

論 文 要 旨

Major vault protein forms complexes with hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and reduces HIF-1 α level in ACHN human renal adenocarcinoma cells

ヒト腎癌由来細胞株 ACHN 細胞において、major vault protein は hypoxia inducible factor (HIF)-1 α と複合体を形成し、そのレベルを減少させる

岩 下 健 一

【序論および目的】

Vault は進化の過程で高度に保存された RNA タンパク質複合体であり、major vault protein (MVP)、vault poly(ADP-ribose) polymerase (VPARP)、telomerase-associated protein-1 (TEP1)、vault RNA の 4 種類の分子から構成される。Vault の機能については抗癌剤耐性や自然免疫に関与することが示唆されているものの、未だ不明な点が多いのが現状である。Vault の主要な構成成分である MVP は、様々な細胞ストレス (DNA 障害、紫外線、高浸透圧、高熱、低酸素など) により発現が上昇することが報告されている。このことは vault が細胞のストレス応答において重要な役割を果たしていることを示唆する。細胞が生体内でさらされるストレスの一つに低酸素があるが、これまでに vault が細胞の低酸素ストレス応答に及ぼす影響を調べた報告はない。そこで、本研究では、vault が細胞の低酸素ストレス応答に及ぼす影響を、低酸素応答の master regulator である hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) に着目して調べた。HIF-1 は basic helix-loop-helix PAS ファミリーに属する転写因子であり、HIF-1 α と HIF-1 β から構成される。HIF-1 β は細胞内に恒常的に発現しているが、HIF-1 α は酸素濃度によりそのレベルが制御されている。正常酸素条件下 (normoxia) では、HIF-1 α は、ユビキチン-プロテアソーム依存的経路により分解されているが、低酸素条件下 (hypoxia) では、その分解が抑制され安定化する。細胞が低酸素に対して適切に応答するためには HIF-1 α レベルが厳密に制御される必要があり、これまでに様々な分子が HIF-1 α レベルを正あるいは負に制御することが報告されている。本研究では、vault が HIF-1 α レベルを制御する可能性について検討を行った。

【材料および方法】

Vault の発現が比較的高いヒト腎癌由来細胞株 ACHN 細胞に MVP shRNA を導入して作製した MVP knockdown 細胞と control 細胞 (MVP shRNA を導入したにもかかわらず、MVP の発現抑制が見られなかった細胞) を用いて細胞の低酸素応答を比較した。低酸素培養は、Personal multi gas incubator を用いて 1% 酸素条件下で行った。HIF-1 α 、MVP、PHD2、pVHL、GAPDH、p38 の発現は immunoblot 法により、HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA の発現は real-time PCR 法により解析を行った。HIF-1 α のユビキチン化は、ACHN 細胞に HIF-1 α 発現ベクターと HA-ユビキチン発現ベクターを co-transfect した後、抗

HIF-1 α 抗体で免疫沈降、抗 HA 抗体で immunoblot を行うことにより解析した。Vault と HIF-1 α 、PHD2、pVHL の相互作用はシヨ糖密度勾配遠心法により解析を行った。

【結果】

まず、ACHN 細胞において、MVP の knockdown が低酸素による HIF-1 α の安定化に及ぼす影響を調べた。Control 細胞及び MVP knockdown 細胞を低酸素条件下で培養して、HIF-1 α タンパク質レベルを immunoblot 法により解析したところ、control 細胞と比較して MVP knockdown 細胞で、低酸素による HIF-1 α タンパク質レベルの上昇が見られた。CoCl₂ や deferoxamine のような hypoxia mimetics を用いた場合にも同様の現象が見られた。次に、MVP の knockdown が低酸素による HIF-1 標的遺伝子 (VEGF) の発現に及ぼす影響を real-time PCR 法により調べた。その結果、control 細胞と比較して MVP knockdown 細胞で、低酸素による VEGF mRNA レベルの上昇が見られた。以上のことから、vault は HIF-1 α の negative regulator として機能することが示唆されたため、そのメカニズムについてさらに解析を進めた。まず、vault が HIF-1 α タンパク質レベルを転写レベルで制御する可能性について検討を行った。Control 細胞及び MVP knockdown 細胞を低酸素条件下で培養して、HIF-1 α mRNA レベルを real-time PCR 法により解析したところ、両細胞間で HIF-1 α mRNA レベルに有意な差は見られなかった。このことから、vault は転写後レベルで HIF-1 α タンパク質レベルを制御することが示唆されたため、次に vault が HIF-1 α タンパク質の分解に及ぼす影響を調べた。その結果、MVP の knockdown は、HIF-1 α のユビキチン化と分解速度を低下させた。以上のことから、vault は HIF-1 α のユビキチン依存的な分解を促進することが示唆された。HIF-1 α は様々な分子との結合によりそのレベルが制御されることが報告されているため、次に、vault が HIF-1 α と複合体を形成する可能性についてシヨ糖密度勾配遠心法により解析を行った。その結果、vault は HIF-1 α に加えて、HIF-1 α のユビキチン依存的な分解において重要な役割を果たしている PHD2 や pVHL とともに複合体を形成することが明らかになった。また pVHL の knockdown は vault と HIF-1 α の複合体形成に影響を与えないことも明らかになった。

