

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16104

研究課題名（和文）タンパク質の量制御機構と分化特異性の解析

研究課題名（英文）Analysis of protein quantity control mechanism and differentiation specificity

研究代表者

岩崎 未央 (Iwasaki, Mio)

京都大学・iPS細胞研究所・特定助教

研究者番号：10722811

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：二種類のhiPSCクローンを用いて神経前駆細胞へ分化誘導を行った。多能性幹細胞で転写後制御を受ける遺伝子群のタンパク量は多能性幹細胞と神経前駆細胞で相関していたが、一方でmRNAの量は神経前駆細胞のみで向上していたことから、タンパク量の制御機構が細胞種間で異なることが示唆された。さらに、二種類の遺伝子に着目し、三胚葉分化中におけるノックダウン実験を行った。その結果、三胚葉分化誘導によって細胞の形態は変化するが、生存する細胞数が減少したことから、これらの転写後制御を受ける遺伝子は細胞生存に影響を与える一方で分化能には関与しないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞の樹立効率は今のところ数%程度であり、今後再生医療への応用を目指す際には作製コストや品質の点から樹立効率の向上が求められている。樹立効率が低い原因として、細胞初期化途中で老化してしまう細胞群の存在や、初期化に必要な複数の遺伝子量がある一定の範囲を満たす一部の細胞のみが初期化される等の多数の知見がある。細胞の性質を定義するには、mRNAによる遺伝子発現解析のみではなく、細胞の機能を担っているタンパク質を直接定量して解析する必要がある。本研究では、転写後翻訳制御機構が幹細胞の運命決定に影響を与えているかどうか着目した結果、運命決定よりもむしろ細胞の生存に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We successfully differentiated two types of hiPSC clones into neural progenitor cells (NPC). The amount of protein in the gene group regulated after transcription in pluripotent stem cells (PSC) was correlated with NPC. In contrast, the amount of mRNA was increased only in neural progenitor cells. So, this result suggested that the control mechanism of protein amount differs between cell types. Furthermore, we focused on two types of genes and conducted knockdown experiments during three germ layer differentiation.

As a result, although the induction of differentiation changes the cell morphology, the number of surviving cells is reduced. Therefore, we concluded that these post-transcriptional regulated genes affect cell survival but are not involved in differentiation potential.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：転写後制御機構 神経前駆細胞 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞の樹立効率は今のところ数%程度であり、今後再生医療への応用を目指す際には作製コストや品質の点から樹立効率の向上が求められている。樹立効率が低い原因として、細胞初期化途中で老化してしまう細胞群の存在や (Tanabe K. et al., PNAS, 2013)、初期化に必要な複数の遺伝子量がある一定の範囲を満たす一部の細胞のみが初期化される等の多数の知見がある (Takahashi K & Yamanaka S., Nature Reviews, 2017)。一方で、これまでの遺伝子発現解析はマイクロアレイや RNA シークエンシング等の網羅性の高い核酸解析技術を用いて行われてきたが、様々な細胞において mRNA とタンパク質の量の相関は低いことがわかってきている。そのため、細胞の性質を定義するには、mRNA による遺伝子発現解析のみではなく、細胞の機能を担っているタンパク質を直接定量して解析する必要がある。また、遺伝子転写後のタンパク質翻訳機構やその制御機構にはまだまだ未知な部分が多く、さらに、細胞種類選択的にタンパク質が翻訳される機構の存在 (Sugiyama H. et al., 2017, PNAS; Werner A. et al., 2015, Nature) が示唆されている。これらの知見から、iPS 細胞や ES 細胞についてもタンパク質翻訳制御機構の詳細を探ることで、これらの細胞の性質が定義できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

「転写後翻訳制御機構が幹細胞の運命決定 (分化能) に影響を与えているのか」

具体的には、遺伝子転写後の翻訳過程での何らかの制御機構 (転写後翻訳制御機構) によって量が調節されるタンパク質で幹細胞の分化能力が決定されているか? を明らかにする。本研究では制御機構の解析のみではなく、翻訳されているタンパク質の種類や量を調べることで、転写後翻訳制御を受けている新規の遺伝子の同定も行う。

