

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）は全ての細胞中に多量に存在する低分子生理活性物質で，主に核酸に結合し，遺伝子発現や細胞の増殖・分化に重要な役割を果たしている。ポリアミンは増殖の盛んな細胞内で増加するため，がんのバイオマーカーとしても有用である。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）により負に調節される。AZの発現には翻訳フレームシフトが必要であり，その効率は細胞内のポリアミン濃度により規定され，この負のフィードバックシステムにより細胞内ポリアミン量が調節されている。AZは哺乳類ではAZ1～3の3種類が存在し，さらにAZは2種類のアンチザイムインヒビター（Azin1, 2）により機能阻害される。我々はポリアミンの調節系の生物学的意義と分子機構を解明し，さらにそれらを利用した研究および診断ツールの開発を目指している。

I. AZ2によるc-Mycの分解機構とその意義

我々はこれまでにAZ2が哺乳動物培養細胞においてc-Mycの分解を促進することを見出し，UV照射によるc-Mycのユビキチン非依存的分解にAZ2が関与している可能性を示した。本年度はAZ2が介するc-Myc分解の他のシグナルを探索する目的で，低酸素環境下におけるc-Myc分解へのAZ2の関与について解析を行った。c-Mycは低酸素環境下においてユビキチン依存的また非依存的にプロテアソームにより分解されるという報告がある。そこで培養細胞を低酸素環境下にて培養し，シクロヘキシミドによる内在性c-Mycの分解をウエスタンブロッティングより確認した。さらにsiRNAによるAZ2のノックダウンを行いc-Mycの分解について解析した。その結果，AZ2のノックダウンによりc-Mycの分解が抑制された。低酸素環境において細胞内のポリアミン濃度が上昇するという報告があることから，低酸素によるポリアミンに濃度上昇よりAZ2が誘導されc-Mycの分解が促進されていることが示唆された。

II. アンチザイムのフレームシフト機構と蛍光タンパク質を利用した細胞内ポリアミンの蛍光モニタリングシステムによるがん細胞の可視化

AZの発現機構と蛍光タンパク質による可視化技術を融合し，ポリアミンが高値となっているがん細胞を可視化することを目的として開発研究を継続している。昨年度は，AZのフレームシフト配列を2つの蛍光タンパク質の間に連結したコンストラクトを作製したがポリアミン応答性を確認できなかった。本年度は，AZ1 mRNAの全コード領域を用い，フレームシフト部位下流のシュードノット構造の直後に緑色蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子を挿入した改良型コンストラクトを培養細胞に導入してポリアミン応答性を調べた。培地にプトレッシンを添加した場合と，オルニチン脱炭酸酵素（ODC）の阻害剤であるジフルオロメチルオルニチン（DFMO）を添加しポリアミン濃度を低下させた場合を比較した結果，ポリアミン添加により明らかなEGFPの蛍光強度の増加と，ウエスタンブロッティングによる翻訳フレームシフト産物の増加が確認された。

III. 尿毒素物質ポリアミンの成体造血への影響

AZ1のノックアウトは，体内のポリアミンの増加，重篤な貧血と部分胎生致死を伴う多能性骨髄前駆細胞の減少をもたらすことを報告してきた。腎排泄性であるポリアミンは腎不全時に体内に蓄積するため，尿毒素物質としても知られている。慢性腎不全患者の10～15%はエリスロポイエチン（EPO）治療抵抗性を示す。その原因は分かっていないが，ポリアミンの蓄積がEPO抵抗性の造血分化障害をもたらす可能性がある。そこで成体骨髄造血がポリアミン負荷の影響を受けるかどうか調べるために，基礎配合飼料にポリアミン添加し，野生型マウスに摂食させて骨髄造血細胞への影響を解析した。その結果，ポリアミン負荷は成体骨髄の多能性前駆細胞の減少をもたらすことが明らかとなった。この結果は，ポリアミンの蓄積が慢性腎不全患者のEPO抵抗性貧血の一因となりうることを示唆する。

