

様式3

令和2年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

令和3年3月1日

国立大学法人愛媛大学  
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関：日本医科大学先端医学研究所

部局・職名：病態解析学部門(分子細胞構造学分野)・教授

氏名：福原 茂朋

1. 研究課題

新規血管新生制御分子 CUL3/KCTD10 の in vivo 解析

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 福原 茂朋	日本医科大学先端医学研究所 病態解析学部門 (分子細胞構造学分野)	教授	研究全体の統括。特にその中でも血管内皮細胞特異的に KCTD10 遺伝子をノックアウトさせる遺伝子改変マウスの作成および表現型評価
研究分担者 坂上 倫久	愛媛大学 プロテオサイエンスセンター細胞増殖・腫瘍制御部門	講師	血管内皮細胞特異的 KCTD10 遺伝子欠損マウスの作成およびその表現型評価を推進。また血管内皮細胞を用いた CUL3/KCTD10 軸の血管新生における役割解明

3. 研究成果

別紙のとおり

【研究課題名】

新規血管新生制御分子 CUL3/KCTD10 の *in vivo* 解析

【研究者所属・職】

日本医科大学 先端医学研究所 病態解析学部門分子細胞構造学分野 教授

【氏名】

福原茂朋

【研究目的】

血管新生制御における CUL3-KCTD10 複合体の機能を明らかにする。

【研究内容】

- ・ Floxed KCTD10 マウス (C57BL/6-Kctd10<sup><tm1855\_3.1Arte></sup> Tg (タコニック社より購入) および VE-cadherin CreERT2 マウス (C57BL/6-Tg(Gdh5-CreERT2) 慶應義塾大学 久保田義顕教授より譲渡) を交配し、タモキシフェン誘導型血管内皮細胞特異的 KCTD10 ノックアウトマウスの作製を試みた。
- ・ CUL3 または KCTD10 を発現抑制した血管内皮細胞 HUVEC を用いて、その内皮細胞機能としての表現型を *in vitro* で解析した。

【研究成果】

- ・ Floxed KCTD10 ヘテロマウスと VE-cadherin CreERT2 マウスを交配し、Floxed KCTD10 ヘテロ;VE-cadherin CreERT2 マウスを得る予定としていたが、得られる個体数が著しく少なく、未だ解析に至っていない。再度、体外受精を試みたが、採卵数に異常を認めないものの、受精率が 2.5% (通常 60%程度) と異常値を示していた。従って、十分な個体数の確保に多大な時間を要している。
- ・ 蛍光免疫染色の結果、CUL3 および KCTD10 は血管内皮細胞において特定の核近傍の細胞内小器官において共局在性を示したが、CUL3 との結合に必須である BTB ドメインを欠損させた KCTD10 を過剰発現したものでは共局在性は認められなかった。また、コムギ無細胞合成系を用いて作成した 2 万タンパク質ライブラリーをベースとした KCTD10 結合タンパク質のスクリーニング解析の結果、CUL3-KCTD10 軸が標的とする新たな基質候補を複数同定することに成功した。さらに、基質候補遺伝子に対しては siRNA ライブラリーを作成し、CUL3 または KCTD10 欠損による血管新生阻害としての表現型をレスキューする siRNA を絞り込むことにも成功した。

【成果発表】

なし

【今後の課題】

- ・ 現在繁殖・飼育中の Floxed KCTD10 マウスは受精率の低さが問題となっており、解

析に必要な十分な個体数を得ることが難しい状況にある。今後、さらにこの状況が継続するようであればゲノム編集技術を用いて新たに floxed KCTD10 マウスの作成も視野に入れ、KCTD10 解析研究を推進させる。

- ・ CUL3-KCTD10 の新たな結合基質候補タンパク質については、in vitro ubiquitination assay を用いて、ユビキチン化の確認およびユビキチン化を受けるアミノ酸残基の同定を行う。これらの研究により同定した標的基質は、将来的には、KCTD10 ノックアウトマウスにおける標的基質タンパク質の血管内皮細胞内蓄積とその生理的意義について明らかにする予定である。