

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07921

研究課題名(和文) ポリアミンによる翻訳制御を介した細胞増殖・分化に関わる遺伝子発現制御の解明

研究課題名(英文) Study of translational regulation mediated gene expression relating cell proliferation and differentiation by polyamines

研究代表者

西村 和洋 (NISHIMURA, Kazuhiro)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：60302569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖・分化に必須のポリアミンが発現制御する遺伝子を明らかにするため、細胞内ポリアミンの有無により変化する蛋白質を複数の方法を用いて同定する研究を行った。その結果、今回新たに5つの蛋白質が細胞内ポリアミン量の低下により存在量が減少すること、すなわちポリアミンによる翻訳制御を受けることが強く示唆された。また、転写因子Klf4がポリアミンにより翻訳制御を受けるメカニズムを調べた結果、Klf4 mRNAの5'-非翻訳領域(5'-UTR)の重要性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To clarify genes whose are translationally regulated by polyamines essential for cell proliferation and differentiation, we performed to identify proteins that change depending on the presence or absence of intracellular polyamines by using some kinds of method. As a result, it was strongly suggested that five proteins are translationally regulated by polyamines, because the amount of these proteins are decreased due to the reduction of intracellular polyamines. In addition, as a result of examining the mechanism of translational stimulation of transcription factor Klf4 by polyamines, we clarified that the 5'-untranslated region (5'-UTR) of Klf4 mRNA was important for translational regulation by polyamines.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：ポリアミン 翻訳 RNA ショ糖密度勾配遠心 メタボロームヌクレオチド代謝

1. 研究開始当初の背景

ポリアミンとはプトレッシン、スペルミジン、スペルミンに代表される生理活性アミンである。その生合成酵素を欠損すると致死性を示すことから、生命に不可欠な重要因子である。しかし、ポリアミンが必要とされる分子基盤の詳細は解明されていない。

ポリアミンの細胞内局在をシミュレーションした研究から、主に RNA と相互作用して存在することが明らかとなっている。つまり、ポリアミンは細胞内で RNA との相互作用を介した構造変化に関与し、翻訳過程の制御に関わることが示唆されている。

2. 研究の目的

ポリアミンは生命に必須であり、細胞増殖・分化の必須因子として重要であるが、その分子基盤が不明である。そこで、ポリアミンと RNA の相互作用、及びポリアミンにより翻訳後修飾を受ける蛋白質合成開始因子 eIF5A による翻訳制御が細胞増殖・分化における遺伝子発現を制御するメカニズムを明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) ポリアミンにより翻訳制御を受ける遺伝子の同定

細胞増殖を阻害するポリアミン生合成阻害剤 (DFMO) の有無で培養を行ったマウス乳がん由来 FM3A 細胞の抽出液を調整し、シヨ糖密度勾配遠心によって翻訳状況の異なる mRNA の分画を行った。その後、各分画に含まれる mRNA 発現量を RNAseq により網羅的に解析した。変化の顕著だった遺伝子の蛋白質をウェスタンブロットにより調べた。

(2) メタボローム解析

細胞増殖を阻害する DFMO の有無で培養を行ったマウス乳がん由来 FM3A 細胞から代謝物を抽出し、CE-TOFMS を用いてメタボローム解析を行った。変化のあった代謝物を生成する酵素量をウェスタンブロット法により調べた。

(3) 遺伝子発現量の解析

蛋白質量に変化のあった遺伝子の発現量を RT-PCR により調べた。

(4) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ポリアミンにより翻訳制御を受ける遺伝子として同定された *Klf4* 遺伝子の 5'-UTR をルシフェラーゼ遺伝子に融合し、NIH3T3 細胞へのトランスフェクション、DFMO の有無によるルシフェラーゼ活性により翻訳制御に必要な領域の解析を行った。

