

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18553

研究課題名(和文) リボソームによる細胞初期化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the cell initialization mechanism with the ribosome

研究代表者

伊藤 尚文 (ITO, NAOFUMI)

熊本大学・大学院先導機構・特定事業教員

研究者番号：60732716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは乳酸菌を細胞に取り込ませると、細胞が多分化能をもつ細胞になることを発表した(Ohta et al., PLOS ONE 2012)。本申請では乳酸菌内の多分化能誘導物質を探索した。乳酸菌抽出液を精製し、高濃度の多分化能誘導物質含有分画を得た。分画をLC-MS/MS分析し、多分化能誘導分子はリボソームであることが判明した。枯草菌や酵母など、乳酸菌以外の生物から抽出したリボソームも多分化能誘導活性を持っていた。リボソーム誘導多能性細胞は三胚葉由来の細胞に分化できるが、細胞塊自体は増殖が停止した状態であった。(Ito et al., Scientific Reports. 2018)

研究成果の概要(英文)：Applicants have previously published that cells can become multipotent cells by incorporating lactic acid bacteria (Ohta et al., PLOS ONE 2012). In this application, we identified for cellular transdifferentiation inducing molecules in lactic acid bacteria. The extract from Lactic acid bacteria was purified in several steps, and we finally obtained a fraction containing a transdifferentiation inducing substrates at a high concentration. Identification of the fraction by LC-MS/MS analysis revealed that the molecules are ribosomes. We also clarified that ribosomes extracted from organisms other than lactic acid bacteria, such as *Bacillus subtilis* and yeast. Ribosome-induced transdifferentiation cells can differentiate into three germ layer-derived cells, but the cell clusters itself was not proliferated. (Ito et al., Scientific Reports. 2018)

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞初期化 微生物 リボソーム 進化

1. 研究開始当初の背景

a) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

ヒト腸内には乳酸菌やクロストリジウム細菌から構成される腸内細菌群が常在している。乳酸菌発酵食品であるヨーグルトなどの摂取が健康にとって有益であることは、人類は経験的に理解しており、古代から実践されてきた。そして、実際に、乳酸菌が抗炎症作用のあるインターフェロン β の発現を誘導する (Tadaomi et al., *Immunity*, 2013) 報告がされ、腸内細菌は生理的作用によって健康維持に貢献していることが示されている。さらに、腸内細菌はうつ病への関与 (Schmidt, *Nature* 2015)、神経グリアの発生 (Kabouridis et al., *Neuron* 2015)、そして好中球の成熟 (Zhang et al., *Nature* 2015) など、精神や発生への関与が報告されており、細菌とヒトの広範な相互作用が示されつつある。

b) 応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

申請者のグループでは、腸内細菌とヒト細胞の未知の相互作用を発生学的観点から探るため、様々な条件で乳酸菌とヒト皮膚腺維芽細胞 (HDF) と共培養したところ、特徴的な細胞塊を形成する条件を見いだした (図1)。この細胞塊は多能性幹細胞である胚性幹 (ES) 細胞が形成する細胞塊とよく似ていたことから、多能性マーカーの発現と分化誘導試験を行ったところ、この細胞塊が三胚葉由来の細胞に分化できる多能性を持つことが判明した (Ohta et al., *PLOS ONE* 2012)。細菌が細胞分化に関係する事例は、乳酸菌に限らず、ピロリ菌が胃癌を誘発する現象 (Fujii et al., *PNAS* 2012) や、ハンセン病に関与するライ菌が感染拡大に宿主細胞の初期化を利用している (Masaki et al., *Cell* 2013) ことが報告されて、微生物の相互作用は細胞分化に関与していることが明らかになった。これらの結果から申請者は、細菌には現在までに報告例のないヒト細胞の脱分化を誘導する因子が含まれていると着想した。

c) これまでの研究成果を発展させる場合にはその内容等

これまでの研究では乳酸菌を用いて多能性細胞塊を形成させる研究を行った。本研究では乳酸菌から、多能性を誘導する成分の同定を行った。生化学的な分析を繰り返した結果、当該物質はリボソームであった。リボソームは全ての生物に存在するタンパク質合成装置として非常によく知られている。しかし、近年の研究でリボソームタンパク質自体がリボソーム内部の配置を調節することで、タンパク質の翻訳を変化させ、発生を制御している (Xue et al., *Nature* 2014) など、単純な翻訳装置ではなく、リボソームは翻訳を介して生物

