

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19344

研究課題名（和文）タンパク質合成装置リボソーム内に存在するリプログラミング因子の同定

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） 4,900,000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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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)。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、申請者らの結果を信じる研究者はほとんどいなかった。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。つまり、申請者らの研究がブレイクスルーとなり、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が証明された。

申請者は死んだ乳酸菌でも同様の細胞塊形成能を確認していたことから、「乳酸菌から細胞の多能性獲得に関わる物質を同定する」というチャレンジ性の高いプロジェクトに取り組んだ。乳酸菌のホモジェナイズから細胞塊形成能を指標として、様々な生化学的手法を駆使して実験を続けた結果、リボソームがリプログラミング物質実体であることを突き止めた (Ito et al., Sci Rep 2018)。この論文の査読では、レビューアーからOhtaらの発見は[Proof of Principle]であるとの評価をいただいた。

約20億年前に古細菌と真正細菌の共生関係を経て誕生した真核細胞が、ミトコンドリアやクロロプラストを獲得した細胞内共生説と同様に、リボソームによる細胞リプログラミングが低頻度ながらも進化の潮流になっている可能性がある。つまり、真核細胞は絶えず様々なバクテリアの感染に晒され、そのリボソームを細胞質や核内に取り込むことにより、細胞をリプログラミングしてより多様な性質を有する細胞を進化させてきたと考えられる。

2. 研究の目的

本申請では、細胞内に取り込まれたリボソームの局在を、電子顕微鏡を用いた観察により明らかにする。また、リボソームを構成するタンパク質やリボソームRNAの中から、細胞に多能性を付与するリプログラミング機能ドメインの同定を目指す。さらに、リボソームをヒト癌細胞に取り込ませ、細胞内でどのようなイベントが誘発されているかを検証する。

3. 研究の方法

大腸菌を構成するタンパク質に His タグが付与された大腸菌 JE28 株を用いて、リボソームを精製し、細胞に取り込ませ、その局在を免疫染色法並びに電子顕微鏡により明らかにする。

大腸菌リボソームを構成する54種類のタンパク質の発現ベクター (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。

ヒト乳がん細胞 MCF7 にリボソーム を取り込ませ、形成された細胞塊を用いて、細胞周期、EMT、オートファジーに関わるマーカーの発現を免疫染色法と western blot 法により検討する。

4 . 研究成果

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し、リプログラミング機能を有するタンパク質の同定を試みた。我々の研究室でNo6タンパク質と呼んでいるタンパク質を精製し、その細胞塊形成を調べたところ、細胞塊は形成されたが、分化能を有していなかった。他のタンパク質の産生も試みたが、上手くタンパク質が産生されなかった。次に、大腸菌JE28株からリボソームを精製し、マウス線維芽細胞に取り込ませ、細胞塊を形成させた。この細胞塊の超薄切片を作製し、現在、電子顕微鏡でリボソームの核内における局在を観察中である

乳がん細胞MCF7にリボソームを取り込ませた細胞塊を以下の実験に用いた。

- 1) BrdUを取り込ませ、免疫染色法を行ったところ、細胞の増殖が明らかに減少していた。
- 2) 細胞周期を免疫染色法で調べたところ、Go, G1期の細胞がコントロール細胞と比べ、増加していた。
- 3) EMTマーカーである、TGF- β 1とSnail1の発現をwestern blot法で解析したところ、リボソームを取り込んだ癌細胞では、両分子の発現が誘導されていた。
- 4) 癌抑制因子であるp53の発現も、リボソームを取り込んだ癌細胞では、増加していた。

以上の結果から、半永久的に増殖を続ける癌細胞でさえ、リボソームを取り込むと増殖を停止することから、将来はリボソーム を安心・安全な抗がん剤の基盤物質として用いることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Naofumi Ito, Mohammad Badrul Anam, Ahmad Shah Adil Ishtiyag, Kunimasa Ohta	4. 巻 60(5)
2. 論文標題 Transdifferentiation of human somatic cells by ribosome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development Growth and Differentiation	6. 最初と最後の頁 241-247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12538	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 -

1. 著者名 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	4. 巻 1
2. 論文標題 The hepatokine Tsukushi gates energy expenditure via brown fat sympathetic innervation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 251-260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ohta K., Aoyama E., Ahmad SAI, Ito N., Anam MB, Kubota S. and Takigawa M	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 CCN2/CTGF binds the small leucine rich proteoglycan protein Tsukushi	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 113-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12079-018-0487-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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 太田 訓正
2. 発表標題 EqvarinはFGFシグナルを制御して水晶体形成に関与する
3. 学会等名 第122回 日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 訓正
2. 発表標題 Disruption of Tsukushi function leads to the hydrocephalus by aberrant neurogenesis in the brain
3. 学会等名 第22回国際神経発生生物学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 訓正
2. 発表標題 Ribosome incorporation into somatic cells promotes reprogramming towards multipotent cells
3. 学会等名 第16回 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 訓正
2. 発表標題 Ribosomes convert human fibroblasts to multipotent cells.
3. 学会等名 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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 訓正
2. 発表標題 Ribosome Incorporation into Somatic Cells Promotes Lineage Transdifferentiation towards Multipotency
3. 学会等名 第8回オルソオルガノジェネシス検討会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 訓正
2. 発表標題 リボソームによる細胞のリプログラミング機構
3. 学会等名 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(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 訓正
2. 発表標題 Tsukushiと突発性正常圧水頭症の関連
3. 学会等名 第10回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 訓正
2. 発表標題 Transdifferentiation of human somatic cells by ribosome
3. 学会等名 第5回 Ribosome Meeting.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 訓正
2. 発表標題 Tsukushiを介した神経幹細胞ニッチ制御と水頭症の連関.
3. 学会等名 2018年度生理学研究所研究会「神経発達・再生研究会」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 訓正
2. 発表標題 DISRUPTION OF TSUKUSHI FUNCTION LEADS TO THE HYDROCEPHALUS BY ABERRANT NEUROGENESIS IN THE BRAIN
3. 学会等名 Hydrocephalus Meeting 2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 訓正
2. 発表標題 Lactic Acid Bacteria Converts Human Fibroblasts to Multipotent cells.
3. 学会等名 Kumamoto - NCBS/InStem Partnership Meeting. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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		
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