

## 平成29年度 徳島大学先端酵素学研究所 「共同利用・共同研究」成果報告書

### 「研究題目」

網羅的プロテオーム解析によるCRK/CRKLシグナルネットワークの同定

### 「研究代表者」

大阪大学 蛋白質研究所 岡田 眞里子

### 「研究の目的」

細胞内シグナル伝達系のアダプタータンパク質CRK遺伝子ファミリーは、CRKとCRKLの2つの最小ファミリーを構成し、それぞれが発生学上必須の遺伝子である。申請者らは、細胞内外の情報のクロストークと細胞形質との関係を理解するために、CRK/CRKLコンディショナルノックアウトマウス由来の線維芽細胞を用いてオミクスデータの情報統合解析を行なっている。これまでに網羅的な遺伝子発現データ（トランスクリプトーム）や代謝物データ（メタボローム）に基づいた細胞機能解析を行い、CRK/CRKLのダブルノックアウト条件下において、細胞サイズの減少や真円率の増加などの細胞形状変化、細胞周期やS6Kシグナルの低下、解糖系や核酸代謝などの代謝系の顕著な低下を見出している。代謝活性やS6Kシグナルの低下は上流の細胞接着関連分子の発現により回復することから、CRK/CRKLは、環境と代謝を細胞接着により結びつける分子であることが示唆されている。しかしながら、これまでの解析では、CRK/CRKL、細胞接着因子およびS6K代謝シグナルの3者のつながりを部分的に明らかにできたものの、CRK/CRKL上流のシグナル経路に関しては、同定できないままである。本研究では、CRK/CRKLを介した細胞接着と代謝のネットワークを同定するため、網羅的なプロテオーム解析を行うことで、CRK/CRKLのシグナル伝達経路の全容を明らかにすることを目的とした。

### 「本年度の研究成果」

これまでに、MEFの安定細胞株を用いて、CRK/CRKL存在・非存在下で、細胞密度の高低、細胞接着因子過剰発現の有無などの4条件下（計8サンプル）の細胞試料の調製を行い、プロテオーム解析を行った。試料はtandem mass tag (TMT) 試薬で標識後に混合し、酸化チタンクロマトでリン酸化ペプチドを精製し、逆相クロマトで8分画し、さらに、酸化チタンに結合できなかった部分をさらにFe-NTAクロマトを用いてリン酸化ペプチドを精製し、計9サンプルをLC-MS/MS解析した。この結果、17,667種類のリン酸化ペプチドを同定、その中の15,556種類は定量解析が可能となった。また、リン酸化解析と同様に蛋白質の同定解析も行った。これらのサンプルのうち、実験系の妥当性の検証のため、CRK/CRKL存在・非存在下の細胞間比較により、本遺伝子欠損下での蛋白質変動の情報学的解析を行った。その結果、CRK/CRKL欠損時に15蛋白質の増加、20蛋白質の減少を見出した。また、リン酸化蛋白質では、51リン酸化蛋白質の増加、44リン酸化蛋白質の減少を見出した。リン酸化蛋白質は比較的多く同定できたことから、これらのデータに関しては、さらにパスウェイ解析を行った。増加したリン酸化蛋白質に関しては、アポトーシス、細胞骨格系、細胞接着などのパスウェイの変動が有意に見出された。また、減少したリン酸化蛋白質に関しては、CRKのほかに、細胞形態、細胞老化、細胞接着などのパスウェイの変動が見られた（図1）。これらの結果は、先行して

行っていた網羅的遺伝子発現解析の結果を裏付ける部分と、相反するよう見える部分があった。このことから、さらに細胞サンプルのN数を増やすと同時に、蛋白質の同定数を増加させるために、各サンプルの蛋白質量を増やすことを目的として、さらなる次の実験を考えた。また、本試験に用いた細胞は、マウスから単離後比較的安定にされた培養細胞株であったことから、遺伝子発現解析に用いた初代細胞に近い細胞株を用いるほうがより、データ間の相補性が高いと考え、それらの細胞試料を準備することとした。これらの細胞は現在準備中である。

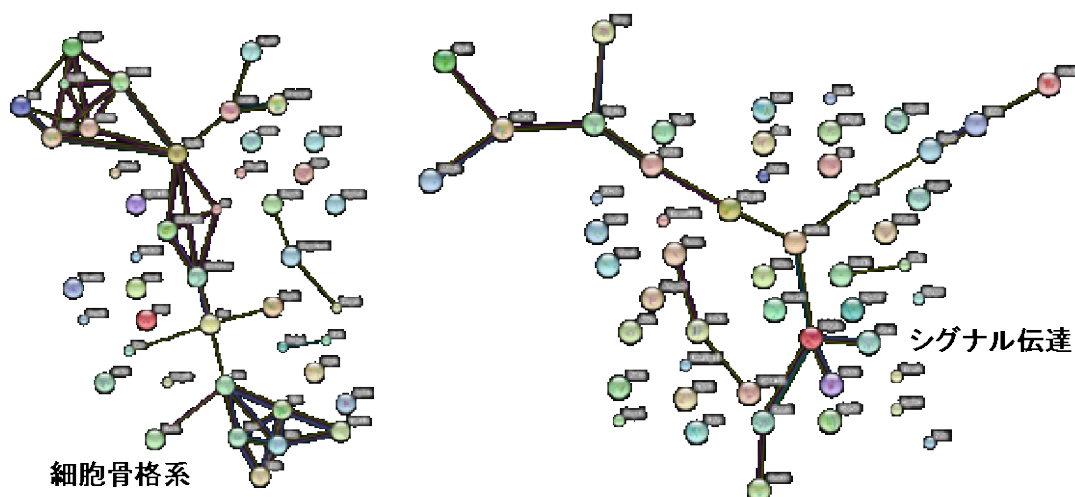


図 1. CRK/CRKL 欠損により減少したリン酸化蛋白質（左）と増加したリン酸化蛋白質（右）の相互作用ネットワーク

#### 「本研究に関する発表」

##### 口頭発表 3 件

- ・ オミクスと数理モデリングによる細胞制御機構の解明. 23th Cardiovascular Metabolism and Aging Conference. 2017 年 12 月 22 日 (東京)
- ・ 細胞の形態と代謝ネットワーク. 第 11 回メタボロームシンポジウム 2017 年 11 月 14 日 (大阪・吹田)
- ・ 細胞形態と代謝を繋ぐシグナル軸の同定. アステラス病態代謝研究会 平成 29 年度研究報告会 2017 年 10 月 21 日 (東京丸の内 日本工業倶楽部)

##### 論文

準備中