

学位論文題名

低酸素誘導転写因子 (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)
に結合して機能を制御する因子の同定

学位論文内容の要旨

[緒言] 生体内においては全身の細胞が血管を通じて酸素や栄養素の供給を受けているため、時に血管の狭窄や閉塞が起こるとその血管の下流にある細胞は酸素不足や栄養不足に曝される。また癌組織では血管の構築が異常であるために、正常組織と比較して低酸素環境にあると考えられている。細胞が低酸素に曝されると、低酸素誘導転写因子 (Hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) を構成する HIF-1 α 蛋白の分解が阻害されて低酸素適応応答に関連した血管新生因子、糖輸送蛋白、解糖系酵素などの遺伝子の転写を誘導することが明らかになっている。したがって、HIF-1 は低酸素環境に対する適応応答のマスター遺伝子と言って過言でない重要な転写因子と考えられる。最近になって、HIF-1 α 蛋白の分解機構について、まず酸素濃度センサーからのシグナルが HIF-1 α 蛋白のリン酸化などの構造変化をおこし、続いて von Hippel-Lindau (VHL) 病の原因遺伝子の産物である VHL 蛋白によってユビキチン化され、最終的にプロテアソームによって分解される機構が提唱されている。著者は、HIF-1 α 蛋白に結合する蛋白を探索することによって HIF-1 α 蛋白の機能を制御する因子を同定できるのではないかと考え、本研究では、酵母を利用する two hybrid system を用いて HIF-1 α 蛋白に結合する蛋白の同定を試みた。候補遺伝子産物については、哺乳動物細胞内での HIF-1 α 蛋白との結合を確認し、その機能についても検討した。

[材料と方法]

1. Two-hybrid 法による HIF-1 α 結合蛋白のスクリーニング：
 - 1) Bait ベクターは、HIF-1 α のアミノ酸 636-826 の部分に相当する cDNA 断片を酵母発現ベクター pAS2C の GAL4 の DNA 結合部と in-frame となるように挿入することにより構築した。Prey ベクターは酵母転写因子 GAL4 の転写活性化部と融合させたヒトリンパ球 cDNA ライブラリーを用いた。
 - 2) 酵母レポーター株 Y190 (レポーター遺伝子: HIS3, lacZ) の bait ベクターによる形質転換
 - 3) TRP・HIS 無添加プレートでの増殖能力の確認と 3AT の至適濃度の決定
 - 4) Bait を発現している酵母コロニー Y190 へのスクリーニング cDNA ライブラリーの導入
 - 5) β -ガラクトシダーゼ活性の検出
 - 6) 酵母からのプラスミド DNA の回収と大腸菌の形質転換
 - 7) Bait DNA と陽性 prey DNA の再導入による結合特異性・再現性の確認
 - 8) 塩基配列の決定
2. 発現ベクターの構築と哺乳動物細胞への導入: FLAG-VBP-1 発現ベクター (pFLAG-CMV-2/VBP-1) および HIF-1 α 発現ベクター (pcDNA3.1hygro/HA-HIF-1 α) を構築し、COS7 細胞に導入した。

3. Western Blot 法：培養細胞から全細胞蛋白質抽出液および細胞質蛋白抽出液と核蛋白抽出液を得た。蛋白抽出液を 7.5%または 14% SDS-PAGE にて分離後、PVDF メンブレンに転写した。Blocking buffer にて非特異的結合を block し一次抗体で標識した。二次抗体と反応させ ECL detection kit を用いて検出した。

4. 免疫沈降法：Protein G sepharose レジンを lysis buffer に懸濁しこれを抗体を入れたチューブに加えローテーターで攪拌した後、蛋白抽出液と混合しローテーターで攪拌した。遠心しレジンを沈殿させ、これを SDS-PAGE と Western Blot 法により分析した。

5. RT-PCR：細胞より TRIzol を用いて全 RNA を抽出し逆転写酵素にて処理し cDNA を得た。これを用いて PCR 法により cDNA の増幅を行った。

[結果]

1. Two hybrid system にて同定された HIF-1 α 蛋白に結合する候補蛋白：

酵母 Two-Hybrid 法により cDNA ライブラリーに対するスクリーニングを行った結果、HIF-1 α 蛋白の分解に関与する VHL 蛋白に結合する蛋白としてクローニングされた VHL binding protein-1 (VBP-1) を含む 21 種 31 個の候補蛋白が得られた。

