

「生命システムの動作原理の解明と活用のための基盤技術の創出」
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とリン酸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、ユビキチン化システムとリン酸化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新方法を開発し、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。

本研究チームは現在 10 台の質量分析計を擁し、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アプローチを合体させる研究を行ってきた。

今年度は、本研究の主たる目標であるユビキチン化酵素の基質を網羅的に探索する技術開発について、特にインタラクション・プロテオミクス (IPX) 法に関して、理論的な研究だけでなく、多くの実験を実施し、技術的には格段の進歩を達成した。まだノイズの除去が完全ではなく、さらなる改良が必要ではあるものの、全般的には技術完成度が高まっており、この技術は近い将来に実用化レベルに達することが期待される。今後は多くのユビキチン化酵素に IPX 法を応用して網羅的に基質を同定し、その生物学的意義を探索していく予定である。同時に他の方法論であるリバー・プロテオミクス (RPX) 法や活性プロテオミクス (ABIES) 法の開発も並行して進めている。

また、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、上記のユビキチン化プロテオミクスと比肩するほどの進歩を得た。特に古典的なリン酸化ペプチド精製法である金属アフィニティー精製は従来精製度が低い方法と信じられてきたが、本研究チームは様々な条件検討を行って、ほぼ 100% の精製度を達成し、非常に網羅性の高いプロテオミクスを行える環境が整ってきた。

また本研究で得られた情報に基づく個別バイオロジーも多くの発展を遂げつつある。

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ことを期待される。

2. 研究実施内容

本年度は、ユビキチン化プロテオミクスとリン酸化プロテオミクスにおいて、ポジティブコントロールとネガティブコントロールにおいて徹底的に条件の最適化を検討した。その結果、特にインタラクシオン・プロテオミクス(IPX)法とリン酸化ペプチド精製法について長足の進歩を得た。主な結果は下記の通りである。

ユビキチン介在性のタンパク質分解機構は、基質分子を特異的に認識し分解する機構として、細胞内タンパク質の量的制御に重要な役割を果たしている。SCF型ユビキチンリガーゼにおいてはF-boxタンパク質が基質特異性を担っており、分解される基質分子に特異的に結合する。現在、約70種類のF-boxタンパク質が知られているが、その大部分は対応する基質分子が同定されていないため、機能未知のまま残されている。本研究チームは、網羅的にF-boxタンパク質の基質分子を同定する方法を開発するために、F-boxタンパク質としてSkp2、その基質分子としてp27を指標とし、プロテオミクス技術を用いて安定にp27が同定できる条件を検討した。Skp2^{-/-}マウス由来の胎仔線維芽細胞ではSkp2の基質分子であるp27やサイクリンEなどの蓄積が見られるが、この蓄積を銀染色により検出することは不可能だった。そこで、本研究チームはSkp2-p27の結合を指標とすることを試みた。野生型Skp2はp27と結合すると、速やかにp27を分解してしまうので、この酵素基質結合を安定的に検出することは困難であった。そこでSkp2のF-boxドメインに変異を導入し、p27と結合できるが分解はできないような状態をつくりあげた。F-box変異型Skp2では、野生型Skp2とは異なり、効率よくp27との結合が検出できた。この変異型Skp2をHeLa細胞に発現させ、免疫沈降産物を質量分析計で測定した結果、p27のペプチドが確認された。

本研究チームはこの方法を用いて、p27以外にも変異型Skp2と共沈降する多数のタンパク質を同定した。これらの中から生理的な基質を判別するために、安定同位体標識を用いた定量的プロテオーム解析法であるSILAC(Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture)法を用いて、野生型Skp2と変異型Skp2の結合タンパク質を定量的に比較した。Skp1等のSCF複合体構成因子やHsp70等のノイズタンパク質のペプチドのピーク強度比は、野生型Skp2と変異型Skp2で同程度であるのに対し、p27などのSkp2基質分子は変異型Skp2において明らかな結合の増加が見られた。われわれは、SILAC法とF-box変異体による免疫沈降法を組み合わせた手法はF-boxタンパク質の基質分子同定に非常に有効な方法であると考え、より効率的に基質分子同定を行うべく解析を進めている。

