

課題名：新規組織形成因子のプロテオミクス解析とタンパク質間相互作用による機能調節法の開発

分担者：紀藤 圭治

成果の概要

脳下垂体は様々なホルモン分泌細胞から成る内分泌組織であるが、それらの分泌細胞は様々な細胞系譜に由来することが知られている。マウス下垂体から単離された TtT/GF 細胞は、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析から未分化能を有することが示唆される細胞株である。そこで、下垂体組織形成のモデルとしての本細胞株の有用性と、本細胞の分化誘導過程において発現量が変動するタンパク質群の同定を目的として研究を行った。

TtT/GF 細胞を TGFβにより分化誘導すると、代表的なシグナル伝達分子である SMAD2 の核内移行や血管周皮細胞マーカーの発現量の上昇がみられ、本細胞は TGFβによる分化誘導能を有することが示された。また、血管周皮細胞マーカーはマウス下垂体組織の血管周辺領域の一部で発現していることも確認された。血管周皮細胞は様々な組織形成に深く関与している細胞でもあり、本細胞株は下垂体組織形成の詳細や血管周皮細胞の組織形成への関与を調べるうえのモデルとして有用であるが示された。次に TtT/GF 細胞を用いた分化誘導過程において発現量が変動するタンパク質を大規模に解析するために、タンパク質抽出方法、プロテオーム定量解析手法である SILAC (stable-isotope labeling by amino acids in cell culture) 法での安定同位体による標識効率、SILAC 法での細胞分化への影響、などを検討した。プロテオーム解析に必要な十分なタンパク質量が回収できること、定量解析に支障のない標識率が実

現できること、細胞分化過程への影響も最小限であることが確認され、本研究におけるプロテオーム定量解析手法を確立することができた。実際のプロテオーム解析として、マウス TtT/GF 細胞の TGFβ刺激による分化過程で発現量が変動するタンパク質の同定を行った。約 180 種類のタンパク質が TGFβ 刺激に依存した発現量の変動を示すことが明らかとなった。そのなかには分化に伴う細胞形態変化に関わるタンパク質に加え、血管周皮細胞で特徴的に発現がみられる多数のタンパク質も見出された。

以上より、本細胞株の下垂体組織形成のモデルとしての有用性を実証するとともに、血管周皮細胞への分化過程でのタンパク質発現変動を明らかにすることができた。

「研究の目的」

脳下垂体は多様なホルモン分泌細胞から構成される内分泌組織であるが、その組織形成の過程や関わるタンパク質についての全容は明らかになっていない。実験操作の簡便さから、培養細胞を用いた解析もそうした組織形成の全容を解明するための有用な手段となる。これまでにマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析によって、マウス下垂体から単離された TtT/GF 細胞は、未分化細胞に特徴的な複数のマーカー遺伝子を発現していることが明らかにされた。すなわち本細胞株は未分化能を有することが示唆される。そこで、下垂体組織形成のモデルとしての本細胞株が有用であることを検証することと、さらに本細胞を分化誘導した際にその過程で特異的に発現量が変動するタンパク質群を大規模に同定し、分化過程に関わる因子を明らかにすることを、本研究の目的とした。

「研究方法」

1. 細胞培養

TtT/GF 細胞は poly-L-lysine でコートしたディッシュ上で DMEM-F/12 培地

で培養した。同位体アミノ酸での標識実験の際には透析した血清を用い、通常の L-lysine と L-arginine、または $^{13}\text{C}_6$ で標識された L-lysine と L-arginine を添加した DMEM-F/12 培地で培養した。

2. mRNA 発現量の RT-PCR による定量解析

培養した細胞から RNeasy mini-kito (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。cDNA は PrimeScript (Takara) を用いて oligo-(dT)20 primer により合成し、それぞれの遺伝子特異的なプライマーで PCR を行った。定量的 PCR の際には、real-time PCR (Applied Biosystems) により SYBR Green を用いて発現量を定量した。

3. タンパク質抽出

培養した細胞から ProteinExtract Complete Mammalian Proteome Extraction Kit (Merk) を用いてタンパク質を抽出した。抽出した試料のタンパク質濃度は Bradford assay kit (Bio-rad) を用いて計測した。

4. 質量分析による発現量解析

同位体標識していない試料と標識した試料とを等量混合し (図 8)、メタノール/クロロホルム沈殿処理後に iodoacetamide でアルキル化処理を行った。その後トリプシンを加え、一晩消化反応を行った。得られたペプチドを 3100 OFFGELL fractionator (Agilent Technologies) で 24 個のフラクションに分画した。各フラクションについて LTQ-Orbitrap 質量分析装置 (Thermo Fisher Scientific) を用いた LC-MS/MS 解析により分析した。各 MS/MS データについてマウスのタンパク質配列 (UniProt) に対するデータベース検索を行うことでペプチド配列を同定するとともに、混合した両試料に由来するペプチドの強度を求め、タンパク質量の差異を定量化した。

5. Gene Ontology 解析

発現量が変動したタンパク質リストについて、DAIVD (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) を用いて機能的特徴を解析した。その際、アイソフォームと思われるタンパク質については一つのタンパク質名に集約して解析を行った。P 値が 0.05 未満のものを有意な Gene Ontology 情報とした。

「研究成果」

1. TtT/GF 細胞での TGFβ受容体の発現

TtT/GF 細胞は未分化細胞のマーカである SOX2 を発現しているなど、遺伝子発現のパターンからは未分化細胞の形質を有している可能性が示唆された。そこで、間葉系細胞や血管細胞の分化誘導活性を有する TGFβにより本細胞が分化能を有するかを解析した。RT-PCR により TGFβ受容体の発現を調べたところ、3 種類の TGFβ受容体の発現が確認された (図 1)。そのうち TGFβ受容体 1 と TGFβ受容体 2 はよく知られている TGFβ受容体のアイソフォームであり、TtT/GF 細胞が TGFβによる分化誘導刺激を受容する可能性が示唆された。

