

56(1) : 47-51.

III. 学会発表

- 1) 高田耕司, 福田隆浩, 青木勝彦, 加藤尚志, 大川 清. カドミウムの継続投与によるマウス腎臓のタンパク質の性状変化. 第 83 回日本生化学会大会. 神戸, 12 月.
- 2) 和田あづみ, 金井孝夫, 大川 清, 都築政起. *Phodopus campbelli* 由来近交系に発見された胃癌発症例. 第 108 回関西実験動物研究会. 京都, 12 月.
- 3) 青木勝彦, 飯田泰志, 山田恭輔, 高田耕司, 朝倉 正, 大川 清. 解糖系阻害剤 3-プロモビルビン酸の取り込みにおける MCT1-EMMPRIN 複合体の役割. 第 83 回日本生化学会大会. 神戸, 12 月.
- 4) 日下部守昭, 大川 清, 井上 循, 橋本尚詞. 近赤外蛍光標識抗テネイン C 抗体を用いた腫瘍の生体イメージング. 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪, 9 月.
- 5) 朝倉 正, 飯田泰志, 青木勝彦, 大川 清. Epoxomicin 耐性細胞における E-cadherin 発現消失はヒストンアセチル化による ZEB1 発現調節を介している. 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪, 9 月.
- 6) 古市達哉, 大川 清, 池川志郎. 糖ヌクレオチド輸送体 SLC35D1 の機能不全は, マウスとヒトにおいて重度の骨格形成異常を引き起こす. 第 127 回成医会総会. 東京, 10 月.
- 7) 和田あづみ, 大川 清, 都築政起. *Phodopus campbelli* の黒色被毛突然変異体における attractin 遺伝子塩基配列. 日本遺伝学会第 82 回大会. 札幌, 9 月.
- 8) 古市達哉, 榊屋啓志, 村上智彦, 鈴木智広, 今泉和則, 大川 清, 若菜茂晴, 池川志郎. ENU ミュータジェネシスによる新規 II 型コラーゲン遺伝子 (Col2a1) 変異マウスの同定. 第 150 回日本獣医学会学術集会. 帯広, 9 月.
- 9) Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Terai T, Ohkawa K, Hashimoto H, Nagano T. Development of novel NIR fluorescent dyes based on rhodamine and their application for *in vivo* tumor imaging. World Molecular Imaging Congress 2010. Kyoto, Sept.
- 10) 小出裕一郎, 浦野泰照, 花岡健二郎, 寺井琢也, 日下部守昭, 大川 清, 橋本尚詞, 長野哲雄. ローダミンを母核とした新規近赤外蛍光色素の開発と *in vivo* イメージングへの応用. 第 23 回バイオメディカル分析科学シンポジウム. 松島, 7 月.
- 11) 江田 誉, 青木勝彦, 吉松俊紀, 吉松俊一, 大川 清, 丸毛啓史. Bortezomib はプロテアソーム活性非依存的に FGF-2 の骨芽細胞分化抑制効果を阻害し骨分化を促す. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会. 東京, 7 月.
- 12) 和田あづみ, 大川 清, 都築政起. *Phodopus campbelli* から育成された新規近交系の遺伝学的基礎特性. 第 57 回日本実験動物学会総会. 京都, 5 月.

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る生理活性アミンである。細胞内ポリアミンは主に核酸と結合して存在し, 複製や遺伝子発現に必須の役割を果たすとともに, アポトーシス, オートファジー, イオンチャネルの制御にも関与する。ポリアミンは, アミノ酸を材料とする生合成と細胞外からの取り込みによって供給されるが, その両方がアンチザイム (AZ) と呼ばれるタンパク質によって負に調節される。AZ の発現には翻訳フレームシフトという特異な機構が必要であり, その効率率は細胞内ポリアミン濃度に応じて増大する。すなわち, AZ の翻訳フレームシフトは, 細胞内ポリアミンのフィードバック調節におけるポリアミンセンサーとして機能する。AZ は広く真核生物に保存され, 哺乳動物には AZ1-3 の 3 種類が存在する。さらに AZ にはアンチザイムインヒビター (Azin) という結合タンパク質が存在し, 細胞内ポリアミンを正に調節している。われわれは, これらポリアミン調節タンパク質の機能を解明し, 複雑な調節系の存在意義を明らかにするとともに, それらを利用した研究および診断ツールの開発をめざしている。

