

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 27 年 4 月 28 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 東京大学医科学研究所  
職 名 准教授  
研究代表者 尾山 大明

下記のとおり平成 26 年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 14015 )

1. 共同研究課題名	LKB1 遺伝子が制御するリン酸化シグナル伝達経路の網羅的解析			
2. 共同研究目的	癌や糖尿病に関わる LKB1 キナーゼに関して、シグナル依存的な標的タンパク質群の網羅的解析をショットガンリン酸化プロテオミクス法によって行い、病態制御機構をシステムレベルで明らかにする。			
3. 共同研究期間	平成 26 年 4 月 1 日 ~ 平成 27 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 尾山 大明	疾患プロテオミクスラボラトリー	准教授	研究総括	
(分担研究者) 秦 裕子	疾患プロテオミクスラボラトリー	技術専門員	nanoLC-MS/MS 解析	
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分子細胞制御分野	氏 名	徳永 文稔

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

## 6. 共同研究計画

本研究では、Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture (SILAC)法による精密比較定量、TiO<sub>2</sub>カラムによる効率的なリン酸化ペプチド濃縮、nanoLC-MS/MS による高感度・高精度質量分析を組み合わせた最先端の定量リン酸化プロテオーム解析システムに基づいて、癌化・糖尿病関連シグナルに関するシグナルネットワーク解析を行う。

SILAC 法は比較する試料を異なる質量の安定同位体で標識・混合して試料調製を行う方法であり、測定に至るまでの精製過程に伴う試料ロスの変りを最小限にし、精密な相対定量を可能とする(Oyama et al., *Mol. Cell. Proteomics*, 2009)。また、TiO<sub>2</sub>カラムによるリン酸化分子特異的濃縮法は高選択的かつ大規模にリン酸化ペプチドを回収できる方法であり、当研究グループにおいて上皮成長因子癌化シグナルに関する解析から 6,000 種類を超えるリン酸化ペプチドを同定している(Kozuka-Hata et al., *PLoS One*, 2012)。上記技術を用いて、癌や糖尿病に深く関わるキナーゼである LKB1 によって制御されるリン酸化シグナル伝達経路の包括的な解析を行い、LKB1 が関わる病態の理解を多角的に行う情報基盤を構築する。

本共同研究計画においては、野生型および LKB1 ノックアウトマウス由来の細胞を用いて LKB1 活性化刺激によるリン酸化プロテオーム解析を行う。細胞溶解液から TiO<sub>2</sub>カラムを用いてリン酸化ペプチドを精製し、作製した試料に関して高感度 nanoLC-MS/MS システムによるショットガン測定を行い、リン酸化分子群を網羅的に同定する。

## 7. 共同研究の成果

分子細胞制御分野の徳永教授および野口助教はこれまでに LKB1 が TNF 誘導性アポトーシスのみならず、NF- $\kappa$ B や JNK 経路を正に制御していることを示唆する実験結果を得ている。本研究では当該シグナルが関与する病態制御機構を多角的に理解するため、野生型 MEF 細胞及び LKB1-KO MEF 細胞を TNF 刺激した際の細胞内リン酸化分子群に関するショットガンプロテオーム解析を行った。

MEF 細胞の可溶化、及び TiO<sub>2</sub>カラムによるリン酸化ペプチド精製に関する実験条件を検討し、nanoLC-MS/MS システムによる測定を行った結果、TNF 刺激を施した細胞から既知のリン酸化因子及び LKB1 の標的候補因子に関するリン酸化プロテオームデータが取得された。

LKB1 は癌や糖尿病など病態解明が急務となっている多くの疾患への関与が明らかとなっているが、その分子機能や生理的役割には不明な部分が多い。本共同研究で得られた包括的な同定リン酸化ペプチドデータは、LKB1 の新たな機能の発見に寄与するだけでなく、当該リン酸化シグナルをターゲットとする創薬に向けた情報基盤となる。

## 8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載, 又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお, 論文の場合は, 別刷りを1部提出してください。)

該当なし