

2017; 75(増刊3 乳癌学): 102-6.

- 3) 山田幸司, 米田悦啓, 岡 正啓. 第4編: 検査・診断法 第1章: 新規腫瘍マーカーと診断技術 第2節: 核輸送因子インポーター $\alpha 1$ の新たな機能. 次世代がん治療: 発症・転移メカニズムからがん免疫療法・ウイルス, 診断法まで. 東京: エヌ・ティー・エス, 2017. p.285-94.

Ⅲ. 学会発表

- 1) 山本武徳, 仁平直江, 與五沢里美, 青木勝彦, 吉田清嗣. RNF8とDYRK2の相互作用はDNA二本鎖切断部位へのDNA修復因子のリクルートを制御する. 第75回日本癌学会学術総会. 横浜, 9月.
- 2) 木澤隆介, 青木勝彦, 多胡直子, 吉田清嗣. DYRK2の活性制御機構に関する研究. 第134回成医学会総会. 東京, 10月.
- 3) 與五沢里美, 吉田清嗣. 乳癌幹細胞株の骨転移に関与する遺伝子の解析. 平成29年度先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会. 茅野, 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: 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。

- ・コース基礎医学Ⅰのユニット「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）
- ・コース基礎医学Ⅰのユニット「分子から生命へ」演習（タンパク質の一生, バイオインフォマティクス, バイオハザードとケミカルハザード, 生体分子の探査法）
- ・コース基礎医学Ⅰのユニット「分子から生命へ」実習（食欲・体重調節機構: レプチンとレプチン受容体）
- ・コース外国語Ⅲのユニット「医学英語専門文献抄読Ⅰ」
- ・コース臨床基礎医学のユニット「症候学演習」
- ・コース臨床基礎医学のユニット「感染・免疫テュートリアル」
- ・コース臨床基礎医学のユニット「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た長寿（老化抑制）や血管の炎症抑制による動脈硬化予防にも関与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は細胞内ポリアミンの濃度のフィードバック調節を行っている。また、AZにはその機能を抑制するタンパク質、アンチザイムインヒビター（AZIN）が存在する。本年度は、このポリアミン調節タンパク質アンチザイムの発現機構や

AZIN を含めた AZ と相互作用するタンパク質との相互作用とその意義について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

我々はこれまで、がん遺伝子産物 c-Myc のユビキチン依存的分解経路とは別に、c-Myc が AZ2 を介してユビキチン非依存的に分解促進されることを明らかにしさらに、AZ2 が神経芽細胞腫細胞株で高発現している MYCN と相互作用しその分解を促進することを見いだした。今年度は、MYCN と AZ2 の相互作用と AZ2 を介したユビキチン非依存的分解が神経芽細胞腫細胞株の増殖と関連があるか、軟寒天コロニーアッセイにより解析を行った。AZ2 をノックダウンした神経芽細胞腫株化細胞 BE(2)-C 細胞は、コントロール細胞に比べて2倍以上のコロニー量を形成し、そのサイズも増大していた。これらのことから、AZ2 は c-Myc と同様に核や核小体において MYCN の分解を制御していて、神経芽細胞腫の増殖に関与している可能性がある。またこのことは、神経芽細胞腫患者で報告されている、「AZ2 の mRNA の発現が高いほど患者の予後が良好」という正の相関を説明できる可能性を秘めている。今後 AZ2 ノックダウン細胞を用いたゼノグラフトマウスモデル実験による腫瘍形成能の解析を計画している。

