



蛋白質フォールディング酵素の生物活性

(課題番号 13460148)

平成13年度 ~ 平成15年度

科学研究費補助金 (基盤研究 (B) (2))

研究成果報告書

平成16年4月

研究代表者 内田隆史

(東北大学 学際科学国際高等研究センター  
助教授、(兼) 加齢医学研究所 助教授)

## 研究成果

### 目次

#### はじめに

1. Pin1 の生物的な機能の概略
2. Pin1 の構造と機能
3. Pin1 欠損マウスの解析
4. 癌と Pin1 の関わり
5. 中枢での機能

#### まとめ

#### 添付資料

- |           |      |
|-----------|------|
| [添付資料 1]  | P9   |
| [添付資料 2]  | P23  |
| [添付資料 3]  | P29  |
| [添付資料 4]  | P33  |
| [添付資料 5]  | P43  |
| [添付資料 6]  | P50  |
| [添付資料 7]  | P55  |
| [添付資料 8]  | P60  |
| [添付資料 9]  | P65  |
| [添付資料 10] | P73  |
| [添付資料 11] | P81  |
| [添付資料 12] | P87  |
| [添付資料 13] | P92  |
| [添付資料 14] | P97  |
| [添付資料 15] | P103 |
| [添付資料 16] | P113 |
| [添付資料 17] | P123 |
| [添付資料 18] | P129 |
| [添付資料 19] | P131 |
| [添付資料 20] | P138 |
| [添付資料 21] | P140 |
| [添付資料 22] | P154 |
| [添付資料 23] | P157 |

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Yeh, E, Cunnigham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, WC., Stukenberg, T., Shenolikar, S., Uchida, T., Counter, CM., Nevins, JR., Means AR and Sears, R. (2004) A signaling pathway controlling myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nature Cell Biology*, 6(4) 308-318. Advance online publication, 14 March, 2004, ; DOI: 10.1038/ncb1110
2. Liou, YC, Sun, A., Ryo, A., Zhou, X.Z., Yu, ZX., Huang, HK., Uchida, T., Bronson, R., Bing, G., Li, X., Hunter, T. and Lu, KP. (2003) Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature*, 424, 556-561.
3. Miyashita, H., Uchida, T., Mori, S., Echigo, S. and Motegi, K. (2003) Expression status of Pin1 and cyclins in oral squamous cell carcinoma: Pin1 correlates with Cyclin D1 mRNA expression and clinical significance of cyclins. *Oncol Rep*, 10(4):1045-1048.
4. Uchida, T., Takamiya, M., Takahashi, M., Miyashita, H., Ikeda, H., Terada, T., Matsuo, Y., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Fujimori F. and Hunter, T. (2003) Pin1 and Par14 peptidyl prolyl isomerase inhibitors block cell proliferation, *Chemistry and Biology*, 10, 15-24.
5. Miyashita, H., Mori, S., Motegi, K., Fukumoto, M. and Uchida, T. (2003) Pin1 is overexpressed in oral squamous cell carcinoma and its level correlates with cyclin D1 level, *Oncol Rep*, 10(2):455-461
6. Uchida, T., Fukawa, A., Uchida, M., Fujita, K. and Saito, K. (2002) Application of a Novel Protein Biochip Technology for Detection and Identification of Rheumatoid Arthritis Biomarkers in Synovial Fluid, *J. Proteome Res*, 1(6), 495- 499.
7. Zacchi, P., Gostissa, M., Uchida, T., Salvagno, C., Avolio F., Volinia, S., Ronai, Z., Blandino, G., Schneider, C. and Del Sal G. (2002) The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature*, 419, 853 - 857. (with News and Views 419:795-797). Advance online publication, Oct., 2, 2002.

