

## 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

### 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る生理活性分子であり、細胞増殖に必須である。増殖刺激により細胞内ポリアミン濃度が顕著に上昇する一方、ポリアミンの過剰蓄積を防ぐフィードバック調節機構が存在する。アンチザイム（AZ）はこのフィードバック機構の中核を成すタンパク質で、ポリアミンによって誘導され、ポリアミン合成の律速段階を触媒するオルニチン脱炭酸酵素（ODC）の分解促進と、ポリアミン輸送体の阻害によって、細胞へのポリアミン供給を遮断する。AZは広く真核細胞に保存され、哺乳動物には3種のパラログ（AZ1~3）が存在する。さらに、これらのAZは2種類のアンチザイム・インヒビター（AZIN1,2）とよばれる調節タンパク質によって負に制御される。当講座の研究目標は、このような多数のタンパク質を介する複雑な調節システムの存在意義と、各調節タンパク質の機能分担の解明、およびそれらに資する研究手法の開発である。

### I. AZ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ポリアミン・アセチル化の臓器特異性

AZ1欠損マウスでは組織ポリアミン含量が著増する。尿中ポリアミンを解析した結果、アセチル化ポリアミンの排泄が増加することから、アセチル体を経由するスペルミジン、スペルミンの分解が組織中で亢進していることが示唆された。実際にスペルミジン/スペルミン  $N^1$ -アセチルトランスフェラーゼ（SSAT）活性を測定したところ、肝臓や脾臓では高値を示したが、脳や心臓ではあまり変化がなかった。また、AZ1ノックアウトマウス各臓器におけるSSAT活性の増加と、残存するAZ2活性との間に有意な逆相関関係を見いだした。AZ2活性の低い臓器ではポリアミンの取込みが増えSSAT活性が誘導されたと考えられた。

#### 2. ポリアミンの強制投与と実験

ポリアミン過剰摂取に対するAZ1の防御機能を明らかにするため、AZ1欠損マウスとその対照動物に通常の摂取量の10倍のスペルミジンを1週間経口投与する実験を行った。投与中、AZ1欠損マ

ウスに対照よりも顕著な体重減少を認め、投与終了後AZ1欠損マウスは対照に比較して、全血中のポリアミンが約3倍、肝組織中のポリアミンが1.5倍高値であった。一方脳組織中のポリアミン濃度は差がなかった。以上より、特にAZ1欠損体では、過剰なスペルミジン経口摂取により体内ポリアミン動態が大きな影響を受けることが示唆された。

#### 3. AZIN1ノックアウトマウスの解析

AZINの個体レベルでの機能を明らかにするために、AZIN1ノックアウトマウスを取得し解析を進めた。戻し交配によりC57BL/6およびBALB/c系統の遺伝背景としたAZIN1ホモ欠損マウスは部分胎生致死であることを確認した。AZIN1欠損マウスの生化学的解析では、肝組織中のプトレッシン、スペルミジンの低下、尿中ポリアミン排泄量の低下を認めた。

## II. AZ2の特異機能の解析

### 1. AZ2とc-Mycの分子間相互作用の解析

これまでにAZ2と相互作用する傍腫瘍性小脳変性疾患関連タンパク質（CDR2）の解析を行ってきたが、その過程で既知のCDR2結合分子であるc-Mycが、AZ2とも相互作用することが示唆された。そこで、ヒト由来293-F細胞にHAまたはFLAGタグを付加したAZ2とc-Mycを発現させプルダウンアッセイを行ったところ、両分子の相互作用が確認された。さらに、COS-7細胞にAZ2とc-Mycを蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現させ、細胞内局在を検討したところ、単独では核と細胞質に分布するAZ2が、c-Mycと共発現させるとほとんどが核内でc-Mycと共局在するようになったことから、両分子の細胞内における相互作用が示された。さらにAZ2は細胞内でODCのタンパク質分解を促進する機能を持っているので、c-Mycの分解への影響を検討した。タグを付加したc-Mycを単独またはAZ2と293-F細胞に共発現させ、タンパク質合成阻害薬シクロヘキシミドを添加してc-Mycの半減期を測定すると、AZ2の存在下ではc-Mycの分解が明らかに促進された。

