計画研究：2005 ～ 2009 年度

パスウェイ・ネットワークの絶対定量による動態解析

●夏目 徹[1)]　◆家村 俊一郎[1)]　◆中山 洋[2)]　◆澁谷 浩司[3)]

1) 産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター　細胞システム制御解析チーム　2) 理化学研究所　3) 東京医科歯科大学難治疾患研究所

＜研究の目的と進め方＞

細胞内のシグナル伝達のパスウェイは、多くのシグナリング分子は互いに相互作用し、複合体を形成しパスウェイを生み出す。

このようにパスウェイを構成する相互作用を高次機能として捉えるには、統一的な方法論での網羅的相互作用解析を行う必要がある。またこれらの相互作用はシグナルの伝達に伴ってダイナミックに変化する可能性があり、これらの動態を捉える技術開発が生命システムの解明に必須である。

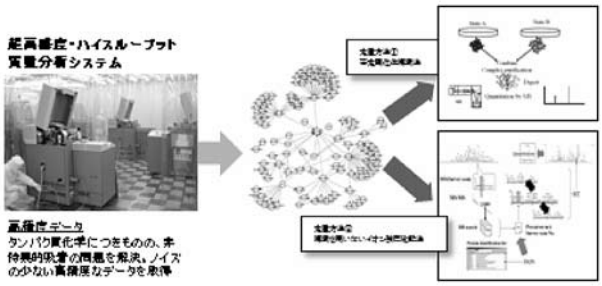
これまで、シグナリングパスウェイを構成するタンパク質を直接同定・定量することは極めて困難なことであった。最近、著しく進歩を遂げたタンデム質量計 (MS/MS) は、タンパク質の内部アミノ酸配列情報とペプチド断片の質量値を自動的に取得することが可能となった。更にゲノム研究の発展と共に配列情報が十分にデータベース化され、且つインフォマティックスの進歩により、タンパク質の大規模同時同定の自動化が実現した。このようなプロテオミクス技術を駆使し、パスウェイ全体の動態解析を行い（パスウェイに関わるタンパク質の網羅的相互作用リンケージマッピングと、その動態変化の記載)、生物情報科学の深化に供することを目指す。

＜研究開始時の研究計画＞

タンデム質量計 (MS/MS) 超高感度化するため、独自に開発したダイレクトナノ LC をオンライン化した。このシステムは、サブ・フェムトモルのオーダーで 150 － 200 個のコンポーネントからなる最も複雑なタンパク質複合体でも、一回の分析で網羅的に同定することが可能である。この解析プラットフォームを駆使し、パスウェイ全体の相互作用動態解析を行う。

そのために、パスウェイに関わる全 cDNA に共通のタグを融合し培養細胞に遺伝子導入する（bait)。その発現タンパク質のタグを介して相互作用複合体を細胞より抽出し、そこに含まれているコンポーネントを一網打尽的に同定する。

これと平行し、cDNA の bait を用いず、細胞内の内因性のシグナル伝達分子複合体の相対・及び絶対定量を行うための技術開発も行う。そのために先ず､内因性の複合体を認識する抗体の作製、



パスウェイ全体に網羅的に行うことを目指す。

研究開発は、先ずシステムの①フィージビリティスタディ研究からスタートする。そのために、最も詳細な解析が進んでいる、古典的 MAP キナーゼカスケードに関係する 25 程度の遺伝子を用い、これらの相互作用のマッピングを行い、シグナルの休止期と刺激時の相互作用の変化を捉える。本解析プラットフォームで、既に報告されている相互作用がどの程度カバーできるかを先ず詳細に検討する。また、絶対定量を行うための、内標準用のペプチドの合成等お行い、小規模なフィージビリティ研究を行う。ここで、新規な相互作用を発見した場合、その相互作用の生物学的な意義も個別に検討する。

その後、これらの相互作用の定量のための新規な解析手法の開発を行う②。現在、質量分析によるタンパク質定量は、安定同位体ラベル・化学ラベルを用いる方法が普及しつつある。しかし、この方法はサンプル調製の条件や、使用できる細胞等に制限が多く､且つ組織由来のサンプルには適用できない。本研究計画では、これらの欠点を克服する技術開発と共に、ラベルを用いない技術も試みる。また、そのための新たなソフトフェア開発にも取り組む。これらの技術を確立し、新規なパスウェイの同定と動態解析から、新たな細胞機能の解明を目指す③。