【結論及び考察】

本研究により、ACHN 細胞において、(1) MVP の knockdown は低酸素及び hypoxia mimetics によって誘導される HIF-1 α タンパク質レベルを上昇させること、(2) MVP の knockdown は HIF-1 α mRNA レベルには影響を与えないが、HIF-1 α タンパク質のユビキチン化と分解速度を低下させること、(3) vault は HIF-1 α 、PHD2、pVHL と複合体を形成することなどが明らかになった。以上のことは、vault が PHD2 及び pVHL による HIF-1 α 分解経路において molecular scaffold として機能することで、HIF-1 α のユビキチン化とそれに続く分解を促進することを示唆する。

細胞が低酸素に対して適切に応答するためには、転写因子 HIF-1 の機能が厳密に制御される必要がある。HIF-1 が転写因子として機能するためには、HIF-1 α の安定化が必須であり、安定化のタイミングと程度が厳密に制御されることではじめて細胞の適切な低酸素応答が可能となる。これまでに様々な分子が HIF-1 α レベルを正あるいは負に制御することが報告されている。それらの分子の存在は、細胞が生体内で起こる複雑な低酸素状況に対処するために必要とされる。今回、見出した vault が HIF-1 α レベルを負に制御するという新知見も HIF-1 α レベルの厳密な制御とそれによる細胞の適切な低酸素応答を実現する過程において重要な役割を果たしている可能性がある。

論文審査の要旨

| | | | |
|------|----------|-------|------------------|
| 報告番号 | 総研第 89 号 | 学位申請者 | 岩下 健一 |
| 審査委員 | 主査 | 宮田 篤郎 | 学位 博士 (医学・歯学・学術) |
| | 副査 | 小澤 政之 | 副査 夏越 祥次 |
| | 副査 | 岸田 昭世 | 副査 西山 賢龍 |

Major vault protein forms complexes with hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and reduces HIF-1 α level in ACHN human renal adenocarcinoma cells

(ヒト腎癌由来細胞株 ACHN 細胞において、major vault protein は hypoxia inducible factor (HIF)-1 α と複合体を形成し、そのレベルを減少させる)

Vault は、1986 年に Rome らのグループによって発見された、現在報告されている中で最大の RNA-タンパク質複合体である。Vault の存在は多くの生物種で確認されており、その構造は進化の過程で高度に保存されているため、重要な機能を持つことが示唆されている。しかしながら、機能の詳細については不明な部分が多い。これまでに、細胞に対する様々なストレス (DNA 障害、高浸透圧、高熱、低酸素など) により、vault の主要な構成成分である major vault protein (MVP) の発現が上昇することが報告されている。このことは vault が細胞のストレス応答において重要な役割を果たすことを示唆する。そこで、学位申請者は、細胞ストレスのうち、低酸素に着目し、vault が細胞の低酸素ストレス応答に及ぼす影響を調べることを目的として実験を行った。具体的には、vault が、低酸素応答の master regulator である hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α レベルを制御する可能性について、ヒト腎癌由来細胞株 ACHN 細胞を用いて immunoblot 法、リアルタイム PCR 法などにより解析を行った。

その結果、以下の知見が明らかにされた。

- 1) MVP の knockdown は、低酸素及び hypoxia mimetics によって誘導される HIF-1 α タンパク質レベルを上昇させた。
- 2) MVP の knockdown は、HIF-1 α mRNA レベルには影響を与えなかったが、HIF-1 α タンパク質のユビキチン化と分解速度を低下させた。
- 3) Vault は HIF-1 α 、prolyl hydroxylase 2 (PHD2)、von Hippel-Lindau protein (pVHL) と複合体を形成した。
- 4) pVHL の knockdown は、vault と HIF-1 α の複合体形成に影響を与えなかった。

