

平成 26 年度分担研究報告

プロテオミクスを用いたヒト iPS 細胞由来心筋の細胞株間差の調査

業務主任者 永森 收志

国立大学法人 大阪大学

大学院医学系研究科 生体システム薬理学 准教授

本業務項目は、網羅的定量質量分析法を用いて、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株の電気的性質を規定している膜イオン輸送に関わるタンパク質発現の細胞株間差を定量化することを目的とする。本研究計画の全期間を通じて、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の質の向上が遅れているところを、プロテオミクス技術を開発することにより、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株を利用した心毒性評価の実用化に貢献することを目指す。

本年度は、心筋マーカーの比較定量解析を行うための予備検討として、マウス培養心筋細胞 HL-1 細胞、未分化 iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて網羅的質量分析を行った。その結果、HL-1 細胞で 18,921 個のペプチドと 2,871 種のタンパク質を、未分化 iPS 細胞において 29,961 個のペプチドと 3,905 種のタンパク質を同定した。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞では 2,213 種類のタンパク質と 15,786 個のペプチドが同定できた。さらに、心筋マーカーであるイオンチャネルを安定発現させた CHO 細胞を用いて、比較定量解析に必要なペプチド情報の取得を進めた。

A. 研究目的

本分担研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株ごとの心筋マーカーを定量解析し、in silico (インシリコ) でヒト心筋細胞のシミュレーションするための基盤データを取得することである。網羅的定量質量分析法を用いて、複数のヒト iPS 心筋細胞

株に対して心筋マーカーの比較定量解析を行うことで、細胞特性のばらつきを明らかにする。さらに主要なヒト心筋マーカーに対する絶対定量を行うことで、ヒト心筋マーカーの絶対的な分子数を取得し、シミュレーションの精度・信頼性の向上を目指す。

B. 研究方法

心筋マーカーとなる膜タンパク質の比較定量解析系の構築を目指し、質量分析計を用いた膜タンパク質の網羅的解析系の確立を試みた。マウス培養心筋細胞 HL-1 細胞、ヒト未分化 iPS 細胞または iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、細胞膜に富んだ粗膜画分を調製した。更に細胞膜を濃縮する為に膜画分を尿素で洗浄し、sodium deoxycholate (SDC) で膜タンパク質を可溶化した。可溶化した膜タンパク質は TCEP を用いて還元し、iodoacetamide (IAA) を用いてアルキル化した後、0.1 M Triethylammonium bicarbonate (TEAB, pH 8.5) 条件下でトリプシンによるペプチド化を行った。Phase-Transfer Surfactant (PTS) 法を用いて SDC の除去を行った後、同定数向上を目的として、微量サンプルでもサンプルロスの少ないチップ型の逆相カラム (Stage-Tip-SDB) を用いて、高 pH 条件で簡易分画を行った。得られたペプチドに対して、質量分析計 Thermo Q Exactive (ベンチップ型四重極 Orbitrap) に ナノ LC Michrom Bioresources Advance UHPLC を接続した nano LC-MS/MS システムを用いてショットガンプロテオーム解析を行った。分析メソッドは 100 分間の直線グラジエント (5% から 40% アセトニトリル) を使用し、分析カラムは日京テクノス社製の C18 キャピラリーカラムを使用し

た。タンパク質配列解析は、解析ソフトウェア Thermo Proteome Discoverer 1.4 をプラットフォームとしたデータベース検索アルゴリズム Matrix Science Mascot 2.4 を用いて行った。解析の対象とするタンパク質配列は UniProt データベース (<http://www.uniprot.org>) に登録されている配列を用いた。得られた解析データは信頼性を高める為、偽陽性ヒット率 False Discovery Rate (FDR) <1% となるように Proteome Discoverer でフィルタリングを行い、最終的な解析結果とした。

