

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：16K19038

研究課題名(和文) CUL3依存的な細胞内膜輸送が制御する血管新生の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of angiogenesis regulated by CUL3-dependent membrane trafficking

研究代表者

前川 大志 (Maekawa, Masashi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・テニユアトラック助教

研究者番号：10771917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新しい血管の構築(血管新生)は、個体の正常な発生だけでなく、癌細胞の増殖や転移等の非常に多くの病態に關与する。特に、抗血管新生医薬品は抗癌剤として臨床応用されている。本研究において我々は、ユビキチンE3リガーゼ複合体CUL3/ANKFY1が、血管新生に必須な細胞接着分子である膜タンパク質 integrin の細胞内輸送を制御する事で、integrin の細胞膜における存在量を規定し、血管新生を正にコントロールしている事を突き止めた。今後、CUL3/ANKFY1複合体の形成阻害剤を同定、開発する事で、新規な血管新生阻害剤の導出に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis, the formation of new blood vessels, is related to not only development but a variety of diseases like tumor growth/metastasis. Anti-angiogenic drugs are successfully used for cancer therapy. In this study, we identified a novel angiogenic factor, the CUL3/ANKFY1 ubiquitin E3 ligase complex, which determines the cell surface level of integrin, an essential adhesion molecule for angiogenesis. CUL3/ANKFY1 regulated recycling of integrin from endosomes to the plasma membrane in human endothelial cells. The CUL3/ANKFY1 complex might be an attractive protein complex to develop novel anti-angiogenic drugs.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：血管新生 CUL3 細胞内膜輸送 Integrin 1

### 1. 研究開始当初の背景

生物の正常な発生と生存のためには、各組織に栄養と酸素を運搬し、老廃物を運び出す新しい血管の構築 (血管新生) が必須である。生理学的には炎症や創傷時の組織修復、胎盤形成時等に血管新生が起こる。更に、血管新生の異常は腫瘍形成・増殖、糖尿病性網膜症等の多岐に渡る病態に関与する。血管新生阻害剤は抗癌剤として臨床応用されており、血管新生を標的とした医薬品開発が進んでいる。我々は既に、血管新生時の血管内皮細胞の遺伝子発現解析を通して、血管新生を制御する新規分子としてユビキチン E3 リガーゼの足場タンパク質である Cullin-3 (CUL3) を同定しているが (Ohnuki *et al.*, *Blood* 2012)、その分子機構は複雑で、その詳細は未解明な点が多く残されていた。

### 2. 研究の目的

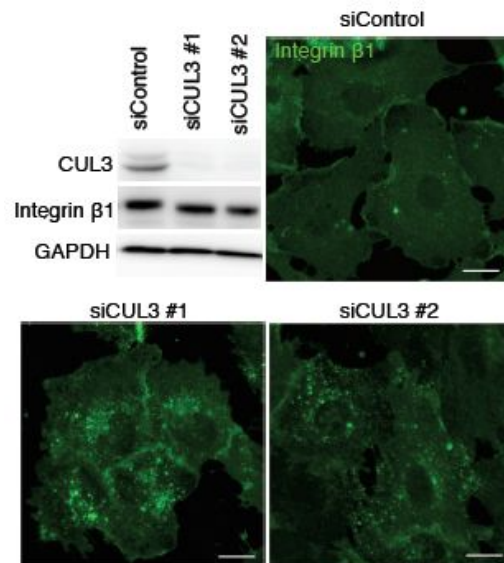
本研究では、血管新生に必要な膜タンパク質の細胞内輸送を解析し、CUL3 依存的な細胞内膜輸送が制御する血管新生の新規分子基盤を解明する事を目的とした。将来的には、CUL3 と細胞内膜輸送を軸とした抗血管新生医薬品開発の標的となる新しい分子基盤として導出する。

### 3. 研究の方法

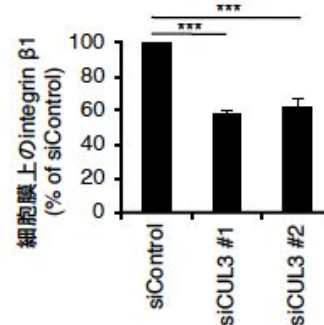
ヒト臍帯血静脈血管内皮細胞 HUVEC を用いて、実験を実施した。まず、siRNA をトランスフェクションする事により、CUL3 を発現抑制し、血管新生に必要な膜タンパク質である integrin  $\beta 1$  の細胞内局在及び、細胞内輸送を解析した。Integrin  $\beta 1$  の細胞内膜輸送は蛍光標識した integrin  $\beta 1$  抗体を用いて、integrin  $\beta 1$  をラベルし、最終的に細胞膜上の integrin  $\beta 1$  の蛍光を蛍光団に対する抗体を用いてクエンチする事で解析した。CUL3 はアダプター分子 family である BTB domain containing protein (BTBP; ヒトでは 183 遺伝子) と複合体を形成し、基質タンパク質をユビキチン化する。そこで次に、CUL3 と共に integrin  $\beta 1$  の細胞内輸送を制御する CUL3 アダプター分子 BTBP の同定を BTBP siRNA ライブラリーを用いて探索した。更に、CUL3 及び、当該 BTBP 下の発現抑制における基底膜への接着及び、血管新生 (tube formation) を解析した。最後に、CUL3 の当該 BTBP の細胞内局在制御機構を免疫組織染色法で検証した。

