

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24619001

研究課題名(和文) ヒト神経幹細胞成立及び分化の機構解明を目指したタンパク質分子基盤の解析

研究課題名(英文) Proteomic analysis on development and differentiation of human neural stem cells

## 研究代表者

赤間 邦子 (Akama, Kuniko)

千葉大学・普遍教育センター・教授

研究者番号：50114228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトES細胞から、一方向的神経分化誘導法であるneural stem sphere法を用いて均質な前期神経幹細胞と後期神経幹細胞へ分化させた。各分化段階の細胞から抽出したタンパク質を、二次元電気泳動及びSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離後、トリプシン消化し、質量分析法を用いて同定した。各分化段階で発現量に差があるものを機能ごとに分類し、代謝経路探索を行った。

その結果、ES細胞は活発な細胞外マトリックス-受容体相互作用、シグナル伝達、細胞骨格制御を介して前期神経幹細胞に分化し、前期神経幹細胞はその増殖とともに細胞骨格制御、細胞伸長を介して後期神経幹細胞に分化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the differentially expressed proteins during differentiation of highly homogeneous human embryonic stem cells to early and late neural stem cells by neural stem sphere method, using 2-dimensional- and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

The results of classification of protein functions and search of metabolic pathways related to the differentially expressed proteins involved in these three differentiation stages suggested that ES cells differentiated to early neural stem cells via extracellular matrix-receptor interactions followed by their signal transduction and reorganization of cytoskeleton, and that early neural stem cells differentiated to late neural stem cells via reorganization of cytoskeleton followed by extension of the cells with increase of the differentiated neural stem cells.

研究分野：タンパク質化学

キーワード：細胞外マトリックス 受容体 シグナル伝達 細胞骨格制御 神経幹細胞の増殖 細胞伸長

### 1. 研究開始当初の背景

ES 細胞とその細胞分化の研究で従来用いられている分化誘導法は、ES 細胞の未分化状態維持に用いられる白血病阻害因子を培地から除去した後、ES 細胞を浮遊培養し、胚様細胞塊を形成する方法である。この方法では内胚葉、中胚葉、外胚葉いずれもが誘導され、最終的に胚様細胞塊の内部に、血液細胞、血管内皮細胞、神経細胞、心筋細胞などができる。ES 細胞と胚様細胞塊を比較することにより、ES 細胞の自己複製性・分化万能性を特徴付ける遺伝子やタンパク質を探索した大規模な解析の報告がある。しかしこのような方法では ES 細胞から分化したそれぞれの幹細胞を特徴付ける遺伝子やタンパク質を明確にすることはできず、神経幹細胞の成立基盤についても未解明の部分が多く残されている。

一方、我々は、ES 細胞から神経幹細胞、神経細胞、アストロサイトへの分化誘導法として ES 細胞から均質な神経幹細胞、神経細胞、アストロサイトを効率よく分化誘導できる独自の新規培養法 (Neural Stem Sphere (NSS)) 法を確立している [1-5]。また、我々は、これらの細胞の二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析と遺伝子発現解析からサルではマウスより多くのタンパク質が神経幹細胞成立・分化に関与しており、ヒトについて解析するためにはヒトの細胞を解析することが必要であることを示している [6-9]。