質量分析計を用いた高精度の比較定量解析には、標的プロテオミクス法の利用が必要となる。現在、標的プロテオミクス法にはプレカーサーイオン測定法である Selected Ion Monitoring (SIM) 法、あるいはプロダクトイオン測定法である Parallel Reaction Monitoring (PRM) 法などが利用されているが、いずれの方法も測定の際には標的となるペプチドの質量 (m/z) 情報が必須である。マウス培養心筋細胞、ヒト未分化 iPS 細胞または iPS 細胞由来心筋細胞サンプルでは検出できなかった心筋マーカー膜タンパク質については、既に確立した心筋マーカー安定発現細胞株を用いて網羅的解析を行い、比較定量解析に必要な目的分子由来のペプチドの質量情報の取得を試みた。

C. 研究結果

HEK293 細胞などの他の細胞で既に確立している質量分析計による網羅的解析系を用いて、マウス培養心筋細胞への応用を検討した。100 分間の直線グラジエントを含む 120 分間の LC-MS 測定で得られた目的サンプルのマスペクトルは、他の細胞サンプルのマスペクトルと比較しても同等以上のシグナル強度であった。また、Stage-Tip-SDB によって 4 分画されたサンプルは、それぞれの画分で同程度のシグナル強度であり、ほぼ均等に分布していることから、分画条件に問題ない事を確認した(図 1)。データ解析の結果、マウス培養心筋細胞で 2,871 種類のタンパク質と 18,921 個のペプチドが同定できた(表 1)。得られた同定数は HEK 293 細胞などの他の培養細胞由来のサンプルと比べても十分な数であり、膜タンパク質の網羅的解析系のマウス培養心筋細胞への適用が可能と判断できた。続いて、比較的サンプル量の確保が容易な未分化 iPS 細胞に対する、網羅的解析系の適用を検討した(図 2)。再現性確認の為、分析を 3 回行ったところ、平均で 3,423 種類のタンパク質と 23,331 個のペプチドが同定でき、3 回の分析を合わせると、3,905 種類のタンパク質と 29,961 個のペプチドが同定された(表 1)。ヒト iPS 細胞でも膜タンパク質の網羅的解析系の適用が問題ないことから、ヒ

ト iPS 細胞由来心筋細胞での検討を行った(図 3)。その結果、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞では 2,213 種類のタンパク質と 15,786 個のペプチドが同定できた(表 1)。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞での質量分析計を用いた膜タンパク質の網羅的解析系が確立できた。

ヒト未分化 iPS 細胞または iPS 細胞由来心筋細胞で同定されたタンパク質の中には、心筋マーカーとなる膜タンパク質も含まれていた(表 2)。しかしながら、前述の膜タンパク質網羅的解析系では検出できなかった、もしくは定量解析に用いるために十分なペプチド情報を取得できなかった心筋マーカーも存在していた。そこで、取得したペプチド情報が不足している複数の重要分子を中心に、東京医科歯科大学で調製した心筋マーカー安定発現細胞株や強制発現細胞を用いて、確立した方法に則り質量分析解析を行った。その結果、全ての心筋マーカー安定発現株から、強制発現させた対象分子(SCN5A、CACNA1C、KCNQ1、KCNH2、KCND3、KCNIP2)が検出でき、定量解析に必要な心筋マーカー膜タンパク質由来のペプチドの質量情報が取得できた(表 3)。

D. 考察

他の培養細胞や動物臓器を対象として行った分析同様のペプチド及びタンパク質の同定数が得られ

たことから、分担研究者らが開発してきた膜タンパク質の網羅的定量質量分析法は、マウス培養心筋細胞、未分化iPS細胞やヒトiPS細胞由来心筋細胞のサンプルに、適応可能であると考えられた。しかしながら、一般的な培養細胞を解析する際に必要な細胞数をヒト iPS 細胞由来心筋細胞で取得することは容易でないため、今後使用する細胞数の削減が可能なサンプル調製方法の開発が求められる。

