

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590353

研究課題名(和文) プロテオミクスによる細胞の“性質変換過程”の解析

研究課題名(英文) Identification of conversion of cells by proteomics analysis

研究代表者

中川 誠人 (Nakagawa, Masato)

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号：10379539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では細胞の性質変換過程における蛋白質の発現変化を捉えることを目的としてきた。そのために質量分析装置(MS)を用いた蛋白質の同定技術の改良を進めた。まず、試料の分離を良くするためにメートル長のモノリスカラムを用い、さらに細胞を膜・細胞質・核に分画しそれぞれの試料を解析することで最終的に同定できる蛋白質数の増加を実現できた。また、サンプル間の比較定量を正確に行うためのラベル化技術を組み合わせることにより、少ない試料を高感度で精度良く定量する技術の確立を行うことができた。この技術を用いてヒトiPS細胞と元の線維芽細胞の解析を行ったところ、これまで同定が難しかった遺伝子の同定が可能となった。

研究成果の概要(英文)：We have been studying for the purpose of capturing the expression changes of proteins during the conversion process of the cell. We proceeded improvements in identification techniques for proteins using a mass spectrometer (MS). First, using a meter-long monolithic column in order to improve the separation of the sample. Second, cells were fractionated into the cell membrane, cytoplasm, nuclear. We were able to achieve an increase in the number of protein that can be finally identified. Furthermore, by combining with labeling for quantitative comparing between samples, it was possible to carry out the establishment of accurately quantifying technology less samples with high sensitivity. Was subjected to analysis of human iPS cells and the original fibroblasts using this technique and have enabled the identification of gene which identification was difficult until now.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：質量分析 幹細胞 iPS細胞 定量

1. 研究開始当初の背景

我々一人一人の体の中に存在する細胞は同じ設計図 (=ゲノム) を持っているが、その中に刻まれた遺伝情報を細胞ごとに調節することで発生段階において様々な細胞が生まれ個体を形成している。最近のゲノム情報解析技術の発展によりヒトゲノムを全て解読することが可能となってきた。しかしながら、我々がその設計図を手にしたからといってなぜ様々な細胞ができるのかを理解することは難しい。なぜならば、細胞内において生理機能を遂行している実態は主に蛋白質であり、この蛋白質レベルでの解析を行わないと本質は分からないといっても良いかもしれない。蛋白質はゲノム情報に従って作られるが、その後ほとんどの蛋白質が何らかの機能付加を受けることで実際の機能体として働くことが知られている。蛋白質同士が複合体を形成し一つの機能体として働いたり、リン酸化やアセチル化などの修飾を受けることで活性を持つことが知られている。つまり、細胞の性質転換過程において蛋白質の複合体解析や修飾解析を行うことがそのシステム制御の理解に結びつくと考えられる。

2. 研究の目的

受精直後から細胞は姿を変え様々な細胞に変化して組織、そして個体を形成する。この間に細胞の性質変換が起きている。近年の解析によりヒトゲノムが解読されほぼ全ての遺伝子情報が明らかとなった。しかし、それだけではなぜ我々の体の中の多くの種類の細胞がひとつの受精卵からできるのかを理解する事は難しい。ゲノムからその細胞に必要な遺伝子が読み出され、蛋白質が作られ、この蛋白質が生理機能を遂行する。つまり、この蛋白質の機能解析をする事がその細胞の機能を明らかにするために重要である。本応募課題では、細胞の性質変換のシステムを蛋白質レベルの解析から明らかにし理解する事を目的とする。

申請者は分化細胞の未分化細胞への性質変換における遺伝子発現のマイクロアレイデータをすでに多数有している。予備的に分化細胞と未分化細胞の蛋白質発現レベルの解析を行ったところ、マイクロアレイデータと一致する動きも多く認められたが、異なる動きが多数あることも見いだしている。しかしながら、蛋白質の同定技術が未熟なこともあり未知の部分が多いという印象が残ったままである。

ある細胞における蛋白質複合体や修飾を解析する際にはそれらの構成(複合体構成因子の組合せ、修飾の種類)や複合体形成・修飾の時期や期間、それらの量を解析することが重要である。