### 2. 研究の目的

ヒト ES 細胞、ES 細胞から分化誘導した均質な初期神経幹細胞 (eNS) 及び後期神経幹細胞 (INS) について、二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析、及び、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後のタンパク質のショットガン法によるプロテオーム解析を行ない、細胞分化におけるタンパク質の発現変化を定量的に調べ、ヒト神経幹細胞成立・分化のタンパク質分子基盤を明らかにすることをめざした。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト ES 細胞から NSS 法 [1-5] によりアストロサイト条件培地で浮遊培養して NSS を作成し、NSS を塩基性繊維芽細胞成長因子を含む接着培地で 15 日間培養したものを eNS と、20 日間培養したものを INS と名付けた。eNS は様々な神経細胞へと分化するのに対し、INS はコリン作動性神経細胞に特化して分化するため、機能的な変化が起こっていると考え、解析に用いた。なお、今回使用した eNS 及び INS はいずれも神経幹細胞マーカー遺伝子である Sox2、Nestin の両方が 90% 以上陽性、どちらかを含む場合は 99.5% ± 0.5% 陽性の細胞であった。ヒト ES 細胞、eNS 及び INS について、プロテアーゼ阻害剤 complete mini (Roche 社) ホスファターゼ阻害剤 2 及び 3 (Sigma 社) を加えた抽出緩衝

液 (5 M urea /2 M thiourea /2% CHAPS /2% SB10 /2% Pharmalyte 3-10) でタンパク質を抽出し、超遠心分離により DNA を除去後、タンパク質の分解を防ぐため還元カルバミドメチル化した。脱塩後、HEPES 緩衝液 (7 M urea /2% CHAPS /50 mM HEPES-NaOH, pH 8.5) に溶解し、各分化段階の試料を等量ずつ混合したものを内部標準試料として IC3-OSu で蛍光標識 [10] し、各分化段階の試料を IC5-OSu で蛍光標識 [10] した。各分化段階及び内部標準試料をそれぞれ 20 µg 混合した試料を一次元目が等電点電気泳動 (pH 4-7、18 cm)、二次元目が SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (7.5% ゲル、Tris-Tricine 系) の二次元電気泳動 [11] を各分化段階につきそれぞれ 3 回行った。一元配置分散分析により有意水準 5% で発現差を示したタンパク質を抽出し、トリプシン消化後、得られたペプチドを AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 にかけて MS/MS 分析した。ProteinPilot™ ソフトウェア (AB SCIEX 社) を用いてタンパク質を同定した。

(2) 発現差を示したタンパク質に結合するタンパク質を STRING (<http://string-db.org/>) を用いて探索した。発現差を示したタンパク質及びその結合タンパク質が関与する代謝経路を KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) を用いて探索した。

(3) 前述のように各分化段階の細胞から抽出し還元カルバミドメチル化したタンパク質を脱塩後、4% SDS 化緩衝液 (4% SDS /20 mM Tris-HCl (pH 6.8) /40% Glycerol) を加えて 100 で 3 分間処理し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (7.5% ゲル、Tris-Tricine 系) で分離した。それぞれのゲルを 19 断片に切り出し、ゲル内でトリプシン消化した。得られたペプチドを、200 µl チップに詰めた C18 Extraction Disks (3M Bioanalytical) [12] を用いて脱塩精製後、0.1% トリフルオロ酢酸 /4.2% アセトニトリルに溶解し、Ultimate 3000 (DIONEX, CA, USA) を用いた HPLC にかけて 0.1% 酢酸中 2-90% アセトニトリルの濃度勾配により分離した。溶出したペプチドを LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) にかけて MS/MS 分析し、Mascot search (version 2.2.6, Matrixscience, London, UK) を用いて同定した。この操作を各分化段階につきそれぞれ 3 回行った。タンパク質の相対的な存在量は、各タンパク質個別の emPAI 値をそれぞれのタンパク質 emPAI 値の合計値で割ることで求めた (emPAI = 10<sup>タンパク質あたりのペプチド数に対する観察されたペプチド数の比</sup> - 1、タンパク質濃度にはほぼ比例する (相関係数 0.899)) [13]。また、一元配置分散分析により有意水準 5% で発現量の差を示したタンパク質を抽出した。

(4) DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)を用いて、有意水準5%で発現差を示したタンパク質がどのような機能を持つクラスターに分類されるかを調べた。また、それらのタンパク質が関与する代謝経路を KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)を用いて探索した。

