

リボゾームによる細胞のリプログラミング機構

Cells reprogramming mechanism by ribosome

(日本発生物学会推薦)

代表研究者 熊本大学 太田 訓正 Kumamoto University Kunimasa OHTA
協同研究者 熊本大学 伊藤 尚文 Kumamoto University Naofumi ITO

Previously, we found that lactic acid bacteria induces cellular transdifferentiation in human dermal fibroblasts (HDFs) (Ohta et al., 2012). Another group later reported that Leprosy bacterium, *Mycobacterium leprae* can efficiently expand their habitat by regulating the cellular differentiation system of the host (Masaki et al., 2013). Thus, bacterial intrinsic factors have the potential to direct cellular reprogramming and transdifferentiation (Ito and Ohta, 2015). Recently, we discovered that ribosome is involved in the regulation of cellular transdifferentiation of HDFs. *In vitro* incorporation of ribosomes into HDFs arrests cell proliferation and induces the formation of cell clusters, that differentiate into three germ layer derived cells upon induction by differentiation mediums. The discovery of ribosome induced transdifferentiation, that is not based on genetic modification, find new possibilities for the treatment of cancer and congenital diseases, as well as to understand early development and cellular lineage differentiation.

研究目的

わたしたちの生物社会は大きく真核生物、真正細菌、古細菌に分類され、「原核生物である古細菌に、同じく原核生物である真正細菌が入り、やがて核を持った真核生物へと進化した」という説が提唱されている。乳酸菌とは、糖を分解して乳酸を生成する細菌類の総称であり、腸内フローラを構成する善玉菌の一つであり、「現代医療のトッランナー」と言われるほど未知なる可能性を持っている。また、一般的な腸内細菌を無菌マウスの腸に過剰投与すると、腸の重要な機能（栄養吸収、粘膜防御など）に関わる様々な遺伝子の発現が変化することから、腸内細菌が宿主細胞の遺伝子発現に影響を与える可能性が示されていた (Hooper et al., Science 2001)。本研究は、「乳酸菌のような善玉菌を細胞に取り込ませると、宿主細胞に何らかの変化をもたらすはずである」というアイデアからスタートした。

iPS 細胞の創造により、最終分化を終えた細胞でさえ、新たな外部刺激によりリプログラミングがお

こり、多能性を獲得することが証明された。しかし、iPS 細胞は4つの山中因子を導入して作製された人工細胞であり、私たちのからだの中には存在しない。申請者は、ヒト皮膚細胞に自然界に存在する乳酸菌を取り込ませると、細胞塊が形成され、リプログラミングの誘導がおこり、三胚葉由来の細胞に分化できる多能性細胞が作製できることを報告した (Ohta et al., PLOS ONE, e51866, 2012)。我々の論文は、全く独創的なものであったがゆえに、学術的にはほとんど信じてもらえなかったが(特許:特願 2011-152479、PCT/JP2012/067544、特願 2013-82797、特願 2014-98213)、「ヒト成人由来のシェワン細胞は、ライ菌(グラム陽性)に感染すると多能性を獲得する」という論文 (Masaki et al., Cell 2013) が発表されたことから、今では、バクテリアが宿主細胞に感染し、宿主細胞にエピジェネティックな影響を与える可能性がひろく認識されている。最近、ヒト皮膚細胞がリボゾームを取り込むと細胞塊を形成し、多能性を獲得することを見出し (Fig.1)、乳酸菌由来のリプログラミング



Fig1: Induction of cell clusters by ribosome

因子がリボソームであることを報告した (Ito et al., Scientific Reports, 8(1):1634, 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。

1970年にマーギュリスが提唱した細胞内共生説（嫌気性真核生物が好気性細菌を飲み込むことにより共生し、現在の真核細胞へと進化した）(Margulis, 1970)を実験的に検証することで、「細菌を飲み込むことにより細胞内にミトコンドリアや葉緑体といった独自にエネルギーを生み出す小器官をもつ真核細胞の起源の解明」が期待できる。

また、ES細胞やiPS細胞は将来の再生医療に向けた有望なツールであるが、ES細胞は倫理上の問題、iPS細胞は癌化への不安を完全には拭いきれていない。体細胞にリボソームを取り込ますことにより作製された多能性細胞には、これらの問題を考慮する必要はなく、再生治療にも応用することができる。本研究によりリボソームによる細胞の形質転換機構を明らかにできれば、安全に増殖する細胞株にリボソームを作用させ、安全・安心な多能性細胞を製造し、将来の細胞移植に用いることができる。