その対象候補は Ca2+ 依存的キナーゼである CaMK のサブファミリーやレドックスタンパク質群が考えられる。CaMK は神経細胞の分化、突起伸長、シナプス形成に関わる重要なキナーゼ群である。古典的 MAP キナーゼの関わりも報告されている。しかし、依然その基質と機能複合体の実態は不明である。

＜研究期間の成果＞

①フィージビリティ研究

パスウェイ全体解析に先立ち、シグナル伝達分子以外を含む機能既知遺伝子を用い、システムの検証研究を行った。すなわち、既知遺伝子の既知相互作用をハイスループットに検出可能であるのか、またその coverage を評価した。その結果、既知相互作用を検出できるにとどまらず、細胞周期調節因子、タンパク質分解系、タンパク質生合成系、カルシウムイオンチャネルなどのシステム中に多くの新規相互作用が発見され、その生物学的な意義が証明された。

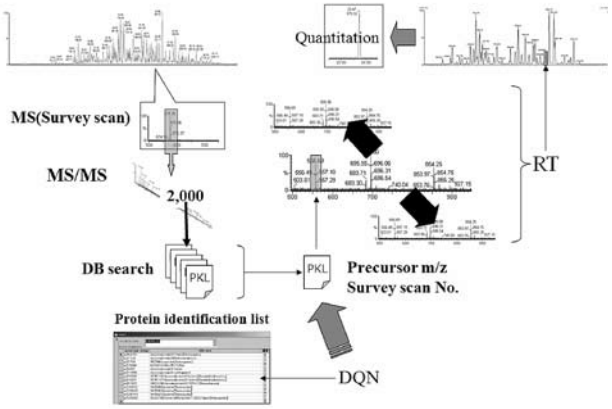
この検証研究を踏まえた上で、古典的 MAP キナーゼカスケードに関係する 25 程度の遺伝子を用いた相互作用のマッピングを、行った。その結果、約 90 の相互作用と、それに関わる 65 のタンパク質を同定した。そのうち、85% ほどは既に報告された相互作用であり、残りの 25% は予想されていたが、未報告のものであった。また､シグナルのカスケードは受容体から核内のイフェクターに至るまで、ほぼ網羅的に相互作用が検出された。

さらに、新規と思われる相互作用も数個検出された。安定同位体ラベル、あるいはペプチド内標準を用い、シグナルの休止期と刺激時の相互作用の動態を定量することにより、その一つは、新規な Erk イフェクターであることが予想された。

②新規な解析手法の開発

安定同位体ラベル、化学ラベルを用いる、相対定量法は、使用できる細胞株に制限が多く、また馴化や培養条件の至適化など大

規模解析に適さないことが次第に明らかとなった。また可能だとしても細胞が生理的な条件で生育しておらず、栄養飢餓などの非生理的な相互作用を検出しかねないという危惧が常につきまとう。そのため、安定同位体ラベルを用いない相対定量の開発を行った。



対照とサンプルを従来通り、別々に解析し、両者で観察されたペプチドイオンの強度比からの定量を試みた。このためには、independent に行われるクロマトグラフィの再現性を高める高精度な超微量クロマト技法を確立した。また、各ペプチドイオンを、クロマトの溶出パターンと分子量などの情報から複数のクロマトグラフィ上から自動抽出しピーク面積を計算し、定量するソフトウェアの開発を行った。

このペプチドイオンの強度比からの相対定量法を DQN 法（Direct Quantitation of Non-labeled proteome）と名付けた。この DQN 法の評価のため、古典的マップキナーゼカスケードの最下流にあたる Erk を用いた。定常時、EGF 刺激時と恒常的活性型 MEK 遺伝子導入時とを比較し、Erk 相互作用分子の変化を定量した。その結果、刺激・非刺激時で Erk の既知基質で 100 倍程度までシグナルが変化を定量することが可能であった。それらの定量性の再現性を検討したところ、変化のあったペプチド 77 本中 75 本（97%）が 4 回の繰り返し実験において CV 値が 10% 以内であった。また 10% の CV 値に収まらなかったペプチドは全てイオンカウントが 30 以下の弱いシグナル強度であり、S/N 比などの問題から再現性が得られなかった。よって、シグナル強度が十分高く且つ、ダイナミックレンジが 2 桁の範囲であれば、再現性の良い相対定量が出来る目処がたたったといえる。

