

博士論文

プロリン異性化酵素 Pin1 による
リン酸化蛋白質を介した新奇生理機能解析

清水 泰希

平成 30 年

博士論文

プロリン異性化酵素 Pin1 による
リン酸化蛋白質を介した
新奇生理機能解析

東北大学大学院農学研究科
応用生命科学専攻

清水 泰希

指導教員 内田 隆史

目次

目次	2
凡例	4
序章	5
第一章 Pin1 による薬剤耐性制御機構	
序論	6
方法	8
本論	10
1. 癌細胞株における Pin1 と P 糖蛋白質の相関関係	
2. Pin1 による転写因子 FoxO3 の活性制御	
結論	13
第二章 Pin1 による血小板産生機構制御	
序論	14
方法	17
本論	20
1. Pin1 ^{-/-} マウスにおける巨核球系細胞数の増加	
2. Pin1 は胞体突起形成を促進する	
3. 胞体突起形成に伴う tau の発現誘導	

4. Meg-01 細胞における tau と Pin1 の相互作用

5. 細胞内において Pin1 は tau の機能を高める

結論	28
終章	30
参考文献	31
謝辞	36

凡例

Pin1	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase NIMA-interacting 1
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
ABC transporter	ATP-binding cassette transporters
UV	ultra violet
MEF	mouse embryonic fibroblast
Pin1 ^{-/-}	Pin1 knockout
p53 ^{-/-}	p53 knockout
FoxO3	Forkhead Box O3
AMPK	AMP-activated protein kinase
FBS	Fetal bovine serum
DMSO	Dimethyl sulfoxide
SDS	Sodium dodecyl sulfate
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
MAPs	microtubule associated proteins

序章

身体的健康を保つとは何を意味するのであろうか。それは生体内の恒常性維持であると考えられる。生体内では常に細胞間・細胞内での情報伝達が繰り返され、あらゆる刺激、環境、成長などに対して迅速かつ的確に応答できるようになっている。しかしこの情報伝達経路が破綻すると、誤った情報伝達が続けられることとなり、これが様々な病気や加齢疾患の元となる老化へと繋がる。従って情報伝達経路の制御は恒常性維持の要となる。

細胞内における情報伝達とはつまり蛋白質の活性制御を介したシグナル伝達である。Peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase NIMA-interacting 1 (Pin1)はリン酸化されたセリン/スレオニンに続くプロリンを特異的に認識し、異性を触媒する酵素である。Pin1はN末端側の基質認識部位であるWWドメインとC末端側の触媒部位であるPPIaseドメインからなる。蛋白質中のプロリンの前に存在するセリンあるいはスレオニンがキナーゼによってリン酸化されると、Pin1はリン酸化部位に結合してプロリン残基の異性を触媒し、構造変化を促す¹。その結果、リン酸化蛋白質は活性を有したり、別の蛋白質との相互作用を有する。リン酸化は生体内の非常に広い範囲で見られることから、Pin1もまたこうした生体反応を潤滑に進めるうえで欠かせない蛋白質と考えられる。既に相互作用の知られている因子としても、p53やc-Mycなどの転写因子、Cdc25やCyclinD1などの細胞周期制御因子、tauやアミロイドβ前駆体などの神経変性疾患関連因子、GSK3βやIRS1などの代謝関連因子という具合に幅広い²。

本研究では薬剤耐性制御機構および血小板産生機構に着目し、Pin1の新奇機能解析を行うこととした。

第一章

Pin1 による薬剤耐性制御機構

序論

【背景】

加齢疾患の中でも癌に罹る確率は極めて高く、生涯で 40~50%もの人が癌に罹るとされている。現在、癌の主たる治療法には外科療法、放射線療法、化学療法との3つがある。外科療法や放射線療法では局所的な治療の場合有効であるが、血液などの癌や転移の見られる場合などには化学療法による広範囲な治療が有効である。また、化学療法は外科療法や放射線療法と組み合わせて行われることもあり、非常に幅広く癌治療に用いられている。

化学療法として用いられる抗癌剤には豊富な種類が存在し、それぞれが特定のターゲット因子に作用することで癌細胞の細胞増殖阻害や、アポトーシス誘導を行う。従って、複数の抗癌剤を組み合わせることでより効率的な癌の排除を行うことも可能である。しかしながらこの治療法は、常に副作用を懸念しなければならない。本論文では、化学療法による副作用の一種である薬剤耐性に関して報告する。

【薬剤耐性の獲得】

抗癌剤の長期暴露は、次第にその効果を薄めていく。その原因として、抗癌剤によって誘導されるアポトーシスの回避機構獲得や、P糖蛋白質を主とするABCトランスポーターの過剰発現、そして遺伝子変異によるターゲット蛋白質の構造変化などが挙げられる³。その結果、癌細胞は異なる作用機序を持つ様々な抗癌剤に対して耐性を持つことが多い。

【薬剤耐性と Pin1】

ドキシソルビシンなどの抗癌剤やUVによってもたらされるDNA損傷に対して、Pin1はp53依存的にアポトーシスの誘導を促しており、Pin1^{-/-}マウスの線維芽細胞(MEF)では薬剤感受性が低くなることが知られている^{4,5}。一方で、Pin1^{+/-}p53^{-/-}およびPin1^{-/-}p53^{-/-}のMEFに対しドキシソルビシンを暴露した際にもPin1が欠損している方で薬剤感受性が低いことを当研究室で明らかとした。従ってPin1はp53非依存的に薬剤感受性を高める働きを担っているこ

とが示唆された。

当研究室では、その原因を探るために ABC トランスポーターなどが担う薬剤排出能を解析し、Pin1^{-/-}p53^{-/-}MEF の方では高い薬剤排出能を有していることを明らかとしていた。そこでこれら MEF における P 糖蛋白質の発現量を解析した結果、Pin1^{-/-}p53^{-/-}MEF では mRNA レベルで高くなっており、Pin1 が P 糖蛋白質遺伝子の転写を抑制していることが明らかとなっていた。

【P 糖蛋白質】

P 糖蛋白質(P-glycoprotein、P-gp)は 12 回膜貫通ドメインおよび 2 つの ATP 結合ドメインを有する ATP 依存的な化合物排出ポンプであり、*mdr-1* 遺伝子によってコードされている^{6,7}。見かけ上の分子量はおよそ 130~180 kDa ほどであり、糖鎖修飾の違いによって細胞腫間ごとや発現のタイミングによって分子量は変化する。P 糖蛋白質の最大の特徴は、基質特異性の低さにあり、あらゆる毒性物質や薬などを排出してしまう。多剤耐性を獲得した癌細胞株では P 糖蛋白質の過剰発現が見られることから、P 糖蛋白質の発現制御が薬剤耐性獲得を阻止する上で重要であると考えられる。

薬剤暴露された細胞では、いくつかの転写因子を介して P 糖蛋白質遺伝子の転写が誘導され、薬剤の排出を行う。

【Forkhead Box O3】

DNA 結合領域である Fork head domain を有する FoxO3 は、DNA の (G/C)(T/A)AA(C/T)AA 領域を認識し転写を制御する因子である⁸。FoxO3 はアポトーシスや酸化ストレス、細胞周期など非常に様々なシグナルに関与しており、老化や寿命を左右する因子とされている^{9,10}。FoxO3 の活性は AKT や PI3K、AMPK など様々なキナーゼによるリン酸化によって制御されている他、アセチル化やメチル化などの修飾によっても制御されている¹¹。そして FoxO3 は P 糖蛋白質遺伝子の転写も促すことが報告されている¹²。

【目的】

そこで本研究では FoxO3 に着目し、Pin1 による P 糖蛋白質の発現制御機構の解明を行うこととした。

【方法】

・細胞培養

HT29 (ヒト結腸腺癌株)、HCT116 (ヒト大腸癌株)、KF28 (ヒト卵巣癌株)、HeLa (ヒト子宮頸癌株)、A549 (ヒト肺胞基底上皮腺癌株)、PANC-1 (ヒト膵臓腺癌株)、MCF7 (ヒト乳腺癌株)、SK-BR-3 (ヒト乳癌株)、MDA-MB-231 (ヒト乳腺癌株) および HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞) は全て 10% FBS、1% ペニシリンストレプトマイシン (ナカライテスク) 含有 DMEM 培地 (ナカライテスク) を用いて 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

・薬剤処理

ドキシソルビシン (和光純薬) は DMSO に溶解し、終濃度 0.4 µg/ml で使用した。

・Western blotting

細胞をプロテアーゼインヒビターカクテル (ナカライテスク) およびホスファターゼインヒビターカクテル (ナカライテスク) の入った SDS サンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl, 5% スクロース、2% SDS、5% βメルカプトエタノール、pH 6.8) あるいは RIPA バッファー (25 mM Tris-HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 1% SDS) に溶解しソニケーション後 20,600 × g、4°C にて 10 分遠心し上清をサンプルとして回収した。SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、下記の抗体を用いてたんぱく質の発現を解析した。Anti-Pin1 antibody (Cell Signaling Technology)、Anti-MDR1 antibody (santa cruz biotechnology)。二次抗体には HRP conjugated secondary antibody を用いた。検出には chemiluminescence を用い、バンドは LAS-3000 (Fuji Film) を用いて確認した。

・GST-pull down assay

foxo3 vector をトランスフェクションした HEK293 細胞をプロテアーゼインヒビターカクテル (ナカライテスク) およびホスファターゼインヒビターカクテル (ナカライテスク) の入った Lysis バッファー (50 mM Tris-HCl, pH7.6, 50 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM EDTA) に溶解しソニケーション後 20,600 × g、4°C にて 30 分遠心し上清をサンプルとして回収した。ライセート、GST 蛋白質または GST-Pin1 蛋白質、およびグルタチオンアガロースビーズ (QIAGEN) を Binding バッファー (20 mM Hepes pH8.0, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl) 中で 4°C にて 4 時間インキュベートした。その後 Binding バッ

ァーで洗浄し、サンプルバッファーにて溶出した。SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、下記の抗体を用いてたんぱく質の発現を解析した。Anti-Pin1 antibody (Cell Signaling Technology)、Anti-FKHRL-1 (=FoxO3) antibody (santa cruz biotechnology)。二次抗体には HRP conjugated secondary antibody を用いた。検出には chemiluminescence を用い、バンドは LAS-3000 (Fuji Film) を用いて確認した。

- ・ 共免疫沈降法

MCF7 細胞を IP buffer (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.5% sodium deoxycholate、1% NP-40、0.1% SDS、pH 8.0) に溶解した。ライセートに anti-FKHRL1 antibody または normal rabbit IgG (santa cruz biotechnology) を加え 4° C にてオーバーナイトでインキュベートした。その後 protein A/G plus agarose (santa cruz biotechnology) を加え 2 時間インキュベートし、ビーズを 3 回洗浄後溶出し Western blotting を行った。

- ・ FoxO3 レポーターアッセイ

96well plate に播種した HEK293 細胞に *foxo3* vector、*pin1* vector、そして FoxO3 レポーターベクター (BPS Bioscience) をトランスフェクションし、48 時間後に回収した。ルシフェラーゼアッセイには dual luciferase reporter assay system (Promega) を用いて、プロトコールの指示に従った。

- ・ 統計解析

統計的数値は means \pm SD で表した。また統計的優位差は Student's *t* test で求め、 $p < 0.05$ を統計的に優位な差とした。

本論

1. 癌細胞株における Pin1 と P 糖蛋白質の相関関係

1-1 緒言

これまでに本研究室では MEF を用いた研究から、Pin1^{-/-}マウスでは P 糖蛋白質の過剰な発現が明らかとなっていた。そこで、癌細胞株においても Pin1 と P 糖蛋白質の発現に相関がみられるのかを Western blot により解析することとした。使用した癌細胞株は以下に示したいくつかの異なる臓器由来の癌細胞株を用いることとした。HT29 (ヒト結腸腺癌株)、HCT116 (ヒト大腸癌株)、KF28 (ヒト卵巣癌株)、HeLa (ヒト子宮頸癌株)、A549 (ヒト肺胞基底上皮腺癌株)、PANC-1 (ヒト膵臓腺癌株)、MCF7 (ヒト乳癌株)、SK-BR-3 (ヒト乳癌株)、MDA-MB-231 (ヒト乳癌株)。

1-2 各種癌細胞株における Pin1 と P 糖蛋白質の発現解析

各種癌細胞株を 48 時間培養後ライセートにし、Pin1 および P 糖蛋白質の発現量を Western blotting により解析した (Fig. 1A)。P 糖蛋白質はおよそ 130 kDa ~180 kDa の分子量の位置に見られ、その大きさは修飾状況により変化する。その位置のバンド全てを P 糖蛋白質として Pin1 の発現量とともに定量を行い、相関グラフを作成した。その結果、Pin1 の発現が多いほど P 糖蛋白質の発現量は減少している傾向が見られた (Fig. 1B)。また、いくつかの癌細胞株を用いてドキソルビシンによる P 糖蛋白質の発現応答を解析したところ、Pin1 と P 糖蛋白質の発現量に、より強い逆相関関係が見られた。(Fig. 1C,D)。

1-3 考察

癌細胞株において Pin1 の発現量が多いと P 糖蛋白質の発現量は低い逆相関を示す結果は、MEF において Pin1 が P 糖蛋白質の発現を抑制するというこれまでの当研究室で明らかとなっていた研究結果と一致する。さらに抗癌剤であるドキソルビシンによる P 糖蛋白質の誘導に対して、より強い Pin1 と P 糖蛋白質の発現相関が見られた。従って、Pin1 は癌細胞においても P 糖蛋白質の発現を制御していることが明らかとなった。

2. Pin1 による転写因子 FoxO3 の活性制御

2-1 緒言

P 糖蛋白質の転写を制御する因子の一つに p53 が存在する。p53 は P 糖蛋白質の発現を抑制する作用を持ち¹³、さらに Pin1 はリン酸化 p53 に作用することで安定化を促すことが知られている¹⁴。従って、Pin1 が p53 を介して P 糖蛋白質の発現を抑制していると考えられたが、当研究室ではこれまでの研究から p53 非依存的に Pin1 が P 糖蛋白質を制御していることが示唆されていた。そこで、P 糖蛋白質の転写を促進する因子であり、リン酸化による活性制御を受けている FoxO3 に着目した。FoxO3 と Pin1 の相互作用に関しては、結合する事のみが報告されている¹⁵。

2-2 Pin1 と FoxO3 の結合解析

まず初めに、Pin1 と FoxO3 の結合を確認することとした。HEK293 細胞に pflag-*foxo3* vector を導入し FoxO3 を過剰発現させライセートにした後、精製した GST-Pin1 を用いて pull down assay を行った。また、Pin1 W34A 変異体をネガティブコントロールとして用いた。WW ドメイン中に存在する 34 番目のトリプトファンに変異を入れることで Pin1 はリン酸化基質との結合能を失う。その結果、野生型の Pin1 でのみ FoxO3 との結合を確認することができた (Fig. 2A)。

次に、内在性の Pin1 と FoxO3 の結合も確認するため、乳癌細胞株 MCF7 を用いて共免疫沈降を行った。MCF7 ライセートに anti-FoxO3 antibody を加え、免疫沈降を行った後、ウェスタンブロットにより Pin1 を検出した。その結果、内在性の Pin1 と FoxO3 も相互作用を有していることが確認できた (Fig. 2B)。

2-3 Pin1 による FoxO3 の転写活性制御解析

Pin1 と FoxO3 の結合を確認できたことから、次に Pin1 による FoxO3 の機能制御を解析した。HEK293 細胞に pflag-*foxo3* vector、FOXO luciferase reporter vector、と empty vector, *pin1* vector または *pin1 w34a* vector のいずれかを導入し FoxO3 と Pin1 を共発現させ、それぞれの細胞のルシフェラーゼ蛍光を測定した。その結果、野生型 Pin1 を共発現させた際に蛍光の減少が見られ、Pin1 が FoxO3 の活性を抑制していることが明らかとなった (Fig. 2C)。

2-4 考察

Pin1 と FoxO3 の結合に関して、pull down および免疫沈降法により確認ができた。さらにいくつかの既知 FoxO3 リン酸化サイトに対して変異 (S173A, S325A, S344A, S425A, S574A) を入れ Pin1 との結合サイト同定を試みたが、全ての箇所 Pin1 との結合が見られた (data not shown)。他のリン酸化サイト

に結合している可能性もあるが、既に Pin1 との相互作用が報告されている同ファミリーの FoxO4 に対して、Pin1 が複数個所に結合している可能性が示唆されていることから¹⁵、FoxO3 に対しても複数のリン酸化サイトに Pin1 が結合している可能性が示唆される。

また、本実験から FoxO3 の転写活性を Pin1 が抑制していることが明らかとなった。FoxO3 によって P 糖蛋白質の転写が促進されることから、Pin1 が FoxO3 による P 糖蛋白質の転写を抑制していることが示唆された。

結論

本研究では癌の薬剤耐性獲得で問題視されている薬剤排出ポンプ P 糖蛋白質の発現制御と Pin1 の関係について調べてきた。癌細胞において Pin1 と P 糖蛋白質の発現は逆相関の関係にあり、P 糖蛋白質の転写因子である FoxO3 が Pin1 によって負の制御を受けていることが明らかとなった (Fig. 3)。FoxO3 と Pin1 の結合部位を同定することでより詳細な機構の解明が期待される。また、Pin1 が薬剤耐性獲得を防ぐキー蛋白質になりうること、あるいは指標になりうることを本研究から期待される。

P 糖蛋白質は癌細胞以外でも、脳血管関門で発現し、アルツハイマー病原因子であるアミロイド β の排出を行っているという報告がされている¹⁶。これは P 糖蛋白質が生理的機能としても重要な役割を担っていることを意味しており、Pin1 は薬剤排出だけでなく生理条件下における細胞外への蛋白質排出にも関与している可能性が示唆された。

本研究で着目した FoxO3 は先に述べたように、様々なストレスに応答して細胞周期やアポトーシス、オートファジーなどを制御し、寿命に関与している。FoxO3 は Pin1 による活性制御を受けることが明らかとなったことから、薬剤耐性以外の FoxO3 関連シグナル伝達に関しても Pin1 が重要な働きを担っている可能性が示唆された。

また、Pin1 は転写因子 Pu.1 を介してグラム陰性菌によってもたらされるエンドトキシンショックを防ぐ働きを有することも我々の研究室で明らかにしており¹⁷、薬剤を含め様々な外界からの刺激に対して順応させる作用を Pin1 は有しているのかもしれない。こうした視点から研究を進めることで Pin1 の新たな知見獲得が期待される。

第二章

Pin1 による血小板産生機構制御

序論

【背景】

微小管は α -tubulin と β -tubulin のダイマーから構成され、重合・脱重合を繰り返すことで細胞骨格や紡錘体形成、物質輸送を担っている細胞小器官である。特に細胞骨格や紡錘体形成においては非常にダイナミックな動態を示すが、これはシグナルを介した様々な微小管関連蛋白質 (MAPs) によって制御されることで可能になっている。従って Pin1 が MAPs を介して微小管制御を行っていることが期待される。微小管は癌やアルツハイマー病の創薬ターゲットにもなっている一方で、正常細胞への副作用が懸念されている。従って微小管制御機構の解明がこれら疾患に対してより副作用の低い創薬に繋がると期待できる。

【血小板産生機構】

血小板の産生は巨核球によって行われている¹⁸ (Fig. 4)。骨髓中に存在する造血幹細胞から分化した巨核球前駆細胞は巨核芽球を経た後、細胞分裂を伴わない核分裂を繰り返しつつ、細胞質も肥大化していく。こうして成熟した巨核芽球はやがて巨核球と呼ばれるようになる。成熟した巨核球は血管内へと突起を伸ばし(胞体突起形成)、その突起先端を切断していく。こうしてできた細胞断片が血小板となり血液中に産生されていく。血小板を産生した巨核球は細胞質を失い、最終的にマクロファージによって分解される。

【胞体突起形成】

胞体突起形成は血小板産生機構の中で非常にダイナミックな構造変化をもたらす機構であり、また胞体突起形成を制御している転写因子 NF-E2 欠損マウスでは血小板数が低下することから¹⁹、この機構は血小板産生に欠かせないものであると考えられる。胞体突起形成には微小管やアクチンなどの細胞骨格因子およびそれらを制御する様々な蛋白質 (NF-E2 を含む) が関与している²⁰。

近年、MAPsの一つである tau 蛋白質が血小板中に存在していることが報告されており^{21,22}、従って胞体突起形成に tau も関与していると考えられた。

【tau】

MAPs の一種である tau は脳で多く発現し、微小管重合を促進したり、微小管を安定化する働きを担っている。tau は 6 種類のスプライシングバリエーションを持ち、その発現は発育時期によって異なる。tau は主にリン酸化修飾による機能制御を受け、一般的にはリン酸化により機能が抑制される²³。しかしながら tau のリン酸化サイトは非常に多く存在し、各サイトにおけるリン酸化の意義は不明な点が多い。tau は天然変性蛋白質であり、通常では特定の構造を取っていないが、tau のプロリンリッチドメイン中に存在するセリン-プロリンあるいはスレオニン-プロリンサイトのリン酸化は tau に特定の構造（ポリプロリン II ヘリックス）をもたらすと報告されている²⁴。従って tau のリン酸化はその構造に大きな影響を与えることで機能制御に繋がると考えられる。また、tau の微小管結合ドメイン中に存在する S262 のリン酸化は微小管との結合の妨げになることで機能抑制作用をもたらすと考えられている²⁵。さらに神経脱落が観察されるようなアルツハイマー病を含むタウオパチーと呼ばれる疾患では過剰にリン酸化された tau が凝集した状態にあることから²⁶、適切な微小管制御機構には tau の構造制御やリン酸化制御が重要であると考えられる。

【tau と Pin1】

Pin1 は tau との関わりも深い。tau はリン酸化によって機能が抑制されるが、Pin1 はリン酸化 tau に作用することで脱リン酸化酵素の働きを促進させ、tau の脱リン酸化を誘導させる^{27,28}。さらに Pin1 はリン酸化 tau に作用することで、脱リン酸化を介すことなく直接 tau の微小管重合促進作用を促進することが報告されている²⁹。さらに Pin1^{-/-}マウスでは軸索の形成が不安定であること²⁷、そしてアルツハイマー病患者の脳では Pin1 が不活性化の状態であること³⁰から Pin1 が tau を介して微小管の制御に深く関わっていると考えられる。

【血小板産生機構と Pin1】

血小板産生機構と Pin1 に関する報告はこれまでない。しかし当研究室では Pin1^{-/-}マウスの解析結果から①巨核球系細胞数が野生型マウスの 2 倍ほどに増えていること②血小板数には差がないこと③Pin1^{-/-}マウスの巨核球は胞体突起

の形成率が低下していることを明らかにしていた。このことは『Pin1 は胞体突起形成を促進し、巨核球からの血小板産生を促進する』ことを示している。

【目的】

本研究では胞体突起形成における Pin1 の機能解析を行い、微小管制御機構の新規知見獲得を目指す。この研究は血小板関連疾患に対する新規創薬や *in vitro* での効率的な血小板産生方法確立に繋がるだけでなく、癌やアルツハイマー病に対する創薬への応用も期待できる。

【方法】

・実験動物

実験動物の使用に際し東北大学の規定に従った。

・細胞培養

ヒト巨核芽球性白血病由来 Meg-01 細胞株は 10%FBS、1%ペニシリンストレプトマイシン含有 RPMI 1640 培地を用い、マウス骨髄由来巨核球は RPMI 1640 培地を用いて 37°C、5%CO₂インキュベーター内で培養した。

・Flow Cytometry解析

マウス大腿骨および脛骨から抽出した骨髄細胞あるいは Meg-01 細胞を PBS に懸濁し、骨髄細胞を (anti-CD41 conjugated with FITC、anti-CD61 conjugated with PE) で、Meg-01 細胞を (anti-CD41 conjugated with FITC、anti-CD61 conjugated with PerCP-Cy5.5) で on ice 30 分静置しラベルした。PBS で洗浄後、flow cytometry を用いて巨核球系細胞数あるいは巨核球成熟具合を解析した。

・胞体突起形成の誘導

Meg-01 細胞培養液中にバルプロ酸を添加する事で胞体突起形成の誘導を行った。バルプロ酸は終濃度 2 mM で使用した。胞体突起を形成した Meg-01 細胞の数は顕微鏡を用いてカウントした。

・shPin1 RNA

Pin1 のノックダウンは lentiviral pLKO.5 vector (Sigma-Aldrich)を用いた。Human Pin1 特異的な標的配列を次に示す。shPin1-1: 5'-cggctacatccagaagatcaagt-3'; shPin1-2: 5'-gccatttgaagacgcctcgt-3'。またコントロールには次の配列を選択した。shcontrol: 5'-caacaagatgaagacaccaa-3'。レンチウイルスは HEK293T 細胞を用いて産生し、濃縮溶液 (終濃度 32% PEG6000、終濃度 40 mM HEPES、終濃度 400 mM NaCl) を加え 2,380 × g で 1 時間、4°C で遠心し、ウイルスを濃縮した。このウイルス濃縮液を培養中の Meg-01 細胞培地中に添加してウイルスを Meg-01 細胞に感染させた。感染後 1 µg/ml のピューロマイシンを加え感染した細胞の選別を行った。

・Western blotting

細胞をプロテアーゼインヒビターカクテル（ナカライテスク）およびホスファターゼインヒビターカクテル（ナカライテスク）の入った SDS サンプルバッファー（62.5 mM Tris-HCl、5% スクロース、2% SDS、5% β メルカプトエタノール、pH 6.8）に溶解しソニケーション後 20,600 $\times g$ 、4 $^{\circ}$ C にて 10 分遠心し上清をサンプルとして回収した。SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、下記の抗体を用いてたんぱく質の発現を解析した。Anti-Pin1 antibody（Cell Signaling Technology）、AT180、AT8 antibody（Thermo Fisher Science）、Tau1 antibody（Chemicon）、Tau5 antibody（BD bioscience pharmigen）。二次抗体には HRP conjugated secondary antibody を用いた。検出には chemiluminescence を用い、バンドは LAS-3000（Fuji Film）を用いて確認した。

・半定量 PCR

Total RNA は TRI reagent[®]（Molecular Research Center）を用いて回収した。cDNA の合成は PrimeScript[™] II 1st strand cDNA Synthesis Kit（TAKARA）を用いて行った。この cDNA を鋳型とし、以下のプライマーを用いて PCR を行った。hTauE9_F:5'-accaagtcgccgtcttccgcc-3'; hTauE11_R:5'-caccttgctcaggtcaactgg-3'; hbactin_F:5'-tcctggagaagagctacga-3'; hbactin_R:5'-agcactgtgtggcgctacag-3'

・共免疫沈降法

6 日間バルプロ酸に暴露された Meg-01 細胞をプロテアーゼインヒビターカクテルおよびホスファターゼインヒビターカクテルを加えた IP buffer（50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.5% sodium deoxycholate、1% NP-40、0.1% SDS、pH 8.0）に溶解した。ライセートに Dynabeads protein G（Veritas）および anti-Pin1 antibody（R&D systems）または normal mouse IgG（Santa Cruz Biotechnology）を加え 4 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。その後ビーズを 3 回洗浄後溶出し Western blotting を行った。tau の検出には Tau antibody（H-150）（Santa Cruz Biotechnology）を用いた。

・細胞由来 tau の精製

HEK293T 細胞に *tau+empty/pin1 vector* をトランスフェクションし 48 時間後に細胞を回収した。RAB buffer（100 mM MES、20 mM NaF、0.5 mM Na₂VO₄、0.75 M NaCl、0.5 mM PMSF、プロテアーゼインヒビターカクテル、10 mM DTT）に懸濁後、10 分間煮沸した。20,000 $\times g$ 4 $^{\circ}$ C で 20 分遠心後、上清に終濃度 2.5% 過塩素酸を加え 25 分間氷上に静置した。その後 20,000 $\times g$ 4 $^{\circ}$ C で 20 分遠心し、上清に終濃度 10% トリクロロ酢酸を加え 25 分間氷上に

静置した。20,000 × *g* 4° C で 20 分遠心し、得られた沈殿を 100%エタノールで 2 回洗浄し、PIPES buffer (100 mM PIPES、5mM EGTA、2 mM MgCl₂、pH 6.9) に溶解させた。

- ・ tubulin 精製

牛脳からの tubulin 精製は PIPES 法により行った³¹。牛脳は東北大学農学研究科の渡邊康一博士より提供していただいた。

- ・ 微小管重合アッセイ

微小管重合の評価には濁度法を用いた³²。濁度法は微小管重合に伴い上昇する 350 nm 吸光 (O.D.₃₅₀) を測定する方法である。25 μM の精製 tubulin および 0.1 μM の HEK293T 細胞由来精製 tau を PM buffer (100 mM PIPES、5 mM EGTA、2 mM MgCl₂、1 mM GTP、pH 6.9) に加え、時間経時的に O.D.₃₅₀ を測定した。

- ・ 統計解析

統計的数値は means ± SD あるいは means ± SEM で表した。また統計的優位差は Student's *t* test あるいは Dunnett's test で求め、*p* < 0.05 を統計的に優位な差とした。

本論

1. Pin1^{-/-}マウスにおける巨核球系細胞数の増加

1-1 緒言

これまでに本研究室では病理解析により Pin1^{-/-}マウスの骨髄中において巨核球系細胞数が増加しているという結果を得ていたが、この結果は骨髄切片から目視でカウントして得られた結果であった。実際、巨核芽球の直径はおよそ 15 μm ~ 50 μm 、巨核球の直径はおよそ 35 μm ~ 150 μm とされており他の細胞に比べ非常に大きいため区別することは可能である。しかしながら巨核球系細胞のマーカーを染色して解析することでより信頼性の高いデータを得られると考えた。造血幹細胞より分化した巨核球系細胞は早期の段階で巨核球系細胞マーカーである CD41 と CD61 を発現し、成熟に伴いその発現は増加していく³³。そこで野生型と Pin1^{-/-}マウスの骨髄細胞における CD41 および CD61 の発現量を解析し、巨核球系細胞数を比較することとした。