8. Zheng, H., You, H., Zhou, X. Z., Murray, S.A., Uchida, T., Wulf, G., Gu, L., Tang, X., Lu, K.P. and Xiao, Z.-X. (2002) The Prolyl isomerase Pin1 is a novel regulator of p53 in genotoxic response. *Nature*, 419, 849-853 (with News and Views 419:795-797). Advance online publication, Oct., 2, 2002.
9. Fujiyama S, Yanagida M, Hayano T, Miura Y, Isobe T, Fujimori, F., Uchida, T. and Takahashi N. (2002) Isolation and proteomic characterization of human Parvulin-associating preribosomal ribonucleoprotein complexes. *J. Biol. Chem.* 277, 23773-23780. (Additions and Corrections; 277, 42418)
10. Miyashita, H., Takebayashi, Y., Eliason, F.J, Fujimori, F., Nitta, Y., Sato, A., Morikawa, H., Ohashi, A., Motegi, K., Fukumoto, M., Mori, S. and Uchida, T. (2002) Uridine phosphorylase is a potential prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma, *Cancer*, 94. 2959-2966.
11. Liou, YC., Ryo, A., Huang, HK., Lu, PJ., Bronson, R., Fujimori, F., Uchida, T., Hunter, T. and Lu, KP (2002) Loss of Pin1 function in the mouse resembles the cyclin D1- null phenotypes, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 99. 1335- 1340.
12. Kanzaki, A., Takebayashi, Y., Bando, H., Eliason EF, Watanabe, SI., Miyashita, H., Fukumoto, M., Toi, M. and Uchida, T. (2002) Expression of uridine and thymidine phosphorylase in breast carcinoma: Their prognostic significance. *Int J Cancer*, 97. 631-635.
13. Uchida, T., Fujimori, F and Nagata, N. (2002) Identification of genes coding enzymes for ascomycin tetrahydropyranose ring formation, *Int. J. Mol. Med.* 9(2) 141- 145.
14. You, H., Zheng, H, Murray, S., Uchida, T., Fan D. and Xiao, Z-X (2002) IGF-1 induces pin1 expression in promoting cell cycle S-phase entry. *J Cell Biochem*, 84, 211-216. (cover story).
15. Fujimori, F., Kikuchi, J., Gunji, W., Mogi, T., Hatta, Y., Makino, T., Okuhara, K., Uchida, T. and Murakami, Y. (2001) Cross Talk of Prolyl Isomerase, Pin1/Ess1 and Cyclophilin A. *Biochem Biophys Res Comm*, 289, 181-190

16. Terada, T., Shirouzu, M., Fukumori, Y., Fujimori, F., Ito, Y., Kigawa, T., Yokoyama, S. and Uchida, T. (2001) Solution structure of the human parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase, hPar14. *J Mol Biol*, 305, 917- 926.

(2) 口頭発表(発表者名、テーマ名、学会等名、年月日)

1. 内田隆史 加齢 Pin1-KO マウスが示唆した Pin1 によるタウ蛋白質のリン酸化および構造変化の防止、日本薬学会年会 シンポジウム 2004年3月29日
2. 島崎精恵、(+4)、内田隆史、富田基郎 Pin1 欠損マウス線維芽細胞の DNA 損傷刺激に対する応答性の解析、日本薬学会年会 2004年3月29日
3. 秋山弘匡、(+2)、内田隆史 リン酸化タウの構造と機能を変える酵素 Pin1-WW ドインのホモログ GAS-7 の機能解析日本分子生物学会 2003年12月
4. 島崎精恵、(+4)、内田隆史、富田基郎 紫外線照射に対する Pin1 欠損線維芽細胞の応答性の解析 日本生化学会 2003年10月
5. 高橋護人、(+4)、内田隆史 プロリルイソメラーゼ Pin1 は遺伝子傷害で生じるリン酸化p53 の機能を調節して、MRP1 遺伝子の発現を低下させる 日本癌学会 2003年9月
6. 内田隆史、(+4) Pin1 ペプチジルプロリルイソメラーゼ阻害剤による細胞増殖抑制 日本癌学会 2003年9月
7. 古川元庸、(+4) 内田隆史 ヒト末梢血チトクロームP450遺伝子発現は肝のそれを反映するか 日本癌学会 2003年9月
8. 福本学(+4) 内田隆史 トロトラスト症肝癌の発生：トロトラスト肝内分布からの考察 日本癌学会 2003年9月
9. 内田隆史 リン酸化蛋白質の構造と機能を変化させるプロリルイソメラーゼ Pin1 日本分子生物学会 ワークショップ (2002年12月)
10. 藤森文啓、内田隆史、村上康文 ペプチジルシス・トランスイソメラーゼ Pin1/Ess1 の転写因子制御の解析 日本分子生物学会 (2002年12月)

11. 藤山沙理、内田隆史(+2) プロリン異性化酵素ヒト Parvulin とリボソーム前駆体複合体の相互作用解析 日本分子生物学会 (2002年12月)
12. 内田隆史 (2002) プロリルイソメラーゼ Pin1 の細胞周期チェックポイント制御 日本生化学会 シンポジウム (2002年10月)
13. 高橋護人、内田隆史(+3) Pin1/Ess1 遺伝子は薬剤耐性遺伝子の発現を制御している 日本癌学会 (2002年10月)
14. 内田隆史 (+4) プロテインバイオチップ技術を応用したリウマチ関節炎の探索と同定 計算生物学会 (2002年10月)
15. 高橋護人、内田隆史 (+2) 出芽酵母 ESS1 遺伝子の機能解析、日本分子生物学会 (2001年12月)
16. 内田隆史 (+3) Pin1 遺伝子欠損マウス胎児細胞を用いた、プロリルイソメラーゼ Pin1 により調節される分子の解析、日本分子生物学会 (2001年12月)
17. 斉藤賢治 (+2) 内田隆史 プロテインチップを用いた慢性関節リウマチで特異的に発現するタンパク質の同定、日本分子生物学会ワークショップ (2001年12月)
18. Uchida T "Biological function of a novel prolyl isomerase Pin1 and the Inhibitors" The 4th Workshop for Microbial Resources (2001,11月)
19. 内田隆史 (+3) プロリルイソメラーゼによるアポトーシス制御、日本癌学会 (2001年、10月)
20. 宮下仁 (+4)内田隆史 口腔扁平上皮癌での Uridine Phosphorylase 発現レベルの臨床病理学的意義、日本癌学会 (2001年11月)
21. 内田隆史 (+5) 新規プロリルイソメラーゼ hPar14 の構造と機能とその阻害剤、計算生物学会 (2001年、7月)