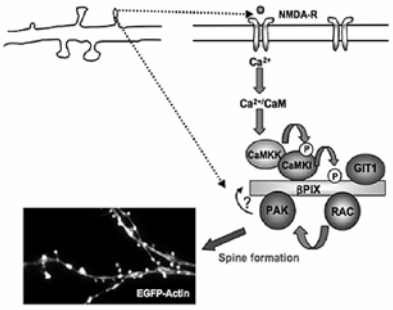
そこで、さらに DQN 法を行うためのデータ処理を自動化するプログラムの開発にも着手した。これは各ペプチドのクロマトの溶出時間、分子量と価数の情報から複数のクロマトグラフィ上から同一種のペプチドピークを自動抽出し、Raw peak にスムージング等を施しピーク面積を計算・定量するものである。定量の自動化において、先ず問題となったのはピークのスムージングが不適切であるとピーク認識が曖昧となり、本来一つのピークを複数の異なるピークとして定量してしまうことであった。この傾向はシグナル強度が低いピークほど顕著であり、スムージングパラメーターの至適化で対処したが、抜本的な対策は今のところない。また、質量分析計が取得したデータをピークリストファイルに変換する際のバグなどが一部まだ修正されておらず今後の課題である。しかし、概ねシステムとして完成した。さらに、クロマトグラフィとサンプルの同定結果の再現性を確認した。多重検定をパラメトリックで行い各データの再現性が極めて高く、ベイトが異なる場合の各特異的な相互作用が極めて低い危険率でほぼ自動的に抽出可能であることを確認した。

また、DQN 法によるデータ再現性をさらに詳細に評価するために、３７の異なる bait タンパク質を用い４回の繰り返し実験を行った（合計１４８解析）。これらの bait は全て小胞体内のレドックスタンパク質であり、非常に多くのタンパク質と相互作用し酸化還元と基質タンパク質のフォールディングに関わっている。従って、bait と伴に同定される Prey タンパク質の総数は７９１に及び、合計１４，４３２のペプチドが検出された。この検出されたペプチド数を確率論に基づきダンダムにペプチドが出現するモデリングを行った。また、実際のペプチドが４回の繰り返し実験によって揺らぎなく出現した場合から、４回とも全て揺らぎがあった場合までを１～４と数値化した。これらを用い実験結果から等分散と見なされる割合をランダムモデルと比較検定を行った。その結果、実験データ中の等分散と見なされるタンパク質とランダムモデルにおける等分散数の有意差は $p<10^{-21}$ という驚異的な差が認められ、生物データとしては極めて高い再現性があると判定された（同法による、一般的な生物データの再現性は $p<10^{-2}$ 程度で高再現率と判定される）

③新規パスウェイの同定

開発して DQN 法を用い、神経細胞でのカルシウムシグナルに関わる分子を bait として用いパスウェイの解析を行った。具体的には Ca2+ 依存的キナーゼである CaMK のサブファミリー全てを用い網羅的なネットワーク解析を行った。

その結果、CaKI が小分子量 G タンパク質である beta-PIX と相互作用しリン酸化し活性化していることを明らかにした。beta-PIX は GTP 交換因子である Rac とそれにより制御されるキナーゼである PAK らと共に signalosome を形成している。活性化した beta-PIX は Rac を介して SAK を活性化し、PAK は細胞骨格であるミオシンを制御する MLC をリン酸化し細胞骨格のダイナミクスに変化を与え、神経突起の形成を引き起こすことが明らかとなった。さらに CaMKI はやはりカルシウム依存的キナーゼである CaMKK により活性化されることも明らかにした。CaMKK は神経活動によって NMDA 受容体などを介して流入するカルシウムイオンによって活性化する。従って神経活動によりダイナミズムが変化する神経突起形成されるが、その新規で重要なパスウェイの全貌を明らかにすることに成功した (Neuron 57, 94-107, 2008：下図)。従って、我々が開発してきた手法が、既知のパスウェイの動態を定量することにとどまらず、新規なパスウェイの発見にも貢献できることを示すことが出来た。



Electrical Activity through a Calcium-Dependent Signaling Pathway Modulates Spine Formation

Saneyoshi, T., *et al.*, **Neuron** (2008) *57, 94-107*

さらに、神経細胞におけるカルシウムシグナルに関わる分子のパスウェイ解析を続行した。具体的にはカルモジュリン依存的キナーゼである CaMK のサブファミリー全てを用い網羅的なネットワーク解析を行った。CaMK は I・II・IV・KK というサブタイプが知られている。また CaMKI と II には α β γ δ という４つ

