

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およびユビキチンリガーゼノックアウトマウスの作製・解析  
RPX 及び IPX の基盤技術を確立し、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、バリデーショナルスタディを行い、最終的に情報生物学的解析を行う。また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。

## § 2. 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、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。本年度も引き続きこの方法を駆使して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関する知見が得られた<sup>1)~22)</sup>。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 Iron Regulatory Protein (IRP) 1 および IRP2 という RNA 結合タンパク質は、ユビキチンリガーゼ SCF<sup>FBXL5</sup> がその分解制御に関わっていることを発見し、FBXL5 が鉄代謝の重要な調節因子であることを突き止めた<sup>10)</sup>。

鉄は種々のタンパク質の活性中心として生命活動に必須の役割を担う一方で、その高い反応性ゆえに過剰な鉄はフリーラジカルの発生源となり、細胞毒性をもたらす。そのため、細胞内の鉄量は鉄代謝制御因子 IRP2 によって厳密に調節されている。IRP2 は鉄欠乏時に鉄代謝関連因子群の mRNA と選択的に結合することでそれらの発現量を制御し、細胞内の利用可能な鉄量を増加させる。一方、鉄過剰時には IRP2 が SCF 複合体型ユビキチンリガーゼ SCF<sup>FBXL5</sup> によって分解され mRNA 結合能を失うことで、細胞内の鉄量が減少する。SCF<sup>FBXL5</sup> の基質認識サブユニット FBXL5 は鉄欠乏時には不安定であるが、鉄過剰時には自身の鉄結合ドメインへの鉄の配位によって安定化し IRP2 を分解できるようになる。このように FBXL5 は細胞内の鉄量を感じ IRP2 の活性を制御することが考えられるが、この経路の鉄代謝制御における重要性は全く明らかになっていない。

われわれはマウス *Fbxl5* 遺伝子を全身と肝臓特異的にそれぞれ欠損させ、FBXL5 の鉄代謝における役割を調べた。全身で FBXL5 を欠損した *Fbxl5*<sup>-/-</sup> マウスは IRP2 の制御異常から鉄の過剰蓄積と酸化ストレスをきたし、胎生期に死亡した。さらに FBXL5 と IRP2 の両方を欠損する *Fbxl5*<sup>-/-</sup> *Irp2*<sup>-/-</sup> マウスを作出したところ、驚いたことに、この変異マウスは正常に出生した。このことは、*Fbxl5*<sup>-/-</sup> マウスの主な死因は IRP2 の恒常的活性化にあることを示している。さらにわれわれは、マウス成体肝臓において特異的に FBXL5 を欠損させた。肝臓は個体レベルでの鉄代謝制御を担う中心臓器であり、鉄過剰時にペプチドホルモンであるヘプシジンを産生することで血中鉄の過剰な増加を抑制している。肝臓特異的 FBXL5 欠損マウスでは肝細胞内の鉄代謝異常に加え、ヘプシジン産生の障害から全身性の鉄代謝異常もきたし、肝細胞におけるミトコンドリア機能障害と脂肪肝炎を呈した。さらに、肝臓特異的 FBXL5 欠損マウスに鉄過剰食を投与すると、肝細胞への過剰な鉄の蓄積と酸化ストレスから広範な肝細胞壊死をきたし、急性肝不全により死亡した。

以上の解析結果により、FBXL5 は細胞内の鉄量を感じ IRP2 を分解することで、必要不可欠かつ危険な鉄を適切な濃度に保っていることが明らかになった。

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、従来のディスカバー・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結果、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) を開発した。

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。昨年度までにわれわれは標品を大規模に (プロテオームワイドに) 入手することによって事前情報ライブラリーを構築した。これを用いてあらゆるタンパク質の大規模な絶対定量解析を可能にする方法を Information-based Multiple Reaction Monitoring (iMRM 法) と名づけ、現在さらなる改良を行っている。これが実現すれば、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) 法に応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。

