

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18421

研究課題名(和文)新規血管伸長制御因子KCTD proteinの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of KCTD protein as a novel angiogenic regulator

研究代表者

坂上 倫久 (Sakaue, Tomohisa)

愛媛大学・医学系研究科・助教(特定教員)

研究者番号：20709266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：最近我々は、新規血管新生制御因子としてE3ユビキチンリガーゼの一つであるCUL3-KCTD複合体を発見した。本研究では、CUL3-KCTDのユビキチン化標的タンパク質を、コムギ無細胞タンパク質合成系を駆使して作成したタンパク質アレイを用いて探索した。その結果、RhoAの活性制御分子を同定することに成功した。CUL3またはKCTDを発現抑制すると、その基質の細胞内蓄量積依存的に血管新生が阻害されることがわかった。これらの結果から、CUL3-KCTDは、血管伸長過程において、RhoA活性制御を担う標的基質の分解を介して血管新生を正に制御する可能性が示唆された。

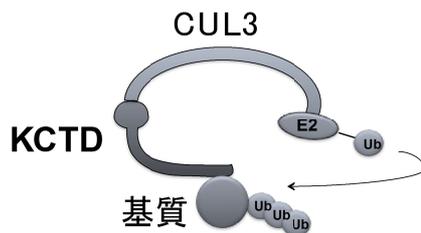
研究成果の概要(英文)：We have recently found CUL3-KCTD complex, one of the E3 ubiquitin ligase, as a novel angiogenic factor. In this study, we screened the substrate of CUL3-KCTD complex using wheat cell-free synthesized protein array, resulting in the successful identification of regulator of GTP-RhoA. Knockdown of CUL3 or KCTD led to severe anti-angiogenic phenotypes due to accumulation of the substrate in endothelial cells. These data suggested that CUL3-KCTD would tightly regulate the substrate protein which might play a crucial role for vascular elongation during angiogenesis.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 CUL3 ユビキチン 細胞骨格 アクチン

## 1. 研究開始当初の背景

血管新生を制御することは、腫瘍や心疾患、糖尿病の治療において重要である。特にがんにおいては、腫瘍血管新生を阻害することで、がん細胞への栄養や酸素の供給を阻止できるという概念から、その阻害薬剤はがん治療に臨床応用されている。しかしながら、既存の血管新生阻害剤は、副作用や薬剤耐性などの多くの問題点を抱えており、新たな薬剤標的分子の発見が必要不可欠である。これまで血管新生は、血管内皮細胞内において、促進シグナルと抑制シグナルのバランスによって制御されていることが知られているが、最近我々は、そのマスターレギュレーターである CUL3-KCTD 複合体 (下図参照) を発見した。CUL3 は、E3 ユビキチンリガーゼのプラットフォームタンパク質であり、KCTD は CUL3 と結合し、基質の受容体として機能すると考えられている。実際、CUL3 あるいは KCTD を発現抑制するとアクチンの過重合が起こり、それに伴って血管新生が強く阻害されることをこれまで我々は見出している。従って、CUL3-KCTD 軸は、血管内皮細胞において、標的タンパク質のユビキチン化とそれに続くタンパク質分解や機能変換を介してアクチン骨格制御に深く関わっていると考えられるが、血管新生における役割は全く不明であった。



## 2. 研究の目的

本研究では、CUL3-KCTD のユビキチン標的タンパク質の同定と、その標的基質の機能解析を実施し、血管新生における役割について、*in vitro* 及び *in vivo* で明らかにすることを目的とした。また、新規血管新生阻害剤の開発を目指して KCTD の機能阻害剤のリード化合物の導出実験を実施した。

## 3. 研究の方法

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、ビオチン化 KCTD を *in vitro* で作成した。また、同系を駆使して作成したヒトタンパク質 2 万アレイと、パーキンエルマー社製の AlphaScreen システムを組み合わせることにより、KCTD に直接結合するタンパク質を網羅的に探索した。見出したタンパク質については、血管内皮細胞で過剰発現、あるいはノックダウンを実施し、コラーゲンゲル内三次元培養系により血管新生の表現型解析を行

った。また、KCTD と基質タンパク質との相互作用を検出する AlphaScreen システムを用いて、その結合阻害化合物を探索する実験も実施した。

## 4. 研究成果

### KCTD に結合する新規タンパク質の同定

ビオチン KCTD に対して、ヒト 2 万種タンパク質の中から、直接結合するタンパク質のスクリーニングを実施した。その結果、25 kDa の分子量を持つ、ストレスファイバー骨格形成に関わる RhoA の活性制御分子を同定することに成功した。この 25 kDa のタンパク質 (25k-protein) は、アミノ酸シーケンスの相対性の高い三つのファミリーを構成しており、それぞれ緑色蛍光タンパク質 (GFP) タグを付加したコンストラクトを作成し、レンチウイルスにより血管内皮細胞に過剰発現させた。この細胞を用いて、以下の 4 つのことを明らかにした。