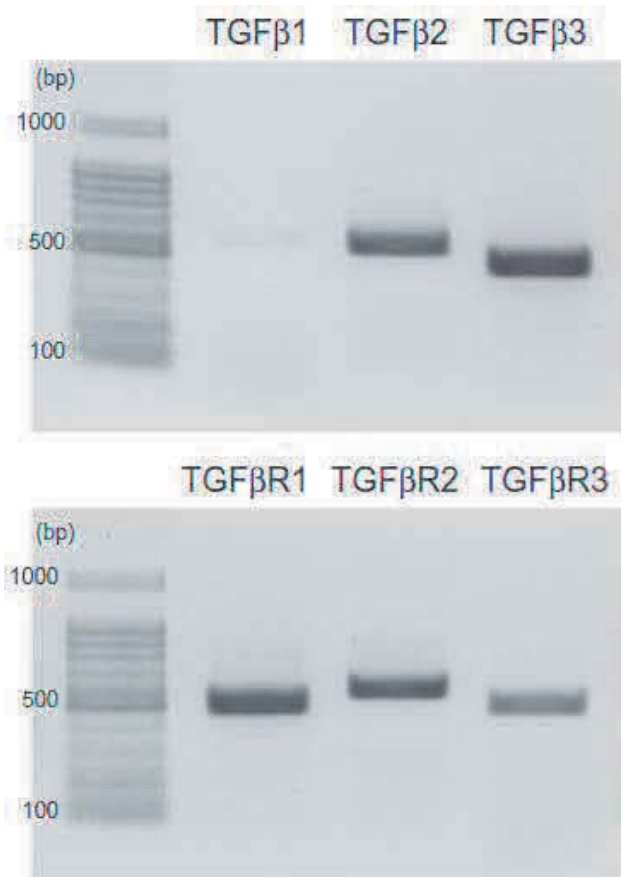


図1 RT-PCRによるTGFβ受容体の発現解析

RT-PCRによりTtT/GF細胞でのTGFβ受容体の発現を検出した。

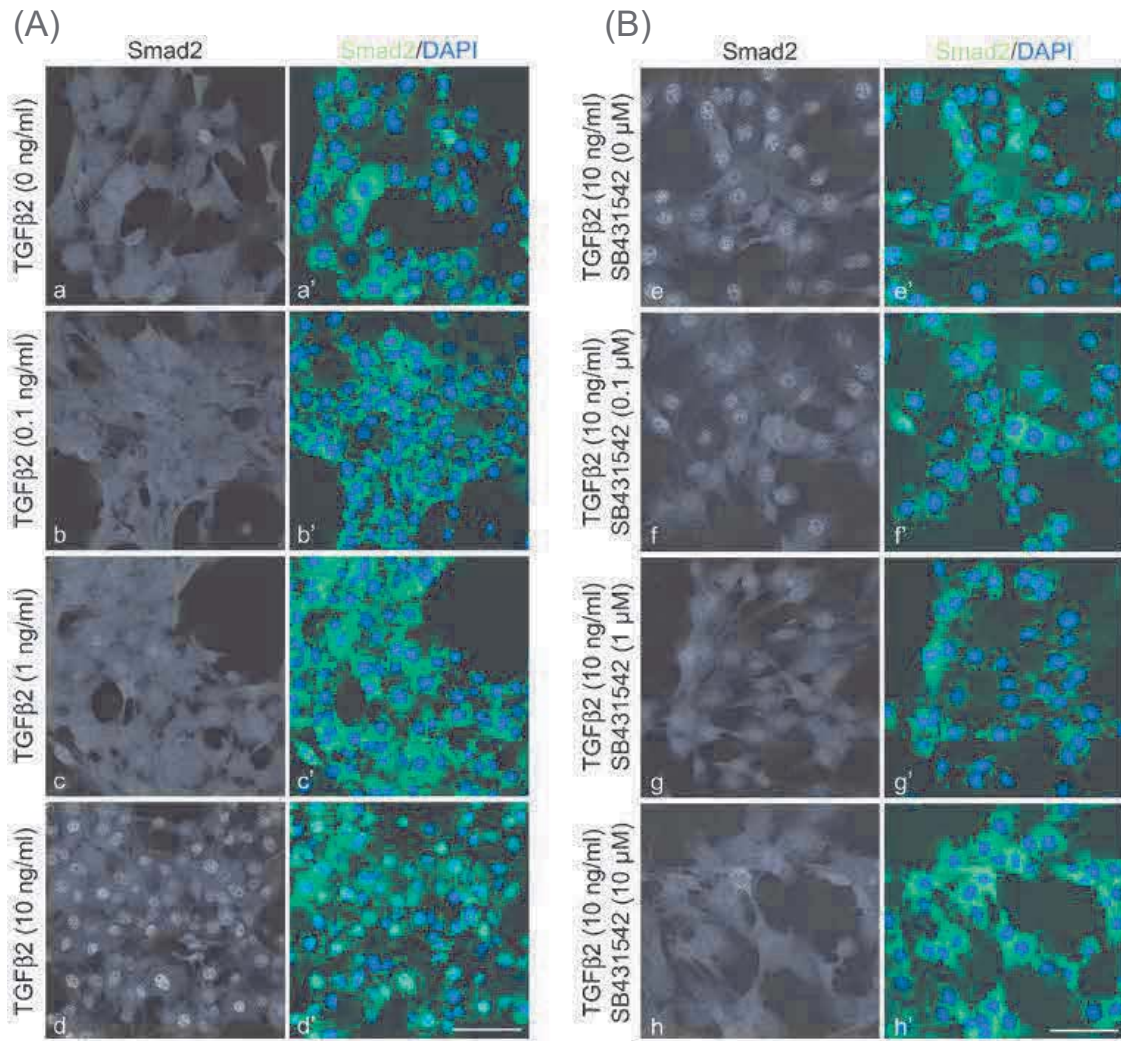


図2 TGFβ刺激による SMAD2 の核内移行

TGFβで刺激 (A) または TGFβと SB431542 共存下で培養した TtT/GF 細胞を SMAD2 に対する抗体で染色するとともに、核を DAPI で染色することで SMAD2 の核内局在を検出した。

2. TtT/GF 細胞の TGFβ刺激による分化誘導能の解析

2. 1. TtT/GF 細胞の TGFβ刺激による SMAD2 の核内移行

TtT/GF 細胞が TGFβに対する応答性を有するかを解析した。TGFβ刺激により核内移行することが知られている SMAD2 の局在を免疫細胞染色により調べたところ、TGFβ刺激後 30 分の細胞で SMAD2 の核内移行が観察された (図 2

A)。また SMAD2 の核内移行は TGF β シグナル伝達の特異的阻害剤である SB431542 を添加すると検出されないことから、観察された SMAD2 の核内移行は TGF β 刺激に依存したものであることが確認された (図 2 B)。