### 4. 研究成果

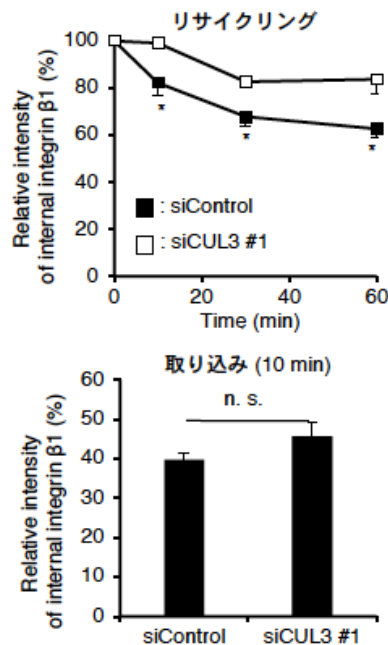
HUVEC において、CUL3 を発現抑制した結果、血管新生に必要な接着分子 integrin  $\beta 1$  の細胞全体の発現量は変わらないものの、細胞内小胞に局在変化した (図 1)。また、細胞膜上の integrin  $\beta 1$  の量が CUL3 の発現抑制により、約 40% 減少した (図 2)。細胞内に局在変化した integrin  $\beta 1$  の局在解析をした結果、初期エンドソームマーカー Rab5、リサ



【図 1】 CUL3 を血管内皮細胞 HUVEC で発現抑制すると、integrin  $\beta 1$  の細胞全体の量は変わらないものの、細胞内に局在変化する (Bar; 20  $\mu$ m)。



【図 2】 CUL3 を HUVEC で発現抑制すると、integrin  $\beta 1$  の細胞膜上の存在量が減少する (\*\*\*P < 0.001)



【図 3】 CUL3 を HUVEC で発現抑制すると、integrin  $\beta 1$  の細胞膜から細胞内への取り込みは影響されないが、細胞内から細胞膜へのリサイクリングが遅延する。 (\*P < 0.05; n.s., not significant)

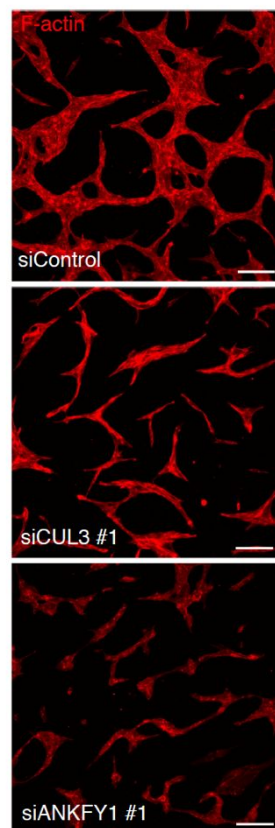
イクリングエンドソームマーカーRab11 と良く共局在し、後期エンドソームマーカーRab7、ライソゾームマーカーLAMP1 とは共局在しなかった。これらの結果から、CUL3 が integrin 1 のリサイクリングを制御している可能性が示唆されたので、integrin 1 のリサイクリングアッセイを実施した結果、細胞膜から細胞内への integrin 1 の取り込みには CUL3 を発現抑制しても影響は出ないものの、integrin 1 の細胞内から細胞膜へのリサイクリングがコントロール細胞に比べ、遅延している結果を得た (図 3)。以上の結果から、CUL3 が血管内皮細胞において、細胞内から細胞膜への integrin 1 のリサイクリングを正に制御している事が明らかにされた。

細胞膜上の integrin 1 の量は細胞外マトリックスとの結合に極めて重要である。CUL3 を発現抑制すると、collagen IV への接着が減少し、他の主要な細胞外マトリックスへの結合には影響は出なかった。Collagen IV は基底膜の主成分なので、基底膜への接着を調べた所、CUL3 を発現抑制すると、血管内皮細胞は基底膜に接着後、正常に spreading する事ができず、細胞は丸いままで、細胞の面積もコントロール細胞に比べ、激減した。以上の結果から、CUL3 の発現抑制により、integrin 1 の細胞内から細胞膜へのリサイクリングが障害され、細胞膜上の integrin 1 の存在量が減少し、基底膜への接着が異常になる事で、血管新生が障害される事が示された。

