

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580412

研究課題名（和文）

細胞自己複製および翻訳を共に促進する新規特性タンパク質の筋肉老化予防への応用

研究課題名（英文）

Studies on a novel protein promoting cell self-renewal and translation for the application of muscle anti-aging

研究代表者

灘野 大太 (NADANO DAITA)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：00228074

研究成果の概要（和文）：ビスチンと命名されたヒトのタンパク質は、幹細胞様の未分化な細胞の自己複製に必要である、および細胞内の翻訳活性化に重要である、というユニークな特性をもつことが示唆された。二種類の過程におけるビスチンの作用機構の多くが不明であったことから、ビスチンと協調して作用するタンパク質性因子を網羅的に探索し、新規性の高い因子が同定され解析を進めた。細胞数増加および細胞成長の両方が重要な筋細胞分化に適用可能なメカニズムにつながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The human protein, named bystin, has been indicated to be necessary for self-renewal of undifferentiated cells such as stem cells and to be important for translational activation in cells, and thus has a unique property playing two distinct roles. Because the molecular mechanisms for these roles were unclear, proteins cooperating with bystin were surveyed, and novel factors were identified and analyzed. These findings are expected to lead to useful mechanisms applicable to differentiation of muscular cells, which requires cell number increase and growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学

キーワード：細胞増殖・分化・発現制御・翻訳

1. 研究開始当初の背景

筋肉量は2種類のメカニズムによって決定される。すなわち筋細胞数と筋細胞の成長（太さ）である。筋細胞数は、その幹細胞である衛星細胞がどれくらい活発に自己複製し、筋芽細胞にコミットされるかによって決まる。筋芽細胞は増殖を続けた後、分裂を停止し、細胞融合を繰り返しながら多核の筋細胞

に分化する。筋繊維の太さは、分化した多核の筋細胞がタンパク質合成亢進によって細胞としていかに大きくなるかによって決まる。この2種類のメカニズムはいわば「車の両輪」で、いずれが不調になっても筋肉量の明らかな減少を生じ、個体に深刻な影響をもたらす。

骨格筋の筋肉量の減少（sarcopenia）は、

多くの高齢者を中心に見られる社会的な問題である。筋肉量の減少は、体機能の低下だけでなく、骨粗しょう症や糖尿病などの様々な疾患の要因になることが示唆されており、高齢者の健康を考える上で避けて通れない問題である。特に高齢化が急速に進みつつある我が国においては迅速な対応が必要である。

受精卵が母親の子宮内膜（表面）に接着する胚着床は、哺乳類の初期発生にとって重要な過程である。また着床後胚は盛んに分裂をすることから、細胞増殖系としても関心がもたれてきた。着床直前の胚表面に発現する細胞接着分子トロフィニンとその細胞質結合タンパク質ビスチン (bystin) について、ノックアウトマウス実験を含めた解析から、胚着床期におけるトロフィニン-ビスチン複合体の重要性が明らかにされた。この間の研究から、ビスチンはトロフィニンの接着シグナルを成長因子受容体キナーゼに伝え、着床後の細胞増殖をオンにすることがわかった。

ビスチンは真核生物において進化的に高度に保存されたタンパク質でありながら、初期胚以外での機能は不明であった。まず複数のヒト癌細胞株において、ビスチンが高い発現レベルを示し、核および細胞質に存在して両画分を往復していることを見出した。核内のビスチンはリボソーム生合成の場である核小体に強く検出された。また、細胞質ビスチンの一部はリボソーム小サブユニットに含まれていた。さらにビスチンのノックダウンによって、リボソーム小サブユニットの構成成分である 18S rRNA のプロセッシングに必要であることを示した。また、ビスチンの発現が mTOR キナーゼによって正に制御されることがわかった。これらのことにより、ビスチンにリボソームを中心とした翻訳制御との関わりという新たな一面が解明された。

2. 研究の目的

ビスチンは、ヒトの初期胚に発現するタンパク質として見出された。その後の申請者らの研究を含めて、ビスチンが①未分化な状態を保った細胞増殖（細胞の自己複製能）、および②翻訳の亢進、いずれにも重要であることが示された。ビスチンは細胞内局在を巧みに変えつつ、細胞自己複製と翻訳の2つの現象のかかわるという、いわば「一人二役」を担っている。本研究において、初期胚・癌細胞以外での組織発生・分化におけるビスチンの作用の解明を目指した。さらに、ビスチンの「一人二役」のユニークな特性の応用についても試みることにした。

