

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560219

研究課題名(和文)ゼノ・フィーダーフリー培養で維持可能なiPS細胞の分離：新規表面マーカーの同定法

研究課題名(英文) Isolation strategy of iPS cells that enable to maintain under xeno feeder free condition.

研究代表者

田岡 万悟 (Taoka, Masato)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：60271160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞の細胞表面に存在するタンパク質を知ることは幹細胞の品質の確認に重要である。そこで細胞表面のタンパク質を効率よく同定・定量するために、STAGEチップ法と順相クロマトグラフィーを組合せた方法を開発した。この方法で1400種類以上の細胞表面に存在するN結合型糖タンパク質が500μgのゼノフィーダーフリー培養したiPS細胞のタンパク質から同定された。iPS化する前の細胞や分化後の細胞とラベルフリーの定量によって比較したところ、10種類のゼノフィーダーフリー培養iPS細胞に特異的なタンパク質を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Detailed knowledge of cell-surface proteins of iPS cells is necessary to isolate a well-defined population and enhance their translational potential. To identify and quantify proteins specific to membrane with high throughput, we developed a normal phase chromatographic approach with STAGE tip strategy. Through the approach, we identified over 1400 of cell-surface and N-linked glycoproteins from 500 micro g of proteins extracted from iPS cells cultured with xeno- and feeder-free condition. Compared them with the proteins on the surface of the original cells before obtaining pluripotency and embryoid body cells after differentiation by label-free proteomics quantitation, we obtained the 10 candidate proteins specific for iPS cells in xeno- and feeder-free condition.

研究分野：生化学

キーワード：プロテオミクス 糖鎖 細胞表面タンパク質

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞を再生医療に利用するためには異種由来成分によって培養器表面を処理しない、すなわちゼノ・フィーダーフリー (XFF) のコンディションに移す必要がある。ところがこうした環境に iPS 細胞を移すと多くのクローンは徐々に未分化性を失い、最終的に 10% 程度の iPS 細胞しか未分化な状態を維持することができない。XFF に順応可能なクローンだけを FACS であらかじめ分離するための細胞表面マーカー「XFF 未分化マーカー」が発見できれば、iPS 細胞を利用するプロセスや労力を大きく減らすことができる。

一方、申請者は、タンパク質マーカーの探索にトランスクリプトーム解析や通常のプロテオーム解析を行うと、細胞表面タンパク質が発見されずに細胞内のタンパク質のみが数多く検出される。そこで、申請者は細胞表面タンパク質を選択的に同定する IGOT 法を開発したが (Kaji H, Nat Biotechnol, 2003)、原報の方法では、試料処理が複雑な上に、レクチン樹脂 (タンパク質を共有結合させた樹脂で安定性が低く管理が難しい) を使うため、再現性がよくなかった。申請者は当初、試料処理には操作の簡便な SDS-PAGE を、細胞表面タンパク質の精製には安定な順相クロマト用樹脂を利用した再現性の高い方法を確立し、既に実証実験を行っていた。また、この方法の高速化および、この方法と質量分析による定量を組み合わせた細胞表面タンパク質の定量法を開発していた。

2. 研究の目的

iPS 細胞を利用するためには、XEF 培養が必要となるが、多くの iPS 細胞は XFF に順応する過程で分化してしまう。実用上の労力を削減するためには、未分化なまま XFF に順応可能な iPS 細胞をあらかじめ見分けて分離するための分子マーカー「XFF 未分化マーカー」の探索が必要である。最近、申請者は細胞表面に発現するタンパク質の効率的な同定法を確立した。そこで本申請では、さらに、細胞表面タンパク質のハイスループット定量法を確立し、その方法を適用して XFF 未分化マーカーを同定を試みることを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

