

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07114

研究課題名(和文) 脱ユビキチン化酵素阻害剤が駆動する新規HIF-1分解経路の同定

研究課題名(英文) Identification of non-canonical degradation pathway of HIF-1 alpha promoted by de-ubiquitinating enzyme inhibitor.

研究代表者

服部 明 (Hattori, Akira)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50300893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脱ユビキチン化酵素阻害剤WP1130の誘導体を化学合成し、それらの脱ユビキチン化酵素阻害活性とHIF-1分解誘導活性との間には高い相関を見出した。

WP1130は、p38 MAPキナーゼ経路を介して、プロテアソーム非依存的HIF-1分解を誘導している可能性が示唆された。欠失変異体を用いた解析の結果、HIF-1の375番から600番目までの分子中央に位置する領域がWP1130によるプロテアソーム非依存的HIF-1分解には必須であることが明らかとなった。カルパイン-1阻害剤ALLN感受性プロテアーゼがWP1130が誘導するHIF-1分解に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療におけるHIF-1機能制御の有効性は既に広く認識されている。本研究の結果、脱ユビキチン化酵素の阻害によって誘導される新しいHIF-1分解経路が、がん悪性化に対する新しい制御点として機能しうることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We found that inhibition of de-ubiquitinating enzymes (DUB), which release ubiquitin (Ub) moieties from Ub chain, promoted a degradation of hypoxia-inducible factor(HIF)-1 through a unidentified proteasome-independent pathway. We revealed that WP1130, a DUB inhibitor, activated the p38 MAP kinase pathway and anisomycin, a p38 MAP kinase activator, promoted the degradation of HIF-1 which accumulated by the proteasome inhibition. These results suggested that WP1130 activates non-canonical HIF-1 degradation pathway via p38 MAP kinase pathway. We constructed a series of C-terminal deletion mutants and demonstrated that a region between residues 375 and 600 of HIF-1 is essential for the induction of non-canonical degradation pathway. Study employing various protease inhibitors including ALLN, a calpain-1 inhibitor, suggested that calpain-1 inhibitor ALLN-sensitive protease is involved in the WP1130-induced degradation of HIF-1 accumulated by proteasome-inhibition,

研究分野：細胞生物学

キーワード：ユビキチン 脱ユビキチン化酵素活性 低酸素誘導因子 プロテアソーム タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍内部（低酸素環境下）に存在するがん細胞内で誘導される低酸素誘導因子（Hypoxia-inducible factor: HIF）-1 は、血管新生、浸潤・転移、代謝に関わる遺伝子群の転写を促進する「がん悪性化のマスターキー」の1つである。近年、新しいがん治療戦略の1つとしてがんの悪性化に関わる多くの因子を一網打尽に抑制可能な HIF-1 分子標的薬の開発が精力的に進められている。

通常酸素濃度下に存在する細胞では、HIF-1 の α サブユニット（HIF-1 α ）の発現はユビキチン（Ub）- プロテアソーム経路によって厳密に抑制されている。すなわち、HIF-1 α は、分子内のプロリン残基が酸素濃度依存的にプロリン水酸化酵素によって水酸化を受けるのを契機として、Ub 添加酵素である von Hippel-Lindau（pVHL）複合体による Lys48 結合型 Ub 鎖の付加が起こり、次いで、Ub 修飾タンパク質の分解装置であるプロテアソームによって速やかに分解される。一方、低酸素環境である固形がん内部のがん細胞では、HIF-1 α 分子内のプロリン残基は水酸化修飾を受けないために、pVHL 複合体による Ub 化修飾が進行せず HIF-1 α がプロテアソームによる分解を受けることがないために蓄積する。これに関連して、VHL 遺伝子欠損病である von Hippel-Lindau 病では、Ub 化修飾酵素欠損に伴う HIF-1 の蓄積が原因で、腎細胞がんや褐色細胞腫が多発することが報告されている。

タンパク質の Ub 化修飾は、E1 - E2 - E3 酵素からなる Ub 添加酵素群によって担われている Ub 付加反応とその逆反応である Ub 鎖からの Ub 分子の遊離を担う脱ユビキチン化酵素（de-ubiquitinating enzyme: DUB）が触媒する Ub 遊離反応のバランスの上に成り立っており、その破綻は様々な疾患の原因となる。近年、pVHL のような Ub 添加酵素についての研究が進み、その機能や作用機構はよく知られるところとなった。一方、その逆反応を担う DUB 遺伝子はヒトで約 90 種類存在するが、解析に必要な様々なツール（活性測定用基質など）の開発が遅れている事もあり、大部分の DUB の酵素学的性状、生理基質、活性制御機構の解析は進んでおらず、各 DUB の生理的・病理的機能研究もようやく緒に就いたばかりである。

