科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号: 11301

研究種目: 挑戦的萌芽研究 研究期間: 2013~2014

課題番号: 25670156

研究課題名(和文)質的量的変動を指標とする細胞分化制御転写因子・クロマチン因子の網羅的同定法の開発

研究課題名(英文)Profiling of proteins associated with cell differentiation based on changes in relative abundance and post-translational modification.

研究代表者

五十嵐 和彦(IGARASHI, KAZUHIKO)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号:00250738

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): 細胞分化の制御の根幹は転写因子やクロマチン因子が担うことが明らかになっているが、これらタンパク質は存在量が微量であることから解析が困難であり、例えば1,000種以上あるとされる転写因子の中で、機能解析の対象となっているのはそのごく一部である。本研究では、質量分析法により、分化前後の核内に存在するタンパク質量や翻訳後修飾の相対定量比較を行い、制御因子候補を同定する技術を開発した。Bリンパ球と形質細胞をモデルとして、核質やクロマチン結合因子の相対定量を試みた。その結果、既知制御因子の変化を確認でき、さらに新規制御因子候補を多数特定できた。

研究成果の概要(英文): Cell differentiation is mainly regulated by a concerted action of transcription factors and chromatin factors. Since these categories of proteins are relatively scarce in their amounts, identification of critical regulators has been challenging. In this project, we have tried to use mass spectrometry to compare relative levels of nuclear and chromatin proteins between B lymphoid cells and plasma cells. We also tried to compare post-translational modifications of proteins. The reproducibility of the protocols we established was confirmed via many rounds of repetition. The feasibility of the protocols were confirmed by comparing known regulators of B cells and plasma cells, such as Pax5, Bach2 and Irf4. We found several, uncharacterized transcription factors and chromatin factors whose expression was much higher in plasma cells. We are now carrying out functional analyses of these proteins.

研究分野: 医歯薬学

キーワード: 細胞分化 転写因子 クロマチン 質量分析

1.研究開始当初の背景

細胞分化の本質は、単一のゲノムから多 様な遺伝子発現状態をつくり出し、その固 有の状態を安定に維持することである。こ れまでの内外の研究から、DNA 結合型転写 因子が遺伝子それぞれの時間・空間軸に沿 った発現パターンを規定すること、この際、 クロマチン構造が転写因子のアクセスを制 限したり、逆に転写因子がクロマチン構造 制御因子をリクルートすることによりクロ マチン構造を変換するという概念が確立し てきた。iPS 細胞誘導に使われる 4 山中因 子は全て転写因子であることからも、細胞 分化や発生における転写因子の中心的な役 割は明確に示されている。一方、環境変化 に対する応答(例えば酸化ストレス応答) では、一定の遺伝子群が誘導されて適応す るとともに、環境変化が元に戻れば遺伝子 発現も基底状態に戻っていく。この環境応 答でも、転写因子が制御の根幹を担う。

このような転写因子により制御されるゲ ノムシステムの全貌を理解する上で、見過 ごされていると申請者が考える問題は、転 写因子の多様性である。マウスでは実に 2.348 ヶの転写因子の存在が推定されてい る。すなわち、ゲノムはそのコーディング キャパシティーの 1/10 程度を転写因子に 割り当て、多彩な遺伝子発現パターンをつ くり出していることが予想される。しかし、 この多様な転写因子の中で、生理的機能が 明らかになっているものはごく一部である。 多くの研究者の関心は、p53 や GATA-1、山 中因子など、有名な転写因子に集中してい るのが現状である。クロマチン制御因子に ついても、機能解析の対象になっているの はその一部のみである。

2.研究の目的

本研究では、細胞分化に関わる転写因子とクロマチン制御因子の候補を、超高感度質量分析器を用いた差分解析によりカタログ化することを行う。そして、今後の機能解析研究の基盤とする。対象とする細胞は、申請者らが長年研究対象としてきたBリンパ球・形質細胞の分化系とする。マウスの正常Bリンパ球および形質細胞の核内因子を同定し、それらの発現量の相対比較を行う。そして、形質細胞分化とともに上昇する、逆に減少する転写因子やクロマチン制御因子を特定する。また、分化前後でタンパク質量でないが翻訳後修飾(リン酸化、アセ

チル化、メチル化など)が変動するものも 特定する。興味深い機能未知の因子の一部 について、ノックダウン実験等により機能 検証を行い、この研究戦略の有効性を示す。

3.研究の方法

細胞分化に伴って変動するクロマチン構 成因子を、定性的および定量的な質量分析 によって解析する方法を確立する。異なる 分化段階の細胞から核抽出タンパク質(ゆ るく DNA に結合していると考えられ、転 写因子を含む、およびクロマチンタンパク 質を分離し、それぞれをプロテアーゼによ ってペプチド断片化したものを LC-MS/MS で分析する。データベース検索によりタン パク質同定を行い、各々に含まれるタンパ ク質のリストを作る。二つのリストを比較 して一方でのみ検出されたタンパク質を抽 出することで、転写因子を含む核内因子や クロマチン構成因子変化の定性的な情報を 得る。さらに、定量比較や翻訳後修飾の測 定行い、分化とともに量や質が変動する転 写因子とクロマチン因子を同定し、機能解 析研究の基盤としていく。

4. 研究成果

Bリンパ球株と形質細胞株を用いて、Bリンパ球から形質細胞へと分化する過程のタンパク質の量および翻訳後修飾を例として取りあげた。これら細胞を安定同位体標識アミノ酸存在下で長期間培養することで、タンパク質をそれぞれ特異的同位体で標識した細胞を用意した。ここから核を単離し、低塩濃度で抽出される核可溶性分画とクロマチン分画を調整した。二つの細胞から調整したものをそれぞれ等量混合した後にSDS-PAGEで分離し、移動度に従って12分

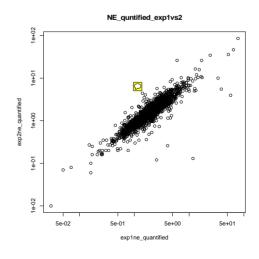


図1 二回の実験結果の比較

画にさらに分けた。定法にしたがって処理し、 LC-MS/MS 解析を実施した。核抽出液でもクロマチン抽出液でも 3000 種を越えるタンパク質の相対定量に成功し、再現性も高いことを確認した(図1)。転写因子を多数定量できたことから、感度も十分に高い。

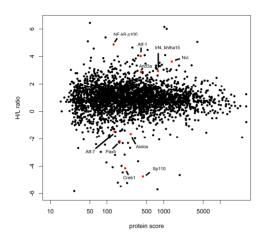


図 2 クロマチン分画でのタンパク質量の比較 赤丸は B リンパ球や形質細胞での機能が報告されているもの

この実験結果から、形質細胞分化に関わる ことが予想されるクロマチン因子をいくつ か特定した(図2)。B リンパ球や形質細胞で の機能が報告されている因子に着目してみ ると、例えば Pax5 は B リンパ球で発現が高 く形質細胞で発現が低下することが知られ ているが、これと合致するタンパク質量変動 を見いだすことができた。逆に Irf4 の発現は 形質細胞分化とともに上昇していくことが 知られているが、この定量解析でも予想通り の測定結果となった。このことから、細胞間 や分化段階の比較をする上で有効な手法を 確立できたと判断した。形質細胞でよりタン パク質レベルの高いクロマチン関連因子を 抽出し、それらの文献的考察を行い、機能未 知のものについて、コンディショナルノック アウトマウスの作製を進めた。形質細胞分化 における機能は本研究の計画外ではあるが、 アプローチの有効性を示すためにさらに解 析を進めている。

また、転写因子 Bach2 がリン酸化を受けることを確定し(図3)、そのリン酸化部位の特定を進めた。上記実験で確立した相対定量の系を用いることで、B 細胞では Bach2 の 72 カ所のセリン、スレオニン残基がリン酸化されることを見いだした。さらにこの中の一カ

所が機能制御に必須であることも証明した (投稿中)。

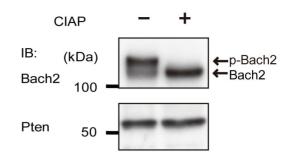


図3 Bach2 のリン酸化

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 4件)

武藤哲彦、Bach2 の発現量が活性化 B 細胞の運命を決定する、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

島弘季、形質細胞分化の誘導・維持に関 わる転写因子とクロマチン制御因子の定 量的質量分析による同定、第37回日本分 子生物学会年会、2014年11月26日、パ シフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 玉原亨、Transcriptional Factor Bach2 is regulated by PI3K-mTOR pathway and promotes cell cycle arrest、第 37 回日本 分子生物学会年会、2014年11月26日、 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 武藤哲彦、Bach2 and HDAC3 repress Blimp-1 gene expression in B cells through the histone deacetylation, Cold Spring Harbor Asia Conference: Frontiers of Immunology in Health and Diseases、2014年9月3日、蘇州(中国)

[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: 種号: 番号: 田内外の別:

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

http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

五十嵐 和彦(IGARASHI, Kazuhiko) 東北大学・大学院医学系研究科・教授 研究者番号:00250738

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

島 弘季(SHIMA, Hiroki)

東北大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号: 00448268