4. 研究成果

(1) DFMO の有無で培養した FM3A 細胞の抽出液から翻訳状況の異なる mRNA を低密度 (NT: 80S リボソームを形成していない画

分) 中密度 (LT: リボソームが 3 個までの画分) 高密度 (HT: 3 個以上のリボソーム画分) に分画した (図 1)。RNAseq によりそれぞれの画分の遺伝子発現量を網羅解析した。初めにポリアミンにより翻訳制御を受ける遺伝子を同定するため、分画していない mRNA 量が DFMO の有無によって変化していない遺伝子を抽出した。次に中密度・高密度画分における mRNA 量が阻害剤有の方で著しく減少した遺伝子を抽出した。そして、減少が著しかった遺伝子の蛋白質量をウェスタンブロットにより調べたところ、3 つの遺伝子の蛋白質量が有意に減少していた。確認のために RT-PCR によりこれら 3 つの遺伝子の mRNA 量を調べたが、DFMO の有無での変化は無かった。以上より、ポリアミンにより翻訳制御を受けることが強く示唆される遺伝子を新たに 3 つ、同定した。

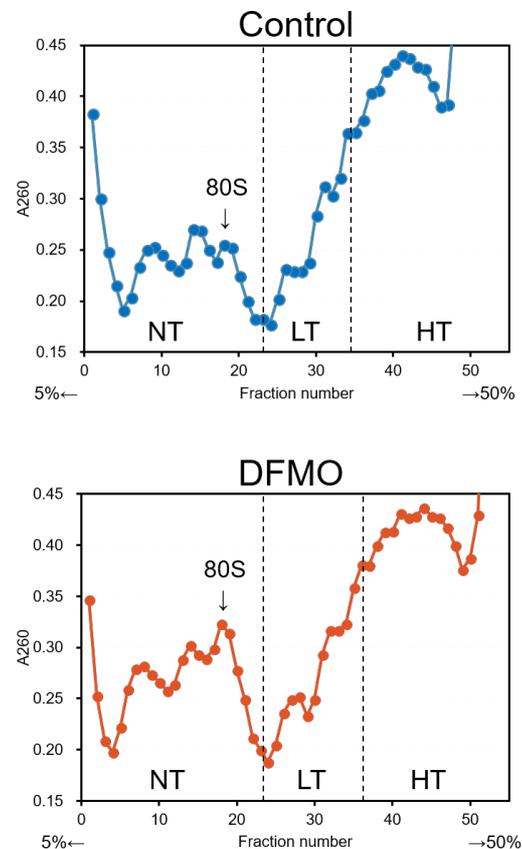


図 1

(2) DFMO の有無で培養した FM3A 細胞の代謝物を CE-TOFMS を用いてメタボローム解析を行った結果、DFMO 有では IMP、AMP、GMP、UMP 等のヌクレオチドの減少を見出した (図 2)。そこで、これらの代謝経路に関わる酵素に着目し、ウェスタンブロットにより蛋白質量の変化を調べた結果、プリン生合成経路の PAICS 及び IMPDH 蛋白質量が減少していた。また、RT-PCR によりそれぞれの mRNA 量を調べたが、DFMO の有無による発現量の変化は無かった。よって、PAICS 及び