の発生を時空間的に制御していることがあきらかになりつつある。

リボソームは翻訳装置としての構造はすべての生物でかなり共通性があるが、構成しているタンパク質の相同性は互いを相補できるほどの高い相同性はみられないことから、その発現制御経路は単純に一つの経路に収束するのではなく、複数の経路で制御されている可能性が高いが、その制御様式にはなんらかの共通性があることが考えられる。

2. 研究の目的

申請者はヒトの主要な腸内細菌の一種である乳酸菌を皮膚細胞に取り込ませると、三胚葉に分化可能な多能性細胞塊が生じることを発見した (Ohta et al., *PLOS ONE* 2012)。細胞塊を形成させる物質を生化学的な分析によってリボソームであることが判明したが、リボソームが多能性を誘導するという報告例は皆無である。本申請ではリボソームが誘導した細胞塊が、通常の細胞および、他の多能性幹細胞と、どのように異なるかを理解することで、多能性の本質に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

リボソーム誘導細胞塊がどのような性質を持つかを、免疫染色による多能性マーカーの発現パターンは解析済みであった。転写レベルでの発現解析は不十分であったため、細胞塊全体での遺伝子発現を行った。ヒト皮膚腺維芽細胞 (HDF) を、コンフルエント状態まで培養する。細胞をタンパク質分解酵素トリプシンで消化して、接着プレートから剥がし、再度培養する際に、リボソームを添加すると細胞塊が生じた。生じたリボソームを 14 日までの間、培養液を交換しながら維持した。細胞塊を RNA 抽出液で溶解させ RNA を抽出した。コントロールとして通常培養した HDF を用いた。抽出した RNA からライブラリを作成し、次世代シーケンサーで遺伝子配列を解析し、遺伝子発現パターンを、既報のヒト iPS 細胞や ES 細胞の発現パターンと比較した。

また、単一細胞レベルの遺伝子発現を調べるため、細胞塊をトリプシン消化によってほぐし、セルソーティングで単一細胞に分画した。個々の細胞の RNA を瞬時に調整し、それぞれの遺伝子発現を、多数の遺伝子について同時に解析できる BioMark システムを用いて、単一細胞レベルの多能性マーカーの遺伝子発現を解析した。

リボソームは大小二つのサブユニットから構成される。E. coli の場合、リボソームは 3 つの RNA サブユニット (rRNA) と約 50 種のタンパク質から構成される。そこで、リボソームを構成するすべての rRNA は PCR によってクローニングし、各タンパク質をコード

するタンパク質は発現ベクターを遺伝研 NBRP の全遺伝子クローニングコレクションから入手して、リボソームを構成するパーツを個別に発現精製した。精製タンパク質を HDF に添加して、細胞塊形成活性を確認した。また、rRNA 配列を発現ベクターにクローニングし、発現精製することで、rRNA を調整し、rRNA の細胞塊形成活性も確認した。

4. 研究成果

リボソームによって誘導した細胞塊の全遺伝子発現解析を行った(図 1)。リボソーム誘導細胞塊(RIC)は添加後、発現パターンを示す座標が移動し、8 日後からあまり変動しなくなることから、8 日あたりが発現における成熟のポイントだと考えられる。さらに元の HDF 細胞および多能性幹細胞(ES 細胞、iPS 細胞)と比較すると、どちらの群とも遺伝子発現が全く異なることが明らかになった。

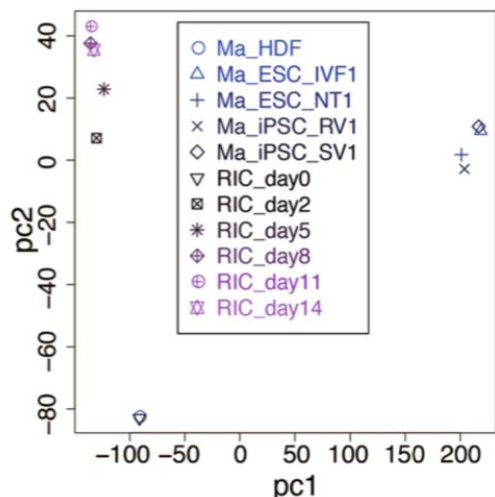
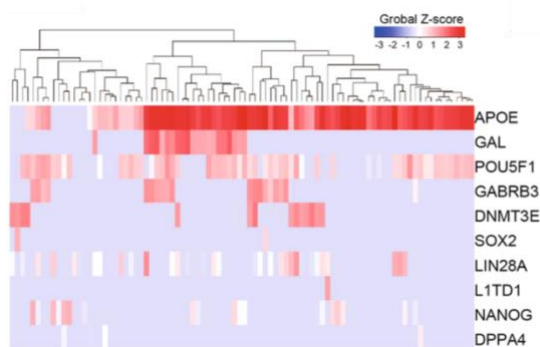


図 1 RNA シーケンス法によるリボソーム誘導細胞塊の遺伝子発現解析。RIC=細胞塊。Ma=対象に引用した多能性幹細胞の発現データ (Ito et al., Scientific reports 2018)。

単一細胞レベルの遺伝子発現解析では、多能性幹細胞のマーカとして知られる Pou5f1(Oct3/4)や Nanog が細胞塊を構成している細胞の一部で高くなっているものの、発現があまりしていない細胞も多く存在していることが判明した(図 2)。この結果は免疫細胞染色でタンパク質レベルの発現を解析した結果と一致しており(図 3)、リボソーム誘導細胞塊が細胞塊内部で不均一性をもつ細胞群であることが判明した。

これらの結果から、リボソームによって誘導された細胞塊は多能性マーカを遺伝子レベル、タンパク質レベルで発現していることが確認されたが、Nanog や Pou5f1 を全体に強く発現する多能性幹細胞とは異なる発現様



式を示していることが判明した (Ito et al., Scientific reports 2018)。

図 2 リボソーム誘導細胞塊の単細胞レベルの発現解析。99 個の細胞について遺伝子発現の解析を行った (Ito et al., Scientific reports 2018)。

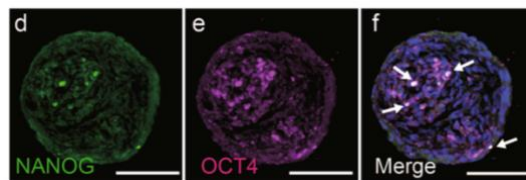


図 3 細胞塊の免疫細胞染色。矢印は Nanog-Oct4(Pou5f1) の 2 重要請細胞 (Ito et al., Scientific reports 2018)。

さらにリボソームを構成する約 50 種類のタンパク質および rRNA を発現するベクターを理研バイオリソースセンターから分譲、あるいはクローニングすることで入手した。リボソームタンパク質は塩基性タンパク質が豊富に含まれていることから、極めて可溶性が悪いが、リボソームを構成することで不溶性部分を内側に入れ込むことで、生体内で可溶性を維持している。実際に個々のタンパク質を発現させると発現精製効率が極めて悪いが、いくつかのタンパク質は精製することができた。細胞塊形成試験は現在、進行中であるが、いくつかのタンパク質に関しては良好な結果を得ている。

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 1 件)

- ① Naofumi Ito, Kaoru Katoh, Hiroko Kushige, Yutaka Saito, Terumasa Umemoto, Yu Matsuzaki, Hiroshi Kiyonari, Daiki Kobayashi, Minami Soga, Takumi Era, Norie Araki, Yasuhide Furuta, Toshio Suda, Yasuyuki Kida & Kunimasa Ohta. Ribosome Incorporation into

Somatic Cells Promotes Lineage Transdifferentiation towards Multipotency. Scientific Reports. 査読有. 8,1634. 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-20057-1.

