

図1 2D-DIGE法による卵巣明細胞腺癌細胞株(OVISe)と卵巣漿液性腺癌細胞株(OVSAHO)の間のタンパク質発現差解析

A: 緑色のspotはOVISe, 赤色のspotはOVSAHO, 黄色のspotは両者で等量発現しているタンパク質を示す

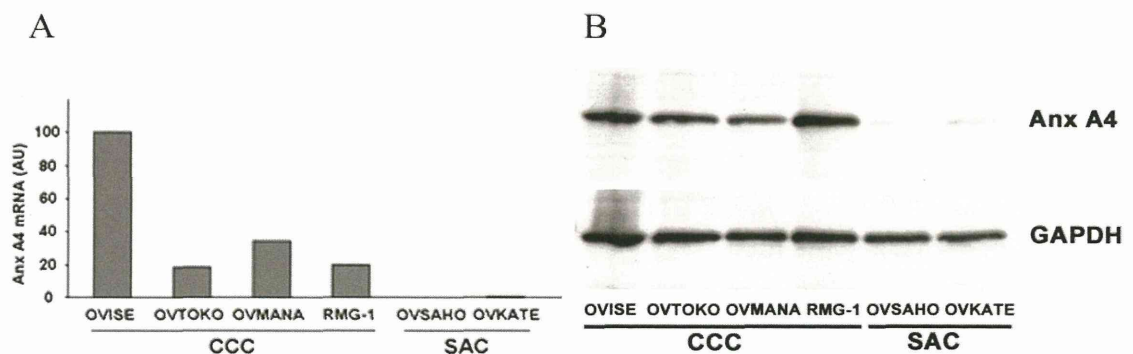


図2 リアルタイムPCR法、及びウェスタンブロット法による卵巣明細胞腺癌細胞株と卵巣漿液性腺癌細胞株におけるAnnexin A4の発現解析

A:リアルタイムPCR法、B:ウェスタンブロット法

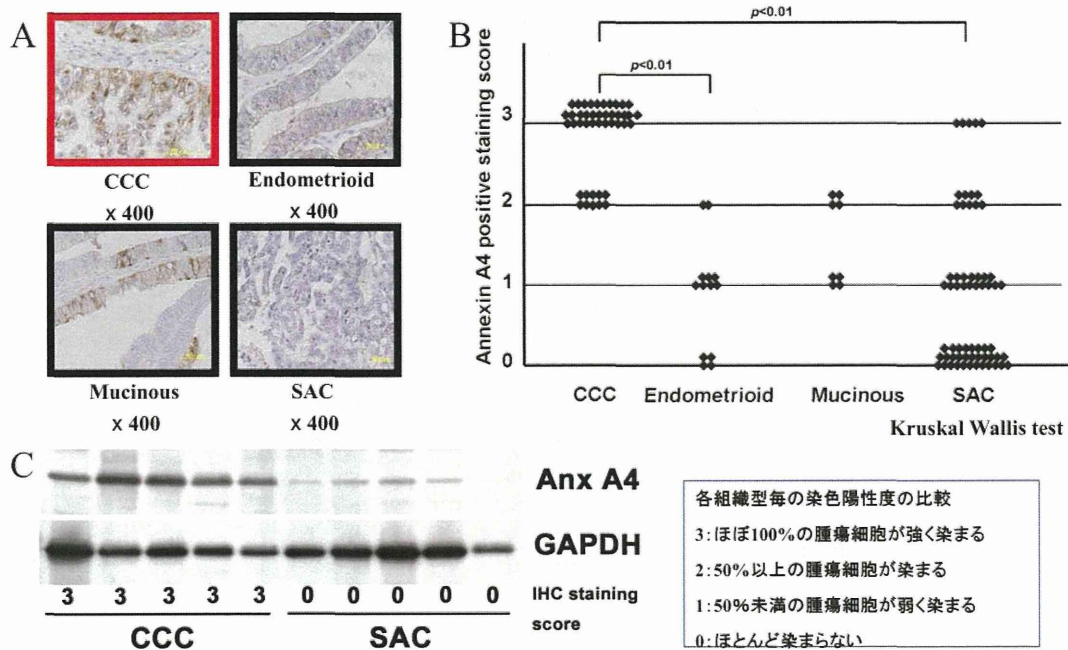


図3 免疫組織化学染色法によるAnnexin A4の発現解析  
 A:Annexin A4染色、B:免疫組織化学染色の結果をスコア化したグラフ、  
 C:ウェスタンブロット法による患者組織でのAnnexin A4の発現解析

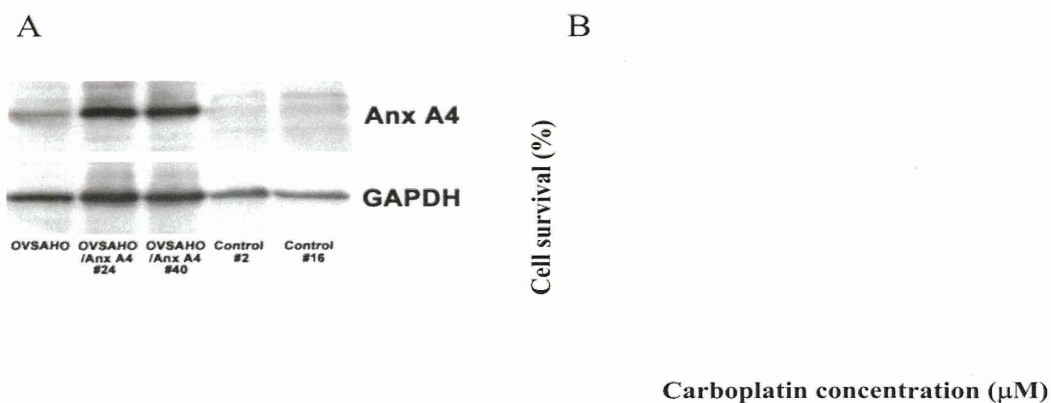


図4 Annexin A4安定発現株の樹立と、カルボプラチンに対する $IC_{50}$ 値の測定  
 A: ウェスタンブロット法による樹立したAnnexin A4安定発現株の確認  
 B: カルボプラチンに対する細胞生存率のアッセイ( $IC_{50}$ の測定)