IMPDH をポリアミンにより翻訳制御を受けることが示唆される遺伝子として新たに同定した。

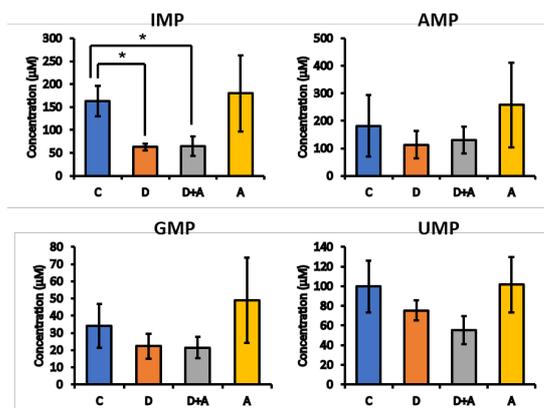


図 2

(3) ポリアミンにより翻訳制御を受ける遺伝子の候補として見出していた *Klf4* 遺伝子の詳細な解析のため、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子としたプラスミドを用いて解析を行った(図3)。*Klf4* 遺伝子の 5'-非翻訳領域(5'-UTR)は約 600 塩基と長く、また GC リッチであり、翻訳効率が悪いと予想された。この領域をルシフェラーゼ遺伝子に融合したプラスミドを作製し、NIH3T3 細胞にトランスフェクション後、ルシフェラーゼの活性測定を行った。その結果、*Klf4* の 5'-UTR が存在する場合、DFMO によりルシフェラーゼ活性の減少がみられた。次に 5'-UTR 内に uORF (upstream open reading frame) が存在すること、そして uORF の有無はポリアミンによる翻訳制御響が関わる事例が報告されていることから、部位特異的変異導入により uORF の ATG GTG に変異したプラスミドを作製して実験を行った。その結果、DFMO の有無による活性への影響は無かった。また、*Klf4* には同一フレームに二つの開始コドンが存在したため、どちらの ATG から翻訳されるかを調べたところ、エキソン 2 に存在する 2nd ATG から翻訳されることを見出した。以上より、ポリアミンによる *Klf4* の翻訳制御には uORF が関与せず、GC リッチな 5'-UTR の強固な立体構造をポリアミンの存在により変化させることで翻訳効率を促進することが示唆された。

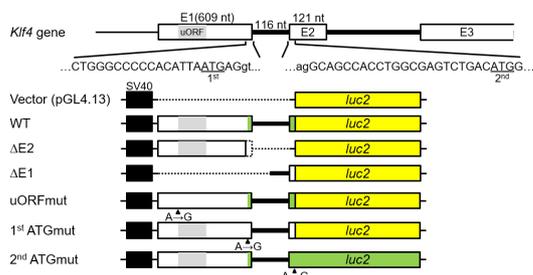


図 3

本研究により、ポリアミンにより翻訳促進を受けることが強く示唆される遺伝子(ポリアミンモジュロン)を新たに5つ同定した。これらの遺伝子がポリアミンによる制御される細胞増殖・分化においてどのような役割を持つのかはまだ不明であり、今後の研究課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計6件)

- (1) Kumamoto, T., Nakajima, M., Uga, R., Ihayazaka, N., Kashihara, H., Katakawa, K., Ishikawa, T., Saiki, R., Nishimura, K., and Igarashi, K.: Design, synthesis, and evaluation of polyamine-memantine hybrids as NMDA channel blockers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 603-608 (2018) 査読有 DOI: 10.1016/j.bmc.2017.12.021
- (2) Williams, A., He, W., Cress, B.F., Liu, X., Alexandria, J., Yoshizawa, H., Nishimura, K., Toida, T., Koffas, M., and Linhardt, R.J.: Cloning and Expression of Recombinant Chondroitinase ACII and Its Comparison to the *Arthrobacter aurescens* Enzyme. *Biotechnol. J.* 12, 201700239 (2017) 査読有 DOI: 10.1002/biot.201700239
- (3) Imamura, M., Higashi, K., Yamaguchi, K., Asakura, K., Furihata, T., Terui, Y., Satake, T., Maegawa, J., Yasumura, K., Ibuki, A., Akase, T., Nishimura, K., Kashiwagi, K., Linhardt, R.J., Igarashi, K., and Toida, T.: Polyamines release the let-7b-mediated suppression of initiation codon recognition during the protein synthesis of EXT2. *Sci. Rep.* 6, 33549 (2016) 査読有 DOI: 10.1038/srep33549
- (4) Uemura, T., Watanabe, K., Ishibashi, M., Saiki, R., Kuni, K., Nishimura, K., Toida, T., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Aggravation of brain infarction through an increase in acrolein production and a decrease in glutathione with aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 630-635 (2016) 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.137
- (5) 西村和洋: eIF5A とハイプシンの今昔物語. *ポリアミン* 3, 2-7 (2016) 査読有
<http://pa.umin.jp/PolyamineVol3No1Apr2016.pdf>
- (6) Nakamura, M., Uemura, T., Saiki, R., Sakamoto, A., Park, H., Nishimura, K.,

Terui, Y., Toida, T., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Toxic acrolein production due to Ca²⁺ influx by the NMDA receptor during stroke. *Atherosclerosis* 244, 131-137 (2016) 査読有 DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.012

〔学会発表〕(計 17 件)

