

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15811

研究課題名(和文) ヒトiPS化の際の染色体リプログラミングを制御するタンパク質分解経路の同定

研究課題名(英文) Identification of proteolytic signaling pathways regulating reprogramming during iPS cell generation

研究代表者

犬塚 博之 (Inuzuka, Hiroyuki)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：20335863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS化の分子メカニズムの解析を目的として、エピジェネティック遺伝子発現調節因子の分解制御を司るSKP2 E3リガーゼの機能に注目し、ヒトiPS化におけるSKP2活性調節機構の解明を試みた。新規SKP2相互作用分子のスクリーニングから、エピジェネティック修飾に関連したRINGファミリータンパク質を単離したほか、本分子がSKP2を標的とするE3リガーゼであることをあわせて明らかとした。さらに、ヒトiPS化の過程におけるSKP2とその上流E3リガーゼの発現相関解析から、今回同定したSKP2活性調節経路がヒトiPS化の制御に重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Direct reprogramming of somatic cells to iPS cells involves global changes in epigenetic modification and gene expression. SKP2 E3 ligase is reported to play essential roles in epigenetic transcriptional regulation through degrading histone methyltransferases including MLL, PR-SET7, and CARM1. Here, to characterize the role of SKP2 signaling in human iPS generation, we conducted a screening of SKP2 interacting proteins and identified a RING-family protein as the E3 ligase of SKP2. Furthermore, we found that the protein levels of SKP2 and the RING E3 ligase are associated with the process of iPS generation. These data suggest that the identified E3 cascade may play important roles in epigenetic reprogramming of somatic to iPS cells.

研究分野：生化学

キーワード：SKP2 Ubiquitination iPS cells

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞の研究領域では、iPS 細胞ストック化や臨床試験への取り組みなど、再生医療実用化のための様々なアプローチが行われている。歯科再生医療においても iPS 細胞を用いた歯科疾患に対する個別化医療実現への様々な試みがなされている。ヒト iPS 細胞の臨床応用にはさらなる iPS 作製効率化が望まれているが、そのためには iPS 化の際に重要な細胞内シグナル伝達因子の同定や遺伝子発現制御機構の解析などによる分子基盤の解明が不可欠である。

体細胞の初期化によるヒト iPS 化には、エピジェネティック制御を介したゲノムワイドな遺伝子発現調節が関与していることが考えられているが、その詳細な分子機構は明らかでない。代表者らは、ヒストンメチル化酵素をはじめとした、遺伝子発現調節に重要なタンパク質群の分解の役割を担う、SKP2 コピキチンリガーゼの iPS 化における機能に着目した。SKP2 がエピジェネティック遺伝子発現制御関連タンパク質分解を介して iPS 化を促進するという仮説のもと、初期化に関与する SKP2 相互作用因子が存在するのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

体細胞初期化分子メカニズムの一端を解明するため、ヒト iPS 化の際のエピジェネティック遺伝子発現を制御するタンパク質の主要な分解調節経路を同定することを目的とした。特に癌幹細胞維持に重要であることが報告されている SKP2 E3 コピキチンリガーゼは、MLL、PR-SET7、CARM1 などのヒストンメチル化酵素の分解を介してエピゲノム修飾の調節に関与することが知られている。このことから、SKP2 シグナル調節機構がどのようにヒト iPS 化に関与しているかを明らかにするため、始めに SKP2 機能制御因子、特に SKP2 の上流に位置し SKP2 の分解調節を行う E3 リガーゼの同定を試み、得られた知見を、SKP2 タンパク質活性調節を介した効率的な iPS 細胞作製への手がかりとすることを考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 無細胞発現系を用いた SKP2 相互作用分子の同定

コムギ胚芽無細胞タンパク質発現系による高感度化学発光検出系を用いて、SKP2 の新規相互作用分子、特に SKP2 上流 E3 リガーゼ分子同定のためのスクリーニング系を構築し、候補分子の絞り込みを行った。