(5) 鍵となると判定されたタンパク質に対する特異的抗体を用いてウェスタンブロット法によりタンパク質の発現上昇を検証した。

(6) 興味深い発現差を示すタンパク質の mRNA の発現を定量的リアルタイム RT-PCR で調べた。

#### 4. 研究成果

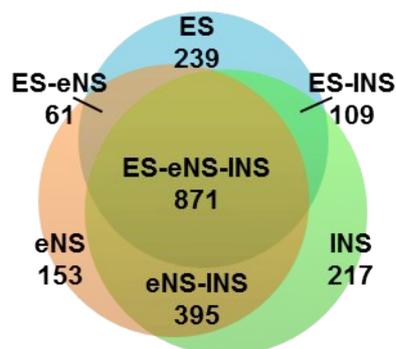
(1) 二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析の結果、ES 細胞から eNS にかけて発現量が増加するタンパク質として POMGNT1、COTL1、CALB1 が同定された。eNS から INS にかけて発現量が増加するタンパク質として HMGCS1、POMGNT1、CALB1、YWHAE が同定された。HMGCS1 はコレステロールとプレノイドの生合成第一段階を触媒する酵素である。HMGCS1 の変異により、コレステロールができないとミエリン遺伝子の発現が妨げられ髄鞘が形成できず、プレノイドができないとオリゴデンドロサイト前駆体の軸索への移動障害がおきる [14]。POMGNT1 の変異は筋眼脳病を引き起こすことが知られている [15]。COTL1 は  $Ca^{2+}$  非依存的に球状アクチンと結合する。COTL1 の eNS における発現量増加は樹状突起の形成や神経可塑性をはじめとした神経の発達や機能にアクチンが様々な役割を果たしていることと一致する。CALB1 は  $Ca^{2+}$  結合部位を 4 か所持つタンパク質で、 $Ca^{2+}$  濃度の恒常性維持に関わり、 $Ca^{2+}$  センサーとしても働くことが示唆されており [16]、神経のシナプス可塑性の制御に関わる [17]。神経終末や神経軸索起始部分ではカルシウムイオンチャンネルが多く存在しており、 $Ca^{2+}$  の濃度差によって情報伝達を行っている。YWHAE はリン酸化タンパク質と結合することで様々なシグナル伝達経路に関与している。YWHAE は神経の移動や脳の発育に重要で、その欠損は遺伝性の重い滑脳症をひきおこす [18]。一方、ES から eNS、INS にかけて発現量が減少したタンパク質としてそれぞれ FABP5 と TXN が同定された。FABP5 は脂肪酸に結合し、輸送や代謝に関与する。このタンパク質の異常な発現上昇が乳がん形成に関与すること [19] から、細胞数を増やす段階である ES 細胞の時期に多く発現し、分化の進む eNS 及び INS では発現量が減少するのではないかと考えられる。TXN は細胞増殖や酸化還元プロセスに関与している [20]。

(2) 発現差を示したタンパク質の相互作用タンパク質を STRING を用いて探索した。発現差を示したタンパク質及びその相互作用タンパク質の代謝経路を KEGG を用いて探索した。その結果、代謝経路として、MAPK シグナル伝達系、PI3K-AKT シグナル伝達系、Neutrophin シグナル伝達系などが示唆された。MAPK シグナル伝達系は神経可塑性における重要性が示唆されており、 $Ca^{2+}$  によって RAS-RAF-MAPK が活性化することが知られている [21]。

(3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後のタンパク質について、ショットガン法を用いて解析した。その結果、3 回とも検出、同定されたタンパク質数は ES 細胞で 1280、eNS で 1480、INS で 1592 であった。それぞれのタンパク質の相関関係を (図 1) に示す。