筋肉量改善につながる分子レベルでのメカニズムの知見には限りがある。特に筋繊維数と筋繊維の太さの「両輪」を共に満足させる方法は見つかっていない。ビスチンは「両

輪」の包括的な解決を可能とする「一人二役」をこなす新規特性を有する分子である。発生生物学的興味に加えて、健康保持の観点からこれまでにない有益な知見が得られることが期待される。たとえば、筋老化防止への応用に有効なメカニズム、すなわち液性因子・低分子化合物（天然・合成）が、細胞・実験動物レベルでビスチンを核とした独自の観点からのスクリーニングによって導かれる。

3. 研究の方法

「一人二役」をこなすビスチンと共に作用するタンパク質を原理の異なる方法を組み合わせることで網羅的に同定することとした。具体的には、ビスチンと相互作用し複合体を形成するタンパク質を、タグ付きビスチンおよび内在性ビスチンに対する抗体を用いた沈降法および質量分析を用いて同定した。ビスチンについて、未分化細胞では、核において分化能に関連した核内遺伝子発現に、また細胞質において細胞周期制御因子への作用が想定された。分化した細胞では、核内でリボソーム生合成因子に、核外では翻訳関連因子に作用することが考えられた。すなわち、局在に依存して異なる役割に関与する可能性が高いため、各種細胞分画を含めた前処理を併用し、系統立てた探索をした。得られた共作用因子から特に細胞自己複製やタンパク質合成促進に有効と推定されるメカニズム・情報伝達系について、これらの作用機構を増強させる条件検討等を行い、応用に向けて細胞レベルで精査を行うという手順を進めた。

4. 研究成果

翻訳をつかさどるリボソームの生合成過程は厳密に制御されており、老化との深い関わりもモデル生物を中心として示唆された。しかしながら、その詳細なメカニズムについては未解明の部分が多く、特にリボソームを構成する二種類のサブユニットのうち 40S 小サブユニットの研究が遅れていた。細胞自己複製および翻訳を共に促進するビスチンタンパク質は 40S 小サブユニットにおける 18S リボソーム RNA の成熟に関わることが示唆されていたが、実際にどのような機能を持つかわかっていなかった。その解明を目的としてビスチンと相互作用するタンパク質の探索をプロテオミクスの手法を用いて試みた。グルタチオン S トラंसフェラーゼとビスチンの融合タンパク質を増殖が亢進した培養細胞に発現させてプルダウン実験を行ない、ビスチンと結合するタンパク質の候補をトリプシン消化物の質量分析によって同定した。その結果、小サブユニットのリボソームタンパク質が多数同定され、同サブユニットとビスチンの結合を支持する結果が得られた。さ

らに、リボスクレアーゼ処理を行なってリボソーム RNA 非依存的にビスチンと結合するタンパク質を解析した。その結果、小サブユニットの核外輸送に関わると推定されるタンパク質が複数同定され、ビスチンが小サブユニットの核外輸送複合体を形成することが示唆された。

ビスチンには既知の機能ドメイン等がないこともあり、ビスチンの作用機構の多くは不明であった。細胞自己複製および翻訳をビスチンと共に促進するのに必要なタンパク質因子を同定するため、ビスチンと共作用するタンパク質を別の観点からも網羅的に同定した。ビスチンの特徴として、その多機能性を効率よく発揮するため細胞内局在をダイナミックに変えることが示された。そこで、ビスチンの主要な細胞内局在の場所であるリボソームを含む翻訳装置の画分および細胞増殖に關与する可能性が想定される細胞質ゾル画分を新たに分離したうえで、それぞれにおいてビスチンと結合するタンパク質を詳細に探索した。まず効率よくビスチン結合タンパク質を同定するためビスチンを安定に発現する細胞株を確立した。次に細胞内のビスチンを含む複合体を、生化学的なアフィニティー精製法を用いて単離した。得られた複合体に含まれるタンパク質を分子量あるいは等電点を含む物理化学的特性の違い、さらにはこれらの組み合わせによって分離した。分離されたタンパク質からビスチンと物理的に結合し機能的にもリンクする可能性がある新規候補タンパク質のスクリーニングを実施した。その結果、これまでに学術論文等で報告されていない新規のタンパク質を含む候補タンパク質が同定された。これらのタンパク質のパラログのなかには、細胞レベルあるいは個体レベルで細胞の増殖を亢進することが報告されているものも含まれており、実際に同定タンパク質のがん細胞での発現が観察された。以上から今回同定された新因子は有望と考えられた。

