博士（医　学）　丸　山　　覚

学位論文題名

前立腺癌細胞のPSA分泌抑制に関するユビキチンリガーゼPIRH2の解析

学位論文内容の要旨

緒言と目的

最近、新規タンパク質である androgen receptor N-terminal-interacting protein (ARNIP)が同定された。ARNIP は別名 p53-induced protein with a RING-H2 domain (PIRH2)としても報告されている。そのアミノ酸配列中にはよく保存された RING-H2 フィンガーモチーフを含んでおり、ユビキチン結合酵素（E2）に依存するユビキチンリガーゼ（E3）として機能することが報告されている。ε-COP はコートタンパク質複合体である COP I のサブユニットのひとつである。COP I はゴルジ体から出芽した小胞を包みこみ、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送、もしくはゴルジ体間のタンパク質輸送に関与していると考えられている。

本研究では、PIRH2がε-COPのユビキチン化を起こし、プロテアソーム依存性分解を促進するか否か、さらにはそれらの相互作用とARとの関連性をみた。また、PIRH2によるε-COPの分解が分泌蛋白におよぼす影響を評価した。最終的に、ARを発現する前立腺癌細胞におけるPSAの分泌動態をあきらかにすることを目的とした。

材料と方法

ヒト PIRH2 cDNA とヒトε-COP cDNA は、それぞれヒト腎癌細胞 cDNA およびヒト肝臓 cDNA より ExTaq ポリメラーゼを用いた PCR 反応により得た。さらに PIRH2 の変異株（C145A）も作製した。ヒト胎児腎細胞由来 293T に PIRH2 やε-COP 遺伝子プラスミドをリン酸カルシウム法で導入し一過性に発現させた。またヒト前立腺癌細胞由来 LNCaP.FGC には、レトロウイルスによる FLAG-PIRH2 遺伝子を恒常発現させた。PIRH2 に相互作用するタンパク質を選別するために酵母株 L40 にヒト PIRH2(1-129)ベクターとヒト HeLa cDNA library を酢酸リチウム法で細胞内導入させた。リコンビナントタンパク質の GST-ε-COP と His_6-PIRH2 をそれぞれ精製し、*in vitro* ユビキチン化アッセイを行なった。PIRH2 やε-COP 遺伝子を一過性に過剰発現させた 293T 細胞をもちいて免疫沈降、*in vivo* ユビキチン化アッセイ、タンパクの分解の速度をみるパルスチェイス法をおこなった。アンドロゲン（dihydrotestosterone; DHT）やフルタミド（flutamide; FLU）を添加し、それらによる影響もみた。PIRH2 遺伝子を恒常発現させた LNCaP 細胞（2.0×10^5）を 6 ウエルプレートでアンドロゲン不含培養液で 24 時間培養し、その後の 24 時間は 10^{-8}M DHT を添加もしくは無添加の培養液で培養した。培養液を回収し PSA を ELISA 法にて測定した。

結果

1. PIRH2のユビキチンリガーゼ活性とユビキチン結合酵素親和性

自己ユビキチン化アッセイにより、PIRH2のユビキチンリガーゼ活性はUbc4、UbcH5A、UbcH5BまたはUbcH5Cにおいて顕著であった。さらにRINGドメインの変異株PIRH2(CA)のリコンビナントタンパク質を用いて*in vitro*ユビキチン化アッセイを行なったところ、RINGドメインの変異によりユビキチンリガーゼ活性の喪失が認められた。これより、RINGドメ

インはPIRH2のユビキチンリガーゼ活性に必須のものであることと同時に、PIRH2(CA)は内在性のPIRH2に対しドミナントネガティブな効果を示すことが示唆された。

2. 酵母ツーハイブリッド法によるPIRH2に相互作用する分子ε-COPの同定

PIRH2に相互作用するタンパク質を同定するため、酵母ツーハイブリッド法をおこないポジティブクローンを得たがそれはヒトε-COP cDNAと同一の塩基配列であった。*in vivo*結合実験を行なったところ、野生型及び変異型のどちらのFLAG-PIRH2に関しても、抗Myc抗体によりMyc-ε-COPとの共沈がみとめられた。このことはヒト細胞株内でPIRH2がε-COPに相互作用していることを示している。