- 3 種類の 25k-protein ファミリータンパク質のうち 25k-protein-2 を過剰発現した細胞では、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A) で誘導される血管新生が強く阻害されたことから、25k-protein-2 は血管新生を負に制御する機能を持つ。
- また、25k-protein-2 を過剰発現した細胞のみ、活性型 RhoA が発現亢進しており、ファロイジン染色によりストレスファイバーの過剰形成が認められることから、血管内皮細胞においては、25k-protein-2 はアクチンの重合・脱重合のバランスを重合側に傾ける機能を持つことがわかった。
- 血管内皮細胞に発現する KCTD を免疫沈降すると、25k-protein-2 が共沈することから、細胞内でも両タンパク質は結合することがわかった。
- サイクロヘキサミドを用いてタンパク質の新規合成を停止させ、その後の 25k-protein-2 の細胞内安定性を観察したところ、Control siRNA をトランスフェクションした血管内皮細胞では薬剤添加直後から 8 時間の間に分解されるのに対して、KCTD siRNA ではほとんど分解されず、25k-protein-2 は長期に渡って安定的であった。

以上の結果から、CUL3-KCTD 軸は 25k-protein-2 のタンパク質安定性を制御しており、これが RhoA 活性化を介した血管新生調節機構に必須であることを新たに見出した。

KCTD を標的とした機能阻害剤リード化合物の探索実験

これまで我々は、ビオチン KCTD をベイトとして、25k-protein-2 及び CUL3 との

AlphaScreen assay 系を樹立している。このアッセイ系は、二者間の結合強度を定量的かつはイスループットに評価できるため、阻害剤開発に極めて有用である。そこで我々は、東京大学創薬機構の 9600 化合物コアライブラリーを用いて、25k-protein-2 と KCTD 間、及び 25k-protein-2-CUL3 間の結合を阻害する化合物のスクリーニング実験を実施した。

その結果、両結合間の阻害活性を示す候補化合物として 48 分子を見いだすことに成功している。現在、これらの分子に対して、血管新生阻害効果 (IC50)、アクチン過重合活性、細胞毒性の評価を進めており、細胞毒性が低く、アクチン過重合により血管新生を阻害する化合物に対しては、がん細胞を移植したゼノグラフトモデルを用いて、その腫瘍縮小効果について *in vivo* で評価する予定にしている。

#### KCTD の *in vivo* での機能解析

血管内皮細胞特異的 KCTD ノックアウトマウスを作成するため、Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9 (CRISPRCas9) 技術を用いて loxP サイトをマウス *Kctd* 遺伝子のエキソン 3 前後のイントロンに挿入する実験を行った。しかしながら、ゲノムへの挿入効率が低いため、現在も作成に時間を要している。今後 floxed KCTD マウスを樹立し、血管内皮細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配することで、内皮細胞特異的に KCTD 遺伝子をノックアウトし、野生型との比較により *in vivo* での KCTD 機能解析を進める予定にしている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Kovačević I\*, Sakaue T(\*Co-first), Majoleč J, Pronk MC, Maekawa M, Geerts D, Fernandez-Borja M, Higashiyama S, Hordijk PL. The Cullin-3-Rbx1-KCTD10 complex controls endothelial barrier function via K63 ubiquitination of RhoB. *J Cell Biol.* 5;217(3):1015-1032. 2018 (査読有)
2. Inoue Y, Shimazawa M, Nakamura S, Takata S, Hashimoto Y, Izawa H, Masuda T, Tsuruma K, Sakaue T, Nakayama H, Higashiyama S and Hara H. Both autocrine signaling and paracrine signaling of HB-EGF enhance ocular neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38, 174-185., 2018 (査読有)
3. Maekawa M, Tanigawa K, Sakaue T,

Hiyoshi H, Kubota E, Joh T, Watanabe Y, Taguchi T and Higashiyama S. Cullin-3 and its adaptor protein ANKFY1 determine the surface level of integrin  $\beta 1$  in endothelial cells. *Biol. Open.* 6, 11: 1707-1719., 2017 (査読有)

4. Sakaue T, Maekawa M, Nakayama H and Higashiyama S. Prospect of divergent roles of the CUL3 system in vascular endothelial cell function and angiogenesis. *J. Biochem.* 162: 237-245., 2017 (査読有)
5. Sakaue T, Suzuki J, Hamaguchi M, Suehiro C, Tanino A, Nagao T, Uetani T, Aono J, Nakaoka H, Kurata M, Sakaue T, Okura T, Yasugi T, Izutani H, Higaki J, Ikeda S. Perivascular Adipose Tissue Angiotensin II Type 1 Receptor Promotes Vascular Inflammation and Aneurysm Formation. *Hypertension.* 12:e0177343., 2017 (査読有)
6. Sakaue T, Sakakibara I, Fujisaki A, Uesugi T, Nakashiro K, Hamakawa H, Kubota E, Joh T, Imai Y, Izutani H, and Higashiyama S. The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in vascular endothelial cells. *Sci Rep.* 7, 46915., 2017 (査読有)
7. Sakaue T, Fujisaki A, Nakayama H, Maekawa M, Hiyoshi H, Kubota E, Joh T, Izutani H, Higashiyama S. Neddylated Cullin 3 is required for vascular endothelial-cadherin-mediated endothelial barrier function. *Cancer Sci.* 108, 208-215., 2017 (査読有)