1-2 flow cytometry による巨核球系細胞の割合解析

野生型と Pin1^{-/-}マウスそれぞれ 3 個体ずつの大腿骨および脛骨から抽出した骨髄細胞を CD41 抗体および CD61 抗体にて染色し flow cytometry によってその発現量を解析した。すると、野生型マウスの骨髄細胞中に含まれる巨核球系細胞の割合は大腿骨 ($5.6 \pm 0.5\%$)、脛骨 ($6.4 \pm 0.3\%$) であったのに対し、Pin1^{-/-}マウスでは大腿骨 ($8.7 \pm 1.5\%$)、脛骨 ($9.3 \pm 0.8\%$) で有意に高かった (Fig. 5)。

1-3 考察

骨髄細胞中における巨核球系細胞の割合は野生型に比べ Pin1^{-/-}マウスの方が有意に増加していた。この結果は病理解析の結果と一致することから、Pin1 は生体内において巨核球系細胞数に影響を与えていることが明らかとなった。一方で、血液解析の結果から巨核球最終産物である血小板数は野生型および Pin1^{-/-}マウスに有意な差が見られなかったことから、Pin1^{-/-}マウスでは血小板産生能が低下していることが示唆された。

2. Pin1 は胞体突起形成を促進する

2-1 緒言

血小板産生の工程で巨核球は CD41 や CD61 の発現を増加させながら成熟していき、胞体突起を形成する。本研究室では Pin1^{-/-}マウスの巨核球では胞体突起形成が抑制されていることを明らかにしていた。しかし、マウスから精製できる巨核球数は非常に少ない点から、実験を効率的に進めるために細胞株を用いて実験を進めることとした。

巨核芽球細胞株である Meg-01 細胞は通常、未成熟の状態では浮遊し数%が接着および胞体突起を形成している細胞群であるが³⁴、バルプロ酸の投与により CD41 と CD61 の発現増加を伴う接着および胞体突起の形成促進が確認されることが報告されている^{35,36}。また、成熟した細胞からの胞体突起形成時において CD41 の発現増加が報告されており³⁷、巨核球系マーカーの発現増加は胞体突起形成時にまで及ぶと考えられる。

そこで Meg-01 細胞を用いて Pin1 が胞体突起形成に与える影響を解析することとした。

2-2 胞体突起形成における Pin1 の機能解析

Meg-01 細胞が胞体突起を形成するにあたり、Pin1 が関与しているかを解析するため、レンチウイルスを用いて Pin1 ノックダウン Meg-01 細胞を作製した。*pin1* の配列のうち異なる 2 か所の部位をターゲットとしてプラスミドを作成し (shPin1-1, shPin1-2)、Pin1 ノックダウンを行った。レンチウイルスを感染させていない細胞 (no infection)、および non targeting な配列に対するノックダウンを行った細胞 (shControl) に対して、Pin1 ノックダウンを行った細胞では Pin1 の発現低下が確認できた (Fig. 6A)。

次に、胞体突起形成に至るまでの CD41, CD61 の発現に Pin1 が影響を与えているのかを解析した。コントロールおよび Pin1 ノックダウン細胞に 2 mM バルプロ酸を 3 日間処理し、anti-CD41 antibody, anti-CD61 antibody を反応させた後、Flow cytometry を用いてそれらの発現量を解析した。その結果、Pin1 をノックダウンすることで CD41, CD61 の発現量低下がみられた (Fig. 6B)。一方で Pin1 を過剰発現させた場合には (GFP も共発現するベクターであり CD41 抗体に付加されている FITC と波長が重なるため、CD61 抗体でのみ測定した)、CD61 の発現増加が見られた (Fig. 6C,D)。

そこで Meg-01 細胞の胞体突起形成に Pin1 が影響を与えているのかを解析した。2 mM のバルプロ酸を 3 日間処理後、接着した細胞中における胞体突起形成細胞数をカウントした。その結果、Pin1 をノックダウンすることで胞体突起の形成割合が減少した (Fig. 6E,F)。

2-3 考察

過去に報告されているように、Meg-01 細胞においてバルプロ酸暴露によって CD41 および CD61 の発現増加とそれに伴う胞体突起形成の増加が確認できた。そこでこの実験系を用いて Pin1 の影響の解析を行った。Pin1 をノックダウンすることによって、CD41 および CD61 の発現が抑制されていた。これは Pin1 が巨核芽球から胞体突起形成までの成熟を促進していることを表す。そこで胞体突起の形成割合を調べたところ、Pin1 をノックダウンすることでその割合も減少していた。既に巨核球からの胞体突起形成を Pin1 が促進していることが本研究室により明らかとなっていたことを踏まえ、Meg-01 細胞においても Pin1 が胞体突起形成を促進していると考えた。一方で、CD41 および CD61 の発現増加は巨核芽球成熟の段階から起きることから、Pin1 がこの成熟にも関与している可能性が示唆された。

3. 胞体突起形成に伴う tau の発現誘導

3-1 緒言

胞体突起形成の際には適切な微小管制御が要求される。微小管重合阻害剤であるノコダゾールや微小管安定剤であるタキソールを巨核球に暴露した際に Proplatelet の形成抑制や形態異常が報告されている³⁸。また、脳の神経軸索に局在し微小管重合を高める働きを持つ tau 蛋白質の発現が血小板中でも確認されていることから^{21,22}、その前駆細胞でもある巨核球でも tau は発現し、胞体突起形成に関与していると考えた。そこで Meg-01 細胞における tau の発現を確認することとした。

3-2 微小管を介した胞体突起制御

まず、Meg-01 細胞の胞体突起形成に微小管が関与しているかを調べるために、バルプロ酸処理を行った Meg-01 細胞に対して 5 μ M ノコダゾールを 30 分処理し形態観察した。その結果、ノコダゾールを処理することで胞体突起の消失が観察された (Fig. 7A)。

3-3 胞体突起形成に伴う tau の発現誘導

次に tau の発現を半定量 PCR およびウェスタンブロットにより解析した。その結果、バルプロ酸処理により tau の転写が誘導されていることが明らかとなった (Fig. 7B,C)。さらに PCR 産物のシーケンス解析を行った結果、3 リピートドメインを持つアイソフォームの tau が誘導されていることが明らかとなった。

3-4 考察

Meg-01 細胞においても微小管を介した胞体突起の形成が起きていることが確認できた。そこで、MAPs の一種であり血小板中での発現が確認されている tau に着目したところ、胞体突起形成に伴う tau の発現誘導が見られ、tau は微小管を介して胞体突起形成に関与している可能性が示唆された。

4. Meg-01細胞における tau と Pin1 の相互作用

4-1 緒言

Meg-01細胞において tau の発現が確認できたことから、Pin1 との相互作用を解析することとした。序論で述べた通り、Pin1 はリン酸化 tau の異性化を触媒することで脱リン酸化酵素である PP2A による tau の脱リン酸化作用を高める働きを有していること²⁸、リン酸化 tau に結合することで直接 tau の機能を高めること²⁹が知られている。そこで Meg-01細胞における Pin1 と tau の結合および tau のリン酸化状態に着目することとした。

4-2 Pin1 と tau の結合解析

バルプロ酸処理した Meg-01細胞をライセートにした後、Pin1抗体で免疫沈降を行い、ウェスタンブロットにより Pin1 と結合する tau の存在を確認した。その結果、Pin1 と tau の結合が確認できた (Fig. 8A)。

4-3 Pin1 ノックダウンによる Meg-01細胞内 tau への影響解析

コントロールおよび Pin1 ノックダウン Meg-01細胞における tau の発現解析を行った。バルプロ酸処理を行ったそれぞれの細胞を用いて tau のウェスタンブロットを行ったところ、Pin1 をノックダウンすることでより高分子側にもバンドが確認できた (Fig. 8B)。

次に脱リン酸化処理を行い、低分子側へのバンドシフトが見られるのかを確認した。バルプロ酸処理を行ったライセートに対してさらにバクテリア由来アルカリフォスファターゼ処理を行った (Fig. 8C)。その結果、tau の低分子側へのバンドシフトが確認でき、さらに Pin1 ノックダウン細胞で見られた高分子 tau もフォスファターゼ処理により消失した。

4-4 考察

Pin1 と tau の結合が確認できたことから、Meg-01細胞内において Pin1 は tau の微小管重合促進作用を高めていることが考えられた。また Pin1 をノックダウンした際、高分子 tau の増加が確認できた。tau はリン酸化を受けることによって高分子側へとバンドシフトする。そこで Pin1 をノックダウンした Meg-01細胞ではリン酸化の進んだ tau が蓄積していると考え、脱リン酸化処理を行ったところ、高分子 tau の消失および tau の低分子側へのバンドシフトが見られた。従って Pin1 は tau の脱リン酸化を促進していることが明らかとなった。しかしながら、アルツハイマー病患者の脳で確認されるような主要な tau リン酸化サイト (pS202, pT205, pT231, pS262, pS396) のリン酸化は Pin1 ノックダウンの有無に関わらずウェスタンブロットでは確認できなかったこと

から(data not shown)、アルツハイマー病病態とは異なる生理的な tau のリン酸化が示唆された。

以上の結果をまとめると、Meg-01 細胞内において Pin1 は tau のリン酸化を制御し、微小管重合を促進させていることが明らかとなった。

5. 細胞内において Pin1 は tau の機能を高める

5-1 緒言

細胞内において Pin1 によるリン酸化 tau の脱リン酸化誘導が起きることはこれまでも報告されてきたが、この作用により tau の機能がどのように変化しているのかは不明であった。そこで細胞内 tau の機能に Pin1 が与える影響を *in vitro* の実験系を利用して解析することとした。

濁度法は微小管重合アッセイ方法の一つである。tubulin は GTP 存在下において 37°C でインキュベートすることにより微小管を形成していく。それに伴い光の散乱も強まっていくことから、この散乱光を光学密度 (O.D.₃₅₀) としてモニタリングすることにより、微小管の形成度合いを数値として表すことができる。この実験系に細胞由来 tau を加えることにより、細胞内 tau の微小管重合促進能を解析することとした。また、tau を過剰発現させる細胞には HEK293T 細胞を用いた。

5-2 細胞内における tau の機能に Pin1 が与える影響の解析

最初に HEK293T 細胞に *tau vector* および *control or pin1 vector* をトランスフェクションし、ウェスタンブロットにより tau のリン酸化を比較した。pS202, pS205 は AT8 抗体、pT231 は AT180 抗体、pS396, pS404 は PHF1 抗体、total tau は Tau5 抗体を用いて検出した。その結果 Pin1 の共発現によりリン酸化 tau の減少が確認された。(Fig. 9A)

次に、先ほどと同様に HEK293T 細胞に *tau vector* および *control or pin1 vector* をトランスフェクションした後、tau の精製を行った。この細胞由来 tau を濁度法の系に加え O.D.₃₅₀ をモニタリングした結果が Fig. 9B である。まず、チューブリンのみ(control)に比べ tau を加えた方がより速い濁度上昇が確認できた。また、tau のみを発現させた場合(tau)に比べ Pin1 を共発現させた方(tau+Pin1)がより速い濁度上昇が見られた。

次に 1 時間インキュベートしたこれらサンプルを暗視野顕微鏡により観察し、微小管が形成されているのかを確認した (Fig. 9C)。その結果、全てのサンプルにおいて微小管が観察された。

5-3 考察

Meg-01 細胞に内在する tau は量が少なく、トランスフェクション効率も非常に低かったため、本実験では HEK293T 細胞を用いた。濁度法および暗視野顕微鏡観察の結果から、濁度の結果は微小管の形成を反映していると考えた。そのため、Pin1 の共発現によって細胞内における tau の微小管重合促進能が増加したことが明らかとなった。tau は熱耐性を有しており精製の段階で熱処理

を行っているため、精製した tau 中には活性を有する Pin1 は存在しないものとして考えられる。従って、本実験で見られた微小管重合の差は、ウェスタンブロットで確認された tau のリン酸化程度の差によるものだと考えられる。

以上をまとめると、細胞内において Pin1 は tau の脱リン酸化を促進することで tau の微小管重合促進能を高める働きを有していることが明らかとなった。

結論

癌や神経変性疾患などの未だ治療法が十分確立されていない疾患において微小管制御は糸口の一つである。Pin1 は様々なシグナルに関与しており、癌や神経変性疾患との関わりも深い。血小板産生機構には非常に様々な因子が関与し多くのステップを経て血小板が産生されているが³⁹、その中で胞体突起形成は微小管制御を介したダイナミックな膜構造変化を起こす非常に特徴的なステップである²⁰。しかしながらこれまで Pin1 と血小板産生機構に関する報告はされてこなかった。そのような中我々の研究室では Pin1^{-/-}マウスでは胞体突起形成低下に伴う巨核球からの血小板産生効率低下を明らかとしていた。そこで本研究では血小板産生機構に着目し Pin1 と微小管制御について研究を進めてきた。

【胞体突起形成における tau と Pin1】

巨核芽球細胞株 Meg-01 細胞において胞体突起形成を誘導した際、MAPs の一つであり Pin1 との相互作用が知られている tau が誘導されていた。tau は神経軸索のマーカーとして用いられるように脳で多く発現している蛋白質である。一方で乳癌細胞や精巣、そして血小板など非神経細胞における発現も報告されてきた^{21,40,41}。特に血小板では活性化に伴って微小管の再構成が行われるが、その際 tau キナーゼである GSK3 β は活性を抑制され、リン酸化 tau (pT231) の低下が起きる^{42,43}。従って、胞体突起形成や血小板活性化を含めダイナミックな微小管制御が行われている細胞において tau は幅広く関与している可能性が示唆された。本博士論文研究により胞体突起形成時、Pin1 は tau に結合して脱リン酸化を促し tau の機能を高めていることが明らかとなった (Fig.10)。これにより潤滑な胞体突起形成が可能になっていると考えられる。

【巨核球 tau と血小板 tau のリン酸化状態】

tau とリン酸化との関係はアルツハイマー病研究で進められており、アルツハイマー病病理で確認されるような tau リン酸化抗体をいくつか用いて(pS202, pT205, pT231, pS262, pS396)巨核球 tau のリン酸化サイト解析を行ったが、どれもバンドは検出されなかった。しかしながら脱リン酸化処理を行うことで tau のバンドシフトが確認されたことから、生理的な tau のリン酸化サイトが存在することが示唆された。興味深いことに、血小板 tau では T231 のリン酸化が報告されており⁴³、当研究室においても S202, T205, T231 のリン酸化が確認されていた。先に述べた通り、T231 のリン酸化は血小板活性化に伴い減少していくことから、『①胞体突起形成にあたる微小管重合②血小板産生のための微小管断片化③血小板活性化のための微小管再構成』という一連の流れは

tau のリン酸化によって制御されている可能性が示唆される。血小板活性化因子でありセリンプロテアーゼであるトロンピンは tau の切断も行い、さらに GSK3 β によってリン酸化された tau はトロンピンに切断されにくいことが報告されている⁴⁴。このことから、血小板活性化において tau が何らかの機能を有していると考えられる。また、Pin1 は tau の脱リン酸化を促進させることから、血小板の活性化にも Pin1 が関与している可能性が考えられる。