3. 研究の方法

本研究では神経細胞への分化を対象とし、分化能の良い ES 細胞 (khES-1) と悪い ES 細胞 (khES-2) を比較し、転写後の翻訳制御がどのように幹細胞の分化能に影響を与えているのかが明らかにする。

(研究計画 1) 神経細胞分化誘導前後でタンパク質の量が制御を受けている遺伝子の同定
神経細胞分化能に違いのある 2 種類の胚性幹細胞の mRNA とタンパク質の発現量解析を行う。
神経細胞分化誘導前後で本解析を行い、mRNA およびタンパク質の量が相関していない遺伝子群を同定する。

(研究計画 2) タンパク質の量の制御機構の解明 (制御段階を明らかにする)
転写後、翻訳中の制御: リボソームプロファイリングによる翻訳活性の評価
特定のタンパク質の発現量が増加/低下している原因として、そのタンパク質の合成が促進/抑制されている可能性がある。リボソームプロファイリングでは、リボソームが結合して翻訳中であると考えられる配列を明らかにし、翻訳効率を算出することができる。神経細胞分化誘導前後でこの解析を行い、転写後に翻訳活性を受けてタンパク質合成が促進している遺伝子群を明らかにする。

翻訳後の制御: シクロヘキシミド添加によるタンパク質分解速度の評価
翻訳後のタンパク質の量を規定する機構の 1 つにタンパク質分解がある。神経細胞分化誘導前後で、シクロヘキシミドに代表されるタンパク質合成阻害薬を培地に添加して細胞のタンパク質合成を停止させ、経時的に細胞試料を回収し網羅的なタンパク質解析を行うことで、各タンパク質の分解速度を計算する。

(研究計画 3) タンパク質の量の制御機構が分化能に寄与しているかの解明
転写後および翻訳後で特異的に制御されている遺伝子群について、siRNA によるノックダウン実験を行う。分化誘導前、分化誘導途中で siRNA スクリーニングを行い、神経細胞分化能を失う、もしくは促進する表現型を解析する。

4. 研究成果

問い 1: 転写後制御を受けている遺伝子群は神経細胞の運命に寄与するのだろうか

成果 1: 着目した二種類の遺伝子は細胞生存に影響を与える一方で分化能には関与しなかった

神経前駆細胞への分化誘導実験に関して、二種類の hiPSC クローンから問題なく分化誘導を行うことができた。多能性幹細胞で転写後制御を受ける遺伝子群のタンパク量は、多能性幹細胞と神経前駆細胞で相関しタンパク量が大きく制御されていたが、一方で mRNA の量は神経前駆細胞

のみで向上していたことから、タンパク量の制御機構が細胞種間で異なることが示唆された。さらに、二種類の遺伝子に着目し、三胚葉分化中におけるノックダウン実験を行った。その結果、三胚葉分化誘導によって細胞の形態は変化するが、生存する細胞数が減少したことから、これらの転写後制御を受ける遺伝子は細胞生存に影響を与える一方で分化能には関与しないことが明らかとなった。本研究を行う過程で、プロテオーム解析の定量手法を改善し精度の良い定量値のみを選べる手法 (RiMS: removal of interference mixture spectra) を開発し、タンパク質の定量精度の向上を実現した (Iwasaki et al., JPR, 2019) 。

問い 2 : より良いタンパク質の定量手法を開発できないだろうか

成果 2 : RiMS という定量値改善手法を開発した

ナノ液体クロマトグラフィー-質量分析 (nanoLC-MS/MS) を用いたタンパク質の網羅的解析手法では約 1 万個のタンパク質の同定が可能であるが、確度の高い定量解析には未だいくつかの問題点がある。同位体ラベル化手法の一つである Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) は、ラベル化した複数の試料を同時に測定でき、かつ測定時の試料複雑性を比較的向上させないことで、定量解析手法としてよく用いられている。しかし、MS/MS によるラベル体スペクトル取得時に他のペプチドイオンが共存している場合、定量精度が低下することが知られている。