### (2) SKP2 調節因子候補分子の動物細胞内での SKP2 との相互作用解析

上記スクリーニング施行の過程で候補分子として単離したタンパク質と SKP2 の相互作用を培養細胞内で明らかにした。主要なアプローチとして、共免疫沈降法、ユ

ビキチン化アッセイ、候補 E3 分子ノックダウン細胞での SKP2 タンパク質安定性評価の解析を行った。

### (3) ヒト iPS 化における SKP2 シグナルの解析

ヒト iPS 細胞株と iPS 化に用いた体細胞株間での SKP2 とその相互作用 E3 リガーゼ分子の細胞内タンパク質量の比較を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 無細胞発現系を用いた SKP2 相互作用分子の同定

SKP2 の E3 リガーゼ同定を目的として、タンパク質間相互作用を指標としたコムギ胚芽無細胞タンパク質発現系スクリーニングを行った。E3 リガーゼライブラリーをコムギ胚芽発現系で調製する一方、bait タンパク質である V5-タグ化 SKP2 を同じくコムギの系で発現させ、それら両抽出液を 384 マルチウェルプレート中で混合し、続けてドナービーズ、アクセプタービーズを加えてさらに反応させた。SKP2 と E3 リガーゼ間で相互作用がある画分でのみ両ビーズが近接しアクセプタービーズが発光することから、得られたシグナル強度を指標として、上位 10 クローンを SKP2 相互作用候補分子として単離した。

### (2) SKP2 調節因子候補分子の動物細胞内での SKP2 との相互作用解析

1 上位 10 クローンを動物細胞発現プラスミドに組み込んで HA タグ化し、それら HA-E3 を SKP2 とそれぞれ 293T 細胞内に共発現させ共免疫沈降を行った。解析した 10 クローン中、最も確度が高い RING-No6 を候補分子として解析に供することとした。

2 SKP2 が、RING-No6 の E3 活性に依存してポリコピキチン化を受けることを明らかにした。

3 RING-No6 に特異的な shRNA を用いてノックダウンを行い、SKP2 の細胞内タンパク質量が増加することを確認した。

4 上記ノックダウン解析で観察された SKP2 の増加が SKP2 タンパク質の安定化によるものであることを証明するため、RING-No6 ノックダウン細胞で SKP2 タンパク質の半減期変化を測定した。その結果、RING-No6 ノックダウンにより SKP2 タンパク質半減期の延長、すなわち SKP2 タンパク質の安定化が認められた。

5 RING-No6 による SKP2 タンパク質内認識配列の同定を目的として、RING-No6 を SKP2 の N 末/C 末両端から段階的に削り込んだ変異体と細胞内に共発現させて、両者の結合、および SKP2 分解の有無を観察した。これにより、RING-No6 と SKP2 の分子会合に重要な部位、すなわち SKP2 タンパク質不安定化領域が SKP2 の N 末端側に存在していることが明らかにな

った。

- (3) ヒト iPS 化における SKP2 シグナルの解析 RING-No6 と SKP2 により構成されるタンパク質分解経路のヒト iPS 化における生理的役割を解析するため、ヒト iPS 細胞 12 株と、iPS 化に用いた体細胞 6 株の細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロット解析を用いて両細胞株間での SKP2 と RING-No6 の細胞内タンパク質量の比較を行った。その結果、SKP2 タンパク質は体細胞株群で低く抑えられていたのに対し、iPS 細胞株群で大きく増加していた。SKP2 と比較し、RING-No6 は体細胞株群で高く発現しており、iPS 化により僅かにその発現量が減少する傾向が認められた。以上から、iPS 化に伴う RING-No6 シグナルの減衰が SKP2 タンパク質の安定化を誘導し、iPS 細胞中で SKP2 活性の上昇が引き起こされることが示唆された。

以上の解析結果から、RING-No6 が SKP2 分解の役割を担う E3 リガーゼであることが同定できたほか、ヒト iPS 化の制御に RING-No6-SKP2 シグナルが機能している可能性が示唆された。RING-No6 の機能についてはエピジェネティック修飾への関連が報告されていることから、引き続き今回同定したタンパク質分解経路の解析を行うことで、ヒト iPS 化の初期化分子メカニズムの解明につなげていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

