

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 13 台の質量分析計を擁し、昨年度までに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を進めている。この技術はインタラクション・プロテオミクス (IPX) 法とリバース・プロテオミクス (RPX) 法の二つの柱からなる。IPX 法についてはほぼ完成の域に達し、現在多くのユビキチンリガーゼに対して実際に基質同定に利用している。一方 RPX 法については、当初採用した 2D-DIGE 等の方法で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とっての大きな障壁であった。しかし昨年度までに Multiple Reaction Monitoring (MRM 法) と呼ばれる技術をベースに新しい技術構築に乗り出し、パイロット実験に成功した。われわれはこの新技术を Information-based Multiple Reaction Monitoring (iMRM 法) と名付けた。

そこで本年度はこの iMRM 法の完成に向けて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を精力的に行っている。

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

① 研究分担グループ長:中山 敬一 (九州大学生体防御医学研究所、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 (東北大学大学院医学系研究科、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)

インタラクション・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)~18)}。さらに本研究のもう一つの柱であるリバース・プロテオミクス(RPX)法について、昨年度より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。本年度はMRM技術と事前情報取得による知識基盤を組み合わせて、ヒト全タンパク質の絶対定量を可能にする新しい技術(Information-based Multiple Reaction Monitoring:略称 iMRM 法)の基盤技術について開発を行った。

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 SREBP という転写因子をユビキチンリガーゼ SCF^{Fbxw7} が肝臓において分解制御に関わっていることを発見し、Fbxw7 が脂肪代謝の重要な調節因子であることを突き止めた¹³⁾。

Fbxw7 はユビキチンリガーゼである SCF 複合体を構成する F-box タンパク質の一つであり、SCF^{Fbxw7}は Notch、c-Myc、cyclin E、c-Jun などの細胞周期を正に制御するタンパク質をユビキチン化依存的に分解することが知られている。実際、胸腺細胞特異的 *Fbxw7* コンディショナルノックアウトマウス(*Fbxw7* CKO)や骨髄細胞特異的 *Fbxw7* CKO ではこれらのタンパク質が分解できずに異常蓄積し、細胞周期の制御異常と発がん(T細胞リンパ腫、T細胞性急性リンパ芽球性白血病)を引き起こすことを最近われわれは報告してきた。一方、SCF^{Fbxw7} は細胞周期関連タンパク質のみならず、SREBP や PGC-1 α などの脂質代謝を司るタンパク質のユビキチン化依存的な分解をも担っていることが生化学的解析から近年明らかにされつつある。そこで、これらのタンパク質が機能する肝細胞における Fbxw7 の機能を明らかにする目的で肝細胞特異的 *Fbxw7* CKO を作製して解析を行った。肝細胞特異的 *Fbxw7* CKO の作製には *Alb-Cre* および *Mx1-Cre* トランスジェニックマウスを用いた。

肝細胞において Fbxw7 を欠損させると短期的には著明な脂肪(トリグリセリド)の蓄積のため肝は腫大し、nonalcoholic steatohepatitis (NASH)様の表現型を呈した。既知の Fbxw7 の基質のうち、Fbxw7 欠損肝細胞では Notch1、cyclin E とともに SREBP1c が異常蓄積しており、これが脂肪蓄積の原因であることが示唆された。一方、肝細胞特異的 *Fbxw7* CKO は長期的には、肝臓に肉眼的、病理組織学的に著明な胆管増生を認め、過誤腫が多発した。未分化性が保たれているマウス胎児肝から肝細胞を分離培養し、Fbxw7 を in vitro で欠失させると胆管細胞への分化が亢進し、Fbxw7 とともに Notch の co-factor である RBP-J を一緒に欠失するとこの現象が見られなくなることから、肝細胞特異的 *Fbxw7* CKO における胆管増生は Notch の分解異常が原因であると考えられた。以上の解析結果から、Fbxw7 は肝臓においては細胞周期の制御のみならず、

SREBP の分解を介した脂質代謝制御、Notch の分解を介した肝細胞と胆管細胞への分化制御を行っていることが明らかとなった。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. 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 transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nature Cell Biol.*, 12: 457-467 (2010). [doi: 10.1038/ncb2047]
2. 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.*, 285: 15538-15547 (2010). [doi: 10.1074/jbc.M110.105841]
3. 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]
4. Ohzono, C., Etoh, S., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Hirota, Y., Tanaka, Y., Fujita, H.: Nedd4-interacting protein 2, a short half-life membrane protein degraded in lysosomes, negatively controls down-regulation of connexin43. *Biol. Pharm. Bull.*, 33: 951-957 (2010). [pii: JST.JSTAGE/bpb/33.951]
5. Hatano, A., Matsumoto, M., Higashinakagawa, T., Nakayama, K.I.: Phosphorylation of the chromodomain changes the binding specificity of Cbx2 for methylated histone H3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 397: 93-99 (2010). [doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.074]
6. Mizokami, A., Tanaka, H., Ishibashi, H., Umabayashi, H., Fukami, K., Takenawa, T., Nakayama, K.I., Yokoyama, T., Nabekura, J., Kanematsu, T., Hirata, M.: GABA_A receptor subunit alteration-dependent diazepam insensitivity in the