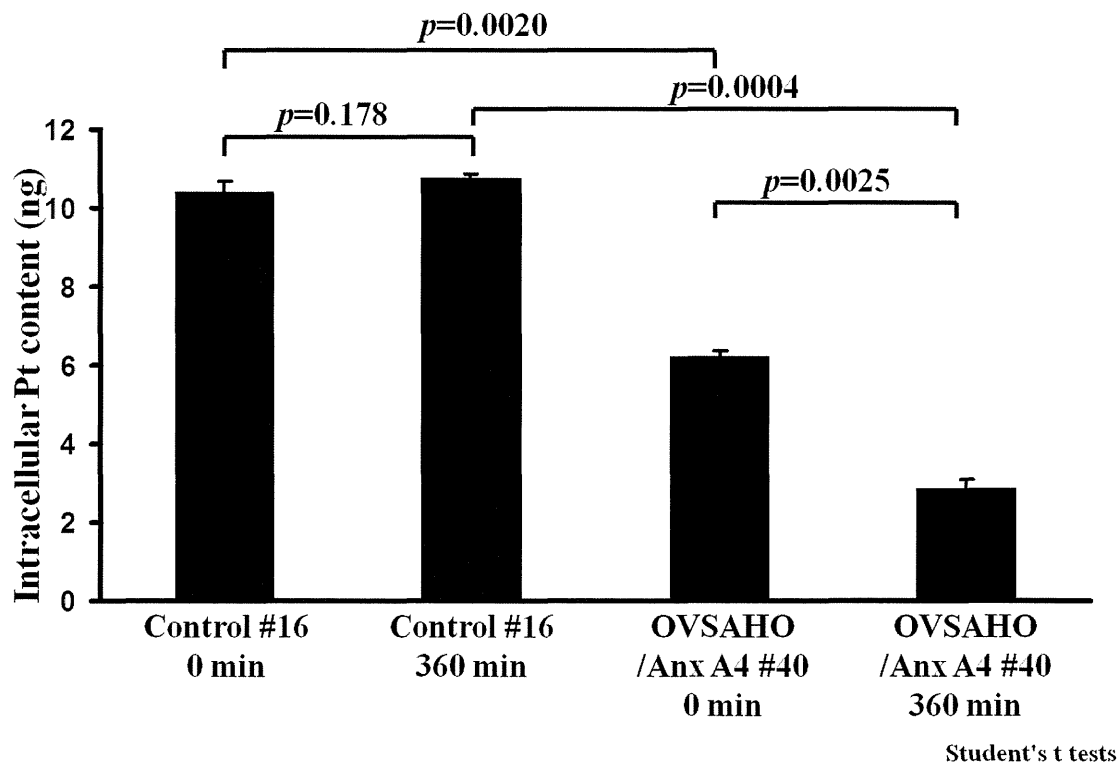


図5 プラチナ定量によるカルボプラチンの細胞内取り込みと細胞外排出アッセイ

Spot no.	Access. no.	Identified protein	$M_w$ (Da)	pI	Coverage (%)
<i>Proteins upregulated in OVISE cells compared with OVSAHO cells</i>					
1	P09211	Glutathione S-transferase P	23,438	5.44	38
2	P09525	Annexin A4 (Annexin IV)	35,957	5.85	49
3	P04792	Heat-shock protein beta-1	22,826	5.98	39
4	Q13011	Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	36,136	8.16	28
5	P30040	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	29,032	6.77	15
6	O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	46,915	6.53	39
7	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	50,451	9.1	14
8	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	50,451	9.1	19
<i>Proteins upregulated in OVSAHO cells compared with OVISE cells</i>					
1	Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor	31,742	4.74	14
2	O75947	ATP synthase D chain, mitochondrial	18,405	5.22	41
3	P30084	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor	31,823	8.34	27
4	P42126	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	33,080	8.8	10
5	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	38,639	6.32	25
6	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	38,639	6.32	25

表1 質量分析により同定された卵巣明細胞腺癌細胞株(OVISE)、及び卵巣漿液性腺癌細胞株(OVSAHO)にて高発現を示すタンパク質

histology	mean age (range)	FIGO stage				total
		I	II	III	IV	
CCC	53 (36-66)	27	5	9	2	43
Endometrioid	53 (28-66)	2	7	4	0	13
Mucinous	53 (28-90)	6	1	1	0	8
SAC	55 (33-81)	9	13	35	5	62

126

表2 免疫組織化学染色に用いた卵巣癌患者組織の臨床背景

Clinical characteristics of patients (n = 182)		
Characteristic	Normal endometrium	Endometrial cancer
Age		
mean age ± SD	49.7 ± 9.4	55.9 ± 9.6
median age (range)	47 (35-73)	56 (22-84)
Normal endometrium		
Proliferative phase	22 (37.3%)	
Secretory phase	22 (37.3%)	
Atrophic endometrium	15 (25.4%)	
Endometrial cancer		
Endometrioid		121 (98.4%)
Serous		2 (1.6%)
Grade		
G1		46 (38.0%)
G2		47 (38.8%)
G3		28 (23.1%)
FIGO stage		
I		77 (62.6%)
II		8 (6.5%)
III		30 (24.4%)
IV		8 (6.5%)
Total	59 (100%)	123 (100%)

表3 患者の臨床情報

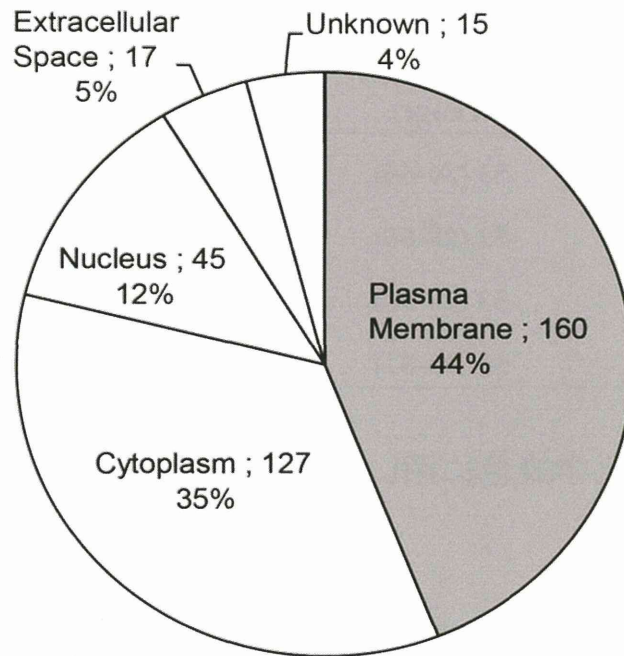


図6 iTRAQ法により同定されたタンパク質の局在分類

Description	HEC1	HEC1A	HEC6	HEC108	HEC116	HEC251	SNG II
BST-2	-	5.618	80.130	91.91	87.12	3.42	38.73
CD98 heavy chain	1.119	0.388	1.353	3.876	2.898	1.147	2.527
Adipocyte plasma membrane-associated protein	0.974	1.312	2.724	2.420	2.720	1.009	0.691
Basal cell adhesion molecule	0.750	0.730	5.100	2.810	2.629	3.950	2.199
CUB domain containing protein 1	1.026	1.949	10.975	3.781	12.346	9.095	15.013
Discoidin, CUB and LCGL domain-containing protein 2	1.396	1.323	1.864	2.860	2.236	4.805	1.409
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	1.402	0.936	1.738	3.251	2.589	3.589	1.095
Large neutral amino acids transporter small subunit 1	0.854	0.249	1.226	5.577	5.351	1.291	4.570
Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT3	2.575	7.388	1.508	1.353	5.867	1.407	1.796
BSA (internal standard)	1.134	0.878	0.941	1.088	1.066	1.059	0.887

内部標準として全ての検体に等量ずつ加えたbiotin標識BSAのiTRAQ定量結果よりサンプル間の誤差は±15%の範囲であり、補正計算により正確な蛋白質発現に関する結果を得ることに成功した。

図7 iTRAQ法により同定された子宮内膜癌抗原候補タンパク質(抜粋)





