

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15244

研究課題名(和文) エンドソーム局在型ユビキチンE3リガーゼによる血管新生制御の分子機構

研究課題名(英文) Angiogenesis regulated by an endosomal ubiquitin E3 complex

研究代表者

前川 大志 (Masashi, Maekawa)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号：10771917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞は血管新生を介して、増殖能と転移能を獲得する。実際に、血管新生阻害剤は抗癌剤として臨床応用されている。即ち、血管新生の新規分子基盤解析は血管内皮細胞の性状変化の分子機構に新知見を与えるだけでなく、新規抗血管新生医薬品の開発標的の導出にも繋がる。本研究では、研究代表者が独自に見出してきた血管新生に必須な初期エンドソーム局在型ユビキチンE3リガーゼCUL3/ANKFY1複合体の分子基盤の解明を試みた。その結果、CUL3/ANKFY1依存的にユビキチン化を受け、血管新生に必須な膜タンパク質 integrin β 1の細胞膜局在を規定する分子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の血管新生阻害剤は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)または、VEGF受容体を標的としており、今後の有効な癌治療のためには血管新生阻害剤のレパートリーを拡充する必要がある。本研究で見出したANKFY1とANKFY1結合タンパク質との相互作用は血管新生に必須であるので、当該相互作用に対する阻害剤は新しい血管新生阻害剤のシーズになる得る。モダリティとしては、低分子化合物だけでなく、核酸アプタマーや環状ペプチドが想定される。また、ANKFY1は細胞や組織によって、異なる結合タンパク質と相互作用し、細胞、組織毎に異なる機能的膜タンパク質を輸送している可能性があり、今後の詳細な機能解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：The formation of new blood vessels, angiogenesis, is essential for a variety of patho-physiological events. Especially, tumor formation and metastasis require angiogenesis. To date, clinically, anti-angiogenic inhibitors exhibit good efficacy in cancer treatments. Here, we aimed to elucidate the molecular mechanisms by which an endosomal ubiquitin E3 complex, CUL3/ANKFY1, regulates angiogenesis in human endothelial cells. We identified an ANKFY1-interacting protein which is essential for both plasmalemmal localization of integrin beta 1 and angiogenesis. We also established the high through-put screen to identify inhibitors of ANKFY1/ANKFY1-interacting protein using AlphaScreen. Our results suggest the possibility of the protein interaction as a promising target for the development of new anti-angiogenic inhibitors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：血管新生 細胞内膜輸送 Integrin β 1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管新生は生理学的には組織修復や胎盤形成時等に生じ、その異常は腫瘍形成・増殖、動脈硬化、糖尿病性網膜症等の多くの病態に関与する。