

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291023

研究課題名(和文) 癌抑制因子VHLの新規機能の解明

研究課題名(英文) Functiona analysis of tumor suppressor gene product pVHL

研究代表者

嘉村 巧 (Kamura, Takumi)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40333455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：VHL病の原因遺伝子であるpVHLは、HIF-alphaの分解を促進する。pVHLの新規基質を探索した結果、転写因子B-Mybを同定した。B-MybはVEGF受容体やPDGF受容体依存的にリン酸化されるとpVHLに認識されにくくなり、安定化することを明らかにした。また、ヌードマウスへの移植実験により、B-Mybが腫瘍形成能を有することを示した。さらにマイクロアレイ解析によりB-Mybは、HIF-alpha非依存性の経路を制御していることが示された。これらの結果はB-MybがHIF-alpha経路とは別の経路を制御することでVHL病の発症や進行を抑制していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：pVHL is a ubiquitin ligase that targets hypoxia-inducible factor-alpha (HIF-alpha) for proteasomal degradation. Although HIF-alpha activation is necessary for VHL disease pathogenesis, constitutive activation of HIF-alpha alone did not induce renal clear cell carcinomas and pheochromocytomas in mice, suggesting the involvement of HIF-alpha-independent pathway in VHL pathogenesis. Here, we show that the transcription factor B-Myb is a pVHL substrate that is degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. Mice injected with B-Myb knockdown 786-O cells developed dramatically larger tumors than those bearing control cell tumors. Microarray screening of B-Myb-regulated genes showed that the expression of HIF-alpha-dependent genes was not affected by B-Myb knockdown, indicating that B-Myb prevents HIF-alpha-dependent tumorigenesis through a HIF-alpha-independent pathway. These data indicate that the regulation of B-Myb by pVHL plays a critical role in VHL disease.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

von Hippel-Lindau (VHL) 病は、常染色体優性の遺伝形式をとる比較的稀な家族性腫瘍症候群(発生頻度 1/36,000)で、腎細胞癌、褐色細胞腫、網膜血管腫、中枢神経系の血管芽腫、腎・脾などの嚢胞性病変を発症する。1993年、ポジショナルクローニング法により、この疾患の原因遺伝子として VHL 癌抑制遺伝子が同定された。申請者である嘉村を含む複数のグループにより VHL が Cul2 型 E3 複合体の基質認識サブユニットとして機能し低酸素誘導性転写因子 HIF- α の分解に関与していることが明らかにされ、VHL 病の発症メカニズムが急速に解明されてきている。すなわち、通常酸素濃度では HIF- α は水酸化を受け、VHL により認識され、ポリユビキチン修飾を受ける。ポリユビキチン修飾を受けた HIF- α はプロテアソームにより認識され分解される。一方、低酸素濃度では上記のようなプロテアソーム依存性分解は起きないため、HIF- α 依存性転写により血管新生などが起こる。VHL 遺伝子に変異が起こり、HIF- α を認識できなくなると通常酸素濃度でも HIF- α を分解できないため、恒常的な HIF- α の転写活性により下流遺伝子の発現制御機構が破綻し腫瘍が発生する。しかしながら VHL 病が多様な病態を示すことや、VHL 欠失細胞株を用いたマイクロアレイ解析でサイクリン D1 などの細胞周期関連因子の発現亢進がみられることなどより、VHL 病の発症を HIF- α の分解異常だけで説明することは困難であると思われた。そこで申請者らは免疫沈降および質量分析を用いて VHL と相互作用する未知分子を網羅的に解析し、候補分子として B-Myb を同定した(未発表データ)。B-Myb は細胞周期依存的に発現制御を受ける転写因子であり S 期に発現が最大となる(Joaquin M et al., Cell. Mol. Life Sci. 60, 2389, 2003)。B-Myb の活性化は、細胞周期の亢進を引き起こし、恒常的な活性化は細胞のガン化に寄与していると考えられている。Myb ファミリーは A-、B-、C-Myb の 3 種類で構成されるが、B-Myb のみが初期発生に重要であり、B-Myb 欠損マウスは胎生至死になる(Tanaka, J. Biol. Chem. 274, 28067, 1999)。また、B-Myb のみ Inner cell mass (ICM) に発現していることから Embryonic stem cell (ES 細胞)の維持に重要であることも示唆されている(Boheler, J. Cell. Physiol. 221: 10, 2009)。このように B-Myb は細胞周期の亢進や ES 細胞の維持、ガン化などに関連する分子であることが広く示唆されている。そこで B-Myb が VHL 病の発症・維持に関与していることが容易に想像され、その分子メカニズムを解明することは VHL の病因解明、さらには効果的な治療方法の確立に貢献できる可能性がある。

