

細胞増殖に対する
脱リン酸化酵素の役割とその意義

山口大学大学院共同獣医学研究科

花木駿介

2024年3月

目次

第1章 諸言	1
第2章 PP1 制御サブユニット NIPP1 は DNA 損傷後に E2F1 標的遺伝子の転写を制御する	5
第1節 背景および目的	6
2-1-1 H3-Thr ¹¹ のリン酸化制御機構	6
2-1-2 H3-pThr ¹¹ の脱リン酸化機構	7
2-1-3 NIPP1	7
2-1-4 本研究の目的	8
第2節 実験結果	9
2-2-1 NIPP1 は DNA 損傷による H3-pThr ¹¹ の脱リン酸化を抑制する	9
2-2-2 NIPP1 の欠失により E2F 標的遺伝子の発現が低下し、増殖が抑制される	16
2-2-3 PKA を介した NIPP1 のリン酸化は、UV による PP1 γ と NIPP1 の解離に重要である	28
2-2-4 DNA 損傷により、NIPP1 の E2F1 標的遺伝子プロモーター領域に対する結合は減少する	40
2-2-5 NIPP1 の発現量は複数のがん細胞で増加している	43

第3節 考察.....	45
2-3-1 DNA 損傷応答における PKA の活性化	47
2-3-2 PP1 と DNA 損傷応答.....	47
2-3-3 NIPP1 の機能.....	48
2-3-4 NIPP1 と PP1 の相互作用の変化	49
2-3-5 NIPP1 と増殖機構.....	49
第4節 小括.....	51
第3章 カルシニューリンによる NFAT の脱リン酸化は Skp2 を介した分解か ら保護する.....	52
第1節 背景および目的	53
3-1-1 NFAT の役割と制御機構	53
3-1-2 カルシニューリンの役割.....	54
3-1-3 本研究の目的	55
第2節 実験結果.....	56
3-2-1 カルシニューリンの阻害は NFAT タンパク質を減少させる	56
3-2-2 カルシニューリンは NFAT タンパク質の安定性に必要である.....	60
3-2-3 カルシウム濃度は NFAT のタンパク質発現を制御する	63

3-2-4 カルシニューリン阻害によって誘導される NFAT 分解は Skp2 に 依存する.....	66
第 3 節 考察.....	70
3-3-1 不安定化に関与する NFAT のリン酸化部位	72
3-3-2 カルシウム濃度と NFAT の安定性.....	73
3-3-3 カルシニューリン阻害と NFAT タンパク質	74
第 4 節 小括.....	75
第 4 章 総括.....	76
第 5 章 実験方法.....	81
5-1 細胞培養および UV 照射.....	82
5-2 薬剤.....	82
5-3 一過性トランスフェクション	83
5-4 変異導入.....	83
5-5 レンチウイルスの作製と感染.....	84
5-6 細胞周期の解析	85
5-7 クロマチン免疫沈降	86
5-8 siRNA トランスフェクションによるノックダウン.....	87
5-9 CRISPR/Cas9 を介した遺伝子の欠失.....	88

5-10	ウエスタンブロット	89
5-11	細胞画分.....	91
5-12	免疫沈降.....	91
5-13	<i>in vitro</i> 脱リン酸化アッセイ	92
5-14	RT-qPCR	92
5-15	候補遺伝子の選定	93
5-16	バイオインフォマティクス解析.....	94
5-17	臨床がん患者における NIPP1 および E2F1 の発現量解析	95
5-18	ChIP-Atlas データベース解析.....	96
5-19	相関係数解析	96
5-20	統計解析.....	97
	引用文献.....	99
	謝辞	111

第 1 章 諸言

タンパク質リン酸化酵素と脱リン酸化酵素は、リン酸化状態の制御を介して、酵素活性、相互作用、細胞内局在、安定性などを変化させ、タンパク質の機能を制御する役割を持つ。この機能は、細胞内のシグナル伝達機構を制御するために不可欠であり、細胞増殖、分化、代謝制御など多様な生命現象に必須である。タンパク質のリン酸化はがん化をはじめとした様々な疾患に関与している。がんにおいては、タンパク質のリン酸化状態の異常を呈しており、リン酸化酵素の多くは、ヒトのがんの発生や進行に関係していることから (1)、阻害剤の臨床応用が進められている (2)。また脱リン酸化酵素に着目した阻害剤の開発も進められている (2)。

タンパク質のリン酸化のうち、約 98%はセリンおよびスレオニン残基に修飾されることが知られている (3)。セリンおよびスレオニンを脱リン酸化する酵素は、phosphoprotein phosphatases (PPP)、metal-dependent protein phosphatases (PPM)、Haloacid dehalogenase phosphatases (HAD) からなる 3つのスーパーファミリー分類される (4)。その中でも、PPPには、protein phosphatase 1 (PP1)、PP2A、PP3 (PP2B、カルシニューリン [CaN])、PP4、PP5、PP6、PP7 の 7種が分類されている。

PP1は細胞や組織に遍在し、全リン酸化タンパク質の3分の1の脱リン酸化を担っている (5)。PP1はPP1相互作用タンパク質 (PP1-interacting

proteins : PIPs) と呼ばれる多種多様な制御サブユニットと結合する。PIPs は 200 種類以上知られており、標的化サブユニット、基質特異化因子、基質、阻害因子として作用する (6)。このことから、PP1 は制御サブユニットの局在や発現によって標的を変化させ、DNA 損傷応答 (7)、細胞分裂 (8,9)、グリコーゲン代謝 (10,11)、胚発生 (12) など多種多様なシグナル伝達経路に関与している。がん細胞における PP1 の役割は複雑であり、がんの種類や、相互作用する PIPs によって多様な影響を及ぼす (13)。クロマチン上における核内 PIPs 結合領域の解析から、核内 PIPs の結合領域には重複が少ないことが明らかになっている (14)。この結果は、クロマチン上における PP1 の機能は PIPs によってリクルートされる遺伝子領域に依存している可能性を示唆しており、特定の遺伝子領域における PP1 と PIPs の複合体の機能を個別に明らかにする必要がある。PP1 のアイソフォームの一つである PP1 γ はヒストンを脱リン酸化することで細胞増殖因子の転写を制御することが知られており (15)、ヒストンの脱リン酸化に関与する PIPs の同定はヒストン修飾を介した転写制御の分子基盤の解明につながると考えられる。カルシニューリンは、カルシウムによって直接活性化される特徴的な脱リン酸化酵素であり、免疫 (16)、腎臓 (17)、神経系 (18)、心臓血管系および骨格筋 (19) などの様々な組織における発達プロセスに必要である。カルシニューリンはがんの悪性化に関与することから、がん促

進因子として働くと考えられている (20)。特に、主要な標的の 1 つである nuclear factor of activated T-cells (NFAT) を介した経路の活性化が多くのがんで報告されている (21)。カルシニューリンによる NFAT の活性化は、脱リン酸化に伴う核局在化シグナルの露出、すなわち核内移行の促進によって説明されるが、NFAT の脱リン酸化がタンパク質の安定化や相互作用分子の変化に影響するか不明である。カルシニューリンによる NFAT の活性化が、タンパク質安定化や相互作用分子の変化によっても制御されていることが明らかになれば、カルシニューリン-NFAT 経路を阻害する新たなアプローチが可能になる。このため、カルシニューリン-NFAT 経路に関するさらなる研究が必要である。

そこで、本研究では、脱リン酸化酵素 PP1 γ およびカルシニューリンに着目し、細胞増殖関連シグナル伝達において、これらの分子が持つ役割を解明することを目的とした。第 2 章では、PP1 制御サブユニットである NIPP1 が、E2F transcription factor 1 (E2F1) 標的遺伝子のプロモーター領域において、PP1 γ が持つ H3-pThr¹¹ に対する脱リン酸化活性を阻害することで、E2F1 標的遺伝子の転写を促進していることを明らかにした。第 3 章では、カルシニューリンが NFAT の脱リン酸化することで、NFAT を S-phase kinase associated protein 2 (Skp2) による分解から保護していることを明らかにした。

第2章 PP1 制御サブユニット NIPP1 は DNA 損傷後に E2F1 標的遺伝子の転写を制御する

第 1 節 背景および目的

2-1-1 H3-Thr¹¹ のリン酸化制御機構

ヒストンの翻訳後修飾は、遺伝子発現を制御する主要なメカニズムである。ヒストンの翻訳後修飾の中でも、リン酸化、アセチル化、メチル化は最も代表的なヒストンの翻訳後修飾である。特に、ヒストンのリン酸化は、転写の活性化、有糸分裂、DNA 損傷応答に際して誘起されることが知られている (22)。加えて、ヒストンのアセチル化はリン酸化によって促進され、リン酸化と協調的な役割を有し、転写の活性化に関与している。E2F1 は細胞周期関連遺伝子の発現を促進する転写因子である。E2F1 の標的となる cyclin-dependent kinase (Cdk) などのプロモーター領域では、ヒストン H3 の 11 番目のスレオニン (H3-Thr¹¹) は checkpoint kinase 1 (Chk1) によってリン酸化されている (23)。ヒストンアセチルトランスフェラーゼである general control non-depressible 5 (GCN5) は H3-Thr¹¹ のリン酸化を認識することで、ヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3-Lys⁹) をアセチル化し、細胞周期関連遺伝子の転写を活性化する。DNA 損傷時には、ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) が活性化し、Chk1 をリン酸化することにより、Chk1 がクロマチンから解離し、H3-Thr¹¹ のリン酸化は減少する。

2-1-2 H3-pThr¹¹の脱リン酸化機構

H3-pThr¹¹の脱リン酸化はPP1 γ によって行われることが知られている(15)。一般に、PP1活性はcyclin-dependent kinase 1 (Cdk1)を介したリン酸化と、制御サブユニットとの結合によって制御されている(24)。細胞周期が進行している状態では、E2F1により転写されたCdk1が、PP1 γ の311番目のスレオニン(PP1 γ -Thr³¹¹)をリン酸化し、PP1 γ の活性を阻害してH3-Thr¹¹のリン酸化を維持している。DNA損傷時には、ATRによってリン酸化されたChk1が、Cdksをリン酸化し不活性化する。これによりPP1 γ 活性が増強され、H3-pThr¹¹の脱リン酸化が促進する。その結果、E2F1標的遺伝子の発現は減少し、細胞周期の進行が抑制される。一方で、DNA損傷時におけるH3-pThr¹¹に対するPP1 γ の活性が増強されるメカニズムは不明である。

2-1-3 NIPP1

Nuclear inhibitor of protein phosphatase 1 (NIPP1)は、スプライシングや転写などの重要な細胞内プロセスに関与しており、PP1との相互作用を介してその機能を発揮している(25,26)。実際、NIPP1は、PP1の強力な阻害因子として発見され、核内におけるPP1の主要な相互作用分子であることが知られている(27)。NIPP1とPP1の相互作用はリン酸化によって制御されている。NIPP1は、protein kinase A (PKA)によって199番目のセリン(Ser¹⁹⁹)、casein kinase 2 (CK2)によって204番目のセリン(Ser²⁰⁴)、Proto-oncogene

tyrosine-protein kinase Src によって 335 番目のチロシン (Tyr³³⁵) がリン酸化され、これらのリン酸化により NIPP1 と PP1 の結合は減少することが知られている (28-31)。

2-1-4 本研究の目的

本研究では、PIPs に対しアノテーションされている Gene Ontology (GO) term に着目したスクリーニングを実施し、PP1 γ が制御するヒストン H3-pThr¹¹ の脱リン酸化に関与する PP1 制御サブユニットを同定し、制御サブユニットが PP1 γ を介して H3-Thr¹¹ のリン酸化を制御する詳細なメカニズムを解明することを目的とした。

第2節 実験結果

2-2-1 NIPP1 は DNA 損傷による H3-pThr¹¹ の脱リン酸化を抑制する

最初に、PP1 γ を介した H3-pThr¹¹ の脱リン酸化を評価することにより、転写制御に関与する制御サブユニットを探索した。上述したように、PP1 の酵素活性は制御サブユニットとの結合によって制御されている (25)。200 近くの既知の PIPs (5) から H3-pThr¹¹ の脱リン酸化に関与する可能性のある PIPs を選択するために、以下の 3 つの GO term のカテゴリーに注目した。ヒストンが核に存在することから、核に存在すること (GO:0005634-nucleus)。転写に関与すること (GO:0006351-transcription, DNA-templated)。PP1 活性の調節に関与すること (GO:0043085-positive regulation of catalytic activity、GO:0043086-negative regulation of catalytic activity、GO:0010923-negative regulation of phosphatase activity および GO:0032516-positive regulation of phosphoprotein phosphatase activity)。これらの GO term がアノテーションされている遺伝子として、*PPP1R8* (NIPP1、nuclear inhibitor of PP1)、*PPP1R10* (PNUTS、phosphatase 1 nuclear targeting subunit)、*URI1* (unconventional prefoldin RPB5 interactor 1) の 3 つを同定した (図 1A)。重要なことに、NIPP1 と PNUTS も DNA 損傷応答に関与していることが報告さ

れている (32,33)。そこで、この 2 つの分子に着目し、H3-pThr¹¹ の脱リン酸化に関する PP1 γ への影響を検討した。

PP1 γ 依存的な H3-pThr¹¹ の脱リン酸化に NIPP1 または PNUTS が関与しているかどうかを検討するために、まず NIPP1 と PNUTS がクロマチンに局在しているかどうかを検討した。両者はクロマチンおよび可溶性画分に検出された (図 1B)。他の PP1 制御サブユニットである myosin phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1) および Inhibitor-2 (I-2) は主に可溶性画分に検出された (図 1B)。UV 照射後、クロマチン結合型 NIPP1 は減少し、可溶性画分の NIPP1 は増加したことから、DNA 損傷により NIPP1 がクロマチンから可溶性画分に移行したことが示唆された (図 1B)。次に、myc-his タグ付き PNUTS を過剰発現させたが、H3-pThr¹¹ には影響を及ぼさなかった (図 1C)。一方で、野生型 (WT) の NIPP1 (C 末に myc-his タグまたは N 末に FLAG タグを付加) を過剰発現させると、DNA 損傷時に H3-pThr¹¹ の増加が認められた (図 1D)。C 末端を切断した NIPP1 (NIPP1- Δ C) は、PP1 の阻害因子として機能する C 末端の 22 個のアミノ酸を欠損している (27)。NIPP1-WT の過剰発現は DNA 損傷に伴う H3-pThr¹¹ の脱リン酸化を阻害したが、NIPP1- Δ C 過剰発現では H3-pThr¹¹ が脱リン酸化された (図 1D)。加えて、PP1 γ と結合しない NIPP1 変異体 (NIPP1-RATA: 201 番目のバリンと 203 番目のフェニルアラニ

ンをアラニンへ変異させた変異体)を過剰発現させて、H3-pThr¹¹に対する影響を検討した。その結果、NIPP1-RATAはDNA損傷によるH3-pThr¹¹の脱リン酸化を抑制しなかった(図1D)。このことから、NIPP1過剰発現によるPP1 γ の脱リン酸化の阻害効果は、PP1 γ への結合に依存していることが明らかになった。逆に、siRNAによるNIPP1のノックダウンは、DNA損傷がない場合でもH3-Thr¹¹のリン酸化を減少させた(図1E)。一方で、PNUTSをノックダウンした場合は、H3-Thr¹¹のリン酸化は減少しなかった。PP1 γ に対するNIPP1の阻害的役割と一致し、NIPP1のノックダウンは、H3-Thr¹¹のリン酸化を減少させたことから、NIPP1ノックダウン細胞ではPP1 γ が活性化していることが示唆された。さらに、PP1 γ -WTもしくはT311をアラニンに置換した変異体(T311A)を用いて*in vitro*脱リン酸化アッセイを行った。PP1 γ -Thr³¹¹におけるリン酸化はPP1 γ の活性を阻害することが報告されており(15)、PP1 γ -T311A変異体は活性化型となる。その結果、NIPP1がH3-pThr¹¹に対するPP1 γ の脱リン酸化活性を抑制することを明らかにした(図1F)。さらに、NIPP1のクロマチン結合量とCDK1やCCNB1などのE2F1標的遺伝子の発現は、UV照射後4時間と24時間で相関していた(図1G)。これらの結果から、PP1 γ 活性はDNA損傷に応答して、少なくともCdk依存的なPP1 γ -

Thr³¹¹でのリン酸化 (15) および NIPP1 との結合、2つの異なるメカニズムによって制御されていることが示唆された。

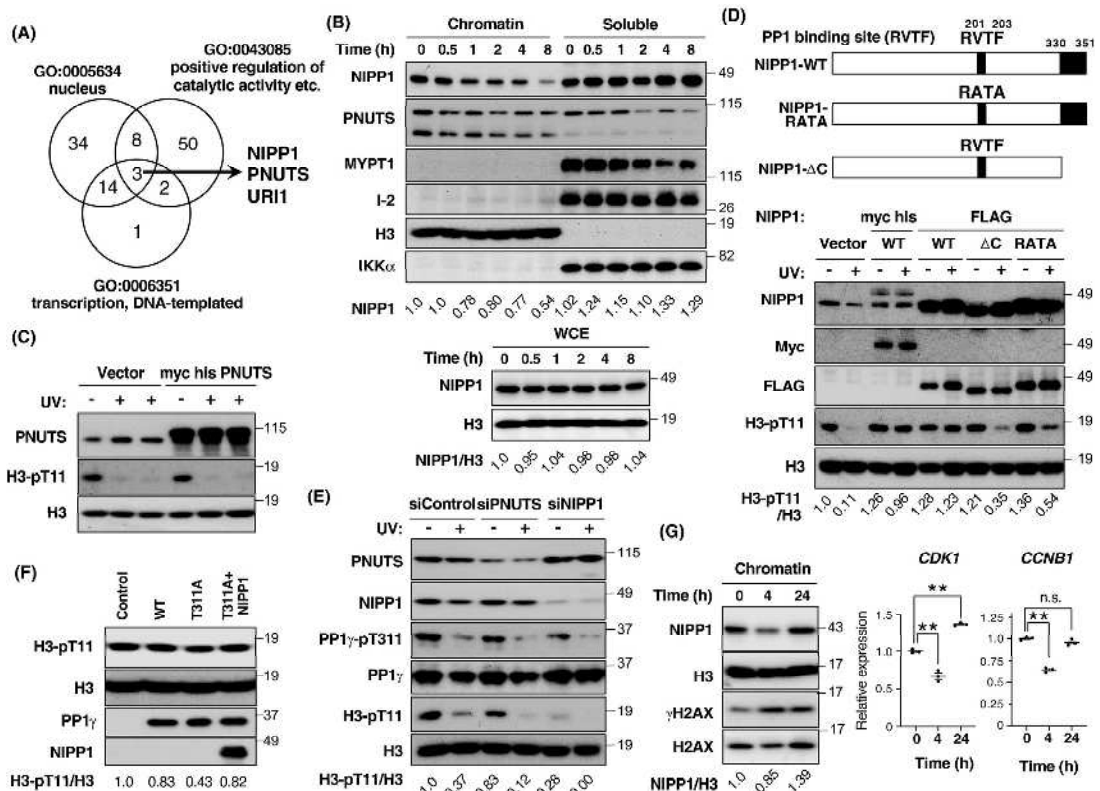


図1 NIPP1はPP1 γ のH3-pThr¹¹に対する脱リン酸化活性を阻害する。

(A) ベン図を用いて、nucleus (GO:0005634)、transcription, DNA-templated (GO:0006351) および PP1 の酵素活性調節、の GO term を持つ PIPs の個数を示した。PP1 の酵素活調節に関する GO term は positive regulation of catalytic activity (GO:0043085)、negative regulation of catalytic activity (GO:0043086)、negative regulation of phosphatase activity (GO:0010923) および positive regulation of phosphoprotein phosphatase activity (GO:0032516) を含んでいる。

(B) HCT116 細胞を 100 J/m^2 の UV を照射し、指示された時間に採取した。クロマチン画分、可溶性画分、全細胞抽出液 (WCE) に対し、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。可溶性画分またはクロマチン画分のマーカーとして、それぞれ i-kappa-b kinase α (IKK α) と H3 を用いた。クロマチンおよび可溶性画分上の NIPP1 の相対バンド強度は、WCE の NIPP1 で正規化した。

(C) HCT116 細胞に対し、空ベクターまたは myc-his-PNUTS を発現するベクターをトランスフェクションした。48 時間後、 100 J/m^2 の UV を照射し、その 2 時間後に細胞を回収した。クロマチン画分に対し、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(D) (上) NIPP1-RATA および NIPP1- Δ C 変異体のドメイン構造を示す図。