細胞表面タンパク質は、まず、iPS 細胞の細胞抽出液を SDS-PAGE で分離し、ゲル内で分離されたタンパク質をそのまま酵素消化によってペプチド状態にまで断片化して、そこに含まれる糖ペプチドを順相クロマトによって捕集することで、部分的なペプチドとして回収した。さらに、得られた糖ペプチドに対して、酵素による脱糖鎖後に質量分析によってそのペプチドを検出することで細胞表面タンパク質を同定した。

この方法の開発にあたって、まず、(i)HPLC システムでおこなっている順相クロマトを高速化のためにバッチクロマトに置き換え、(ii)質量分析によるスペクトルの積算値を指標とする定量法の導入をおこなうことで、ハイスループットに細胞表面タンパク質が定量できるようにした。(i)バッチクロマトは、HPLC による予備実験と比較しながら最適な方法を選択した。バッチクロマトに変更する際に、溶離液 (酢酸アンモニウム中性条件下や、酢酸やギ酸による酸性条件下、イオンペア試薬添加) や充填剤 (zwitterionic 親水性相互作用充填剤やアクリルアミド結合型充填剤、アミン結合型充填剤など) の最適化も同時におこなった。(ii)定量には、簡便な方法として定評のある質量分析によって得られたスペクトルの積算による方法を導入した。実際のデータ処理に利用したソフトウェアは、現在保有している市販ソフトウェア (Proteome discoverer, Thermo Fisher Scientific 社) と自作のソフトウェア STEM (Shinkawa T, J Proteome Res, 2005) で、処理後に得られた二次データを実際の質量スペクトルと比較することによって、実際に使用するソフトウェアを選択した。データセットはトランスフェリンや α -acid glycoprotein など、標準タンパク質を解析して確認した。

ヒト由来培養細胞や iPS 細胞、胚様体をそれぞれ回収し、細胞表面タンパク質を相対定量した。XEF で成育する iPS 細胞に特異的な表面タンパク質を複数同定し、XFF 未分化マーカー候補を 10 種類選択した。

4. 研究成果

本研究では「糖タンパク質 細胞表面タンパク質」であるという観測事実 (Kaji H, Mol Cell Proteomics, 2007) に基づいて、細胞表面タンパク質の高速な同定と定量方法の確立し、その方法の適用として XEF で生育可能な iPS 細胞の表面に特異的に発現するマーカータンパク質の探索を行った。細胞表面タンパク質の高速な同定については、複数の条件で検討を行って、イオンペア試薬存在下の酸性条件で、順相クロマトグラフィーによる分離を行うと糖タンパク質がよく回収され、最も非糖ペプチドの混入が少なかった。STAGE チップ法 (Rappsilber J, Nat Protoc, 2007) を導入することで、この方法を HPLC システムでおこなう方法からバッチクロマトに置き換えることに成功した。また、この方法は SDS-PAGE によるタンパク質の分画と相性がよく、タンパク質の分離からペプチド化、IGOT 法、細胞表面タンパク質の同定まで、シームレスな分析が可能となった (次頁図)。