のアイソフォームが、CaMKKにはαβという二つのアイソフォームが存在する。従ってこれら１１分子全てをbaitとして用いた。またwild typeのみならずconstitutively activeとkinase deadである変異体も用いた。また、細胞はHEK293細胞の他にCortical NeuronとHippocampal Neuronのラット初代細胞も用いた。その結果、CaMKと相互作用する１８６個の新規な分子を発見し、そこから８つの新たなCaMK機能複合体を発見した。また基質候補の絞り込みのために、生化学的な手法によるリン酸化部位決定とともに、やはり質量分析によるリン酸化タンパク質の解析を試みた。具体的には、細胞にカルシウム刺激、あるいはconstitutively activeなCaMKを発現させた細胞のリン酸化タンパク質を網羅的に定量しリン酸化が上昇したタンパク質群とネットワーク解析によって検出された新規相互作用分子との比較を行った。

その結果、1分子についてはCaMK Ⅰの新規な基質であることが確認された。この分子をbaitとしてさらに「芋づる式」パスウェイの探索を行ったところ、Erkのパスウェイの上流に収束することを発見した（現在論文投稿準備中）。

＜国内外での成果の位置づけ＞

医学・生命科学分野・製薬・バイオテクノロジー産業において、高感度・ハイスループットな質量分析が必須である。その重要性は島津製作所の田中耕一フェローがノーベル賞を受賞したことが如実に物語っている。現在最も高感度な質量分析計は10^{-18}モルという微量のタンパク質を検出することが理論的に可能である。

しかし、実際の測定現場において、そのような高感度分析が行われることは残念ながらない。それは、10万種類のタンパク質の一つ一つが、千差万別の形状と大きさをもち、化学的な性質も様々で且つ不安定だからである。従って微量なタンパク質は僅かな時間、容器に保持するだけで分解あるいは変性し、また容器の壁に吸着し、解析が不可能となってしまう。また、質量分析計にサンプルを導入する過程で混入が避けられない各種の微量異物質が、S/N比を下げるとともに、サンプルのイオン化効率を妨げ、実質的な解析感度を大幅に低下させている。従って、微量異物質の混入を避け、微量サンプルを失うことなく、質量分析計に導入する技術が不可欠なのである。

そのために、我々は世界に先駆け、半導体産業で培われたクリーンルーム技術を導入し、解析を妨害する環境由来のノイズ・発塵を排除し、高感度化とS/N比の向上を図ってきた。また、微量サンプルの消失問題を解決するために、ナノテク活用したマイクロ流路や、精密産業ロボットなど日本の強みを活かし、異分野の技術をバイオへと応用してきた。

従って、本研究開発の中心的な解析システムである質量分析システムはサンプル前処理・導入法と解析環境を含めた全体最適化によって、感度のみならず再現性においても世界ダントツNo1である。従って、本研究開発の世界的な優位性は高い。

また、本研究によって確立された定量技術は、単にパスウェイの動態解析にとどまらず、これまで実質的に不可能であった酵素の基質決定がシステマティックに行えることをも可能とした。これは、極めて再現性から、酵素－基質のような一過性の相互作用であっても優位性をもって同定可能となったからである。これは、ある意味、タンパク質化学の悲願が達成されたとも言える。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

当初計画では、内因性複合体の絶対定量を目指し、複合体を効率よく免疫沈降出来る抗体をファージディスプレーシステムによりシステマティックに所得することを目指し、古典的MAPキナーゼカスケードに関わるパスウェイを構成する１０の分子の抗体を取得することを目指した。しかし、特異性高くアフィニティの高い抗体を取得することが出来なかった。これはファージディスプレーシステムに用いたcDNAライブラリの構造に問題があり、十分な多様性がありかつ、Nativeフォームをとることが保証されていない配列を多く含んでいたことが原因であると考えられた。従って、このテーマは2008年度で中止をした。

＜今後の課題、展望＞

現在の、我々のシステムでは、標準サンプルのスパイク実験で、20ng分の細胞抽出液（細胞約400個相当）中から約2.5 a molのタンパク質を検出出来る感度を誇る。これは、分子量50,000のタンパク質の1500,000個が検出されていることになる。これを1細胞あたりに換算すると、3,750コピー以上のタンパク質であれば1細胞中から、検出可能と言うことになる。従って、1細胞プロテオミクスを十分可能とする感度であることを意味する。また、極めて微量の組織サンプルからのタンパク質の定量・検出が可能であることも示す。また、1細胞中のタンパク質量をf molと仮定すると400個分相当の400f中の2.5 a molであるので、ダイナミックレンジは5乗程度である。