図8 子宮内膜癌細胞株におけるBST2のmRNAレベルでの発現解析

### FACS 解析

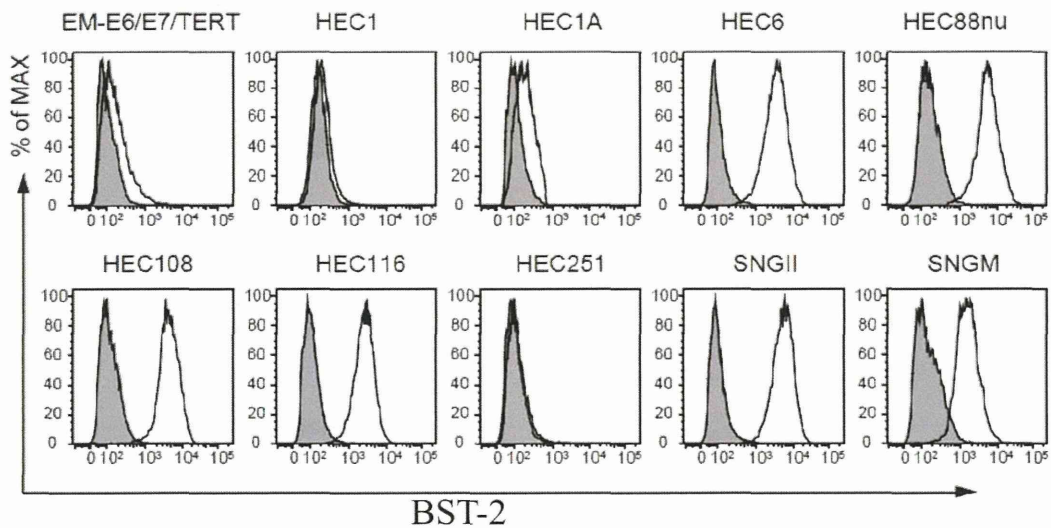


図9 子宮内膜癌細胞株におけるFACS解析によるBST2のタンパク質発現解析

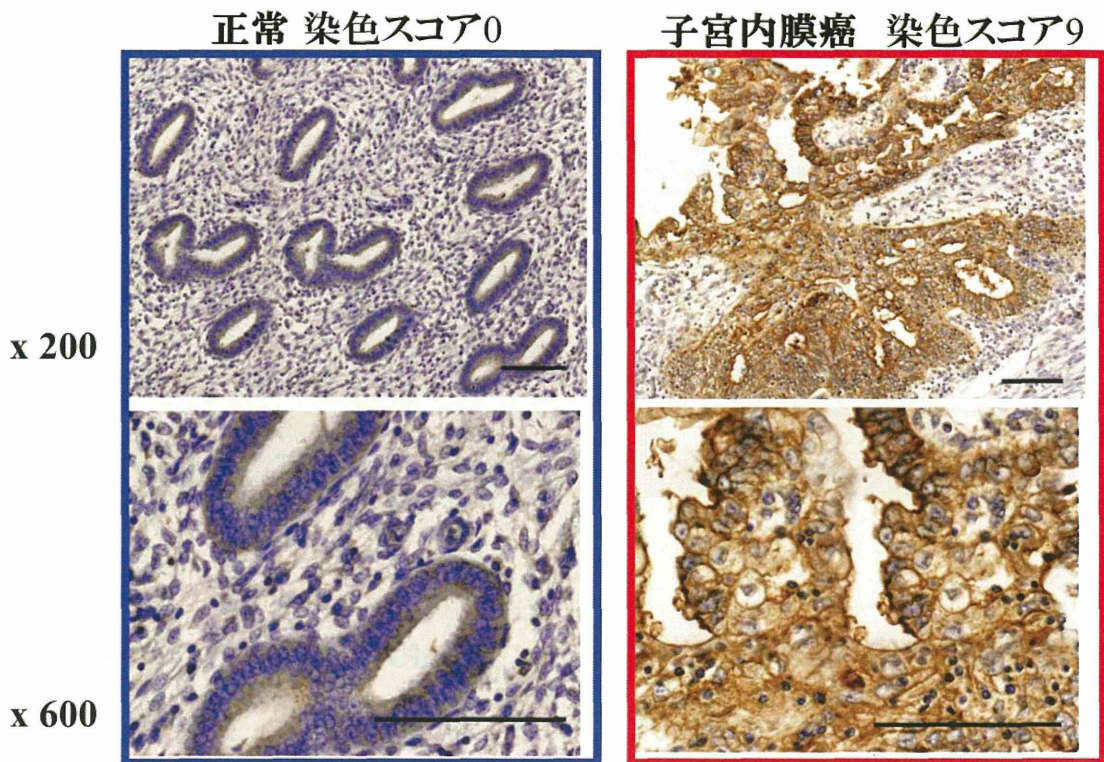


図10 子宮内膜癌組織におけるBST2の免疫組織化学染色

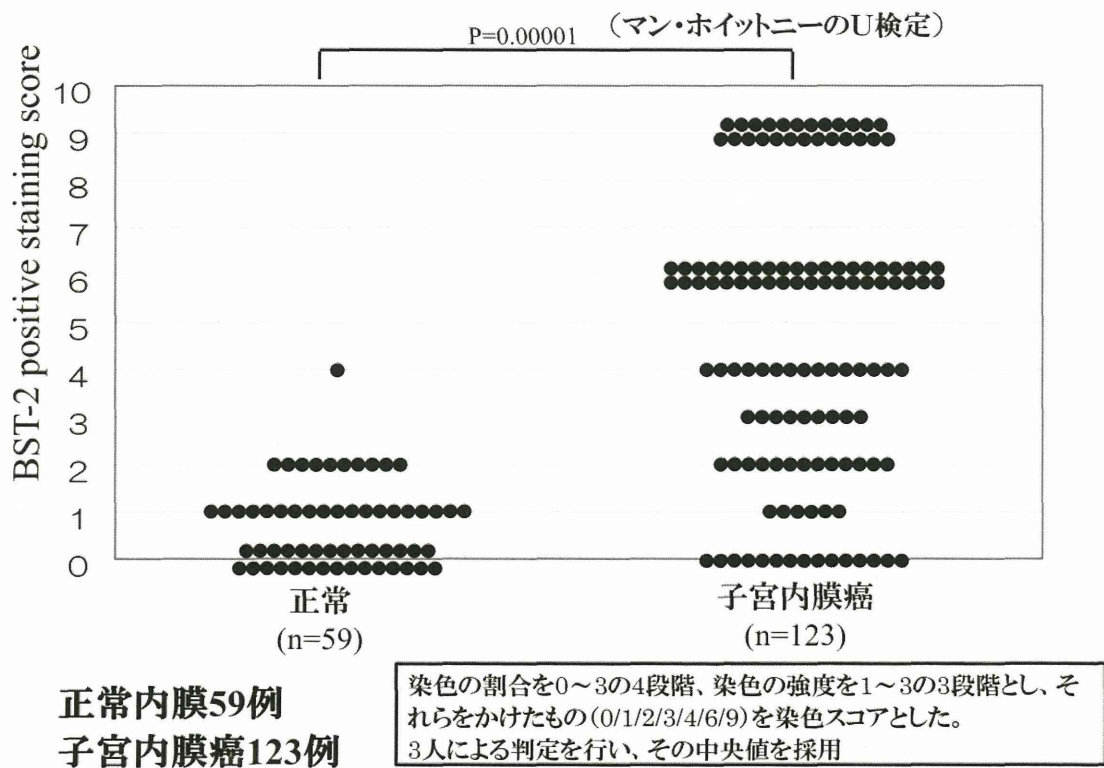


図11 子宮内膜癌組織におけるBST2の免疫組織化学染色による発現解析

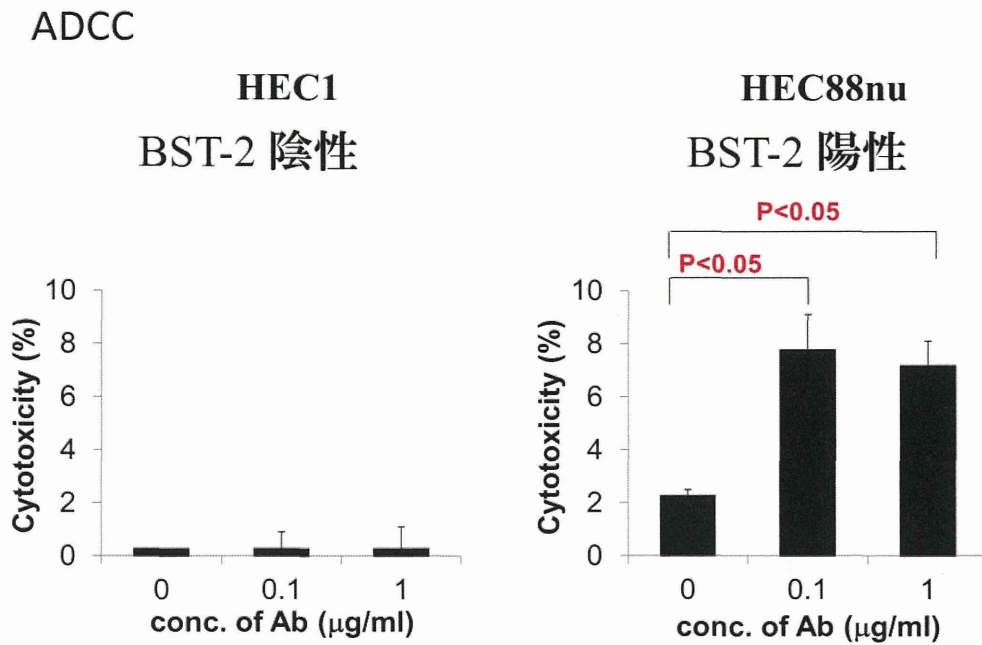


図12 子宮内膜癌細胞株に対するBST2抗体によるADCCアッセイ

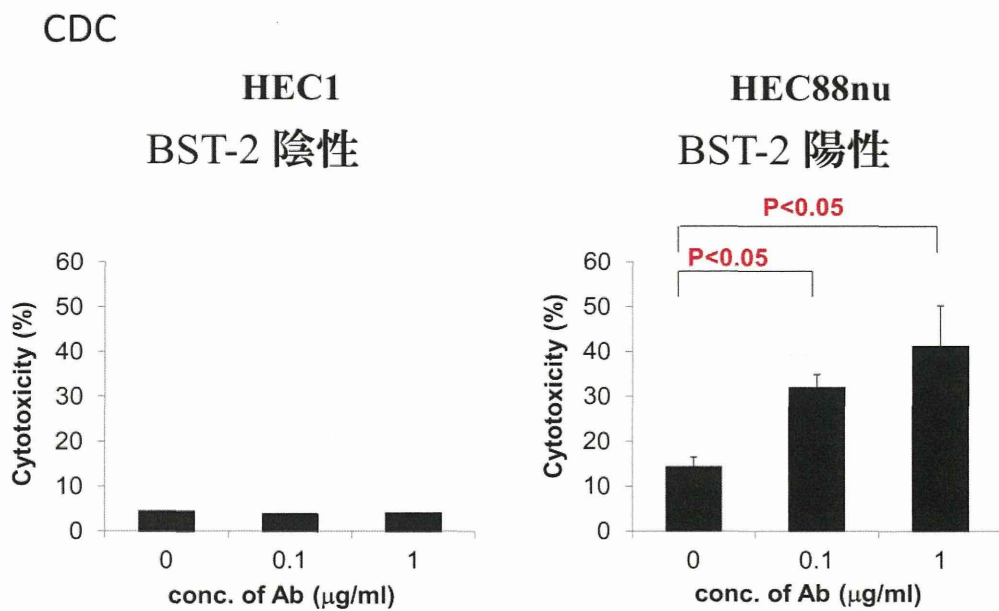
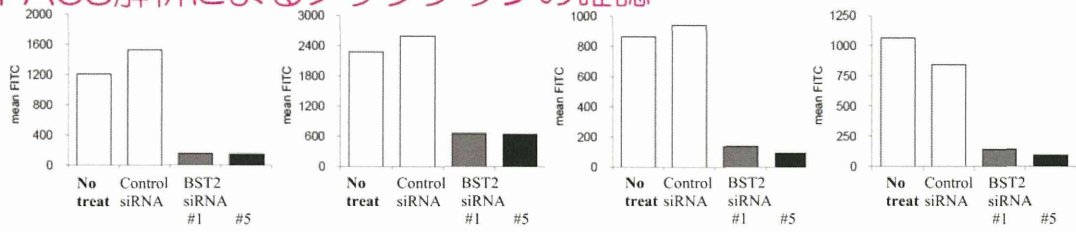