さらに同様の方法を別のF-boxタンパク質であるFbw7にも応用して、その既知の基質群や未発見の基質を探索できるかどうかを検討した。方法論は上記のSkp2とほぼ同じである。その結果、既知の基質であるc-Mycを同定することができた。この結果により、Skp2とFbw7という二つのF-boxタンパク質において、最も有名な基質であるp27とc-Mycを同定できたことは、それ以外に同定された数十のタンパク質も同様にこれらのF-boxタンパク質の基質である可能性が高い。現在、これを検証している。

一方で、リン酸化プロテオミクスを行う上での技術的な障壁は、リン酸化ペプチドの純度であっ

た。リン酸化ペプチドは非リン酸化ペプチドに対してイオン化効率が格段に劣るため、両者の混合状態ではリン酸化ペプチドの同定効率は極端に悪化する。従来からリン酸化ペプチドの精製に用いられてきた固相化金属アフィニティーカラムクロマトグラフィー(IMAC)法は、簡便であるものの純度が低いという問題があり、大量の不純物(非リン酸化ペプチド)が混入してしまい、上記のようにイオン化効率の劣るリン酸化ペプチドの検出は困難であるという問題点があった。この点を解決するためにIMAC法の実験諸条件を徹底的に最適化し、最終的にはほぼ100%に近い純度を達成した。この改良型IMAC法によるリン酸化ペプチド精製とタンデム質量分析による高感度同定法に安定同位体標識法による定量解析技術と組み合わせることで10000種類以上のリン酸化ペプチドを同定・定量できるシステムを構築した。

本研究チームはこの方法の実用性を検証するために、有糸分裂期(M期)におけるリン酸化プロテオームの解析を行った。M期は染色体凝縮、核膜崩壊、紡錘体形成など細胞周期の中でも最も劇的な変化を伴うステージである。M期の制御機構においてはサイクリンB・Cdc2をはじめ、Auroraキナーゼなどのいくつかのプロテインキナーゼが重要な役割を担っている。しかしながら、これらのキナーゼが如何なる基質をリン酸化することで細胞周期を駆動しているかは、未だ不明な点が多く、既知の基質分子でM期進行の分子機構を十分に説明できるとは言い難い。従って、M期特異的なリン酸化基質分子の網羅的同定はM期における様々な現象を理解するために重要である。そこで本システムを用いて非同調細胞とM期同調細胞間でのリン酸化ペプチドの比較定量を行ったところ、約1000種類のタンパク質がM期においてそのリン酸化が変動していることが判明した。これらの中には、これまでM期においてリン酸化することが知られているタンパク質に加え、新規リン酸化タンパク質も多数同定された。また、バイオインフォマティクスを用いた解析より、これまでM期との関係が示されていなかったいくつかのシグナル伝達経路がM期において制御されている可能性が示唆された。このように、細胞内リン酸化の大規模かつ定量的な解析によって、細胞周期などのリン酸化によって制御されている様々な生命現象の分子機構の全体像を俯瞰することが可能であり、その結果、これまでの知識では予測できなかった、意外な新発見をもたらすことが期待される。

このような網羅的解析技術の確立の過程で、多くの興味深い基質タンパク質が同定されている。その中の一つであるクロマチンリモデリング因子CHD8が癌抑制遺伝子p53の重要な調節因子であることを突き止めた。

p53は細胞の生死を制御する多数の情報を統合しており、細胞内情報の極めて複雑なネットワークの集積点に位置している。p53は癌遺伝子の異常活性化やDNA損傷、酸化ストレスなどの異なった入力情報に応答して、DNA修復や細胞増殖停止、老化、アポトーシスなどの適切な出力プログラムを開始する。特に、細胞が癌化するとp53によるアポトーシスが起り、癌細胞は死滅する。

p53はクロマチンに結合する転写活性化因子であるが、p53による転写活性化は、その大部分がp53の発現量と翻訳後修飾によって制御されていると信じられてきました。しかし最近になって、染色体の立体構造を変化させるいくつかのタンパク質がp53と結合することによってp53の転写活性を調節していることが明らかとなってきた。これらの知見は、染色体の立体構造がp53の転写活性に影響する可能性を示唆するが、染色体構造が変化する仕組みと、それによってどのような結果が起こるのか、そしてそれらが生物にとってどのように大切なのかなどについてはほとんど不明