2. 研究の目的

(A) B-Myb がユビキチンリガーゼ VHL の基質分子であることを明らかにする。これまでの予備実験により過剰発現した VHL と B-Myb が結合することを明らかにしている(未発表データ)。さらには B-Myb の半減期が VHL の過剰発現により短くなることも明らかにしている。本研究においてはさらに内在性の VHL と B-Myb の結合を確認し、VHL のノックダウンにより内在性 B-Myb の半減期が延長することを示す。さらに精製した B-Myb のポリユビキチン修飾が VHL 複合体依存的に起こることを試験管内(in vitro)反応において明らかにする。

(B) VHL 依存的な B-Myb の分解が担う生理的役割の解明

腎癌由来細胞株 786-O は VHL 遺伝子が不活性化されておりその発現が認められないことが広く知られている。786-O 細胞株に VHL を導入することで VHL の役割を解析する手法は一般的に使われており、本申請課題でも同様の手法により VHL と B-Myb の関係を明らかにする。すなわち VHL の発現により内在性の B-Myb の発現が抑制されることを示す。さらに B-Myb ノックダウン細胞株を作製し、ガン化能を in vitro (ソフトアガーコロニーアッセイ)や in vivo (ヌードマウスを用いた腫瘍形成能の比較)において比較検討し、生理的環境下における B-Myb の役割を明らかにする。B-Myb は転写因子であるので VHL 病にどのように関わっているのかを推測するために、B-Myb ノックダウン 786-O 細胞株を用いてマイクロアレイを行い、影響を受ける遺伝子群を網羅的に解析する。

ユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解機構は、多くの生命現象に重要な役割を担っており、その破綻は様々な疾患発症と関与していることが明らかになってきている。中でも家族性腫瘍症候群 VHL 病はユビキチンリガーゼ VHL の不活性化によって発症することがよく知られている。申請者である嘉村は VHL が Cul2 型 E3 の構成因子として、HIF- α を認識しユビキチン依存的分解に導くということを報告している。本研究はこれらの知見を基に計画されており、非常に独創性が高いものである。本研究により VHL による B-Myb 分解の分子機構を明らかにできれば、B-Myb 依存的 VHL 病発症の解明につながる可能性がある。VHL 病の治療は、腫瘍を外科的に切除することが主に行われてきている。内科的治療として VEGF 受容体阻害剤(ranibizumab)が用いられるがあまり効果は得られていない。VHL 病発症における B-Myb の役割を明らかにすることができれば、有効な治療薬を開発できる可能性がある。

3. 研究の方法

(A) VHL と B-myb の結合の検討

われわれはすでに VHL と B-Myb を哺乳類培養細胞 293T に過剰発現させ、プロテアソーム阻害剤存在下で、免疫沈降法を行うことにより、両者が結合することを確認している。そこで引き続き内在性タンパク質レベルで VHL と B-Myb が結合するかどうかを検討する。

(B) VHL と B-Myb の結合部位およびその修飾の解析

基質が E3 ユビキチンリガーゼと結合する際にはリン酸化や水酸化などの修飾が認められるのが一般的である。免疫沈降法で VHL と結合する B-Myb を精製し、二次元電気泳動で分離する。B-Myb のスポットを切り出し in gel でトリプシン消化後、MALDI-TOF/MS でその修飾を同定する。野生型およびこの修飾部位に変異を持つ B-Myb の発現ベクターを作製し、哺乳類培養細胞での VHL との結合を調べることにより、結合部位を同定する。同様に VHL の欠失変異体を作製し、B-Myb との結合に必要な部位を明らかにする。

(C) 新規基質に対する試験管内ユビキチン化反応の検討

野生型あるいは(B)で同定した修飾部位を欠くあるいは変異を持つ B-Myb を大腸菌で発現させリコンビナントタンパク質を精製する。B-Myb は分子量 100kDa と大きいため、大腸菌では発現しない可能性がある。その場合は、バキュロウイルス発現系で B-Myb の発現精製を行う。VHL、ElonginB、ElonginC、Cul2 および Rbx 1 からなる CRL2VHL E3 複合体をバキュロウイルス発現系を用いて精製する。ユビキチン化反応に必要な酵素 E1 と E2 そしてユビキチンさらに ATP を加え B-Myb と E3 複合体を反応させることにより、試験管内で B-Myb へのユビキチン化反応を起こすことができるかどうかを検討する。野生型 B-Myb はユビキチン化されるのに対し、変異型 B-Myb はユビキチン化されないことが予想される。