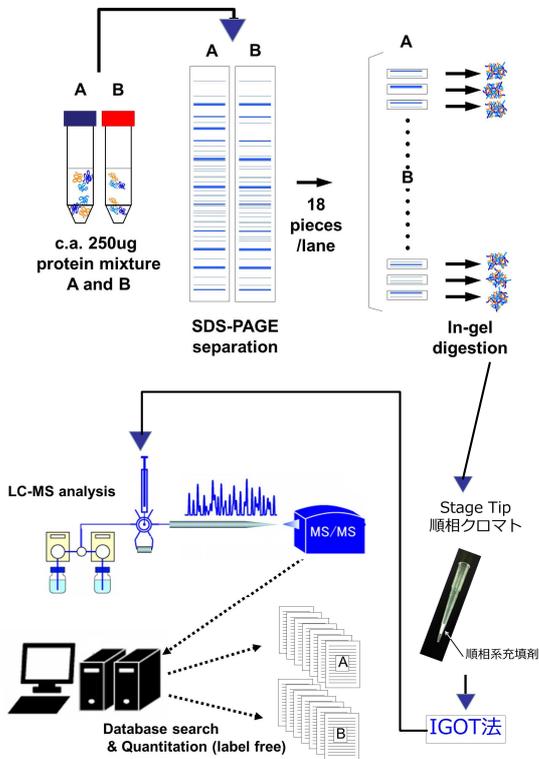


図 細胞表面タンパク質の回収と同定の概要

この方法をヒト iPS 細胞に適用したところ、500 μg のタンパク質を含む抽出液から 4000 種類をこえるペプチドに由来する 1400 種類以上のタンパク質が同定され、その約 9 割が細胞表面タンパク質であった。同定されたタンパク質は、CD 抗原や G タンパク質共役型リセプターなど、多くの方法では検出が非常に難しい膜貫通型タンパク質が含まれていた (下図)。

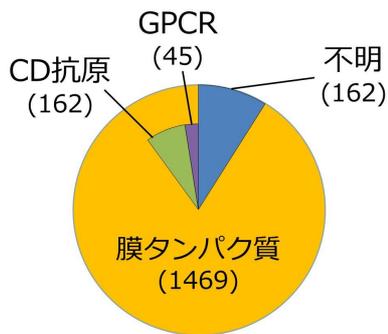


図 同定された iPS 細胞表面タンパク質の分類

この方法にノンラベル定量法を導入するために前述の 2 種類のソフトウェアをデータ処理に適用し、標準タンパク質を解析することで定量に支障がないことを確認した。次に、本方法を TIG-1 と MRC-5 とこれらの細胞を親株とし、かつ XEF 上で成育する iPS 細胞クローン、iPS 細胞を分化させた胚様体に適用した。それぞれの試料から、細胞表面タンパク質を前述の方法で相対定量したところ、多

数の XEF 成育 iPS に特異的な細胞表面タンパク質が同定できた (下図)。10 種のタンパク質をピックアップしてウエスタンブロットで確認している。

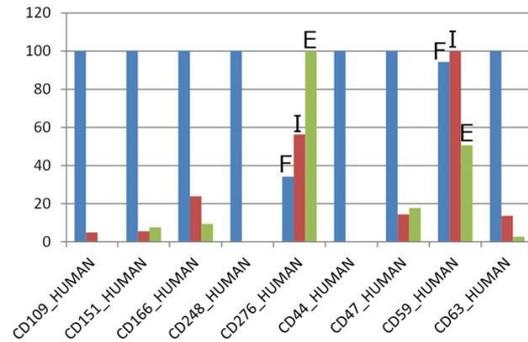


図 分化状態と細胞表面タンパク質の変動
線維芽細胞 (青 F) と iPS 細胞 (赤 I)、胚様体 (緑 E) で発現が異なるタンパク質を一部グラフに示した。細胞表面タンパク質の回収と同定の概要

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Global PROTOMAP profiling to search for biomarkers of early-recurrent hepatocellular carcinoma.

Taoka M, Morofuji N, Yamauchi Y, Ojima H, Kubota D, Terukina G, Nobe Y, Nakayama H, Takahashi N, Kosuge T, Isobe T, Kondo T. J Proteome Res. 2014;13(11):4847-58. 査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

「CELL-SURFACE PROTEOME: N 型糖タンパク質を指標にした細胞表面タンパク質の簡便な同定法」田岡万悟 藤田千春 山内芳雄 嶋本顕 磯辺俊明 日本プロテオーム学会 2015 年会 2015 年 7 月 24 日 熊本新都心プラザ (熊本県熊本市)

〔産業財産権〕

該当無し

〔その他〕

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田岡 万悟 (TAOKA, Masato)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号: 60271160

(2) 研究分担者

泉 友則 (IZUMI, Tomonori)

山口大学・医学 (系) 研究科・准教授

研究者番号：00261694

嶋本 顕 (SHIMAMOTO, Akira)
広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授
研究者番号：70432713

(3)連携研究者
該当無し