IV. 選択的スプライシングにより生じる新規Azin1産物の解析

ポリアミンを正方向に調節するAzin1は，増殖刺激やがん化に伴って誘導され，ポリアミンにより翻訳調節や分解調節を受ける。遺伝子トラップ法により作製したAzin1変異マウスでは組織プトレッシンが低下するが，低レベルのAzin1発現が検出され，遺伝子トラップを回避する機構の存在が考え

られた。昨年度、選択的スプライシングによって生じた多種の *Azin1* 転写産物を見出し、その一部は *Azin1* 変異マウスで発現が大きく変動していた。今年度はさらに、遺伝子トラップの挿入配列の下流に新たに5つの選択的転写開始点 (TSS1-5) を同定した。TSS1-3は通常の翻訳開始部位の上流に位置し、*Azin1* 変異マウスの全長 *Azin1* の発現はこれらから転写されたものと推定された。TSS4は正常の翻訳開始コドンの下流に位置し、ここからの転写産物はN末端側アミノ酸を欠く短いタンパク質 (*Azin1* ΔN) をコードする。また、エキソン7が5側に延長され、新たな終結コドンを生じてC末端側約70%を欠いた *Azin1* タンパク質 (*Azin1* ΔC) をコードする新たなスプライシングバリエーションを同定した。*Azin1* ΔNと *Azin1* ΔCはAZ結合活性を保持していた。マウス胎仔由来繊維芽細胞において *Azin1* ΔCと全長 *Azin1* の mRNA の発現はポリアミンにより相反的な制御を受けた。この結果はポリアミン調節性スプライシングが *Azin1* の機能を調節する可能性を示唆する。

V. スペルミン結合アプタマーの結合領域の解明

RNA アプタマーは、ランダムな配列を持つ RNA ライブラリーから標的分子との結合を指標に選別される機能性 RNA であり、標的分子の検出・解析ツールとして利用されたり、標的の結合配列/モチーフの解析に用いられる。我々はポリアミンに結合するアプタマーを用いて、未だ核酸に対する機能が不明なポリアミンの結合配列/モチーフを解明し、さらにアプタマーによるがんの診断系の開発を行っている。昨年度までに我々が取得したスペルミンに結合するアプタマーは、2つのステムループ構造を持つことが予測されるが、このうち強い結合活性を有している3'側のステムループ構造中のスペルミン結合領域の解析を行った。3'側のステムループ構造はACA/Cで形成される bulge out 構造を有しているが、この bulge out 構造を塩基対合させる変異を導入したところ、アプタマーの結合活性は著しく低下した。また、この構造に隣接する A-U 塩基対を他の塩基対や対合を作らない組み合わせにすると結合活性が下がった。またその隣に存在する G-U 塩基対は NMR スペクトル解析においてスペルミンとの相互作用が示唆された。以上のことから bulge out 領域とこれに隣接する2塩基対よりなるステム領域が結合に重要であることが分かった。

VI. 卵巣明細胞腺癌における発癌分子機構の解明

卵巣癌のうち日本人に比較的高頻度であり、治療抵抗性の明細胞腺癌 (CCC) では17q21-23の増幅が約40%の頻度で見つかる。この領域にコードされるフォスファターゼ PPM1D が原因遺伝子のひとつと考えられているが、その過剰発現の頻度は10%であり、他の遺伝子の関与が示唆されている。他の臓器の癌において高頻度に高発現することが知られている microRNA-21 (miR-21) は、17q21-23に局在する TMEM49 遺伝子にコードされ、その標的として癌抑制遺伝子 PTEN が報告されている。我々は、17q21-23増幅により miR-21 が過剰発現し、PTEN タンパク質の低下が発癌に関与する可能性を考え、CCC の臨床検体を用いて miR-21 と PTEN の発現を解析している。実際に17q21-24領域の増幅を認めた症例の一部では miR-21 の高発現と PTEN 発現低下が見られることが明らかになった。

