

# ポリアミンによるグリコサミノグリカン合成調節機構の解明

2017年

今村 正隆



# 目次

1. 序論	1
2. ヒト皮膚に含まれるグリコサミノグリカンおよびポリアミンの相関	5
2-1 実験方法	5
2-2 結果	10
2-3 考察	26
3.HS 生合成に対するポリアミンの効果	27
3-1 実験方法	28
3-2 結果	36
3-3 考察	56
4.CS 生合成に対するポリアミンの効果	58
4-1 実験方法	59
4-2 結果	60
4-3 考察	64
5.結論	65
6.参考文献	66
7.論文目録	72
8.謝辞	73
9.審査委員	74



## 1. 序論

グリコサミノグリカン (GAG)はウロン酸 (D-グルクロン酸: GlcA、L-イズロン酸: IdoA) とアミノ糖 (*N*-アセチル-D-グルコサミン: GlcNAc、*N*-アセチル-D-ガラクトサミン: GalNAc) が交互に結合した二糖繰り返し構造から成る直鎖の酸性多糖類の総称である。GAGとしてヘパラン硫酸 (HS)、ヘパリン (HP)、コンドロイチン硫酸 (CS)、デルマタン硫酸 (DS)、ケラタン硫酸 (KS) 及びヒアルロン酸 (HA)が挙げられる<sup>1</sup>。GAGはコア蛋白質と共有結合したプロテオグリカンとして細胞表面や細胞外マトリックスに存在し、ミッドカインやプレイオトロフィンに代表される成長因子及びL-セレクチン等の接着因子と結合することで結合組織の機能維持、分化、形態形成、創傷治癒及び神経軸索伸長など多岐に渡る生命現象に関与する (Fig. 1)<sup>2-4</sup>。HAはGAGに属しているが、コア蛋白質と結合しないことや硫酸基による修飾を受けないこと、大きな分子量を持つことが特徴として挙げられる。

CSやHSは硫酸基の結合位置や結合数の違いによる様々な異性体が存在しており (Fig. 2)、硫酸化パターンの違いにより、蛋白質リガンドとの結合の強さや生理作用も異なることが報告されている<sup>5,6</sup>。CSやHSの構造はその生理機能と密接な関係にあり、その構造を明らかにすることがGAGの生理機能を解明するために非常に重要であると考えられている。実際、遺伝子の変異により、GAGの合成や機能が阻害されると骨や皮膚等に異常が発生する<sup>7-9</sup>。例えば、HS合成酵素であるEXT1またはEXT2の変異により遺伝性多発性外骨腫が発症し、CS合成酵素であるCHSY1の変異では肢奇形、低身長等の特徴とする軸前性短指症候群が発症する<sup>8,10,11</sup>。

哺乳動物では胎生期における分化や加齢によりCSやHSの構造や量が変化することが報告されている。例えば、皮膚や軟骨では加齢に伴いCS、DSのGalNAc水酸基の4位が硫酸化された4S構造とGalNAc水酸基の6位が硫酸化された6S構造の比(4S/6S比)が減少すること<sup>12-15</sup>、皮膚やブルッフ膜に発現するHS量が加齢に伴い減少することが知られている<sup>16,17</sup>。哺乳動物におけるGAGの生合成系・分解系はほぼ解明されているにも関わらず、糖鎖構造や発現量を調節する詳細な機構は未だ解明されていない<sup>3,7,8</sup>。

ポリアミンは生物に普遍的に存在する塩基性生理活性物質であり、生体内には主としてプトレシン (PUT)、スペルミジン (SPD)、スペルミン (SPM)の3種が細胞内に mM オーダーの

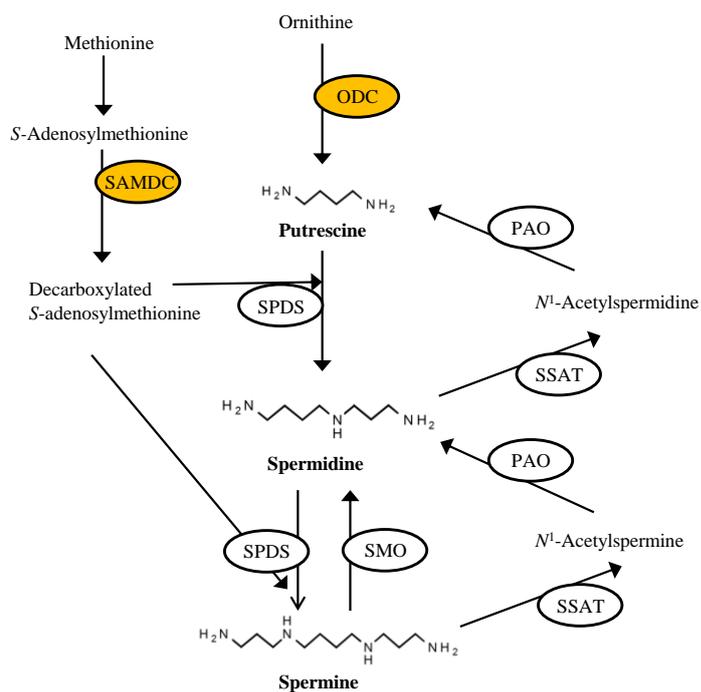
濃度で存在している<sup>18</sup>。Fig. 3 に動物細胞におけるポリアミンの生合成系と分解系の模式図を示す。ポリアミン生合成の律速酵素は、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC)とS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (SAMDC)である。ODC によりオルニチンから PUT が合成され、SAMDC によって合成された S-アデノシルメチルチオプロピルアミンによりアミノプロピル基が供給され、SPD、SPM 合成が行われる。一方、ポリアミン分解系では一度スペルミジン/スペルミン N<sup>1</sup>-アセチルトランスフェラーゼによりアセチル化された後、アセチルアミノオキシダーゼが働き、SPM →SPD、SPD→PUT への変換が行われる。また、スペルミンオキシダーゼ (SMO)により、SPM がSPDに直接変換される<sup>19</sup>。このように細胞内ポリアミン量は生合成系、分解系及び輸送系により厳密に調節されている<sup>20</sup>。

ポリアミンは細胞内において主として RNA と結合しており、大腸菌では PUT の 48%、SPD の 90%、牛リンパ球では SPD の 57%、SPM の 65%が RNA と結合している<sup>21,22</sup>。私達の研究グループでは、ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進を受ける蛋白質をコードしている遺伝子群を“ポリアミンモジュロン”と定義した。大腸菌においては 20 種、酵母においては 1 種 (COX4)、動物細胞においては 4 種 (Cct2、Hnrpl、pgam1、eEF1A)がポリアミンモジュロンとして同定されている<sup>23-30</sup>。大腸菌においてポリアミンは RNA の立体構造を変化させることで翻訳効率の悪い特定蛋白質の合成を促進し、細胞増殖・生存率の維持に関与することが明らかになったが、動物におけるポリアミンモジュロンの役割は未だ不明な点が多い。

ラットやマウスにおいては加齢に伴い組織中のポリアミン量が減少することが報告されている<sup>31,32</sup>。また、ウサギ軟骨細胞にパラトルモンを添加することで成熟軟骨細胞へ分化を誘導すると、ポリアミン生合成律速酵素である ODC の活性及び GAG 量が増加する<sup>33,34</sup>。さらに、パラトルモンと同様にウサギ軟骨細胞にポリアミンを添加すると成熟軟骨細胞へ分化が誘導され、逆にポリアミン生合成阻害剤を添加すると分化が阻害されることが報告されている<sup>35</sup>。以上の報告から、加齢に伴う組織中ポリアミン量の減少と GAG の構造・量に相関があることが考えられた。

本研究では、グリコサミノグリカン合成調節機構を解明するためにポリアミンに注目し、以下の解析を行った。





ODC, ornithine decarboxylase; PAO, polyamine oxidase; SAMDC, *S*-adenosylmethionine decarboxylase; SMO, spermine oxidase; SPDS, spermidine synthase; SPMS, spermine synthase; SSAT, spermidine/spermine *N*<sup>1</sup>-acetyltransferase.

**Figure 3. Pathway for the biosynthesis and degradation of polyamines.**

## 2. ヒト皮膚に含まれるグリコサミノグリカンおよびポリアミンの相関

GAG とコア蛋白質が共有結合したプロテオグリカンは皮膚に多く存在しており、肌の弾力性の維持や創傷治癒において重要な役割を果たしている<sup>15,36-38</sup>。皮膚においては加齢に伴い CS、DS の硫酸化パターンが変化し、HS はその量が減少することが報告されているが、糖鎖構造や発現量を調節する詳細な機構は未だ解明されてはいない<sup>15,39</sup>。本研究室ではこれまでにリタイアマウスを用いることで、マウス皮膚中のポリアミン量が加齢に伴い減少することを明らかとした<sup>32</sup>。そこで本研究では、ヒト皮膚試料を用いて老化による皮膚中ポリアミン量の減少と GAG の変化に相関があるかどうかを検討した。

### 2-1. 実験方法

#### 1) 試料

皮膚は乳癌に罹患した女性の乳房再建術【一期再建 [ステージ I (n=5)、ステージ II (n=8)] 及び二期再建 [ステージ I (n=4)、ステージ II (n=25)]】に用いる腹部の皮膚の一部を横浜市立大学医学部 赤瀬智子教授、前川二郎教授、安村和則診療講師、伊吹愛助教の御好意とご協力により提供していただいた。本研究に用いた皮膚はインフォームド・コンセントが得られた患者のみから提供していただき、本研究は横浜市立大学医学部および千葉大学大学院 薬学研究院倫理委員会の承認を受けた上で行った。

#### 2) 試薬

CS 二糖標準品 ( $\Delta$ Di-0S、 $\Delta$ Di-4S、 $\Delta$ Di-6S、 $\Delta$ Di-UA2S、 $\Delta$ Di-diS<sub>B</sub>、 $\Delta$ Di-diS<sub>D</sub>、 $\Delta$ Di-diS<sub>E</sub>、 $\Delta$ Di-triS)、HS 二糖標準品( $\Delta$ Di-0S<sub>HS</sub>、 $\Delta$ Di-NS、 $\Delta$ Di-6S<sub>HS</sub>、 $\Delta$ Di-NS6S、 $\Delta$ Di-NSUA2S、 $\Delta$ Di-TriS<sub>HS</sub>)、は生化学工業より購入した。Chondroitinase ABC、Chondroitinase ACII、Heparitinase I、Heparitinase II、Heparinase は生化学工業より購入した。Actinase E は科研製薬より購入した。Dispase II は Sigma より購入した。

#### 3) Dispase II 処理による表皮と真皮の分離

Dispase II 処理は Huang らの方法に従って行った<sup>40</sup>。6 well プレート中に 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> 及び 1 mM CaCl<sub>2</sub> を含んだリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) を添加し、1.2 U/mL の濃度になるように Dispase II を加え、4 °C で 12 時間攪拌しながら反応させた。反応後、真皮の皮下脂肪をピンセットとハサミを用いて取り除いた後に、ピンセットとハサミを用いて皮膚を表皮と真皮に分離した。ポリアミン定量用に表皮約 40 mg、真皮約 60 mg、GAG 精製用に表皮約 50 mg、真皮約 90 mg をそれぞれ確保した。

#### 4) 皮膚中に含まれるポリアミンの定量

皮膚に 5% CCl<sub>3</sub>COOH を加え、70°C で 30 分間加熱した後に 10,000 x g、4 °C、5 分間遠心分離を行い、蛋白質を沈殿させた。遠心分離によって得られた上清を Millex-LH Filter、0.45 µm (EMD Millipore) を用いてフィルター濾過し、ポリアミン定量に用いた。沈殿物は 1 M NaOH に溶解し、Lowry 法による蛋白質定量に用いた<sup>41</sup>。

ポリアミン定量は Igarashi らの方法に従い、蛍光ポストカラム検出法を用いたイオンクロマトグラフィーにより行った<sup>42</sup>。溶離液のポンプは日立ハイテック製 Chromaster® 5110 Pump、ポストポンプは日本精密科学株式会社製 MINICHEMI PUMP NP-FX(II)-1U、オーガナイザーは日立ハイテック製 ELITE LaChrom、カラム恒温層は日立ハイテック製 ELITE LaChrom L-2300、蛍光検出器は日立ハイテック製 ELITE LaChrom L-2485、オートサンプラーは日立ハイテック製 ELITE LaChrom L-2200、カラムは東ソー製 TSKgel polyaminepak (4.6 mm x 50 mm) を使用した。試料の分離は TSKgel polyaminepak (4.6 mm x 50 mm) を直列に 2 つ繋げて用い、流速 0.21 mL/min、カラム温度 50°C で行った。溶離液は Buffer II (0.35 M クエン酸ナトリウム、2 M NaCl、20% メタノール、0.08% Brij-35、0.64 mM ヘキサン酸) を用いた。ポストカラム試薬であるオルトフタルアルデヒド溶液 (0.4 M ホウ酸、0.35 M KOH、4 mM オルトフタルアルデヒド、28 mM 2-メルカプトエタノール、0.1% Brij-35、0.63% メタノール) は流速 0.21 mL/min で送液した。反応後は励起波長 336 nm、蛍光波長 470 nm の条件で検出した。

#### 5) 皮膚に含まれる GAG の二糖組成分析

皮膚を凍結乾燥した後、50 mM Tris-acetate (pH 8.0) を 400 µL 加え、10 mg/mL Actinase E を 10 µL 添加し、45°C で 72 時間インキュベーションすることで蛋白質を分解した。GAG の精

製は Zhang らの方法に従って行った<sup>43</sup>。CHAPS 8 mg (final 2%)、尿素 192.2 mg (final 8 M) を加えることで不溶性蛋白質を可溶化し、Millex-LH Filter 0.45  $\mu\text{m}$  (EMD Millipore) を用いてフィルター濾過を行った。得られた溶液を Vivapure Q MINI H spin column に供し、0.2 M NaCl 450  $\mu\text{L}$  を加え、1,800 x g 室温 5 min で遠心分離を行い、この操作をさらに2度繰り返すことでサンプルを洗浄した。16% NaCl 500  $\mu\text{L}$  を spin column に添加し、1,800 x g 室温 5 min で遠心分離を行い、この操作をさらに1度繰り返すことでGAG画分を得た。GAG画分に4 mL メタノールを加え 4 $^{\circ}\text{C}$  16 h 静置しメタノール沈殿を行った。スイングローターで 2,300 x g、4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間、アングルローターで 11,000 x g、4 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間遠心分離を行うことでGAGを得た。得られたGAGにメタノールを1 mL 加え 11,000 x g 4 $^{\circ}\text{C}$  5 分間遠心分離を行うことでGAGを洗浄した。GAG に H<sub>2</sub>O 25  $\mu\text{L}$ 、緩衝液 [0.2 M Tris-acetate buffer (pH 8.0)] 5  $\mu\text{L}$ 、10 mU/ $\mu\text{L}$  コンドロイチナーゼ ABC 5  $\mu\text{L}$  を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応を行った。その後、100 $^{\circ}\text{C}$ で3分間加熱することで酵素を失活させ、10,000 x g、4 $^{\circ}\text{C}$ 、5分間遠心分離を行い、上清を Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-30 membrane (Millipore) に供した。H<sub>2</sub>O 400  $\mu\text{L}$  を加え、15,000 x g、20 $^{\circ}\text{C}$ 、20分間遠心分離を行った後、H<sub>2</sub>O 450  $\mu\text{L}$  を加え、15,000 x g、20 $^{\circ}\text{C}$ 、20分間遠心分離を行い、溶出画分をCS、DS 不飽和二糖画分とした。CS、DS 不飽和二糖画分を凍結乾燥させ CS、DS 不飽和二糖を得た。カラムに残っている HS を H<sub>2</sub>O 800  $\mu\text{L}$  を用いて溶出させ、凍結乾燥により HS を得た。H<sub>2</sub>O 5  $\mu\text{L}$ 、緩衝液 [0.1 M CH<sub>3</sub>COONa、10 mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Ca (pH 7.0)] 5  $\mu\text{L}$ 、0.5 mU/ $\mu\text{L}$  Heparinase 2  $\mu\text{L}$ 、0.5 mU/ $\mu\text{L}$  Heparitinase I 2  $\mu\text{L}$ 、0.5 mU/ $\mu\text{L}$  Heparitinase II 2  $\mu\text{L}$  を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で16時間反応を行った。100 $^{\circ}\text{C}$ で3分間加熱し、酵素を失活させ、10,000 x g、室温、5分間遠心分離を行い、上清をエッペンに移し、遠心エバポレーターで乾燥させることで HS 不飽和二糖を得た。

CS、DS 不飽和二糖の分析は蛍光ポストカラム検出法を用いた逆相イオンペアクロマトグラフィーにより行った。溶離液のポンプに島津製作所製 Liquid Chromatograph LC-10Ai、検出器にJASCO製 Intelligent Fluorescence Detector FP-920S、ポスト反应用ポンプに日本精密科学株式会社製 MINICHEMI PUMP NP-FX(II)-1U、インテグレーターとして日立製作所製 Chromato Integrator D-2500、インジェクターに Reodyne 社製 sample injector (model 7725、sample loop 20  $\mu\text{L}$ )、カラムにセンシユ科学社製 Senshu Pak DOCOSIL (4.6 mm i.d. x 150 mm)、カラム恒温槽に EYELA 社製 NTT2200、ドライ反応槽に島村計器製作所製 Dry

Reaction Bath DB-5、データ処理用ソフトとして株式会社ランタイムインスツルメンツ製 Chromato-PRO を用いた。試料の分離は Senshu Pak DOCOSIL カラムを用い、流速 1.0 mL/min、カラム温度 60 °Cで行った。二液グラジエントのため、溶離液は (A) 1.2 mM 硫酸水素テトラブチルアンモニウムを含む 12%メタノール溶離液と (B) 0.2 M NaCl および 12%メタノールを含む 1.2 mM 硫酸水素テトラブチルアンモニウム水溶液を用い、0-10 min (1% B)、10-11 min (1-10% B)、11-30 min (10% B)、30-35 min (10-60% B)、35-40 min (60% B) の条件でグラジエント溶出を行い、1% B で 24 分間平衡化した。ポストカラム試薬である 0.5% (w/v) 2-シアノアセトアミドと 1.0 M NaOH はダブルプランジャーポンプで両液とも流速 0.25 mL/min で送液した。混合液は反応コイル (0.5 mm i.d. x 10 m) を通過中にドライ反応槽を用いて 110°Cで加熱反応させ、冷却コイル (0.25 mm i.d. x 5 m) で冷却した。反応後は励起波長 346 nm、蛍光波長 410 nm で蛍光検出した。

HS 不飽和二糖の分析は前述の CS、DS 二糖組成分析と同様の装置、条件で行った。ただし流速は 1.0 mL/min、グラジエントは 0-10 min (1-4% B)、10-11 min (4-15% B)、11-20 min (15-25% B)、20-22 min (25-53% B)、22-29 min (53% B) の条件でグラジエント溶出を行い、1% B で 25 分間平衡化した。

HA の分析は蛍光ポストカラム検出法を用いたキラルクロマトグラフィーにより行った<sup>44</sup>。試料の分離は Thermo Fisher Scientific 社製 Hypercarb (4.6 mm i.d. x 100 mm) を用い、流速 0.75 mL/min、カラム温度 40 °Cで行った。溶離液は 4%アセトニトリルを含む 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (pH 11) を用いた。ポストカラム試薬である 0.5% (w/v) 2-シアノアセトアミドと 1.0 M NaOH はダブルプランジャーポンプで両液とも流速 0.25 mL/min で送液した。混合液は反応コイル (0.5 mm i.d. x 10 m) を通過中にドライ反応槽を用いて 110 °Cで加熱反応させ、冷却コイル (0.25 mm i.d. x 5 m) で冷却した。反応後は励起波長 346 nm、蛍光波長 410 nm で蛍光検出した。

## 6) 統計解析

異なる二群間の相関分析は GraphPad Prism® Software を用い、スピアマンの順位相関分析により行った。

## 7) 創傷モデルマウス

動物実験は千葉大学動物実験委員会による許可を受け、千葉大学動物実験実施規定に基づいて実施した。7週齢で体重 34-36 g の ddY 系雌マウス 6 匹を日本 SLC 株式会社から購入し、1 週間飼育した後に創傷モデルマウスを作製した。イソフルランを用いて麻酔を導入した後、背部を剃毛し、Kai Industries 社製生検トレパン (直径 8 mm)により皮膚全層欠損創を 1 匹あたり 3 個作製した。丸石製薬より購入した親水ワセリンを軟膏基剤として用いて 1% DFMO、0.1% ポリアミン (0.075% スペルミジン、0.025% スペルミン)軟膏をそれぞれ調製した。調製した 1% DFMO 軟膏、0.1% ポリアミン軟膏、コントロールとして親水ワセリンを 1 日 1 回、連日創部に塗布した。ポリプロピレンシートを創部に密着させ、創の形状をマーキングし、シートに記入した創の面積を Image J imaging software を用いて測定した。

## 2-2.結果

### 皮膚に含まれる GAG とポリアミンの相関

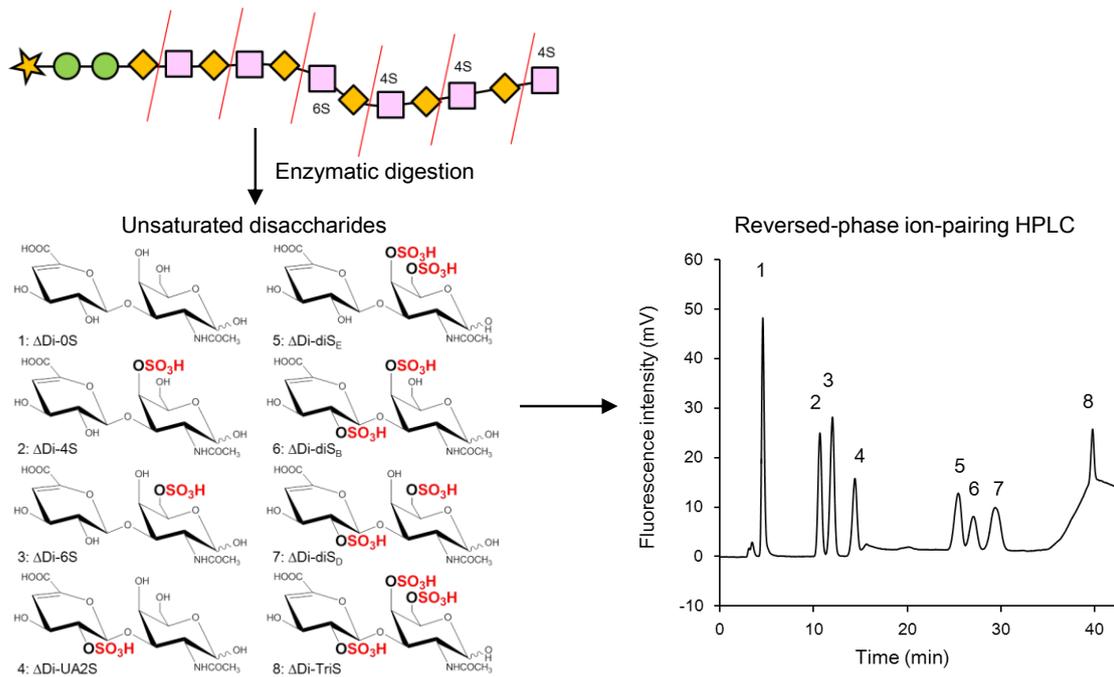
GAG とポリアミンの相関を検討するために、ヒト皮膚試料 42 検体から GAG とポリアミンを抽出し、GAG の二糖組成分析を行った。酵素消化により生成した不飽和二糖は蛍光ポストカラム誘導体化法を用いた逆相イオンペアクロマトグラフィーにより分離・検出した (Fig. 4)。検体は乳房再建術を行った時期により、一期再建と二期再建に分類され、さらに癌の進行度によりステージ I と II に分類される。これらの分類に基づき、皮膚中に含まれる DS 及び HS の二糖組成を調べたところ、二糖組成は各ステージで同じであり (Tables 1,4-7)、且つこれまでに報告された皮膚における DS 及び HS 二糖組成と同じであった<sup>15,17</sup>。

表皮または真皮に含まれる GAG 量 とポリアミン量の相関を評価したところ、HA 量 および DS 量 については相関が認められなかったが (Fig. 6a-c; Tables 2,3,6,7)、HS 量においては総ポリアミン量、スペルミジン量、スペルミン量との正の相関が認められ、特に真皮では強い相関が認められた (Fig. 5a; Tables 3,5)。表皮においては HS の発現量が少なく、19 人の患者においては表皮から HS を検出することができなかった (Table 4)。そのため、HS が検出できなかった患者の検体を除いた 23 検体で表皮中の HS 量 とポリアミン量の相関性を再評価したところ、表皮においても真皮と同程度の相関が認められた (Fig. 6d; Tables 2,4)。また、4 人の患者 (no. 7-10)の皮膚においては特に多くのポリアミンと HS が検出されたため、HS の二糖組成を調べ、他の患者の皮膚から得られた HS の二糖組成と比較した。その結果、硫酸化パターンに多少の変化は見られたものの、HS 全体の硫酸化度に大きな変化は認められなかった (Fig. 5b; Tables 3,5)。

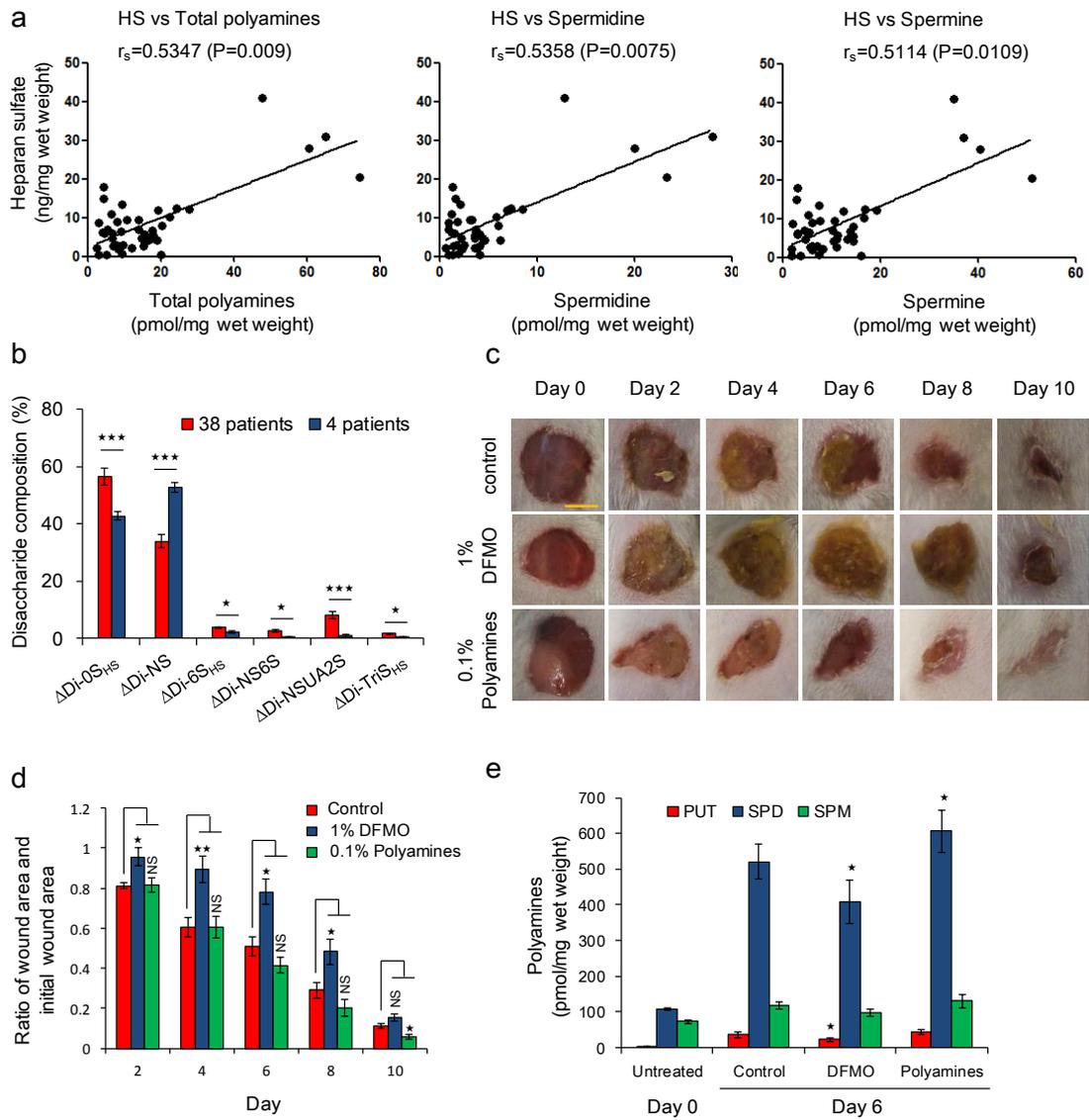
年齢と表皮または真皮に含まれるポリアミン量、GAG と年齢の相関性を評価した。表皮では加齢に伴い総ポリアミン量の減少が認められたが、真皮に含まれるポリアミン量が少ないため、真皮においてはポリアミン量と年齢に相関は認められなかった (Fig. 7; Tables 1-3)。次に、表皮または真皮に含まれる DS 量、HA 量、HS 量、DS の 4S/6S 比と年齢の相関性を調べたが、相関は認められなかった (Fig. 8; Tables 1,4-7)。

### 創傷治癒に対するポリアミンの効果

皮膚中において HS は HS プロテオグリカンであるシンデカンやパールカンとして存在し、皮膚組織の水分や強度を保持する他、創傷治癒など重要な役割を果たしている<sup>36-38</sup>。皮膚中の HS 量とポリアミン量に相関が認められたため (Fig. 5a, 6d; Tables 2-5)、HS プロテオグリカンの機能である創傷治癒にポリアミンが影響を与えることが考えられた。そこで、創傷モデルマウスを用いることで、創傷治癒に対するポリアミンの影響を検討した。創部にポリアミン生合成律速酵素 ODC の阻害剤である  $\alpha$ -difluoromethyl ornithine (DFMO) または 0.1% ポリアミン (0.075% スペルミジン、0.025% スペルミン) を添加し、創を作製してから 10 日間創の面積を観察したところ、創を作製してから 4-8 日では 1% DFMO 添加群の創傷治癒の速度が減少していた (Fig. 5c, d)。さらに、創作製直後 (day0) と創作製後 6 日が経過した創周辺の皮膚を採取し、ポリアミン定量を行うことで、創部のポリアミン量が増加しているかどうかを調べた。その結果、創作製後 6 日が経過した創部では創作製直後と比べてプトレスシン、スペルミジン量が大きく増加していた (Fig. 5e)。Mizutani らにより創傷後 12 時間で ODC の発現が誘導されることが報告されており<sup>45</sup>、創作製後 6 日でプトレスシン、スペルミジン量が大きく増加していた原因として ODC の発現量が増加していることが考えられた。また、DFMO 添加群とポリアミン添加群の創部に含まれているポリアミン量を調べたところ、DFMO 添加群ではポリアミン量が減少し、ポリアミン添加群ではポリアミン量がわずかに増加していることが確認できた (Fig. 5e)。

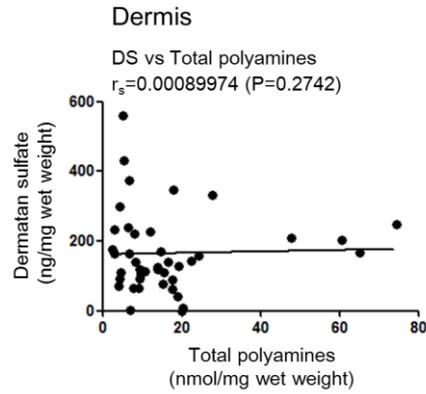
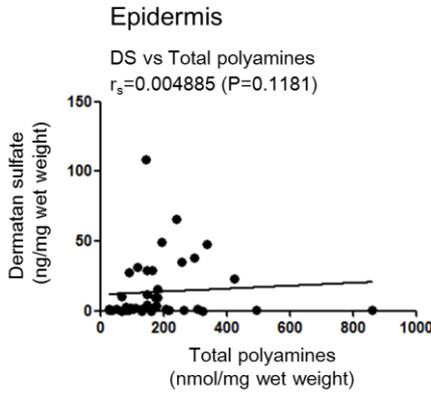


**Figure 4. Scheme of unsaturated disaccharides analysis by a reversed phase ion-pair chromatography with post-column detection.** For GAG depolymerization, sample were incubated with Chase ABC or heparinase I,II,III. After enzymatic digestion, levels and compositions of unsaturated disaccharide were determined using reversed phase ion-pair chromatography with sensitive and specific post-column detection. HPLC condition was described under Method.

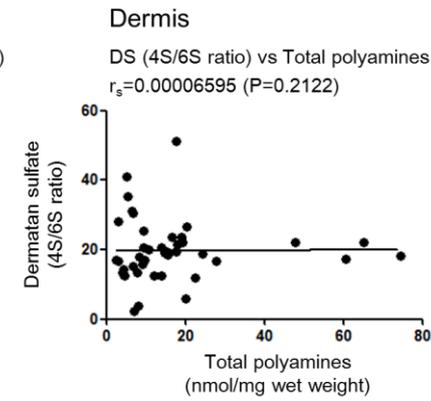
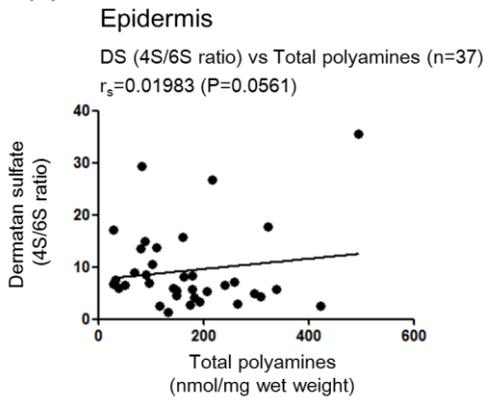


**Figure 5. Relationship between heparan sulfate and polyamines in skin.** (a) Correlation between HS and polyamine contents in human dermis. Median values of HS, total polyamines, spermidine and spermine were 6.2 ng/mg wet weight, 11.3, 3.4 and 7.8 pmol/mg wet weight, respectively. In four subjects increased levels of HS levels were well correlated with total polyamines, spermidine and spermine. Data of 42 subjects with breast reconstruction was evaluated by Spearman's rank correlation analysis ( $r_s$  and p value) using GraphPad Prism<sup>®</sup> Software (GraphPad Software). (b) Disaccharide compositions of unsaturated disaccharides of HS in dermis from four patients having a good correlation between HS and total polyamines and from other 38 patients. Data were evaluated by two-tailed unpaired Student's *t*-tests. \*\*\* $P < 0.005$ ,  $0.01 < *P < 0.05$ . (c,d) Effect of polyamines on wound healing of mouse skin. Three full thickness wounds were made in individual mouse using an 8-mm biopsy punch. After wounding, hydrophilic petrolatum only (control), hydrophilic petrolatum containing 1% DFMO or 0.1% polyamines (0.075% spermidine, 0.025% spermine) were applied to wounds every day. The scale bar shown is 5 mm. Data are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. ( $n = 6$ ). \*\* $P < 0.01$ ,  $0.01 < *P < 0.05$ , NS, not significant were determined by two-tailed unpaired Student's *t*-tests. (e) Determination of polyamine contents in wound regions (surround skin) by HPLC. PUT, putrescine; SPD, spermidine; SPM, spermine. Data are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. ( $n = 6$ ).  $0.01 < *P < 0.05$  compared to control skin.

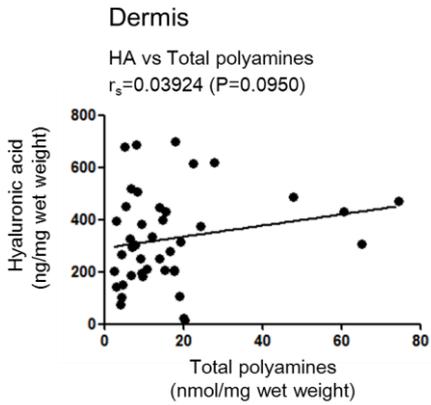
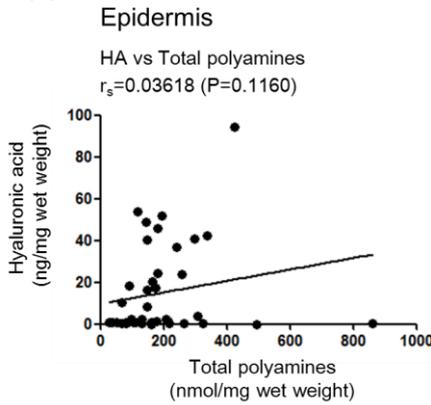
(a)



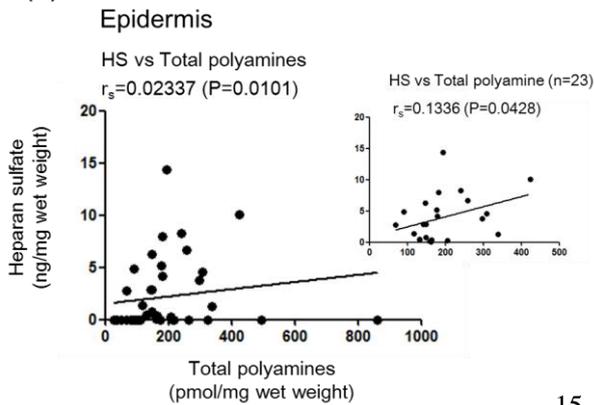
(b)



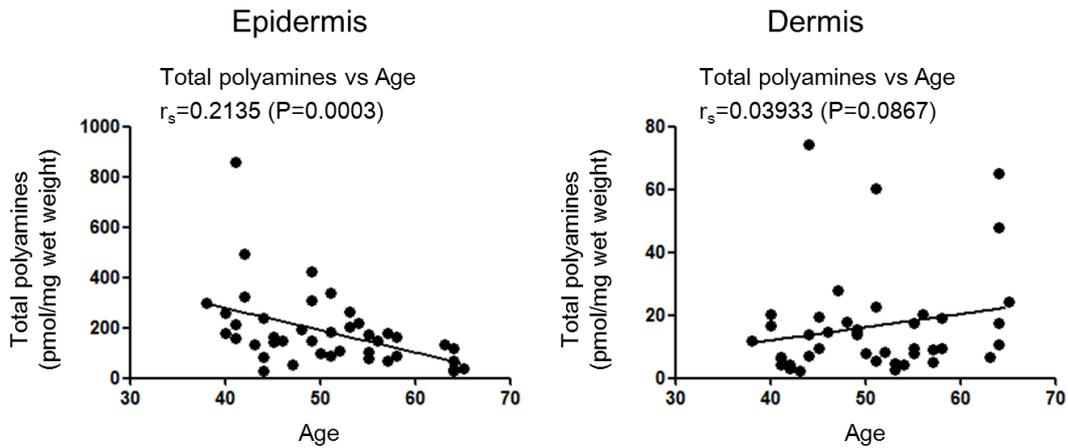
(c)



