

学位論文題名

TRIM24 mediates ligand-dependent activation of androgen receptor and is repressed by a bromodomain-containing protein, BRD7, in prostate cancer cells

(前立腺癌細胞におけるアンドロゲン受容体のリガンド依存性活性化に関する TRIM24及び BRD7の制御機序の解析)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】ある種の遺伝子の発現は、ホルモン依存性の転写因子として機能する核内受容体により制御されている。アンドロゲン受容体 (androgen receptor : AR) は核内受容体型の転写因子ひとつであり、さまざまな共役調節因子 (コアクチベーター及びコリプレッサー) と共に標的遺伝子発現を制御し、適切なタンパク質発現を誘導する。AR 依存性標的遺伝子の発現に関して、コアクチベーターはその転写レベルを増加させ、またコリプレッサーは減少させる。AR と共役調節因子の活性は、メチル化、リン酸化、アセチル化、及びユビキチン化などの翻訳後修飾により制御される。これらの共役調節因子にはユビキチンリガーゼ活性を有するものが含まれる。AR の転写活性はプロテアソームによる選択的なタンパク質分解を必要とし、AR の核内への移動やコレギュレーターとの結合を制御する。

RING フィンガードメイン、B ボックス、コイルドコイル領域を有したタンパク質は TRIM ファミリーと言われる。多くの TRIM タンパク質はユビキチン化に関与し、また転写制御や細胞増殖、アポトーシス、発生、癌化などに関与することが報告されている。TRIM24 は TRIM ファミリーのひとつであり、クロマチンを制御する核タンパク質によくみられる PHD フィンガーとプロモドメインをさらに有する。これらのドメインは転写因子にもみられ、タンパク質の相互作用を制御していると考えられている。TRIM24 は transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) ファミリーにも属し、同ファミリーである TIF1 β 、TIF1 γ 及び TIF1 δ と同様にクロマチン構造を制御する分子と考えられている。TRIM24 はレチノイン酸受容体、甲状腺受容体、ビタミン D3 受容体及びエストロゲン受容体と結合することが既に報告されている。マウスにおいて TRIM24 はレチノイン酸 α 受容体による標的遺伝子の転写を抑制することで肝癌抑制因子として機能することが報告されている。そこで本研究において、TRIM24 が前立腺癌細胞において AR の転写活性に与える影響を検討した。また、本研究で新たに同定した TRIM24 結合タンパク質 BRD7 がどのように TRIM24 の生理活性に影響を与えるかについても検討した。

【材料と方法】TRIM24 発現プラスミド及び AR 発現プラスミドを用いた過剰発現系における細胞内での結合、さらに前立腺癌細胞株 CWR22Rv1 細胞における内在性の TRIM24 と AR の結合を免疫沈降とウエスタンブロットティングを用いて検討した。また、アンドロゲンによる標的遺伝子の転写に対する TRIM24 の影響をルシフェラーゼをアッセイにより検討した。さらに、RING フィンガードメインを欠失した変異体 TRIM24 (Δ RING) 発現プラスミドを作製し、RING フィンガードメインが AR 依存性転写活性に及ぼす影響を検討した。バイカルタミドとフルタミドという 2 種類の抗アンドロゲン試薬が TRIM24 の AR 依存性転写活性化にもたらす効果について検討した。AR のコアクチベーターである TIP60 と TRIM24 の結合や AR 依存性転写活性増強作用についても上記と同様な方法にて検討し

た。さらに酵母ツーハイブリッド法を用いて TRIM24 に対する結合タンパクを探索した。候補タンパク質として BRD7 を同定し、TRIM24 との細胞内での結合を免疫沈降とウエスタンブロッティングを用いて検討した。免疫蛍光染色法でそれぞれの細胞内局在を調べ、シクロヘキシミドを用いたパルスチェイス法により BRD7 の細胞内における安定性に与える TRIM24 の影響について検討した。前立腺癌細胞を含む複数の細胞株における TRIM24 と BRD7 の内在性の発現をウエスタンブロッティングを用いて確認し、TRIM24 の AR 依存性転写活性化に対する BRD7 の影響についてルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。