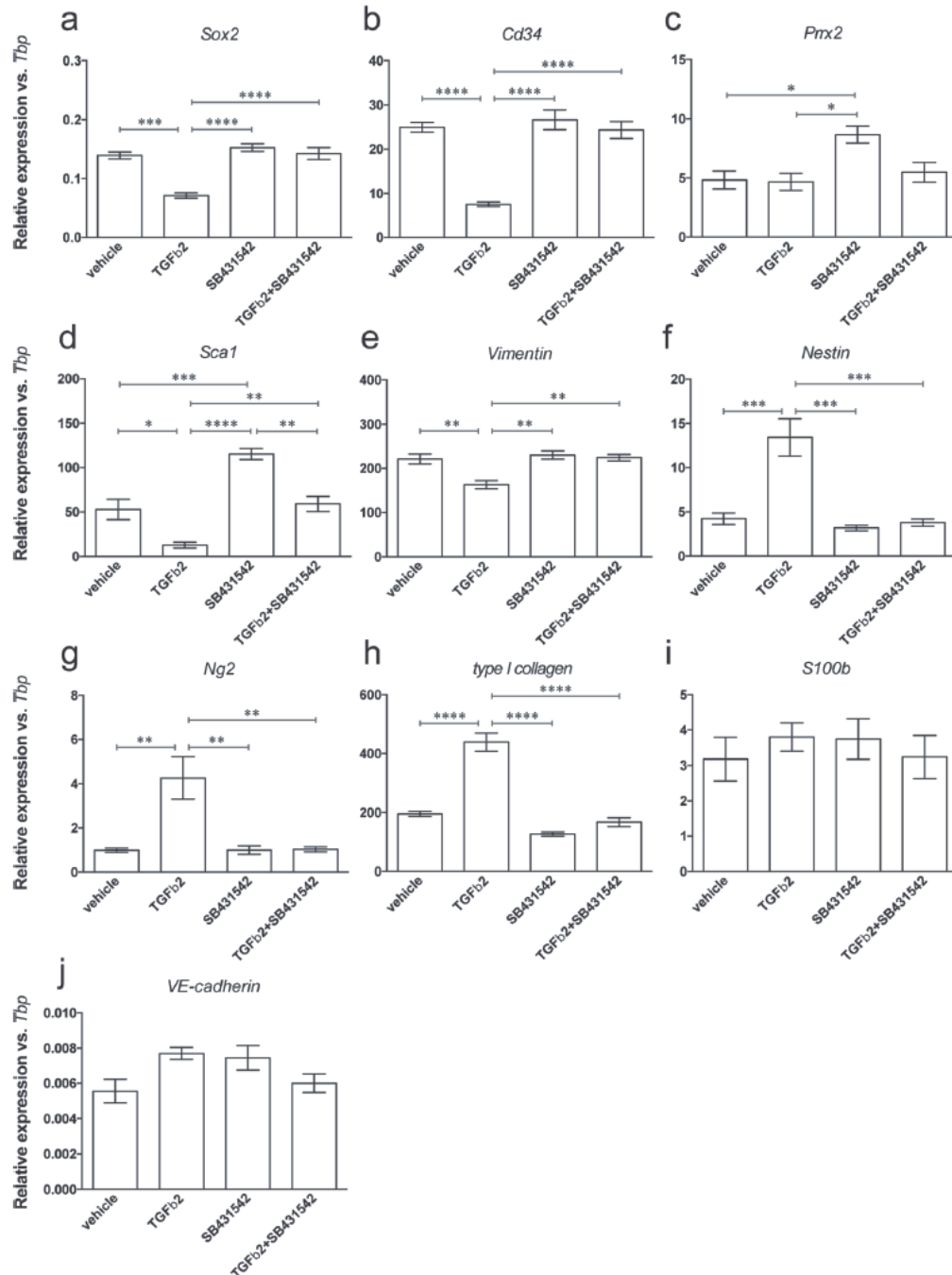


図 3 TGF β 刺激による遺伝子発現量の変化

RT-PCR により TtT/GF 細胞での各種 mRNA 発現量の変化を定量した。

2. 2. TtT/GF 細胞の TGFβ刺激による遺伝子発現の変化

次に、TtT/GF 細胞が TGFβ刺激後に分化した細胞の形質を有しているかを、様々な遺伝子の発現量の変化を RT-PCR により解析した (図 3)。幹細胞のマーカである Sox2、Cd34、Vimentin、Sca1 の発現量が TGFβ刺激後に減少することが明らかとなった。その減少は、TGFβシグナル伝達の特異的阻害剤である SB431542 を添加することで抑制された。さらに、血管周皮細胞で特徴的に発現することが知られている Nestin、Ng2、type-1 Collagen は、TGFβ刺激によりその発現量が増加した。またその増加は阻害剤 SB431542 により完全に抑えられた。一方で内皮細胞のマーカ遺伝子 (VE-cadherin) や濾胞細胞のマーカ遺伝子 (S100b) は TGFβ刺激による発現量の増加はみられなかった。さらに、血管周皮細胞で特徴的に発現する遺伝子について、TGFβ刺激によるタンパク質発現量の変化を免疫細胞染色により調べたところ、Nestin、Ng2、type-1 Collagen の発現量が TGFβ刺激に依存して増加することが観察された (図 4)。

3. マウス下垂体組織での血管周皮細胞マーカの発現

血管周皮細胞で特徴的に発現することが知られている Nestin と Ng2 について、マウス下垂体組織での発現と局在を免疫組織染色により解析した。一部の細胞で Nestin と Ng2 の両方を発現している血管周皮細胞が観察された (図 5)。

以上のことより、TtT/GF 細胞は TGFβ刺激により血管周皮細胞への分化能を有するとともに、血管周皮細胞の下垂体組織形成への関与が示唆された。これらのことから本細胞株は、下垂体組織形成の詳細を調べるうえでとくに血管周皮細胞の分化に関する解析のモデルとして有用であるが示された。本成果は学術論文 (業績 1) にて報告した。

