

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AZ1，2，3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

これまでにAZ2の新たな相互作用分子としてがん原遺伝子産物c-MYCを発見し，結合がc-MYCの分解を促進することを明らかにした。またそれらの細胞内局在は共に，核および核小体であった。

AZ2とc-MYCの核小体における相互作用の意義について調べるために，AZ2またはc-MYCのsiRNAによるノックダウンを行い互いの局在を解析したところ，AZ2のノックダウンではc-MYCの核小体局在には変化がなかったが，c-MYCのノックダウンではAZ2の核および核小体局在は抑制され，ほとんどが細胞質局在となった。AZ2を介したc-MYCの分解促進が核小体で起こっている可能性が考えられたため，c-MYCの核小体局在に重要な分子であるNPM1を過剰発現させ，c-MYCの多くを核小体に局在させた状態でAZ2の強制発現およびノックダウンを行い，内在性c-MYCの分解を解析した。その結果AZ2の強制発現ではc-MYCの分解が促進され，ノックダウンでは明らかに分解が抑制された。これらの結果は，AZ2を介

するc-MYCの分解促進が，核小体で起こっている可能性を示唆するものである。

II. AZとATPクエン酸リアーゼの相互作用の解析

昨年度AZ2に相互作用する分子としての一つとして，ATPクエン酸リアーゼ（ACLY）を同定した。引き続きこれらの相互作用とその意義について研究を行った。293-F細胞に発現させたHAタグを付加したAZ1，AZ2およびACLYを精製し，*in vitro*においてプルダウンアッセイにより相互作用を解析したところ，ACLYはAZ1，AZ2の両方に直接結合することが明らかとなった。さらにACLYの活性にAZがどのように影響するか，*in vitro*および*in vivo*において解析を行ったところ，AZが存在するとACLY活性が2倍近く高くなること，またAZをノックダウンすると逆に抑制されることが明らかとなった。このときポリアミンは直接ACLYの活性には関与しなかった。これらの結果は，AZがACLYと直接相互作用しACLYの活性を調節している可能性を示唆する。

ACLYの活性は，リンゴ酸脱水素酵素を用いた間接的方法で測定しているが，現在安定同位体標識クエン酸を用いて，ACLY反応生成物のアセチルCoAを，質量分析装置を用いて定量する方法を確立中である。

III. ポリアミン化翻訳後修飾検出系の確立

ポリアミンはトランスグルタミナーゼによってタンパク質のグルタミン残基とイソペプチド結合を形成する（タンパク質ポリアミン化修飾）。ポリアミン化されたタンパク質は瞬時に機能や性質を変化させうる。ポリアミン化の標的タンパク質の全容，生理的意義などあまりよく分かっていない。ポリアミン化反応を解析するにあたり，まずポリアミン化反応を検出する方法について検討した。トランスグルタミナーゼでジメチルカゼインにプトレッシンを結合させた試料を用いて確認を行ったところ，マルチモードoctadecylsilyl（ODS）カラムを用いた液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）によるアミノ酸分析にてプトレッシン化グルタミン分子関連イオンピークを高い正確性をもって検出した。また，low-flow captive sprayイオン化（CSI）法を用いた液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS分析）にてプトレッシン化により質量が増加したピークを検出した。今後，この方法を応用し，ポリアミン量の変動に依存する培養細胞や組織のポ

リアミン化反応についての網羅的解析および相対定量を行ない、ポリアミン化反応の生理的意義の解明を進める。

IV. ポリアミンにより異なる調節を受ける *Azin1* 転写産物

我々はこれまでにポリアミンが *Azin1* の発現を少なくとも2段階、すなわち、転写とスプライシングアクセプターサイトの選択の段階で調節することを明らかにした。この両段階での調節は、いずれも活性化型である全長の *Azin1* タンパク質をコードする mRNA の発現量に影響する可能性が示唆される。本年度は、全長の *Azin1* をコードする mRNA と、C 末端欠損 *Azin1* タンパク質をコードし、NMD (nonsense-mediated mRNA decay) の標的となる *Azin1*-X mRNA の安定性を調べた。いずれの mRNA の半減期もポリアミン合成阻害剤 DFMO の有無でほとんど差がないことから、ポリアミンは mRNA の安定性には影響しないと推定された。次に、*Azin1* 変異型マウスの胎児由来繊維芽細胞 (H-MEF) および野生型マウスの MEF (W-MEF) を用いて解析したところ、H-MEF でポリアミンやチミジン投与により増殖が部分的に改善することを認めた。現在、両 MEF のタンパク質の比較と代謝産物の比較解析を進めている。