しかし、このような「超々」とも言うべき検出感度を誇っても、1細胞レベルの微量のタンパク質を質量分析装置に導入できないため、「無駄に」感度が高いだけである。従って、今後、臨床検体や、少数の細胞を解析するには、超微量サンプルを調製するためのマイクロマニピュレーション技術の開発が必須であり、実質的な質量分析の検出限界を決定する。従って、さらに飛躍的に進歩した産業ロボット等の技術、またナノテクを活用し、これらの課題に取り組みたい。

また、質量分析によるタンパク質同定・定量技術はこれまで内部アミノ酸配列の決定と配列データベース検索によって行ってきた。しかし、日本が誇るcDNA研究の成果を活用し、プロテオームワイドにタンパク質を全て発現し、それに由来する全てのペプチド断片のMSMSスペクトルを取得することも現実味を帯びてきた。先回りして取得したMSMSスペクトルをKnowledgeとしてDB化し、このknowledgeと観測スペクトルとの相関を取ることにより、より微量なシグナルから、より確実なタンパク質の同定定量が可能となる。従って、配列依存的なプロテオミクスから、Knowledge basedなプロテオミクスへと、今後研究手法が変わっていくものと思われる。これらのことを実現するための基盤整備と研究開発が肝要と思われる。これらのことが実現すると、計測したいタンパク質をknowledgeに基づき狙い打ちすることも可能となる。即ち、複雑で混み合ったサンプルでは、大量に存在するタンパク質ほど、同定されるチャンスが高く、低いものは取り逃がしてしまっている。しかし、同定される場所と時間が予め分かっていれば、検出感度内であれば必ず同定することが可能である。このような狙い打ちは、質量分析のマスフィルター（チャンネル）の切換がマイクロ秒からサブマイクロ秒レベルと飛躍的に高速化したため、一回の解析で3,000個ほどのタンパク質を狙い打ちすることが既にハードウェア的には可能である。従って、一つのサンプルを10回解析すれば、プロテオームワイドのタンパク質の定量も、数時間で可能となる。

このような大規模なタンパク質レベルの解析は、当然ながら次世代シークエンサとの相補性が高く、核酸・タンパク質レベルでの複合オーミック研究が現実味を帯び、世界標準となるであろう。無論、これらの技術は基礎研究に貢献するにとどまらず、今後診断、治療といった応用へと、いち早く視野を拡げ、一般化と普及への研究開発と橋渡し研究も検討準備をし、科学技術施策に

反映させる必要がある。当然、臨床への応用への鍵は、更なる高感度化と高精度化に他ならない。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1）論文

1.0910221519

Patrick, M.S., H. Oda, K. Hayakawa, Y. Sato, K. Eshima, T. Kirikae, S.: Iemura, M. Shirai, T. Abe, T. Natsume, T. Sasazuki, H. Suzuki:Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes, Proc Natl Acad Sci USA, 106(38), 16345-16350(2009).

2.0908101133

Michael, P., Oda, H., Hayakawa, K., Sato, Y., Eshima, K., Kirikae, T., Iemura, S., Shirai, M., Abe, T., Natsume, T., Sasazuki, T., Suzuki, H.: A novel Grb2 associating protein (Gasp) is critical for positiveselection of thymocytes, Proc Natl Acad Sci USA, MS#2009-08593, (2009), (in press).

3.0910061452

Hashimoto, J., T. Watanabe, T. Seki, S. Karasawa, M. Izumikawa, T. Seki, S.I. Iemura, T. Natsume, N. Nomura, N. Goshima, A. Miyawaki, M. Takagi, K. Shin-Ya.: Novel In Vitro Protein Fragment Complementation Assay Applicable to High-Throughput Screening in a 1536-Well Format, J Biomol Screen, 14(8),970-9(2009)

4.0903051355

Hosokawa, N., T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, J.L. Guan, N. Oshiro, N. Mizushima.: Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy, Molecular biology of the cell, 20(7), 1981-1991(2009).

