

令和元年5月29日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04795

研究課題名(和文) リボソームによる細胞の多能性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism for the acquisition of multipotency by 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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ほとんど全ての生物が有するリボソームによる細胞リプログラミング機能を解明し、細胞の多能性獲得に関する新たなコンセプトの創出を目的とした。リボソームはエンドサイトーシスとトリプシン処理の相乗作用により、細胞内に取り込まれることが明らかになった。リボソームタンパク質の中には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。ヒト癌細胞でさえ大腸菌由来リボソームを取り込むと、細胞塊を形成し、その増殖が完全に抑えられることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常細胞にリボソームを取り込ませると、細胞塊を形成し、増殖が停止する。ヒト癌細胞(肺癌、乳癌、大腸癌、肝臓癌)でさえ大腸菌由来リボソームを取り込むと、細胞塊を形成し、その増殖が完全に抑えられることをシャーレ内で見出している。今後は、正常細胞を用いた研究で得られた実験結果を、ヒト癌細胞にも応用することにより、ヒト癌細胞の細胞周期制御機構や細胞増殖停止機構を明らかに出来、将来の安全・安心な抗がん剤の開発に発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We tried to elucidate the molecular mechanism of cellular reprogramming by ribosome. We found that ribosome was incorporated into cells by endocytosis and trypsin treatment. We also found that one of ribosome proteins have a cell cluster formation activity. When we added ribosome into the human cancer cell after trypsin treatment, some human cancer cells formed cell cluster and stopped their cell proliferation.

研究分野：生物学

キーワード：リボソーム 多能性獲得 リプログラミング ヒト癌細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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」を作り出し、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、ヒト腸管の主要な善玉菌であり、糖を分解して乳酸を生成する細菌類の総称である。乳酸菌は、「現代医療のトップランナーとして未知なる可能性を持っている」と言われているが、学術としての乳酸菌と腸管細胞の相互作用の実態はほとんど調べられていなかった。

原核生物は、細胞小器官をもっておらず、DNA を保持する核すらなく、リボソームで満たされた簡単な構造をもち、不要なものをそぎ落とした生命の姿を見せてくれる。今世紀の初頭に、Steizらによりリボソームがペプチド転移反応を触媒するリボサイムであることが証明され、自己複製能を有する RNA の出現とその進化が生命の誕生をもたらしたとする「RNA ワールド仮説」は広く支持されている。

申請者のグループは、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 2012)。バクテリアが細胞に感染し、宿主細胞の遺伝子発現に影響を与えるという発見は全く独創的なものであったにもかかわらず、私たちの結果を信じる研究者はほとんどいなかった。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。現在では、申請者らの研究がブレイクスルーとなり、1)バクテリアが細胞に感染すること、2)取り込まれたバクテリアは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、多能性を付与することが認識されている。最近、申請者らは乳酸菌由来のリプログラミング因子の分子実体がりボソームであることを見出した(Ito et al., Sci Rep, 2018)。今振り返ってみると、「ヒト皮膚細胞が生きた乳酸菌を取り込むと細胞塊を形成する」という現象は、乳酸菌体内に充満するリボソームに起因する結果であったと考えれば得心がいく。

2. 研究の目的

本研究では、以下のメカニズムを明らかにすることにより、触媒活性を有するリボソームのリプログラミング機能ドメインを同定し、細胞の多能性獲得に関する新たなコンセプトの創出を目的とする。(1)リボソームの細胞内への取り込み、(2)外来リボソームのオートファジーからの攻撃回避、(3)細胞周期停止機構の解析、(4)多能性獲得時における発現およびエピジェネティクス解析、(5)リボソーム内のリプログラミングドメインの同定。(6)ヒト癌細胞にリボソームやリプログラミングドメインを取り込ませ、その細胞動態を観察し、細胞増殖停止機構を解明する。

