

Development of p53-Inducible Phosphatase PPM1D Inhibitors Directed to Specific Regulatory Loops

(p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D の特異的調節ループ指向性阻害剤の開発)

学位論文内容の要旨

p53 依存的に誘導される PPM1D (PP2C δ , Wip1) は、PPM1 ファミリーに属する Ser/Thr ホスファターゼである。PPM1 ファミリーのサブタイプの多くはその触媒ドメイン内に固有のインサート配列を有しており、PPM1D には B-loop と P-loop の特徴的な 2 つのインサート配列が存在する。PPM1D の生理学的機能の詳細は未知の部分が多いが、機能の一つとして活性化した p53 や p38 などの DNA 損傷応答タンパク質の不活性化を介した DNA 損傷応答のネガティブフィードバック制御が報告されている。一方、乳癌を含む多様な癌において PPM1D の過剰発現および遺伝子増幅が報告されており、さらに PPM1D 欠損マウスは腫瘍抵抗性を有することが示されている。以上のことから、PPM1D の過剰発現は、癌化抑制に関わるタンパク質の不活性化をとおして細胞の癌化に関与すると考えられている。このため、PPM1D は抗癌治療の標的タンパク質として注目されており、PPM1D 阻害剤の開発およびその制御機構の解明が強く望まれている。本研究では、PPM1D 特異的ループ領域 B-loop および P-loop 指向性阻害剤の開発を行い、それをとおして両インサート配列を介した PPM1D 制御機構モデルを提案した。

PPM1D 基質において、脱リン酸化標的部位周辺には酸性アミノ酸残基が多く含まれる。PPM1D との高親和性を有する p53 由来リン酸化ペプチド基質 3E に対して、非加水分解性リン酸化セリンミミック体 2-amino-4-phosphonobutyric acid (AP4) を導入した Ac-AP4-3E をデザインした。Ac-AP4-3E は、濃度依存的に PPM1D 活性を阻害した。阻害形式における速度論的解析の結果、興味深いことに Ac-AP4-3E はユニークな不拮抗型阻害剤であることが明らかとなった。また、PPM1D 活性中心近傍に存在する B-loop を PPM1A 相当領域に置換することで塩基性領域を除去した変異体 Sub-B を作製した。この変異体に対して速度論的解析を実施した結果、基質ペプチドに対する親和性が著しく低下することが明らかとなった。これらの結果より、B-loop が基質との相互作用に関与することで PPM1D の基質認識を制御することが示唆された。酸性残基を多く持つ Ac-AP4-3E は、静電相互作用による結合を介して B-loop の作用を制限し、酵素活性を抑制していると考えられる。基質と拮抗しない不拮抗型阻害剤は基質タンパク質が高濃度の条件下でも阻害活性を維持できるため、Ac-AP4-3E は有効な PPM1D 制御因子のリード化合物として期待される。

独自の低分子有機化合物ライブラリーからのスクリーニングによって PPM1D 特異的阻害剤 SPI-001 および SPI-002 を同定した。これら阻害剤は、これまで報告された阻害剤とは全く異なる構造の骨格を有しており、非拮抗型阻害形式を示した。特に、SPI-001 はサブマイクロオーダーの K_i 値を持ち、強力な PPM1D 阻害活性を示した。

SPI-001 は、ヒト癌細胞内においても PPM1D 阻害能を有し、p53 の活性化に必要とされ得る 15 位 Ser 残基の脱リン酸化を顕著に抑制した。さらに、SPI-001 は、PPM1D を過剰発現している乳癌細胞のアポトーシスを誘導し、細胞増殖を抑制することを明らかにした。SPI-001 と SPI-002 のアナログを用いた構造活性相関解析により、特定の配向を持つ 2 つの疎水性部位が PPM1D に対する阻害能に深く関与することが示された。CD スペクトル解析より、SPI-001 が PPM1D の構造変化を誘起することを明らかにした。

P-loop の PPM1A 相当領域への置換により、Pro リッチなループ領域を除去した変異体 Sub-P を作製した。変異体 Sub-P に対する速度論的解析により、P-loop の PPM1D 触媒活性に対する影響を解析した結果、Sub-P の基質ペプチドに対する親和性は野生型 PPM1D と比べ大きく変化しないのに対して、代謝回転数が顕著に低下し、P-loop が PPM1D の触媒活性に関与していることが示唆された。さらに、この変異体に対する SPI-001 の阻害効果を解析した結果、阻害活性が低下し、活性中心の反対側に位置する P-loop が SPI-001 との相互作用に深く関与していることが示された。これらの結果より、P-loop が PPM1D のアロステリック部位として機能していることが示唆された。SPI-001 は、P-loop の作用を制限することによって阻害能を発揮するアロステリック阻害剤であり、より強力かつ特異的に PPM1D 活性を阻害する抗癌剤のリード化合物として期待される。

本研究において、PPM1D の特異的調節ループ指向性 PPM1D 阻害剤を開発した。PPM1 タイプホスファターゼは構造が類似した浅く広い活性中心を持つため、強力かつ選択的な拮抗型 PPM1D 阻害剤の開発は困難であると考えられている。このため、活性中心以外の部位に作用するこれらの阻害剤を母体とすることで、より強力な PPM1D 特異的阻害剤の開発が期待される。

今回開発した PPM1D 阻害剤の活性解析および他の PPM1D に関する知見より、特異的インサート配列 B-loop および P-loop を介した PPM1D 制御モデルを提案した。このモデルにおいて、B-loop は PPM1D 基質との相互作用をとおして PPM1D の基質認識を制御している。さらに、PPM1D の酵素基質複合体形成時に B-loop の構造変化が誘起され、より強力かつ特異的な結合を獲得している。一方、P-loop は PPM1D 触媒活性のアロステリック制御に関与している。P-loop は SH3 ドメインなどを有する結合因子との相互作用、リン酸化などの翻訳後修飾、あるいは P-loop を介したホモ多量体形成をとおして、PPM1D の触媒活性を制御する。また、活性制御に加え、これらの相互作用、修飾や多量体化が、PPM1D の局在の制御に関わっている可能性も示唆される。

以上、本研究において、2 つの PPM1D 特異的ループ領域に対する極めて有効で興味深い PPM1D 阻害剤の開発を実施した。さらに、これらの解析により PPM1D 特異的制御ループの機能解明へと発展させ、B-loop および P-loop による基質認識・触媒活性・局在変化をとおした PPM1D の生理的条件下における機能制御機構モデルを提唱した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	坂口和靖
副査	教授	村上洋太
副査	教授	高岡晃教
副査	教授	谷野圭持

学位論文題名

Development of p53-Inducible Phosphatase PPM1D Inhibitors Directed to Specific Regulatory Loops

(p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D の特異的調節ループ指向性阻害剤の開発)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

p53 依存的に誘導される PPM1D (PP2C δ , Wip1) は、PPM1 ファミリーに属する Ser/Thr ホスファターゼであり、触媒ドメイン内に B-loop と P-loop の特徴的な 2 つのインサート配列を有する。PPM1D 機能の一つとして、p53 や p38 などの細胞周期制御関連タンパク質の不活性化を介した DNA ダメージ応答機構のネガティブフィードバック制御が知られている。また、乳癌を含む多様な癌において PPM1D の過剰発現が報告されており、PPM1D の過剰発現と発癌との関係が示唆されている。このため、癌治療における標的タンパク質として PPM1D は注目されており、PPM1D 阻害剤の開発および PPM1D ホスファターゼ活性の制御機構の解明が強く望まれている。

本研究は、PPM1D 特異的阻害剤の開発および、特異的調節ループを介した活性制御機構の解明を目的としている。筆者は PPM1D 特異的ループ領域 B-loop および P-loop 指向性阻害剤の開発と、両ループ領域を介した PPM1D 制御機構モデルを提案している。

本論文は 4 章より構成されている。

第 1 章では、PPM1D の構造、機能制御に関連した現在までに報告された研究について総括している。さらに、本研究の目的を示しその重要性を述べている。

第 2 章では、p53 リン酸化ペプチド由来の高親和性 PPM1D 基質に非加水分解性リン酸化セリンミミック体を導入することで、PPM1D ペプチド性阻害剤 Ac-AP4-3E を開発した。さらに Ac-AP4-3E はユニークな不拮抗型の阻害形式を有することを明らかにした。また、PPM1D 活性中心近傍に存在する塩基性領域 B-loop を除去することで、基質ペプチドに

対する親和性が著しく低下し、B-loop が PPM1D の基質認識に深く関与することを示した。以上の結果より、酸性残基密度の高い Ac-AP4-3E は、静電相互作用を介して B-loop の作用を制限し、酵素活性を抑制していることを示唆した。

第 3 章では、独自化合物ライブラリーのスクリーニングにより、ユニークな骨格構造を有する非拮抗型 PPM1D 特異的阻害剤 SPI-001 および SPI-002 を同定した。特に、SPI-001 は、PPM1D に対し高い阻害能と選択性を有しており、ヒト癌細胞内においても PPM1D を阻害することが示された。SPI-001 は、PPM1D を過剰発現している乳癌細胞の増殖抑制能を有しており、抗癌剤のリード化合物として非常に興味深い。加えて、SPI-001 の構造活性相関解析により、2 つの疎水性基の立体的配向が PPM1D に対する阻害能に深く関与することを見出した。また、CD スペクトル解析より、SPI-001 が PPM1D の構造変化を誘起することを明らかにした。さらに、Pro 残基に富むループ領域 P-loop の置換は、基質ペプチドに対する親和性には影響を与えないが、代謝回転数を顕著に低下させることを明らかにした。また、P-loop 置換は SPI-001 の阻害活性も低下させ、P-loop が SPI-001 との相互作用に関与していることが示された。これらの結果は、P-loop が PPM1D の触媒活性に関与していることを強く示唆している。

第 4 章では、本研究で開発した PPM1D 阻害剤を母体とした、より強力な阻害剤開発のための戦略を示した。さらに、筆者は特異的ループ領域 B-loop および P-loop を介した PPM1D 制御モデルを提案した。このモデルにおいて、B-loop は PPM1D の基質認識を制御しており、基質結合後の B-loop を含む領域の構造変化により、PPM1D は強力かつ特異的な基質認識機構を獲得している可能性を見出した。一方、P-loop は PPM1D の触媒活性の制御に関与しており、PPM1D 結合因子との相互作用やホモ多量体形成、P-loop 領域の翻訳後修飾が PPM1D 特異的調節ループを介して生体内において PPM1D の機能を制御している可能性を提唱した。

本論文は、PPM1D の特異的調節ループ指向性 PPM1D 阻害剤の開発に関してまとめたものであり、PPM1D 特異的制御ループ B-loop および P-loop による機能制御機構モデルを世界に先駆けて提唱している。現在 PPM1D 阻害剤は抗癌剤のリード化合物として期待されているが、PPM1 タイプホスファターゼの活性中心構造の特徴から、強力かつ選択的な拮抗型 PPM1D 阻害剤の開発は困難であると考えられている。このため、活性中心以外の部位に作用する、これらの阻害剤および PPM1D 特異的調節ループに関する知見は、より強力な PPM1D 特異的阻害剤の開発ならびに PPM1D の制御機構の解明に貢献するところ大なるものがある。

よって、審査員一同は、申請者が北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと判定した。