

分子生物学講座

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

教育・研究概要

I. 教育概要

- 今年度は以下の講義・演習・実習を担当した。
- ・「分子から生命へ」講義（アミノ酸代謝，核酸代謝，遺伝子発現制御）
 - ・「分子から生命へ」演習（タンパク質の一生，バイオフィオマトイクス，バイオハザードとケミカルハザード，生体分子の探査法）
 - ・「分子から生命へ」実習（マウス体色発現のメカニズム）
 - ・医学英語専門文献抄読Ⅰ
 - ・症候学演習
 - ・感染症チュートリアル
 - ・行動科学

II. 研究概要

当講座ではアンチザイム (AZ) というポリアミン調節タンパク質の分子機能に焦点を当て、ポリアミン調節系の生物学的意義の解明と医学的応用を目的として研究を推進している。ポリアミンは細胞増殖に必須の生理活性物質であり、個体発生や発がん深く関わっているばかりでなく、最近ではオートファジーを介して長寿（老化抑制）と関連していることが報告されている。AZは細胞内のポリアミン濃度が高値となると翻訳フレームシフト機構によって発現誘導され、ポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) に結合し、その活性を抑制するとともにプロテアソームによる分解を促進する。またAZはポリアミンの細胞内への取り込みも抑制する。このようにAZは細胞内のポリアミンのフィードバック調節を行っている。本年度、AZ・ポリアミンに関する以下の研究を行った。

1. 神経芽細胞腫におけるMYCNとAZ2の相互作用の意義

我々が明らかにしてきたがん遺伝子産物 c-Myc のAZ2を介するユビキチン非依存的分解に関連し、c-MycのファミリーであるMYCNもAZ2によって分解調節されていると推測し、昨年度プルダウンアッセイによる相互作用とAZ過剰発現の系によるMYCNの分解促進を確認した。本年度は他の神経

芽細胞腫株でのAZ2過剰発現系によるMYCNの分解、AZのノックダウンによる内在性MYCNの安定化および細胞内局在について解析した。MYCN遺伝子が増幅されている2つの神経芽細胞腫株、KellyおよびBE(2)-C細胞のAZ2を、siRNAを用いてノックダウンすると、両細胞においてMYCNタンパク質の増加が確認された。さらにそのノックダウン細胞におけるMYCNの分解を解析したところ、特にBE(2)-C細胞においてMYCNの分解が抑制された。またBE(2)-C細胞におけるHA-AZ2と内在性MYCNの細胞内局在をHA、MYCN抗体および蛍光二次抗体を用い蛍光顕微鏡で解析すると、プロテアソーム阻害薬MG132添加により両タンパク質は核質から核小体へ移行し共局在していた。これらのことからAZ2は神経芽細胞腫において核や核小体でMYCNと相互作用しその分解を調節している可能性がある。

2. 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は細胞質でアセチル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。ODCと同様にAZによるACLYの分解促進を予想したが、細胞内でAZ1、AZ2ともACLYの分解を促進しなかった。そこでACLY活性に対するAZの効果、培養細胞よりHAタグ付加のAZ1およびACLYを精製しin vitroで解析したところ、AZの濃度依存的にACLY活性を増加させた。これらのことは、AZ1はACLYを分解促進するのではなく、逆に活性化することが明らかとなった。さら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 (Tajima A, et al. 2016)。現在、AZとACLYを介するアセチルCoA合成促進作用がポリアミン代謝に与える影響について解析を進めている。

3. 高ポリアミン食摂取による代謝物への影響

加齢に伴いポリアミン量は減少する。高ポリアミン食摂取による代謝への影響を調べる目的で、コントロール食摂取野生型マウス、高ブトレッシン食摂取野生型マウス、およびポリアミン合成の促進したAZ1遺伝子Oaz1ヘテロ欠損マウス間で代謝物の比較をおこなった。血清のガスクロマトグラフィー質

量分析においては132の化合物が検出された。2-way ANOVA解析の結果、若齢群-高齢群間で25の化合物が、またコントロール食摂取群、高プトレッシン食摂取群およびOaz1ヘテロ欠損群間で18の化合物が、それぞれ有意差のある化合物として同定された。これらの中で、プトレッシン投与した高齢マウスの代謝物レベルのパターンは若齢マウス群に部分的に似ていた。