(D) VHL による B-Myb の細胞内分解の検討(1)

3. の試験管内ユビキチン化反応により得られた情報を細胞内で確認する。野生型あるいは変異型の B-Myb と VHL を 293T 細胞に発現させ、B-Myb に対する抗体を用いて免疫沈降する。SDS-PAGE で展開した後、抗ユビキチン抗体でウェスタンブロットを行う。ユビキチン化された B-Myb は梯子状に(付加するユビキチンの数によって分子量が段階的に増加するため)認められる。野生型の B-Myb はユビキチン化されるのに対し、変異型の B-Myb はユビキチン化されないはずである。また、パルスチェイス法により B-Myb の半減期を測定する。変異型 B-Myb は VHL によってユビキチン修飾依存性に分解されないため、野生型 B-Myb に比べて半減期は延長することが期待される。

(E) VHL による B-Myb の細胞内分解の検討(2)

293T 細胞を用いた過剰発現実験系による VHL の B-Myb ユビキチン依存性分解に及ぼす影響が、実際に生理的なものであるかどうかの検証を行う。293T 細胞で VHL をロックダウンし内在性 B-MYb のユビキチン化の減少や、それに伴う安定性の亢進がみられるかを調べる。さらには VHL 欠損細胞株 786-0 に VHL を再導入し内在性の B-Myb が不安定化するかどうかを、そして B-Myb の不安定化がプロテアソーム阻害剤 MG132 により抑制されるかどうかを検討する。また、VHL の E3 としての機能に必要な VHL ボックス (Cul2 との結合ドメイン) を欠失した変異体の再導入ではそのような効果がないことを示す。

(F) 酸素濃度変化による B-Myb の安定性の検討

VHL は低酸素条件下で HIF をユビキチン修飾依存性分解に導く。B-Myb が VHL の新規基質である場合、HIF と同様に酸素濃度に影響を受けることが考えられる。そこで、低酸素条件下における VHL と B-Myb の結合を免疫沈降法を用いて検討する。さらには B-Myb の安定性をパルスチェイス法により調べる。

(G) B-Myb、VHL および HIF の結合の検討

B-Myb と HIF の両方が VHL と結合することからこれら因子の結合様式を明らかにする。具体的には、293T 細胞に B-Myb、VHL そして HIF を過剰発現し結合を調べる。VHL が B-Myb あるいは HIF と結合し、三量体を形成しない場合は VHL のどの領域がそれぞれの因子との結合に必要なのかを VHL 病由来の変異体を用いて詳細に検討する。三量体を形成する場合は B-Myb と HIF の直接結合があるかどうかを VHL が欠失している 786-0 細胞を用いて調べる。VHL 病患者では VHL タンパク質の変異あるいは欠損のために HIF が分解されず、結果として HIF が過剰に蓄積し VHL 病を発症する。したがって B-Myb と HIF が結合すれば B-Myb による HIF の活性制御という新規メカニズムを提唱できる。

(H) B-Myb 発現制御異常の腫瘍形成能に及ぼす影響の検討

786-0 細胞に VHL を導入した細胞株あるいは B-Myb、HIF をロックダウンした細胞株を作製し、足場非依存的増殖能を比較検討するためにソフトアガロース内で培養し、コロニー形成能を比較する。これらの細胞株をヌードマウスに皮下移植し、in vivo における腫瘍形成能を比較する。

(I) B-Myb あるいは HIF 依存的な下流遺伝子群を網羅的に解析

(H) に示す各種細胞株からメッセンジャー RNA を精製し、MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Kit (Ambion) を用いてビオチン標識を導入した aRNA を作製し、GeneChip Human Genome U133A 2.0 (Affymetrix) にハイブリ

ダイズし、マイクロアレイ解析をおこなう。B-Myb あるいは HIF 依存的な下流遺伝子群を網羅的に解析し、VHL 病の発症・病態にどのように関与しているのかを考察する。

