

## 論 文 要 旨

### Major vault protein forms complexes with hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ and reduces HIF-1 $\alpha$ 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 $\alpha$  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 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  から構成される。HIF-1 $\beta$  は細胞内に恒常的に発現しているが、HIF-1 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$ 、MVP、PHD2、pVHL、GAPDH、p38 の発現は immunoblot 法により、HIF-1 $\alpha$  mRNA、VEGF mRNA の発現は real-time PCR 法により解析を行った。HIF-1 $\alpha$  のユビキチン化は、ACHN 細胞に HIF-1 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$ 、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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  タンパク質レベルの上昇が見られた。CoCl<sub>2</sub> 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$*  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 $\alpha$*  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  に加えて、HIF-1 $\alpha$  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 とも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 $\alpha$  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 $\alpha$  タンパク質レベルを上昇させること、(2) MVP の knockdown は *HIF-1 $\alpha$*  mRNA レベルには影響を与えないが、HIF-1 $\alpha$  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 $\alpha$ 、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 $\alpha$  分解経路において molecular scaffold として機能することで、HIF-1 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  レベルを負に制御するという新知見も HIF-1 $\alpha$  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。