

論文内容要旨

Prolyl isomerase Pin1 binds to and stabilizes acetyl CoA
carboxylase 1 protein, thereby supporting cancer cell proliferation

(プロリルイソメラーゼ Pin1 はアセチル CoA カルボキシラーゼ 1 タンパク質
に結合して安定化させる。結果として癌細胞増殖を支持する。)

Oncotarget, 10(17): 1637-1648, 2019.

主指導教員：浅野 知一郎 教授

(医系科学研究科 医化学)

副指導教員：吉栖 正生 教授

(医系科学研究科 心臓血管生理医学)

副指導教員：中津 祐介 講師

(医系科学研究科 医化学)

上田 晃嗣

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

プロリルイソメラーゼ Pin1 は、多くの癌種で発現が増加しており、予後不良因子として報告されている。癌細胞や癌組織での異常シグナル経路の多くで中心的な共通伝達機構となるプロリン指向性リン酸化であり、多くのキナーゼおよびホスファターゼによって調節されている。これらのリン酸化タンパク質の構造と機能を Pin1 が制御している。Pin1 は現在 50 以上の癌蛋白の活性化や癌抑制蛋白質の抑制に作用していることが分かっており、両者のバランスを破綻させることによって癌および癌幹細胞を促進している。

一方で、癌組織では急速な細胞増殖のため細胞膜の原料やエネルギー源として十分な脂肪酸 (FA) が必要であり、パルミチン酸やステアリン酸、オレイン酸といった FA を供給するために脂肪酸合成も正常組織に比べて活発に行われている。このため脂肪酸合成の酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼ 1 (ACC1) や脂肪酸合成酵素 (FASN) は癌組織で豊富に発現されている。

今回我々は、ヒト前立腺癌において Pin1 の発現レベルが ACC1 レベルと正の相関があることを見出し、Pin1 と ACC1 の相互作用に着目して解析を行った。

まず Pin1 の脂肪酸合成への影響を確認するために、前立腺癌細胞株である DU145 を Pin1-siRNA で処理 (Pin1-KD) してからの FA 変化を Lipidomics で解析した。Pin1-KD で主要な FA であるパルミチン酸やステアリン酸、オレイン酸の合成は全て低下している結果であった。

前立腺癌細胞株である DU145 と LNCAP の両者において、免疫沈降法により Pin1 と ACC1 が結合が確認できたため、次に HEK293T 細胞を使用した過剰発現系での実験からも Pin1 と ACC1 の結合を確認した。一方で、サブタイプであるアセチル CoA カルボキシラーゼ 2 (ACC2) とは結合しないことが確認された。

相互の結合部位に関しては、pcDNA3.1(-)vector を使用した ACC1 変異蛋白を使用した。Pin1 への結合部位の候補である Ser, Thr の配列を Ala に置換した変異蛋白を作成し、Pin1 との結合低下をみることで結合部位を同定した。ACC1 のカルボキシル基の転移活性を有するドメイン (S1705, T2229) と Pin1 の結合ドメインである WW ドメイン (W34) であることを同定した。

また、Pin1 の発現変化による ACC1 蛋白量の変化を確認するための実験を DU145 で行った。CRISPR-Cas9 を使用した Pin1 ノックアウト (Pin1-KO) と Pin1-KD の Pin1 遺伝子の抑制処理に加えて Pin1 阻害剤であるジユグロン処理を行った。すべての Pin1 抑制処理で、ACC1 の mRNA レベルに影響を及ぼすことなく ACC1 タンパク質を著しく減少させた。さらには Pin1 の過剰発現では ACC1 タンパク質レベルの増加が認められ、Pin1 と ACC1 の発現は相関を示すことが確認された。

ここで Pin1 による ACC1 の安定化作用を考え、Pin1-KD へのシクロヘキシミド処理による ACC1 の半減期を確認したところ、Pin1-KD で有意に半減期の短縮を認めた。この結果から Pin1 による蛋白分解抑制による安定化と考え、リソソームの阻害作用を有するクロロキンとユビキチン-プロテアソームの阻害作用を有する MG-132 での処理による解析を行った。ここで Pin1-KD での ACC1 タンパク質の減少は、MG-132 処理には影響せず、クロロキン処理でのみ回復することが確認された。これは、Pin1 がユビキチンプロテアソーム経路ではなくリソソーム経路を通じて ACC1 の分解を抑制したことを示しているものと考えられた。

これらの結果から Pin1 が ACC1 の分解経路を阻害することで安定化させ、結果として蛋白レベルの増加をもたらすと結論した。これらの知見から、癌細胞における Pin1 の増殖促進効果は、ACC1 タンパク質の安定化による癌脂質代謝の変化による影響が考えられ、これらの代謝変化により部分的に媒介されるものと思われた。