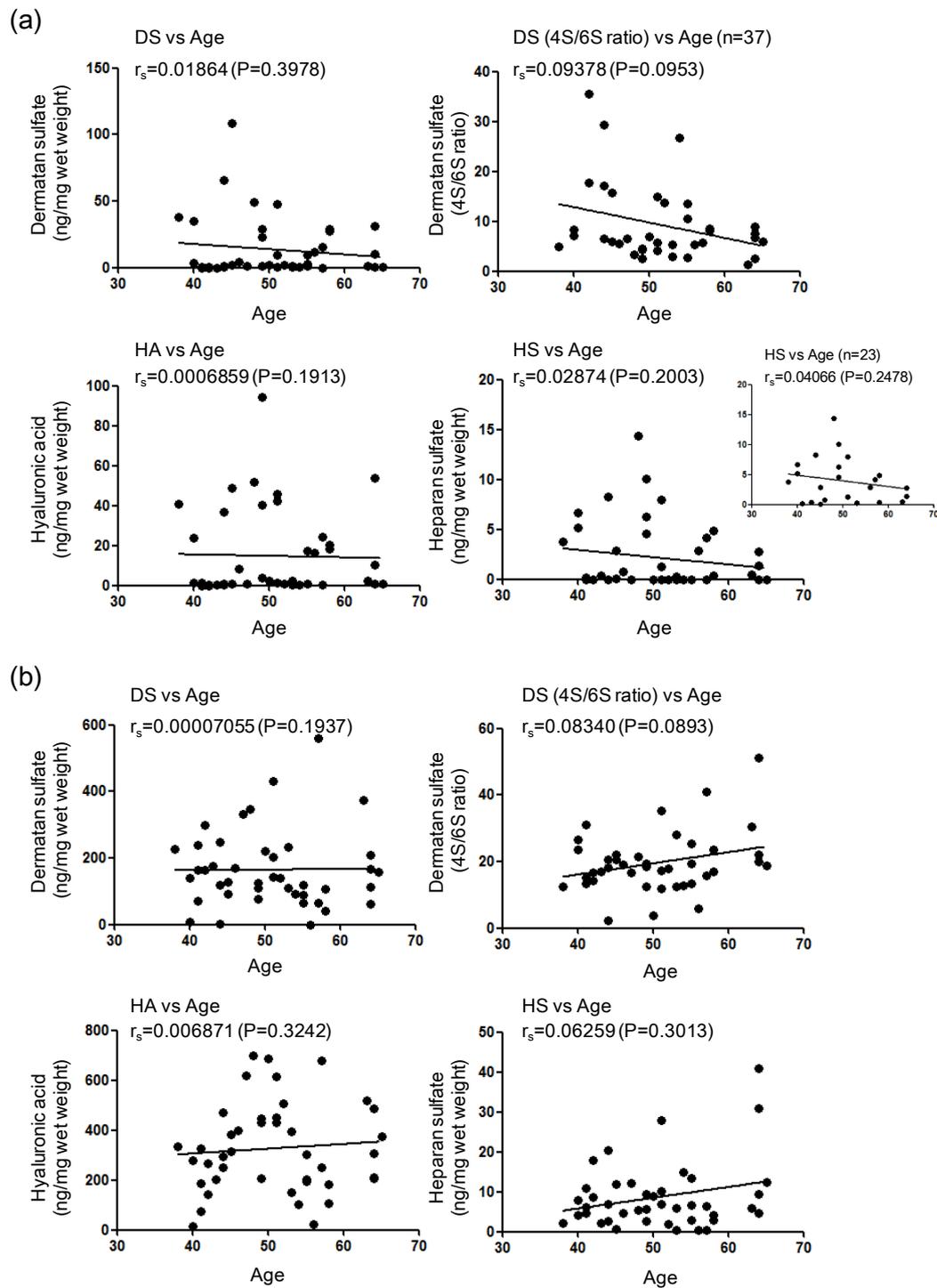
(d)



**Figure 6. Relationships between GAGs and polyamines in human skin.** Correlation between polyamines and DS **(a)**, 4S/6S ratio of DS **(b)**, HA **(c)**, or HS **(d)**. Data of 42 subjects with breast reconstruction was evaluated by Spearman's rank correlation analysis ( $r_s$  and  $p$  value) using GraphPad Prism<sup>®</sup> Software (GraphPad Software). Median values of DS, 4S/6S ratio of DS (n=37), HA (n=41) and HS in epidermis were 2.0 ng/mg wet weight, 6.6, 1.8 ng/mg wet weight and 0.2 ng/mg wet weight, respectively. In case of epidermis HS **(d)**, data of 23 subjects were also evaluated, and median value was 2.9 ng/mg wet weight. Median values of DS, 4S/6S ratio of DS and HA in dermis were 140.5 ng/mg wet weight, 18.6, 304.8 ng/mg wet weight, respectively.



**Figure 7. Relationships between polyamines and age in human skin.** Median values of polyamines in epidermis and dermis were 153.3 pmol/mg wet weight, 11.3 pmol/mg wet weight, respectively. Data of 42 subjects with breast reconstruction was evaluated by Spearman's rank correlation analysis ( $r_s$  and  $p$  value) using GraphPad Prism<sup>®</sup> Software (GraphPad Software).



**Figure 8. Relationships between GAGs and age in human epidermis (a) and dermis (b).** Data of 42 subjects with breast reconstruction were evaluated by Spearman's rank correlation analysis ( $r_s$  and  $p$  value) using GraphPad Prism<sup>®</sup> Software (GraphPad Software). In case of epidermis HS, data of 23 subjects were also evaluated.

**Table 1.** Grade of breast cancer, age of patients and wet weights of abdominal skins used in this study.

Patient No.	immediate		delayed		age	Wet weight (mg)			
	stage I	stage II	stage I	stage II		GAG epi*	GAG der**	Polyamines epi*	Polyamines der**
1				○	41	14	91	4	58
2				○	54	38	105	9	58
3				○	41	27	101	28	64
4				○	42	53	73	65	50
5		○			53	37	95	41	63
6				○	42	22	108	34	90
7				○	64	40	83	36	78
8		○			51	23	102	20	85
9				○	64	56	96	44	60
10	○				44	60	85	48	74
11				○	47	78	74	51	70
12	○				65	66	76	38	59
13			○		64	77	96	62	76
14	○				46	57	97	44	63
15				○	51	77	75	44	52
16				○	45	66	88	48	60
17				○	40	63	83	43	56
18				○	40	66	92	54	67
19		○			57	34	81	21	52
20				○	49	29	98	27	70
21		○			56	47	81	36	43
22			○		49	61	101	43	54
23				○	58	85	97	61	61
24		○			44	59	91	36	50
25				○	45	74	135	55	95
26				○	50	51	102	35	71
27				○	55	71	116	48	97
28				○	58	53	109	39	73
29				○	44	60	127	49	88
30	○				52	106	101	70	73
31			○		51	12	98	14	73
32		○			38	46	72	30	56
33				○	49	31	79	22	76
34			○		48	49	79	36	59
35				○	55	54	71	40	60
36		○			64	39	68	31	55
37				○	57	36	87	24	74
38				○	53	34	86	32	69
39	○				41	42	92	35	77
40		○			43	44	90	39	62
41				○	55	49	105	45	60
42				○	63	43	103	28	71

\*epi, epidermis, \*\*der, dermis

**Table 2.** Polyamine contents in human epidermis.

Patient No.	Polyamines (pmol/mg wet weight)			
	PUT	SPD	SPM	Total polyamine
1	ND*	33.6	179.1	212.6
2	ND*	34.4	181.7	216.1
3	ND*	102.7	755.9	858.6
4	ND*	39.2	283.7	322.9
5	ND*	27.3	236.1	263.3
6	ND*	45.8	448.3	494.1
7	ND*	4.2	22.7	27.0
8	ND*	12.7	76.1	88.8
9	ND*	5.4	26.5	31.8
10	ND*	3.5	23.5	27.1
11	ND*	5.8	45.1	50.9
12	ND*	5.0	32.5	37.6
13	ND*	6.6	61.7	68.3
14	ND*	5.3	142.5	147.9
15	ND*	21.7	315.9	337.6
16	0.5	15.3	126.2	142.0
17	ND*	10.7	166.4	177.1
18	0.3	21.7	235.6	257.6
19	ND*	13.8	164.8	178.6
20	ND*	19.6	288.1	307.8
21	ND*	8.9	138.9	147.7
22	ND*	8.3	138.9	147.2
23	ND*	7.3	82.1	89.4
24	ND*	14.7	225.3	240.0
25	ND*	10.6	150.3	160.9
26	ND*	6.5	90.1	96.6
27	ND*	4.8	75.3	80.1
28	ND*	9.6	153.2	162.7
29	ND*	7.1	74.4	81.5
30	ND*	10.7	99.4	110.2
31	ND*	7.2	174.0	181.2
32	ND*	19.3	277.1	296.4
33	ND*	25.0	397.6	422.7
34	ND*	14.5	178.4	192.9
35	ND*	13.0	161.0	174.0
36	ND*	10.8	105.2	116.1
37	ND*	5.8	62.5	68.3
38	ND*	10.8	194.5	205.3
39	ND*	9.1	149.6	158.7
40	ND*	7.9	123.2	131.1
41	ND*	6.0	96.5	102.5
42	ND*	7.0	124.1	131.0

\* ND, not detected.

**Table 3.** Polyamine contents in human dermis.

Patient No.	Polyamines (pmol/mg wet weight)			
	PUT	SPD	SPM	Total polyamine
1	ND*	1.2	2.9	4.1
2	ND*	1.6	2.7	4.3
3	ND*	2.2	4.6	6.8
4	ND*	1.3	3.0	4.3
5	ND*	1.5	3.1	4.6
6	ND*	0.9	2.0	2.9
7	ND*	12.8	35.0	47.8
8	ND*	20.0	40.4	60.4
9	ND*	28.0	37.0	65.0
10	ND*	23.3	51.1	74.4
11	ND*	8.5	19.2	27.7
12	ND*	7.3	16.8	24.2
13	ND*	4.4	13.2	17.6
14	ND*	3.6	11.0	14.7
15	ND*	5.8	16.6	22.5
16	ND*	6.9	12.4	19.3
17	ND*	6.0	14.4	20.4
18	ND*	6.2	10.4	16.6
19	ND*	3.8	5.3	9.1
20	ND*	4.1	11.0	15.2
21	ND*	4.1	16.0	20.1
22	ND*	4.1	11.2	15.3
23	ND*	4.6	14.4	19.0
24	ND*	3.7	10.2	13.9
25	ND*	1.9	7.4	9.4
26	ND*	1.8	6.1	8.0
27	ND*	1.7	6.0	7.8
28	ND*	2.5	7.1	9.6
29	ND*	1.4	5.6	7.1
30	ND*	2.3	6.0	8.3
31	ND*	0.9	4.3	5.3
32	0.2	3.6	8.2	11.9
33	ND*	3.3	10.5	13.8
34	ND*	3.6	14.3	17.9
35	ND*	3.7	13.8	17.5
36	ND*	3.1	7.5	10.6
37	ND*	1.3	3.6	5.0
38	ND*	0.9	1.9	2.8
39	ND*	1.2	5.2	6.4
40	ND*	0.6	1.9	2.4
41	ND*	2.1	7.3	9.4
42	ND*	1.4	5.2	6.6

\* ND, not detected.

**Table 4.** Level and composition of disaccharides in HS in human epidermis.

Patient No.	Unsaturated disaccharide (%)						Total amount ng/mg wet weight
	$\Delta$ Di-0S <sub>HS</sub>	$\Delta$ Di-NS	$\Delta$ Di-6S <sub>HS</sub>	$\Delta$ Di-NS6S	$\Delta$ Di-NSUA2S	$\Delta$ Di-TriS <sub>HS</sub>	
1	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
2	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
3	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
4	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
5	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
6	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
7	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
8	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
9	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
10	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
11	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
12	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
13	52.8	32.5	4.1	ND*	10.6	ND*	2.8
14	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	0.8
15	61.5	30.0	3.1	ND*	5.4	ND*	1.3
16	62.6	23.9	ND*	ND*	13.5	ND*	2.9
17	50.6	29.5	8.9	ND*	11.0	ND*	5.2
18	57.4	26.7	4.6	ND*	11.2	ND*	6.7
19	55.0	25.9	4.5	ND*	14.5	ND*	4.2
20	58.9	22.5	9.5	ND*	9.1	ND*	4.6
21	57.6	25.5	ND*	ND*	16.8	ND*	2.9
22	60.7	20.0	7.3	ND*	12.0	ND*	6.3
23	53.8	31.6	6.7	ND*	7.9	ND*	4.9
24	53.7	25.9	5.0	3.4	12.0	ND*	8.3
25	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	0.1
26	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
27	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
28	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	0.4
29	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
30	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
31	79.4	ND*	ND*	ND*	20.6	ND*	8.0
32	65.1	22.7	ND*	ND*	12.1	ND*	3.8
33	55.3	24.9	3.0	ND*	16.7	ND*	10.1
34	58.7	24.1	4.4	ND*	12.9	ND*	14.4
35	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
36	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	1.4
37	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
38	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	0.3
39	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	0.2
40	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	0.4
41	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
42	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	0.5

\* ND, not detected.

**Table 5.** Level and composition of disaccharides in HS in human dermis.

Patient No.	Unsaturated disaccharide (%)						Total amount ng/mg wet weight
	$\Delta$ Di-0S <sub>HS</sub>	$\Delta$ Di-NS	$\Delta$ Di-6S <sub>HS</sub>	$\Delta$ Di-NS6S	$\Delta$ Di-NSUA2S	$\Delta$ Di-TriS <sub>HS</sub>	
1	36.6	35.5	4.1	3.0	20.8	ND*	6.1
2	27.2	37.5	4.4	2.1	26.6	2.2	14.8
3	45.2	36.4	2.7	ND*	15.7	ND*	4.7
4	28.6	37.6	4.0	2.5	25.7	1.6	17.8
5	66.0	19.3	2.9	1.7	10.0	ND*	5.9
6	27.9	42.8	2.9	1.1	25.3	ND*	8.6
7	45.8	51.3	1.7	0.6	0.3	0.3	40.9
8	45.3	48.7	3.0	0.5	1.7	0.7	27.8
9	39.7	55.3	2.5	0.4	1.2	0.9	30.8
10	40.5	55.8	2.1	0.6	0.5	0.5	20.4
11	43.9	52.3	1.8	1.0	1.0	ND*	12.1
12	49.8	48.4	1.7	ND*	ND*	ND*	12.4
13	64.4	25.2	5.6	ND*	4.8	ND*	4.7
14	57.3	32.8	4.0	ND*	5.9	ND*	4.7
15	74.4	18.4	1.7	0.5	5.0	ND*	10.1
16	60.5	29.4	3.6	1.9	4.6	ND*	12.0
17	50.3	40.9	5.4	ND*	3.4	ND*	8.0
18	58.3	34.1	3.9	ND*	3.7	ND*	4.1
19	66.0	24.6	5.5	ND*	3.9	ND*	6.3
20	87.2	ND*	4.8	2.4	5.6	ND*	2.7
21	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	0.5
22	65.3	25.8	4.3	ND*	4.6	ND*	5.6
23	66.5	31.5	1.9	ND*	ND*	ND*	4.2
24	60.5	28.8	1.3	2.9	6.5	ND*	6.8
25	14.7	85.3	ND*	ND*	ND*	ND*	0.6
26	55.0	32.8	9.0	ND*	3.2	ND*	8.8
27	68.5	26.2	5.3	ND*	ND*	ND*	2.9
28	54.1	35.9	3.0	2.3	4.8	ND*	3.0
29	56.7	6.9	7.0	15.4	14.1	ND*	2.6
30	80.2	19.8	ND*	ND*	ND*	ND*	2.0
31	52.3	38.9	3.7	ND*	5.1	ND*	6.8
32	91.8	6.5	1.7	ND*	ND*	ND*	2.2
33	65.1	23.1	3.7	1.5	6.6	ND*	9.4
34	61.8	25.2	2.7	3.7	6.6	ND*	5.4
35	75.3	21.7	1.3	ND*	1.7	ND*	6.7
36	60.5	28.4	4.3	0.8	6.1	ND*	9.3
37	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	0.4
38	51.1	48.9	ND*	ND*	ND*	ND*	0.3
39	46.8	47.7	3.4	ND*	2.1	ND*	10.9
40	43.9	50.3	5.8	ND*	ND*	ND*	2.1
41	45.2	45.7	3.2	1.7	4.2	ND*	13.4
42	46.4	43.8	3.3	1.5	5.1	ND*	5.8

\* ND, not detected.

**Table 6.** Level and composition of disaccharides in DS and HA in human epidermis.

Patient No.	Unsaturated disaccharide (%)								4S/6S ratio	Total amount of DS ng/mg wet weight	HA level ng/mg wet weight
	ΔDi-0S	ΔDi-4S	ΔDi-6S	ΔDi-UA2S	ΔDi-diS <sub>E</sub>	ΔDi-diS <sub>B</sub>	ΔDi-diS <sub>D</sub>	ΔDi-TriS			
1	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	-	0.8	1.3
2	73.3	26.7	1.0	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	26.7	0.2	0.2
3	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	-	0.2	0.2
4	82.3	17.7	1.0	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	17.7	0.1	0.1
5	70.9	21.8	7.4	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	3.0	0.7	0.5
6	64.4	35.6	1.0	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	35.6	0.2	0.0
7	69.1	26.9	4.0	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	6.8	0.7	0.6
8	85.1	14.9	1.0	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	14.9	0.5	1.5
9	77.5	19.9	2.6	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	7.6	0.4	1.0
10	48.6	39.5	2.3	ND*	ND*	9.6	ND*	ND*	17.1	0.9	0.7
11	56.0	32.5	5.0	ND*	ND*	6.5	ND*	ND*	6.5	1.0	1.0
12	67.4	27.9	4.7	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	5.9	0.4	0.6
13	59.3	28.5	3.2	ND*	ND*	9.1	ND*	ND*	9.0	10.3	10.3
14	73.3	19.4	3.5	ND*	ND*	3.9	ND*	ND*	5.6	4.5	8.5
15	56.5	29.1	5.0	ND*	ND*	8.8	0.6	ND*	5.8	47.4	42.3
16	40.3	41.1	6.9	ND*	ND*	11.1	0.7	ND*	6.0	108.7	49.0
17	36.8	42.8	5.1	ND*	ND*	15.3	ND*	ND*	8.4	3.2	1.2
18	49.6	35.6	5.0	ND*	ND*	9.3	0.6	ND*	7.2	35.1	23.6
19	70.2	20.0	3.5	ND*	ND*	5.6	0.6	ND*	5.7	15.2	24.2
20	84.5	12.6	2.9	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	4.3	1.1	3.9
21	67.4	20.8	3.9	ND*	ND*	7.4	0.6	ND*	5.4	11.8	16.5
22	67.1	21.9	4.8	ND*	ND*	5.6	0.6	ND*	4.6	29.2	40.5
23	49.0	35.5	4.1	ND*	ND*	11.0	0.5	ND*	8.6	27.5	18.3
24	42.2	39.1	5.9	ND*	ND*	12.1	0.7	ND*	6.6	65.8	36.6
25	43.7	41.7	2.7	ND*	ND*	11.9	ND*	ND*	15.7	2.0	0.9
26	65.3	26.5	3.8	ND*	ND*	4.5	ND*	ND*	6.9	1.9	2.1
27	34.3	51.7	3.8	ND*	ND*	10.1	ND*	ND*	13.5	2.7	0.9
28	53.8	34.6	4.2	ND*	ND*	7.0	0.4	ND*	8.2	28.7	20.3
29	49.3	45.0	1.5	ND*	ND*	4.1	ND*	ND*	29.3	0.7	0.4
30	38.5	44.3	3.2	ND*	ND*	14.0	ND*	ND*	13.8	2.3	0.9
31	88.8	9.0	2.2	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	4.2	9.8	45.9
32	60.6	27.6	5.5	ND*	ND*	5.9	0.4	ND*	5.0	37.7	40.7
33	85.1	9.4	3.8	ND*	ND*	1.7	ND*	ND*	2.5	23.2	94.2
34	60.5	24.6	7.3	ND*	ND*	6.9	0.6	ND*	3.4	49.1	51.9
35	72.9	16.8	6.0	ND*	ND*	3.6	0.7	ND*	2.8	9.4	17.2
36	71.2	17.6	7.1	ND*	ND*	3.6	0.4	ND*	2.5	31.4	54.0
37	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	-	0.1	0.4
38	74.7	21.3	4.0	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	5.3	1.5	2.4
39	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	-	ND*	ND*
40	100	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	-	0.04	0.3
41	49.0	33.5	3.2	ND*	ND*	14.3	ND*	ND*	10.6	1.6	0.9
42	87.2	7.4	5.4	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	1.4	0.9	2.5

\* ND, not detected.

