

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06138

研究課題名(和文) 簡便なりボソームインタラクトーム解析法によるMyc依存的ながん原りボソームの同定

研究課題名(英文) Functional characterization of Myc-dependent ribosomes by Ribo Mega-SEC coupled to mass spectrometry-based proteomics

研究代表者

吉川 治孝 (YOSHIKAWA, Harunori)

徳島大学・先端酵素学研究所・助教

研究者番号：60709567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リボソームは生物に必須の細胞内翻訳装置である。がん細胞はリボソーム合成を活性化させてリボソーム量を増やし、その成長と増殖に必要なタンパク質量を確保する。転写因子Mycはリボソームの全構成成分の遺伝子転写等を介してリボソーム量の増加に寄与する。本研究では、Mycによるリボソームの質的变化とそれに起因する翻訳能の変化も細胞がん化に関わるのではないかと、という仮説のもと、Myc依存的なリボソームとの相互作用タンパク質の変化を系統的に解析することで、Myc依存のかつ特異的リボソームの分子実体の解明に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌感染症の治癒などに大きく貢献してきた抗生物質は、現代の医療においてはなくてはならないものである。その抗生物質のほとんどはリボソームによるタンパク質合成を阻害することで細菌の増殖を抑制する。つまりリボソームの機能阻害は有用な薬剤標的の一つである。Mycが高発現している腫瘍は全体の約7割に及ぶ。本研究で明らかにされたMyc発現依存のかつ特異的リボソームはがん細胞特異的な翻訳メカニズムについての理解を深め、Mycを高発現する腫瘍において新しい治療戦略の構築にも展開できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The ribosome is an intracellular machinery to translate mRNAs to proteins. In cancer cells, ribosome biogenesis which occurs in nucleoli is highly activated to increase in the ribosomes, leading to elevated protein synthesis enabling cell growth and proliferation. Myc, a transcription factor, increases in the ribosomes by upregulating transcription of ribosomal protein genes and ribosomal RNA. In this study, we hypothesized that Myc can alter ribosome biogenesis and generate Myc-dependent specialised ribosomes, resulting in changes in mRNA translation leading to tumorigenesis. Therefore, I aimed to identify changes in protein composition in the ribosomes between normal cells and high Myc-expressing cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：特殊化リボソーム サイズ排除クロマトグラフィー プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

細菌感染症の治癒などに大きく貢献してきた抗生物質は、現代の医療においてはなくてはならないものである。その抗生物質のほとんどはリボソームによるタンパク質合成を阻害することで細菌の増殖を抑制する。つまり、リボソームの機能阻害は有用な薬剤標的の一つである。

全生物に普遍的な細胞内タンパク質合成装置リボソームは、これまで多様性がなく、mRNA 情報をただ単に翻訳するだけの静的な装置として認識されてきた。しかし、近年のプロテオミクス・次世代シーケンシング・電子顕微鏡技術の発展により、リボソーム研究は一変した。というのも、(1) リボソームは不均一 (heterogeneity) で多様性を有する、(2) 組織特異的なリボソーム相互作用因子や翻訳後修飾を受けたリボソームタンパク質が含まれる「特殊化リボソーム」が存在する、(3) その特殊化リボソームが選択的に mRNA を翻訳する、といった動的性質が次々と明らかになってきたためである。そこで新たな薬剤標的や治療標的に向けて、組織特異的な特殊化リボソームや疾患と関連する特殊化リボソームの解析がなされつつある。

しかし一般的なリボソームの分離法であるショ糖密度勾配遠心分離 (SDG) 法は、(1) 操作が煩雑で時間を必要とすること、(2) 分離能と再現性が低いこと、(3) 感度が低いために特に臨床検体などの少量のサンプルには不向きなこと、などのデメリットを有しており、研究開発を妨げている。そこで効率の良いリボソーム分離法を用いることで、特殊化リボソームの分子実体の解明が求められている。