実際、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の網羅的解析ではマウス培養心筋細胞やヒト iPS 細胞を解析した場合と比べてタンパク質同定数が少ないが、これは準備できたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の膜画分が微量であったためと推測される。そのため、網羅的解析での検出を目指した心筋マーカーの一部が検出不可能であった。しかしながら、今後は本年度の解析によって収集したペプチド情報を利用することで、より高感度な測定である標的プロテオミクス法の適応が可能になり、本年度行った網羅的解析では検出できなかった心筋マーカータンパク質を定量することが可能になると考えられる。

E. 結論

マウス培養心筋細胞、未分化 iPS 細胞さらにヒト iPS 細胞由来心筋細胞の質量分析に成功したことで、次年度に計画している複数のヒト iPS 心筋細胞株に対しての心筋マーカー比較定量解析が可能になった。さらに、心筋マーカー膜タンパク質由来のペプチドの質量情報が得られたことから、これらのマーカータンパク質の絶対定量系の構築も実現可能になった。

G. 研究発表論文

特になし

学会発表

1. 藤塚美紀、中井雄治、諫田泰成、永森收志、金井好克、古川哲史、黒川洵子：Effects of substrate elasticity on gene expression profiles of human iPS-derived cardiomyocytes、CBI学会2014年大会、(2014,10,東京)

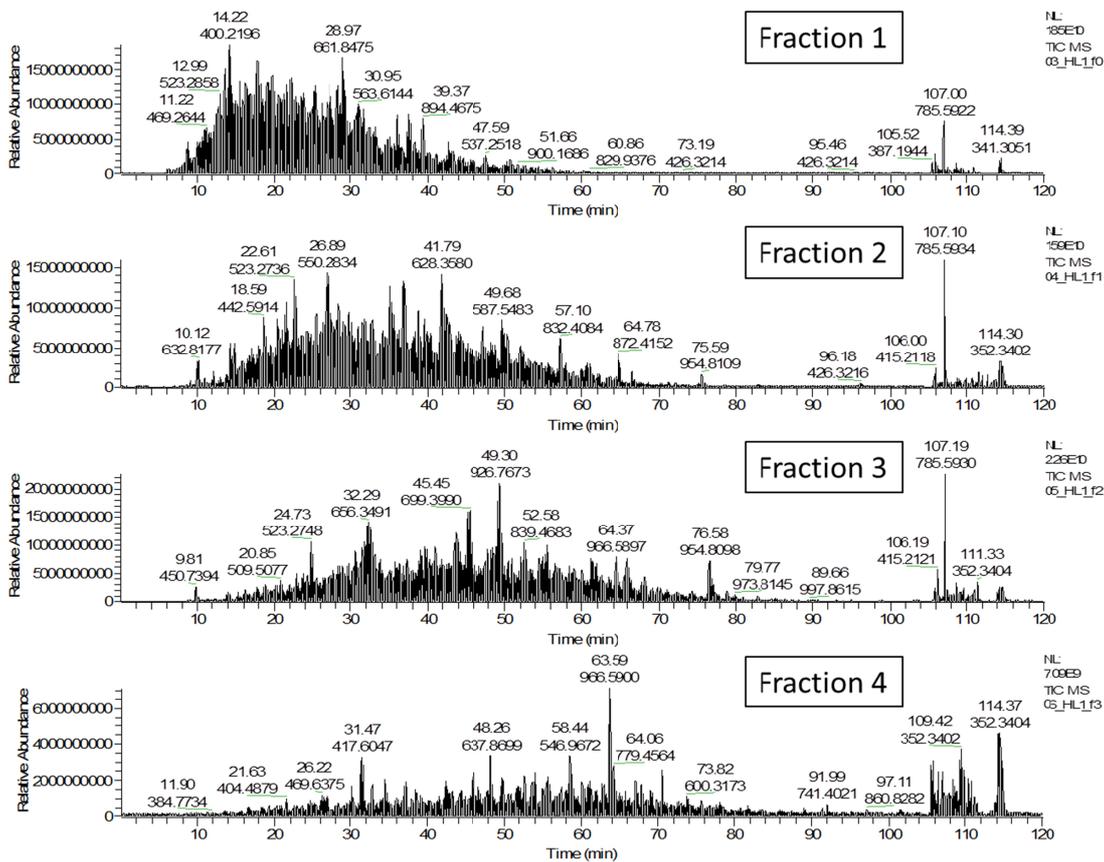


図 1 : マウス培養心筋細胞サンプルのマススペクトル .