V. スペルミン結合アプタマーの結合領域の解明

RNA アプタマーは標的分子と強い親和性を持つ機能性 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。我々はスペルミンに結合するアプタマー (スペルミン結合アプタマー) を取得し、このアプタマーのスペルミン結合配列/モチーフの解明を行っている。昨年度までに、アプタマーのバルジ構造をはさんだ4塩基対からなるステム構造と5塩基対からなるステム構造の2つの領域が立体的に近接するような構造を取って結合部位を形成し、1分子のスペルミンと結合するモデルを提唱した。このアプタマーとスペルミンの結合の定量評価を行なうため、等温滴定型カロリメーター (ITC) 装置と水晶振動子マイクロバランス (QCM) 装置を使い結合解析を行なった。ITC 装置ではアプタマーとスペルミンの特異的な結合が検出でき、その結合比は1:1であることが示された。また、解離定数 (K_d 値) は約 $250\mu\text{M}$ 程度であると算出された。一方、QCM 装置ではアプタマーとスペルミンの結合が特異的に確認されたが、測定値が質量より予測さ

れる変化よりも10倍以上大きかった。これはスペルミンが結合することで RNA の構造変化が起きていること示唆している。これらの定量解析の結果は、これまでに得られていた結合モデルを支持するものであり、ポリアミンが細胞内の主要な結合分子である RNA の構造変化を起こしうることを示している。

「点検・評価」

1. 教育

主に2年生前期の基礎医学 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。講義では丸暗記の学習でなく、学生がより論理的に内容を理解、学習するように促し、講義中に学習課題を積極的に提示し、試験では論述問題を主体に出題した。実習では昨年度に採用した新たなテーマを今年度も行ない、昨年度の反省点をフィードバックし、実習内容やスケジュールをより洗練させた。演習や講義の内容と実習内容の関連性をより明確にし、学生がスムーズに実習内容を理解できるよう工夫した。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、自発的な学習と他者と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。さらに、演習では学習内容が学年レベルに達しないと判断された場合、再度自己学習を行なうように指導し、その結果を再評価するようにした。実習では口頭試験を導入し、知識を覚えるだけでなく内容を論理的に説明できることを確認し、それを評価するようにした。

その他、所属教員は医学総論、基礎医学 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進め、コンスタントに国内外の学会等で発表を行っており、国際誌での論文発表も行なった。さらに、投稿準備中の論文も控えている。また、昨年度より始めた安定同位体を用いた研究も軌道に乗り、今後さらなる研究成果が期待できる。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Matoba K, Kawanami D, Okada R, Tsukamoto M, Kinoshita J, Ito T, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T,

Murai N, Matsufuji S, Takahashi-Fujigasaki J, Utsunomiya K. Rho-kinase inhibition prevents the progression of diabetic nephropathy by downregulating hypoxia-inducible factor 1 α . *Kidney Int* 2013; 84(3): 545-54.

2) Murakami Y, Ohkido M, Takizawa H, Murai N, Matsufuji S. Multiple forms of mouse antizyme inhibitor 1 mRNA differentially regulated by polyamines. *Amino Acids* 2014; 46(3): 575-83.

III. 学会発表

- 1) Oguro A, Matsufuji S. Analysis of spermine-binding property of RNA aptamer. 2013 Gordon Research Conference on Polyamines. Waterville Valley, June.
- 2) Ohkido M, Matsufuji S. Characterization of hematopoietic stem cells in fetal liver of antizyme 1 knockout mice with long-term bone marrow repopulating assay. 2013 Gordon Research Conference on Polyamines. Waterville Valley, June.
- 3) Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. Antizyme2 contributes to downregulation of c-Myc protein levels under the hypoxia and glucose free condition. 2013 Gordon Research Conferences on Polyamines. Waterville Valley, June.
- 4) 小黒明広, 松藤千弥. RNA アプタマーの解析から明らかにされてきたポリアミンと RNA の結合様式. 第 15 回日本 RNA 学会年会. 松山, 7 月.
- 5) 村井法之, 村上安子, 松藤千弥. アンチザイム 2 を介する c-My のユビキチン非依存的分解機構. 第 1 回がん代謝研究会. 鶴岡, 11 月.
- 6) 大城戸真喜子, 松藤千弥. (セッション VI: ポリアミンとその代謝物医療応用) アンチザイム 1 ノックアウトマウスにおける長期造血再構築をもつ細胞の特徴. 日本ポリアミン学会第 5 回年会. 銚子, 1 月.
- 7) 柳田明日美, 藤枝裕大, 小黒明広, 松藤千弥, 河合剛太. (セッション V: ポリアミンとその代謝物の解析) スペルミンに結合する RNA アプタマーの結合様式の解析. 日本ポリアミン学会第 5 回年会. 銚子, 1 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: 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
講師: 川村 将仁	中枢神経の薬理学

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。また, ドーパミン受容体ノックアウトマウスを用いて, 生理的に遊離されたドーパミンのシナプス伝達における機能, および行動制御における機能を明らかにした。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, セロトニン受容体を介するシナプス伝達修飾機構, さらにフェロモン受容体に関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。さらに, 局所神経回路機能の解析をより精密に行うために, 特定のニューロンを光刺激によって活性化する新たな技法を導入しつつある。

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。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, 形態学的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, 神経変性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。