3. PIRH2はε-COPを*in vitro*と*in vivo*でユビキチン化する

PIRH2 がε-COP をユビキチン化するかをみるために *in vitro* ユビキチン化アッセイを行なった。His_6-PIRH2 を加えた場合にのみ GST-ε-COP のポリユビキチン化がみられた。さらに細胞内でε-COP のユビキチン化が起こっているかをみるため *in vivo* ユビキチン化アッセイを行なったところ、PIRH2 の共発現により Myc-ε-COP のユビキチン化の明らかな増強が認められた。これらの結果により、PIRH2 の過剰発現がε-COP のユビキチン化を引き起こすことが判明した。

4. *in vivo*でε-COPの分解はPIRH2により促進される

*in vivo*でのε-COPの分解においてPIRH2がいかに作用するかを調べるためパルスチェイス法をおこなったところ、野生型のPIRH2はε-COPの分解を亢進し、逆に変異型のPIRH2はε-COPの分解を遅延させることが明らかとなった。これより変異型PIRH2(CA)はε-COPの分解に対してドミナントネガティブな効果をもつことが示唆された。これらの結果は、PIRH2が細胞内のε-COPの安定性に関与していることを示している。

5. アンドロゲンが存在するとε-COPのユビキチン化、及び分解は進行する

アンドロゲン(DHT)の有無によりPIRH2とAR結合親和性に差が出るかどうかをみるため免疫沈降を行なったところ、DHT存在下ではARとPIRH2の結合力は弱く、DHTが存在しないときはARとPIRH2の結合力は強いことが判明した。次にDHTがε-COPのユビキチン化に影響を及ぼすかどうかをみるため*in vivo*ユビキチン化アッセイを行なった。Myc-ε-COPは、DHTの存在下において、より著明なユビキチン化が検出された。さらにDHTの有無もしくはDHTがARに結合することを競合的に阻害するフルタミドを加えることによりε-COPの分解速度がどう変化するかを調べるために、ε-COPのパルスチェイスアッセイを行った。この実験の結果、ε-COPの分解はDHTの存在下で促進されたが、それはフルタミドにより抑制された。これらの結果によりDHTとPIRH2は、前立腺細胞を含むARを発現する細胞内でのε-COPの安定性に関与しており、DHTによりARは核内移行する一方、ARから解離したPIRH2は細胞質にとどまりε-COPに結合し、ε-COPのユビキチン化を促進することが予想された。

6. PIRH2は前立腺癌細胞からのPSA分泌を抑制する

前立腺特異抗原（PSA）は前立腺癌の診断または治療効果判定や再発・再燃の診断に用いられている。PIRH2がε-COPの分解を惹起することから、PIRH2が細胞内膜輸送システムに影響を及ぼし、PSAのような分泌タンパク質に何らかの影響を与えるのではないかという仮説を立てた。そこでヒト前立腺癌細胞の培養液に分泌されたPSAをELISA法により測定した。FLAG-PIRH2恒常発現株と空ベクターを感染させたMock細胞株をDHT存在下もしくは非存在下で培養し、その培養液中に分泌されたPSA値を測定した。PSA分泌アッセイにより、LNCaP.FLAG-PIRH2におけるPSA測定値（細胞数による補正値）はMockに比べ有意に低下していた（$p<0.0001$）。

結語

本研究において、PIRH2がε-COPのユビキチン化を起こし、プロテアソーム依存性分解を促進するということ、さらにはそれらの相互作用はARにより調節されていることが判明した。また、PIRH2を過剰発現させることにより前立腺癌細胞株であるLNCaP細胞からのPSA分

泌が抑制されることが認められた。これらの所見は、PIRH2がゴルジ体から小胞体への逆行輸送の調節因子として働くことを示唆するものであり、この分子をさらに解析することによりPSAを分泌する前立腺癌細胞の特徴があきらかとなり、将来的に前立腺癌の診断などの臨床応用も可能になると考えられる。

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　　岩　永　敏　彦

学 位 論 文 題 名

前立腺癌細胞のPSA分泌抑制に関するユビキチンリガーゼPIRH2の解析

アンドロゲン受容体（AR）は核内受容体スーパーファミリーの一つであり、多くのコアクチベータータンパク質やコリプレッサータンパク質と相互作用することによってアンドロゲン作動性遺伝子の転写を活性化、もしくは抑制し、アンドロゲンの作用を調節する。最近、AR 結合タンパク質として PIRH2 が同定されており、そのアミノ酸配列中にはRING-H2 フィンガーモチーフを含んでおり、ユビキチンリガーゼ（E3）として機能することが報告されている。本論文では、ユビキチンリガーゼ PIRH2 とコートタンパク質複合体COP I のサブユニットのひとつであるε-COP との相互作用を検討し、さらにその相互作用とAR との関連性を解析した。また PIRH2 によるε-COP の分解が分泌タンパク質におよぼす影響として、AR を発現する前立腺癌細胞からの前立腺特異抗原（PSA）分泌における PIRH2の影響について検討している。