5.0910061450

Hosokawa, N., T. Sasaki, S.I. Iemura, T. Natsume, T. Hara, N. Mizushima.: Atg101 a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13, Autophagy, 5(7), 973-9(2009)

6.0905211520

Saita, S., Shirane, M., Natsume, T., Iemura, S., Nakayama, K.: Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction, Journal of Biological Chemistry (IF=5.58), in press (2009)

7.0908031137

Ichihara, T., M. Ishida, K. Kitagawa, Y. Ichikawa, T. Natsume, N. Yamaki, H. Maeda, K. Takeda, H. Sakuma.: Quantitative analysis of first-pass contrast-enhanced myocardial perfusion MRI using a Patlak plot method and blood saturation correction, Magn Reson Med, 62(2), 373-383)2009)

8.0908031131

Kaneko, T., J. Hamazaki, S. Iemura, K. Sasaki, K. Furuyama, T. Natsume, K. Tanaka, S. Murata.: Assembly pathway of the Mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones, Cell,137(5), 914-925(2009)

9.0905211518

Kiefer, H., A. Mizutani, S. Iemura, T. Natsume, H. Ando, Y. Kuroda, K. Mikoshiba.: Inositol 1,4,5-triphosphate receptor-binding protein released with inositol 1,4,5-triphosphate (IRBIT) associates with components of the mRNA 3' processing machinery in a phosphorylation-dependent manner and inhibits polyadenylation, The Journal of biological chemistry, 284(16),10694-10705(2009).

10.0903051346

Nishiyama, M., K. Oshikawa, Y. Tsukada, T. Nakagawa, S. Iemura, T. Natsume, Y. Fan, A. Kikuchi, A.I. Skoultchi, K.I. Nakayama.: CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis, Nat cell Bio, 11(2), 172-182(2009)

11.0903051351

Sagara, M., Y. Kawasaki, S.I. Iemura, T. Natsume, Y. Takai, T. Akiyama.: Asef2 and Neurabin2 cooperatively regulate actin cytoskeletal organization and are involved in HGF-induced cell migration, Oncogene, 28(10), 1357-1365(2009)

12.0903051341

Tachibana, M., E. Kiyokawa, S. Hara, S. Iemura, T. Natsume, T. Manabe, M. Matsuda.: Ankyrin repeat domain 28 (ANKRD28), a novel binding partner of DOCK180, promotes cell migration by regulating focal adhesion formation, Experimental cell research, 315(5), 863-876(2009)

13.0910061447

Takeda, K., Y. Komuro, T. Hayakawa, H. Oguchi, Y. Ishida, S. Murakami, T. Noguchi, H. Kinoshita, Y. Sekine, S. Iemura, T. Natsume, H.: Ichijo, Mitochondrial phosphoglycerate mutase 5 uses alternate catalytic activity as a protein serine/threonine phosphatase to activate ASK1, Proc Nat Acad Sci USA, 106(30), 12301-12305(2009)

14.0910061454

Yamazumi, Y., A. Kamiya, A. Nishida, A. Nishihara, S.I. Iemura, T. Natsume, T. Akiyama.: The transmembrane nucleoporin NDC1 is required for targeting of ALADIN to nuclear pore complexes, Biochemical and biophysical research communications,389(1),100-4(2009)

15.0801171704

Hamuro, J., O. Higuchi, K. Okada, M. Ueno, S. Iemura, T. Natsume, H. Spearman, D. Beeson, Y. Yamanashi.: Mutations causing DOK7 congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7, The Journal of biological chemistry, 283(9), 5518-5524(2008)

16.0810241333

Hara, S., E. Kiyokawa, S. Iemura, T. Natsume, T. Wassmer, P.J. Cullen, H. Hiai, M. Matsuda.: The DHR1 domain of DOCK180 binds to SNX5 and regulates cation-independent mannose 6-phosphate receptor transport, Molecular biology of the cell, 19(9), 3823-3835(2008)

17.0805191110

Hara, T., A. Takamura, C. Kishi, S. Iemura, T. Natsume, J.L. Guan, N. Mizushima.: FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells, The Journal of cell biology, 181(3), 497-510(2008)

18.0801171706

Saneyoshi, T., G. Wayman, D. Fortin, M. Davare, N. Hoshi, N. Nozaki, T. Natsume, T.R. Soderling.: Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex, Neuron 57(1), 94-107(2007)

19.0810241354

Tomita, T., T. Kido, R. Kurotani, S. Iemura, E. Sterneck, T.