図 1 同定したタンパク質数

DAVID を用いて、有意水準 5% で発現量の差を示したタンパク質の機能分類を行った。ES



細胞から eNS にかけて発現量が増加したタンパク質は 415 あり、アクチン結合、カルモジュリン結合、EF ハンド、LIM ドメイン、細胞外マトリックス-受容体相互作用、焦点接着、細胞骨格制御、コレステロール生合成等に分類された。一方、ES 細胞から eNS にかけて発現量が減少したタンパク質は 196 あり、タンパク質合成、酸化還元酵素、リボヌクレオタンパク質、RNA 結合、リボゾームタンパク質等に分類された。eNS から INS にかけて発現量が増加したタンパク質は 251 あり、ヌクレオチド結合、細胞周期、DNA 複製、細胞分裂、mRNA スプライシング、mRNA プロセッシング、細胞骨格制御、細胞伸長等に分類された。一方、eNS から INS にかけて発現量が減少したタンパク質は 196 あり、アクチン結合、カルシウム結合、EF ハンド、LIM ドメイン、細胞外マトリックス-受容体相互作用、焦点接着、リン脂質結合等に分類された。さらに ES 細胞から INS にかけて発現量が増加したタンパク質は 454 あり、このうち、この過程ではじめて有意の発現量増加が検出されたタンパク質が 76 あった。CALB1 はショットガン法では ES 細胞から INS にかけて発

現上昇するタンパク質クラスターのうち、シナプス可塑性の制御に分類される項目で見出された。前述のように、二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析で発現差を示したタンパク質から推定された代謝経路のうち、MAPK シグナル伝達系は神経可塑性の制御に重要であることが示唆されている[21]。一方、ES 細胞から INS にかけて発現量が減少したタンパク質は 182 あり、このうち、この過程ではじめて有意の発現量減少が検出されたタンパク質が 12 あったが、ミトコンドリア、リボヌクレオタンパク質、酸化還元酵素、タンパク質合成、リボソームといった細胞内器官や機能に分類されるタンパク質が多かった。これらに分類されるタンパク質は前述のように ES 細胞から eNS にかけて減少が検出されているため、ES 細胞の持つ自己複製性や分化万能性が失われた結果であると考えられる。

(4) ショットガン法により発現量の差が検出されたタンパク質の代謝経路を KEGG を用いて探索した結果、ES 細胞から eNS 及び INS にかけて MAPK シグナル伝達系、PI3K-AKT シグナル伝達系、Neutrophin シグナル伝達系等が活発になっていることが示唆された。このように、ショットガン法で同定されたタンパク質が前述の二次元電気泳動の結果から推定された代謝経路上におおまかに見出され、二次元電気泳動の結果から推定された代謝経路を支持する結果となった。また、ショットガン法を用いることにより、新たに、細胞外マトリックス-受容体相互作用、細胞骨格制御の代謝経路が ES 細胞から eNS にかけて活発になり、前者は eNS から INS にかけて弱まる結果が示唆された。さらに、eNS から INS にかけて、生成した神経幹細胞の増殖や遺伝子転写が活発に行われ、細胞骨格制御や細胞伸長が活発になることが示唆された。

本研究で得られた結果は、これまで ES 細胞から神経幹細胞への分化として大まかに区分されていた神経幹細胞の成立・分化をより詳細に理解する上で意義がある。

(5) そこで、ES 細胞、eNS 及び INS から抽出したタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、神経のシナプス可塑性の制御に重要な役割を果たすと考えられる CALB1 タンパク質に対する特異的抗体を用いて、ウェスタンブロット法により CALB1 の発現量変化を調べた。前述の 2 つのプロテオーム解析法で得られた結果(ES 細胞から INS への分化過程で CALB1 の発現量が増加すること)を確認した。

(6) 次に、興味深い発現差を示すタンパク質についてその mRNA の発現を定量的リアルタイム RT-PCR で調べ、プロテオーム解析の結果と比較した。神経幹細胞のマーカーで