まず、PIRH2 に相互作用する新規タンパク質を同定するため、酵母ツーハイブリッド法を行ったところ PIRH2 結合タンパク質としてヒトε-COP cDNA を同定した。*in vivo* 結合実験を行なったところ、PIRH2 とε-COP の共沈が認められた。さらに PIRH2 がε-COP をユビキチン化するかを確認するために *in vitro* ユビキチン化アッセイを行なったところ、PIRH2 添加時にのみ、ε-COP のポリユビキチン化が認められた。さらに細胞内でε-COP のユビキチン化が起こっているかを確認するために *in vivo* ユビキチン化アッセイを行なったところ、PIRH2 の共発現によりε-COP のユビキチン化の増強が認められた。これらの結果により、PIRH2 の過剰発現がε-COP のユビキチン化を引き起こすことが判明した。さらに、*in vivo* でのε-COP の分解において PIRH2 がいかに作用するかを調べるためパルスチェイス法を行ったところ、野生型の PIRH2 はε-COP の分解を亢進し、逆に変異型の PIRH2 はε-COP の分解を遅延させることが明らかとなった。これらの結果により、PIRH2 が細胞内のε-COP の安定性に関与していることを示した。

また、アンドロゲン(DHT)の有無により PIRH2 と AR 結合親和性の変化を確認するために

免疫沈降実験を行なったところ、DHT存在下ではARとPIRH2の結合力は減弱し、DHTが存在しないときはARとPIRH2の結合力は増強することが判明した。次にDHTがε-COPのユビキチン化に影響を及ぼすかどうかをみるため*in vivo*ユビキチン化アッセイを行なったところ、ε-COPは、DHTの存在下において、より著明なユビキチン化が検出され、抗アンドロゲン剤フルタミドを加えることによりε-COPの分解速度が抑制された。これらの結果によりDHTとPIRH2は、前立腺細胞を含むARを発現する細胞内でのε-COPの安定性に関与しており、DHTによりARは核内移行する一方、ARから解離したPIRH2は細胞質にとどまりε-COPに結合し、ε-COPのユビキチン化を促進すると推測している。

さらに、PIRH2がε-COPの分解を惹起することから、PIRH2が細胞内膜輸送システムに関与し、分泌タンパク質である前立腺特異抗原（PSA）に影響を与える可能性を想定した。そこでヒト前立腺癌細胞の培養液に分泌されたPSAをELISA法により測定したところ、DHT存在下において、対照細胞に比べPIRH2安定発現株の培養液中のPSA分泌量が低いことを確認している。

公開発表にあたっては、副査の岩永敏彦教授からPIRH2の機能を予想する目的でPIRH2の生体の各臓器での発現の検討に関して、さらにPIRH2によるPSAの転写・分泌についての質問があった。次いで副査の畠山鎮次教授からε-COPの複合体であるCOP Ⅰの分解をしているのかどうか、さらにPIRH2がp53タンパク質の分解以外の他のシステムへ与える影響についての質問があった。また主査の野々村克也教授からε-COP分解におけるアンドロゲン濃度依存性の有無、ARの変異による構造異常があった場合、すなわちホルモン不応性前立腺癌においてPIRH2の作用は変化するのか、ARとドメイン構造が似通っている他のステロイドホルモンレセプターとPIRH2との関連についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は実験結果や文献を引用して説明し、おおむね適切に回答した。

この論文はPIRH2がε-COPのユビキチン化をきたし、プロテアソーム依存性分解を促進するということ、さらにはそれらの相互作用はアンドロゲンレセプターにより調節されていることを見出し、PIRH2を過剰発現させることにより前立腺癌細胞株からのPSA分泌が抑制されることを初めて明らかとした点で高く評価され、またこれらの所見はPIRH2がゴルジ体から小胞体への逆行輸送の調節因子として働くことを示唆するものであり、この分子をさらに解析することによりPSAを分泌する前立腺癌細胞の特徴が明らかとなり、今後前立腺癌の診断や治療などの臨床応用も可能にな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充分な資格を有するものと判定した。