

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	上田 晃嗣
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1, 2 項該当		
論文題目 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。)			
論文審査担当者			
主査	教授	今泉 和則	印
審査委員	教授	杉山 一彦	
審査委員	教授	安井 弥	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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。癌細胞におけるシグナル経路の異常は、多くのキナーゼおよびホスファターゼによるリン酸化の制御によって引き起こされている。現在までに、Pin1 は、細胞増殖や生存を活性化させる 30 以上のタンパクの活性化や安定化、一方、増殖抑制やアポトーシス誘導に関わる 20 程度のタンパクに対しては活性の抑制や分解促進に作用していることが分かっている。Pin1 は、これら複数のターゲットタンパクに作用し、細胞増殖と細胞死のバランスを、増殖側に誘導することによって癌および癌幹細胞を活性化している。</p> <p>一方、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。</p> <p>本研究において、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ている。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 量の変化を Lipidomics で解析した。Pin1 発現量を減少させると、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することが判明した。</p> <p>そこで、Pin1 と脂肪酸合成酵素との関連に着目し、前立腺癌細胞株である DU145 と LNCAP の両者において、Pin1 と ACC1 の結合を免疫沈降法により証明した。さらに、HEK293T 細胞での過剰発現系の実験からも Pin1 と ACC1 の結合は確認された。相互の結合部位の同定のために、ACC1 と Pin1 の両変異タンパクをコードする cDNA を pcDNA3.1(-)vector に挿入し、細胞に発現させることで結合の有無を検討した。さらに、Pin1 への結合部位の候補である Ser/Thr-Pro を含む配列中の Ser/Thr を Ala に置換した変異 ACC1 タンパクを作成した。その結果、Pin1 と ACC1 の結合は、ACC1 のカルボキシル基の転移活性を有するドメイン内の Ser1705-Pro、Thr2229-Pro の 2 箇所と、Pin1 側の結合ドメインである WW ドメイン (W34) が関与していることが明らかとなった。</p>			

続けて、Pin1 の発現変化による ACC1 タンパク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 を行った DU145 に加えて、Pin1 阻害剤であるジユグロン処理を行った DU145 では、ACC1 の mRNA レベルに影響を及ぼすことなく ACC1 タンパク量が著しく減少していた。逆に、Pin1 の過剰発現では ACC1 タンパク量の増加が認められ、Pin1 と ACC1 の発現は正の相関を示すことが確認された。

これらの結果から、Pin1 による ACC1 の安定化作用を考え、シクロヘキシミド処理後の ACC1 半減期における Pin1-KD の影響を検討したところ、Pin1-KD で有意に半減期の短縮を認めた。さらに、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 タンパクの減少は、MG-132 処理には影響を受けず、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、リソソーム経路を介する ACC1 の分解を抑制したことを示唆しているものと考えられる。

このことから Pin1 は ACC1 に結合し、その分解経路を阻害することで安定化させ、結果としてタンパクレベルの増加をもたらし、細胞内の脂肪酸合成の促進に関与することが示唆された。

以上の結果から、本論文は既知の Pin1 の細胞増殖に加えて、脂肪酸合成酵素である ACC1 との直接的な結合を介した代謝による相加的な作用を明らかにした。Pin1 による脂質代謝酵素への直接的な変化の報告は初であり、この機序は脂肪肝などの代謝性疾患への成因となっている可能性がある。

よって審査委員会委員全員は、本論文が上田晃嗣に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。