ある FABP7 の mRNA は ES 細胞から eNS にかけて、また、eNS から INS にかけて増加し、FABP7 タンパク質はショットガン法で ES 細胞から INS にかけての増加が検出された。ES 細胞から神経幹細胞にかけて、マウス及びサルの FABP7 タンパク質が増加し、サルではその mRNA も増加している[6-9]。CRABP1 の mRNA は ES 細胞から eNS にかけて増加し、eNS から INS にかけて減少したが、CRABP1 タンパク質は ES 細胞から INS にかけてショットガン法で減少が検出された。サルでは CRABP1 タンパク質が ES 細胞から NSS にかけて増加し神経幹細胞では減少している[8]。CRABP2 タンパク質は ES 細胞から eNS にかけて増加したが、その mRNA は ES 細胞から eNS にかけて、また、eNS から INS にかけて減少した。サルでは CRABP2 タンパク質の発現変化は検出されず、その mRNA は NSS で増加し、神経幹細胞で減少している[8]。Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質 CALU は ES 細胞から eNS にかけて増加したが、その mRNA の発現変化は検出されなかった。マウスでは ES 細胞から神経幹細胞にかけて CALU の mRNA、タンパク質ともに増加している[6]。Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質 RCN1 は mRNA、タンパク質ともに ES 細胞から eNS にかけて、eNS から INS にかけて増加した。サルでは RCN1 は mRNA、タンパク質ともに ES 細胞から NSS にかけて増加している[8]。VCL タンパク質は ES 細胞から eNS にかけて増加し、eNS から INS にかけて減少したが、その mRNA は eNS から INS にかけて減少した。サルでは VCL の mRNA、タンパク質ともに NSS から神経幹細胞にかけて増加している[8]。細胞外マトリックス-受容体相互作用に關与する LMB1 タンパク質は ES 細胞から eNS にかけて増加し、eNS から INS にかけて減少したが、その mRNA は ES 細胞から eNS にかけて減少した。筋肉栄養因子である MTPN タンパク質は ES 細胞から eNS にかけて増加し、eNS から INS にかけて減少したが、その mRNA の発現変化は検出されなかった。その異常が視力退化に關連する OPA1 タンパク質、及び、神経分化に關連する ATXN タンパク質はいずれも ES 細胞から INS にかけて増加したが、その mRNA の発現変化は検出されなかった。コレステロール合成の律速段階を触媒する酵素 HMGCS1 の mRNA とタンパク質はいずれも ES 細胞から eNS にかけて、また、eNS から INS にかけて増加した。Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質 CALB1 の mRNA とタンパク質はいずれも eNS から INS にかけて増加した。このように mRNA とタンパク質の発現解析である程度の相関性が見られたのは、FABP7、CRABP1、RCN1、VCL、HMGCS1、CALB1 であった。CRABP2、CALU、LAMB1、MTPN、OPA1、ATXN10については mRNA とタンパク質の発現解析で相関が検出されなかった。

また、本研究開始前に得られていた結果から予想されたように、マウス、サル、ヒトの

間でかなりの差があることが認められた。これは、神経幹細胞成立における動物間の進化の差を反映しているものと考えられ、ヒト神経幹細胞について解析するためには、ヒトの細胞を解析することが必要であることをあらためて示した。

#### (7) 今後の課題

本研究では、タンパク質の抽出緩衝液 (5 M urea /2 M thiourea /2% CHAPS /2% SB10 /2% Pharylyte 3-10) に可溶性のタンパク質についてプロテオーム解析を行った。この抽出緩衝液に不溶性の分画から、相間移動可溶化剤を用いた方法[22]によりさらに膜タンパク質を抽出できれば、ヒト神経幹細胞成立・分化のタンパク質分子基盤をさらに充実させることができると考えられる。また、本研究でKEGGを用いた代謝系にヒットしたタンパク質は同定されたタンパク質の約 40%程度であった。同定されたタンパク質の未知機能の解明が期待される。