本研究では、1)リボソームがどのようにして細胞内に取り込まれるのか？ 2)細胞質に取り込まれたリボソームは、細胞内のどの領域に存在し、どのようにして核内の遺伝子発現を制御するのか？という問題を解明し、リボソームによる多能性獲得機序を明らかにすることにより、生命の進化の過程において非常に多様な構造と機能を持つ「細胞」誕生の本質に迫ることができると考える。

研究経過

(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。Fig2に示すように、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

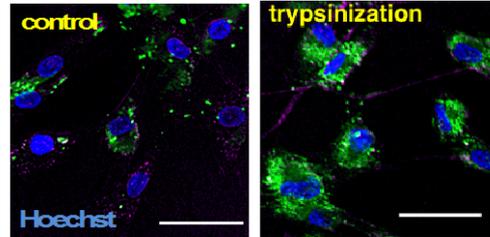


Fig2: Trypsinization enhanced the incorporation of beads into cytoplasmic region

れないが（左図）、トリプシン処理後の細胞に蛍光ビーズを加えると右図のように細胞内への取り込み（白いドット）が劇的に増加した。

次に、細胞質内への取り込みメカニズムとしてエンドサイトーシスが考えられる。6種類のエンドサイトーシス阻害剤を準備し、これら阻害剤の存在下で細胞塊形成実験を行った。

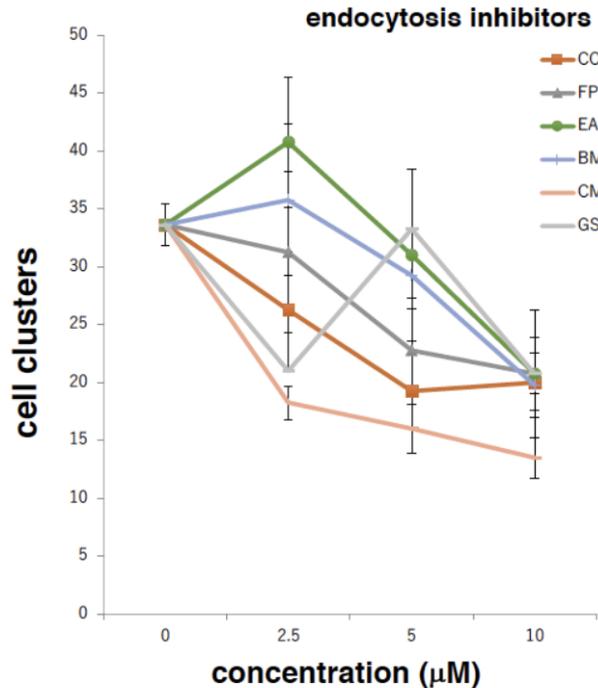


Fig3: Cell clusters formation was inhibited by endocytosis inhibitors

① 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。②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。

Fig3 に示すように、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) 取り込まれたリボソームの細胞内局在
我々は、スウェーデンのグループが開発した、リボソームの大サブユニットを構成する L12 タンパク質に His-tagged が付いているリボソーム (Ederth et al., 2009) を取得しており、細胞内に取り込まれた後の追跡が、anti-His 抗体により可能になる。大腸菌由来 His-tagged リボソームを取り込んだ細胞塊を用いて免疫染色を行い、細胞内での局在を調べた。興味深いことに、取り込まれたリボソームは細胞質内だけでなく核内にも存在していた。

考察

リボソームは、現存するすべての生命に共通したタンパク質合成マシンであり、50 種類以上のタンパク質と少なくとも 3 種類の RNA からなる複合体である。リボソームを構成するタンパク質群は、タンパク質合成マシンの一部であるとの認識であったが、リボソームタンパク質 L-12 を産生しない KO マウスを作製すると Hoxa5 の発現が減少し、異所性の肋骨が形成されることから (Kondrashov et al., Cell 2011)、リボソームを構成する個々のタンパク質が初期発生時において様々な機能を有することが示唆されている。そこで、個々のリボソームタンパク質を用いた細胞塊形成実験を行うために、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) を、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っており、今後さらなる解析を進めていきたい。

本研究は、確固たる実験結果に基づく提案であり、リボソームの発生・細胞生物学における新しい原理の発展に結びつく発展性がある。例えば、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、触媒活性を有する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良い性質を有する細胞を進化させてきたのかもしれない。

参考文献

1. Ederth, J., Mandava, C.S., Dasgupta, S., Sanyal, S., 2009. A single-step method for purification of active His-tagged ribosomes from a genetically engineered *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 37, e15.
2. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, and Gordon JL, 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine, *Science* 291, 881-884.
3. Kondrashov, N. et al. 2011. Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* 145, 383-397.
4. Margulis L., 1970. Recombination of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas*: assortment of mitochondria and chloroplasts? (Translated from eng) *J Theor Biol* 26(2):337-342.
5. Masaki, T., Qu, J., Cholewa-Waclaw, J., Burr, K., Raaum, R., Rambukkana, A., 2013. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell* 152, 51-67.