申請者は研究用ツール不足を解消すべく、DUB 基質や活性型 DUB の検出用プローブ（activity-based probe）を独自に作製した。これらを活用して低酸素環境下での DUB 活性動態を解析したところ、低酸素に応答して活性が亢進する DUB の存在を示唆する結果を得た。そこで、本低酸素応答性 DUB の機能を探索するため、DUB 阻害剤の添加による HIF-1 の動態解析を行った。その結果、DUB 阻害剤の添加によって、低酸素環境下の繊維肉腫 HT1080 細胞、プロテアソーム阻害剤処理した HT1080 細胞、VHL 遺伝子欠損である腎細胞がん細胞（RCC4 細胞）中の「Ub - プロテアソーム経路耐性の HIF-1 α 」が分解されることを見出した。本結果は、HIF-1 α の分解が、プロテアソーム依存的経路に加えて、未同定のタンパク質分解酵素が関わるプロテアソーム非依存的分解経路によって担われていることを強く示唆している。さらに、プロテアソーム非依存的 HIF-1 分解経路は、未知の DUB によって通常は不活性に保たれている可能性も見出した。

2. 研究の目的

HIF-1 α の Ub 修飾が環境中の酸素濃度に依存して起こり、それがプロテアソームによって速やかに分解されるという、シナリオ通りの制御下にあることが明らかにされて以来、そのメカニズムなどの詳細は精力的に解析されてきた。一方、プロテアソームに依存しない HIF-1 α 分解については、これまでほとんど焦点が当てられてこなかった。本研究では、我々が新たに見出した DUB 阻害剤が誘導するプロテアソーム非依存的 HIF-1 分解経路に関わる分子の同定およびそれらの作用メカニズムの解明を目指す。これらの解析を通じて、DUB 阻害剤によるプロテアソーム非依存的 HIF-1 分解経路の活性化を介して、がん悪性化のマスターキーである HIF-1 を分解へと導くという、新しい概念のがん化学療法開発に向けた分子基盤を構築したい。

3. 研究の方法

DUB 阻害剤 WP1130 の誘導体は化学合成によって作成した。各誘導体について、プロテアソーム阻害剤処理によって蓄積した HIF-1 α に対する分解誘導作用を検討し、構造活性相関解析を行った。

siRNA を用いて、DUB の knock-down を行った。knock-down による HIF-1 安定性への効果は、抗 HIF-1 α 抗体を用いたウエスタンブロット解析およびルシフェラーゼ利用した HIF-1 レポーターアッセイを用いて検討した。

プロテアソーム非依存的 HIF-1 分解経路による認識に必要な HIF-1 α の分子内領域（すなわち DUB 阻害による HIF-1 分解誘導に必須な分子内領域）の決定を試みた。具体的には、HA タグを付加した各種の HIF-1 α 欠失変異体を HepG2 細胞に発現させ、DUB 阻害剤で処理した際のそれらの安定性（ウエスタンブロット解析）を解析することで必須領域の絞り込みを行った。欠失変異体の作成においては、HIF-1 α のドメイン構造を基に、C 末端領域を順次欠失させた。構築した各種変異体発現プラスミドはリポフェクトアミン 3000 を用いて HepG2 細胞に導入し、blasticidin S による選択によって遺伝子発現安定細胞株を樹立した。

各種プロテアソーム阻害剤を用いて DUB 阻害剤が活性化する HIF-1 分解装置の同定を試みた。すなわち、プロテアソーム阻害剤 MG-132 処理によって蓄積した HIF-1 α は DUB 阻害剤

WP1130 によって分解促進を受けるが、その際に各種プロテアーゼを添加してその影響を抗 HIF-1 α 抗体を用いたウエスタンブロット解析によって検討した。

p38 MAP キナーゼ経路の関与については、p38 MAP キナーゼを活性化可能な抗生物質である anisomycin を用いて検討した。p38 MAP キナーゼの活性化の検討は、本酵素の活性化に必要な Threonine-Glycine-Tyrosine モチーフを構成するトレオニンおよびチロシン残基のリン酸化修飾を検出可能な抗体ならびに本酵素の基質として知られている転写因子 ATF-2 のリン酸化修飾を検出可能な抗体を用いたウエスタンブロット解析、MAP キナーゼ阻害剤 SB203580 を用いた解析によって検討した。

