

性超音波造影剤の試作と応用にむけて。第23回ゲノム創薬フォーラム談話会。東京、9月。

- 13) 成相孝一, 神谷直樹, 安田 允, 田中忠夫, 大川 清. 光線力学療法 (PDT) を応用した卵巣退行の誘導. 第27回日本ヒト細胞学会. 東京, 8月.
- 14) 江田 誉, 丸毛啓史, 大川 清. Bortezomib は FGF-2 による TAZ 減少を抑制し骨芽細胞分化を刺激する. 第27回日本骨代謝学会学術集会. 大阪, 7月.
- 15) 間森 聡, 丸島秀樹, 永妻啓介, 田中 賢, 滝川真吾, 瀬風康之, 田尻久雄, 松浦知和, 酒井はるか, 大川 清. 肝細胞におけるグルコーストランスポーター (GLUT) 発現の変容 - 3次元環流培養系を用いた検討 -. 第45回日本肝臓学会総会. 神戸, 6月.
- 16) 江田 誉, 青木勝彦, 大友博之, 大川 清. JNK 阻害剤は FGF-2 存在下で骨芽細胞分化を刺激する. 第9回日本抗加齢医学会総会. 東京, 5月.
- 17) 和田あづみ, 大川 清, 都築政起. Phodopus 属ハムスターに存在する2つの淡色被毛突然変異. 第56回日本実験動物学会総会. 大宮, 5月.

IV. 著 書

- 1) 高田耕司, 第I部: 分子細胞生物学 7. 蛋白質の成熟・分解・異常. 花岡炳雄, 永倉俊和編. 臨床分子細胞生物学. 東京: メディカルレビュー社, 2009. p.103-17.

分子生物学講座

教授: 松藤 千弥 生化学・分子生物学
 講師: 小黒 明広 分子生物学
 講師: 村井 法之 生化学・分子生物学

教育・研究概要

ポリアミン (プトレッシン, スペルミジン, スペルミン) は, あらゆる細胞に含まれ, 細胞増殖に必須の生理活性分子である。ポリアミンは RNA や DNA に結合し, それらの安定化や機能制御にはたらくとともに, アポトーシスや NMDA レセプターなどの制御にも関与している。細胞内ポリアミン濃度の調節において中心的な役割を果たすのは, アンチザイム (AZ) と呼ばれるタンパク質である。AZ は翻訳フレームシフトによって発現誘導され, ポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の分解促進と, 細胞外からのポリアミンの取込みを阻害することにより, ポリアミン濃度をフィードバック調節する。AZ は広く真核生物に保存され, 哺乳動物には3種のファミリー (AZ1, 2, 3) が存在する。当講座では, ポリアミン調節システムの分子機構と存在意義を明らかにすることを目標として, 研究を進めている。

I. AZ1 の個体レベルでの生理機能

1. AZ1 欠損マウスにおける造血障害

我々は昨年度までに, AZ1 欠損マウスの部分胎生致死の原因の一つとして, 胎仔肝における高濃度のポリアミンが, コロニーアッセイで赤芽球系前駆細胞に相当する burst-forming unit-erythroid (BFU-e) を減少させ, 貧血を引き起こすことを見出した。BFU-e が減少する原因として, 大動脈生殖原基中腎 aorta-gonad-mesonephros (AGM) で発生した造血幹細胞の胎仔肝へ移行障害, または赤芽球系前駆細胞より早期の造血系細胞の分化障害の可能性が考えられたため, 本年度はこれらに着目して解析を行った。AZ1 欠損胎仔肝細胞の fluorescence-activated cell sorting (FACS) 解析において, 造血幹細胞および早期前駆細胞の表面マーカーを発現している細胞群は野生型に比べてやや増加しており, 造血幹細胞の胎仔肝への移行には問題ないことが示された。また胎仔肝由来造血細胞のコロニーアッセイでは, 赤血球系と骨髄球系の共通の前駆細胞に相当する mixed コロニーが減少し, さらに骨髄系のコロニーも減少していた。以上の結果から,

赤血球系と骨髄球系の分岐点にあたる common myeloid progenitor (CMP), あるいはその上流の multi potent progenitor (MPP) への分化段階に障害があることが示唆された。