2. 哺乳動物細胞内での結合の確認：FLAG-VBP-1 発現ベクターと HIF-1 α 発現ベクターが導入された細胞でそれぞれ FLAG-VBP-1 蛋白と HIF-1 α 蛋白が発現していることを確認した。両発現ベクターを同時に導入した細胞では Anti-HIF-1 α antibody にて免疫沈降した蛋白中に VBP-1 蛋白が認められた。

3. VBP-1 強制発現後の HIF-1 制御遺伝子発現：低酸素誘導遺伝子である糖輸送蛋白 Glut-1 と解糖系酵素 aldolase A のいずれにおいても、親株と vector 導入株では低酸素下で遺伝子発現が亢進したが、VBP-1 導入株では低酸素下での発現亢進が認められなかった。

4. VBP-1 強制発現後の HIF-1 α 蛋白発現：正常酸素分圧下および低酸素分圧下いずれにおいても核蛋白および細胞質蛋白の両方で、導入した HIF-1 α の蛋白の発現量が VBP-1 導入によって著しく減少し、さらに低酸素分圧下では endogenous な HIF-1 α 蛋白発現量も VBP-1 導入によって減少した。

[考案] 低酸素応答の主要な制御因子である低酸素誘導転写因子 (HIF-1) のサブユニット HIF-1 α はユビキチン化・プロテアソーム分解系によって制御されており、VHL の遺伝子産物はその oxygen dependent degradation domain に直接結合することがユビキチン化の最初のステップとなるとされている。

今回著者が同定した HIF-1 α 結合蛋白である VBP-1 は、1996 年に VHL 蛋白に結合する蛋白として報告されたが、その後その機能については明らかにされないままとなっていた。VBP-1 が HIF-1 α 蛋白と VHL 蛋白の両者に結合することから細胞内蛋白のユビキチン化において標的蛋白 HIF-1 α とユビキチン化酵素蛋白 VHL 蛋白との結合を促進する足場蛋白質として HIF-1 α の分解を促進している可能性が考えられた。VBP-1 を強制発現すると HIF-1 α 蛋白の発現量が減少するという結果は、VBP-1 が HIF-1 α 蛋白の分解を促進する働きを示していることを示しており、著者の仮説と矛盾しない結果と考えられた。現在は、VHL 蛋白を欠損している細胞において VBP-1 を強制発現させることにより HIF-1 α 蛋白の発現がどのような影響を受けるのかを検討している。今回の研究結果から、VBP-1 が HIF-1 α 蛋白の分解に何らかの関与をしている可能性が示唆されたが、VBP-1 のどの部位が HIF-1 α 蛋白および VHL 蛋白と結合するのか、VBP-1 の強制発現により HIF-1 α 蛋白のユビキチン化が促進することなど、今後確認すべき課題も数多く残されている。

[結語] VHL binding protein-1 (VBP-1)が HIF-1 α 蛋白にも結合することが判明した。VBP-1 蛋白は、VHL 蛋白と HIF-1 α 両者に結合する能力を持ち VHL 依存性もしくは非依存性に HIF-1 α 蛋白の分解を促進している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 細 川 眞 澄 男

学位論文題名

低酸素誘導転写因子 (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) に結合して機能を制御する因子の同定

