

「生命システムの動作原理と基盤技術」

平成 19 年度採択研究代表者

中山 敬一

九州大学生体防御医学研究所・教授

ユビキチンシステムの網羅的解析基盤の創出

1. 研究実施の概要

タンパク質の翻訳後修飾は生命現象の制御に本質的であり、きわめて重要である。しかし翻訳後の修飾については、現在われわれが持つゲノム情報からは予想できず、網羅的な理解は期待できない。そこで、タンパク質修飾プロファイルの網羅的解析技術の創出が強く求められている。特にタンパク質のユビキチン化はあらゆる生命現象に関わるタンパク質の量的・質的制御機構であるが、その全体像を解明しようとする試みはほとんど成功していない。本研究課題では、ユビキチンシステムを網羅的に解析できる新たな基盤技術の創出を目標に、発生工学技術とプロテオミクス技術を組み合わせたリバース・プロテオミクス (RPX) 法およびインタラクション・プロテオミクス (IPX) 法を開発し、双方向的なタンパク質翻訳後修飾の網羅的解析基盤を確立することを目指す。同時にリン酸化プロテオミクスについても同じ方法論の応用を行う予定である。

われわれは 8 台の質量分析計を擁し、世界で初めてヒトにおけるユビキチンプロテオームを発表した。また定量的プロテオミクスを行うために、ディファレンシャル・プロテオミクスの方法について SILAC 法や iTRAQ 法など最先端の方法を取り入れ、発生工学的なアプローチとプロテオミクスのなアプローチを合体させる研究を行ってきた。

本研究はまだ始まって半年足らずであり、目に見える大きな進捗はないが、本研究の基礎である多くのユビキチンリガーゼノックアウトマウスを作製し、その解析を行うことによって、その生物学的役割を明らかにしてきた。またリバース・プロテオミクス (RPX) 法およびインタラクション・プロテオミクス (IPX) 法に関して多くの基礎検討を行っただけでなく、この課題の発展系であるリン酸化プロテオミクスについてもいろいろと検討を行い、この方法の実用化への道は着実に進みつつある。

本研究によって多様な生体機能分子の量的・質的制御メカニズムの解明が飛躍的に促進され、さらに創薬やバイオテクノロジーなどの多くの産業分野にとっても重要なイノベーション創出につながる事が期待される。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

本年度は、本研究計画の基礎となるいくつかのユビキチンリガーゼノックアウトマウスを作製し、解析を行った。また以前に作製したノックアウトマウスの各臓器における詳細な検討も併せて施行した。主な結果は下記の通りである。

まず SCF 型ユビキチンリガーゼである Fbw7 のコンディショナルノックアウトマウスを作製した(1,2)。Fbw7 はサイクリン E や Notch を標的とすることが示唆されていたが、個体レベルでどのような機能を有しているかは不明であった。そこでわれわれはマウス Fbw7 遺伝子を破壊した場合にどのような異常が生じるかを検討したが、Fbw7 ノックアウトマウスは胎生中期(胎生 10.5~11.5 日)で死亡し、十分な細胞周期解析ができないため、われわれはコンディショナルノックアウトマウスを作製することとした。

われわれは哺乳類で最も細胞分化の研究が進んでいる T リンパ球において、特異的に Fbw7 を欠失させ、どのように分化特異的な細胞周期制御が影響されるかを検討した(1)。T リンパ球は胸腺内において CD4-8-(DN)→CD4+8+(DP)→CD4+8-/CD4-8+(SP)という分化段階を経て成熟していくが、細胞が激しく増殖するのは DN 後期に限られ、DP 以降は細胞周期は停止する。われわれは c-Myc のユビキチン依存性分解を促進する F-box タンパク質である Fbw7 の T 細胞系列におけるコンディショナルノックアウトマウスを作製したところ、胸腺が腫大していることを発見した。さらに FACS 解析の結果、DP の比率が特異的に増加していることを見出した(1)。

そこで細胞の絶対数を計算してみると、やはり DP 細胞の数が正常の 2 倍程度増加していることが明らかとなった。しかし SP 細胞の数は増加していなかった。BrdU の取込み実験を行うと、DN では Fbw7 の有無にかかわらずその増殖率は高いが、DP では本来細胞周期が停止するべきところ、Fbw7 が欠損していると細胞周期が停止せず、増殖を続けることが判明した(1)。

