

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名： (日本語) マスターモジュレーターとしての CUL3 システムを標的とした血管新生制御法の開発とがん治療応用  
(英語) Development and application of a novel anti-angiogenic strategy based on the targeting of CUL3 system as a master modulator.

研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人 愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 教授 東山繁樹  
(英語) National University Corporation Ehime University Proteo-Science Center, Professor, Shigeki Higashiyama

実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究開発課題名：  
(日本語) CUL3-BTBP 軸の基質探索システムと阻害剤スクリーニング用ハイスループットシステムの構築・応用  
(英語) Establishment and application of high-throughput screening systems of CUL3-BTBPs-Substrates and their inhibitors

研究開発代表者 所属 役職 氏名：  
(日本語) 国立大学法人 愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 教授 東山繁樹  
(英語) National University Corporation Ehime University Proteo-Science Center, Professor, Shigeki Higashiyama

分担研究開発課題名：  
(日本語) CUL3-BTBP 軸の基質探索システムと阻害剤スクリーニング用ハイスループットシステムの構築・応用  
(英語) Establishment and application of high-throughput screening systems of CUL3-BTBPs-Substrates and their inhibitors

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人 愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 教授 澤崎 達也

(英語) National University Corporation Ehime University Proteo-Science Center, Professor,  
Tatsuya Sawasaki

分担研究開発課題名：

(日本語) CUL3-BTBP 軸の基質探索システムと阻害剤スクリーニング用ハイスループットシステムの構築・応用

(英語) Establishment and application of high-throughput screening systems of  
CUL3-BTBPs-Substrates and their inhibitors

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人 愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 准教授 竹田 浩之

(英語) National University Corporation Ehime University Proteo-Science Center, Associate  
Professor, Hiroyuki Takeda

分担研究開発課題名：

(日本語) CUL3-BTBP 軸の基質探索システムと阻害剤スクリーニング用ハイスループットシステムの構築・応用

(英語) Establishment and application of high-throughput screening systems of  
CUL3-BTBPs-Substrates and their inhibitors

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人 愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 講師 高橋 宏隆

(英語) National University Corporation Ehime University Proteo-Science Center, Associate  
Professor, Takahiro Takahashi

分担研究開発課題名：

(日本語) 血管内皮細胞での CUL3-SPOP 軸によるエピゲノム制御解析

(英語) Epigenetic regulation by CUL3-SPOP axis in vascular endothelial cell

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人 愛媛大学 大学院医学系研究科 助教 坂上 倫久

(英語) National University Corporation Ehime University Graduate School of Medicine, Assistant  
Professor, Tomohisa Sakaue

分担研究開発課題名：

(日本語) 血管内皮細胞での CUL3-SPOP 軸によるエピゲノム制御解析

(英語) Epigenetic regulation by CUL3-SPOP axis in vascular endothelial cell

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人 愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 教授 今井 祐記

(英語) National University Corporation Ehime University Proteo-Science Center, Professor,  
Yu-ki Imai

分担研究開発課題名：

(日本語) 血管内皮細胞での CUL3-KCTD10 軸によるアクチンダイナミクス制御機構解析及び、血管内皮細胞での膜蛋白質輸送を制御する CUL3-BTBP-基質軸の同定

(英語) Actin dynamics regulation by CUL3-KCTD10 axis, and identification and functional analysis of CUL3-BTBP-Substate axis which regulates membrane protein trafficking in vascular endothelial cell.

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人 愛媛大学 大学院医学系研究科 助教 前川 大志

(英語) National University Corporation Ehime University Graduate School of Medicine, Assistant Professor, Masashi Maekawa

分担研究開発課題名：

(日本語) 血管内皮細胞での膜蛋白質輸送を制御する CUL3-BTBP-基質軸の同定と機能解析

(英語) Identification and functional analysis of CUL3-BTBP-Substate axis which regulates membrane protein trafficking in vascular endothelial cell.

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人 東京大学 大学院薬学系研究科 疾患細胞生物学教室 田口 友彦

(英語) National University Corporation The University of Tokyo Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Tomohiko Taguchi

分担研究開発課題名：

(日本語) 担がんモデル動物を用いた CUL3-BTBP-基質軸標的効果の検証

(英語) Targeting study of CUL3-BTBP-Substate axis in tumor bearing mice

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人 愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 助教 中山 寛尚

(英語) National University Corporation Ehime University Proteo-Science Center, Assistant Professor, Hironao Nakayama

分担研究開発課題名：

(日本語) 担がんモデル動物を用いた CUL3-BTBP-基質軸標的効果の検証

(英語) Targeting study of CUL3-BTBP-Substate axis in tumor bearing mice

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 公立大学法人 名古屋市立大学 大学院医学研究科 教授 城 卓志

(英語) Public University Corporation Nagoya City University Graduate School of Medical Science,  
Professor, Takashi Joh