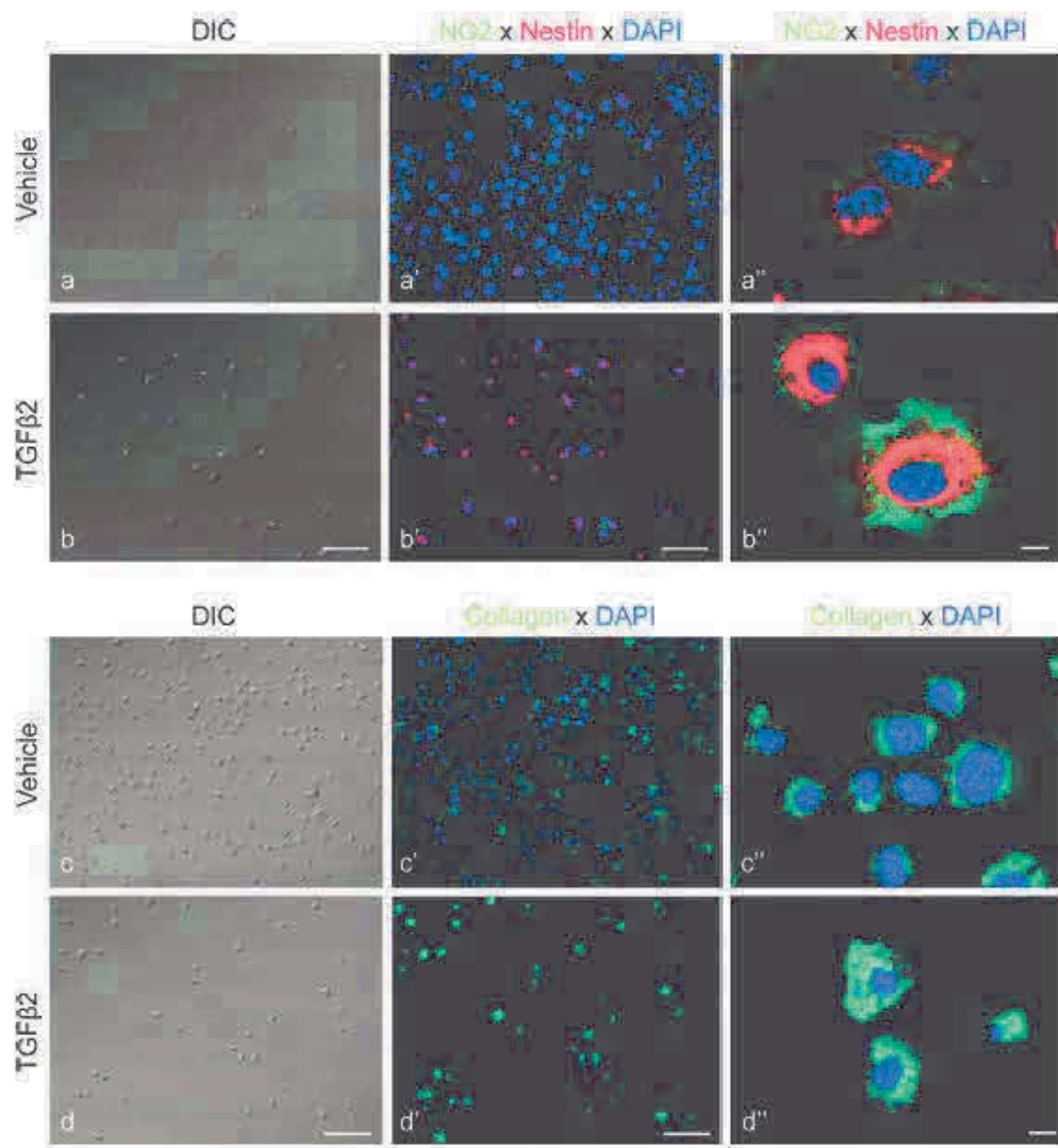


図4 TGFβ刺激によるタンパク質発現量の変化

未刺激またはTGFβで刺激したTtT/GF細胞をNestinとNg2に対する抗体(A)、またはtype-1 Collagenに対する抗体(B)で染色した。

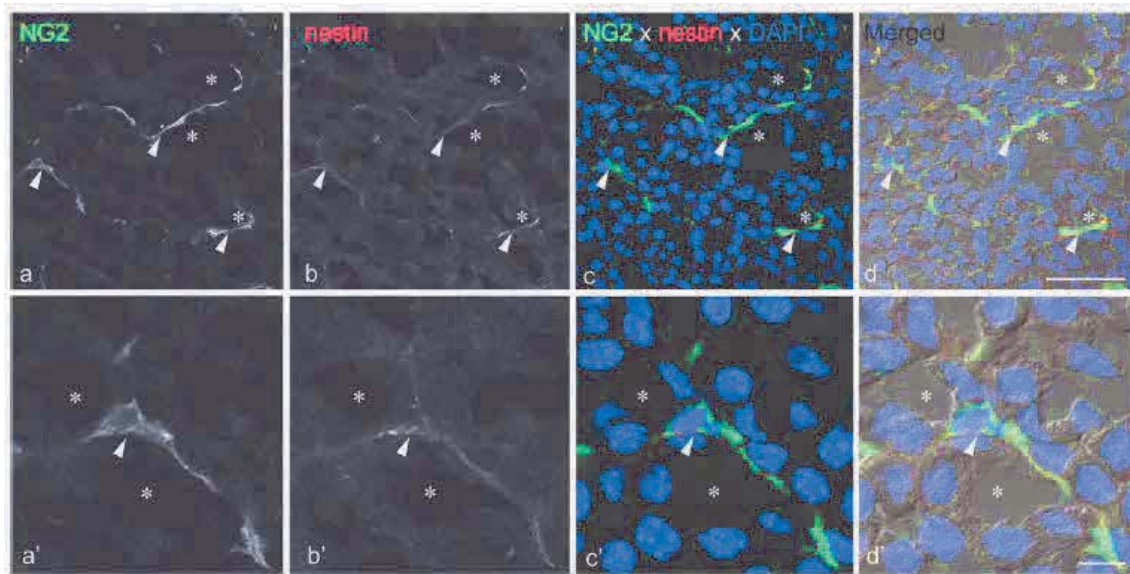


図5 下垂体組織での血管周皮細胞マーカーの発現と局在
マウス下垂体組織を Nestin と Ng2 に対する抗体で染色した。

4. プロテオーム解析手法の確立

4. 1. タンパク質抽出手法の検討

TtT/GF 細胞を用いた分化誘導過程において特異的に発現量が変動するタンパク質を大規模に解析することを目的に、タンパク質抽出方法の検討と定量解析手法の確立を実施した。様々な動物細胞からのタンパク質抽出方法を比較検討し、質量分析によるタンパク質解析（プロテオーム解析）への影響がない方法を選定し、抽出したタンパク質から十分な数のタンパク質が質量分析により同定されることが確認できた。さらにプロテオーム解析に必要なタンパク質量として、100 mm 培養ディッシュ 4 枚 ($1.4\sim 1.5 \times 10^6$ 個の細胞) から解析に必要な十分量のタンパク質を回収できることが分かった (表1)。

表 1 細胞あたりのタンパク質回収量

Sample	Cells ($\times 10^{-6}$)	Conc [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Protein [μg]
Vehicle	1.5	8.82	706
TGFb2	1.4	6.49	519
SB431542	1.4	9.22	738

4. 2. タンパク質発現量の比較解析方法の検討

発現量の定量手法としては、安定同位体標識を用いる手法と非標識での定量解析によるものとの二種類があるが、両手法では定量精度の違いや解析目的に応じた適合性があることを既に明らかにしている（業績 2・3）。本研究では各タンパク質の発現量を精度よく定量することが求められるため、同位体標識を活用した手法（SILAC 法）で解析することとした（図 6）。TtT/GF 細胞を同位体標識開始後に約 30 倍に増殖させ、そこから回収したタンパク質の標識効率を質量分析により解析した。全体としては約 90%のタンパク質が標識されていることが明らかとなり、本条件でタンパク質発現量の解析に十分な標識効率を実現できることが明らかとなった（図 7）。また、標識実験には透析済みの血清を培養時に用いるため、通常血清との違いが懸念された。通常血清に対して透析済み血清では細胞分化過程での細胞形態へ影響がみられるものの、TGF β 刺激による SMAD2 の核内移行や分化の指標となるタンパク質の発現変動が観察され、透析済み血清を用いた本標識実験においても細胞分化の誘導が確認された。以上より、細胞分化誘導時のプロテオーム解析に用いる TtT/GF 細胞数、タンパク質試料調製方法、同位体標識手法など種々の実験条件を確立することができた。

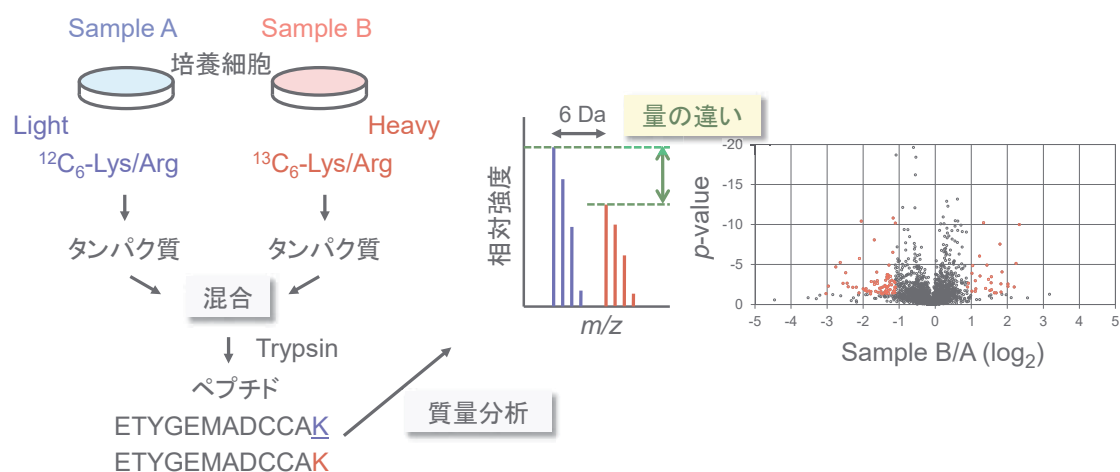


図6 SILAC法によるタンパク質発現量の定量解析

プロテオーム発現量を比較したい片方の細胞を同位体標識アミノ酸存在下で培養し、タンパク質の同位体標識を行う。抽出したタンパク質試料を混合後、トリプシンなどの特異的消化酵素によりペプチドに断片化し、質量分析でその配列を特定するとともに、両試料間での存在量比をピーク強度比にもとづいて計測する。得られたペプチドの存在量比から合計で数千種類のタンパク質について試料間での発現量比を算出し、有意差検討とともに発現量に違いがみられたタンパク質を同定する。

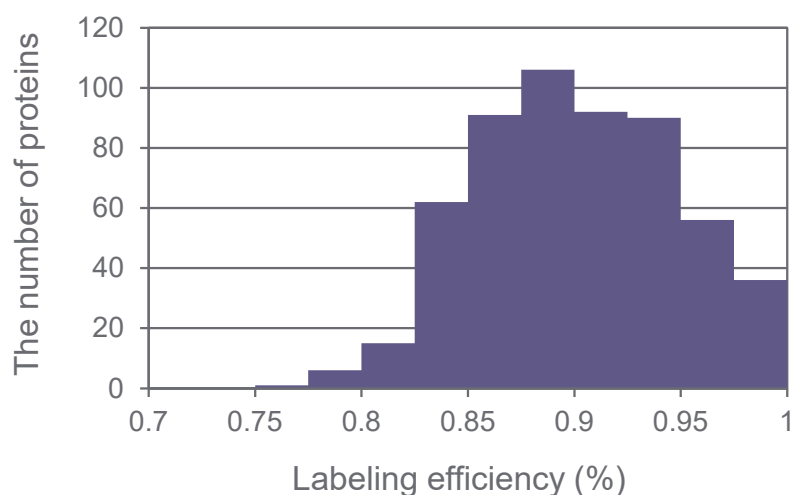


図7 タンパク質の安定同位体による標識率

LC-MS/MS 解析により 555 種類のタンパク質の標識率が定量され、その分布を図に示した。標識率の平均値と中央値は、それぞれ 90.1%と 90.0%であった。