昨年度はヒト全タンパク質の試験管内合成を行い、数万クローンを含むヒト完全長 cDNA ライブラリーよりロボット技術とコムギ胚芽抽出液を用いた *in vitro* 転写翻訳システムを応用して全てのクローンよりリコンビナントタンパク質を合成した (産業技術総合研究所・五島直樹先生との共同研究)。それらを全てトリプシンで消化した後、LC-MS/MS 解析を行い、得られたパターンを解析して MRM 用のウィンドウ (トランジションを呼ぶ) を設定した。現在、大部分のタンパク質についてトランジションを決定している。このデータベースは将来的にヒトプロテオーム計画の重要な礎になると期待される。

また従来の MRM 法では数個のタンパク質の測定にとどまっていたが、プロテオームワイドに計測するためには高速でトランジションを切り替える必要がある。そのためにはいつどのようなペプチドが質量分析計に入ってくるかを事前情報取得しておく必要がある。われわれは保持時間マーカーという新たな方法を考案し、それによって高速液体クロマトグラフィーによる分離に要する時間 (保持時間) を相対値に変換することによって、各々のペプチド毎に保持時間のマーカー相対値を決定することに成功した。そこで現在、全てのペプチドに対してこの保持時間のマーカー相対値を測定して上記データベースに加える作業を行っている。これが完成すれば、ヒトプロテオームを短時間で完全に解読できるようになることが期待されている。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

- ① 発行済論文数(国内(和文) 0件、国際(欧文) 13件):
  - ② 未発行論文数(“accepted”、“in press”等)(国内(和文) 0件、国際(欧文) 9件)
  - ③ 論文詳細情報
1. 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 p27<sup>kip1</sup>, KPC1, and SOCS-1. *Blood*, 117: 4293-4303 (2011). (DOI: 10.1182/blood-2010-12-322503)
  2. 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.*, 286: 13754-13764 (2011). (DOI: 10.1074/jbc.M110.194936)
  3. Matsumoto, A., Tateishi, Y., Onoyama, I., Okita, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Fbxw7 $\beta$  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)
  4. 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)
  5. Inoue, S., Matsushita, T., Tomokiyo, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kinoshita, T., Shimazaki, K.: Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 156: 117-128 (2011). (DOI: 10.1104/pp.111.175943)
  6. Fotovati, A., Abu-Ali, S., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Impaired ovarian development and reduced fertility in female mice deficient in Skp2. *J. Anat.*, 218: 668-677 (2011). (DOI: 10.1111/j.1469-7580.2011.01370.x)
  7. Yu, Z., Ono, C., Kim, H.B., Komatsu, H., Tanabe, Y., Sakae, N., Nakayama, K.I., Matsuoka, H., Sora, I., Bunney, W.E., Tomita, H.: Four mood stabilizers commonly

induce FEZ1 expression in human astrocytes. *Bipolar Disord.*, 13: 486-499 (2011). (DOI: 10.1111/j.1399-5618.2011.00946.x)

8. Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Suda, T.: p57<sup>Kip2</sup> and p27<sup>Kip1</sup> cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell*, 9: 247-261 (2011). (DOI: 10.1016/j.stem.2011.07.003)

9. Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 9: 262-271 (2011). (DOI: 10.1016/j.stem.2011.06.014)

10. Moroishi, T., Nishiyama, M., Takeda, Y., Iwai, K., Nakayama, K.I.: The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. *Cell Metab.*, 14: 339-351 (2011). (DOI: 10.1016/j.cmet.2011.07.011)

11. Matsumoto, A., Susaki, E., Onoyama, I., Nakayama, K., Hoshino, M., Nakayama, K.I.: Deregulation of the p57-E2F1-p53 axis results in nonobstructive hydrocephalus and cerebellar malformation in mice. *Mol. Cell. Biol.*, 31: 4176-4192 (2011). (DOI: 10.1128/MCB.05370-11)

12. Okumura, F., Okumura, A.J., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S.: TRIM8 regulates Nanog via Hsp90beta-mediated nuclear translocation of STAT3 in embryonic stem cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1813: 1784-1792 (2011). (DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.05.013)

13. Fuster, J.J., Gonzalez-Navarro, H., Vinue, A., Molina-Sanchez, P., Andres-Manzano, M.J., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Diez-Juan, A., Bernad, A., Rodriguez, C., Martinez-Gonzalez, J., Andres, V.: Deficient p27 phosphorylation at serine 10 increases macrophage foam cell formation and aggravates atherosclerosis through a proliferation-independent mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 31: 2455-2463 (2011). (DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.235580)

14. Oshikawa, K., Matsumoto, M., Oyamada, K., Nakayama, K.I.: Proteome-wide identification of ubiquitylation sites by conjugation of engineered lysine-less ubiquitin.