3. 研究の方法

平成28年度の計画

私たちが独自に確立した実験方法は、とても簡便な方法であり、細胞塊形成活性の判定を容易に判定できる。

(1)「リボソームの細胞内への取り込み機構」

リボソームは、細胞外部から添加しても細胞内に取り込まれることは無いと考えられてきた。私たちは、トリプシン処理後の細胞に乳酸菌やリボソームが取り込まれることを発見しており、そのメカニズムとしてエンドサイトーシスが考えられる。また、トリプシン処理により添加物の取り込みが増強するという報告もあり(Serdiuk et al., 2014)、エンドサイトーシス阻害剤とトリプシン処理の組み合わせにより細胞塊形成実験を行った。

(2)「外来リボソームのオートファジーからの攻撃回避機構」

細胞内部に取り込まれたリボソームは、培養2週間後も検出されることから、プロテアソームやオートファジーの攻撃を回避したと考えられる。細胞周期の進行にはオートファジーが関与することや(Matsui et al., 2013)、オートファジー膜が小胞体とミトコンドリアと接触部で精製されることから(Hamasaki et al., 2013)、リボソームが翻訳を行う場である小胞体において、導入したリボソームが作用しオートファジーを阻害する可能性がある。そこで、オートファジー膜マーカーLC3抗体による蛍光抗体染色を細胞塊状態のまま細胞内の空間的位置を定量追跡できるイメージングサイトメーターを用いて行い、オートファジー因子 Atg の発現を qPCR 法により解析し、オートファジーの発生と進行を調べる。

(3)「細胞周期停止機構の解析」

リボソームによるリプログラミングには細胞増殖の停止が伴うことから、細胞周期を核染色法(PI)による FACS 解析や Fucci 発現マウス細胞のライブイメージングによる細胞周期状態の解析を行う。さらに、Cyclin D 等の細胞周期マーカーの免疫染色法及び qPCR 解析を行い、細胞周期の変遷を解析する。また、申請者らは超解像顕微鏡を用いて、大腸菌由来 His-tagged リボソームを導入して作製された細胞塊を観察したところ、核内部において大腸菌リボソームを検出した。リボソームタンパク質の中には、核タンパク質 MDM2 と結合して p53 を核内に係留することにより、細胞周期の進行を阻害しているものもある(Zhang et al., 2003)。そこで、

ヒト皮膚細胞に導入した大腸菌由来 His-tagged リボソームの結合パートナーを免疫沈降法で探索し、細胞内での機能位置と遺伝子発現制御を解明する。

平成29年度以降の計画

(4)「多能性獲得時における発現およびエピジェネティクス解析」

申請者らは、リボソームを取り込ませて作製した多能性細胞塊の解析を14日後に行ってきた。14日目後の細胞塊では、抗OCT4抗体を用いた免疫染色法によりモザイク状に陽性細胞が検出され、Bisulfite sequence 解析によってもクローン毎の脱メチル化レベルが多様であることから、細胞塊中の各々の細胞はヘテロな状態にあることが判明している。そこで、OCT4-GFP マウスまたは NANOG-GFP マウス由来の MEF 細胞にリボソームを取り込ませ、FACS により OCT4 または NANOG 誘導細胞のソーティングを行い、qPCR 発現解析及び Bisulfite sequence 解析によって細胞塊の中のヘテロな状態を分析し、多能性を獲得した細胞集団の選択を行う。選択された細胞については、ChIP-seq 法によるクロマチン構造の解析、PBAT 法による全ゲノムバイサルファイトシーケンス解析、並びに全ゲノム再編成解析 (Hi-C) を行い、リボソームによる多能性獲得時におけるエピゲノムの全貌を解明する。

(5)「リボソーム内のリプログラミングドメインの同定」

トップダウン実験として、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い、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する。ボトムアップ実験として、大腸菌リボソームを構成する個別のタンパク質による細胞塊形成能を調べる。個々のリボソームタンパク質の発現ベクターは、ナショナルバイオリソースプロジェクト (遺伝学研究所) より入手し、タンパク質の精製を行っている。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。

(6)「リボソームとリプログラミングドメインの癌細胞への影響」

ヒト癌細胞でさえ大腸菌由来リボソームを取り込むと、細胞塊を形成し、その増殖が完全に抑えられる。形成された細胞塊を特殊な細胞分化液で培養することにより、がん細胞がリボソームを取り込むことにより形質転換が誘導されるか検討する。上記研究プロジェクトで得られた実験結果を癌細胞にも応用することにより、その細胞周期制御機構や細胞増殖停止機構を明らかにする。

