

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. 神経芽細胞腫におけるMYCNとAZ2の相互作用

昨年よりc-MYCとAZ2の相互作用の解析を行い、AZ2がc-MYCと核や核小体に共局在すること、c-MYCをユビキチン非依存的に分解促進することを見出した。本年度は、MYCのファミリーであるMYCNについてAZ2との相互作用の解析を行った。MYCNは神経芽細胞腫患者の細胞において高発現しているタンパク質であるが、AZ2の発現が高いほど患者の予後が良いという正の相関があることが報告されている。我々はc-MYCの解析結果を踏まえAZ2がMYCNとも相互作用しユビキチン非依存的にその分解を促進している可能性を考えた。HAタグを付加したAZ2（HA-AZ2）やMYCN（HA-MYCN）を神経芽細胞腫細胞SH-SY-5Yに発現させ、MYCN抗体やHA抗体を用いプルダウンアッセイを行った。その結果AZ2はMYCNと結合することがわかった。コントロールとして用いた

ODCはMYCNには全く結合しなかった。また293-FおよびSH-SY-5Y細胞に発現させたHA-MYCNがAZ2の有無によって分解が促進されるか解析すると、AZ2が存在するとHA-MYCNの分解が促進された。これらのことから、AZ2は細胞内でc-MYCばかりでなくMYCNもユビキチン非依存的に分解促進することが示唆された。

II. AZとATPクエン酸リアーゼの相互作用の解析

AZ結合タンパク質の探索から新たにATPクエン酸リアーゼ（ACLY）を同定し解析を進めてきた。ACLYはアセチルCoA生成を触媒する酵素で、脂質代謝と細胞内成分のアセチル化に関与している。これまでに、AZ1とAZ2はACLYと結合し、両者の細胞質での共局在を確認した。予想に反し、AZ1やAZ2はACLYの分解を促進しなかったが、精製AZ1は精製ACLYの活性をin vitroで濃度依存的に増加させたことから、AZが分子間相互作用を介してACLY活性を調節していると考えられた。一方、ポリアミンはACLYに対して直接影響を与えなかった。今年度新たに、ヒトがん細胞においてAZ1やAZ2をノックダウンするとACLY活性が有意に減少して、アセチルCoAとコレステロールの両者の生成量が減少することを明らかにした。現在、アセチルCoAとポリアミン代謝とのクロストークに関してさらに解析を行っている。

III. AZ1ノックアウトマウスにおける造血幹細胞の不均質性

昨年度に引き続きAZ1ノックアウト（AZ1^{-/-}）マウスの研究を行った。AZ1^{-/-}マウスの重要な特徴は、組織プトレッシン濃度の増加、および著しい貧血を伴った部分胎生致死である。昨年の報告で、胎仔肝に存在する長期構築能を有する造血幹細胞（HSCs）は不均質であることを示した。胎生後期に胎仔肝から骨髄に移行したHSCsの不均質性は出生後も続くのかを調べるために、出生後6ヶ月のAZ1^{-/-}マウスから骨髄を採取し、レシピエントマウスに移植し、HSCsの再構築能を定量した。その結果、骨髄から採取したAZ1^{-/-}HSCsは胎仔肝から採取したAZ1^{-/-}HSCsと同様の不均質性を示した。

IV. Azin1の生理機能の解析

Azin1の生理機能を解析する目的で、自然発症的に不死化したAzin1正常型マウス胎児由来繊維芽細胞（MEFs^{+/+}）と、同様に不死化したAzin1変

異型 MEF (MEFs^{-/-}) で、キャピラリー電気泳動-質量分析法により、メタボローム解析を行った。Azin1 変異型 MEF ではブトレッシンは検出されず、スベルミジン、*N*-アセチルスベルミジン、*N*-アセチルスベルミンは何れも著しく減少するなど、ポリアミン代謝の障害、5-メチルテトラヒドロ葉酸の著しい減少など葉酸代謝の障害、およびホスホリボシルピロリン酸の著しい減少とグルタミンの著しい増加など核酸代謝の障害が示唆された。また、Propidium iodide を用いてフローサイトメトリーにより細胞周期を解析したところ、Azin1 変異型 MEF では G2M 期の比率の増加が認められた。また、アポトーシスに特異的とみなされている sub-G1 (hypodiploid) ピークの出現が認められた。

V. ヒト由来無細胞翻訳系を使った AZ 翻訳フレームシフトの解析

AZ の +1 翻訳フレームシフト機構の分子メカニズムの解析を行う目的で、ヒト由来無細胞翻訳系を用いて解析を進めている。無細胞翻訳系ではポリアミン存在下でフレームシフトだけでなく、終止コドンにおける読み飛ばし (リードスルー) が誘導されるため、複数の合成産物が混在してしまう。そこで、これらが単一産物として検出されるレポーターを構築した。リードスルー産物については、途中で出てくる終止コドンをアラニンのコドンに置換し、また、フレームシフト産物との分子量差を大きくする目的で下流に緑色蛍光タンパク質 (GFP) が融合した形で合成されるように改変した。さらにそれぞれの翻訳終結反応を終止コドンではなくウイルス由来のリリース配列に依存させ、終止コドンでのリードスルーは考慮しなくて良いようにした。このように作製したレポーターを HeLa cell 抽出液およびヒト再構成系で発現させ、SDS-PAGE 上でそれぞれの合成産物が単一バンドとして検出できることを確認した。現在、これを用いて、AZ のフレームシフトの分子機構の解明を進めている。