**Table 7.** Level and composition of disaccharides in DS and HA in human dermis.

Patient No.	Unsaturated disaccharide (%)								4S/6S ratio	Total amount of DS ng/mg wet weight	HA level ng/mg wet weight
	ΔDi-0S	ΔDi-4S	ΔDi-6S	ΔDi-UA2S	ΔDi-diS <sub>E</sub>	ΔDi-diS <sub>B</sub>	ΔDi-diS <sub>D</sub>	ΔDi-Tris			
1	63.4	25.3	1.9	ND*	ND*	9.3	ND*	ND*	13.3	69.7	75.8
2	65.1	23.6	1.8	ND*	ND*	9.4	ND*	ND*	12.8	92.8	104.4
3	64.0	24.0	1.6	ND*	ND*	10.2	0.2	ND*	15.1	162.8	184.9
4	58.0	28.9	2.0	ND*	ND*	10.7	0.3	ND*	14.2	300.4	265.5
5	68.8	20.8	1.6	ND*	ND*	8.6	0.2	ND*	12.6	110.0	149.1
6	56.9	31.8	1.9	ND*	ND*	9.2	0.2	ND*	16.8	163.3	141.7
7	75.1	20.3	0.9	ND*	ND*	3.6	ND*	ND*	22.0	208.8	487.7
8	73.3	20.9	1.2	ND*	ND*	4.4	0.2	ND*	17.3	203.0	429.7
9	70.3	24.1	1.1	ND*	ND*	4.5	ND*	ND*	22.2	167.2	305.0
10	71.0	23.3	1.3	ND*	ND*	4.3	0.1	ND*	18.2	248.6	468.9
11	70.8	22.9	1.4	ND*	ND*	4.8	0.2	ND*	16.7	333.0	618.1
12	75.5	19.4	1.0	ND*	ND*	4.0	0.1	ND*	18.9	157.4	374.3
13	81.8	11.6	0.2	ND*	ND*	6.3	ND*	ND*	51.3	61.1	204.8
14	75.6	17.8	0.9	ND*	ND*	5.7	ND*	ND*	19.1	168.8	397.5
15	85.1	10.2	0.9	ND*	ND*	3.8	ND*	ND*	11.8	142.4	616.3
16	76.3	18.3	0.8	ND*	ND*	4.5	ND*	ND*	22.2	127.8	315.6
17	70.9	21.7	0.8	ND*	ND*	6.5	ND*	ND*	26.5	8.8	16.2
18	72.8	20.7	0.9	ND*	ND*	5.6	ND*	ND*	23.5	141.4	277.1
19	83.6	11.1	0.7	ND*	ND*	4.6	ND*	ND*	15.7	65.8	252.4
20	79.2	16.4	0.8	ND*	ND*	3.6	ND*	ND*	19.5	75.8	205.3
21	99.4	0.6	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	5.8	0.2	21.8
22	83.7	11.7	0.6	ND*	ND*	3.9	ND*	ND*	18.4	110.6	432.5
23	77.1	16.4	0.7	ND*	ND*	5.8	ND*	ND*	23.6	42.1	107.7
24	73.5	18.5	0.9	ND*	ND*	6.8	0.3	ND*	20.5	119.2	249.4
25	85.1	11.9	0.6	ND*	ND*	2.3	0.1	ND*	20.6	91.3	384.2
26	81.1	14.4	3.6	ND*	ND*	0.9	ND*	ND*	3.9	221.1	686.5
27	86.2	11.1	0.8	ND*	ND*	1.9	ND*	ND*	13.3	65.8	304.6
28	69.7	24.3	1.4	ND*	ND*	4.6	ND*	ND*	17.0	106.5	183.8
29	99.8	0.2	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	2.2	0.8	294.8
30	83.1	12.6	0.7	ND*	ND*	3.6	ND*	ND*	17.8	139.5	506.1
31	58.6	31.1	0.9	ND*	ND*	9.5	ND*	ND*	35.4	431.8	448.9
32	66.7	25.4	2.0	ND*	ND*	5.8	ND*	ND*	12.6	226.4	333.7
33	82.9	12.6	1.0	ND*	ND*	3.3	0.1	ND*	12.4	123.8	444.8
34	73.2	20.3	0.9	ND*	ND*	5.6	ND*	ND*	21.5	346.3	700.6
35	75.5	18.5	1.0	ND*	ND*	5.0	ND*	ND*	19.4	88.4	201.1
36	71.5	21.1	1.1	ND*	ND*	6.3	ND*	ND*	19.9	112.8	209.3
37	61.9	30.5	0.7	ND*	ND*	6.8	ND*	ND*	41.1	559.1	677.3
38	69.6	24.6	0.9	ND*	ND*	5.0	ND*	ND*	28.1	232.9	395.3
39	65.2	27.5	0.9	ND*	ND*	6.5	ND*	ND*	31.0	237.9	327.7
40	60.8	31.6	1.9	ND*	ND*	5.7	ND*	ND*	16.9	176.0	202.8
41	68.4	25.9	1.0	ND*	ND*	4.7	ND*	ND*	25.5	120.0	193.6
42	65.0	27.8	0.9	ND*	ND*	6.3	ND*	ND*	30.6	374.1	520.2

\* ND, not detected.

## 2-3. 考察

本章ではヒトの皮膚中に含まれる GAG とポリアミンの測定を行い、加齢、GAG の存在量、GAG の組成、ポリアミン量に相関があるかどうかを検討した。まず、乳房再建術を行った時期、癌の進行度によって GAG の二糖組成が影響を受けるかを調べた。その結果、GAG の二糖組成は各ステージで同じであり (Tables 1, 4-7)、且つこれまでに報告された皮膚における DS 及び HS 二糖組成と同じであった<sup>15,17</sup>。本研究では癌組織から離れた腹部の皮膚を癌治療後に採取したものをを用いているため、その性質は健常な皮膚と変わらないと考えられる。続いて、表皮または真皮に含まれる GAG 量 とポリアミン量の相関性を評価したところ、HS 量は総ポリアミン量、スぺルミジン量、スぺルミン量との正の相関が認められた (Fig. 5a, 2d; Tables 2-5)。さらに、年齢と皮膚中に含まれるポリアミン量との相関を解析したところ、表皮において年齢と皮膚中に含まれるポリアミン量に相関が認められた (Fig. 7; Tables 1, 2)。一方、年齢が GAG の発現量と組成に与える影響を調べたところ、加齢による GAG の発現量および組成変化は認められなかった (Fig. 8; Tables 1, 4-7)。しかしながら、加齢により GAG の構造が変化することが既に報告されており<sup>12,14</sup>、本研究で用いた 42 検体は年齢が 40~60 歳の間集中していたため (Table 2)、加齢による GAG への影響が十分に評価できなかった可能性が考えられた。

皮膚中の HS 量とポリアミン量に相関が認められたことから、HS プロテオグリカンの機能である創傷治癒にポリアミンが影響を与えていると考え、創傷モデルマウスを用いることで、創傷治癒に対するポリアミンの影響を検討した。その結果、ポリアミン量の減少に伴い皮膚の創傷治癒の速度が減少しており、ポリアミンは HS プロテオグリカンの機能に影響を与えていた (Fig. 5c, d)。すなわち、HS プロテオグリカンの成熟にはポリアミンが必要であることが示唆された。

### 3.HS 生合成に対するポリアミンの効果

HS はウロン酸 (D-グルクロン酸: GlcA、L-イズロン酸: IdoA )と *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc)が交互に結合し、各糖水酸基の一部に硫酸基が付加した二糖繰り返し構造から成る直鎖の酸性多糖である<sup>1</sup>。HS 生合成の模式図を Fig. 9 に示す。HS の生合成は蛋白質セリン残基に付加された橋渡し領域 (キシロース、ガラクトース、ガラクトース、グルクロン酸) に EXTL3 が GlcNAc を付加することから始まる<sup>2,4</sup>。続いて、EXT1/EXT2 ヘテロダイマーが GlcA と GlcNAc を付加することで HS を伸長する。また、EXTL2 による橋渡し領域への GlcNAc 付加が起きると HS 合成が阻害される<sup>46</sup>。加齢に伴い HS 量が減少することが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかとされてはいない<sup>16,17</sup>。

第一章ではポリアミン量が加齢により減少することから、ポリアミンに注目し、皮膚中に含まれる HS 量とポリアミン量に正の相関が存在することを明らかとした。そのため第二章では HS とポリアミンの関係性に焦点を当て、培養細胞を用いてさらなる解析を行った。

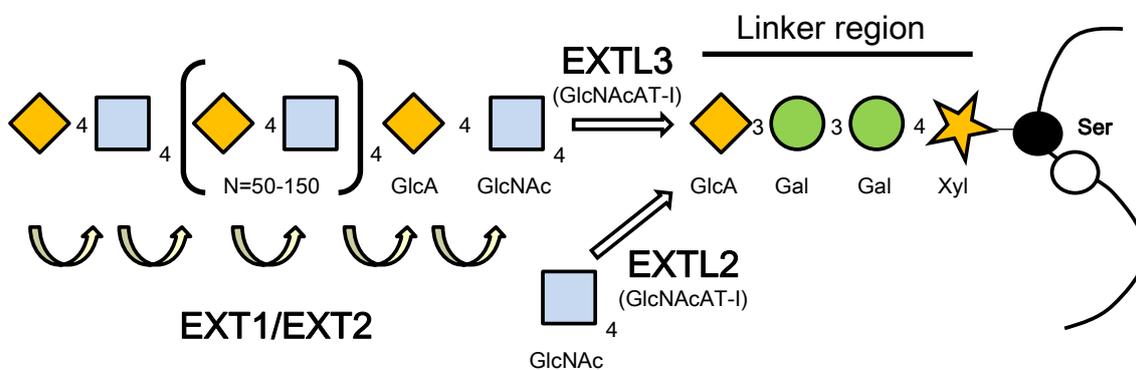


Figure 9. Conventional scheme for HS biosynthetic machineries

### 3-1.実験方法

#### 1) 細胞培養

Neuro2a 細胞は神戸薬科大学 生化学研究室 北川裕之 教授の御好意により分与していた。U2OS 細胞は東京慈恵医科大学大学院 分子生物学講座 村井法之講師の御好意により分与していただいた。HCT116 細胞は千葉大学大学院 薬学研究院 分子細胞生物学研究室 山口 直人教授、講師 福本泰典先生の御好意により分与していただいた。PANC-1 細胞、MCF-7 細胞、CCF-STTG1 細胞は千葉大学大学院 薬学研究院 薬物学研究室 助教 降幡知巳先生の御好意により分与していただいた。A549 細胞は千葉大学大学院 薬学研究院 薬効薬理学研究室 助教 中村浩之先生の御好意により分与していただいた。培養は 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培地は、CHO 細胞においては MEM $\alpha$ 、その他の細胞においては DMEM に 10% FBS、100 倍希釈した Penicillin、Streptomycin を添加したものをを用いた。FBS、Penicillin、Streptomycin は GIBCO より購入した。培養を開始してから 12 時間後に DFMO を添加し、3 日間培養することでポリアミン量を減少させた。Table 10 にそれぞれの細胞株に添加した DFMO の最終濃度を示す。スペルミジンの分解を防ぐため、amine oxidase 阻害剤であるアミノグアニジン (1 mM) とスペルミジン (25  $\mu$ M) を培地に添加し、3 日間培養することで細胞内ポリアミン量を回復させた。Deoxyhypusine synthase 阻害剤である N<sup>1</sup>-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC<sub>7</sub>) は National Institutes of Health Dr. M. H. Park 御好意により分与していただいた。

#### 2) 細胞内ポリアミン定量及び HS 二糖組成分析

培養した細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (137 mM 塩化ナトリウム、2.7 mM 塩化カリウム、10 mM リン酸水素二ナトリウム、1.8 mM リン酸二水素カリウム、pH 7.4) を用いて洗浄した。次に PBS を 1 mL 加え、セルスクレーパーを用いて接着している細胞を回収した後、細胞懸濁液をエッペンチューブに移した。遠心分離を行い、上清を除いた後に PBS 1mL を加えた。

ポリアミン定量のためのサンプルとして細胞懸濁液から 40  $\mu$ L 採取し、遠心分離した後、得られた細胞に 5% トリクロロ酢酸 (TCA) を 100  $\mu$ L 加え懸濁した。遠心分離して蛋白質を沈殿

させ得られた上清をポリアミン画分とした。ポリアミン定量は上記と同様の方法で行った。沈殿した蛋白質は 20  $\mu$ L の 0.1 M 水酸化ナトリウムに溶解させ、lowry 法により蛋白質定量を行った<sup>41</sup>。

HS の二糖組成分析に用いる細胞は、細胞懸濁液 960  $\mu$ l を遠心分離し、上清を除いた後に凍結乾燥を行って調製した。その後、上記と同様の方法で HS を精製し、二糖組成分析を行った。

### 3) Western Blotting

Western Blotting は Nielsen らの方法に従い行った<sup>47</sup>。細胞を lysis buffer [5 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.25 M スクロース、1 mM EDTA、1 mM DTT、20  $\mu$ M FUT-175、1% Triton X-100] で懸濁し、超音波で細胞を破碎した。調製した細胞溶解液 (10~30  $\mu$ g) を用いて SDS-PAGE を行った。電気泳動後、30 V 定電圧で Invitrolon PVDF (Invitrogen) に転写した。メンブレンは 5% skim milk により室温で 60 分間ブロッキング後、一次抗体を室温、60 分で反応させ、二次抗体を室温で 30 分間反応させた。一次抗体および二次抗体の希釈は TBST またはシグナル増強剤 HIKARI (nacalai tesque) を用いて行った。Table 8 に使用した抗体を示す。メンブレンに ECLTM Western blotting detection reagents (GE Healthcare) または ECL select (GE Healthcare) を反応させ、LAS-4000 (GE Healthcare) で蛋白質を検出した。蛋白質定量は Bradford 法により行った<sup>48</sup>。

### 4) PCR による mRNA と let-7b の検出

RNA の抽出は、付属のプロトコールに従い細胞から RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。その後、抽出した RNA に RQ1 RNase-Free DNase (Promega) を用い、付属のプロトコールに従って DNA を分解した。DNA を分解した後、Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-5 membrane (Millipore) を用いて RNA を精製した。1st strand buffer (40  $\mu$ l) 中に RNA 3.5  $\mu$ g、50  $\mu$ g/mL Oligo (dT)18 primer、10 mM DTT、50  $\mu$ M dNTPs 及び SuperScript® II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を添加し 42 °C、50 分間反応を行うことで cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として用い、Blend Taq® (TOYOBO) により PCR 反応を行った。PCR に用いたプライマーを Table 9 に示す。バンドの定量は Image J imaging software により行った。

let-7b の定量に用いる RNA は miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用い、付属のプロトコールに従って抽出した。得られた miRNA から Mir-XTM miRNA First-Strand synthesis kit (Takara Bio) を用い、付属のプロトコールに従ってポリアダニル化、cDNA の合成を行った。real-time RT-PCR は得られた cDNA を鋳型として、SYBR Advantage qPCR Premix (Takara Bio) を用い、付属のプロトコールに従って行った。PCR に用いたプライマーを Table 9 に示す。発現量は  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法により計算した。

## 5) プラスミドの作製

NIH3T3 細胞より上記の方法に従い RNA を抽出した。その後、Super Script<sup>®</sup>III 逆転写酵素を用いて RNA 2  $\mu$ g から 42°C、60 分間反応させることで cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型とし、PCR 反応を行うことで EXT1 (2270 bp)、EXT2 (336 bp)、EXTL3 (2790 bp) の遺伝子配列を増幅した。プライマーは EXT1 の増幅に P3 と P4 を、EXT2 の増幅に P1 と P2 を、EXTL3 の増幅に P5 と P6 をそれぞれ用いた。pEXT2-EGFP、pEXT2-EGFP 変異体、pcDNA3.1/EXT1-myc-His、pcDNA3.1/EXTL3-myc-His の作製に用いたプライマーは Table 9 に示す。増幅した EXT2 遺伝子 (5'-UTR 212 bp、N 末端アミノ酸コード領域 104 bp) 及び pEGFP-N1 (Clontech) を EcoRI 及び BamHI で切断した。EXT1 遺伝子は BamHI 及び EcoRI で切断し、EXTL3 遺伝子は KpnI 及び XhoI で切断し、同じ制限酵素サイトで pcDNA3.1-myc-His A (Thermo Fisher Scientific) を切断した。アガロースゲルによる分離並びに精製を行った後、精製した PCR 産物およびベクターを DNA ligation kit (TaKaRa) を用いてライゲーションさせた。pEXT2 (AUGG)-EGFP、pEXT2 (AUGA)-EGFP、pEXT2 (AUGC)-EGFP、pEXT2 (CCAUGU)-EGFP、pEXT2 (CCAUGG)-EGFP、pEXT2 (GCCACCAUGU)-EGFP、pEXT2 ( $\Delta$ -204-169)-EGFP、pEXT2 ( $\Delta$ -167-9)-EGFP、pEXT2 ( $\Delta$ -204-9)-EGFP、pEXT2 (NC-167-162)-EGFP、pEXT2 (NC-16-9)-EGFP、pEXT2 (NC-37-29)-EGFP、pEXT2 ( $\Delta$ 5-22)-EGFP、pEXT2 ( $\Delta$ 28-87)-EGFP、pEXT2 ( $\Delta$ 25-51)-EGFP、pEXT2 ( $\Delta$ 40-66)-EGFP、pEXT2 ( $\Delta$ 57-86)-EGFP、pEXT2 (Mut61-82)-EGFP、pEXT2 (Mut67-71)-EGFP、pEXT2 (Mut63-79)-EGFP の作製は pEXT2-EGFP を鋳型とし、Table 9 に示したプライマーを用いて PCR を行うことで作製した。pEXT2 (SD-20)-EGFP、pEXT2 (SD-10)-EGFP は pEXT2 (NC-37-29)-EGFP pEXT2-EGFP を鋳型とし、Table 9 に示したプライマーを用いて PCR を行うことで作製した。得られたプラスミドは DNA ligation kit (Takara) を用

いて、ライゲーションを行った。プラスミドのクローニングは大腸菌 DH5 $\alpha$ を用い、QIAGEN から購入した QIAGEN plasmid kit を使用することでプラスミドを精製した。作製したプラスミドは DNA シークエンスサービス (Eurofins Genomics) により塩基配列を確認した。mRNA のコンピューターによるコンフォメーションの予測は Zuker らの方法に従った<sup>49</sup>。

#### 6) プラスミド、miRNA 阻害剤の細胞への形質導入

EXT2-EGFP プラスミドの細胞への形質導入は Fukumoto らの方法に従った<sup>50</sup>。NIH3T3 細胞 ( $1.2 \times 10^5$  cells)を 12 時間培養し、DFMO を濃度が 5 mM となるよう培地に添加した。12 時間後、5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  のポリエチレンイミン (Polysciences) 1.2  $\mu\text{L}$ 、1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  のプラスミド 1  $\mu\text{L}$  をそれぞれ LBS (20 mM 乳酸、150 mM NaCl、pH4.0) 50  $\mu\text{L}$  に溶解させた。ポリエチレンイミン溶液とプラスミド溶液を混合し、室温、20 分間静置した後、Opti-MEMI を 500  $\mu\text{L}$  加えた。培地を交換し、DFMO を濃度が 5 mM となるよう培地に添加した後、得られたポリエチレンイミン/プラスミド溶液を 600  $\mu\text{L}$  培地に添加した。8 時間後、培地を交換し、DFMO を濃度が 5 mM となるよう培地に添加した。16 時間培養後、細胞を回収した。

let-7b に対する阻害剤として miRCURY LNA Inhibitor let-7b (ACCACACAACCTACTACCTC)、ネガティブコントロールとして miRCURY LNA Inhibitor Control Negative control A (TAACACGTCTATACGCCCA) (EXIQON) を用いた。NIH3T3 細胞への形質導入には Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用い、付属のプロトコールに従って行った。