図13 子宮内膜癌細胞株に対するBST2抗体によるCDCアッセイ



## FACS解析によるノックダウンの確認



## siRNAを用いたノックダウンによる増殖阻害アッセイ

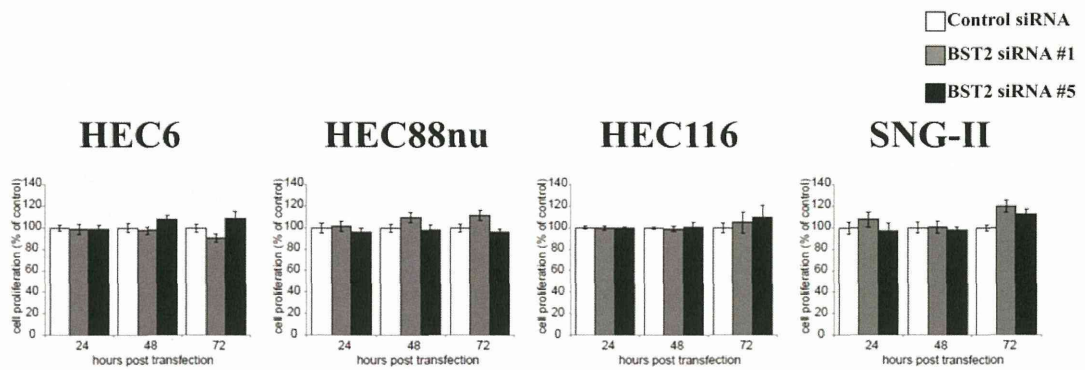


図14 子宮内膜癌細胞株のBST2 siRNAによる細胞増殖アッセイ

## 特異的抗体による増殖阻害アッセイ

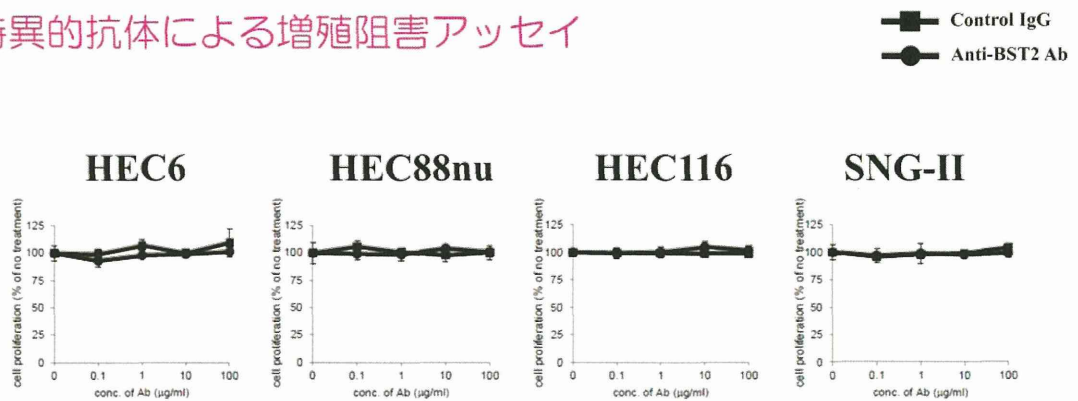


図15 子宮内膜癌細胞株のBST2 抗体による細胞増殖アッセイ

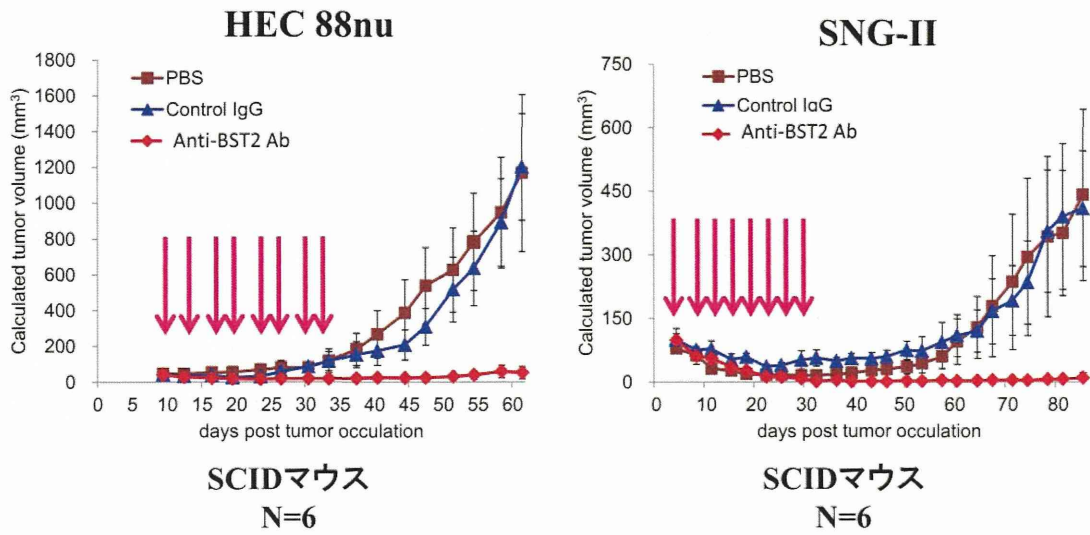


図16 子宮内膜癌細胞移植SCIDマウスに対するBST2抗体による*in vivo*での抗腫瘍効果

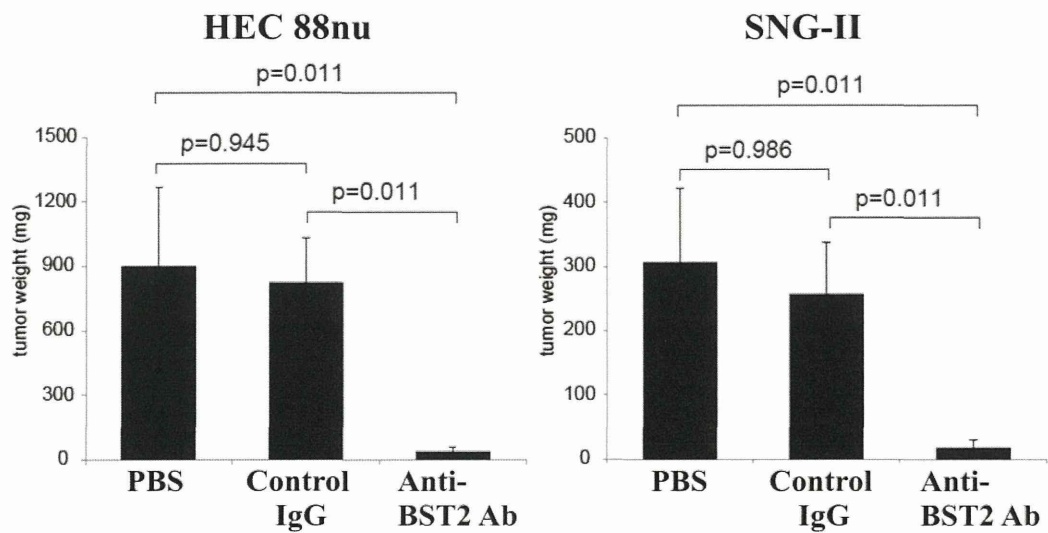


図17 子宮内膜癌細胞移植SCIDマウスに対するBST2抗体による*in vivo*での抗腫瘍効果

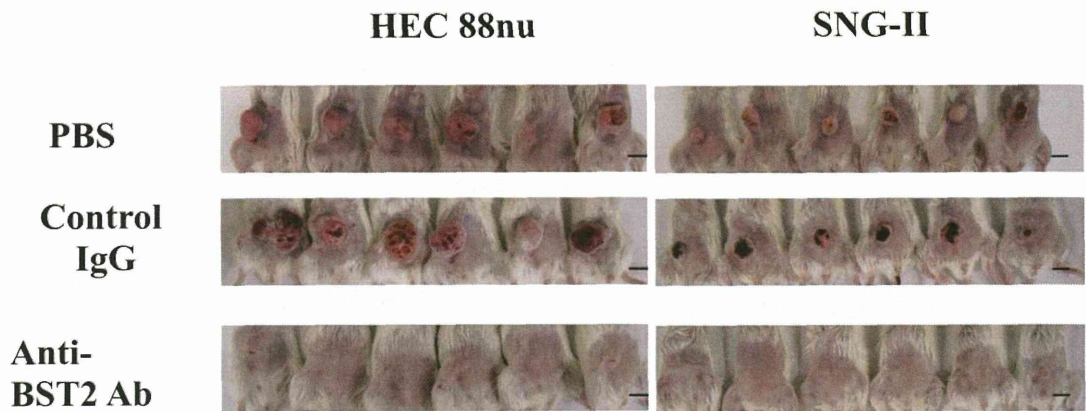


図18子宮内膜癌細胞移植SCIDマウスに対するBST2抗体による*in vivo*での抗腫瘍効果

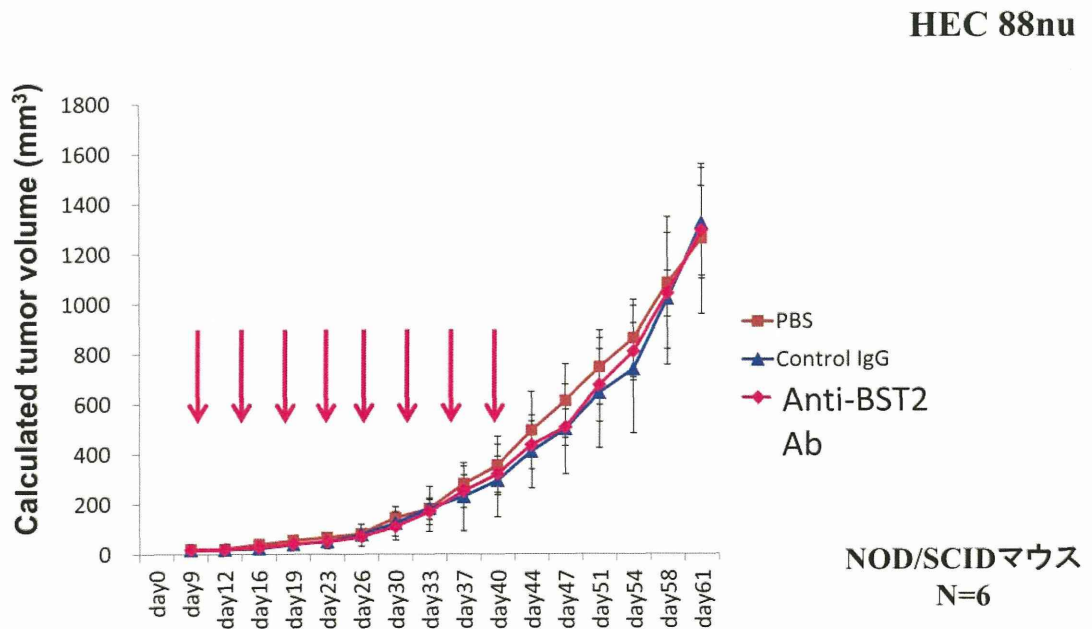
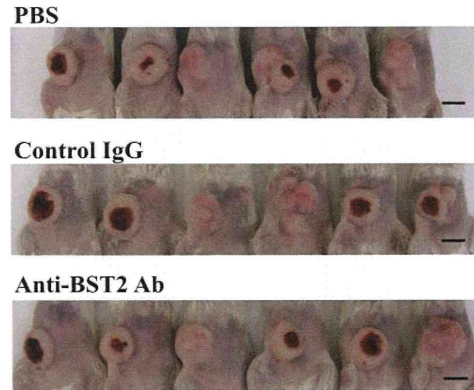
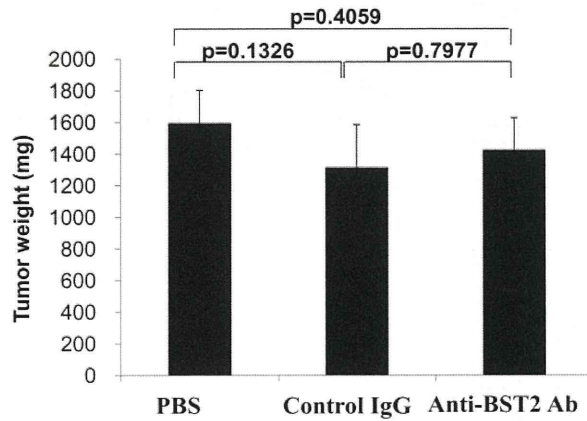


図19 子宮内膜癌細胞移植NOD/SCIDマウスに対するBST2抗体による*in vivo*での抗腫瘍効果

## HEC 88nu



NOD/SCID N=6

図20子宮内膜癌細胞移植NOD/SCIDマウスに対するBST2抗体による *in vivo*での抗腫瘍効果

Accession	腫瘍組織(in situ melanoma) /正常皮膚組織(in situ melanoma)	腫瘍組織(invasive melanoma) /正常皮膚組織(invasive melanoma)	Description
1	Q9NP78	.	ATP-binding cassette sub-family B member 9
2	P05164	5.671	Myeloperoxidase
3	P05107	6.504	Integrin beta-2
4	Q96AY3	4.308	FK506-binding protein 10
