

- 8) 上田 和, 山田恭輔, 浦島充佳, 青木勝彦, 鷹橋浩幸, 岡本愛光, 安田 允, 大川 清, 田中忠雄. 子宮体癌における CD147 の発現と臨床病理学的検討. 第 65 回日本癌学会総会, 横浜, 9 月. [日本癌学会 65 回総会記事 2006: 356]
- 9) 青木勝彦, 上田 和, 間森 聡, 丸島秀樹, 山田恭輔, 朝倉 正, 大川 清. 癌浸潤マーカータンパク質 CD147 を標的とするモノクローナル抗体 MAb12C3 の機能解析. 日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」. 名古屋, 12 月. [Abstracts of Late Submission 2006: 31]
- 10) 江田 誉, 青木勝彦, 高田耕司, 丸毛啓史, 大川 清, 藤井克之. FGF2 は骨芽細胞様細胞内の TAZ タンパク質量を減少させる. 日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」. 名古屋, 12 月. [Abstracts of Late Submission 2006: 456]
- 11) 松浦知和, 大川 清. ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発. 平成 17 年度厚生労働省科学研究費研究成果等普及啓発事業萌芽の先端医療技術推進研. ナノメディシン研究成果発表会, 東京, 2 月.
- 12) 高田耕司. カドミウム曝露に伴い蓄積するユビキチン化タンパク質の性状解析. 北陸大学学術フロンティア・サテライトミーティング—食品汚染金属の毒性とその防御の分子メカニズム. 仙台, 2 月. [講演要旨集 2007: 23-4]

V. その他

- 1) 大川 清. ストレス誘導性アポトーシスとグルタチオン S-トランスフェラーゼの役割 (II). 平成 17 年度ビタミン B 研究委員会報告書 2006: 25.
- 2) 大川 清. ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発: 平成 17 年度総括研究報告書 厚生労働科学研究費補助金萌芽の先端医療技術推進研究事業, 2006.
- 3) 高田耕司. カドミウムによる細胞障害の分子機構: ユビキチン修飾を指標としたタンパク質異常化の解明. 中間評価のための資料集 2006: 477-86

生化学講座第 2

教授: 大川 清 癌の生化学, 病態生化学
教授: 松藤 千弥 生化学, 分子生物学

研究概要

I. 翻訳フレームシフトの分子機構

当講座では, 酵母から哺乳動物にいたる真核細胞に広く保存されているポリアミン調節タンパク質, アンチザイム (AZ) の発現調節と生理的役割に焦点を当てて研究を行っている。哺乳動物の AZ は AZ1, AZ2, AZ3 からなるファミリーを形成し, いずれもポリアミンで促進される +1 翻訳フレームシフトがその発現に必要な。

1. AZ シュードノット RNA 結合タンパク質の探索

AZ1 と AZ2 の mRNA には翻訳フレームシフトの促進配列としてはたらくシュードノット構造が存在する。ここに特異的に結合し, フレームシフト促進機構に関与する RNA 結合タンパク質を, UV クロソリング法で探索した。昨年度候補にあがった複数のタンパク質は, 変異体を用いた検討において十分な特異性が証明されず, 目的とするタンパク質ではないと結論した。一方, 変異体解析において, シュードノットの 5' 側ステムの下半分を形成しない変異体に特異的に結合する 34 kDa のタンパク質をヒト由来 293F 細胞の抽出液中に検出した。シフト部位に到達したリボソームにより 5' 側ステムの下半分が融解した構造に本タンパク質が結合し, フレームシフトを制御するという仮説を立て, フレームシフトに対する効果を検討している。また, 担体に固定した変異体シュードノット RNA を用いて, 細胞抽出液の 34 kDa のタンパク質をアフィニティー精製することに成功し, 質量分析装置を用いたペプチド・マス・フィンガープリント法による同定を試みている。

2. 大腸菌における哺乳動物アンチザイムフレームシフト信号の解析

AZ1 のフレームシフト信号配列は, 大腸菌内で, シフト部位周辺の塩基配列に依存して 3' 側へのリボソームホッピングによる -8 や -5 翻訳フレームシフトを引き起こすことを報告した。この現象の分子機構を MALDI-TOF 質量分析を用いて解析するため, グルタチオン S-トランスフェラーゼ遺伝子と C 末端に His タグを付けたプロテイン A 遺伝子の間

にフレームシフト信号配列を挿入したベクターを構築した。複数のタグを用いてフレームシフト産物をアフィニティー精製した後、フレームシフト部位上流のプロテアーゼ認識配列により産物を質量分析に適するサイズに切断することができる。このシステムを用いて、AZ1 フレームシフト信号配列より -8、-5 および -2 翻訳フレームシフト産物が生成されることを確認した。また、-8 翻訳フレームシフトの際の tRNA 再対合コドンを変異させると対応する産物が消失し、再対合部位の配列が本現象の信号のひとつであることが示唆された。

3. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) を指標とした新規リコーディング遺伝子の探索

分裂酵母において NMD を指標として、リコーディング(プログラムされた非標準遺伝子暗号解読)をうける新規遺伝子の探索を継続した。DNA マイクロアレイにより *upf3* 欠損による NMD 破壊株と野生株の遺伝子発現プロファイルを比較して得られた 98 遺伝子について、リコーディングを受ける可能性をコンピューター上で検討し、33 の候補遺伝子を見いだした。さらにリコーディング候補予測の精度を向上させるため、別の NMD 因子 *upf2* についても破壊株を作製し、現在 DNA マイクロアレイ解析を行なっている。また、この探索の過程で、選択スプライシングを受ける mRNA の中に *upf3* 欠損株で著しくスプライシングが促進されるものを認めた。スプライシング制御という UPF3 の新機能の可能性を示す現象として興味深い。

II. AZ1 ノックアウトマウスの解析

C57BL の遺伝背景を持つ AZ1 ノックアウトマウスは、胎仔期の造血分化障害をきたして致死となる。ポリアミン合成阻害剤、ジフルオロメチルオルニチン (DFMO) を用いた昨年度の実験結果より、肝臓に移行する前の aorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域の造血細胞も障害を受けていることが示唆された。本年度は DFMO の投与量を再検討し、飲水に 2% DFMO を加えて妊娠マウスに投与した。肝造血開始前の胎生 9.5~11.5 日 (E9.5~11.5) の時期に投与すると E15.5 での胎仔肝における造血障害は回避され、末梢血では成熟赤血球の割合が回復した。しかし肝造血期である E11.5~13.5 の DFMO 投与では、造血障害の回復は見られなかった。また、AGM および骨髄由来の造血細胞を用いてコロニーアッセイを行った結果、AZ1 欠損マウスにおいて BFU-e (burst forming unit of erythroid), および

それ以前の造血細胞の減少を認め、肝臓に移行する前の分化段階の造血細胞が、AZ1 欠損による高濃度のプロレッシンに特に高感受性を示すことが明らかとなった。

III. アンチザイム 2 の相互作用分子

1. AZ2 と傍腫瘍性小脳変性疾患関連タンパク質 cerebellar degeneration related protein 2 (CDR2) の相互作用の解析

昨年度までに AZ2 が CDR2 に特異的に結合することを見だし、CDR2 分子上では N 末端側のロイシンジッパーを含む領域が結合部位であることを示した。今年度は AZ2 側の CDR2 結合領域を AZ1 と AZ2 のキメラタンパク質を用いて解析した結果、AZ2 のアミノ酸残基 135~181 の領域が結合に必要であることが判明した。さらに、この領域内において種間保存性の高い 7 残基を各々アラニンに置換した場合、R140 と V174 の 2 つの置換体が結合活性を失った。逆に AZ1 分子のこれら 2 つのアミノ酸残基を AZ2 型に置換すると CDR2 に対する結合活性を獲得した。これら 2 残基は、立体構造上近接する位置にあることがわかっており、CDR2 との結合の特異性を担う残基であることが示唆された。

2. 腎臓における AZ2 相互作用分子の探索

腎臓における AZ2 特異的機能を探索する目的で、酵母ツーハイブリッドシステムを用い、AZ2 との相互作用分子をスクリーニングした。マウス腎 cDNA ライブラリー 1.35×10^5 クローンをスクリーニングし、約 300 個の陽性クローンを得た。そのうち信号強度が大きい 75 クローン of 塩基配列を決定したところ、既知の AZ2 結合タンパク質であるオルニチン脱炭酸酵素、アンチザイムインヒビター、CDR2 が含まれていた。一方、AZ2 によって調節されることが知られているポリアミン輸送タンパク質候補は見つからなかった。複数の陽性クローンが得られた遺伝子から優先的に、結合の特異性確認を行っている。

「点検・評価」

1. 教育

主として 2 年生前期の基礎医科学 I の分子から生命へ (講義, 演習, 実習) を生化学講座第 1 と共に担当した。小グループ学習の分子から生命へ演習, 問題解決型の分子から生命へ実習には教員全員で取り組み、それに見合う効果をあげたと考えている。その他、所属教員は医学総論 I 演習, 臨床基礎医学 I (栄養科学, 行動科学, 症候学演習), 医学英語専門文献抄読, 研究室配属, および選択実習の各カリキュラ

ムを担当した。

2. 研究

依然としてタイムリーな論文発表ができていないことが課題となっている。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Kosuge M, Takizawa H, Maehashi H, Matsuura T, Matsufuji S. A comprehensive gene expression analysis of human hepatocellular carcinoma cell lines as components of a bioartificial liver using a radial flow bioreactor. *Liver Int* 2007; 27(1): 101-8.

III. 学会発表

- 1) 堀谷学, 松藤千弥, 原田和雄(学芸大). GNRA型テトラループ含有RNAへアピンに結合する新規アルギニン・リッチ・ペプチド. 日本ケミカルバイオロジー研究会第1回年会. 東京, 5月.
- 2) Murai N, Matsufuji S. Discovery of novel antizyme 2-specific interacting proteins. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress(兼第79回日本生化学会大会, 第29回日本分子生物学会年会). Kyoto, June.
- 3) Ohkido M, Sugitani Y¹⁾, Yamanaka H¹⁾(¹Riken), Noda T^{2,3,4)}(²Cancer Inst, ³Mouse Genome GSC Riken, ⁴Tohoku Univ Sch of Med), Matsufuji S. Disturbance of the embryonic hematopoiesis in antizyme 1 knockout mice is caused by high level of polyamines. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress(兼第79回日本生化学会大会, 第29回日本分子生物学会年会). Kyoto, June.
- 4) 渡邊ユキノ, 松藤千弥. アンチザイム mRNA 上に存在するシュードノット構造を置換したヘテロデュープレックスによるフレームシフト促進効果の検討. 第8回日本RNA学会年会. 淡路, 7月.
- 5) 堀谷学, Howard MT¹⁾, Atkins JF¹⁾(¹ユタ大), 村井法之, 松藤千弥. 細胞内在性RNAアプタマーの標的分子としてのアンチザイム・シュードノットRNA結合タンパク質の探索. 第8回日本RNA学会年会. 淡路, 7月.
- 6) Murai N, Matsufuji S. Interaction of a neurospecific protein, cerebellar degeneration related protein 2 (CDR2), with antizyme 2. International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases. Rome, Sept. [Abstract 2006; 45-6]

- 7) Ohkido M, Matsufuji S. Suppressive effects of polyamines on differentiation of hematopoietic cells. International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases. Rome, Sept. [Abstract 2006; 175-6]
- 8) Murakami Y, Suzuki J¹⁾, Ohtani M¹⁾, Ohkido M, Matsufuji S, Oka T¹⁾(¹Musashino Univ). Analysis of polyamine regulatory components during the development of mammary gland. International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases. Rome, Sept. [Abstract 2006; 173-4]
- 9) 渡邊ユキノ, 松藤千弥. アンチザイム mRNA 上に存在するシュードノット構造を置換したヘテロデュープレックスによるフレームシフト促進効果の検討. 第123回成医会総会. 東京, 10月.
- 10) 松藤千弥. Biological aspects of frameshift protein, antizyme. 第11回慶應医学賞受賞記念シンポジウム「RNAバイオロジーと分子標的創薬研究の新展開(New Frontiers of RNA Biology and Molecule-Targeted Drug Development)」。東京, 11月.
- 11) Yoshimura K, Matsufuji S. Analyses of recoding in NMD deficient mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. 特定領域研究「RNA情報発現系の時空間ネットワーク」公開国際シンポジウム RNA 2006 Izu “Functional RNAs and Regulatory Machinery”. 伊豆の国, 12月.
- 12) Watanabe Y, Matsufuji S. Stimulatory effect of pseudoknot-mimicing RNA oligonucleotides on antizyme frameshifting. 特定領域研究「RNA情報発現系の時空間ネットワーク」公開国際シンポジウム RNA 2006 Izu “Functional RNAs and Regulatory Machinery”. 伊豆の国, 12月.
- 13) Takahashi Y, Wills NM¹⁾, Gesteland RF¹⁾, Atkins JF¹⁾(¹University of Utah), Murai N, Matsufuji S. Unusual codon-anticodon pairing at the landing site of backward hopping in *E. coli* directed by mammalian antizyme frameshift signal. 特定領域研究「RNA情報発現系の時空間ネットワーク」公開国際シンポジウム RNA 2006 Izu “Functional RNAs and Regulatory Machinery”. 伊豆の国, 12月.
- 14) Horiya S, Howard MT¹⁾, Atkins JF¹⁾(¹University of Utah), Murai N, Matsufuji S. Possible conformational change of the pseudoknot during antizyme frameshifting as detected by a pseudoknot RNA-binding protein. 特定領域研究「RNA情報発現系の時空間ネットワーク」公開国際シンポジウム RNA 2006 Izu “Functional RNAs and Regulatory

Machinery”. 伊豆の国, 12月.

- 15) 大城戸真喜子, 松藤千弥. アンチザイム1ノックアウトマウスにおける高濃度ポリアミンによる造血障害. 日本ポリアミン研究会第21回研究発表会. 西東京, 1月. [講演要旨集 2007; 27]
- 16) 村井法之, 松藤千弥. 傍腫瘍性小脳変性疾患関連タンパク質 CDR2 と AZ2 の相互作用の解析. 日本ポリアミン研究会第21回研究発表会. 西東京, 1月. [講演要旨集 2007; 29]

薬理学講座第1

教授: 川村 将弘 内分泌薬理学
 教授: 堀 誠治 感染化学療法学, 神経薬理学
 講師: 中道 昇 内分泌薬理学, 臨床薬理学
 講師: 大野 裕治 内分泌薬理学
 (DNA 研究所)

研究概要

I. ウシ副腎皮質細胞における ACTH 受容体と ATP 受容体との相互作用に関する研究

細胞外の ATP および UTP は, 細胞膜に局在する P2 受容体に作用し, 種々細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。P2 受容体は, イオンチャネル内臓型の P2X と G タンパク共役型の P2Y に大別される。P2Y は少なくとも 7 つのサブタイプを持っている。我々はウシ副腎皮質束状層細胞 (bovine adrenocortical fasciculate cell: BAFC) において, 糖質コルチコイド産生を促進する, Gq と共役した P2Y2 の存在を認めたので, その糖質コルチコイド産生機構における生理的役割について検討を行っている。そして, ATP が副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の糖質コルチコイド産生および cAMP 産生促進作用を増強することを見出した。ATP は P2Y2 以外に cAMP 産生を促進する Gs と共役した未知の P2Y 受容体とも結合し cAMP 産生を促進するので, Gq と共役している P2Y2 のみと結合する UTP の ACTH による cAMP 産生に対する影響を検討したところ, UTP もまた ATP と同様に増強的に作用した。P2Y2 は Gq を介して IP3 産生を刺激し, 細胞内小胞体の Ca^{2+} の枯渇を引き起こし, その結果細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進する。したがって, UTP の ACTH 誘発 cAMP 産生増強作用の一つとしては, 細胞内への Ca^{2+} 流入の増加が考えられるが, 細胞外に比較的低濃度の Ca^{2+} の存在があれば, 十分な増強効果がみられるので, この仮説は可能性が少ない。一方, 近年, Gq の $\beta\gamma$ サブユニットのアデニル酸シクラーゼ活性調節への関与が報告され始めている。したがって, P2Y2 に共役した Gq から遊離した $\beta\gamma$ サブユニットが移動し Gs と相互作用を起こしている可能性がある。 $\beta\gamma$ サブユニットの移動にはアクチン細胞骨格の関与が考えられるので, アクチン細胞骨格の正常構造を乱すサイトカラシン D 等の, この UTP の増強作用への影響を検討したところ, これらの薬物は何ら影響を与えなかつ

た。すなわち、細胞骨格は関与していないことが示された。この結果から、 $\beta\gamma$ サブユニットの関与が否定されるわけではなく、今後抗体直接このサブユニットを阻害する方法等を用いて検討する必要がある。

II. 細胞内 Ca^{2+} 動態に関する研究

Ca^{2+} が種々の細胞・臓器における機能調節に重要な細胞内情報伝達物質として作用していることは良く知られている。我々は、数種の細胞および臓器における、 Ca^{2+} 動態に関与する因子およびその生理的意義について、主として蛍光性 Ca^{2+} 指示薬を細胞内に導入し、カルシウムイメージング装置を用いて研究を行っている。

1. BAFC における容量依存性 Ca^{2+} 流入 (store-operated calcium entry: SOCE) 機構に関する研究

細胞内への Ca^{2+} 流入機構の一つに、小胞体内の Ca^{2+} が枯渇することにより活性化される SOCE がある。我々は、BAFC には ATP および UTP により活性化される SOCE が存在し、それが糖質コルチコイド産生と連関していることを報告した。SOCE 機構の詳細は未だ明らかではないが、SOCE チャネルの候補として、幾つかの細胞種において transient receptor potential protein (TRP) が報告されている。そして、BAFC には TRP のサブタイプの内、TRPC が存在することが報告されているので、BAFC における SOCE への TRP の関与の有無について検討を行い、少なくとも BAFC において TRPC は SOCE チャネルではないことを明らかにした。

2. 3T3-L1 前駆脂肪細胞 (3T3-L1) における SOCE に関する研究

3T3-L1 は脂肪細胞への分化の機序の研究に良く用いられている。3T3-L1 の脂肪細胞への分化に影響を与える因子の一つに Ca^{2+} がある。 Ca^{2+} は分化開始初期には抑制的に、分化の後期には促進的に作用するといわれている。我々はこの細胞株における Ca^{2+} 動態を検討することは、脂肪細胞への分化機構を解明する上で重要であると考え研究を行っている。その結果、未分化 3T3-L1 には $\text{PGF}2\alpha$ により惹起される SOCE が存在することが判明したが、SOCE 機構については不明であった。そこで、アクチン細胞骨格の正常構造を乱す、サイトカラシン D 等の影響を検討したところ何ら影響を与えなかった。昨年度 BAFC においては、これらの薬物が SOCE を抑制することを報告したが、未分化 3T3

-L1 においては、BAFC とは異なった機序により SOCE が活性化することが示された。

3. イヌ正常遠位尿細管細胞 (MDCK 細胞) における細胞内 Ca^{2+} 動態に関する研究

腎尿細管上皮細胞では Ca^{2+} は管腔側から基底膜側へ輸送されると共に、細胞内情報伝達物質として重要な役割を果たしている。したがって、膵臓の発症機序等の解明には本細胞における細胞内 Ca^{2+} 動態について検討することは重要であるが、知見は少ない。そこで、モデル細胞として MDCK 細胞を用いて細胞内 Ca^{2+} 動態を観察したところ、細胞外 Ca^{2+} の有無にかかわらず自発的カルシウムオシレーションがみられた。このオシレーションは IP3/リアノジン受容体を介する小胞体からの Ca^{2+} の放出機構が関与していることを明らかにした。また、プロベネシドによりこの自発的カルシウムオシレーションが抑制されることを見出し、その機序の検討を行っている。

4. 細胞外 ATP による海馬アストロサイトのカルシウムオシレーション調節機構の解析

中枢神経系の非興奮性細胞であるグリア細胞のアストロサイトが、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を伝播していくカルシウムウェーブを引き起こすことは良く知られている。しかしながら、その生理的役割については未解明である。そこで、我々はラット海馬スライス培養標本を用いてカルシウムイメージングを行うことにより、海馬アストロサイトの自発的カルシウムオシレーションに対する細胞外 ATP の作用について検討した。ATP はアストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 濃度を一過性に上昇させた後、自発的カルシウムオシレーション頻度を有意に増加した。自発的カルシウムオシレーション頻度増加は ATP がアデノシンに加水分解後活性化されるアデノシン A2B 受容体により引き起こされていた。すなわち、細胞外 ATP が ATP 受容体およびアデノシン受容体の二つの異なる受容体を活性化することにより、アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 濃度およびアストロサイトの自発的カルシウムオシレーションの頻度調節を行っていることが示唆された。

III. キノロン系抗菌薬 (キノロン薬) の非抗菌作用に関する研究

1. キノロン薬の痙攣誘発作用と非ステロイド薬との薬物相互作用に関する研究

これまでキノロン薬が痙攣誘発作用を持ち、かつある種のキノロン薬は非ステロイド薬との併用で痙攣誘発作用が増強されることを明らかにしてきた。