#### 7) Ago 抗体を用いた miRNA/mRNA/Ago 複合体の免疫沈降

miRNA/mRNA/Ago 複合体の免疫沈降は miRNA Target IP kit (Active Motif) を用い、付属のプロトコールに従って行った。Protein G 共役磁気ビーズ (25  $\mu\text{L}$ )と 100  $\mu\text{L}$  の BSA 溶液を 10 分間混合した後に、遠心分離によりビーズを回収した。2.5  $\mu\text{g}$  の Ago 抗体または IgG 抗体を含む洗浄バッファー 50  $\mu\text{L}$  とビーズを 30 分間混合することで Ago 抗体の結合した Protein G 共役磁気ビーズを調製した。NIH3T3 細胞は 5 mM DFMO の有無で 3 日間培養した。細胞 ( $1 \times 10^7$ )を 150  $\mu\text{L}$  の lysis buffer に溶解させ、-80  $^{\circ}\text{C}$ で冷凍させることで細胞を破碎した。15,000 x g で遠心分離を行い、70  $\mu\text{L}$  の上清を Ago 抗体または IgG 抗体が結合した磁気ビーズを含む immunoprecipitation buffer 450  $\mu\text{L}$  に加え、4  $^{\circ}\text{C}$ 、16 時間で免疫沈降を行

った。ビーズを洗浄バッファーで洗浄した後、55 °C、30 分間プロテイナーゼ K と反応させることで RNA を回収した。cDNA の合成と real-time RT-PCR は上記と同様の方法で行った。IgG 抗体により免疫沈降を行った試料をネガティブコントロールとして用いた。

**Table 8.** List of antibodies.

Antibody	Supplier	Species	Dilution
EXT1	ABGENT	Rabbit Polyclonal	1:2000
EXT2	Santa Cruz Biotechnology	Goat Polyclonal	1:2000
EXTL2	Abcam	Rabbit Polyclonal	1:2000
EXTL3	Abcam	Rabbit Polyclonal	1:2000
$\beta$ -actin	Abcam	Mouse Monoclonal	1:4000
eIF5a	Our group Biochem J 385, 779-785, doi:10.1042/BJ20041477 (2005)	Rabbit Polyclonal	1:2000
Hypusinated eIF5A	Dr. R. G. Mirmira Springerplus 2, 421, doi:10.1186/2193-1801-2-421 (2013)	Rabbit Polyclonal	1:2000
EGFP	Takara Bio	Rabbit Polyclonal	1:2000
GAPDH	GeneTex	Rabbit Polyclonal	1:2000
C4ST1	AVIVA SYSTEMS BIOLOGY	Rabbit Polyclonal	1:2000
C4ST2	ATLAS ANTIBODIES	Rabbit Polyclonal	1:2000
GalNAc4S-6ST	LifeSpan BioSciences	Rabbit Polyclonal	1:2000
CHSY1	Abcam	Rabbit Polyclonal	1:2000
CHSY2	Abcam	Rabbit Polyclonal	1:2000
CHSY3	MyBioSource	Rabbit Polyclonal	1:2000
CHPF	MyBioSource	Rabbit Polyclonal	1:2000

**Table 9.** List of primers.

No.	Primer used	Nucreotide sequence
Semi-quantitative RT-PCR		
P#1	5'-EXT1	5'-TCCTGGAGGATTGTTCTGTC-3'
P#2	3'-EXT1	5'-TAGCAGCTCCTGTCAACAC-3'
P#3	5'-EXT2	5'-GCTGTGAAGTGGGCTAGTGTGAGC-3'
P#4	3'-EXT2	5'-ATACTTCCACTTGTTCATCTCGTG-3'
P#5	5'-EXTL3	5'-CTGCGGCCTGCCGACCTTGAAA-3'
P#6	3'-EXTL3	5'-CAGAGACTCGATCTTCTCGCCCT-3'
P#7	5'-mouse- $\beta$ -actin	5'-AGGTGACAGCATTGCTTCTG-3'
P#8	3'-mouse- $\beta$ -actin	5'-GCTGCCTCAACACCTCAAC-3'
P#9	5'-EGFP	5'-ACGTAAACGGCCACAAGTTC-3'
P#10	3'-EGFP	5'-AAGTCGTGCTGCTTCATGTG-3'
P#11	5'-C4ST1	5'-AAGTATGTTGCACCCAGTCATGC-3'
P#12	3'-C4ST1	5'-TTCAAGCGGTGGTTGATTTCTGG-3'
P#13	5'-C4ST2	5'-GTGTCCCTTCGCCAACTTCAT-3'
P#14	3'-C4ST2	5'-TTCCCCACGAAGTCGTAGTC-3'
P#15	5'-C6ST1	5'-GACTTTGTGCACAGCCTGAA-3'
P#16	3'-C6ST1	5'-AGAGCTTGGGGAATCTGCTT-3'
P#17	5'-C6ST2	5'-GGGGCAATCTGTCACACTCT-3'
P#18	3'-C6ST2	5'-AGGATGCCTTGTTGAAATGG-3'
P#19	5'-CHSY1	5'-AGTGTGTCTGGTCTTATGAGATGCA-3'
P#20	3'-CHSY1	5'-AGCTGTGGAGCCTGTACTGGTAG-3'
P#21	5'-human- $\beta$ -actin	5'-CACTCTTCCAGCCTTCCTCCTG-3'
P#22	3'-human- $\beta$ -actin	5'-TAGTCCGCTAGAAGCATTGCG-3'
Real-Time quantitative RT-PCR		
P#23	5'-let-7b	5'-TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT-3'
P#24	mRQ 3' Primer	Mir-X miNA First-Strand Synthesis Kit (Takara Bio Inc.)
P#25	5'-EXT2	5'-CGGCTTCAACCCAAAGAACA-3'
P#26	3'-EXT2	5'-GTCAATGGAGGGGACGAACA-3'
P#7	5'- $\beta$ -actin	5'-AGGTGACAGCATTGCTTCTG-3'
P#8	3'- $\beta$ -actin	5'-GCTGCCTCAACACCTCAAC-3'
P#27	5'-GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
P#28	3'-GAPDH	5'-GCCAATACGACCAAATCC-3'
P#29	U6 Forward Primer	Mir-X miNA First-Strand Synthesis Kit (Takara Bio Inc.)
P#30	U6 Reverse Primer	Mir-X miNA First-Strand Synthesis Kit (Takara Bio Inc.)
EXT2-EGFP fusion plasmids		
P1	5'-EXT2	5'-CAGAATTCAGTGCGCGCCGTGTCAGCCG-3'
P2	3'-EXT2	5'-GCTATGGGATCCAGGAGGACGATGGAG-3'
P7	5'-EXT2 ( $\Delta$ -204-169)	5'-ATTCAGTGCGCGCTTCCCCGCTGGCTCCAGGGTAC-3'
P8	3'-EXT2 ( $\Delta$ -204-169)	5'-CCAGCGGGGAAGCGCGCACTGAATTCGAAGCTTGAG-3'
P9	5'-EXT2 ( $\Delta$ -167-9)	5'-GCCGCGCAGGCGTTTCATTATGTGTGCGTCAGTC-3'
P10	3'-EXT2 ( $\Delta$ -167-9)	5'-ACATAATGAAACGCCTGCGCCGGCTCCAGTTCCC-3'
P11	5'-EXT2 ( $\Delta$ -204-9)	5'-ATTCAGTGCGCGGTTTCATTATGTGTGCGTCAGTC-3'
P12	3'-EXT2 ( $\Delta$ -204-9)	5'-ACATAATGAAACCGCGCACTGAATTCGAAGCTTGAG-3'
P13	5'-EXT2 (AUG <u>G</u> )	5'-TTCATTATGGGTGCGTCAGTCAAGTCCAAC-3'
P14	3'-EXT2 (AUG <u>G</u> )	5'-ACTGACGCACCCATAATGAAACAGGTGTCC-3'
P15	5'-EXT2 (AUG <u>A</u> )	5'-TTCATTATGAGTGCGTCAGTCAAGTCCAAC-3'
P16	3'-EXT2 (AUG <u>A</u> )	5'-ACTGACGCACCTATAATGAAACAGGTGTCC-3'
P17	5'-EXT2 (AUG <u>C</u> )	5'-TTCATTATGCGTGCGTCAGTCAAGTCCAAC-3'
P18	3'-EXT2 (AUG <u>C</u> )	5'-ACTGACGCACGCATAATGAAACAGGTGTCC-3'
P19	5'-EXT2 (C <u>CA</u> UGU)	5'-TTCACCATGTGTGCGTCAGTCAAGTCCAAC-3'

**Table 9.** Continued.

P20	3'-EXT2 ( <u>CCAUGU</u> )	5'-ACTGACGCACACATGGTGAAACAGGTGTCC -3'
P21	5'-EXT2 ( <u>CCAUGG</u> )	5'-TTCACCATGGGTGCGTCAGTCAAGTCCAAC-3'
P22	3'-EXT2 ( <u>CCAUGG</u> )	5'-ACTGACGCACCCATGGTGAAACAGGTGTCC-3'
P23	5'-EXT2 ( <u>GCCACCAUGU</u> )	5'-GCCACCATGTGTGCGTCAGTCAAGTCCAAC-3'
P24	3'-EXT2 ( <u>GCCACCAUGU</u> )	5'-TGACGCACACATGGTGGCACAGGTGCCTC-3'
P25	5'-EXT2 (NC-167-162)	5'-AGGCCGGCGCAGGCAAGACTGCTGGCTCCAGGGTAC-3'
P26	3'-EXT2 (NC-167-162)	5'-CTGGAGCCAGCAGTCTTGCCCTGCGCCGGCCTCCAGTTC-3'
P27	5'-EXT2 (NC-16-9)	5'-TGTGAGGACGAAGACTCCCGTTTCATTATGTGTGCGTC-3'
P28	3'-EXT2 (NC-16-9)	5'-CATAATGAAACGGGAGTCTTCGTCCTCACACACCTC-3'
P29	5'-EXT2 (NC-37-29)	5'-GCGGCCGGTAGGCTACAGTGTGAGGACGAGGACACCTG-3'
P30	3'-EXT2 (NC-37-29)	5'-GTCCTCACACTGTAGCCTACCGGCCGCTTCCCGCTCGGC -3'
P31	5'-EXT2 (SD-20)	5'-GGCTACAGTGTTCGAGGTGGACACCTGTTTCATTATG-3'
P32	3'-EXT2 (SD-20)	5'-ACAGGTGTCCACCTCGGAACACTGTAGCCTACCGGCCGC-3'
P33	5'-EXT2 (SD-10)	5'-TGAGGACGAGTTCGAGGTTTCATTATGTGTGCGTCAG-3'
P34	3'-EXT2 (SD-10)	5'-ACATAATGAAACCTCGGAACCTCGTCCTCACACTGTAGC-3'
P35	5'-EXT2 ( $\Delta$ 5-22)	5'-GTTTCATTATGTACATCCGGGGTCCCGCCCTCATC-3'
P36	3'-EXT2 ( $\Delta$ 5-22)	5'-GACCCCGGATGTACATAATGAAACAGGTGTCCTCG-3'
P37	5'-EXT2 ( $\Delta$ 28-87)	5'-AAGTCCAACATCTTCTCCATCGTCCTCCTGGATCC-3'
P38	3'-EXT2 ( $\Delta$ 28-87)	5'-GACGATGGAGAAGATGTTGGACTTGACTGACGCAC-3'
P39	5'-EXT2 ( $\Delta$ 25-51)	5'-GTCAAGTCCAACATGAAGACCAAGCACCGAATCTAC-3'
P40	3'-EXT2 ( $\Delta$ 25-51)	5'-CTTGGTCTTCATGTTGGACTTGACTGACGCACAC-3'
P41	5'-EXT2 ( $\Delta$ 40-66)	5'-CGGGGTCCCGCCCAATCTACTACGTCACCCTGTTC-3'
P42	3'-EXT2 ( $\Delta$ 40-66)	5'-TAGTAGATTCCGGGCGGGACCCCGGATGTTGGACTTG -3'
P43	5'-EXT2 ( $\Delta$ 57-86)	5'-CCCAAGGATGAAGTTCTCCATCGTCCTCCTGGATCC-3'
P44	3'-EXT2 ( $\Delta$ 57-86)	5'-CGATGGAGAACTTCATCCTTGGGATGAGGGCGGGAC-3'
P45	5'-EXT2 (Mut61-82)	5'-CAGAAGCGTCTGACATCCGCAACCCTGTTCTCCATCG-3'
P46	3'-EXT2 (Mut61-82)	5'-TTGCGGATGTCAGACGCTTCTGGGTCTTCATCCTTGGG-3'
P47	5'-EXT2 (Mut67-71)	5'-AGACCAAGCACACAACCTACTACGTACCCTGTTCTCC-3'
P48	3'-EXT2 (Mut67-71)	5'-GGTGACGTAGTAGTTGTGTGCTTGGTCTTCATCCTTG-3'
P49	5'-EXT2 (Mut63-79)	5'-AGACCAACCACACAACCTACTACCTACCCTGTTCTCC-3'
P50	3'-EXT2 (Mut63-79)	5'-GGTGAGGTAGTAGTTGTGTGTTGGTCTTCATCCTTG-3'
pcDNA3.1/EXT1- <i>myc</i> -His fusion plasmid		
P3	5'-EXT1	5'-CTCGGATCCCAGGCAGGACACATGCAGGCC-3'
P4	3'-EXT1	5'-CGGATGAATTCAAGTCGCTCAATGTCTCGG-3'
pcDNA3.1/EXTL3- <i>myc</i> -His fusion plasmid		
P5	5'-EXTL3	5'-GGGGTACCCTGCAGAGGACTCATGACAGGC-3'
P6	3'-EXTL3	5'-CGCTGCTCGAGGATGAACTTGAAGCACTTG-3'

## 3-2.結果

### 細胞内ポリアミン量減少による HS 発現量の変化

培養細胞においてポリアミン量の変化が HS 量に影響を与えるかどうかを調べるため、細胞内ポリアミン量を減少させた際の HS 発現量、硫酸化パターンの変化を調べた。DFMO はポリアミン合成酵素 ODC の阻害剤であり、DFMO を添加した培地で細胞を 3 日間培養することでプトレスシン、スペルミジン量を著しく減少させ (Table 10)、細胞増殖速度をコントロールに比べて 30% に減少させることができる。そこで異なる HS 発現量、硫酸化パターンを持つ細胞 15 種を DFMO 存在下又は非存在下で培養し、HS の二糖組成分析を行った (Table 11)。その結果、硫酸化パターンに変化は認められなかったが、ポリアミン量の減少により HS 量が減少していた (Fig. 9a,b; Table 11)。さらに、この HS 量の減少は NIH3T3 細胞などの HS 発現量が多い細胞でより顕著であることが明らかとなった (Fig. 10b; Table 11)。

### HS 合成酵素の発現に対するポリアミンの影響

細胞内ポリアミン量の減少により HS 量の減少が観察されたことから、HS 合成酵素の発現がポリアミンにより調節を受けることが考えられた。HS 生合成過程における伸長酵素として EXT1、EXT2、EXTL2 及び EXTL3 が同定されている<sup>2,4,46</sup>。そこで、ポリアミンの有無で 4 種の蛋白質の発現量が変わるかどうかを Western-blotting 法により検討した。その結果、検討を行ったほぼ全ての細胞で DFMO 添加により EXT2 の発現量が減少した (Fig. 11a,12c,d)。一方、NIH3T3 細胞を用いて DFMO の有無による EXT2 mRNA 量の変化を RT-PCR 法により検討したところ、ポリアミンの有無で EXT2 mRNA の量に変化は認められなかった (Fig. 11c)。EXTL2 は 7 種の細胞で発現が確認されたが、DFMO の有無で EXTL2 の発現量は変化しなかった (Fig. 11a,12e,f)。EXTL3 は EXTL3 を過剰発現させた NIH3T3 細胞では発現を確認することができたが (Fig. 11b)、今回検討を行った細胞では EXTL3 を検出することができなかった (Fig. 12g)。また、EXT1 の発現を調べたところ、マウス軟骨前駆細胞である ATDC5 細胞のみで発現が確認され (Fig. 11b,12a,b)、ATDC5 細胞は NIH3T3 細胞と比べ多くの EXT1 mRNA が発現していた (Fig. 11c)。さらに、ATDC5 細胞では DFMO 添加により EXT1 の発現量が減少していたが (Fig. 11b,12a,b)、EXT1 mRNA の発現量に変

化は認められなかった (Fig. 11c)。以上の結果より、EXT1、EXT2 はポリアミンにより翻訳レベルで合成促進を受けることが明らかとなった。

多くの細胞種でポリアミンによる EXT2 合成促進が認められたことから (Fig. 11a,12c,d)、EXT2 についてさらなる検討を行った。まず、細胞内ポリアミン量を回復させた際に EXT2 発現量に変化するかどうかを調べた。DFMO を添加し培養した細胞にスペルミジンを追加することで細胞内ポリアミン量を回復させたところ、ポリアミン量の回復に伴い EXT2 発現量が回復していた (Fig. 11d)。蛋白質合成開始因子 eIF5a はスペルミジン由来のハイプシンによる修飾を受けており、細胞増殖に関与している<sup>51</sup>。そのため、eIF5a がポリアミンによる EXT2 合成促進に関与しているのではないかと考え、eIF5a のハイプシン化阻害剤である GC<sub>7</sub> を用いて、eIF5a の影響を調べた。その結果、GC<sub>7</sub> によりハイプシン化された eIF5a の発現量は減少したが、EXT2 の発現量に変化は認められなかった (Fig. 11e)。以上の結果より、EXT2 はポリアミンにより直接合成促進を受けていることが示唆された。

#### ポリアミンによる EXT2 合成促進に対する 5'-UTR の影響

EXT2 がポリアミンにより翻訳レベルで合成促進を受けていたことから、EXT2 mRNA 上にポリアミンの合成促進に必須となる塩基配列が存在することが考えられた。そこで、EGFP レポーター遺伝子に EXT2 5' 非翻訳領域及びアミノ酸コード領域の N 末端側 104 塩基に欠失及び変異を導入した EXT2-EGFP 融合遺伝子を作製し (Fig. 11f)、ポリアミンによる EXT2 合成促進機構を検討した。作製した EXT2-EGFP 融合遺伝子は 2 つの EXT2 由来開始コドンと 1 つの EGFP 由来開始コドンを有している。NIH3T3 細胞に EXT2-EGFP 融合遺伝子を形質導入し、Western-blotting 法により EGFP 蛋白質を検出すると 3 種の主要なバンドを検出した (Fig. 11g)。32 KDa、30 KDa、27 KDa のバンドはそれぞれ EXT2 1st AUG、EXT2 2nd AUG、EGFP AUG から合成されており、特に EXT2 1st AUG から合成された融合蛋白質は DFMO 添加により発現量が減少することを確認した (Fig. 11g)。一方、EXT2-EGFP mRNA 量は DFMO の有無で変化しなかった (Fig. 11h)。以上の結果から、ポリアミンによる EXT2 の合成促進は翻訳開始段階で起こることが示唆された。

真核生物の蛋白質の翻訳開始は開始コドン近傍の Kozak 配列により制御されることが知られている<sup>52,53</sup>。脊椎動物の Kozak 配列は GCC (G/A) CCAUGG であり、-3 位の塩基がプリン塩基であり、+4 位が G であることが重要であると考えられている。しかしながら、EXT2 の 1st AUG、