(3) 出版物(著者名、書名、出版者名、年月日)

1. 内田隆史 (2004) over view、および 蛋白質の過剰リン酸化によっておこる疾患、Pin1 と癌、アルツハイマ病 (内田隆史 編) Molecular Medicine, 中山書店。印刷中。
2. 内田隆史 (2003) Pin1 のアルツハイマー病防止機能、BioMedical Quick Review Net (インターネット)、メディカルドゥ社、No. 015。
3. 内田隆史 (2003) 加齢に伴う神経変性から脳を守るプロリルイソメラーゼ Pin1、医学のあゆみ、医歯薬出版社、207 (3) 205-206。
4. 内田隆史 (2003) タンパク質リン酸化の謎を解く鍵 Pin1、Molecular Medicine、中山書店、40 (4) 468-474。
5. 内田隆史 (2002) プロリルイソメラーゼ Pin1 による P53 の機能調節 実験医学、羊土社 20(18) 2644-2645。
6. 斎藤賢治、内田隆史 (2002) 癌の薬剤耐性診断の新展開 - CGH と cDNA マイクロアレイ技術の耐性診断への応用 - プロテインチップを用いた蛋白質機能解析 臨床病理レビュー特集第 119 号 (菊地義公、竹村譲 編集) 臨床病理刊行会 pp 143- 156。
7. 内田隆史 (2002) リン酸化タンパク質を異性化させる酵素 Pin1 の多様な機能 「化学と生物」学会出版センター 40 (8) 494-496。

マスコミ報道

1. 2000 年 10 月 3 日 日刊工業新聞「癌抑制遺伝子 p53 を制御する蛋白質を特定」
2. 2000 年 12 月号 日本科学技術動向 (カナダ大使館発行) 「A Protein that Controls Functions of Cancer Restraining Gene p53 Identified.」
3. 2003 年 1 月 7 日 リューマチ (プロテオーム); 日経バイオテク
4. 2003 年 7 月 31 日 アルツハイマー病; 脳の神経細胞を維持する遺伝子発見。ヤフーニュース。他、毎日新聞、日本経済新聞、各地方新聞朝刊。

## はじめに

本科学研究費の補助を受けて、我々は、蛋白質フォールディング酵素の生物活性について研究した。特に、リン酸化された蛋白質に特異的に作用するプロリルイソメラーゼ Pin1 の生物学的な機能について、Pin1 遺伝子欠損マウスとその細胞を用いて検討し、Pin1 が、癌や神経変性疾患の発症に関与していることを明らかにすることに成功した。今後は、これまでの研究成果を発展させて、他の生物学的な活性について明らかにして、得られた成果の実用的な応用に関しての検討を進めていく計画である。

本研究による成果は、Pin1 の生物学的な作用を明らかにしたことである。また、偶然であるが、世界で始めて、遺伝子を欠損させることで神経変性疾患のモデルになりうるマウスを作成することに成功した。これらの研究は、参考文献として後述してあるように、*Nature* に 3 報、*Nature Cell Biology* に 1 報、*Proc Natl Acad Sci, USA* に 1 報、*Chem and Biol* に 1 報などを始めとする多くの一流雑誌に掲載された。研究成果の多くは、国際的な共同研究によって生まれたものであるが、その核は本研究補助金によってつくられた。国内外の共同研究者たち、私の研究を支えてくれた私の研究グループのメンバーに大変感謝している。

### 1. Pin1 の生物学的な機能の概略

細胞が刺激を受けると、細胞内にシグナルが伝達されるが、その伝達には多様なカイネースが関わっている。カイネースのうち、例えば、MAPK, JNK, p38 または CDKs などのカイネースは、細胞内の蛋白質の Ser または Thr をリン酸化 (p) する。特に、Ser-Pro または Thr-Pro の配列が pS/T-P になると、この部位を含む周辺の特定の配列を特異的に認識して、Pin1 が結合する。次に、Pin1 が、プロリルイソメラーゼ活性によって、S/T-P のペプチド結合を回転させることで、リン酸化された蛋白質の構造は変化し、直接的、または間接的に機能も変化する。