5	Q02809	7.123	Procollagen lysine-2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
6	P02679	5.307	Fibrinogen gamma chain
7	P07958	7.690	Cathepsin B
8	P02788	2.419	Lactotransferrin
9	Q96D15	3.130	Reticulocalbin-3
10	P15104	12.093	Glutamine synthetase
11	Q9HD89	2.814	Resistin
12	P50454	2.725	Serpin H1
13	<b>Q15063</b>	<b>4.434</b>	<b>Periostin</b>
14	P14780	2.630	Matrix
15	P13796	5.983	Plastin-2
16	P02675	2.033	Fibrinogen beta chain
17	P80511	.	Protein S100-A12
18	Q16695	5.041	Histone H3.1t
19	P41218	2.273	Myeloid cell nuclear differentiation antigen
20	P31146	4.035	Coronin-1A
21	P02792	1.269	Ferritin light chain
22	P17213	1.076	Bactericidal permeability-increasing protein
23	Q96AG4	3.854	Leucine-rich repeat-containing protein 59
24	Q9P2E9	3.176	Ribosome-binding protein 1
25	P24821	3.544	Tenascin
26	P00747	3.638	Plasminogen
27	O15460	2.853	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2
28	P05109	11.016	Protein S100-A8
29	Q86UX7	3.317	Ferritin family homolog 3
30	Q9UEB2	3.647	Cathepsin

表4 iTRAQ法により同定されたタンパク質の悪性黒色腫にて高発現するタンパク質のリスト(抜粋)