VI. スベ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、標的の結合配列/モチーフの解析に用いられる。我々はこれまでにスベルミンに結合するアプタマー (SL₂) を取得している。これまでの解析より、SL₂ の末端側とループ側の 2 つのステム構造と、それには含まれた内部ループ構造がスベルミンとの結合に重要であることが明らか

になっている。内部ループに面している末端側ステムの A-U 塩基対を G-C 塩基対に置換 (SL₂ GC) するとスベルミンへの結合活性は低下した。NMR 解析より、SL₂ の末端側ステムのシグナルは SL₂ GC のものと比べて拡幅していることが分かった。この結果は、SL₂ の末端側ステムが緩い構造を取っていることを示し、この緩いステム構造が RNA に可塑性を与え、スベルミンの結合部位が形成されることが考えられた。

「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, 総合医科学センターと共同で担当した。講義では暗記に頼る学習でなく、学生がより論理的に考えられるように、自己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。演習や実習のレポート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。実習は昨年度と同様の内容で行ない、その前段階の演習において実習内容との関連づけをより明確に行ない、効果的に学生に理解してもらえるように工夫した。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。

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、学術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、昨年度より開始された研究プロジェクトも順調に軌道に乗っており、これから重要な解析結果が得られてくると期待が持てる。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Tajima A, Murai N, Murakami Y, Iwamoto T, Migita T (Japanese Foundation Cancer Res), Matsufuji S. Polyamine regulating protein antizyme binds to ATP

citrate lyase to accelerate acetyl-CoA production in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 471(4): 646-51.

II. 総 説

- 1) 大城戸真喜子. 「次世代を育てる」医学生・看護学生への試み ロービジョン者の抱える問題に気づき、想像し、解決する方法を考える機会としてのロービジョン教育. *眼臨紀* 2016; 9(2): 113-9.

III. 学会発表

- 1) Tajima A, Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. Interaction between antizyme and ATP citrate lyase in cancer cells. Gordon Research Conference on Polyamines. Waterville Valley. June.
- 2) Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. Interaction between c-MYC and antizyme 2 in the nucleolus. Gordon Research Conferences on Polyamines. Waterville Valley. June.
- 3) Oguro A, Yanagida A¹⁾, Amano R¹⁾, Sakamoto T¹⁾, Kawai G¹⁾ (¹Chiba Inst Technol), Matsufuji S. Quantitative analysis of the interaction between spermine and RNA aptamer. Gordon Research Conferences on Polyamines. Waterville Valley. June.
- 4) Okido M, Matsufuji S. Heterogeneity of hematopoietic stem cells in antizyme 1 knockout mouse. Gordon Research Conferences on Polyamines. Waterville Valley. June.
- 5) 小黒明広, 柳田明日美¹⁾, 天野 亮¹⁾, 坂本泰一¹⁾, 河合剛太¹⁾ (¹千葉工業大), 松藤千弥. (ポスターセッション) ITC によるポリアミンと RNA アプタマーの結合様式の解析. 第 17 回日本 RNA 学会年会. 札幌, 7 月.
- 6) 田島彩沙, 村井法之, 村上安子, 松藤千弥. (ポスター) アンチザイムと ATP クエン酸リアーゼの相互作用の解析. 第 3 回がんと代謝研究会. 金沢, 7 月.
- 7) 山口真紀, 山澤徳志子, 大城戸真喜子, 池田道明, 山内秀樹, 竹森 重. 心筋細胞のカルシウム応答に対する細胞増殖因子ポリアミンの効果. 第 70 回日本体力医学会大会. 和歌山, 9 月.
- 8) 松藤千弥. (特別講演 3) 医科大学教育での臨床栄養学. 第 37 回日本臨床栄養学会総会・第 36 回日本臨床栄養協会総会第 13 回大連合大会. 東京, 10 月.
- 9) 小黒明広, 柳田明日美¹⁾, 天野 亮¹⁾, 坂本泰一¹⁾, 河合剛太¹⁾ (¹千葉工業大), 松藤千弥. (一般ポスター発表) NMR 法を用いたスベルミンと RNA アプタマーの相互作用解析. 第 54 回 NMR 討論会. 習志野, 11 月.
- 10) 村井法之. (ワークショップ 1W8-p: 生理活性物質ポリアミンから疾病と健康を考える) Introduction.

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会). 神戸, 12 月.

- 11) 村井法之, 村上安子, 松藤千弥. (ワークショップ 1W8-p: 生理活性物質ポリアミンから疾病と健康を考える) アンチザイム 2 と c-MYC の核小体局在とユビキチン非依存的分解. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会). 神戸, 12 月.
- 12) 田島彩沙, 村井法之, 村上安子, 松藤千弥. (ポスター発表: 疾患生物学-1) がん) がん細胞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解析. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会). 神戸, 12 月.