I. ポリアミン過剰摂取に対する AZ1 の防御作用

ポリアミンは正常な細胞機能に必須であり, 年齢とともにその細胞内含量が低下することから, 老化を防ぐ健康食品としての応用が試みられている。一方, ポリアミンの過剰状態は生体にとって有害であることが知られている。われわれは, これまでにノックアウトマウスを用いて, AZ1 欠損によるポリアミンの過剰が個体発生や造血系の分化の障害を引き起こすことを明らかにしてきた。今回は, AZ1 がマウス成体においてポリアミン過剰摂取に対する安全装置としての役割を果たしているかを調べる目的で飼育実験を行った。AZ1 欠損マウスおよび野生型マウスに高ポリアミン含有食 (通常食の 25 倍量) を 1 年間摂食させ, 個体, 組織の変化を解析した。その結果, 両群間の体重や寿命などに差はみられなかったが, AZ1 欠損マウスにのみ肝腫瘍の発生を

認めた。このことは、AZ1がポリアミンの過剰摂取に際してがん化を抑える役割を担っている可能性を示唆する。

II. AZ2によるc-Mycの分解機構とその意義

AZは、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)に結合し、プロテアソームによるODCタンパク質の分解を引き起こす。また、AZ1はODC以外の種々のタンパク質に結合し、分解を引き起こすことが報告されている。われわれは、AZ1とAZ2の機能分担を明らかにするため、AZ2に特異的に結合するタンパク質を検索し、昨年度までにAZ2がc-Mycに結合しその分解を促進することを見出した。今年度はその分子機構と生物学的意義について解析を行った。細胞が増殖抑制シグナルを受けるとc-Mycがユビキチン依存的にプロテアソームで分解されることが知られている。その際にはc-Mycの58番目のスレオニン残基と62番目のセリン残基のリン酸化が信号となり、さらにFBW7というユビキチンリガーゼが関与する。そこで、ユビキチン依存的分解に必要なリン酸化部位をアラニンに置換したc-Myc(T58A/S62A)を作製し、AZ2またはFBW7と共発現させ、タンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミド存在下で分解速度を測定した。c-Myc(T58A/S62A)はFBW7存在下ではほとんど分解促進を受けなかったが、AZ2存在下では明らかに分解が促進されたことから、この機構がユビキチン非依存的であることが示唆された。また、従来報告されているc-Myc分解のうち、紫外線照射時の分解にはユビキチン非依存的機構が関与している。そこで、紫外線照射時のc-Myc分解におけるAZ2の関与を調べたところ、培養細胞への紫外線照射によって加速したc-Mycの分解が、RNA干渉を用いたAZ2のノックダウンによって抑制された。このことから、AZ2は紫外線照射のような特定のストレスによるc-Mycの分解促進を仲介している可能性が考えられた。

III. フレームシフトを利用した細胞内ポリアミンの蛍光モニタリング

がん細胞ではポリアミンが高値となることが知られている。この性質を利用したがん細胞の検出を目的として、細胞内ポリアミンのセンサーであるAZの発現機構と、蛍光タンパク質による細胞可視化技術を融合する技術開発をめざした。AZ1 mRNAのフレームシフト配列を、シアン蛍光タンパク質(ECFP)と赤色蛍光を発するKeima-Redの遺伝子

の間に連結し、フレームシフトが起こらないときにはECFPのみが、ポリアミン濃度が上昇してフレームシフトが起こるとECFP-Keima-Red融合タンパク質が発現するようにデザインしたプラスミドを構築した。このプラスミドを導入した細胞では、Keima-Red/ECFP蛍光強度比が細胞内ポリアミン濃度の指標となることが期待される。さらに、異なるポリアミン濃度感受性を期待し、フレームシフト配列を1つだけ有するコンストラクトと、タンデムに連結したコンストラクトを用意した。これらのプラスミドを導入した培養細胞に、ブトレッシンまたはODCの阻害剤 α -ジフルオロメチルオルニチンを添加し、Keima-Red/ECFP蛍光強度比の変化を計測した。その結果、プラスミド導入細胞は蛍光顕微鏡下においてECFPとKeima-Red両者に由来する蛍光が観察されたが、ポリアミンの変化に伴うKeima-Red/ECFP蛍光強度比の変化は明らかでなかった。今後フレームシフト配列部分を改良し、モニタリング系を確立する予定である。

