

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830077

研究課題名(和文) CUL3による in vivo時空間的血管新生制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the spatio-temporal angiogenic regulation by CUL3

研究代表者

坂上 倫久 (Sakaue, Tomohisa)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、E3ユビキチンリガーゼ複合体のコアタンパク質であるCUL3による血管新生制御における役割について検討した。我々は、siRNAライブラリーと、AlphaScreen assay系を用いた解析から、新規CUL3結合型血管新生制御因子としてKCTDファミリータンパク質を同定することに成功した。本分子を欠損した血管内皮細胞は細胞運動異常が起こり、結果的に血管伸長が強く阻害される。本成果は、CUL3-KCTD10を標的とした新規創薬へと発展させるための重要な分子基盤となる。

研究成果の概要(英文)：We first identified KCTD protein as a novel angiogenic regulator by siRNA-based screening and AlphaScreening assay system. This molecule is one of the CUL3-binding protein. VEGF-A-induced angiogenic sprouting was strongly inhibited due to disorder of cell movement when KCTD was knocked down. Silencing KCTD completely phenocopied the effects of CUL3 knockdown in HUVECs. We believe that our data contribute to the understanding of the precise mechanism by which the CUL3-KCTD axis regulates angiogenesis in humans and provide insights that may help to establish a new strategy for the treatment of angiogenesis-associated diseases.

研究分野：血管生物学

キーワード：CUL3 KCTD 血管新生 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、血管新生において、VEGF-Notch シグナルクロストークを担う複合体、CUL3-BAZF complex を発見した(Blood, 2012 & Angiogenesis, 2013)。BAZF は VEGF 刺激で、血管内皮細胞特異的に誘導され、これが E3 ユビキチン化酵素である CUL3 と結合し、Notch シグナルの下流転写因子 CBF-1 をユビキチン化し、分解に導くことで Notch シグナルを遮断する。

一方 CUL3 ノックダウンによる血管新生の阻害は、BAZF ノックダウン群に比べて、より重篤な血管形成の破綻を生じる。このことは、CUL3 は、BAZF とは別のシグナル経路を介して、幅広く血管新生を制御することが示唆される。一般的に CUL3 は BTB ドメインを持つタンパク質 (BTBP) をアダプターとし、これを介して基質と結合するため、CUL3 の基質特異性は、結合する BTBP の種類によって決定される(Nature Cell Biology, 2003) (下

CUL3-BTBP E3 リガーゼ複合体

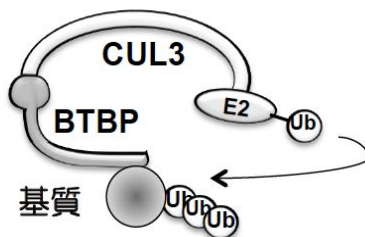


図)。しかし、血管内皮細胞において BTBP は多彩な血管制御機能を持つにもかかわらず、これまで血管内皮細胞において CUL3 と相互作用し、なおかつ機能が分かっている BTBP は BAZF 以外不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、血管新生における CUL3 の生理的および時空間的役割を明らかにする。さらに、血管新生制御に重要な CUL3-BTBP complex を網羅的に明らかにすることで CUL3 との機能的作用点を解明する。また、同定した BTBP と CUL3 との相互作用を阻害する阻害剤を化合物ライブラリーよりスクリーニングすることによって新規血管新生制御医薬の開発を目指す。

2. 研究の方法

血管内皮細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Cdh5-CreERT2 マウスと floxed-CUL3 マウスに対して、これらを交配

させることによって血管内皮細胞特異的 CUL3 ノックアウト可能なマウス (Cdh5-CreERT2; CUL3^{flox/flox}) を作成した。次に、本マウス網膜に、血管新生各ステップにごと (P4=細胞増殖・伸長、P18=動静脈分化、P24=安定化) に Tamoxifen を投与し、その後 Isolectin 染色によって血管形態を解析し、その表現型を野生型のものと比較した。一方、in vitro 実験においては、CUL3 をノックダウンした血管内皮細胞をコラーゲンゲルに包埋し、VEGF-A 刺激を行うことで三次元的な血管新生をタイムラプスイメージング解析によって観察し、コントロール群と比較した。この時、Lifeact-venus 蛍光プローブを用いて時空間的な細胞運動様式を解析した。

一方、愛媛大学プロテオサイエンスセンターが保有するコムギ無細胞タンパク質合成システム (Nat Protoc, 2010) を用いて、ヒト BTBP を網羅的に合成し、ライブラリー化した。次に、AlphaScreen 法を用いて、CUL3 と相互作用する BTBP を全て決定した。

同定した CUL3 結合 BTBP に対して siRNA を合成し、これを培養血管内皮細胞にトランスフェクションする。遺伝子ノックダウンした血管内皮細胞を用いてコラーゲンゲル三次元血管新生アッセイを行うことで、血管新生制御において重要となる CUL3-BTBP 複合体を網羅的に明らかにした。さらに、樹立した CUL3-BTBP の AlphaScreen 相互作用アッセイシステムを用いて、CUL3-BTBP 結合阻害剤を、低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングする。