DNA が障害を受けると、それを修復するために、細胞の増殖を停止させ、また損傷を受けた DNA をもつ細胞にアポトーシスを誘導させて抹殺するなどの防衛反応がおこる。Pin1 がないとこれらの細胞を守る機構が順調に働かなくなり、癌を発症する可能性が高くなる。しかし、Pin1 の発現量が多すぎると細胞の増殖が急速に進み、逆に癌細胞の増殖を早める。癌の他に、補助因子である Pin1 の有無で発症のしやすさが異なる疾患としては、加齢に伴って発症する疾患が考えられる。加齢に伴い増大する疾患の代表としては、アルツハイマー病などの神経変性疾患がある。神経変性疾患は蛋白質の耐用年数を超えて長生きする



ことによって起こるようになった病気とも考えられる。Pin1 が疾患の原因蛋白質の発現量を調節していることを考えると、癌と同じように、Pin1 の発現が全くないと、病因となる変性蛋白質の集積が起こるし、過剰に発現すると別な機構が働き、発症しやすくなる可能性があると予想している。

Pin1 が全く発現していなくても、また、過剰に発現しても、癌や神経変性疾患の発症しやすくし、また悪性を促進すると思われる。

## 2. Pin1 の構造と機能

Pin1 は、アスペルジルスニドランスのネバーインマイトーチス A (NIMA) をベイトにした酵母ツーハイブリッドスクリーニングによってヒト cDNA 発現ライブラリーからクローニングされた分子である (1)。NIMA は、細胞周期 G2/M の進行に関わるカイネースであり、サイクリン B/CDC2 複合体による G2/M の進行促進経路以外の経路をつかさどる酵素である。脊椎動物にも NIMA 経路が存在するという報告が 1995 年にでてから、我々を含めて多くの研究者がそれを発見しようと試みたが、今では NIMA のホモログは脊椎動物では発見されていないし、その存在はあまり信じられていない。しかし、NIMA 研究の副産物として発見された Pin1 の重要性は以前よりも増加している。

Pin1 はアミノ末端側にある WW (Trp-Trp) ドメインと、カルボキシル末端側にあるペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ (PPIase) ドメインの 2 つのドメイン構造を短い柔軟性のあるアミノ酸配列 (ループ) を介して結びついた構造をとっている。このような 2 重ドメイン構造をとっている PPIase は、発芽酵母では Ess1、分裂酵母では Pin1、ショウジョウバエでは Dodo、哺乳類では Pin1 と呼ばれており、すべての真核細胞で保存されている。どちらのドメインも Pin1 の蛋白質制御活性に関与している可能性がある。WW ドメインは、2 つの保存された Trp を含んだ構造をとっている約 40 アミノ酸からなる小さな蛋白質ドメインである。この WW ドメインは蛋白質-蛋白質間の相互作用に関わる。Pin1 が属するのは、タイプ 4 の WW ドメインであり、pSer-Pro または pThr-Pro 部位と相互作用する。pSer/Thr-Pro を含むペプチド構造からなる蛋白質に、Pin1 は WW ドメインで結合する。リン酸化ペプチドには、次にループで連結している PPIase ドメインの活性中心が作用して、そのタンパク質がその後の変化を受けやすくなるように構造を変化させる。PPIase は、蛋白質分子中のアミノ酸 X-Pro ペプチドを認識して、この部分のペプチド結合をシスからトランスに回転させて、ペプチド結合を平衡化させる酵素である。

PPIase には、FK506 結合蛋白質 (FKBP)、シクロフィリンおよびパルブリンの 3 種類のサブファミリーがある。FKBP とシクロフィリンは、ともに何種類もの類似の蛋白質からなる大きなファミリーを形成している。これらの

PPlase の作用は多方面にわたっているが、これらの分子に重複分子が多いことから、生体での機能については、未だに不明な点が多い。Pin1 は比較的新しく発見されたファミリーであり、ゲノムデータベースを探索しても、哺乳類には Pin1 の他には我々が発見した Par14 だけしかない。しかも、Par14 は WW ドメインを持っておらず、構造上からは、Pin1 の重複分子ではないと推察された(2)。また、Pin1 の最大の特徴は、X-Pro の X がリン酸化された Ser または Thr である構造を特異的に認識するが、Par14 のリン酸化ペプチドに対する結合は弱いこともその理由である。酵母で、ESS1/Pin1 を欠損させると、ESS1 の機能をサイクロフィリンが補ったので、多様な PPlase は、たとえそれぞれの属するサブファミリーが異なっているとしても、いざとなればお互いに補い合って働く可能性もあり、Par14 が Pin1 の機能を補っていないということは言い切れない。