5. TtT/GF 細胞分化過程におけるプロテオーム解析

5. 1. 分化過程で発現量が変動したタンパク質数

実際のプロテオーム解析として、マウス TtT/GF 細胞を TGFβ で分化誘導したときに発現量が変動するタンパク質の同定を行った。TGFβ 未刺激の細胞は通常の培地で培養し、TGFβ で分化誘導した細胞を同位体 ($^{13}\text{C}_6\text{-Lys/Arg}$) で標識した。このとき、TGFβ 刺激により活性化される細胞内シグナル伝達の阻害剤である SB431542 で処理した細胞も用意し、同じく同位体 ($^{13}\text{C}_6\text{-Lys/Arg}$) で標識した。3 種類の細胞について独立した 3 回の培養を行い、そこから得られたタンパク質について未刺激細胞 (非標識) と TGFβ2 刺激細胞 (標識) の試料を混合したものと、未刺激細胞 (非標識) と SB431542 処理細胞 (標識) の試料を混合したものの 2 種類を質量分析で解析し、それぞれの条件間で各タンパク質発現の量比を定量した (図 8)。TGFβ2 刺激細胞 (標識) と SB431542 処理細胞 (標識) での発現量の比較は、それぞれの未刺激細胞 (非標識) との量比から算出した。同一試料については計 2 回の質量分析による解析を行い、計 12 セットのプロ算出したプロテオーム発現量解析データを得た (表 2)。タンパク質の同定に用いるマウスの網羅的タンパク質配列データベースは冗長性が高いため、互いの配列類似度の高い (99%以上) ものはデータベースから取り除くことで、同定されたタンパク質情報の冗長性を軽減させた。

各プロテオーム解析データでは 1500~2000 種類ほどのタンパク質の発現量を比較定量することができた (表 2)。さらに 3 回の独立した細胞培養実験のうち 2 回以上の実験で発現量に差があったものとして、約 40 種類から 190 種類のタンパク質を各刺激の有無により発現量が変動したタンパク質として見出した。(表 3、図 9)。

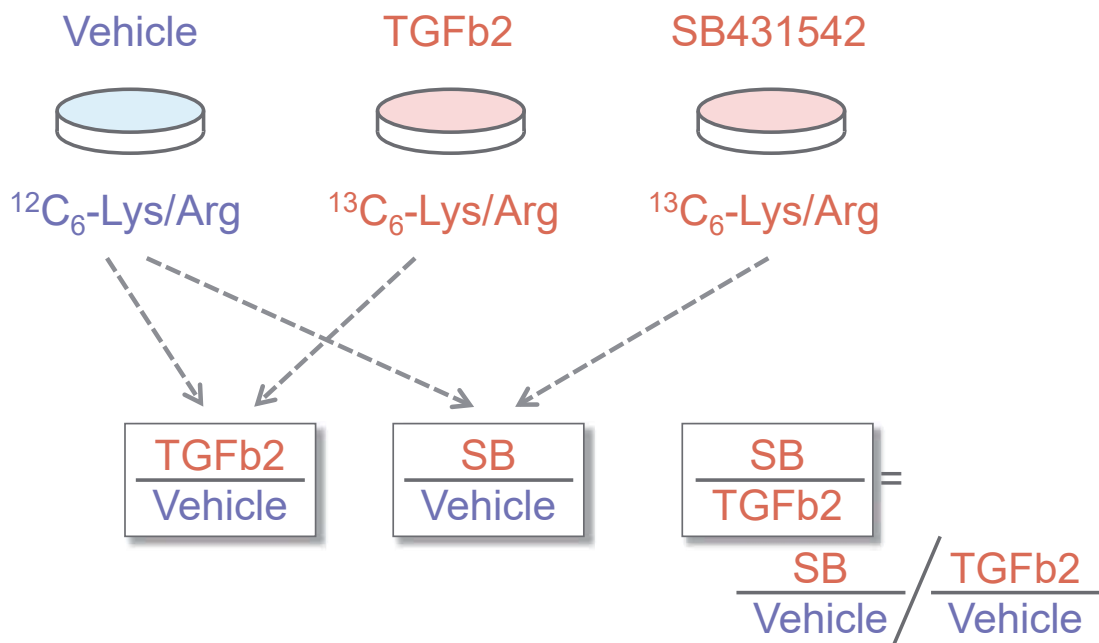


図8 プロテオーム解析での同位体標識と発現量比の算出

未刺激細胞（非標識）と TGFβ2 刺激細胞（標識）の試料を混合したものと、未刺激細胞（非標識）と SB431542 処理細胞（標識）の試料を混合したものの 2 種類を質量分析で解析し、それぞれの条件間で各タンパク質発現の量比を定量した。TGFβ2 刺激細胞（標識）と SB431542 処理細胞（標識）での発現量の比較は、それぞれの未刺激細胞（非標識）との量比から算出した。

表3 全プロテオーム解析により定量されたタンパク質数と発現量の変動がみ

Experiment		MS analysis	Quantified proteins (>= 2 exp.)	Up (>= 2 exp.)	Dwn (>= 2 exp.)
#01-03	TGF/Veh	#01-02	2230	49	56
	SB/Veh	#01-02	2059	24	13
	SB/TGF	#01-02	1693	121	66

$|\text{Log2}| \geq 0.6, p < 0.05$

表2 各プロテオーム解析により同定されたタンパク質数と定量されたタンパク質数

Experiment		MS analysis	Identified proteins	Quantified proteins
#01	TGF/Veh	#01	4089	1901
		#02	3902	1856
	SB/Veh	#01	4007	1969
		#02	3368	1551
#02	TGF/Veh	#01	3151	1438
		#02	3521	1595
	SB/Veh	#01	3730	1639
		#02	3006	1259
#03	TGF/Veh	#01	3251	1447
		#02	3069	1381
	SB/Veh	#01	3306	1561
		#02	4122	2071

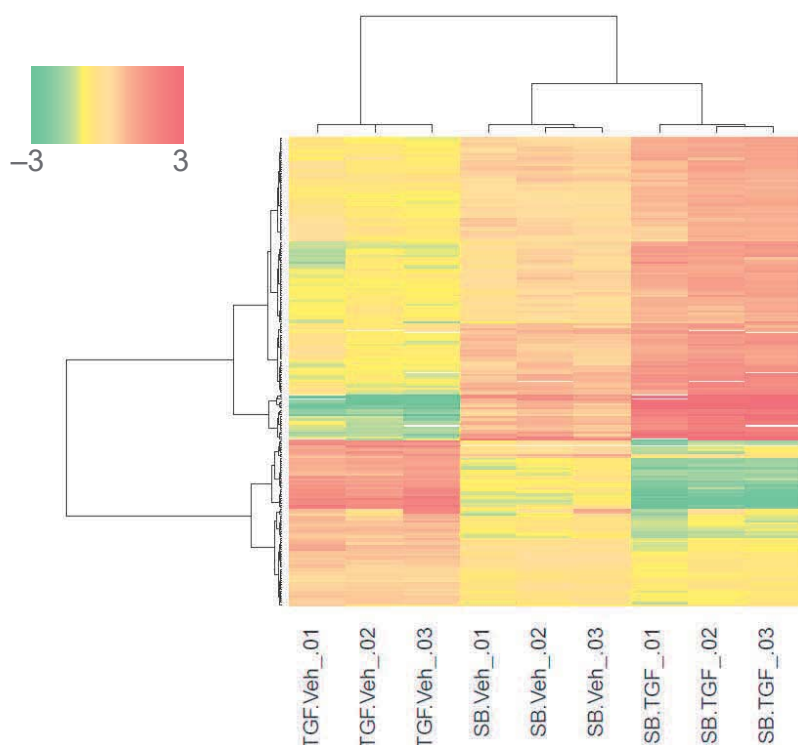


図9 発現量が変動したタンパク質のヒートマップ

01~03の番号は、独立した各細胞培養実験のデータに対応する。

5. 2. 分化過程で発現量が変動したタンパク質の特徴

上記プロテオーム解析で発現量が変動したタンパク質（表 3）の中には、TtT/GF 細胞が発現する内在性の TGF β に依存したタンパク質発現量の変動も、含まれるため、シグナル伝達阻害剤 SB431542 処理細胞に対して TGF β 処理細胞で発現量が変動したタンパク質を、本研究では TGF β 刺激に依存して発現量が変化するタンパク質群とした。最終的に、組織の局在が異なるだけといった同一タンパク質と思われるものを集約し、TGF β 刺激に依存して 51 種類のタンパク質で発現量が増加し、112 種類で減少することが明らかとなった（表 4、5）。