申請者の所属する研究室では線維芽細胞の様な分化細胞にいくつかの因子を導入することで未分化細胞(iPS細胞)に変換(初

期化)させる技術を確立している。この技術を用いることで細胞の性質変換過程における蛋白質を介した制御機構を明らかにしたいと考える。

3. 研究の方法

申請者の所属する研究所には高感度の質量分析機がすでに設置されている。網羅的蛋白質解析を行うためにはこの質量分析機の性能を最大限に引き出す必要があり、研究当初はセットアップを集中して行う。最適・最高の条件下でまずは分化細胞と未分化細胞における発現蛋白質を網羅的に解析し比較検討を行う。同時に蛋白質の修飾についても解析を進める。得られたデータはバイオインフォマティクスによる解析を行い重要な蛋白質の同定を行う。また、体細胞の初期化に関与する因子について複合体解析を行い、コアになる複合体形成因子とそれぞれの細胞特異的な複合体サブユニットの同定を行う。

4. 研究成果

平成 24 年度は質量分析装置(MS)を用いた蛋白質の同定技術の改良を進めた。メートル長モノリスカラムを用いることで質量分析における解像度が飛躍的に向上し蛋白質の同定数向上に寄与することが分かってきており、この技術を用いてまずは iPS 細胞とそのもとになっている線維芽細胞のプロテオミクスを行い、試料間の比較を行ったその結果、iPS 細胞中に発現している蛋白質全体(プロテオーム)を世界最大規模で網羅的に解析することに成功した。ヒト線維芽細胞中のプロテオーム発現プロファイルと比較することにより、今回同定された 9510 種の蛋白質のうち、約 25%にあたる 2366 種の蛋白質は iPS 細胞選択的に発現していることが分かった。この中には、遺伝子から蛋白質への転写過程に関わる転写制御蛋白質が集中しており、そこには人工多能性を誘引する山中 4 因子や、すでに多能性マーカーとして知られている蛋白質群も含まれていることが確認された。本研究では、いままで蛋白質レベルではその存在が確認されていなかった 1091 種の蛋白質の発現があらたに確認され、その中には iPS 細胞選択的に発現し転写制御機能を有する多能性マーカー候補蛋白質も含まれていた。本研究で用いた計測システムは、従来のものに比べて 50 分の 1 以下の試料量で 3 倍の高速測定が可能であった。

平成 25 年度は、この解析システムのさらなるアップグレードを目指し研究を進めた。これまで解析試料は細胞をそのまますりつぶした whole cell extract (WCE) を用いていたが、発現量が低く、ある特定の場所に局在するような蛋白質の同定が難しかった。そこで、細胞を幾つかに分画することでより同定効率を上げることを試みた。細胞を、膜・細胞質・核、という分画に分けてサンプルを調

製して質量分析器による解析を行ったところ今まで同定が難しかった蛋白質の同定に成功した。WCE だけの解析に比べ分画したデータを総合した場合の方が同定数の向上が認められた。次に、線維芽細胞とそれから樹立した iPS 細胞のサンプルを用いて分画試料のプロテオーム解析を行ったところ、それぞれの細胞種特異的に発現する蛋白質の同定に成功した。また、これらのプロテオームデータとマイクロアレイのデータを比較検討した。その結果、マイクロアレイのデータでは発現量に差は認められないがプロテオームのデータでは差が認められる遺伝子を見つけたことができた。このことは、これまでのような遺伝子発現の解析では見つけることができなかつた新規のマーカーの同定につながる事が予測される。以上のことから、細胞内の蛋白質を同定・定量することにおいて世界でもトップレベルのシステムの構築に成功し、新規のマーカーの解析にも道が開いたと考えられる。

平成 26 年度はヒト線維芽細胞やヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞などにおけるプロテオミクスによる解析をより詳細に行うために定量精度の向上を進めた。我々はこれまでにメートル長モノリスカラムを用いることで発現蛋白質の同定数の向上を達成してきた。しかしながら、細胞ごとに解析を行っているため定量精度に欠ける点が問題となってきた。この点を改善するためにいくつかの定量手法を検討し、iTRAQ 法を用いることで精度よく定量できることが分かってきた。この方法であればサンプルごとに別のラベリングを行い、それらを同時に解析することができる。この iTRAQ 法を用いることでヒト線維芽細胞やヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞などにおける蛋白質の発現を精度よく定量することが可能となった。また、ヒト ES 細胞や iPS 細胞のサンプルを容易に大量に準備できるような新たな培養法の確立も行った。