2. 研究の目的

上記の学術的背景から、がん細胞においてがん特異的な特殊化リボソームが存在し、細胞がん化やがんの進展に積極的に関わっているのではないかと考えた。そこで本研究では、独自に開発したリボソーム分離法「Ribo Mega-SEC」を用いて上記の技術的問題点を克服するとともに、がん原遺伝子 Myc を高発現する神経芽腫 (neuroblastoma) に特異的な特殊化リボソームを同定すること、その分子実体を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでにサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によってリボソームを短時間かつ高分解能で分離する Ribo Mega-SEC を開発している。この方法により、従来よりも多数のサンプル解析が可能だけでなく、少量のサンプルでも高感度で、かつ高い再現性も実現している (図 1)。そこで、まずは Ribo Mega-SEC によってポリソームレベル・リボソームサブユニットレベルの変動解析を行うこととした。これまでの研究から、Ribo Mega-SEC と定量プロテオーム解析との融合によるリボソームサブユニット特異的な相互作用因子の同定法を確立している (図 1)。そこで、これらの方法により Myc を高発現する神経芽腫に特異的なリボソームを同定することとした。

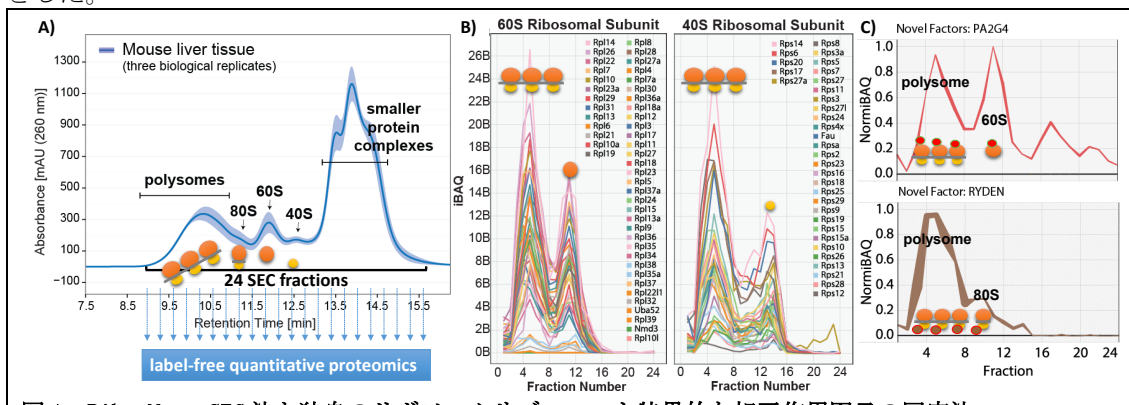


図 1: Ribo Mega-SEC 法と独自のリボソームサブユニット特異的な相互作用因子の同定法

- Ribo Mega-SEC によるマウス肝臓組織からのリボソームの分離：中心線は三回の独立した試行から得られた平均値、周りの影はその標準偏差を示している
- 定量プロテオーム解析によって得られたリボソーム構成タンパク質の定量プロファイル
- リボソームタンパク質の定量プロファイルをもとに、例えば PA2G4 は 60S サブユニット特異的に (上図)、そして RYDEN は翻訳活性のあるポリソームと 80S リボソームに (下図)、それぞれ結合すると判定できる

4. 研究成果

薬剤添加によってがん原遺伝子 Myc の発現を調節できる神経芽腫細胞 Tet21N を用いて、Myc 発現時および非発現時のポリソームと各リボソームの分布を Ribo Mega-SEC 法により調べた。その結果、Myc 発現時には翻訳活性の低い 80S リボソームが減少し、翻訳活性の高いポリソームが増加していた (図 2)。これは Myc 発現により 80S リボソームが特殊化を受けることで、単一の mRNA に 80S リボソームが複数個結合した「ポリソーム構造」を形成しやすくなる、という可能性を示唆している。またこの結果は Myc によって細胞はがん化するが、一般的にがん細胞はその成長と増殖に必要なタンパク質量を確保するために翻訳能を亢進することと一致している。