2nd AUGはこの配列と一致しておらず、43S 開始前複合体が Kozak 配列と一致する EGFP AUG を優先的に認識している可能性が考えられた (Fig. 13a)。この 43S 開始前複合体による Kozak 配列の認識がポリアミンによる EXT2 合成促進に重要ではないかと考え、EXT2-EGFP レポーター遺伝子に変異を導入し、EXT2 1st AUG 近傍の配列を Kozak 配列に近づけることで Kozak 配列の重要性を評価した (Fig. 13a)。その結果、+4 位の塩基を G (AUGG) に変えることで EXT2 1st AUG からの蛋白質の合成は増加していたが、ポリアミンによる EXT2-EGFP の合成促進には影響が認められなかった (Fig. 13b)。

次に、ポリアミンによる EXT2 合成促進に対する 5'-UTR の影響を検討した。EXT2 mRNA の 5'-UTR 212 塩基の 2 次構造予測を行ったところ、3 つのヘアピン構造が 5'-UTR 上に存在することが示唆された (Fig. 14)。そこで、ヘアピン I (-204 位~-169 位)、ヘアピン II と III (-167 位~-9 位)、ヘアピン I から III(-204 位~-9 位)を欠失させた EXT2-EGFP レポーター遺伝子を作製し (Fig. 13c)、ポリアミンによる EXT2-EGFP 合成促進に対する影響を調べた。その結果、mRNA 量に変化は認められなかったが (Fig. 18)、5'-UTR の長さを短くするにつれ蛋白質の合成量が増加し、ポリアミンによる合成促進が 1.9 倍から 1.4 倍に減弱した (Fig. 13d)。

私達の研究グループではポリアミンにより翻訳レベルで合成促進をうける遺伝子として Cct2 及び eEF1A を同定している<sup>29,30</sup>。Cct2 mRNA の 5'-UTR がスキヤニングされる際に、18S rRNA と相補的な配列を持つテイクオフ部位およびランディング部位間のステムループ構造を飛び越えるシャンティングがポリアミンにより促進されることが示唆されている<sup>29</sup>。加えて、eEF1A 開始コドンから離れた 18S rRNA と相補的な配列 (CR 配列)がポリアミンによる eEF1A 合成促進に重要であることが明らかとなっている<sup>30</sup>。そこで本研究においてもシャンティング、CR 配列のポリアミンによる EXT2 合成促進に対する影響を検討したが、ポリアミンによる EXT2-EGFP の合成促進には影響が認められなかった (Fig. 15)。

以上の結果から、ポリアミンによる EXT2 合成促進には 5'-UTR の配列ではなく、5'-UTR の長さが重要であることが示唆された。

#### ポリアミンによる EXT2 合成促進に対する miRNA let-7b の影響

EXT2 mRNA のアミノ酸コード領域の N 末端側 104 塩基の 2 次構造予測を行ったところ、2 つのステムループ構造が存在することが示唆された (Fig. 17)。そこで、これらステムループの

配列を欠失させることで、アミノ酸コード領域の N 末端側の塩基配列がポリアミンによる EXT2 合成促進に対し影響を与えるかどうかを検討した (Fig. 16)。N 末端側のアミノ酸コード領域を欠失させているため、EXT2 1st AUG から合成された融合蛋白質の分子量が減少していた (Fig. 16a)。そして、N 末端側 5 番目から 22 番目の塩基配列を欠失させても EXT2 1st AUG から合成された蛋白質の発現量に影響は認められなかったが、28 番目から 87 番目の塩基配列を欠失させると EXT2-EGFP 融合蛋白質の発現量が上昇し、ポリアミンによる EXT2-EGFP 融合蛋白質の合成促進が消失していた (Fig. 16b)。そこで、N 末端側 28 番目から 87 番目の塩基配列の中でポリアミンによる EXT2 の合成促進に重要となる配列を探索したところ、N 末端側 57 番目から 86 番目の塩基配列を欠失させると EXT2-EGFP 融合蛋白質の発現量が上昇し、ポリアミンによる EXT2-EGFP 融合蛋白質の合成促進が消失していた (Fig. 16b)。以上の結果より、ポリアミンによる EXT2 の合成促進にはアミノ酸コード領域の N 末端側 57 番目から 86 番目の塩基配列が重要であることが示唆された。

この同定した配列と結合する miRNA を miRBase (<http://www.mirbase.org>) を用いて探索したところ、let-7b が N 末端側 61 番目から 86 番目の塩基配列に結合することが示唆された<sup>54</sup>。

micro RNA (miRNA) は約 22 塩基のノンコーディング RNA であり、標的 mRNA の 3'-UTR と結合することで mRNA の分解、蛋白質の翻訳阻害を行うことが知られている<sup>55,56</sup>。miRNA は Argonaute (Ago) protein や GW182 等の蛋白質と相互作用をすることで RNA-induced silencing complex (RISC) を形成し蛋白質の翻訳阻害することが知られているが、その詳細な機構は明らかとされてはいない<sup>56</sup>。また、miRNA がアミノ酸コード領域の配列を標的とし蛋白質の翻訳を阻害することも報告されている<sup>57-62</sup>。

let-7b がポリアミンによる EXT2 合成促進に影響を与えるかどうかを調べるため、let-7b と非相補的になるように EXT2-EGFP レポーター遺伝子に変異を導入し (Fig. 16c)、EXT2-EGFP 融合蛋白質の発現量、ポリアミンによる合成促進を確認した。pEXT2 (Mut61-82)-EGFP を細胞に形質導入し、EXT2-EGFP 融合蛋白質の発現を調べた結果、1st AUG から合成された EXT2-EGFP 融合蛋白質の発現量が上昇し、ポリアミンによる EXT2-EGFP 融合蛋白質の合成促進が消失していた (Fig. 16d)。一方、let-7b とより強固に結合を形成できるように EXT2-EGFP レポーター遺伝子に変異を導入し (Fig. 16c)、EXT2-EGFP 融合蛋白質の発現量、ポリアミンによる合成促進を確認したところ、融合蛋白質の発現量が減少し、ポリアミンによる EXT2-EGFP 融合蛋白質の合成促進が消失していた (Fig. 16e)。以上の結果から、EXT2

開始コドンの認識は let-7b により制御されており、ポリアミンは let-7b の機能を阻害することで EXT2 の合成を促進することが示唆された。

さらに、let-7b の阻害剤であるアンチセンス let-7b を NIH3T3 細胞に形質導入し、EXT2 の発現量を調べた。その結果、アンチセンス let-7b の形質導入により EXT2 の発現量が増加した (Fig. 19a)。一方、ポリアミンによる合成促進は減弱しており、ポリアミンは let-7b の機能を阻害することで EXT2 の合成を促進していることが確認できた。

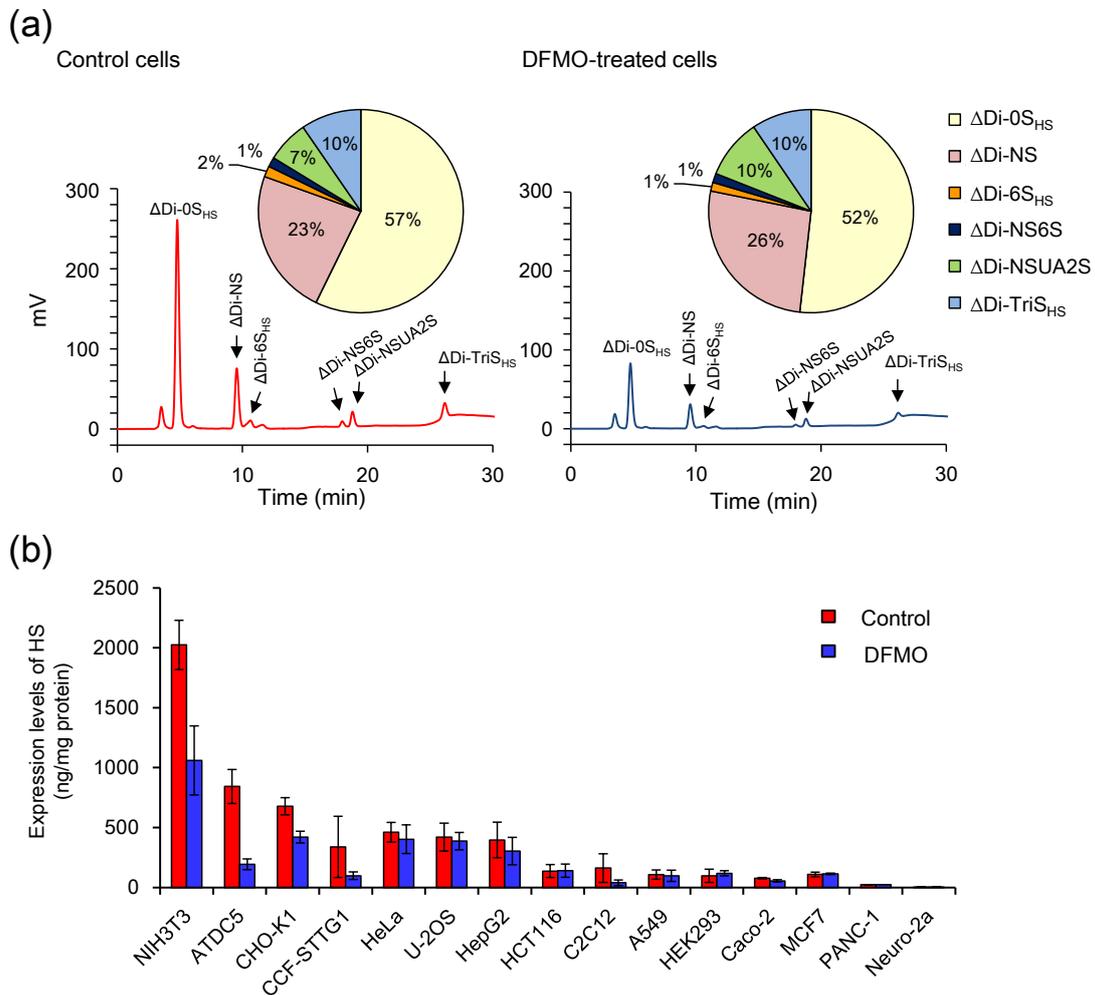
#### ポリアミンによる miRNA/EXT2 mRNA 複合体の形成阻害

DFMO 添加による細胞内ポリアミン量の枯渇や、eIF5a1/2 をノックダウンさせることにより pre-miRNA からの let-7b 産生を阻害する Lin28 の発現が減少し、let-7 ファミリーの 1 種である let-7i の発現量が増加することが報告されている<sup>63,64</sup>。そこで、ポリアミンが let-7b の機能を阻害する機構を明らかにするため、細胞内の let-7b 発現量に注目し、細胞に DFMO を添加した際の let-7b の発現量を調べた (Fig. 19b)。しかしながら、NIH3T3 細胞を DFMO の有無で培養し、let-7b の発現量を比較した結果、let-7b の発現量に変化は認められなかった (Fig. 19b)。Heo らは let-7 前駆体中のループ構造に存在する GGAG 配列が Lin28 の認識に重要であると報告している<sup>64</sup>。一方、let-7b 前駆体中のループ構造に含まれる配列は GAAG であり、Lin28 による let-7b の認識は他の let-7 ファミリーと比べ弱いことが予想される。さらに、GC<sub>7</sub>を用いた実験からポリアミンによる EXT2 合成促進に eIF5a は影響を与えないことを本研究では明らかとしているため (Fig. 11e)、ポリアミンは let-7b の発現量に影響を与えないと考えた。

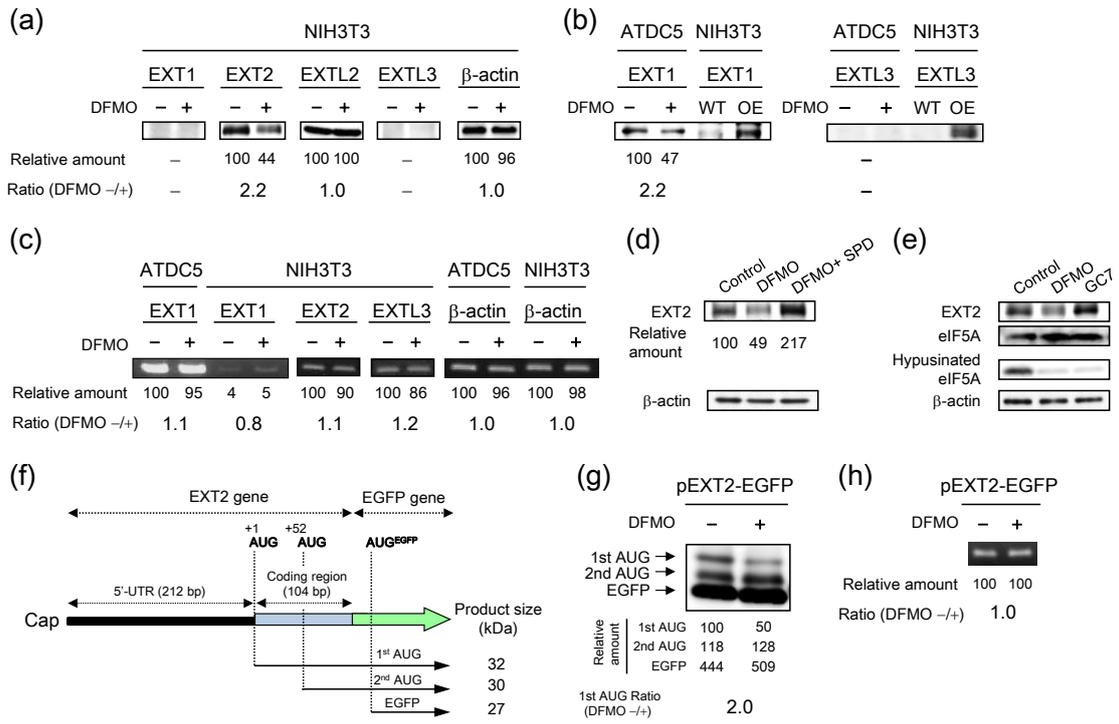
続いて、ポリアミンが miRNA と標的 mRNA の結合に影響を与えるかどうかを検討した。miRNA は Ago protein 等いくつかの蛋白質と相互作用をすることで RISC を形成するため<sup>56</sup>、Ago 蛋白質に対する抗体を用いた免疫沈降により、RISC に結合した標的 mRNA の結合量を定量することができる。そこで、EXT2 mRNA と let-7b の結合に対するポリアミン (スペルミジン) の効果を免疫沈降法により検討した。DFMO の有無で培養した細胞抽出液に Ago 抗体を添加し、回収した EXT2 mRNA 量を real-time PCR により測定した。その結果を Fig. 19c に示す。DFMO の有無で培養した細胞抽出液からそれぞれ回収した EXT2 mRNA 量はほぼ同じであった (Fig. 19c; columns 1 and 3)。この原因としてコントロールとした細胞内のポリアミンが lysis buffer と immunoprecipitation buffer により希釈されたことにあると考え、

immunoprecipitation buffer にスペルミジンを追加し、さらなる検討を行った。その結果、スペルミジン添加により RISC 中の EXT2 mRNA 量が減少していた (Fig. 19c; column 2)。一方、DFMO を添加しポリアミン量を減少させた細胞から調製した細胞抽出液では、スペルミジンを添加しても EXT2 mRNA 量は減少しなかった (Fig. 19c; column 2)。この原因として、mRNA とスペルミジンの結合と比較して mRNA と miRNA の結合がより強固であることが考えられた。Ago と結合した RNA と標的 RNA の結合乖離定数は 0.2 nM であり<sup>65</sup>、2 重鎖 RNA のバルジアウト構造に結合するスペルミジンの結合乖離定数は 0.4 mM であると報告されている<sup>66</sup>。そのため、ポリアミンが減少した細胞内で miRNA と EXT2 mRNA は強固に結合しており、スペルミジンを添加しても miRNA/EXT2 mRNA 複合体を不安定化させることができなかったと考えた。以上の結果より、ポリアミンは miRNA/EXT2 mRNA 複合体の不安定化に関わるのではなく、複合体の形成を直接阻害することが示唆された。

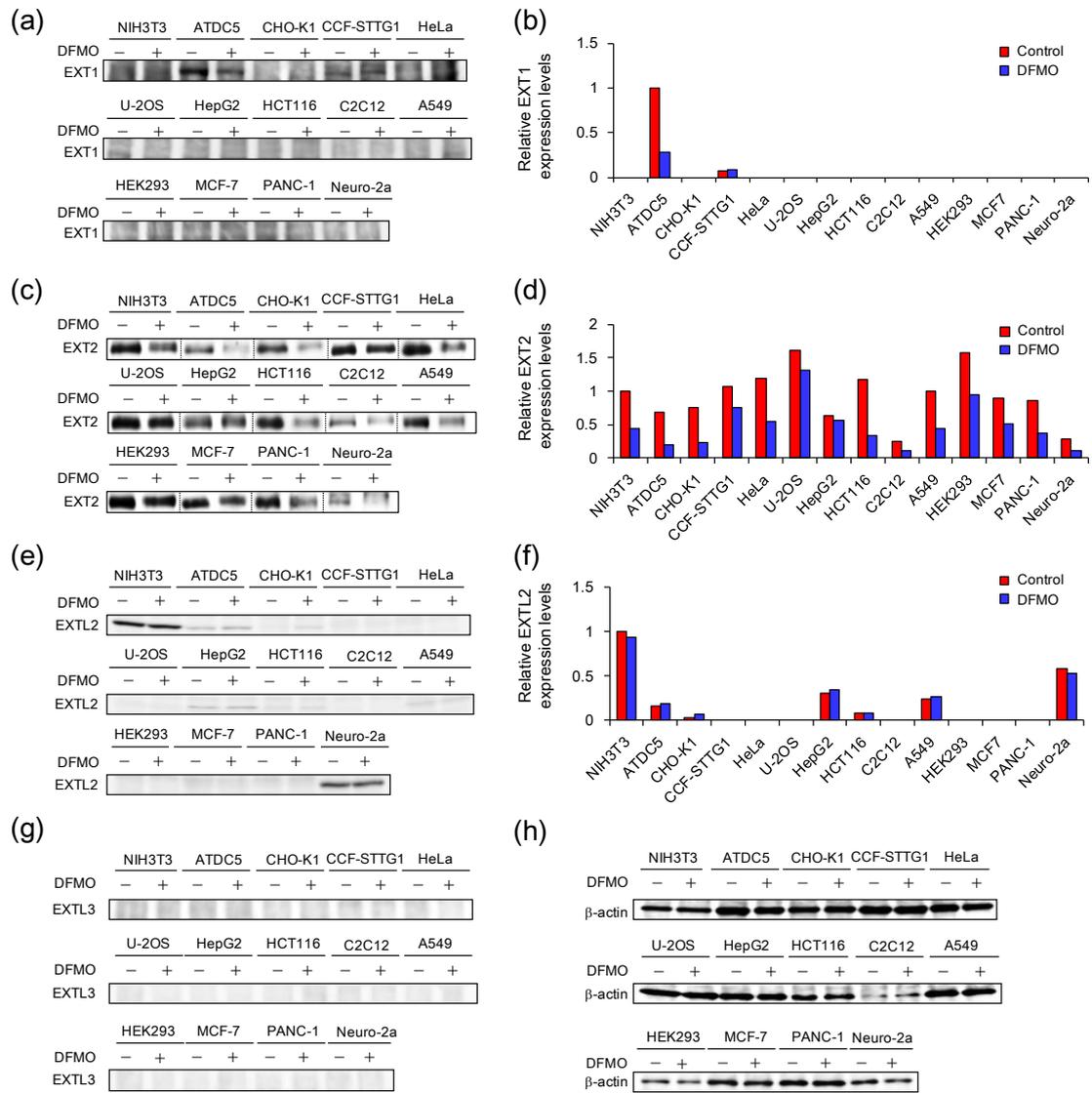
また、GAPDH と  $\beta$ -actin の発現が 3'-UTR に結合する miR-644 により調節されることが報告されているため<sup>67</sup>、EXT2 と同様に、miRNA と結合している GAPDH、 $\beta$ -actin mRNA 量を免疫沈降法により調べた。その結果、スペルミジン添加により miRNA と結合している  $\beta$ -actin mRNA 量がわずかに減少することが明らかとなったが (Fig. 19d)、ポリアミンの有無で GAPDH、 $\beta$ -actin の発現量は変化していなかった (Fig. 19e)。このことから、ポリアミンによる EXT2 の合成促進には 3'-UTR ではなく、アミノ酸コード領域の N 末端側での let-7b/EXT2 mRNA 複合体形成が必要であることが示唆された。



