

平成21年4月1日現在

研究種目：基盤研究 (A)
研究期間：2006～2008
課題番号：18201039
研究課題名 (和文) マウス ES 細胞の分化調節機構に関する機能プロテオミクス研究
研究課題名 (英文) Functional proteomics studies on the mechanism of differentiation of mouse embryonic stem cells
研究代表者 磯辺 俊明 (ISOBE TOSHIAKI) 首都大学東京・大学院理工学研究科・教授 研究者番号：70106607

研究成果の概要：

本研究では、再生医療や移植医療などへの応用が期待される胚性幹細胞 (ES 細胞) の特質や分化調節機構についての理解を深める目的で、マウス ES 細胞のプロテオームを最新のプロテオミクス技術で解析し、分化誘導刺激にともなう約 4,000 種類のタンパク質の変動を定量的に解析した。また、未分化 ES 細胞に特異的なタンパク質の細胞機能を解析した。本研究の成果は、ES 細胞の基礎研究だけでなく、各種の方法で作成した iPS 細胞の比較解析や分化状態を識別するためのバイオマーカー探索のための資源として有用と考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2007 年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2008 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
年度			
年度			
総計	34,800,000	10,440,000	45,240,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：プロテオーム、発生・分化、幹細胞、機能プロテオミクス、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞 (ES 細胞) は自己複製能とすべての細胞に分化しうる多分化能を有する全能性の細胞で、発生学をはじめとする基礎生物学の研究だけでなく、将来的には移植医療や臓器再生のための強力な医療資源として広範な応用が期待されている。生物学の基礎研究では、ES 細胞がもつ未分化維持機構と環境要因に依存した分化過程の研究を中心に、ほ

乳類の発生過程における細胞系譜の形成や細胞分化の分子機構を試験管内で研究できる系として、例えば発生初期の特定の時期に部位特異的に出現する特定の神経細胞の分化誘導に関する研究などが注目されている。こうした研究は、ES 細胞に関する基本的な理解を深めるとともに、ES 細胞の分化を人為的に制御し、特定の細胞系譜へ選択的に誘導する技術の開発と結びつくことで、パーキンソン

ン病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患や糖尿病など、特定の細胞機能の消失により引き起こされ、自立的な回復が望めない多くの疾患に対する治療法の開発に繋がる点でも重要な研究課題となっている。実際に、ES細胞を資源として、神経、心筋、骨、血球系細胞をはじめ、肝、脾、消化管などさまざまな器官が分化する内胚葉細胞などへ分化誘導させる試みが報告されている。また、試験管内でES細胞から特定の組織を構築する研究も始まっており、組織及び臓器形成の基本的な知見とともに人工臓器への応用という点でも注目されている。このように、ES細胞を資源とした移植医療や再生医療の実現に向けた試みは大きな期待を受けて国内外で精力的な研究が続けられている。

一方、ES細胞の基本特性である未分化維持機構や分化能力に関しては、マウスES細胞などを用いた分子生物学や細胞生物学的な基礎研究が行われ、ES細胞の多分化能を維持するためにはOct3/4、Sox2、Nanogなどの転写因子が必須であること、特定の細胞系譜に誘導するためにはBMP、Wntなどのシグナルやさまざまなサイトカインが必要であることなどが明らかにされている。しかし、ES細胞が示す刺激応答系に関する我々の知識はまだ部分的であり、またES細胞の特性の1つともなっている奇形種（テラトーマ）形成などの生物学的特性の分子機構に関する知識も極めて不完全である。したがって本研究を開始してから3年を経た現在においても、ES細胞の分化の方向を完全な形で人為的に制御し、特定の細胞系譜に誘導して選択的に増殖させることは困難であった。また、ES細胞の臨床応用に関しても、分化誘導過程での腫瘍形成など、医療技術としたときの深刻な問題も懸念されている。こうした問題の解決には、ES細胞がもつ細胞生物学的な特質と分化調節機構に関する基本的な原理をより良く理解することが不可欠と考えられた。

この研究の開始と前後して、京都大学・山中伸弥教授らのグループが、ヒト繊維芽細胞を人為的に操作することでES細胞と同様の細胞学的性質を有するiPS細胞（induced pluripotent stem cell）を作成することに成功した。この研究は、ES細胞研究がもつ科学および倫理的な問題を解決し、将来の移植医療、再生医療の実現に向けた大きな一歩となった。しかしiPS細胞がもつ細胞生物学的な性質や、ES細胞との相違などの詳細については十分に理解されていない。したがってiPS細胞の出現は、従来のES細胞研究の重要性をますます増大するものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、質量分析法を中心とする最新のプロテオミクス技術によって、ES細胞で機

