

リボゾーム工学研究ユニット

Ribosome Engineering Research Unit

ユニットリーダー 入 江 新 司

IRIE, Shinji

当研究ユニットでは、生物共有の細胞器官であるリボゾーム内に内在する未知の機能の探索・解明をすすめ、リボゾームを合目的に改変する技術「リボゾーム工学」の構築を図り、生物の新たな潜在能力の開発および制御を行う技術を確認することにより、これまでになく新機能を持った生物の創出を目指す。そのために、リボゾームを中心とする動物細胞の翻訳・翻訳後制御機構を解明することによりがん細胞が潜在機能としての細胞死回避能を獲得する経緯を明らかにするとともに、その増殖を制御し細胞死を誘導する技術を開発する。

1. アポトーシスにおけるリボゾームサブユニットおよびタンパク質の特性解析（瀬野，青木^{*1}，飛田^{*1}）

我々は、細胞死受容体刺激によって起こるアポトーシス（Fasを刺激したヒト Jurkat 細胞および腫瘍壊死因子受容体を刺激したヒト U937 細胞）において 28S リボゾーム RNA が特異的に分解されることを見いだすとともに、この分解はタンパク質合成阻害を介して細胞死を促進させる可能性を示した。今年度はアポトーシスにおけるリボゾームサブユニットとリボゾームタンパク質の解析を行った。解析対象のアポトーシスとして上記 2 つの系にスタウロsporin で刺激したヒト MCF-7 細胞および紫外線を照射したヒト 293T 細胞を加えた。リボゾームサブユニットの解析はポリアクリルアミド-アガロース複合ゲル電気泳動法により行った。本法を用いた解析ではリボゾームサブユニットの変化は見いだされなかったことから、リボゾーム RNA の断片化を含むアポトーシスの執行過程においてリボゾームは断片化や顕著なコンフォーメーションの変化を起こさないことが示唆された。アポトーシスにおけるリボゾームタンパク質については 21 種類の同タンパク質に対する抗体を用いた免疫プロテオミクス法によって解析した。この解析によりアポトーシスを起こした乳がん細胞株 MCF-7 細胞において S11 タンパク質の発現が特異的に down-regulation される知見が得られた。S11 の down-regulation はスタウロsporin で刺激した他の乳がん細胞株においても認められた。昨年度我々は S11 の発現量ががん細胞間で変動することを示したが、今回の知見と併せて、S11 は特定の細胞内環境下においてその発現量が大きく変動するという特性を有していると考えられる。一方、アポトーシスにおけるリボゾームタンパク質の変化を網羅的に解析するため、*in vitro* 転写・翻訳系を利用してすべてのヒトリボゾームタンパク質を調製し、これらがアポトーシスの執行役である caspase-3 および caspase-6 の基質として機能しうるか否かを検討している。

2. リボゾームタンパク質の網羅的解析（リボソミクス）

のためのツール（特異抗体および GST 融合タンパク質）の調製とその応用（瀬野，青木^{*1}，瀧澤）

タンパク質生合成におけるリボゾームの役割については多くの基礎生物学的研究がなされてきたが、リボゾームにおける個々のリボゾームタンパク質の役割については不明な点が多い。さらに最近特定のリボゾームタンパク質と遺伝病およびがんとの関連が指摘されリボゾームタンパク質の新しい機能の存在が示唆されている。我々はヒトリボゾームおよびその構成成分の網羅的研究をリボソミクス（ribosomics）と命名し取り組んでいる。この一環としてすべてのヒトリボゾームタンパク質に対する特異抗体の作製を目標に昨年度までに 26 種類のタンパク質に対するウサギ抗体を得た。今回、新たな抗体を得るためニワトリを免疫源としてリボゾームタンパク質に対する抗体の作製を検討した。すなわち、コンピューター解析により抗原として適当と推定されたそれぞれのリボゾームタンパク質（計 10 種類）のペプチド配列を化学合成し、ヘモシアニン（KLH）に結合し、これをメスのニワトリに免疫した。このニワトリの卵黄から精製された抗体（IgY）について酵素免疫定量法およびラットリボゾーム等を用いたイムノプロテオミクスによって反応性を調べた。その結果精製リボゾームに反応する新しい抗体 3 種類（抗 S3a，抗 S19 および抗 L10a）を得た。このうち 2 種類（抗 S3a および抗 L10a）は細胞溶解液中の抗原タンパク質とも特異的に反応した。これらの抗体はたとえば別項のアポトーシスにおけるリボゾームタンパク質の解析等に応用されている。また我々は個々のリボゾームタンパク質の未知の extraribosomal function を網羅的に解明するため、昨年 pGEX にサブクローニングしたすべてのリボゾームタンパク質の cDNA を利用して、77 種類のリボゾームタンパク質について GST 融合タンパク質として大腸菌内に発現させ精製を行った。現在各 GST 融合タンパク質を用いて各リボゾームタンパク質の自己リン酸化活性をスクリーニング中である。