これらのタンパク質について Gene Ontology 解析を行ったところ、アクチン線維、細胞接着、細胞外マトリクス、DNA 複製、に関わるタンパク質が多く含まれることが分かった（表 6）。また、細胞分化やエンドサイトーシス、各種代謝に関わるタンパク質も見出された。このなかで、TGF β がアクチン繊維の制御に確かに関わっているかを調べるために、TGF β 刺激後の TtT/GF 細胞を Phalloidin で染色すると、TGF β 刺激によりアクチン繊維の形成が促進され、シグナル伝達阻害剤 SB431542 によりそれが抑制されることが明らかとなった（図 10）。

TGF β 刺激後により分化誘導した TtT/GF 細胞の特性を解析するために、発現量が変動したタンパク質リストのうち各種細胞のマーカーとして知られるタンパク質名を抽出した（表 7）。多くの血管周皮細胞のマーカーで発現量が増加しており、TtT/GF 細胞は TGF β 刺激後により血管周皮細胞様に分化することが示唆された。また一部重複するものの平滑筋細胞のマーカータンパク質の発現量の増加もみられた。一方で、幹細胞、甲状腺刺激ホルモン産生細胞、濾胞細胞、などのマーカータンパク質の量は減少しており、TGF β 刺激後の TtT/GF 細胞はこれらの細胞種とは異なる形質を有するものと考えられた。

以上より、TGF β 刺激により分化誘導した TtT/GF 細胞では、分化に伴う細

胞形態変化に関わると考えられる細胞骨格や細胞接着関連のタンパク質に加え、とくに血管周皮細胞で特徴的に発現がみられる多数のタンパク質の発現量が増加していることが明らかとなった。TtT/GF 細胞の分化過程におけるタンパク質発現変動の解析結果は、TtT/GF 細胞が血管周皮細胞への分化能を有する有用なモデルであることを示すとともに、下垂体血管周皮細胞への分化過程を解明するための基盤情報になると考えられる。本成果は学術論文（業績4）にて報告した。

表 4 TtT/GF 細胞で TGFβ 刺激により発現量が増加したタンパク質

Name	Symbol	TGFβ/SB431542 (log ratio)
Actin, aortic smooth muscle	ACTA	3.15
Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3	2.97
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	PLOD2	2.79
Transgelin	TAGLN	2.69
Neural cell adhesion molecule 1	NCAM1	2.60
PDZ and LIM domain protein 7	PDLIM7	2.27
Cysteine and glycine-rich protein 2	CSRP2	2.16
Calponin-1	CNN1	2.01
Palladin	PALLD	1.91
Fibronectin	FN1	1.89
Fibrillin-1	FBN1	1.76
Myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9	1.75
Integrin alpha-5	ITGA5	1.64
PDZ and LIM domain protein 1	PDLIM1	1.57
Fibulin-2	FBLN2	1.54
Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	1.50
Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	LTBP1	1.41
Chondroitin sulfate proteoglycan 4	CSPG4	1.37
EH domain-binding protein 1-like protein 1	EHBP1L1	1.32
Protein Col6a3	COL6A3	1.27
Caldesmon 1	CALD1	1.26
Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	ALDH1L2	1.25
Thrombospondin-1	THBS1	1.24
Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	1.22
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1	1.14
Alpha-actinin-1	ACTN1	1.12
Ferritin light chain 1	FTL1	1.10
Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial	MTHFD1	1.08
Serpine H1	SERPINH1	1.04
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	ALDH18A1	0.98
Transmembrane protein 263	TMEM263	0.94
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	IDH3A	0.92
Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1	0.90
Microtubule-associated protein 1B	MTAP1B	0.89
Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	TARS	0.89
Nestin	NES	0.87
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	PCK2	0.87
Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial	PYCR1	0.83
Serine hydroxymethyltransferase	SHMT2	0.80
Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	MARS	0.80
Calponin-2	CNN2	0.78
Lysyl oxidase homolog 2	LOXL2	0.78
Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	IARS	0.76
MCG5400	MYL12A	0.76
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	P4HA2	0.71
Protein transport protein Sec23A	SEC23A	0.70
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	0.69
Filamin-A	FLNA	0.67
Lon protease homolog, mitochondrial	LONP1	0.64
Reticulocalbin-1	RCN1	0.64
Nucleolar RNA helicase 2	DDX21	0.62

*Values are average of logarithmic ratios (n=2 or 3)

