

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790057

研究課題名（和文）ポリアミンによる細胞増殖に必須な翻訳制御の解明

研究課題名（英文）Study of translational regulation for cell proliferation 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

研究成果の概要（和文）：ポリアミン（プトレスシン、スペルミジン、スペルミン）は細胞増殖因子として細胞機能に大変重要である。特に RNA との相互作用を通じて翻訳制御に関わることから、ポリアミンが標的とする生体分子の同定を目指して研究を行い、その候補となる分子を同定した。また、スペルミジンにより修飾を受ける蛋白質合成開始因子 eIF5A 及びその修飾酵素の欠損マウスの解析を行い、致死となることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Polyamines (putrescine, spermidine, spermine) have important roles for cell function as a growth factor. In this study, we identified the target molecules translationally regulated by polyamines, because polyamines mainly binds to RNA in cells. Spermidine is required for modification of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). It was clarified that eIF5A and its modification enzyme disruption in mice appeared the embryonic lethality.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ポリアミン、細胞増殖、翻訳、ハイプシン、ジーントラップ、転写因子、RNA

1. 研究開始当初の背景

ポリアミンは1価のカチオンを除くと、細胞内において Mg^{2+} 、ATP と共に主要な構成成分であり、その細胞内濃度は mM オーダーである。生理的役割がよく知られている Mg^{2+} 、ATP に比べて、ポリアミンはこれらと同程度の存在量を保持しながら、その生理的役割ははっきりしない。その最大の理由は、ポリアミンが1種類の分子で構成されたものではなく、2価カチオンのプトレスシン

$[NH_2(CH_2)_4NH_2]$ 、3 価カチオンのスペルミジン $[NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2]$ 、4 価カチオンのスペルミン $[NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2]$ のように複数分子から構成されていることが挙げられる。実際にこれらの分子の存在比率は、プトレスシンとスペルミジンを主に持つ原核生物、スペルミジンとスペルミンを主に持つ真核生物のように生物種が変われば異なり、マウスやヒトなどの多細胞生物では臓器や

組織の違いでもその存在比率は異なる。ただし、ポリアミンは細胞機能において必須な成分であり、トータルとしての細胞内ポリアミン量は生合成系と分解系及び細胞内外の輸送系を介して厳密に調節されている。ポリアミン生合成系の律速酵素にはオルニチンからプトレスシンを合成するオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) とスペルミジン、スペルミン合成のプロピルアミン供与体を合成する S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (AdoMetDC) の 2 種が存在し、転写レベル、翻訳レベル、酵素蛋白質の分解など様々なステップで調節されている。これまでに AdoMetDC に焦点をあてた研究から、マウスの AdoMetDC の転写・翻訳制御、遺伝子のクローニング、遺伝子ターゲティングによる欠損マウスの作製を行った。特に AdoMetDC 遺伝子欠損マウスの表現型は致死性を示し、他のグループによって作製されたもう一つの律速酵素である ODC の欠損マウスも同様の表現型を示した。

ポリアミンの細胞内分布シミュレーションの結果、核酸、特に DNA よりも RNA と強く相互作用して存在していることが分かった。この知見からポリアミンはある種の mRNA に結合し、その構造変化を導くことで翻訳レベルで蛋白質合成を制御することを見出した。大腸菌を用いた研究から、ポリアミン存在下に mRNA からの翻訳が促進される蛋白質を複数同定し、それらをポリアミンモジュロンと名付けた。最近、真核細胞におけるポリアミンモジュロンを 3 種 (Cct2、Hnrpl、Pgaml) 同定した。また、ポリアミンによる翻訳制御には、間接的に関与する機構が存在する。それは蛋白質合成開始因子 eIF5A の翻訳後修飾にスペルミジンが基質として必須なことである。eIF5A の翻訳後修飾はハイプシンという特殊なアミノ酸がリジン残基上に 2 段階の酵素反応により形成される非常にユニークなものである。修飾された eIF5A は細胞増殖において絶対的に必須であるが、蛋白質合成の開始反応において、開始因子と命名されたにも関わらず本質的ではないと考えられている。最近、ペプチド伸長段階で機能する可能性が報告されたが、その詳細なメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

プトレスシン、スペルミジン、スペルミンの総称であるポリアミンは低分子の生理活性アミンであり、細胞増殖における必須因子である。そのため、細胞内濃度は非常に厳密に調節されており、欠乏した場合もしくは過剰になった場合でも細胞増殖が著しく影響を受けることが知られている。その原因については、カチオンとしての性質を持つことから細胞内で核酸の RNA と主に相互作用し、

蛋白質合成に大きく関与していることが示されている。またポリアミンが唯一共有結合する eIF5A がそのような蛋白質合成過程においてどのような役割を担っているのかはいまだ不明である。よって、本研究では細胞増殖に必須なこれらの翻訳制御に対するポリアミンの分子基盤を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 新規ポリアミンモジュロンの同定

大腸菌で同定されたポリアミンモジュロンの多くが転写因子だったことから、真核細胞においても転写因子を標的にした。ポリアミンを欠乏させた HeLa 細胞株から核抽出液を調整し、「転写因子活性検出アレイ」を用いて、コントロールとの比較でスクリーニングを行った。

(2) ゲルシフトアッセイによる核内転写因子量の検討

上記のスクリーニングから同定した転写因子に関して、それぞれの結合配列を持った蛍光標識 DNA を準備し、核抽出液との反応によるゲルシフトアッセイを行った。

(3) eIF5A 及び DHS ジーントラップマウスの解析

eIF5A 及び eIF5A の翻訳後修飾酵素の一つであるデオキシハイプシン合成酵素 (DHS) のジーントラップマウスの致死性の解析及び胚盤胞を分離し、*in vitro* 培養を行った。

4. 研究成果

(1) ポリアミン欠乏 HeLa 細胞株を作製するため、ポリアミン生合成阻害剤である DFMO 存在下で 3 日間培養し、細胞内ポリアミン量を測定した。コントロールに比べて、スペルミン量は 80% に減少し、プトレスシンとスペルミジンは完全に無くなった。この条件下で、核抽出液を準備した。ヒストン及びチューブリンのウェスタンブロットを行い、核抽出液に細胞質の蛋白質であるチューブリンがほぼ無いことを確認した。そして、核抽出液を用いて、「転写因子活性検出アレイ」を行った結果、コントロールと比べて活性の変化が認められる候補分子を 14 種見つけた。

(2) 上記の 14 種の転写因子に関して、DNA 結合配列を含む蛍光標識されたオリゴ DNA を合成した。標識オリゴとコントロール及びポリアミン欠乏株由来の核抽出液と複合体を形成させた後、ゲル電気泳動を行うゲルシフトアッセイにて、核に含まれる転写因子量の検討を行った。その結果、明らかに差が認められた転写因子は PU.1 という転写因子だけであった。この転写因子は血球系の分化に

重要な因子であり、ポリアミンによる細胞分化の制御機構において必要とされている可能性が示唆された。

(3) ポリアミンが唯一翻訳後修飾する eIF5A 蛋白質及びその翻訳後修飾を担う酵素であるデオキシハイプシン合成酵素 (DHS) のジーントランプマウスの解析を行った。その結果、ともに胚性致死を示した。胚性致死の時期はポリアミン生合成酵素遺伝子ノックアウトマウスと同様、子宮への着床後すぐに胚の確認が出来なくなる初期胚のステージ (胚盤胞) であった。そこで、胚盤胞の *in vitro* 培養を行って見たところ、eIF5A 及び DHS のホモ欠損胚は wild type と比べて、明らかに細胞数が減少した。同時に DNA 合成の指標となる BrdU の取り込みアッセイを行ったところ、コントロールに比べて、低下していた。よって、子宮着床後の胚の細胞増殖阻害が致死性に関与していることが示唆された。

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 5 件)

- (1) Nishimura, K., Lee, S. B., Park, J. H., and Park, M. H.: Essential role of eIF5A-1 and deoxyhypusine synthase in mouse embryonic development. *Amino Acids* 42, 703-710 (2012) 査読有
- (2) Saiki, R., Park, H., Ishii, I., Yoshida, M., Nishimura, K., Toida, T., Tatsukawa, H., Kojima, S., Ikeguchi, Y., Pegg, A. E., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Brain infarction correlates more closely with acrolein than with reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 1044-1049 (2011) 査読有
- (3) Higashi, K., Sakamaki, Y., Herai, E., Demizu, R., Uemura, T., Saroj, S. D., Zenda, R., Terui, Y., Nishimura, K., Toida, T., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Identification and functions amino acid residues in PotB and PotC involved in spermidine uptake activity. *J. Biol. Chem.* 285, 39061-39069 (2010) 査読有
- (4) Yoshida, M., Higashi, K., Jin, L., Machi, Y., Suzuki, T., Masuda, A., Dohmae, N., Suganami, A., Tamura, Y., Nishimura, K., Toida, T., Tomitori, H., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Identification of acrolein-conjugated protein in plasma of patients with brain infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1234-1239 (2010) 査読有
- (5) Park, M. H., Nishimura, K., Zanelli, C. F.,

and Valentini, S. R.: Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38, 491-500 (2010) 査読有

[学会発表] (計 19 件)

- (1) 松永成永、東恭平、西村和洋、戸井田敏彦:天然物由来ウロン酸の分析。日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日 (札幌)
- (2) 幾尾由紀子、西村和洋、林大輔、三村花華、小林カオル、千葉寛、柏木敬子、東恭平、戸井田敏彦、五十嵐一衛:脳梗塞における新規マーカーとしてのアクロレインによるインターロイキン 6 及び C 反応性タンパク質の産生誘導機構。日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 29 日 (札幌)
- (3) 斎木遼太郎、廣瀬直雄、朴恵林、西村和洋、戸井田敏彦、山寄健一、池口文彦、白幡晶、柏木敬子、五十嵐一衛:脳梗塞モデルマウス及び培養細胞におけるカルシウム毒性とアクロレインの関連。日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 29 日 (札幌)
- (4) 吉田円、三上貴弘、東恭平、斎木遼太郎、溝井睦美、福田和正、中村孝雄、石井伊都子、西村和洋、戸井田敏彦、富取秀行、柏木敬子、五十嵐一衛:脳梗塞患者における尿中アクロレイン-グルタチオン代謝物 3-HPMA (3-ヒドロキシプロピルメルカプトール酸) の低下。日本ポリアミン学会第 3 回年会、2012 年 1 月 26 日 (大宮)
- (5) Nishimura, K.: Essential Role of Polyamines and Hypusine in Mouse Embryonic Development. 2011 Joint symposium College of Pharmacy, Seoul National University & Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 2011 年 10 月 14 日 (Seoul, Korea)
- (6) 朴恵林、斎木遼太郎、西村和洋、戸井田敏彦、山寄健一、池口文彦、白幡晶、柏木敬子、五十嵐一衛:細胞培養系及び脳梗塞モデルマウスにおける Ca²⁺並びにアクロレイン量と細胞毒性の相関。第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日 (京都)
- (7) 吉沢祐基、東恭平、富取秀行、Hamdan, F. F., 西村和洋、戸井田敏彦、柏木敬子、五十嵐一衛:脳における NMDA 受容体の機能 - 知的能力形成とポリアミン輸送 -。「ポリアミンと核酸の共進化」第 10 回合同シンポジウム、2011 年 9 月 10 日 (東京)

- (8) Nishimura, K., Ikuo, Y., Hayashi, D., Saiki, R., Park, H., Ishii, I., Mimura, H., Kobayashi, K., Chiba, K., Kashiwagi, K., Toida, T., and Igarashi, K.: Effect of acrolein on IL-6 and C-reactive protein production in cultured cells and mouse stroke model. Gordon Research Conference on Polyamines, 2011年6月19日(Waterville Valley, NH, USA)
- (9) Saiki, R., Park, H., Nishimura, K., Toida, T., Yamazaki, K., Ikeguchi, Y., Shirahata, A., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Correlation between calcium ion entry and acrolein production. Gordon Research Conference on Polyamines, 2011年6月19日(Waterville Valley, NH, USA)
- (10) 熊本卓哉、中嶋真里恵、片川和明、吉沢佑基、西村和洋、戸井田敏彦、五十嵐一衛: 脳機能改善薬としての機能を目指したメマンチン誘導体の合成とNMDA受容体活性阻害(その2)。日本薬学会第131年会、2011年3月31日(静岡)
- (11) 吉沢佑基、水野聡美、富取秀行、韓霞、益子崇、菅波晃子、田村裕、東恭平、斎木遼太郎、西村和洋、戸井田敏彦、柏木敬子、五十嵐一衛: NMDA受容体調節領域NR1RとNR2BRの構造と機能。日本薬学会第131年会、2011年3月30日(静岡)
- (12) 柏木敬子、酒巻善春、東恭平、戸来江美子、出水理砂、植村武史、Sunil D. SAROJ、照井祐介、西村和洋、戸井田敏彦、五十嵐一衛: スペルミジン輸送活性に関与するPotB及びPotCのアミノ酸残基の同定とその機能。日本薬学会第131年会、2011年3月30日(静岡)
- (13) 西村和洋、吉田円、東恭平、金麗花、町佳樹、鈴木健裕、益田晶子、堂前直、菅波晃子、田村裕、戸井田敏彦、富取秀行、柏木敬子、五十嵐一衛: 脳梗塞患者の血漿中に見いだされるアクロレイン抱合蛋白質の分析と同定。BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会)、2010年12月8日(神戸)
- (14) 斎木遼太郎、朴恵林、石井伊都子、西村和洋、戸井田敏彦、柏木敬子、五十嵐一衛: アクロレインおよび活性酸素の脳梗塞に果たす役割。BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会)、2010年12月8日(神戸)
- (15) 松本成永、東恭平、西村和洋、戸井田敏彦: 天然物由来多糖類に含まれるウロン酸類のHPLCによる分離定量。日本分析化学会第59年会、2010年9月17日(仙台)
- (16) 三上貴弘、東恭平、西村和洋、吉田円、戸井田敏彦、五十嵐一衛: 尿中のアクロレイン及びアクロレイン抱合体の定量。「ポリアミンと核酸の共進化」第9回合同シンポジウム、2010年9月11日(東京)
- (17) Park, M. H., and Nishimura, K.: The story of hypusine and eIF5A: an essential posttranslational modification involving a polyamine. 2010 International Polyamine Conference, 2010年6月16日(Gotemba, Shizuoka, Japan)
- (18) Nishimura, K., and Park, M. H.: Generation of eukaryotic translation initiation factor 5A and its post-translational modification enzyme disrupted mice. 2010 International Polyamine Conference, 2010年6月15日(Gotemba, Shizuoka, Japan)
- (19) Saiki, R., Park, H., Ishii, I., Yoshida, M., Nishimura, K., Toida, T., Tatsukawa, H., Kojima, S., Yamazaki, K., Ikeguchi, Y., Pegg, A. E., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: More intensive correlation between brain infarction and acrolein than reactive oxygen species. 2010 International Polyamine Conference, 2010年6月15日(Gotemba, Shizuoka, Japan)

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.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