Natsume, C. Vinson, S. Kimura.: CAATT/enhancer-binding proteins alpha and delta interact with NKX2-1 to synergistically activate mouse secretoglobin 3A2 gene expression, The Journal of biological chemistry, 283(37), 25617-25627(2008)

20.0801171437
Iioka, H., S. Iemura, T. Natsume, N. Kinoshita. :Wnt signalling regulates paxillin ubiquitination essential for mesodermal cell motility, Nat cell Biol, 9(7), 813–821 (2007)

21.0801171702
Komatsu, M., S. Waguri, M. Koike, Y.S. Sou, T. Ueno, T. Hara, N. Mizushima, J. Iwata, J. Ezaki, S. Murata, J. Hamazaki, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Yanagawa, J. Uwayama, E. Warabi, H. Yoshida, T. Ishii, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Z. Yue, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka.: Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice, Cell 131(6), 1149-1163(2007)

22.0801171444
Lee, R.H., H. Iioka, M. Ohashi, S. Iemura, T. Natsume, N. Kinoshita.: XRab40 and XCullin5 form a ubiquitin ligase complex essential for the noncanonical Wnt pathway, The EMBO journal 26(15), 3592-3606(2007)

23.0801171441
Nakagawa, T., M. Shirane, S. Iemura, T. Natsume, K.I. Nakayama.: Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38, Genes Cells 12(6), 709-719(2007)

24.0801171507
Saijou, E., T. Itoh, K.W. Kim, S. Iemura, T. Natsume, A. Miyajima.: Nucleocytoplasmic shuttling of the zinc finger protein EZI Is mediated by importin-7-dependent nuclear import and CRM1-independent export mechanisms, The Journal of biological chemistry, 282(44), 32327-32337(2007)

24.0801171504
Satoh, K., J. Ohnishi, A. Sato, M. Takeyama, S. Iemura, T. Natsume, H. Shibuya.: Nemo-like kinase-myocyte enhancer factor 2A signaling regulates anterior formation in Xenopus development. Molecular and cellular biology, 27(21), 7623-7630(2007)

25.0801171430
Ueda, J.Y., J. Hashimoto, A. Nagai, T. Nakashima, H. Komaki, K. Anzai, S. Harayama, T. Doi, T. Takahashi, K. Nagasawa, T. Natsume, M. Takagi, K. Shin-ya.: New aureothin derivative, alloaureothin, from Streptomyces sp MM23, The Journal of antibiotics, 60(5), 321-324(2007)

26.0801171500
Ueda, J.Y., T. Togashi, S. Matukura, A. Nagai, T. Nakashima, H. Komaki, K. Anzai, S. Harayama, T. Doi, T. Takahashi, T. Natsume, Y. Kisu, N. Goshima, N. Nomura, M. Takagi, K. Shin-Ya.: A novel nuclear export inhibitor JBIR-02, a new piericidin discovered from Streptomyces sp. ML55, The Journal of antibiotics, 60(7), 459-462(2007)

27.0701101116
Hamazaki, J., Iemura, S., Natsume, T., Yashiroda, H., Tanaka, K., and Murata, S.: A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes, The EMBO journal 25(19), 4524-36(2006)

28.0701101122
Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S.: Cooperation of Multiple Chaperones Required for the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes, Molecular cell, 24(6), 977-84(2007)

29.0608011429
Hyodo-Miura, J., Yamamoto, T.S., Hyodo, A.C., Iemura, S., Kusakabe, M., Nishida, E., Natsume, T., and Ueno, N.: XGAP, an ArfGAP, is required for polarized localization of PAR proteins and cell polarity in Xenopus gastrulation, Dev Cell, 11(1), 69-79(2006)

30.0701101119
Kajino, T., Ren, H., Iemura, S., Natsume, T., Stefansson, B., Brautigan, D.L., Matsumoto, K., and Ninomiya-Tsuji, J.: Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway, The Journal of biological chemistry, 281(52), 39891-6(2006)

31.0608011409
Kitajima, T.S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y.: Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesion, Nature 441(7089), 46-52(2006)

32.0608011424
Polouliakh, N., Natsume, T., Harada, H., Fujibuchi, W., and Horton, P.: Comparative genomic analysis of transcription regulation elements involved in human map kinase g-protein coupling pathway, J Bioinform Comput Biol, 4(2), 469-82(2006)

33.0608011414
Terasawa, K., Yoshimatsu, K., Iemura, S., Natsume, T., Tanaka, K., and Minami, Y.: Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases, Mol Cell Biol, 26(9), 3378-89(2006)

34.0608011417
Yamada, M., Ohnishi, J., Ohkawara, B., Iemura, S., Satoh, K., Hyodo-Miura, J., Kawachi, K., Natsume, T., and Shibuya, H.: NARF, an Nemo-like Kinase (NLK)-associated Ring Finger Protein Regulates the Ubiquitylation and Degradation of T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF), J Biol Chem 281(30), 20749-60(2006)