NIPP1 は RVTF 配列からなる PP1 結合モチーフを持つ。(下) HCT116 細胞に対し、空ベクター、NIPP1-WT、NIPP1 各変異体を発現するベクターをトランスフェクションした。48 時間後、 100 J/m^2 の UV を照射し、その 2 時間後に細胞を回収した。クロマチン画分に対し、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(E) HCT116 細胞に control、PNUTS、NIPP1 に対する siRNA をトランスフェクションした。70 時間後、 100 J/m^2 の UV を照射し、その 2 時間後に細胞を

回収した。クロマチン画分に対し、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(F) 精製した PP1 γ と精製した NIPP1 を用いて *in vitro* 脱リン酸化アッセイを行った。PP1 γ -WT、PP1 γ -T311A、または his-NIPP1 とプレインキュベートした PP1 γ -T311A を、クロマチンとインキュベートした。その後、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(G) (左) HCT116 細胞を 25 J/m² の UV を照射し、示した時間に細胞を回収した。クロマチン画分に対し、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。クロマチン画分のマーカーとして H3 を用いた。(右) HCT116 細胞を 25 J/m² の UV を照射し、示した時間に細胞を回収した。その後、RT-qPCR を行い *CDK1* と *CCNB1* の発現を解析した。データは平均値 ± 標準誤差で示した ($n = 3$)。One-way ANOVA を用いて検定を行った後、0h に対し Dunnett's multiple comparison test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

2-2-2 NIPP1 の欠失により E2F 標的遺伝子の発現が低下し、増殖が抑制される

転写と細胞増殖に対する NIPP1 の生理的な役割を検討するために、CRISPR/Cas9 を介した DNA 二本鎖切断によって NIPP1 を欠失させた HeLa 細胞を作製し、シングルセルクローニングを行い、細胞を樹立した。NIPP1 を欠失させた HCT116 細胞は増殖が極めて悪かったため、NIPP1 を欠失した HeLa 細胞を解析に用いた。NIPP1 欠失細胞は、CRISPR/Cas9 による DNA 二本鎖切断の結果、*PPP1R8* 遺伝子の single-guide RNA (sgRNA) 標的部位において、塩基の挿入および欠失によるフレームシフトが起こっていた (図 2)。ウエスタンブロットにより、NIPP1 タンパク質がほとんど検出されないことを確認した (図 3A)。NIPP1 欠失細胞では E2F1 標的遺伝子の発現の低下が確認された (図 3B)。加えて、NIPP1 欠失細胞は、Control 細胞と比較して増殖能の低下を示した (図 3C)。Propidium iodide (PI) 染色に加え、EdU の取り込みを標識し細胞周期プロファイルを解析した。この解析により、NIPP1 欠失細胞では細胞周期の S 期にある細胞集団が減少し、G2/M 期にある細胞集団が増加していることが明らかになった (図 3D)。同様に、CRISPR/Cas9 を用いて NIPP1 を欠失させた HEK293T 細胞を作製した (図 4)。この時、2 つの異なる配列を sgRNA 標的の標的として用いた。その結果、これらの細胞も NIPP1 の

欠失によって増殖が抑制された (図 5A)。同様に、HeLa 細胞と HCT116 細胞において、shRNA を介した NIPP1 のノックダウンを行った。NIPP1 のノックダウンは、Control 細胞と比較して、細胞増殖を抑制した (図 5B、C)。これらの結果は、NIPP1 が細胞増殖に必要であることを示している。

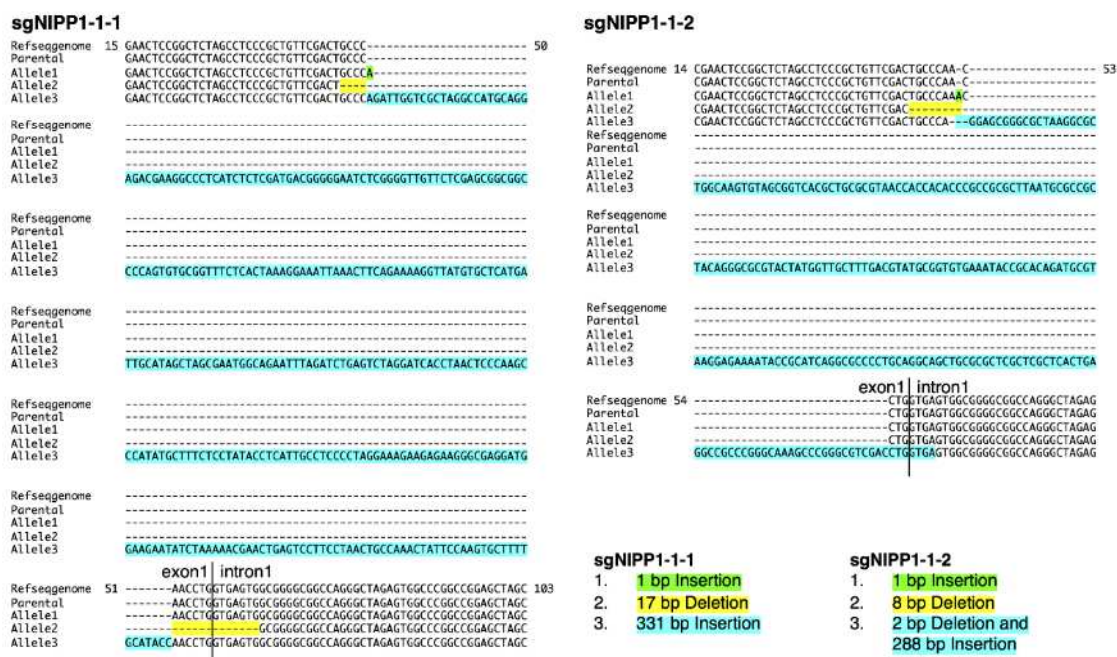


図2 HeLa 細胞における NIPP1 のシーケンス解析。

NIPP1 遺伝子の塩基配列を確認したところ、HeLa-sgNIPP1-1-1 には 3 つの対立遺伝子においてそれぞれ 1bp の挿入、17bp の欠失、331bp の挿入が、HeLa-sgNIPP1-1-2 には 3 つの対立遺伝子においてそれぞれ exon1 に 1bp の挿入、8bp の欠失、2bp の欠失、288bp の挿入が認められた。Refseqgenome における数字はヒト NIPP1 (アクセッション番号：NM_014110.5) の開始コドンからのヌクレオチドの位置を示す。

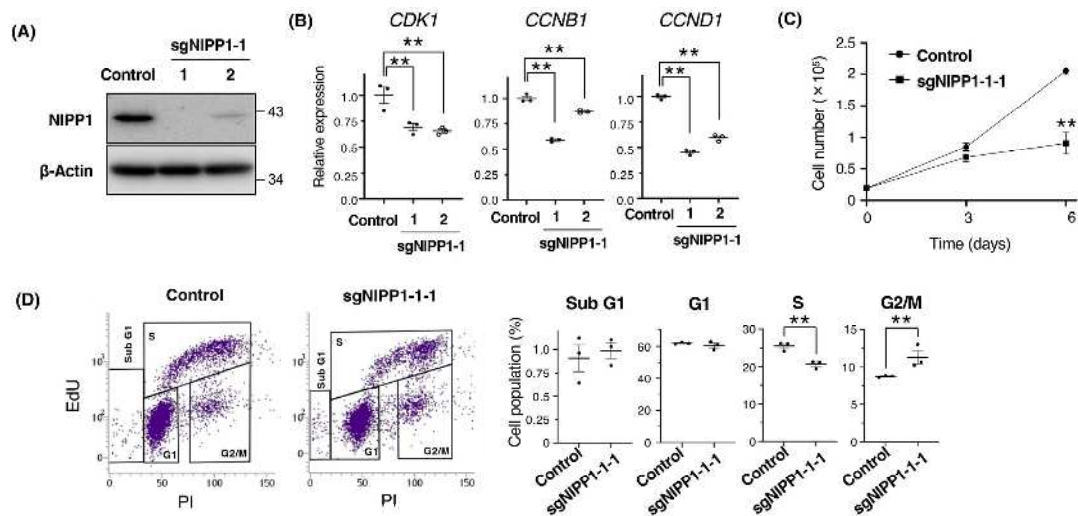


図3 NIPP1 は E2F1 標的遺伝子の転写に必要である。

(A) Control 細胞および NIPP1 欠失 HeLa 細胞に対し、示した抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

(B) Control 細胞および NIPP1 欠失 HeLa 細胞に対し RT-qPCR を行い *CDK1*、*CCNB1*、*CCND1* の発現を解析した。データは平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 3$)。One-way ANOVA を用いて検定を行った後、Control に対し Dunnett's multiple comparison test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

(C) Control 細胞および NIPP1 欠失 HeLa 細胞を播種し、示した日時に回収し、細胞数をカウントした。データは平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 3$)。

Control と比較し、両側 Student's *t*-test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

(D) Control 細胞および NIPP1 欠失 HeLa 細胞の細胞周期分布を、FACS により解析した。各細胞は EdU および PI で染色した。細胞周期の各フェーズにあ

る細胞の割合を計測した。データは平均値±標準誤差で示した ($n = 3$)。

Control と比較し、両側 Student's t -test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

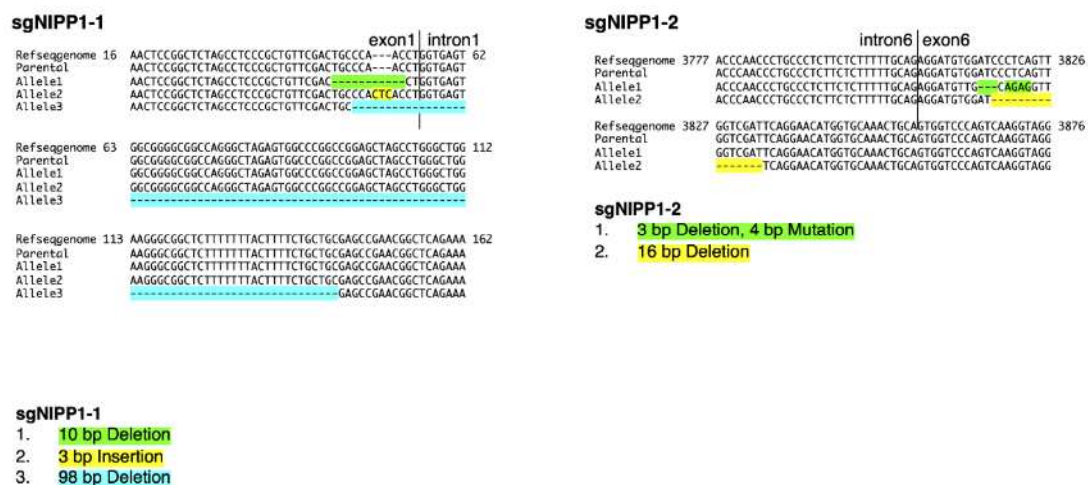


図4 HEK293T細胞におけるNIPP1のシーケンス解析。

NIPP1 遺伝子の塩基配列を確認した結果、HEK293T-sgNIPP1-1 は3つの対立遺伝子においてそれぞれ exon1 に10bpの欠失、3bpの挿入、98bpの欠失を、HEK293T-sgNIPP1-2 は2つの対立遺伝子においてそれぞれ exon6 に3bpの欠失、4bpの変異、16bpの欠失が含まれていた。Refseqgenomeにおける数字はヒトNIPP1 (アクセッション番号: NM_014110.5) の開始コドンからのヌクレオチドの位置を示す。

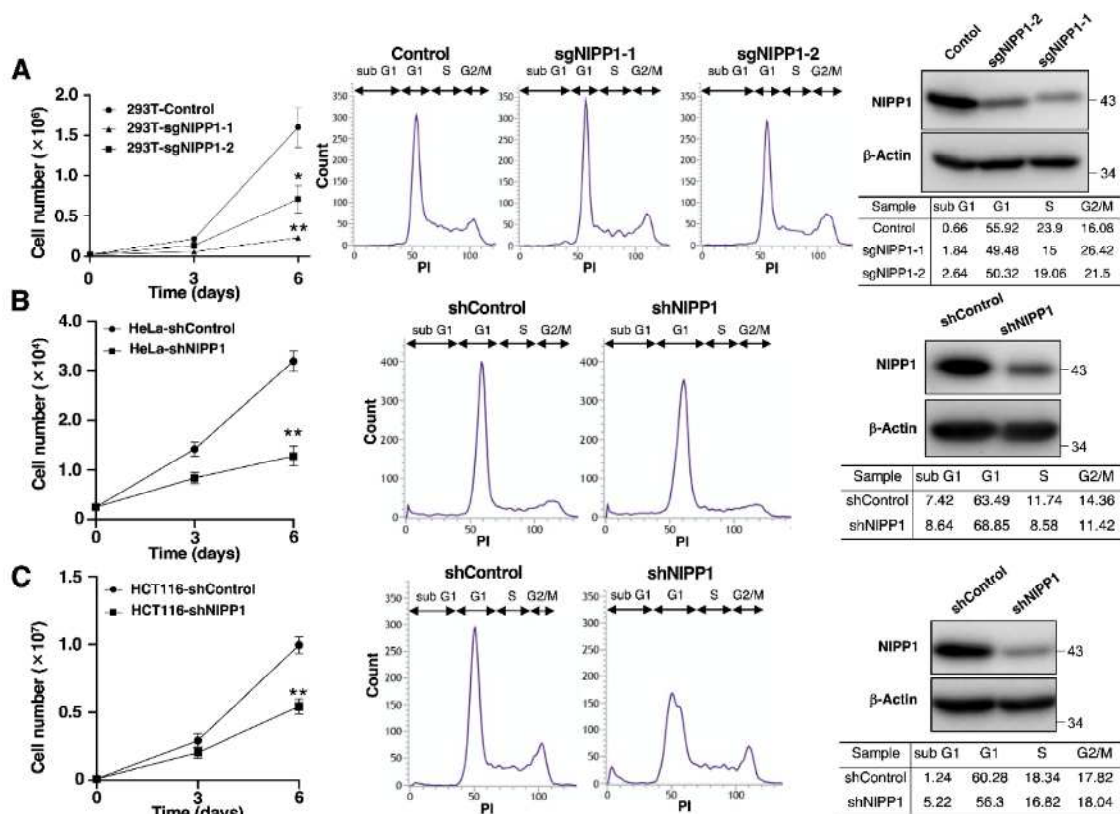


図5 NIPP1 欠失細胞の増殖曲線と細胞周期分布。

(A) Control 細胞および NIPP1 欠失 HEK293T 細胞を培養し、細胞数のカウント (左)、FACS 解析 (中)、ウエスタンブロット (右) を行った。細胞数のカウントに関しては、One-way ANOVA を用いて検定を行った後、Control に対し Dunnett's multiple comparison test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

(B、C) shControl または shNIPP1 を発現する HeLa 細胞 (B) または HCT116 細胞 (C) を Dox 存在下で指示された日数培養し、細胞数をカウントした (左)。Control と比較し、両側 Student's t -test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p <$

0.01)。データは平均値±標準誤差で示した ($n = 3$)。加えて、Dox 添加 4 日後に細胞を回収し、FACS 解析 (中) およびウエスタンブロット (右) を行った。

さらに、公共データベース上の精巢特異的に NIPP1 をノックアウトしたマウスの精巢を用いた RNA-seq データを用いて gene set enrichment analysis (GSEA) を行ったところ (34)、NIPP1 のノックアウトにより、E2F および MYC 標的遺伝子群の発現が有意に減少するところが明らかになった (図 6A、B)。E2F 転写因子には 9 つのメンバーがあり、E2F1 は G1/S 進行を活性化するマスターレギュレーターとして働く。NIPP1 が E2F1 標的遺伝子を制御しているかどうかを検討するため、E2F 標的遺伝子 (35) のうち特に TSS への結合が強い遺伝子セット (ChIP-Atlas にて結合スコア>750) を作製し、NIPP1 をノックアウトしたマウス精巢の RNA-seq データを用いて GSEA を行った (34)。その結果、NIPP1 のノックアウトにより、E2F1 結合遺伝子の発現が有意に減少していることが確認された (図 6C)。これらの結果は、NIPP1 が PP1 γ 活性の阻害を介して E2F1 標的遺伝子の発現に重要であるという考えを支持している。

一般に、E2F 標的遺伝子はその機能によって主に細胞周期 (G1、G1/S、S/G2)、DNA synthesis and replication、negative regulators of the cell cycle、checkpoint、DNA damage repair、apoptosis、development、differentiation に細分される (35)。そこで、TCGA Pan-Cancer データセットを用いて、NIPP1 の mRNA 発現と、分類された E2F 標的遺伝子の mRNA 発現

の相関値を計算した。その結果、G1/S、S/G2、DNA synthesis and replication に属する E2F 標的遺伝子と NIPP1 の発現の相関係数は 0.3~0.4 と正の相関の値を示した。一方で、G1、apoptosis、development、differentiation に属する E2F 標的遺伝子の発現は、NIPP1 の発現とあまり相関しないことが分かった (図 6D)。これらの結果から、特に G1/S、S/G2、DNA synthesis and replication に分類される E2F 標的遺伝子は、NIPP1 によって制御されている可能性が示唆された。さらに、NIPP1 の発現量と E2F1 の代表的な標的遺伝子との相関係数を算出した。その結果、*AURKB*、*CDK1*、*CCNB1*、*PCNA*、*MCM2* といった細胞周期制御に寄与する E2F 標的遺伝子の発現量は高い相関を示した (図 6E)。加えて、E2F 標的遺伝子とそれ以外の遺伝子との相関係数を算出した結果、NIPP1 の発現は E2F 標的遺伝子の発現と有意に高い相関係数を示した (図 6F)。これらの結果から、NIPP1 の発現は、細胞周期に関与する E2F 標的遺伝子の転写と関連していることが示唆された。

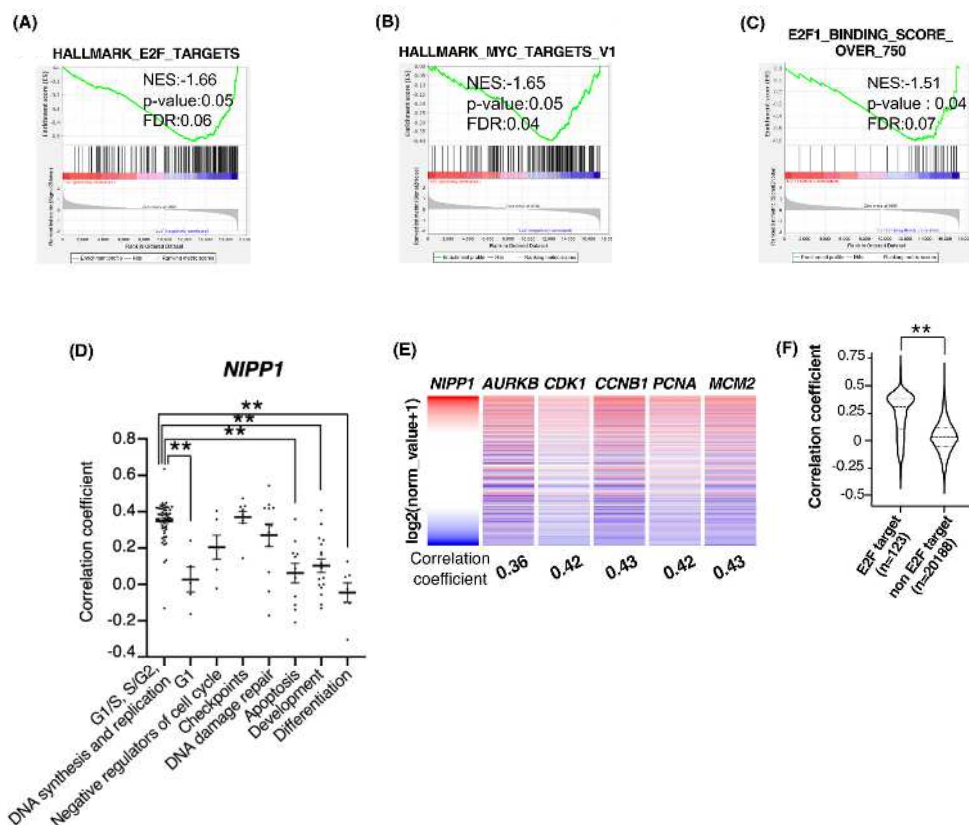


図6 NIPP1の発現は細胞周期に関連するE2F標的遺伝子の発現と相関する。(A、B) NIPP1-WTと比較したNIPP1をノックアウトしたマウス精巣におけるHALLMARK_E2F_TARGETS (A) およびHALLMARK_MYC_TARGETS_V1 (B)のenrichment plotを、GSEA softwareを用いて作製した ($n=4$)。NES: normalized enrichment score、FDR: false discovery rate。(C) NIPP1-WTと比較したNIPP1をノックアウトしたマウス精巣におけるE2F1_BINDING_SCORE_OVER_750のenrichment plotを、GSEA softwareを用いて作製した ($n=4$)。E2F1_BINDING_SCORE_OVER_750 gene setはE2F target genes (35)の中で、E2F1 binding scoreが750より大きいもの49遺伝子を選出した。NES: normalized enrichment score、FDR: false discovery rate。

(D) TCGA Pan-Cancer データセット ($n = 1060$) における NIPP1 と E2F 標的遺伝子との間のピアソンの相関係数を University of California at Santa Cruz (UCSC) Xena を用いて計算した。横軸は E2F 標的遺伝子を遺伝子機能別にグループ化したもの。データは平均値 ± 標準誤差で示した。One-way ANOVA を用いて検定を行った後、細胞周期関連の遺伝子群 (左端) に対し Dunnett's multiple comparison test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

(E) UCSC Xena を用いて、TCGA Pan-Cancer データセット ($n = 11060$) における NIPP1 と E2F 標的遺伝子との間のピアソンの相関係数を算出し、ヒートマップを作製した。

(F) UCSC Xena を用いて、TCGA Pan-Cancer データセット ($n = 11060$) における NIPP1 と E2F 標的遺伝子 ($n = 123$) または非 E2F 標的遺伝子 ($n = 20188$) の相関係数の Violin plot を作製し、両側 Welch's t -test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

2-2-3 PKA を介した NIPP1 のリン酸化は、UV による PP1 γ と NIPP1 の解離に重要である

PP1 γ は NIPP1 によって負に制御されているので、PP1 γ -NIPP1 複合体の安定性が DNA 損傷によって影響を受けるか検証した。NIPP1 は UV 照射によりクロマチンから可溶性画分へと移動した (図 1B)。そのため、クロマチン画分を精製し、UV 未照射細胞と照射細胞で PP1 γ の免疫沈降を行った。その結果、照射細胞では NIPP1 と PP1 γ の相互作用が徐々に減少することがわかった (図 7A)。これらの結果から、DNA 損傷後に PP1 γ が NIPP1 から解離し、PP1 γ が活性化されることが示唆された。

NIPP1 と PP1 γ の結合が解離する分子メカニズムを解明するために、PKA および CK2 による NIPP1 のリン酸化によって、NIPP1 による PP1 の阻害機能が抑制されることを示した研究に注目した (31)。同報告では、PKA によるリン酸化部位 (Ser¹⁹⁹) と CK2 によるリン酸化部位 (Ser²⁰⁴) が、NIPP1 の RVxF モチーフを挟んでいることも見いだした (図 7B)。この先行研究に基づき、PKA または CK2 が NIPP1 と PP1 γ との相互作用を制御しているかどうか検討した。PKA 特異的阻害剤である H89、CK2 特異的阻害剤である TBB を用いたところ、H89 が DNA 損傷後における PP1 γ と NIPP1 の解離を阻害した (図

7C)。このことから、PKA が NIPP1 と PP1 γ の相互作用を制御していることが示唆された。

NIPP1 は PKA によって Ser¹⁷⁸ と Ser¹⁹⁹ の 2 つ部位がリン酸化される (31)。HCT116 細胞に、NIPP1-WT、Ser¹⁷⁸ をアラニンに置換した変異体 (S178A)、または Ser¹⁹⁹ をアラニンに置換した変異体 (S199A) を発現する FLAG タグ付き NIPP1 をトランスフェクションし、UV を照射した。FLAG タグ付き NIPP1 を免疫沈降し、FLAG または PP1 γ でウエスタンブロットを行った。その結果、DNA 損傷に伴う NIPP1-S199A の PP1 γ への結合は、NIPP1-WT よりも有意に高いことが明らかになった (図 7D)。これらの結果は、PKA を介した NIPP1 の PP1 結合モチーフに隣接する Ser¹⁹⁹ でのリン酸化が、UV による DNA 損傷に応答した NIPP1 と PP1 γ の解離に必要であることを示している。PP1 γ -Thr³¹¹ におけるリン酸化は PP1 γ の活性を阻害することから (15)、PP1 γ -Thr³¹¹ リン酸化が PP1 γ と NIPP1 の結合に影響を与えるかどうかを検討した。しかし、PP1 γ -T311A は PP1 γ -WT と比較して、NIPP1 との相互作用には影響せず (図 7E)、PP1 γ -Thr³¹¹ におけるリン酸化は NIPP1 との結合に影響しないことが示された。

図 7F に示すように、NIPP1-S199A 発現は、NIPP1-WT と比較して、H3-Thr¹¹ のリン酸化を促進したことから、NIPP1-S199A は、NIPP1-WT よりも

H3-pThr¹¹ に対する PP1 γ 活性をより効果的に阻害したことが示された。これらの結果から、PKA を介した UV による NIPP1-Ser¹⁹⁹ でのリン酸化が、NIPP1 の PP1 γ からの解離に寄与し、PP1 γ の活性化につながったことが示唆された。

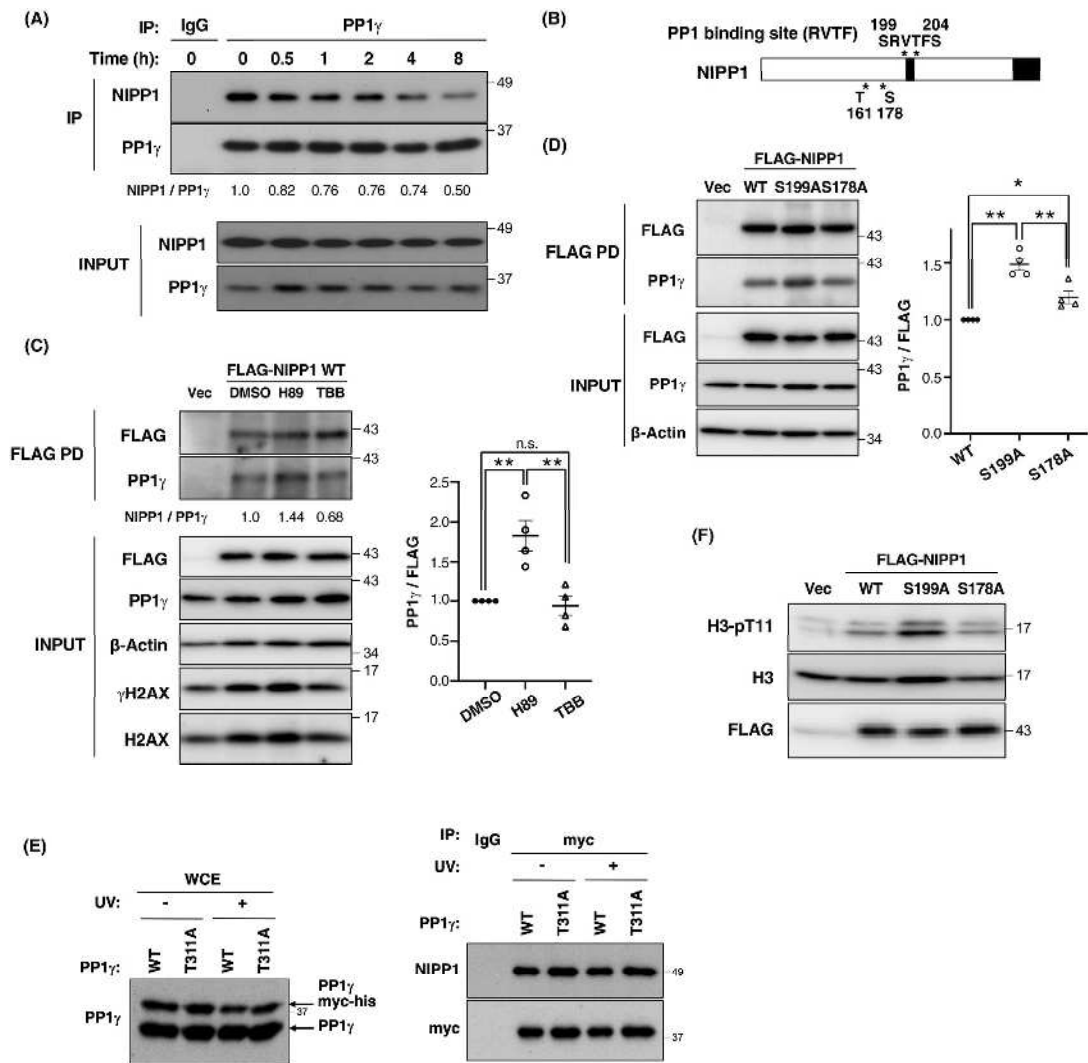


図7 NIPP1 のリン酸化は PP1 γ との解離に重要である

(A) HCT116 細胞に対し、100 J/m² の UV を照射し、示した時間培養した後に細胞を回収した。クロマチン画分を可溶化し PP1 γ で免疫沈降を行い、示した抗体を用いてウェスタンブロットを行った。IgG はネガティブコントロールとして用いた。

(B) NIPP1 のドメイン構造と PKA および CK2 によるリン酸化部位を示す。

NIPP1 は RVTF 配列からなる PP1 結合モチーフを持つ。

(C) HCT116 細胞を TBB (50 μ M) または H89 (40 μ M) で処置し、100 J/m² の UV を照射した。4 時間後、細胞を回収し、クロマチン画分を可溶化し、FLAG M2 アガロースでプルダウンした。その後、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。データは平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 4$)。One-way ANOVA を用いて検定を行った後、Tukey multiple comparison test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

(D) HCT116 細胞に NIPP1-WT、NIPP1-S178A、または NIPP1-S199A をトランスフェクションした。回収した細胞を可溶化し、FLAG M2 アガロースで免疫沈降した。その後、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。データは平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 4$)。One-way ANOVA を用いて検定を行った後、Tukey multiple comparison test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

(E) HCT116 細胞に、myc-his タグ付き PP1 γ -WT または T311A 変異体を発現するベクターをトランスフェクションした。48 時間後、100 J/m² の UV を照射し、その 2 時間後に細胞を回収した。WCE および myc タグで免疫沈降を行っ

たサンプルに対し、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。IgG はネガティブコントロールとして用いた。

(F) HCT116 細胞に NIPP1-WT、NIPP1-S178A、または NIPP1-S199A をトランスフェクションした。回収した細胞に対し、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

PKA の活性が UV 照射によって制御されるかどうか検討するために、活性化型 PKA の指標である Thr¹⁹⁷ におけるリン酸化状態を検証した (36)。その結果、UV 照射により Thr¹⁹⁷ におけるリン酸化が増加し、UV 照射が PKA を活性化することが示された (図 8A)。DNA 損傷後に NIPP1 が PKA によってリン酸化されるかどうかを検討するために、NIPP1 を免疫沈降し、PKA のコンセンサスモチーフ、すなわち R-x-x-pS/T を認識する phospho-PKA 基質に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。この抗 phospho-PKA 基質抗体では、shControl 細胞では UV 照射により NIPP1 を検出できたが、PKA のアイソフォームの一つである PKA α をノックダウンした細胞では NIPP1 を検出できなかった (図 8B)。また、TBB 処置はこのリン酸化に影響を与えなかった。これらの結果は、NIPP1 のリン酸化は PKA α によって媒介され、DNA 損傷によって増加することを示している。抗 phospho-PKA 基質抗体が *in vivo* で NIPP1-pSer¹⁹⁹ を検出できることを確認するため、FLAG タグ付き NIPP1-WT または S199A を発現させ、UV 照射を行った。NIPP1-WT ではリン酸化特異的シグナルが検出されたが、NIPP1-S199A では検出されなかったことから、UV 照射により Ser¹⁹⁹ がリン酸化されることが示された (図 8C)。次に、PKA 活性化物質である 8Br-cAMP で細胞を処置し、PKA による NIPP1 のリン酸化状態を検討した。その結果、8Br-cAMP 処置により、PKA コンセンサス部位での

NIPP1 のリン酸化が増加することがわかった (図 8D)。また、重要なことに、DNA 損傷がない場合でも、8Br-cAMP による PKA の活性化によって、NIPP1 と PP1 γ の結合が解離した (図 8D)。これらの結果から、PKA による NIPP1 のリン酸化が、NIPP1 と PP1 γ の相互作用を負に制御していることが示唆された。

PKA が E2F 標的遺伝子の発現に関与しているかどうかを明らかにするために、公共データベース上の H89 で処置したマウス 3T3 細胞の RNA-seq データを解析した (37)。H89 処置細胞では、Control 細胞と比較して E2F 標的遺伝子の発現が増加しており、PKA が E2F 標的遺伝子を負に制御している可能性が示された (図 8E)。また、E2F1 結合遺伝子が H89 処置細胞で有意に増加した (図 8F)。さらに、PKA (PKA 触媒サブユニット ; *PRKACA* および *PRKACB*) と、各カテゴリーに分類された E2F 標的遺伝子の発現との相関係数を算出した。*PRKACA* と E2F 標的遺伝子との間に有意差は見られなかった。*PRKACB* においては、G1/S、S/G2、DNA synthesis and replication に分類された遺伝子群は、G1、negative regulators of the cell cycle、development に分類された遺伝子群と比較して負の相関を示した (図 8G、H)。これらの結果は、PKA が NIPP1 の上流で機能し、E2F 標的遺伝子の発現に影響を与えていることを

示唆しており、それには NIPP1 のリン酸化を介している可能性が高いと考えられる。

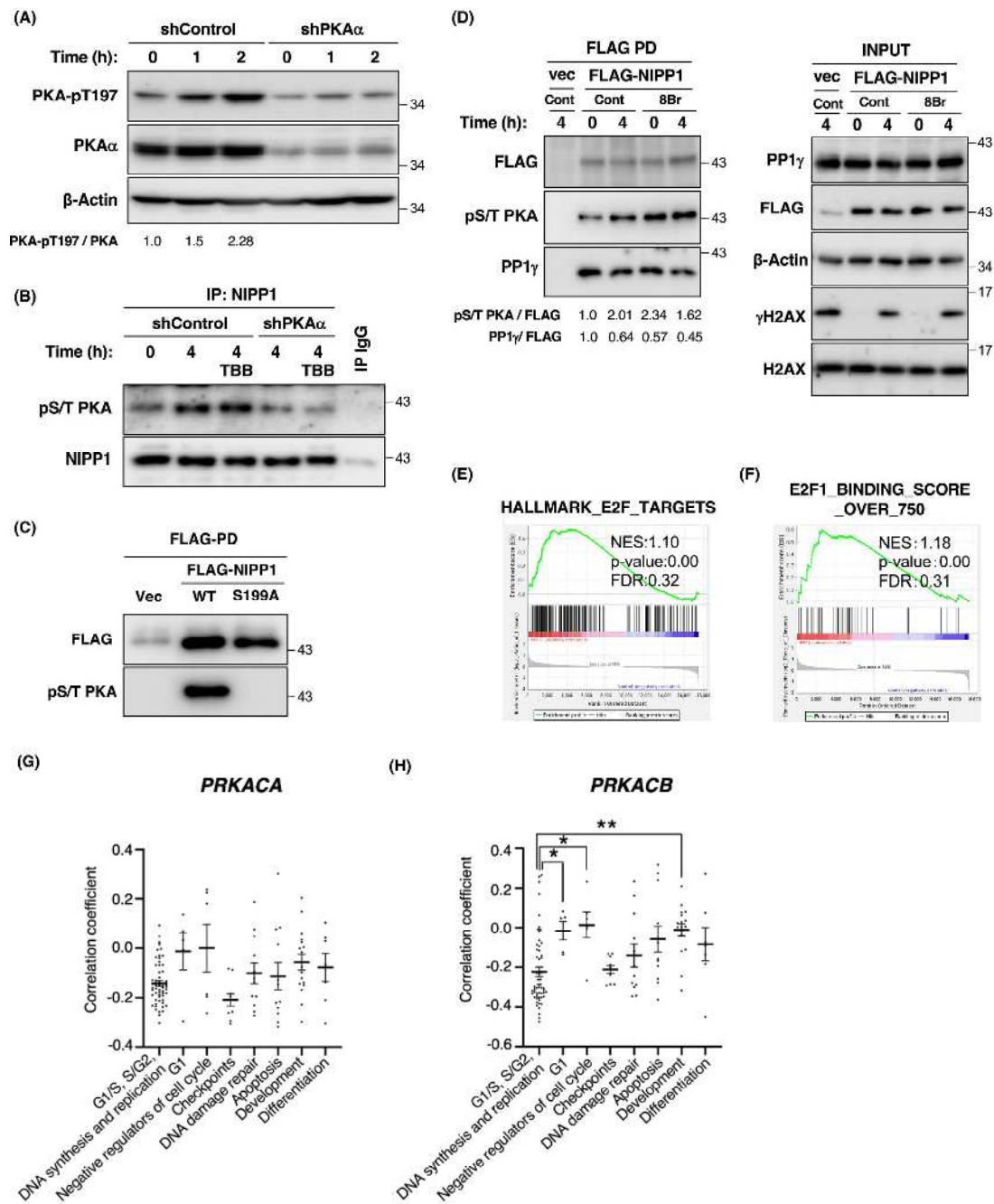


図8 PKAはNIPP1とPP1 γ の相互作用を制御している。

(A) shControlまたはshPKA α を発現するHCT116細胞をDox存在下で3日間培養し、100J/m²のUVを照射した。示した時間培養した後に細胞を回収し、示した抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

(B) shControl または shPKA α を発現する HCT116 細胞を Dox 存在下で 3 日間培養し、TBB (50 μ M) で処置し、100 J/m² の UV を照射した。4 時間後、細胞を回収し、NIPP1 を WCE から免疫沈降させ、示した抗体を用いてウェスタンブロットを行った。IgG はネガティブコントロールとして用いた。

(C) HCT116 細胞に NIPP1-WT または NIPP1-S199A をトランスフェクションし、2 日間培養した。100 J/m² の UV を照射し、その 2 時間後に細胞を回収した。FLAG M2 アガロースで免疫沈降した。その後、示した抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

(D) HCT116 細胞に対し FLAG-NIPP1 をトランスフェクションし、2 日間培養した。8Br-cAMP (500 μ M) で 2 時間処置し、UV を照射した。4 時間後、回収した細胞を可溶化し、FLAG M2 アガロースで免疫沈降した。その後、示した抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

(E) H89 で 3 時間処置したマウス 3T3 細胞における HALLMARK_E2F_TARGETS の enrichment plot を、未処置の 3T3 細胞と比較して、GSEA software を用いて作製した ($n = 2$)。NES : normalized enrichment score、FDR : false discovery rate。

(F) H89 で 3 時間処置したマウス 3T3 細胞における E2F1_BINDING_SCORE_OVER_750 の enrichment plot を、未処置の 3T3 細胞と比較して GSEA

software で作製した ($n = 2$)。NES : normalized enrichment score、FDR : false discovery rate。

(G、H) TCGA Pan-Cancer データセット ($n = 11060$) における *PRKACA* (G)、*PRKACB* (H) と E2F 標的遺伝子との間のピアソンの相関係数を UCSC Xena を用いて計算した。横軸は E2F 標的遺伝子を遺伝子機能別にグループ化したもの。データは平均値 ± 標準誤差で示した。One-way ANOVA を用いて検定を行った後、細胞周期関連の遺伝子群 (左端) に対し Dunnett's multiple comparison test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