研究代表者らは血管新生制御分子としてユビキチンE3リガーゼ複合体足場タンパク質 Cullin-3 (CUL3)を同定している。CUL3はアダプター分子であるBTBタンパク質 (BTBP)を介して、基質タンパク質と複合体を形成し、基質タンパク質をユビキチン化 (Ub化)する。Ub化された基質タンパク質は分解や局在変化等の新規機能が付加される。ヒトには183種類のBTBPが存在し、各BTBPがUb化を促す基質タンパク質も複数あるとされ、多様なCUL3/BTBP/基質タンパク質の軸により、生理機能が発揮される。研究代表者は、CUL3による血管新生制御を解析する中で、CUL3が血管新生に必須な接着分子 integrin $\beta 1$ の細胞内から細胞膜へのリサイクル経路で機能する事で血管新生を制御する事を解明した。CUL3をヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)において発現抑制すると integrin $\beta 1$ の発現量は変わらないものの、細胞内に著しく蓄積し、細胞膜表面上の integrin $\beta 1$ が激減した。同様の表現型を示すBTBPを siRNA libraryを用いてスクリーニングした結果、初期エンドソーム局在型BTBPであるANKFY1を同定した。ANKFY1の発現抑制により、CUL3と同様に integrin $\beta 1$ が細胞内に蓄積し、血管新生が阻害された。しかしながら、ANKFY1依存的にUb化され、integrin $\beta 1$ のリサイクル及び、血管新生を制御する基質タンパク質は未同定のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、血管新生制御機構の詳細な分子機構を探り、抗血管新生医薬品の開発標的の導出を志向して、CUL3/ANKFY1依存的にUb化を受ける血管新生に機能的な基質タンパク質を同定する事を目的とした。また、血管新生を正に制御する CUL3/ANKFY1/基質タンパク質複合体を新規抗血管新生医薬品の開発標的として、ANKFY1/基質タンパク質の結合阻害剤の探索を試みた。併せて、ANKFY1のHUVECにおける機能特異性を評価するために、ANKFY1の癌細胞や他の血管内皮細胞における機能解析も実施した。既存の血管新生阻害剤は全て血管内皮細胞増殖因子であるvascular endothelial growth factor (VEGF)を標的としており、本研究を通してVEGF以外を標的とする新しい血管新生阻害剤の開発が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 血管新生に必須なCUL3/ANKFY1依存的にUb化を受ける基質タンパク質の同定と性状解析
CUL3/BTBP複合体による標的基質タンパク質とのUb化において、標的基質タンパク質はBTBPと直接結合する必要がある。そこで、ANKFY1と直接結合するタンパク質を探索するために愛媛大学プロテオサイエンスセンターが整備しているヒトタンパク質アレイ (human protein array)とアルファスクリーンとを組み合わせて、スクリーニングを実施した (図1A)。ビオチン化ANKFY1、FLAGタグ付き human protein array とともにコムギ無細胞タンパク質合成系により合成、発現確認を行った。尚、今回は、膜輸送関連分子に絞ってANKFY1結合タンパク質の探索を実施した。結合陽性となったANKFY1結合タンパク質に関しては、HUVECにおける性状解析をウェスタンブロット、免疫細胞染色、発現抑制、過剰発現実験により検証した。ANKFY1結合タンパク質のCUL3/ANKFY1依存的なUb化を細胞レベルでのUb化アッセイで検証し、Ub化を受けるリジンをアルギニンに置換したKR変異体を発現させ、そのUb化の意義の解明を行った。