マウス培養心筋細胞の膜画分は膜濃縮後、還元・アルキル化され、トリプシンによるペプチド化を行った。ペプチド化したサンプルはStage-Tip-SDBで4分画 (Fraction 1 - 4) した後、LC-MS/MS解析を行った。測定時間は120分間、分析メソッドには100分間の直線グラジエント (5%から40%アセトニトリル) を使用した。分析カラムはC18キャピラリーカラムを使用した。スペクトルは保持時間に対するシグナル強度を相対値で示し、スペクトル上のラベルは保持時間 (上段) と m/z (下段) を表す。

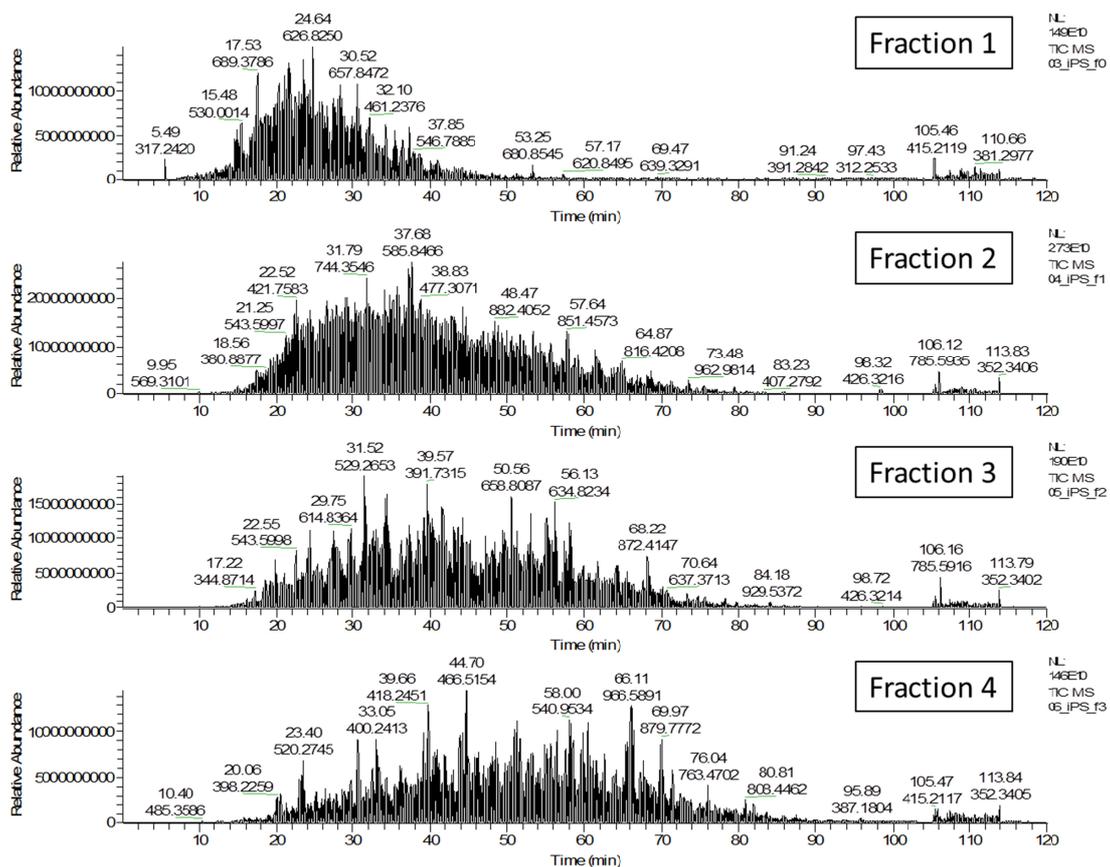


図 2 : ヒト未分化 iPS 細胞サンプルのマススペクトル .

ヒト未分化iPS細胞の膜画分は膜濃縮後、還元・アルキル化され、トリプシンによるペプチド化を行った。ペプチド化したサンプルはStage-Tip-SDBで4分画 (Fraction 1 - 4) した後、LC-MS/MS解析を行った。測定時間は120分間、分析メソッドには100分間の直線グラジエント (5%から40%アセトニトリル) を使用した。分析カラムはC18キャピラリーカラムを使用した。スペクトルは保持時間に対するシグナル強度を相対値で示し、スペクトル上のラベルは保持時間 (上段) と m/z (下段) を表す。

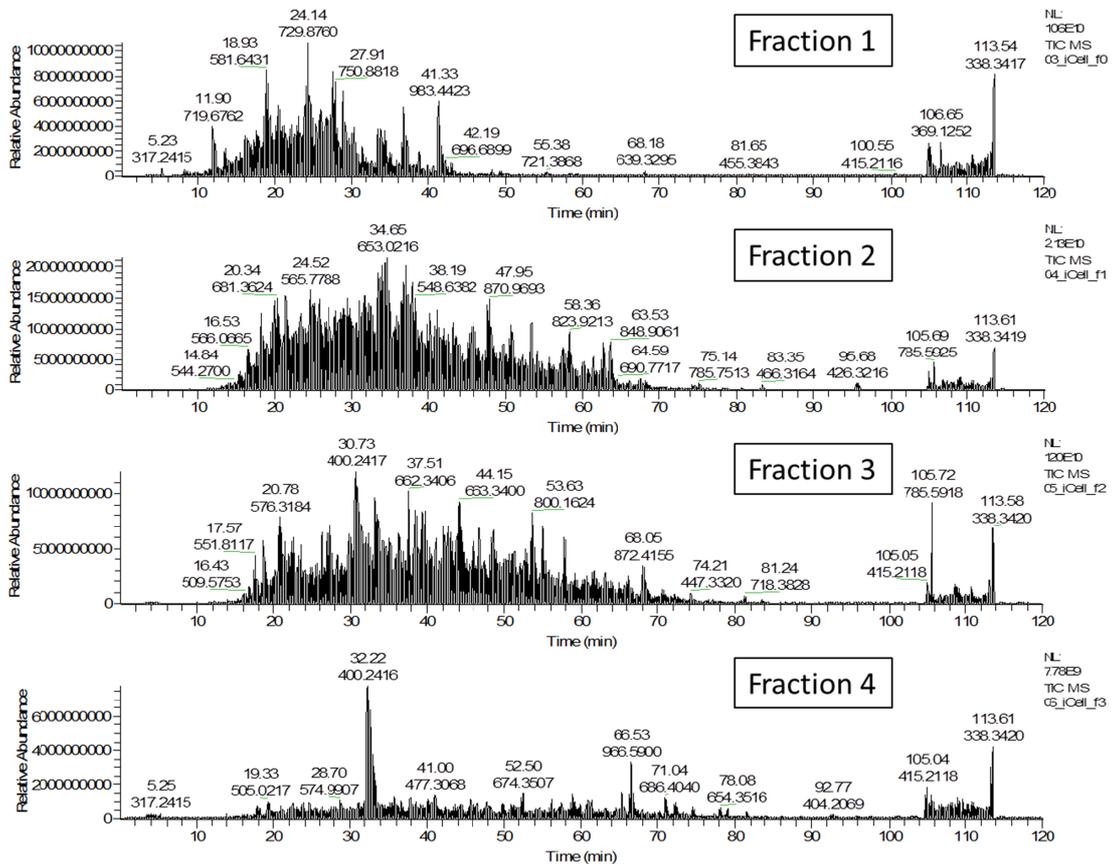


図3：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞サンプルのマススペクトル。

ヒトiPS細胞由来心筋細胞の膜画分は膜濃縮後、還元・アルキル化され、トリプシンによるペプチド化を行った。ペプチド化したサンプルはStage-Tip-SDBで4分画 (Fraction 1 - 4) した後、LC-MS/MS解析を行った。測定時間は120分間、分析メソッドには100分間の直線グラジエント (5%から40%アセトニトリル) を使用した。分析カラムはC18キャピラリーカラムを使用した。スペクトルは保持時間に対するシグナル強度を相対値で示し、スペクトル上のラベルは保持時間 (上段) と m/z (下段) を表す。

表 1 : 膜画分サンプルの LC-MS/MS による網羅的解析 .

膜画分サンプル		同定タンパク質数	同定ペプチド数
マウス培養心筋		2,871	18,921
	Replicate 1	3,516	24,693
	Replicate 2	3,421	22,920
ヒト未分化 iPS 細胞	Replicate 3	3,333	22,381
	平均	3,423	23,331
	合計	3,905	29,961
ヒト iPS 細胞由来心筋		2,213	15,786

表2：LC-MS/MSによる網羅的解析で同定された心筋マーカーの比較。

Gene Symbol	Protein Name	同定ペプチド数	
		未分化 iPS	iPS 細胞由来心筋
SCN5A	Nav 1.5 α subunit		1
SCN1B	Nav 1.5 β -1 subunit		
CACNA1C	Cav 1.2 α -1C subunit		
CACNA1D	Cav 1.2 α -1D subunit		