現在これらポリアミンによる代謝物レベルのパターン変化の生理的意義について解析を行っている。

4. ヒト無細胞翻訳系を使ったAZの+1フレームシフト機構の解析

ポリアミンにより誘導されるAZの+1フレームシフトの分子機構について無細胞翻訳系を用いて解析を行っている。AZフレームシフトにはシフト部位の終止コドンが必要であることが知られている。今回、このシフト部位の終止コドン(UGA)をセンスコドン(UUC, UAU, GGA)に置換した変異レポーターを作製し、HeLa細胞抽出液の無細胞翻訳系でフレームシフト解析を行った。すると、これまでの知見と異なり、シフト部位がセンスコドンの変異型AZでも+1フレームシフトがポリアミンにより誘導されてきた。質量分析を行ったところ、この変異型のフレームシフトはオリジナルのシフト部位と同じ位置で起こっていることが確認された。また、シフト部位の終止コドンを、ロイシンをコードしている3種類のコドン(CUG, CUA, UUA, コドン出現頻度はそれぞれ4%, 0.6%, 0.4%)に置換してもフレームシフトが誘導され、これらのロイシンコドン間ではフレームシフト効率には差が見られなかった。これらの結果は、シフト部位のコドンによるリボソームの停滞は、+1フレームシフトの誘導に必ずしも必須ではないことを示している。

〔点検・評価〕

1. 教育

講座としての主な教育は、コース基礎医科学Iユニット「分子から生命へ」講義、演習、実習である。講義では生化学分野のアミノ酸とヌクレオチド代謝を担当したが、糖代謝や脂質代謝などとも関連づけながら講義した。また講義の中で演習問題を行うなど、授業方法を工夫した。分子生物学分野では遺伝子発現の制御について講義した。自己学習課題を提示し学生が論理的に考えられるようにした。演習では、タンパク質の一生というテーマで、生体内でのタンパク質がどのように合成され機能しそして分解

されていくのか、またそれらがどのような生命現象や疾患と関係しているのかを、学生が自己学習しプレゼンテーションするPBL形式で学習させた。演習では実習と連携させて、実習時に必要な生命科学の実験法を理解させ、さらにコンピューターを用いたデータベース上から遺伝子情報の収集法や解析法を学習させ実習の内容の理解度を高めるように工夫した。演習や実習ではレポートを課し、その書き方などに問題がある学生に対しては個別に指導した。さらに実習では、最終日に口頭試験を行い実習の理解度を評価した。実習終了時に学生に対して行った独自のカリキュラム評価では、良好な評価を得た。

医学英語専門文献抄読Iでは医学・生命科学の英語文献を論文の構成、専門用語、実験手法などを学習しながら精読し、英語論文を読むための導入となるよう指導した。その他教育概要に挙げた演習等を担当したが、これらにおいては、学生がディスカッションにおいて自分の考えや意見を積極的に発言するように指導した。

2. 研究

学会発表はコンスタントに行っているが、講座主体の学術雑誌論文が少ないので、毎年各々の研究から論文発表できるように努力する必要がある。投稿あるいは投稿準備中の論文はあるので徐々に論文数も増加していくと考えている。また研究するための競争的資金の獲得もまだ少ないため一層の努力が必要である。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Jaafar ZA¹⁾, Oguro A, Nakamura Y (Univ Tokyo), Kieft JS¹⁾ (¹Univ Colorado). Translation initiation by the hepatitis C virus IRES requires eIF1A and ribosomal complex remodeling. *Elife* 2016; 5: e21198.
- 2) Oguro A, Yanagida A¹⁾, Fujieda Y¹⁾, Amano R¹⁾, Otsu M¹⁾, Sakamoto T¹⁾, Kawai G¹⁾ (¹Chiba Inst Tech), Matsufuji S. Two stems with different characteristics and an internal loop in an RNA aptamer contribute to spermine-binding. *J Biochem* 2017; 161(2): 197-206.

III. 学会発表

- 1) Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. (Poster) Novel ubiquitin-independent c-Myc degradation mediated by antizyme 2. 4th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives. Rome, Sept.