(2) ANKFY1/基質タンパク質の結合阻害剤の探索

ANKFY1/基質タンパク質の相互作用は、血管新生を正に制御する。従って、当該相互作用の結合阻害剤は、新しい血管新生阻害剤のシーズとなり得る。そこで、ANKFY1/基質タンパク質の結合を検出するアルファスクリーンの系の構築を行った。安定的でハイスループット性の高いスクリーニング系を構築後は、当該系に対して、コア化合物ライブラリー1000化合物を供して、ANKFY1/基質タンパク質の結合阻害剤の探索を実施した。また、ANKFY1/基質タンパク質の相互作用に対する特異性を検証するために、他のタンパク質結合に対する影響を同様のアルファスクリーンの系を利用して確認した。具体的には、CUL3/SPOP、CUL3/KCTD10の結合検出系を用いた。ビオチン化ANKFY1、ビオチン化CUL3、SPOP-FLAG、KCTD10-FLAG、FLAGタグ付き基質タンパク質は全てコムギ無細胞タンパク質合成系を用いて合成し、ウェスタンブロットにより、発現確認を行った。アルファスクリーンによる結合陽性の判定は、negative control (植物DHFRタンパク質)とのアルファスクリーニングシグナルの10倍以上と定義した。

(3) 癌細胞や他の血管内皮細胞におけるANKFY1の機能解析

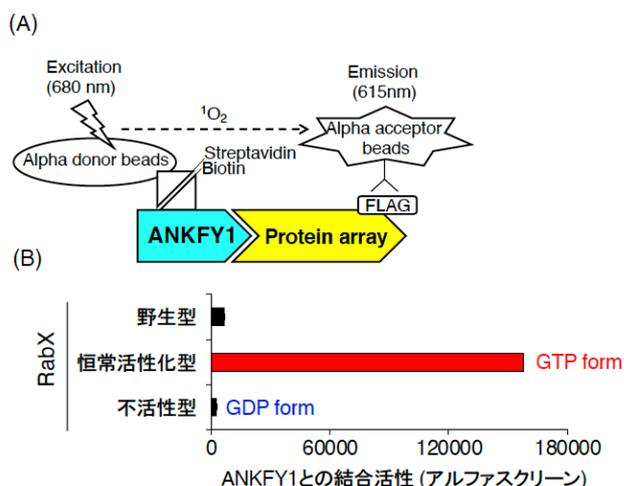
ANKFY1のHUVECにおける integrin $\beta 1$ 輸送の細胞特異性を検証するために、他の癌細胞やヒト

網膜毛細血管内皮細胞 (HRMEC)において、ANKFY1 を発現抑制し、主要膜タンパク質の局在や細胞増殖能等を検証した。癌細胞に関しては、複数の胃癌細胞株を使用し、名古屋市立大学 消化器・代謝内科学教室との共同研究として、実験を実施した。また、HRMEC に関しては、岐阜薬科大学 薬効解析学教室との共同研究として、VEGF 受容体やその下流のシグナルに関して解析を実施した。

4. 研究成果

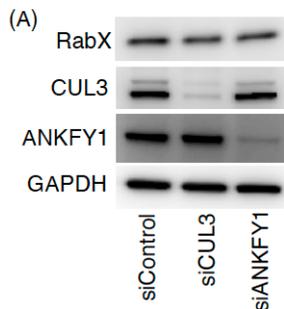
(1) 血管新生に必須な CUL3/ANKFY1 依存的に Ub 化を受ける基質タンパク質の同定と性状解析

コムギ無細胞タンパク質で合成、整備された human protein array の中から ANKFY1 結合タンパク質を探索した結果、細胞内膜輸送関連タンパク質である RabX を同定した。興味深い事に、恒常活性化型 (GTP form) の RabX が ANKFY1 と極めて高い結合活性を示した (図 1B)。活性化した RabX が CUL3/ANKFY1 複合体により Ub 化を受け、制御されている可能性が示唆された。一般に、Ub 化を受けた基質タンパク質は分解もしくは、新規機能不可を受ける。HUVEC において、CUL3 または、ANKFY1 を発現抑制した結果、RabX のタンパク質発現に顕著な変化は見られなかった (図 2A)。一方で、CUL3 または、ANKFY1 を発現抑制した HUVEC では、RabX 陽性のエンドソームが肥大化している事が分かった (図 2B)。

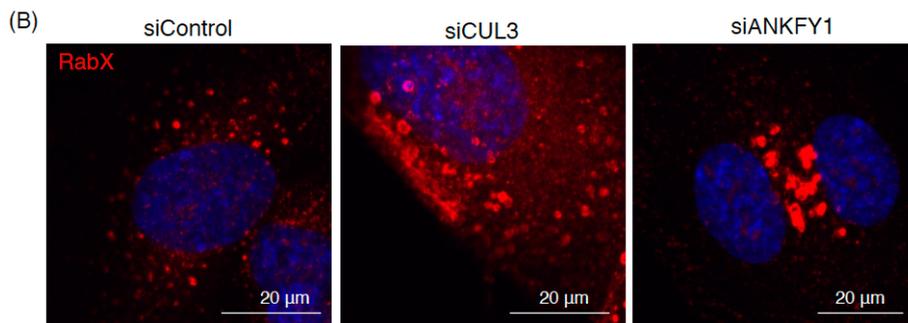


【図1】(A) アルファスクリーンを用いたANKFY1結合タンパク質探索の模式図。(B) ANKFY1結合タンパク質として見出された膜輸送関連分子RabXとANKFY1とのアルファスクリーンの結果 (n=3)。