能しているタンパク質の発現と相互作用のダイナミクスを大規模に解析し、その細胞生物学的な特質と分化調節機構に関する基本的な理解を深めることを目標とした。

具体的には、次の目標を設定して研究を行うこととした。（1）ショットガン法を基本原理とするプロテオミクス解析技術によって、未分化状態を維持したまま増殖を続けるES細胞のタンパク質発現の全体像を明らかにする。また分化誘導刺激によって特定の細胞系譜に分化を開始したES細胞のタンパク質発現のダイナミクスを時系列に添って定量的かつ系統的に解析することで、ES細胞の分化過程を特徴づけるタンパク質マーカーを検索する。（2）ES細胞の運命決定に重要なサイトカインなどの分化誘導因子に対する細胞膜受容体や細胞間相互作用を規定する細胞接着因子、CD抗原などの細胞表面タンパク質群や糖タンパク質、あるいはクロマチン分画に存在するタンパク質に焦点をあてて選択的に解析することで、ES細胞の分化に関与するタンパク質の同定を試みる。（3）以上の研究で検出した未分化あるいは分化状態を特徴づけるタンパク質を起点としたタンパク質相互作用解析や生化学、分子生物学的な解析によって、ES細胞の細胞生物学的な特性や分化調節機構に関する知見を得る。

最後に本研究では、未分化および分化誘導刺激を受けたES細胞に存在するタンパク質に関する大規模なデータセットを整備することで、ES細胞の未分化状態の維持や分化調節機構など、ES細胞の特性を解析するさまざまな基礎研究や、特定の刺激や環境因子によってES細胞やiPS細胞から誘導される細胞系譜や組織を同定するためのバイオマーカー探索のための資源として、移植医療や再生医療の発展に寄与することを目標とした。

3. 研究の方法

ES細胞をはじめとする幹細胞研究は、臨床応用の観点からヒトの細胞に興味を持たれるが、生命倫理の問題など解決すべき課題が多く残されている。そこで、ES細胞が共通にもつ細胞生物学的な特性の理解を目標とする本研究では、実験的な取り扱いが容易で多くの知見が蓄積しているマウスES細胞を用いた。マウスES細胞は、白血病阻害因子（LIF）の存在下で多分化能を維持したまま培養することが可能で、神経、心筋、骨、血球系細胞などの細胞系譜へ分化誘導する実験系が知られている。

一方、本研究では、高分離能・高感度のダイレクトナノフロー多次元液体クロマトグラフ（LC）と高分解能質量分析計（MS）を連結し、データ処理システムを一体化した全自動多次元ナノ LC-MS システムをプロテオーム解析のプラットフォームとして使用した。

このシステムは、文部科学省などの援助によって申請者が進めてきた研究開発プロジェクトの成果として生まれた世界最先端のプロテオーム解析システムで、細胞抽出液などのタンパク質試料をプロテアーゼで消化して得られる複雑なペプチド混合物をオンラインで分析し、その質量情報からタンパク質を同定する「ショットガン法」を基本原理にしている。この方法ではタンパク質の消化で生じたペプチド断片を分析の対象とするので、タンパク質としての取り扱いが難しい細胞膜受容体などの不溶性タンパク質も同定できる大きな利点がある。またこのシステムでは、ディッシュ1枚で培養した細胞に含まれる数マイクログラムの試料中に含まれるフェモトモルレベルのタンパク質を1回の分析で数千種類同定できる。このシステムを利用した予備的な研究では、LIF 存在下で培養した未分化マウス ES 細胞に発現しているタンパク質 1,800 種類を同定して細胞内局在や機能情報を付加したタンパク質カタログを作成し、mRNA レベルでの解析と比較しながら ES 細胞の特質を解析できた (Nagano K. et al, Proteomics 5, 1346-1361, 2005)。また、膜不透過型のタンパク質ビオチン標識試薬で処理することで ES 細胞の細胞膜表面に存在するタンパク質を選択的に標識してからショットガン解析し、未分化および分化過程にあるマウス ES 細胞表面タンパク質を同定した (Numomura K et al, Mol. Cell. Proteomics 12, 1968-1976, 2005)。