2-2-4 DNA 損傷により、NIPP1 の E2F1 標的遺伝子プロモーター領域に対する結合は減少する

CDK1 や *CCNB1* などの E2F1 標的遺伝子は、DNA 損傷時に Chk1 依存的に転写が抑制される (23)。そこで、DNA 損傷時に E2F1 標的遺伝子のプロモーター領域における PP1 γ や NIPP1 の存在量が変化するかどうかを検討した。しかしながら、標的遺伝子プロモーターにおける E2F タンパク質の占有率は細胞周期中に変化することが知られており (38-40)、これは E2F 制御遺伝子が S 期に転写活性を示すという考え方と一致している (41)。そこで、HCT116 細胞を S 期初期に同期させ、DNA 損傷を与えた。その後、クロマチン免疫沈降を行い、*CDK1* および *CCNB1* 遺伝子内の E2F 結合部位を挟むプライマーを用いて RT-qPCR 解析を行った。*CDK1* および *CCNB1* 遺伝子のプロモーター領域から、Chk1 が遊離し、同時に H3-Thr¹¹ のリン酸化が減少したことは既報の通りであった (図 9) (23)。これらのプロモーター領域における PP1 γ の結合は DNA 損傷前後で顕著に変化しなかったが、NIPP1 の結合は有意に減少することが明らかになった。図 1 の結果から、PP1 γ の活性は NIPP1 と解離することにより活性化されると考えられ、*CDK1* および *CCNB1* 遺伝子のプロモーター領域では UV 照射後 PP1 γ が活性化されることが示唆される (図 9)。これらの知見から、DNA 損傷によって E2F1 標的遺伝子の転写が抑制されるのは、遺

伝子プロモーターから Chk1 が解離し H3-Thr¹¹ のリン酸化が抑制されること、
加えて NIPP1 が PP1 γ と解離することで PP1 γ が活性化され、H3-pThr¹¹ の
脱リン酸化が促進されるためであることが明らかになった。

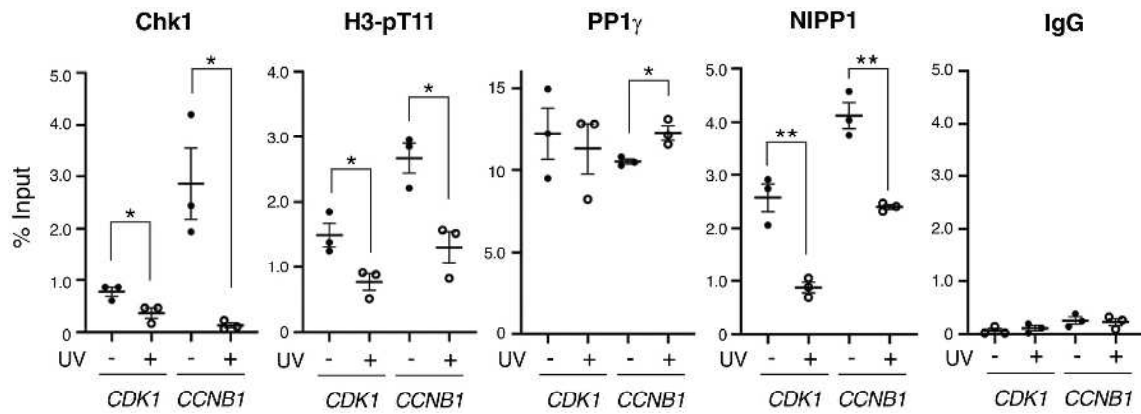


図9 *CDK1* および *CCNB1* のプロモーター領域におけるプロモーター占有率の変化。

クロマチン免疫沈降は、S 期初期で同期化した HCT116 細胞を用いて行った。

結果は、総インプットクロマチンに対するパーセンテージで表した。データは

平均値 ± 標準誤差で示した ($n = 3$)。UV (-) と比較し、両側 Student's *t*-test

を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

2-2-5 NIPP1 の発現量は複数のがん細胞で増加している

E2F 経路はがんにおいて頻繁に調節異常を起こしていることから、NIPP1 の発現とがんととの相関を評価した。TCGA データベースを用いて、腫瘍組織 (Cancer) と隣接する非腫瘍組織 (Tissue) を比較し、NIPP1 の遺伝子発現の変化を検討した。その結果、NIPP1 は結腸腺がん (COAD)、食道がん (ESCA)、肺腺がん (LUAD)、肺扁平上皮がん (LUSC)、胃腺がん (STAD) で有意に過剰発現していることが明らかになった (図 10)。これらの結果は、NIPP1 がこれらのがんにおいて E2F1 標的遺伝子の発現を活性化し、細胞増殖を促進している可能性を示唆している。

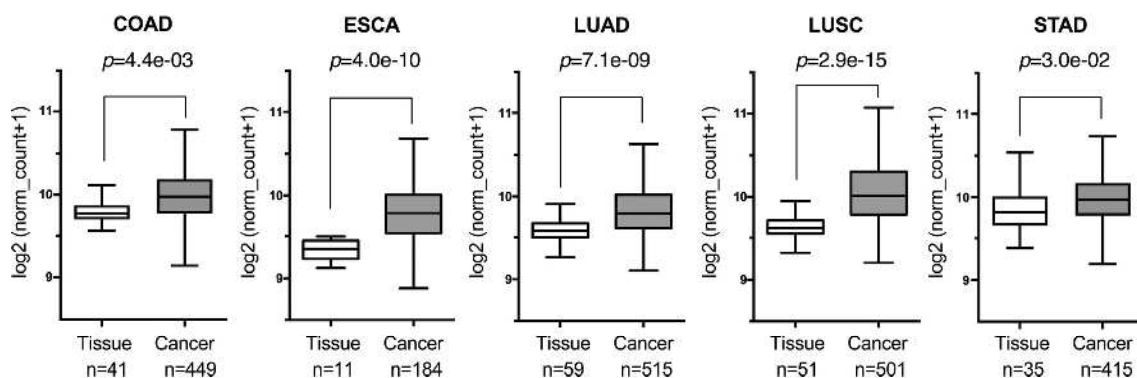


図 10 NIPP1 はいくつかのがんで発現が上昇している。

TCGA の各がん種のデータセットの正常固形組織と原発腫瘍における NIPP1 mRNA 発現量を UCSC Xena から取得した。中央値を用いて fold-change を計算し、発現上昇率が高い上位 5 つのがん種のデータを示した。箱ひげ図では、中央の線は中央値を表し、箱の境界線はプロットされたデータの四分位範囲を表す。ひげは四分位範囲の 1.5 倍を示しており、外れ値は示していない。

Tissue と比較し、両側 Welch's *t*-test を行った。

第3節 考察

本研究では、DNA 損傷時に H3-pThr¹¹ の脱リン酸化を介して転写抑制を制御する複雑なシグナル伝達経路が明らかになった (図 11)。増殖中の細胞では、*CDK1* と *CCNB1* 遺伝子のプロモーター領域において、PP1 γ は NIPP1 と複合体を形成しているため、H3-pThr¹¹ に対する脱リン酸化活性を示さない。このため、主に Chk1 によって媒介される H3-Thr¹¹ のリン酸化が維持され、E2F1 標的遺伝子の転写活性化が可能になる。DNA 損傷時には、これらの遺伝子プロモーター領域における PP1 γ の結合量は変化しないが、Cdk1 活性の低下により PP1 γ -Thr³¹¹ のリン酸化が減少する結果、PP1 γ が活性化される。PP1 γ -NIPP1 複合体の解離も PP1 γ の活性化に関与する。そして、活性化された PP1 γ は H3-pThr¹¹ を脱リン酸化し、E2F1 標的遺伝子の転写抑制につながる。また、PP1 γ -pThr³¹¹ の脱リン酸化は PP1 γ -NIPP1 の解離には関与しないことから、Cdk1 による PP1 γ のリン酸化は NIPP1 との結合には影響しないことが示された。

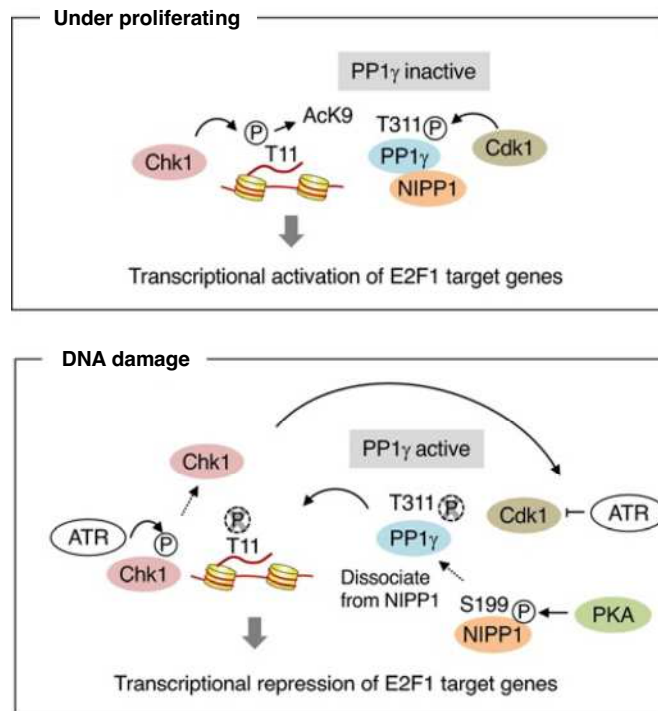


図 11 DNA 損傷による E2F 標的遺伝子の転写抑制の模式図。
 正常な状態では、Chk1 は H3-Thr¹¹ をリン酸化し、H3-Lys⁹ のアセチル化を誘導し、E2F1 標的遺伝子の転写活性化につながる。PP1 γ は、Cdk 依存的な Thr³¹¹ におけるリン酸化と NIPP1 との結合の両方を介して不活性化されている。DNA 損傷にตอบสนองして、ATR 依存的な Chk1 のクロマチンからの遊離が間接的に Cdk 活性を抑制し、その結果、PP1 γ -Thr³¹¹ のリン酸化の減少を介して PP1 γ が活性化される。また、PP1 γ と NIPP1 の解離は PKA による NIPP1 のリン酸化によって媒介される。活性化された PP1 γ は、E2F1 から遊離した Chk1 と協同して H3-pThr¹¹ を脱リン酸化し、最終的に *CDK1* や *CCNB1* など細胞周期に関与する遺伝子の転写抑制をもたらす。

2-3-1 DNA 損傷応答における PKA の活性化

複数の先行研究から、NIPP1 と PP1 の結合は、PKA 依存的な Ser¹⁷⁸ と Ser¹⁹⁹ のリン酸化と、CK2 依存的な Thr¹⁶¹ と Ser²⁰⁴ のリン酸化によって制御されていることが明らかになっている (28,30)。PKA と CK2 によるこれら 4 つの残基の複合的なリン酸化によって NIPP1 が PP1 から解離し、それによって PP1 が活性化される (28,30,31)。また、本研究では、DNA 損傷が PKA を活性化させることも見いだした。これは、UV 照射が melanocortin-1 receptor (MC1R) を活性化させることで、adenylate cyclase を活性化し、結果として PKA が活性化するという以前の報告と一致している (42)。DNA 損傷により、PKA を介した NIPP1 の Ser¹⁹⁹ でのリン酸化が増加し、PP1 γ と NIPP1 の解離が引き起こされた。NIPP1 からの解離後、PP1 γ は Thr³¹¹ を自己脱リン酸化し、最終的に PP1 γ は完全に活性化された状態となる。従って、本研究は、DNA 損傷に対する細胞応答において、PKA、NIPP1、PP1 γ をつなぐ新たな経路を明らかにした。

2-3-2 PP1 と DNA 損傷応答

PP1 は、脱リン酸化活性と基質選択性を決定する様々な PIPs と結合し、セリン・スレオニンの脱リン酸化反応を触媒する。いくつかの PIPs が細胞周期や DNA 損傷応答における PP1 活性の制御に関与していることが報告されてい

る。例えば、recruits PP1 onto mitotic chromatin at anaphase protein (Repo-Man) は有糸分裂期のヒストン H3 に対する PP1 の制御因子であるが、H3-pThr¹¹ は PP1-Repo-Man 複合体の直接的な基質とは考えにくい (43)。PP1 を阻害する I-2 は、DNA 損傷時に ATM によって Ser⁴⁴ でリン酸化され、PP1-I-2 複合体が解離し、PP1 の活性化につながる (44)。さらに、PNUTS と PP1 は、DNA 依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニットである DNA-PKcs のリン酸化を調整することによって、DNA の二本鎖切断を促進することが報告されている (45)。

2-3-3 NIPP1 の機能

200 の PIPs の中で、H3-pThr¹¹ の PP1 γ の制御因子として NIPP1 を同定した。NIPP1 はもともと、RVxF モチーフでの相互作用を通して PP1 と結合する強力で特異的な阻害因子として同定された (30)。NIPP1 は、スプライシング因子である cell division cycle 5-like protein (CDC5L) や spliceosome-associated protein 155 (SAP155) と相互作用することで、スプライソソーム形成に必要な pre-mRNA スプライシングに関与していることが示唆されている (46,47)。さらに、NIPP1 は polycomb repressive complex 2 (PRC2) タンパク質である enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2) や embryonic ectoderm development (EED) との相互作用を通して、転写抑制因子として働いている

(48,49)。Forkhead-Associated (FHA) ドメインは、DNA 損傷応答や細胞増殖など数多くの生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たすことが示されている。NIPP1 は FHA ドメインを有しており、CDC5L と相互作用することが報告されている (46)。DNA 損傷後の転写制御における FHA ドメインの役割は不明であり、さらなる研究が必要である。

2-3-4 NIPP1 と PP1 の相互作用の変化

PP1 と NIPP1 の相互作用の変化は、生理学的に様々な反応をもたらす。例えば、熱ショックなどの細胞ストレスに応答すると、PP1 は NIPP1 から解離し、PP1 の活性化を引き起こす。活性化された PP1 は次に SRp38 を脱リン酸化し、pre-mRNA のスプライシングを制御する (50)。また、低酸素状態では、細胞内の酸化的リン酸化が減少するため ATP が低下する (51)。ATP の低下により cAMP が減少し PKA のキナーゼ活性の低下とそれに続く NIPP1 のリン酸化が減少する。その結果、NIPP1 と PP1 γ との結合が増加することで、PP1 γ の活性が阻害される (52)。

2-3-5 NIPP1 と増殖機構

公共データベース上の NIPP1 をノックアウトしたマウス精巣における RNA シーケンスデータを解析した (34)。NIPP1 をノックアウトした精巣で観察さ

れた細胞周期関連遺伝子の発現低下と一致して、E2F と MYC の標的遺伝子の発現が抑制されていることが明らかになった。E2F 転写因子は 9 つのメンバーから構成され、その機能的特徴に基づいて、転写の活性化因子 (E2F1-3a) と抑制因子 (E2F3b-8) の 2 つのグループに細分化される。本研究の結果から、NIPP1 は PP1 γ の阻害を介して、E2F1 標的遺伝子の転写を活性化する能力によって、細胞周期の進行に寄与している可能性が高いことが示唆された。

重要なことに、NIPP1 をノックアウトしたマウスは胚形成開始時に胚致死となり、NIPP1 ノックダウン細胞も増殖異常を示した (53,54)。これらの結果は、NIPP1 が胚発生と細胞増殖に必須であることを示している。さらに、精巣における NIPP1 のノックアウトは、精原細胞および減数分裂初期の精細胞の増殖低下とアポトーシスの増加をもたらすことが以前に報告されている (34)。私たちのモデルは、NIPP1 の欠損が G1/S の進行を阻害する可能性を示唆している報告と一致している (54)。

これらの結果と一致して、NIPP1 が COAD、ESCA、LUAD、LUSC、STAD において発現上昇していることも見いだされ、NIPP1 の発現調節異常ががん遺伝子として機能している可能性が示唆された。以上の結果から、E2F1 標的遺伝子の転写を活性化する NIPP1 の役割が明らかになり、NIPP1 ががん治療の創薬ターゲットとなる可能性が示された。

第4節 小括

以上の結果から、NIPP1はPP1 γ と結合することにより、PP1 γ のH3-pThr¹¹に対する脱リン酸化活性を阻害し、細胞増殖を促進していることが明らかになった。本研究は、PP1 γ の増殖に関連するPIPsとしてNIPP1を新たに同定し、PP1 γ とPIPsの関係の理解を深めるものである。加えて、PP1とNIPP1の相互作用は、熱ショックや低酸素などの複数の経路の制御に関与している。したがって、熱ショックや低酸素症後の転写もH3-Thr¹¹のリン酸化によって制御されるかどうかを明らかにするための、今後の研究の基礎的な知見となる。

第3章 カルシニューリンによる NFAT の脱リン酸化は Skp2 を介した分解から保護する

第1節 背景および目的

3-1-1 NFATの役割と制御機構

NFATは5つのメンバーからなる転写因子ファミリーである。NFATc1-NFATc4はカルシウムイオンによって制御され、NFAT5は浸透圧によって制御される。NFATはT細胞で最初に同定されて以来、循環器、神経、骨組織など様々な組織で発現し、それらの発生に重要であることが明らかになっている(55)。NFATc1-NFATc4の転写活性は、カルシウム-カルシニューリン経路によって活性化される。NFATはリン酸化された状態で細胞質に存在する(56)。細胞内カルシウム濃度の上昇により、カルシニューリンが活性化され、NFATの脱リン酸化を引き起こす(57)。脱リン酸化されたNFATは核に移行し、免疫応答関連遺伝子に代表される種々の標的遺伝子の転写を促進する。免疫抑制剤として知られるFK506はカルシニューリンに結合し、その脱リン酸化活性を阻害する(58)。これによりNFATの標的である免疫応答関連遺伝子の転写が抑制され、免疫抑制作用を発揮する。これまでの研究で、がん細胞におけるNFATの役割が明らかになっており、卵巣がん(59,60)、肝臓がん(61)、前立腺がん(62)、リンパ腫(63)、黒色腫(64)、神経膠腫(65)、肺腺がん(66)などで過剰発現が報告されている。加えて、NFATはがん遺伝子である、c-Myc、COX-2、メタロプロテアーゼの転写を促進することにより、増殖と浸

潤・転移を活性化することも報告されている (59,64,65,67-70)。免疫応答やがん細胞の悪性化において NFAT が重要な役割を持っているにもかかわらず、NFAT タンパク質の安定性を制御するメカニズムはよく理解されていない。特に、カルシニューリンが NFAT の安定性に影響を及ぼすかどうかは不明である。

3-1-2 カルシニューリンの役割

カルシニューリンはカルシウム依存性のセリン・スレオニン脱リン酸化酵素であり、その活性は細胞内カルシウム濃度によって調節される。細胞内カルシウム濃度の上昇は、NFAT に代表されるカルシニューリンの標的の脱リン酸化を介して、様々なシグナル伝達経路を調節する (21)。カルシニューリンの過剰発現および過剰な活性化は、神経膠腫 (71)、乳がん (72)、リンパ腫 (73)、大腸がん (74) で同定されており、カルシニューリンががん治療のターゲットになりうることが示唆されている。カルシニューリンはサイクリン D1 (75)、エストロゲン受容体 α (ER α) (72)、c-Myc (76)、上皮成長因子受容体 (EGFR) (77)、c-Jun (78) を標的とし、これらのタンパク質の安定性と細胞増殖の促進をもたらすことが報告されている。

3-1-3 本研究の目的

本研究では、カルシニューリンが NFAT の安定性に重要である可能性を検証し、詳細なメカニズムを解明することを目的とした。

第2節 実験結果

3-2-1 カルシニューリンの阻害は NFAT タンパク質を減少させる

カルシニューリンがタンパク質レベルで NFAT の存在量に影響を及ぼすかどうか検討するため、MCF7 細胞でカルシニューリンをノックダウンした。5 つの NFAT のうち、NFATc4 は MCF7 細胞ではほとんど発現しておらず、NFAT5 はカルシニューリンによって制御されていないため、研究対象から除外した。そこで、NFATc1、NFATc2、NFATc3 のタンパク質発現量を定量したところ、3 つの NFAT すべてのタンパク質発現量が有意に低下していることが観察された (図 12A)。さらに、電気泳動による移動度の低下も観察され、これは NFAT のリン酸化を反映していると考えられる。同様の結果は HT29 細胞でも観察された (図 12B)。HT29 細胞には NFATc1 が発現していないことから、NFATc1 については検討しなかった。さらに、カルシニューリンの阻害剤である FK506 を MCF7 細胞に処置すると、NFATc3 のタンパク質発現量も用量依存的に低下し、これは NFAT タンパク質の電気泳動による移動度の低下と関連していた (図 12C)。次に、カルシニューリン阻害時の NFAT タンパク質の減少が脱リン酸化活性に依存するかどうかを検討した。カルシニューリンをノックダウンした細胞に、N 末に HA タグを付加したカルシニューリン-WT または酵素活性が欠損している H151Q 変異体 (151 番目のヒスチジンをグルタミン