【結果】3 種類の前立腺癌細胞株 CWR22Rv1、LNCaP 及び PC3 について、TRIM24 の発現を確認した。また、CWR22Rv1 と LNCaP では AR の発現を認めたが、PC3 では AR の発現は認められなかった。さらに、TRIM24 と AR は細胞内で結合することが判明した。ルシフェラーゼアッセイにより、TRIM24 は AR の転写活性を増強することが明らかになった。TRIM24(Δ RING)変異体もアンドロゲン依存性の AR の転写活性を増強したが、野生型に比べその作用は弱く、TRIM24 の AR の転写活性増強に RING フィンガードドメインが関与していることが示された。抗アンドロゲン試薬であるバイカルタミドとフルタミドにより、TRIM24 による転写活性増強作用は部分的に抑制された。また、AR の転写活性を増強することが知られているヒストンアセチル化酵素である TIP60 が TRIM24 と細胞内で結合し、さらに TIP60 と TRIM24 により AR の転写活性が増強されることが判明した。酵母ツーハイブリッド法により TRIM24 の新規結合タンパクとして BRD7 を同定した。TRIM24 は BRD7 と細胞内で結合し、TRIM24 の RING フィンガードドメインと BRD7 のプロモドメインはその結合には必須ではないことを確認した。免疫蛍光染色法で野生型 TRIM24 と BRD7 は主に核に局在するが、TRIM24(Δ RING)変異体は細胞質に局在することを確認した。また、TRIM24 の過剰発現により、BRD7 の分解を亢進しなかった。種々の細胞株を用いて TRIM24 と BRD7 の発現を検討したが、発現パターンに相関は無かった。ルシフェラーゼアッセイにより、BRD7 はアンドロゲン依存性の AR の転写活性を量依存性に抑制し、さらに TRIM24 による AR の転写活性増強作用も抑制することが判明した。

【考察】AR の転写活性は前立腺癌の発生と増殖に大きく関わっており、さまざまなコファクターにより転写が制御されていることが知られている。TRIM24 はクロマチン修飾や DNA と結合した核内受容体と基本転写因子複合体の結合の促進などにより AR の転写活性を増強することが推測されているが、転写活性を制御するコアクチベーターとの関係も含め、詳細な機序は不明である。TIP60 は AR の転写活性に重要な役割を果たしており、TRIM24 以外の他の TRIM タンパク質も TIP60 と協調して AR の転写活性を増強するという報告があり、TRIM タンパク質は核内受容体の転写制御に重要な役割を果たしている可能性がある。BRD7 は TRIM24 による AR の転写活性増強を抑制する作用を有するが未だ詳細な分子機序は不明であり、さらなる研究により、ホルモン治療抵抗性前立腺癌や転移した前立腺癌に対して新しい治療法を確立する可能性がある。

【結論】本研究により、TRIM24 が AR と結合し、前立腺癌細胞においてアンドロゲン依存性 AR の転写活性を増強することが示された。さらに、TRIM24 は BRD7 と結合し、BRD7 は TRIM24 による AR の転写活性の増強を抑制することが判明した。以上より、TRIM24 は BRD7 と協調し AR の転写活性を制御していることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学位論文題名

TRIM24 mediates ligand-dependent activation of androgen receptor and is repressed by a bromodomain-containing protein, BRD7, in prostate cancer cells

(前立腺癌細胞におけるアンドロゲン受容体のリガンド依存性活性化に関する TRIM24及び BRD7の制御機序の解析)

アンドロゲン受容体 (androgen receptor : AR) は核内受容体のひとつであり、さまざまなコレギュレーターと共に標的遺伝子発現を制御し、適切なタンパク質発現を誘導する。TRIM24 は多くの核内受容体と結合することが報告されている。マウスにおいて TRIM24 はレチノイン酸 α 受容体による標的遺伝子の転写を抑制することで肝癌抑制因子として機能するという報告がある。本研究において、TRIM24 が前立腺癌細胞において AR の転写活性に与える影響を検討した。

