

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14741

研究課題名(和文) リボソーム内に存在するリプログラミング機能ドメインの同定

研究課題名(英文) Identification of the re-programming function domain existing in ribosome

研究代表者

太田 訓正(OHTA, KUNIMASA)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：90244128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌をホモジネートして、フラクションに分離し、細胞塊形成実験を行ったところ、あるシングルフラクションに、細胞塊形成を引き起こす活性があることを見出した。この中には、リボソームを構成するタンパク質が多く含まれることを見出した。そこで、乳酸菌からリボソームを超遠心法で精製し、細胞塊形成実験を行ったところ、細胞塊が形成された。以上の結果から、リボソームが乳酸菌由来のリプログラミング物質の可能性を明らかにした(Ito et al., revised)。

研究成果の概要(英文)：I homogenized the lactic acid bacteria (LAB), separated them to each fraction by chromatography, and performed the cell cluster formation assay. I found that a single fraction has cell cluster formation activity and it contained some proteins derived from the ribosome. Then, I purified the ribosome from LAB by the ultra centrifugation, and performed the same cell cluster formation assay. Interestingly, it showed the cell clusters formation. From these results, I confirmed that the reprogramming material from LAB is ribosome (Ito et al., revised).

研究分野：生物学

キーワード：リボソーム 幹細胞 リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

約5億年前に誕生したヒドラ(腔腸動物)は、エサを消化する「腸」をつくりだし、進化した腸は、捕食動物のあらゆる臓器の原始であると考えられる。その捕食・消化吸収に欠かせない共生細菌である乳酸菌は、「食すれば医者いらず」とさえ言われほど、ヒト小腸の主要な細菌である。しかしながら、学術としての乳酸菌と小腸細胞の相互作用の実態はほとんど調べられていない。

我々のグループは、ヒト皮膚細胞が乳酸菌を取り込むことにより細胞塊を形成し、多能性を獲得することを世界で初めて報告した(Ohta et al., PLOS ONE e51866, 2012)。細胞にバクテリアを感染させ、宿主細胞にリプログラミングを誘導するというアイデアは全く新規で独創的なものであったにも関わらず、私たちの結果を信じる研究者はほとんど存在しなかった。この発見に対する特許は、国内外で特許を取得済みであり(日本:第6040494号、アメリカ:US9587224)、ヨーロッパには申請中である(PCT/JP2012/067544、特願2013-82797)。

興味深いことに、2013年に入り、末梢神経系のシュワン細胞がハンセン病の原因であるライ菌(グラム陽性)に感染することにより、シュワン細胞が幹細胞に分化転換するという論文(Masaki et al., Cell 2013)が発表された。すなわち、我々は世界に先駆けて、バクテリアが細胞に感染して宿主細胞をリプログラムし、その遺伝子発現に影響を与える現象を報告したことになる。

2. 研究の目的

我々は、ヒト皮膚細胞に乳酸菌を取り込ませると、多能性細胞が作製できることを報告したが(Ohta et al., PLOS ONE 2012)、次の問題は何か乳酸菌由来のリプログラミング物質であるか?である。乳酸菌を大量培養後、様々なクロマトグラフィーや質量分析法を用いた生化学的解析により、乳酸菌由来リプログラム物質がリボソームであることを見出している(Ito et al., revised)。本研究では、多能性獲得を担うリボソーム内の機能ドメインの同定を目的とした。具体的には、リボソームを大サブユニット、小サブユニットとrRNAに分離し、細胞塊形成能を有する領域を確認した後、個々のリボソームタンパク質(発現ベクターは入手済み)とrRNAを精製し、リプログラミングを担う機能ドメインを絞り込み、リボソームによる多能性獲得機序を明らかにすることにより、細胞の多能性獲得に関する新たなコンセプトの創出に迫る。

3. 研究の方法

トップダウン実験として、リボソームを大サブユニット、小サブユニットとリボソーム

RNA(rRNA)に分離し、それらを個別または組み合わせてヒト皮膚細胞に取り込ませ、細胞塊形成能を調べる。

精製した大腸菌リボソームの大サブユニット、小サブユニット、並びにrRNAを用いて細胞塊形成実験を行う。サンプルとしては、大サブユニット、小サブユニット、大サブユニット+小サブユニット、rRNA、rRNA+大サブユニット、rRNA+大サブユニットを各々の濃度を調節しながら調べる。ポジティブコントロールとしては、invitroで再構築されたリボソームを用いる。この実験により、細胞塊形成能が各々のサブユニットに存在するのか、またはリボソーム複合体としての構造が必要であるのかを明らかにできる。

ボトムアップ実験としては、個々のリボソームタンパク質(発現ベクターは入手済み)を産生し、単独または他のタンパク質やrRNAとの組み合わせにより、細胞塊形成能を調べる。これらの実験を繰り返し行うことにより、細胞塊形成能を有するターゲットを絞り込み、リボソーム内に存在するリプログラミングドメインを同定する。

我々が独自に確立した実験方法は、以下に示すように簡便な方法であり、細胞塊形成活性の判定を容易にフォローできる。1)ヒト皮膚細胞(Human dermal fibroblast, Cell application社)を培養する。2)トリプシン+EDTA処理を行い、細胞をシングルセルになるように懸濁する。3)トリプシン阻害液を加えて反応を止め、細胞数をカウントし、予めサンプルを加えておいた4well dishに細胞を加え、数日後に細胞塊形成を観察する。ポジティブコントロールとして、リボソームそのものを用いる。