CACNA2D1	Cav 1.2 α -2/ β -1 subunit	3	17
CACNB1	Cav 1.2 β -1 subunit		
CACNB2	Cav 1.2 β -2 subunit		
CACNA1H	Cav 3.2 α -H subunit		
HCN1	Pacemaker channel		
HCN2	Pacemaker channel		
HCN4	Pacemaker channel		2
KCNA4	Kv 1.4 α subunit		
KCNA5	Kv 1.5 α subunit		
KCNAB1	Kv 1.5 β -1 subunit		
KCNAB2	Kv 1.5 β -2 subunit		
KCND3	Kv 4.3		
KCNIP1	Kv channel-interacting protein		
KCNIP2	Kv channel-interacting protein		
KCNQ1	Kv 7.1 (KvLQT1)		
KCNE1	minK		
KCNE2	MiPR1		
KCNH2	Kv 11.1 (KvLQT2,hERG)		
KCNJ5	GIRK4 IKACH channel		
KCNJ3	GIRK1 IKACH channel		
KCNJ2	Kir 2.1		
SLC8A1	NCX 1.1		24
ATP1A1	NaK ATPase α 1	47	30
ATP2A2	SERCA 2A	33	55
RYR2	Ryanodine receptor		33
PLN	phospholamban		3

表3：心筋マーカー安定発現株のLC-MS/MSによる網羅的解析。

Gene Symbol	Protein Name	同定ペプチド数						
		未分化 iPS	iPS 細胞 由来心筋	安定発現株				
				KCNQ1 +SLC8A1	SCN5A	KCNH2	KCND3 +KChIP2	CACNA1C
SCN5A	Nav 1.5 α subunit		1		42			
CACNA1C	Cav 1.2 α -1C subunit							62
KCNQ1	Kv 7.1 (KvLQT1)			21				
KCNH2	Kv 11.1 (KvLQT2,hERG)					41		
SLC8A1	NCX1.1		24	17				
KCND3	Kv 4.3						11	
KCNIP2	Kv channel- interacting protein						3	