表5 TtT/GF 細胞で TGFβ 刺激により発現量が減少したタンパク質

Name	Symbol	TGFβ/SB431542 (log ratio)	Name	Symbol	TGFβ/SB431542 (log ratio)
Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	-3.69	Plesin-B2	PLN2B2	-1.04
cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	PRKAR2B	-3.65	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	SPTAN1	-1.03
Latein	LQN	-3.58	Copper transport protein ATOX1	ATOX1	-1.03
Integrin beta-4	ITGB4	-3.11	Thy-1 membrane glycoprotein	THY1	-1.02
Indolethylamine N-methyltransferase	DNMT	-2.69	Drebrin-like protein	DBNL	-1.00
Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	EP8	-2.65	Rho-associated protein kinase 2	ROCK2	-0.99
DnaJ homolog subfamily B member 4	DNAJB4	-2.31	Acetoacetyl-CoA synthetase	AACS	-0.98
Galectin-3	LGALS3	-2.29	Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPVL2	-0.96
Erythrocyte band 7 integral membrane protein	STOM	-2.28	Calpain-1 catalytic subunit	CAPN1	-0.95
Xanthine dehydrogenase/oxidase	XDH	-2.26	DNA replication licensing factor MCM4	MCM4	-0.93
UDP-N-acetylthiamine pyrophosphorylase-like protein 1	UAP1L1	-2.25	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X	G6PDX	-0.93
F-box only protein 2	FBXO2	-2.09	Annexin A1	ANXA1	-0.93
Leukocyte elastase inhibitor A	SERPINF1A	-2.07	Ras-related protein R-Ras2	RRA52	-0.93
Esrin	EZR	-1.89	Protein S100-A13	S100A13	-0.92
D-dopachrome decarboxylase	DDT	-1.80	Nidogen-1	NID1	-0.92
Protein Niban	FAM120A	-1.78	Ribonuclease inhibitor	RNH1	-0.92
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5	ENPP5	-1.68	Aldose reductase-related protein 2	AKR1B8	-0.90
Epside hydrolase 1	EPHX1	-1.62	LIM domain and actin-binding protein 1	LIM1	-0.90
UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	UGP2	-1.58	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	OXCT1	-0.89
Perilipin-3	PLIN3	-1.52	Serpin B6	SERPINF6A	-0.89
MCG116562, isoform CRA_a	VCAN	-1.50	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	-0.89
Glypican-4	GPC4	-1.49	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3	RIPK3	-0.89
Heat shock 70 kDa protein 1B	HSPA1B	-1.48	DNA replication licensing factor MCM5	MCM5	-0.88
Glutathione S-transferase P 1	GSTP1	-1.38	Protein Ahnak3 (Fragment)	AHNAK3	-0.88
Deoxyribose diphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	SAMHD1	-1.38	Prospodin	PSAP	-0.88
Versican core protein	CSPG2	-1.34	EHD domain-containing protein 1	EHD1	-0.87
Alpha-mannosidase 2	MAN2A1	-1.32	L-lactate dehydrogenase	LDHA	-0.87
Nardilysin	NRD1	-1.30	Flotillin-1	FLOT1	-0.86
A-kinase anchor protein 2	AKAP2	-1.30	Interferon-induced transmembrane protein 3	IFITM3	-0.84
Aquaporin-1	AQP1	-1.29	DNA replication licensing factor MCM7	MCM7	-0.83
Polyomase I and transcript release factor	PTRF	-1.28	Myoferlin	MYOF	-0.83
Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma	TMPO	-1.28	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKBP1A	-0.82
Glutathione S-transferase Mu 2	GSTM2	-1.27	5-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	MTAP	-0.82
Laminin subunit alpha-5	LAMA5	-1.27	Troponomodulin-3	TMOD3	-0.80
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	-1.24	DNA replication licensing factor MCM2	MCM2	-0.79
Laminin subunit gamma-1	LAMC1	-1.23	Phosphoserine aminotransferase	PSAT1	-0.79
4-trimethylaminouracilaldehyde dehydrogenase	ALDH9A1	-1.22	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2	-0.78
Four and a half LIM domains 1, isoform CRA_c	FHL1	-1.22	Reticulon-4	RTN4	-0.78
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	-1.22	WD repeat-containing protein 1	WDR1	-0.78
Prostaglandin G/H synthase 1	PTGS1	-1.20	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	-0.78
Creatine kinase B-type	CKB	-1.20	C-type natriuretic receptor 2	MRC2	-0.77
Serum deprivation-response protein	SDPR	-1.18	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	FAM120A	-0.76
EH domain-containing protein 2	EHD2	-1.14	Cathepsin Z	CTSZ	-0.76
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	SPTB2	-1.13	DNA replication licensing factor MCM6	MCM6	-0.76
von Willebrand factor A domain-containing protein 5A	VWFA5A	-1.13	Feritin heavy chain	FTH1	-0.75
UMP-CMP kinase	CMPK1	-1.13	Major vault protein	MVP	-0.74
Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	ACOX1	-1.12	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	-0.74
Carbonyl reductase [NADPH] 3	CBR3	-1.10	Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2	-0.74
Acylphosphatase	ACYP1	-1.10	Lipoma-preferred partner homolog	LPP	-0.74
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	-1.09	High mobility group protein B2	HMGB2	-0.73
PDZ and LIM domain protein 2	PDLIM2	-1.09	Lamin-B1	LMNB1	-0.73
Cathepsin B	CTSB	-1.08	Tubulin beta-2A chain	TUBB2A	-0.73
Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	CPT1A	-1.07	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	ACAT1	-0.73
3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	ACAA2	-1.07	Annexin A11	ANXA11	-0.69
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	VAT1	-1.05	GDP-mannose 4,6 dehydratase	GMD5	-0.69
N-acetylglucosamine-6-sulfatase	GNS	-1.05	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC	-0.66

*Values are average of logarithmic ratios (n=2 or 3)

表 6 TtT/GF 細胞で TGFβ 刺激により発現量に変動したタンパク質の Gene

Ontology 解析

Category	Description	P-value	Symbol
<i>Actin cytoskeleton</i>			
<i>Cell shape</i>	Actin filament bundle assembly	1.04E-05	CALD1, LIMA1, EZR, ACTN1, DBNL, EPS8
	Regulation of cell shape	1.74E-04	WDR1, ANXA1, PLYNB2, EZR, FN1, MYL12A, EPS8, S100A13
	Actin cytoskeleton organization	1.99E-04	WDR1, CSRP1, PDLIM7, TMOD3, PALLD, ROCK2, FLNA, EHD2
	Actin cytoskeleton reorganization	9.50E-04	ANXA1, EZR, SPTAN1, EPS8, FLNA
	Actin crosslink formation	0.00438	ACTN1, EPS8, FLNA
	Cortical cytoskeleton organization	0.04940	WDR1, ACTN1
	Negative regulation of cellular component movement	0.04940	ACTN1, TMOD3
<i>Muscle</i>	Muscle contraction	8.18E-04	CALD1, ANXA1, ACTA, TMOD3, FKBP1A
	Positive regulation of myoblast fusion	0.01093	FLOT1, EHD1, EHD2
	Skeletal system development	0.01270	COL1A2, LGALS3, CSPG2, FBN1, VCAN, COL1A1
<i>Motility</i>	Regulation of cell migration	0.02710	LAMA5, THY1, RTN4, FLNA
	Positive regulation of cell migration	0.02864	RRAS2, FN1, AQP1, THBS1, ITGA5, COL1A1
<i>Adhesion</i>			
<i>Cell-cell</i>	Cell-cell adhesion	0.00529	IDH1, LIMA1, CNN2, PLN3, PDLIM1, DBNL, TMPO
	Cell adhesion	0.00798	LAMA5, ITGB4, THY1, NCAM1, CSPG2, FN1, VCAN, LPP, THBS1, ITGA5, NID1, LAMC1
<i>Cell-ECM</i>	Positive regulation of cell-substrate adhesion	0.00526	FBLN2, THBS1, ITGA5, NID1
	Hemidesmosome assembly	0.04133	ITGB4, LAMC1
	Cell-substrate junction assembly	0.04133	FN1, ITGA5
<i>ECM</i>			
	Collagen fibril organization	0.00426	COL1A2, SERPINH1, COL1A1, LOXL2
	Extracellular matrix disassembly	0.01452	FLOT1, NID1, LAMC1
	Extracellular matrix organization	0.01570	LAMA5, LGALS3, FN1, NID1, LAMC1
	Substrate adhesion-dependent cell spreading	0.04447	LAMA5, FN1, LAMC1
	Wound healing	0.04485	CNN2, FN1, AQP1, COL1A1
	Collagen biosynthetic process	0.04940	SERPINH1, COL1A1
<i>DNA replication</i>			
	DNA replication initiation	4.47E-05	MCM6, MCM5, MCM7, MCM4, MCM2
	DNA unwinding involved in DNA replication	6.69E-05	MCM6, MCM7, MCM4, MCM2
	DNA replication	0.00384	MCM6, MCM5, PCNA, MCM7, MCM4, MCM2
	Negative regulation of apoptotic process	0.04981	LGALS3, ALDH2, GSTP1, FN1, AQP1, HSPA1B, SODC, HSPD1, FLNA, THBS1
<i>Differentiation</i>			
	Osteoblast differentiation	0.00266	DDX21, MRC2, IARS, RRAS2, CSPG2, VCAN, COL1A1
	Epithelial cell differentiation	0.01885	CPT1A, LGALS3, TAGLN, CTSB
	Adipose tissue development	0.03304	AACS, ACAT1, OXCT1
<i>Endocytosis</i>			
	Receptor-mediated endocytosis	0.01405	DBNL, FTL1, FTH1, IFITM3
	Endocytosis	0.01846	MRC2, FLOT1, DBNL, EHD1, DPYL2, EHD2
	Positive regulation of endocytic recycling	0.03321	EHD1, EHD2
<i>Metabolism</i>			
	Metabolic process	1.25E-08	UGP2, AACS, ACAA2, ACAT1, GSTP1, ALDH2, ACOX1, ENPP5, SAMHD1, ALDH18A1, MAN2A1, GSTM2, OXCT1, ALDH9A1, CNDP2, UAP1L1, MTHFD1, ALDH1A1, ALDH1L2, GNS
<i>Others</i>			
	Oxidation-reduction process	2.38E-07	MDH1, ACOX1, ALDH2, PLOD2, VAT1, PTGS1, ALDH18A1, AKR1B8, G6PDX, ALDH9A1, IDH1, XDH, MTHFD1, IDH3A, CBR3, ALDH1A1, ALDH1L2, SODC, PYCR1, P4HA2, FTH1, LOXL2