本研究では、未分化 ES 細胞のプロテオーム解析を徹底的に行って網羅性を高めるとともに、分化誘導後の細胞のタンパク質発現のダイナミクスを、安定同位体標識法 (SILAC 法: Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture) を利用して定量的に解析することで、それぞれの細胞系譜に時期特異的に発現するタンパク質セットを同定することを試みた。そのため、細胞全体を対象とした解析に加えて、細胞分画法によって調製した ES 細胞のクロマチン分画を対象とした解析を行った。さらに、レクチンカラムを利用して細胞膜などに内在する糖タンパク質を選択的に濃縮し、同定する方法 (IGOT 法) について検討した (Kaji H et al, Nat Protoc. 6, 3019-3027, 2007)。最後に本研究では、上記の方法で検出した未分化 ES 細胞に特徴的なタンパク質数種類について、プロテオミクス技術を利用した相互作用解析や細胞生物学的な方法による機能解析を行った。

4. 研究成果

①本研究では、まず始めにマウス ES 細胞を安定同位体で標識したアミノ酸 (^{13}C -Lys) を含む培地で培養することで、ES 細胞の形質を維持したまま細胞が合成するタンパク質

をまるごと代謝ラベルする実験系を確立した。またこの細胞を、培養液から白血病阻害因子 (LIF) を除去すると同時にレチノイン酸を加えて神経様細胞へと分化誘導することで、未分化状態から特定の細胞系譜へ向かってダイナミックに変動するプロテオームのダイナミクスをショットガン法による大規模プロテオーム解析法で定量的に解析した (図 1)。



図 1. 代謝標識法による ES プロテオームの大規模解析

その結果、細胞全体を構成するタンパク質約 3700 種類について、分化誘導前後での発現プロファイルの変動を定量的に解析できた (図 2)。未分化状態の ES 細胞には、細胞が未分化状態を維持するために不可欠な転写因子 Oct3/4 などのほか、これまでは機能が知られていない多くのタンパク質が特徴的に発現していることが確認された。一方、この解析で同定したタンパク質を細胞内局在に基づいて分類したところ、未分化状態の ES 細胞に特徴的なタンパク質の多くが核に局在することが明らかになった (図 3)。

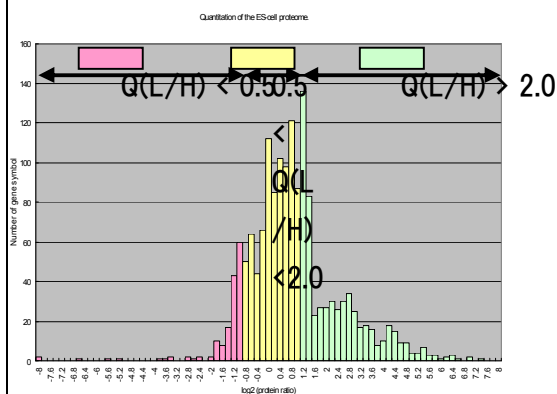


図 2. 分化誘導刺激による ES 細胞プロテオームの変動
分化誘導刺激によって 1/2 以下に減少 (ピンク)、2 倍以上に増加 (グリーン)、変動が観察されない (黄色) タンパク質

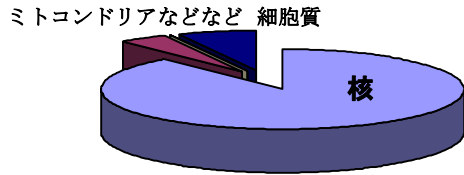


図3. 未分化ES細胞に特徴的なタンパク質の細胞内局在

そこで安定同位体標識した未分化/分化ES細胞から細胞分画法によりクロマチン結合タンパク質を調製し、ショットガン解析したところ、細胞全体の解析では検出できなかった約500種類のタンパク質の変動を新たに解析することができた。さらに本研究では、レクチンを利用して糖タンパク質を選択的に安定同位体で標識できるIGOT法を改良し、この方法が細胞膜などに内在する糖タンパク質の同定に有効であることを示した(Kaji H et al, Mol. Cell Proteomics 12, 2100-2109, 2007)。この方法は、ES細胞の細胞膜表面に存在する糖タンパク質の同定、すなわち非侵襲的バイオマーカー探索に有効と考えられたが、本研究の期間内には、この方法をES細胞研究に適用することはできなかった。

以上の研究の結果、ES細胞で発現するタンパク質4,000種類以上について、分化誘導刺激にともなう発現量の変動を定量的に解析した「ES細胞タンパク質カタログ」を作成することができた。