2. AZ と ATP クエン酸リアーゼ (ACLY) の相互作用の解析

AZ 結合タンパク質の探索から新たに 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、がん細胞内で AZ1 と AZ2 は ACLY と結合し、ACLY の活性を増加させることがわかった。我々は今回、このはたらきががん細胞だけでなく脂肪前駆細胞 3T3-L1 においても確認した。これまでに脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化にはポリアミンと ACLY が必須であることが知られていることから、AZ を介してポリアミンと脂質の2つの代謝系が調節されているとの仮説の下、現在解析を進めている。またこれとは別に、細胞内ポリアミンが細胞外に排出されるときに受けるアセチル化が、ACLY によって作られるアセチル CoA が基質となっている可能性を考え、AZ や ACLY の発現系や siRNA によるノックダウンにより細胞外に出されるアセチル化ポリアミン量に違いがあるか解析中である。この仮説が本当であれば、ポリアミン代謝の新たな制御機構の解明に繋がる。

3. AZIN1 の生理機能の解析

AZIN1 は、AZ に ODC より高い親和性で結合することにより ODC を安定化させ、細胞内ポリアミンを正に調節するタンパク質である。AZIN1 の生理機能を解析する目的で、AZIN1 変異型マウスより胎児由来線維芽 (MEFs) 細胞を確立し、野生型と細胞分裂、細胞増殖およびメタボロームの比較解析を行った。M-MEFs 細胞では、AZ が安定化されているため細胞内ポリアミン濃度が減少していた。また細胞増殖が遅延し一部の細胞に micronuclei (小核) を伴う二核細胞が出現し DNA 損傷の存在が示唆された。ポリアミンの枯渇は DNA 損傷をもたらすことが知られているが、M-MEFs 細胞へポリアミンを添加しても、小核および二核細胞は減少しなかったため、AZIN1 が直接これらに関与している可能性がある。メタボローム解析では、メチル基供与体である S-アデノシルメチオニン (SAM) とチミジル酸合成に重要な 5-メチルトetraヒドロ葉酸 (5-methyl-THF) の著しい減少が見られ DNA 修飾や合成に関連する代謝物の減少がみられた。今後さらに詳細な解析を進め AZIN1 の生理機能を明らかにしたい。

4. ヒト無細胞翻訳系を使った AZ + 1 翻訳フレームシフト機構の解析

AZ の mRNA は、ORF1 と ORF2 から構成される。ORF1 は、細胞内のポリアミン濃度が正常時に合成される翻訳産物をコードし、ORF2 は、ポリアミン濃度が高値となると +1 翻訳フレームシフトにより ORF1 産物と融合する形で翻訳され、その結果アンチザイムが生成される。AZ mRNA の +1 翻訳フレームシフトには、フレームシフト部位 (終始コドン) から上流約 50 塩基の促進配列、フレームシフト部位およびそのすぐ下流の 60 塩基で構成されるシュドノット構造の3つのシス要素が必須であることが知られている。しかし、HeLa 細胞抽出液を用いた in vitro 翻訳系で、これらのシス要素を全て欠失させた AZ mRNA においても +1 フレームシフトがポリアミン (スベルミジン) によって誘導された。このことから、既知のフレームシフト部位の下流にも +1 フレームシフトを引き起こす部位が存在している可能性が考えられたので、その部位を特定するために +1 フレームである ORF2 内の様々な位置に終止コドンを導入した。その結果、インフレームで翻訳される領域の長さに応じて +1 フレームシフト効率が増加していくことが分かった。また、AZ の ORF2 以外の任意の遺伝子配列において同様のことが起こるか確認するためのレポーターシステ

ムを作製し解析すると、AZ の ORF2 と同様に遺伝子の mRNA 配列の長さに応じて +1 フレームシフト効率が増加してくることが示された。これらの結果は、ヒト無細胞翻訳系においてポリアミンが様々な配列上で +1 フレームシフトが起きやすいように作用していることを示しているのかもしれない。

「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のユニット「分子から生命へ」の講義、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。本年度の実習は、前年度の「マウス体色発現のメカニズム」から「食欲・体重調節機構：レプチンとレプチン受容体」に変更した。実習の内容の理解を深める目的で演習と連携させて、実習時に必要な生命科学の実験法やデータベース上の遺伝子情報の収集法や解析法をコンピューターも利用して学習させた。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。