4. 研究成果

【平成28年度】

(1)リボソームが取り込まれる分子メカニズム

細胞内にリボソームが取り込まれる際には、トリプシンのような酵素処理が必要か検討した。蛍光ビーズ (直径 50 nm) を培養中の細胞に添加しても、細胞内への取り込みはほとんど観察されないが、トリプシン処理後の細胞に蛍光ビーズを加えると細胞内への取り込みが劇的に増加した。次に、6種類のエンドサイトーシス阻害剤 filipin (FP)、genistein (GS)、cytochalasinB(CC)、bafilomycinA1(BM)、concanamycinA (CM)、5-(N-ethyl-N-isopropyl) -amiloride (EA) を購入し、細胞毒性を示さない濃度レベルで準備し、リボソームと混ぜ、96 well に加えた。ヒト皮膚細胞を酵素処理し、細胞数 (2×10^4) を数え、96 well に添加し、数日後に細胞塊の数を調べ、その効果を検討した。6種類のエンドサイトーシス阻害剤の存在下では、細胞塊形成が約 50%阻害された。濃度を上げていくと細胞塊形成率はさらに減少するが、同時に細胞死も多く観察されることから、細胞死が観察されない濃度で実験を行った。

(2)我々のグループで用いてきた細胞塊形成実験の条件に従って、ニワトリ幹細胞を用いて細胞塊形成を行ったが、上手く細胞塊が形成されなかったことから、詳細なプロトコールの条件決めを行う。

【平成29年度】

Human Dermal Fibroblasts (HDF) にリボソームを取り込ませて作製した細胞塊の、多能性獲得時における発現解析及びエピジェネティクス解析を行った。qPCR 発現解析及び Bisulfite sequence 解析によって細胞塊の中のヘテロな状態を分析し、多能性を獲得した細胞集団の均一性を調べたところ、細胞塊を形成する細胞は Heterogenous な細胞集団から構成されていることが明らかになった。この結果は、Oct4 や Nanog などの多能性マーカーを認識する抗体染色法やシングルセルでの qPCR 解析でも再現されている (Ito et al., Scientific Reports, 2018)。

リボソーム内のリプログラミングドメインの同定。精製した大腸菌リボソームの大・小サブユニット、並びに rRNA を用いて細胞塊形成実験を行い、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することを試みた。まず、リボソームを熱処理すると細胞塊形成性能が消失した。また、精製した rRNA では、細胞塊形成効果がないことが明らかになった。

リボソームによるニワトリ細胞初期化法の確立を試みた。京都大学・高橋淑子教授との共同研究により、ニワトリ胚尾部に存在する幹細胞様の細胞を単離し、His タグラベルされ

たりボソームを取り込ませる計画であったが、幹細胞様細胞の培養が上手くいかなかった。今後は、幹細胞様細胞での細胞培養を確立する必要がある。

【平成30年度】

トップダウン実験として、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、並びにリボソーム RNA を用いて細胞塊形成実験を行い、細胞塊形成能が各々のサブユニットに存在するのか、リボソーム RNA でだけで形成するのか、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する。

ボトムアップ実験として、大腸菌リボソームを構成する個別のタンパク質とリボソーム RNA の組み合わせによる細胞塊形成能を調べる。個々のリボソームタンパク質の発現ベクターは、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。個々のタンパク質は His タグが付与されていることから、His タグカラムを用いてタンパク精製を行った。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。

「リボソームとリプログラミングドメインの癌細胞への影響」

我々は、ヒト癌細胞（肺癌、乳癌、大腸癌、肝臓癌、）でさえ大腸菌由来リボソームを取り込むと、細胞塊を形成し、その増殖が完全に抑えられることをシャーレ内で見出した（未発表データ）。さらに、癌細胞にリボソームを取り込ませ、免疫不全マウスの皮下に細胞移植を行い、数週間後に腫瘍の直径や体積を計り、生体内における腫瘍形成抑止力を検討している。現時点では、リボソームによる癌細胞の増殖抑制は観察されていないが、移植前にリボソームを癌細胞に取り込ませ、腫瘍形成時にも数カ所にリボソームを投与することにより、その効果を検討している。今後は、正常細胞を用いた研究で得られた実験結果をヒト癌細胞にも応用することにより、その細胞周期制御機構や細胞増殖停止機構を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 9 件）

Ohta K., Aoyama E., Ahmad SAI., Ito N., Anam MB., Kubota S., and Takigawa M. CCN2/CTGF binds the small leucine rich proteoglycan protein Tsukushi. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 査読有. 13(1), 2019. pp113-118. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12079-018-0487-x>.

Wang, Q., Sharma, V.P., Shen, H., Xiao, Y., Zhu, Q., Xiong, X., Guo, L., Jiang, L., Ohta, K., Li, S., Shi, H., Rui, L., and Lin, J.D. The hepatokine Tsukushi gates energy expenditure via brown fat sympathetic innervation. *Nature Metabolism*. 査読有. (1), 2019. pp251-260. <https://www.nature.com/articles/s42255-018-0020-9>.

Ito N., Anam MB., Ahmad SAI., Ohta K. Transdifferentiation of human somatic cells by ribosome. *Development, Growth & Differentiation*, 査読有. 60(5), 2018. pp 241-247. DOI: 10.1111/dgd.12538

Ito N., Katoh K., Kushige H., Saito Y., Umemoto T., Matsuzaki Y., Kiyonari H., Kobayashi D., Soga M., Era T., Araki N., Furuta Y., Suda T., Kida Y., Ohta K. Ribosome Incorporation into Somatic Cells Promotes Lineage Transdifferentiation towards Multipotency. *Scientific Reports*, 査読有. 8(1), 2018.1634. DOI: 10.1038/s41598-018-20057-1.

Ahmad SAI., Anam MB., Ito N., Ohta K. Involvement of Tsukushi in diverse developmental processes. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 査読有. 12(1) 2018. pp 205-210. DOI: 10.1007/s12079-018-0452-8.

Islam MS., Wei FY., Ohta K., Shigematsu N., Fukuda T., Tomizawa K., Yoshizawa T., Yamagata K. Sirtuin 7 is involved in the consolidation of fear memory in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有. 495(1) 2018. pp261-266. DOI: 10.1016/j.bbrc.

Yano K., Washio K., Tsumanuma U., Yamato M., Ohta K., Okano T., and Izumi Y. The role of Tsukushi (TSK), a small leucine-rich repeat proteoglycan, in bone growth. *Regenerative Therapy*, 査読有. (7) 2017. pp 98-107. DOI: 10.1016/j.reth.

Kawano R., Ohta K., and Lupo G.
Cadherin-7 enhances Sonic Hedgehog signaling by preventing Gli3 repressor formation during neural tube patterning.
Open Biology, 査読有. 7(12) 2017.170255. DOI: 10.1098/rsob.170225.

Acharjee UK., Felemban AA., Riyadh AM., Ohta K.
Regulation of the neural niche by the soluble molecule Akhirin.
Development, Growth & Differentiation, 査読有. 58(5) 2016.468.
DOI: 10.1111/dgd.12284.

〔学会発表〕（計 56 件）

太田訓正.
Lactic Acid Bacteria Converts Human Fibroblasts to Multipotent cells.
Kumamoto - NCBS/InStem Partnership Meeting. 2019 年.

太田訓正, SAI Ahmad, MB Anam, 伊藤尚文.
DISRUPTION OF TSUKUSHI FUNCTION LEADS TO THE HYDROCEPHALUS BY ABERRANT NEUROGENESIS IN THE BRAIN.
Hydrocephalus Meeting 2018. 2018 年.

太田訓正.
Tsukushi を介した神経幹細胞ニッチ制御と水頭症の連関.
2018 年度生理学研究所研究会「神経発達・再生研究会」. 2018 年.

Kunimasa Ohta, Shah Adil Ishtiyah Ahmad, Naofumi Ito, Mohammad Badrul Anam.
Transdifferentiation of human somatic cells by ribosome.
第 5 回 Ribosome Meeting. 2018 年.

太田訓正.
Tsukushi と突発性正常圧水頭症の連関.
第 10 回日本 CCN ファミリー研究会. 2018 年.

