

分子生物学講座

講座担当教授：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：小黑 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。

- ・コース基礎医科学Ⅰのユニット「分子から生命へ」(医学科2年)
- ・コース基礎医科学Ⅰのユニット「分子から生命へ演習」(医学科2年)
- ・コース基礎医科学Ⅰのユニット「分子から生命へ実習」(医学科2年)
- ・コース臨床基礎医学のユニット「症候学演習」(医学科3年)
- ・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」(医学科3年)
- ・コース外国語Ⅲのユニット「医学英語専門文献抄読Ⅰ」(医学科3年)
- ・コース「研究室配属」(医学科3年)
- ・コース基礎医科学Ⅱのユニット「泌尿器系」(医学科2年)
- ・コース医学総論Ⅰのユニット「医学総論Ⅰ演習」(医学科1年)
- ・看護専門基礎・人間と健康「生化学」(看護学科2年)

II. 研究概要

当講座では生理活性物質ポリアミンに焦点を当て、生命現象におけるポリアミンおよびその調節機構の生理的意義の解明と医学的応用を目的として研究を進めている。ポリアミンは全ての細胞中に多量に存在し、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、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。動物細胞の主要なポリアミンはプトレッシン、スペルミジン、スペルミンで、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、次いでスペルミジン、スペ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。本年度はAZとがん細胞増殖や脂質代謝に関わるタンパク質との相互作用、ポリアミンが誘導するフレームシフト機構、ポリアミンと呼吸機能の関連性について研究を行なった。

1. 神経芽細胞腫瘍増殖におけるAZ2の役割

我々はこれまでに、ポリアミン調節タンパク質ファミリーの1つであるAZ2が、神経芽細胞腫瘍の予後不良因子であるがん原遺伝子産物MYCNと相互作用し、その分解をユビキチン非依存的に促進することを見いだした。昨年度までに神経芽細胞腫瘍増殖におけるAZ2の役割を解析するため、AZ2ノックダウン神経芽細胞腫瘍細胞株を用いた軟寒天コロニーアッセイおよびその細胞をヌードマウスに移植し個体での腫瘍形成を解析するゼノグラフトマウスモデル実験を行い、AZ2がノックダウンされると腫瘍増殖能が亢進することを見出した。今年度はAZ2がノックダウンされた神経芽細胞腫瘍細胞株の遺伝子発現がどのように変化するか、RNAシーケンスにより網羅的に解析した。AZ2ノックダウン細胞では、細胞の増殖・分化・生存に深く関与するFosおよびJun遺伝子の発現が有意に上昇していた。またアポトーシスに深く関連しているカスパーゼ遺伝子、特にエフェクター(アポトーシス実行型)およびイニシエーター(アポトーシス誘導型)のカスパーゼの発現が有意に減少しており、増殖シグナルの亢進とアポトーシスの抑制により全体として腫瘍増殖が亢進していることが示唆された。

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を明らかにしてきた。AZは細胞内ポリアミンを負に制御するタンパク質であるが、ACLY活性化がポリアミン代謝においてどんな意義があるのかは不明である。細胞内ポリアミンは細胞外に排出されるときにアセチル化を受けることが知られているが、ACLYによって作られるアセチルCoAがその基質となっている可能性を考えた。その仮説を証明するために、本年度はポリアミン過剰発現株であるEXOD-1細胞にACLYの発現また

は siRNA によるノックダウン処理を行い、細胞内外のポリアミン量の変化を解析した。ポリアミン過剰発現株に ACLY を発現させると細胞外へのポリアミン排出が促進されると予想したが、ACLY を発現させただけでは細胞内アセチル化ポリアミン量は増えるものの、細胞外への排出は促進されなかった。ACLY 量だけではなく他の因子が関係する可能性も含め現在検討中である。

3. ポリアミンにより誘導される配列非依存的+1フレームシフトの解析

AZ の発現は、翻訳途中に存在する終止コドンの位置で読み枠が+1方向にシフトすることにより完全長のタンパク質として合成されてくる。この+1翻訳フレームシフトの分子機構は未だ明らかになっていない。我々は AZ の+1翻訳フレームシフトの分子機構の解明を目的に、HeLa 細胞由来のヒト無細胞翻訳系を用いて解析を進めてきた。その結果、AZ のフレームシフト部位以外の様々な配列で、スベルミジン依存的に翻訳フレームが+1方向にずれること（配列非依存的+1フレームシフト）を見出した。この配列非依存的+1フレームシフトの誘導効率は翻訳効率と逆相関関係にあることを示してきた。今年度は、この+1フレームシフトはプトレッシンとスベルミンでも誘導されることを確認し、ポリアミンによる普遍的な効果であること、その誘導効率はポリアミンのアミノ基の数と相関性があることを解明した。また、in vitro で転写させたレポーターRNA を鋳型に用いても+1フレームシフトがポリアミンにより誘導されることを確認し、この配列非依存的+1フレームシフトが翻訳時に起こっていることを明らかにした。