コース外国語Ⅲのユニット「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

今年度は講座主体の学術雑誌論文を発表することができた。学会発表も国際学会で招待講演するなど国内外含め積極的に活動できた。さらに多くの論文を発表できるように努力したい。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

ないため科研費に限らず財団などにも積極的に応募していきたい。

研究業績

Ⅰ. 原著論文

- 1) Murai N, Murakami Y, Tajima A, Matsufuji S. Novel ubiquitin-independent nucleolar c-Myc degradation pathway mediated by antizyme 2. *Sci Rep* 2018; 8(1): 3005.
- 2) Yamamoto Y¹⁾, Makino T²⁾, Kudo H²⁾, Ihn H²⁾ (² Kumamoto Univ), Murakami Y, Matsufuji S, Fujiwara K¹⁾, Shin M¹⁾ (¹ Sojo Univ). Expression and distribution patterns of spermine, spermidine, and putrescine in rat hair follicle. *Histochem Cell Biol* 2018; 149(2): 161-7.

Ⅱ. 総説

- 1) 村井法之. 【シリーズ ポリアミン研究】アンチザイム. ポリアミン 2017; 4(1): 8-13.

Ⅲ. 学会発表

- 1) Murai N. (Invited Speaker) Antizyme interacting proteins in cancer cells. Gordon Research Conference: Polyamine: Polyamine Metabolism in Disease and Polyamine-Targeted Therapies. Waterville Valley, June.
- 2) Tajima A, Murai N, Matsufuji S. (Poster) Relationship between ATP citrate lyase and polyamine metabolism. Gordon Research Conference: Polyamine: Polyamine Metabolism in Disease and Polyamine-Targeted Therapies. Waterville Valley, June.
- 3) 村井法之, 村上安子, 松藤千弥. (口頭) 神経芽細胞腫増殖における MYCN とアンチザイム 2 の関与. 日本ポリアミン学会第 9 回年会. 西宮, 1 月.
- 4) 太田礼伊也¹⁾, 小黒明広, 西村和洋 (千葉大), 藤岡弘道¹⁾, 有澤光弘¹⁾ (¹ 大阪大). (口頭) アプタマー取得に向けた樹脂担持型ハイブシンの設計と合成. 日本薬学会第 138 年会. 金沢, 3 月.
- 5) 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. (ポスター) ポリアミンで誘導される +1 翻訳フレームシフトの新規分子機構. 第 19 回日本 RNA 学会年会. 富山, 7 月.
- 6) 大城戸真喜子, 豊島裕子 (千葉保健大). (口頭) ロービジョンという視点からの管理栄養士養成教育. 第 64 回日本栄養改善学会学術集会. 徳島, 9 月. [栄養誌 2017; 75(5): 203]
- 7) Yamaguchi M, Yamazawa T, Ohkido M, Yamauchi H, Ikeda M, Morimoto S, Takemori S. (Oral) Does

polyamine administration affect cardiac structure and function of athletes' heart? 第72回日本体力医学会大会. 松山, 9月. [J Phys Fit Sports Med 2017; 6(6): 445]

- 8) Yamazawa T, Murayama T¹⁾, Ohkido M, Yamaguchi M, Yamauchi H, Takemori S, Sakurai T¹⁾ (¹ Juntendo Univ), Ohno T. (Oral) Role of polyamines in skeletal muscle hypertrophy. 第72回日本体力医学会大会. 松山, 9月. [J Phys Fit Sports Med 2017; 6(6): 428]

IV. 著 書

- 1) 村井法之助. 1章: ヒトの細胞と分子基盤 II. 細胞の発生. 栗原 敏監修, 大橋十也, 岡野ジェイムス洋尚, 本郷賢一, 横尾 隆監訳. イラストレイテッド統合臨床基礎医学: リッピンコットシリーズ. 東京: 丸善出版, 2018. p.1-7.

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 将仁	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。興奮性シナプス伝達に対する修飾作用に関してもデータをj得ている。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, 上記脳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