

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20627

研究課題名（和文）網羅的プロテオーム解析によるヒトの細胞種特異的リボソームタンパクの同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and Functional Analysis of Cell-Type-Specific Ribosomal Proteins in Humans by Comprehensive Proteomic Analysis

研究代表者

山川 達也（Yamakawa, Tatsuya）

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：20961197

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：三胚葉由来であるヒト初代細胞7種類の培養系の確立と、ヒトiPS細胞を用いた複数種の体細胞への分化誘導を習得した。これら、ヒト細胞において、各々RNAとタンパク質試料を回収した。翻訳が盛んに行われていると考えられるポリソーム分画を取得し、解析する必要があると考え、今回用いた細胞種すべてに対して、スクロースグラジエントによるポリソーム画分の回収と、そこからのタンパク質抽出を行った。これら試料を用いた網羅的マルチオミクス解析（トランスクリプトーム・プロテオーム）のためのmRNA-seq、質量分析器の扱いを習得し、引き続き解析を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボソームは、遺伝子発現の最終段階であるタンパク質合成を担う細胞小器官である。80種のリボソームタンパク質（RP）の量的な不均一性からなるリボソームの機能特異性は発見当初から提唱されていたものの長らくその真偽は不明であった。近年、細胞種特異的なリボソームの機能差因が報告されているものの、リボソームの主要な構成要素であるRPの量的な差についてヒト細胞での報告が限られている。ヒト細胞における細胞種特異的なRPの解析は、多くのリボソーム病に対する新たな病態解明の手がかりとなるだけでなく、リボソームの機能差による遺伝子発現制御という分子生物学における新たな分野を開くことが期待される。

研究成果の概要（英文）：We established cultures of seven types of human primary cells derived from the three germ layers and learned the methods to induce differentiation into multiple cell types using human induced pluripotent stem cells (iPSCs). We collected RNA and protein samples from each of these human cells. Considering the active translation occurring in these cells, we obtained and analyzed polysome fractions using sucrose gradients, and subsequently performed protein extraction. For comprehensive multi-omics analysis using these samples (transcriptome and proteome), we mastered mRNA-seq and handling of mass spectrometers, and will continue the analysis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リボソーム リボソームタンパク質 ヒト人工多能性幹細胞 プロテオーム 質量分析

1．研究開始当初の背景

リボソームは、遺伝子発現の最終段階であるタンパク質合成を担う細胞小器官である。そして、あらゆる生物のタンパク質合成の場として中心的な役割を担う巨大な RNA-タンパク質複合体であり、特にヒトでは4種のリボソーム RNA (rRNA) と80種のRPからなる大小2つのサブユニット (60S、及び40S) が組み合わさった80Sリボソームとして機能する。

1950年代に電子顕微鏡によりリボソームが確認された当初、その大きさや形のわずかな違いから何か機能的な差が存在するのではと考えられていた (Crick, PMID:13580867)。一方で、実験的な制限から長年の間、それらの機能的差を示すことは難しく、リボソームは核から送られてきた mRNA を受動的にタンパク質に翻訳するだけの装置だと考えられてきた。近年のシーケンシング技術や質量分析手法の発展により、rRNA や RP というリボソーム構成要素の直接的な違いを組織間で比較、同定・定量することが可能になった。その結果、機能的に異なったりリボソームが選択的に特定の mRNA の翻訳を制御することで下流の遺伝子発現に影響を与えることが明らかとなってきている (Shi, PMID:28625553)。現在では、それらの機能差は主にリボソームの主要な構成要素である RP の存在量が変化し、構成パターンが変動することで引き起こされることが示唆されている。実際に、生育状況の異なる酵母ではリボソームを構成する RP の量比が異なることや (Slavov, PMID:26565899)、マウス胚性幹細胞 (ESC; embryonic stem cell) で特定の RP をノックアウトすると組織特異的に分化能に影響を与えることが報告されている (Tiu and Kerr, PMID:34242585)。しかし、ヒト細胞での RP 量的な構成変化に関する知見は乏しく、一部の癌由来の細胞株での研究が主流である。

そこで本研究では『ヒト三胚葉由来の分化細胞に特異的な RP がどのように細胞状態を規定するか』を「問い」として研究を行う。

2．研究の目的

「三胚葉それぞれに由来するヒト体細胞の大規模プロテオーム解析による RP の絶対定量を行い、細胞種特異的な RP の同定と機能解析を行う。」

具体的には、申請期間において以下の3点について明らかにする。

正常なヒト体細胞において細胞種特異的な RP は存在するか

各々の特異的 RP が制御する遺伝子群は何か

ヒト多能性幹細胞、及びそこから誘導される体細胞の分化過程での特異的 RP の機能は何か

3．研究の方法

正常なヒト体細胞において細胞種特異的な RP は存在するか

液体クロマトグラフィー / 質量分析 (LC-MS/MS; Liquid chromatography-mass spectrometry) を用いてヒト細胞における RP の同定、定量を行う。細胞種としては外胚葉由来である表皮角化細胞・アストロサイト・神経前駆細胞、中胚葉由来である線維芽細胞・脂肪由来幹細胞、内胚葉由来である前立腺上皮細胞・気管支上皮細胞の7種を用いる。また、所属研究所内で確立された誘導法を用いてヒト iPSC 由来の神経堤細胞・骨格筋・造血系細胞なども必要に応じて解析対象に加えていく。これらの解析から細胞種、または胚葉特異的に量が変化している RP を同定し、

各細胞種特異的な RP 構成を明らかにする。同時に各種細胞から抽出した mRNA の発現解析を行うことで、細胞種特異的な RP の中でも mRNA とタンパク質の比が正比例しない、従来の研究では着目されていなかった RP も絞り込むことが可能である。

各々の特異的な RP が制御する遺伝子群は何か

各 RP に対する精度の高い抗体が得られる場合は特異的な RP に対する免疫沈降とそれに結合する mRNA を次世代シーケンス (NGS; next generation sequencing) による網羅的解析により同定する。抗体の取得が難しい場合は、スクロースグラジエント法により翻訳が盛んに行われていると考えられるポリソーム分画を取得し、翻訳効率の高い遺伝子を絞り込み、特異的な RP の量が候補遺伝子の翻訳量を変化させることを、各種細胞を用いて確認する。また、ヒト iPS 細胞からの分化誘導法が確立されている細胞種に関しては、内在的な RP に FLAG-tag を組み込むことで免疫沈降を可能にすることも検討する。

4. 研究成果

各種細胞に関する培養系の確立

外胚葉由来である表皮角化細胞・アストロサイト・神経前駆細胞、中胚葉由来である線維芽細胞・脂肪由来幹細胞、内胚葉由来である前立腺上皮細胞・気管支上皮細胞の 7 種の細胞の培養系を確立した。また、所属研究所内の複数の研究室の協力のもと、ヒト iPS 細胞を用いた間葉系幹細胞・神経堤細胞・赤芽球前駆体への分化誘導を習得した。これら、ヒト体細胞由来、またはヒト iPS 細胞由来の体細胞において、各々 RNA とタンパク質試料を回収した。

スクロースグラジエント法によるポリソーム分画の取得

細胞種特異的な RP が、その細胞種を規定する遺伝子発現を制御していると仮定した際に、翻訳が盛んに行われていると考えられるポリソーム分画を取得し、解析する必要があると考えた。そこで、今回用いた細胞種すべてに足して、スクロースグラジエントによるポリソーム画分の回収と、そこからのタンパク質抽出を行った。

mRNA-seq、および LC-MS/MS による網羅的なマルチオミクス解析

これら試料を用いた網羅的なマルチオミクス解析 (トランスクリプトーム・プロテオーム) を行うにあたり、申請者自身での実験・解析技術を習得した。mRNA-seq に関しては、いくつかの細胞種に関して実験を行い、現在は解析技術の習得中のため、引き続き実験と解析を行う。プロテオーム解析に関しては、研究所に新たに導入された質量分析器を扱うための訓練中であり、実際の解析にまで至っていない。今後は、引き続きトランスクリプトーム、プロテオームの両面で実験、解析までを行えるようになり、研究を遂行していく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------