

令和元年5月30日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08244

研究課題名(和文)細胞増殖因子ポリアミンの体内時計制御における役割解明

研究課題名(英文)Regulation of circadian clock by cell growth factor polyamines

研究代表者

照井 祐介 (TERUI, Yusuke)

千葉科学大学・薬学部・教授

研究者番号：60433687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、時計遺伝子に着目し、体内時計に果たすポリアミンの役割について解析した。ポリアミンの細胞内濃度を4時間ごとに測定した結果、24時間周期の概日リズムを刻んでいることを見出した。そこで、BMAL1やPER2などの時計遺伝子のmRNA量をポリアミンの有無で比較したところ、発現位相に2-4時間の遅れが見られた。また、BMAL1がポリアミンにより翻訳レベルで約2倍発現増加することを見出した。ポリアミンによるBMAL1の合成促進機構を解析した結果、ポリアミンはribosome shuntingを促進し、時計遺伝子BMAL1を翻訳レベルで発現調節し、体内時計を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、BMAL1蛋白質のポリアミンによる合成促進機序とBMAL1の調節機構の生理的意義が明らかになり、体内時計制御の新たな経路を標的とした新規時差症候群回復薬や、様々な疾患に対する個々のリズム位相を知るための有益なバイオマーカーの開発の基盤が確立できると期待される。

研究成果の概要(英文)： We examined the relationship between polyamines and circadian rhythms. The levels of polyamines showed a circadian rhythm. We next compared the expression level of 6 kinds of the circadian clock genes in control and DFMO (an inhibitor of polyamine synthesis) treated NIH3T3 cells. Although the mRNA level of clock genes did not alter in cells, the clock gene Bmal1 was increased about 2.5-fold at the protein level in control cells. The result suggests that Bmal1 synthesis is enhanced by polyamines at the level of translation. To clarify the mechanism of polyamine stimulation of Bmal1 synthesis, Bmal1-EGFP fusion plasmids were constructed. On the 5' -UTR of Bmal1 mRNA, there are two hairpin structures and complementary sequences to 18S rRNA necessary for ribosome shunting. Polyamine stimulation of Bmal1-EGFP synthesis disappeared by the deletion of these structures. These results suggest that polyamines enhance ribosome shunting and stimulate Bmal1 synthesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ポリアミン 概日リズム 体内時計 BMAL1 遺伝子発現制御 時計遺伝子 翻訳 生体分子

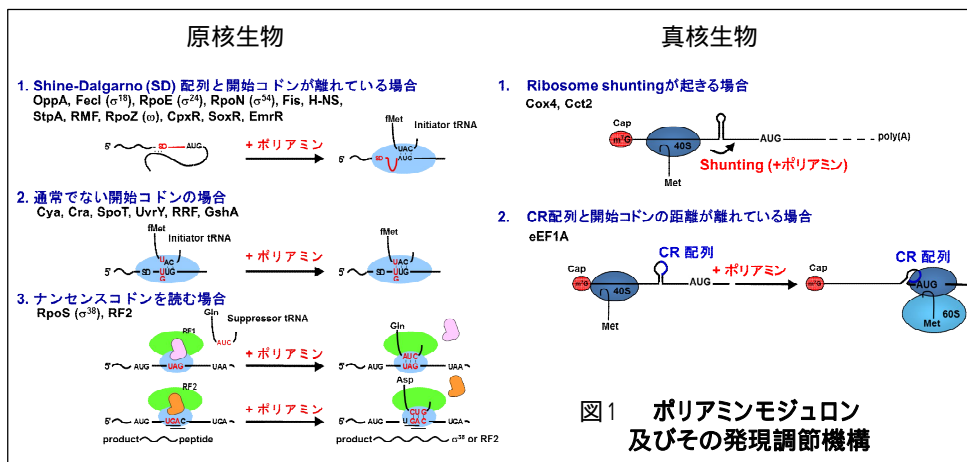
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ポリアミン( プトレッシン: diamine、スペルミジン: triamine、スペルミン: tetraamine ) は、生命に必須な低分子生理活性アミンであり、ウイルスからヒトに至るほぼ全ての生物に普遍的に存在する。主としてRNAに結合し、構造変化を引き起こすことで細胞増殖因子として働く。申請者らは、ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進を受け、細胞増殖に必要な蛋白質をコードする遺伝子群をポリアミンモジュロンと命名し、これまでに大腸菌において12種 ( *oppA*, *cya*, *rpoS*, *fecI*, *fis*, *prfB*, *rpoN*, *hns*, *cra*, *rpoE*, *stpA*, *emrR* ) を同定した。そのうち10種は転写因子であることから、ポリアミンが多く遺伝子発現を調節し、細胞増殖を促進していることが示された。さらに最近、大腸菌の生存率維持、ストレス除去やバイオフィーム形成能の上昇に必要な蛋白質をコードする8種のポリアミンモジュロン ( *rmf*, *rpoZ*, *spoT*, *cpxR*, *uvrY*, *frr*, *soxR*, *gshA* ) を同定した。

大腸菌のポリアミンモジュロンのmRNAは、翻訳効率の悪いmRNAであり、翻訳開始に重要なShine-Dalgarno (SD) 配列と開始コドンが離れている場合 ( *oppA*, *fecI*, *fis*, *rpoN*, *hns*, *rpoE*, *stpA*, *rmf*, *rpoZ*, *cpxR*, *soxR*, *emrR* ) 開始コドンがAUGではなくGUGやUUGの場合 ( *cya*, *cra*, *spoT*, *uvrY*, *frr*, *gshA* ) 及び mRNAの翻訳領域に終止コドンが存在する場合 ( *rpoS*, *prfB* ) に、ポリアミンがRNAの特定構造 ( 2本鎖を形成しないbulged-out構造やstem and loop構造 ) に結合して構造変化を引き起こすことにより、翻訳レベルでの発現を上昇させることが明らかになった。さらに、真核細胞のポリアミンモジュロンとして、マウス乳がんFM3A細胞で4種 ( Cct2, Hnrpl, Pgam1, eEF1A ) 及び、酵母で1種 ( Cox4 ) が同定されている。

真核生物のポリアミンモジュロンのmRNAも翻訳効率の悪いmRNAであり、リボソームシャントング ( 40Sリボソームサブユニットが5' -非翻訳領域上のステム・ループ構造を飛び越えること ) が起きる特徴を持つ場合 ( COX4, Cct2 ) CR配列と開始コドンとの距離が離れている場合 ( eEF1A ) に、ポリアミンがRNAの特定構造に結合して構造変化を引き起こし、翻訳レベルでの発現を上昇させることが明らかになった。特に、申請者らは、原核生物と同様のSD配列がmRNAの5' -非翻訳領域に存在することを発見し、その配列を「CR配列」 ( 18S rRNAとの相補的な配列、complementary sequence to 18S rRNA ) と命名した。ポリアミンにより、CR配列と開始コドン付近の構造が変化し、相対的な距離が縮まることで翻訳開始複合体形成の効率を高めることが示唆された ( 図1 ) 。



## 2. 研究の目的

体内時計（概日リズム）の調節因子である時計遺伝子が、睡眠障害、循環器疾患、メタボリックシンドローム、がんなど様々な疾患の発症に影響することが多数報告されている。その時計遺伝子が薬物輸送や代謝リズムの調節に深く関与することから、病気と体内時計との関係が重要視されている。体内時計を制御する時計遺伝子は、現在数種が同定されているが、それらを制御している明確な調節因子は明らかとなっていない。また、マウスやヒトでは3種のポリアミン（プトレッシン、スペルミジン、スペルミン）が主に存在するが、3種のポリアミンの細胞内濃度の経時変化は測定されておらず、細胞増殖調節因子のポリアミンが体内時計に及ぼす影響は未だ明らかとなっていない。著者らは、ポリアミンの同定や濃度変化をHPLCを用いて正確に測ることが可能であるため、マウス線維芽細胞（NIH3T3）とヒト肝がん細胞（HepG2）を用いて、デキサメタゾン（同調試薬）で個々の細胞の体内時計を同調させた後、ポリアミンの細胞内濃度の2日間の経時変化を測定した結果、規則性のある概日リズムを刻んで変動していることを見出した（図2）。

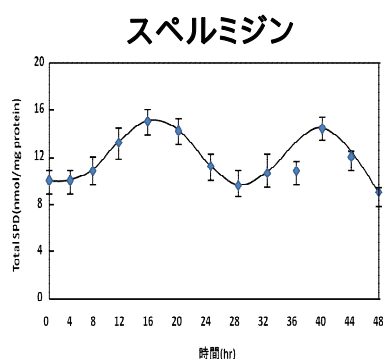


図2 細胞内ポリアミン含量の経時変化

体内時計を細胞レベルにおいて調節しているのは、転写因子であるBMAL1とCLOCKの複合体であり、この複合体がDNAに結合してPERやCRYなどの時計遺伝子、多くのホルモン・サイトカインなどの発現を制御している。そこで、時計遺伝子のマスターレギュレーターBMAL1の発現量を正常細胞とポリアミン欠乏細胞で比較した結果、BMAL1がポリアミンモジュロンと判明したので、BMAL1の蛋白質のポリアミン合成促進機構とポリアミンが生体時計ネットワークに果たす役割を解析した。

## 3. 研究の方法

ポリアミンが概日リズムを刻んでいることから、時計遺伝子に対するポリアミンの影響について検討した。デキサメタゾンで同調させた NIH3T3 細胞を 0~24 時間で 4 時間ごとに回収し、RNA 及び cell lysate を調製し、コントロール細胞とポリアミン減少細胞で mRNA と蛋白質発現量を比較した。

体内時計に対するポリアミンの効果において、NIH3T3細胞の正常細胞とポリアミン欠乏細胞で時計遺伝子の発現量の差をWestern blotting及びNorthern blottingを用いて比較した。また、この遺伝子のmRNA構造の検討を行ったところ、*Bmal1* mRNAも他の真核細胞のポリアミンモジュロンのmRNAと同様、5'-非翻訳領域の長さが長く、

ポリアミンの結合によってribosome shuntingが起こると予想される翻訳効率が悪い mRNAであった。そこで、ポリアミンによってribosome shuntingが起きるかどうか、ポリアミン結合部位のstem and loop構造を部位特異的変異導入により欠損させたプラスミドを作製し、細胞に形質転換して、ポリアミンによる合成促進効果が消失するかどうかを検証した。

#### 4. 研究成果

時計遺伝子 BMAL1 や PER2 の mRNA 発現量を測定したところ、BMAL1 では 16 時間、PER2 では 4 時間をピークとする概日リズムが見られた (図 3A)。一方、ポリアミン減少細胞は、BMAL1 では 18 時間、PER2 では 8 時間にピークが認められ、発現位相に 2~4 時間の遅れが見られた。コントロール細胞とポリアミン減少細胞の時計遺伝子の mRNA 量を比較したところ、ポリアミンの有無で差は見られなかった。また、mRNA 発現量のピーク時間である BMAL1 では 18 時間、PER2 では 8 時間でポリアミン有無による蛋白質発現量の比較を行った。BMAL1 蛋白質においてポリアミンにより約 2 倍の発現増加が見られたが、PER2 蛋白質においてはポリアミンの有無による差は見られなかった (図 3B)。以上の結果から、BMAL1 がポリアミンにより翻訳レベルで合成促進されていることが示唆された。

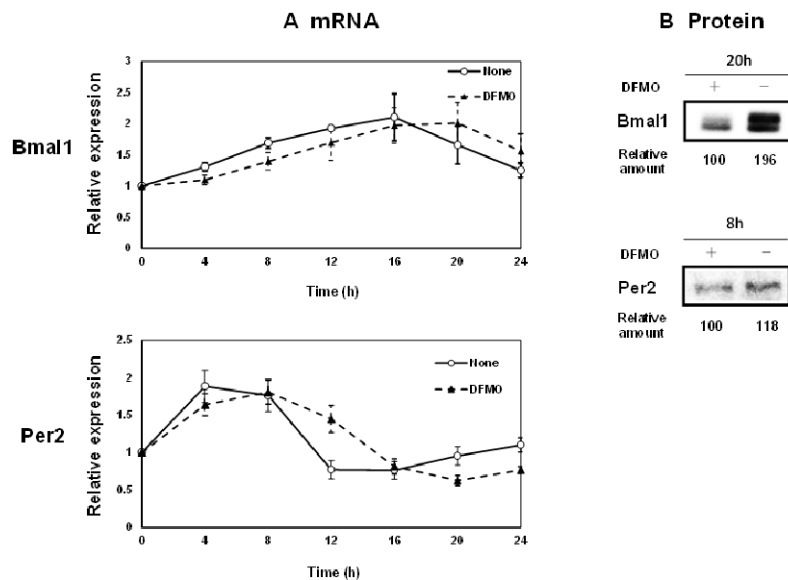


図 3 時計遺伝子 BMAL1 及び PER2 の発現量に対するポリアミンの効果

ポリアミンによる BMAL1 の合成促進機構を解明するため、*Bmal1* mRNA の 2 次構造を調べたところ、5'-非翻訳領域に安定なヘアピン構造を 2 つ (Hairpin 1、Hairpin 2) と 18S rRNA との相補配列を見出した。18S rRNA との相補配列は、*Bmal1* mRNA 5'-UTR の開始コドンから 453~460 塩基上流と、4~10 塩基上流に存在し、それぞれが ribosome shunting に必要な take-off 及び landing サイトである可能性が示唆された。これまでの研究により、このような特徴を持つ mRNA において、ポリアミンが ribosome shunting を促進することが明らかとなっている (図 4)。

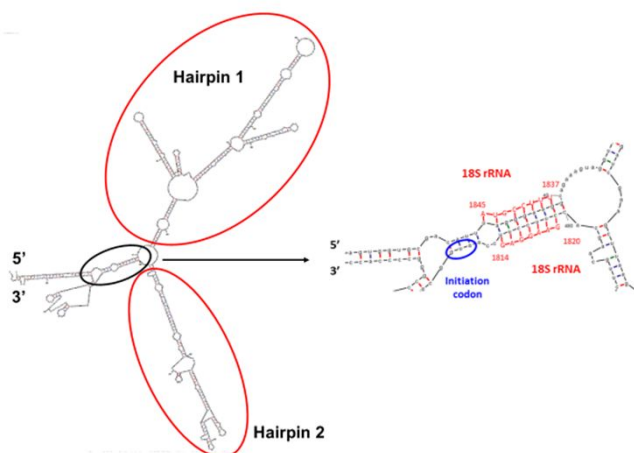


図4 *Bmal1* mRNA 5'-UTR の予測 2次構造

5'-UTR に高次構造である stem and loop 構造が存在する場合、通常ではスキャニングが行われるが、ポリアミンが作用することによって、mRNA の高次構造を読み飛ばすことが可能となり、翻訳効率が上昇する。*Bmal1* mRNA にもこの特徴が見られたため、BMAL1 遺伝子の一部と、EGFP をつなげたプラスミドを作製し、検討を行った。*Bmal1* mRNA の 5' 末端は非常に GC 含量が高く、PCR による増幅が困難であると考えられた。そこで、5'-UTR 全長 521 塩基から 5' 末端側 30 塩基欠損させた 5'-UTR の一部 (491 塩基) と ORF の一部を組み込んだ、プラスミドを作製するとともに、Hairpin 1、Hairpin 2 及び、Hairpin 1,2 の両方を欠損させた変異体 ( $\Delta$ Hairpin 1、 $\Delta$ Hairpin 2、 $\Delta$ Hairpin 1,2) を作製した。これらのプラスミドを NIH3T3 細胞にトランスフェクションし、ポリアミンの有無による EGFP の発現量を比較した。その結果、Wild type では、ポリアミンにより 2.3 倍の合成発現促進が見られたのに対して、 $\Delta$ Hairpin 1、 $\Delta$ Hairpin 2、 $\Delta$ Hairpin 1,2 の全てにおいてポリアミンの合成促進効果が消失した。また、DFMO 存在下における蛋白質合成が 3~6 倍に増加した。以上の結果から、ポリアミンはこれらのヘアピン構造に作用し、蛋白質合成を促進することが示唆された (図 5)。本研究により、ポリアミンが時計遺伝子 BMAL1 を翻訳レベルで発現調節し、体内時計を制御していることが示唆された。

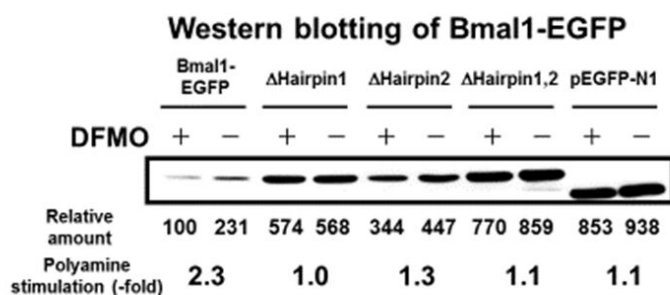


図5 BMAL1-EGFP 変異体におけるポリアミンの合成促進効果の消失

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

YOSHIDA Taketo, SAKAMOTO Akihiko, **TERUI Yusuke**, TAKAO Koichi, SUGITA Yoshiaki, YAMAMOTO Kaneyoshi, ISHIHAMA Akira, IGARASHI Kazuei, KASHIWAGI Keiko, Effect of spermidine analogues on cell growth of *Escherichia coli* polyamine requiring mutant MA261. *PLoS One*. 11, e0159494 (2016) 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0159494. eCollection 2016.

**TERUI Yusuke**, YOSHIDA Taketo, SAKAMOTO Akihiko, SAITO Daisuke, OSHIMA Tairo, KAWAZOE Masahito, YOKOYAMA Shigeyuki, IGARASHI Kazuei, KASHIWAGI Keiko, Polyamines protect nucleic acids against depurination. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 99. 147-153. (2018) 査読有, doi: 10.1016/j.biocel.2018.04.008.

KASHIWAGI Keiko, **TERUI Yusuke**, IGARASHI Kazuei, Modulation of protein synthesis by polyamines in mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* 1694. 325-336. (2018) 査読有, doi: 10.1007/978-1-4939-7398-9\_27.

〔学会発表〕(計 32 件)

SAKAMOTO Akihiko, YOSHIDA Taketo, **TERUI Yusuke**, IGARASHI Kazuei, KASHIWAGI Keiko, Exploration of novel polyamine modulon in eukaryotic cells. 4<sup>th</sup> International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives, 2016. 9. 口頭発表, Rome, Italy.

**TERUI Yusuke**, SAKAMOTO Akihiko, YOSHIDA Taketo, SAITO Daisuke, OSHIMA Tairo, IGARASHI Kazuei, KASHIWAGI Keiko, Thermal protection of nucleic acids by polyamines, Gordon Research Conference on Polyamines, 2017. 6. ポスター発表, Waterville Valley, USA.

茂木沙織、坂本明彦、吉田健人、**照井祐介**、五十嵐一衛、柏木敬子、ポリアミンによる時計遺伝子 Bmal1 の翻訳レベルにおける合成促進、「ポリアミンと核酸の共進化」第 16 回合同シンポジウム、2017. 9. 口頭発表、東京慈恵会医科大学

坂本明彦、**照井祐介**、五十嵐一衛、柏木敬子、ポリアミンによる時計遺伝子 Bmal1 の発現制御、第 91 回日本生化学大会、2018. 9. ポスター発表、国立京都国際会館

坂本明彦、岩崎倅千、金子達紀、**照井祐介**、五十嵐一衛、柏木敬子、ポリアミンによる時計遺伝子 Bmal1 の発現促進、日本薬学会第 139 年会、2019. 3. 口頭発表、幕張メッセ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cis.ac.jp/teacher>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。