分担研究開発課題名：

(日本語) 担がんモデル動物を用いた CUL3-BTBP-基質軸標的効果の検証

(英語) Targeting study of CUL3-BTBP-Substate axis in tumor barring mice

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 公立大学法人 名古屋市立大学 大学院医学研究科 講師 久保田 英嗣

(英語) Public University Corporation Nagoya City University Graduate School of Medical Science,  
Assistant Professor, Eiji Kubota

分担研究開発課題名：

(日本語) 担がんモデル動物を用いた CUL3-BTBP-基質軸標的効果の検証

(英語) Targeting study of CUL3-BTBP-Substate axis in tumor barring mice

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 公立大学法人 名古屋市立大学 大学院医学研究科 助教 日吉 裕美

(英語) Public University Corporation Nagoya City University Graduate School of Medical Science,  
Assistant Professor, Hiromi Hiyoshi

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 和文

血管新生のバランス制御分子として同定した CUL3 型ユビキチンリガーゼ複合体(CRL3)による制御ネットワークを解明するとともに、新たな血管新生制御の作用点を明らかにすることを目的として、以下の 4 項目について解析を進めた。

#### 1. 血管新生を担う CUL3-BTBP 軸の同定と、基質探索システム及び阻害剤スクリーニング用ハイスループットシステムの構築・応用

血管新生を担う CUL3-BTBP 軸探索のため、BTBP siRNA ライブラリーを整備し、それを用いたスクリーニングにより新たに CUL3-BTBP 3 軸を同定した。同定した CUL3-BTBP 3 軸の基質探索に向け、HEK293T 細胞を用いて Halo タグ付加 BTBP リコンビナントタンパク質(Halo-BTBP)を作成し HaloLink レジンに固相化した。これを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の可溶性画分から各 BTBP に結合するタンパク質を精製した。精製タンパク質は、SDS 電気泳動後、質量分析により同定した。本検出タンパク質を KEGG Pathway 解析により機能的に分類した。その結果に基づき、基質候補フォーカスト・プロテインアレイの作製を行なった。また、3つの FLAG-タグ付加 BTBP リコンビナントタンパク質を、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作成し、これ

をプローブとして、基質候補タンパク質の直接的結合を測定するための AlphaScreen システムを構築した。

## 2. 遺伝子発現を制御する CUL3-BTBP-基質軸の同定と阻害剤スクリーニングシステムの構築

VEGFR2 を代表とする重要な血管新生因子の mRNA 発現制御を担う CUL3 システムとして CUL3-SPOP-DAXX 軸を同定した(Sakaue *et al.*, Sci Rep. 2017)。CUL3 及び SPOP ノックダウンにより DAXX が増大すること、SPOP と DAXX が結合すること、DAXX 発現量と血管新生因子 mRNA 及びタンパク質発現が逆相関することから、DAXX が血管新生因子 mRNA の発現を負に制御することを明らかにした。以上の結果より、CUL3-SPOP-DAXX 軸が血管新生因子の遺伝子発現制御機構として重要な働きをしていることが明らかとなったことから、CUL3-SPOP 及び SPOP-DAXX の分子間相互作用阻害剤をスクリーニングする AlphaScreen システムを構築した。

## 3. 細胞運動を制御する CUL3-BTBP-基質軸の同定と阻害剤スクリーニングシステムの構築

血管内皮細胞の細胞運動を制御する CUL3 システムとして CUL3-BTBP1 軸を同定した。さらに、当該 CUL3-BTBP1 軸の基質を、上記実験 1 で作成したフォーカスト・プロテインアレイを用いて、Biotin-BTBP1 をプローブとして AlphaScreen を行うことにより同定した。その結果、基質候補分子 A を検出した。さらに、CUL3 または BTBP1 のノックダウンと基質候補分子 A の強制発現が同等の細胞運動表現型を示すことを確認した。これを基に、CUL3-BTBP1、及び BTBP1-基質 A の分子間相互作用阻害剤をスクリーニングする AlphaScreen システムを構築した。

## 4. 膜蛋白質輸送を制御する CUL3-BTBP-基質軸の同定と阻害剤スクリーニングシステムの構築

血管内皮細胞での重要な膜タンパク質輸送を制御する CUL3-BTBP2 軸を同定した。さらに、当該 CUL3-BTBP2 軸の基質を、上記実験 1 で作成したフォーカスト・プロテインアレイを用いて、Biotin-BTBP2 をプローブとした AlphaScreen を行うことにより同定を進めている。

## 英文

In order to analyze the roles of CUL3-based ubiquitin E3 ligase (CRL3) system in angiogenesis and their potency as therapeutic targets, we studied the following 4 points.

### 1. Identification of CUL3-BTBP axes involved in angiogenic regulation and establishment of high throughput screening systems of their substrates and inhibitors.