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 5 件)

Nakagawa, M., Taniguchi, Y., Senda, S., Takizawa, N., Ichisaka, T., Asano, K., Morizane, A., Doi, D., Takahashi, J., Nishizawa, M., Yoshida, Y., Toyoda, T., Osafune, K., Sekiguchi, K., Yamanaka, S.
A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports*. 査読有, Vol.4, 2014, 3594.
DOI: 10.1038/srep03594

Doi, D., Samata, B., Katsukawa, M., Kikuchi, T., Morizane, A., Ono, Y., Sekiguchi, K., Nakagawa, M., Parmar, M., and Takahashi, J.

Isolation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Progenitors by Cell Sorting for Successful Transplantation. *Stem Cell Reports*. 査読有, Vol.2,2014,337-350.

DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.01.013

Hirata, N., Nakagawa, M., et al.

A Chemical Probe that Labels Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports*. 査読有, Vol.6, 2014,1165-1174.

DOI: 10.1016/j.celrep.2014.02.006

Samata, B., Kikuchi, T., Miyawaki, A., Mashimo, T., Nakagawa, M., Okita, K., Takahashi, J.

X-linked severe combined immunodeficiency (S-SCID) rats for xenotransplantation and behavioral evaluation. *J Neurosci Methods*. 査読有, Vol.30, 2014,68-77.

DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.01.027

Fukuta, M., Nakai, Y., Kirino, K., Nakagawa, M., Sekiguchi, K., Nagata, S., Matsumoto, Y., Yamamoto, T., Umeda, K., Heike, T., Okumura, N., Koizumi, N., Sato, T., Nakahata, T., Saito, M., Otsuka, T., Kinoshita, S., Ueno, M., Ikeya, M., Toguchida, J.

Derivation of Mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media.

PLoS One. 査読有, Vol.9,2014,e112291

DOI: 10.1371/journal.pone.0112291

[学会発表](計 6 件)

Iwasaki, M., Nakagawa, M., Ishihama, Y., and Yamanaka, S.

Deep Subcellular Proteome Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell by One-shot nanoLC-MS/MS Analyses with Meter-scale Monolithic Silica Columns.

HUPO12th world congress. 2013.9.14-18.

パシフィコ横浜(神奈川).

中川誠人、プロテオーム解析からみた iPS 細胞研究、第 5 回薬学の未来を考える京都シン

ポジウム「オミオクス科学と細胞解析」、
2013.10.5、京都大学薬学記念講堂（京都）

中川誠人、DNA から iPS 細胞の謎を解く、
日本化学会科学教育協議会「高校生のための
科学講座」「テーマ：遺伝子」、2013.12.14、
静岡県立大学浜松キャンパス（静岡）

Masato Nakagawa, Novel feeder-free
culture system for human ES/iPS cells, The
7th Takeda Science Foundation Symposium
on PharmaSciences iPS Cells in Drug
Discovery & Development /CiRA
International Symposium 2014, 2014.1.16,
武田薬品工業株式会社研修所（大阪）

中川誠人、臨床応用可能な iPS 細胞の培養技
術の開発、大阪大学蛋白質研究所セミナー
「多能性幹細胞研究の最前線～培養技術か
ら解析技術まで～」2014.3.28、大阪大学蛋白
質研究所（大阪）

岩崎未央、川原優香、小野美幸、石濱泰、山
中伸弥、中川誠人、転写産物および蛋白質の
大規模発現量データを用いたヒト人工多能
性幹細胞における転写後制御機能解析、第 37
会日本分子生物学会年会、2014.11.25-27、パ
シフィコ横浜（神奈川）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

中川研究グループ
<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/nakagawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 誠人 (Masato, Nakagawa)

研究者番号：10379539

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：