生体内においては全身の細胞が血管を通じて酸素や栄養素の供給を受けているため、時に血管の狭窄や閉塞が起こるとその血管の下流にある細胞は酸素不足や栄養不足に曝される。また癌組織では血管の構築が異常であるために、正常組織と比較して低酸素環境にあると考えられている。細胞が低酸素に曝されると、低酸素誘導転写因子 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) を構成するHIF-1 α 蛋白の分解が阻害されて、低酸素適応応答に関連したさまざまな遺伝子の転写を誘導することが明らかになっている。したがって、HIF-1は低酸素環境に対する適応応答のマスター遺伝子と言って過言でない重要な転写因子と考えられる。申請者は、HIF-1 α 蛋白の機能を制御する因子を同定するために酵母two-hybrid法を用いてHIF-1 α 蛋白に結合する蛋白の同定を試みた。また候補遺伝子産物のひとつVBP-1について哺乳動物細胞内でのHIF-1 α 蛋白との結合を確認し、その機能について検討した。HIF-1 α のアミノ酸636-826の部分に相当する cDNA 断片を用いて構築したbaitベクター、preyベクターとしてヒトリンパ球cDNAライブラリー、酵母レポーター株Y190 (レポーター遺伝子: HIS3, lacZ) を用いて酵母two-hybrid 法によるスクリーニングを行った。その結果、21種31個の候補蛋白が得られた。そのうちHIF-1 α 蛋白の分解に関与するVHL蛋白に結合する蛋白として同定されたが、その機能が明らかにされていないVHL binding protein-1 (VBP-1) に着目した。哺乳動物細胞発現ベクターとしてFLAG-VBP-1発現ベクターおよびHIF-1 α 発現ベクターを構築し、COS7細胞に導入した。両発現ベクターを同時に導入した細胞では抗HIF-1 α 抗体にて免疫沈降した蛋白中にVBP-1が認められた。この結果より、HIF-1 α とVBP-1が哺乳動物細胞内でも結合することが示された。VBP-1の機能を明らかにするために、VBP-1を強制発現させた細胞におけるHIF-1制御遺伝子である解糖系酵素aldolase Aの発現をRT-PCR法により検討した。親株とベクター導入株では低酸素下でaldolase Aの発現が亢進したが、VBP-1導入株では低酸素下での遺伝子発現の亢進が認められなかった。この結果より、VBP-1がHIF-1 α の機能を抑制する可能性が示唆された。この機序として、まず第一にVBP-1がHIF-1 α 蛋白の分解を促進する可能性を検討した。VBP-1を強制発現させた細胞におけるHIF-1 α 蛋白の発現をWestern blot 法により検討した。その結果、低酸素および正常酸素分圧下いずれにおいてもHIF-1 α の蛋白の発現量がVBP-1導入によって著しく減少した。この結果はVBP-1がHIF-1 α 蛋白の分解を促進する可能性を示唆した。以上の結果より次のような考察を行った。1) 酵母two-hybrid法にてHIF-1 α 蛋白に結合する多くの蛋白を同定することができたが、VBP-1以外の蛋白については今後の検討が必要である。2) 低酸素応答の主要な制御因子であるHIF-1のサブユニットHIF-1 α はユビキチン・プロテアソーム分解系によって制御されており、von Hippel-Lindau病の原因遺伝子であるVHL癌抑制遺伝子の遺伝子産物がHIF-1 α に直接結合することがユビキチン化の最初のステップとなるとされている。今回同定

したVBP-1は、ユビキチン・プロテアソーム蛋白分解系における標的蛋白HIF-1 α とユビキチン酵素蛋白VHLの両者に結合することから足場蛋白質として働く可能性が考えられた。3) VBP-1を強制発現するとHIF-1 α 蛋白の発現量が減少することより、VBP-1がHIF-1 α 蛋白の分解を促進する働きをしていることが示唆された。

公開発表にあたり、副査浅香正博教授より、1) 酵母two-hybrid法においてbaitとしHIF-1 α 636-826の部分を用いた理由、2) 正常酸素分圧下と低酸素分圧下でのaldolase A発現量の差の再現性、3) 癌の種類、正常組織との間でのVBP-1発現の差、4) 遺伝子治療への応用の可能性、5) VBP-1の強制発現によるendogenousなHIF-1 α 蛋白量の変化について、副査西村正治教授より、1) 今回の実験の結果は生理的な条件下でも働いているのか、さらに今後の展望、2) VBP-1の低酸素下での動向、3) VBP-1がHIF-1 α のregulatorとして働いている可能性、4) VBP-1の強制発現により低酸素下で逆にaldolase Aの発現が低下している理由、5) HIF-1 α 蛋白発現の時間経過、6) HIF-1 α mRNAの正常酸素、低酸素下での発現の変化について、副査細川眞澄男教授より、1) 教室で初めてtwo-hybrid法を行った感想とその有用性、2) スクリーニングで得た21種の候補遺伝子産物のうち、VBP-1以外に興味のある蛋白、3) VBP-1をregulateする因子についての質問があり、最後に、主査今村が、低酸素でのHIF-1 α 蛋白の分解、HIF-1 α 蛋白のpositive regulatorの候補などについて質問した。申請者はこれらの質問に、自らの実験経験および、これまで学習した知識を駆使して適確にしかも明確に回答した。

本研究の成果は、低酸素環境に対する適応応答のマスター遺伝子であるHIF-1 α の機能を制御する多くの候補蛋白を同定したこと、そのひとつVBP-1がHIF-1 α 蛋白の分解に関与する可能性を示唆したこと、また、今後VBP-1が低酸素、低栄養という厳しい環境に適応している癌の制御に利用される可能性を提示した点で、高く評価される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程にける研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位に受けるのに十分な資格を有するものと判定した。