

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、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 ケ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およびクロマチン結合因子を同定し、さらに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には変化がないが翻訳後修飾（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、ロ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を行い、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

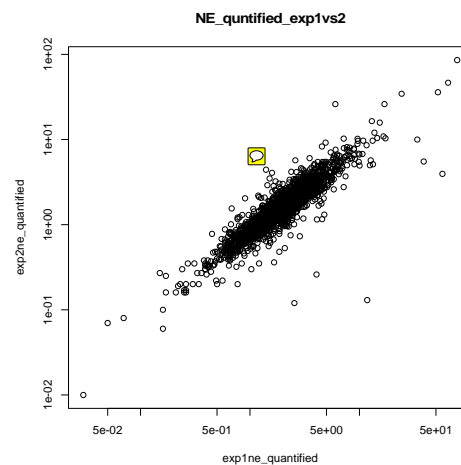


図 1 二回の実験結果の比較

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