4. 研究成果

(1) 血管新生時空間的制御機構における CUL3 の機能解析

作成した、Cdh5-CreERT2; CUL3^{flox/flox} マウス腹腔内にタモキシフェンを投与し、CUL3 ノックアウトマウスの解析を試みたが、タモキシフェン投与による CUL3 の発現抑制効果が極めて弱く、WT に比べて大きな表現型の違いが認められなかった。そこで、in vitro 三次元的血管新生アッセイ系を用いて CUL3 を発現抑制した血管内皮細胞の細胞運動について評価した。その結果、VEGF-A 刺激約 48 時間後の血管伸長過程において、極めて強いアクチン線維を持った細胞が出現した。さらに、刺激後 72 時間においては、アクチン過重合により細胞進展異常を伴った細胞群が多数認められた。これに伴い、血管先端細胞 (tip cell) においても細胞進展異常細胞が散

見され、これにより血管伸長異常に至ることが分かった。つまり、血管伸長過程において CUL3 は血管内皮細胞の伸展、収縮に必要なアクチンの重合・脱重合のバランスを時空間的に制御することで、血管伸長を可能にしていると考えられる。

(2) 血管新生制御に重要な CUL3-BTBP 軸の同定とその阻害剤の開発

ヒト BTBP に対してそれらの遺伝子をクローニングし、コムギ無細胞タンパク質発現系によりリコンビナントタンパク質を合成した。結果的に、ヒト BTBP183 種のうち 168 種の BTBP の合成に成功した。FLAG タグを付加したこれら BTBP に対して、ピオチンタグを付加した CUL3 との結合を、AlphaScreen assay 法により検出した。その結果、CUL3 は 168 種ある BTBP の内、82 種の BTBP と結合することが分かった。

次に、これら CUL3 結合 BTBP に対する siRNA を合成し、ノックダウン法により、その血管新生阻害様式を解析した。その結果、CUL3 ノックダウン時に認められる細胞運動異常が認められ、なおかつ強く血管新生を抑制する遺伝子として KCTD を同定した。本分子を血管内皮細胞において発現抑制すると、CUL3 と同様にアクチン過重合を起こすことがわかった。我々は、この CUL3-KCTD 軸が時空間的に血管新生を制御する鍵タンパク質であると考え、現在、抗血管新生効果を期待した、本分子の複合体形成阻害剤のスクリーニングを遂行中である。

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 0 件)

[学会発表](計 14 件)

1. 坂上 倫久, 血管内皮細胞において CUL3 は VEGFR2 の発現を制御する, がん支援 冬期公開シンポジウム, 2016 年 2 月 9 日, 一ツ橋講堂(東京都千代田区)
2. 坂上 倫久, 藤崎 亜耶子, 中城 公一, 浜川 裕之, 泉谷 裕則, 東山 繁樹, 血管内皮細胞における CUL3 の機能解析, 第 23 回日本血管生物医学学会学術集会 2015 年 12 月 11 日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)
3. 藤崎 亜耶子, 宇都宮 果歩, 上杉 恭広, 深江 舜也, 坂上 倫久, 高橋 宏隆, 澤崎 達也, 東山 繁樹,

AlphaScreen を用いた CUL3 複合体解析システムの構築, 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 3 日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

4. 坂上 倫久, 藤崎 亜耶子, 中城 公一, 浜川 裕之, 泉谷 裕則, 東山 繁樹, CUL3 regulates vascular endothelial cell-specific gene expression, 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 3 日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)
5. 上杉 恭広, 宇都宮 果歩, 深江 舜也, 坂上 倫久, 中山 寛尚, 福田 信治, 泉谷 裕則, 東山 繁樹, CUL3 regulates expression of EGF receptor family proteins, 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 3 日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)
6. 深江 舜也, 上杉 恭広, 宇都宮 果歩, 坂上 倫久, 泉谷 裕則, 東山 繁樹, KLHL20, CUL3-binding protein, regulates expression of EGFR family proteins, 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 3 日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市).
7. 宇都宮 果歩, 上杉 恭広, 深江 舜也, 藤崎 亜耶子, 坂上 倫久, 高橋 宏隆, 澤崎 達也, 東山 繁樹 Analysis of novel Nrf2-binding BTB proteins using AlphaScreen assay, 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 3 日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市).
8. Tomohisa Sakaue, Ayako Fujisaki, Shigeki, Higashiyama Cullin3-KCTD10 regulates angiogenesis through controlling levels of RhoA, Protein Island Matsuyama International Symposium 2015, September, 25, 2015. 愛媛大学(愛媛県松山市)
9. 坂上 倫久, 藤崎 亜耶子, 東山 繁樹, CUL3/SPOP/Daxx 複合体による VEGFR2 の発現制御機構, 第 56 回日本生化学会 中国・四国支部例会, 2015 年 5 月 30 日, 島根大学(島根県松江市)
10. Tomohisa Sakaue, Shigeki Higashiyama BTB proteins as an

adaptor for Cul3-based ubiquitin ligases multiply regulate angiogenesis, Joint International Symposium on TGF- β Family and Cancer Signal Network in Tumor Microenvironment, 2015 年 1 月 12 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

11. **坂上 倫久**, 東山 繁樹, CUL3 は Rho タンパク質の発現および活性制御を介して血管新生を調節する, 第 87 回日本生化学大会, 2014 年 10 月 16 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)
12. **坂上 倫久**, 東山 繁樹, CUL3 は多様な血管新生制御遺伝子の発現を制御する, 第 55 回日本生化学会中国四国支部例会 2014 年 6 月 6 日, 愛媛大学 (愛媛県松山市)
13. **Tomohisa Sakaue**, Shigeki Higashiyama Versatility of E3 ubiquitin ligase Cullin3 as an angiogenic balance regulator, The 18th International Vascular Biology Meeting, April, 16, 2014, 京都市勧業館みやこめっせ (京都府京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://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