35.0608011406
Honma, M., Higuchi, O., Shirakata, M., Yasuda, T., Shibuya, H., Iemura, S., Natsume, T., and Yamanashi, Y.: Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases, Genes Cells 11(2), 143-51(2006)

36.0608011401
Hishiya, A., Iemura, S., Natsume, T., Takayama, S., Ikeda, K., and Watanabe, K.:
A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy, Embo J, 25(3), 554-64(2006)

37.0603021841
Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S.: A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes, Nature, 437(7063), 1381-5(2005)

38.0603021845
Moriguchi, T., Urushiyama, S., Hisamoto, N., Iemura, S., Uchida, S., Natsume, T., Matsumoto, K., and Shibuya, H.:WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1, J Biol Chem, 280(52), 42685-93(2005)

2) 学会発表 (国際)

1. 澁谷　浩司（東京医科歯科大学)、中山　洋（理化学研究所)、家村 俊一郎、夏目 徹,「パスウェイ・ネットワークの絶対定量による動態解析」2009 年度ゲノム特定 4 領域合同班会議, 神戸ポートピアホテル,　2009/8/31
2. 夏目　徹,「New generation proteomics」, 日本ヒトプロテオーム機構,　北里大学,　2009/7/30
3. 夏目 徹,「タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析」, 第 39 回分子生物情報研究会, 産総研・臨海副都心センター、2008/11/06
4. 澁谷　浩司（東京医科歯科大学)、中山　洋（理化学研究所)、家村 俊一郎、夏目 徹,「パスウェイ・ネットワークの絶対定量による動態解析」, 2008 年度合同班会議, 神戸ポートピアホテル、2008/08/26
5. 夏目 徹,「産総研における創薬基盤」, トランスレーショナル研究推進上の課題等に関する研究会, 六本木、2007/10/22
6. 夏目 徹,「パスウェイ・ネットワークの絶対定量による動態解析」, 文科省科学研究費補助金　特定領域「ゲノム」４領域２００６年度合同班会議, 大阪国際会議場、2006/09/21
7. 夏目 徹、家村 俊一郎、中山　洋、澁谷　浩司,「パスウェイ・ネットワークの絶対定量による動態解析」, 文部科学省科学研究費補助金　特定領域「生命システム情報」　２００６年度領域個別班会議, 奈良県新公会堂、2006/12/01

3) 図書

1. 夏目 徹,「新規素材探索　- 医薬品リード化合物・食品素材を求めて -, 大規模タンパク質相互作用ネットワーク解析から展開するケミカルバイオロジー」, シーエムシー出版、2008/09/30
2. 夏目 徹,「蛋白質核酸酵素　増刊　ケミカルバイオロジー, 大規模蛋白質相互作用ネットワーク解析から展開するケミカルバイオロジープロジェクト」, 共立出版、2007/10/10
3. 夏目 徹,「ゲノムを医学する, 大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開」, 南山堂、2007/07/25
4. 夏目 徹,「タンパク質科学　構造・物性・機能, ポストゲノム時代のタンパク質科学」, 化学同人、2006/10/25
5. 夏目徹、「タンパク質科学　構造・物性・機能、p19-32 ポストゲノム時代のタンパク質科学」, 2005、化学同人
6. 夏目徹、蛋白質核酸酵素 50(16 Suppl)「ゲノムから生命システムへ」、p2065-71 ゲノムから人間　ヒトプロテオーム、2005、共立出版
7. 夏目徹、「遺伝子医学 MOOK　疾患プロテオミクスの最前線」, p91-98 完全長ヒト cDNA を用いた大規模タンパク質ネットワーク解析 ,、2005、メディカル ドゥ
8. 夏目徹、実験医学 VOL.23 No.4（増刊）「ここまで進んだゲノム医科学と疾患研究」、p118-124 大規模タンパク質相互作用ネットワーク解析 ,、2005、羊土社
9. 夏目徹、バイオテクノロジージャーナル 隔月刊 ,5(6)「特集タンパク質相互作用を解明する最適メソッド」、p692-697 タンパク質相互作用ネットワークの網羅的な解析、2005、羊土社
10. 夏目徹、「遺伝子医学 MOOK　疾患プロテオミクスの最前線」、p146-153 統合インフォマティクス、2005、メディカル ドゥ