

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03494

研究課題名(和文) がん進展に関わるVasohibin-2の構造と機能に関する研究

研究課題名(英文) Study for the structure and function of vasohibin-2 on cancer progression

研究代表者

佐藤 靖史 (Sato, Yasufumi)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授

研究者番号：50178779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：Vasohibinの機能を理解する上で、VASH1とVASH2ではN末端のアミノ酸構成は異なっているため、それぞれのN末端領域を入れ替えたキメラ変異体(VASH2ChNとVASH1ChN)を構築し、アデノウイルスベクターに組み込んで、細胞レベルで解析したが、N末端領域のVASH作用への影響は確認できなかった。VASH1とVASH2はいずれも中央にtubulin carboxypeptidase(TCP)活性部位を有している。細胞にVASHを高発現させると、細胞分裂に際して紡錘体 チュープリンの脱チロシン化が増強し、結果として染色体分配異常を生じることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者が発見したVASH1とVASH2は、血管新生に対して抑制と促進の相反する作用を有している。VASH1とVASH2ではN末端のアミノ酸構成は異なっているため、それがこの相反する作用に関連している可能性を考慮して解析したが、それを示唆する成績は得られなかった。一方、VASH1とVASH2はいずれもTCP活性を有しており、血管内皮細胞に発現するVASH1とがん細胞に発現するVASH2について、それぞれ細胞分裂に際して紡錘体 チュープリンの脱チロシン化が増強し、結果として染色体分配異常を生じることが明らかとなり、がん細胞や腫瘍血管内皮細胞といった発現する細胞の違いとの関係が示された。

研究成果の概要(英文)：The amino acid composition of the N-terminal is different between VASH1 and VASH2. Therefore, we constructed chimeric mutants (VASH2ChN and VASH1ChN) in which each N-terminal region was exchanged, incorporated them into an adenovirus vector, and analyzed them at the cellular level. But we could not find any difference in the effect of the N-terminal region on VASH action in terms of cell migration.

Both VASH1 and VASH2 have tubulin carboxypeptidase (TCP) activity. We therefore examined its significance. When VASH was highly expressed in cells, VASH enhanced the detyrosination of spindle-tubulin during cell division, resulting in abnormal chromosome distribution.

研究分野：実験病理学、血管生物学

キーワード：Vasohibin-1 Vasohibin-2 脱チロシン化チューブリン 染色体分配異常

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、血管新生刺激に反応して血管内皮細胞が産生する血管新生抑制因子 Vasohibin-1 (VASH1)と、そのホモログで、VASH1とは相反して血管新生を促進する Vasohibin-2 (VASH2)を単離・同定し、特にがんにおけるそれらの機能に関する研究を展開している。分子系統的解析より、Vasohibin (VASH)は種を超えて良く保存されており、血管の無い下等生物は単一の VASH 祖先遺伝子を持つが、進化の過程で血管を有する脊椎動物から VASH1、VASH2 に別れたことが判明した。すなわち、VASH はもともと血管とは無関係の分子として生体に付与されたが、脊椎動物から血管系にも使われるようになったと考えられる。遺伝子配列上 VASH2の方が VASH 祖先遺伝子により近く、VASH1が血管内皮細胞に発現するのに対し、VASH2は、精巣を除く正常組織では殆ど発現しないが、細胞のがん化に伴って発現上昇し、その高発現はあらゆるがんで確認される。また VASH2は、腫瘍血管新生を促進するばかりか、がん随伴線維芽細胞を活性化し、がん細胞自身の浸潤・転移を促進するなど多彩な作用によってがんの進展を促進しており、その阻害により顕著な抗腫瘍効果が得られることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

VASH2は、がんの治療標的として有望であるが、その作用機序の詳細は未だ不明であり、これを理解することは、開発研究を進める上で必要不可欠である。研究代表者は、VASHの分子構造、分泌様式、結合性膜蛋白について独自の研究を進めてきた。また最近、VASHの tyrosine carboxypeptidase (TCP)としての特性が明らかにされ、世界的に注目されている。このような背景のもと、本研究はこれまでの知見を基に、さまざまな変異体や結合性膜蛋白の解析を行い、以下の4点を解明することを目的とする。

- (1) VASH2の腫瘍進展作用のうち細胞外分泌はどの程度を占めているか？
- (2) 細胞外の作用発現のために、VASH-受容体システムは存在するか？
- (3) VASH2の腫瘍進展作用のうちTCPとしての酵素活性はどの程度重要か？
- (4) VASH1とVASH2の血管新生に対する相反する作用はどの構造に由来するか？

## 3. 研究の方法

(1) 構造解析から VASH は、PX ドメイン、TGL ドメイン、X ドメイン、N 末端と C 末側の disorder 領域、C 末端の tail motif からなる。また、VASH は分泌のためのシグナル配列を持たないが、SVBP (small vasohibin binding protein) と結合することによって安定化して細胞外に分泌され、VASH2<sub>R85A</sub> の変異体では分泌が顕著に低下することが確認された (manuscript in preparation)。そこで、分泌不全型 VASH2<sub>R85A</sub> について野生型 VASH2 と作用を比較する。

(2) これまでに実施して来た VASH 結合性蛋白に関するプロテオーム研究から、VASH の細胞膜受容体候補として、Glypican, Syndecan, Neurexin の3種類の蛋白を絞り込んでいる。Glypican と Syndecan は heparan sulfate proteoglycan であり、いずれも造腫瘍性やがんの悪性度との相関性が指摘されている。一方 Neurexin は、神経シナプシスに局在する細胞接着分子であるが、最近、血管内皮細胞での発現や血管新生との関連性が指摘されている。そこで、がん細胞における Glypican あるいは Syndecan の発現、あるいは血管内皮細胞における Neurexin の発現が VASH2 の作用発現に必要なか否か

を解析する。

(3) VASH の TGL (transglutaminase-like) ドメインに tyrosine carboxypeptidase (TCP) 活性が証明された。そこで TCP 活性の低下が最も著しいことを確認した VASH2<sub>S210A</sub> について野生型 VASH2 と作用を比較する。

(4) VASH1 と VASH2 の N 末側の disorder 領域は相同性が低く、特性も異なっており、このことは、この disorder 領域に VASH1 と VASH2 の相反する作用の謎が隠されていることが示唆される。そこで、VASH2 の N 末側 disorder 領域を VASH1 のそれと置き換えた VASH2-N1、VASH2 の C 末側の disorder 領域を VASH1 のそれと置き換えた VASH2-C1、VASH2 の N 末側と C 末側の両方の disorder 領域を VASH1 のそれと置き換えた VASH2-NC1 を作成し、それらの作用を野生型 VASH2 と比較解析する。

#### 4. 研究成果

VASH2細胞外分泌メカニズムを解析するために、NanoLucルシフェラーゼを繋げた融合タンパクを発現するベクターを構築し、細胞外分泌能をルシフェラーゼ活性を指標にモニタリングかつ定量化可能な新たな測定系を確立した。この測定系を用いて解析したところ、VASH2<sub>R85A</sub>は細胞内での安定性が低下し、その結果として分泌も低下することが判明し、分泌不全型として解析することには適さないことと判断された。

次に、TCP活性と分泌との関連性を評価した。158番目のシステインをアラニンに変換し チュープリンの脱チロシン化活性を欠損したVASH2変異体 (C158A) は、野生型 VASH2と同様に培養上清中に強いルシフェラーゼ活性が検出されることから、脱チロシン化活性はVASH2の細胞外分泌には影響しないことを確認した。

VASH2はVASH1と高いアミノ酸相同性を有るが、N末端に存在するDisorder領域のアミノ酸構成は大きく異なっており、互いの生理機能に違いをもたらす領域と想定される。そこで、N末端領域の機能を解析するためのツールとして、それぞれのDisorder領域であるVASH1(1-56)とVASH2(1-45)を入れ替えたキメラ変異体(VASH2ChNとVASH1ChN)をデザインし、その発現ベクターを構築し、それぞれをアデノウイルスベクターに組み込んで、細胞レベルで解析したが、VASH2とキメラ変異体とでがん細胞の遊走に対する効果に差を認めることはできず、N末端に存在するDisorder領域がvasohibinの作用に影響するとの仮説を支持する結果は得られなかった。

TCP活性によるチュープリンの脱チロシン化の細胞機能に与える影響について解析した。その結果、アデノウイルスベクターを用いてがん細胞にVASH2を高発現させると、細胞分裂に際して紡錘体 チュープリンの脱チロシン化が増強し、同時に染色体分配異常が高率に生じることをライブイメージングで観察した。このことはVASH2の高発現が、がん細胞での染色体不安定性に関与することが示唆された。

なお、Vasohibin 受容体については、分泌不全型 Vasohibin の作成が困難であったため解析に進むことはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	鈴木 康弘  (Suzuki Yasuhiro)  (60332277)	東北大学・未来科学技術共同研究センター・助教    (11301)	

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