のまま残されていた。

本研究チームは、CHD8 を培養細胞に強制的に発現させると、p53 によるアポトーシスが起これないという現象を発見した。逆に、CHD8 を減少させると、p53 によるアポトーシスが增加した。CHD8 は p53 に結合するが、さらにヒストン H1 とともに同時に結合することが判明した。つまり CHD8 の存在下では、p53-CHD8-ヒストン H1 という三量体が p53 の標的遺伝子上に形成される。このヒストン H1 の呼び込みは、クロマチンを凝縮させ、p53 の転写活性化能を強く抑制する。

この三量体形成ができないと、p53 が必要以上に活性化され、強いアポトーシスが起これることがノックアウトマウスの研究から明らかとなった。CHD8 ノックアウトマウスでは、胎仔は胚発生初期に広汎なアポトーシスを起こして死亡するが、p53 を同時に欠損させるとこの胚発生停止は著明に改善する。

このように、本研究は CHD8 による新たな p53 制御のメカニズムを解明しました。今まで p53 については、p53 タンパク質の翻訳後修飾による制御がその研究のほとんどを占めていたが、CHD8-ヒストン H1 による強力な抑制は、最終的に p53 が活性化するような修飾状態でもその活性をなくしてしまう新しいタイプの制御であり、アポトーシスに対する“最終抑制機構”と言える。

胚発生早期において、細胞は高速に増殖する。そのため p53 はこの時期に容易に活性化し、結果としてアポトーシスが誘導される危険を伴う。CHD8 の発現量は胚発生初期から中期にかけて非常に高く、それ以降は発現量が激減する。また CHD8 ノックアウトマウスが胚発生初期に p53 依存的なアポトーシスを起こして死亡することは、CHD8 の生物学的役割が胚発生初期において有害なアポトーシスを抑制することであるというモデルを支持する。一方、アポトーシスは器官形成に重要で、これは主に CHD8 の発現レベルが低下する胚発生中期から後期にかけて起こる。このように、CHD8 は胚発生段階特異的にアポトーシス誘導の境界線を制御しているものと考えられる。

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. 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 fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev.*, 22: 986-991 (2008).
2. Inoue, S., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Doi, M., Shimazaki, K.: Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 105: 5626-5631 (2008).
3. Mukai, A., Mizuno, E., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kitamura, N., Komada, M.: Dynamic regulation of ubiquitylation and deubiquitylation at the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Sci.*, 121: 1325-1333 (2008).
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 RAS^{SF1A} via ubiquitin-mediated degradation at the G1-S transition. *Oncogene*, 27: 3176-3185 (2008).
5. 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.*, 105: 1394-1404 (2008).
6. 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*, 111: 4690-4699 (2008).
7. 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*, 13: 635-651 (2008).
8. Agarwal, A., Bumm, T.G., Corbin, A.S., O'Hare, T., Loriaux, M., VanDyke, J., Willis, S.G., Deininger, J., Nakayama, K.I., Druker, B.J., Deininger, M.W.: Absence of SKP2 expression attenuates BCR-ABL-induced myeloproliferative disease. *Blood*, 112: 1960-1970 (2008).
9. Matsumoto, A., Kawamoto, T., Mutoh, F., Isse, T., Oyama, T., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Ichiba, M.: Effects of 5-week ethanol feeding on the liver of aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice. *Pharmacogenet. Genomics*, 18: 847-852 (2008).
10. Sakae, N., Yamasaki, N., Kitaichi, K., Fukuda, T., Yamada, M., Yoshikawa, H., Hiranita, T., Tatsumi, Y., Kira, J., Yamamoto, T., Miyakawa, T., Nakayama, K.I.: Mice lacking the schizophrenia-associated protein FEZ1 manifest hyperactivity and enhanced responsiveness to psychostimulants. *Hum. Mol. Genet.*, 17: 3191-3203 (2008).