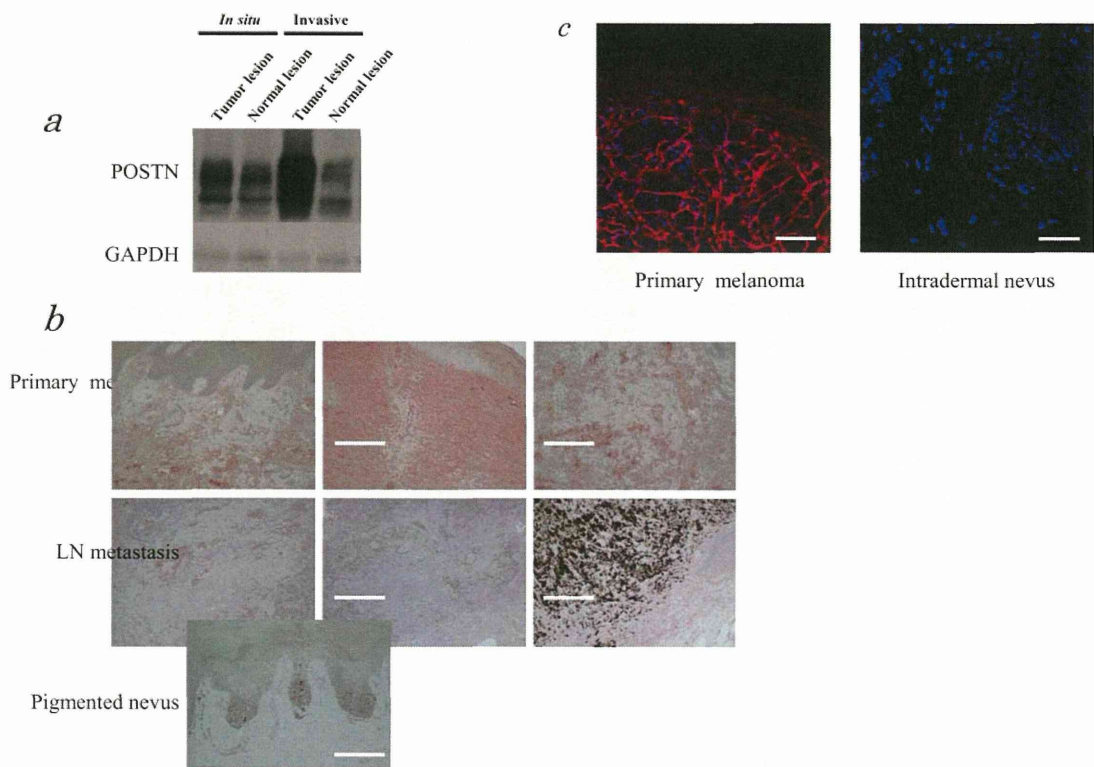


図21 免疫組織化学染色による悪性黒色腫におけるPeriostinの発現解析

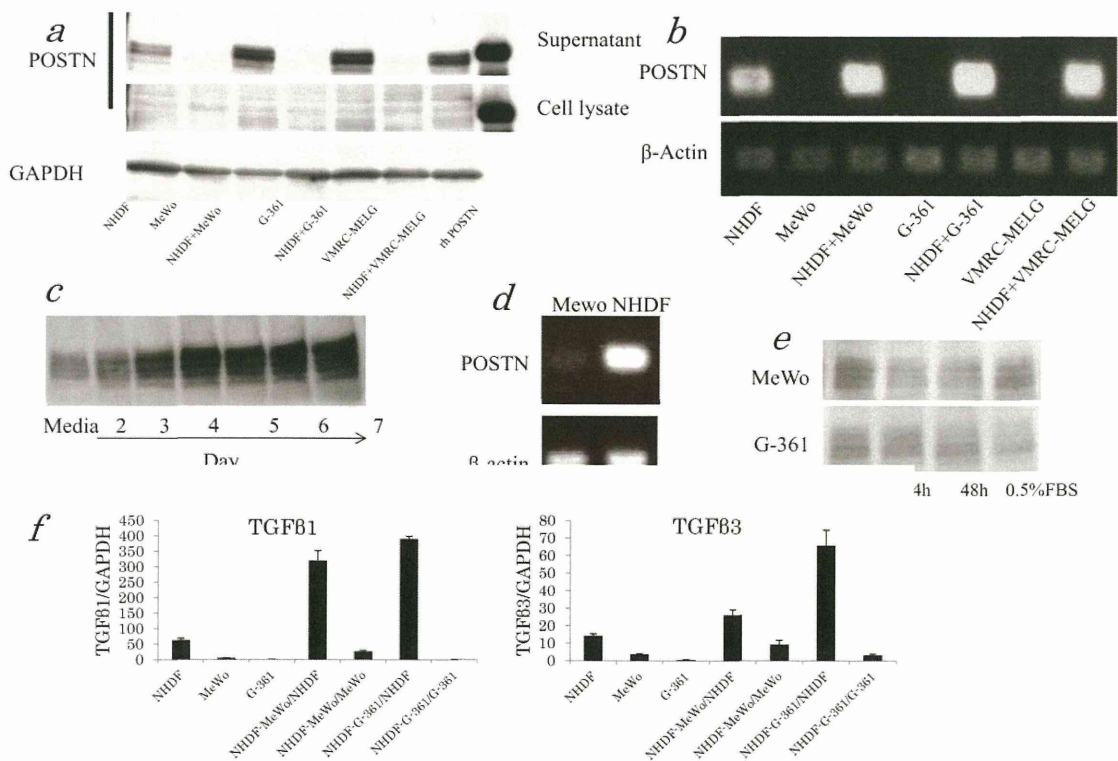


図22 Periostin産生細胞と発現誘導因子の解析

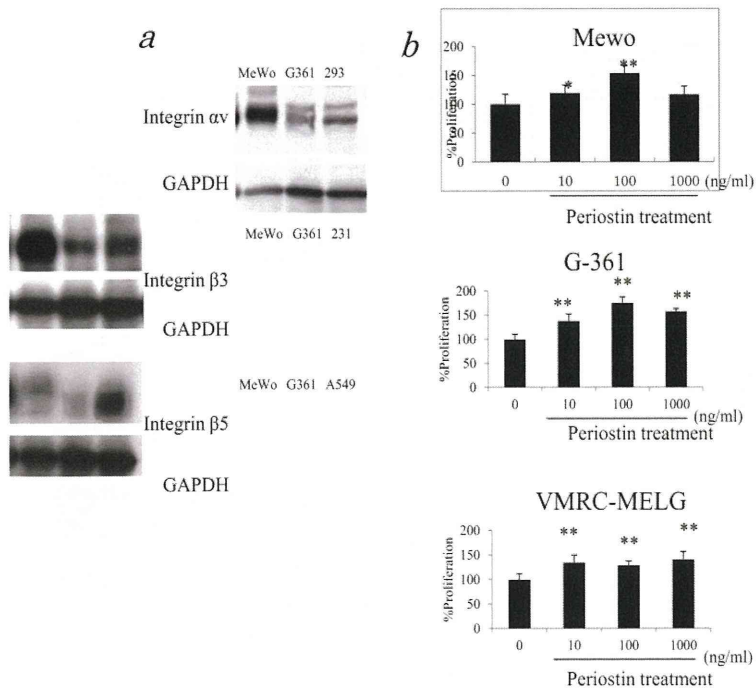


図 23 Periostin受容体の発現解析と細胞増殖促進能の解析

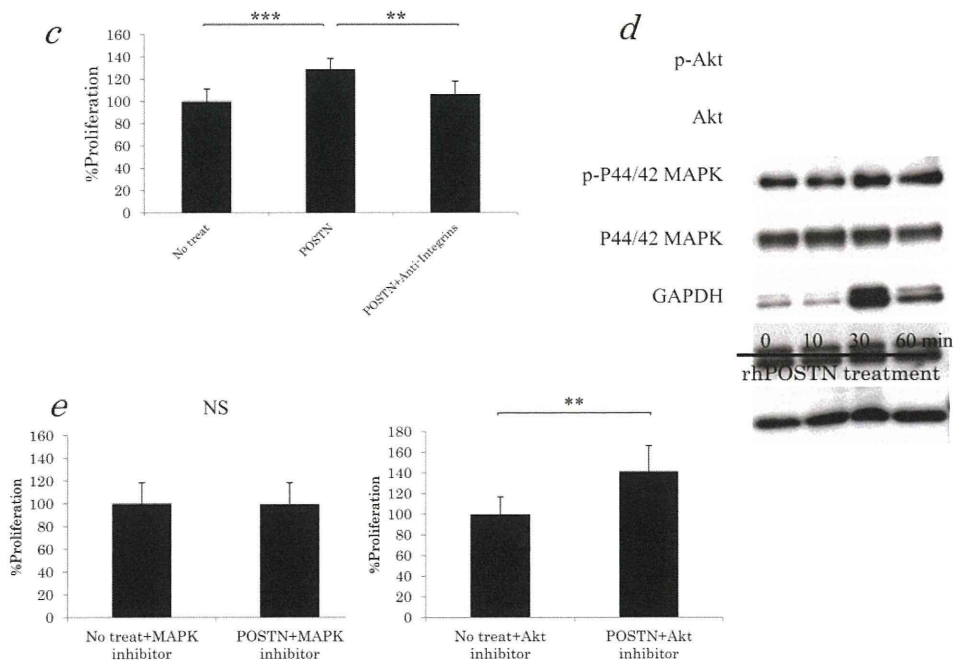


図 23(続き) Periostin受容体の発現解析と細胞増殖促進能の解析

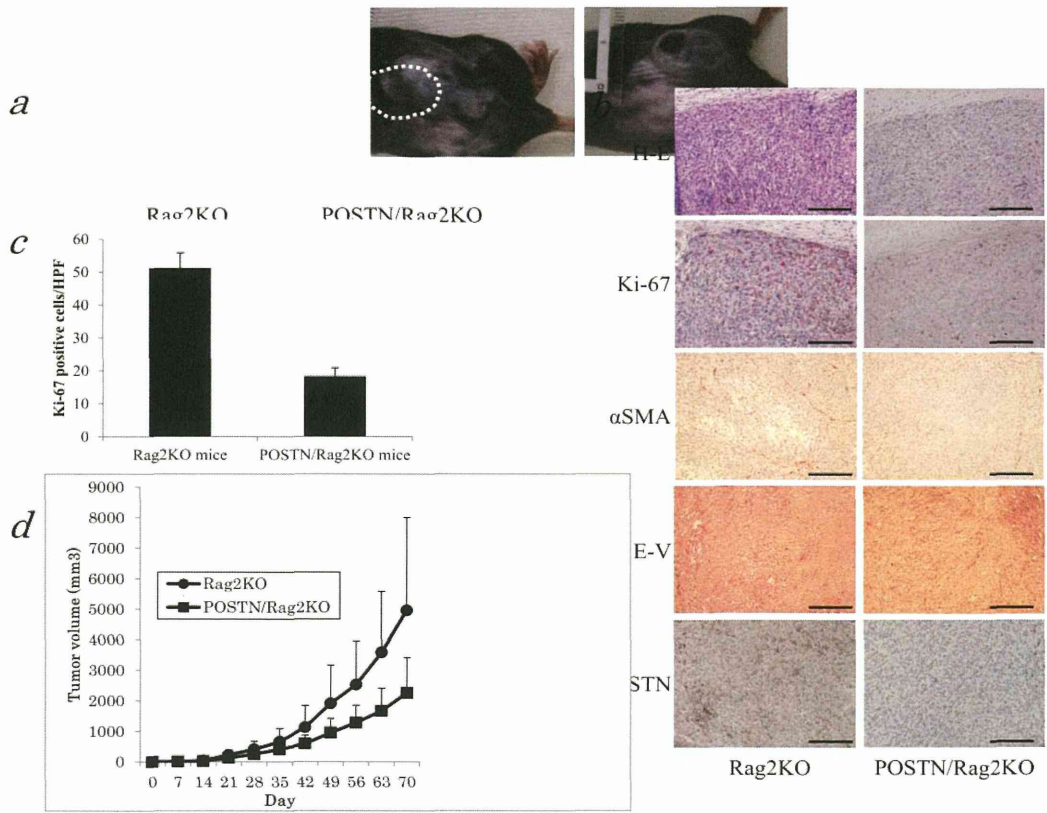


図 24 *in vivo*におけるPeriostinの腫瘍増殖促進効果の確認

ターゲットプロテオミクスを用いた網羅的タンパク質解析技術の開発と  
バイオマーカー探索への応用

研究分担者 中山敬一 九州大学生体防御医学研究所 主幹教授

### 研究要旨

バイオマーカーの探索の成功のためには、多数の検体に対して迅速かつ網羅的にタンパク質の定量・同定を行う必要がある。従来型の探索ベースの質量分析を基盤としたプロテオミクスアプローチは現実的には網羅性が低く、定量性に関しても精度が低いという問題を内包していた。われわれは従来バリデーションベースに使用されているターゲットプロテオミクスの代表的な方法である Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法を発展させることで網羅的かつ高精度でタンパク質絶対定量を行うための基盤技術の開発を行い、最終的にプロテオームワイドな MRM 解析プラットフォームである情報基盤 MRM (Information-based MRM : iMRM 法と略称) の開発に成功した。さらに iMRM 法を利用して多検体の精密な絶対量計測が可能であることを実証するとともに、よりスループットが高い解析法として (Information-based sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra : iSWATH 法と略称) による絶対定量法の構築を試みた。iMRM および iSWATH 法は互いに相補的であり、これらを組み合わせることで極めてパワフルなタンパク質発現絶対定量計測が実現できると考えられる。これはバイオマーカー探索のための新たな技術基盤と成り得ることが期待される。

### A. 研究目的

近年、ゲノム情報の解明を背景に、トランスクリプトーム解析に代表される網羅的解析が盛んに行われ、様々な生命現象をシステムとして理解する試みがなされている。中でも生命現象と直接的に結びつくタンパク質の量的・質的变化をグローバルにとらえるプロテオーム解析の重要性は明白であり、ゲノム情報の整備と質量分析計の高感度化を追い風に、プロテオーム解析への期待が過熱している。プロテオーム解析によってタンパク質の時空間的発現情報のみならず、タンパク質の相互作用や翻訳後修飾情報などの多次元情報を取得することが可能である。ところがこの中でもっとも本質的で重要なタンパク質発現情報の取得に関しては、他に比べて極端に発展途上であり、これを可能にする画期的な技術の開発が渴望されている。

LC-MS/MS 解析によるショットガン定量プロテオミクスは基本的にデータ依存的な自動

