

称号及び氏名	博士(農学) 原田 直樹
学位授与の日付	平成19年9月30日
論文名	「Regulatory Mechanisms of Androgen Receptor Transactivation in Prostate Cancer Cells (前立腺がん細胞におけるアンドロゲン受容体による転写調節機構)」
論文審査委員	主査 乾 博 副査 和田野 晃 副査 笠井 尚哉 副査 山地 亮一

論文要旨

第1章 諸論

精巣のライディッヒ細胞で産生される男性ホルモンのテストステロンは、生体内で5 α -還元酵素によって生理活性のより高いジヒドロテストステロン(DHT)に変換され、性分化や第二次性徴の発達、精子や骨形成、前立腺組織の発生や維持に関わる遺伝子の発現を制御するとともに、前立腺がんの進行にも関与する。DHTは細胞質に局在するアンドロゲン受容体(AR)に結合し、DHT結合型ARは活性型として核内に移行後、標的遺伝子のアンドロゲン応答配列に結合して、転写因子として標的遺伝子の発現を亢進する。ARを含むステロイドホルモン受容体は、受容体間で保存性が低いN末端ドメインと相同性が高いDNA結合ドメイン、リガンド結合ドメインの3つのドメインから構成されている。ARの転写活性調節には、ARに結合し転写促進作用を持つタンパク質であるコアクチベーターが重要であり、従って、コアクチベーターの作用機構を明らかにすることは前立腺がん進行機序の解明や治療に貢献すると考えられる。前立腺がんは米国における部位別がんの罹患率1位、死亡率2位と既に深刻な問題になっている。日本でも追従するように増加しており、この一因として食生活の欧米化が考えられている。本研究では、第2章と第3章において、前立腺がんが発現が高いARの新規なコアクチベーターとしてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)とRan結合タンパク質10(RanBP10)を同定し、その作用機構について検討した。さらに第4章では、機能性食品による前立腺がんの予防を目的とし、ブドウの果皮に含まれるポリフェノールであるレスベラトロールによるARの転写活性調節機構について検討した。

第2章 ARの転写活性に及ぼす新規コアクチベーターGAPDHの作用機構の解明

ARのコアクチベーターの多くはステロイド受容体間で相同性の高いDNA結合ドメ

インやリガンド結合ドメインと結合するため、受容体共通に作用する。一方で、相同性の低い AR の N 末端ドメインには特徴的なポリグルタミン領域が存在する。解糖系酵素である GAPDH は、*in vitro* の実験から AR のポリグルタミン領域に結合すること、さらに前立腺がんの転移性に比例して発現が増加することが報告されているが、その生理的意義は不明である。本章では、GAPDH が AR のコアクチベーターであることを同定し、その作用機構を検討した。

前立腺がん細胞株 PC-3 に AR 及び GAPDH 発現ベクターとレポーターベクターをトランスフェクトし、AR の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより測定した。GAPDH は、発現量に依存して合成アンドロゲン (R1881) 存在下において AR の転写活性を促進し、AR の転写活性を約 2 倍高めるために必要な GAPDH の増加はわずか 1.8 倍であった。高い転移性を持つ前立腺がん細胞では GAPDH はこのレベル以上に増加することから、GAPDH が AR の転写活性を促進する機能は、前立腺がんのような病態生理条件で特に発揮されると推測される。GAPDH による AR 転写活性の促進はリガンド依存的であり、R1881 の濃度が 0.05 nM においても観察されたことから、アンドロゲン除去治療を受け、DHT 濃度が通常の 1/10 (1nM) に減少した前立腺がん患者においても GAPDH の発現亢進が AR 転写活性を促進することが示唆された。また、アンドロゲン依存性前立腺がん細胞株 LNCaP において、GAPDH は R1881 により誘導された前立腺がんのバイオマーカーであり AR 標的遺伝子である前立腺特異抗原の発現を上昇させた。さらに、GAPDH は AR 転写活性を介して自己の mRNA を増幅させることを見出した。一方で、PC-3 細胞で発現している GAPDH を siRNA によりノックダウンすると、AR の転写活性が抑制されたことから、高発現時のみならず前立腺がん細胞で発現している内在性の GAPDH が AR の転写活性調節機構に関与することが判明した。GAPDH はステロイドホルモン受容体ファミリーのグルココルチコイド受容体 (GR) やエストロゲン受容体 α (ER α) に対して転写活性促進効果を示さず、AR の転写活性促進作用は GAPDH の解糖系酵素活性を欠損した変異体 GAPDH(C151S) でも野生型と同レベルであったことから、GAPDH は AR 選択的に転写活性化能を示し、それはエネルギー産生能と独立した新規機能であることが明らかとなった。

LNCaP 細胞を用いた免疫沈降により、リガンドの結合状態に関わらず AR は GAPDH と結合すること、GAPDH-AR 複合体は細胞質と核内の両方に存在することが判明した。AR はリガンド非結合時に細胞質でシャペロンタンパク質と複合体を形成して存在するが、リガンド結合後核内へ移行し転写因子として機能する。GAPDH も細胞質と核内に存在するので、AR 転写調節に関わる GAPDH の細胞内局在を検討するため、核内移行シグナルを融合した GAPDH-NLS と核外移行シグナルに変異を導入した GAPDH(258-261A)、及び AR のリガンド結合ドメインを欠損させることによって恒常的に活性型で核に局在する変異型 AR Δ C-Nuc を作製し、それぞれの局在と AR 転写活性促進能を検討した。その結果、核内の GAPDH の増加よりも、むしろサイトゾルにおいて GAPDH-AR 複合体が形成されることが AR の転写活性促進に重要であると示唆された。

第 3 章 AR の転写活性に及ぼす新規コアクチベーター RanBP10 の作用機構の解明

ARのコアクチベーターであるRanBPM/RanBP9のホモログとしてRanBP10が発見され、ともに低分子量Gタンパク質でありARのコアクチベーターとしての機能を持つARA24/Ranの結合タンパク質であることが同定されている。しかし、RanBP10の発現様式やARの転写活性における機能は明らかでない。本章では、各種培養細胞におけるRanBP10とRanBPMの発現パターンを解析し、さらにRanBP10がARの転写活性に及ぼす効果をRanBPMと比較検討した。

RanBP10はアンドロゲン依存性の前立腺がん細胞株(LNCaP)で、一方RanBPMは肺繊維芽細胞株(WI-38)や乳がん細胞株(MCF-7)で発現が高かった。RanBP10はARと結合し、リガンド依存的にARの転写活性を促進すること、さらにGRの転写活性をも促進するがER α の転写活性には寄与しないことが判明した。このステロイド受容体選択性及び転写活性促進作用はRanBPMと同様であった。また、RanBP10とRanBPMを共発現させた際、ARの転写活性を相加的に促進すること、RanBP10は細胞内においてRanBP10-RanBP10あるいはRanBP10-RanBPMの複合体を形成することが判明した。これらの結果より、RanBP10はアンドロゲン依存性前立腺がん細胞で発現量が高く、RanBP10ホモダイマーあるいはRanBP10-RanBPMヘテロダイマー構造でARと複合体を形成し、ARコアクチベーターとして機能することが示唆された。

第4章 レスベラトロールによるAR転写抑制機構の解明

前立腺がんの発症は食習慣と関連があり、前立腺がんの予防を目的とした機能性食品によるARの転写抑制作用が注目されている。ブドウ果皮やピーナッツに含まれるポリフェノールの一種であるレスベラトロールは、ARの転写抑制作用を持ち、アンドロゲン依存性前立腺がんの増殖を抑制する。レスベラトロールはAR遺伝子の発現を抑制することが知られているが、レスベラトロールによるARの転写抑制作用はARのmRNA減少だけでは説明できず、他の機構が存在している可能性がある。そこで、本章では、ARのタンパク質レベルに及ぼすレスベラトロールの影響を検討した。

レスベラトロールは、野生型ARだけでなく、リガンド結合ドメインを欠損させることによって恒常的に活性型で核に局在する変異型AR Δ C-Nucの転写活性も濃度依存的に阻害した。さらにシクロヘキシミドを使った実験から、ARタンパクの半減期がコントロール細胞で約13時間であったのに対して、レスベラトロール処理したLNCaP細胞では約4時間となった。これらの結果から、レスベラトロールによるAR転写活性の阻害は、ARのリガンド結合ドメインとの結合を介したのではなく、翻訳後のARタンパクを減少させることがAR転写活性に及ぼすレスベラトロールの阻害効果の一因であることが示された。

第5章 総括

本研究において、GAPDHが解糖系酵素活性とは独立した機能としてAR特異的なコアクチベーターであること、また、RanBP10がAR依存性の前立腺がん発現が高いコアクチベーターであると同定した。これらの結果から、AR転写活性の制御を目的とした創薬においてGAPDHやRanBP10は標的タンパク質としての位置づけが高いことが示唆された。また、食後糖代謝が活性化され、インシュリンにより解糖系酵素である