4. 研究成果

本研究では、脱ユビキチン化酵素阻害剤処理によって誘導されるプロテアソーム非依存的 HIF-1 α 分解のメカニズム解析を行った。

脱ユビキチン化酵素阻害剤 WP1130 の誘導体を化学合成し、それらの脱ユビキチン化酵素阻害活性と HIF-1 分解誘導活性の相関を検討した結果、両活性の間には高い相関が観察された。

また、可逆的プロテアソーム阻害剤 MG132 とは異なった様式によってプロテアソームを阻害する不可逆的プロテアソーム阻害剤である epoxomicin 処理によって蓄積した HIF-1 α も WP1130 添加によって分解誘導を受けることが明らかとなった。

HIF-1 α 分解を誘導する WP1130 の標的分子の探索を、DUB と共有結合を形成しうる Ub 誘導体型 activity based probe を用いて行った。WP1130 処理した HT1080 細胞抽出液と HA-Ub-*-vinylmethyl ester* とを反応させた。抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果、種々の probe 反応性のバンドが検出されたが、そのうち、分子量約 100,000 のバンドは HIF-1 α 分解誘導能を欠いた WP1130 誘導体で前処理した細胞抽出液からは検出されたが、一方、WP1130 処理した細胞では検出されなかった。このことは、本来 Ub 誘導体型 activity based probe と共有結合を形成するはず分子が、WP1130 の共存によって複合体形成が阻害されたと考えられるため、本分子が DUB 阻害剤誘導性 HIF-1 α 分解に関わっている可能性が示唆された。本知見に加えて、WP1130 による阻害を受けることが報告されている Ubiquitin specific protease (USP)-5、USP-14 および Ubiquitin-C-terminal hydrolase Like-5(UCH-L5) を HIF-1 α 分解関連 DUB の候補分子として考え、これら遺伝子の発現を siRNA を用いてノックダウンし、WP1130 刺激後の HIF-1 α 発現レベルの変化を検討した。しかしながら、検討したいずれの酵素の発現低下も WP1130 の作用に対する影響が認められなかった。これらの結果から、USP5、USP14 および UCH-L5 のプロテアソーム非依存的 HIF-1 α 分解への関与は否定された。

WP1130 による分解促進が HIF-1 α に特異的な現象であるかどうかを検討するために、他の転写因子の発現レベルに及ぼす WP1130 の影響を検討した。その過程で、WP1130 が転写因子 ATF-2 のリン酸化が誘導されることを見出した。ATF-2 はストレス応答性セリン・トレオニンキナーゼである p38 MAP キナーゼの基質であることが広く知られていることから、WP1130 処理した細胞での、p38 MAP キナーゼの活性化を検討したところ、確かに、WP1130 による p38 MAP キナーゼの活性化が観察された。そこで、p38 MAP キナーゼを活性化剤である anisomycin によるプロテアソーム非依存的 HIF-1 分解を検討した。その結果、anisomycin は p38 MAP キナーゼ活性化能とよく相関して、プロテアソーム非依存的な HIF-1 α 分解を誘導した。これらの結果から、脱ユビキチン化酵素阻害剤 WP1130 は、p38 MAP キナーゼ経路を介して、プロテアソーム非依存的 HIF-1 α 分解を誘導している可能性が示唆された。

プロテアソーム非依存的 HIF-1 α 分解を受けるために必要な HIF-1 α の分子内領域を、各種欠失変異体を作製して検討した。その結果、HIF-1 α の 375 番から 600 番目までの分子中央に位置する領域が WP1130 や anisomycin 処理によるプロテアソーム非依存的 HIF-1 分解には必須であることが明らかとなった。

また、HIF-1 α 分解を担うプロテアソーム以外のプロテアーゼについては、各種プロテアーゼ阻害剤を用いた解析を行った。その結果、カルパイン-I の阻害剤である ALLN が WP1130 や anisomycin による HIF-1 α の分解誘導に対して阻害作用を示した。これらの結果から、ALLN 感受性プロテアーゼが HIF-1 α の分解に関わっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計3件)