MS/MS 解析によっているため、何か意味のあるものが偶然“見つかる”ことを期待しつつ兎に角たくさんのタンパク質を同定し比較する方法である。確かにこの方法である程度の網羅性を得ることが可能であるが、ショットガン法の技術的な問題点は、網羅性を上げるためには試料の分画を必要とするため、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。また、偶然に任せている以上、検出されなかったものが、本当は発現しているのにたまたま同定できなかったのか、検出感度以下しか発現していないのかわからないという問題点を内包する。つまりショットガン解析では定量情報はあくまで同定結果に付随して得られるものであり、同定できなければ変動していたのかを知ることはできない。

そこでわれわれは、従来のディスカバリーアプローチから、ターゲットアプローチとして最近注目を集めている MRM (Multiple reaction



monitoring)[あるいは SRM (Selected reaction monitoring)とも呼ばれる]への転換を考えた。MRM は三連四重極型質量分析計の定量用測定モードであり、少数の検体のバリデーションには適するが、多くのタンパク質を網羅的に同定・定量することは本質的に難しいとされてきた。われわれの研究はこの障壁を乗り越えて、抜本的に MRM を改良し、将来的に大深度プロテオミクス (ディープ・プロテオミクス) を達成することによって、新たなバイオマーカー探索の時代を築くことを目的とした。

## B. 研究方法

われわれは全てのヒトタンパク質に対してリコンビナントタンパク質を作成し、それを基に Proteotypic peptide (PTP) を決定した。この PTP 情報を元に、1) これらの PTP が実際に利用出来るか否かを組換えタンパク質を対象とした verification を実施と、実証済み MRM メソッドを登録した Verified MRM メソッドライブラリーの構築、2) これらの情報を用いて様々なヒト培養細胞に対して代謝酵素を中心とした絶対定量、を実施した。この予め全てのペプチド情報を取得して高速に MRM 法を行うシステムを情報基盤 MRM (Information-based MRM : iMRM 法と略称) と呼称し、実際ががん細胞における代謝酵素の絶対量測定を行うことによって、がん代謝変化の全体像をシステムレベルで捉えることに成功した。また iMRM を相補する方法として iSWATH 法 (Information-based sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra) を用いた比較定量法およびリン酸化定量法の開発を行った。

### 1) 実証済み MRM メソッドライブラリーの構築

これまでに取得した PTP 情報を元に MRM-method を作成し、組換えタンパク質消化物(mTRAQ 標識済み)を用いて実際に MRM クロマトグラムが検出できるか否かの実証と、各ペプチドの検出感度の定量化を実施した。組換えタンパク質は 1 タンパク質あたり 20  $\mu\text{g}$  で

98 タンパク質単位で混合し、精製を行った。これらのタンパク質を変性後、酵素消化を行い、50 倍希釈したものを 1  $\mu\text{l}$  を質量分析計に導入し MRM 測定を行った。得られたデータを MultiQuant にてクロマトグラムのピーク検出を行い、手作業による確認後、各ピークの面積値および強度値をデータベースに入力した。現在、18000 タンパク質のうち、約半数に対して同実証実験を完了している。既に検証済みのタンパク質セット中には主要パスウェイ構成タンパク質や代謝経路構成タンパク質などがほぼ全て含まれており、現時点で十分にパスウェイ単位でのタンパク質絶対定量が即時可能な状況になっている。