我々がこれまでに開発したモノリス型カラムを用いたプロテオーム解析手法では、長い分析時間をかけて試料中のペプチドを分離することで同定効率を改善しており、質量分析計のスキャン時間に余裕があるため、MS/MS によるラベル体スペクトル取得時に他のペプチドイオンが共存しているかどうかという情報が得られる。この情報を用いて、定量に用いるペプチドの信頼性を計算した。その結果、質量分析で得られた約 6 割のスペクトルに、他のペプチドイオンの混入が認められた。他のペプチドイオンの混入が確認されなかったスペクトルのみを用いて定量を行う手法を RiMS (removal of interference mixture spectra) と名付け、RiMS で定量精度が向上するかを計算したところ、すべてのスペクトルを用いた場合と比較して優位に定量精度が向上した (図 1) 。さらに、既存の手法である MS イオンの純度計算 (spectral purity) 結果との比較を行ったところ、一般的に使用される 70% 純度を用いた結果よりも RiMS で定量精度が向上することが明らかとなった (図 2) 。本手法は Perl 言語で作成しており、一般公開している。本手法を用いることで、誰でもデータを取り直すことなくプロテオーム解析の定量精度を向上できるようになった。

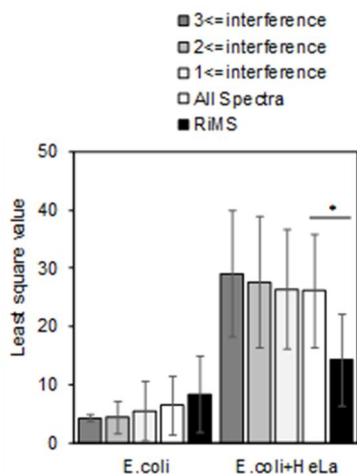


図 1. RiMS によって定量精度が向上する

大腸菌タンパク質由来のペプチド測定結果 (E.coli) と、ノイズとしてヒトタンパク質由来ペプチドを混合して測定した結果 (E.coli+HeLa) を示す。本手法で一つ以上のノイズイオンが観測されたスペクトルを用いた場合と (1,2,3<=interference)、すべてのスペクトルを用いた場合 (All Spectra)、ノイズイオンを含まないスペクトルを用いた場合 (RiMS) で計算された実測量値に対して、理論的正解値との距離を示した。この値は小さいほど定量精度が良いことを示し、混合試料解析で RiMS を用いることで優位に定量精度が向上することが明らかとなった。 (*p-value 0.05, paired t-test)

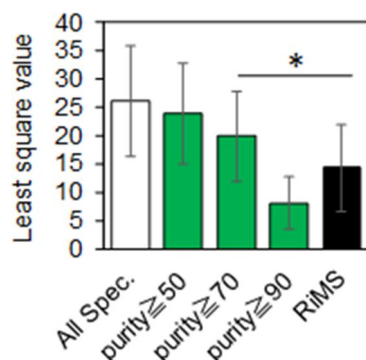


図 2. 70% 純度計算結果よりも RiMS で定量精度が向上する

大腸菌タンパク質由来ペプチドに対して、ノイズとしてヒトタンパク質由来ペプチドを混合して測定した結果の実測量値に対する理論的正解値との距離を示す。純度計算を行う場合に一般的に使用される 70% 純度を用いた結果よりも、RiMS を用いた方が、優位に定量精度が向上した。

(*p-value 0.05, paired t-test)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwasaki Mio, Tabata Tsuyoshi, Kawahara Yuka, Ishihama Yasushi, Nakagawa Masato	4. 巻 18
2. 論文標題 Removal of Interference MS/MS Spectra for Accurate Quantification in Isobaric Tag-Based Proteomics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 2535 ~ 2544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jproteome.9b00078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 M. Iwasaki, T. Tabata, Y. Kawahara, Y. Ishihama, M. Nakagawa
2. 発表標題 Pros and cons of isobaric tag-based proteome quantification.
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎 未央
2. 発表標題 Global transcriptome and proteome profiling unveiled the unique post-transcriptional properties in PSCs.
3. 学会等名 第12回K-CONNEX研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩崎 未央
2. 発表標題 細胞種類特異的な転写後制御機構の解明
3. 学会等名 第13回 K-CONNEX研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------