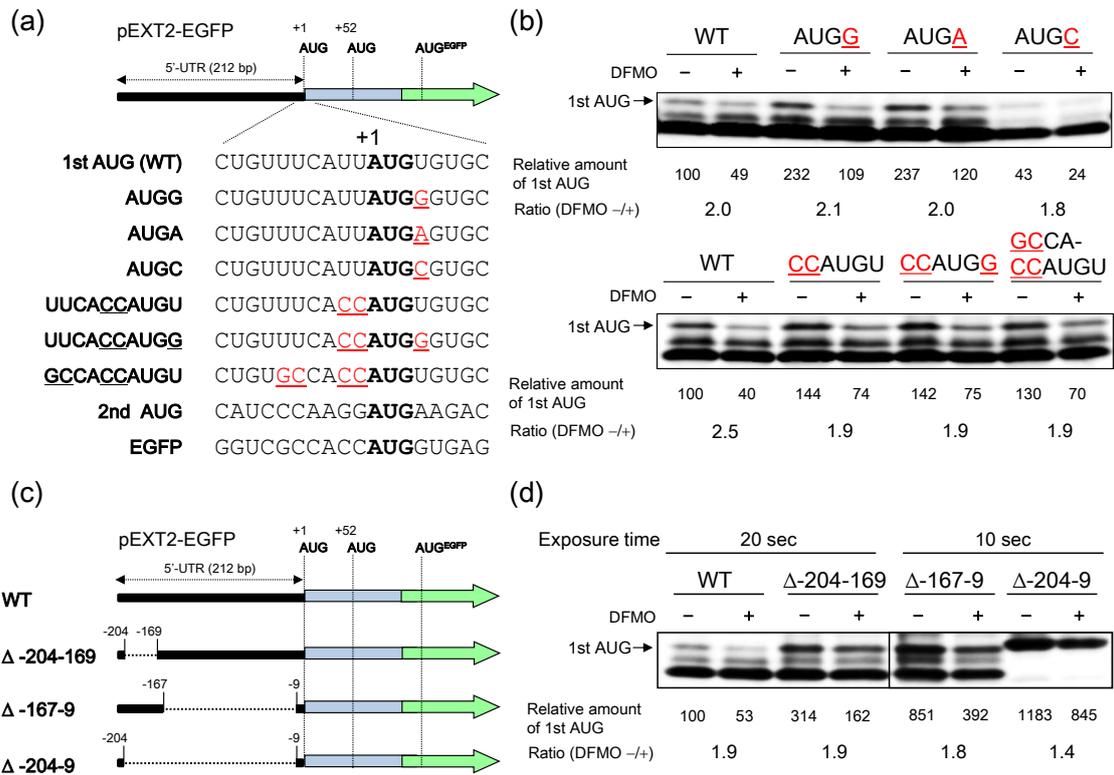
**Figure 10. Levels and disaccharide compositions of heparan sulfate in normal and DFMO treated cells.** (a) Chromatogram and disaccharide compositions of HS in NIH3T3 cells cultured with or without DFMO. HS purified from  $1 \times 10^7$  cells was treated with 1 mIU of heparinase I, II and III, and then submitted to HPLC. Note that the level of HS but not its disaccharide composition clearly changed in DFMO-treated cells.  $\Delta\text{Di-0S}_{\text{HS}}$  is deoxy- $\alpha$ -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid ( $\Delta\text{UA}$ ) (1 $\rightarrow$ 4) N-acetylglucosamine (GlcNAc),  $\Delta\text{Di-NS}$  is  $\Delta\text{UA}$  (1 $\rightarrow$ 4) GlcNS,  $\Delta\text{Di-6S}_{\text{HS}}$  is  $\Delta\text{UA}$  (1 $\rightarrow$ 4) GlcNAc6S,  $\Delta\text{Di-NS6S}$  is  $\Delta\text{UA}$  (1 $\rightarrow$ 4) GlcNS6S,  $\Delta\text{Di-NSUA2S}$  is  $\Delta\text{UA2S}$  (1 $\rightarrow$ 4) GlcNS, and  $\Delta\text{Di-TriS}_{\text{HS}}$  is  $\Delta\text{UA2S}$  (1 $\rightarrow$ 4) GlcNS6S. (b) Levels of HS in 15 cell types of untreated (control) and DFMO-treated cells. Data are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. ( $n = 3$ ). Detailed expression level and disaccharide composition of HS in 15 types of control and DFMO-treated cells are shown in Table 11.



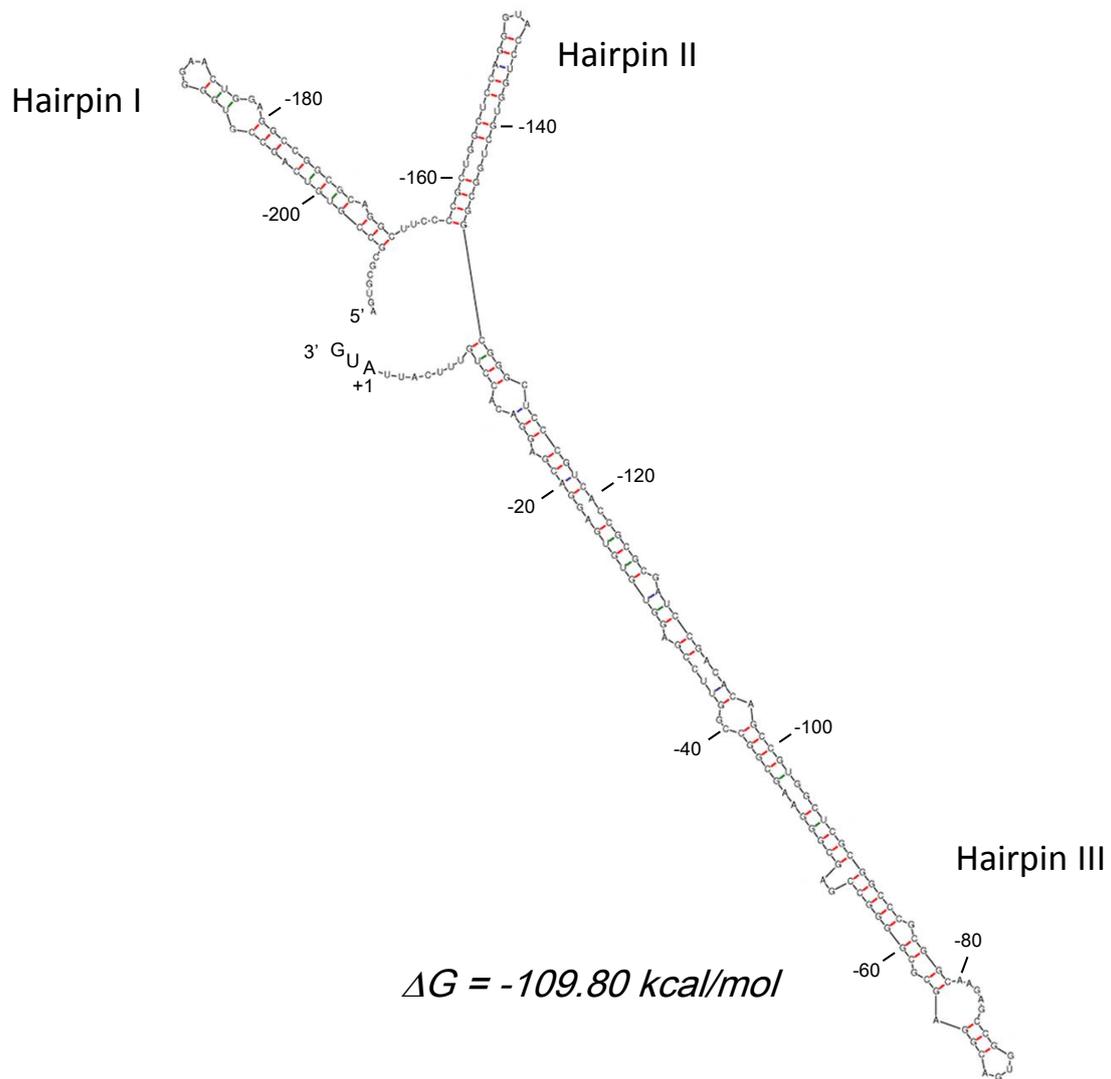
**Figure 11. EXT1 and EXT2 synthesis are enhanced by polyamines at the level of translation.** (a) Effect of polyamine depletion on the expression level of EXT proteins in NIH3T3 cells. For Western blotting of EXT proteins and  $\beta$ -actin, 30  $\mu$ g (EXT1), 20  $\mu$ g (EXT2), 20  $\mu$ g (EXTL2), 60  $\mu$ g (EXTL3) or 5  $\mu$ g ( $\beta$ -actin) of protein of whole cell lysate, prepared from cells cultured with or without DFMO, was used. (b) Effect of polyamine depletion on the expression of EXT1 and EXTL3 in ATDC5 cells. For Western blotting, 30  $\mu$ g (EXT1) or 60  $\mu$ g (EXTL3) of protein was used. OE: over expressed. (c) Effect of polyamine depletion on the expression level of mRNAs of EXT gene family in NIH3T3 and ATDC5 cells. (d) Effects of 5 mM DFMO and/or 25  $\mu$ M spermidine (SPD) on the expression level of EXT2 in NIH3T3 cells. To avoid the degradation of SPD, 1 mM aminoguanidine, an inhibitor of serum amine oxidase, was added together with SPD in culture medium for 3 days. (e) Effect of GC<sub>7</sub>, an efficient inhibitor of deoxyhypusin synthase, on the expression of EXT2 protein in NIH3T3 cells. GC<sub>7</sub> (20  $\mu$ M) was added to culture medium for 3 days to inhibit the hypusination for eIF5A. Note that the EXT2 expression was maintained despite an inhibition of hypusination of eIF5A by the GC<sub>7</sub> treatment. For detection of the eIF5A protein, 10  $\mu$ g of protein was used. (f) Structure of EXT2-EGFP fusion genes. Two kinds of fusion proteins (32 kDa and 30 kDa) and EGFP protein (27 kDa) can be produced by individual AUG triplets in EXT2-EGFP fusion gene. (g) Effect of polyamine depletion on the expression level of EXT2-EGFP fusion proteins. For detection of the EXT2-EGFP fusion protein, 30  $\mu$ g of protein was used. (h) Effect of polyamine depletion on the expression level of EXT2-EGFP mRNA. Experiments were repeated in triplicate with reproducible results.



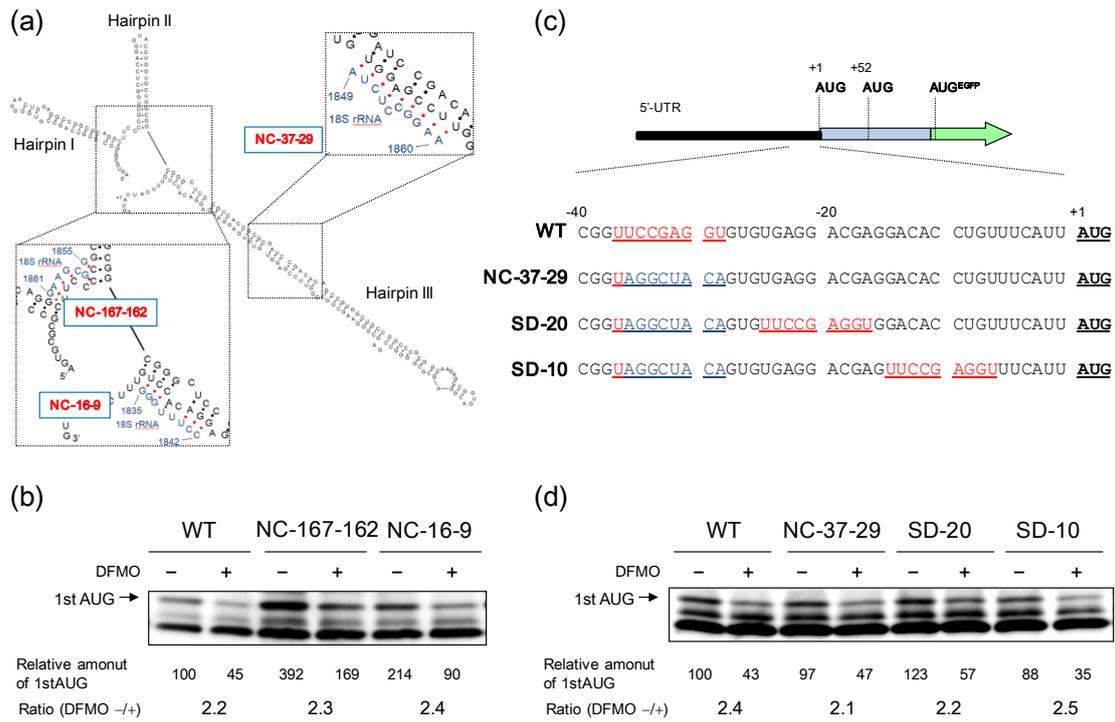
**Figure 12. Effect of polyamine depletion on the expression level of EXT1 (a,b), EXT2 (c,d), EXTL2 (e,f), EXTL3 (g) and  $\beta$ -actin (h) in several kinds of cells.** For Western blotting of EXT proteins and  $\beta$ -actin, 30  $\mu$ g (EXT1), 20  $\mu$ g (EXT2), 20  $\mu$ g (EXTL2), 60  $\mu$ g (EXTL3) or 5  $\mu$ g ( $\beta$ -actin) of protein of whole cell lysate prepared from cells cultured with or without DFMO was used.



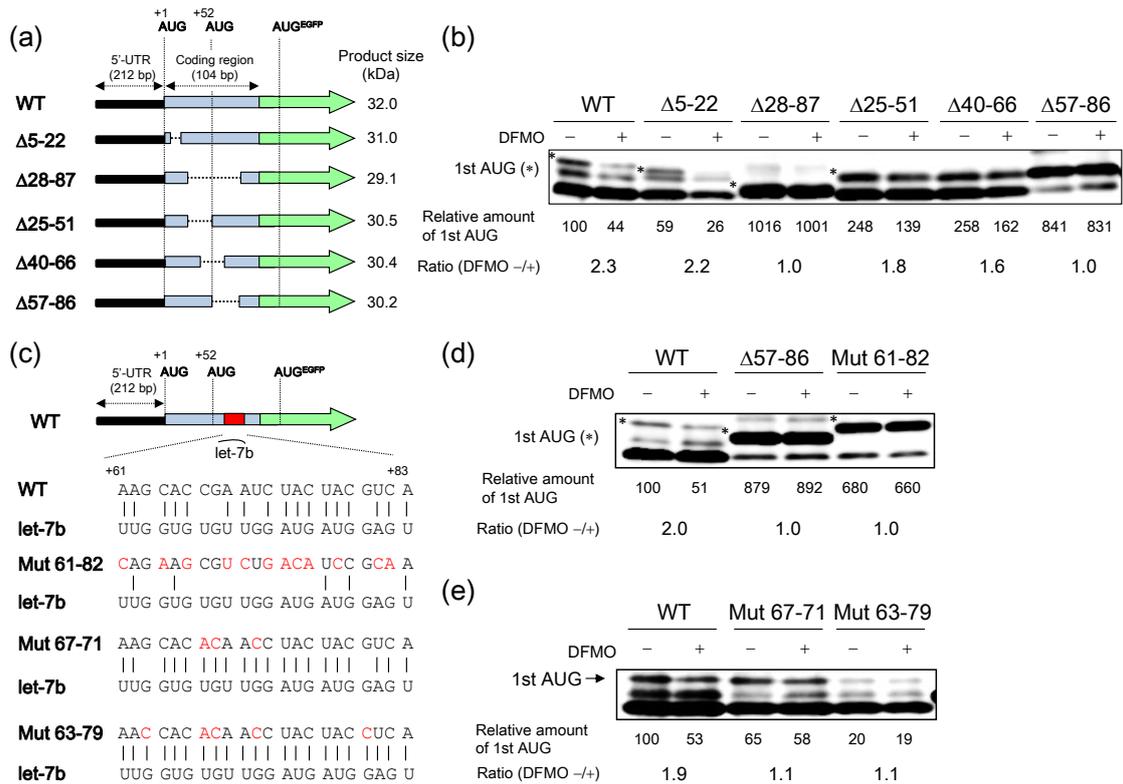
**Figure 13. Effect of AUG codon context and 5'-UTR on the polyamine stimulation of EXT2 synthesis.** (a) Structures of mutated AUG codon context in EXT2-EGFP fusion genes. The modified nucleotides in first AUG context are shown in red and underlined. (b) Effect of mutated first AUG codon context in EXT2 gene on the expression level of the first AUG product of the EXT2-fusion protein was examined. (c) Structures of 5'-UTR deletion mutants of EXT2-EGFP fusion genes. (d) Effect of 5'-UTR on the expression level of first AUG product of EXT2-fusion protein was examined. In the case of the 5'-UTR deletion mutants, exposure time of ECL detection was shortened compared to the WT because of a significant increase in the expression of EGFP-protein. Transfection and DFMO treatment were carried out as described under "Methods" and 30 μg of protein was used to detect the EGFP fusion protein. Experiments were repeated in triplicate with reproducible results.