大腸菌リボソームを構成する54種類のタンパク質を産生する発現ベクター(His-tag付与)は、ナショナルバイオリソースプロジェクト(遺伝学研究所)より入手済みである。1)個々のリボソームタンパク質発現ベクターを感染させた大腸菌を培養後、IPTG処理を行い、タンパク質合成を誘導する。2)大腸菌をホモジェナイズし、His-tagカラムをとおしてタンパク質を精製し、各々のタンパク質を用いて細胞塊形成を観察する。

予備的な実験では、これらのタンパク質の中に細胞塊形成の活性を持つものが見つかり、今後さらなる解析を進める(未発表データ)。リプログラミングタンパク質を同定後は、以下の実験により細胞の多能性を確認する

1)抗多能性マーカー抗体(Oct4、Nanogなどの多能性マーカータンパク質)による免疫染色法。

2)シングルセルレベルでのqPCR法による多能性マーカー遺伝子の発現解析。

3)細胞種特異的な分化誘導培養液による細

胞塊を構成する細胞の分化誘導。

4. 研究成果

トップダウン実験

リボソームを大サブユニットと小サブユニットに分離を試みた。リボソーム学会でリボソーム研究者から大サブユニットと小サブユニットの分離はとても難しく、素人の私たちが精製を行っても必ずコンタミが存在することを聞いた。そこで、乳酸菌からリボソーム RNA を分離し、ヒト皮膚細胞を用いて細胞塊形成実験を行ったが、リボソーム RNA 単独では細胞塊形成能が無いことが明らかになった。大サブユニットと小サブユニットの分離実験は行っていない。

ボトムアップ実験

個々のタンパク質を産生する発現ベクターを感染させた大腸菌を培養後、IPTG 処理を行ったが、タンパク質の産生が各々のタンパク質で異なり、簡単にはタンパク質を産生・精製できないことが分かった。しかしながら、幾つかのタンパク質は His-tag カラムをとおすことにより綺麗に精製できた。各々の精製タンパク質を用いて細胞塊形成実験を行ったところ、単独で細胞塊を形成できるタンパク質が明らかになった。現在は、他のタンパク質の精製を試みながら、このタンパク質の機能解析を詳細に行っている。

リボソームに細胞をリプログラミングする活性があることは、乳酸菌を用いた研究の場合と同様に、当初は全く予期していない結果であった。その後、様々な学会等で聴衆の方々から頂いた疑問点を一つ一つ解決することにより、私たちはリボソームが細胞をリプログラミングできる活性を有することを確信している。今後は、さらに研究を進め、リボソームを構成する何がリプログラミング因子であるかを解明していきたい。

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 9 件)

K. Ohta, Ribosome incorporation into somatic cells promotes reprogramming towards multipotency without activating cell proliferation. 2017年3月15日-18日, University of Kiel. (Kiel, Germany) .

太田訓正, リボソームによる細胞の多能性獲得機能. 第16回日本再生医療学会総会, 2017年3月7日-9日, 仙台国際

センター(宮城県仙台市).

伊藤尚文, 太田訓正, Bacterial ribosome incorporation into somatic cells promotes reprogramming towards multipotency without activating cell proliferation. 第6回オルソオレガノジェネシス検討会. 2016年12月7日-9日. リザンシーパークホテル, シーサイドハウス(沖縄科学技術大学院大学 OIST). (沖縄県恩納村).

伊藤尚文, 太田訓正, Ribosome Incorporation into Somatic Cells Promotes Reprogramming towards Multipotency without Activating Cell Proliferation. 第39回日本分子生物学. 2016年11月29日-12月1日. パシフィコ横浜. (横浜市).

伊藤尚文, 太田訓正, Ribosome Incorporation into Somatic Cells Promotes Reprogramming towards Multipotency without Activating Cell Proliferation. The 4th Ribosome Meeting. 2016年9月17日-18日. 大阪医科大学(大阪府高槻市).

太田訓正, Ribosome Incorporation into Somatic Cells Impedes Proliferation in Conjunction with Conferring Differentiability into All Three Germ-Layer Lineages. RNA JAPAN 2016. 2016年6月28日-7月2日. 国立京都国際会館(京都市).

太田訓正, 発酵菌による細胞リプログラミング機構の解明. 発酵研究所第10回助成研究報告会. 2016年6月10日. 里ライフサイエンスセンター(大阪府吹田市).

太田訓正, Ribosomes convert human fibroblasts into multipotent cells. JSDB Special Symposium. 2016年6月1日-2日. 東京都文京区(東京大学).

太田訓正, Ribosomes convert human fibroblasts into multipotent cells. 第14回幹細胞シンポジウム. 2016年5月20日-21日. 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 2 件）

名称：発酵能を有する細胞を用いた多能性細胞の製造方法
発明者：太田訓正
権利者：国立大学法人 熊本大学
種類：特許
番号：6040494号
取得年月日：平成28年11月18日
国内外の別：国内

名称：METHOD FOR PRODUCING PLURIPOTENT CELL USING BACTERIUM HAVING FERMENTATION ABILITY
発明者：Kunimasa Ohta
権利者：NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY
種類：PATENT
番号：US 9,587,224
取得年月日：MAR. 7, 2017
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等
<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/department/devneuro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 訓正 (OHTA KUNIMASA)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：90244128

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

伊藤 尚文 (ITO NAOFUMI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・研究員
研究者番号：60732716