4. 呼吸機能に関与するポリアミン

細胞外ポリアミン濃度は、細胞内ポリアミン濃度の1/1,000~1/100程度であることが知られている。ポリアミンは全ての生物に存在し、また全ての細胞に存在するため、ポリアミン研究のほとんどは、ポリアミンの細胞内の機能に着目したもので占められてきた。我々はポリアミンが肺胞中に存在することを見出したが、これらが呼吸機能に関与するか否かを検証した。肺呼吸窮迫症候群（ARDS）モデルラットとして確立されている肺胞洗浄（LAV）モデルを用いてポリアミンの効果を検証した結果、肺胞投与ポリアミンは、肺コンプライアンス、動脈血酸素化、肺野の含気を改善させることが明らかとなった。ARDS は未だ有効な治療法がなく、全世界の多くのARDS患者が命を落としている。ヒトへの実用化に向けて、検証をつづけている。

「点検・評価」

1. 教育

主に2年生前期のコース基礎医科学Ⅰのユニット「分子から生命へ」（講義、演習、実習）を生化学講座、基盤研究施設、アイソトープ実験研究施設と共同で担当した。講義では基礎的な生化学の内容を解説しつつ、臨床との関連性を意識させることを心がけた。また、講義の中で演習問題等を示すことで学生の理解を深めるように工夫した。試験では、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論述問題を主体に出題した。演習では、「タンパク質の一生」と「生体分子の探査法」というテーマで、自己学習を基にしたディスカッションを中心とするPBL形式で行い、自発的な学習と論理的な意思伝達の重要性について理解させるように努めた。また、「ゲノム医科学とバイオインフォマティクス」というテーマの演習では、コンピュータを使用して遺伝情報に関連するビッグデータの取り扱い方を学習させた。これらの演習課題は実習と関連する内容として設定され、学生には演習から実習への連続性を意識づけ、実習内容を効果的に理解してもらえるように努めた。実習ではレポート評価と共に口頭試験での評価も行い、より直接的に理解度を判定できるようにした。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した場合、学生にフィードバックを行い、その結果を再評価するようにした。講義、実習、演習において双方向型の教育形態の充実を推し進め、授業時間後や放課後に学生からの発信に応えられる時間を多く設けた。

その他、コース研究室配属、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」、「感染・免疫テュートリアル」、コース医学総論Ⅰのユニット「医学総論Ⅰ演習」、コース基礎医科学Ⅱの「泌尿器系」、看護専門基礎・人間と健康「生化学」（看護学科）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

これまでの研究の継続と共に、新規に開始した研究も軌道に乗り、それらの研究成果を学術集会で発表した。学術誌での論文発表も行ない、さらにいくつかの論文も次年度での発表に向けて準備中である。今年度は競争的資金の獲得も増え、また、海外の研究グループとの共同研究も始まり、次年度以降の研究活動の充実が期待できる。

学外活動として、当講座が運営を担当した日本ポリアミン学会第11回年會を、2020年1月24~25

日に開催した。大学1号館3階講堂に110名を超える研究者が参集し、盛況のうちに終えることができた。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Katagiri S, Hosono K, Hayashi T, Murai N, Wake E, Miyata I, Mizobuchi K, Kurata K, Matsuura T, Nakano T, Hotta Y. Novel biallelic splice-site BBS1 variants in Bardet-Biedle syndrome: a case report of the first Japanese patient. *Doc Ophthalmol* 2020; 141(1): 77-88. Epub 2020 Jan 29.
- 2) Oguro A, Shigeta T, Machida K, Suzuki T, Iwamoto T, Matsufuji S, Imataka H. Translation efficiency affects the sequence-independent +1 ribosomal frameshifting by polyamines. *J Biochem* 2020; 168(1): 139-49. Epub 2020 Mar 20.

III. 学会発表

- 1) 小黒明広, 鈴木智明, 町田幸大, 岩本武夫, 松藤千弥, 今高寛晃. (口頭) ポリアミンにより誘導される配列非依存的+1フレームシフトの解析. 第14回無細胞生命科学研究会. 三浦, 11月.
- 2) 小黒明広, 鈴木智明, 町田幸大, 岩本武夫, 今高寛晃, 松藤千弥. (ポスター) ポリアミンによる配列非依存的+1フレームシフトと翻訳効率の関連性. 第42回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月.
- 3) 大城戸真喜子, 三尾 寧, 木村直史. (口頭) 肺コンプライアンス改善をもたらす新規ARDS治療法の確立. 日本ポリアミン学会第11回年会. 東京, 1月.
- 4) 村井法之, 奥五沢里美, 青木勝彦, 松藤千弥. (口頭) 神経芽細胞腫の腫瘍増殖におけるアンチザイム2の役割. 日本ポリアミン学会第11回年会. 東京, 1月.

薬理学講座

講座担当教授:	靱山 俊彦	中枢シナプスの生理学および薬理学
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核として、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は、複数のセロトニン受容体サブタイプが関与すること、そして、各サブタイプ活性化により、異なるイオン機構を解してシナプス伝達が修飾されることを明らかにしつつある。また、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ンネル結合型受容体の機能を明らかにしつつある。さらに、線条体の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伝達制御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. 副腎皮質と末梢型ベンゾジアゼピン受容体 (大野裕治)

PBRはミトコンドリア外膜に存在し、生理的条件下でのコレステロール輸送に関与するだけでなく、ガン、炎症および神経疾患のような病的状態にも関与することが注目されている。PBRのligandであ