「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で連携をとり、学生の興味を引き出し、思考を促すことに注意を払った。また演習と実習では少人数のグループに班分けを行い、自己学習とそれを基にしたディスカッションを通して学生間での意見交換の重要性について理解を深めさせるように努めた。実習では口頭試験を導入しており、知識を覚えるだけでなく論理的に理解し、説明できるように促し、それを評価するように努めた。また次年度において新たな実習内容で行なえるよう準備を進めた。その他、所属教員は医学総論、基礎医科学 II、臨床基礎医学 I、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

これまでの研究を継続して推進しつつ、新たなテーマでの研究も立ち上がり、その成果も徐々に結実しつつある。研究業績としてコンスタントに国内外の学会等で発表を行っており、論文発表の準備も進められている。

研究業績

Ⅲ. 学会発表

- 1) Oguro A, Matsufuji S. Analyses of the binding manner of in vitro selected RNA to polyamine. RNA 2011 (16th Annual Meeting of the RNA Society and RNA Society of Japan 13th Annual Meeting). Kyoto, June.
- 2) Matsufuji S. Regulation of c-Myc by antizyme 2 and its biological significance. Gordon Research Conference on Polyamines. Waterville Valley, June.
- 3) Murai N, Matsufuji S. Novel c-Myc degradation pathway mediated by antizyme 2. Gordon Research Conference on Polyamines. Waterville Valley, June.
- 4) Murakami Y, Ohkido M, Murai N, Matsufuji S. (Poster) Expression analysis of antizyme inhibitor 1. Gordon Research Conference on Polyamines. Waterville Valley, June.
- 5) Oguro A, Matsufuji S. Binding Manner of in vitro Selected RNA against Spermine. Gordon Research Conference on Polyamines. Waterville Valley, June.
- 6) 大城戸真喜子, 原 孝彦 (都医学研), 松藤千弥. 限界希釈法を用いた AZ1 ノックアウトマウス胎仔肝由来 KSL 細胞の増殖能の検討. 第 4 回トランスグルタミナーゼ研究会 & 日本ポリアミン学会合同学術集会. 京都, 9 月.
- 7) 松藤千弥. アンチザイムの分子進化. 第 84 回日本生化学会大会. 京都, 9 月.
- 8) 村井法之, 松藤千弥. アンチザイム 2 による c-Myc の分解促進. 第 84 回日本生化学会大会. 京都, 9 月.
- 9) 村上安子, 大城戸真喜子, 滝沢浩子, 村井法之, 松藤千弥. アンチザイムインヒビター 1 の発現解析. 第 128 回成医学会総会. 東京, 10 月.
- 10) Oguro A, Matsufuji S. Isolation and evaluation of anti-polyamine aptamer as a diagnostic tool. 2011 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on RNA & Oligonucleotide Therapeutics. Cold Spring Harbor, Dec.
- 11) Oguro A, Matsufuji S. Binding manner of anti-spermine aptamer reveals a preferential RNA structure for spermine. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜, 12 月.
- 12) 小黒明広, 松藤千弥. RNA アプタマーを用いたスベルミン結合モチーフの解明. 日本ポリアミン学会第 3 回年会. さいたま 1 月.
- 13) 藤枝裕大¹⁾, 柳田明日美¹⁾, 小黒明広, 松藤千弥, 河合剛太¹⁾(¹千葉工大). スベルミンに結合する RNA アプタマーの結合様式の解析. 日本ポリアミン学会第 3 回年会. さいたま 1 月.

薬理学講座

- 教授： 初山 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 (初山俊彦)

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, さらにはフェロモン受容に關与する新規チャネル結合型受容体の機能を解明すべく, 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)

あくびは, ほぼ総ての脊椎動物にみられる共通の突発的な定型行動である。有羊膜類とその外群動物