

中山 敬一

九州大学生体防御医学研究所・主幹教授

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 12 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。

昨年度まで、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。しかしこの方法論の欠点はノイズが大きいことであり、厳密なバリデーション研究が求められる。そのため、もう一つの方法であるリバーサ・プロテオミクス(RPX)法を組み合わせることによって、両者の和を取ることで真の基質を同定することを考案している。しかしながら昨年まで RPX の主な方法論と考えていた 2D-DIGE 等の方法は網羅性が十分ではなく、実用に供するには問題が大きいことが本研究の進行にわたる大きな障壁であった。

そこで本年度は発想を全く転換し、RPX を最近開発されたユニークなプロテオミクス法であるターゲット・プロテオミクスで施行する基盤作りを行った。ターゲット・プロテオミクスを行うためにわれ

われは Multiple Reaction Monitoring (MRM 法) と呼ばれる技術を応用し、ヒト全タンパク質のリコンビナントタンパク質作製とそれによる事前情報取得によって、理論的には全てのタンパク質の絶対定量が可能なシステムである Information-based Multiple Reaction Monitoring (IB-MRM 法) を新たに考案し、現在実用化のための基盤開発を行っている。

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事が期待される。

§ 2. 研究実施体制

(1) 「プロテオミクス」グループ (九州大学)

① 研究分担グループ長: 中山 敬一 (九州大学、主幹教授)

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 (東北大学)

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。

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は (4-1) に対応する)

昨年度までは主にインタラクシオン・プロテオミクス (IPX) 法について種々の開発・改良を行い、その技術はほぼ完成した。本年度は、多くのユビキチンリガーゼに対する基質を同定し、それぞれのユビキチンリガーゼや基質の重要性において多くの知見が得られた^{1)~20)}。さらに本研究の一つの柱であるリバース・プロテオミクス (RPX) 法について、従来のディスカバリー・プロテオミ

クスからターゲット・プロテオミクスへと大きな方向転換を行い、その基盤技術である **Multiple Reaction Monitoring (MRM)** 法の確立とより高度な技術開発に取り組んだ。加えてチロシンリン酸化タンパク質の網羅的な解析²¹⁾や新規ヒストン脱メチル化酵素の同定・解析²²⁾等も行った。主な結果は下記の通りである。

われわれを含む世界中のプロテオミクス研究者の大部分が今まで行ってきた2次元電気泳動やショットガン解析を含めた従来の方法は、タンパク質の同定（発見）を主な目的としたディスカバリー・プロテオミクスとみなすことができ、定量情報はあくまで同定結果に付随して取得されてきた。したがって、ディスカバリー・プロテオミクスで微量タンパク質を定量するには必然的に網羅性を上げる必要が出てくる。ここで問題となるのは、ディスカバリー・プロテオミクスにおいて検出タンパク質数（網羅性）とスループットが完全にトレードオフの関係にあることである。検出するタンパク質の数を増やすためには質量分析計による分析の前に試料を様々な方法で分画する必要があり、これを測定するには多大なる時間を要する。また本研究のインタラクション・プロテオミクス(IPX)法のように、ディスカバリー・プロテオミクスを用いた定量解析で変化するタンパク質が発見された場合、さらに検体数を増やしバリデーションを行う必要が出てくる。その場合、目的タンパク質に対する抗体を用いたウェスタン・ブロットやELISA法などの利用が一般的であるが、今日の高感度化されたディスカバリー・プロテオミクスで評価対象として挙がってくるタンパク質は数百に及ぶことも少なくない。各々のタンパク質に対する抗体が市販されていれば、それを購入できるが、必ずしも市販の抗体で十分な特異性と感度が得られるわけではない。抗体が市販されていないような新規タンパク質（場合によってはこちらの方が興味の対象になることが多い）に関しては抗体作製から取り掛かることになり、多大なる時間と労力が必要である。そもそも、抗体を用いて絞り込むのはかかる費用対効果を考えると非効率的である。われわれもインタラクション・プロテオミクス(IPX)法を行った結果、数百の基質候補分子が同定されたが、その中から真の基質を絞り込む作業が現在ボトルネックとなっており、抗体を用いたアッセイに入る前に、その他の方法で絞り込みを行うことが必要となっている。その方法としてわれわれが採用したのはMRM法を用いたターゲット・プロテオミクスである。

MRM法を用いたターゲット・プロテオミクスでは抗体を必要とせず、高い定量性が確保できることから、インタラクション・プロテオミクス(IPX)法のバリデーション研究には最適であると考えられた。そこでその実際の検出感度を測定するために、細胞内のタンパク質濃度が最も低い部類に属するp27というタンパク質をMRM法で検出することをベンチマークとして、種々の技術開発を行った。最終的に、HeLa細胞の全細胞抽出液の消化物をMRM解析したところ、内部標準由来のシグナルに完全に一致して内在性p27^{Kip1}のシグナルが観測され、絶対定量することが可能になった。p27が検出できたことにより、その他多くのタンパク質も同様に検出できる可能性が高い。そこでわれわれは数百の細胞周期制御タンパク質やシグナル伝達分子の定量を行い、信頼できるデータの取得に成功している。

われわれはMRM法の成功によって、それを用いてリバース・プロテオミクス(RPX)法を行う新たな方策を考えついた。MRM法では標的ペプチドのMS/MS情報を用いてMRM-transitionを前もって設定(事前情報の取得)する必要があるため、MRMはショットガン解析のバリデーション用の手段であるとの認識が一般的であった。しかしながら、仮に標品を大規模に(プロテオームワイドに)入手することができれば、それらを用いて事前情報ライブラリーを構築することが可能である。これが実現すれば、あらゆるタンパク質の大規模な絶対定量解析が可能となると思われる。われわれはこの手法をInformation-based Multiple Reaction Monitoring (IB-MRM法)と名づけその実現に向けて要素技術の開発を行っている。これが成功すれば、全てのタンパク質の絶対定量が可能になるため、単にリバース・プロテオミクス(RPX)法に应用できるだけでなく、現代科学の大きな問題であるプロテオーム・プロジェクトの目標である「ヒト完全プロテオーム解読」が実現できる可能性が高い。次年度以降はヒト全タンパク質におけるペプチド情報の事前取得に向けた研究開発を進めていく予定である。

さらにリン酸化プロテオミクスに対しても、本研究チームは独自の技術によって種々の新たな知見を得ている。例えば、チロシンリン酸化の網羅的解析技術についてはほぼ完成し、リンパ球(T細胞、B細胞)と非リンパ球(HEK293T細胞)において、免疫レセプター刺激(TCRおよびBCR刺激)や非特異的チロシンリン酸化(過酸化水素・バナジン酸処理)を行い、細胞特異的なチロシンリン酸化経路や刺激特異的なチロシンリン酸化経路を発見した²¹⁾。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ヒストン脱メチル化酵素KDM7が神経発生・分化の重要な調節因子であることを突き止めた²²⁾。

ヒストンのメチル化は近年遺伝子発現調節のエピジェネティックマークとして最も重要と考えられているタンパク質翻訳後修飾である。特にヒストンH3の4番、9番、27番のリジン残基(K4、K9、K27)は転写調節に特に重要な役割を果たすことが知られている。一般的な理解としては、K4メチル化は遺伝子発現を活性化し、逆にK9とK27のメチル化は遺伝子発現を抑制することが多くの生化学的・遺伝学的研究から明らかにされている。われわれが同定したKDM7はJmJcドメインを有する一群のヒストン脱メチル化酵素群の一つであるが、その発現は特に神経細胞に高いことが知られていた。われわれはこのKDM7の生化学的性質を調べているうちに、KDM7がK9とK27の脱メチル化を同時に起こす「二重脱メチル化酵素」であることを発見した。先に述べたように、K9とK27のメチル化は遺伝子発現を抑制する最も重要な修飾であるので、KDM7はその両者に対抗する強力な「サイレンシングマーク消去因子」である可能性が高いと考えられた。

そこでわれわれは神経細胞のマイクロアレイ解析によってKDM7の発現を抑制すると遺伝子発現が低下するような遺伝子を網羅的に探索し、その中心的な標的としてFollistatinを発見した。FollistatinはTGF-βファミリーメンバーの抑制因子であり、特に脳の発生に必要なアクチビンを