2. ポリアミン過剰摂取に対する安全装置としての AZ1 の役割

ポリアミン過剰摂取に対する AZ の防御的な役割を個体レベルで検証することを目的として、過剰量のポリアミンを含む食餌の影響を AZ1 欠損マウスと対照マウスの間で比較した。高ポリアミン食は合成飼料に通常の食餌の 25 倍量のポリアミンを添加して調製し、AZ1 欠損マウスと野生体マウスに高ポリアミン食と非添加食をそれぞれ 2 週間摂食させる実験を実施した。実験開始前には、すでに観察されていたように AZ1 欠損マウスは対照に比べて低体重の傾向があったが、摂取実験期間中の体重変化には群間で明らかな差はなかった。実験開始前の全血中プトレッシン、スベルミジン、スベルミンはいずれも AZ1 欠損マウスで対照に比べて有意に高値であったが、高ポリアミン食摂取 7 日目の AZ1 欠損マウスにおいてスベルミンが著減した。尿中ポリアミン排泄量は AZ1 欠損マウス群、対照群共に 7 日目までともに増加して差がなかったが、14 日目には AZ1 欠損マウス群で高値が維持されていた一方、対照マウス群では減少に転じた。尿中のアセチル化されたポリアミンの割合は高ポリアミン食群で増加し、特に AZ1 欠損マウス群では増加傾向がより長く続いた。以上より、ポリアミン添加飼料を摂食させると、野生体では AZ1 によってポリアミンの吸収が抑制されたが、AZ1 欠損マウスでは抑制がかからず、アセチル化によるポリアミン代謝の亢進と、スベルミン合成の抑制という代償機構が働いたことが示唆された。

II. AZ2 による c-Myc の分解機構の解析

これまでに、AZ2 と相互作用する分子として c-Myc 結合タンパク質である傍腫瘍性小脳変性疾患関連タンパク質 (CDR2) を同定した。また AZ2 と CDR2 の結合解析を行う過程において、AZ2 が c-Myc と相互作用し、その分解を促進することを見出した。今年度はその分解機構の解析を行った。ヒト由来 293-F 細胞に HA タグを付加した AZ2 または AZ1 と c-Myc を共発現させ、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドを添加後 c-Myc の半減期を測定すると、AZ1 発現時にはほとんど分解が促進されないが、AZ2 発現時には明らかに分解が促進された。この分解促進は、プロテアソームインヒ

ビター MG132 により阻害された。また AZ2 を発現させた 293-F 細胞の内在性 c-Myc の分解は、AZ2 を発現させない細胞と比べて明らかに促進された。さらにアンチザイムを誘導するため、プトレッシンを培地に添加し 1 時間後の内在性 c-Myc の分解を測定したところ、明らかな分解促進を示した。以上の結果は、293-F 細胞において、ポリアミンで誘導された AZ2 がプロテアソームによる c-Myc の分解を促進していることを強く示唆する。

III. スベルミン結合アプタマーの機能解析

RNA アプタマーは、標的分子に特異的に結合する機能性 RNA であり、ランダム RNA プールより SELEX という方法で取得される。我々は、がんのバイオマーカーとしての利用をめざし、各種ポリアミンを高感度で識別・検出できる RNA アプタマーの単離を試み、昨年度スベルミン結合アプタマーを取得した。本年度は、変異アプタマーおよび表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析装置を用い、スベルミン結合アプタマーの結合様式と結合カイネティクスを解析した。その結果、1 分子の RNA アプタマーに複数のスベルミンが結合している可能性が示唆された。またセンサーチップに固定化したスベルミンの結合カイネティクス解析では、非特異的な静電結合が強く検出され、アプタマーが持つ特異的な結合を検出することはできなかった。今後は他の方法で結合定数を求める予定である。また他のポリアミンに対する RNA アプタマーも引き続き取得を試みている。

IV. アンチザイム翻訳フレームシフト促進タンパク質

AZ の翻訳フレームシフト効率を変動させるタンパク質を探索し、heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1L と呼ばれる機能未知のタンパク質がフレームシフトを促進することを見いだした。hnRNP A1L は、核および細胞質の両方で様々な RNA または DNA に結合することが知られている hnRNP A1 と 97 % 相同なアミノ酸配列を有する。ルシフェラーゼを指示遺伝子とする細胞内 AZ1 翻訳フレームシフトアッセイ系では、hnRNP A1L の発現により AZ1 翻訳フレームシフト効率が約 2 倍増加した。この性質は hnRNP A1 には認められなかったため、hnRNP A1 と hnRNP A1L の効果の違いが起因する部位をキメラ解析により検討した。hnRNP A1 は、N 末端側から 2 つの RNA recognition motif (RRM), RGG ボックス, M9 シグナ

ル配列を有し、2つのタンパク質間で異なる残基は各領域に散在する。両者のキメラタンパク質を作製し、AZ1翻訳フレームシフトに対する効果を解析したところ、RGGボックスとM9シグナル配列の領域の由来によらず、hnRNP A1Lの両方あるいは片方のRRMをもつキメラが全て野生型hnRNP A1Lと同程度の活性を示した。以上の結果から、hnRNP A1L特異的なAZ1翻訳フレームシフト促進効果は、RRM領域に起因していることが明らかになった。

「点検・評価」

1. 教育

主に医学科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、DNA医学研究所および生化学研究施設と共同で担当した。演習・実習および講義との間の連携をとり、学生の興味を引き出し、各自が思考し、討論しながら理解を深めるような教育に努めた。実習では、従来全体のまとめをレポート提出によって行ってきたが、他人のレポートを転記するなどのため教育効果が上がらなくなっていると判断し、実習最終日に口頭試問を行う形式に変更した。その結果、実習期間中にその内容を理解しようとする学生が増えるという効果が得られた。その他、分子生物学講座の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）、医学英語文献抄読、研究室配属の各カリキュラムを担当した。

2. 研究

当講座主導の論文発表を行うことができた。AZによるポリアミン調節の分子機構と存在意義の理解を深めたとともに、研究費獲得や、若い人へのアピールなどの点でも意義が大きい。しかし、昨年度からあまり進展のみられない研究テーマもあり、一層の努力が必要である。

研究業績

I. 原著論文

- Oguro A, Ohtsu T¹, Nakamura Y¹ (¹Univ. Tokyo). An aptamer-based biosensor for mammalian initiation factor eukaryotic initiation factor 4A. *Anal Biochem* 2009; 388(1) : 102-7.
- Murakami Y, Suzuki J¹, Samejima K¹, Kikuchi K, Hascilowicz T, Murai N, Matsufuji S, Oka T¹ (¹Musashino Univ.). The change of antizyme inhibitor expression and its possible role during mammalian cell cycle. *Exp Cell Res* 2009; 315(13) : 2301-11.
- Horiya S, Inaba M¹, Koh CS¹, Uehara H¹, Masui N¹, Mizuguchi M¹, Ishibashi M (Shinkasoyaku), Matsufuji S, Harada K¹ (¹Tokyo Gakugei Univ.). Replacement of the lambda boxB RNA-N peptide with heterologous RNA-peptide interactions relaxes the strict spatial requirements for the formation of a transcription anti-termination complex. *Mol Microbiol* 2009; 74(1) : 85-97.
- Murai N, Shimizu A, Murakami Y, Matsufuji S. Subcellular localization and phosphorylation of antizyme 2. *J Cell Biochem* 2009; 108(4) : 1012-21.
- Horiya S, Inaba M¹, Koh CS¹, Uehara H¹, Masui N¹, Ishibashi M (Shinkasoyaku), Matsufuji S, Harada K¹ (¹Tokyo Gakugei Univ.). Analysis of the spacial requirements for RNA-protein interactions within the N antitermination complex of bacteriophage lambda. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2009; 53 : 91-2.

III. 学会発表

- Ohkido M, Matsufuji S. Antizyme 2 activity in the tissues from antizyme 1 knockout mouse inversely correlates with spermidine/spermine N¹-acetyltransferase activity. Gordon Research Conference on Polyamines. Waterville Valley, June.
- Murai N, Shimizu A, Murakami Y, Matsufuji S. Analysis of novel antizyme 2 interacting protein, cerebellar degeneration related protein 2. Gordon Research Conference on Polyamines. Waterville Valley, June.
- 堀谷 学, 稲葉 満¹, 高 昌成¹, 上原宏章¹, 増井尚美¹, 石橋正也 (進化創薬), 松藤千弥, 原田和雄¹ (¹学芸大). バクテリオファージλ Nタンパク質による抗転写終結複合体におけるRNA-ペプチド相互作用の空間配置の厳密性とその人工的な緩和. 第11回日本RNA学会年会. 新潟, 7月.
- 小黒明広, 松藤千弥. ポリアミン認識RNAアプタマーの取得と解析. 第11回日本RNA学会年会. 新潟, 7月.
- 小黒明広, 松藤千弥. スペルミンを標的にしたRNAアプタマーの取得. 東京慈恵会医科大学学外共同研究「ポリアミンと核酸の共進化」第8回合同シンポジウム. 東京, 9月.
- Horiya S, Inaba M¹, Koh CS¹, Uehara H¹, Masui N¹, Ishibashi M (Shinkasoyaku), Matsufuji S, Harada K¹ (¹Tokyo Gakugei Univ.). Analysis of the spacial requirements for RNA-protein interactions within the N antitermination complex of bacteriophage lambda. The 6th International Symposium on Nucleic

Acids Chemistry (36th Symposium on Nucleic Acids Chemistry). Takayama, Sept.

- 7) 佐藤 理, 大城戸真喜子, 松藤千弥, ポリアミン調節におけるアンチザイム 2 の役割. 第 126 回成医学会総会, 東京, 10 月. [第 126 回成医学会総会抄録集 2009: 4]
- 8) 佐藤 理, 大城戸真喜子, 松藤千弥, アンチザイム 2 はアンチザイム 1 の代役か? 第 3 回トランスグルタミナーゼ研究会&ポリアミン研究会合同学術集会, 横浜, 10 月.
- 9) 大城戸真喜子, 松藤千弥, アンチザイム (AZ) 1 ノックアウトマウスにおける AZ2 活性はポリアミン異化反応活性と逆相関する. 第 3 回トランスグルタミナーゼ研究会&ポリアミン研究会合同学術集会, 横浜, 10 月.
- 10) 村井法之, 清水昭博, 村上安子, 松藤千弥, アンチザイム 2 の結合は傍腫瘍性小脳変性疾患関連タンパク質 CDR2 の分解を促進しない. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 10 月.
- 11) 小黒明広, 松藤千弥, スベルミンに結合する RNA アプタマーの結合様式の解析. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月.

薬 理 学 講 座

教 授: 靱山 俊彦	中枢シナプスの生理学および薬理学
教 授: 堀 誠治	感染化学療法学, 神経薬理学
教 授: 木村 直史	呼吸・循環調節の生理学・薬理学, 医学教育
講 師: 大野 裕治	内分泌薬理学
講 師: 西 晴久	内分泌薬理学, アレルギー学
講 師: 石川 太郎	中枢神経の生理学および薬理学

教育・研究概要

I. 大脳基底核・前脳基底核シナプス伝達に関する研究 (靱山俊彦)

前脳基底核は中枢アセチルコリン性ニューロンの起始核であり, 記憶, 学習, 注意等の生理的機能と密接に関係するとともに, その病的状態としてアルツハイマー病との関連が示唆されている。また, 線条体は運動制御を司る中枢として, パーキンソン病等大脳基底核関連疾患と関連している。これらの中枢部位の興奮性および抑制性シナプス伝達機構および修飾機構につき, ニューロン同定の新たな手法を導入しつつ, 電気生理学的解析および形態学的解析を行ない, 伝達物質遊離制御における特定のドーパミン受容体と特定のカルシウムチャネルの選択的共役, およびその生後発達変化を明らかにした。

大脳基底核シナプスおよび神経回路の再生機構の詳細は不明である。実験的に脳虚血状態を起こしたラットおよびパーキンソン病モデルラットを用いて, 傷害された線条体神経細胞, シナプス再生経過および再生機構を明らかにする目的で, 形態学および電気生理学的解析を行なった。本プロジェクトによる基礎的データが, 脳梗塞等の疾患に対する新たな治療法開発につながることを期待したい。

II. ニューキノロン薬の体温・血圧に及ぼす影響 (慶応義塾大学薬学部実務薬学講座との共同研究) (堀 誠治)

ニューキノロン薬 (NQ 薬) が, 生体反応を修飾する可能性が考えられたので, NQ 薬の生体に及ぼす影響を検討した。

NQ 薬が体温を低下させる可能性のあることを, マウスを用いた *in vivo* の検討により明らかとした。