### 2) ヒト培養細胞における代謝経路の絶対定量

ヒト培養細胞 (HeLa, HEK293, U2OS, T98G, HepG2, HCT116, SW480, MCF7, Jurkat, Namalwa, SKOV3, TIG1, TIG3, WI38, NTERA-2 など)から 2% SDS/7 M urea/100 mM Tris-HCl にてタンパク質を抽出し、BCA アッセイによるタンパク質定量を実施し、それぞれ 200  $\mu\text{g}$  を 1.5 ml チューブに取り分けてメタノール・クロホルム法によって塩、界面活性剤、および夾雑物の除去を行った。得られたタンパク質沈殿を 7 M グアニジン塩酸塩・500 mM triethylammonium bicarbonate バッファーにて可溶化し、65°C, 15 min 加熱処理後、超純水にて 4 倍希釈を行った。これに 2  $\mu\text{g}$  の Lys-C を添加し、37°C, 3 h 処理後、さらに 2 倍希釈し、1  $\mu\text{g}$  trypsin を添加後、37°C, 4 h インキュベーションを行った。さらに 1  $\mu\text{g}$  trypsin を加えて一晩 37°C にてインキュベーション後、凍結乾燥を行った。凍結乾燥ペプチドを 15  $\mu\text{l}$  の超純水に再溶解し、50  $\mu\text{l}$  のイソプロパノールおよび 20  $\mu\text{l}$  の mTRAQ $\Delta$ 0 試薬を添加し、ボルテックス後、室温にて 2 h 反応させ、その後再度凍結乾燥を行った。これらを 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるよう再溶解後、1  $\mu\text{g}$  相当を LC-MS 用バイアルに分注し、mTRAQ $\Delta$ 4 標識済み内部標準を原液 0.04  $\mu\text{l}$  相当を添加し、総量 10  $\mu\text{l}$  とした後、2  $\mu\text{l}$  を LC-MS に導入した (200 ng 消化物相当)。計測対象は中心代謝経路を構成する 107 種類のタンパク質に関し

て全ての細胞でMRM計測を実施するとともに、一部の細胞においては約1200種類の全代謝経路セット(96タンパク質12セット)に関して実施した。

### 3) iSWATH法による絶対定量法およびリン酸化定量法の確立

われわれは組換えタンパク質による事前情報取得と組み合わせることで大規模なMRMを可能とするプラットフォームを構築してきた。しかしながら、本方法を用いた場合、現状ではヒトタンパク質の網羅的絶対定量は物理的に困難である。そこでMRM法の解析対象タンパク質の数的限界を解消する方法として親イオンMSスペクトルデータ非依存的なMS/MS取得法であるSWATH法を用いることを検討した。SWATH法は網羅的にMRM様データを取得できるが、そのデータの帰属が別途取得したMS/MSスペクトルライブラリーを利用する必要がある。そこで、われわれが保有する組換えタンパク質リソースを用いてSWATH用事前情報ライブラリーを構築した。SWATH法は現在の仕様ではラベルフリー法に向いているため、mTRAQ標識前の組換えタンパク質消化物をIDAモードにてLC-MS/MS解析し、得られた結果をMASCOTおよびProteinPilotにて解析し、事前情報ライブラリーを構築した。また、リン酸化ペプチドに関しても同様の解析を行うためEGF刺激後のHeLa細胞消化物を鉄イオンキレートカラムに通すことでリン酸化ペプチドを精製し、ライブラリー調製用試料とし、同様にIDAモードによるLC-MS/MS解析とMASCOT/ProteinPilot解析を実施した。

### C. 研究結果

われわれは独自に作成したPTPデータベースに格納されているデータを元にさらに最適化されたMRM methodライブラリーを構築し、より高感度にMRM測定を実施できる体制(iMRM法)を整えた。得られた実証済みMRM methodを用いて、多数のヒト培養細胞において代謝酵素を中心とした精密なタンパク質絶対定量を実施した。その結果、中心炭素代謝を

はじめとする代謝酵素の発現量は概ね細胞種間で保存されているものの、一部の酵素が特定細胞にのみ発現していることで代謝経路の特性を大きく左右している可能性が示された。また、一部の細胞株に対して実施したより網羅性と感度の高い分析によって代謝酵素の発現量は5桁以上の極めて広範なダイナミックレンジを有することが判明した。

また、iMRM法の欠点を補う手法としてiSWATH法の導入を検討した。iSWATH法においてはSWATH法で得た極めて複雑なMS/MSスペクトルをペプチドにアサインするために、同一クロマトグラフィー条件で取得したIDAモードによるMS/MSライブラリーが必要であり、これが本方法を実際に使用する上で大きな障壁となっている。また、現在のSWATHの仕様では絶対量計測のための内部標準の添加が困難である(詳細は述べないが装置への導入イオン量の制限のため)。そこで、われわれは組み替えタンパク質リソースを用いてIDAおよびリファレンスSWATHデータを取得することを試みた。その結果、組換えタンパク質を利用して取得したIDAデータやSWATHデータを有効に利用することで、SWATHを用いた大規模なタンパク質絶対定量が可能であることが示された。これをiSWATH法と呼称する。また、リン酸化の解析においてもiSWATH法は有効であり、細胞刺激後の詳細なリン酸化の経時変化の定量的追跡が可能であることが判明した。

### D. 考察

これまでにPTP情報の取得、より高感度な解析のための前処理技術の開発、情報処理インフラの構築などを行い大規模なMRM解析のためプラットフォームであるiMRM法が完成した。われわれは主要なタンパク質に関しては全て測定可能であることが実証済みであるMRM methodのライブラリーを構築し、これを用いて多検体における絶対定量を実施することが可能となり、代謝経路のパスウェイ構造比較などを実施することができた。また、iMRM法の原理的欠点を相補する手法としてSWATH法を

導入したが、SWATH 法の原法が抱える、事前情報不足によるピークアサインの問題や絶対定量の問題を、組換えタンパク質を利用することで解決することができた (iSWATH 法)。今後は、iSWATH 法を用いてより正確な絶対定量のため、組み換えタンパク質を用いて得た SWATH データを合成ペプチドによる複数の内部標準添加によってノーマライズし、これをライブラリーとして保持することで、同様にノーマライズした実サンプル SWATH データとのシグナル強度の比からタンパク質絶対量を見積もることを試みる。これまでに、予備的なデータ取得は完了しており、一部のタンパク質に関しては本方法による絶対定量が可能であることが判明しており、大規模なタンパク質絶対定量の実現が期待できる。

## E. 結論

より信頼性の高い MRM method ライブラリーの構築によって容易に多検体での MRM 解析 (iMRM 法) が可能となり、iMRM 法による精密なタンパク質発現絶対量の計測が実施できた。また、SWATH 法を導入することでより網羅的な絶対定量法の構築の目処がたった。さらに SWATH 法のリン酸化定量解析への応用の可能性も示すことができた (iSWATH 法)。これらの方法を組み合わせて利用することで容易にパスウェイワイド・システムワイドなタンパク質の絶対量計測やリン酸化変動計測が可能であり、バイオマーカー探索実施のための大規模データ取得において次世代の有効な手段となることが十分に期待される。

## F. 研究発表

### F-1. 論文発表

1. 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**, 172-82 (2009).

2. 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**, 5192-97 (2009).
3. 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**, 420-32 (2009).
4. 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**, 3549-63 (2009).
5. 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<sup>+/+</sup> mice. *Nature Genet.* **42**, 83-88 (2010).
6. Tsukada, Y., Ishitani, T. & Nakayama, K.I. KDM7 is a dual demethylase for histone H3 Lys 9 and Lys 27 and functions in brain development. *Genes Dev.* **24**, 432-7 (2010).
7. 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 by Arf-p53-independent

- cellular senescence. *Nature* **464**, 374-9 (2010).
8. 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**, 457-67 (2010).
  9. 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<sup>kip1</sup>. *Immunity* **34**, 24-38 (2011).
  10. 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).
  11. Wu, H., Pomeroy, S.L., Ferreira, M., Teider, N., Mariani, J., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S., Tron, V.A., Saltibus, L.F., Spyrapoulos, L. & Leng, R.P. UBE4B promotes Hdm2-mediated degradation of the tumor suppressor p53. *Nature Med.* **17**, 347-355 (2011).
  12. Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R.S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A.W., Xiao, Y., Christie, A.L., Aster, J., Settleman, J., Gygi, S.P., Kung, A.L., Look, T., Nakayama, K.I., DePinho, R.A. & Wei, W. SCF<sup>FBW7</sup> regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* **471**, 104-109 (2011).
  13. 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).
  14. 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).
  15. 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).
  16. 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.* **11**, 796-807 (2012).
  17. Chan, C.H., Li, C.F., Yang, W.L., Gao, Y., Lee, S.W., Feng, Z., Huang, H.Y., Tsai, K.K., 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* **149**, 1098-1111 (2012).
  18. Yumimoto, K., Matsumoto, M., Oyamada, K., Moroishi, T. & Nakayama, K.I. Comprehensive identification of substrates for F-box proteins by differential proteomics analysis. *J. Proteome Res.*, in press (2013).
  19. Saita, S., Shirane, M. & Nakayama, K.I. Selective escape of proteins from the mitochondria during mitophagy. *Nature Commun.* **4**, 1410 (2013).
  20. Hirano, A., Yumimoto, K., Tsunematsu, R., Matsumoto, M., Oyama, M., Kozuka-