

SUMO リガーゼ PIAS3による HIF-1 α の転写活性制御

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

細胞は酸素濃度の低下にさらされると様々な遺伝子の発現を活性化させ、恒常性の維持に働く。低酸素適応応答の最も重要な制御因子は、転写因子 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)で、HIF-1 は低酸素により活性化され、血管新生因子、解糖系酵素、糖輸送体などの様々な遺伝子の発現を亢進させる。正常酸素濃度では、HIF-1 α はプロリン水酸化を介して、ユビキチン-プロテアソーム系により分解されるが、低酸素下では水酸化が進まず、ユビキチン化を逃れ安定化して活性化する。HIF-1 の転写活性は HIF-1 α の安定性の制御以外に、様々な翻訳後修飾によっても制御され、そのひとつとして SUMO (small ubiquitin-related modifier) 化修飾が報告されており、SUMO 化修飾により HIF-1 α の安定性や転写活性が影響を受ける。SUMO はユビキチン様タンパク質の一つで、ユビキチン化が主に分解のシグナルとして機能するのに対し、SUMO 化修飾はタンパク質の安定化や細胞内局在の制御、転写活性の制御、立体構造の変化による酵素活性制御など標的タンパク質の機能変換に関与する。SUMO はユビキチンと同様の E1、E2そして E3 (リガーゼ) 様酵素の働きにより修飾反応が行われる。SUMO-1 の E3 様酵素として PIAS ファミリー、RanBP2、Pc2 などが報告されている。PIAS (protein inhibitor of activated STAT) ファミリーは、様々な転写因子と相互作用し転写活性調節に関与しており、その RING finger ドメイン依存的に SUMO 化修飾を促進し E3 様酵素活性を発揮する。PIAS ファミリータンパク質には現在 PIAS1、PIAS2 α (PIASx α /ARIP3)、PIAS2 β (PIASx β /Miz1)、PIAS3、PIAS4 (PIASy) の 5 種類が報告されている。これまで、HIF-1 α の SUMO 化修飾の E3 様酵素として RanBP2/Nu538 が報告されているが、PIAS ファミリーについては明らかではない。本研究では、PIAS が、HIF-1 α の SUMO 化修飾およびその転写活性にどのように影響を与えるかについて明らかにする目的で、PIAS ファミリーの中で、特に様々な組織で広く発現している PIAS3 について中心に検討し、低酸素適応応答での役割につき解析した。

【実験と結果】

- 1 ヒト骨肉種細胞株 U2OS への遺伝子導入系を用いて、HIF-1 α と PIAS ファミリー (PIAS1、2 α 、3 および 4) の結合性を免疫沈降・ウェスタンブロットティングにより解析した結果、いずれの PIAS ファミリータンパク質とも結合が認められた。
- 2 U2OS 細胞において HIF-1 α 欠変異体と PIAS3 との結合性を免疫沈降法により解析した結果、HIF-1 α の ODD ドメインと主要な SUMO 化修飾部位を含む、311-603 aa の部位で PIAS3 との最も強い結合が認められた。

3 PIAS3がHIF-1 α のSUMO化修飾に対するE3様酵素活性を示すか否かを検討するため、ヒト胎児腎臓細胞株 HEK293 への遺伝子導入系を用いて、免疫沈降・ウェスタンブロット解析を行った。PIAS3はRING fingerドメイン依存的にHIF-1 α のSUMO化修飾を促進した。

4 pVHLとHIF-1 α の結合に対するPIAS3の影響を調べるため、U2OS細胞において免疫沈降・ウェスタンブロット解析を行った。PIAS3によるHIF-1 α のSUMO化の増強は、HIF-1 α とpVHLの結合には影響しなかった。

5 U2OS細胞および293細胞において、エリスロポエチン遺伝子由来のhypoxia response element (HRE)を持つレポーターベクターを用いたルシフェラーゼアッセイを行った。各PIASファミリータンパク質の共発現によりHIF-1 α の転写活性の上昇が認められた。

6 ルシフェラーゼアッセイにより、PIAS3によるHIF-1 α の転写活性化にはPIAS3のRING fingerドメインが必要であることが示された。

7 U2OS細胞および293細胞においてsiRNAを導入し内在性PIAS3の必要性につき検討した。RT-PCR、ウェスタンブロットでPIAS3の発現抑制を確認した。また、HIF-1 α の転写活性は減少したがHIF-1 α タンパク質量は約1.4倍の上昇が観察された。HIF-1の代表的な標的遺伝子である、VEGF、adrenomedullin、aldolase C、GLUT-1の4つ遺伝子の低酸素下での発現をreal-time PCR法にて解析した。いずれの標的遺伝子も低酸素下で発現亢進し、また、PIAS3の発現抑制により減少した。以上より、内在性のPIAS3がHIF-1 α の転写活性化・標的遺伝子の発現に影響を与えることが確認された。

【考察】

腫瘍細胞は生体内で低酸素環境にさらされており、HIF-1 α 依存的に低酸素下で発現亢進する遺伝子は、腫瘍の増殖・転移に重要な役割を担っていると考えられる。本研究では、HIF-1 α の転写活性制御におけるSUMO-E3様酵素PIASの役割を、PIAS3を中心に検討した。

PIAS3は、HIF-1 α の主要SUMO化修飾部位を含む311-603aaの領域を介して結合し、また、RING fingerドメイン依存的にHIF-1 α のSUMO化修飾を促進することから、PIAS3はHIF-1 α のSUMO化修飾におけるE3様酵素として働いていると考えられる。さらに、PIAS3はHIF-1 α の転写活性を増強させるが、その増強にもPIAS3のRING fingerドメインが必要であり、詳細な機能は不明なものの、HIF-1 α のSUMO化修飾の促進が転写活性の増強に関与していることを示唆する。また、siRNAによりPIAS3を発現抑制したところ、HIF-1 α の転写活性は抑制され、その標的遺伝子であるVEGF、adrenomedullin、aldolase C、GLUT-1の発現抑制が示されたため、内在性のPIAS3がHIF-1 α の活性に必要であることが示唆された。PIAS3以外のPIASファミリーも補完的に同様の働きをしている可能性が考えられ、PIAS3以外のPIASファミリーのノックダウンの検討や同時ノックダウン、その条件等の検討が必要である。

【結語】

今回の検討によりPIAS3によるHIF-1 α の活性化は、低酸素環境下におけるHIF-1 α を中心とした適応応答の中で重要な役割を担っていると考えられた。HIF-1 α は腫瘍環境において低酸素応答の中心的役割を担っており、HIF-1 α およびその標的遺伝子の制御の解明は、今後の抗腫瘍治療においても重要である。HIF-1 α のSUMO化修飾に関しては、不明な点も多く、今後さらなる研究が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 高 岡 晃 教
副 査 教 授 武 蔵 学

学位論文題名

SUMO リガーゼ PIAS3による HIF-1 α の転写活性制御

HIF-1 の転写活性は様々な翻訳後修飾によって制御され、そのひとつとして SUMO (small ubiquitin-related modifier) 化修飾がある。SUMO-1 の E3 リガーゼの1つとして PIAS ファミリーが報告されており、本研究では、PIAS が SUMO 化の E3 リガーゼとして、HIF-1 α の SUMO 化修飾およびその転写活性にどのように影響を与えるかについて、特に様々な組織で広く発現している PIAS3 について中心に検討した。

本研究では HIF-1 α と PIAS の結合を確認し、また、PIAS3 は、RING finger ドメイン依存的に HIF-1 α の SUMO 化修飾を促進することから、PIAS3 は HIF-1 α の SUMO 化における E3 リガーゼとして働くことを示した。さらに、PIAS3 は RING finger ドメイン依存的に HIF-1 α の転写活性を増強させ、SUMO 化修飾の促進により転写活性が増強されることが示された。また、siRNA による PIAS3 を発現抑制により HIF-1 α の転写活性は抑制され、その標的遺伝子である VEGF、aldorase C、GLUT-1 の発現抑制が示されたため、内在性の PIAS3 が HIF-1 α の活性に必要なことが示唆された。

公開発表では、学位論文内容発表の後、副査畠山鎮次教授より、今回の実験では組み替えタンパク質を用いた *in vitro* の反応系でも確認しているか、HIF-1 α の SUMO 化バンドが複数見られるのは poly SUMO 化なのか、PIAS3 の RING finger ドメイン変異体でも転写活性が上昇する理由についての質問があった。申請者はそれに対し、*in vitro* 系の実験はしておらず、検討が必要であると答え、HIF-1 α の SUMO 化バンドが多数見られる理由は SUMO-1 は SUMO-2, 3 と異なり poly SUMO 化しないことから、プロテアソーム阻害剤によるユビキチン化のバンドが見られているのではないかと述べた。また、PIAS3 の変異体でも転写活性が上昇するのは SUMO 化が関与しない経路での働きを有する可能性について述べた。

次いで副査高岡晃教教授より、今回の研究で特に PIAS3 に着目した理由、PIAS3 の HIF-1 への作用に STAT3 が関与するか、SUMO 化阻害剤などを用いた実験をしたかどうかについての質問があった。申請者はそれに対し、PIAS3 が特に幅広い組織での発現が確認されていること、PIAS ファミリーのうち PIAS3 が HIF-1 への結合性が高く、転写活性を有意に上昇させる結果を得たことから、PIAS3 に注目したと述べた。また、STAT3 に関する実験は行っていないが、STAT3 が HIF-1 系に影響を及ぼしている可能性はあり今後検討が必要であると答えた。また、*in vivo* に作用する SUMO 化の阻害剤はまだないが、SUMO 修飾を抑制した状態でも同様の結果を得られるかどうかは、今後の課題であると述べた。

次いで副査武蔵学教授より、PIAS3 が HIF-1 α を制御する一方 STAT3 を抑制するが何か関係はあるのか、本研究から得られた知見を臨床にどう応用していくのかについての質問があった。申請者はそれに対し、今回は STAT3 に関する実験は行っていないが PIAS3 が

SUMO 化を介して STAT3 を制御している可能性もあり、影響している可能性はあると述べた。また、PIAS3 は STAT3 をはじめ様々な因子に対して影響を及ぼすので治療の直接のターゲットとしては難しいが、HIF-1 の活性を抑制することは癌治療のターゲットになってきており、その観点から考えると PIAS3 と HIF-1 の結合阻害や HIF-1 の SUMO 化の阻害法を開発することができれば治療に応用できるかもしれないと述べた。

最後に主査浅香正博教授より、今後どうすれば臨床に応用していけるのかについての質問があった。申請者はそれに対し、本研究では、SUMO 化がどのような機構で HIF-1 の活性化をもたらしているのかは不明であり、その機構が解明できれば、HIF-1 の活性化を制御し、治療のターゲットに出来るかもしれないと述べた。

この論文は、PIAS3 が SUMO の E3 リガーゼとして HIF1 α の SUMO 化修飾に働くことを初めて示し、HIF1 α の転写活性を上昇させることを示した。また、HIF1 α の活性化には PIAS による SUMO 化修飾が必要であることが示唆され、低酸素環境下における PIAS の役割につき更なる解析を行うことで、腫瘍環境に対する臨床応用可能な新たな知見をもたらす可能性が示唆され、今後の発展が期待される。

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