For all data, see Electronic Supplementary Material Table S5. Abbreviation: ECM, extracellular matrix

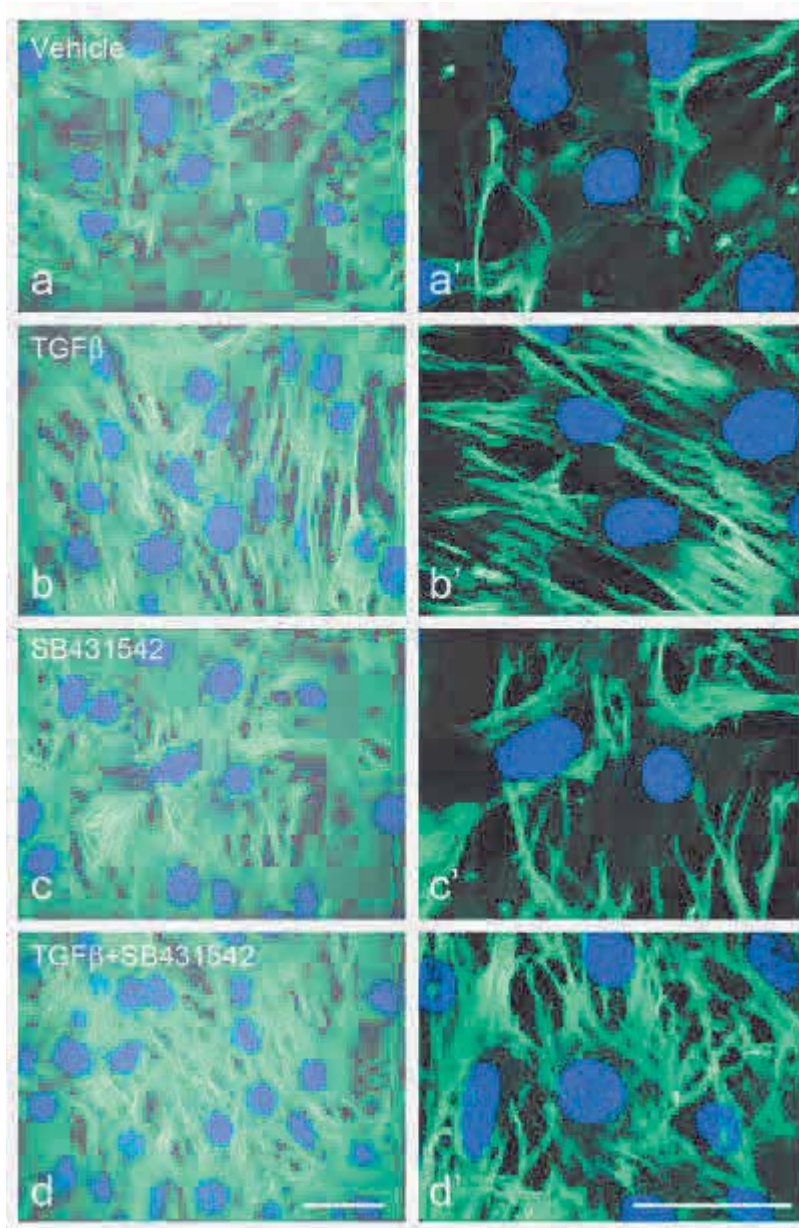


図 10 TGF β 刺激によるアクチン線維構造への影響
 未刺激、TGF β 、またはシグナル伝達阻害剤 SB431542 を添加して培養下
 TtT/GF 細胞を Phalloidine で染色した。

表 7 TGFβ 刺激に依存して発現量が変動した各細胞種のマーカータンパク質

Name	Symbol	UP/DOWN	TGFβ/SB431542 (log ratio)	References
<i>Pericyte</i>				
Actin, aortic smooth muscle	ACTA	UP	3.15	Lu and Shenoy, 2017
Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3	UP	2.97	Saunders <i>et al.</i> 2006, Azuma <i>et al.</i> 2015,
Transgelin	TAGLN	UP	2.69	Lu and Shenoy, 2017
Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	UP	1.50	Fujiwara <i>et al.</i> 2010, Alimuddin <i>et al.</i> 2016
Chondroitin sulfate proteoglycan 4	CSPG4	UP	1.37	Lu and Shenoy, 2017
Thrombospondin-1	THBS1	UP	1.24	Schor <i>et al.</i> 1995
Nestin	NES	UP	0.87	Krylyshkina <i>et al.</i> 2005
Filamin-A	FLNA	UP	0.67	Shojaee <i>et al.</i> 1998
<i>Smooth muscle cell</i>				
Actin, aortic smooth muscle	ACTA	UP	3.15	Lu and Shenoy, 2017
Transgelin	TAGLN	UP	2.69	Lu and Shenoy, 2017
Calponin-1	CNN1	UP	2.01	Hughes and Chan-Ling, 2004
Fibulin-2	FBLN2	UP	1.54	Strom <i>et al.</i> 2006
Chondroitin sulfate proteoglycan 4	CSPG4	UP	1.37	Hughes and Chan-Ling, 2004
Caldesmon 1	CALD1	UP	1.26	Hughes and Chan-Ling, 2004
<i>Pituitary adenoma</i>				
Cathepsin B	CTSB	DOWN	-1.08	Tanase <i>et al.</i> 2014
Ezrin	EZR	DOWN	-1.89	Chen <i>et al.</i> 2017
Galectin-3	LGALS3	DOWN	-2.29	Righi <i>et al.</i> 2013, Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Stem cell</i>				
Laminin subunit alpha-5	LAMA5	DOWN	-1.27	Domogatskaya <i>et al.</i> 2008
<i>Thyrotrope</i>				
Thy-1 membrane glycoprotein	THY1	DOWN	-1.02	Horiguchi <i>et al.</i> 2016
<i>Folliculostellate cell</i>				
Annexin A1	ANXA1	DOWN	-0.93	Ozawa <i>et al.</i> 2002, Chapman <i>et al.</i> 2002

*Values are average of logarithmic ratios (n=2 or 3). For all data, see Electronic Supplementary Material Table S3 and S4.

業績

1. *Tsukada, T., Yoshida, S., Kito, K., Fujiwara, K., Yako, H., Horiguchi, K., Isowa, Y., Yashiro, T., Kato, T., Kato, Y. TGF β signalling reinforces pericyte properties of the non-endocrine mouse pituitary cell line TtT/GF. *Cell Tissue Res.* **371**, 339-350. 2018.
2. *Kito, K., Okada, M., Ishibashi, Y., Okada, S., Ito, T. A Strategy for Absolute Proteome Quantification with Mass Spectrometry by Hierarchical Use of Peptide-concatenated Standards. *Proteomics.* **16**, 1457-1473. 2016.
3. *Kito, K., Ito, H., Nohara, T., Ohnishi, M., Ishibashi, Y., Takeda, D. Yeast inter-species comparative proteomics reveals divergence in expression profiles and provides insights into proteome resource allocation and evolutionary roles of gene duplication. *Mol Cell Proteomics.* **15**, 218-235. 2016.
4. *Tsukada, T., Isowa, Y., Kito, K., Yoshida, S., Toneri, S., Horiguchi, K., Fujiwara, K. Yashiro, T., Kato, T., *Kato, Y. Identification of TGF β -induced proteins in non-endocrine mouse pituitary cell line TtT/GF by SILAC-assisted quantitative mass spectrometry. *Cell Tissue Res.* In press.