また、この肥大化したエンドソームに integrin $\beta 1$ が強く蓄積している事も細胞染色の結果から示された。以上の結果から、CUL3/ANKFY1 依存的な RabX の Ub 化は RabX 自身のタンパク質分解に寄与する事はなく、活性化した GTP form の RabX の機能を変化させ、integrin $\beta 1$ の細胞膜への輸送を促進する方向に働く事が強く示唆された。本データを中心に、現在、論文投稿準備中である。



【図2】(A) ANKFY1結合タンパク質RabXのタンパク質量は、CUL3または、ANKFY1を発現抑制しても変化しない(細胞: HUVEC)。(B) CUL3または、ANKFY1をHUVECにおいて発現抑制すると、ANKFY1結合タンパク質RabX陽性のendosomeが肥大化する。



(2) ANKFY1/基質タンパク質の結合阻害剤の探索

コムギ無細胞タンパク質合成系で合成した ANKFY1 と RabX の結合をハイスループットに検出するアルファスクリーンの系の構築に成功した (図 1B)。当該系に対して、コア化合物ライブラリー (1000化合物) を供し、ANKFY1 と RabX との結合シグナルを低下させる化合物の探索を行った。1次スクリーニングでは、約 100 種類のヒット化合物を見出したが、特異性を評価するために実施したカウンターアッセイ (CUL3/SPOP, CUL3/KCTD10 の結合を阻害する化合物探索) の結果、残念ながら、1次スクリーニングでヒットした化合物の中には、ANKFY1 と RabX との結合を特異的に阻害する化合物は存在しなかった。今後、別の化合物ライブラリーを用いて、再度スクリーニングを行う計画である。また、低分子化合物だけでなく、核酸アプタマーや環状ペプチド等の他のモダリティの中から、ANKFY1 制御剤を開発していく必要がある。

(3) 癌細胞や他の血管内皮細胞における ANKFY1 の機能解析

岐阜薬科大学 薬効解析学教室との共同研究として、HRMEC において ANKFY1 を発現抑制した結果、integrin $\beta 1$ の発現量及び、細胞内局在には影響は見られなかった一方で、VEGFR2 がタンパク質レベルで発現減少している事を見出した。さらに、ANKFY1 発現抑制によって、VEGFR2 の下流のシグナル伝達分子のリン酸化の著しい減少と、HRMEC の増殖阻害を確認した (Tanaka *et al.*, BBRC, 2020)。胃癌細胞株での解析結果 (現在、論文投稿準備中) を含め、ANKFY1 が種々の血管内皮細胞や癌細胞で異なる膜タンパク質の輸送を担っている事が分かった。今後、細胞や組織毎に ANKFY1 の機能の更なる解明が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanigawa K, Maekawa M, Kiyoi T, Nakayama J, Kitazawa R, Kitazawa S, Semba K, Taguchi T, Akita S, Yoshida M, Ishimaru K, Watanabe Y, Higashiyama S.	4. 巻 234
2. 論文標題 SNX9 determines the surface levels of integrin 1 in vascular endothelial cells: Implication in poor prognosis of human colorectal cancers overexpressing SNX9.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 17280-17294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.28346.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka M, Nakamura S, Maekawa M, Higashiyama S, Hara H	4. 巻 533
2. 論文標題 ANKFY1 is essential for retinal endothelial cell proliferation and migration via VEGFR2/Akt/eNOS pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1406-1412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.10.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前川大志, 谷川和史, 坂上倫久, 渡部祐司, 田口友彦, 東山繁樹
2. 発表標題 血管新生を制御するCUL3ユビキチンE3複合体依存的な細胞内膜輸送
3. 学会等名 第59回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	東山 繁樹 (Higashiyama Shigeki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	谷田 諭史 (Tanida Satoshi)		
研究協力者	原 英彰 (Hara Hideaki)		
研究協力者	中村 信介 (Nakamura Shinsuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関