へ変異させた変異体) を発現させた。カルシニューリン-WT を発現させると NFATc3 のタンパク質発現量が回復したが、H151Q 酵素活性変異体では NFATc3 のタンパク質発現量は回復しなかった (図 12D)。同様の結果は HCT116 細胞でも観察された (図 12E)。これらの結果は、カルシニューリンの脱リン酸化酵素活性が NFAT タンパク質の発現に必要であることを示唆している。

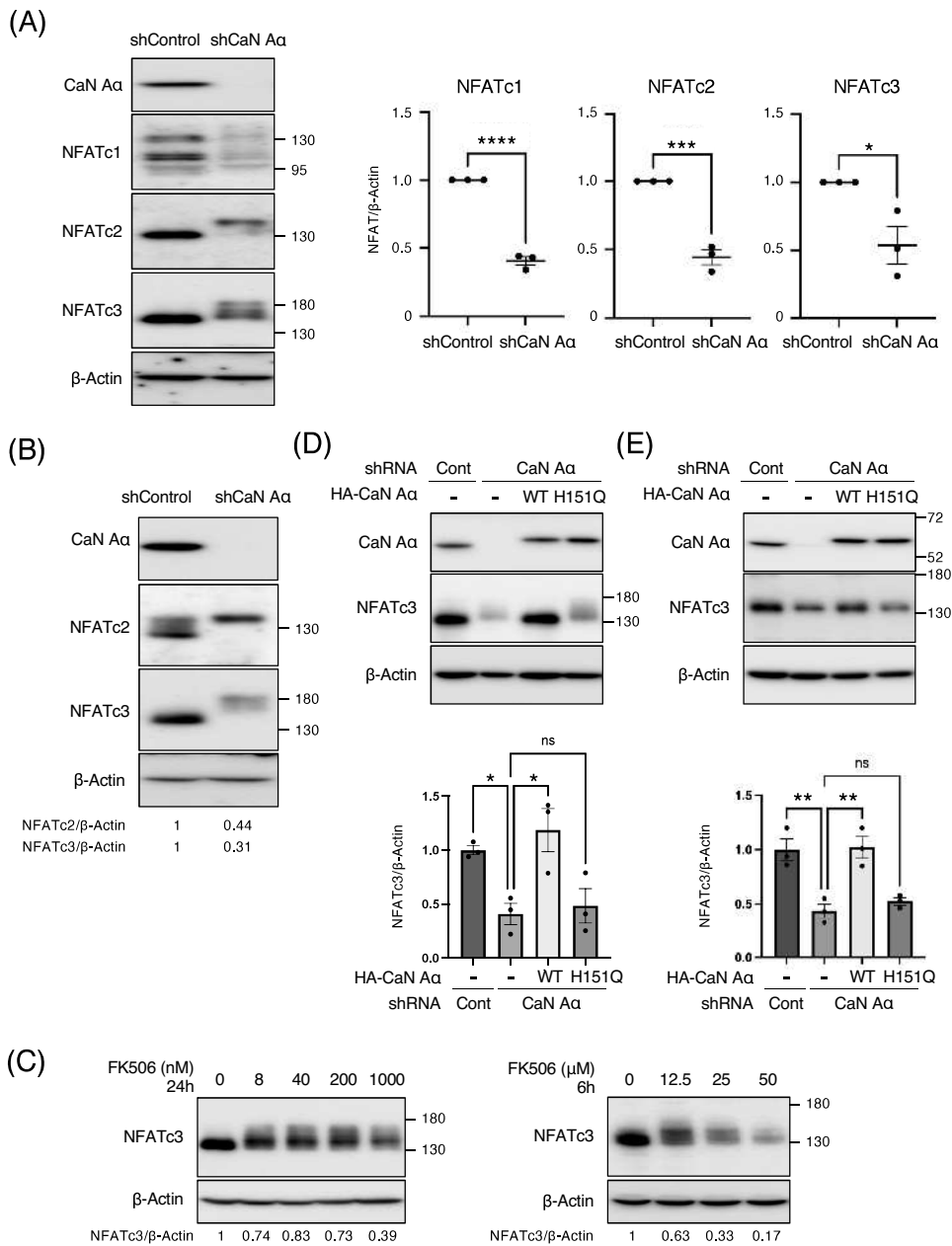


図 12 カルシニューリンのノックダウンは NFAT のタンパク質発現量を減少させる。

(A、B) shControl または shCaN A α を発現する MCF7 または HT29 細胞を Dox 存在下で 3 日間培養した。細胞を回収し、示した抗体を用いてウエスタン

プロットを行った。データは平均値±標準誤差で示した ($n = 3$)。Control と比較し、両側 Student's t -test を行った (*: $p < 0.05$ 、***: $p < 0.001$ 、****: $p < 0.0001$)。

(C) MCF7 細胞を指示濃度の FK506 で処置し、24 時間 (左) または 6 時間 (右) 後に回収した。その後、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(D、E) shControl または shCaN A α を発現する MCF7 細胞 (D) または HCT116 細胞 (E) に、Control、HA-CaN A α -WT または HA-CaN A α -H151Q を発現させ Dox 存在下で 3 日間培養した。樹立した細胞株から単一細胞をクローニングした細胞を使用した。細胞を回収し、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。データは平均値±標準誤差で示した ($n = 3$)。One-way ANOVA を用いて検定を行った後、示した群間で Sidak's multiple comparison test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)

3-2-2 カルシニューリンは NFAT タンパク質の安定化に必要である

NFAT タンパク質の発現低下がタンパク質の分解に起因しているか検討するために、cullin-related ubiquitin ligases (CRL) の活性を阻害することで、タンパク質の分解を阻害する MLN4924 を用いた。MCF7 細胞に対し MLN4924 を処置すると、NFATc1 と NFATc3 のタンパク質発現量が増加した (図 13A)。また、MLN4924 を処置することで、カルシニューリンをノックダウンした場合の NFAT タンパク質発現量の減少が回復した。これらの結果から、カルシニューリンのノックダウンに伴う NFAT タンパク質発現量の減少の一部は、CRL を介したユビキチン化に依存していることが示唆された。また、HT29 細胞における NFAT の安定性を評価するために、新規タンパク質合成を阻害するシクロヘキシミド (CHX) を用いてチェイスアッセイを行った。その結果、FK506 を処置した細胞では、対照の無処置細胞と比較して、NFAT の安定性が有意に低下した (図 13B)。同様の結果が HCT116 細胞でも観察された (図 13C)。この結果は、カルシニューリン阻害が NFAT タンパク質の安定性を低下させることを示している。まとめると、これらの結果は、カルシニューリンは NFAT のタンパク質の安定化に重要であることを示している。

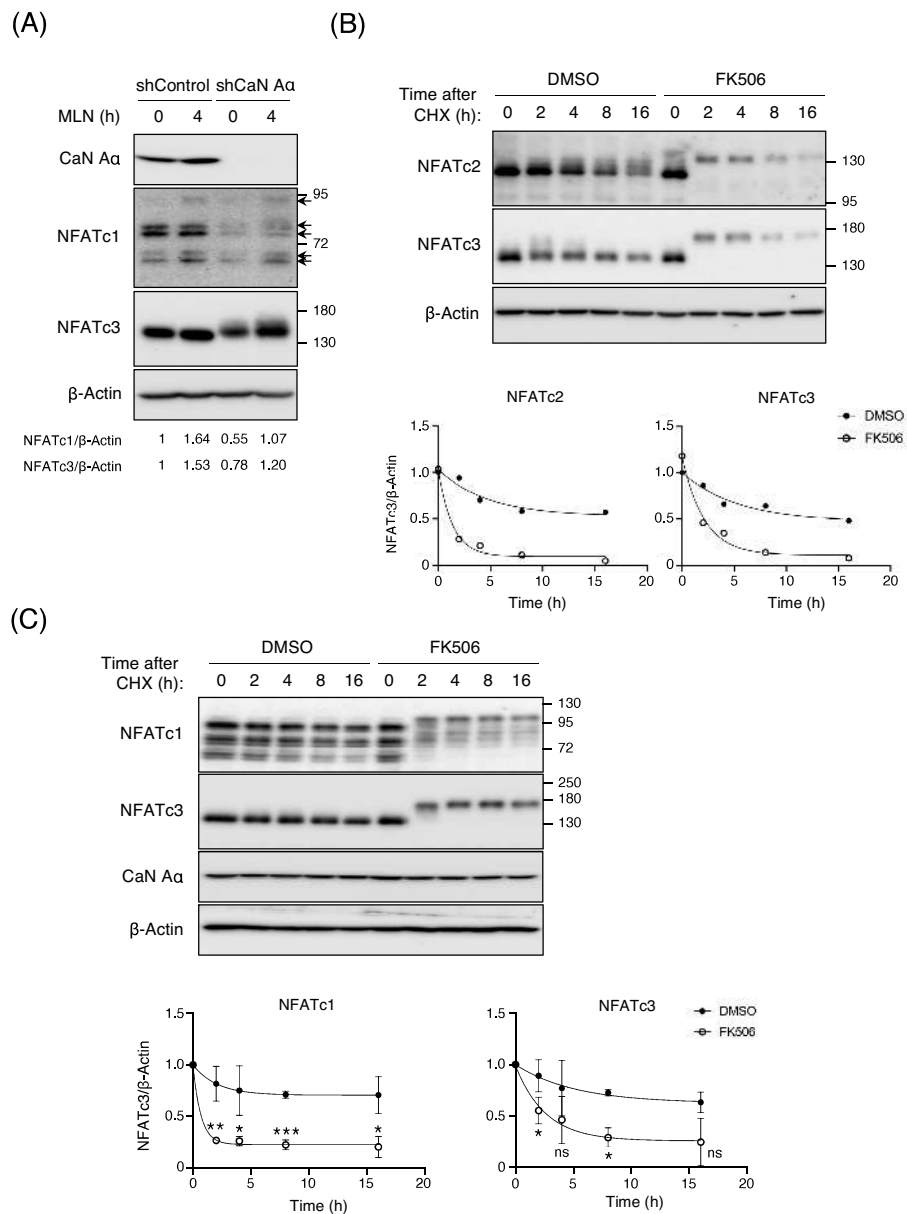


図 13 カルシニューリンのノックダウンにより NFAT は不安定化する。

(A) shControl または shCaN A α を発現する MCF7 細胞を Dox 存在下で 3 日間培養し、MLN4924 (0.5 μ M) で処置し、指示された時間の後に回収した。その後、示した抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

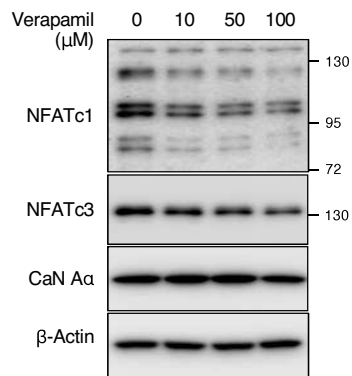
(B) HT29 細胞を、FK506 (50 μ M) および CHX (50 μ g/mL) で処置し、指示された時間の後に回収した。その後、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。減衰曲線は相対発現の経時変化を示す。

(C) HCT116 細胞を、FK506 (50 μ M) および CHX (50 μ g/mL) で処置し、指示された時間の後に回収した。その後、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。データは平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 3$)。DMSO と比較し、両側 Student's t -test を行った (*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$)。

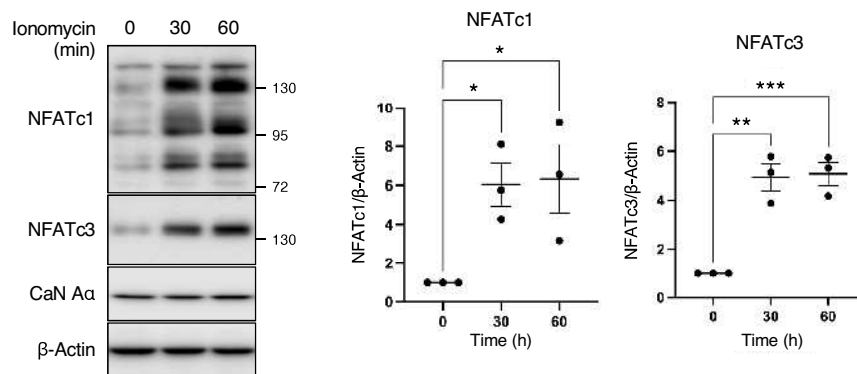
3-2-3 カルシウム濃度は NFAT のタンパク質発現を制御する

細胞内カルシウムイオンがカルシニューリンの脱リン酸化活性を促進することから、カルシウムチャンネル阻害剤 verapamil によってカルシウムチャンネルが遮断されると、NFAT タンパク質の発現量が減少すると予想した。予想通り、NFATc1 と NFATc3 のタンパク質発現量は、verapamil 処置細胞で濃度依存的に減少した (図 14A)。対照的に、ionomycin 処置による細胞内カルシウム濃度の上昇により、NFATc1 および NFATc3 のタンパク質発現量が有意に上昇した (図 14B)。さらに公共データベース上の ionomycin 処置時の T 細胞の RNA-seq (79) を再解析したところ、NFAT 結合モチーフを持つ遺伝子の発現が有意に増加することが明らかになった (図 14C)。これらの結果は、細胞内カルシウム濃度が NFAT タンパク質の発現とその転写活性に影響を与えることを示唆している。

(A)



(B)



(C)

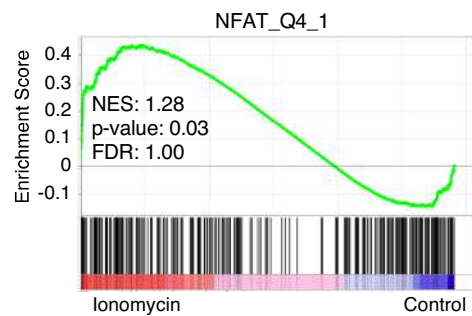


図 14 カルシウムは NFAT の発現と転写活性を活性化する。

(A) MCF7 細胞を指示濃度の verapamil で 9 時間処置し、回収した。その後、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(B) MCF7 細胞を ionomycin ($1 \mu\text{M}$) で示した時間処置し、回収した。その後、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。データは平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 3$)。One-way ANOVA を用いて検定を行った後、0h と比較し Dunnett's multiple comparison test を行った (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$)。

(C) ionomycin ($1 \mu\text{g/mL}$) で 3 時間処置した Jurkat T 細胞における NFAT_Q4_1 の enrichment plot を、未処置の Jurkat T 細胞と比較して、GSEA software を用いて作製した ($n = 3$)。NES : normalized enrichment score、FDR : false discovery rate。

3-2-4 カルシニューリン阻害によって誘導される NFAT の分解は Skp2 に依存している

次に、カルシニューリンのノックダウン時に NFAT が不安定化するメカニズムを検討するため、ユビキチンリガーゼに注目した。Human E3 Ubiquitin Ligases (80) および Human E3 Ubiquitin Ligase Accessory Proteins (81) のリストの中から、細胞質に存在すること (GO:0005829-cytosol)、タンパク質の分解に関与すること (GO:0006511-ubiquitin-dependent protein catabolic process)、ポリユビキチン化に関与すること (GO:0000209-protein polyubiquitination)、これら 3 つの GO term がアノテーションされている遺伝子として、32 個が同定された (図 15A)。さらに候補を絞り込むために、プロテオームデータベース (82) を用いて、これら 32 個の遺伝子について、それぞれのタンパク質存在量と NFATc1 のタンパク質存在量との相関係数を計算した。最終的に、最も高い負の相関を示すタンパク質として Skp2 を同定した (図 15B、C)。Skp2 は、SCF ユビキチンリガーゼ複合体を形成する F-box タンパク質ファミリーのメンバーであり、ユビキチン化反応における標的基質の認識に必要である。Skp2 は細胞質と核の両方に存在し (83)、様々な基質が報告されており (84)、リン酸化されたアミノ酸残基を認識することが知られている (85,86)。カルシニューリンのノックダウンによる NFAT タンパク質発現量の減

少が Skp2 に依存しているかどうかを検討するため、カルシニューリンおよび Skp2 ノックダウン細胞を用いた。Skp2 ノックダウン細胞では NFATc1 と NFATc3 タンパク質発現量が増加した (図 15D)。加えて、カルシニューリンの ノックダウンと組み合わせると、NFATc1 と NFATc3 タンパク質発現量は回復した。次に、N 末に HA タグを付加した Skp2 と N 末に FLAG タグを付加した NFATc3 を過剰発現した細胞で、NFATc3 と Skp2 が相互作用しているかどうか検討した。共免疫沈降実験から、Skp2 と NFATc3 は結合していることが明らかになった (図 15E)。これらの結果は、カルシニューリン活性が阻害されると、NFAT のリン酸化が亢進するため、Skp2 依存的に NFAT が分解されることを示唆している。

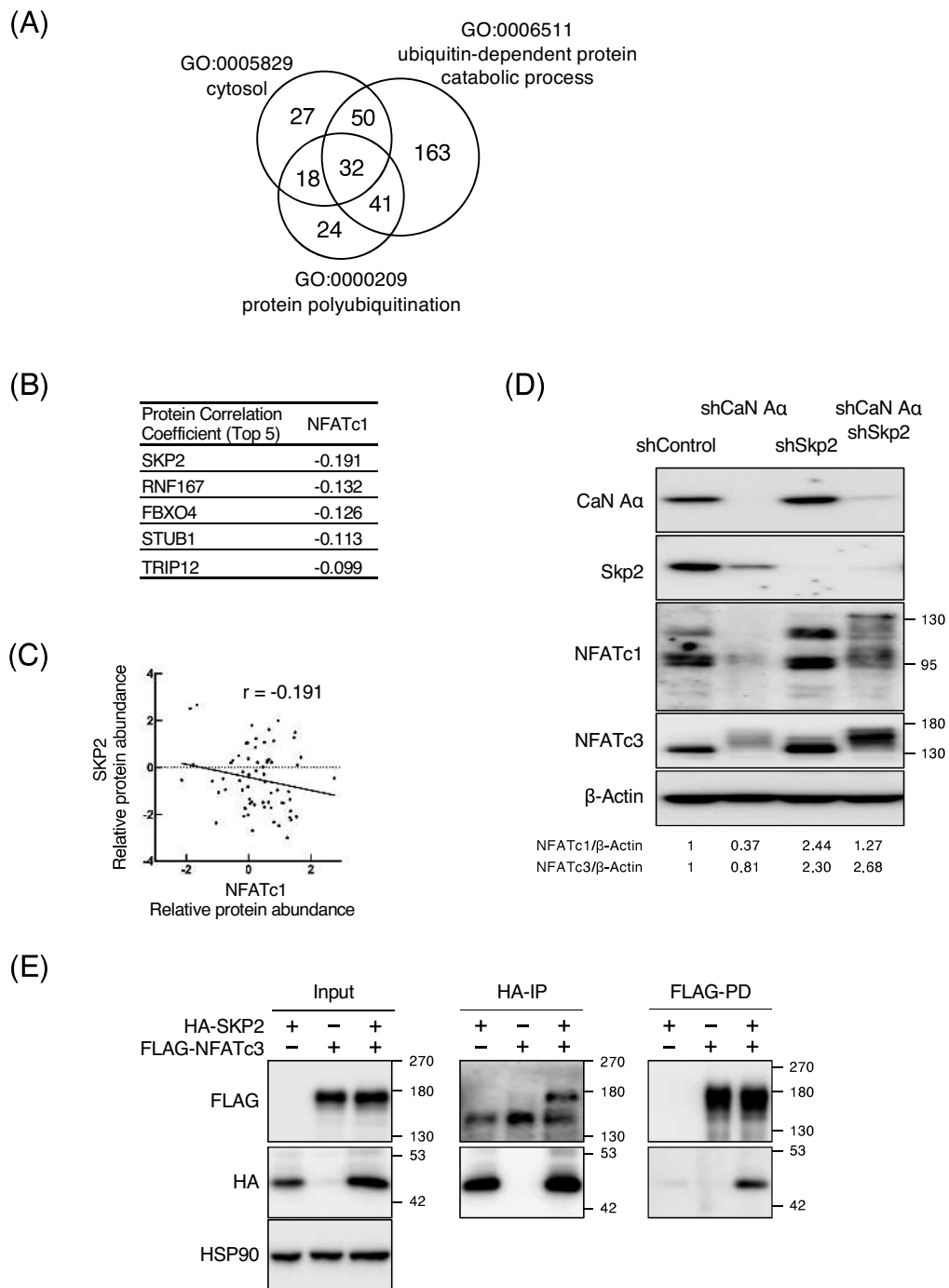


図 15 カルシニューリン枯渇による NFAT 分解は Skp2 に依存する。

(A) ベン図を用いて、cytosol (GO:0005829)、ubiquitin-dependent protein catabolic process (GO:0006511)、protein polyubiquitination (GO:0000209)

の GO term を持つ Human E3 Ubiquitin Ligases および Human E3 Ubiquitin Ligase Accessory Proteins の個数を示した。

(B) NFATc1 タンパク質発現レベルと負の相関を示す上位 5 つのタンパク質のリスト。

(C) Skp2 と NFATc1 タンパク質発現の散布図。r は相関係数、直線は回帰直線を示す。

(D) shControl、shCaN A α または shSkp2 を発現する MCF7 細胞を Dox 存在下で 3 日間培養した。細胞を回収し、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(E) HEK293T 細胞に対し、空ベクター、または HA-SKP2 および FLAG-NFATc3 を発現するベクターをトランスフェクションした。FLAG または HA を用いた免疫沈降を行い、示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

第3節 考察

本研究では、細胞内カルシウムレベルの上昇とそれに続くカルシニューリンの活性化が、NFAT のタンパク質の安定性に寄与していることを発見した (図16)。カルシニューリンのノックダウンは NFAT のリン酸化をもたらし、Skp2 依存的に NFAT の分解を誘導する。さらに、カルシウムの流入を阻害すると、NFAT タンパク質発現量も減少した。カルシニューリンは、サイクリン D1 (75)、ER α (72)、c-Myc (76)、EGFR (77)、c-Jun (78) の主要な制御因子であり、脱リン酸化を誘導することによってこれらのタンパク質を安定化させる。しかしながら、NFAT の安定性との関連は不明であった。本研究は、カルシウム-カルシニューリン経路が NFAT の核内移行を促進するだけでなく、NFAT タンパク質の安定性に寄与していることを明らかにした。

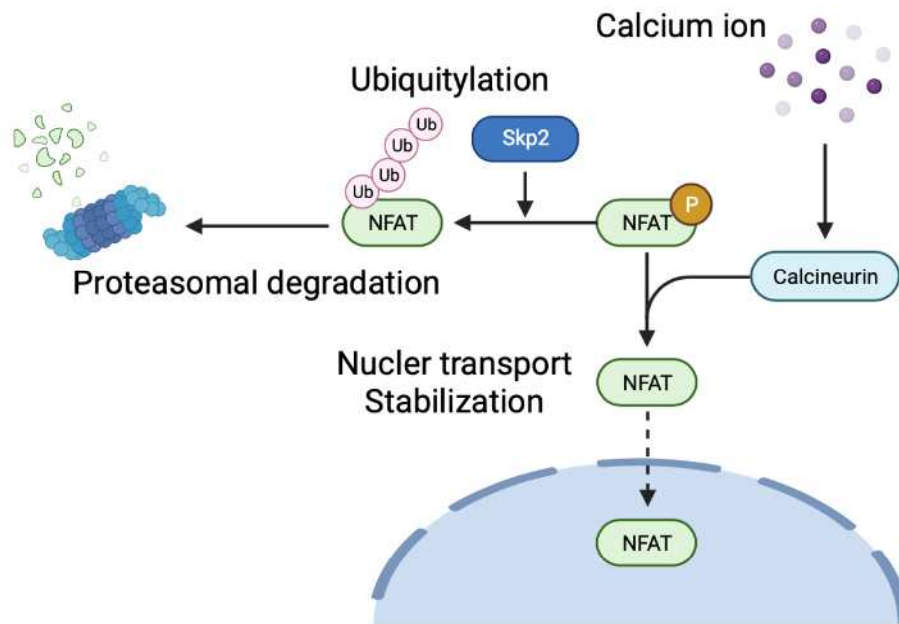


図 16 NFAT を制御するカルシニューリンの模式図。

NFAT はカルシニューリンによって脱リン酸化され、タンパク質は安定化する。この脱リン酸化は NFAT の核内移行も促進する。リン酸化状態の NFAT は SKP2 によってユビキチン化され、その後分解される。

3-3-1 不安定化に關与する NFAT のリン酸化部位

NFAT は、glycogen synthase kinase 3β (GSK3 β)、casein kinase 1 (CK1)、dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1 (DYRK1) などのリン酸化酵素によって、NFAT homology domain (NHD) の複数の部位でリン酸化される (87)。NFAT のリン酸化は、NFAT の核外移行を引き起こし、その転写活性を抑制する (55)。カルシニューリンは NFAT のリン酸化部位の大部分を脱リン酸化し、NFAT の核局在シグナルを露出させ、核内移行を促進する (88)。本研究では、カルシニューリンのノックダウンは NFAT のリン酸化とそれに続くタンパク質の不安定化を引き起こした。カルシニューリンをノックダウンした細胞に対し、酵素活性を欠損した変異型カルシニューリンを過剰発現させても、NFAT のタンパク質発現量は回復しなかった。このことから、NFAT のタンパク質安定化にはカルシニューリンの酵素活性が必要であることが明らかになった。これらの結果は、NFAT がリン酸化依存的に分解されることを示唆している。また、NFAT の不安定化の責任因子として Skp2 を同定した。Skp2 はリン酸化された標的を認識し、ユビキチン化する (85,86)。これは、NFAT がリン酸化依存的に Skp2 によって分解されるというモデルと一致する。しかしながら、GSK3 β による NFAT の SP2 モチーフにおけるリン酸化は、murine double minute 2 (MDM2) による分解から NFAT を

保護し、それによって NFAT を安定化させることが報告されている (89)。カルシニューリンを阻害すると、GSK3 β を含む複数のリン酸化酵素の標的部位でリン酸化の亢進が起こる (56,87)。従って、Skp2 が介在する NFAT の分解には、GSK3 β が標的とする部位とは異なるリン酸化部位の認識が関与している可能性がある。NFAT の不安定化に関与するリン酸化部位とリン酸化酵素の同定は今後の課題である。

3-3-2 カルシウム濃度と NFAT の安定性

本研究では、細胞内カルシウムレベルが NFAT タンパク質の発現に影響を与えることを示した。カルシニューリンの酵素活性が細胞内のカルシウムイオンに依存していることから、カルシウム動態はカルシニューリンを介して NFAT のタンパク質の安定性に影響を与えることが示唆された。Ionomycin 処置時の T 細胞の RNA-seq (79) の再解析では、NFAT 結合モチーフを持つ遺伝子の発現が有意に増加することが明らかにした。この報告では NFATc2 タンパク質量の明らかな増加は認められなかったが、NFATc1 および NFATc3 のタンパク質量が増加している可能性がある。カルシウム濃度が NFAT のタンパク質量に与える影響についてはさらなる研究が必要である。

3-3-3 カルシニューリン阻害と NFAT タンパク質

先行研究では、カルシニューリンの阻害が NFAT のタンパク質発現に影響することが報告されており、マクロファージ細胞では NFATc2 のタンパク質発現を減少させ (90)、骨芽細胞様細胞では NFATc1 のタンパク質発現を減少させることが明らかになっている (91)。これらの結果は、カルシニューリンが NFAT の安定性を促進するという結論と一致している。

第4節 小括

以上の結果から、カルシニューリンによる NFAT の脱リン酸化は、NFAT を Skp2 依存性の分解から防ぐことが示された。NFAT は免疫系だけでなく、がん化や組織の発生においても重要な役割を果たしている。本研究は、カルシニューリンが NFAT の核内移行だけでなく、NFAT タンパク質の安定化に重要であることを明らかにし、カルシニューリンによる NFAT の制御機構の理解に貢献できると考えられる。

第 4 章 総括

タンパク質のリン酸化は、細胞内のシグナル伝達機構を制御するために不可欠な機構であり、細胞増殖、分化、代謝制御など多様な生命現象に必須である。タンパク質のリン酸化はリン酸化酵素および脱リン酸化酵素により制御されており、がん化をはじめとした様々な疾患に関与している。がんにおいては、これらの酵素に対する阻害剤の開発が行われている。

脱リン酸化酵素 PP1 は 200 種類以上知られている PIPs との相互作用により標的を変化させ、多種多様なシグナル伝達経路に関与している。がん細胞においても、がんの種類や相互作用する PIPs によって多様な影響を及ぼす (13)。クロマチン上における核内 PIPs の結合領域の重複が少ないことから (14)、クロマチン上における PP1 の機能は PIPs によってリクルートされる遺伝子領域に依存している可能性があり、クロマチン上の PP1 と PIPs の複合体の機能を個別に明らかにする必要がある。PP1 のアイソフォームの一つである PP1 γ はヒストンを脱リン酸化し細胞増殖因子の転写制御に重要であることが知られており (15)、ヒストンの脱リン酸化に関与する PIPs の同定はヒストン修飾を介した転写制御の分子基盤の解明につながると考えられる。

カルシニューリンは主要な標的の 1 つである NFAT を介し、多くのがんにおいて悪性化に関与している (21)。カルシニューリンによる NFAT の活性化は、核内移行の促進によって説明されるが、タンパク質の安定化や相互作用分

子の変化に対して影響を及ぼすかは不明である。カルシニューリンによる NFAT の活性化が、タンパク質安定化や相互作用分子の変化によっても制御されていることが明らかになれば、カルシニューリン-NFAT 経路を阻害する新たなアプローチが可能になる。

そこで、本研究では、脱リン酸化酵素 PP1 γ およびカルシニューリンに着目し、これらの分子が制御する細胞増殖関連シグナル伝達経路の解明を行った。

第 2 章では、E2F1 標的遺伝子プロモーターにおける H3-pThr¹¹ に関する PP1 γ の制御サブユニットを同定した。PP1 γ は制御サブユニットと結合することで活性を制御しているが、H3-pThr¹¹ の脱リン酸化に関する制御サブユニットは不明であった。200 近くの PIPs から、PP1 γ を介した H3-pThr¹¹ の制御サブユニットとして NIPP1 を同定し、NIPP1 が *in vivo* および *in vitro* の両方で PP1 γ を介した H3-pThr¹¹ の脱リン酸化を阻害することを明らかにした。NIPP1 欠失細胞を作製し、NIPP1 が細胞増殖と E2F1 標的遺伝子の発現に必要であることを示した。DNA 損傷後、活性化された PKA は、PP1 結合モチーフ (RVxF) に隣接する NIPP1-Ser¹⁹⁹ をリン酸化し、PP1 γ から NIPP1 を解離させ、PP1 γ の活性化を引き起した。さらに、PKA 活性の阻害は E2F 標的遺伝子の転写活性化につながった。統計解析の結果、NIPP1 の発現は E2F 標的遺伝子と正の相関があることが確認された。以上のことから、PP1 γ の制御

サブユニットである NIPP1 は、DNA 損傷時に PKA によりリン酸化され、PP1 γ と解離することで、E2F1 標的遺伝子の発現を調節していることが明らかになった。

第3章では転写因子 NFAT とカルシニューリンの新たな関係について明らかにした。カルシニューリンは様々な標的タンパク質を脱リン酸化し、その安定化を促進することが知られているが、主要な標的である NFAT の安定性に寄与しているかは不明であった。カルシニューリン阻害が NFAT タンパク質の安定性に及ぼす影響を検討した結果、カルシニューリンの阻害は NFAT を不安定化することが明らかになった。カルシニューリンによる NFAT の脱リン酸化は NFAT の安定化を促進するが、脱リン酸化活性が欠損したカルシニューリン変異体は NFAT を安定化できないことが明らかになった。カルシニューリンの活性化に必須な細胞内カルシウムイオン濃度の上昇も、NFAT の安定化を誘導した。さらに、SCF ユビキチンリガーゼ複合体の F-box タンパク質である Skp2 が、カルシニューリンをノックダウンした際に、NFAT の分解を媒介する因子であることを同定した。以上の結果から、カルシニューリンによる NFAT の脱リン酸化は、Skp2 による分解から NFAT を保護し、そのタンパク質の安定性を促進することが明らかになった。

本研究では、PP1 γ およびカルシニューリンが媒介する増殖制御機構の一端を明らかにした。PP1-NIPP1 の相互作用は低酸素下におけるエネルギー代謝や、熱ショック時の pre-mRNA のスプライシングを制御している。カルシニューリン-NFAT 経路はがんだけでなく免疫機能や組織の発達など異なる領域においても重要な役割を持つ。これらのことから、本研究で明らかにした内容はがん以外の異なる分野の研究に応用できる可能性があり、脱リン酸化酵素が制御するシグナル伝達機構の包括的な理解の一助となる。

第 5 章 実験方法

5-1 細胞培養および UV 照射

MCF7 (HTB-22、ATCC) および HEK293T (632180、Takara) 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FBS) (173012、Sigma) および Antibiotic-Antimycotic (15240062、Thermo Fisher Scientific) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (044-29765、Wako) で培養した。HT29 (HTB-38、ATCC) HCT116 (CCL-247、ACTT) 細胞は、10%FBS および Antibiotic-Antimycotic を添加した McCoy's 5A 培地 (16600-082、Gibco) で培養した。UV の照射は、StrataLinker 1800 crosslinker (Agilent-Stratagene, Santa Clara, CA, USA) を用いて行った。細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、 100 J/m^2 または 25 J/m^2 の UV-C で処置した。

5-2 薬剤

本研究では 4,5,6,7-Tetrabromo-1H-benzotriazole (TBB) (2275、Tocris)、H89 (CAY10010556、Cayman Chemical)、8Br-cAMP (201564、Santa Cruz)、FK506 (063-06191、Wako)、cycloheximide (037-20991、Wako)、ionomycin (095-05831、Wako)、verapamil (222-00781、Wako) および MNL-4924 (S7109、Selleck)、以上の薬剤を使用した。8Br-cAMP および cycloheximide は水に溶解し、他は DMSO に溶解した。処置した濃度と時間は図の凡例に示した。

5-3 一過性トランスフェクション

pcDNA3.1-myc-his-hPPP1 γ -WT、hPPP1 γ -T311A、hPNUTS、hNIPP1、pCMV-3 \times FLAG-ratNIPP1-WT、ratNIPP1- Δ C、ratNIPP1-RATA、ratNIPP1-S178A、ratNIPP1-S199A については、プラスミド DNA と Lipofectamine 3000 (L3000-008、Invitrogen) または Polyethylenimine (PEI) MAX (24765-1、Polysciences) を用いて HCT116 細胞にトランスフェクションした。

pcDNA3-3 \times FLAG-hNFATc3、HA-mouseSKP2 については、プラスミド DNA と PEI を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの 8 時間後に培地を交換し、2 日後に細胞を回収した。

5-4 変異導入

ratNIPP1-S178A、S199A、hCaN A α -H151Q は KOD-Plus-Mutagenesis Kit (SMK-101,2wq、Toyobo) を用いて作製した。変異導入に用いたプライマーは表 1 に示した。

表 1 変異導入に用いたプライマー

プライマー	配列 (5' \rightarrow 3')
S178A	Forward <u>GCT</u> ACCTCACTATGAAGAGGAAATC
	Reverse AATCCGCTTGTTGTGGGC

S199A	Forward	<u>GCGAGGGT</u> GACCTTCAGTGA
	Reverse	GTTCTTCCTCTTCCTCTTTGGTCT
H151Q	Forward	GAAAT <u>CAGGAAT</u> GTAGACATCTAACA
	Reverse	TACATTCCTGATTTCCACGAAGTAAA

5-5 レンチウイルスの作製と感染

shRNA による遺伝子ノックダウンについては、shControl、shPKA α 、shNIPP1、shCaN A α 、および shSkp2 を発現するレンチウイルスを、PEI を用いて、HEK293T 細胞とレンチウイルスパッケージングベクター (psPAX2 および pMD2.G)、および CS-RfA-ETBsd との共トランスフェクションにより作製した。遺伝子過剰発現のために、空ベクター、HA-hCaN A α -WT、および HA-hCaN A α -H151Q を発現するレンチウイルスを、HEK293T 細胞をレンチウイルスパッケージングベクター、および PEI を用いて CSII-CMV-MCS-IRES2-Puro で共トランスフェクションすることにより作製した。トランスフェクションの2日後にウイルスを回収した。4 μ g/ml の polybrene (H9268、Sigma-Aldrich) を添加した後、ウイルスを MCF7 細胞または HCT116 細胞に感染させた。MCF7 細胞および HCT116 細胞を 24 時間レンチウイルスとインキュベートした。ウイルス感染細胞を 10 μ g/mL の Blasticidin (A1113903、Gibco) または 1 μ g/mL puromycin (P-7255、Sigma-Aldrich) で 2 日間処置した。shRNA の発現を促進するために、Doxycycline (Dox; D9891、Sigma-

Aldrich) を 1 μ g/mL の濃度で培地に添加した。shRNA の標的配列を表 2 に示す。

表 2 shRNA の標的配列

標的遺伝子	配列 (5' → 3')
Control (Luciferase)	CGTGCGTGGGAATGCTTCGA
PKA α	GAAGCTCCCTTCATACCAAAG
NIPP1	GGATTTCTACCCTTACCATTG
PPP3CA (カルシニューリン)	GCCAAGGGCTTAGACCGAATT
SKP2	GGGAGTGACAAAGACTTTG

5-6 細胞周期の解析

5-Ethynyl-2' -deoxyuridine (EdU) 標識は、Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 Imaging kit (C10637、Thermo Scientific) を用いて行った。細胞を 10 nM EdU で 1 時間培養し、回収した後に PBS で洗浄した。その後、希釈した 4% PFA (18814-10、Polysciences) と室温で 10 分間、その後 4°C で 30 分間インキュベートし細胞を固定した。固定後、細胞を 3% の BSA (013-27054、Wako) を含む PBS で洗浄した。その後、PBS で希釈した 0.5% Triton-X (168-11805、Wako) と 20 分間インキュベートした。取り込まれた EdU の検出は、使用した kit のプロトコルに従って行った。細胞を RNase で処置し、PI

で染色した。フローサイトメトリーは FACSVerse フローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて行った。細胞周期プロファイルは BD FACSDiva™ software (BD Biosciences) を用いて解析した。

5-7 クロマチン免疫沈降

HCT116 細胞を nocodazole (50 ng/mL、12 時間) で同期化し、分裂停止細胞を回収した。細胞周期の進行を開始させ、7 時間後に、FACS により初期 S 期に同期したことが確認された細胞に 100 J/m² の UV を照射し、さらに 2 時間インキュベートした。細胞を 1% のホルムアルデヒドで 37°C、10 分間架橋した。125 mM グリシンで架橋反応を停止した後、固定した細胞をプロテアーゼ阻害剤 (1 mM PMSF、1 μg/mL Aprotinin、1 μg/mL Pepstatin A) を含む PBS で洗浄した。細胞をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶解バッファー (1% SDS、10 mM EDTA、50 mM Tris-HCl、pH 8.1) に懸濁し、gDNA を超音波で平均 200-1000 bp の断片サイズにした。可溶化したクロマチンを 13,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離して清澄化し、ChIP 希釈バッファー (1% Triton X-100、1 mM EDTA、150 mM NaCl、15 mM Tris-HCl、pH 8.1) で 10 倍に希釈した。希釈クロマチンを抗体と 4°C で 12-16 時間インキュベートした。免疫複合体をサケ精子 DNA と BSA であらかじめブロッキングしたプロテイン A セ

ファロースビーズに 4°C で 1 時間結合させた。ビーズを低塩洗浄バッファー (0.1% SDS、1% Triton-X100、2 mM EDTA、150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、pH 8.1)、高塩洗浄バッファー (500 mM NaCl 洗浄バッファー)、LiCl 洗浄バッファー (0.25 M LiCl、1% NP-40、1% デオキシコール酸、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl、pH8.1) で各 1 回、Tris-EDTA Buffer で 2 回洗浄した。プロテイン A ビーズに結合した免疫複合体を 100 μ g/mL の Proteinase K で 56°C、2 時間処理し、フェノール/クロロホルムで 1 回抽出した後、エタノールおよびグリコーゲン担体として DNA を沈殿させた。沈殿した DNA を 60 μ L の水に懸濁した。SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて全生成物を検出した。結果は、総インプットクロマチンに対するパーセンテージで表した。

5-8 siRNA トランスフェクションによるノックダウン

HCT116 細胞に Control siRNA (Silencer Negative Control number 2、Ambion)、NIPP1 (M00010903-01、Thermo Scientific) または PNUTS (M011358-00、Thermo Scientific) を Lipofectamine 2000 (11668-027、Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。

5-9 CRISPR/Cas9 を介した遺伝子の欠失

PPP1R8 の sgRNA 配列は、Integrated DNA Technologies の design custom gRNA tool

(https://sg.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM) を

用いて決定した。sgRNA はオリゴヌクレオチドとしてオーダーし、アニーリン

グした後、BbsI サイトを持つ pX330 にクローニングした。HeLa 細胞および

HEK293T 細胞を、10% FBS を含む D-MEM 中で、 1.0×10^4 cells/3.5cm dish

の密度で 24 時間培養した。この細胞に、PEI MAX を用いて、 $1.4 \mu\text{g}$ の

pX330-sgPPP1R8 と $0.1 \mu\text{g}$ の pPGK-puroR をトランスフェクションした。

24 時間後に、puromycin ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) で 1 日間処置し、トランスフェクション

した細胞の薬剤セレクションを行なった。LaboPass Tissue Mini (CME

0111、Cosmo Genetech) を用いてトランスフェクションした細胞から gDNA

を抽出し、T7 endonuclease I アッセイを用いて sgRNA の切断効率を確認し

た。確認後、細胞を個々に分割して単一クローンの細胞株を樹立した。標的遺

伝子の配列を確認するために、ウエスタンブロットによるタンパク質発現量の

解析および標的領域周辺の gDNA の塩基配列の確認を行なった。sgRNA の塩

基配列は表 3 にした。

表 3 sgRNA の塩基配列

標的	配列 (5' → 3')
sgNIPP1-1	CGCTGTTCTCGACTGCCCAACC
sgNIPP1-2	G TTCCTGAATCGACCAACTG

5-10 ウェスタンブロット

全細胞溶解物を調製するために、集めた細胞を氷冷した PBS で洗浄し、サンプルバッファー (2% SDS、10% グリセロール、100 μ M DTT、0.1% Bromophenol blue、50 mM Tris-HCl、pH6.8) に懸濁し、5 分間煮沸した。デジタル画像は ChemiDoc Imaging system (Bio-Rad) を用いて取り込んだ。タンパク質のシグナルは、Image Lab (Bio-Rad) を用いて定量した。代表的な画像を図に示した。NFATc1、NFATc2、および NFATc3 の減衰曲線は、 β -Actin のバンド強度で正規化し、GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software) を用いてプロットした。非線形回帰による指数関数的減衰式を用いて減衰曲線を作製した。本研究で使用した抗体を表 4 に示す。

表 4 本研究で使用した抗体

抗体	カタログナンバー	メーカー
Calcineurin A α	ab52761	Abcam
Chk1	sc8408	Santa Cruz
Chk1	sc56291	Santa Cruz

FLAG	M158-3L	MBL
FLAG	M185-3	MBL
H2AX	ab11175	Abcam
H3	ab1791	Abcam
H3	17168-1-AP	Proteintech
H3-pThr ¹¹	ab5168	Abcam
HA	PAB10343	Abnova
I-2	AF4719	R&D SYSTEMS
IKK α	sc7182	Santa Cruz
myc	sc789	Santa Cruz
myc	c40	Santa Cruz
MYPT1	ab59235	Abcam
NFATc1	sc-7294	Santa Cruz
NFATc2	sc-7296	Santa Cruz
NFATc3	18222-1-AP	Proteintech
NIPP1	612368	BD Bioscience
NIPP1	HPA027452	Sigma
normal goat IgG	sc2028	Santa Cruz
normal mouse IgG	sc2025	Santa Cruz
normal rabbit IgG	cs2729	Cell Signaling
PKA-pThr ¹⁹⁷	cs4781	Cell Signaling
PKA α	sc28315	Santa Cruz
PNUTS	611060	BD Biosciences
PP1-pThr ³²¹ (PP1 γ -pTThr ³¹¹ に対応)	#2581	Cell Signaling
PP1 γ	sc6108	Santa Cruz
PP1 γ	07-1298	Millipore
pS/T-PKA	cs9624	Cell Signaling
Skp2	#2652	Cell Signaling
β -actin	ab6276	Abcam
γ H2AX	05-636	Sigma

5-11 細胞画分

細胞を 400 μ l の溶液 A (10 mM HEPES pH7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.34 M sucrose, 10% glycerol, 1 mM DTT) に懸濁した。その後、細胞を氷上で 5 分間インキュベートした。細胞質画分と核画分を分けるため、1300 g で 4 分間遠心を行い、上清を細胞質画分、沈殿を核画分として回収した。単離した核画分を溶液 A で洗浄した後、400 μ l の溶液 B (3 mM EDTA、0.2 mM EGTA、1 mM DTT) で溶解し、氷上で 10 分間インキュベートした。可溶性画分とクロマチン画分を分けるため、1700 g で 4 分間遠心分離を行い、上清を可溶性画分、沈殿をクロマチン画分として回収した。その後、単離したクロマチン画分を溶液 B 液で洗浄した。クロマチン画分に対し Biorupter を用いて 4 回、各回 30 秒間超音波を処置した。

5-12 免疫沈降

細胞を immunoprecipitation kinase buffer (50 mM HEPES-NaOH、150 mM NaCl、2.5 mM EGTA、1 mM DTT、0.1% Tween-20、10% glycerol、pH8.0) にプロテアーゼ阻害剤 (200 μ g/mL PMFS、10 μ g/mL Leupeptin、40 μ g/mL Trypsin inhibitor、2 μ g/mL Aprotinin)、および脱リン酸化酵素阻害剤 (50 mM NaF、0.1 mM Na₃VO₄、15 mM p-Nitrophenylphosphate、80

mM β -Glycerophosphate) を添加した。溶解物を FLAG-M2 agarose (A2220、Sigma-Aldrich) とインキュベートするか、あるいは抗体を用いて 4°C で 1 時間、回転させながら免疫沈降を行った。

5-13 *in vitro* 脱リン酸化アッセイ

クロマチンに結合した PP1 γ を可溶化し、抗 PP1 γ 抗体で免疫沈降させた。沈殿物は、phosphatase buffer (10 mM HEPES、10 mM MgCl₂、1 mM MnCl₂、1 mM DTT) 中で、クロマチンと 30°C、1 時間インキュベートした。His タグ付き PP1 γ -WT、PP1 γ -T311A、NIPP1 を Sf9 細胞から精製した。脱リン酸化反応の基質にはクロマチン画分を用いた。

5-14 RT-qPCR

製造元のプロトコールに従い、ISOGEN II (311-07361、NIPPON GENE) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA に対し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814、ABI) を用いてランダムプライマーで逆転写を行った。qPCR は、FastStart Universal SYBR Green Master (11226200、Roche) と StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて行った。発現レベルは Glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase (GAPDH) の発現レベルに対して正規化した。RT-qPCR に用いたプライマーは表 5 に示した。

表 5 RT-qPCR に用いたプライマー

プライマー		配列 (5' → 3')
CCNB1	Forward	CAAGCCCAATGGAAACATCT
	Reverse	GGATCAGCTCCATCTTCTGC
CCND1	Forward	GAAGCCCTGCTGGAGTCA
	Reverse	CCAGGTCCACCTCCTCCT
CDK1	Forward	TTTTCAGAGCTTTGGGCACT
	Reverse	AGGCTTCCTGGTTTCCATTT
GAPDH	Forward	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
	Reverse	TTGATTTTGGAGGGATCTCG

5-15 候補遺伝子の選定

Human E3 Ubiquitin Ligase のリストは以下のウェブサイト

(<https://esbl.nhlbi.nih.gov/Databases/KSBP2/Targets/Lists/E3-ligases/>)

(80) から、Human E3 Ubiquitin Ligase Accessory Proteins のリストは以下のウェブサイト

([https://esbl.nhlbi.nih.gov/Databases/KSBP2/Targets/Lists/E3-](https://esbl.nhlbi.nih.gov/Databases/KSBP2/Targets/Lists/E3-ligases/DomainRP.html)

[ligases/DomainRP.html](https://esbl.nhlbi.nih.gov/Databases/KSBP2/Targets/Lists/E3-ligases/DomainRP.html)) (81) から取得した (2023 年 6 月)。GO term は

Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)

version v2023q1 (92,93) を用いて、functional annotation table における GOTERM_BP_DIRECT、GOTERM_CC_DIRECT、GOTERM_MF_DIRECT の各項目を取得した。

5-16 バイオインフォマティクス解析

第2章におけるバイオインフォマティクス解析は以下のように行なった。

NIPP1-WT マウスおよび NIPP1 をノックアウトしたマウス精巢の RNA-seq データは、Gene Expression Omnibus (GEO) から入手した (アクセッション番号 : GSE83145) (34)。Trim Galore ! バージョン 0.6.4. (94) を用いてリードからアダプター配列をトリミングした後、品質管理とフィルタリングを PRINSEQ version 0.20.4. (95) を用いて行った。リードはリファレンスゲノム Musculus (GRCm38.98) (96-99) にアライメントし、Salmon version 0.14.2. (100) を用いて転写産物ごとにカウントした。Toximport version 1.12.3. (101) を用いて転写産物レベルの発現推定値を遺伝子レベルにまとめた。GSEA は、GSEA software バージョン 4.0.3. (102,108)、hallmark version 7.0 (103) を用いて行った。順位付けの指標として、検出された全遺伝子の Signal2Noise 値を用いて実施した。コントロールおよび H89 で処置した 3T3 細胞の RNA-seq データは、GEO から入手した (アクセッション番号 : GSE58746) (37)。

TPM+1 を発現値として用い、log2_Ratio_of_Classes を用いて GSEA を行った。

第3章におけるバイオインフォマティクス解析は以下のように行なった。

DMSO および ionomycin で処置した Jurkat T 細胞の RNA-seq データは、GEO から入手した (アクセッション番号: GSE90718) (79)。生のカウントデータは RaNA-seq version 10.13 (104) を用いて取得した。正規化は edgeR v. 3.40.2 (105-107) を用いて行った。GSEA は GSEA software バージョン 4.2.0 (102,108) を用いて行った。順位付けの指標として、検出された全遺伝子の Signal2Noise 値を用いて実施した。

5-17 臨床がん患者における NIPP1 および E2F1 標的遺伝子の発現解析

mRNA 発現データは、UCSC Xena (<http://xena.ucsc.edu/>) (109) を用いて、TCGA Pan-Cancer (PANCAN) データセット (batch effects normalized mRNA data、 $n = 11060$) から入手した (2020年5月)。原発腫瘍と正常組織間の NIPP1 発現の差は、上記のように UCSC 経由で入手した TCGA の BLCA、BRCA、CHOL、COAD、ESCA、HNSC、KICH、KIRC、KIRP、LIHC、LUAD、LUSC、PRAD、READ、STAD、THCA、UCEC データセットを用いて解析した。これらのがん種の略称は、TCGA の略称に基づいている。適

切な統計解析を行うため、5 つ以上の固形組織正常サンプルを含むデータセットを解析した。箱ひげ図は、GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) を用いて、最も NIPP1 が過剰発現している上位 5 つのがん種について作製した。

5-18 CHIP-Atlas データベース解析

E2F 標的遺伝子は以前の報告 (35) を参照し、E2F1 結合スコアは CHIP-Atlas version 19 (110) を用いて求めた。検索パラメーターは以下の通りに設定した (antigen:E2F1、species:H sapiens、distance from TSS:±1 kb)。SRX1556104 と SRX1556105 はすべての遺伝子に対して E2F1 結合スコアが 0 であったため除外した ($n = 49$)。E2F1 結合遺伝子セットは、E2F1 標的遺伝子における E2F1 結合スコアが 750 より高い遺伝子群とした。

5-19 相関係数解析

mRNA 発現データは、UCSC Xena (<http://xena.ucsc.edu/>) (109) を用いて、TCGA Pan-Cancer (PANCAN) データセット (batch effects normalized mRNA data、 $n = 11060$) から入手した (2020 年 5 月)。NIPP1、PRKACA、PRKACB、および E2F 標的遺伝子の mRNA 発現のピアソンの相関係数を、

TCGA PANCAN の原発巣、転移巣、および正常固形組織データを含む全患者について計算した。E2F 標的遺伝子は、G1/S、S/G2、DNA synthesis and replication ($n = 56$)、G1 ($n = 5$)、negative regulators of the cell cycle ($n = 6$)、checkpoint ($n = 9$)、DNA damage repair ($n = 12$)、apoptosis ($n = 11$)、development ($n = 17$) および differentiation ($n = 7$) のカテゴリーに分類した (35)。Dot plot は、GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software, Inc.) を用いて作製した。また、*NIPPI1* と他のすべての遺伝子との mRNA 発現のピアソンの相関係数は、TCGA PANCAN の原発巣、転移巣、および正常固形組織データを含む全患者について計算した。ヒートマップは UCSC Xena (<http://xena.ucsc.edu/>) (109) を用いて作製し、Violin plot は GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) を用いて作製した。

5-20 統計解析

2 群の比較には、両側 Student's *t*-test または両側 Welch's *t*-test を用いた。3 群以上の比較では、One-way ANOVA を用いて検定を行った。その後、すべての群間で比較する場合は、Tukey multiple comparison test を行った。対照群に対して複数の群を比較する場合は、対照群に対し Dunnett's multiple

comparison test を行った。複数の群における特定の対を比較する場合は、示した群間で Sidak's multiple comparison test を行った。統計解析は GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) を用いて行った。危険率 p は以下のように示した (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$ 、****: $p < 0.0001$)。

引用文献

1. Bhullar, K. S., Lagaron, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P., and Rupasinghe, H. P. V. (2018) Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol Cancer* **17**, 48
2. Turdo, A., D'Accardo, C., Glaviano, A., Porcelli, G., Colarossi, C., Colarossi, L., Mare, M., Faldetta, N., Modica, C., Pistone, G., Bongiorno, M. R., Todaro, M., and Stassi, G. (2021) Targeting Phosphatases and Kinases: How to Checkmate Cancer. *Front Cell Dev Biol* **9**, 690306
3. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635–648
4. Vaneynde, P., Verbinnen, I., and Janssens, V. (2022) The role of serine/threonine phosphatases in human development: Evidence from congenital disorders. *Front Cell Dev Biol* **10**, 1030119
5. Heroes, E., Lesage, B., Gornemann, J., Beullens, M., Van Meervelt, L., and Bollen, M. (2013) The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. *FEBS J* **280**, 584–595
6. Verbinnen, I., Ferreira, M., and Bollen, M. (2017) Biogenesis and activity regulation of protein phosphatase 1. *Biochem Soc Trans* **45**, 89–99
7. Campos, A., and Clemente-Blanco, A. (2020) Cell Cycle and DNA Repair Regulation in the Damage Response: Protein Phosphatases Take Over the Reins. *Int J Mol Sci* **21**
8. Saurin, A. T. (2018) Kinase and Phosphatase Cross-Talk at the Kinetochore. *Front Cell Dev Biol* **6**, 62
9. Holder, J., Poser, E., and Barr, F. A. (2019) Getting out of mitosis: spatial and temporal control of mitotic exit and cytokinesis by PP1 and PP2A. *FEBS Lett* **593**, 2908–2924
10. Delibegovic, M., Armstrong, C. G., Dobbie, L., Watt, P. W., Smith, A. J., and Cohen, P. T. (2003) Disruption of the striated muscle glycogen targeting subunit PPP1R3A of protein phosphatase 1 leads to increased weight gain, fat deposition, and development of insulin resistance. *Diabetes* **52**, 596–604
11. Kelsall, I. R., Voss, M., Munro, S., Cuthbertson, D. J., and Cohen, P. T. (2011) R3F, a novel membrane-associated glycogen targeting subunit of protein phosphatase 1 regulates glycogen synthase in astrocytoma cells in response to glucose and extracellular signals. *J Neurochem* **118**, 596–610

12. Ferreira, M., Beullens, M., Bollen, M., and Van Eynde, A. (2019) Functions and therapeutic potential of protein phosphatase 1: Insights from mouse genetics. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1866**, 16–30
13. Felgueiras, J., Jeronimo, C., and Fardilha, M. (2020) Protein phosphatase 1 in tumorigenesis: is it worth a closer look? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1874**, 188433
14. Verheyen, T., Gornemann, J., Verbinnen, I., Boens, S., Beullens, M., Van Eynde, A., and Bollen, M. (2015) Genome-wide promoter binding profiling of protein phosphatase-1 and its major nuclear targeting subunits. *Nucleic Acids Res* **43**, 5771–5784
15. Shimada, M., Haruta, M., Niida, H., Sawamoto, K., and Nakanishi, M. (2010) Protein phosphatase 1gamma is responsible for dephosphorylation of histone H3 at Thr 11 after DNA damage. *EMBO Rep* **11**, 883–889
16. Bueno, O. F., Brandt, E. B., Rothenberg, M. E., and Molkenin, J. D. (2002) Defective T cell development and function in calcineurin A beta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9398–9403
17. Gooch, J. L., Toro, J. J., Guler, R. L., and Barnes, J. L. (2004) Calcineurin A-alpha but not A-beta is required for normal kidney development and function. *Am J Pathol* **165**, 1755–1765
18. Serrano-Perez, M. C., Fernandez, M., Neria, F., Berjon-Otero, M., Doncel-Perez, E., Cano, E., and Tranque, P. (2015) NFAT transcription factors regulate survival, proliferation, migration, and differentiation of neural precursor cells. *Glia* **63**, 987–1004
19. Schulz, R. A., and Yutzey, K. E. (2004) Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev Biol* **266**, 1–16
20. Brun, M., and Godbout, R. (2016) Activation of calcineurin in cancer: many paths, one hub. *Translational Cancer Research* **5**, S497–S506
21. Masaki, T., and Shimada, M. (2022) Decoding the Phosphatase Code: Regulation of Cell Proliferation by Calcineurin. *Int J Mol Sci* **23**
22. Rossetto, D., Avvakumov, N., and Cote, J. (2012) Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* **7**, 1098–1108
23. Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D. H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H., and Nakanishi, M. (2008) Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* **132**, 221–232

24. Lemonnier, T., Dupre, A., and Jessus, C. (2020) The G2-to-M transition from a phosphatase perspective: a new vision of the meiotic division. *Cell Div* **15**, 9
25. Aggen, J. B., Nairn, A. C., and Chamberlin, R. (2000) Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol* **7**, R13-23
26. Beullens, M., and Bollen, M. (2002) The protein phosphatase-1 regulator NIPP1 is also a splicing factor involved in a late step of spliceosome assembly. *J Biol Chem* **277**, 19855-19860
27. Tanuma, N., Kim, S. E., Beullens, M., Tsubaki, Y., Mitsuhashi, S., Nomura, M., Kawamura, T., Isono, K., Koseki, H., Sato, M., Bollen, M., Kikuchi, K., and Shima, H. (2008) Nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP1) directs protein phosphatase-1 (PP1) to dephosphorylate the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) component, spliceosome-associated protein 155 (Sap155). *J Biol Chem* **283**, 35805-35814
28. Beullens, M., Van Eynde, A., Bollen, M., and Stalmans, W. (1993) Inactivation of nuclear inhibitory polypeptides of protein phosphatase-1 (NIPP-1) by protein kinase A. *J Biol Chem* **268**, 13172-13177
29. Beullens, M., Vulsteke, V., Van Eynde, A., Jagiello, I., Stalmans, W., and Bollen, M. (2000) The C-terminus of NIPP1 (nuclear inhibitor of protein phosphatase-1) contains a novel binding site for protein phosphatase-1 that is controlled by tyrosine phosphorylation and RNA binding. *Biochem J* **352 Pt 3**, 651-658
30. Van Eynde, A., Beullens, M., Stalmans, W., and Bollen, M. (1994) Full activation of a nuclear species of protein phosphatase-1 by phosphorylation with protein kinase A and casein kinase-2. *Biochem J* **297 (Pt 3)**, 447-449
31. Vulsteke, V., Beullens, M., Waelkens, E., Stalmans, W., and Bollen, M. (1997) Properties and phosphorylation sites of baculovirus-expressed nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP-1). *J Biol Chem* **272**, 32972-32978
32. Winkler, C., Rouget, R., Wu, D., Beullens, M., Van Eynde, A., and Bollen, M. (2018) Overexpression of PP1-NIPP1 limits the capacity of cells to repair DNA double-strand breaks. *J Cell Sci* **131**
33. Landsverk, H. B., Mora-Bermudez, F., Landsverk, O. J., Hasvold, G., Naderi, S., Bakke, O., Ellenberg, J., Collas, P., Syljuasen, R. G., and Kuntziger, T. (2010) The protein phosphatase 1 regulator PNUTS is a new component of the DNA damage response. *EMBO Rep* **11**, 868-875