- 1 Clement E, Inuzuka H, Nihira NT, Wei W, Toker A, Skp2-dependent reactivation of AKT drives resistance to PI3K inhibitors, *Science Signaling*(査読有) No.11(521)、2018  
DOI: 10.1126/scisignal.aao3810
- 2 Hidefumi F, Kouhei S, Watahiki A, Hoshikawa S, Kosho T, Oba D, Sakano S, Arakaki M, Yamada A, Nagashima K, Okabe K, Fukumoto S, Jimi E, Bigas A, Nakayama KI., Nakayama K, Aoki Y, Wei W, Inuzuka H, NOTCH2 Hajdu-Cheney Mutations Escape SCFFBW7-Dependent Proteolysis to Promote Osteoporosis, *Molecular Cell*(査読有) No.68、2017、pp645-658  
DOI: 10.1016/j.molcel.2017.10.018
- 3 Dai X, Gan W, Li X, Wang S, Zhang W, Huang L, Liu S, Zhong Q, Guo J, Zhang J, Chen T, Shimizu K, Beca F, Blattner M, Vasudevan D, Buckley DL, Qi J, Buser L, Liu P, Inuzuka H, Beck AH, Wang L, Wild PJ, Garraway LA, Rubin MA, Barbieri CE, Wong KK, Muthuswamy SK, Huang J, Chen Y, Bradner JE, Wei W. Prostate cancer-associated SPOP mutations confer resistance to BET inhibitors through stabilization of BRD4, *Nature Medicine* (査読有)、No.23(9)、2017、pp1063-1071  
DOI: 10.1038/nm.4378
- 4 Takada M, Zhang W, Suzuki A, Kuroda TS, Yu Z, Inuzuka H, Gao D, Wan L, Zhuang M, Hu L, Zhai B, Fry CJ, Bloom K, Li G, Karpen GH, Wei W, Zhang Q, FBW7 Loss Promotes Chromosomal Instability and Tumorigenesis via Cyclin E1/CDK2-Mediated Phosphorylation of CENP-A, *Cancer Research* (査読有)、No.77(18)、2017、pp4881-4893  
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1240
- 5 Nihira NT, Ogura K, Shimizu K, North BJ, Zhang J, Gao D, Inuzuka H, Wei W, Acetylation-dependent regulation of MDM2 E3 ligase activity dictates its oncogenic function, *Science Signaling* (査読有) 2017  
DOI: 10.1126/scisignal.aai8026
- 6 Liu L, Michowski W, Inuzuka H, Shimizu K, Nihira NT, Chick JM, Li N, Geng Y, Meng AY, Ordureau A, Kolodziejczyk A, Ligon KL, Bronson RT, Polyak K, Harper JW, Gygi SP, Wei W, Sicinski P, G1 cyclins link proliferation, pluripotency and differentiation of embryonic stem cells, *Nature Cell Biology* (査読有)、No.19(3)、2017、pp177-188  
DOI: 10.1038/ncb3474
- 7 Wan L, Chen M, Cao J, Dai X, Yin Q, Zhang J, Song SJ, Lu Y, Liu J, Inuzuka H, Katon JM, Berry K, Fung J, Ng C, Liu P, Song MS, Xue L, Bronson RT, Kirschner MW, Cui R, Pandolfi PP, Wei W, The APC/C E3 Ligase Complex Activator FZR1 Restricts BRAF Oncogenic Function, *Cancer Discovery* (査読有) No.7(4)、2017、pp424-441  
DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0647
- 8 Shimizu K, Fukushima H, Ogura K, Lien EC, Nihira NT, Zhang J, North BJ, Guo A, Nagashima K, Nakagawa T, Hoshikawa S, Watahiki A, Okabe K, Yamada A, Toker A, Asara JM, Fukumoto S, Nakayama KI, Nakayama K, Inuzuka H, Wei W, The SCF -TRCP E3 ubiquitin ligase complex targets Lipin1 for ubiquitination and degradation to promote hepatic lipogenesis, *Science Signaling* (査読有) 2017  
DOI: 10.1126/scisignal.aah4117
- 9 Nagashima K, Fukushima H, Shimizu K, Yamada A, Hidaka M, Hasumi H, Ikebe T, Fukumoto S, Okabe K, Inuzuka H, Nutrient-induced FNIP degradation by