IV. アンチザイムインヒビター1の発現解析

アンチザイムインヒビター1(Azin1)は、ODCのホモログであり、AZを阻害することにより、ポリアミンを正に調節する制御タンパク質である。Azin1は増殖刺激やがん化に伴って変動し、ポリアミンにより翻訳調節や分解調節を受けるが、転写調節については不明であった。そこで遺伝子トラップ法により作製したAzin1変異マウスと野生型マウスにおいて、選択的スプライシングによるAzin1転写産物を同定し、それらの発現動態を解析した。Azin1変異マウスのホモ接合体は、組織中のODCの活性ならびにブトレッシンの濃度が低下し、肝臓の形態異常が惹起されて部分的致死となる。しかし、ノーザンブロット解析においてホモ接合体にもAzin1 mRNAが検出され、またマウス胎仔由来繊維芽細胞を用いたウエスタンブロットにおいてもホモ接合体に野生型の20~30%のAzin1タンパク質発現を認めたことより、Azin1の転写産物には遺伝子トラップに用いた挿入配列をスキップするようなタイプが存在する可能性が示唆された。そこでオリゴキャッピング法によりAzin1遺伝子の転写開始点(TSS)を同定するとともに、マウスmRNA TSSデータベースをもとにデザインしたプライマーを用いて、逆転写酵素(RT)-PCRによりAzin1転写産物を調べた。その結果、Azin1変異マウスでは、エクソン1上の通常のTSSから開始した低レベルの全長の転写産物と、エクソン2を欠く高レベルの

転写物が検出された。また、野生型では低頻度でしか使用されないエクソン3を含む転写物の発現が、変異マウスでは著しく増加しており、かつその発現量は組織特異性を示した。以上に加えて、選択的スプライシングによって生じた多種の転写産物が、野生型と変異マウスの両方で見出された。これらの中には、ポリアミンによる翻訳制御、あるいはAZとの結合に必要なドメインを欠損した転写物が含まれていた。以上の結果は、*Azin1* 遺伝子の複雑な発現制御を示している。

V. スペルミン結合アプタマーによるがん診断系の開発

われわれは、ポリアミンに対するRNAアプタマーを利用し、がんのバイオマーカーとして有用なポリアミン検出系の開発をめざしており、昨年度までにスペルミン結合アプタマーを取得しその結合様式を解析した。本年度は、スペルミン結合アプタマーの認識特異性を調べるため、スペルミンとは構造の異なるアミン類との結合をSELEX法により比較解析した。その結果、スペルミン結合アプタマーは、両端に一級アミンを持ち、アミン間の炭素数が3個または4個の直鎖状テトラアミン類に強く結合することが明らかとなった。またスペルミン結合アプタマーを用いたスペルミン親和性カラムや、蛍光物質ラベルしたスペルミン結合アプタマーを作製し、溶液中のポリアミンの定量および可視化を試みた。その結果、 $10\ \mu\text{M}$ ～ $3\ \text{mM}$ の範囲においてスペルミンを半定量的に検出することができ、さらに紫外光下でスペルミンを可視化することができた。

〔点検・評価〕

1. 教育

主に2年生前期の基礎医科学I「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、思考を促すことに注意を払った。また実習と演習ではディスカッションを活性化し、その機会をなるべく多くするように努めた。実習では昨年度から口頭試験を導入して効果をあげたが、マウスのチロシナーゼ遺伝子変異を題材とした実習が長期となったため、新たな題材の導入を準備している。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)、医学英語文献抄読、研究室配属、選択実習の各カリキュラムを担当した。また大学院教育に

おいても共通カリキュラムの講義を担当した。

2. 研究

これまでの業績が複数の競争的研究費の獲得につながり、それに伴って新たな研究もスタートした。これらの研究を進展させ、タイムリーな業績発表につなげたい。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. Protocols for studying antizyme expression and function. *Methods Mol Biol* 2011; 720: 237-67.