#### <引用文献>

- 1 Nakayama, T., Momoki-Soga, T., Inoue, N. Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons, *Neurosci. Res.*, 46, 2003, 241-249
- 2 Nakayama, T., Momoki-Soga, T., Yamaguchi, K., Inoue, N. Efficient production of neural stem cells and neurons from embryonic stem cells, *NeuroReport*, 15, 2004, 487-491
- 3 Nakayama, T., Inoue, N., Embryonic cell protocols: differentiation model, neural stem sphere method: induction of neural stem cells and neurons by astrocyte-derived factors in embryonic stem cells *in vitro*, In: Turksen, K. (Ed.), *Method. Mol. Biol.*, 330, 2006, 1-13
- 4 Nakayama, T., Sai, T., Otsu, M., Momoki-Soga, T., and Inoue, N., Astrocytogenesis of embryonic stem-cell-derived neural stem cells: Default differentiation, *NeuroReport*, 17, 2006, 1519-1523
- 5 Akama, K., Tatsuno, R., Otsu, M., Horikoshi, T., Nakayama, T., Nakamura, M., Toda, T., Inoue, N., Proteomic identification of differentially expressed genes in mouse neural stem cells and neurons derived from ES cells *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1784, 2008, 773-782
- 6 Akama, K., Horikoshi, T., Nakayama, T., Otsu, M., Imaizumi, N., Nakamura, M., Toda, T., Inuma, M., Hirano, H., Kondo, Y., Suzuki, Y., Inoue, N. Proteomic characterization during neural differentiation from monkey embryonic stem cells into neurons *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814, 2011, 265-276
- 7 Otsu, M., Sai, T., Nakayama, T., Murakami, K., Inoue, N. Uni-directional differentiation of mouse embryonic stem cells into neurons by the neural stem sphere method, *Neurosci. Res.* 69, 2011, 314-321
- 8 Akama, K., Horikoshi, T., Nakayama, T., Otsu, M., Imaizumi, N., Nakamura, M., Toda, T., Inuma, M., Hirano, H., Kondo, Y., Suzuki, Y., Inoue, N., Proteomic identification of differentially expressed genes during differentiation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) embryonic stem cells to astrocyte progenitor cells *in vitro*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1834, 2013, 601-610
- 9 Akama, K., Nakayama, T., Otsu, M., Toda, T., Inoue, N., Neural stem cells differentiated from embryonic stem cells: Proteomic identification of expressed genes, In : Hayat, M. A. (Ed.), *Therapeutic applications in disease and injury*, Vol. 5, 2012, pp. 257-266, Series: Stem cells and cancer stem cells. Springer, Amsterdam, Netherlands
- 10 榊原 陽一, 中原 幸太, 森永 浩通, 山崎 正夫, 西山 和夫, 水光 正仁, プロテオーム解析による食品機能の研究, *生物工学* 89 (10), 2011, 593-596
- 11 Toda, T., Kimura, N., Standardization of protocol for Immobiline 2-D PAGE and construction of 2-D PAGE protein database on World Wide Web home page, *Jpn. J. Electrophoresis*, 41, 1997, 13-20
- 12 Rappsilber, J., Mann, M., Ishihama, Y., Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips, *Nat. Protoc.* 2, 2007, 1896-1906
- 13 Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., Mann, M., Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for Estimation of Absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein, *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 2005, 1265-1271
- 14 Mathews, E. S., Mawdsley, D. J., Walker, M., Hines, J. H., Pozzoli, M., Appel, B., Mutation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase I reveals requirements for isoprenoid and cholesterol synthesis in oligodendrocyte migration arrest, axon wrapping, and myelin gene expression, *J. Neurosci.*, 34, 2014, 3402-3412
- 15 Akasaka-Manyu, K., Manyu, H., Kobayashi, K., Toda, T., Endo, T., Structure-function analysis of human protein O-linked mannose  $\beta$ 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1, POMGnT1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 2004, 39-44
- 16 Berggård, T., Miron, S., Önerfjord, P., Thulin, E., Åkerfeldt, K. S., Enghild, J. J., Akke, M., Linse, S., Calbindin D28k exhibits properties characteristic of a  $Ca^{2+}$  sensor, *J.*

- Biol. Chem., 277, 2002, 16662-16672
- 17 Molinari, S., Battini, R., Ferrari, S., Pozzi, L., Killercross, A. S., Robbins, T. W., Jouvenceau, A., Billard, J. M., Dutar, P., Lamour, Y., Baker, W. A., Cox, H., Emson, P. C., Deficits in memory and hippocampal long-term potentiation in mice with reduced calbindin D28K expression, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1996, 8028-8033
  - 18 Toyo-oka K, Shionoya A, Gambello MJ, Cardoso C, Leventer R, Ward HL, Ramses Ayala, R., Tsai, L.-H. Dobyns, W., Ledbetter, D., Hirotsune, S., Wynshaw-Boris1, A., 14-3-3 epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. Nat. Genet. 34, 2003, 274-85
  - 19 Levi, L., Lobo, G., Doud, M. K., Lintig, J. V., Seachrist, D., Tochtrop, G. P., Noy, N., Genetic ablation of the fatty acid-binding protein FABP5 suppresses HER2-induced mammary tumorigenesis, Cancer Res., 73, 2013, 4770-4780
  - 20 Wei, S. J., Botero, A., Hirota, K., Bradbury, C.M., Markovina, S., Laszlo, A., Spitz, D. R., Goswami, P. C., Yodoi, J., Gius, D., Thioredoxin nuclear translocation and interaction with redox factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation, Cancer Res., 60, 2000, 6688-6695
  - 21 飯野 雄一, 神経系における MAP キナーゼの機能、蛋白質 核酸 酵素、47, 2002, 1390-1398
  - 22 Masuda, T., Tomita, M., Ishihama, Y., Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. J. Proteome Res., 7, 2008, 731-740

#### 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2件)

- 1 赤間 邦子、柴崎 玄、富岡 鉄太郎、戸塚 啓太、大津 昌弘、井上 順雄、中山 孝、三浦 ゆり、岩本 真知子、津元 裕樹、佐藤 守、荷堂 清香、鈴木 豊、近藤 靖、Neural stem sphere 法によるヒト ES 細胞から初期及び後期神経幹細胞への分化誘導におけるタンパク質発現比較解析、第 58 回神経化学学会大会、2015 年 9 月 11 日-9 月 13 日(予定) 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市大宮区桜木町)
- 2 柴崎 玄、大津 昌弘、中山 孝、三浦 ゆり、岩本 真知子、津元 裕樹、佐藤 守、鈴木 豊、近藤 靖、井上 順雄、赤間 邦子、プロテオーム解析から探る ES 細胞か

ら前期及び後期神経幹細胞への分化基盤、第 12 回日本プロテオーム学会大会、2014 年 7 月 17 日、つくば国際会議場(茨城県つくば市竹園)

〔図書〕(計1件)

赤間 邦子 他、講談社、プロテオミクス辞典、日本プロテオーム学会編、2013 年、135

〔その他〕

ホームページ等

<http://pchem2.s.chiba-u.ac.jp/chem/lab/akamalab/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

赤間 邦子 (AKAMA Kuniko)  
千葉大学・普遍教育センター・教授  
研究者番号：50114228

##### (2)研究分担者

井上 順雄 (INOUE Nobuo)  
首都大学東京・人間健康科学研究科・客員教授  
研究者番号：50159985

中山 孝 (NAKAYAMA Takashi)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：90150060

##### (3)連携研究者

平野 久 (HIRANO Hisashi)  
横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・教授  
研究者番号：00275075

##### (4)研究協力者

富岡 鉄太郎 (TOMIOKA Tetsutaro)  
柴崎 玄 (SHIBASAKI Gen)  
戸塚 啓太 (TOTSUKA Akihiro)  
狩野 祥寛 (KANO Yoshihiro)