4. 研究成果

pVHL の新規基質を探索した結果、転写因子 B-Myb を pVHL 結合タンパク質として同定した。B-Myb の安定性を検討するために、pVHL 欠損細胞株 786-0 を用いた。コントロール細胞株、あるいは pVHL を安定発現する細胞株を樹立し、B-Myb の安定性を比較した。興味深いことに、同じ細胞数を高密度 (4 cm ディッシュ、培地 4 ml) で培養した時は B-Myb は pVHL 依存的に分解されるが、低密度 (15 cm ディッシュ、培地 20 ml) で培養すると、pVHL 依存的な B-Myb の分解はみられなかった。また、ユビキチンリガーゼ活性に必要な VHL ボックスを欠損した pVHL 変異体を発現させても、B-Myb は分解しなかった。ユビキチン化に必要な酵素群を試験管内に混合し、B-Myb の pVHL 依存的なユビキチン化を検討したところ、すべての酵素が含まれるときにのみ B-Myb がポリユビキチン化を受けることを示した。

次に、なぜ培養条件の違いが B-Myb の安定性に影響を及ぼすのかを検討した。高密度培養条件下では、使用する培地の量が少なく、結果として含まれる成長因子 (growth factor) の量も少ないので、growth factor 依存的なチロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase) の関与を検討した。その結果、B-Myb は vascular endothelial growth factor (VEGF) 受容体や platelet-derived growth factor (PDGF) 受容体依存的にその 15 番目のチロシン残基がリン酸化されることが分かった。B-Myb はチロシンリン酸化を受けると pVHL に認識されにくくなり、安定化することが示唆された。

B-Myb は細胞周期依存的に発現が変動し、また、細胞周期を制御するタンパク質であることが報告されている。したがって、B-Myb のノックダウンによる細胞周期の変動を 786-0 細胞株を用いて検討したが、コントロール細胞と比較して有意な差は認められなかった。

次に、786-0 細胞株の腫瘍形成能を指標に B-Myb の生物学的な役割を検討した。786-0 細胞は HIF 経路が恒常的に活性化しているために、ヌードマウスの皮下に移植すると、移植部位で増殖し、肉眼で認められる程度の大きさの腫瘍を形成することが知られている。B-Myb をノックダウンした 786-0 細胞をヌードマウスの皮下に移植したところ、コントロール 786-0 細胞と比較して、数十倍の大きさの腫瘍を形成し、腫瘍形成能の著しい亢進が認められた。B-Myb は転写因子であるので、どのような遺伝子群の変動がそのような腫瘍形成能の亢進に寄与しているのかをマイクロアレイ解析により検討した。その結果、

特定のシグナル経路の変動は起こっておらず、また、HIF 経路で制御されている遺伝子群の有意な変動も認められなかったことから、B-Myb 欠損による腫瘍形成能亢進は HIF 経路非依存性の経路を介していることが示された。B-Myb が制御する遺伝子群の多くは機能未知であり、また多くの non-coding RNA の発現量も変動していることから、今後それらの遺伝子群の解析が進むことで、現在は未知であるが、ある特定の経路が同定されるかもしれない。これらの結果は B-Myb が HIF 経路とは別の経路を制御することで VHL 病の発症や進行を抑制していることを示唆している。

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. Okumura, F., Uematsu, K., Byrne, SD., Hirano, M., Joo-Okumura, A., Nishikimi, A., Shuin, T., Fukui, Y., Nakatsukasa, K., Kamura, T. Parallel regulation of VHL disease by pVHL-mediated degradation of B-Myb and HIF-1. *Mol. Cell. Biol.*, in press (2016) 査読有
2. Okumura, F., Okumura, AJ., Nakatsukasa, K., Kamura, T. The role of cullin 5-containing ubiquitin ligases. *Cell Division*. 11:1 DOI 10.1186/s13008-016-0016-3. (2016) 査読有
3. Nakatsukasa, K., Kamura, T. Subcellular Fractionation Analysis of the Extraction of Ubiquitinated Polytropic Membrane Substrate during ER-Associated Degradation. *PLoS One*. Feb 5;11(2):e0148327. doi: 10.1371/journal.pone.0148327. (2016) 査読有
4. Nakatsukasa, K., Nishimura, T., Byrne, D., Okamoto, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Chibana, H., Okumura, F., Kamura, T. The ubiquitin ligase SCF^{Ucc1} acts as a metabolic switch for the glyoxylate cycle. *Molecular Cell*. 59:22-34 doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.013. (2015) 査読有
5. Nakatsukasa, K., Okumura, F., Kamura, T. Proteolytic regulation of metabolic enzymes by E3 ubiquitin ligase complexes: lessons from yeast. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 50(6):489-502. doi: 10.3109/10409238.2015.1081869. (2015) 査読有
6. Song, XJ., Kuroha, T., Ayano, M., Furuta, T., Nagai, K., Komeda, N., Segami, S., Miura, K., Ogawa, D., Kamura, T., Suzuki, T., Higashiyama, T., Yamasaki, M., Mori, H., Inukai, Y., Wu, J., Kitano, H., Sakakibara, H., Jacobsen, SE., Ashikari, M. : Rare allele of a previously

unidentified histone H4 acetyltransferase enhances grain weight, yield, and plant biomass in rice. Proc Natl Acad Sci USA. 112:76-81. doi: 10.1073/pnas.1421127112 (2015) 査読有