太田訓正, 青山絵理子, Shah Adil Ishtiyah Ahmad, Mohammad Badrul Anam, 伊藤尚文, 久保田聡, 滝川正春.
リボソームによる細胞のリプログラミング機構.
第 577 回 難研セミナー 第 150 回 難治疾患共同研究拠点セミナー 第 1 回 RCC イメージングユニットセミナー. 2018 年.

Kunimasa Ohta, Shah Adil Ishtiyah Ahmad, Mohammad Badrul Anam, Naofumi Ito.
Ribosomes convert human fibroblasts to multipotent cells.
第 70 回日本細胞生物学会・第 51 回日本発生生物学会合同大会学会. 2018 年.

Kunimasa Ohta, Adil Ishtiyah, Naofumi Ito.
Ribosome incorporation into somatic cells promotes reprogramming towards multipotent cells.
第 16 回 幹細胞シンポジウム. 2018 年.

Kunimasa Ohta, Shah Adil Ishtiyah, Mohammad Badrul Anam, Naofumi Ito.
Disruption of Tsukushi function leads to the hydrocephalus by aberrant neurogenesis in the brain.
第 22 回国際神経発生生物学会. 2018 年.

太田訓正.
神経幹細胞ニッチを制御する Tsukushi と水頭症の連関.
第 17 回日本再生医療学会総会. 2018 年.

Kunimasa Ohta, Shah Adil Ishtiyah Ahmad, Mohammad Badrul Anam, Naofumi Ito.
Dysfunction of Tsukushi, a soluble molecule belonging to the small leucine-rich proteoglycan family, leads to hydrocephalus by altering neurogenesis in the brain.
第 13 回日中交流国際生命科学シンポジウム. 2017 年.

Kunimasa Ohta, Shah Adil Ishtiyah Ahmad, Mohammad Badrul Anam, Naofumi Ito.

Dysfunction of Tsukushi, a soluble molecule belonging to the small leucine-rich proteoglycan family, leads to hydrocephalus by altering neurogenesis in the brain. The 9th INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE CCN FAMILY OF GENES. 2017年.

Kunimasa Ohta.

Lactic acid bacteria convert human fibroblasts into multipotent cells. 6th BENEFICIAL MICROBES CONFERENCE 2017. 2017年.

Kunimasa Ohta, Shah Adil Ishtiyag Ahmad, Mohammad Badrul Anam, Naofumi Ito.

Dysfunction of Tsukushi, a soluble molecule belonging to the small leucine-rich proteoglycan family, leads to hydrocephalus by altering neurogenesis in the brain. 第9回日本CCNファミリー研究会. 2017年.

Kunimasa Ohta.

Tsukushi dysfunction leads to hydrocephalus by altering neurogenesis in the subventricular zone. 第15回 幹細胞シンポジウム. 2017年.

Kunimasa Ohta, Adil Ishtiyag, Naofumi Ito.

Ribosome incorporation into somatic cells promotes reprogramming towards multipotent cells. 第50回 日本発生生物学会年会. 2017年.

Kunimasa Ohta.

Ribosome incorporation into somatic cells promotes reprogramming towards multipotency without activating cell proliferation. Joint Meeting of the German and Japanese Society of Developmental Biologists. 2017年.

Kunimasa Ohta.

Disruption of Tsukushi function leads to the hydrocephalus by aberrant neurogenesis in the brain. Keystone Symposia Neurogenesis during Development and in the Adult Brain (J2). 2017年.

〔図書〕(計 2 件)

伊藤尚文, 太田訓正. 乳酸菌による細胞リプログラミング. シーエムシー出版. 264, 2018.
Ito N., and Ohta K. Cell reprogramming by Lactic Acid Bacteria. Applied RNA Biosciences. (Eds. Matsuda S. and Izawa S.) 2018.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学 大学院生命科学研究部 神経分化学分野

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/devneuro/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 高橋 淑子

ローマ字氏名: (TAKAHASHI, yoshiko)

所属研究機関名: 京都大学

部局名: 理学研究科 生物科学専攻 動物学教室 動物発生学

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10183857

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 伊藤 尚文

ローマ字氏名: (ITO, naofumi)