制御していることが知られている。そこでわれわれはこの仮説を証明すべく、ゼブラフィッシュを用いて KDM7 の発現を阻害し、その神経発生に対する効果を検討した。その結果、KDM7 に対するモルフォリノオリゴを注入した個体にのみ、視蓋 (tectum) の形成が強く抑制されるという表現型を得た。種々の実験の結果、KDM7 は Follistatin の遺伝子発現をコントロールすることによって、脳の発生・分化を制御していることが明らかになった。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. 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). [doi:10.1038/ncb1849].
2. Mitra, P., Ghule, P.N., van der Deen, M., Medina, R., Xie, R.L., Holmes, W.F., Ye, X., Nakayama, K.I., Harper, J.W., Stein, J.L., Stein, G.S., van Wijnen, A.J.: 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). [doi:10.1002/jcp.21687].
3. 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.*, 69: 3788-3794 (2009). [doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2846].
4. Saiga, T., Fukuda, T., Matsumoto, M., Tada, H., Okano, H.J., Okano, H., Nakayama, K.I.: Fbxo45 forms a novel ubiquitin ligase complex and is required for neuronal development. *Mol. Cell. Biol.*, 29: 3529-3543 (2009). [doi:10.1128/MCB.00364-09].
5. Jiang, X., Austin, P.F., Niederhoff, R.A., Manson, S.R., Riehm, J.J., Cook, B.L., Pengue, G., Chitaley, K., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Weintraub, S.J.: Mechanoregulation of proliferation. *Mol. Cell. Biol.*, 29: 5104-5114 (2009). [doi:10.1128/MCB.00465-09].
6. Ranchal, I., Gonzalez, R., Bello, R.I., Ferrin, G., Hidalgo, A.B., Linares, C.I.,

- Aguilar-Melero, P., Gonzalez-Rubio, S., Barrera, P., Marchal, T., Nakayama, K.I., de la Mata, M., Muntane, J.: The reduction of cell death and proliferation by p27^{Kip1} minimizes DNA damage in an experimental model of genotoxicity. *Int. J. Cancer*, 125: 2270-2280 (2009). [doi:10.1002/ijc.24621].
7. Wu, Y.J., Sala-Newby, G.B., Shu, K.T., Yeh, H.I., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Newby, A.C., Bond, M.: S-phase kinase-associated protein-2 (Skp2) promotes vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in vivo. *J. Vasc. Surg.*, 50: 1135-1142 (2009). [doi:10.1016/j.jvs.2009.07.066].
 8. Zhang, J., Hung, A.C., Ng, P.Y., Nakayama, K., Hu, Y., Li, B., Porter, A.G., Dhakshinamoorthy, S.: PKC δ mediates Nrf2-dependent protection of neuronal cells from NO-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 386: 750-756 (2009). [doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.129].
 9. Oyamada, A., Ikebe, H., Itsumi, M., Saiwai, H., Okada, S., Shimoda, K., Iwakura, Y., Nakayama, K.I., Iwamoto, Y., Yoshikai, Y., Yamada, H.: Tyrosine kinase 2 plays critical roles in the pathogenic CD4 T cell responses for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 183: 7539-7546 (2009). [doi:10.4049/jimmunol.0902740].
 10. Saita, S., Shirane, M., Natume, T., Iemura, S., Nakayama, K.I.: Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with vesicle-associated membrane protein-associated protein. *J. Biol. Chem.*, 284: 13766-13777 (2009). [doi:10.1074/jbc.M807938200].
 11. Tsukuba, T., Yanagawa, M., Okamoto, K., Okamoto, Y., Yasuda, Y., Nakayama, K.I., Kadowaki, T., Yamamoto, K.: Impaired chemotaxis and cell adhesion due to decrease in several cell-surface receptors in cathepsin E-deficient macrophages. *J. Biochem.*, 145: 565-573 (2009). [doi:10.1093/jb/mvp016].
 12. Kimura, T., Sakai, M., Tabu, K., Wang, L., Tsunematsu, R., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K., Nishihara, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Ladanyi, M., Tanaka, S., Nakayama, K.I.: Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration. *Lab. Invest.*, 89: 645-656 (2009). [doi:10.1038/labinvest.2009.25].
 13. Matsuda, M., Tsutsumi, K., Kanematsu, T., Fukami, K., Terada, Y., Takenawa, T., Nakayama, K.I., Hirata, M.: Involvement of phospholipase C-related inactive