- cerebellum of phospholipase C-related inactive protein knockout mice. *J. Neurochem.*, 114: 302-310 (2010). [doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06754.x]
7. Okumura, F., Matsunaga, Y., Katayama, Y., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S.: TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. *J. Cell Sci.*, 123: 2238-2245 (2010). [doi: 10.1242/jcs.068981]
 8. Ma, H., Yu, L., Byra, E.A., Hu, N., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Kawamoto, T., Ren, J.: Aldehyde dehydrogenase 2 knockout accentuates ethanol-induced cardiac depression: role of protein phosphatases. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 49: 322-329 (2010). [doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.03.017]
 9. Benirschke, R.C., Thompson, J.R., Nomine, Y., Wasielewski, E., Juranic, N., Macura, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Botuyan, M.V., Mer, G.: Molecular Basis for the Association of Human E4B U Box Ubiquitin Ligase with E2-Conjugating Enzymes UbcH5c and Ubc4. *Structure*, 18: 955-965 (2010). [doi: 10.1016/j.str.2010.04.017]
 10. Tsukada, Y., Nakayama, K.I.: In vitro histone demethylase assay. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2010: pdb prot5512 (2010). [ISSN: 1559-6095]
 11. Takeda, H., Kawamura, Y., Miura, A., Mori, M., Wakamatsu, A., Yamamoto, J., Isogai, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Natsume, T., Nomura, N., Goshima, N.: Comparative analysis of human SRC-family kinase substrate specificity in vitro. *J. Proteome Res.*, 9: 5982-5993 (2010). [doi: 10.1021/pr100773t]
 12. Hayakawa, H., Fujikane, A., Ito, R., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Sekiguchi, M.: Human proteins that specifically bind to 8-oxoguanine-containing RNA and their responses to oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 403: 220-224 (2010). [doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.011]
 13. Onoyama, I., Suzuki, A., Matsumoto, A., Tomita, K., Katagiri, H., Oike, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. *J. Clin. Invest.*, 121: 342-354 (2011). [doi: 10.1172/JCI40725]
 14. Iriuchishima, H., Takubo, K., Matsuoka, S., Onoyama, I., Nakayama, K.I., Nojima, Y., Suda, T.: Ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells by quiescence induction through Fbxw7 α overexpression. *Blood*, 117: 2373-2377 (2011). [doi:

10.1182/blood-2010-07-294801]

15. Katagiri, K., Ueda, Y., Tomiyama, T., Yasuda, K., Toda, Y., Ikehara, S., Nakayama, K.I., Kinashi, T.: Deficiency of Rap1-binding protein RAPL causes lymphoproliferative disorders through mislocalization of p27^{kip1}. *Immunity*, 34: 24-38 (2011). [doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.010]
16. Matsumoto, A., Tateishi, Y., Onoyama, I., Okita, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Fbxw7beta resides in the endoplasmic reticulum membrane and protects cells from oxidative stress. *Cancer Sci.*, 102: 749-755 (2011). [doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01851.x]
17. Tachiyama, R., Ishikawa, D., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Yoshimori, T., Yokota, S., Himeno, M., Tanaka, Y., Fujita, H.: Proteome of ubiquitin/MVB-Pathway: Possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation. *Genes Cells*, 16: 448-466 (2011). [doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01499.x]
18. Wu, H., Pomeroy, S.L., Ferreira, M., Teider, N., Mariani, J., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S., Tron, V.A., Saltibus, L.F., Spyropoulos, L., Leng, R.P.: UBE4B promotes Hdm2-mediated degradation of the tumor suppressor p53. *Nature Med.*, 17: 347-355 (2011). [doi: 10.1038/nm.2283]
19. Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Tseng, A., Gao, D., Maser, R., Zhai, B., Gutierrez, A., Wan, L., Lau, A., Xiao, Y., Christie, A., Aster, J., Settleman, J., Kung, A.L., Gygi, S.P., Look, T., Nakayama, K.I., DePinho, R.A., Wei, W.: SCFFbw7 regulates cellular apoptosis by targeting the Mcl-1 oncoprotein for ubiquitination and destruction. *Nature*, 471: 104-109 (2011).
20. Sistrunk, h., Macias, E., Nakayama, K.I., Kim, Y., Rodriguez-Puebla, M.L.: Skp2 is necessary for Myc-induced keratinocyte proliferation but dispensable for Myc oncogenic activity in the oral epithelium. *Am. J. Pathol.*, in press. (2011).
21. Matsumoto, A., Onoyama, I., Sunabori, T., Kageyama, R., Okano, H., Nakayama, K.I.: Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of stemness and neuronal-glia differentiation in neural stem cells. *J. Biol. Chem.*, in press. (2011).
22. Rodriguez, S., Wang, L., Mumaw, C., Srour, E.F., Celso, C.L., Nakayama, K.I.,

- Carlesso, N.: The SKP2 E3 Ligase regulates basal homeostasis and stress-induced regeneration of hematopoietic stem cells. *Blood*, in press. (2011).
23. Inoue, S.I., Matsushita, T., Tomokiyo, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kinoshita, T., Shimazaki, K.I.: Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, in press. (2011).
24. Fotovati, A., Abu-Ali, S., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Impaired ovarian development and reduced fertility in female mice deficient in Skp2. *J. Anat.*, in press. (2011). [doi: 10.1111/j.1469-7580.2011.01370.x]
25. Lu, C., Huang, X., Zhang, X., Roensch, K., Cao, Q., Nakayama, K.I., Blazar, B.R., Zeng, Y., Zhou, X.: MiR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1 and SOCS-1. *Blood*, in press. (2011).