- 2) Tajima A, Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. (Oral, Poster) Antizyme binds to ATP citrate lyase to accelerate acetyl-CoA production in cancer cells. 4th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives. Rome, Sept.
- 3) Oguro A, Yanagida A¹⁾, Fujieda Y¹⁾, Amano R¹⁾, Otsu M¹⁾, Sakamoto T¹⁾, Kawai G¹⁾ (¹Chiba Inst Tech), Matsufuji S. (Poster) Two distinct stems and an internal loop in RNA aptamer are necessary for the specific spermine-binding. RNA2016. Kyoto, June.
- 4) 山口眞紀, 山澤徳志子, 大城戸真喜子, 池田道明, 山内秀樹, 竹森 重. (口頭) 心筋細胞のカルシウム応答と膜電位に対するポリアミンの効果. 第71回日本体力医学会大会. 盛岡, 9月.
- 5) 大野哲生, 山澤徳志子, 山口眞紀, 大城戸真喜子. (ポスター) 筋細胞へのポリアミンの効果. 第71回日本体力医学会大会. 盛岡, 9月.
- 6) 山口眞紀, 山澤徳志子, 大城戸真喜子, 池田道明, 栗原 貴, 山内秀樹, 竹森 重. (口頭) 心興奮現象に対するポリアミンの効果. 日本ポリアミン学会第8回年会. 習志野, 1月.
- 7) 山澤徳志子, 村山 尚¹⁾, 大城戸真喜子, 山口眞紀, 山内秀樹, 竹森 重, 櫻井 隆¹⁾ (¹順天堂大), 大野哲生. (口頭) 骨格筋の増殖と分化におけるポリアミンの調節機構 (Regulatory mechanisms of polyamine in skeletal muscle proliferation and differentiation). 第90回日本薬理学会年会. 長崎, 3月.
- 8) 山澤徳志子, 村山 尚¹⁾, 大城戸真喜子, 山口眞紀, 山内秀樹, 竹森 重, 櫻井 隆¹⁾ (¹順天堂大), 大野哲生. (ポスター) 骨格筋に対するポリアミンの作用 (Effects of polyamines on skeletal muscle). 第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月.
- 9) 小黒明広, 重田友明¹⁾, 岩本武夫, 今高寛晃¹⁾ (¹兵庫県立大), 松藤千弥. (口頭) アンチザイムの翻訳フレームシフト部位の終止コドンの役割. 日本ポリアミン学会第8回年会. 習志野, 1月.

V. その他

- 1) 植村武史 (アミンファーマ研究所), 大城戸真喜子. オルニチン脱炭酸酵素活性の測定. ポリアミン 2016; 3(1): 14-22.

薬理学講座

- 教授: 靱山 俊彦 中枢シナプスの生理学および薬理学
- 教授: 木村 直史 呼吸・循環調節の生理学・薬理学, 医学教育
- 講師: 大野 裕治 内分泌薬理学
- 講師: 西 晴久 内分泌薬理学, アレルギー学
- 講師: 石川 太郎 中枢神経系の生理学および薬理学
- 講師: 川村 将弘 神経薬理学
- 講師: 中村 行宏 中枢神経系の生理学および薬理学

教育・研究概要

I. 大脳基底核・前脳基底核シナプス伝達に関する研究 (靱山俊彦)

前脳基底核は中枢アセチルコリン性ニューロンの起始核であり, 記憶, 学習, 注意等の生理的機能と密接に関係するとともに, その病的状態としてアルツハイマー病との関連が示唆されている。また, 線条体は運動制御の中枢として, パーキンソン病等大脳基底核関連疾患と関連している。前脳基底核抑制性シナプス伝達機構および修飾機構に関する電気生理学的解析によって, 抑制性シナプス伝達修飾におけるセロトニン受容体の機能を明らかにした。また, 現在, 大脳基底核, 前脳基底核シナプス伝達における転写因子等の情報伝達系の関与, フェロモン受容に関与する新規チャネル結合型受容体の機能を解明すべく, 研究を進めている。さらに, 局所神経回路機能の解析をより精密に行うために新たな技術を導入し, 特定のニューロンを光刺激によって活性化することによってシナプス電流を誘発し, ムスカリン受容体を介する抑制機構の解析を進めている。

本プロジェクトによる基礎的データが, 上記能領域関連の変性疾患に対する新たな治療法開発につながることを期待したい。

II. 脊椎動物の神経性呼吸調節に関する研究 (木村直史)

Xenopus laevis の単離された脳幹の神経呼吸出力は, 2つの運動パターン, 肺換気様の大きいバーストと機能的に不明の小さいバーストを発現した。肺呼吸に関連した大きなバーストは, 低濃度 (0.1 μ M) の μ -オピオイド受容体アゴニスト, DAMGO の灌