また、collagen IV に結合する integrin の鎖と鎖として、2/1 が知られている。そこで、integrin 2 の細胞内局在を調べた所、CUL3 の発現抑制により、integrin 2 も細胞全体の発現量は変わらず、細胞内に局在変化し、一部は integrin 1 と共局在した。以上の結果から、CUL3 は integrin 2/1 のリサイクリングを制御して、collagen IV を含む基底膜への接着を制御している事が明らかになった。

integrin 1 のリサイクリングを介して、血管新生を制御する BTBP を、siRNA ライブラリーを用いて結果、ANKFY1, BTBD7, CCIN, KCTD2, KLHL18, KLHL34, ZBTB6 の7つの BTBD 遺伝子の同定に成功した。このうち、初期エンドソーム局在型 BTBP である ANKFY1 (別名: Rabankyrin-5) に着目して更に解析を進めた。其の結果、ANKFY1 を発現抑制すると、CUL3 の発現抑制時と全く同様に、integrin 1 の細胞全体の発現量は変わらないものの、細胞内に局在変化し、細胞膜上の integrin 1 の量が激減し、基底膜への接着と、その後の cell spreading が抑制された。更に、血管新生も CUL3 の発現抑制時と同様に障害された (図 4)。

ANKFY1-HA と FLAG-CUL3 と Myc-Nedd8 を 293T 細胞に過剰発現し、HA 抗体で免疫沈降した結果、Nedd8 の過剰発現時においてのみ、ANKFY1 と CUL3 が結合する事が見出された。



【図 4】 CUL3 または、ANKFY1 を HUVEC で発現抑制すると、血管新生 (tube formation assay) が障害される (Bar; 200  $\mu$ m)。

更に、CUL3 を発現抑制すると、ANKFY1 のエンドソーム局在が消失し、この現象は CUL3 の野生型の過剰発現では回復するが、Nedd8 修飾を受けない CUL3 の過剰発現では、回復しなかった。以上の結果から、CUL3 及び、その Nedd8 修飾が ANKFY1 の初期エンドソーム局在と、integrin 1 のリサイクリングに必須である事が示された。以上の成果を Biology Open 誌に発表した。

今後は、CUL3/ANKFY1 依存的にユビキチン化を受け、血管新生に必須な基質タンパク質の同定が重要である。現在、候補分子を複数同定しているので、その詳細な解析を進めていく計画である。特に、ANKFY1 は初期エンドソームに豊富に局在するリン脂質 phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) と結合するドメインを有するので、初期エンドソーム上での PI3P 代謝と CUL3/ANKFY1 依存的にユビキチン化される基質タンパク質のユビキチン化レベルに何らかの相関がある可能性がある。脂質代謝とタンパク質代謝の双方を橋渡ししつつ、当該分子基盤を VEGF 以外を標的とした新規な血管新生障害剤の開発標的として導出していきたい。

##### 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 4 件)

中山寛尚、坂上倫久、前川大志、藤崎亜耶子、東山繁樹、Cullin-3 regulates ADAMs-mediated ectodomain shedding of amphiregulin. Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有、499、17-23、2018年、10.1016/j.bbrc.2018.03.097.

Igor Kovacevic、坂上倫久、Jisca Majolee、Manon Pronk、前川大志、Dirk Geerts、Mar Fernandez-Borja、東山繁樹、Peter Hordijk、The Cullin3-Rbx1-KCTD10 complex controls endothelial barrier function via K63 ubiquitination of RhoB. Journal of Cell Biology. 査読有、217、1015-1032、2018年、10.1083/jcb.201606055.

前川大志、谷川和史、坂上倫久、日吉裕美、久保田英嗣、城卓志、渡部祐司、田口友彦、東山繁樹、Cullin-3 and its adaptor protein ANKFY1 determine the surface level of integrin 1 in endothelial cells. Biology Open. 査読有、6、1707-1719、2017年、10.1242/bio.029579

坂上倫久、前川大志、中山寛尚、東山繁樹、Prospect of divergent roles for the CUL3 system in vascular endothelial cell function and angiogenesis. Journal of Biochemistry. 査読有、162、237-245、2017年、10.1093/jb/mvx051

〔学会発表〕(計2件)

前川大志、低濃度 staurosporine 処理によるスフィンゴミエリンの生合成亢進を介したホスファチジルセリンの細胞膜局在制御、第58回日本生化学会中国・四国支部例会、2017年

前川大志、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

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：細胞内輸送を介した膜蛋白質の分解又はリサイクリングの制御剤

発明者：東山繁樹、前川大志、坂上倫久、城卓志、久保田英嗣

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-244776

出願年月日：2017年12月21日

国内外の別：国内

名称：血管新生制御剤及びその利用法

発明者：東山繁樹、前川大志、坂上倫久、城

卓志、久保田英嗣

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-193118

出願年月日：2017年10月2日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/bioc/hem2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 大志 (MAEKAWA, Masashi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教

研究者番号：10771917

(2) 研究分担者 なし。

(3) 連携研究者 なし。

(4) 研究協力者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA, Shigeki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60202272

坂上 倫久 (SAKAUE, Tomohisa)

愛媛大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号：20709266

田口 友彦 (TAGUCHI, Tomohiko)

東北大学大学院・生命科学研究科・教授

研究者番号：10300881