GAPDH の発現が誘導されることから、GAPDH を介して食習慣が前立腺がんの進行に影響する可能性が示唆された。一方で、レスベラトロールは、AR のタンパク質レベルを減少させることより AR 転写活性を抑制するために、前立腺がんの予防や治療に有効な機能性食品であることが示唆された。

審査結果の要旨

男性ホルモンであるジヒドロテストステロン (DHT) は、性分化や第二次性徴の発達、精子や骨形成、前立腺組織の発生や維持に関わる遺伝子の発現を制御するとともに、前立腺がんの進行にも関与する。DHT は細胞質に局在するアンドロゲン受容体 (AR) に結合し、DHT 結合型 AR として核内に移行後、標的遺伝子のアンドロゲン応答配列に結合し、転写因子として標的遺伝子の発現を亢進する。AR の転写活性調節には、AR に結合し転写促進作用を持つタンパク質であるコアクチベーターが重要であり、従って、コアクチベーターの作用機構を明らかにすることは前立腺がん進行機序の解明や治療に貢献すると考えられる。前立腺がんは米国男性における部位別がんの罹患率 1 位、死亡率 2 位と深刻な問題になっている。日本でも追従するように増加しており、その一因として食生活の欧米化が考えられている。本研究では、前立腺がん細胞における AR の転写調節に関わる新規な 2 種のコアクチベーターを同定し、その重要性を明らかにしている。また、機能性食品成分による前立腺がんの予防を目的とし、ブドウ果皮に含まれるポリフェノールの AR に対する作用を検討している。

解糖系酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) は、*in vitro* の実験から AR に結合すること、さらに前立腺がんの転移性に比例して発現が増加することが報告されているが、その生理的意義は不明であった。前立腺がん細胞株 PC-3 において、AR の転写活性に及ぼす GAPDH の影響を検討した結果、GAPDH は発現量に依存して合成アンドロゲン (R1881) 存在下において AR の転写活性を促進し、AR の転写活性を約 2 倍高めるために必要な GAPDH の増加はわずか 1.8 倍であることを明らかにした。さらに、GAPDH は AR 転写活性を介して自己の mRNA を増幅させた。一方で、GAPDH を siRNA によりノックダウンすると、AR の転写活性は抑制された。AR の転写活性促進作用は GAPDH の解糖系酵素活性を欠損した変異体でも野生型と同レベルであったことから、エネルギー産生能と独立した新規機能であることを明らかにした。また、免疫沈降により、リガンドの結合状態に関わらず AR は GAPDH と結合し、GAPDH-AR 複合体は細胞質と核内の両方に存在することを明らかにした。さらに、種々の変異体を用いた実験から、AR のコアクチベーターとしての GAPDH の作用は、核内における GAPDH の増加よりも、むしろサイトゾルにおいて GAPDH-AR 複合体が形成されることが重要であると結論付けている。

AR のコアクチベーターである RanBPM/RanBP9 のホモログとして発見された RanBP10 の AR の転写活性化に及ぼす影響を RanBPM と比較検討した結果、RanBPM は肺繊維芽細胞株 (WI-38) や乳がん細胞株 (MCF-7) で発現が高いのに対し、RanBP10 がアンドロゲン依存性の前立腺がん細胞株 (LNCaP) で発現が高い AR のコアクチベーターであることを見出した。さらに、RanBP10 はホモダイマーあるいは RanBPM とヘテロダイマーを形成すること

を見出し、これらのダイマー構造で AR のコアクチベーターとして機能することを示唆している。

ブドウ果皮に含まれるポリフェノール的一种であるレスベラトロールは、ARの転写抑制作用を持ち、アンドロゲン依存性前立腺がんの増殖を抑制することが知られているが、その機構に関しては不明な点が多く残されていた。このレスベラトロールによるAR転写抑制機構に関して検討した結果、レスベラトロールは、ARのリガンド結合ドメインとの結合を介さずに、翻訳後のARタンパクを減少させることがAR転写活性に及ぼすレスベラトロールの阻害効果の一因であることを明らかにしている。

以上、本研究は、GAPDH が AR 特異的なコアクチベーターであること、また、RanBP10 が前立腺がん発現が高いコアクチベーターであることを同定することで AR の転写活性化機構の一端を明らかにした。一方で、レスベラトロールは、AR のタンパク質レベルを減少させることより AR 転写活性を抑制する機構を解明した。これらの成果は、生化学、細胞生物学、食品栄養学さらに医学の分野に大きく貢献するものであり、最終試験の結果と併せて博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。