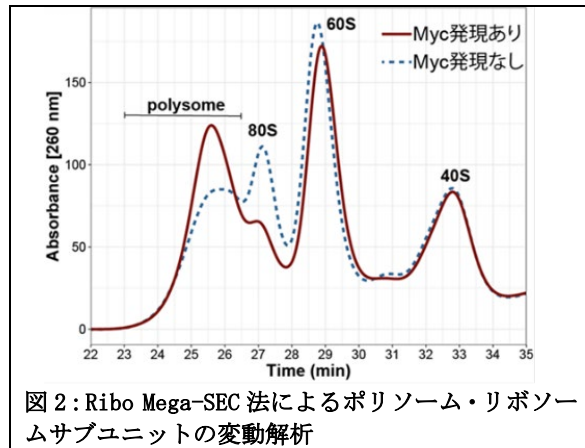


図 2: Ribo Mega-SEC 法によるポリソーム・リボソームサブユニットの変動解析

次に Myc 依存的に形成が促進されたポリソームフラクションに対して定量プロテオーム解析を行うことで、Myc を高発現する神経芽腫に特異的なリボソームの同定を試みた。具体的にはポリソームフラクションに含まれるタンパク質を精製後、消化酵素トリプシンを用いることでペプチドを生成し、LC-MS/MS 解析を行なった。その結果、2800 以上のタンパク質の同定と定量に成功した。さらにリボソーム構成タンパク質に注目してより詳細なデータ解析を行ったところ、RPL22 と RPL31 が Myc 発現時に特にポリソームに取り込まれていることを見出した (図 3)。

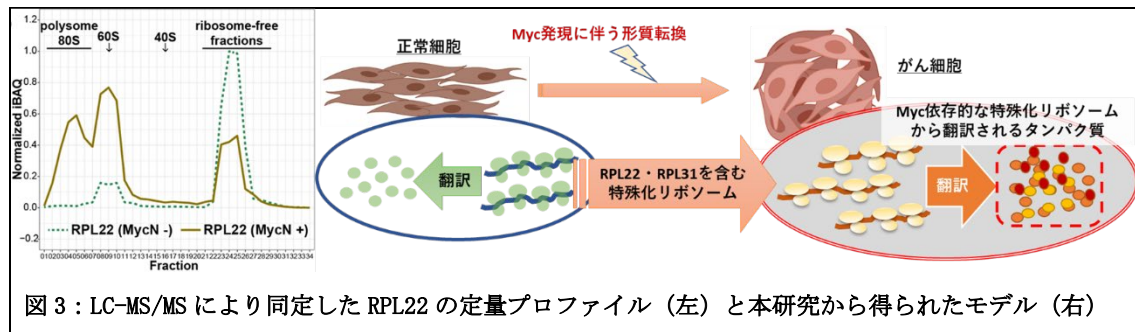


図 3: LC-MS/MS により同定した RPL22 の定量プロファイル (左) と本研究から得られたモデル (右)

現在では RPL22 に着目したさらなる解析を行っている。具体的には RPL22 の相互作用解析により、細胞がん化と翻訳活性化を結びつける因子群の特定に成功している。RPL22 と特定した因子群の機能解析をより詳細に行うことで、Myc 依存的に形成される神経芽腫特異的リボソームと細胞がん化との関連性の解明につなげる。

また本研究の開始時には最新の uHPLC 装置が現所属に導入されたため、本装置に適したリボソームの分離条件やリボソーム以外のタンパク質複合体の分離条件を最適化した。その結果、従来法よりも高感度で、かつ高再現的なリボソームの分離や様々なタンパク質複合体の分離に成功している。重要なことに、現在の方法では高感度がゆえに数十マイクログラム程度のタンパク質を含む試料からもリボソームを分離でき、さらに試料間でポリソーム量・リボソームサブユニット量の統計的有意な変動も見出している。このことは、将来的に臨床検体等のタンパク質量に限りのある試料からのリボソームや様々なタンパク質複合体の分離と解析も可能であることを示している。以上の内容を含む研究成果の一部は、国際共著論文として国際誌に発表している (Rodriguez-Algarra F *et al.*, 2022 *Genome Biol.*, Faria JRC *et al.*, 2023 *Nat. Commun.*)。

【引用文献】

Faria JRC, Tinti M, Marques CA, Zoltner M, Yoshikawa H, Field MC, Horn D. “An allele-selective inter-chromosomal protein bridge supports monogenic antigen expression in the African trypanosome” *Nat Commun.* 2023 Dec 11;14(1):8200.

