

機関番号：17401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21770119

研究課題名 (和文) 翻訳後修飾を指標にしたマウス神経幹細胞の分化・未分化を司る核内スイッチ分子の探索

研究課題名 (英文) Identification of post-translational modification in nuclear proteins during neural stem cell fate specification by proteomic analysis

研究代表者

新森 加納子 (NIIMORI KANAKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：30457600

研究成果の概要 (和文)：

神経幹細胞は自己複製能を持つと同時に、さまざまな分化制御を受けながらニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを作り出すことができる。神経幹細胞がニューロンやグリア細胞へと分化する過程には、細胞外来性シグナルと細胞内在性プログラムが関わっており、個体の発生初期から成体に至るまで時空間的に厳密に制御されている。そこでこれらに関わる重要な蛋白分子群とその翻訳後修飾を含む構造と機能の変化を明らかにするため、翻訳後修飾プロテオミクス解析による神経幹細胞分化制御因子のスクリーニングを試みた。その結果、未分化刺激の有無により発現量に変化した蛋白質が 80 個検出され、その中でも 80 個中の 24 個はリン酸化蛋白質であることが明らかとなった。これらの分子群を質量分析により同定した結果、転写調節、クロマチンリモデリングなどの核内動態に関与する蛋白質が含まれていた。

研究成果の概要 (英文)：

It is not yet completely understood how neural stem cell fate is specified, in spite of extensive investigations by, for instance, gene expression profiling. To tackle this important question, we have focused on the changes in post-translational modification of nuclear proteins such as transcription factors, coactivators/corepressors, and chromatin modifiers in neural stem cells (NSCs) in response to fibroblast growth factor 2 (FGF2), a representative factor to maintain them. NSCs were stimulated by FGF2, and its lysates were examined by proteomic analysis. The result revealed 80 up- or down-regulated protein spots upon FGF2 stimulation out of 4095 spots with statistically significant differences. Among them, we focused on 24 spots differentially phosphorylated in response to FGF2, and identified all of them by nanoLC-QqTOF MS analysis. These proteins contained factors related to nuclear dynamics including nuclear translocation and chromatin modifications.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：

(1) 神経幹細胞	(2) プロテオミクス	(3) 翻訳後修飾
(4) リン酸化	(5) 2D-DIGE	(6) 分化制御
(7) 転写調節因子	(8) 質量分析	

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は自己複製能をもつと同時にさまざまな分化制御を受けながらニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを作り出すことのできる未分化な細胞のことである。神経幹細胞がニューロンやグリア細胞へと分化する過程には、細胞外来性シグナルと細胞内在性プログラムが関わっており、個体の発生初期から成体に至るまで時空間的に厳密に制御されている。神経幹細胞の未分化性維持や分化のメカニズムを解明することは、脳の発生の基本的メカニズムを明らかにするとともに、将来的には神経系疾患の新しい治療法の開発につながるため、一刻も早い解明が期待されている。しかしながら、神経幹細胞の分化制御を司るシグナル伝達の

スイッチングには未解明な点が多い。その理由の一つとして、分化・未分化を制御する ON/OFF スwitchングが実際に生命現象の大部分を担っている蛋白質発現や翻訳後修飾により行われている可能性が挙げられる。そこで私は最新のプロテオミクスの手法を組み合わせ解析を行うことで、神経幹細胞の分化・未分化を制御する ON/OFF スwitchングが核内分子の翻訳後修飾により行われていることを明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究は最新プロテオミクス解析に基づき、蛋白質の翻訳後修飾による神経幹細胞の分化・未分化のシグナルスイッチを解明することを目標に掲げている。これまで行ってきた

核蛋白質のプロテオミクス解析により、神経幹細胞の分化・未分化で蛋白質の発現に変動のある核内スイッチ分子について質量分析により網羅的に同定し、得られた情報から神経幹細胞の分化・未分化で動く蛋白質群の核移行やリン酸化などの初期イベントを明らかにし、特に分化・未分化の制御に強く働いている分子にターゲットを絞り、例えばsiRNA、核移行実験、Luciferase assay、リン酸化部位の同定および変異体の作成などの手法を用いてターゲット蛋白質の機能を明らかにしたい。最終的には転写因子が細胞質でリン酸化すると核に移行し、神経幹細胞の分化にはたらく遺伝子を発現させているなどの機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(※実験手法については、現在特許出願予定のため、一部割愛する。)

E14.5日目のマウス胎仔の終脳から神経上皮細胞を単離しFGF2存在下で5日間培養したものを神経幹細胞試料として用いた。未分化性に関与している分子は神経幹細胞の培地からFGF2を除去することでその発現量は減少し、その後FGF2で再び刺激すると発現量が増加すると仮定した。さらに分化・未分化を調節するリン酸化蛋白質についてもFGF2の除去と再刺激によりリン酸化あるいは脱リン酸化が起こると考えた。そこでFGF2の除去と再刺激により発現の変化する蛋白質とリン酸化を翻訳後修飾プロテオミクス法により解析した。その結果、FGF2再刺激の有無で蛋白発現量とリン酸化に有意差のある分子群を見出し、

これらを質量分析装置により同定した。同定した分子群の機能解析については、神経幹細胞やマウス胎仔を材料にした、免疫染色法、ウェスタンブロットティング、siRNAによるノックダウン実験などを行った。

4. 研究成果

(※研究成果について、特に同定された分子と機能に関して、現在特許出願予定のため、成果の記載を一部割愛する。)

本研究は翻訳後修飾プロテオミクス解析の手法を用いて、多くの機能的核内因子群を同定することに成功した。解析の結果、FGF2再刺激の有無で蛋白の発現量に有意差のある分子を80個検出することができた。これらに加えて、FGF2再刺激の有無で発現量に差のあるリン酸化蛋白質を検出した。80個の分子中24個がリン酸化蛋白質であり、FGF2再刺激の有無でリン酸化の亢進が起こっていることが示唆された。これら全ての蛋白質スポットからトリプシン消化フラグメントを抽出し、質量分析装置を用いて同定した。その結果、転写調節やクロマチンリモデリングなど核内動態に関与する興味深い蛋白質群が24個同定された。これらの分子群を質量分析により同定した結果、転写調節、クロマチンリモデリングなどの核内動態に関与する蛋白質が含まれていた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. 招待講演

講演名：2010 年度・第 138 回発生医学研究所セミナー

講演者：○新森加納子

演題： 「翻訳後修飾を指標にしたマウス神経幹細胞の分化の運命づけを司る

核内分子の探索」

日時：2010 年3 月16 日 (火)

場所：熊本大学 発生医学研究所

2.新森加納子 他 翻訳後修飾を指標にしたマウス神経幹細胞の分化の運命づけを司る核内分子の探索

日本ヒトプロテオーム学会/日本ヒトプロテオーム機構第 7 回大会(JHUPO), 東京白金北里大学 2009 年 7 月 27~28 日(ポスター発表、査読あり)

3.新森加納子 他 翻訳後修飾を指標にしたマウス神経幹細胞の分化の運命づけを司る核内分子の探索

神経発生討論会, 愛知県岡崎市, 2009 年 3 月 12 日(ポスター発表、査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新森 加納子 (NIIMORI KANAKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：30457600