### 2. 腎臓におけるAZ2相互作用分子

これまでに、酵母ツーハイブリッド法、動物細胞を用いたプルダウンアッセイ、および蛍光タンパク質タグによる細胞内局在の解析により、マウス腎臓cDNAライブラリーより2つのAZ2相互作用分子を同定した。このうちZinc finger HIT domain-containing protein 1 (Znhit1)は腫瘍抑制タンパク質p53と結合することが知られているので、タグ

を付加した3種のタンパク質 FLAG-Znhit1, myc-AZ2 および myc-p53 を HEK293 細胞内に発現させ、ブルダウンアッセイを行ったところ、p53 の発現を増加させると Znhit1 と結合する AZ2 が減少した。これは、AZ2 および p53 が Znhit1 に対して競合的に結合することを示唆している。

### III. AZ シュードノットを標的とする RNA 結合ペプチド選択系の改良

ポリアミンによる AZ の発現誘導は、高等動物では他に例のない翻訳フレームシフトの促進による。AZ の mRNA には、翻訳フレームシフトの信号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、その作用機構は不明である。以前の研究で、AZ シュードノットの作用機構解析を目的として、AZ1 シュードノットに結合する人工 RNA 結合ペプチドを、大腸菌を利用するランダムペプチドライブラリーからのスクリーニング系を用いて選別したが、同定には至らなかった。この系は、バクテリオファージλの N タンパク質とその結合標的 boxB RNA を中心とした複合体による抗転写終結作用を利用したものであり、boxB を標的 RNA、N タンパク質をライブラリーとの融合タンパク質にそれぞれ置換することが可能である。AZ1 シュードノット結合ペプチドの取得に至らなかった理由として、boxB 部位に導入可能な RNA のサイズに限界があると仮定し、boxB のステムを伸長した変異体を解析したところ、結合活性が大幅に低下した。一方、この活性低下は boxB の上流に位置する boxA と間のスペーサーの伸長により部分的に回復した。この知見は、新規の AZ シュードノット結合ペプチド取得のための系の改良のために有用である。

### IV. ポリアミン結合 RNA アプタマーの取得と解析

がん患者では尿中ポリアミン排泄量が増加しており、その免疫学的測定が悪性腫瘍の診断に応用されている。しかし、現存する抗ポリアミン抗体は親和性、特異性とも不十分であり、ポリアミン分子間の微細な構造の差をうまく区別できない。RNA アプタマーは、ランダム RNA プールより結合活性を指標に単離する SELEX 法によって得られる機能性 RNA であり、抗体よりも微細な構造の差異を識別する能力に優れ、生体分子の新規検出・解析ツールとして注目されている。そこで RNA アプタマーを利用して生体試料から各種ポリアミンを特異的に検

出する系を開発することを目的に、まずスペルミンを標的に RNA アプタマーの取得を行なった。その結果、スペルミンに対して高い結合活性を持つ RNA アプタマーを2種類取得した。これらの RNA アプタマーはプロテッシンには結合せず、スペルミジンには弱いながらも結合活性を持っていた。2種類のアプタマーには保存された構造モチーフが存在し、結合に重要であることが推測された。現在、他のポリアミンに対しても RNA アプタマーの取得を試みている。

#### 「点検・評価」

##### 1. 教育

教育活動の中心は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）である。特に生化学講座とともに全教員が取り組んだ演習・実習では、演習・実習相互および講義との間の連携をとり、討論を重視して思考を促し、学生の興味を引き出すことに努めた。その他、所属教員は医学総論 I 演習、基礎医科学 II、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

