

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07012

研究課題名（和文）ポリアミンによるプリンヌクレオチド合成経路促進機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism of polyamine stimulation of purine nucleotide biosynthesis

研究代表者

西村 和洋（NISHIMURA, Kazuhiro）

国際医療福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：60302569

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）：ポリアミンによるプリンヌクレオチド合成経路の促進機構を明らかにするため、ポリアミン生合成阻害剤の有無、および遺伝子ノックダウンの手法を用いて研究を行った。その結果、マウス細胞株では細胞内ポリアミン量の低下によりプリンヌクレオチド合成酵素のPAICSタンパク質量が翻訳レベルで低下することで細胞内イノシンーリン酸（IMP）量も減少することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリアミンは細胞増殖の必須因子であり、生命の必須因子でもある。ポリアミンの有無がIMP量に関わるという本研究の成果は、細胞増殖の際に必要なDNA複製の基質を供給するしくみに直結するという重要性を含む。日本人の死亡要因の第1位では悪性新生物（腫瘍）であり、細胞増殖の制御が破綻した結果である。その癌治療の新たな戦略の基盤となりうる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism by which polyamines promote the purine nucleotide synthesis pathway, we investigated the presence or absence of polyamine biosynthesis inhibitors and gene knockdown methods. As a result, it was clarified that the intracellular inosine monophosphate (IMP) reduced due to the decrease of the amount of purine synthesis enzyme PAICS by the inhibitor at the translational level in mouse cell lines.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：ポリアミン プリンヌクレオチド イノシンーリン酸 翻訳制御 遺伝子ノックダウン

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プトレッシン、スペルミジン、スペルミンに代表されるポリアミンは細胞増殖必須因子として知られている。その生合成酵素の欠損マウスを作製すると致死となることから、生命に必須な生理活性アミンであるということを示している。また、細胞内では主に RNA と相互作用して存在するといふ知見から、細胞増殖に必要な遺伝子の翻訳促進に関わるとの考えで研究を進めてきた。その結果、ポリアミンによる翻訳促進を受ける遺伝子をいくつも同定してきた。

2. 研究の目的

これまでの研究で、細胞内ポリアミン量の低下によりイノシン酸 (IMP) が減少することを明らかにし、ポリアミンにより翻訳促進を受ける遺伝子の候補として、プリンヌクレオチド合成経路の酵素遺伝子である *Paics*、*Impdh* を見出した。そこで、本研究ではポリアミンが直接核酸合成を促進するメカニズムの解明を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) NIH3T3 細胞でのプリンヌクレオチド合成経路の解析

Paics、*Impdh* 遺伝子を見出したのはマウス乳がん由来 FM3A 細胞を用いた研究成果だったため、マウス繊維芽細胞由来の NIH3T3 をポリアミン生合成阻害剤の有無で培養し、プリンヌクレオチド合成経路の関連酵素を Western blotting で調べ、HPLC を用いた細胞内 IMP 量の定量を行った。

(2) 遺伝子ノックダウン

NIH3T3 細胞に標的遺伝子に対する shRNA 発現ベクターをトランスフェクションして細胞増殖阻害効果、および HPLC を用いた細胞内 IMP 量の定量を行った。また、IMP、ヒポキサンチン (Hypo) 添加による細胞増殖阻害からの回復を検討した。

(3) *Paics* 遺伝子の翻訳促進機構の解析

Paics 遺伝子の 5'-UTR (5'-非翻訳領域) をルシフェラーゼと融合したレポーター遺伝子を作製し、NIH3T3 細胞へトランスフェクションしてポリアミン生合成阻害剤の有無によるルシフェラーゼ活性を指標とした翻訳活性を測定した。

(4) HeLa 細胞でのプリンヌクレオチド合成経路の解析

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞株をポリアミン生合成阻害剤の有無で培養し、プリンヌクレオチド合成経路の関連酵素を Western blotting で調べ、HPLC を用いた細胞内 IMP 量の定量を行った。

4. 研究成果

(1) ポリアミン生合成阻害剤の有無で培養した NIH3T3 細胞の抽出液を用いて、プリンヌクレオチド合成経路の関連酵素の Western blotting を行った結果、コントロールに比べて PAICS 蛋白質量は減少した。しかし、FM3A 細胞と異なり IMPDH タンパク質については変化しなかった (図1)。続いて、細胞内 IMP 量を HPLC で定量した結果、有意に減少することが明らかになった。

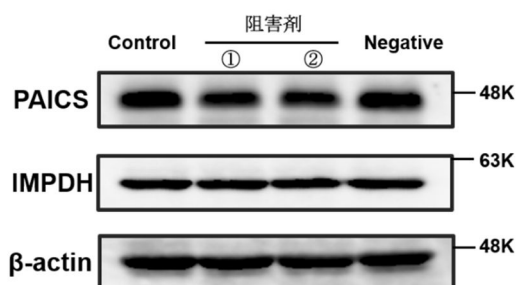


図1. Western blotting

(2) 細胞内ポリアミン量の減少に依存せずに PAICS 蛋白質量を低下させるために shRNA 発現ベクターを用いて遺伝子ノックダウンを行った。その結果、NIH3T3 細胞での PAICS 蛋白質の減少は細胞増殖を強く阻害した。そして、IMP 量の定量を行うとコントロールの shRNA に対して、有意に減少することが明らかになった。以上の結果から、細胞増殖阻害を示す細胞内ポリアミン

量の減少が PAICS の低下を導き、最終的に IMP の減少を引き起こすことが証明された (図 2)。このような IMP の減少に対して細胞外からの IMP もしくは Hypo を添加することによる細胞増殖の回復を検討したが、どちらの条件でも回復は見られなかった。NIH3T3 細胞においては、IMP 産生にサルベージ経路の関与が低く、プリン *de novo* 合成経路が大きく貢献していることがわかった。

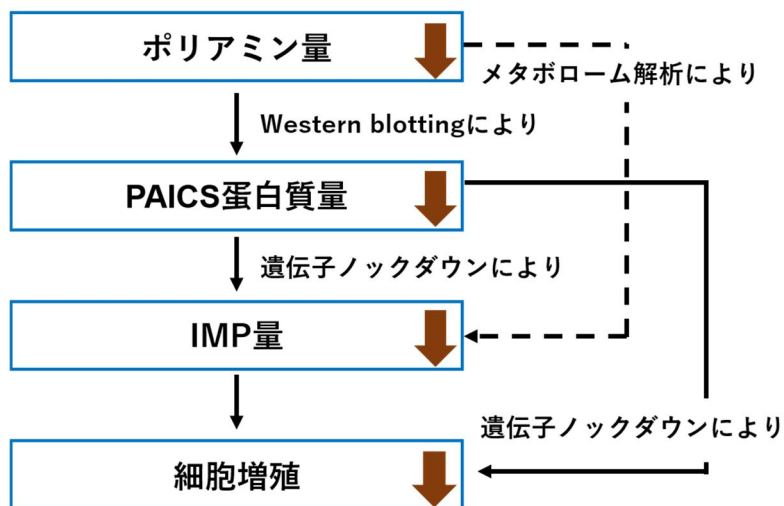


図2. ポリアミンによる細胞増殖促進機構

(3) ポリアミン合成阻害時の PAICS 蛋白質量の低下では mRNA 量に変化がなく、翻訳レベルでの関与が強く示唆されている。ポリアミンによる翻訳制御では mRNA の 5'-UTR が大きく影響することから、5'-UTR とルシフェラーゼとの融合遺伝子によるレポーターアッセイを行った。*Paics* 遺伝子の 5'-UTR を含むレポーター遺伝子を NIH3T3 細胞に導入してポリアミン合成阻害剤の有無による比較を行うと、阻害剤存在下ではルシフェラーゼ活性がより低下した。すなわち、ポリアミン量の低下により翻訳阻害が見られたということになり、5'-UTR を介したポリアミンによる翻訳制御が重要であることが示唆された。

(4) これまでの成果は、マウス細胞株を用いた解析である。そこで、ヒト細胞株の HeLa 細胞を用いて研究の方法 (1) と同様の解析を行った。その結果、プリンヌクレオチド合成の関連酵素の量的変化を見出すことは出来ていない。しかしながら、細胞内 IMP 量については、ポリアミン合成阻害剤により減少する結果を得ている。マウスとヒトでの結果の違いに関する理由は不明であり、今後の更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山友里奈、鍵岡輝一、内田雅士、石井伊都子、五十嵐一衛、戸井田敏彦、西村和洋
2. 発表標題 プリンde novo合成経路に対するポリアミンの影響
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村和洋
2. 発表標題 細胞増殖・分化を制御するポリアミンの標的遺伝子の解析
3. 学会等名 第11回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大内はるか、渡邊紗貴、内田雅士、石井伊都子、五十嵐一衛、戸井田敏彦、西村和洋
2. 発表標題 ポリアミンにより制御を受けるシャペロニンCCTの機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村和洋、岡本萌実、澁江梨奈、戸井田敏彦、五十嵐一衛
2. 発表標題 Klf4遺伝子のポリアミンによる翻訳制御機構の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上輝己、吉野哲彦、五十嵐一衛、戸井田敏彦、西村和洋
2. 発表標題 定量分析に基づいた細胞内ポリアミン分布の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村和洋
2. 発表標題 ポリアミンによる細胞増殖促進とプリンヌクレオチド代謝制御の解析
3. 学会等名 第12回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小坂空知、井谷田翔馬、岩下史樹、上村瑞穂、齋藤有里、西村和洋
2. 発表標題 HeLa細胞のプリンヌクレオチド合成に対するポリアミンの影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://otawara.iuhw.ac.jp/staff/yakugaku/8783.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	内田 雅士 (UCHIDA Masashi) (90824574)	千葉大学・大学院薬学研究院・助教 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関