〔学会発表〕 (計 8 件)

- ① Naofumi Ito, Shah Adil Ishtiyag Ahmad, Mohammad Badrul Anam, Kunimasa Ohta. Ribosome incorporation into somatic cells promotes lineage transdifferentiation towards multipotency. The program released_JSPS & NUS Joint 2nd Symposium 2018. 2018.1.18. 熊本大学 山崎記念会館 (熊本市) .
- ② Naofumi Ito, Shah Adil Ishtiyag Ahmad, Mohammad Badrul Anam, Kunimasa Ohta. Ribosome incorporation into somatic cells promotes lineage transdifferentiation towards multipotency. KEY Forum 2018 Stem Cell Traits and Developmental Systems. 2018.1.11-12. 熊本市国際交流会館 (熊本市).
- ③ Naofumi Ito, Shah Adil Ishtiyag Ahmad, Mohammad Badrul Anam, Kunimasa Ohta. Ribosome incorporation into somatic cells promotes lineage transdifferentiation towards multipotency. 第 4 回 包括的神経グリア研究会 UNG light 2018. 2018.1.6-7. 熊本大学 医学部 (熊本市).
- ④ 伊藤 尚文, Shah Adil Ishtiyag Ahmad, Mohammad Badrul Anam, 太田 訓正. リボソーム取り込みによるヒト細胞の多能性獲得. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 2017.12.6-9. 神戸ポートアイランド (神戸市) .
- ⑤ 伊藤 尚文, 太田 訓正. 微生物由来多能性誘導因子による細胞運命の転換. 第 7 回オルソオルガノジェネシス検討会 2017. 2017.08.24-25. 熊本大学 山崎記念会館 (熊本市) .
- ⑥ Naofumi Ito, Shah Adil Ishtiyag Ahmad, Mohammad Badrul Anam, Kunimasa Ohta. Ribosome incorporation into somatic cells promotes reprogramming towards multipotency without activating cell proliferation. Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists 2017. 2017.3.15-18. キール大学.(キール, ドイツ連邦共和国) .
- ⑦ 伊藤 尚文, Shah Adil Ishtiyag Ahmad, Mohammad Badrul Anam, 太田 訓正. Bacterial ribosome incorporation

into somatic cells promotes reprogramming towards multipotency without activating cell proliferation. 第 6 回オルソオルガノジェネシス検討会 2016. 2016.12.7-8. 沖縄科学技術大学院大学(OIST) シーサイドハウス.(沖縄県国頭郡恩納村).

- ⑧ 伊藤 尚文, Shah Adil Ishtiyag Ahmad, Mohammad Badrul Anam, 太田 訓正. Ribosome Incorporation into Somatic Cells Promotes Reprogramming towards Multipotency without Activating Cell Proliferation. The 4th Ribosome Meeting. 2016. 2016.9.16-17. 大阪医科大学 (大阪市).

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 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.
- ② 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 2 件)

- ① 出願番号：特願 2016-519244, 出願日：平成 27 年 5 月 11 日(2015.5.11), 発明者：太田 訓正、伊藤 尚文, 出願人：国立大学法人 熊本大学, 発明の名称：細胞の再プログラミング誘導方法、および多能性細胞の製造方法
- ② 国際出願番号：2015JP063457, 国際出願日：平成 27 年 5 月 11 日(2015.5.11), 発明者：OHTA KUNIMASA, ITO NAOFUMI, 出願人：NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY, 発明の名称：METHOD FOR INDUCING CELL REPROGRAMMING, AND METHOD FOR PRODUCING PLURIPOTENT CELLS

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学大学院 生命科学研究部
神経分化学教室
<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/devneuro/>

6. 研究組織

(1)研究代表者 伊藤 尚文 (Ito Naofumi)
熊本大学・大学院先導機構・特定事業教員
研究者番号：60732716

(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
()