RNA アプタマーの応用が新たに講座の研究テーマに加わった。その他 AZIN ノックアウトマウスの解析や、海外との共同研究が実を結んでいる。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Namy O<sup>1)</sup>, Galopier A<sup>1)</sup>, Martini C<sup>1)</sup>, Matsufuji S, Fabret C<sup>1)</sup>, Rousset JP<sup>1)</sup> (IGM, CNRS and Univ. Paris-Sud). Epigenetic control of polyamines by the prion [PSI+]. *Nat Cell Biol* 2008; 10(9): 1069-75.
- 2) Horiya S, Koh CS<sup>1)</sup>, Matsufuji S, Harada K<sup>1)</sup> (Tokyo Gakugei Univ.). Analysis of the interaction between selected RNA-binding peptides and a target RNA containing a bulge and a GNRA-type tetraloop. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2008; 52: 209-10.
- 3) Tang H<sup>1),2)</sup>, Ariki K<sup>2)</sup>, Ohkido M, Murakami Y, Matsufuji S, Li Z<sup>2)</sup>, Yamamura K<sup>2)</sup> (Chongqing Medical Univ., Kumamoto Univ.). Role of ornithine decarboxylase antizyme inhibitor in vivo. *Genes Cells* 2009; 14(1): 79-87.
- 4) Liao CP<sup>1)</sup>, Lasbury ME<sup>1)</sup>, Wang SH<sup>1)</sup>, Zhang C<sup>1)</sup>, Durant PJ<sup>1)</sup>, Murakami Y, Matsufuji S, Lee CH<sup>1)</sup>

(<sup>1</sup>Indiana Univ.). Pneumocystis mediates overexpression of antizyme inhibitor resulting in increased polyamine levels and apoptosis in alveolar macrophages. *J Biol Chem* 2009 ; 284(12) : 8174-84.

### III. 学会発表

- 1) Matsufuji S, Ohkido M. On the low body weight of antizyme 1 knockout mice. POLYAMINES: Forty Years of Mammalian Ornithine Decarboxylase. The First Saastamoinen Foundation International Symposium on Frontiers of Contemporary Science. Kuopio, June.
- 2) Ohkido M, Matsufuji S. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) activity in antizyme 1 knockout mice. POLYAMINES: Forty Years of Mammalian Ornithine Decarboxylase. The First Saastamoinen Foundation International Symposium on Frontiers of Contemporary Science. Kuopio, June.
- 3) 松藤千弥. ポリアミン調節タンパク質アンチザイム1ノックアウトマウスにおける造血細胞分化異常. 第18回日本サイトメトリー学会学術集会. 東京, 6月.
- 4) 小黒明広, 中村義一(東大). RNA アプタマーを利用した細胞破碎液中の標的タンパク質検出系法の確立. 第10回日本RNA学会年会. 札幌, 7月.
- 5) 堀谷 学, 村井法之, 松藤千弥. hnRNP A1様タンパク質によるアンチザイム翻訳フレームシフト促進機構. 第10回日本RNA学会年会. 札幌, 7月.
- 6) Horiya S, Koh C-S<sup>1)</sup>, Matsufuji S, Harada K<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Tokyo Gakugei Univ.). Analysis of the interaction between selected RNA-binding peptides and a target RNA containing a bulge and a GNRA-type tetraloop. Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry. Kyoto, Sept.
- 7) 佐藤 理, 大城戸真喜子, 松藤千弥. アンチザイム2は単なるアンチザイム1のバックアップか・アンチザイム2ノックアウトマウスを用いた解析. 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7回合同シンポジウム. 東京, 9月.
- 8) 鈴木啓子, 大城戸真喜子, 松藤千弥. ポリアミン調節タンパク質アンチザイムのノックアウトマウスにおける低体重のメカニズム. 第125回成医会総会. 東京, 10月.
- 9) Yamamura Y<sup>1)</sup>, Oguro A, Ito K<sup>1)</sup>, Nakamura Y<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Univ. Tokyo). Negative regulation of cap-dependent and HCV IRES-dependent translation by Smad3. 第67回日本癌学会学術総会. 名古屋, 10月.
- 10) 大城戸真喜子, 鈴木啓子, 松藤千弥. アンチザイム1ノックアウトマウスにおける体脂肪率低下. 第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 12月.
- 11) 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相互作用分子の探索. 第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 12月.
- 12) 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活性変化の臓器特異性. 日本ポリアミン研究会第23回研究発表会. 茨木, 1月.
- 13) 佐藤 理, 大城戸真喜子, 松藤千弥. アンチザイム2ノックアウトマウスのポリアミンとODC活性. 日本ポリアミン研究会第23回研究発表会. 茨木, 1月.