3. RPL29 の多型分析（瀬野，吉仲^{*1}，野津^{*1}）

上述した全ヒトリボゾームタンパク質 cDNA80 種類の発現プラスミド作製の際に発見したリボゾームタンパク質 L29 遺伝子のリジアラニンリピート（3,4,5）の違いは、リジンがポジティブチャージをもつアミノ酸であることから、相互作用するタンパク質との結合性の変化によって重要な表現型に結びつく可能性が高いと考えられる。L29 遺伝子のリジアラニンリピートは NCBI EST データベースにもリピート数が異なるクローンが含まれることを確認したが、ラット，マウス由来の L29 遺伝子にはこのリジアラニンリピートは存在しない。そこで、ゲノム DNA でのリジアラニンリピート数を把握するため、ヒトリボゾームタン

パク質 L29 遺伝子のイントロン，エクソンのジャンクションを決定後，ゲノム DNA でのリジルアラニンリピート数の検出条件を PCR とダイレクトシーケンスにより設定した。p53 野生型のヒトがん細胞株と肺がん，乳がんのヒト腫瘍組織サンプルにおけるヒトリボゾームタンパク質 L29 遺伝子のリジルアラニンリピート数を解析した結果，高頻度に 3,4,5 の 3 種類の異なる長さのリピートが認められたが，組織サンプルでのリピート数は同一患者の正常組織と腫瘍組織で同一であり，がんのリピート数に相関関係は認められなかった。また，異常なトリプレットリピートの伸長は遺伝性神経筋疾患の原因の 1 つであると報告されているが，L29 遺伝子には 3,4,5 以外の異常に伸長したリジルアラニンリピートは検出されなかった。今後，組織サンプル数を増加することにより，L29 遺伝子のリジルアラニンリピート数を解析し多型であることを確認するとともに，他のリボゾームタンパク質遺伝子についても，1 塩基多型をも含めたヒトリボゾームタンパク質遺伝子の多型を網羅的に解析する予定である。

4. リボゾームタンパク質を過剰発現させたトランスジェニックマウスの作製（灘野^{*1}，飛田^{*1}，瀧澤^{*1}）

リボゾームタンパク質ならびにリボゾーム関連タンパク質の生体内における役割を検索しかつ明快に示すため，これらのタンパク質の遺伝子を過剰に発現したトランスジェニックマウスの作製を試みた。解析対象としてヒトリボゾームタンパク質 Sa（培養細胞において過剰発現によって細胞周期制御活性とアポトーシス促進活性が示された），ヒトリボゾームタンパク質 L29 gene1 および gene 2（gene 1 に多型が存在することを見いだした，また gene2 は我々の研究より新たに見いだされた遺伝子），マウス NADE（神経成長因子受容体 p75 に結合して細胞死を促進するタンパク質であり，その促進機構としてタンパク質合成系の制御が示唆されている）および Fas（活性化により 28S リボゾーム RNA 分解を引き起こす細胞死受容体，FAP-1 [Fas-associated phosphatase-1] が結合することによりアポトーシスの抑制を受けるヒト型 Fas）の 5 種類を選択し，全組織における過剰発現を目的としてそれぞれのタンパク質（野生型）の全長を含む cDNA を β -アクチンプロモーターでドライブする発現用カセットに組み込んだ。各 cDNA を含む発現用カセットは C57BL/6 の受精卵に注入した後，仮親に移した。産子の尾 DNA を PCR を利用して遺伝子型解析することにより上記の遺伝子が組み込まれたマウスを選択することに成功した。今後，この遺伝子が子孫に遺伝すること，および組織において遺伝子産物が過剰発現することを確認し，各遺伝子の過剰発現に伴う表現系を解析する予定である。

5. リボゾームタンパク発現プロファイリングによる extraribosomal function をもつリボゾームタンパク質のスクリーニング（永瀬^{*1}，木村^{*1}，五十嵐^{*1}）

がんの発生，正常発生および突然変異体の発生過程におけるリボゾームタンパク質の関与を同定するために，extraribosomal function を有するリボゾームタンパクのマウスでのスクリーニングを検討した。マウス発がんモデルにおける多段階発がんの各過程での背景遺伝子としてのリボゾー

ム遺伝子の影響を調べるため，発がん修飾遺伝子座とリボゾームタンパクのマップの比較を行いながら候補となるリボゾームタンパクを確認した。さらに発がん過程に関与する遺伝子をスクリーニングするため，マウス皮膚がんモデルより得られた正常ケラチノサイトを含む各段階の培養細胞を樹立し，この細胞間でマウス遺伝子の発現量の差をスクリーニングした。即ち発現量の少ない遺伝子の On-Off を検索する目的でのサブトラクション法，および絶対値で定量化し発現量が検出可能な Affymetrix array を用いたスクリーニングを試みた。またがん発生に加え，正常発生については，組織特異的に胎生時期の器官形成期に発現量が変わる遺伝子および変異個体として発生するマウス胎児の奇形器官発生で正常器官発生と異なる遺伝子発現量を示す遺伝子のスクリーニングをも実施した。正常発生においては胎生 13 週と 15 週の比較で，乳腺については S5，S10，L41，S12，S16 タンパク質，顎下腺については L35a，L7，L32 タンパク質の発現変化が認められ，重粒子線を用いた変異導入により作製した神経系の発達遅延マウスで S3，S5，S28，L3，L6，L10a の発現抑制が認められた。このような発生，発達，がん発生過程等で発現量が変化するリボゾームタンパク質には，その表現型の変化に直接あるいは間接的な影響を与えているものが含まれている可能性があると考えられる。さらにスクリーニングしていく中で extraribosomal function を持つと予想される候補リボゾームタンパクを同定し詳細なタンパク機能を解明していくと同時に，候補が同定された時点で表現型としての発生過程等が既に解っていることから，発生過程などの系を直接利用した詳細な検討も実施していく。

6. アポトーシスを起こしたがん細胞におけるリボゾームタンパク質の構造と局在性の変化（中西^{*1}，白土^{*1}）

アポトーシスを起こした細胞ではタンパク質合成が低下するが，リボゾームの主たる成分であるリボゾームタンパク質の構造変化に関する情報は乏しい。そこで，79 種類のヒトリボゾームタンパク質を認識するポリクローナル抗体を利用して，アポトーシスを起こしたがん細胞におけるリボゾームタンパク質の構造と細胞内局在性の変動を包括的に解析した。その結果，抗がん剤ドキシソルビシン存在下に培養してアポトーシスを誘導した成人 T 細胞白血病由来細胞株 Jurkat 細胞から調製したポリソームでは，260 nm における吸光度の顕著な減少が観察された。また，ポリソーム画分に含まれるタンパク質を解析したところ，アポトーシス誘導時に分子質量約 43 kDa のペプチドがポリソーム画分に濃縮されてくることが分かった。このペプチドの部分アミノ酸配列を決定すると，クレアチンキナーゼとの高い相同性が得られた。また，アポトーシス細胞抽出液のウェスタンブロッティング（抗体 30 種類を使用）での解析を行ったところ，S18，L5 および L14 の 3 種のリボゾームタンパク質を認識する抗体では完全長のタンパク質よりも移動度の大きいシグナルが検出された。これらの新たなシグナルは，抗体反応時に抗原ペプチドを共存させると消失したことから，これらのシグナルは 3 種のリボゾームタンパク質がアポトーシス細胞において部分分解を受けたために出現したと考えられた。先に示したように，リボゾームサブユニット・コンフォーメーションの変化は検出されない

ものの、個々のリボソームタンパク質レベルでは部分的な分解が起きていると思われる。なお、*in vitro* における caspase に対する反応性の解析から、L5, L14 が caspase-6 によって、L14 は caspase-3 によっても切断されることを確認している。さらに、27 種類の抗体を用いて Jurkat 細胞のフローサイトメトリー解析を行ったところ、7 種類のリボソームタンパク質 (S15, P0, L5, L6, L7, L36a, L41) に対する抗体がアポトーシス細胞の表層に結合したことから、これらのタンパク質がアポトーシスに伴って細胞内局在性を変化させ、細胞表層に移動することが示唆された。一方、リボソームタンパク質の分解がタンパク質合成能の低下の原因になり得るかどうかを知るために、アポトーシス細胞におけるこれら 2 つの変化のタイムコースを調べたところ、リボソームタンパク質の分解はアポトーシスを誘導してから 24 時間以上経過しないと観察されなかったが、タンパク質合成の低下は 12 時間以内に始まることが分かった。アポトーシス誘導時におけるリボソームタンパク質の構造変化はタンパク質の部分分解でありタンパク合成が低下した後に観察されたことから、この変化はアポトーシス細胞でのタンパク合成能低下の原因ではなく、細胞機能を最終的に破壊するための現象ではないかと考えられる。

7. 乳がん、甲状腺がんにおけるリボソームタンパク質発現の免疫染色による検討 (石川^{*1})

肺がんにおけるリボソームタンパク質の発現強度は、肺がんでは組織型と発がん物質との関係がかなり確立しており、また悪性度が異なることから組織型別にリボソームタンパクの発現率が異なるとすると興味深い結果となるが、preliminary な結果では扁平上皮がんや小細胞がん に比べ、腺がんでは陽性率が高い傾向があった。そこで本年度は乳がん と甲状腺がん (癌研究会付属病院で切除された乳がん 20 例 [平均年齢 53 才], 甲状腺がん 15 例 [平均年齢 46 歳, 男:女 = 3:12 例] をホルマリン固定した後パラフィン包埋した組織) において同様の抗体を用いて染色し、発現の程度を検討した。しかしながら、乳がん、甲状腺がん共にがん細胞と周囲の間質細胞との間に明瞭な染色強度の差を認めなかった。即ちバックグラウンドが高く、対象とするがん細胞の染色性を評価することが困難であった。肺がんの場合は凍結組織が使用可能であり、それをアセトン固定した材料をパラフィン包埋し染色することで比較的良好な染色結果を得たが、今回の乳がん と甲状腺がん の場合はアセトン固定材料を使えなかったことが良好な染色結果を得られなかった主原因と考えられる。今後は凍結材料を得る努力をすること、およびパラフィン材料でも良好な染色結果の得られる抗体の開発が考えられるが、後者の抗体を開発できれば病理で保存されている膨大なホルマリン固定材料を利用できるので、より展望が開けると考えられる。

8. DNA チップによるリボソーム遺伝子発現解析 (油谷^{*1})

最大 6 万個の遺伝子あるいは EST (Expressed Sequence Tag) についてオリゴヌクレオチドアレイを用いて肝細胞がんおよび肝芽腫における遺伝子発現プロファイルの解析を行った。検体としては、外科的に切除された原発性肝がん 23 例 (高分化型肝がん 5 例, 中分化型肝がん 8 例, 肝芽

腫 8 例, von Gierke 病合併肝がん 2 例) と背景肝 10 例 (肝硬変 6 例, 慢性肝炎 2 例, von Gierke 病 2 例), およびコントロールとして肝炎ウイルスに罹患していない転移性肝がんの正常肝 10 例について、GeneChip (Affymetrix) ヒト U95A アレイを用いて発現プロファイル解析を行った。2 方向クラスタリングなどのクラスタ分析ではがん部と非がん部の分類に加え、肝がんの分化度による分類、非がん部では正常肝と慢性肝炎、肝硬変にそれぞれ分類することが可能であった。さらに症例数は少ないものの、肝硬変組織については B 型・C 型肝炎ウイルスにより分類することも可能であった。一方、正常、慢性肝炎、肝硬変、早期がんである高分化型肝がん、古典的肝がんである中分化型肝がん、小児肝腫瘍である肝芽腫に特異的な「判別のための遺伝子」の選定により、各グループへの重み付け場合分け解析が可能であった。U95A アレイは昨年度の報告で用いたヒト FL アレイよりもデータの再現性が高い印象であり、蛍光強度測定の調整により、高レベルに発現するような遺伝子についてもより定量的な取扱いが可能となった。リボソーム遺伝子群の腫瘍組織における発現変動、非リボソーム遺伝子との発現レベルの相関について詳細な検討を進めている。

^{*1} 研究協力員

口頭発表 Oral Presentations (国際会議等)

Nagase H., Yoshiki A., Yoshida-Noro C., and Kusakabe M.: "Possible use of somatic and germ-line mutation induced by heavy ion beam (HIB) irradiation in mouse carcinogenesis models", 14th Int. Mouse Genome Conf. (IMGC 2000), (RIKEN and others), Narita, Nov. (2000).
Nadano D., Irie S., and Sato T.: "Ribosomics: A comprehensive study of the human ribosome and its components", 3rd ORCS Int. Symp. on Ribosome Engineering, Tsukuba, Jan. (2001).

Research Subjects and Members of Ribosome Engineering Research Unit

1. Function Analysis of Ribosomal Proteins in Mammalian Cells
2. Mechanism of Rescue to Cell Death and Modification of Protein
3. Mutation of Ribosomal Proteins and Regulation of Gene Expression Related to Cancer

Head

Dr. Shinji IRIE

Members

Dr. Daita NADANO

Visiting Members

Ms. Chikage AOKI

Dr. Hiroyuki ABURATANI (Res. Cen. Adv. Sci. Tech.,
Univ. Tokyo)

Mr. Jun IGARASHI

Dr. Yuichi ISHIKAWA (Jpn. Fund. Cancer Res.)

Ms. Mika KIMURA

Ms. Kaoru TAKIZAWA

Dr. Yuji NAKAI (Dept. Med., Kanazawa Univ.)

Dr. Yoshinobu NAKANISHI (Dept. Med., Kanazawa
Univ.)

Dr. Hiroki NAGASE

Ms. Tomomi NOTSU

Mr. Takayuki HIDA

Dr. Akiko HIRAYAMA (Dept. Med., Kanazawa Univ.)

Ms. Naomi FURUYA

Dr. Toko YOSHINAKA