細胞が低酸素に対して適切に応答するためには、転写因子 HIF-1 の機能が厳密に制御される必要がある。HIF-1 が転写因子として機能するためには、HIF-1 α の安定化が必須であり、安定化のタイミングと程度が、様々な因子により厳密に制御されることではじめて、適切な低酸素応答が可能となる。本研究は、vault が HIF-1 α レベルを負に制御することにより、細胞の低酸素応答を制御する可能性を示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

| | | | | |
|------|----------|-------|-------|---------------|
| 報告番号 | 総研第 89 号 | | 学位申請者 | 岩下 健一 |
| 審査委員 | 主査 | 宮田 篤郎 | 学位 | 博士 (医学・歯学・学術) |
| | 副査 | 小澤 政之 | 副査 | 夏越 祥次 |
| | 副査 | 岸田 昭世 | 副査 | 西山 賢龍 |

主査および副査の5名は、平成22年2月8日、学位申請者 岩下 健一 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) HIF-1 α のヒドロキシル化を調べる方法があるか？

(回答) HIF-1 α のヒドロキシル化を特異的に検出する抗体が市販されている。

質問2) CoCl₂ と deferoxamine はどのようなメカニズムで低酸素様状況を作り出すのか？

(回答) PHD による HIF-1 α のヒドロキシル化には、PHD の活性中心に存在する鉄イオンが必要である。CoCl₂ はコバルトイオンが鉄イオンと置き換わることにより、deferoxamine は鉄イオンをキレートすることにより、PHD の活性を阻害し、低酸素様状況を作り出す。

質問3) Vault に HIF-1 α 、PHD2、pVHL はどのような形で結合していると考えられるか？

(回答) Vault 上で各分子がどのように結合しているかを解析するうえで障害となるのは、vault が4種類の分子から構成されているということである。HIF-1 α と vault の結合一つをとってみても、HIF-1 α が MVP と結合している可能性、TEP-1 と結合している可能性、VPARP と結合している可能性、vault RNA と結合している可能性の4種類があり、PHD2 と pVHL についても同様のことが考えられる。また、HIF-1 α 、PHD2、pVHL の3者間の結合様式にも様々なパターンがあるため、詳細な解析により、これらの分子がどのように vault に結合しているのかを調べる必要がある。

質問4) 腎癌で HIF-1 α の発現は予後不良と関係するという報告がある。今回の研究では、MVP の発現と HIF-1 α の発現が逆相関している。このことを考えると、MVP が発現している癌は悪性度が低いと考えられるのか？

(回答) 最近、腎癌で、HIF-1 α と HIF-2 α の2つの分子の発現レベルと予後の関係を調べた報告がなされた。腎癌患者の細胞を解析したところ、HIF-1 α と HIF-2 α がともに発現している場合、HIF-1 α のみが発現している場合、HIF-2 α のみが発現している場合の3パターンがあり、この中で最も予後不良だったのは、HIF-2 α のみが発現している場合であった。そのメカニズムは、HIF-1 α は癌遺伝子産物 myc の活性を抑制するが、HIF-2 α は myc の活性を促進するため、このことが癌の悪性化に関与していることが示された。本研究により、MVP が HIF-1 α レベルを低下させることが示されたが、HIF-2 α レベルにどのような影響を与えるかについては未だ不明である。MVP は HIF-1 α レベルを低下させるが、もし、HIF-2 α レベルに影響を与えなければ、相対的にレベルが上昇した HIF-2 α が myc を活性化することにより、癌の悪性度を助長させる可能性がある。

質問5) MVP が発現していても、抗癌剤耐性を示す細胞と示さない細胞がある。このギャップについて何か考察があるか？

(回答) MVP は直接的に抗癌剤耐性に関わっていない可能性がある。MVP に加えて、その他の factor が加わることで細胞が抗癌剤耐性となるのかもしれない。

質問6) MG132 を使って、ユビキチン化された HIF-1 α と vault の複合体形成を示しているが、そのうえで、HIF-1 α のユビキチン化が促進していると考えているのはなぜか？ Vault が HIF-1 α の脱ユビキチン化を抑制することにより、