### 3) Pin1 欠損マウスの解析

我々は Pin1 遺伝子欠損マウスを作製したが、この Pin1<sup>-/-</sup>マウスは、それまでの Pin1 研究に風穴を開け、Pin1 の生物学的な機能を明らかにするのに役立ってきた (3)。第一に、Pin1 は発見当初、生存に必須であると報告されていたが (1)、我々の作製した Pin1<sup>-/-</sup>マウスが生存することで、この報告が間違いであることが明確になった。Pin1<sup>-/-</sup>マウスの胎児線維芽細胞 (MEF) では Par14 の発現量が増加していたので、Par14 が機能的な意味での Pin1 の重複分子である可能性は否定できない(3)。第二に、この Pin1<sup>-/-</sup>MEF を用いた一連の研究によって、Pin1 が生存には必須でないだけでなく、それまで G2/M に特異的に関わると報告されていた Pin1 が、G0 期からの脱出や、G1/S の進行にもかかわることが明らかにされた (4)。第三に、Pin1<sup>-/-</sup>マウスの表現型を解析した結果、1) 個体が小さい、2) 網膜が薄くなる異常が生じる、3) 妊娠したメスマウスの乳腺の形成が貧弱になるなど、CyclinD1 遺伝子を欠損させたマウスと同様の表現型を示すことを発見し、Pin1 がの発現レベルを増加することを見出した (5)。Pin1 は口腔癌患者の予後を推測する危険因子ではなかったが、その発現が口腔癌では正常組織に比べて高レベルであることを示した (6)。第四に、精子形成の欠陥が見られた。特に、129SV マウスを B6 マウスとバッククロス交配して作成した B6 遺伝子バックグラウンドの Pin1<sup>-/-</sup>マウスでは精子だけでなく卵子形成にも欠陥が起こり、雌雄ともに完全な不妊になる表現型も発見された(5,7)。第五に、Pin1<sup>-/-</sup>マウス MEF に遺伝子損傷を与えても、細胞増殖 (細胞周期) が停止したり、細胞死が起こったりしないことから、Pin1 が p53 の機能を調節していることを発見した(8,9)。第六に、Pin1<sup>-/-</sup>マウスの脳に変性した過剰リン酸化 tau が多く存在して、神経原線維変化を起こすことを発見して、Pin1 が神経原線維変化を防止する可能性があることを示した(10)。我々

は、現在も Pin1 の機能を検討しており、Pin1 が影響を与える新しい分子を発見しており、今後もさらに関連分子が発見される可能性は大きい。

#### 4) 癌と Pin1 の関わり

Pin1 欠損マウスでは、マウスの小型化、老化に伴う網膜の薄化、および出産後の乳腺形成不全などが観察された。これらの表現型は *CyclinD1* 欠損マウスでみられる変化であり、Pin1 による *CyclinD1* の発現上昇や、*CyclinD1* の安定化によるものと予測された。そこで、網膜の切片と乳腺の切片について、組織病理学的な解析を行い、*CyclinD1* と Pin1 の発現を比較した。両者の発現場所は重なっていたので、Pin1 が *CyclinD1* の発現を上昇させているのか、または *CyclinD1* 蛋白質を安定化させているのだと推察した。ヒトでも口腔癌での両者の発現を検討して、マウスと同様に、Pin1 が高発現している細胞は *CyclinD1* を高発現しており、両者の発現には関連があることが確認された (6)。同様のことは乳癌でも観察された。

Pin1 が *CyclinD1* の発現を上昇させるということは、Pin1 が細胞の増殖を速めることを示唆していたが、逆に、細胞の遺伝子が傷つくと、細胞が増殖を停止したり、アポトーシスをおこすのにも Pin1 が関係していることを発見した。我々は、*Pin1*<sup>-/-</sup>/MEF を低血清濃度の培地で培養した後に、通常濃度の血清を含む培地に移すと、細胞が順調に増殖しなくなることに気がついたので (4)、次に、細胞にストレスを与えた後で細胞の増殖がどう変化するかを検討してみた。紫外線照射や抗癌剤投与などによって、細胞の DNA に障害を与えると、野生型 MEF は増殖を停止するか、アポトーシスを起こす。しかし、*Pin1*<sup>-/-</sup>/MEF は増殖の停止やアポトーシスの誘導も野生型のようにタイミングよく迅速におこさなかった。これらの事実から、Pin1 がチェックポイントに関わっているのではないかと推測した。

そこで Pin1 が p53 の活性に影響を与えているかどうか調べてみることにした。p53 には、Pin1 が結合しうる pSer/Thr-Pro が 6 箇所もあった。検討の結果、Ser33, Thr81, Ser315 がリン酸化されると、そこに Pin1 が結合することがわかった。この結合には Pin1 の WW ドメイン部分が関与する。Pin1 が p53 に結合すると、さらにその PPIase 活性が p53 に作用して、p53 の構造を変化させて MDM2 と結合しにくい構造にする。その結果、p53 はユビキチン化による分解を受けにくくなるために、結果として発現量は増加する。しかも、活性型構造に変化した p53 の転写活性も亢進する。この結果、p53 に発現を制御されているアポトーシスを促進する分子 “killerDR5 や BAX”、また細胞周期に関係する分子 “p21” などの発現が亢進する。以上、Pin1 の作用は図 1 にまとめたとおりである (8,9)。この Pin1 による p53 の制御は、Pin1 がある通常の状態では

発癌が抑えられるが、Pin1 がないと癌になりやすくなることを示唆している。通常のマウスに比較して、Pin1<sup>-/-</sup>マウスでは発癌率が上昇している事実はまだ観察されていないが、今後、放射線や紫外線を照射するなどしてマウスでの発癌率について検討する必要があると考える。

以上のように Pin1 が過剰発現すると細胞周期の回転は速くなり、一方で Pin1 が発現しないとチェックポイントがタイミングよく機能しないことから、Pin1 の発現量は適量であることが癌を防ぐ上で重要だと考える。Pin1 のような補助因子はそれ自体では病気の発症には直接関与しないが、全くないと Pin1 の作用する p53 などの分子の機能が十分に発揮されず疾患の原因になる恐れがある。一方で、他の分子の機能を増強させるので、Pin1 が過剰に発現すると、すでに癌になって過剰に発現している CyclinD1 などの分子をさらに過剰発現させたり、または蛋白質自体を活性化させてしまっただけで癌を悪化させたりする可能性がある。

さらに我々は Myc の発現量に Pin1 が関係していることも見出した。私は、1999 年にすでに Pin1 が p53 や Myc (特に Myc BOX) に作用することを予測していた (11)。海外のグループとの共同研究によって、これらの予測のうち p53 に関しては 2002 年に証明して発表した (8, 9)、最近、ついに Myc についても証明することができた (12)。Myc は、ERK によって Ser62 がリン酸化され、次に GSK-3 $\beta$  によって Thr58 がリン酸化される。この 2 箇所がリン酸化された Myc に Pin1 が結合して Myc の構造を変化させる。これより、Ser62 が PP2A によって脱リン酸化されやすい構造に変化する。Ser62 が脱リン酸化されて、Thr58 だけがリン酸化された構造の Myc はユビキチン化されやすい構造となり、Myc は分解されていく。このように、我々は、Pin1 が機能しないと、Myc が蓄積されて、細胞が不死化することを発見した。ついでだが、SV40 の small T 抗原は PP2A に結合して活性を阻害することで、Myc の脱リン酸化を阻止して、Myc を安定化させて、細胞を不死化すると説明できる。Pin1 はこのように正常細胞が癌化する際の重要な役割を Myc を通してしている可能性がある。

Pin1 の機能は抑制と活性化が入り混じっていて、多様であり単純ではない (13)。したがって、Pin1 と癌との関連に関しては、さらなる研究が必要であると考える。

## 5) 中枢での機能

Tau は、微小管の重合を促進し、重合した微小管を束ねる機能を持つ。神経細胞は突起を伸ばして連絡しあっているため、脳内には多くの微小管が存在しており、したがって、Tau の発現量も多い。Tau は M 期に高度にリン酸化される蛋白質であり、MPM-2 抗原の一つである。MPM-2 抗原の蓄積はアルツハイ

マー病など神経変性疾患で初期に見られる共通の所見である。実際、Pin1<sup>-/-</sup>マウスの神経細胞では野生型に比べて約3倍多く MPM-2 抗原が発現していた。しかも、Tau 中には、17箇所 Ser/Thr-Pro が存在している。Pin1 は、Tau の Thr231-Pro 部位に特異的に結合して、その構造を変化させる。これによって、失活した Tau の微小管重合機能を回復させること、およびその回復の原因が、Pin1 によって、リン酸化 Tau がホスファターゼ(PP2A)の作用を受けやすくなることであることが報告されている。また、ドミナントネガティブ PP2A を発現させたマウスでは、リン酸化 Tau の発現量が減少していることも報告されている。

一方、我々は、Pin1<sup>-/-</sup>マウスが加齢とともに、網膜の萎縮を示すこと、および四肢の反射異常を起こすことを発見していた。網膜の萎縮は神経変性疾患の特徴でもある。これらを考え合わせると、Pin1-KO マウスの脳では、Tau が過剰にリン酸化されて、異常構造をとっており、それによって中枢の異常が起こっていることが推測された。

Tau に対するいろいろな抗体を用いてウエスタンブロット解析をしたところ、68K に検出される Tau のバンドが、過剰にリン酸化された異常構造(神経原線維変化)をとっている Tau であることが示唆された。Pin1-KO マウスと野生型マウスの脳の CDK と GSK-3b のキナーゼ活性を比較したところ、活性に差はなかった。しかし、リン酸化 Tau に対する両者のホスファターゼ活性は大きく異なっていた。これらの事実は、リン酸化 Tau への Pin1 の結合と、それによる Tau の構造変化が、リン酸化 Tau からの効率的なリン酸の除去に必要であることを裏付けている(図2)。ニューロンの細胞質に神経原線維変化が見られたが、この神経原線維変化が過剰リン酸化変性 Tau によるものであることは、変性 Tau に対する抗体標識した金コロイドが繊維に結合することを電子顕微鏡でも確認したことで示した。Pin1 の発現している場所と神経原線維変化が起きている場所を、それぞれを認識する抗体(抗 Pin1 抗体と神経原線維変化に特異的な抗リン酸化 Tau 抗体 AT8)で同時に免疫染色して検討した。健常人とアルツハイマー病患者の海馬と頭頂皮質での Pin1 の発現を各々数例ずつ調べたところ、海馬でも皮質でも、Pin1 の発現量が高い部位では、神経原線維変化をあまりおこさないで、Pin1 の発現量が低い部位では、逆に、神経原線維変化を起こしやすくなる傾向がみられた。野生型に比べて、Pin1<sup>-/-</sup>マウスは、加齢とともにその運動能を急速に低下させた。加齢とともに Pin1<sup>-/-</sup>マウスでは頭頂皮質や脊髄の前核細胞でのニューロン数が減少することが運動能低下の理由だと考えられる。

遺伝子を過剰発現させるのではなくて、特定の遺伝子、Pin1 を欠損させることでアルツハイマー病に関係する神経原線維変化を起こしたマウスを作成することに成功したのは我々が始めてである。現在、Pin1 とアミロイドとの関連な

どについても、この Pin1-KO マウスやトランスジェニックマウスなどを用いて検討している。今後アルツハイマー病の表現型である学習と記憶についての検討を行っていく。

#### まとめ

Pin1 の研究は、癌や中枢を中心にしてさらに発展していくと予想され、Pin1 欠損マウスやトランスジェニックマウスが、癌や加齢に関係する多様な疾患のモデル動物になることも期待される。Pin1 の機能を制御する薬剤としては、我々がすでに報告したものがあるが (3)、さらにこういった研究が進めば、これらの疾患の治療や予防にも役立つと期待できる。また、Pin1 とは別のリン酸化蛋白質の構造と機能を制御する制御因子の発見も今後期待でき、これらの使い分けがなされていることと推察される。我々も昨年からは NEDO の助成を受けて、p53 や myc のようなリン酸化による制御を受けている転写因子の制御因子の発見を試みている。

- 1) Lu, KP. *et al* (1996) *Nature* 380: 544-547.
- 2) Uchida, T. *et al* (1999) *FEBS Lett* 446: 278-282.
- 3) Uchida, T. *et al* (2003) *Chem and Biol* 10: 15-24.
- 4) Fujimori F. *et al* (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 265: 658-663.
- 5) Liou, YC. *et al* (2002) *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 99: 1335-1340.
- 6) Miyashita, H. *et al* (2003) *Oncol Rep* 10: 455-461.
- 7) Atchison FW *et al* (2003) *Development* 130: 3579-3586.
- 8) Zacchi, P. *et al* (2002) *Nature* 419: 853-857.
- 9) Zheng, H. *et al* (2002) *Nature* 419: 849-853.
- 10) Liou, YC. *et al* (2003) *Nature* 424: 556-561.
- 11) 内田隆史 (1999) 実験医学 羊土社 増刊 17 (5) 102-106.
- 12) Yeh, E. *et al* (2004) *Nature Cell Biology*, *in press*
- 13) 内田隆史 (2003) *Molecular Medicine*、中山書店、40 (4): 468-474.