*J. Proteome Res.*, in press, (2011). (DOI: 10.1021/pr200668y)

15. Chow, C., Wong, N., Pagano, M., Lun, S.W., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Lo, K.W.: Regulation of APC/C<sup>Cdc20</sup> activity by RASSF1A-APC/C<sup>Cdc20</sup> circuitry. *Oncogene*, in press, (2011). (DOI: 10.1038/onc.2011.372)

16. Matsuzaki, F., Shirane, M., Matsumoto, M., Nakayama, K.I.: Protrudin serves as an adaptor molecule that connects KIF5 and its cargoes in vesicular transport during process formation. *Mol. Biol. Cell*, in press, (2011). (DOI: 10.1091/mbc.E11-01-0068)

17. Nishiyama, M., Skoultchi, A.I., Nakayama, K.I.: Histone H1 recruitment by CHD8 is essential for suppression of the Wnt- $\beta$ -catenin signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.*, in press, (2011). (DOI: 10.1128/MCB.06409-11)

18. 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). (DOI: 10.1182/blood-2010-11-321521)

19. Bargagna-Mohan, P., Paranthan, R.R., Hamza, A., Zhan, C.G., Lee, D.M., Kim, K.B., Lau, D.L., Srinivasan, C., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Herrmann, H., Mohan, R.: A corneal anti-fibrotic switch identified in genetic and pharmacological deficiency of vimentin. *J. Biol. Chem.*, in press, (2011). (DOI: 10.1074/jbc.M111.297150)

20. Ellman, M.B., Kim, J., An, H.S., Kroin, J.S., Li, X., Chen, D., Yan, D., Buechter, D.D., Nakayama, K.I., Mochly-Rosen, Liu, B., Qvit, N., Morganand, S., Im, H.-J.: The pathophysiological role of the PKC $\delta$  pathway in the intervertebral disc: In vitro, ex vivo and in vivo studies. *Arthritis Rheumat.*, in press, (2011). (DOI: 10.1002/art.34337)

21. Kanie, T., Onoyama, I., Matsumoto, A., Yamada, M., Nakatsumi, H., Tateishi, Y., Yamamura, S., Tsunematsu, R., Matsumoto, M., Nakayama, K.I.: Genetic reevaluation of the role of F-box proteins in cyclin D1 degradation. *Mol. Cell. Biol.*, in press, (2011). (DOI: 10.1128/MCB.06570-11)

22. 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). (DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.02.034)

23. Kita, Y., Nishiyama, M., Nakayama, K.I.: Identification of CHD7<sub>s</sub> as a novel splicing variant of CHD7 with functions similar and antagonistic to those of the full-length CHD7<sub>L</sub>. *Genes Cells*, in press. (2012).

24. Liu, N., Matsumoto, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Suzuki, S., Shirasawa, S., Nakayama, K.I., Nakanishi, M., Niida, H., Kitagawa, M.: Chk1 phosphorylates the tumor suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signaling. *EMBO J.*, in press. (2012).

25. Chan, C-H., Li, C-F., Yang, W-L., Gao, Y., Lee, S-W., Feng, Z., Huang, H-Y., Tsai, K.K.C., Flores, L.G., Shao, Y., Hazle, J.D., Yu, D., Wei, W., Sarbassov, D., Hung, M-C., Nakayama, K.I., Lin, H-K.: The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, Herceptin sensitivity and tumorigenesis. *Cell*, in press. (2012).

### (3-2) 知財出願

① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)