

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年2月21日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770240

研究課題名（和文）マウス精原幹細胞におけるクロマチン結合タンパク質のプロテオーム解析

研究課題名（英文）Proteomic analysis of chromatin binding proteins in mouse spermatogonial stem cells.

研究代表者

垣内 一恵（Kakiuchi Kazue）

研究者番号：90509184

研究成果の概要（和文）：本研究は、精子形成を維持する精原幹細胞の自己複製機構と分化の過程を分子レベルで明らかにするために、分化型精原細胞と比較してマウス精原幹細胞特異的に発現する核タンパク質の網羅的な解析を行った。同定したタンパク質は、精子形成との関連性、精原幹細胞の自己複製や分化に関する知見は皆無であったことから、さらなる機能解析により精原幹細胞の自己複製と分化を司る新たな調節機構が明らかにされる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To reveal differentiation process of spermatogonial stem cells in mice, comparative analysis of nuclear proteome of spermatogonial stem cells and differentiating spermatogonia was performed. None of identified proteins have been characterized with respect to either stem cell self-renewal or spermatogenesis. Future functional studies will clarify the exact roles of these proteins on self-renewal and differentiation of spermatogonial stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：幹細胞

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は分化能を維持したまま増殖し続ける能力（自己複製能）を持つことから組織の恒常的維持や再生の中心的役割を果たしている。なかでも、精子形成を維持している精原幹細胞は遺伝情報を次世代に継ぐことができるという他の組織幹細胞にはない特徴を持ち、再生医療のみならず不妊治療や

様々な産業動物の遺伝子組換え個体の作成などの多くの分野で応用が期待されている一方で、精原幹細胞の自己複製機構や分化の過程の分子メカニズムについては不明な点が多く、医療への応用が大きく阻まれている。

これまでの研究により、マウスではグリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）を添加した無血清培地において半永久的に自己複製す

ることが明らかとなっている。申請者は、前所属機関においてタンパク質同定システム (LC-MS/MS) を用いたプロテオーム解析技術の開発に携わり、試料の調整法やデータ解析法等の技術・知識を習得してきた。最近の胚性幹細胞 (ES 細胞) の研究分野では、核分画に焦点を絞ったプロテオーム解析が幹細胞の自己複製調節機構や分化の過程の有益な情報の提供源になることが期待されている。本研究は、精原幹細胞の自己複製機構と分化の過程を細胞・分子レベルで明らかにするために、マウス精原幹細胞を大量培養し、精原幹細胞と分化型精原細胞に特徴的に発現する核プロテオームを解析した。

2. 研究の目的

(1) 精原幹細胞と分化型精原細胞の核プロテオーム解析を行い、それぞれ特徴的に発現するタンパク質を探索する。

(2) 精原幹細胞あるいは分化型精原細胞に特徴的なタンパク質が自己複製機構や分化機構に直接関わる因子であるのか明らかにする。

3. 研究の方法

当研究室で確立した精原幹細胞大規模培養系において、分化誘導因子であるレチノイン酸を加え分化型精原細胞を得た。得られた各細胞集団から NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE 社) を使用して核を分画した。トリプシン消化によりペプチド断片化し、LC-MS/MS によって解析した。MS/MS スペクトルデータは、検索エンジン SEQUEST により解析し、FDR (false discovery rate) が 5% 未満のデータのみを評価した。比較相対定量解析は、差異解析ソフトウェア SIEVE により行った。同定タンパク質の特徴については、データベース Reactome を使用して解析した。同定タンパク質において精原幹細胞あるいは分化型精原細胞に特徴的に同定したタンパク質は、定量的 RT-PCR 法によって同定タンパク質をコードする mRNA の発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) 精原幹細胞の分化誘導条件の検討

精原幹細胞の増殖因子である GDNF を培養細胞にて調製し、精原幹細胞の大量培養を行った。精原幹細胞はレチノイン酸により分化型精原細胞に分化させることが可能である。そこで十分量の分化型精原細胞を得るためにレチノイン酸による精原幹細胞の分化誘導条件を検討した。未分化状態の指標である POU5F1 と ZBTB16 の発現、および分化マ

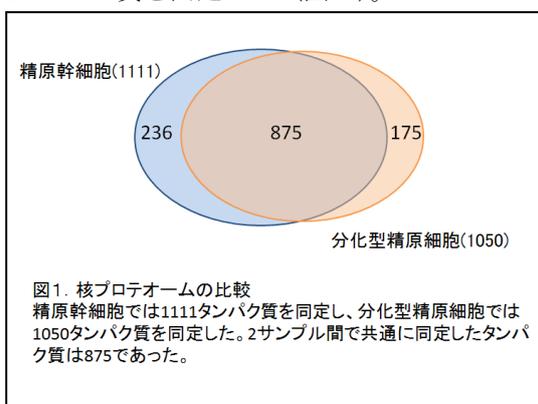
ーカーとして KIT の発現を指標に分化誘導の最適化を図った。その結果効率よくほとんどの精原幹細胞を分化型に誘導する培養条件を決定した。