We constructed BTBP siRNA library with minimum off target effects and performed a 3D endothelial cell tube formation assay *in vitro* by using them, resulting in the identification of 3 CUL3-BTBP axes as a candidate of an angiogenic regulator. For the identification of their CUL3-BTBP targeting substrates, we subsequently performed an affinity chromatography using Halo-tagged BTBP recombinant proteins immobilized HaloLink resin and cell extracts from human umbilical vein endothelial cells. The following SDS-PAGE and mass spectrometry analysis revealed the more than 1000 proteins. The information of the identified proteins was subjected to KEGG Pathway analysis and their functional classification. Based on the classification, we prepared several kinds of functionally classified protein arrays for the direct interaction analysis of protein-protein.

We performed an AlphaScreen assay by using a combination of the protein arrays and Flag-tagged BTBP probes, and successfully listed up substrate candidates for the identified CUL3-BTBPs. We also established AlphaScreen assay systems of CUL3- BTBPs and BTBPs-substrates.

2. Identification of CUL3-BTBP axes to regulate gene expression in endothelial cells and establishment of high throughput screening systems of their substrates and inhibitors.

Based on the results described above (#1), we identified SPOP which regulates VEGFR2 mRNA expression. We further performed DNA microarray analysis under the knockdown of SPOP, and revealed that CUL3-SPOP axis regulated mRNA expression of multiple angiogenic factors. Further, we successfully identified SPOP-binding protein DAXX as a substrate candidate by using the combination of siRNAs and the protein arrays. We also established AlphaScreen assay systems of CUL3-SPOP and SPOP-DAXX.

3. Identification of CUL3-BTBP axes to regulate endothelial cell movement and establishment of high throughput screening systems of their substrates and inhibitors.

During the experiment carried on the first screening described above (#1), we identified BTBP1 which regulates endothelial cell movement. Then, we successfully identified BTBP1-binding protein A as a substrate candidate (Substrate-A) by using the combination of siRNAs and the protein arrays. We also established AlphaScreen assay systems of CUL3-BTBP1 and BTBP1-Substrate-A.

4. Identification of CUL3-BTBP axes to regulate transmembrane trafficking and establishment of high throughput screening systems of their substrates and inhibitors.

Based on the results described above (#1), we performed the immunostaining analysis of membrane proteins under the knockdown of the 1<sup>st</sup>-identified BTBPs, resulting in the identification of BTBP2 which regulates appropriate localization of membrane proteins which regulate angiogenesis. Then, we are now performing an AlphaScreen assay to identify BTBP2-binding protein by using the protein arrays.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 2件）

1. Sakaue T, Sakakibara I, Uesugi T, Fujisaki A, Nakashiro KI, Hamakawa H, Kubota E, Joh T, Imai Y, Izutani H, Higashiyama S. The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in vascular endothelial cells. *Sci Rep.* 2017, 20, 7.
2. Sakaue T, Fujisaki A, Nakayama H, Maekawa M, Hiyoshi H, Kubota E, Joh T, Izutani H, Higashiyama S. Neddylated Cullin 3 is required for vascular endothelial-cadherin-mediated endothelial barrier function. *Cancer Sci.* 2017, 108, 208-215.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. CUL3 による血管内皮細胞接着制御機構の解析, 口頭, 藤崎亜耶子, 坂上倫久, 中山寛尚, 前川大志, 東山繁樹 第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2016/5/28, 高知, 国内
2. CUL3 による血管内皮細胞活性化制御機構, 口頭&ポスター, 坂上倫久, 藤崎亜耶子, 泉谷裕則, 東山繁樹 日本病態プロテアーゼ学会, 第 21 回学術集会, 2016/8/16, 大阪, 国内
3. 血管内皮細胞における CUL3 による VEGF-A 応答制御機構, 口頭&ポスター, 坂上倫久, 藤崎亜耶子, 泉谷裕則, 東山繁樹, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/26, 仙台, 国内
4. CUL3 による VE-cadherin モジュレーションを介した血管内皮細胞接着制御機構の解析, 口頭&ポスター, 藤崎亜耶子, 坂上倫久, 中山寛尚, 前川大志, 東山繁樹, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/26, 仙台, 国内
5. CUL3-KLHL20 軸による細胞内タンパク質輸送制御機構の解析, ポスター, 宇都宮果歩, 深江舜也, 上杉恭広, 坂上倫久, 中山寛尚, 前川大志, 泉谷裕則, 東山繁樹, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/26, 仙台, 国内
6. The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in endothelial cells. Poster, Sakaue Tomohisa, Fujisaki Ayako, Izutani Hironori, Higashiyama Shigeki, The 19th International Vascular Biology Meeting, 2016/11/1, Boston, USA, 国外
7. 血管内皮細胞における CUL3 の役割, 口頭, 坂上倫久, 第 3 回血管生物医学会若手研究会, 2017/3/4, 淡路, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. Tomohisa Sakaue, Ayako Fujisaki, Hironori Izutani, Shigeki Higashiyama, Oral The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in vascular endothelial cells. Protein Island Matsuyama 2016 & The 14th Matsuyama International Symposium, 2016/9/16, Matsuyama, Japan, 国内

(4) 特許出願

該当なし