

研究区分	教員特別研究推進 独創・先進的研究
------	-------------------

研究テーマ	去勢抵抗性前立腺がん進行の原因タンパク質 AR-V7 の転写複合体の解明				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・講師	氏名	志津 怜太
	研究分担者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	吉成 浩一
		所属・職名	薬学部・助教	氏名	保坂 卓臣
		所属・職名		氏名	
	発 表 者	所属・職名	薬学部・講師	氏名	志津 怜太

講演題目
近位依存性ビオチン化酵素を用いた AR-V7 の核内相互作用タンパク質の解明
研究の目的、成果及び今後の展望
アンドロゲン受容体(AR)のスプライシングバリエーションである AR-V7 は、リガンド結合ドメイン(LBD)を欠損しており、リガンド非依存的に恒常的な転写活性化作用を示す。AR-V7 の恒常的転写活性化は、抗アンドロゲン薬の治療効果が認められない前立腺がん進行の原因であることが知られているが、AR-V7 の DNA 結合転写複合体による転写調節の詳細は不明である。エストロゲン受容体 (ER) において DNA 結合時の転写共役因子との転写複合体が相分離状態で存在することが報告されている(Nat Struct Mol Biol (2019))。AR-V7 も ER と同様に相分離によって転写複合体が形成される可能性があるため、本研究では、まず AR-V7 と転写共役因子との複合体が、相分離状態で存在するか否かを明らかにし、その後、近位依存性ビオチン化酵素を用いた相互作用タンパク質の網羅的解析によって、AR-V7 による転写に関与する転写共役因子を同定することを目的とした。 AR-V7 による標的遺伝子の転写活性化における相分離の役割を明らかにするため、ヒト前立腺がん由来 PC-3 細胞に AR-V7 発現プラスミド及び AR 応答配列を組み込んだレポータープラスミドを導入し、相分離阻害薬 1,6-hexanediol 又はその対照薬 2,5-hexanediol を処置し、レポーター活性を調べた。その結果、レポーター活性は AR-V7 の発現により著しく増加し、この上昇は 1,6-hexanediol 処置によって減弱したが、2,5-hexanediol 処置では変化しなかった。また、PC-3 細胞に AR-V7 を発現させ、1,6-hexanediol 又は 2,5-hexanediol 処置後、AR 標的遺伝子 KLK3 プロモーター上の AR 応答配列への AR-V7 及び AR-V7 の既知の転写共役因子 BRD4 の結合をクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) により調べた。その結果、AR-V7 の AR 応答配列への結合は両処置群で認められたが、BRD4 の結合は 2,5-hexanediol 処置時のみ認められた。以上の結果から、AR-V7 及びその転写共役因子が DNA 上で相分離を形成して応答配列に結合する可能性が示された。次に、AR-V7 の C 末端に近接タンパクのビオチン化酵素である AirID を融合したタンパク質 (AR-V7-AirID) の発現プラスミドを作製し、AR-V7 又は AR-V7-AirID を PC-3 細胞に発現させた。両細胞の核画分を用いて、ストレプトアビジンビーズを用いたプルダウンによりビオチン化されたタンパク質を回収した。質量分析の結果、232 種が AR-V7-AirID 発現時特異的に検出され、この中には AR-V7 の転写に関与することが既に報告されている転写共役因子 MED、AR による転写の調節を行うことが報告されている転写因子 ARID および NR2C1 があった。これら同定されたタンパク質の中でも、ARID4B は、siRNA によるノックダウンにより、レポーターアッセイにおける AR-V7 依存的な転写を強く増強したため、AR-V7 による転写のリプレッサーとして機能する可能性が示された。