

Iwamoto T, Ohkawa K, Yoshida K, Yanaga K, Takeda K. An efficient system for secretory production of fibrinogen using a hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatol Res* 2015; 45(3): 315-25.

- 5) Asakura T, Yamaguchi N, Ohkawa K, Yoshida K. Proteasome inhibitor-resistant cells caused EMT-induction via suppression of E-cadherin by miR-200 and ZEB1. *Int J Oncol* 2015; 46(5): 2251-60. Epub 2015 Mar 4.

## II. 総 説

- 1) Nihira NT, Yoshida K. Engagement of DYRK2 in proper control for cell division. *Cell Cycle* 2015; 14(6): 802-7.

## III. 学会発表

- 1) Dashzeveg N, Taira N, Yoshida K. Tumor suppressor p53 with Ser46 phosphorylation controls cell death via palmdelphin in the apoptotic response to DNA damage. 4th International Conference on "Current advances in Microbiology and Immunology". Ulaanbaatar, June.
- 2) 朝倉 正, 山口乃里子, 青木勝彦, 吉田清嗣. プロテアソーム阻害剤体制がん細胞は CD44 高発現によりがん幹細胞化するとともに EMT を誘発する. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜, 9 月.
- 3) 三本 麗, 井廻良美, 山口乃里子, 仁平直江, 武山浩, 吉田清嗣. RAD001 は化学療法体制 DYRK2 低発現乳癌において有効である. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜, 9 月.
- 4) ダシゼウエゲヌルマ, 吉田清嗣. P53 は DNA 損傷に应答して miR-1915 の成熟に関わる事で Bcl-2 の発現を抑制しアポトーシスを誘導する. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜, 9 月.
- 5) 加賀美裕也, 仁平啓史, 尾野雅哉, 吉田清嗣. Mps1/TK は condensin II のリン酸化を介して染色体凝集を制御する. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜, 9 月.
- 6) 山口乃里子, 三本 麗, 上田 和, 仁平直江, 矢内原臨, 岡本愛光, 吉田清嗣. 卵巣漿液性腺癌における DYRK2 を介した転移・浸潤メカニズムの解明. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜, 9 月.

## 分子生物学講座

教授：松藤 千弥 生化学・分子生物学  
 講師：小黒 明広 分子生物学  
 講師：村井 法之 生化学・分子生物学

### 教育・研究概要

生理活性物質ポリアミン（プトレッシン，スベルミジン，スベルミン）は全ての細胞中に多量に存在し、主に核酸に結合して、遺伝子発現や細胞の増殖・分化に重要な役割を果たしている。ポリアミンは増殖の盛んな細胞内では増加しているため、がんのバイオマーカーとしても有用である。動物細胞のポリアミン生合成は、オルニチン脱炭酸酵素（ODC）の働きによりオルニチンを材料にプトレッシンが合成され、次いでスベルミジン，スベルミンの順で合成される。ODC はアンチザイム（AZ）と結合することにより分解に導かれる。AZ の発現は翻訳フレームシフトで制御されており、その効率は細胞内のポリアミン濃度により規定されている。細胞内ポリアミン量は、この負のフィードバックシステムにより調節されている。AZ は哺乳類では AZ1, 2, 3 の 3 種類が存在し、さらに AZ は 2 種類のアンチザイムインヒビター（Azin1, 2）により機能阻害される。我々はポリアミンの調節系の生物学的意義と分子機構を解明し、さらにそれらを利用した研究および診断ツールの開発を目指している。

### I. AZ2 による c-MYC の分解機構とその意義

昨年までに AZ2 が c-MYC と特異的に結合してその分解をユビキチン非依存的に促進することを発見し、AZ2 は c-MYC と核、特に核小体に共局在することを明らかにした。引き続き c-MYC の核小体における分解に及ぼす AZ2 の影響について解析した。c-MYC の核小体局在には NPM1 という核小体タンパク質が重要であることがわかっており、NPM1 を過剰発現させると、c-MYC の核小体局在が増加するとともに分解が促進されることが報告されている。この条件下において、AZ2 のノックダウンおよび強制発現を行ったところ、内在性 c-MYC の分解は、AZ2 のノックダウンでは抑制され、過剰発現では促進された。また、ユビキチン化されない c-MYC の変異体（T58A）は、NPM1 存在下で分解されるが、そこに AZ2 を強制発現させると c-MYC の分解がさらに促進された。以上の結果は、AZ2 が核小体で c-MYC をユビキチン非依存的に