[学会発表](計 16 件)

1. 坂上倫久、前川大志、藤崎亜耶子、高橋宏隆、澤崎達也、泉谷裕則、東山繁樹  
新規 CUL3 複合体による血管新生制御機構  
第 25 回日本血管生物医学会学術集会  
2017 年 12 月 9 日  
大阪国際交流センター(大阪府大阪市)
2. 坂上倫久、前川大志、藤崎亜耶子、高橋宏隆、澤崎達也、泉谷裕則、東山繁樹  
NEDD8 化シグナル伝達経路は血管内皮細胞運動を制御する  
ConBio2017  
2017 年 12 月 8 日  
神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
3. 前川大志、谷川和史、坂上倫久、渡部祐司、田口友彦、東山繁樹

血管内皮細胞におけるユビキチン E3 リガーゼ複合体依存的な細胞内膜輸送

ConBio2017

2017年12月6日

神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

4. 坂上倫久

The roles of CUL3-based E3 ligase in vascular endothelial cells

第2回秋期特別日本血管生物医学学会シンポジウム

2017年9月9日

大阪大学最先端医療イノベーションセンター(大阪府豊中市)

5. Tomohisa Sakaue, Shigeki Higashiyama

The essential roles of Cullin 3-based E3 ubiquitin ligase complex in vascular endothelial cell function and angiogenesis

Academic Exchanges Forum Between DMU & AIDAI

Sep 15., 2017

Dalian medical University (Dalian, China)

6. Tomohisa Sakaue, Ayako Fujisaki, Masashi Maekawa, Hironori Izutani, Shigeki Higashiyama  
Neddylated Cullin 3 is required for vascular endothelial-cadherin-mediated endothelial barrier function.

Protein Island Matsuyama 2017 & The 15th Matsuyama International Symposium

Sep 13., 2017

NANKA Memorial Hole (Matsuyama, Japan)

7. 藤崎亜耶子, 坂上倫久, 前川大志, 高橋宏隆, 澤崎達也, 泉谷裕則, 東山繁樹  
ユビキチンリガーゼ CUL-BTB 複合体解析システムの構築

第22回日本病態プロテアーゼ学会学術集会

2017年8月11日

千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

8. 坂上倫久, 藤崎亜耶子, 前川大志, 高橋宏隆, 澤崎達也, 泉谷裕則, 東山繁樹  
血管新生制御を担う Cul3-based E3 ubiquitin ligase の機能解析

第22回日本病態プロテアーゼ学会学術集会

2017年8月11日

千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

9. 坂上倫久

血管内皮細胞における CUL3 の役割

第3回血管生物医学学会若手研究会

2017年3月4日

淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

10. Tomohisa Sakaue, Ayako Fujisaki, Hironori Izutani, Shigeki Higashiyama

The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in endothelial cells

The 19th International Vascular Biology Meeting in Boston

November 5., 2016

Sheraton Boston Hotel (Boston USA)

11. 宇都宮果歩, 深江舜也, 上杉恭広, 坂上倫久, 中山寛尚, 前川大志, 泉谷裕則, 東山繁樹, CUL3-KLHL20 軸による細胞内タンパク質輸送制御機構の解析

第89回日本生化学会大会

2016年9月26日

仙台国際センターおよび東北大学(宮城県仙台市)

12. 藤崎亜耶子, 坂上倫久, 中山寛尚, 前川大志, 東山繁樹

CUL3 による VE-cadherin モジュレーションを介した血管内皮細胞接着制御機構の解析

第89回日本生化学会大会

2016年9月26日

仙台国際センターおよび東北大学(宮城県仙台市)

13. 坂上倫久, 藤崎亜耶子, 泉谷裕則, 東山繁樹

血管内皮細胞における CUL3 による VEGF-A 応答制御機構

第89回日本生化学会大会

2016年9月26日

仙台国際センターおよび東北大学(宮城県仙台市)

14. Tomohisa Sakaue, Ayako Fujisaki, Hironori Izutani, Shigeki Higashiyama.

The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in vascular endothelial cells.

Protein Island Matsuyama 2016 & The 15th Matsuyama International Symposium

Sep 16., 2016

NANKA Memorial Hole (Matsuyama, Japan)

15. 坂上倫久, 藤崎亜耶子, 泉谷裕則, 東山繁樹

CUL3 による血管内皮細胞活性化制御機構  
日本病態プロテアーゼ学会 第21回学術集会

2016年8月16日

千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

16. 藤崎亜耶子, 坂上倫久, 中山寛尚, 前川大志, 東山繁樹

CUL3 による VE-cadherin を介した血管内皮細胞接着制御

第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会(高知)

2016 年 5 月 28 日

高知大学医学部(高知県南国市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/biochem2/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

坂上 倫久(Sakaue, Tomohisa)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教(特定教員)

研究者番号: 20709266

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし