

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870126

研究課題名(和文)細胞増殖必須因子ポリアミンによるグリコサミノグリカン合成調節機構の解明

研究課題名(英文) Enhancement of the synthesis of EXT2, EXTL3 and CHSY1 by polyamines at the level of translation.

研究代表者

東 恭平 (HIGASHI, KYOHEI)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10463829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

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)はヘパラン硫酸の発現量を、コンドロイチン硫酸では4硫酸化と分子量を増加させることが明らかとなったので、その結果に基づきポリアミンモジュロンを探索した。その結果、EXT2、EXTL3、CHSY1がポリアミンにより翻訳レベルで、C4ST2は転写レベルで合成促進を受けることが明らかとなった。更にEXT2およびCHSY1 mRNAにおける翻訳開始は、それぞれmicroRNAによって制御されており、ポリアミンはmicroRNAの機能を阻害することでEXT2およびCHSY1の合成を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have previously found that polyamines (putrescine, spermidine and spermine) stimulated the expression level of heparan sulfate and 4-O-sulfation of chondroitin sulfate in mammalian cells. For this reason, we looked for glycosaminoglycan biosynthesis genes whose synthesis is enhanced by polyamines at the level of translation. It was found that the synthesis of EXT2, EXTL3 and CHSY1 were enhanced by polyamines at the level of translation. Furthermore, synthesis of EXT2 and CHSY1 were down-regulated by microRNAs at the translation initiation and polyamine inhibited its microRNA function. It was also found that C4ST2 was stimulated by polyamines at the level of transcription. Experiments are in progress to clarify the polyamine stimulation of the synthesis of C4ST2 mRNA.

研究分野：生物系薬学

キーワード：ポリアミン ヘパラン硫酸 コンドロイチン硫酸 蛋白質合成 microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

ポリアミンは細胞内において、主として RNA と相互作用することにより特定蛋白質の合成を翻訳レベルで促進し、細胞増殖促進因子として機能する。私達は、ポリアミン要求性大腸菌を用い、ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進を受ける遺伝子群「ポリアミンモジュロン」を同定することで、ポリアミンの生理的意義を見出してきた (Igarashi K and Kashiwagi K., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2010, **42**, 39-51)。一方、真核細胞ではポリアミン生合成律速酵素ノックアウトマウスが胎生致死であることから、ポリアミンは細胞増殖必須因子として機能し、その生理作用はポリアミンと RNA の相互作用に基づく特定蛋白質合成促進に依ると考えられるが、詳細は明らかでない。

グリコサミノグリカン (GAG)はウロン酸とアミノ糖が交互に結合し、各糖水酸基の一部に硫酸基が付加した二糖の繰り返し構造を有した直鎖の酸性多糖類であり、代表的な GAG としてヘパラン硫酸 (HS)やコンドロイチン硫酸 (CS)が知られている。GAG はコア蛋白質と共有結合したプロテオグリカンとして、組織の細胞表面や細胞外マトリクスに普遍的に存在し、成長因子や接着因子と結合することで細胞増殖の他、初期胚の細胞質分裂や形態形成・骨格形成など数多くの生命現象に関与することが広く知られている (Bishop JR. *et al.*, *Nature* 2007, **446**, 1030-1037)。

ポリアミンと GAG の研究は、30 年前から行われている。例えば、ポリアミンはウサギ由来初代軟骨細胞の分化に必須の因子であり、分化に伴う酸性糖鎖の発現にポリアミンの関与が示唆されている (Takigawa M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1980, **77**, 1481-1485)。しかしながら、GAG の微量分析は一般的に困難であり、ポリアミンによる発現調節機構は明らかとなっていない。

我々はこれまでに、15 種の動物細胞をポリアミン生合成阻害剤の有無で培養し、細胞膜

上の CS と HS の発現量と二糖組成をポストカラム HPLC で検討したところ、ポリアミンは HS の発現量を促進し、CS では分子量と 4 硫酸化を増加させることを見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、ポリアミンにより発現調節をうけるグリコサミノグリカン合成酵素、硫酸化酵素を同定し、その促進機序を明らかにすることを目的とする。

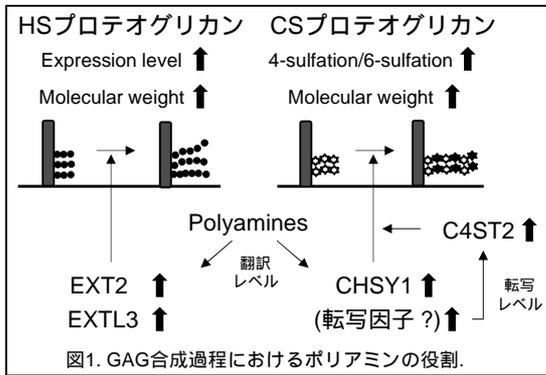
## 3. 研究の方法

ポリアミン生合成阻害剤 ( $\alpha$ -difluoromethylornithine: DFMO)の存在下又は非存在下で 15 種の細胞を培養した後、糖鎖を精製し GAG の発現量、分子量、および組成を逆相イオンペア HPLC で解析した。その結果に基づきポリアミンにより制御を受ける候補遺伝子をピックアップし、蛋白質量はウェスタンブロット法で、mRNA 量は semi-quantitative RT-PCR を用いて調べた。

## 4. 研究成果

### (1) ポリアミンにより発現調節をうけるヘパラン硫酸合成遺伝子の探索

HS の生合成は橋渡し領域四糖構造 (Linker region: GlcA-Gal-Gal-Xyl)の末端グルクロン酸に EXTL3 が GlcNAc を付加することから始まる。次に EXT1/EXT2 ヘテロダイマーが GlcA と GlcNAc を交互に付加することで HS 鎖が伸長する。EXTL2 が Linker region の末端 GlcA に GlcNAc を付加すると HS 合成は阻害される。ポリアミンの有無で NIH3T3 細胞を培養し、EXT1、EXT2、EXTL2、EXTL3 の発現量をウェスタンブロット法により調べた。その結果、ポリアミン減少により EXT2 及び EXTL3 の発現量が著しく減少していた。次に、EXT2 及び EXTL3 mRNA の発現量に対するポリアミンの効果を RT-PCR で検討したところ、変化は認められなかった。以上の結果より、EXT2 および EXTL3 はポリアミンにより翻訳レベルで合成促進することが明らかとなった (図 1)。



## (2) ポリアミンにより発現調節をうけるコンドロイチン硫酸合成遺伝子の探索

CSの生合成はHSと同様に Linker regionの末端グルクロン酸に GalNAc を付加することから始まる。コンドロイチン合成酵素 (CHSY1、CHSY2、CHSY3)およびコンドロイチン重合化因子 (CHPF)のうち2種の合成酵素がCS鎖を伸長し、コンドロイチン4-O-硫酸基転移酵素 (C4ST)によりGalNAcの4位の水酸基に硫酸基が付加するとコンドロイチン4硫酸が合成され、N-アセチルガラクトサミン4-硫酸6-O-硫酸基転移酵素 (GalNAc4S-6ST)によりコンドロイチン4,6硫酸が合成される。

一方、コンドロイチン6-O-硫酸基転移酵素 (C6ST)によりGalNAcの6位の水酸基に硫酸基が付加するとコンドロイチン6硫酸が合成され、ウロニル-2-O-硫酸基転移酵素 (UST)によりコンドロイチン2,6硫酸が合成される。

DFMO添加により細胞内ポリアミン量を減少させると、コンドロイチン4硫酸の発現量および分子量が減少していたため、CHSY1、CHSY2、CHSY3、CHPF、C4ST1、C4ST2およびGalNAc4S-6STの発現量をウエスタンブロット法を用いて調べた。その結果、CHSY1およびC4ST2の発現量がポリアミン減少により減少していた。そこで、mRNA量を調べたところ、CHSY1はポリアミンの有無で変化がなかったのに対し、C4ST2はポリアミン減少によりmRNA量が減少していた。以上の結果より、CHSY1は翻訳レベルで、C4ST2は転写レベルでポリアミンにより合成促進を受けることが明らかとなった(図1)。

## (3) ポリアミンによるEXT2合成促進機構

ポリアミンによるEXT2の合成促進機構を解明すべく、212塩基から成る5'非翻訳領域(untranslated region:UTR)およびORF(104塩基)をレポーター遺伝子であるEGFPに融合させたプラスミドを作製した。ポリアミンの有無で培養した時のEXT2-EGFP融合蛋白質の合成量を調べた結果、ポリアミンによりEXT2-EGFP融合蛋白質の合成が促進されたことから、ポリアミンは翻訳開始段階でEXT2合成を促進することが明らかとなった。次に、部位特異的変異導入法を用いて、ポリアミンによる促進機構を検討した。

真核細胞の翻訳開始効率は、5'-UTRの長さや18S rRNAに対する相補的な配列の有無に依るとの報告がある。EXT2の5'-UTRを部分的に欠損させたプラスミドを作製し、ポリアミンによる促進効果への影響を調べた。その結果、5'-UTRを短くすると蛋白質合成量が増加したが、ポリアミンの促進効果とは関係がなかった。また、18S rRNAに相補的な配列がEXT2 mRNAに3箇所存在したため、変異をいれたプラスミドを作製したが、翻訳効率およびポリアミンによる促進効果は野生型と同じであった。

驚いたことに、EXT2のORFを欠損させると著しくEXT2-EGFP融合蛋白質の発現量が増加し、ポリアミンによる促進効果が消失した。そこで、miRBase (<http://www.mirbase.org/index.shtml>)を用いてEXT2 mRNAのORF領域に相補的なmicroRNA(miRNA)を探索したところ、1種のmiRNAがヒットしたため、EXT2 mRNAに変異を入れ、miRNAとの相互作用を消失させたプラスミドを作製した。その結果、EXT2の蛋白質合成が著しく増加し、ポリアミンによる促進効果が消失した。miRNAの阻害剤を形質導入するとEXT2の発現量が増加すること、ポリアミンの有無でmiRNAの発現量は変化がなかったことから、EXT2の翻訳開始はmiRNAによって負に制御されており、ポリアミンはそのmiRNAの機能を阻害することでEXT2合成を促進することが示唆された。現在、そ

の詳細なメカニズムについて検討中である。

#### (4) ポリアミンによる CHSY1 合成促進機序

ポリアミンによる CHSY1 の合成促進機序を解明すべく、5'-UTR (421 塩基)および ORF (43 塩基)を、レポーター遺伝子である EGFP に融合させたプラスミドを作製した。ポリアミンの有無で培養した時の CHSY1-EGFP 融合蛋白質の合成量を調べた結果、CHSY1-EGFP 融合蛋白質の合成がポリアミンによって促進されたことから、ポリアミンは翻訳開始段階で CHSY1 合成を促進することが明らかとなった。更に CHSY1 の翻訳開始は 2 種の miRNA によって負に制御されており、ポリアミンが miRNA の機能を阻害することで CHSY1 の合成を促進することを示唆するデータを得た。現在、その詳細なメカニズムについて検討中である。

#### 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 16 件)

- Association between components of exudates and periwound moisture-associated dermatitis in breast cancer patients with malignant fungating wounds. Tamai N, Akase T, Minematsu T, Higashi K, Toida T, Igarashi K, Sanada H. *Biol Res Nurs.*, 査読有, *In press*.
- ポストカラム HPLC 法によるポリアミン分析. 東恭平, **ポリアミン**, 査読無, **2**, 19-25 (2015)
- Polyphenol extract from phellinus igniarius protects against acrolein toxicity in vitro and provides protection in a mouse stroke model. Suabjakyong P, Saiki R, Van Griensven LJ, Higashi K, Nishimura K, Igarashi K, Toida T. *PLoS One*, 査読有, **10**, e0122733 (2015)
- Composition of glycosaminoglycans in elasmobranchs including several deep-sea sharks: Identification of chondroitin/dermatan sulfate from the dried fins of *isurus oxyrinchus* and *prionace glauca*. Higashi K, Takeuchi Y, Mukuno A, Tomitori H, Miya M, Linhardt RJ, Toida T. *PLoS One*. 査読有, **10**, e0120860 (2015)
- The acute encephalopathy induced by intake of sugihiratake mushroom in the patients with renal damage might be associated with the intoxication of cyanide and thiocyanate. Akiyama H, Matsuoka H, Okuyama T, Higashi K, Toida T, Komatsu H, Sugita-Konishi Y, Kobori S, Kodama Y, Yoshida M, Endou H. *Food Safety*, 査読有, **3**, 16-29 (2015)
- Distinguishing mild cognitive impairment from Alzheimer's disease with acrolein metabolites and creatinine in urine. Yoshida M, Higashi K, Kuni K, Mizoi M, Saiki R, Nakamura M, Waragai M, Uemura K, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K. *Clin Chim Acta.*, 査読有, **441**, 115-121 (2015).
- Polyamine stimulation of eEF1A synthesis based on the unusual position of a complementary sequence to 18S rRNA in eEF1A mRNA. Terui Y, Sakamoto A, Yoshida T, Kasahara T, Tomitori H, Higashi K, Igarashi K, Kashiwagi K. *Amino Acids* 査読有, **47**, 345-356 (2015).
- A simple HPLC method for identification of the origin of chondroitin sulfate in health foods. Higashi K, Okamoto Y, Mano T, Wada T, Toida T. *Jpn. J. Food Chem.*, 査読有, **21**, 187-194 (2014).
- Identification of functional amino acid residues involved in polyamine and agmatine transport by human organic cation transporter 2. Higashi K, Imamura M, Fudo S, Uemura T, Saiki R, Hoshino T, Toida T, Kashiwagi K, and Igarashi K. *PLoS One*, 査読有, **9**, e102234 (2014).
- Properties of putrescine uptake by PotFGHI and PuuP and their physiological

- significance in *Escherichia coli*. Terui Y, Saroj SD, Sakamoto A, Yoshida T, Higashi K, Kurihara S, Suzuki H, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K. *Amino Acids*, 査読有, **46**, 661-670 (2014).
11. Prediction of the interaction between spermidine and the G-G mismatch containing acceptor stem in tRNA(Ile): molecular modeling, density functional theory, and molecular dynamics study. Hayashi Y, Sugiyama H, Sukanami A, Higashi K, Kashiwagi K, Igarashi K, Kawauchi S, Tamura Y. *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有, **441**, 999-1004 (2013).
  12. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of spermidine acetyltransferase from *Escherichia coli*. Niiyama M, Sugiyama S, Hirose M, Ishikawa S, Tomitori H, Higashi K, Yamashita T, Adachi H, Takano K, Murakami S, Murata M, Inoue T, Mori Y, Kashiwagi K, Matsumura H, Igarashi K. *Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 査読有, **69**, 884-887 (2013)
  13. Acetaldehyde-induced cytotoxicity involves induction of spermine oxidase at the transcriptional level. Uemura T, Tanaka Y, Higashi K, Miyamori D, Takasaka T, Nagano T, Toida T, Yoshimoto K, Igarashi K, Ikegaya H. *Toxicology*, 査読有, **310**, 1-7 (2013)
  14. Role of polyamines at the G1/S boundary and G2/M phase of the cell cycle. Yamashita T, Nishimura K, Saiki R, Okudaira H, Tome M, Higashi K, Nakamura M, Terui Y, Fujiwara K, Kashiwagi K, Igarashi K. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 査読有, **45**, 1042-1050. (2013)
  15. Effect of molecular sizes of chondroitin sulfate on interaction with L-Selectin. Igarashi N, Takeguchi A, Sakai S, Akiyama H, Higashi K, Toida T. *Int. J. Carbohydr. Chem.*, 査読有, **2013**, Article ID 856142 (2013)
  16. Sequence analysis and domain motifs in the porcine skin decorin glycosaminoglycan chain. Zhao X, Yang B, Solakylidirim K, Joo EJ, Toida T, Higashi K, Linhardt RJ, Li L. *J. Biol. Chem.*, 査読有, **288**, 9226-9237 (2013)
- 【学会発表】(計16件)**
1. 東恭平, 武内芳貴, 向野杏, 富取秀行, 宮正樹, 戸井田敏彦. 乾燥フカヒレに含まれるデルマタン硫酸の構造解析. 日本薬学会第135年会, 2015年3月28日, 神戸.
  2. 岡本悠佑, 東恭平, 向野杏, 戸井田敏彦. ミズダコ由来コンドロイチン硫酸におけるGlcA3Sの検出. 日本薬学会第135年会, 2015年3月28日, 神戸.
  3. 吉田円, 東恭平, 國恭司郎, 溝井睦美, 斎木遼太郎, 中村瑞穂, 藁谷正明, 植村研一, 戸井田敏彦, 柏木敬子, 五十嵐一衛. 尿中のアクロレイン代謝物とクレアチニン測定によるアルツハイマー病と軽度認知障害の識別. 日本薬学会第135年会, 2015年3月27日, 神戸.
  4. 伊藤千弘, 西田光貴, 北口公司, 植木章晴, 石田秀治, 木曾真, 東恭平, 戸井田敏彦, 五十嵐一衛, 森雄一郎, 山元宏貴, 伊神孝生, 矢部富雄. 食物繊維摂取による小腸絨毛伸長作用の機構解明. 日本農芸化学会2015年度大会, 2015年3月27日, 岡山.
  5. 今村正隆, 東恭平, 不動聡志, 植村武史, 斎木遼太郎, 星野忠次, 戸井田敏彦, 柏木敬子, 五十嵐一衛. Organic cation transporter 2 によるポリアミン及びアグ

- マチン輸送機構の解明. ポリアミン学会  
第6回年会, 2015年1月20日, 東京.
6. 戸井田敏彦, 東恭平, 真野貴, 濱館直史, 松本祥幸, 瀬戸加代子, 和田竜哉.  
反転腸管を用いたグルコサミン吸収に  
おける黒酢の効果. 第12回日本機能性  
食品医学学会, 2014年12月13日, 京都.
  7. 今村正隆, 東恭平, 山口勝利, 降幡知巳,  
西村和洋, 五十嵐一衛, 戸井田敏彦. ポ  
リアミンによるグリコサミノグリカン  
合成調節機構の解明. 第87回日本生化学  
学会大会, 2014年10月18日, 京都.
  8. 萩原裕樹, 東恭平, 戸井田敏彦. 小分子  
蛍光物質を用いた蛍光標識グリコサミ  
ノグリカン作製と有効性評価. 第87回  
日本生化学学会大会, 2014年10月18日,  
京都.
  9. 山口勝利, 東恭平, 今村正隆, 西村和洋,  
柏木敬子, 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33回日本糖質学  
会, 2014年8月12日, 名古屋.
  10. 東恭平, 今村正隆, 山口勝利, 西村和洋,  
柏木敬子, 五十嵐一衛, 戸井田敏彦. 動  
物細胞のグリコサミノグリカンの網羅  
的解析とポリアミンの役割. 第33回日  
本糖質学会, 2014年8月10日, 名古屋.
  11. Higashi K, Imamura T, Yamaguchi K,  
Furihata T, Nishimura K, Kashiwagi K,  
Linhardt RJ, Igarashi K, and Toida T  
(Invited speaker). Enhancement of the  
synthesis of EXT2, EXTL3 and CHSY1 by  
polyamines at the level of translation in  
mammalian cells. Gordon research  
conference on proteoglycans. 2014年7月7  
日, Andover, NH, USA.
  12. Higashi K, Imamura T, Yamaguchi K,  
Furihata T, Nishimura K, Kashiwagi K,  
Linhardt RJ, Igarashi K, and Toida T  
(Invited Lecture). Enhancement of the  
synthesis of EXT2, EXTL3 and CHSY1 by  
polyamines at the level of translation in  
mammalian cells. Glycomics meeting at  
Rensselaer Polytechnic Institute, 2014年7  
月5日, Troy, NY, USA.
  13. 國恭司郎, 東恭平, 西村和洋, 五十嵐一  
衛, 戸井田敏彦. 無症候性脳梗塞診断マ  
ーカー3-HPMA の高感度分析法の開発.  
日本薬学会第134年会, 2014年3月28  
日, 熊本.
  14. 山口勝利, 東恭平, 今村正隆, 降幡知巳,  
西村和洋, 五十嵐一衛, 戸井田敏彦. コ  
ンドロイチン硫酸合成酵素における新  
規ポリアミンモジュロンの同定. 東京慈  
恵会医学大学 学外共同研究シンポジウ  
ム「ポリアミンと核酸の共進化」第12  
回合同シンポジウム, 2013年11月9日,  
東京.
  15. 萩原裕樹, 東恭平, 萩田拓, 花岡宏史,  
上原知也, 荒野泰, 戸井田敏彦. センチ  
ネルリンパ節を標的とした糖鎖リガン  
ドの開発. 第32回日本糖質学会年会,  
2013年8月7日, 名古屋.
  16. Higashi K, Imamura M, Furihata T,  
Nishimura K, Linhardt RJ, Kashiwagi K,  
Igarashi K, Toida T. Comprehensive  
analysis of glycosaminoglycans in  
mammalian cells cultured in the presence or  
absence of polyamines: Identification of  
polyamine modulon in glycosaminoglycan  
synthesis. Gordon research conference on  
polyamines, 2013年6月17日, Waterville  
valley, NH, USA.

#### 【その他】

ホームページ等

[http://www.p.chiba-u.jp/lab/bunseki/publication.h  
tml](http://www.p.chiba-u.jp/lab/bunseki/publication.h<br/>tml)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 恭平 (HIGASHI Kyohei)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：10463829