

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。

- ・コース基礎医科学医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）
- ・コース基礎医科学医Ⅰのユニット「分子から生命へ演習」（タンパク質の一生，バイオフィオマテイクス，バイオハザードとケミカルハザード，生体分子の探査法）
- ・コース基礎医科学医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、ポリアミン調節タンパク質AZとがんの増殖や脂質代謝に

関わるタンパク質との相互作用の意義、AZINの細胞内機能解析やポリアミン依存的フレームシフト機構について研究を行った。

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。昨年度は、MYCNとAZ2の相互作用と神経芽細胞腫細胞株の増殖と関連を軟寒天コロニーアッセイにより解析し、AZ2をノックダウンした神経芽細胞腫細胞株におけるコロニー量を形成の増大を確認した。今年度は、このAZ2ノックダウン細胞とコントロール細胞をヌードマウスに移植するゼノグラフトマウスモデル実験を行い、個体における腫瘍形成を比較解析した。マウス左右腹部皮下に対比させるようにAZ2ノックダウン細胞とコントロール細胞を接種した。接種後24日目には、AZ2ノックダウン細胞を接種した方の腫瘍体積がコントロールの7倍を超えていた。またその時点で摘出した腫瘍の重量もコントロールに比べ4倍増加していた。このことは個体においてもAZ2の発現が抑制された神経芽腫細胞では、腫瘍増殖能が高くなることを意味し「AZ2のmRNAの発現が高いほど患者の予後が良好」という正の相関の一端を説明できると考えている。今後さらに詳細なメカニズムの解析を行うと同時に創薬に向けた構造レベルの解析も行っていきたい。

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は細胞質のクエン酸からアセチルCoAの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。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、AZがACLYを活性化するという機能を持つことは興味深い。この意義として我々は、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、クエン酸からACLYによって作られるアセチルCoAを基質として行われているという可能性を考えた。その仮説を検証するために、ポリアミン過剰発現株であるEXOD-1細胞を用いてACLYの強制発現またはsiRNAによるノックダウンが細胞内外のアセチル化ポリアミン量に影響を与えるか解析を試みた。EXOD-1細胞にACLYを過剰発現させると、細胞内外のアセチルポリアミン量

が有意に上昇した。引き続き ACLY のノックダウンによる効果など検討中である。

3. AZIN1 の生理機能

AZIN1 は、AZ (Oaz) に結合する ODC ホモログで、Oaz の機能を阻害することで、ポリアミン濃度を正に調節するタンパク質である。我々はこれまでに、AZIN1 変異型マウスより確立した胎児由来線維芽細胞 (M-MEFs) は野生型胎児由来線維芽細胞 (W-MEF) と比較して、細胞増殖の遅延、多核、巨核、や微小核を有する細胞が増加していることを見出してきた。今年度はその原因を探るため、微小核や多核を生じていない M-MEFs (intact M-MEFs; iM-MEFs) に着目して解析を進めた。中心体の数を計測するため、中心体マーカーとして知られる γ チューブリンを染色したところ、W-MEF に対し iM-MEFs で中心体数の有意な減少を見出した。細胞分裂のある時期に AZIN1 が中心体局在しているという我々を含めたこれまでの知見から推測すると、これらの結果は、AZIN1 の欠損が中心体の不安定性を引き起すことにより染色体不分配をもたらし、多核や巨核細胞の形成を増加させた可能性を示唆する。このことは、AZIN1 はポリアミン濃度調節以外に、適切な細胞分裂の進行に関わる重要なファクターであることを意味するのかもしれない。

4. ポリアミンで誘導される配列非依存的 +1 フレームシフトと翻訳効率の関係性

昨年度までに、ヒト無細胞翻訳系において、ポリアミン依存的に様々な配列で翻訳フレームが +1 方向にずれること (配列非依存的 +1 フレームシフト) を報告した。今年度はこの配列非依存的 +1 フレームシフトと翻訳効率との関連性について解析を行った。翻訳効率は Codon Adaptation Index (CAI) を用いて塩基配列から予測した。CAI はコドンの出現頻度を基に算出される指標で、0 から 1 の間の数値で表され、0.8 から 1 の範囲で高い翻訳効率とされる。CAI が 0.50 である AZ 遺伝子のリードスルー領域の部分配列 TF+36nt (TCCTTCTGCTC TTTCAGCCAACTTATTCTACTCCGACGAT CGGCT) と、この配列に、コードするアミノ酸配列は同じであるが塩基配列が異なるような変異 (同義コドン) を導入した CAI 0.86 の配列 (TCCTTCTGCTCTTTCAGCCAgCTcATTCTgCTgCGgCGgTCcGCT, 小文字が変異させた塩基) をレポーターとしてポリアミン依存的 +1 フレームシフトの誘導効率を比較すると、変異配列で低下した。逆に CAI は 0.86 であるクロラムフェニコール耐性遺伝