研究の発表

口頭発表

1. 太田訓正: Ribosome converts human fibroblasts to multipoint cells, 国際ミニシンポジウム「Frontline in Developmental Biology」学会大会、京都大学、2018年3月23日。
2. N.Ito, S.A.I.Ahmad, M.B.Anam, K.Ohta : Ribosome incorporation into somatic cells promotes lineage

- transdifferentiation towards multipotency, The program released_JSPS & NUS Joint 2nd Symposium 2018, 熊本大学, 2018年1月18日.
3. N.Ito, S.A.I.Ahmad, M.B.Anam, K.Ohta : Ribosome incorporation into somatic cells promotes lineage transdifferentiation towards multipotency, KEY Forum 2018 Stem Cell Traits and Developmental Systems, 2018年1月11日.
 4. N.Ito, S.A.I.Ahmad, M.B.Anam, K.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年1月6日.
 5. 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年12月6日.
 6. K.Ohta : Lactic acid bacteria convert human fibroblasts into multipotent cells, 6th BENEFICIAL MICROBES CONFERENCE 2017, Amsterdam, October 2017.
 7. 太田訓正: Tsukushi と Ribosome. 第12回 認識と形成研究会、2017年9月23日.
 8. K.Ohta : Ribosome incorporation into somatic cells promotes reprogramming towards multipotency, 国立遺伝子研究所セミナー、2017年9月11日.
 9. 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年8月24日.
 10. K.Ohta, S.A.I.Ahmad, N.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5月10日.
 11. K.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年3月15日.
 12. 太田訓正: リボソームによる細胞の多能性獲得機能、第16回日本再生医療学会総会、2017年3月7日.
 13. 伊藤尚文、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・第2回 JST-SICORP 国際ワークショップ 合同開催ワークショップ、2016年12月9日.
 14. N.Ito, S.A.I.Ahmad, A.Nishidzu, K.Ohta: リボソーム取り込みによるヒト細胞の多能性獲得、第39回日本分子生物学、2016年12月1日.
 15. 伊藤尚文、S.A.I.Ahmad、西津綾香、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、第4回リボソームミーティング、2016年9月17日.
 16. 太田訓正: Tsukushi と Ribosome, 第11回 認識と形成研究会、熊本大学、2016年9月16日.
 17. K.Ohta: Ribosome Incorporation into Somatic Cells Impedes Proliferation in Conjunction with Conferring Differentiability into All Three Germ-Layer Lineages, RNA JAPAN 2016, 2016年6月28日.
 18. 太田訓正: 発酵菌による細胞リプログラミング機構の解明、発酵研究所第10回助成研究報告会、2016年6月10日.
 19. K.Ohta: Ribosomes covert human fibroblasts into mutipotent cells, JSDB Special Symposium: Frontier of Developmental Biology(+ 49th Meeting) Hosted by JSDB, 2016年6月1日.
 20. K.Ohta: Ribosomes convert human fibroblasts into multipotent cells, 第14回 幹細胞シンポジウム、2016年5月20日.

誌上発表

1. Naofumi Ito, Mohammad Badrul Anam, Shah Adil Ishtiyah Ahmad, and Kunimasa Ohta. Transdifferentiation of human somatic cells by ribosome. *Develop. Growth Differ.* (in press).
2. N.Ito, K.Katoh, H.Kushige, Y.Saito, T.Umemoto, Y.Matsuzaki, H.Kiyonari, D.Kobayashi, M.Soga, T.Era, N.Araki, Y.Furuta, T.Suda, Y.Kida, K.Ohta. 2018, Ribosome Incorporation into Somatic Cells Promotes Lineage Transdifferentiation towards Multipotency. *Scientific Reports*, 8(1):1634.
3. 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, 2018, ISBN:978-4-7813-1317-7.
4. N.Ito, and K.Ohta, Cell reprogramming by Lactic Acid Bacteria, *Applied RNA Biosciences* (Eds. Matsuda S. and Izawa S.), 2018, ISBN:(in press)