- protein in the mouse reproductive system through the regulation of gonadotropin levels. *Biol. Reprod.*, 81: 681-689 (2009). [doi:10.1095/biolreprod.109.076760].
14. Tanaka, S., Wakeyama, H., Akiyama, T., Takahashi, K., Amano, H., Nakayama, K.I., Nakamura, K.: Regulation of osteoclast apoptosis by bcl-2 family protein bim and caspase-3. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 658: 111-116 (2010). [doi:10.1007/978-1-4419-1050-9_12].
 15. Wang, H., Bauzon, F., Ji, P., Xu, X., Sun, D., Locker, J., Sellers, R.S., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Cobrinik, D., Zhu, L.: Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in Rb1(+/-) mice. *Nature Genet.*, 42: 83-88 (2010). [doi:10.1038/ng.498].
 16. Bohgaki, M., Matsumoto, M., Atsumi, T., Kondo, T., Yasuda, S., Horita, T., Nakayama, K.I., Okumura, F., Hatakeyama, S., Koike, T.: Plasma gelsolin facilitates interaction between β_2 glycoprotein I and $\alpha_5\beta_1$ integrin. *J. Cell. Mol. Med.*, in press. (2010). [doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00940.x].
 17. Iwatsuki, M., Mimori, K., Ishii, H., Yokobori, T., Takatsuno, Y., Sato, T., Toh, H., Onoyama, I., Nakayama, K.I., Baba, H., Mori, M.: Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: Clinical significance. *Int. J. Cancer*, 126: 1828-1837 (2010). [doi:10.1002/ijc.24879].
 18. Fujii, M., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Fukami, K., Takenawa, T., Nakayama, K.I., Moss, S.J., Nabekura, J., Hirata, M.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein is required for insulin-induced cell surface expression of γ -aminobutyric acid type A receptors. *J. Biol. Chem.*, 285: 4837-4846 (2010). [doi:10.1074/jbc.M109.070045].
 19. Tada, H., Okano, H.J., Takagi, H., Shibata, S., Yao, I., Matsumoto, M., Saiga, T., Nakayama, K.I., Kashima, H., Takahashi, T., Setou, M., Okano, H.: Fbxo45, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity. *J. Biol. Chem.*, 285: 3840-3849 (2010). [doi:10.1074/jbc.M109.046284].
 20. Masuda, K., Ishikawa, Y., Onoyama, I., Unno, M., de Alboran, I.M., Nakayama, K.I., Nakayama, K.: Complex regulation of cell-cycle inhibitors by Fbxw7 in mouse embryonic fibroblasts. *Oncogene*, 29: 1798-1809 (2010). [doi:10.1038/onc.2009.469].

21. Matsumoto, M., Oyamada, K., Takahashi, H., Sato, T., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I.: Large-scale proteomic analysis of tyrosine-phosphorylation induced by T-cell receptor or B-cell receptor activation reveals new signaling pathways. *Proteomics*, 9: 3549-3563 (2009). [doi:10.1002/pmic.200900011].
22. Tsukada, Y.-i., Ishitani, T., Nakayama, K.I.: KDM7 is a dual demethylase for histone H3 lysines 9 and 27 and functions in brain development. *Genes Dev.*, 24: 432-437 (2010). [doi:10.1101/gad.1864410].
23. Susaki, E., Kaneko-Oshikawa, C., Miyata, K., Tabata, M., Yamada, T., Oike, Y., Katagiri, H., Nakayama, K.I.: Increased E4 activity in mice leads to ubiquitin-containing aggregates and degeneration of hypothalamic neurons resulting in obesity. *J. Biol. Chem.*, in press. (2010). [doi:10.1074/jbc.M110.105841].
24. Old, J.B., Kratzat, S., Hoellein, A., Graf, S., Nilsson, J.A., Nilsson, L., Nakayama, K.I., Peschel, C., Cleveland, J.L., Keller, U.B.: Skp2 Directs Myc-Mediated Suppression of p27^{Kip1} yet Has Modest Effects on Myc-Driven Lymphomagenesis. *Mol. Cancer Res.*, 8: 353-62 (2010). [doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0232].
25. Okumura, F., Matsunaga, Y., Katayama, Y., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S.: TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. *J. Cell Sci.*, in press. (2010). [doi:不明].
26. Chan, C.H., Lee, S.W., Li, C.F., Wang, J., Yang, W.L., Wu, C.Y., Wu, J., Nakayama, K.I., Kang, H.Y., Huang, H.Y., Hung, M.C., Pandolfi, P.P., Lin, H.K.: Deciphering the transcription complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nature Cell Biol.*, in press. (2010). [doi:不明].
27. Lin, H.K., Chen, Z., Wang, G., Nardella, C., Lee, S.W., Chan, C.H., Yang, W.L., Wang, J., Egia, A., Nakayama, K.I., Cordon-Cardo, C., Teruya-Feldstein, J., Pandolfi, P.P.: Skp2 targeting suppresses tumorigenesis through p19Arf/p53-independent cellular senescence. *Nature*, 464: 374-379 (2010). [doi:10.1038/nature08815].

(4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 1 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)