分解促進する可能性を示唆する。

## II. AZ と ATP クエン酸リアーゼの相互作用の解析

AZ2 に相互作用する分子としての1つとして、ATP クエン酸リアーゼ (ACLY) を同定し、in vitro および in vivo において ACLY が AZ2 だけでなく AZ1 にも結合すること、また AZ は in vitro において ACLY の活性を促進することを明らかにしてきた。今年度新たに、in vivo においてポリアミンで AZ の発現を誘導すると ACLY が活性化され、AZ をノックダウンすると ACLY 活性が抑制されることを見いだした。この際 ACLY の活性化に関与する Ser455 のリン酸化は、AZ の有無により変化しなかった。これらの結果は、AZ は細胞内において ACLY と相互作用し、既知の Ser455 のリン酸化以外の機序で ACLY 活性を促進することを示している。現在、安定同位体標識クエン酸を用いた細胞内同位体ラベルアセチル CoA の定量分析による ACLY 活性の評価方法の確立に向け、詳細な測定条件検討を行っている。

## III. AZ1 ノックアウトマウスの造血幹細胞の特性

AZ1 のノックアウトマウスは、組織中のポリアミン濃度の高値と著しい貧血を呈し、ほとんどが胎生後期に死亡する。これまでに赤芽球系前駆細胞数、骨髓球マクロファージ系前駆細胞数および共通骨髓球系前駆細胞が低下しており、分化能が低下した造血幹細胞が増加している可能性を示してきた。全ての造血幹細胞の活性が一樣に低いのか、一部の造血幹細胞の活性が低いのか明らかにするために、限界希釈した胎仔肝を骨髓移植のドナー細胞として用い、造血幹細胞の長期構築能および多能性について解析を行った。移植後4ヶ月以降、生着した造血幹細胞に由来する造血細胞で構成されるレシピエントマウスの末梢血を解析した結果、野生型と同様の多能性を有する造血幹細胞の他に、骨髓球系への分化が抑制された造血幹細胞の存在を見だし、一部の造血幹細胞のみが傷害されているモデルが支持された。

## IV. Azin1 の生理機能の解析

Azin1 の生理機能を解析する目的で、*Azin1* 変異型マウス胎児由来繊維芽細胞 (MEFs) を用いて ODC 活性を調べた。ほぼ均一な野生型 MEFs (MEFs<sup>+/+</sup>) に対して、*Azin1* 変異型 MEF (MEFs<sup>-/-</sup>) には多数 (全細胞の約 30%) の異常に小さい細胞が認められた。ノコダゾール処理により G2/M 期に同調

した MEFs<sup>-/-</sup> の ODC 活性は、MEFs<sup>+/+</sup> の 3.3% と著しく低かった。また、cell dilution による ODC 活性の誘導も MEFs<sup>-/-</sup> では MEFs<sup>+/+</sup> の 23% であった。これらの結果は Azin1 が細胞の正常な増殖に重要であることを示している。次に、MEFs<sup>+/+</sup> と MEFs<sup>-/-</sup> で発現に差のあるタンパク質を液体クロマトグラフィータンデム質量分析法で解析したところ、前述の ACLY など興味深いタンパク質が見出された。また、キャピラリー電気泳動-質量分析法により、ポリアミン代謝と葉酸代謝を中心にメタボローム解析を行なったところ、MEFs<sup>-/-</sup> における著しい代謝障害が示された。現在解析をさらに進めている。

## V. ヒト PURE システムを使った AZ 翻訳フレームシフトの解析

ヒト PURE システムは精製した因子で再構成した in vitro 翻訳系で、ポリアミンを含めた特定の因子を系に加えたり、除いたりすることが容易に行なえるという利点がある。AZ の翻訳フレームシフト機構の解析を行う目的で、ヒト PURE システムの系で AZ の翻訳フレームシフトが再現できるかを確認した。ヒト AZ1 遺伝子を翻訳させたところ、翻訳効率は低いながらも全長の AZ1 翻訳産物がポリアミン依存的に合成されてくることが確認できた。現在、この系を用いて、フレームシフトに関与するシス要素やトランス因子の解析を進めている。

## VI. スペルミン結合アプタマーの相互作用様式の解明

RNA アプタマーは標的分子と強い親和性を持つ機能性 RNA であり、標的分子の検出・解析ツールとして利用されたり、標的結合配列/モチーフの解析に用いられる。我々はスペルミンに結合するアプタマー (スペルミン結合アプタマー) を取得し、このアプタマーのスペルミン結合配列/モチーフの解明を行っている。昨年度から引き続き定温滴定型カロリメーター装置を用いてアプタマーとスペルミンの相互作用解析を行ない、解析精度の向上を図った。測定結果から、結合比はスペルミン:アプタマー = 1 : 0.85、解離定数は 27.2  $\mu$ M と算出された。また NMR 解析によって塩基対内のイミノプロトンとピリミジン残基の H5-H6 相関ピークを測定し、スペルミンの有無でのシグナルの変化を観察した。その結果、これら両者でスペルミン添加によるシグナルの変化が観察された。さらにシグナル変化が見られる塩基がアプタマーの広い範囲に及んでいたこ