三種類の前立腺癌細胞株 CWR22Rv1、LNCaP、PC3 において TRIM24 の発現を確認した。また CWR22Rv1 と LNCaP では AR の発現を認めたが、PC3 では AR の発現は認められなかった。さらに、TRIM24 と AR は細胞内で結合した。レポーター遺伝子を用いた解析により、TRIM24 は AR の転写活性を増強することを確認した。TRIM24(Δ RING)変異体もアンドロゲン依存性の AR の転写活性を増強したが、野生型に比べその作用は弱く、TRIM24のARの転写活性増強にRINGフィンガードメインが関与していることが示された。抗アンドロゲン試薬であるバイカルタミドとフルタミドにより TRIM24 による転写活性増強作用が部分的に抑制された。酵母ツーハイブリッド法により TRIM24 の新規結合タンパクとして BRD7 を同定した。TRIM24 は BRD7 と細胞内で結合し、TRIM24 の RING フィンガードメインと BRD7 のプロモドメインは結合に必須ではないことを確認した。免疫蛍光染色法で野生型 TRIM24 と BRD7 は主に核に局在するが、TRIM24(Δ RING)変異体は細胞質に局在することを確認した。種々の細胞株を用いて TRIM24 と BRD7 の発現を検討したが、発現パターンは様々であった。ルシフェラーゼをレポーター遺伝子とした解析では、BRD7 がアンドロゲン依存性の AR の転写活性を量依存性に抑制し、さらに TRIM24 による AR の

転写活性増強作用も抑制することが判明した。

副査である秋田弘俊教授から、TRIM24 が有するアンドロゲン受容体依存性の転写活性増強作用と、ユビキチンリガーゼ活性との関連について質問があった。さらに秋田弘俊教授から、アンドロゲン受容体の発現がみられない前立腺癌細胞株 PC3 における TRIM24 と BRD7 の発現について質問があった。また、秋田弘俊教授から、BRD7 は癌抑制遺伝子として機能するようであるが、鼻咽頭癌以外の癌において遺伝子異常の報告があるかどうか質問があった。さらに秋田弘俊教授から、TRIM24 と BRD7 の発現の相関について質問があった。次いで主査である野々村克也教授から、アンドロゲン受容体依存性の転写に関連する TRIM タンパク質として TRIM68 の報告があり、TRIM68 においても RING フィンガードメインが転写の制御に重要な役割を果たしているが、TRIM24 と TRIM68 の転写制御の機序の相違について質問があった。さらに野々村克也教授から、白血病と TRIM24 との関連を検討する研究の方法について質問があった。次いで副査である畠山鎮次教授から、TRIM24 は TIF1 ファミリーの一員であるが、同ファミリーの TIF1 β や TIF γ と、核内受容体による転写との関連について質問があった。さらに畠山鎮次教授から、TRIM24 の HP1 結合ドメイン、PHD フィンガーやプロモドメインが果たす機能について質問があった。さらに畠山鎮次教授から、TRIM24 と BRD7 の相互作用について、分子機序の解明には至っておらず、どちらが上流で機能しているかについて質問があった。次いで副査である今村雅寛教授から、TRIM24 と BRD7 の相互作用と、レチノイン酸受容体による転写との関連について質問があった。さらに今村雅寛教授から、急性前骨髄性白血病では PML-RAR α キメラ遺伝子による発症機序の解明が進んでいるが、TRIM24 や BRD7 との関連について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は実験で得られた結果や過去の論文等を引用し、おおむね適切に回答した。

この論文は、TRIM24 のアンドロゲン受容体のコアクチベーターとしての機能を新たに示し、また BRD7 という TRIM24 の新規結合タンパク質を同定し、両者が協調してアンドロゲン受容体の転写を制御することが示され、今後詳細な制御機序の解明によりホルモン治療抵抗性前立腺癌に対する治療への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課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。