34. Ferreira, M., Boens, S., Winkler, C., Szeker, K., Verbinnen, I., Van Eynde, A., Fardilha, M., and Bollen, M. (2017) The protein phosphatase 1 regulator NIPP1 is essential for mammalian spermatogenesis. *Sci Rep* **7**, 13364
35. Bracken, A. P., Ciro, M., Cocito, A., and Helin, K. (2004) E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci* **29**, 409–417
36. Adams, J. A., McGlone, M. L., Gibson, R., and Taylor, S. S. (1995) Phosphorylation modulates catalytic function and regulation in the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **34**, 2447–2454
37. Sawicka, A., Hartl, D., Goiser, M., Pusch, O., Stocsits, R. R., Tamir, I. M., Mechtler, K., and Seiser, C. (2014) H3S28 phosphorylation is a hallmark of the transcriptional response to cellular stress. *Genome Res* **24**, 1808–1820
38. Wells, J., Boyd, K. E., Fry, C. J., Bartley, S. M., and Farnham, P. J. (2000) Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells. *Mol Cell Biol* **20**, 5797–5807
39. Zhang, H. S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A. A., Ma, D., Luo, R. X., Harbour, J. W., and Dean, D. C. (2000) Exit from G1 and S Phase of the Cell Cycle Is Regulated by Repressor Complexes Containing HDAC–Rb–hSWI/SNF and Rb–hSWI/SNF. *Cell* **101**, 79–89
40. Rayman, J. B., Takahashi, Y., Indjeian, V. B., Dannenberg, J. H., Catchpole, S., Watson, R. J., te Riele, H., and Dynlacht, B. D. (2002) E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* **16**, 933–947
41. Blais, A., and Dynlacht, B. D. (2007) E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 658–662
42. Jarrett, S. G., Wolf Horrell, E. M., Christian, P. A., Vanover, J. C., Boulanger, M. C., Zou, Y., and D’Orazio, J. A. (2014) PKA-mediated phosphorylation of ATR promotes recruitment of XPA to UV-induced DNA damage. *Mol Cell* **54**, 999–1011
43. Qian, J., Lesage, B., Beullens, M., Van Eynde, A., and Bollen, M. (2011) PP1/Repo-man dephosphorylates mitotic histone H3 at T3 and regulates chromosomal aurora B targeting. *Curr Biol* **21**, 766–773
44. Tang, X., Hui, Z. G., Cui, X. L., Garg, R., Kastan, M. B., and Xu, B. (2008) A novel ATM-dependent pathway regulates protein phosphatase 1 in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **28**, 2559–2566
45. Zhu, S., Fisher, L. A., Bessho, T., and Peng, A. (2017) Protein phosphatase 1 and phosphatase 1 nuclear targeting subunit-dependent regulation of DNA-

- dependent protein kinase and non-homologous end joining. *Nucleic Acids Res* **45**, 10583–10594
46. Boudrez, A., Beullens, M., Groenen, P., Van Eynde, A., Vulsteke, V., Jagiello, I., Murray, M., Krainer, A. R., Stalmans, W., and Bollen, M. (2000) NIPP1-mediated interaction of protein phosphatase-1 with CDC5L, a regulator of pre-mRNA splicing and mitotic entry. *J Biol Chem* **275**, 25411–25417
 47. Deckert, J., Hartmuth, K., Boehringer, D., Behzadnia, N., Will, C. L., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H., and Luhrmann, R. (2006) Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions. *Mol Cell Biol* **26**, 5528–5543
 48. Jin, Q., van Eynde, A., Beullens, M., Roy, N., Thiel, G., Stalmans, W., and Bollen, M. (2003) The protein phosphatase-1 (PP1) regulator, nuclear inhibitor of PP1 (NIPP1), interacts with the polycomb group protein, embryonic ectoderm development (EED), and functions as a transcriptional repressor. *J Biol Chem* **278**, 30677–30685
 49. Roy, N., Van Eynde, A., Beke, L., Nuytten, M., and Bollen, M. (2007) The transcriptional repression by NIPP1 is mediated by Polycomb group proteins. *Biochim Biophys Acta* **1769**, 541–545
 50. Shi, Y., and Manley, J. L. (2007) A complex signaling pathway regulates SRp38 phosphorylation and pre-mRNA splicing in response to heat shock. *Mol Cell* **28**, 79–90
 51. Ogawa, S., Koga, S., Kuwabara, K., Brett, J., Morrow, B., Morris, S. A., Bilezikian, J. P., Silverstein, S. C., and Stern, D. (1992) Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *Am J Physiol* **262**, C546–554
 52. Comerford, K. M., Leonard, M. O., Cummins, E. P., Fitzgerald, K. T., Beullens, M., Bollen, M., and Taylor, C. T. (2006) Regulation of protein phosphatase 1gamma activity in hypoxia through increased interaction with NIPP1: implications for cellular metabolism. *J Cell Physiol* **209**, 211–218
 53. Nuytten, M., Beke, L., Van Eynde, A., Ceulemans, H., Beullens, M., Van Hummelen, P., Fuks, F., and Bollen, M. (2008) The transcriptional repressor NIPP1 is an essential player in EZH2-mediated gene silencing. *Oncogene* **27**, 1449–1460
 54. Van Eynde, A., Nuytten, M., Dewerchin, M., Schoonjans, L., Keppens, S., Beullens, M., Moons, L., Carmeliet, P., Stalmans, W., and Bollen, M. (2004) The

- nuclear scaffold protein NIPP1 is essential for early embryonic development and cell proliferation. *Mol Cell Biol* **24**, 5863–5874
55. Muller, M. R., and Rao, A. (2010) NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* **10**, 645–656
 56. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* **17**, 2205–2232
 57. Lin, Y., Song, Y., Zhang, Y., Shi, M., Hou, A., and Han, S. (2023) NFAT signaling dysregulation in cancer: Emerging roles in cancer stem cells. *Biomed Pharmacother* **165**, 115167
 58. Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin–cyclosporin A and FKBP–FK506 complexes. *Cell* **66**, 807–815
 59. Xu, W., Gu, J., Ren, Q., Shi, Y., Xia, Q., Wang, J., Wang, S., Wang, Y., and Wang, J. (2016) NFATC1 promotes cell growth and tumorigenesis in ovarian cancer up-regulating c-Myc through ERK1/2/p38 MAPK signal pathway. *Tumour Biol* **37**, 4493–4500
 60. Xin, B., Ji, K. Q., Liu, Y. S., and Zhao, X. D. (2021) NFAT Overexpression Correlates with CA72-4 and Poor Prognosis of Ovarian Clear-Cell Carcinoma Subtype. *Reprod Sci* **28**, 745–756
 61. Wang, S., Kang, X., Cao, S., Cheng, H., Wang, D., and Geng, J. (2012) Calcineurin/NFATc1 pathway contributes to cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* **57**, 3184–3188
 62. Manda, K. R., Tripathi, P., Hsi, A. C., Ning, J., Ruzinova, M. B., Liapis, H., Bailey, M., Zhang, H., Maher, C. A., Humphrey, P. A., Andriole, G. L., Ding, L., You, Z., and Chen, F. (2016) NFATc1 promotes prostate tumorigenesis and overcomes PTEN loss-induced senescence. *Oncogene* **35**, 3282–3292
 63. Pham, L. V., Tamayo, A. T., Yoshimura, L. C., Lin-Lee, Y. C., and Ford, R. J. (2005) Constitutive NF- κ B and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood* **106**, 3940–3947
 64. Shoshan, E., Braeuer, R. R., Kamiya, T., Mobley, A. K., Huang, L., Vasquez, M. E., Velazquez-Torres, G., Chakravarti, N., Ivan, C., Prieto, V., Villares, G. J., and Bar-Eli, M. (2016) NFAT1 Directly Regulates IL8 and MMP3 to Promote Melanoma Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res* **76**, 3145–3155

65. Tie, X., Han, S., Meng, L., Wang, Y., and Wu, A. (2013) NFAT1 is highly expressed in, and regulates the invasion of, glioblastoma multiforme cells. *PLoS One* **8**, e66008
66. Liu, J. F., Zhao, S. H., and Wu, S. S. (2013) Depleting NFAT1 expression inhibits the ability of invasion and migration of human lung cancer cells. *Cancer Cell Int* **13**, 41
67. Corral, R. S., Iniguez, M. A., Duque, J., Lopez-Perez, R., and Fresno, M. (2007) Bombesin induces cyclooxygenase-2 expression through the activation of the nuclear factor of activated T cells and enhances cell migration in Caco-2 colon carcinoma cells. *Oncogene* **26**, 958-969
68. Yiu, G. K., and Toker, A. (2006) NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **281**, 12210-12217
69. Quang, C. T., Leboucher, S., Passaro, D., Fuhrmann, L., Nourieh, M., Vincent-Salomon, A., and Ghysdael, J. (2015) The calcineurin/NFAT pathway is activated in diagnostic breast cancer cases and is essential to survival and metastasis of mammary cancer cells. *Cell Death Dis* **6**, e1658
70. Koenig, A., Linhart, T., Schlegemann, K., Reutlinger, K., Wegele, J., Adler, G., Singh, G., Hofmann, L., Kunsch, S., Buch, T., Schafer, E., Gress, T. M., Fernandez-Zapico, M. E., and Ellenrieder, V. (2010) NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* **138**, 1189-1199 e1181-1182
71. Brun, M., Glubrecht, D. D., Baksh, S., and Godbout, R. (2013) Calcineurin regulates nuclear factor I dephosphorylation and activity in malignant glioma cell lines. *J Biol Chem* **288**, 24104-24115
72. Masaki, T., Habara, M., Sato, Y., Goshima, T., Maeda, K., Hanaki, S., and Shimada, M. (2021) Calcineurin regulates the stability and activity of estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**
73. Medyouf, H., Alcalde, H., Berthier, C., Guillemin, M. C., dos Santos, N. R., Janin, A., Decaudin, D., de The, H., and Ghysdael, J. (2007) Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* **13**, 736-741
74. Masuo, T., Okamura, S., Zhang, Y., and Mori, M. (2009) Cyclosporine A inhibits colorectal cancer proliferation probably by regulating expression levels of c-Myc, p21(WAF1/CIP1) and proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Lett* **285**, 66-72

75. Goshima, T., Habara, M., Maeda, K., Hanaki, S., Kato, Y., and Shimada, M. (2019) Calcineurin regulates cyclin D1 stability through dephosphorylation at T286. *Sci Rep* **9**, 12779
76. Masaki, T., Habara, M., Hanaki, S., Sato, Y., Tomiyasu, H., Miki, Y., and Shimada, M. (2023) Calcineurin-mediated dephosphorylation enhances the stability and transactivation of c-Myc. *Sci Rep* **13**, 13116
77. Masaki, T., Habara, M., Shibutani, S., Hanaki, S., Sato, Y., Tomiyasu, H., and Shimada, M. (2023) Dephosphorylation of the EGFR protein by calcineurin at serine 1046/1047 enhances its stability. *Biochem Biophys Res Commun* **641**, 84–92
78. Huang, C. C., Wang, J. M., Kikkawa, U., Mukai, H., Shen, M. R., Morita, I., Chen, B. K., and Chang, W. C. (2008) Calcineurin-mediated dephosphorylation of c-Jun Ser-243 is required for c-Jun protein stability and cell transformation. *Oncogene* **27**, 2422–2429
79. Brignall, R., Cauchy, P., Bevington, S. L., Gorman, B., Pisco, A. O., Bagnall, J., Boddington, C., Rowe, W., England, H., Rich, K., Schmidt, L., Dyer, N. P., Travis, M. A., Ott, S., Jackson, D. A., Cockerill, P. N., and Paszek, P. (2017) Integration of Kinase and Calcium Signaling at the Level of Chromatin Underlies Inducible Gene Activation in T Cells. *J Immunol* **199**, 2652–2667
80. Medvar, B., Raghuram, V., Pisitkun, T., Sarkar, A., and Knepper, M. A. (2016) Comprehensive database of human E3 ubiquitin ligases: application to aquaporin-2 regulation. *Physiol Genomics* **48**, 502–512
81. Li, W., Bengtson, M. H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V. A., Orth, A., Chanda, S. K., Batalov, S., and Joazeiro, C. A. (2008) Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* **3**, e1487
82. Krug, K., Jaehnig, E. J., Satpathy, S., Blumenberg, L., Karpova, A., Anurag, M., Miles, G., Mertins, P., Geffen, Y., Tang, L. C., Heiman, D. I., Cao, S., Maruvka, Y. E., Lei, J. T., Huang, C., Kothadia, R. B., Colaprico, A., Birger, C., Wang, J., Dou, Y., Wen, B., Shi, Z., Liao, Y., Wiznerowicz, M., Wyczalkowski, M. A., Chen, X. S., Kennedy, J. J., Paulovich, A. G., Thiagarajan, M., Kinsinger, C. R., Hiltke, T., Boja, E. S., Mesri, M., Robles, A. I., Rodriguez, H., Westbrook, T. F., Ding, L., Getz, G., Clauser, K. R., Fenyo, D., Ruggles, K. V., Zhang, B., Mani, D. R., Carr, S. A., Ellis, M. J., Gillette, M. A., and Clinical Proteomic Tumor Analysis, C.

- (2020) Proteogenomic Landscape of Breast Cancer Tumorigenesis and Targeted Therapy. *Cell* **183**, 1436–1456 e1431
83. Asmamaw, M. D., Liu, Y., Zheng, Y. C., Shi, X. J., and Liu, H. M. (2020) Skp2 in the ubiquitin–proteasome system: A comprehensive review. *Med Res Rev* **40**, 1920–1949
84. Frescas, D., and Pagano, M. (2008) Deregulated proteolysis by the F–box proteins SKP2 and beta–TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 438–449
85. Carrano, A. C., Eytan, E., Hershko, A., and Pagano, M. (1999) SKP2 is required for ubiquitin–mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* **1**, 193–199
86. Bornstein, G., Bloom, J., Sitry–Shevah, D., Nakayama, K., Pagano, M., and Hershko, A. (2003) Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem* **278**, 25752–25757
87. Qin, J. J., Nag, S., Wang, W., Zhou, J., Zhang, W. D., Wang, H., and Zhang, R. (2014) NFAT as cancer target: mission possible? *Biochim Biophys Acta* **1846**, 297–311
88. Mognol, G. P., Carneiro, F. R., Robbs, B. K., Faget, D. V., and Viola, J. P. (2016) Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death Dis* **7**, e2199
89. Singh, S. K., Baumgart, S., Singh, G., Konig, A. O., Reutlinger, K., Hofbauer, L. C., Barth, P., Gress, T. M., Lomberk, G., Urrutia, R., Fernandez–Zapico, M. E., and Ellenrieder, V. (2011) Disruption of a nuclear NFATc2 protein stabilization loop confers breast and pancreatic cancer growth suppression by zoledronic acid. *J Biol Chem* **286**, 28761–28771
90. Herbst, S., Shah, A., Mazon Moya, M., Marzola, V., Jensen, B., Reed, A., Birrell, M. A., Saijo, S., Mostowy, S., Shaunak, S., and Armstrong–James, D. (2015) Phagocytosis–dependent activation of a TLR9–BTK–calcineurin–NFAT pathway co–ordinates innate immunity to *Aspergillus fumigatus*. *EMBO Mol Med* **7**, 240–258
91. Jie, J., Li, W., Wang, G., and Xu, X. (2021) FK506 ameliorates osteoporosis caused by osteoblast apoptosis via suppressing the activated CaN/NFAT pathway during oxidative stress. *Inflamm Res* **70**, 789–797
92. Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44–57

93. Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* **37**, 1–13
94. Martin, M. (2011) Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnetjournal*
95. Schmieder, R., and Edwards, R. (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* **27**, 863–864
96. Steward, C. A., Humphray, S., Plumb, B., Jones, M. C., Quail, M. A., Rice, S., Cox, T., Davies, R., Bonfield, J., Keane, T. M., Nefedov, M., de Jong, P. J., Lyons, P., Wicker, L., Todd, J., Hayashizaki, Y., Gulban, O., Danska, J., Harrow, J., Hubbard, T., Rogers, J., and Adams, D. J. (2010) Genome-wide end-sequenced BAC resources for the NOD/MrkTac() and NOD/ShiLtJ() mouse genomes. *Genomics* **95**, 105–110
97. Church, D. M., Goodstadt, L., Hillier, L. W., Zody, M. C., Goldstein, S., She, X., Bult, C. J., Agarwala, R., Cherry, J. L., DiCuccio, M., Hlavina, W., Kapustin, Y., Meric, P., Maglott, D., Birtle, Z., Marques, A. C., Graves, T., Zhou, S., Teague, B., Potamouisis, K., Churas, C., Place, M., Herschleb, J., Runnheim, R., Forrest, D., Amos-Landgraf, J., Schwartz, D. C., Cheng, Z., Lindblad-Toh, K., Eichler, E. E., Ponting, C. P., and Mouse Genome Sequencing, C. (2009) Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol* **7**, e1000112
98. Church, D. M., Schneider, V. A., Graves, T., Auger, K., Cunningham, F., Bouk, N., Chen, H. C., Agarwala, R., McLaren, W. M., Ritchie, G. R., Albracht, D., Kremitzki, M., Rock, S., Kotkiewicz, H., Kremitzki, C., Wollam, A., Trani, L., Fulton, L., Fulton, R., Matthews, L., Whitehead, S., Chow, W., Torrance, J., Dunn, M., Harden, G., Threadgold, G., Wood, J., Collins, J., Heath, P., Griffiths, G., Pelan, S., Grafham, D., Eichler, E. E., Weinstock, G., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Howe, K., Flicek, P., and Hubbard, T. (2011) Modernizing reference genome assemblies. *PLoS Biol* **9**, e1001091
99. Bayona-Bafaluy, M. P., Acin-Perez, R., Mullikin, J. C., Park, J. S., Moreno-Loshuertos, R., Hu, P., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., Bai, Y., and Enriquez, J. A. (2003) Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence. *Nucleic Acids Res* **31**, 5349–5355
100. Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., and Kingsford, C. (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* **14**, 417–419

101. Sonesson, C., Love, M. I., and Robinson, M. D. (2015) Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res* **4**, 1521
102. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545–15550
103. Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdottir, H., Ghandi, M., Mesirov, J. P., and Tamayo, P. (2015) The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* **1**, 417–425
104. Prieto, C., and Barrios, D. (2019) RaNA-Seq: Interactive RNA-Seq analysis from FASTQ files to functional analysis. *Bioinformatics*
105. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140
106. Chen, Y., Lun, A. T., and Smyth, G. K. (2016) From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Res* **5**, 1438
107. McCarthy, D. J., Chen, Y., and Smyth, G. K. (2012) Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* **40**, 4288–4297
108. Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D., and Groop, L. C. (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* **34**, 267–273
109. Goldman, M. J., Craft, B., Hastie, M., Repecka, K., McDade, F., Kamath, A., Banerjee, A., Luo, Y., Rogers, D., Brooks, A. N., Zhu, J., and Haussler, D. (2020) Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol* **38**, 675–678
110. Oki, S., Ohta, T., Shioi, G., Hatanaka, H., Ogasawara, O., Okuda, Y., Kawaji, H., Nakaki, R., Sese, J., and Meno, C. (2018) ChIP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public ChIP-seq data. *EMBO Rep* **19**

謝辞

本研究および論文の作製を進めるにあたり、懇切なご指導およびご助言を頂いた名古屋大学 医学系研究科 分子生物学 島田緑教授、山口大学 共同獣医学部 獣医生化学研究室 羽原誠助教、獣医薬理学研究室 大浜剛准教授に心より厚く感謝の意を表します。

東京大学 医科学研究所 中西真教授および金沢大学 がん進展制御研究所 城村由和教授には様々な材料を提供していただきました。宮城県立がんセンター がん薬物療法研究部 田沼延公先生には NIPP1 関連のプラスミドを提供していただきました。東京医科歯科大学 高等研究院 制がんストラテジー研究室 中山敬一教授には、pcDNA3-FLAG-mouse-SKP2、pPGK-puroR、pX330 のプラスミドを提供していただきました。心より厚く感謝の意を表します。

また、本論文を作製するにあたり懇切丁寧なご指導およびご助言を頂いた山口大学 獣医生化学研究室の佐藤悠紀後輩、富安遥己後輩、三木陽清後輩、川崎直子研究技術員に心より感謝いたします。

また、私を暖かく見守ってくれた父・花木基行、母・花木里美、弟・花木優介、亮介に心より感謝の意を表します。