

ユビキチンリガーゼ TRIM68による

アンドロゲン受容体転写制御

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 アンドロゲン受容体 (AR) は初期前立腺癌のみならず、ホルモン不応性前立腺癌における増殖、進展にも大きく関与している。AR の転写活性は転写共役因子 (活性化因子・抑制因子) により正と負の制御がされている。転写共役因子の研究は、ホルモン不応性前立腺癌の発生メカニズム、治療法開発を考える上で非常に重要である。AR や転写共役因子の活性調節は、これらの核内・外への移行、複合体の形成・分解・安定化など種々の機構により制御されていると考えられている。ユビキチン・プロテアソーム系蛋白分解システムはリン酸化、アセチル化、メチル化などと並ぶタンパク質の翻訳後修飾機構の一つである。この系は、基質特異性をもつユビキチンリガーゼが標的タンパク質をユビキチン化し、プロテアソームと呼ばれる複合体で速やかに分解することにより、細胞周期制御やシグナル伝達、癌化などの生命現象に関与している。近年、AR や転写共役因子も、このユビキチン・プロテアソーム系により分解・安定化され、転写活性が制御されている可能性が示されている。今回我々は、ある種の自己抗体として知られていた TRIM68 が新規のユビキチンリガーゼであり、AR の転写活性化因子であることを見出したので報告する。

【方法と結果】 TRIM68 が実際にユビキチンリガーゼ活性を有しているかを調べるために、バキュロウィルスシステムを用いて組み換え TRIM68 タンパク質を精製しユビキチンアッセイを行った結果、TRIM68 が実際にユビキチンリガーゼ活性を有していることが判明した。定量 PCR 法により TRIM68 の mRNA 量は、種々の癌細胞株のうち前立腺癌細胞株 LNCaP で特異的に発現増加していた。免疫沈降法により TRIM68 と AR は LNCaP 細胞内で結合し、さらにアンドロゲン付加により核内での結合が増強された。レポーターアッセイでは TRIM68 は AR の転写活性を有意に促進させた。プロテアソーム阻害剤を使用したレポーターアッセイにより、その転写活性促進能はユビキチンリガーゼ活性、プロテアソーム活性依存性であることが示された。さらに既知の転写活性化因子である TIP60 と結合・共同し、AR の転写活性を相乗的に促進させた。RNA 干渉法により LNCaP 細胞内の内在性 TRIM68 の発現を抑制させると、AR の転写活性は減弱した。TRIM68 を LNCaP 細胞に過剰発現させると細胞培養液中の PSA 分泌は増加し、発現抑制により PSA 分泌は減少した。細胞増殖アッセイでは、TRIM68 の発現抑制は LNCaP 細胞の増殖能を低下させた。癌化能を反映するコロニー形成能アッセイでは、TRIM68 の発現抑制は LNCaP 細胞の足場非依存性増殖 (コロニー形成能) を低下させた。ヒト前立腺癌検体の定量 PCR 法では、正常組織に比べ、前立腺癌組織で TRIM68 の mRNA 発現量は増加していた。さらにヒト前立腺癌検体の免疫組織染色においても、正常組織に比べ、前立腺癌組織で TRIM68 のタンパク質発現量が増加していることが判明した。

【考察】 近年、AR の転写活性はリン酸化、アセチル化、ユビキチン化等の翻訳後修飾に

より制御されていることが分かってきた。特にタンパク質分解系であるユビキチン化は、AR や転写共役因子を分解することによって適切な転写活性調節を行っていると言われている。E3 ユビキチンリガーゼは AR の転写制御において重要な役割を担っていると思われる。TRIM68 がさまざまな細胞株の中で、前立腺癌細胞株 LNCaP に特異的に発現していることが判明した。これにより、TRIM68 は前立腺の機能に特異的に働いていることが予想される。TRIM68 と AR の結合を免疫沈降と免疫染色にて示したが、さらに、LNCaP 細胞の核内における TRIM68 と AR の結合がアンドロゲンを加えることでより増強されることが判明した。これは TRIM68 が、アンドロゲンにより形成される AR の転写複合体の一つである可能性を示している。さらに TRIM68 は、LNCaP のみならずさまざまな前立腺癌細胞株における AR の転写活性を促進させることがわかった。一方、RNA 干渉法を用いた TRIM68 の発現抑制は LNCaP 細胞の AR 転写活性を抑制した。これにより、TRIM68 が前立腺癌細胞において AR の転写活性化因子であることが示された。ユビキチン化された基質タンパク質は、プロテアソームと呼ばれる複合体によって認識され取り込まれ分解される。プロテアソーム阻害剤を使用した実験から、TRIM68 の AR 転写促進作用にはプロテアソームが必要であるということがわかった。TRIM68 は AR を直接ユビキチン化しないため、TRIM68 の AR 転写活性促進作用は、何らかの AR 転写抑制因子をユビキチン・プロテアソーム系で分解することによって起こる結果と予想される。アンドロゲンにより、AR や転写共役因子は転写複合体として核内に集合し転写を促進する。そして、次々と新たな転写を行っていくためには、転写を終了した AR や転写共役因子の速やかな離散・分解が必要であるとの報告がある。今回、TRIM68 が転写活性化因子の一つである TIP60 と結合し、相乗的に AR 転写活性を促進させることが分かった。この結果から、TRIM68 は転写抑制因子をユビキチン化して分解することにより、転写活性化因子や転写抑制因子の集合を促進させる仮説が示唆される。TRIM68 は、前立腺癌の最も信頼のおける腫瘍マーカーである PSA を増加させ、TRIM68 の発現抑制は PSA を減少させた。さらに TRIM68 の発現抑制は、前立腺癌の細胞増殖や足場非依存性増殖（コロニー形成能）を有意に抑制させた。これらの結果により、TRIM68 は PSA 等の転写産物や癌化能に関与する重要な因子であることが予想される。さらに、臨床検体を使用した定量的 RT-PCR 法や免疫組織染色により、TRIM68 は隣接正常組織に比べて前立腺癌で有意に高発現していることがわかった。以上より、AR の転写活性化因子であることを考え合わせると、TRIM68 は前立腺における発癌やその進展に大きく関与している可能性があると思われる。

【結論】 今回我々は、TRIM68 が新たな AR の転写活性化因子であることを示した。その機序はユビキチンリガーゼである TRIM68 が、何らかの AR 転写抑制因子をユビキチン化して分解することによるものと予想される。したがって、TRIM68 が標的とする基質タンパク質の同定が重要となる。今後、TRIM68 等の AR 関連ユビキチンリガーゼやプロテアソームが、ホルモン非依存性癌や転移性前立腺癌などの難治性進行性前立腺癌に対する新たな治療法の標的となり得る可能性があると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 笠 原 正 典

学 位 論 文 題 名

ユビキチンリガーゼ TRIM68による

アンドロゲン受容体転写制御

アンドロゲン受容体 (AR) を含む転写共役因子は、リン酸化、アセチル化やユビキチン化等の翻訳後修飾により活性が調節されている。ユビキチン化はタンパク質翻訳後修飾の一つであり、ユビキチンリガーゼ (ユビキチン化酵素) が標的タンパク質を認識する。本研究は、ユビキチンリガーゼ TRIM68 の AR 転写活性への影響を解明したものである。TRIM68 は前立腺癌細胞株 LNCaP で特異的に発現し、AR と結合して転写活性を促進させ、その作用はユビキチン化活性依存的であることが判明した。RNA 干渉法により LNCaP 細胞内の内在性 TRIM68 発現を抑制させると、AR 転写活性は減弱し、細胞増殖能は低下した。さらに臨床検体を用いた実験において、TRIM68 は前立腺癌組織でその発現量が増加していた。本研究により、ユビキチンリガーゼ TRIM68 は新規の AR 転写活性化因子であり、前立腺癌に関連したタンパク質である可能性が示唆された。

口頭発表において、笠原正典教授より、前立腺癌検体のグリソンスコア (前立腺癌の組織分類) と TRIM68 発現量との相関関係についての質問があった。この質問に対し、今回の実験で使用した臨床検体においては有意な結果は得られなかったが、今後検体数を増やして、臨床的・病理学的因子や生存率などの各パラメーターと TRIM68 発現量との相関を検討することを述べた。また、TRIM68 自身の発現制御についての質問があった。この質問に対し、解析した限りでは TRIM68 遺伝子の上流にアンドロゲン反応領域は存在せず、TRIM68 を発現制御している分子は未だ判明していないことを述べた。また、TRIM68 変異タンパク質を用いたドミナントネガティブ効果に関しての質問があった。この質問に対し、ドミナントネガティブ効果は、基質結合部位を残しつつ、酵素活性部位を欠失させた変異体を導入することにより、内在性の酵素活性を競合的に阻害して、本来の酵素活性による効果とは逆の効果を示すことであると回答した。ついで、畠山鎮

次教授より、TRIM68の核内移行機序と核移行シグナルの有無についての質問があった。この質問に対し、TRIM68は核移行シグナルを持たないため、ARに依存して核内移行していると推測するが、今後ARを発現していない前立腺癌細胞株であるPC3細胞等でTRIM68の局在実験を検討したいと回答した。また、TRIM68の基質候補となる転写抑制因子についての質問があった。この質問に対し、HDAC1、NcoRやSMART等の転写抑制因子はユビキチン化で分解制御されていることが判明しており、それらが基質候補となり得るが、今のところHDAC1については有意な結果が得られていないと回答した。また、結合蛋白質の同定法であるYeast two hybrid法やpull-down assayを行い、TRIM68と結合する転写抑制因子の検索を行い、その中から、TRIM68がユビキチン化する基質タンパク質を同定することが有用であると回答した。さらに、野々村克也教授より、アンドロゲン除去療法によるアンドロゲン非存在下では、TRIM68は機能していないのではないかとこの質問があった。この質問に対し、アンドロゲン除去療法にても残存する極微量なアンドロゲンにも敏感に反応してしまう可能性があること、またTRIM68により転写共役因子の異常が引き起こされることでARの過剰な転写活性化が起り、さらにはホルモン抵抗性前立腺癌の発生機序に関与する可能性があるかと回答した。また、ホルモン抵抗性前立腺癌におけるTRIM68の発現についての質問があった。この質問に対し、手術適応となるホルモン抵抗性前立腺癌は少ないため、検体が入手困難であるが、今後、生検などにおける微量な検体での発現解析の可否を検討していきたいと回答した。

この論文は、北海道医学雑誌で高く評価され、今後、アンドロゲン受容体転写制御や前立腺癌におけるユビキチン化の重要性を認識させることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。