【展望①～血小板と神経～】

血小板から分泌される Platelet-derived-growth-factor (PDGF) は神経形成や神経細胞死、イオンチャネル制御などに関与している事が既に報告されており⁴⁵、血小板が脳神経に何らかの影響を与えていることが伺える。本研究では巨核球中における tau に注目して研究を進めてきたが、血小板中にはアミロイド β 前駆体の存在も報告されている⁴⁶。tau やアミロイド β は神経脱落をもたらす神経変性疾患の原因物質とされ、分泌もされることが知られていることから^{47,48}、血小板の tau やアミロイド β も脳神経に何らかの影響を与えている可能性が示唆される。アルツハイマー型マウスと正常マウスを併体結合によって血液を共有させることにより、野生型マウスにもアルツハイマー病の症状が現れることが最近報告されたことからこの可能性は十分考えられる⁴⁹。

【展望②～胞体突起と神経～】

胞体突起形成誘導試薬として使用したバルプロ酸は、従来 GABA トランスアミナーゼ阻害剤として癲癇治療薬に使われてきた。しかし Histone Deacetylase (HDAC) 阻害剤としての作用も有しており、神経分化を促進させる働きを持つことが報告されている^{50,51}。巨核球における tau やアミロイド β 前駆体の存在、そして HDAC による突起形成は神経細胞と類似しており、またアミロイド β 前駆体は胞体突起形成および血小板産生に関与していることが報告されている⁴⁶。従って、神経変性疾患で見られる神経脱落と胞体突起からの細胞質断片化による血小板産生機構は何等かの繋がりと私は考えている。

【最後に】

本研究では胞体突起形成に着目し Pin1 による tau を介した微小管制御を研究してきたが、こうしたアプローチからの基礎的知見の積み重ねは、アルツハイマー病発症メカニズムにも繋がると私は信じている。また、Pin1 は tau 以外の MAPs との相互作用を有している可能性も非常に高く、Pin1 による MAPs を介した微小管制御というものが脳や巨核球だけでなく様々な組織、そして癌細胞でも行われており、こうした着眼点からの研究が癌に対する新たな創薬にも繋がると期待される。

終章

これまで薬剤耐性機構および血小板産生機構に着目し、Pin1 の新たな機能解析を行ってきた。

薬剤耐性機構の研究の中では、Pin1 の新奇ターゲットとして様々なシグナル伝達を制御し寿命に影響を与える FoxO3 を見出し、Pin1 による P 糖蛋白質発現制御の仕組みの一部を解明した。

また、血小板産生機構に着目した研究では、巨核球における tau の発現と、Pin1 による微小管重合を介した胞体突起形成促進を明らかにした。

P 糖蛋白質および血小板の機能に共通している点を一つ紹介したいと思う。それは『炎症』である。炎症反応は生体内の様々な場面で見られ、癌やアルツハイマー病などの疾患においても確認されている。P 糖蛋白質は炎症に関与している因子であるサイトカインの拡散を促す役割を担っている⁵²。そして血小板は、炎症反応時には増加し⁵³、炎症反応によってもたらされる様々な因子に応答し血管内皮細胞の透過性を制御したり白血球と結合することで活性化を促進させる働きを担っている⁵⁴。従って P 糖蛋白質の発現や血小板産生制御に異常が生じることは、たとえ正常状態では異常が見られなくとも、様々な疾患に関係してくることが予想される。本研究で明らかとなった Pin1 と P 糖蛋白質、そして血小板産生への関与は炎症反応において重要な役割を担っている可能性が示唆される。Pin1^{-/-}マウスではエンドトキシンショックを起こしやすいという知見¹⁷も、炎症反応における P 糖蛋白質発現や血小板産生の異常が関係している可能性は十分考えられる。

Pin1 は実に多くの蛋白質と相互作用し、多様なシグナル伝達を可能にしている因子である。従って Pin1 に焦点を当てて研究を進めることで、未だ治療の難しい疾患に対して新しい突破口を切り開くことができるのではないかと期待している。

参考文献

1. Yaffe, M. B. *et al.* Sequence-specific and phosphorylation dependent proline isomerization: A potential mitotic regulatory mechanism. *Science*. **278**, 1957–1960 (1997).
2. Takahashi, K., Uchida, C., Shin, R.-W., Shimazaki, K. & Uchida, T. Prolyl isomerase, Pin1: new findings of post-translational modifications and physiological substrates in cancer, asthma and Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 359–375 (2008).
3. Housman, G. *et al.* Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*. **6**, 1769–1792 (2014).
4. Zacchi, P. *et al.* The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* **419**, 853–857 (2002).
5. Zheng, H. *et al.* The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* **419**, 849–853 (2002).
6. Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M. M. & Pastan, I. Expression of a full-length cDNA for the human MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Med. Sci.* **84**, 3004–3008 (1987).
7. Dean, M., Rzhetsky, A. & Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**, 1156–1166 (2001).
8. Wang, Y., Zhou, Y. & Graves, D. T. FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation. *Biomed Res.* 925350 (2014).
9. Kahn, A. J. FOXO3 and Related Transcription Factors in Development, Aging, and Exceptional Longevity. *Journals Gerontol.* **70**, 421–425 (2015).
10. Morris, B. J., Willcox, D. C., Donlon, T. A. & Willcox, B. J. FOXO3: A Major Gene for Human Longevity - A Mini-Review. *Gerontology* **61**, 515–525 (2015).
11. Eijkelenboom, A. & Burgering, B. M. T. FOXOs: Signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 83–97 (2013).
12. Hui, R. C.-Y. *et al.* Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) in K562 leukemic cells. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 670–678 (2008).
13. Chin, K. V., Ueda, K., Pastan, I. & Gottesman, M. M. Modulation of

- activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science*. **255**, 459–462 (1992).
14. Wulf, G. M., Liou, Y.-C., Ryo, A., Lee, S. W. & Lu, K. P. Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **277**, 47976–47979 (2002).
 15. Brenkman, A. B. *et al.* The peptidyl-isomerase Pin1 regulates p27kip1 expression through inhibition of Forkhead box O tumor suppressors. *Cancer Res.* **68**, 7597–7605 (2008).
 16. Cirrito, J. R. *et al.* P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* **115**, 3285–3290 (2005).
 17. Akiyama, H., Misawa, T., Ono, M., Uchida, C. & Uchida, T. Prolyl Isomerase Pin1 Protects Mice from Endotoxin Shock. *PLoS One* **6**, e14656 (2011).
 18. Schulze, H. & Shivdasani, R. A. Mechanisms of thrombopoiesis. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 1717–1724 (2005).
 19. Lecine, P. *et al.* Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes. *Blood* **92**, 1608–1616 (1998).
 20. Thon, J. N. *et al.* Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J. Cell Biol.* **191**, 861–874 (2010).
 21. Neumann, K., Farías, G., Slachevsky, A., Perez, P. & Maccioni, R. B. Human platelets tau: a potential peripheral marker for Alzheimer’s disease. *J. Alzheimers. Dis.* **25**, 103–109 (2011).
 22. Farías, G., Pérez, P., Slachevsky, A. & Maccioni, R. B. Platelet tau pattern correlates with cognitive status in Alzheimer’s disease. *J. Alzheimers. Dis.* **31**, 65–69 (2012).
 23. Johnson, G. V. W. & Stoothoff, W. H. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J. Cell Sci.* **117**, 5721–5729 (2004).
 24. Bielska, A. A. & Zondlo, N. J. Hyperphosphorylation of tau induces local

- polyproline II helix. *Biochemistry* **45**, 5527–5537 (2006).
25. Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E. & Mandelkow, E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* **11**, 153–163 (1993).
 26. Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X. & Grundke-Iqbal, I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr. Alzheimer Res.* **7**, 656–664 (2010).
 27. Liou, Y. *et al.* Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature* **424**, 556–561 (2003).
 28. Zhou, X. Z. *et al.* Pin1-Dependent Prolyl Isomerization Regulates Dephosphorylation of Cdc25C and Tau Proteins. *Mol. Cell* **6**, 873–883 (2000).
 29. Lu, P. J., Wulf, G., Zhou, X. Z., Davies, P. & Lu, K. P. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* **399**, 784–788 (1999).
 30. Butterfield, D. A. *et al.* REVIEW: Pin1 in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **98**, 1697–1706 (2006).
 31. Castoldi, M. & Popov, A. V. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif.* **32**, 83–88 (2003).
 32. Witman, G. B., Cleveland, D. W., Weingarten, M. D. & Kirschner, M. W. Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 4070–4074 (1976).
 33. Tomer, A., Harker, L. A. & Burstein, S. A. Flow Cytometric Analysis of Normal Human Megakaryocytes. *Blood* **71**, 1244–1252 (1988).
 34. Ogura, M. *et al.* Establishment of a Novel Human Megakaryoblastic Leukemia Cell Line, MEG-01, With Positive Philadelphia Chromosome. *Blood* **66**, 1384–1392 (1985).
 35. Vulcano, F. *et al.* HDAC inhibition is associated to valproic acid induction of early megakaryocytic markers. *Exp. Cell Res.* **312**, 1590–1597 (2006).
 36. Schweinfurth, N., Hohmann, S., Deuschle, M., Lederbogen, F. & Schloss, P. Valproic acid and all trans retinoic acid differentially induce

- megakaryopoiesis and platelet-like particle formation from the megakaryoblastic cell line MEG-01. *Platelets* **21**, 648–657 (2010).
37. Morishima, N. & Nakanishi, K. Proplatelet formation in megakaryocytes is associated with endoplasmic reticulum stress. *Genes to Cells* **21**, 798–806 (2016).
 38. Patel, S. R. *et al.* Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* **106**, 4076–4085 (2005).
 39. Kaushansky, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J. Clin. Invest.* **115**, 3339–3347 (2005).
 40. Smoter, M. *et al.* The role of Tau protein in resistance to paclitaxel. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **68**, 553–557 (2011).
 41. Inoue, H. *et al.* Site-specific phosphorylation of Tau protein is associated with deacetylation of microtubules in mouse spermatogenic cells during meiosis. *FEBS Lett.* **588**, 2003–2008 (2014).
 42. White, J., Krumwiede, M. & Sauk, J. Microtubule reassembly in surface-activated platelets. *Blood* **65**, 1494–503 (1985).
 43. Li, D., August, S. & Woulfe, D. S. GSK3beta is a negative regulator of platelet function and thrombosis. *Blood* **111**, 3522–3530 (2008).
 44. Arai, T., Guo, J.-P. & McGeer, P. L. Proteolysis of non-phosphorylated and phosphorylated tau by thrombin. *J. Biol. Chem.* **280**, 5145–5153 (2005).
 45. Funata, K. & Sasahara, M. The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **9**, 168–181 (2014).
 46. Canobbio, I. *et al.* Platelet amyloid precursor protein is a modulator of venous thromboembolism in mice. *Blood* **130**, 527–536 (2017).
 47. Rodriguez, L. *et al.* Rab7A regulates tau secretion. *J. Neurochem.* **141**, 592–605 (2017).
 48. Mohamed, N.-V., Desjardins, A. & Leclerc, N. Tau secretion is correlated to an increase of Golgi dynamics. *PLoS One* **12**, e0178288 (2017).
 49. Bu, X.-L. *et al.* Blood-derived amyloid- β protein induces Alzheimer's disease pathologies. *Mol. Psychiatry* (2017). doi:10.1038/mp.2017.204

50. Yu, I. T. *et al.* Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of proneural factors in association with H4 acetylation. *Neuropharmacology* **56**, 473–480 (2009)
51. Vukićević, V. *et al.* Valproic acid enhances neuronal differentiation of sympathoadrenal progenitor cells. *Mol. Psychiatry* **20**, 941–950 (2015).
52. Pawlik, A., Gawrońska-Szklarz, B., Baśkiewicz-Masiuk, M., Machaliński, B. & Safranow, K. Involvement of P-glycoprotein in the release of cytokines from peripheral blood mononuclear cells treated with methotrexate and dexamethasone. *J. Pharm. Pharmacol.* **57**, 1421–1425 (2005).
53. Beaulieu, L. M. & Freedman, J. E. The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes. *Thromb. Res.* **125**, 205–209 (2010).
54. Stokes, K. Y. & Granger, D. N. Platelets: a critical link between inflammation and microvascular dysfunction. *J. Physiol.* **590**, 1023–1034 (2012).

謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導を頂いた指導教員である 東北大学大学院 農学研究科 分子酵素学分野 内田隆史 教授に深謝致します。また、巨核球の研究を進めるにあたり多くの助言および技術指導を賜り、実験材料も提供して頂きました 東北大学大学院 医学系研究科 分子血液学分野 清水律子 教授、後藤あや氏に厚く御礼申し上げます。

本学位論文の審査にあたりご教授下さった鈴木徹 教授、種村健太郎 教授、西森克彦 教授、金子淳 准教授、新谷 尚弘 准教授、米山裕 准教授に厚く御礼申し上げます。

研究を進めるにあたり、牛脳を提供していただきました本学 渡邊康一 助教授に深く感謝いたします。

また、日々の研究生生活を支えてくださった日高将文 助教授、藤森富美子氏、学生の皆様に感謝申し上げます。

最後に、長きに渡る学生生活を理解し、支えて下さった両親に深く感謝の念を表し、謝辞とさせていただきます。

Fig. 1A

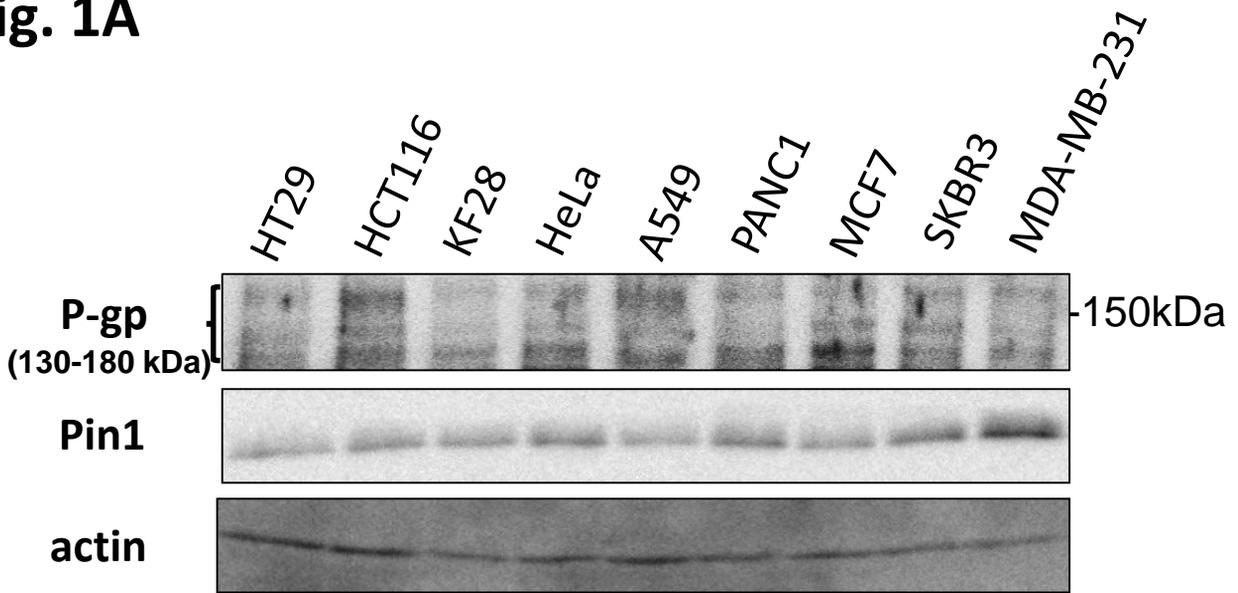


Fig. 1B

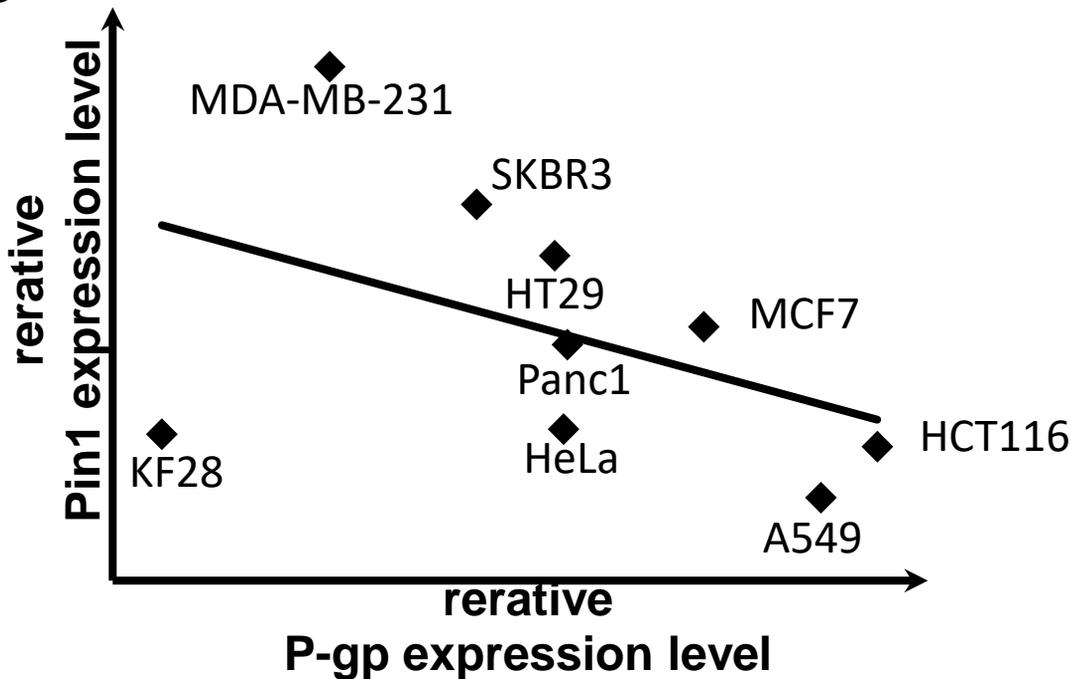


Fig.1(A)(B) Comparison between P-gp and Pin1 expression levels of cancer cell lines. (A) The expression of P-gp and Pin1 was detected using western blotting. (B) The scatter plot was prepared from the strength of the bands.

Fig. 1C

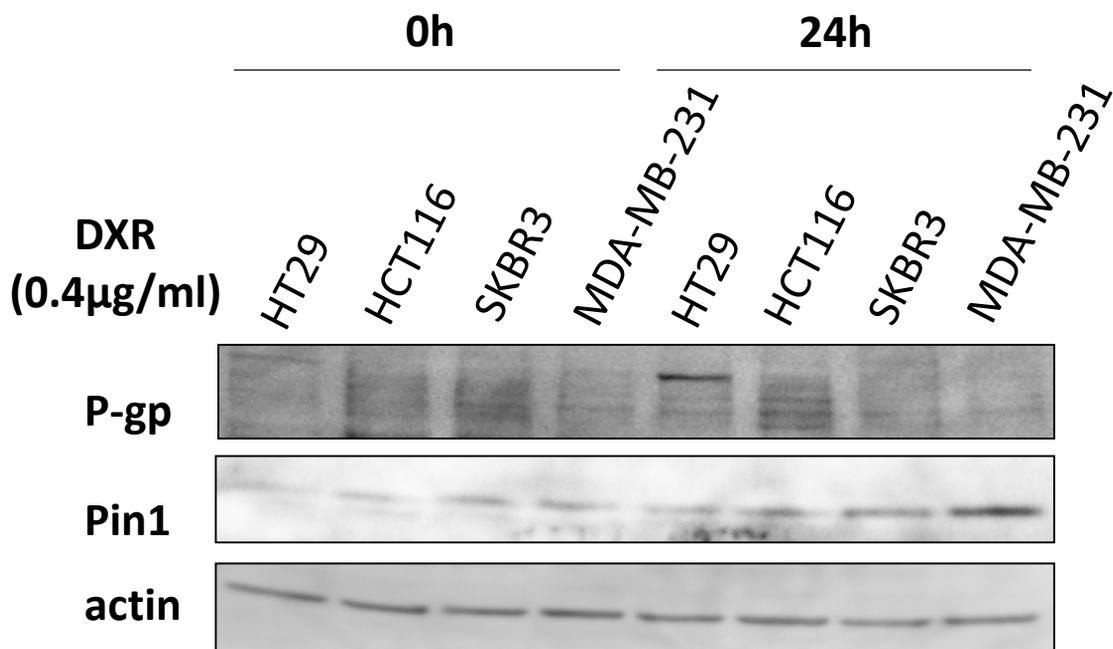


Fig. 1D

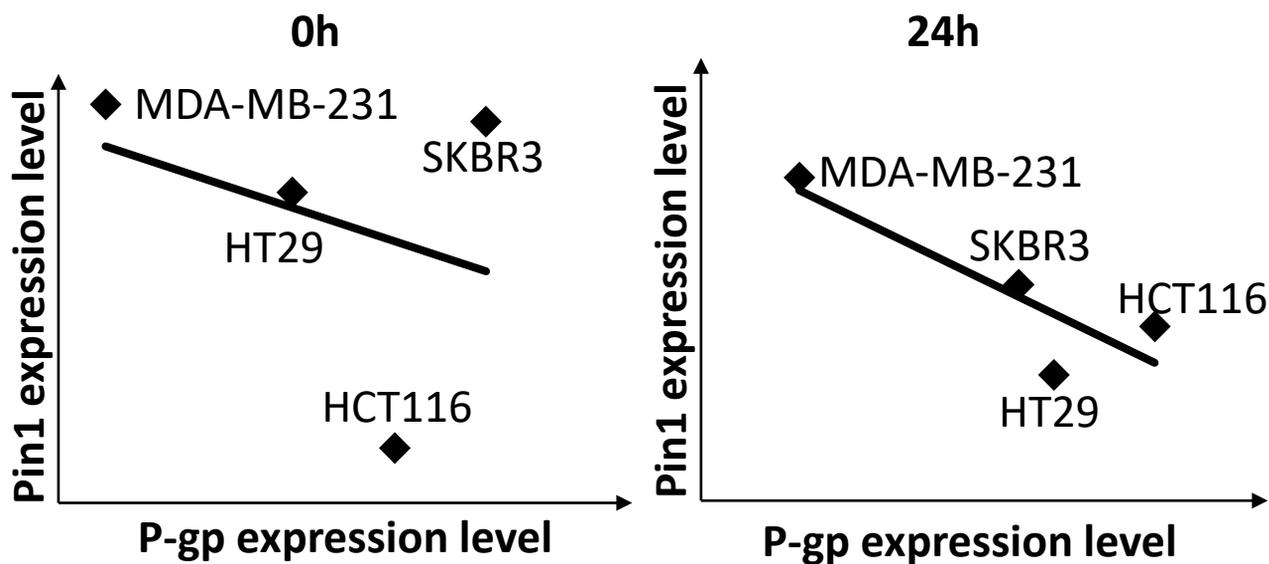


Fig.1(C)(D) Comparison between P-gp and Pin1 expression levels of cancer cell lines. Cancer cell lines, HT29, HCT116, SKBR3 and MDA-MB-231 were treated with 0.4 μg/ml doxorubicin (DXR) for 0 and 24 h. (A) The expression of P-gp and Pin1 was detected using western blotting. (B) The scatter plot was prepared from the strength of the bands.

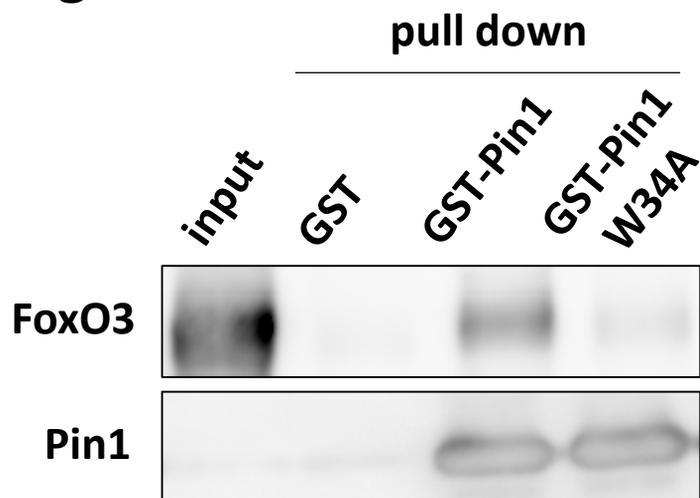
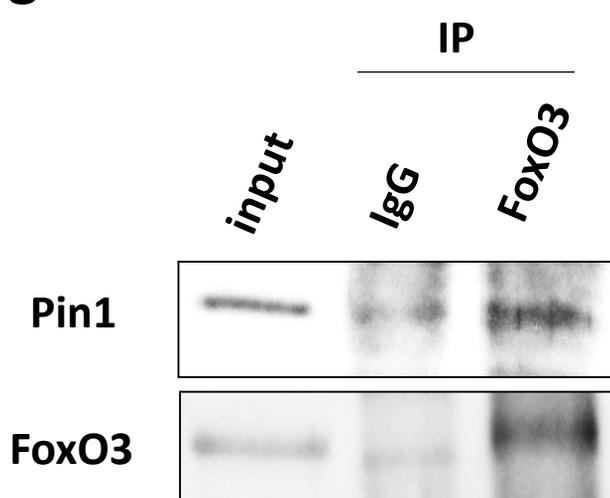
Fig. 2A**Fig. 2B**

Fig. 2(A) HEK293 cells were transfected with flag-FOXO3 plasmid and cultured for 48 h. The cells were lysed and subjected to pull down assay using Pin1-GST-beads. The FoxO3 bound to Pin1-GST- and GST-beads was analyzed by the western blotting. (B) Co-immunoprecipitation analysis of endogenous Pin1 and FOXO3 in MCF7 cells. The precipitated proteins by anti-FOXO3 antibody were analyzed by western blotting using anti-Pin1 and anti-FOXO3 antibodies respectively.

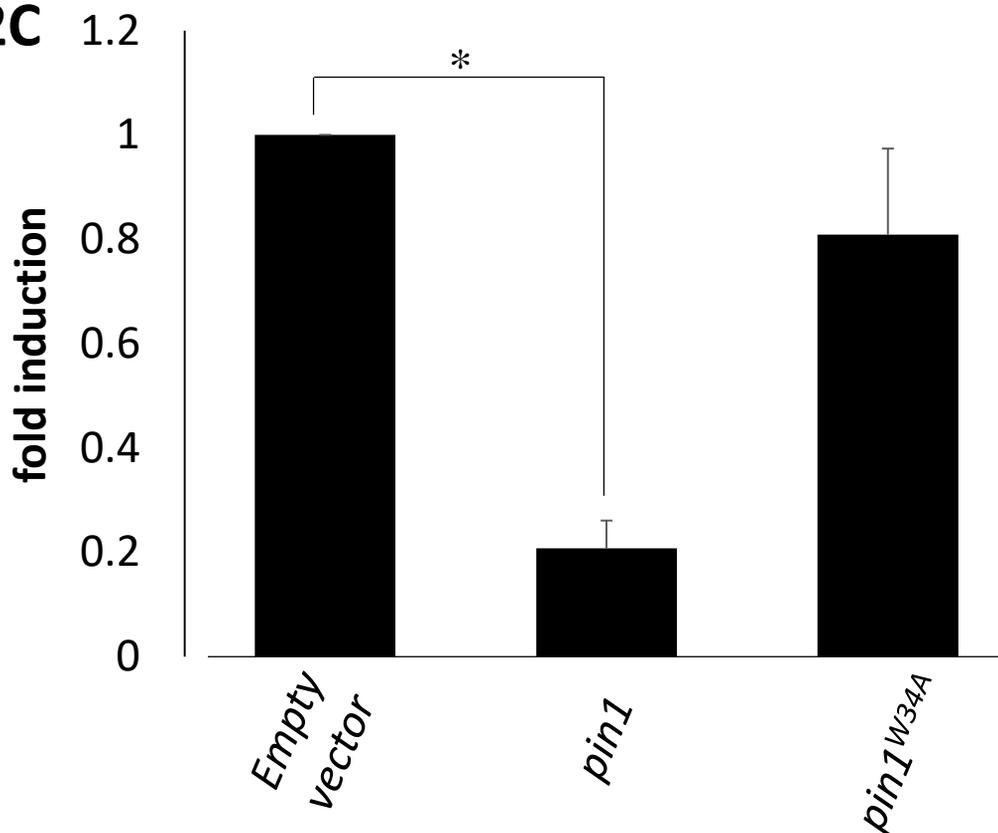
Fig. 2C

Fig. 2(C) Luciferase assay for FOXO3 promoter in the HEK293 cells-transfected with *foxo3* and *pin1*. *pin1*^{W34A} was used as negative control. * $p < 0.05$

Fig. 3

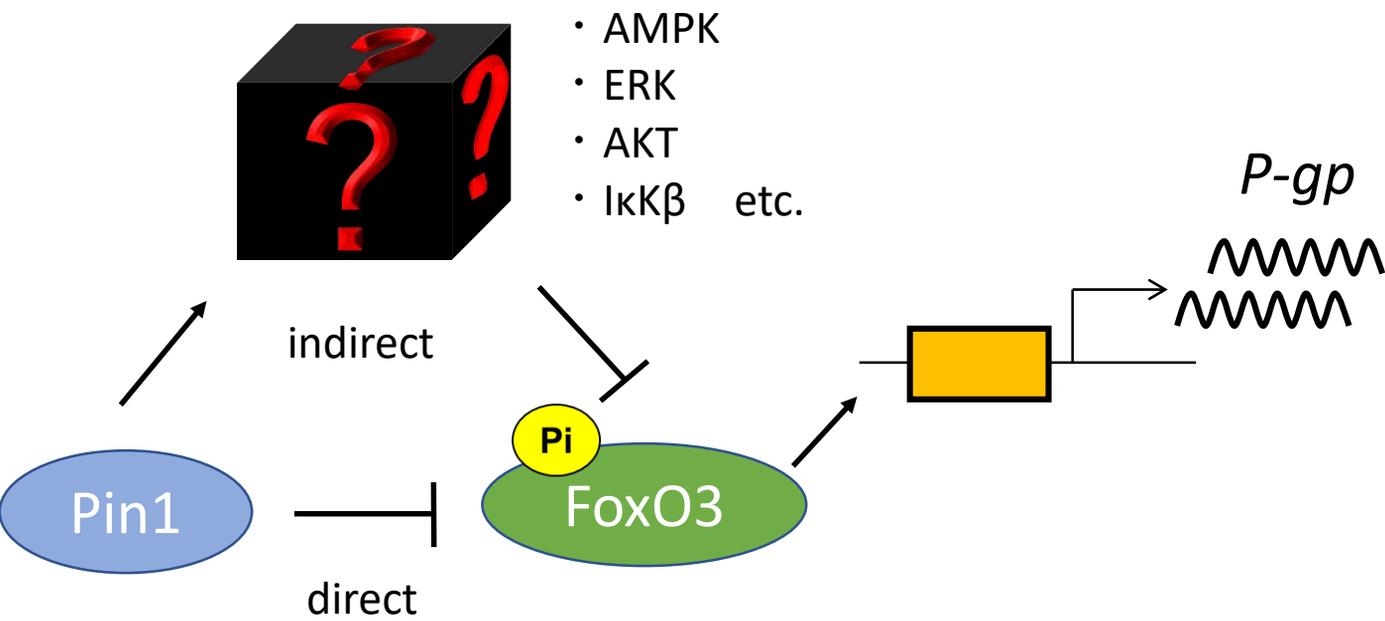


Fig. 3 By treatment with anti cancer drug, efflux pump P-gp is induced via FoxO3. Pin1 suppresses P-gp expression by reducing FoxO3 activity.

Fig. 4

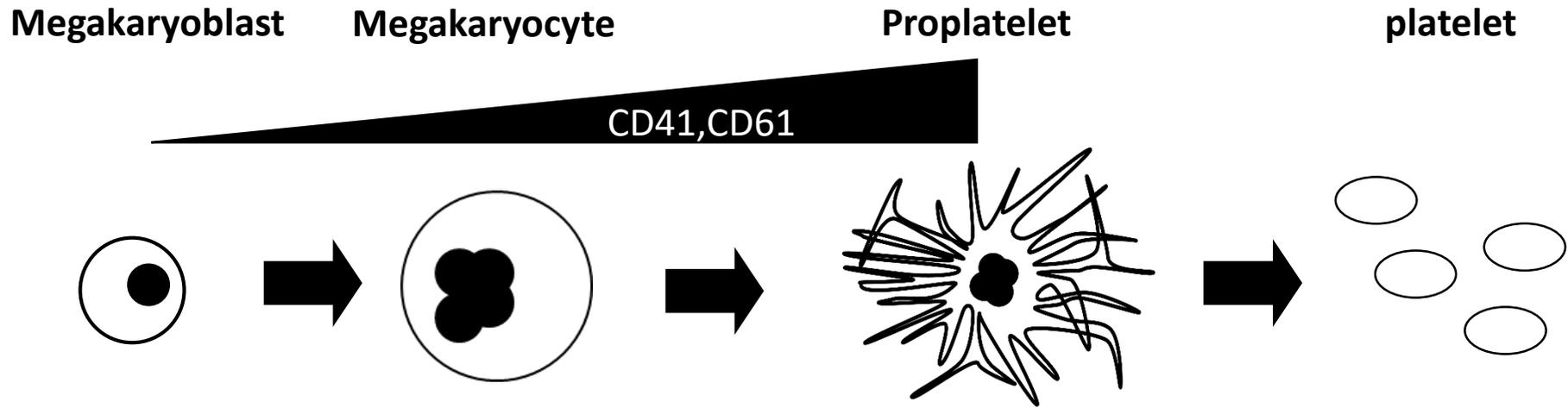


Fig. 4 Megakaryoblasts differentiated from hematopoietic stem cells are matured accompanied with multinucleation and expansion of cytoplasm. Mature megakaryoblasts are called megakaryocytes. Megakaryocytes form proplatelets, and produce platelets by cytoplasmic fragmentation. It is essential that the formation of cytoskeletal filaments is regulated properly during proplatelets.

Fig. 5A

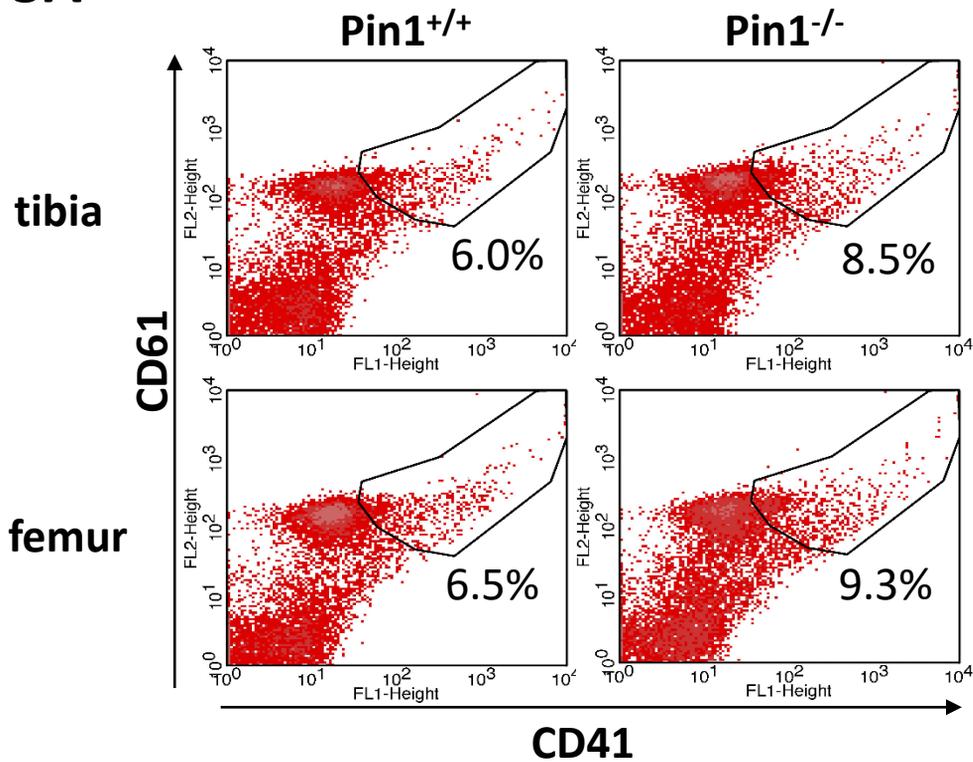


Fig. 5B

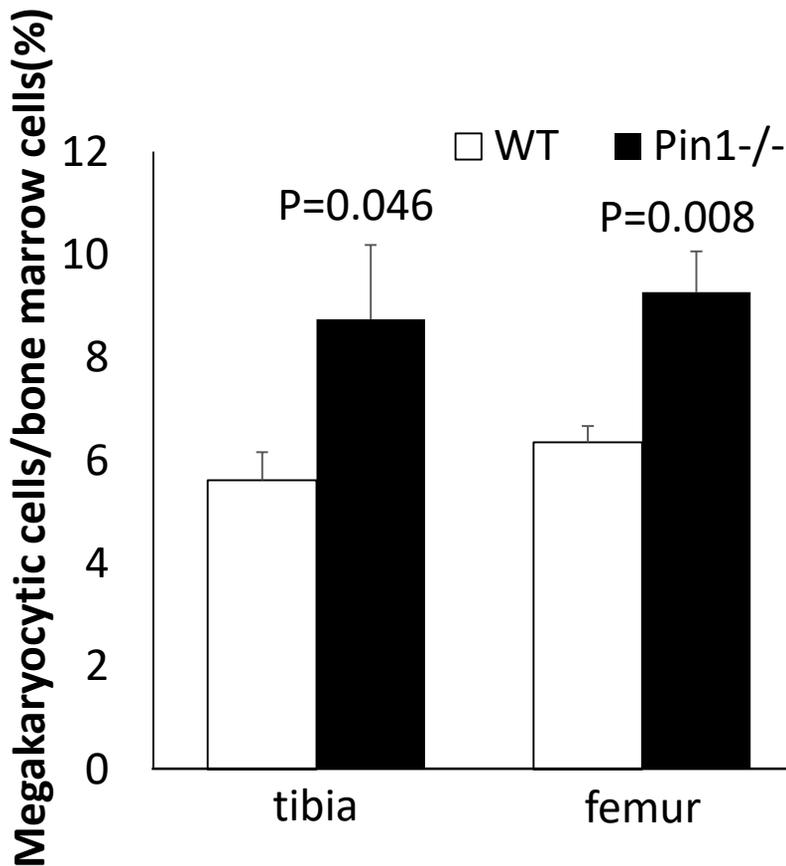


Fig. 5(A) CD41 and CD61 expression on WT and *Pin1*^{-/-} bone marrow cells were analyzed by flow cytometry. (B) The average of the percentage of megakaryocytic cells in three mouse bone marrow cells. Data represents mean \pm SD.

Fig. 6A

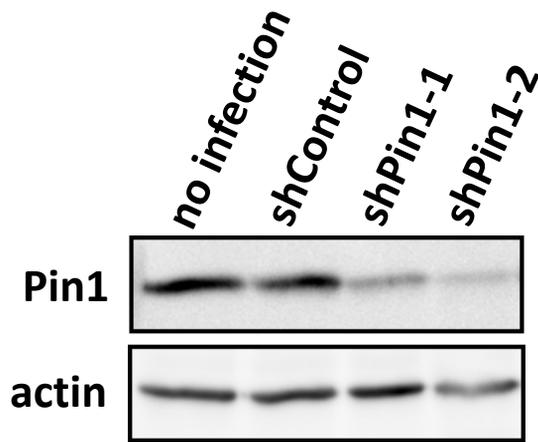


Fig. 6(A) Knockdown of Pin1 in Meg-01 cells by shRNA. The lentivirus carrying the control (shControl) and the shRNA targeting different sites in Pin1 (shPin1-1 and -2) were used to infect the cells.

Fig. 6B

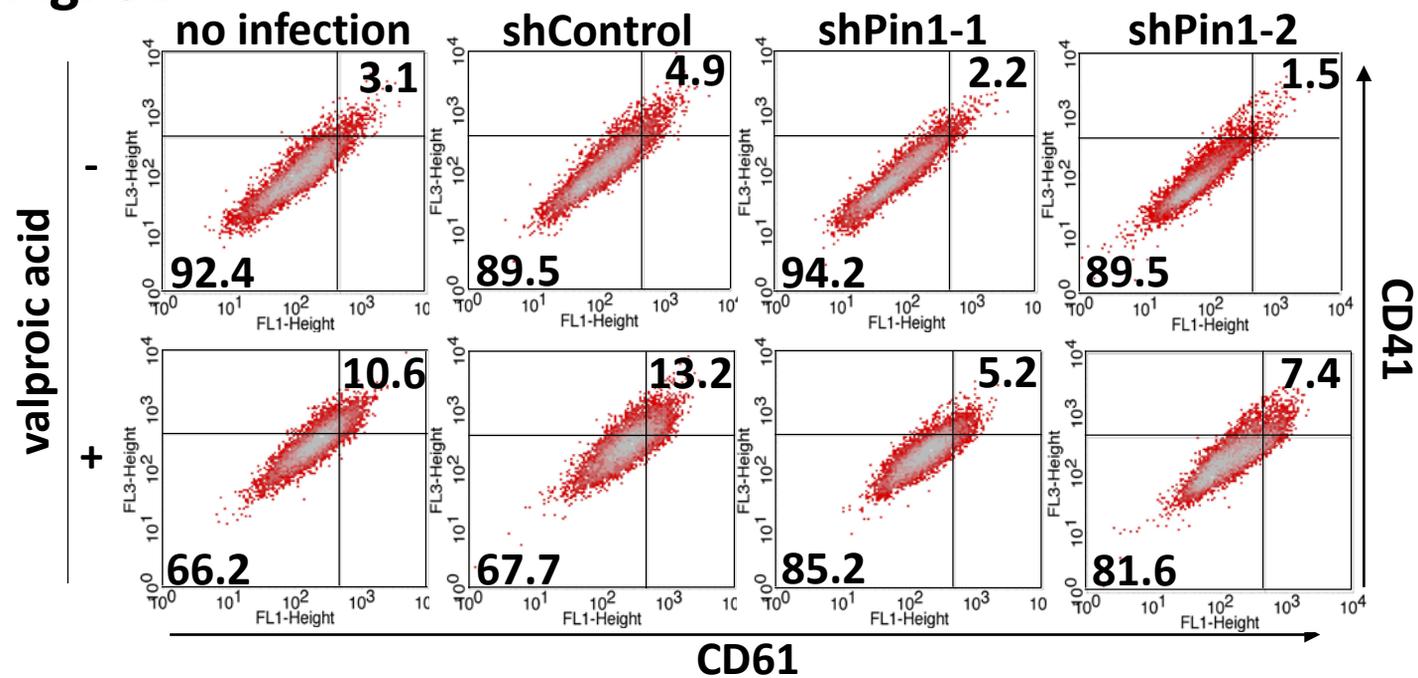


Fig. 6 (B) Meg-01 cells were treated with valproic acid for 3 days and then CD41 and CD61 expression on the cells were analyzed by Flow cytometer.

Fig. 6C

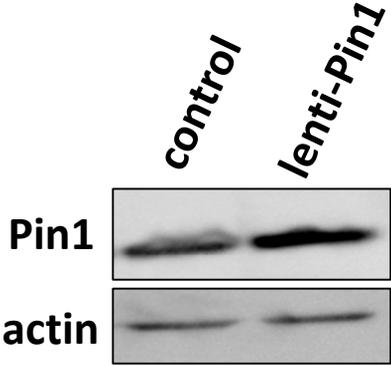


Fig. 6D

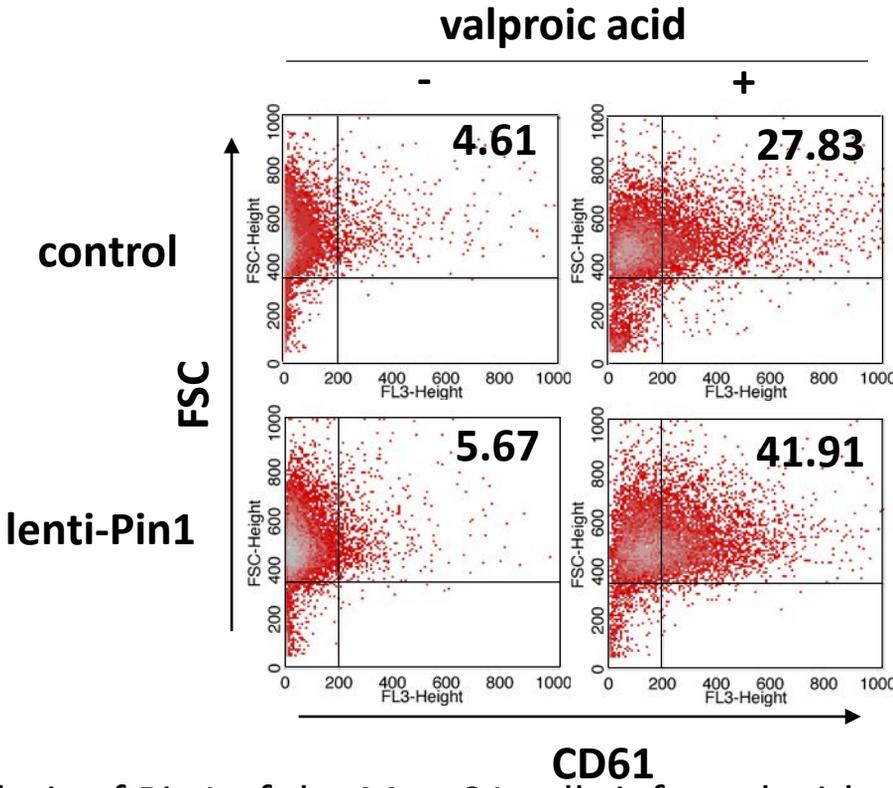


Fig. 6(C) Western blot analysis of Pin1 of the Meg-01 cells infected with MOCK and lentiviral Pin1. (D) Expression of CD61 of Meg-01 cells-infected with control and lentiviral Pin1 in response to valproic acid treatment for 3days was analyzed by flow cytometry.

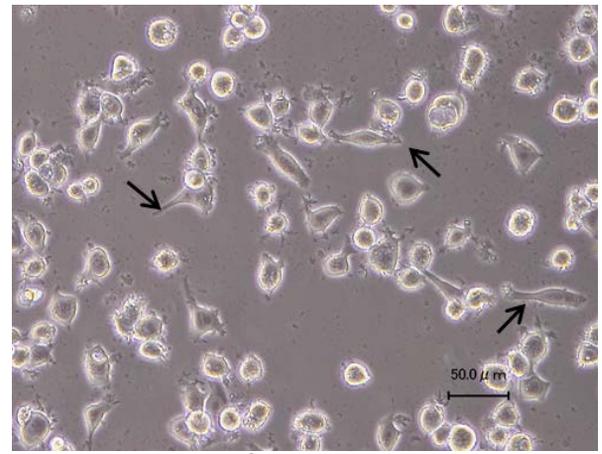
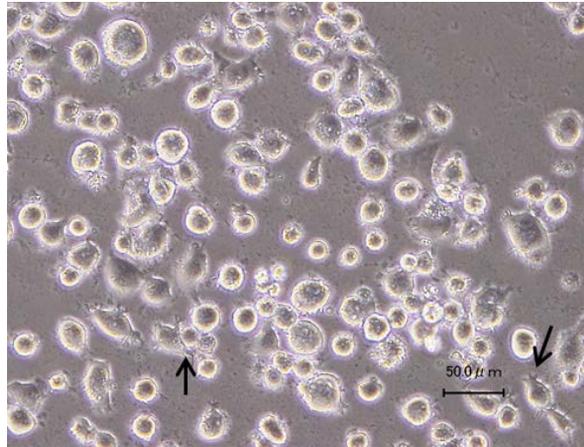
Fig. 6E**no infection****shcontrol****shPin1-1****shPin1-2**

Fig. 6 (E) Representative micrographs of the control and Pin1 knockdown Meg-01 cells in response to valproic acid. Arrows indicate Meg-01 cells extending proplatelets. Scale bar indicates 50 μ m.

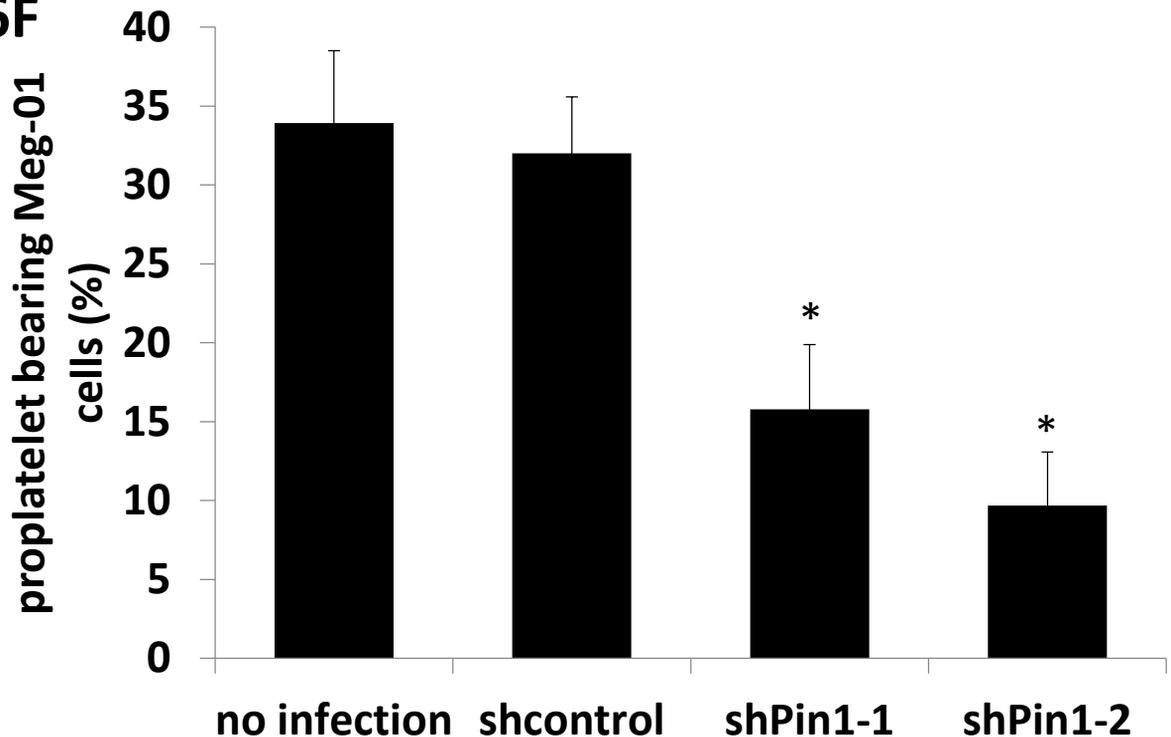
Fig. 6F

Fig. 6(F) The ratios of Meg-01 cells with proplatelets. Data represent mean \pm SD of three independent experiments. Dunnette's test.* $p < 0.05$.

Fig. 7A



Fig. 7(A) Photomicrographs of nocodazole-treated Meg-01 cells in response to valproic acid. Meg-01 cells were treated with 0 and 5 μ M nocodazole for 30 min were stimulated with valproic acid. Scale bar indicates 50 μ m.

Fig. 7B

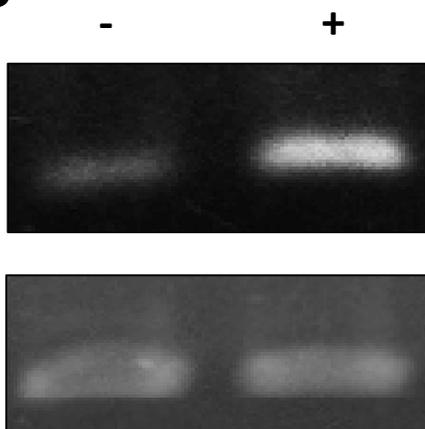


Fig. 7C

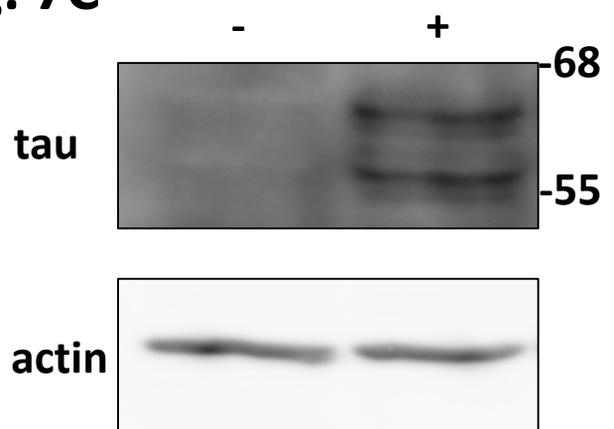


Fig. 7 (B)(C) Tau was induced by treatment with valproic acid. (B) cDNA was prepared from Meg-01 cells treated with or without valproic acid. RT-PCR was performed using human tau specific primer. (C) Meg-01 cells treated with or without valproic acid was lysed, and the expression of tau was analyzed by western blotting.

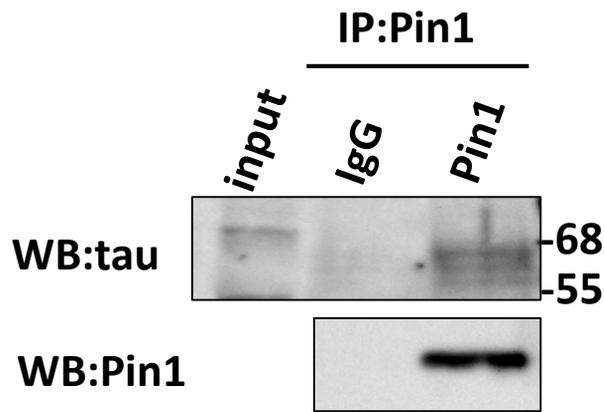
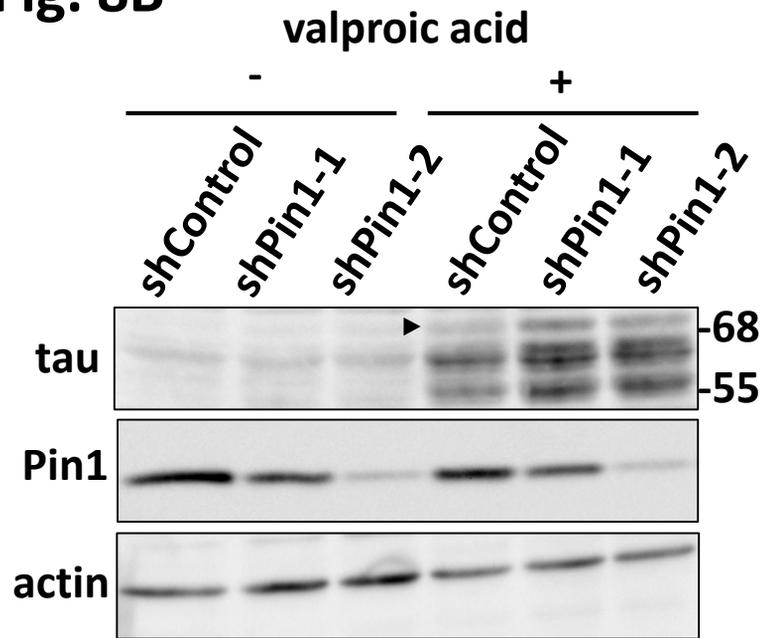
Fig. 8A**Fig. 8B**

Fig. 8(A) Meg-01 cells treated with valproic acid for 6 days were lysed and subjected to immunoprecipitation using normal mouse IgG or Pin1 antibodies. Immunoblotting was performed with the TauH150 antibody. (B) Meg-01 cells-infected with shControl, shPin1-1 and shPin1-2 were treated with or without valproic acid for 3 days. The cells were lysed and the expression of tau were analyzed by western blotting with Tau1 antibody. Arrow indicates high molecular weight tau.

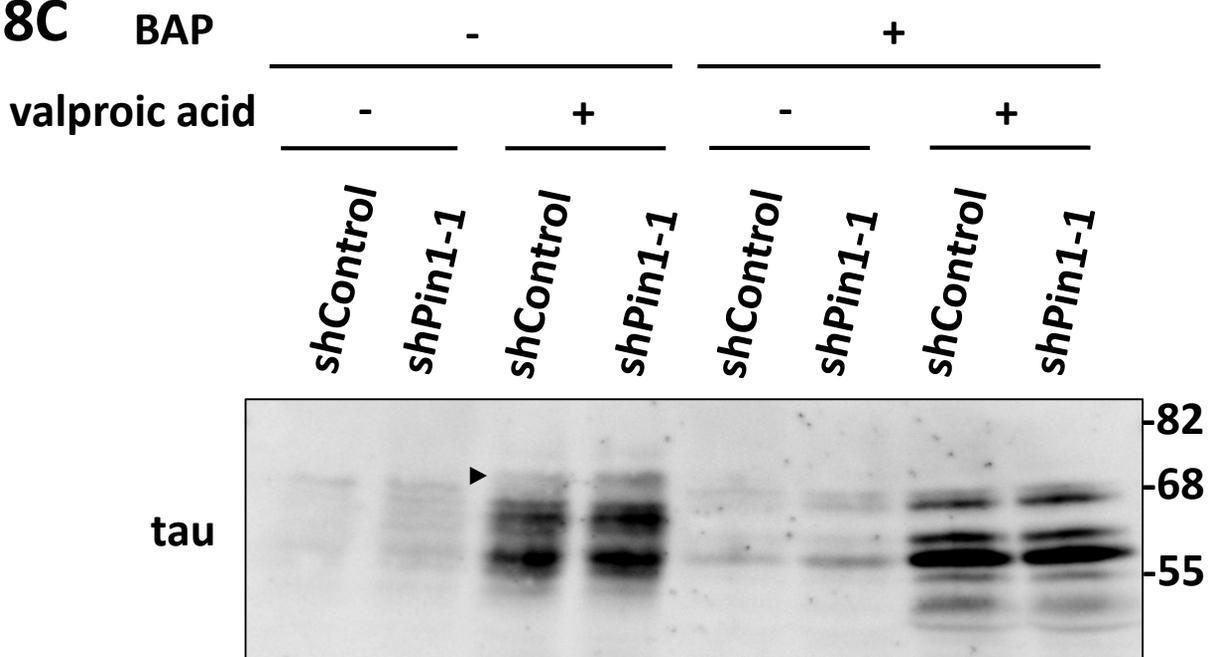
Fig. 8C

Fig. 8(C) The lysates prepared from Meg-01 cells stimulated with valproic acid for 3 days were treated with bacteria alkaline phosphatase (BAP) for 3 hrs. Tau was detected with Tau1 antibody. Arrow indicates high molecular weight tau.