7. Nakatsukasa, K., Kanada, A., Matsuzaki, M., Byrne, SD., Okumura, F., Kamura, T. : The nutrient stress-induced small GTPase Rab5 contributes to the activation of vesicle trafficking and vacuolar activity. J Biol Chem., 289(30):20970-8. doi: 10.1074/jbc.M114.548297 (2014) 査読有

[学会発表](計12件)

1. 中務 邦雄、嘉村 巧 : F ボックスタンパク質 Ucc1 による代謝制御機構の解析 BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸ポートアイランド(神戸)(ワークショップ)

2. 奥村 文彦、植松 桂司、Stuart D. Byrne、平野 みえ、奥村(城尾) 晶子、錦見 昭彦、執印 太郎、福井 宣規、中務 邦雄、嘉村 巧 : pVHL 依存的な FOB と HIF の分解はそれぞれ独立して VHL 病を制御している

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸ポートアイランド(神戸)(口頭発表及び Poster 発表)

3. 植松 桂司、奥村 文彦、中務 邦雄、嘉村 巧 : 染色体安定性の維持における CRL5ASB7 ユビキチンリガーゼの機能

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸ポートアイランド(神戸)(Poster 発表)

4. 富澤 優貴、中務 邦雄、奥村 文彦、嘉村 巧 : ユビキチンリガーゼ SCFMet30 の新規基質 p17 の同定と機能解析

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸ポートアイランド(神戸)(Poster 発表)

5. Dawit Hailu Alemayehu、中務 邦雄、奥村 文彦、嘉村 巧 : 出芽酵母 E3 リガーゼ SCFDia2 の新奇基質 Pr11 の同定

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸ポートアイランド(神戸)(Poster 発表)

6. 栗田 英奈、中務 邦雄、曾根 恵、奥村 文彦、嘉村 巧 : Hect 型 E3 リガーゼ Tom1 による FEAR ネットワーク構成因子 Spo12 の分解制御

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸ポートアイランド(神戸)(Poster 発表)

7. Fumihiko Okumura:

Parallel regulation of VHL disease through

degradation of Hif-□ and FOB by pVHL.

Symposium for young ubiquitin researchers in Japan "New Era in the Ubiquitin Research"

November 11-12, 2014, International Institute for Advanced Studies (Kyoto) (Oral)

8. 奥村文彦、植松桂司、松崎真理子、平野みえ、奥村晶子、錦見昭彦、金森正和、執印太郎、福井宣規、中務邦雄、嘉村巧 : pVHL は FOB と HIF-□ の分解を介して VHL 病を制御する。

第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日~27 日、パシフィコ横浜(横浜)(口頭発表及び Poster 発表)

9. 外海駿輔、奥村文彦、中務邦雄、嘉村巧 : 複合体型ユビキチンリガーゼ CRLASB7 の新規基質探索。

第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日~27 日、パシフィコ横浜(横浜)(Poster 発表)

10. 植松桂司、奥村文彦、中務邦雄、嘉村巧 : ユビキチンリガーゼ CRLASB7 の紡錘体形成における役割。

第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日~27 日、パシフィコ横浜(横浜)(Poster 発表)

11. 中村歩、植松桂司、松崎真理子、奥村文彦、中務邦雄、嘉村巧 :

HIF-□ の発現は p90 によって抑制される。

第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日~27 日、パシフィコ横浜(横浜)(Poster 発表)

12. Kunio Nakatsukasa, Takumi Kamura: Subcellular fractionation analysis of the extraction of ubiquitinated polytopic substrates during ER-associated degradation.

The 2014 ASCB/IFCB Meeting, December 6-10, 2014, Philadelphia, Pennsylvania, USA (Poster)

[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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/~2kamura/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嘉村 巧 (Takumi Kamura)
名古屋大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：40333455

(2) 研究分担者

奥村 文彦 (Fumihiko Okumura)
名古屋大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：00507212

(3) 連携研究者

連携研究者なし ()

研究者番号：