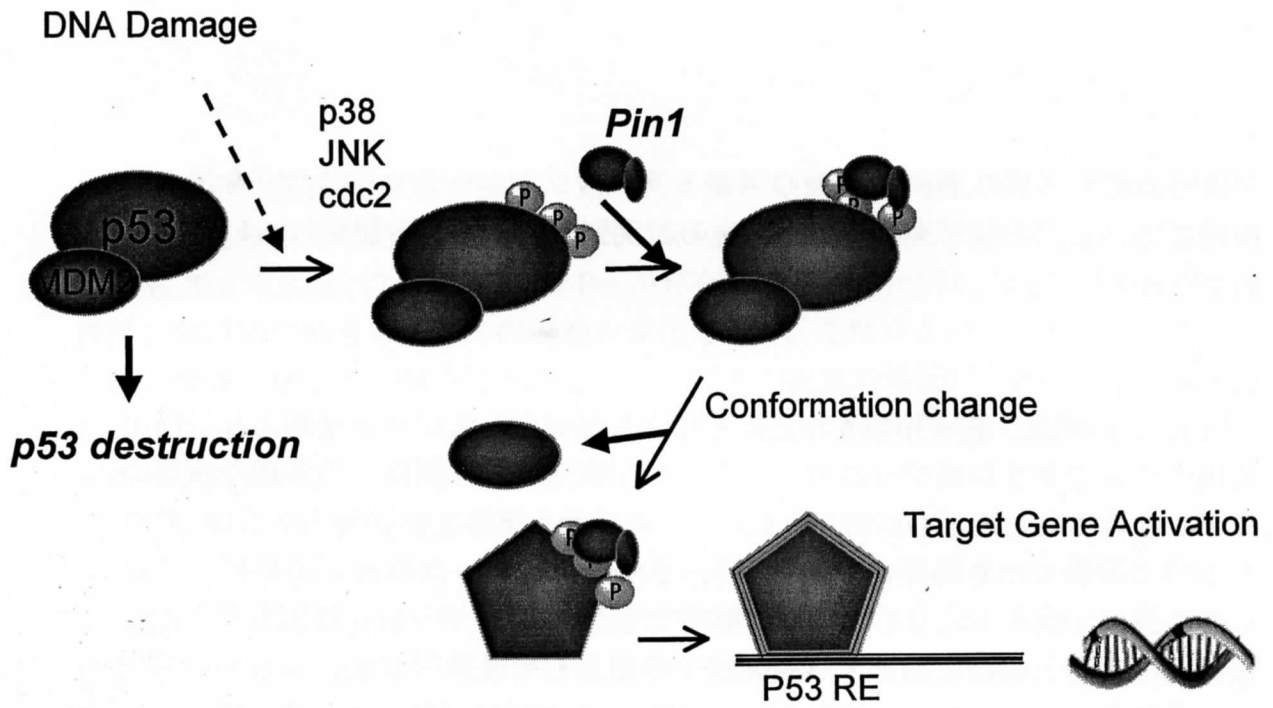


図1 Pin1は、DNA障害によって誘導される「タイムリーなp53の転写活性機能の活性化」に必要である。

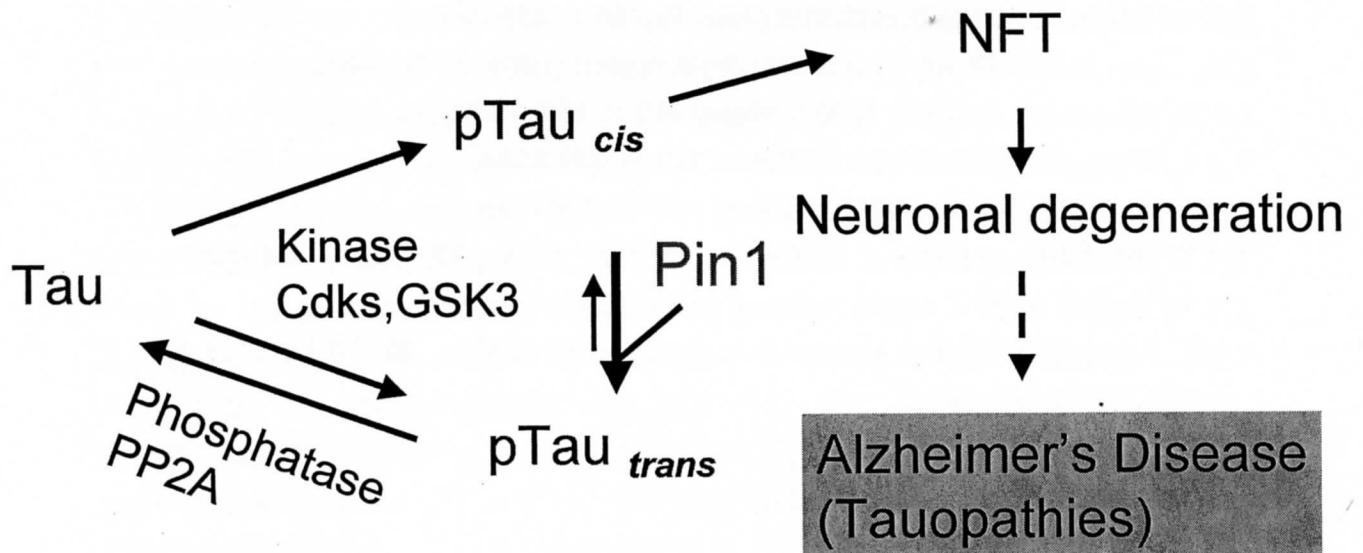


図2 ; Pin1はリン酸化Tauが変性して神経原線維変化をおこすのを防止する。

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録していません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。