分解を促進しているという可能性もあるのではないかと？

(回答) 論文の fig. 5 では MG132 を使って、fig. 6 では CoCl_2 及び MG132 を使って、MVP あるいは vault と HIF-1 α の相互作用を解析している。本研究の結果だけでは、どの状態の HIF-1 α が vault と結合しているのか判断することはできない。したがって、指摘されたように、vault がユビキチン化された HIF-1 α と結合し、その脱ユビキチン化を抑制することで HIF-1 α の分解を促進している可能性も否定できない。ただ、ユビキチン化よりも前のステップで作用する低酸素や hypoxia mimetics を用いた実験により、HIF-1 α レベルに差が見られているため、ユビキチン化以前に起こる反応に vault が関与する可能性があり、vault が HIF-1 α のユビキチン化を促進しているのではないかと考察した。質問 7) 論文の fig. 1 (b) の MVP knockdown 細胞で pVHL が減少しているにもかかわらず、HIF-1 α が上昇していないことについてどう考えるか？

(回答) HIF-1 α レベルの制御には negative feedback 機構が存在し、pVHL が関与しない HIF-1 α 分解経路が存在することも知られている。そのような機構が働くことにより、pVHL が低下したにも関わらず、HIF-1 α レベルの上昇が見られなかったのではないかと考えられる。

質問 8) 論文の fig. 3 で、HIF-1 α の絶対的な分解量にどのくらい差があるか？

(回答) (a) の CHX 処理 0h で、HIF-1 α レベルは control 細胞と比較して MVP knockdown 細胞で 2 倍程度高く、(b) の CHX 処理 1h で、HIF-1 α 残存率は control 細胞で 20% 程度、MVP knockdown 細胞で 40% 程度であるため、絶対的な分解量は MVP knockdown 細胞で 1.5 倍程度多いと考えられる。

質問 9) Control 細胞と MVP knockdown 細胞の間で細胞の増殖速度に差がみられたか？

(回答) 両細胞間で細胞増殖速度に差はみられなかった。

質問 10) MVP の knockdown で HIF-1 α の発現が持続するのではなくて、control 細胞と同じように一過性に発現して、その程度が上昇しているが、このことについてはどう考えるか？

(回答) HIF-1 α レベルの制御には negative feedback 機構が存在することが知られている。MVP は HIF-1 α の持続的発現を抑制する negative feedback 機構には影響を与えない方法で作用して、HIF-1 シグナルの intensity の制御に関わっている可能性がある。

質問 11) MVP ノックアウトマウスは虚血などのストレスに対して脆弱性を示すのか？

(回答) MVP ノックアウトマウスは、生存可能であり、特に異常が見られなかったと報告されている。虚血などのストレス条件下で解析した報告はないため、その点については不明である。

質問 12) これまでに、vault が 転写因子のレベルを制御するという報告や molecular scaffold として機能するという報告があるか？

(回答) どちらについても報告がある。vault は、E3 ユビキチンリガーゼ COP1 と結合し、転写因子 c-Jun の分解に関与することが報告されている。また、vault は、SHP-2 及び ERK2 と結合し、EGF receptor シグナル伝達経路において molecular scaffold として機能することが報告されている。

質問 13) vault RNA の機能について何か報告があるか？

(回答) vault RNA は、ヒトでは hvg 1、hvg 2、hvg 3、hvg 4 の 4 種類が存在することが報告されている。これらの RNA の機能の詳細については不明であるが、hvg 1 と hvg 2 が抗癌剤ミトキサントロンに結合するという報告、通常は hvg 1 が vault に結合しているが、ドキシソルビシン耐性細胞では、hvg 3 の vault への結合が増加しているという報告などがあり、vault RNA が何らかの形で抗癌剤耐性に関わっている可能性がある。

質問 14) Vault 研究の臨床的な展開としてはどのようなことが考えられるか？

(回答) Vault 研究を癌治療に応用しようとした場合に必要なのは、vault がどのようなメカニズムで細胞に抗癌剤耐性を与えるのかを明らかにすることである。Vault が発現していても、抗癌剤耐性になる場合とならない場合があり、このことから、vault 以外の factor がさらに加わることで、細胞が抗癌剤耐性になる可能性がある。その factor を明らかにし、それを除去することができれば、抗癌剤耐性克服に応用できるかもしれない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。