

平成19年2月

# 黒崎 創 学位論文審査要旨

主 査 佐 藤 建 三

副主査 西連寺 剛

同 押 村 光 雄

## 主論文

A comparison study in the proteomic signatures of multipotent germline stem cells, embryonic stem cells and germline stem cells

(多能性をもつ精子幹細胞、ES細胞及び精子幹細胞におけるプロテオーム比較解析)

(著者：黒崎創、香月康宏、平塚正治、井上敏昭、松居靖久、Chi Chiu Wang、篠原美都、篠原隆司、戸田年総、押村光雄)

平成19年2月 Biochemical and Biophysical Research Communications

9巻 259頁～267頁

# 学 位 論 文 要 旨

## A comparison study in the proteomic signatures of multipotent germline stem cells, embryonic stem cells and germline stem cells

### (多能性をもつ精子幹細胞、ES細胞及び精子幹細胞におけるプロテオーム比較解析)

生殖系列細胞は多能性の細胞を生じる能力があることが知られている。マウスの精巣から樹立された精子幹細胞 (Germline stem cell: GS細胞) は生殖系列にのみ分化できる細胞である。一方多能性の精子幹細胞 (Multipotent germline stem cell: mGS細胞) はGS細胞から偶発的に樹立され、様々な体細胞や組織に分化することができES様のポテンシャルをもつことが知られている。本研究ではmGS細胞における分化能の特徴をプロテオーム (タンパク質群) の発現パターンを調べることで評価することを目的とし、GS、mGS及びES細胞におけるプロテオームを二次元電気泳動法により比較した。26個の発現パターンが異なるタンパク群が検出され、またこのタンパク群をMS解析により同定した。さらにこれらのタンパクの発現レベルを多分化能をもつ胚性生殖細胞 (Embryonic germline cell: EG cell) 及び胚性癌細胞 (Embryonal carcinoma cell: EC cell) についても調べた。

### 方 法

細胞株はGS細胞3種、mGS細胞2種、ES細胞3種、EG細胞4種及びEC細胞2種を用いた。それぞれの細胞株についてタンパク抽出し、二次元電気泳動を行った。タンパクを一次元目はpH 勾配ゲルを用い等電点により分離し、二次元目はSDS-PAGEにより分子量により分離を行った。泳動後のゲルをRuby蛍光染色し、染色像はBIO-RADのImagerによりスキャンした。それぞれの二次元電気泳動像におけるスポットの比較と蛍光強度の測定はPDQuestソフトを用いて行った。候補タンパクを切り出し、ゲル内トリプシン消化後抽出した。個々のタンパクのペプチド断片をMALDI-TOF MSを用いて検出した。候補タンパクをMascotのMSデータベース上にて検索同定を行った。

### 結 果

GS、mGS及びESとのプロテオーム比較解析の結果、二次元電気泳動ゲルにおいて1000個以上のタンパクスポットが確認できた。GSとmGSとの比較により全スポットの中から26個の発現量が違うスポットが検出できた。mGSで発現が減少しているものが10個、増加しているものが16個であった。mGSで発現増加、減少しているスポットはほとんどがESにおいても同様

にそれぞれの発現が増加、減少していたが1スポットだけはmGSよりも低い発現量であり、GSにおける発現量と似ていることがわかった。

26個のタンパクをMALDI-TOF MSを用いて解析し同定を行った結果、様々な機能をもつタンパクが同定された。解析結果をもとに遺伝子機能を分類するとプロテインフォールディングやプロテアソームに関わるものが26.9%、代謝に関わるものが38.5%、タンパク輸送に関わるものが7.7%、転写制御因子が11.5%、シグナル伝達分子が15.4%であった。

これらのタンパクが生殖細胞系に特異的なものなのか、あるいは幹細胞の多分化能を特徴付けるものなのかを明らかにするために、多能性をもつEG細胞とEC細胞における26個のタンパク発現をGS細胞のパターンと比べた。mGSとESにおいて発現減少していた10個のタンパクは全てEG細胞とEC細胞においても減少していることがわかった。またmGSとESにおいて発現増加していたタンパクはほとんどがEG細胞やEC細胞でも発現増加傾向を示していた。

## 考 察

mGS細胞の発現プロテオームはGS細胞のそれに比べES細胞のパターンと非常によく似ていたことから得られたタンパク発現差が直接的あるいは間接的に幹細胞の多分化能に関わっていることが考えられた。

今後、同定により得られた候補遺伝子リストの機能を調べることはmGSや未分化の幹細胞の同定あるいは単離に役立つと考えられる。