(2) 核分画の調整

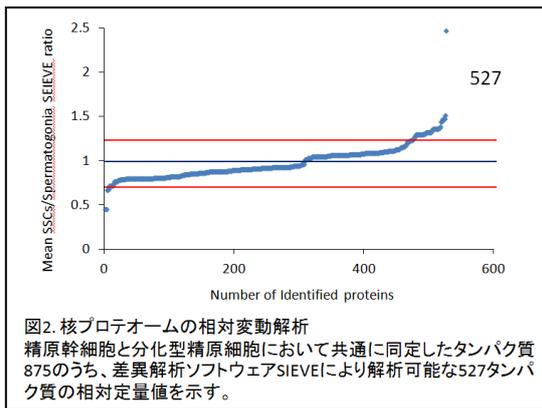
調整した核分画には、転写制御因子である POU5F1 や ZBTB16 が濃縮されていることをウェスタンブロット法によって確認した。そこで、核分画を TSK gel G3000SW を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによってさらに分画し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動と銀染色法によって可視化した。その結果、精原幹細胞、分化型精原細胞に特徴的なタンパク質バンドを顕著に検出することはできなかった。この理由として、分化に伴って発現が誘導または抑制されるタンパク質は発現量が非常に低いために銀染色法では検出できないことが考えられた。そこで、網羅的にタンパク質を同定することで微量なタンパク質の同定を試みた。

(3) 精原幹細胞と分化型精原細胞の核プロテオーム解析

得られた核分画をトリプシン消化によりペプチド断片化し、LC-MS/MS によって解析した。その結果、精原幹細胞の核分画において 1111、分化型精原細胞の核分画において 1050 タンパク質を同定した (図 1)。



精原幹細胞の核分画においてのみ同定されたタンパク質は 236、分化型精原細胞の核分画においてのみ同定されたタンパク質は 175 であった。また、875 タンパク質は精原幹細胞と分化型精原細胞に共通して同定された。この共通に同定された 875 タンパク質については、さらに比較相対定量解析を行った。その結果、相対定量値が 2 倍以上変動したタンパク質はほとんど存在しなかった (図 2)。従って、精原幹細胞と分化型精原細胞の核分画において共通して同定されたタンパク質は分化の過程で発現量がほとんど変化しないことが明らかとなった。



(4)核プロテオーム解析により同定されたタンパク質の精原幹細胞および分化型精原細胞における発現解析

精原幹細胞および分化型精原細胞の核分画においてそれぞれ特徴的に同定した236、175タンパク質のうち、同定ペプチドによるシーケンスカバー率が高いタンパク質をそれぞれ抽出した。その結果、精原幹細胞では25タンパク質、分化型精原細胞では6タンパク質を抽出することができた。これらのタンパク質には精子形成への関与を示唆する報告はなく、さらに精原幹細胞の自己複製や分化に関する知見は皆無であった。これらのタンパク質の発現解析をウェスタンブロット法によって試みたが、特異性が高い抗体が得られず検出することができなかった。そこで、定量的RT-PCR法によって同定タンパク質をコードするmRNAの発現量を解析した。その結果、7種の遺伝子がプロテオーム解析の結果と一致する発現パターンを示した。さらに7種の遺伝子のうち2種の遺伝子が生体内においても同様の発現パターンを示した。

(5)精原幹細胞に特徴的なタンパク質の機能解析

絞り込みを行った2種の遺伝子を精原幹細胞において発現させるため発現ベクターを構築した。現在、この2種の遺伝子を過剰発現する精原幹細胞株を作製している。選択した細胞株が得られた場合には、未分化状態の維持及び分化能について解析することを計画している。

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)

[学会発表] (計9件)

①Proteomic Analysis of Nuclear proteins in mouse Spermatogonial stem cells. 垣内一恵・高岸聖彦・久保田浩司・第35回日本分子生物学会年会・福岡・2012年12月13日

②マウス精原幹細胞のプロテオーム解析 垣内一恵・高岸聖彦・久保田浩司・ハイテクリサーチセンタープロジェクト研究中間報告会・北里大学獣医学部・2011年11月3日

③ブタ glial cell line derived neurotrophic factor の発現と機能解析 垣内一恵・高岸聖彦・久保田浩司・ハイテクリサーチセンタープロジェクト研究中間報告会・北里大学獣医学部・2011年11月3日

④ヒト精子の凍結保存における糖鎖添加の効果について 高岸聖彦・垣内一恵・久保田浩司・ハイテクリサーチセンタープロジェクト研究中間報告会・北里大学獣医学部・2011年11月3日

⑤ブタ精巣における THY1 陽性細胞の解析 後藤優樹・嶋田孝紀・垣内一恵・高岸聖彦・久保田浩司・日本畜産学会第114回大会(十和田)2011年8月27日

⑥ブタゴノサイトに発現する PLZF の生化学的解析 児玉勇慈・嶋田孝紀・垣内一恵・高岸聖彦・久保田浩司・日本畜産学会第114回大会(十和田)2011年8月27日

⑦ブタゴノサイトに発現する PLZF の生化学的解析 児玉勇慈・垣内一恵・高岸聖彦・久保田浩司・第24回北里大学バイオサイエンスフォーラム2011年8月24日

⑧ブタ精巣における GDNF の発現解析 垣内一恵・高岸聖彦・久保田浩司・第24回北里大学バイオサイエンスフォーラム2011年8月24日

⑨グリア細胞由来神経栄養因子 GDNF 発現系の構築 垣内一恵・久保田浩司・ハイテクリサーチセンタープロジェクト研究中間報告会(北里大学獣医学部)2009年7月25日

[その他]

ホームページ等

http://www.kitasato-u.ac.jp/vmas/faculty/as/as_study01.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

垣内一恵 (KAKIUCHI KAZUE)

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：90509184