②本研究で作成した「ES細胞タンパク質カタログ」には未分化あるいは分化したES細胞に特徴的なタンパク質が数多く含まれていた。これらのタンパク質の中で、クロマチン分画に存在する未分化ES細胞特異的なタンパク質群は、エピジェネティックなクロマチン調節タンパク質として、ES細胞の未分化状態の維持や分化調節機構に関わる可能性が考えられた。そこで、これらの中から特に注目される機能未知のタンパク質10種類を選択し、エピトープタグを挿入した遺伝子をES細胞に挿入して細胞内局在を確認した。

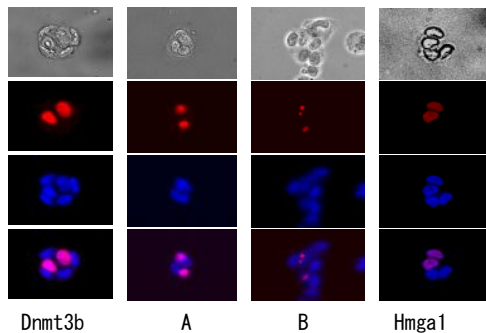


図4. 未分化ES細胞特異的なタンパク質の細胞内局在(一部)

また、これらの遺伝子を過剰発現あるいは逆にsiRNAによって発現抑制した時の表現型(フェノタイプ)を観察した。すなわち細胞の形態変化とOct3/4の発現をウェスタンブロット法で確認した。その結果、少なくとも2種類のタンパク質(A, B)がES細胞の未分化状態の維持に関わっていることが推定された。これらのタンパク質はいずれも「Pumilioドメイン」をもつRNA結合タンパク質として知られていたが、その細胞機能の詳細は不明であった。そこで、エピトープタグを利用してES細胞からタンパク質AあるいはBを含む複合体を分離精製し、それらのタンパク質成分をショットガン法で同定したところ、多種類のリボソームタンパク質とともに、合成過程にあるリボソーム先駆体に含まれるトランス因子が多数検出された。したがって、タンパク質A, Bはいずれもリボソーム先駆体の構成成分としてその生合成に関わるタンパク質因子と推定された。

③未分化ES細胞に特徴的なタンパク質についてさらに詳細な解析を進めるため、これらのタンパク質発現を人為的に制御できるES細胞株を作成した。未分化-分化間のES細胞の変化にこれらのタンパク質が関わっているものであれば、人為的にその発現を維持することによって未分化状態を維持できる可能性がある。細胞株の作成にはROSA-TET system (Masui S. et al. Nucleic Acids Research, 33, e43, 2005)を用いた。このシステムはE14ES細胞株のrosa26遺伝子部分に目的遺伝子を置換する形で挿入し、培地中にテトラサイクリンが存在するときは発現が抑制され、テトラサイクリンを除去すると発現が誘導される。

このシステムを用いて構築したES細胞株をLIF存在下で培養した。次に、LIF存在下あるいは非存在でレンチニン酸刺激して分化誘導し、同時に培養液からテトラサイクリンを除去して挿入した遺伝子の発現を誘導したところ、タンパク質A, Bの2種類に特異的に細胞死が誘導されることがわかった。また、この細胞死がアポトーシスであることをCaspaseの活性化とDNAの断片化により確認した。一方本研究で見出した未分化ES細胞に特徴的な他のタンパク質(Jmjd1a, Jarid2)を挿入した細胞株や、細胞の代謝に直接関与しない遺伝子(ハイグロマイシン耐性遺伝子)を挿入した細胞株では同様な現象は観察されなかった。このことからタンパク質A, Bの発現はES細胞の分化過程で厳密に調節されているものと推定された。