- SCF -TRCP regulates FLCN complex localization and promotes renal cancer progression、Oncotarget (査読有) No. 8(6)、2017、pp9947-9960  
DOI: 10.18632/oncotarget.14221
- 10 Takada M, Zhuang M, Inuzuka H, Zhang J, Zurlo G, Zhang J, Zhang Q, Egin2 contributes to triple negative breast tumorigenesis by functioning as a substrate for the FBW7 tumor suppressor、Oncotarget (査読有)、No.8(4)、2017、pp6787-6795  
DOI: 10.18632/oncotarget.14290
- 11 Hong X, Liu W, Song R, Shah JJ, Feng X, Tsang CK, Morgan KM, Bunting SF, Inuzuka H, Zheng XF, Shen Z, Sabaawy HE, Liu L, Pine SR, SOX9 is targeted for proteasomal degradation by the E3 ligase FBW7 in response to DNA damage、Nucleic Acids Research (査読有)、No.44(18)、2016、pp8855-8869  
DOI: 10.1093/nar/gkw748
- 12 Guo J, Chakraborty AA, Liu P, Gan W, Zheng X, Inuzuka H, Wang B, Zhang J, Zhang L, Yuan M, Novak J, Cheng JQ, Toker A, Signoretti S, Zhang Q, Asara JM, Kaelin WG Jr, Wei W、Science (査読有) 2016、No.353(6302)、pp929-32  
DOI: 10.1126/science.aad5755
- 13 Li X, Dai X, Wan L, Inuzuka H, Sun L, North BJ, Smurf1 regulation of DAB2IP controls cell proliferation and migration、Oncotarget(査読有) 2016、No. 7(18)、pp26057-26069  
DOI: 10.18632/oncotarget.8424

〔学会発表〕(計 8件)

- 1 清水 康平、犬塚 博之、福島 秀文、福本 敏、抗アポトーシスタンパク質 MCL1 の安定性制御におけるアセチル化の役割、第 59 回 歯科基礎医学会学術大会、2017.9.18、松本歯科大学(長野県)
- 2 Inuzuka H、Multiple functions of SCF E3 ligase and its implications as a therapeutic target、第 15 回 松山国際学術シンポジウム、2017.9.13、愛媛大学(愛媛県)
- 3 犬塚 博之、タンパク質分解から考える骨及び脂質代謝制御、第 55 回日本小児歯科学会大会、2017.5.26、西日本総合展示場(福岡県)
- 4 Hoshikawa S, Watahiki A, Fukushima H、Fukumoto S、Inuzuka H、Analysis of proteasome-dependent lipogenic pathway in hepatocytes、The 2017 Japan-NIH Joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease、2017.2.16、東北大学(宮城県)
- 5 犬塚 博之、脂質代謝における SCF ユビキチンリガーゼの機能と役割、第 70 回

東北大学歯学会、2016.12.2、東北大学(宮城県)

- 6 綿引 麻美、星川 聖良、犬塚 博之、江草 宏、福島 秀文、BHD 症候群関連タンパク質 FNIP2 のプロテアソーム依存的な量的調節機構の解析、第 39 回 日本分子生物学会年会、2016.12.1、パシフィコ横浜(神奈川県)
- 7 星川 聖良、綿引 麻美、福島 秀文、福本 敏、犬塚 博之、ユビキチン-プロテアソーム系を介した肝細胞脂質合成経路の解析、第 39 回 日本分子生物学会年会、2016.11.30、パシフィコ横浜(神奈川県)
- 8 犬塚 博之、福島 秀文、清水 康平、Wei W、福本 敏、脂質代謝における SCF beta-TRCP ユビキチンリガーゼ複合体の役割、第 58 回 歯科基礎医学会学術大会、2016.8.25、札幌コンベンションセンター(北海道)

6. 研究組織

(1)研究代表者

犬塚 博之 (INUZUKA, Hiroyuki)  
東北大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：20335863

(2)研究分担者

福本 敏 (FUKUMOTO, Satoshi)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：30264253

福島 秀文 (FUKUSHIMA, Hidefumi)  
東北大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：70412624

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

澤崎 達也 (SAWASAKI, Tatsuya)  
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

清水 康平 (SHIMIZU, Kouhei)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教