Matsumoto H, Sato Y, Horie A, Suginami K, Tani H, Hattori A, Araki Y, Kagami K, Konishi I and Fujiwara H
CD9 suppresses human extravillous trophoblast invasion.
Placenta(査読有), 47:105-112 (2016)
10.1016/j.placenta.2016.09.014

Fujiwara H, Matsumoto H, Sato Y, Horie A, Ono M, Nakamura M, Mizumoto Y, Kagami K, Fujiwara T, Hattori A, Maida Y, Daikoku T, Imakawa K, and Araki Y

Factors Regulating Human Extravillous Trophoblast Invasion: Chemokine-peptidase and CD9-integrin Systems.

Curr. Pharm. Biotechnol.(査読有), 19: 764-770(2018)

10.2174/1389201019666181029164906.

Goto Y, Nakamura TJ, Ogawa K, Hattori A, and Tsujimoto M

Acute-phase protein-like properties of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1.

J. Biochem.(査読有), 165:159-165(2019)

10.1093/jb/mvy090.

〔学会発表〕(計5件)

吹上遼介、小林万祐子、服部 明、掛谷秀昭

脱ユビキチン化酵素阻害による HIF-1 発現レベルの制御

第 89 回日本生化学大会、2016 年 9 月 25 日～27 日 仙台国際センター他(宮城県)

福岡啓太、青木 豊、服部 明、掛谷秀昭

脱ユビキチン化酵素 USP47 のポリユビキチン鎖消化機構の解明

第 89 回日本生化学大会、2016 年 9 月 25 日～27 日 仙台国際センター他(宮城県)

福岡啓太、服部 明、掛谷秀昭

脱ユビキチン化酵素 USP47 の C 末端ホモロジー領域はそのポリユビキチン鎖認識機構に重要である

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 6 日～9 日 神戸国際会議場他(兵庫県)

福岡啓太、服部 明、掛谷秀昭

酵素反応速度論的解析を用いた脱ユビキチン化酵素 USP47 の C 末端領域の機能解析

第 91 回日本生化学大会 2018 年 9 月 24 日～26 日 京都国際会議場(京都)

松原拓真、服部 明、掛谷秀昭

Calpain7 の細胞内局在の解析

第 91 回日本生化学大会 2018 年 9 月 24 日～26 日 京都国際会議場(京都)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

Identification of non-canonical degradation pathway of HIF-1 α promoted by de-ubiquitinating enzyme inhibitor.

脱ユビキチン化酵素阻害剤 WP1130 の誘導体を化学合成し、それらの脱ユビキチン化酵素阻害活性と HIF-1 分解誘導活性の相関を検討した結果、両活性の間には高い相関が観察された。Ub activity based probe を用いた解析の結果、WP1130 の標的分子として、分子量約 100,000 のタンパク質が候補として見出された。

WP1130 は、p38 MAP キナーゼ経路を介して、プロテアソーム非依存的 HIF-1 α 分解を誘導している可能性が示唆された。欠失変異体を用いた解析の結果、HIF-1 α の 375 番から 600 番目までの分子中央に位置する領域が WP1130 や anisomycin 処理によるプロテアソーム非依存的 HIF-1 分解には必須であることが明らかとなった。カルパイン-I の阻害剤 ALLN 感受性プロテアーゼが WP1130 や anisomycin が誘導する HIF-1 α 分解に関与している可能性が示唆された。

We found that inhibition of de-ubiquitinating enzymes (DUB), which release ubiquitin (Ub) moieties from Ub chain, promoted a degradation of hypoxia-inducible factor(HIF)-1 α through a unidentified proteasome-independent pathway. We revealed that WP1130, a DUB inhibitor, activated the p38 MAP kinase pathway and anisomycin, a p38 MAP kinase activator, promoted the degradation of HIF-1 α which accumulated by the proteasome inhibition. These results suggested that WP1130 activates non-canonical HIF-1 α degradation pathway via p38 MAP kinase pathway. We constructed a series of C-terminal deletion mutants and demonstrated that a region between residues 375 and 600 of HIF-1 α is essential for the induction of non-canonical degradation pathway. Study employing various protease inhibitors including ALLN, a calpain-I inhibitor, suggested that calpain-I inhibitor ALLN-sensitive protease is involved in the WP1130-induced degradation of HIF-1 α accumulated by proteasome-inhibition,