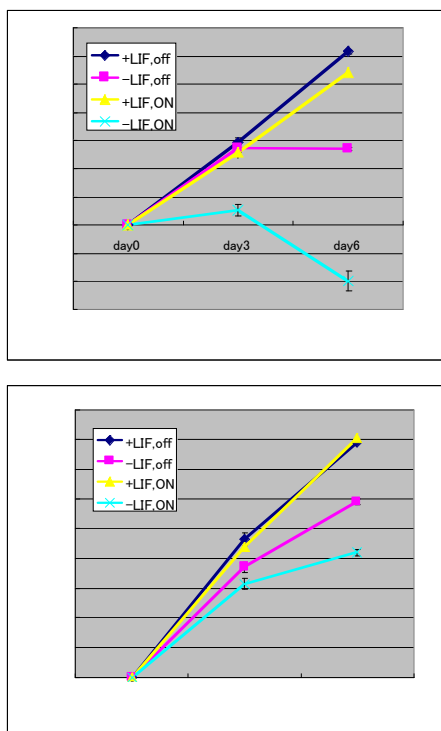


図4. ES細胞に対するタンパク質A(上)とJmjd1a(下)の発現誘導の影響

本研究および関連する分野の研究から、タンパク質 A、B はいずれもリボソーム生合成の初期過程に重要な rRNA のプロセッシングに関与する因子と推定された。また実際に、LIF 非存在下でタンパク質 A の発現を誘導した後に細胞の rRNA を調べてみると、rRNA 先駆体である 47S/45S rRNA の減少が観察された。この結果は、ES 細胞の分化過程でリボソーム合成が厳密に制御されていることを示唆するものであるが、その生物学的な意味や分子機構の詳細については更に詳しい研究が必要と考えられた。

〔まとめ〕本研究では、マウス ES 細胞を安定同位体で標識したアミノ酸 (^{13}C -Lys) を含む培地で培養することで、ES 細胞の形質を維持したまま細胞が合成するタンパク質をまるごと代謝ラベルできる実験系を確立した。また、この同位体標識マウス ES 細胞をレチノイン酸刺激によって分化誘導した際に観察されるプロテオームの変動を最新のプロテオミクス技術によって大規模に解析した。その結果、マウス ES 細胞に存在する約 4,000 種類のタンパク質を同定するとともに、分化誘導刺激によるその変動を定量的に解析することができた。この中には ES 細胞が未分化状態を維持するために必要とされている Oct3/4 や Sox2 などのタンパク質が含まれていた。また、未分化状態に特徴的な

タンパク質の多くは核に局在する因子であることがわかった。ES 細胞のプロテオームを解析した以前の研究 (Nunomura K, et al, Mol. Cell Proteomics 12, 1968-1976, 2005) や本研究の結果から、未分化状態を維持している ES 細胞が既に神経や血球系細胞などを特徴付ける分化マーカーとして知られている複数のタンパク質を発現しているが明らかになった。このことは、未分化の ES 細胞がすでに多様な細胞へ分化するためのタンパク質セットを準備しており、この中から分化誘導刺激に依存したセットを選択することで特定の細胞系譜に分化することを示唆していた。一方、本研究では、未分化 ES 細胞に特徴的なタンパク質セットから従来 ES 細胞での機能が知られていないタンパク質約 10 種類を選び、その細胞機能解析を試みた。テトラサイクリンの有無によって、これらの遺伝子の発現を制御できる ES 細胞株を作成し、分化誘導刺激を加えた際の表現型などを観察したところ、2 種類のタンパク質が特異的に ES 細胞のアポトーシスを誘導することがわかった。これらのタンパク質はいずれも Pumilio ドメインをもつ RNA 結合タンパク質であり、細胞のリボソーム生合成初期の rRNA 修飾などに関わるトランス因子であることから、ES 細胞の分化調節にリボソーム合成系の制御が関わっていることが推定されたが、その詳細については今後の課題となった。

最後に、本研究の成果は、未分化および分化過程にある ES 細胞に発現する機能性タンパク質に関する基礎生物学的な研究や、ES 細胞の未分化状態の維持と多分化能ならびに分化を規定する分子機構を規定する分子機構に関して重要な知見をもたらすとともに、既に行われている mRNA レベルでの大規模な発現解析に相補的な ES 細胞のタンパク質カタログとして、ES 細胞の特性を解析するさまざまな研究の基盤となることが期待される。また、本研究で同定されたタンパク質群は、特定の刺激や環境因子によって ES 細胞や iPS 細胞から誘導される細胞系譜や組織を同定するための非浸襲のバイオマーカーあるいは分化の方向を制御するための標的分子として、移植医療や再生医療の発展に寄与することが期待される。

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)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- ① Nagano K, Yoshida Y, Isobe T. Cell surface biomarkers of embryonic stem cells. Proteomics 8, 4025-4035 (2008) 査読有
- ② Kaji H, Isobe T. Liquid chromatography

/mass spectrometry-based glycoproteomics technologies for cancer biomarker discovery. *Clinical Proteomics* DOI 10.1007/s12014-008-9004-1 (2008) 査読有