- (1) 吉野哲彦、吉澤祐希、戸井田敏彦、五十嵐一衛、西村和洋: ポリアミンにより翻訳促進を受ける蛋白質の同定。日本薬学会第 138 年会(金沢)2018 年
- (2) 太田礼伊也、小黑明広、西村和洋、藤岡弘道、有澤光弘: アプタマー取得に向けた樹脂担持型ハイプシンの設計と合成。日本薬学会第 138 年会(金沢)2018 年
- (3) 朝倉希里生、東恭平、今村正隆、山口勝利、降幡知巳、西村和洋、五十嵐一衛、戸井田敏彦: ポリアミンによりコンドロイチン硫酸合成調節機構の解明。日本薬学会第 138 年会(金沢)2018 年
- (4) 東恭平、朝倉希里生、今村正隆、工藤遥香、山口勝利、西村和洋、五十嵐一衛、戸井田敏彦: ポリアミンによるコンドロイチン 4-O-硫酸基転移酵素 2 の合成促進機構の解明。日本ポリアミン学会第 9 回年会(西宮)2018 年
- (5) 吉澤祐希、吉野哲彦、戸井田敏彦、五十嵐一衛、西村和洋: ポリアミンによるヌクレオチド代謝への影響。ConBio2017(第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会合同大会)(神戸)2017 年
- (6) 西村和洋、岡本萌実、澁江梨奈、水田俊男、芝山徹、田中智之、東恭平、戸井田敏彦、五十嵐一衛: ポリアミンによる KLF4 の翻訳制御は骨髄由来マスト細胞分化のヒスタミン産生を抑制する。ConBio2017(第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会合同大会)(神戸)2017 年
- (7) 吉澤祐希、吉野哲彦、戸井田敏彦、五十嵐一衛、西村和洋: ポリアミン代謝阻害剤によるメタボローム解析。「ポリアミンと核酸の共進化」第 15 回合同シンポジウム(東京)2017 年
- (8) 渡辺健太、植村武史、東恭平、小暮紀行、北島満里子、高山廣光、高尾浩一、杉田義昭、西村和洋、五十嵐一衛、戸井田敏彦: 加齢による脳梗塞悪化とアクロレインの関係並びに新規脳保護薬の開発。日本薬学会第 137 年会(仙台)2017 年
- (9) 東恭平、山口勝利、今村正隆、朝倉希里生、西村和洋、五十嵐一衛、戸井田敏彦: ポリアミンによる

Chondroitin synthase-1 合成促進機構の解明。日本ポリアミン学会第 8 回年会(津田沼)2017 年

- (10) 朝倉希里生、東恭平、今村正隆、山口勝利、降幡知巳、西村和洋、五十嵐一衛、戸井田敏彦: ポリアミンによるコンドロイチン硫酸合成調節機構の解明。第 89 回日本生化学会大会(仙台)2016 年
- (11) 渡邊紗貴、小高愛彩、戸井田敏彦、五十嵐一衛、西村和洋: シャペロニン CCT の機能に対するポリアミンの影響。第 89 回日本生化学会大会(仙台)2016 年
- (12) 朝倉希里生、東恭平、今村正隆、山口勝利、西村和洋、五十嵐一衛、戸井田敏彦: ポリアミンによるコンドロイチン硫酸合成調節機構の解明。「ポリアミンと核酸の共進化」第 14 回合同シンポジウム(東京)2016 年
- (13) 植村武史、渡辺健太、石橋美咲、斎木遼太郎、西村和洋、戸井田敏彦、五十嵐一衛: 加齢による脳梗塞リスクの上昇には、ポリアミン代謝の活性化とグルタチオン合成の低下が関わる。日本薬学会第 136 年会(横浜)2016 年
- (14) 水田俊男、西村和洋、芝山徹、田中智之、戸井田敏彦、五十嵐一衛: マスト細胞におけるポリアミンのヒスタミン生合成抑制機構の解明。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)2015 年
- (15) 渡辺健太、石橋美咲、斎木遼太郎、植村武史、西村和洋、戸井田敏彦、五十嵐一衛: 脳梗塞時のポリアミン代謝における加齢の影響。日本ポリアミン学会第 7 回年会(京都)2015 年
- (16) Nishimura, K., Mizuta, T., Shibayama, T., Tanaka, S., Toida, T., and Igarashi, K.: Histamine synthesis is regulated by polyamines in mouse bone marrow derived mast cells. Gordon Research Conference on Polyamines (Waterville Valley, NH, USA) 2015 年
- (17) 西村和洋: ポリアミンの生理作用とバイオマーカーへの展開。第 9 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(千葉)2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/bunseki/>

6．研究組織

(1)研究代表者

西村 和洋 (NISHIMURA, Kazuhiro)
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：60302569

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし