

## 分子生物学講座

教授：松藤 千弥 生化学・分子生物学

### 教育・研究概要

当講座ではアンチザイム (AZ) を介するポリアミン調節の生物学的意義と仕組みに焦点をあてて研究を進めている。ポリアミンとは、プトレッシン、スペルミジン、スペルミンを主体とする多価有機アミンであり、細胞増殖に必須であるとともに、種々の生体分子の機能を制御する。AZ はポリアミンによって誘導され、ポリアミン生合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の分解促進と細胞内へのポリアミンの取り込み抑制により、細胞内ポリアミン濃度をフィードバック調節する。ポリアミンによる AZ の誘導は、他に例のない調節性の翻訳フレームシフトによるものである。また、AZ は広範囲の真核細胞に進化的に保存されており、哺乳動物では AZ1, AZ2, AZ3 の 3 種のパラログが存在する。

### I. AZ1 の個体レベルでの生理機能

#### 1. AZ1 ノックアウトマウスにおける造血障害

AZ1 は全身に分布し、発現量も多い主要分子種である。AZ1 ノックアウトマウス (のホモ欠損個体) は部分胎生致死となる。解析の結果、死因は造血障害であり、胎仔肝の低形成と造血細胞の減少、各二次造血器官における初期の赤芽球系前駆細胞に相当する burst-forming unit-erythroid (BFU-e) の減少が観察される。本年度は、これら造血細胞分化異常とポリアミンとの関連を細胞レベルで検討した。ODC の特異的阻害剤ジフルオロメチルオルニチン (DFMO) を母体経路で二次造血が始まる Aorta-Gonad-Mesonephros (AGM) 期以降に投与した場合、AZ1 欠損マウスの胎仔肝と成体の骨髄由来細胞を用いたコロニーアッセイで、非投与群に見られた BFU-e の減少が回復した。また、野生体の AGM 由来細胞を、プトレッシン添加培地で 7 日間前培養してからコロニーアッセイを行うと BFU-e の減少が見られたが、コロニー形成中の軟寒天培地へのプトレッシン添加には AGM 由来細胞でも胎仔肝由来細胞でも効果がなかった。以上の結果は、AGM における BFU-e 以前の分化段階にある造血前駆細胞が高濃度プトレッシンに曝されることが AZ1 欠損マウスにおける造血障害の主因であることを示唆する。

#### 2. AZ1 ノックアウトマウスにおける低体重

胎生期の致死を回避して部分的に出生する AZ1 のホモ欠損マウスは、非欠損体と比較して低体重傾向となる。その成因を母体経路で DFMO を投与した C57BL6/J 系のノックアウトマウスを用いて解析した。AZ1 欠損体と非欠損体は出生時には体重差を認めないが、欠損体は生後 9~12 週より有意な低体重となった。いずれのタイミングでも貧血は認められなかった。動物用 X 線 CT を用いて測定した体脂肪率は、生後 12~14 週齢の欠損体では非欠損体に比較して有意に低く、加齢に伴い差が拡大した。組織 ODC と尿中ポリアミン排泄量は増加し、ポリアミン分解の指標となるスペルミジン/スペルミン  $N^1$  アセチルトランスフェラーゼ (SSAT) 活性が肝臓で 1.5 倍に上昇していた。SSAT 過剰発現マウスではアセチル CoA の消費が増え脂肪合成が抑制されることが報告されており、AZ1 欠損マウスでも同様の機序で低体重となっている可能性もあるが、SSAT 活性の上昇は SSAT 過剰発現マウスに比べて軽微であり、他の要因が存在する可能性が示唆された。

### II. AZ2 の特異機能の解析

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

AZ2 は AZ1 と同じく全身に分布するが、AZ1 よりも発現量が少ない。我々は AZ2 特異的な分子機能を探索するため、ツーハイブリッド法を用いてマウス脳および肝 cDNA ライブラリより AZ2 との相互作用分子を検索し、昨年度までに神経系に高発現して腫瘍随伴症候群に関与する CDR2 を見いだした。CDR2 の機能は不明であるが、ロイシンジッパーを介して c-Myc と相互作用することが知られている。そこでヒト由来 293-F 細胞にタグを付加した AZ2, CDR, c-Myc を発現させプルダウンアッセイによって 3 者の相互作用を解析したところ、c-Myc の発現増加により AZ2 に結合する CDR2 が減少し、AZ2 の発現増加により c-Myc に結合する CDR2 が減少したことから、AZ2 と c-Myc は競合的に CDR2 と相互作用することが示された。次に、CDR2 の安定性に対する効果を HEK293 細胞において解析した結果、AZ2 は CDR2 の分解を抑制することがわかった。AZ2 の既知の標的分子である ODC は AZ2 によって分解促進されるが、CDR2 に対しては逆の効果を持つことになる。さらに、神経由来 Nuro2a 細胞において、強化シアン蛍光タンパク質 (ECFP) や強化黄色蛍光タンパク質 (EYFP)

との融合タンパク質としてそれぞれ発現させた CDR2 と AZ2 の細胞内局在を検討した。単独では、主に AZ2 は核に、CDR2 は細胞質に局在したが、両者を共発現させると細胞質での共局在が観察され、細胞内で両者が相互作用することが示された。

## 2. 腎臓における AZ2 相互作用分子

昨年度は、ツーハイブリッド法を用いてマウス腎臓 cDNA ライブラリより AZ2 との相互作用分子候補 75 クローンを得たが、本年度はさらに厳密な選択条件を用いてこれを 8 種類に絞り込んだ。これらに FLAG-タグを付加し、HA-タグを付加した AZ2 と共に HEK293 細胞に発現させ、プルダウンアッセイを行った。その結果、AZ2 特異な結合を示したタンパク質を 3 種類、AZ1、2 両者に結合するタンパク質を 2 種類確認した。次に、これらと EYFP の融合タンパク質を、単独あるいは AZ2-EYFP 融合タンパク質と共発現させ、細胞内局在を解析した。その結果、少なくとも 2 種類のタンパク質をそれぞれ共発現した場合に AZ2 の局在パターンが著しく変化し、それぞれのタンパク質と AZ2 が共局在することを見いだした。

## III. AZ シュードノット RNA 結合タンパク質の探索

AZ 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とよばれる高次構造が存在するが、その促進機構は不明である。我々は、シュードノットに結合するタンパク質がフレームシフトに関与するという仮説を立て、UV クロスリンク法を用いて探索を行った。その結果、昨年度までに、ヒト由来 293F 細胞の抽出液中に AZ1 シュードノットの変異体のみ結合する約 34 kDa のタンパク質を検出し、さらにこれをアフィニティー精製することに成功した。本年度はペプチド・マス・フィンガープリント法を用いて本タンパク質の同定を試みた。精製したタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、トリプシンによってゲル内消化した断片を MALDI-TOF 質量分析計で解析した。その結果、既知の RNA 結合タンパク質である hnRNP A1 と、その関連タンパク質 hnRNP A1 様タンパク質 (hnRNP A1L) と同定された。これらの cDNA を培養細胞に導入し、指示遺伝子を用いた AZ1 翻訳フレームシフト測定系で評価したところ、hnRNP A1L が約 2 倍の翻訳フレームシフト効率促進を示した。しかし、この促進効果は AZ1 シュードノットの野生体と変異体いずれを有する指示遺伝子に対しても見られることがわ

かり、大腸菌発現系により組換えタンパク質を作製して、結合と翻訳フレームシフトへの効果を再検討している。

## 「点検・評価」

### 1. 教育

主として 2 年生前期の基礎医学 I の分子から生命へ (講義, 演習, 実習) を生化学講座と共に担当した。演習・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。特に実習などで当講座の研究に興味を持ち、課外活動として自主的に研究に参加する学生が少しずつ増えていることは喜ばしい。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

各研究項目について、徐々にであるが興味深い知見が得られている。論文発表により研究費獲得に結びつけた。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Isome M<sup>1)</sup>, Lortie MJ<sup>1)</sup>, Murakami Y (武蔵野大), Parisi E<sup>1)</sup>, Matsufuji S, Satriano J<sup>1)</sup> (カリフォルニア大サンディエゴ校). The antiproliferative effects of agmatine correlate with the rate of cellular proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293 (2): C705-11.

### III. 学会発表

- 1) Ohkido M, Matsufuji S. Hematopoietic cells are sensitive to high putrescine even before migrating into the fetal liver. *Gordon Research Conference on Polyamines*. Waterville Valley, June.
- 2) 堀谷 学, Howard MT<sup>1)</sup>, Atkins JF<sup>1)</sup> (ユタ大), 村井法之, 松藤千弥. 部分融解したアンチザイム・シュードノットを認識する RNA 結合タンパク質. 第 9 回日本 RNA 学会年会. 名古屋, 7 月. [第 9 回日本 RNA 学会年会抄録集 2007; 165]
- 3) 清水昭博, 村井法之, 松藤千弥. Two ハイブリッド法によるアンチザイム 2 相互作用分子の解析. 第 124 回成医会総会. 東京, 10 月.
- 4) 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 とアンチザイム 2 の相互作用. 第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会. 横浜, 12 月. [第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会講演要旨集

2007; 839]

- 5) 大城戸真喜子, 藤原邦雄 (崇城大), 松藤千弥. ポリアミン濃度変化に伴う組織中のトランスグルタミンナーゼ反応生成物の変動. 第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会. 横浜, 12 月. [第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会講演要旨集 2007; 121]
- 6) 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 22 回研究発表会. 熊本, 1 月. [日本ポリアミン研究会第 22 回研究発表会講演要旨集 2008; 24]
- 7) 清水昭博, 村井法之, 松藤千弥. マウス腎臓におけるアンチザイム 2 相互作用分子の検索. 日本ポリアミン研究会第 22 回研究発表会. 熊本, 1 月. [日本ポリアミン研究会第 22 回研究発表会講演要旨集 2008; 25]
- 8) 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 SSAT 活性. 日本ポリアミン研究会第 22 回研究発表会. 熊本, 1 月. [日本ポリアミン研究会第 22 回研究発表会講演要旨集 2008; 26]
- 9) 大城戸真喜子. アンチザイムによる細胞内ポリアミン濃度調節の機構とその意義. 日本農芸化学会 2008 年度大会. 名古屋, 3 月. [日本農芸化学会大会講演要旨集 2008; SHI68]

## 薬理学講座

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
教授: 木村 直史	呼吸・循環調節の生理学・薬理学, 医学教育
准教授: 高野 一夫	呼吸の中枢性調節に関する生理学および薬理学
講師: 中道 昇	内分泌薬理学, 臨床薬理学
講師: 大野 裕治 (DNA 研究所)	内分泌薬理学
講師: 西 晴久	内分泌薬理学, アレルギー学

## 教育・研究概要

### I. 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 受容体と ATP 受容体 (プリン受容体) との相互作用に関する研究

1. 初代培養したウシ副腎皮質束状層細胞 (bovine adrenocortical fasciculate cell: BAFC) を用いた研究

各種細胞から神経刺激やストレスにより放出された ATP および UTP は, autocrine/paracrine 的に細胞膜に局在する P2 受容体に作用して, 主として非興奮性細胞の機能調節に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。P2 受容体は, ion channel 内蔵型の P2X と G protein 共役型 (GPCR) の P2Y に大別される。P2Y については現在少なくとも 8 個の subtype が cloning されているが, 我々は BAFC に glucocorticoid (GC) 産生を促進する Gq protein と共役した P2Y<sub>2</sub> の存在を認め, その受容体の BAFC における GC 産生における生理的役割について検討している。そして, ATP が ACTH の GC 産生および cAMP 産生促進作用を相乗的に増強することを見出した。しかしながら, この研究を行っている過程で, BAFC において ATP は未知の P2Y にも結合し cAMP 産生を弱いながら促進することが判明した。この Gs protein と共役した P2Y の cloning を行っているが未だ成功していない。近年, heterodimer 受容体の存在が GPCR においても発見されつつあるが, おそらく BAFC の Gs と共役したこの P2Y は他の P2Y subtype との heteromer を形成している可能性がある。したがって, 今回の研究は ATP を用いると複雑になるので, Ca<sup>2+</sup> 流入のみを引き起こし, cAMP 産生は刺激しない P2Y<sub>2</sub>