③Hayano T, Yamauchi Y, Asano K, Tsujimura T, Hashimoto S, Isobe T, Takahashi N. Automated SPR-LC-MS/MS system for protein interaction analysis. *J. Proteome Res.* 9, 4183-4190 (2008) 査読有

④ Izumikawa K, Yanagida M, Hayano T, Tachikawa H, Komatsu W, Shimamoto A, Futami K, Furuichi Y, Shinkawa T, Yamauchi Y, Isobe T, Takahashi N. Association of human DNA helicase RecQ5beta with RNA polymerase II and its possible role in transcription. *Biochem. J.*, 413, 505-516 (2008) 査読有

⑤Kaji H, Kamiie J, Kawakami H, Kido K, Yamauchi T, Shinkawa T, Taoka M, Takahashi N, Isobe T. Proteomics reveals N-linked glycoprotein diversity in *Caenorhabditis elegans* and suggests an atypical translocation mechanism for integral membrane proteins. *Mol. Cell Proteomics* 2100-2109 (2007) 査読有

⑥Kaji H, Yamauchi Y, Takahashi N, Isobe T. Mass spectrometric identification of N-linked glycopeptides using lectin-mediated affinity capture and glycosylation site-specific stable isotope tagging. *Nature Protocols* 1, 3019-3027 (2006) 査読有

[学会発表] (計6件)

①吉田陽子、鷲田元久、新川高志、谷知美、山内芳雄、磯辺俊明、代謝標識法を用いたマウス ES 細胞クロマチン結合タンパク質の大規模プロテオーム解析, 第8回日本蛋白質科学会年会, 東京, 2008. 6. 10.

②Yoshikawa H, Kawasaki M, Komatsu W, Yanagida M, Hayano T, Izumikawa K, Ishikawa H, Shinkawa T, Yamauchi Y, Isobe T, Takahashi N. "Proteomic analysis of proteins associated with splicing factor-2 associated protein p32 revealed its possible involvement in human ribosome biogenesis." 2nd Pacific Rim Intern. Conf. on Protein Science (PRICPS) and 5th AOHUPO, Cairns, Australia, 2008. 6.

③梶裕之、磯辺俊明、成松久, 腫瘍バイオマーカー探索のためのグライコプロテオーム解析法, 日本ヒトプロテオーム機構第6回大会, 大阪, 2008. 7.

④吉田陽子、鷲田元久、新川高志、清水祐亮、山内芳雄、磯辺俊明、代謝標識法を用いたマウス ES 細胞分化過程の大規模プロテオーム解析, 第5回日本ヒトプロテオーム

機構大会, 東京, 2007. 7.

⑤磯辺俊明「プロテオミクス: タンパク質大規模解析からのアプローチ」日本電気泳動学会シンポジウム, 横浜, 2007. 6.

⑥梶裕之、佐々木明子、山内芳雄、新川高志、磯辺俊明、N型糖タンパク質の大規模同定と変動解析法の開発, 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 2006. 4.

[図書] (計3件)

①Takahashi N, Isobe T. *Proteomic Biology using LC-MS: Large-scale Analysis of Cellular Dynamics and Function*. Wiley-Interscience, pp. 254 (2007)

②磯辺俊明、中山敬一、伊藤隆司(編) 分子間相互作用解析ハンドブック 羊土社 pp. 286 (2007)

③磯辺俊明、高橋信弘(編) プロテオミクスの細胞機能解析への挑戦 細胞工学 pp. 130、(2006)

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称 糖ペプチドの糖鎖結合部位特定方法

発明者 梶裕之、山内芳雄、磯辺俊明

権利者 同上

種類 特許

番号 特許第4220257号

取得年月日 平20.11.21

国内外の別 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.sci.metro-u.ac.jp/proteomicslab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯辺俊明 (ISOBE TOSHIAKI)

首都大学東京・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 70106607

(2) 研究分担者

高橋 信弘 (TAKAHASHI NOBUHIRO)

東京農工大学・共生科学技術研究院・教授
研究者番号: 80293017

(3) 連携研究者

梶裕之 (KAJI HIROYUKI)

(独) 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・主任研究員

研究者番号: 80214302

田岡 万悟 (TAOKA MASATO)

首都大学東京・大学院理工学研究科・助教
研究者番号: 80293017

吉田 陽子 (YOSHIDA YOKO)

首都大学東京・大学院理工学研究科・特任助教

研究者番号: 00379661