とから、スベルミンがRNAの立体的な構造変化を誘導していることが示された。また熱安定性解析よりスベルミン結合アプタマーの融解温度を測定した結果、スベルミンと結合することでアプタマーの安定性が増していた。これらの結果より、スベルミンはRNAアプタマーと結合することでその構造変化を促し、より安定な形態へと遷移させることが示唆された。

## 「点検・評価」

### 1. 教育

主に2年生前期の基礎医科学Ⅰ「分子から生命へ（講義、演習、実習）」を生化学講座、総合医科学研究センターおよび生化学研究施設と共同で担当した。講義では記憶主体の学習でなく、学生がより論理的に内容を理解、学習するように促し、講義中に学習課題を積極的に提示し、試験では論述問題を主体に出題した。また、演習と実習では少人数のグループで行い、自己学習とそれを基にしたディスカッションを通して、自発的な学習と他者との意見交換の重要性について理解を深めさせるように努めた。演習では学習内容が学年レベルに達しないと判断された場合、再度自己学習を行なうように指導し、その結果を再評価するようにした。実習は昨年度とは異なる内容で行ない、昨年度受講生からの情報の伝達を遮断し、学生が一から学習する状況を生じさせる工夫を行った。さらに、実習では口頭試験を行ない、内容を論理的に説明できることを中心に評価するようにした。全体的には演習や講義の内容と実習内容の関連性をより明確にし、学生がスムーズに実習内容を理解できるよう工夫した。

その他、所属教員は医学総論、基礎医科学Ⅱ、臨床基礎医学Ⅰ、医学英語文献抄読、研究室配属、選択実習の各カリキュラムを担当した。また大学院教育においても共通カリキュラムの講義を担当した。

### 2. 研究

これまでの研究を継続して進め、コンスタントに学会等で発表を行っており、国際誌での論文発表も行なった。さらに、投稿準備中の論文も複数控えている。また、今年度より開始された研究プロジェクトもあり、今後の研究成果が期待される。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Matoba K, Kawanami D, Tsukamoto M, Kinoshita J, Ito T, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Murai N, Matsufuji S, Utsunomiya K. Rho-kinase regulation of

TNF- $\alpha$ -induced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B RelA/p65 and M-CSF expression via p38 MAPK in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307(5): F571-80.

- 2) Hirata Y, Murai N, Yanaihara N, Saito M, Saito M, Urashima M, Murakami Y, Matsufuji S, Okamoto A. MicroRNA-21 is a candidate driver gene for 17q23-25 amplification in ovarian clear cell carcinoma. *BMC Cancer* 2014; 14: 799.

## II. 総説

- 1) Murai N. Chapter 7: Antizyme. In: Kusano T, Suzuki H, eds. Polyamines: a universal molecular nexus for growth, survival, and specialized metabolism. Tokyo: Springer, 2015. p.91-9.

## III. 学会発表

- 1) 山口真紀, 山澤徳志子, 高木邦彰, 池田道明, 大城戸真喜子, 竹森 重. ポリアミン蓄積はスポーツ心臓の不整脈の誘因か? 培養細胞での検討. 第69回日本体力医学会大会. 長崎, 9月. [体力科学 2014; 63(6): 584]
- 2) 大城戸真喜子. (シンポジウム1: 医療: 次世代を育てる) 医学生・看護学生での試み 医学部1年生へのロービジョン教育. 第15回日本ロービジョン学会学術総会. さいたま, 11月.
- 3) 田島彩沙, 村井法之, 村上安子, 松藤千弥. がん細胞増殖におけるアンチザイムとATPクエン酸リアーゼの相互作用の意義. 日本ポリアミン学会第6回年会. 東京, 1月.
- 4) 小黒明広, 柳田明日美<sup>1)</sup>, 天野 亮<sup>1)</sup>, 坂本泰一<sup>1)</sup>, 河合剛太<sup>1)</sup> (1千葉工業大), 松藤千弥. 等温滴定型カロリメーターを用いたRNAアプタマーとスベルミンの相互作用解析. 日本ポリアミン学会第6回年会. 東京, 1月.
- 5) 柳田明日美<sup>1)</sup>, 藤枝裕大<sup>1)</sup>, 小黒明広, 松藤千弥, 河合剛太<sup>1)</sup> (1千葉工業大). スベルミンに結合するRNAアプタマーの結合様式のNMR法による解析. 日本ポリアミン学会第6回年会. 東京, 1月.