Rodriguez-Algarra F, Seaborne RAE, Danson AF, Yildizoglu S, Yoshikawa H, Law PP, Ahmad Z, Maudsley VA, Brew A, Holmes N, Ochôa M, Hodgkinson A, Marzi SJ, Pradeepa MM, Loose M, Holland ML, Rakyan VK. “Genetic variation at mouse and human ribosomal DNA influences associated epigenetic states.” *Genome Biol.* 2022, 23:54

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishino Kohei, Yoshikawa Harunori, Motani Kou, Kosako Hidetaka	4. 巻 21
2. 論文標題 Optimized Workflow for Enrichment and Identification of Biotinylated Peptides Using Tamavidin 2-REV for BioID and Cell Surface Proteomics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 2094 ~ 2103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.2c00130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshikawa Harunori, Nishino Kohei, Kosako Hidetaka	4. 巻 258
2. 論文標題 Identification and validation of new ERK substrates by phosphoproteomic technologies including Phos-tag SDS-PAGE	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Proteomics	6. 最初と最後の頁 104543 ~ 104543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jprot.2022.104543	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Rodriguez-Algarra Francisco, Seaborne Robert A. E., Danson Amy F., Yildizoglu Selin, Yoshikawa Harunori, Law Pui Pik, Ahmad Zakaryya, Maudsley Victoria A., Brew Ama, Holmes Nadine, Ochoa Mateus, Hodgkinson Alan, Marzi Sarah J., Pradeepa Madapura M., Loose Matthew, Holland Michelle L., Rakyan Vardhman K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Genetic variation at mouse and human ribosomal DNA influences associated epigenetic states	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genome Biology	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13059-022-02617-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Faria Joana R. C., Tinti Michele, Marques Catarina A., Zoltner Martin, Yoshikawa Harunori, Field Mark C., Horn David	4. 巻 14
2. 論文標題 An allele-selective inter-chromosomal protein bridge supports monogenic antigen expression in the African trypanosome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-44043-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Brenes Alejandro J., Griesser Eva, Sinclair Linda V., Davidson Lindsay, Prescott Alan R., Singh Francois, Hogg Elizabeth K.J., Espejo-Serrano Carmen, Jiang Hao, Yoshikawa Harunori, Platani Melpomeni, Swedlow Jason, Findlay Greg M., Cantrell Doreen A., Lamond Angus I.	4. 巻 -
2. 論文標題 Proteomic and functional comparison between human induced and embryonic stem cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.92025.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉川治孝、小迫英尊
2. 発表標題 Protein Correlation Profilingによる細胞内巨大タンパク質複合体の解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川治孝、小迫英尊、Lamond Angus
2. 発表標題 核小体ヒトプレリボソームの新規分離法が切り拓く リボソーム合成因子の網羅的解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川治孝
2. 発表標題 Co-Fractionation MSによる細胞内巨大タンパク質複合体の解析
3. 学会等名 第71回質量分析総合討論会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉川治孝
2. 発表標題 Co-Fractionation MS (CF-MS) による細胞内巨大タンパク質複合体の解析
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉川治孝
2. 発表標題 定量プロテオミクスによる核小体リボソーム生合成過程の解明
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会 JPrOS2023 (21st JHUP0) (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 馬場健史、松本雅記、松田史生、山本敦史、吉川治孝、及川彰、三浦大典、谷水雅治、松井誠一、小林大樹、増田豪、川島祐介、幡野敦、大槻純男、津曲和哉、小形公亮、石濱泰、今見考志、足達俊吾、足立淳	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 363
3. 書名 決定版質量分析活用スタンダード	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

英国	University of York	University of Dundee	Queen Mary University of London	
----	--------------------	----------------------	---------------------------------	--