III. 学会発表

- 1) Matsufuji S. Analyses of antizyme 2-interacting proteins. 2010 International Polyamine Conference: Progress in Medicine and Life Sciences. Gotemba, June.
- 2) Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. Antizyme 2 accelerates c-Myc degradation in the cells. 2010 International Polyamine Conference: Progress in Medicine and Life Sciences. Gotemba, June.
- 3) Ohkido M, Matsufuji S. Differentiation of multipotent progenitors into common myeloid progenitors is impaired in the liver of antizyme-1 knockout embryo. 2010 International Polyamine Conference: Progress in Medicine and Life Sciences. Gotemba, June.
- 4) Horiya S, Murai N, Matsufuji S. Enhancement of translational frameshifting by hnRNP A1-like protein. 2010 International Polyamine Conference: Progress in Medicine and Life Sciences. Gotemba, June.
- 5) Oguro A, Matsufuji S. Selection and characterization of RNA aptamers against spermine to develop the new sensing probe of polyamine. 2010 International Polyamine Conference: Progress in Medicine and Life Sciences. Gotemba, June.
- 6) 堀谷 学, 村井法之, 松藤千弥. hnRNP A1様タンパク質特異的なアンチザイム翻訳フレームシフト促進効果の解析. 第12回日本RNA学会年会. 東京, 7月.
- 7) Chang J (UCLA), 村井法之, 松藤千弥. 翻訳フレームシフト機構を利用した細胞内ポリアミンセンサーの開発. 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9回合同シンポジウム. 東京, 9月.
- 8) 小黒明広, 松藤千弥. RNAアプタマーを利用した新規がん診断系の開発. 第127回成医会総会. 東京, 10月.
- 9) Oguro A, Matsufuji S. Isolation and evaluation of

- anti-spermine aptamer. The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry. Yokohama, Nov.
- 10) Ohkido M, Matsufuji S. Defect of antizyme 1 affects activated hematopoiesis elicited by acute anemia in adult mice. 2nd International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases. Rome, Dec.
- 11) 小黒明広, 松藤千弥. RNA アプタマーを用いたスベルミン検出系の開発. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会). 神戸, 12月.
- 12) 村井法之, 村上安子, 松藤千弥. Antizyme 2 accelerates c-Myc degradation in the cells. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会). 神戸, 12月.
- 13) 小黒明広, 松藤千弥. RNA アプタマーを用いたポリアミン検出系の開発. 日本ポリアミン学会第2回年会. 宇都宮, 1月.
- 14) 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骨髓造血細胞の解析. 日本ポリアミン学会第2回年会. 宇都宮, 1月.
- 15) 村上安子, 大城戸真喜子, 滝澤浩子, 村井法之, 松藤千弥. ノックアウトマウスを用いたアンチザイムインヒビター1 (AIn1) の発現解析. 日本ポリアミン学会第2回年会. 宇都宮, 1月.
- 16) 村井法之, 村上安子, 松藤千弥. アンチザイム2は細胞内でc-Mycの分解を促進する. 日本ポリアミン学会第2回年会. 宇都宮, 1月.
- 17) 松藤千弥. 細胞内ポリアミン濃度の変動と維持. 日本ポリアミン学会第2回年会. 宇都宮, 1月.

IV. 著 書

- 1) Ivanov IP (Univ. Col. Cork), Matsufuji S. Part II: Frameshifting - Redirection of linear readout 13. Autoregulatory frameshifting in antizyme gene expression governs polyamine levels from yeast to mammals. In: Atkins JF, Gesteland RF eds. Recoding: Expansion of Decoding Rules Enriches Gene Expression (Nucleic Acids and Molecular Biology: 24). New York: Springer, 2010. p.281-300.

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: 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。これらの中脳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。また, 細胞内リン酸化酵素系の異常によって大脳基底核機能, シナプス伝達の異常が生じることを明らかにした。今後は大脳基底核, 前脳基底核シナプス伝達における転写因子等の情報伝達系の関与を解明すべく, 研究を進めている。

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. 水生脊椎動物の神経性呼吸調節に関する研究 (木村直史)

完全水棲のピパ科のカエルは比較呼吸生理学的に興味深い特徴を有しており, 他の無尾目両生類と異なり, 口腔呼吸サイクルを発現せず, 口腔内に空気