子 (CAT) 由来配列 (AACGTGGCCAATATGGCAACTTCTTCGCCCCCGTTTTTCACGATG) を同様に同義コドンで変異導入し CAI を 0.62 へと減少させると (AAATGTtGCgAATATGGACAAATTC TTCGCGcCCgGTTTTTCACGATG, 小文字が変異させた塩基), +1 フレームシフト効率は増加した。以上の結果よりポリアミンで誘導される配列非依存的 +1 フレームシフトの効率は mRNA の翻訳効率と逆相関関係にあることが示唆された。

「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」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も関連づけながら講義した。そしてこれらの代謝を司る酵素が欠損した場合にどのような疾患につながるのかを解説し臨床との関連性を学生に意識させた。また講義の中で演習問題を行うなどし、学生の理解を深めるように工夫した。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。演習では、自己学習および発表課題を提示し、学生の論理的思考とプレゼンテーション能力向上を目指した。具体的には、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・輸送され機能しそして分解されていくのか、またそれらの破綻がどのような生命現象や疾患と関係しているのかを PBL 形式で学習させた。本年度の実習は昨年同様、「食欲・体重調節機構：レプチンとレプチン受容体」を行った。実習内容の理解を深める目的で、演習と連携させ「ゲノム医科学とバイオインフォマティクス」および「生体分子の探査法」と題して、実習時に必要な遺伝子情報の収集や解析をデータベース上で行う方法や生命科学の実験法を、コンピュータールームを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われるアンケートや実習独自のカリキュラム評価では、高評価を得ており学生の満足度は高かった。引き続きこのレベルを持続できるよう努力していきたい。

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できなかったが、共同研究など論文を複数発表できた。学会発表も国際学会で口頭発表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。講座主体の投稿準備中の論文があるので来年度は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) Ohta R¹, Oguro A, Nishimura K (Chiba Univ), Murai K¹, Fujioka H¹, Arisawa M¹ (¹ Osaka Univ). Design and synthesis of *N*¹,*N*⁸-diacetylspermidine analogues having a linker with desired functional groups. *Org Biomol Chem* 2019; 17(4) : 867-75.
- 2) Tamari K¹, Konno M¹, Asai A¹, Koseki J¹, Hayashi K^{1,2}, Kawamoto K¹, Murai N, Matsufuji S, Isohashi F¹, Satoh T¹, Goto N (Kanazawa Univ), Tanaka S (Tokyo Med Dent Univ), Doki Y², Mori M² (² Natl Inst Radiological Sci), Ogawa K¹, Ishii H¹ (¹ Osaka Univ). Polyamine flux suppresses histone lysine demethylases and enhances *IDI* expression in cancer stem cells. *Cell Death Discov* 2018; 4 : 104.
- 3) Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K¹, Murai N, Matsui Z², Kubo H, Satoh H² (² Tokyo Metropolitan Children's Med Ctr), Matsufuji S, Takamura T, Yokoo T, Omori Y³, Furukawa T³ (³ Osaka Univ), Iwata T¹ (¹ Natl Inst Sensory Organs), Nakano T. Compound heterozygous splice site variants in the *SCLT1* gene highlight an additional candidate locus for Senior-Løken syndrome. *Sci Rep* 2018; 8(1) : 16733.
- 4) Ohta R¹, Oguro A, Nishimura K (Chiba Univ), Murai K¹, Fujioka H¹, Arisawa M¹ (¹ Osaka Univ). (Poster) Design and synthesis of polyamine analogues to obtain their aptamers. 22nd International Conference on Organic Synthesis (22-ICOS). Florence, Sept.
- 5) 太田礼伊也¹, 小黑明広, 西村和洋 (千葉大), 村井健一¹, 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ポリアミン誘導体の設計と合成. 第44回反応と合成の進歩シンポジウム. 熊本, 11月.
- 6) 大城戸真喜子, 豊島裕子 (千葉保医療大). (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その2. 第65回日本栄養改善学会学術総会. 新潟, 9月. [栄養誌 2018; 76(5 Suppl.) : 223]
- 7) 秋山政晴, 大城戸真喜子, 松藤千弥. (口頭) 網膜芽細胞腫の長期フォローにおける尿中ポリアミンの有用性の検討. 第10回日本ポリアミン学会. 加賀, 12月.

III. 学会発表

- 1) Tajima A. (Oral) Antizyme and ATP citrate lyase suppresses the cell death of ornithine decarboxylase-overproducing cell line 5th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives. Taipei, Sept.
- 2) Oguro A, Shigeta T¹, Machida K¹, Imataka H¹ (¹ Univ Hyogo), Matsufuji S. (Oral, Poster) Polyamines promiscuously induce +1 ribosomal frameshifting in a human cell-free translation system.