引き続きビスチンと相互作用するタンパク質の網羅的探索を含む分子メカニズムの解明をより詳細にわたって実施した。その結果、新たな相互作用因子としての候補タンパク質が複数同定された。これらは機能未知の新規タンパク質あるいはすでに報告があるがビスチンとの相互作用を含めた本研究の目的とする作用が知られていない分子であった。そこでこれらのタンパク質の機能をビスチンとの相互作用を含めて分析した。候補タンパク質の機能を知る手がかりを得るため、それらの cDNA をクローニングし、細胞内で発現させ解析したところ、核小体に局在するものが見出された。核小体はがん細胞などの増殖が亢進した細胞において特徴的な形態をとり、また上記のとおりリボソーム

の生合成の場である。さらに、候補因子とビスチンの両者が共発現する細胞環境下において解析を進めたところ、両タンパク質の特異的でかつ強い作用が見出され、細胞の自己複製ならびに翻訳活性化に果たす新規のメカニズムが分子レベルで独自の視点から示された。

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 4 件)

1. Hosono, H., Yamaguchi, N., Oshima, K., Matsuda, T., and Nadano, D. The murine Gcap14 gene encodes a novel microtubule binding and bundling protein. *FEBS Lett.*, 586 (10): 1426-1430, 2012. 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2012.04.008

2. Moriya, H., Uchida, K., Okajima, T., Matsuda, T., and Nadano, D. Secretion of three enzymes for fatty acid synthesis into mouse milk in association with fat globules, and rapid decrease of the secreted enzymes by treatment with rapamycin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 508 (1): 87-92, 2011. 査読有
DOI: 10.1016/j.abb.2011.01.015

3. Taga, Y., Miyoshi, M., Okajima, T., Matsuda, T., and Nadano, D. Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B as a cytoplasmic mRNA-binding protein in early involution of the mouse mammary gland. *Cell Biochem. Function*, 28 (4): 321-328, 2010. 査読有
DOI: 10.1002/cbf.1662

4. Sugihara, Y., Honda, H., Iida, T., Morinaga, T., Hino, S., Okajima, T., Matsuda, T., and Nadano, D. Proteomic analysis of rodent ribosomes revealed heterogeneity including ribosomal proteins L10-like, L22-like 1, and L39-like. *J. Proteome Res.*, 9 (3): 1351-1366, 2010. 査読有
DOI: 10.1021/pr9008964

[学会発表] (計 7 件)

1. 佐土原英司・杉原圭彦・大島健司・松田幹・灘野大太: 発達段階に依存した精巣特異的リボソームタンパク質 L10-like の発現
2012 年度日本農芸化学会全国大会
2012. 3. 24 (京都女子大学)

2. 佐土原英司・杉原圭彦・大島健司・松田

幹・灘野大太：精巢特異的リボソームタンパク質の発達段階に依存した発現 第1回リボソームミーティング 2012. 3. 15 (広島大学)

3. 灘野大太・杉原圭彦・本多弘樹・日野真吾・岡島徹也・松田幹：プロテオミクスによる哺乳類リボソームにおける不均一性の解析 2010 年度日本農芸化学会全国大会 2010. 3. 30 (東京大学)

4. Sugihara, Y., Honda, H., Okajima, T., Matsuda, T., and Nadano, D. Proteomic analysis of rodent ribosomes revealed heterogeneity including ribosomal proteins L10 like, L22 like 1, and L39 like. The 8th international conference on ribosome biogenesis. 2009. 8. 28 (Regensburg, Germany)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

灘野 大太 (NADANO DAITA)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：00228074

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし