

ポリアミン Polyamine

Vol. 12
Nov. 2025

シリーズ ポリアミン研究
小黒 明広
国際学会参加報告
藤田 剛士



日本ポリアミン学会
The Japanese Society of Polyamine Research

ポリアミン Polyamine

Vol. 12

Nov 2025

シリーズ ポリアミン研究

- ・リピート関連非 AUG 翻訳に対するポリアミンの作用 小黒明広 1

国際会議参加報告

- ・2025 年ポリアミンに関するゴードン会議に参加して 藤田剛士 6

発行：日本ポリアミン学会 office@polyamine.jp

制作：日本ポリアミン学会 学会誌編集委員会

委員長：小黒明広（慈恵医大）

委員： 照井祐介（国際医療大）

植村武史（城西大）

田島彩沙（慈恵医大）

リピート関連非 AUG 翻訳に対するポリアミンの作用

小黒 明広¹、植村 武史²、河合 剛太³

¹東京慈恵会医科大学 分子生理学講座 体力医学研究室 (aoguro@jikei.ac.jp)、

²城西大学 薬学部、³千葉工業大学 先端工学部

リピート病は、遺伝子の 3~12 塩基単位の繰り返し配列 (リピート配列) の異常伸長を特徴とする難治性の疾患群で、その多くが神経・筋疾患に分類される¹⁾。特定のリピート配列においては、異常伸長に伴って、開始コドン AUG を必要としない非標準翻訳であるリピート関連非 AUG 翻訳 (repeat-associated non-AUG translation; RAN 翻訳) が誘導されることが報告されている²⁾。現在までに、RAN 翻訳は 7 種類のリピート配列で報告されており、この翻訳産物がリピート病発症に関与することも示されている²⁻⁵⁾。RAN 翻訳誘導ではリピート配列の伸長数が重要であり、リピート数が増加するほど RAN 翻訳は亢進する²⁾。一方、リピート病患者における発症時のリピート数には大きな個人差が存在し、さらに RAN 翻訳の発現量には組織間での差異も認められている⁶⁾。これらの知見は、RAN 翻訳の誘導にはリピート数以外の因子が関与している可能性を示唆しており、その分子機構の解明が求められている。

ポリアミンは、多様な生理作用を有する低分子生理活性因子である。その機能のひとつとして、非標準型翻訳反応の促進作用が知られており、これまでに非 AUG 翻訳、翻訳フレームシフト、コドンの読み飛ばしなど、さまざまな非標準型翻訳に対する関与が報告されている⁷⁾。さらに、ポリアミンは細胞内において主に RNA と結合した状態で存在し、RNA の高次構造の安定化に寄与することも明らかにされている^{8,9)}。筆者らはこれまでに、ポリアミンが RNA の

高次構造を変化させ、非標準翻訳を誘導することを明らかにしてきた^{10,11)}。一方、RAN 翻訳の誘導には、リピート RNA が形成する高次構造が重要な役割を担うことが示唆されている⁵⁾。

筋強直性ジストロフィー 2 型は代表的なリピート病のひとつであり、原因遺伝子のイントロンに存在する CCUG リピートで RAN 翻訳が生じることが報告されている²⁾。我々は、この CCUG リピートを用いた RAN 翻訳の解析を通じて、ポリアミンが RAN 翻訳を強力に促進することを見出した¹²⁾。以下に、その解析結果について概説する。

1. ヒト無細胞タンパク質合成系での RAN 翻訳解析

最初に、*in vitro* 転写により合成・精製した CCUG リピートを含む RNA を用い、HeLa 細胞抽出液由来のヒト無細胞タンパ

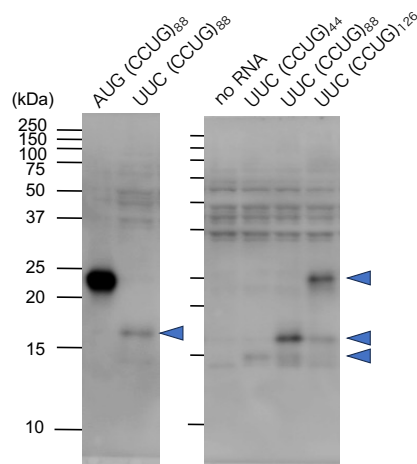


図 1. ヒト無細胞タンパク質合成系での RAN 翻訳の再現。矢頭が RAN 翻訳産物を示す。(文献 12 より引用)

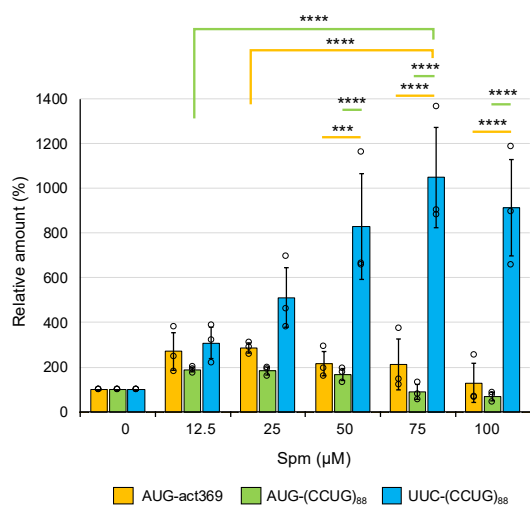


図2. ヒト無細胞タンパク質合成系のRAN翻訳に対するSpmの影響。抗HA抗体を用いたウエスタンブロット法でRAN翻訳産物[UUC-(CCUG)₈₈ (青)]を検出し、定量した。平均値±標準偏差 (n=3), *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$ (文献12より引用)

ク質合成系¹³⁾によりRAN翻訳を再構成する解析系を確立した。なお、本研究で使用したHeLa細胞抽出液には、プトレッシン(Put)が $12.4 \pm 4.0 \mu\text{M}$ 、スペルミジン(Spd)が $24.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$ 、スペルミン(Spm)が $39.1 \pm 1.9 \mu\text{M}$ が含まれていることを確認した。開始コドンAUGの下流に88回のCCUGリピートをもつRNA[AUG-(CCUG)₈₈]をHeLa細胞由来の無細胞タンパク質合成系に加えると、AUGから翻訳された約23 kDaの産物が検出された。一方、開始コドンAUGをUUCに置換したUUC-(CCUG)₈₈では、このバンドは消失し、代わりに約16 kDaのRAN翻訳産物が微量に検出された(図1)。このRAN翻訳産物はCCUGリピート数の減少により低分子側へ、増加により高分子側へとシフトすることが確認された(図1)。この系にSpmを加え、RAN翻訳への影響を検討した(図2)。Spmは開始コドンAUGからの通常の翻訳[AUG-act369とAUG-(CCUG)₈₈]も促進するが、RAN翻訳[UUC-(CCUG)₈₈]に対しては至適濃度が異なるうえ、より強い促

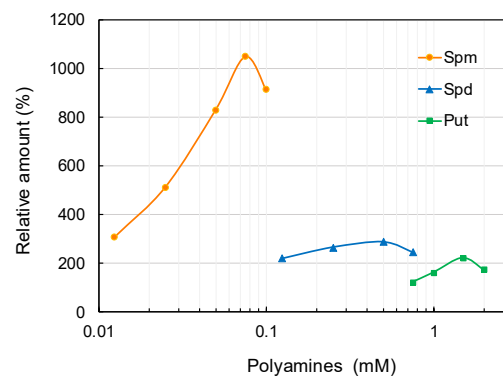


図3. ヒト無細胞タンパク質合成系のRAN翻訳に対するPut (緑)、Spd (青)、Spm (橙)の影響の比較。(文献12より引用)

進効果が認められた。この結果より、SpmはRAN翻訳に対して特異的な促進効果を有することが示唆された。さらに、SpdおよびPutについても同様の促進効果が確認できたが、促進効果の程度は $\text{Spm} > \text{Spd} > \text{Put}$ の順であった(図3)。

2. 培養細胞でのRAN翻訳解析

培養細胞(HEK293)にTTC-(CCUG)₈₈遺伝子を導入したところ、無細胞タンパク質合成系と同様の分子量を有するRAN翻訳産物の合成が確認された。さらに、培養液にPutおよびSpmを添加すると、RAN翻訳産物の量が増加し(図4、#2)、このとき細胞内のポリアミン量も上昇していた

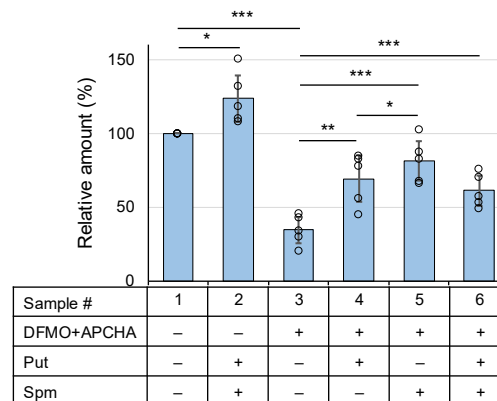


図4. 培養細胞でのRAN翻訳に対するポリアミンの影響。平均値±標準偏差 (n=5), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ (文献12より引用)

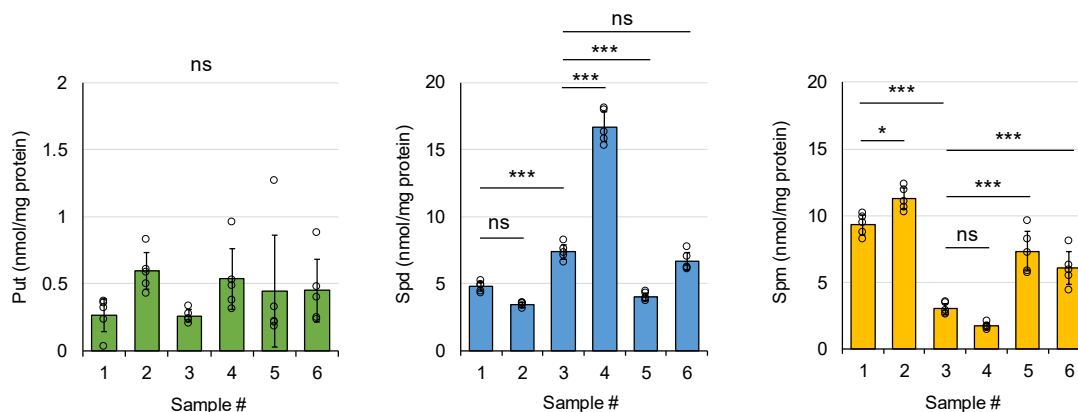


図5. 図4の条件での細胞内のPut、Spd、Spm濃度。イオン対逆相HPLCでの測定¹⁴⁾。平均値±標準偏差 (n=5), * $p<0.05$, *** $p<0.005$, ns: not significant (文献12より引用)

(図5、#2)。一方、培養液にPut合成酵素であるオルニチン脱炭酸酵素の阻害剤の α -difluoromethylornithine (DFMO) と、Spm合成酵素の阻害剤の N -(3-aminopropyl) cyclohexylamine (APCHA) を同時に添加すると、細胞内ポリアミン量が減少し(図5、#3)、それに伴ってRAN翻訳産物も減少した(図4、#3)。この状態にさらにPutとSpmを添加すると、細胞内ポリアミン量は回復し(図5、#4~6)、これに伴いRAN翻訳も回復した(図4、#4~6)。特にSpmのみを添加した条件(図4、#5)では、回復が最も顕著であり、このときの細胞内Spm量の回復量が最も大きかった(図5、#5)。この回復効果は、Spd量が大きく上昇していた条件(図5、#4)よりも高く、SpmがRAN翻訳に対してより強い促進効果をもつことを示す。これは、無細胞タンパク質合成系においてSpmの効果が高かった結果と一致する。なお、ポリアミンが培養細胞でのAUG-act369の発現には影響しないこと、また、細胞破碎液から抽出したRNAを用いたRT-qPCRの結果から、ポリアミンがCCUGリピートRNAの転写には影響を与えていないことを確認した。これらの結果より、培養細胞においてもSpm依存的にRAN翻訳が誘導されることが示された。

4. ポリアミンのリピートRNA立体構造への効果

ポリアミンによるRAN翻訳誘導機構を解明するため、リピートRNAの立体構造とRAN翻訳の関連性を検討した。mRNAを95℃で加熱後、氷上で急冷することで立体構造を変性させ、この状態のRNAをヒト無細胞タンパク質合成系に供した。その結果、開始コドンAUGを有するAUG-act369とAUG-(CCUG)₈₈の翻訳産物量に変化はなかったが、UUC-(CCUG)₈₈のRAN翻訳産物量は約50%に低下した。この結果より、RAN翻訳にはリピートRNAの立体構造が重要であることが分かった。次に、ポリアミンがリピートRNAの立体構造に与える影響を評価するため、SpdおよびSpm存在下でのCCUGリピート(44回)RNAの熱融解温度(T_m 値)を算出した。

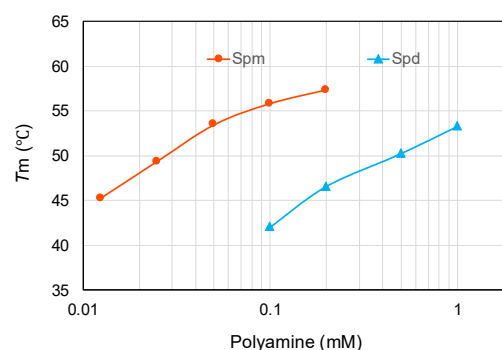


図6. T_m 値に対するSpd(青)とSpm(赤)の影響の比較。(文献12より引用)

その結果、Spm や Spm の濃度に依存して T_m 値の上昇がみられ (図 6)、ポリアミンが CCUG リピート RNA の立体構造を安定化していることが示された。さらに、Spm と比べて Spm の方がより高いリピート RNA の安定化効率を示した (図 6)。これらの結果から、Spm によるリピート RNA の高い安定化効率が、RAN 翻訳の効率的な誘導につながっていると考えられた。

5. CCUG リピート RAN 翻訳の開始点

ヒト無細胞タンパク質合成系で用いた UUC-(CCUG)₈₈ は、CCUG リピートの上流に 53 ヌクレオチドのスペーサー配列を含んでおり、この領域から RAN 翻訳が開始されている可能性が考えられた。そこで、スペーサー配列のうち 14 番目から 53 番目までの塩基配列を欠失させたレポーター RNA を作製し、ヒト無細胞タンパク質合成系で翻訳させたところ、RAN 翻訳産物の合成が確認された。さらに、残りの 13 ヌクレオチドの配列を別の配列と置換しても RAN 翻訳は行われた。これらの結果から、RAN 翻訳は CCUG リピート配列の上流配列からではなく、リピート配列内から開始され

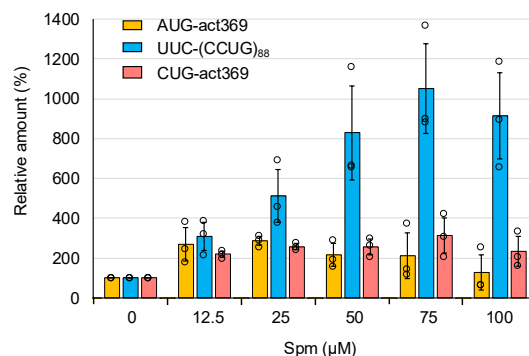


図 7. CUG からの翻訳開始 [CUG-act369 (朱)] に対する Spm の影響。平均値±標準偏差 (n=3)。AUG-act369 (橙) と UUC-(CCUG)₈₈ (青) のデータは図 2 と同一。(文献 12 より引用)

ることが示唆された。次に、CCUG リピートに含まれるコドン (CCU、CUG、UGC、GCC) のいずれが翻訳開始に関与しているかを検討するために、無細胞タンパク質合成系において各コドンからの翻訳開始効率を評価した。その結果、CUG のみが AUG と比較して約 18% の効率で翻訳開始を誘導した。CUG は、細胞内で AUG の代替開始コドンとして機能する^{15,16}。ポリアミンが CUG からの翻訳開始を促進するかを無細胞タンパク質合成系で解析したところ、AUG からの翻訳開始と比べて、顕著な促進効果

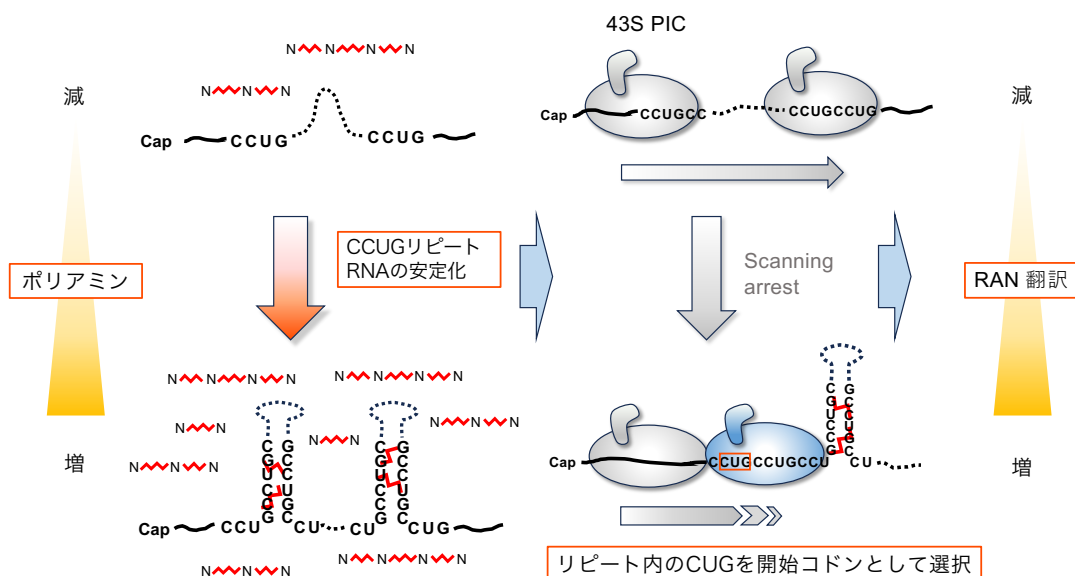


図 8. 本研究結果より導かれるポリアミンによる RAN 翻訳促進の分子メカニズム。(文献 12 より引用、改変)

は確認できなかった(図7)。このことから、ポリアミンによる RAN 翻訳の誘導には、CUG コドンからの翻訳開始の促進とは関連しないことが示された。

6. ポリアミンによる RAN 翻訳誘導の分子モデル

以上の結果から、ポリアミンによる RAN 翻訳の誘導モデルが提唱される(図8)。ポリアミンはリピート RNA に結合し、その立体構造を安定化させることで、開始コドンをスキッピングしている 43S 開始前複合体 (pre-initiation complex, PIC) の停滞を引き起こす。停滞した 43S PIC は、CCUG リピート配列内に存在する CUG を AUG の代わりに開始コドンとして利用し、翻訳が開始されると考えられる。

本研究の成果は、細胞内ポリアミン量の変化がリピート病の発症に関与する可能性を示すものであり、ポリアミン作用の抑制やリピート RNA 構造の安定性の緩和が病態抑制に寄与することを示唆する。これらの知見は、難治性のリピート病に対する新たな治療戦略を提示するものである。

<謝辞>

本研究で用いたヒト無細胞タンパク質合成系は兵庫県立大学 今高 寛晃 教授より、APCHA は城西大学 高尾 浩一 教授よりご供与いただいた。本研究は JSPS 科研費 JP22K07357 および東京慈恵会医科大学 研究奨励費の助成を受けて実施した。

<参考文献>

- Depienne, C., Mandel, J.L. (2021) 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? *Am J Hum Genet.* **108**, 764–785
- Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M.D., et al. (2011) Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci USA.* **108**, 260–265
- Zu, T., Pattamatta, A., Ranum, L.P.W. (2018) Repeat-associated non-ATG translation in neurological diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **10**(12):a033019
- Rodriguez, C.M., Todd, P.K. (2019) New pathologic mechanisms in nucleotide repeat expansion disorders. *Neurobiol Dis.* **130**:104515
- Fujino, Y., Mori, K., Nagai, Y. (2023) Repeat-associated non-AUG translation in neuromuscular diseases: mechanisms and therapeutic insights. *J Biochem.* **173**, 273–281
- Guo, S., Nguyen, L., Ranum, L.P.W. (2022) RAN proteins in neurodegenerative disease: Repeating themes and unifying therapeutic strategies. *Curr Opin Neurobiol.* **72**, 160–170
- Igarashi, K., Kashiwagi, K. (2010) Modulation of cellular function by polyamines. *International J Biochem Cell Biol.* **42**, 39–51
- Watanabe, S.-I., Kusama-Eguchi, K., Kobayashi, H., Igarashi, K. (1991) Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem.* **266**, 20–23
- Heerschap, A., Walters, J.A.L.I., Hilbers, C.W. (1986) Influence of the polyamines spermine and spermidine on yeast tRNA^{Phe} as revealed from its imino proton NMR spectrum. *Nucleic Acids Res.* **14**, 983–998
- Oguro, A., Yanagida, A., Fujieda, Y., Amano, R., Otsu, M., Sakamoto, T., Kawai, G., Matsufuji, S. (2017) Two stems with different characteristics and an internal loop in an RNA aptamer contribute to spermine-binding. *J Biochem.* **161**, 197–206
- Oguro, A., Shigeta, T., Machida, K., Suzuki, T., Iwamoto, T., Matsufuji, S., Imataka, H. (2021) Translation efficiency affects the sequence-independent +1 ribosomal frameshifting by polyamines. *J Biochem.* **168**, 139–149
- Oguro, A., Uemura, T., Machida, K., Kitajiri, K., Tajima, A., Furuchi, T., Kawai, G., Imataka, H. (2025) Polyamines enhance repeat-associated non-AUG translation from CCUG repeats by stabilizing the tertiary structure of RNA. *J Biol Chem.* **301**(3):108251.
- Mikami, S., Kobayashi, T., Masutani, M., Yokoyama, S., Imataka, H. (2008) A human cell-derived in vitro coupled transcription/translation system optimized for production of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* **62**, 190–198
- Uemura, T., Matsunaga, M., Yokota, Y., Takao, K., Furuchi, T. (2023) Inhibition of Polyamine Catabolism Reduces Cellular Senescence. *Int J Mol Sci.* 10.3390/ijms241713397
- Ingolia, N.T., Lareau, L.F., Weissman, J.S. (2011) Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell.* **147**, 789–802
- Kearse, M.G., Wilusz, J.E. (2017) Non-AUG translation: a new start for protein synthesis in eukaryotes. *Gene Dev.* **31**, 1717–1731

2025 年ポリアミンに関するゴードン会議に参加して

藤田 剛士

近畿大学大学院 生物理工学研究科 博士前期課程 2 年

この度は、2025 年ゴードン研究会議への参加にあたり、若手補助にご採択いただき、誠にありがとうございました。ご支援を賜りました日本ポリアミン学会評議員会の先生方に、心より感謝申し上げます。

私は、アメリカ・ニューハンプシャー州のウォータービルバレーで 2025 年 7 月 12 日から 13 日に開催された Gordon Research Seminar (GRS) と 7 月 13 日から 18 日に開催された Gordon Research Conference (GRC) に参加し、それぞれ「Effects of orally ingested polyamines on the physical activity of *Drosophila melanogaster*」というテーマでポスター発表を行いました。

私にとって英語での発表は、昨年度に参加した国際ポリアミン学会以来であり、国際学会への参加は 2 回目ですが、英語での発表には依然として大きな緊張を伴いました。私は、ゴードン研究会議の 1 か月前からポスターと原稿を作成し、発音だけでなくイントネーションや抑揚にも気を配り、繰り返し練習しました。

GRS では、世界各国の若手研究者による最新の研究発表を間近で聞くことができ、非常に刺激的でした。特に、同世代の学生や研究者と昼食時の席で一緒に食事をしながらお互いの研究について、英語で話し合ったことは、今後の研究に対するモチベーションを高める貴重な機会となりました。参加者の中では、私が唯一の修士課程の学生であり、この恵まれた環境にいることを強く実感しました。

GRC では、世界中のポリアミン研究の第一人者の先生方のお話を直接聞くことができ、大変勉強になりました。今回のゴードン会議では、「ポリアミンとがん」に関する演題と「ポリアミンと健康」に関する演題が、それぞれ全体の約 3 分の 1 を占めていました。「ポリアミンとがん」に関する演題では、ポリアミンが抗腫瘍免疫を増強し、がんを抑制するという発表があり、ポリアミンががんの分野でも重要な役割を果たしていることが分かりました。Keith 先生が「消化管炎症とがんにおけるポリアミンの二面的役割：有益な側面と有害な側面」という演題で講演され、ポリアミンががんを悪化させる側面についても理解を深めることができました。私もポリアミンの摂取と宿主の活動量の向上について、研究をしている身として、「ポリアミンと健康」は世界的にも注目されている研究内容だと知り、これからの研究に対する熱が入りました。質疑応答の時間では、日本の学会では学生が積極的に質問する場面が少ないと感じていましたが、GRC では学生や若手研究者も臆することなく次々と質問し、議論に参加する姿勢がとても印象的でした。私はこの経験から、今後の学会では積極的に質問したいと強く感じました。

私はGRSとGRCの1日目と2日目にポスター発表を行いました(図1)。日本語での発表とは異なり、英語で相手に伝わっているかを確認しながら説明する必要があり、特に質疑応答では、なれない英語を駆使しながら対応する難しさを痛感しました。それでも、相手の表情やリアクションを見ながら懸命に伝えようと努力することで、何とか意思疎通を図ることができました。

今回の国際学会への参加を通じて、英語でのコミュニケーション能力をさらに向上させる必要性を強く感じると同時に、研究者同士の活発な交流がいかに重要かを再認識しました。この貴重な経験を今後の研究活動に活かし、ポリアミン研究に一層貢献できるよう精進してまいります。改めて、ゴードン研究会議への参加を支援してくださった関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

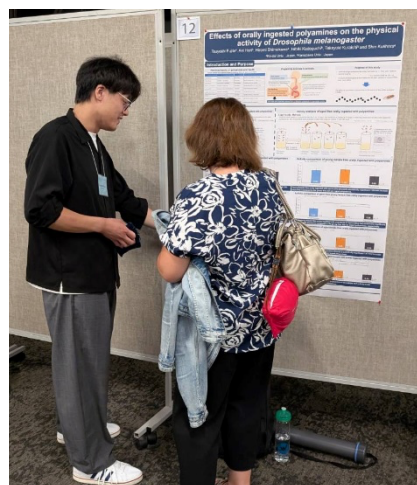


図1 ポスター発表でのディスカッションの様子