次にわれわれは、この DP 期における細胞周期停止異常のメカニズムを調べた。ウェスタンブロッティング法により、Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスの DP では c-Myc と Notch の異常発現が観察された(1)。

そこで Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスと RBP-J コンディショナルノックアウトマウスまたは c-Myc コンディショナルノックアウトマウスを交配させて、それぞれダブルコンディショナルノックアウトマウス($Fbw7^{fllox/fllox}; RBP-J^{fllox/fllox}$; CD4-Cre または $Fbw7^{fllox/fllox}; c-Myc^{fllox/fllox}$; CD4-Cre)を作製した。RBP-J は Notch の転写活性化に必要な協同分子であり、その欠損は 4 つの Notch ファミリーメンバー全ての機能を不活化する。この実験の結果、Notch の欠失によっても Fbw7 欠損における増殖過剰の表現型は認められることから、これらの異常は Fbw7 による Notch の分解異常とは関係ないと結論された。一方で c-Myc の欠失は Fbw7 欠損における増殖過剰の表現型を打ち消すことから、この増殖過剰状態は c-Myc の分解過程に異常を来した結果であると考えられた(1)。

しかしながら、Fbw7 が欠損した状態でも、成熟 T 細胞になると細胞周期が停止するようになる。この原因を調べるために、Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスの T 細胞を抗原刺激し、細胞周

期を回転させてみたが、細胞周期の進行は G1-S 期においてブロックされていた。同時に c-Myc の増加とそれに反応して p53 の誘導が確認された。p53 の誘導は細胞周期を G1-S 期で停止させ、アポトーシスを増加されることが予想され、Fbw7 欠損 T 細胞の表現型と一致する。そこでこの仮説を検証するため、Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスと p53 ノックアウトマウスを交配して、ダブルノックアウトマウスを作製した (*Fbw7^{fllox/flox}; p53^{-/-}; Lck-Cre*)。すると G1-S 期における細胞周期停止が解除され、アポトーシスが減少した(1)。

このことは、成熟 T 細胞における、未熟細胞と正反対の表現型は、p53 の活性化に因っていることを示している。つまり成熟 T 細胞においては、c-Myc の異常発現が p53 を誘導し、その結果細胞周期停止とアポトーシスの上昇を招くことが明らかとなった。このことから、Fbw7 の欠失は c-Myc の過剰発現を招き、短期的に細胞周期を回転させるものの、p53 によるチェックポイントが作用して細胞周期は強制的に停止させられることが示唆される(1)。

しかしこのような不安定な状態は、長期間のうちに p53 遺伝子に変異が入ることによって容易に癌化することが予想された。そこでマウスを長期間観察すると、1 年間で約 60% のマウスがリンパ腫によって死亡することが明らかとなった。この経過は比較的ゆっくりとしたものであるが、p53 を欠失させた Fbw7/p53 ダブルノックアウトマウスでは非常に早いリンパ腫の発症を認めたことにより、p53 が腫瘍抑制に関わっていることが明らかとなった。最近ヒトのリンパ腫において Fbw7 の異常が多く報告されており、本研究結果はそのメカニズムを具体的に再現したものである(1)。

さらに骨髄幹細胞において Fbw7 の欠損を起こすため、誘導型ノックアウトマウスを作製した (*Fbw7^{fllox/flox}; Mx1-Cre*) (2)。このマウスは poly(I)poly(C)の投与によってインターフェロン誘導を起こし、その刺激によって発現した Cre が Fbw7 遺伝子の欠損を引き起こすように設計した。骨髄幹細胞で Fbw7 を欠損させると G0 期の細胞が減少し、Fbw7 が G0 期維持に関与していることが明らかとなった。さらにこの骨髄幹細胞は移植実験によって長期骨髄再建能が著しく喪失していることが判明した。つまり Fbw7 による G0 期維持は幹細胞としての機能に重要な役割を持っていることが示唆された(2)。

その他、Skp2 等多くのノックアウトマウスの詳細な解析を行い、その生物学的役割を明らかにした(3-10)。

またユビキチンプロテオミクス(11)やリン酸化プロテオミクス(12)の応用による成果も出始めている。

3. 研究実施体制

(1)「プロテオミクス」グループ

①研究分担グループ長: 中山 敬一(九州大学、教授)

②研究項目

・ユビキチンシステムのプロテオミクス解析

RPX 及び IPX の基盤技術を確立し、ジェネティクスグループが作製したノックアウトマウスを用いて、実際にこれらの方法を応用する。RPXとIPXの組み合わせによって得られた基質候補分子に対して、バリデーションスタディを行い、最終的に情報生物学的解析を行う。

(2)「ジェネティクス」グループ

①研究分担グループ長: 中山 啓子(東北大学、教授)

②研究項目

・ユビキチンリガーゼノックアウトマウスの作製・解析

生物学的に重要と思われるユビキチンリガーゼ (E3) に対してノックアウトマウスの作製を行い、その表現型を詳細に解析する。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. Onoyama, I., Tsunematsu, R., Matsumoto, A., Kimura, T., de Alboran, I.M., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Conditional inactivation of Fbxw7 impairs cell-cycle exit during T cell differentiation and results in lymphomatogenesis. *J. Exp. Med.*, 204: 2875-2888 (2007).
2. Matsuoka, S., Oike, Y., Onoyama, I., Iwama, A., Arai, F., Takubo, K., Mashimo, Y., Oguro, H., Nitta, E., Ito, K., Miyamoto, K., Yoshiwara, H., Hosokawa, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Hayashi, Y., Matsuzaki, Y., Nakayama, K., Ikeda, Y., Hata, A., Chiba, S., Nakayama, K.I., Suda, T.: Fbxw7 acts as a critical failsafe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev.*, in press. (2008).
3. Zhong, L., Georgia, S., Tschen, S.I., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Bhushan, A.: Essential role of Skp2-mediated p27 degradation in growth and adaptive expansion of pancreatic beta cells. *J. Clin. Invest.*, 117: 2869-2876 (2007).
4. Song, M.S., Song, S.J., Kim, S.J., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Lim, D.S.: Skp2 regulates the antiproliferative function of the tumor suppressor RASSF1A via ubiquitin-mediated degradation at the G₁-S transition. *Oncogene*, 1210971 (2007 Dec 10) . (2007).
5. Chen, Q., Xie, W., Kuhn, D.J., Voorhees, P.M., Lopez-Girona, A., Mendy, D., Corral, L.G., Krenitsky, V.P., Xu, W., Moutouh-de Parseval, L., Webb, D.R., Mercurio, F., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Orłowski, R.Z.: Targeting the p27 E3 ligase SCF^{Skp2} results in p27- and Skp2-mediated cell cycle arrest, and activation of autophagy. *Blood*, in press. (2008).
6. Shirane, M., Ogawa, M., Motoyama, J., Nakayama, K.I.: Regulation of apoptosis and neurite extension by FKBP38 is required for neural tube formation in the mouse. *Genes Cells*, in press. (2008).

7. Ueyama, C., Akashiba, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Nishiyama, N., Matsuki, N.: Ablation of p27 enhance kainate-induced seizure and hippocampal degeneration. *Neuroreport*, 18: 1781-1785 (2007).
8. Wakeyama, H., Akiyama, T., Takahashi, K., Amano, H., Kadono, Y., Nakamura, M., Oshima, Y., Itabe, H., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Nakamura, K., Tanaka, S.: Negative feedback loop in the bim-caspase-3 axis regulating apoptosis and activity of osteoclasts. *J. Bone. Miner. Res.*, 22: 1631-1639 (2007).
9. Kawakubo, T., Okamoto, K., Iwata, J., Shin, M., Okamoto, Y., Yasukochi, A., Nakayama, K.I., Kadowaki, T., Tsukuba, T., Yamamoto, K.: Cathepsin E prevents tumor growth and metastasis by catalyzing the proteolytic release of soluble TRAIL from tumor cell surface. *Cancer Res.*, 67: 10869-10878 (2007).
10. Shigematsu, N., Fukuda, T., Yamamoto, T., Nishioku, T., Yamaguchi, T., Himeno, M., Nakayama, K.I., Tsukuba, T., Kadowaki, T., Okamoto, K., Higuchi, S., Yamamoto, K.: Association of cathepsin E deficiency with the increased territorial aggressive response of mice. *J. Neurochem.*, in press. (2008).
11. Mukai, A., Mizuno, E., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kitamura, M., Komada, M.: Dynamic regulation of ubiquitination and deubiquitination at the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Sci.*, in press. (2008).
12. Inoue, S.-i., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Doi, M., Shimazaki, K.-i.: Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press. (2008).