

氏名 (本籍)	鈴木紀子 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 878 号
学位授与日付	平成 24 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Evidence that lack of ligand-binding domain correlates with nuclear distribution of unliganded human androgen receptor and loss of transactivation activity
審査委員	(主査) 教授 小澤 修 (副査) 教授 近藤直実 教授 長岡 仁

### 論文内容の要旨

アンドロゲン不応症 (androgen insensitive syndrome, AIS) は精巣を有するが、内性器および外性器が女性型を示す症候群であり、原因はアンドロゲン標的臓器におけるアンドロゲン受容体 (AR) 不応によるアンドロゲン作用の欠如とされている。本症候群では Müller 管抑制因子 (MIS) とアンドロゲンの分泌はあるため、Müller 管の退縮は起こるが、アンドロゲンによる Wolff 管からの男性内性器の誘導が起きない。また、排泄腔由来のアンドロゲン標的細胞内でも活性化されたテストステロンへの反応が生じないため、外性器は女性化を示すことになる。伴性劣勢遺伝であるが、突然変異による散発例も知られている。

AR はステロイド受容体のスーパーファミリーに属しており、主に 4 つのドメイン構造よりなっている。N 末端 transactivation ドメイン、DNA 結合ドメイン、ヒンジ領域、C 末端リガンド結合ドメインである。リガンド (アンドロゲン) が結合していない AR は細胞質に局在しているが、リガンドが結合すると核内へ移行する。AIS 患者の AR 遺伝子解析によって、多くのタイプの AR 構造および機能異常の存在が明らかになりつつある。

今回、我々は家族性に発症した AIS 症例とその母親について、変異 AR 遺伝子・タンパク質と病態の関連性の解明を試みた。特に、変異 AR のタンパク質レベルの機能構造を解析するために Green Fluorescence Protein (GFP) 融合タンパク質を作製し、アンドロゲン結合によって変化する細胞内局在および転写活性化能について検討し、AR の生物学的な活性化調節機構を再考した。

#### 【対象と方法】

研究に先立ち大学院医学系研究科医学研究等倫理審査委員会の承認を得た。十分な説明と同意を文書で得た後、臨床症状および染色体分析から完全型 AIS と診断された患者由来の genomic DNA より cDNA を単離し、また購入した野生型 AR の cDNA を GFP ベクターにクローニングした。転写活性化能はルシフェリン・ルシフェラーゼアッセイ法で検討した。また、アンドロゲン結合型および非結合の AR 細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した。

#### 【結果】

GFP ベクターにクローニングした患者と野生型 AR を COS-7 細胞に遺伝子導入し、その細胞抽出液を用いてウェスタンブロッティングを行い、GFP 融合 AR タンパクが発現されていること

を予め確認した。

また、変異型と野生型の AR 機能として、転写活性化能をルシフェラーゼアッセイで比較検討したところ、野生型ではリガンド依存的に転写が活性化されたが、変異型 AR ではリガンドが高濃度で存在しても転写は活性化されなかった。

さらに AR の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察したところ、野生型 AR はリガンド依存的に細胞質から核内に移行したが、予想に反して変異体 AR はリガンド非存在下、存在下においても核内に留まったままであった。

### 【考察】

申請者らは既報で、患者 AR 遺伝子 2 塩基挿入によるフレームシフトにより、リガンド結合領域を欠失していることを明らかにしている。今回の AR 細胞内局在の結果から、i) 変異 AR はアンドロゲンの存在に関係なく常に核内に局在し、ii) 転写活性化能を保持しないことが明らかになった。これは変異型 AR では、遺伝子・タンパク質レベルの解析によって推察された「リガンド結合部位の欠失」が機能的にも推測された結果である。この現象はリガンド結合部位として認識されてきた C 末端ドメインが、核内移行にも大きく寄与していることを示唆する。今回遭遇した患者の AR はリガンド結合領域を欠失しており、常に核内に局在しながらも転写活性化能を保持しないために AIS となったと考えられた。

AIS 患者の AR 遺伝子変異はこれまでに 1000 例以上報告されているが、その多くが置換変異であり、本症例のような挿入変異はわずか 30 例である。本症例の遺伝子とタンパク質構造を通して、1) AR の遺伝子変異と AR 構造異常および 2) 構造と機能の観点から、正常 AR の理解を深めるのみならず、AR 機能異常の代表である AIS 発症のメカニズムを明らかにした。これらの結果から、AIS に対する将来的な遺伝子治療のヒントとなりうる可能性が示唆された。

### 【結論】

ヒトアンドロゲン受容体のリガンド結合部位欠失は、リガンド非結合時の核内局在と転写活性化能の欠失を引き起こす可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 鈴木紀子は、ヒトアンドロゲン受容体のリガンド結合部位の欠失は、リガンドの存在に関わらず受容体が核内に局在することおよび転写活性化能の欠失を惹起することを明らかとした。本研究の成果は、アンドロゲン不応症の治療につながる新たな知見をもたらし、産科婦人科学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表誌]

Noriko Suzuki, Atsushi Imai : Evidence that lack of ligand-binding domain correlates with nuclear distribution of unliganded human androgen receptor and loss of transactivation activity.

Gynecological Endocrinology 27, 940-943 (2011)