11. Ishikawa, Y., Onoyama, I., Nakayama, K.I., Nakayama, K.: Notch-dependent cell cycle arrest and apoptosis in mouse embryonic fibroblasts lacking Fbxw7. *Oncogene*, 27: 6164-6174 (2008).
12. Ohsaki, K., Oishi, K., Kozono, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ishida, N.: The role of β -TrCP1 and β -TrCP2 in circadian rhythm generation by mediating degradation of clock protein PER2. *J. Biochem.*, 144: 609-618 (2008).
13. Kanei-Ishii, C., Nomura, T., Takagi, T., Watanabe, N., Nakayama, K.I., Ishii, S.: Fbxw7 acts as an E3 ubiquitin ligase that targets c-Myb for nemo-like kinase (NLK)-induced degradation. *J. Biol. Chem.*, 283: 30540-30548 (2008).
14. Miranda-Carboni, G.A., Krum, S.A., Yee, K., Nava, M., Deng, Q.E., Pervin, S., Collado-Hidalgo, A., Galic, Z., Zack, J.A., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Lane, T.F.: A functional link between Wnt signaling and SKP2-independent p27 turnover in mammary tumors. *Genes Dev.*, 22: 3121-3134 (2008).
15. Tamamori-Adachi, M., Takagi, H., Hashimoto, K., Goto, K., Hidaka, T., Koshimizu, U., Yamada, K., Goto, I., Maejima, Y., Isobe, M., Nakayama, K.I., Inomata, N., Kitajima, S.: Cardiomyocyte proliferation and protection against post-myocardial infarction heart failure by cyclin D1 and Skp2 ubiquitin ligase. *Cardiovasc. Res.*, 80: 181-190 (2008).
16. Minhajuddin, M., Bijli, K.M., Fazal, F., Sassano, A., Nakayama, K.I., Hay, N., Plataniias, L.C., Rahman, A.: Protein kinase C δ and PI3-kinase/Akt activate mammalian target of rapamycin to modulate NF- κ B activation and ICAM-1 expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 284: 4052-4061 (2008).
17. Lu, Y., Adegoke, O.A., Nepveu, A., Nakayama, K.I., Bedard, N., Cheng, D., Peng, J., Wing, S.S.: USP19 deubiquitinating enzyme supports cell proliferation by stabilizing KPC1, a ubiquitin ligase for p27^{Kip1}. *Mol. Cell. Biol.*, 29: 547-558 (2009).
18. Mitra, P., Ghule, P.N., Deen, M.v.d., Medina, R., Xie, R.-L., Holmes, W.F., Ye, X., Nakayama, K.I., Harper, J.W., Stein, J.L., Stein, G.S., Wijnen, A.J.v.: CDK inhibitors selectively diminish cell cycle controlled activation of the histone H4 gene promoter by p220^{NPAT} and HiNF-P. *J. Cell Physiol.*, 219: 438-448 (2009).
19. Nishiyama, M., Oshikawa, K., Tsukada, Y., Nakagawa, T., Iemura, S., Natsume, T., Fan, Y., Kikuchi, A., Skoultchi, A.I., Nakayama, K.I.: CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nature Cell Biol.*, 11: 172-182
20. Endo, A., Matsumoto, M., Inada, T., Yamamoto, A., Nakayama, K.I., Kitamura, N., Komada, M.: Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitylating enzyme USP36. *J. Cell Sci.*, 122: 678-686 (2009).
21. Lu, Y., Adegoke, O.A., Nepveu, A., Nakayama, K.I., Bedard, N., Cheng, D., Peng, J., Wing, S.S.: USP19 deubiquitinating enzyme supports cell proliferation by stabilizing KPC1, a ubiquitin ligase for p27^{Kip1}. *Mol. Cell. Biol.*, 29: 547-558 (2009).
22. Susaki, E., Nakayama, K., Yamasaki, L., Nakayama, K.I.: Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse model. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U S A, 106: 5192-5197 (2009).
23. Lin, H.K., Wang, G., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Liu, Y., Chan, C.H., Yang, W.L., Erdjument-Bromage, H., Nakayama, K.I., Nimer, S., Tempst, P., Pandolfi, P.P.: Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB. *Nature Cell Biol.*, 11: 420-432 (2009).
 24. Saita, S., Shirane, M., Natume, T., Iemura, S.I., Nakayama, K.I.: Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with VAMP-associated protein (VAP). *J. Biol. Chem.*, in press. (2009).
 25. Yokobori, T., Mimori, K., Iwatsuki, M., Ishii, H., Onoyama, I., Fukagawa, T., Kuwano, H., Nakayama, K.I., Mori, M.: p53-altered FBXW7 expression determines poor prognosis in gastric cancer cases. *Cancer Res.*, in press. (2009).
 26. Matsumoto, M., Oyamada, K., Takahashi, H., Sato, T., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I.: Large-scale proteomic analysis of tyrosine phosphorylation induced by TCR or BCR activation reveals new signaling pathways. *Proteomics*, in press. (2009).

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)