Fig. 9A

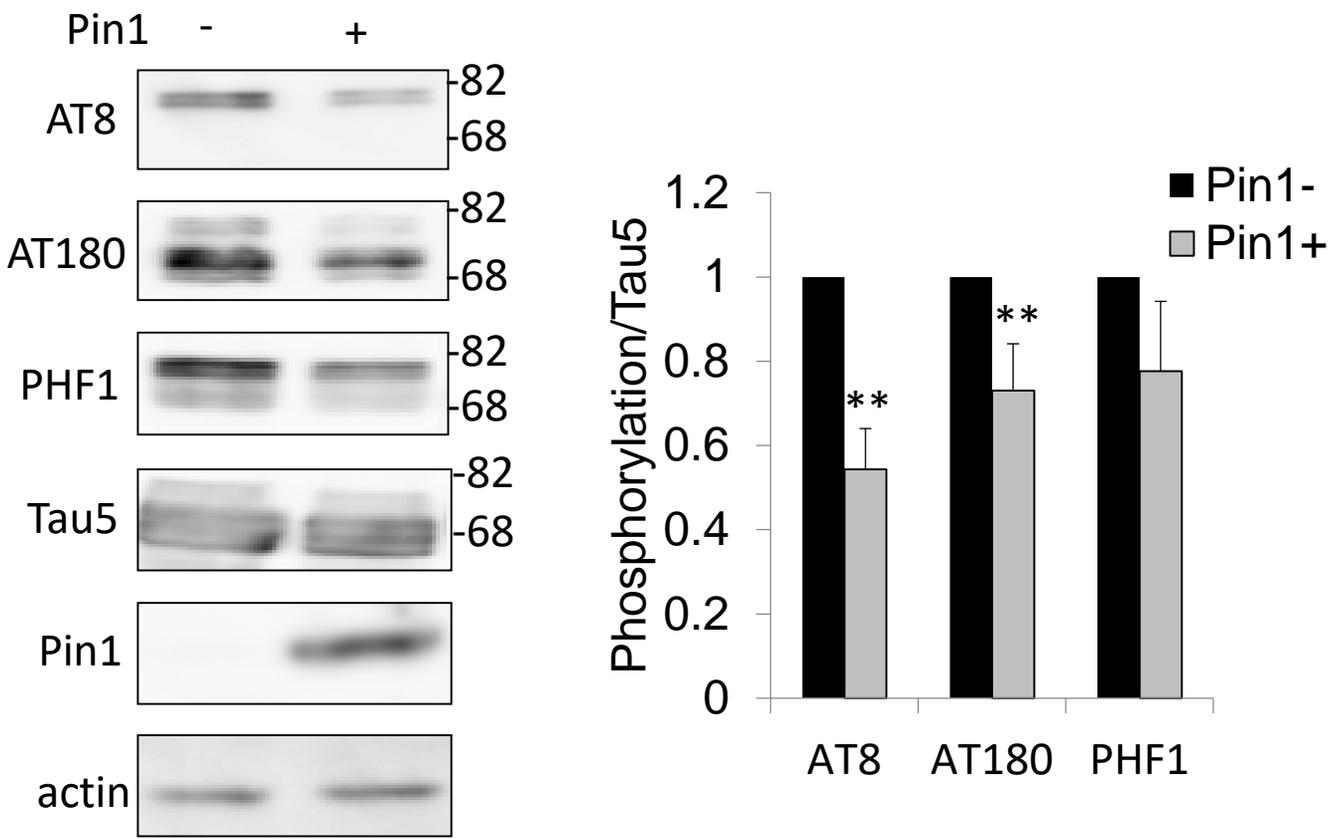


Fig.9(A) HEK293T cells were transfected with *tau* with/without *pin1* plasmid for 48h. Phosphorylation of Tau was analyzed by immunoblotting with AT8 (pS202, pT205), AT180 (pT231), PHF1 (pS396, pS404), Tau5 (total Tau) antibodies (left). Quantification of Tau phosphorylation levels (right). Data represent mean \pm SD of four independent experiments. **p<0.01.

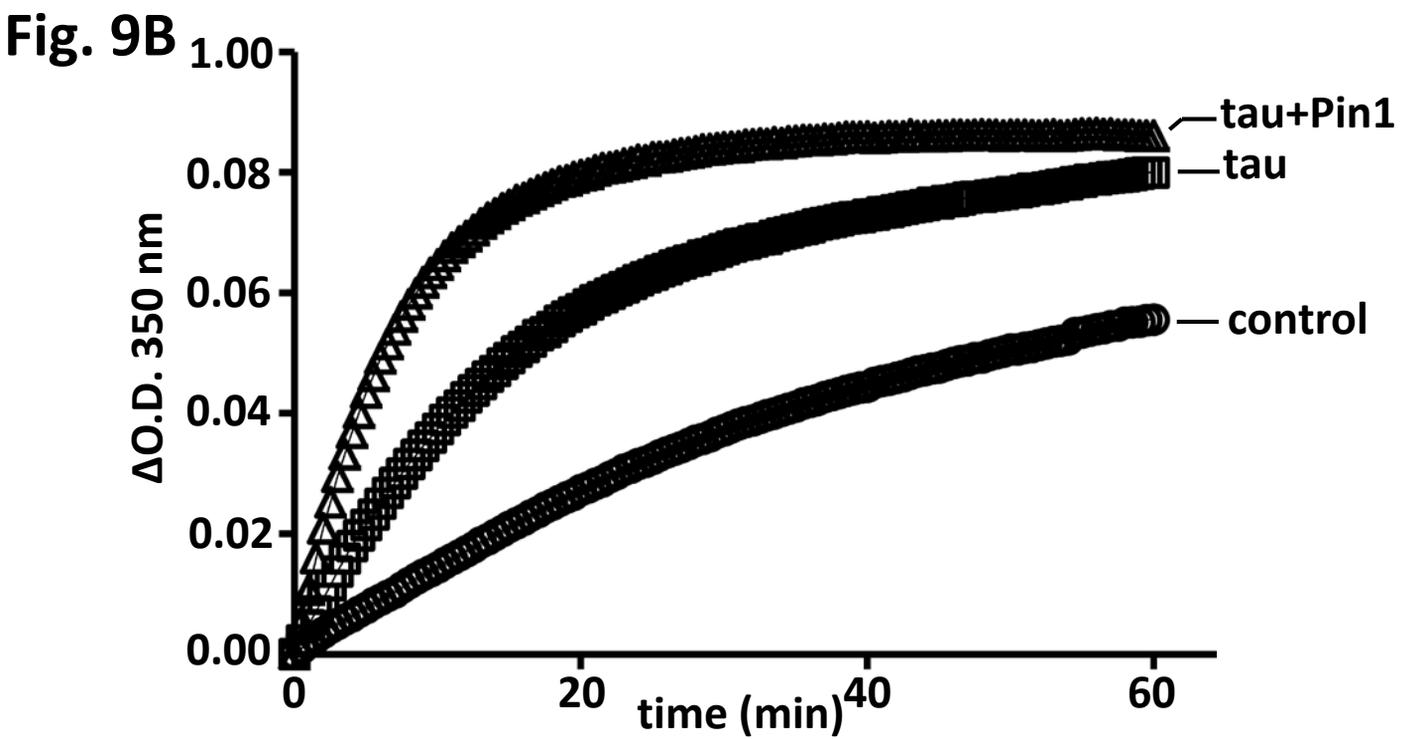


Fig. 9(B) Transfected tau with/without Pin1 in HEK293T cells were purified, and the activity was analyzed by microtubule polymerization assay. 0.1 μM tau (square) or tau cotransfected with *pin1* (triangle) was mixed with 25 μM tubulin and the turbidity was monitored at 350 nm for 60 min. Control (circle) indicates without tau.

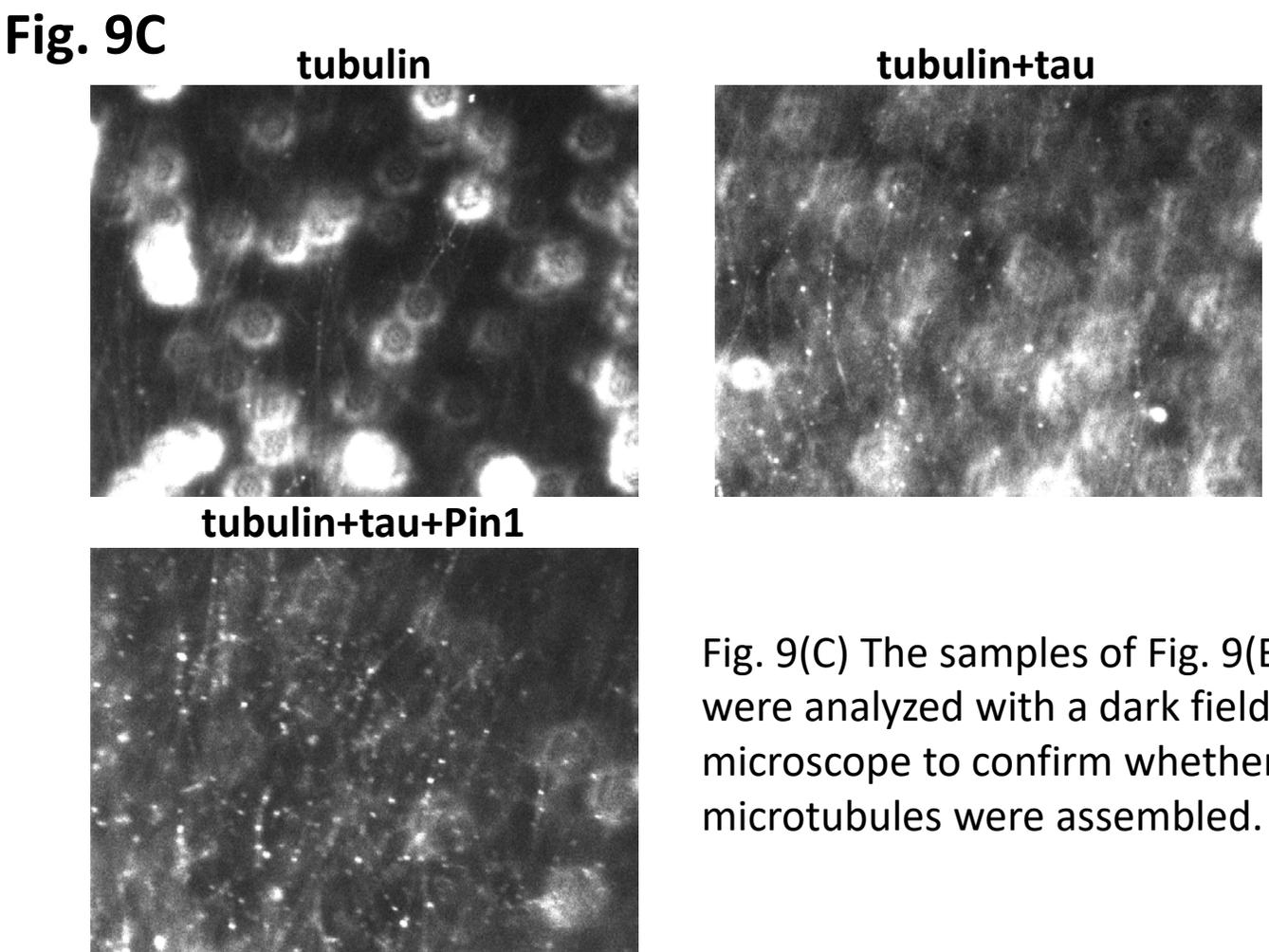


Fig. 9(C) The samples of Fig. 9(B) were analyzed with a dark field microscope to confirm whether microtubules were assembled.

Fig. 10

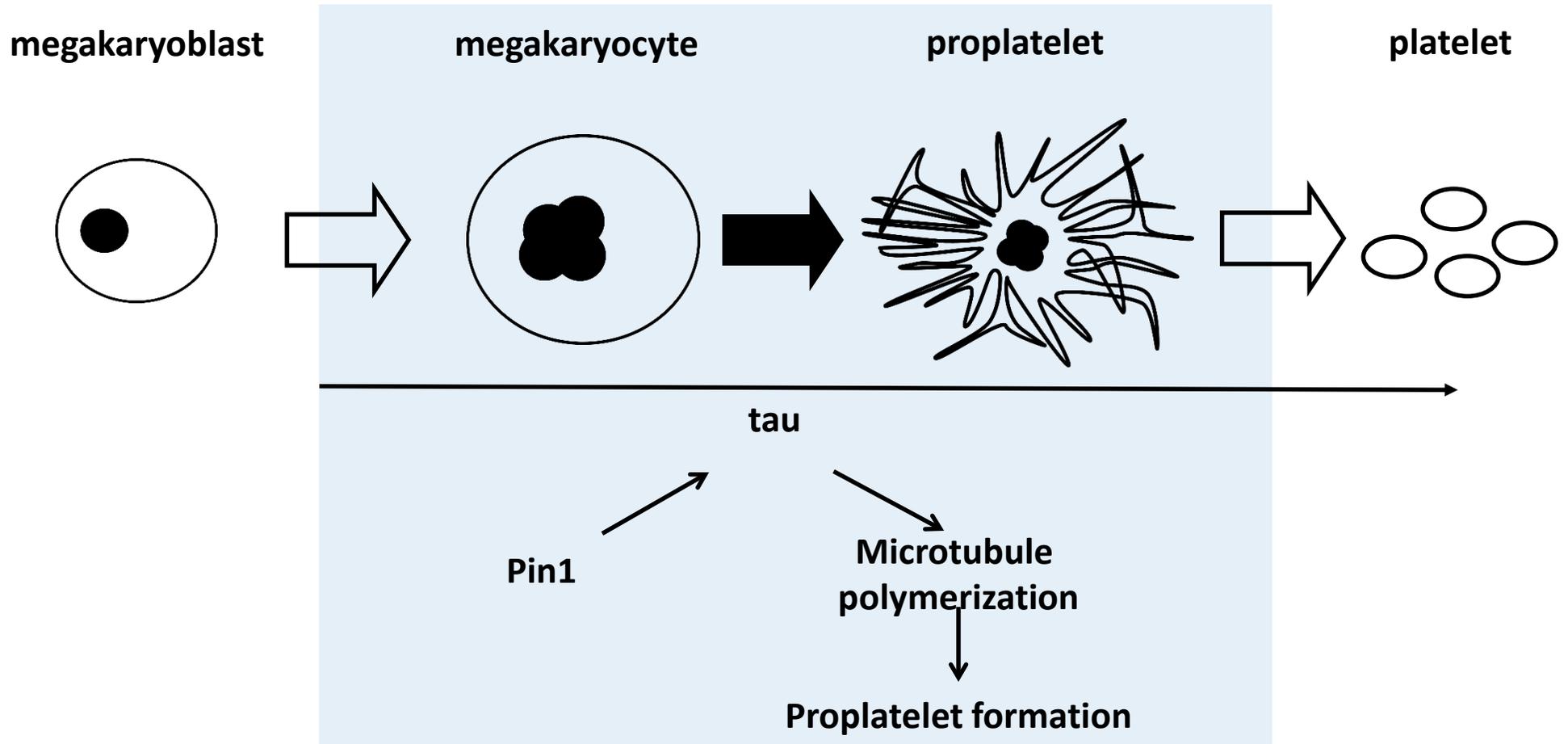


Fig. 10 During proplatelet formation, microtubule associated protein tau is induced. Pin1 promotes proplatelet formation by interacting with tau.