

1

ヒト前立腺細胞アンドロゲン受容体に対する特異的coactivator, ARA₇₀のクローニングと特性評価Cloning and Characterization of a Specific Coactivator, ARA₇₀, for the Androgen Receptor in Human Prostate Cells

S.Yeh, C.Chang

Department of Medicine and University of Wisconsin Comprehensive Cancer Center, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA

Proc Natl Acad Sci USA, 93: 5517-5521, 1996 ©1996, National Academy of Sciences, U.S.A.

アンドロゲン受容体 (AR) はステロイド受容体スーパーファミリーのひとつであり, 雄性分化と前立腺細胞増殖において重要な役割を担っている. ARの突然変異あるいは異常発現は, 前立腺癌がアンドロゲン依存性から非依存性へと変化する過程において, 重要な意味を持つ可能性がある.

筆者らは, yeast two-hybrid システムを用いて, リガンド依存性AR関連蛋白質 (ARA₇₀) を単離することに成功した. ARA₇₀はヒト前立腺癌由来DU145細胞において, ジヒドロテストステロン (DHT) 10^{-10} M, もしくはテストステロン 10^{-9} Mの存在下で転写活性因子として機能し, AR転写活性を10倍亢進させたのに対し, 抗アンドロゲン剤の存在下では転写活性亢進作用を示さなかった. さらに, DU145細胞のエストロゲン受容体, グルココルチコイド受容体, プロゲステロン受容体など, 他のステロイド受容体に対する転写活性誘導作用はきわめて弱いことが示唆された.

以上の結果より, アンドロゲンの至適活性発現には, ARA₇₀のようなARに特異的なcoactivatorが必要であることが示唆された.

GAL4bdとARの融合蛋白質を導入したY190では, ARA₇₀およびリガンド (DHT) の共存下でLacZの転写が促進され, β -ガラクトシダーゼ活性が顕著に発現したが, 他のステロイド受容体 (RAR, TR4) との融合蛋白質では β -ガラクトシダーゼ活性はきわめて弱かった.

ARA₇₀がDHT存在下でARと特異的に相互作用し, 転写活性を誘導することが示唆された.

RAR: retinoic acid receptor
TR4: 次頁POINT参照

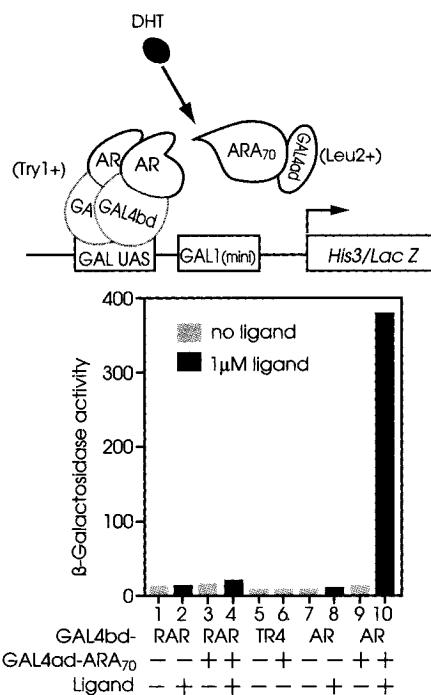


図 ARA₇₀の同定: ヒトARとのリガンド特異的な相互作用

酵母細胞Y190を用いたliquid assayによるARA₇₀とホルモン受容体との相互作用。GAL4 (Y190の転写活性化因子) のDNA結合ドメインGALbdとホルモン受容体 (AR, RAR, TR4) のhybrid遺伝子を作製し, β -ガラクトシダーゼ遺伝子LacZを保有するY190に導入した。一方, GAL4の転写活性化ドメインGAL4adとARA₇₀のhybrid遺伝子を作製し, 同じY190に導入した。形質転換したY190をtrans-レチノイン酸 10^{-6} M (lane1~4) もしくはDHT 10^{-6} M (lane7~10) を含有する培地で培養した。

POINT

ホルモン受容体は、リガンド（ホルモン）との特異的結合に続いて、標的とするDNAと結合し、転写（DNA→mRNA）の活性化・不活性化に関与する転写調節因子のひとつである。この過程には、受容体とリガンド以外にも複数の因子が選択的に作用するものと考えられている。

これまでもホルモン受容体との相互作用を示すいくつかの蛋白質の存在が明らかにされているが、本報告では、ARの転写活性を特異的に誘導するリガンド依存性蛋白質（ARA₇₀）が、遺伝子クローニングにより初めて同定された。

ステロイド受容体スーパーファミリー＝ステロイドホルモンや甲状腺ホルモンなどの受容体は、その一次構造の相同性からステロイド受容体スーパーファミリーと称される。いずれもC末端側にリガンド結合部位、中央部～N末端側にDNA結合部位を有するDNA結合蛋白質であり、リガンドとの結合により特定のDNAに対する結合活性を獲得する。これらの受容体は細胞質あるいは細胞核内に存在し、核内で標的DNAの転写を制御する転写調節因子のひとつである。

転写調節＝DNAを鋳型としてRNAが合成される「転写」の過程は、蛋白質合成の第一段階である。転写調節、すなわちRNA合成量の調節は、その後の種々の蛋白質合成の調節につながり、発生、分化、増殖、あるいは癌化など、あらゆる生物学的現象の調節段階であるとも言える。

TR4 orphan receptor＝ステロイド受容体スーパーファミリーのひとつであるが、現在のところリガンドは同定されていない。

yeast two-hybrid system＝サッカロミセス酵母の転写活性系を利用して蛋白質の相互作用・複合体形成能をスクリーニングする方法。最近では遺伝子クローニング法として種々の領域で応用されている。

サッカロミセス酵母の転写制御蛋白質GAL4は、N末端側にDNA結合ドメイン（GAL4bd）、C末端側に転写活性化ドメイン（GAL4ad）を有するDNA結合蛋白質である。β-ガラクトシダーゼ遺伝子LacZを標的の遺伝子として、上流のプロモーター領域にある特異的塩基配列（UAS: Upstream Activating Sequence）に結合し、mRNAへの転写を強力に促進する（図A）。

GAL4の両ドメインを物理的に切り離すと転写促進作用は発現しない（図B）。

しかし、両ドメインをそれぞれ別の蛋白質X、Yと融合させ、このX、Yに相互作用が存在すれば、X、Yを介してGAL4bdとGAL4adの複合体が再構築され、LacZに対する転写促進作用が発現する（図C）。

以上の原理から、LacZの転写によるガラクトシダーゼ活性の発現を指標とし、XもしくはYに相当する特定の蛋白質との相互作用を示す未知の蛋白質のスクリーニングおよびクローニングに利用される。

本報告では、Xにホルモン受容体レセプターを用い、反応系にリガンドを添加することによって、リガンド依存的にARと特異的な相互作用を示すARA₇₀が確認された。