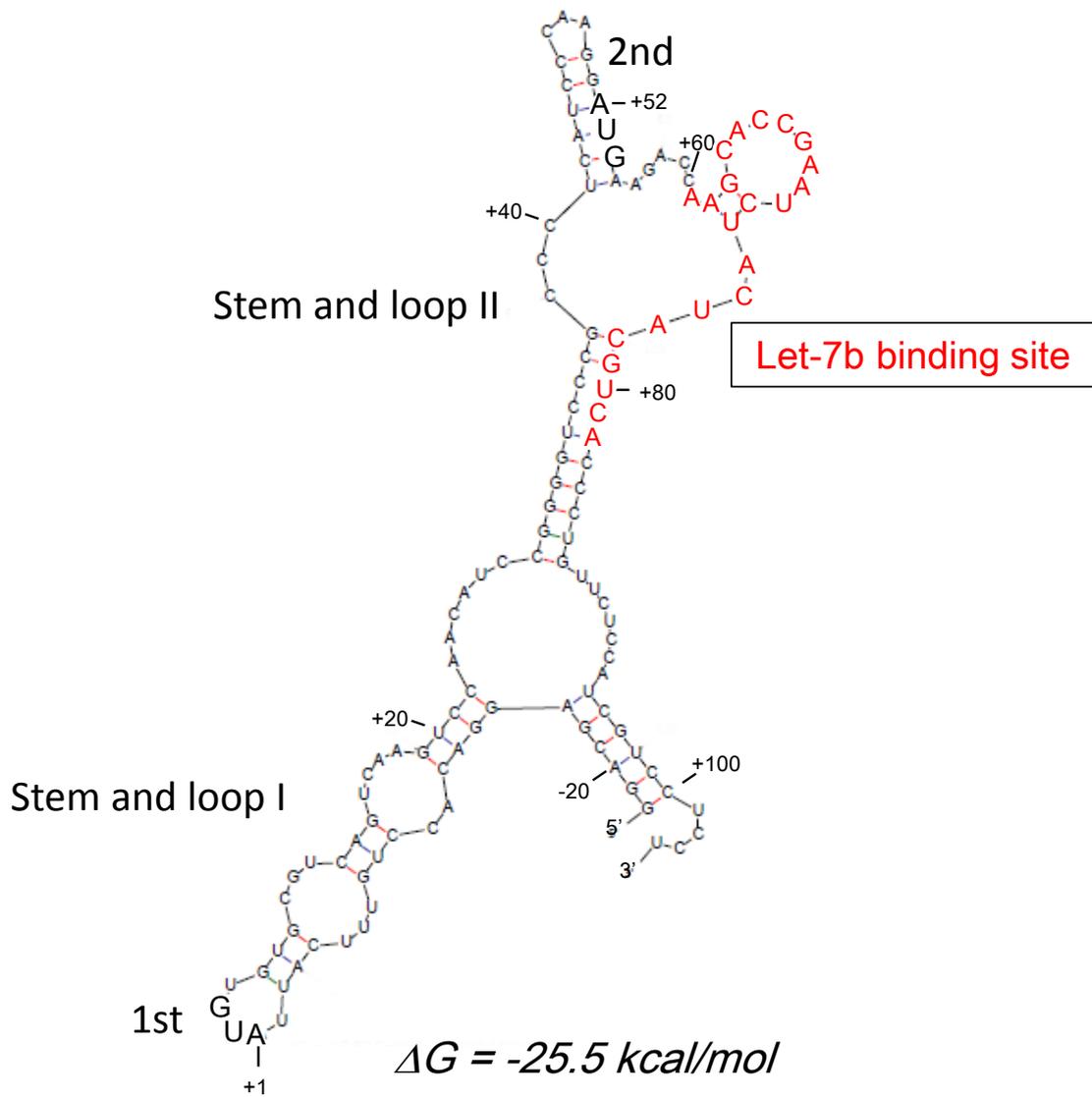
**Figure 14. Possible secondary structure of 5'-untranslated region in EXT2 mRNA.**



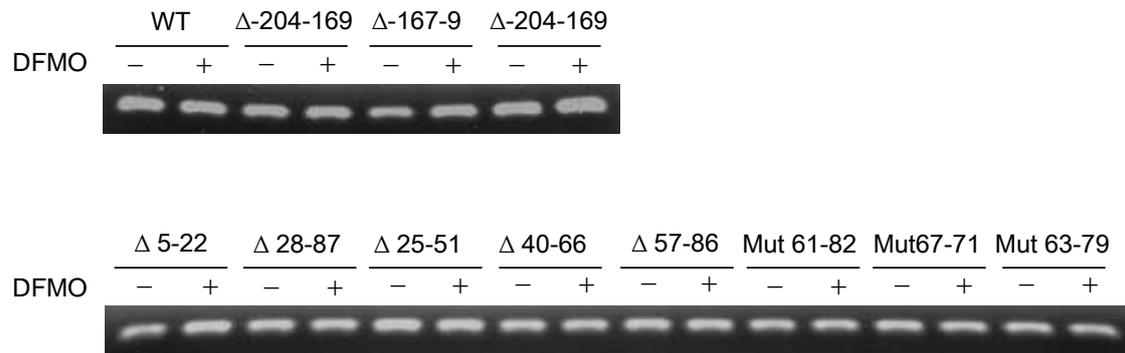
**Figure 15. Relationship between polyamine stimulation and complementary sequences to 18S rRNA.**(a) The possible secondary structure of the 5'-UTR of EXT2 and complementary putative contact sequence in 18S rRNA (shown in blue) are shown. The EXT2-EGFP genes whose sequences (-167 to -162, -37 to -29 or -16 to -9) were converted to non-complementary sequence to 18S rRNA were termed as NC-167-162, NC-37-29 and NC-16-9, respectively. (b) The expression levels of EXT2-EGFP synthesized from NC-167-162 and NC-16-9 were examined by Western blotting. (c) Nucleotide sequences of mutants at the region of CR sequence of EXT2-EGFP genes are shown. The EXT2-EGFP genes in which the position of CR sequence shifted were termed as SD-20 and SD-10, respectively. CR sequence is shown in red. (d) The expression levels of EXT2-EGFP synthesized from NC-37-29, SD-20 and SD-10 were examined by Western blotting.



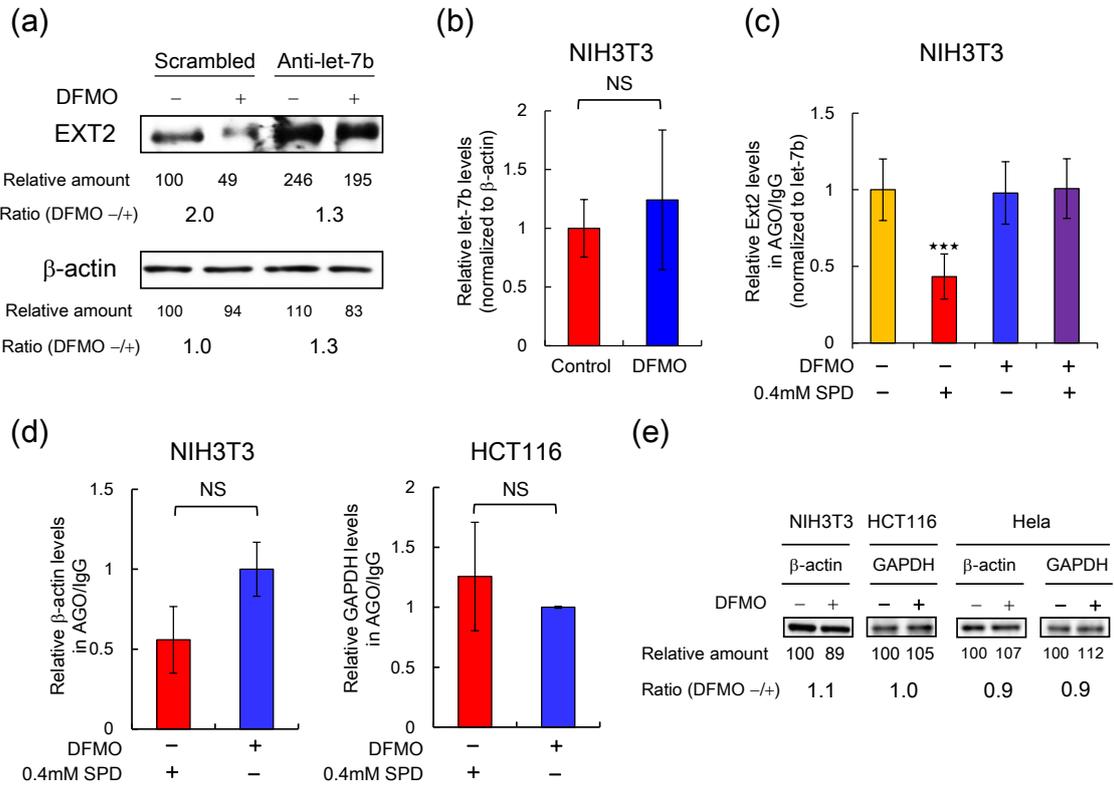
**Figure 16. Effect of let-7b binding site in N-terminal amino acid coding sequence on polyamine stimulation of EXT2 synthesis.** (a) Structures of deletion mutants of N-terminal CDS in EXT2-EGFP fusion genes. Based on the possible secondary structure of EXT2 mRNA obtained by Mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/>), specified region of CDS was deleted (See Fig. 12). Note that sizes of first AUG products in deletion mutants were smaller than that of WT. (b) Effect of N-terminal CDS on the expression levels of first AUG products (\*) of EXT2-EGFP fusion proteins. (c) Sequence of let-7b binding site in EXT2-EGFP fusion gene. (d,e) Effects of mutations of let-7b binding site on the expression level of the first AUG products of the EXT2-EGFP fusion proteins. Molecular weight of the first AUG product from Δ57-86 mutant is 30.2 kDa. For detection of the EGFP fusion protein, 30 μg of protein was used. Experiments were repeated in triplicate with reproducible results.



**Figure 17. Possible secondary structure of N-terminal amino acid coding sequence in EXT2 mRNA.**



**Figure 18. Effect of polyamine depletion on the expression level of mRNAs in EXT2-EGFP mutants.** Mutated EXT2-EGFP genes were transfected to NIH3T3 cells and then cultured in medium with or without 5 mM DFMO. Preparation of first stranded cDNA and semi-quantitative RT-PCR were performed as described under “Methods”.



**Figure 19. Direct inhibition of let-7b binding by spermidine to its target sequence. (a)**

Effect of anti-let-7b on the expression of EXT2 protein in NIH3T3 cells. The microRNA inhibitor for let-7b or negative control A (scrambled) were transfected to NIH3T3 cells for 72h in the presence or absence of 5 mM DFMO. **(b)** Effect of polyamine depletion on the expression level of let-7b in NIH3T3 cells was examined by qRT-PCR. The level of let-7b expression in control cells was defined as 1.0. NS, not significant, two-tailed unpaired Student's *t*-tests. **(c,d)** Immunoprecipitation (IP) of miRNA/EXT2 mRNA **(c)**,  $\beta$ -actin or GAPDH mRNAs **(d)** complexes associated with Argonaute proteins (Ago1, Ago2 or Ago3) from NIH3T3 or HCT116 cell extract. Precipitated miRNA/mRNA complexes were treated with proteinase K, and resulting free mRNAs were converted to cDNA and quantified by qRT-PCR. The results obtained with Ago-IP were normalized by mouse IgG-IP as a negative control. **(e)** In this pull-down assay system, since precipitated let-7b by Ago-IP was also detectable, EXT2 mRNA was further normalized to let-7b. Data are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments and data was by one-way ANOVA with Tukey-Kramer post-test using GraphPad Prism<sup>®</sup> Software (GraphPad Software).  $P^{***}<0.005$ . **(d)** In case of values of  $\beta$ -actin and GAPDH, both of which are obtained from three independent experiments are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. Data were evaluated by two-tailed unpaired Student's *t*-tests, however no significant difference was observed. **(e)** Effect of polyamine depletion on the expression of  $\beta$ -actin and GAPDH.

**Table 10.** Determination of polyamine contents in cells cultured with or without DFMO. Experiments are expressed as the mean of three independent experiments.

Cell	DFMO	Polyamines (nmol/mg protein)		
		PUT	SPD	SPM
NIH3T3	-	1.9	28.7	14.9
	5 mM*	0.1	0.4	12.3
ATDC5	-	ND**	2.9	11.4
	5 mM*	ND**	0.4	8.8
CHO-K1	-	0.4	11.0	16.6
	5 mM*	ND**	0.3	17.9
CCF-STTG1	-	0.6	5.2	15.3
	5 mM*	ND**	0.5	19.1
HeLa	-	1.0	5.9	15.0
	0.5 mM*	ND**	0.5	12.2
U-2OS	-	0.5	3.7	15.1
	5 mM*	ND**	0.2	16.5
HepG2	-	0.9	4.8	9.8
	5 mM*	ND	0.1	7.9
HCT116	-	1.4	10.0	12.1
	5 mM*	ND**	0.1	9.6
C2C12	-	0.4	3.3	11.4
	0.5 mM*	ND**	0.4	13.0
A549	-	0.3	6.1	5.0
	5 mM*	ND**	0.3	5.5
HEK293	-	ND	2.9	16.1
	0.5 mM*	ND**	0.1	13.9
Caco-2***	-	0.1	3.0	10.9
	5 mM*	ND**	0.2	8.1
MCF7	-	0.3	5.1	5.4
	5 mM*	ND**	0.2	6.1
PANC-1	-	0.2	3.5	7.9
	0.2 mM*	ND**	0.7	5.8
Neuro-2a	-	1.1	19.1	18.4
	5 mM*	ND**	1.2	14.1

\* Concentration of DFMO for the decrease of cell numbers to 30% of control cells on 3 days.

\*\* ND, not detected.

\*\*\*To decrease the intracellular polyamines, 1  $\mu$ M of ethylglyoxal bis(guanyldiazone) (EGBG), an inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase was also used.

**Table 11.** Level and composition of unsaturated disaccharides in HS of control and DFMO treated cells. Experiments are expressed as the mean of three independent experiments.

Cell	DFMO	Unsaturated disaccharide (%)						Total amount ng/mg protein
		$\Delta$ Di-0S <sub>HS</sub>	$\Delta$ Di-NS	$\Delta$ Di-6S <sub>HS</sub>	$\Delta$ Di-NS6S	$\Delta$ Di-NSUA2S	$\Delta$ Di-TriS <sub>HS</sub>	
NIH3T3	-	57.2	23.3	1.7	1.5	6.7	9.5	2024.0
	+	51.8	26.4	1.4	1.5	9.5	9.5	1060.5
ATDC5	-	39.7	32.7	6.8	4.4	9.8	6.7	842.6
	+	34.0	38.9	5.9	3.1	12.3	5.8	192.9
CHO-K1	-	63.3	20.3	1.7	0.9	9.5	4.3	678.2
	+	67.2	18.0	2.6	0.0	8.7	3.6	420.9
CCF-STTG1	-	37.8	30.6	11.6	4.8	9.6	5.5	338.9
	+	37.8	35.0	8.9	3.7	10.2	4.3	98.4
HeLa	-	49.7	28.9	8.6	4.6	3.3	4.9	462.2
	+	47.1	25.2	8.5	5.3	6.8	7.1	402.4
U-2OS	-	78.9	13.3	3.4	ND*	3.4	1.0	421.1
	+	70.4	15.9	7.7	ND*	4.6	1.4	386.9
HepG2	-	50.9	30.2	1.2	0.8	12.5	4.3	396.6
	+	47.4	30.1	0.7	0.5	18.0	3.2	304.3
HCT116	-	41.6	18.0	13.1	9.2	7.7	10.4	136.8
	+	44.5	18.6	8.9	5.5	11.3	11.2	140.5
C2C12	-	55.8	26.5	ND	ND*	17.7	ND*	162.2
	+	50.8	29.4	ND	ND*	19.9	ND*	39.5
A549	-	30.2	41.0	11.5	2.8	6.6	7.8	107.4
	+	52.4	31.2	3.9	0.9	8.1	3.5	98.5
HEK293	-	32.8	18.7	19.5	13.8	8.3	7.0	98.3
	+	31.7	19.6	16.5	12.4	11.3	8.5	118.8
Caco-2	-	50.9	16.7	11.0	12.1	3.9	5.5	77.7
	+	54.8	18.1	6.8	12.4	4.6	3.4	55.2
MCF7	-	40.6	18.2	13.8	14.4	8.3	4.7	109.5
	+	40.8	19.8	10.7	11.7	13.0	4.1	113.7
PANC-1	-	80.4	19.6	ND*	ND*	ND*	ND*	23.3
	+	76.1	23.9	ND*	ND*	ND*	ND*	24.7
Neuro-2a	-	88.8	11.2	ND*	ND*	ND*	ND*	2.6
	+	87.5	12.5	ND*	ND*	ND*	ND*	4.0

\*ND, not detected.

### 3-3. 考察

本章では HS とポリアミンの関係性に焦点を当て、培養細胞を用いてポリアミンによる HS 合成促進機構の検討を行った。まず、細胞内ポリアミン量を減少させた際の HS 発現量、硫酸化パターンの変化を調べた。その結果、ヒト皮膚組織と同様に、細胞内ポリアミン量減少により HS 発現量が減少していた (Fig. 10a,b; Table 11)。さらに、この HS 量の減少は NIH3T3 細胞などの HS 発現量が多い細胞でより顕著であることが明らかとなった (Fig. 10b; Table 11)。ポリアミンは細胞内において主に RNA と結合して存在しており、特定蛋白質の合成を翻訳レベルで促進している。私達はポリアミンにより翻訳レベルで合成促進を受ける遺伝子群をポリアミンモジュロンと定義し、ポリアミンモジュロンを探索することでポリアミンの機能を研究してきた<sup>18,68</sup>。ポリアミンにより発現調節を受ける HS 合成酵素を探索したところ、EXT1、EXT2 がポリアミンにより翻訳レベルで合成促進を受けており (Fig. 11a-c,12a-d)、新規ポリアミンモジュロンであることが明らかとなった。

細胞に発現する EXT2 量を網羅的に調べたところ、HS 発現量が少なく、DFMO による HS 発現量への影響が小さい細胞においても EXT2 の発現が確認でき、ポリアミン量減少により EXT2 の発現が減少していた (Fig. 10b,12c,d)。細胞膜に発現している HS 量は HS 合成酵素だけではなく、HS 分解酵素であるヘパラーゼやリソソームによる分解によって調節されている<sup>69,70</sup>。HS の代謝回転について、ゴルジ体で合成された後に細胞表面に運ばれた HS の半減期は 2.5 h であり、細胞内に存在する HS の半減期は 6.2 h であることや<sup>69</sup>、細胞の培養条件により HS 代謝回転が変化することが報告されている<sup>71</sup>。そのため、HS 発現量が少なく、DFMO による HS 発現量への影響が小さい細胞においては、HS の分解による影響を強く受けている可能性が考えられた。加えて、EXTL3 の発現も HS 発現量とポリアミンによる HS 合成促進に影響を与えていることが考えられる。EXTL3 は 664 bp の長い 5'-UTR を有しているため転写効率や翻訳効率が低いことが予想される。本研究では EXTL3 を過剰発現させた NIH3T3 細胞では発現を確認することができたが (Fig. 11b)、その他の細胞においては EXTL3 を検出することができなかった (Fig. 12g)。EXTL3 がポリアミンにより合成調節を受けている可能性が考えられるため、EXTL3 については更なる研究が必要と考える。

ポリアミンによる EXT2 合成促進機構を解明するため、EXT2-EGFP レポーター遺伝子を作

製し、ポリアミンによる EXT2 合成促進機序を検討した。その結果、EXT2 開始コドンの認識は let-7b により制御されており、ポリアミンは let-7b の機能を阻害することで EXT2 の合成を促進することが明らかとなった (Fig. 16,19a)。加えて、ポリアミンが開始前複合体による EXT2 開始コドンの認識を制御し、EXT2 の合成を促進するためには 5'-UTR の長さが重要であった (Fig. 13c,d)。開始コドンの認識には eIF1 が重要であることが知られているが<sup>53</sup>、miRISC による蛋白質の翻訳制御に eIF1 が関与するという報告は現在まで存在しない。しかしながら、DEAD-box ヘリカーゼである eIF4aII が miRISC による蛋白質の翻訳制御に関与することが Meijer らによって報告されている<sup>72</sup>。さらに、この報告では miRISC による蛋白質の翻訳制御には eIF4aII と標的 mRNA の 5'-UTR が重要となることが示された。本研究においても、ポリアミンによる EXT2 の合成促進に 5'-UTR の長さが重要であったことから、eIF4aII がポリアミンによる EXT2 合成促進に関与している可能性が考えられた。

ポリアミンが miRNA と標的 mRNA の結合に影響を与えるかどうかを検討し、ポリアミンは let-7b/EXT2 mRNA 複合体の形成を阻害することが明らかとなった (Fig. 19c)。しかしながら、miR-644a/ $\beta$ -actin、miR-644a/GAPDH 複合体の形成がポリアミンにより阻害されない理由は未だ不明のままである。ポリアミンが let-7b/EXT2 mRNA 複合体形成のみを阻害する理由として、let-7b/EXT2 mRNA 複合体は 3'-UTR ではなく、アミノ酸コード領域 N 末端側で形成されること、複合体の形成が EXT2 mRNA の 3 次元構造の影響を受けていること、この 2 つの特徴を let-7b/EXT2 mRNA 複合体が有しているためだと考えられた。EXT2 mRNA の let-7b 結合部位はアミノ酸コード領域 N 末端側のステムループ構造上に存在している (Fig. 17)。このステムループ構造の配列の一部 (+25 位~+51 位、+40 位~+66 位)を欠失させることで、ポリアミンによる合成促進に変化は認められなかったが、蛋白質の発現量は増加しており、let-7b による翻訳阻害が減弱していた (Fig. 16a,b)。すなわち、miRNA 結合部位を含む標的 mRNA の 3 次元構造の変化が miRNA/EXT2 mRNA 複合体の形成に影響を与えることが示唆された。以上の特徴を let-7b/EXT2 mRNA 複合体が有しているため、let-7b/EXT2 mRNA 複合体形成のみがポリアミンにより阻害されていると考えられるが、ポリアミンによる miRNA/mRNA 複合体の形成阻害については更なる研究が必要と考える。

## 4.CS 生合成に対するポリアミンの効果

CS はD-グルクロン酸 (GlcA) とN-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) が交互に結合した二糖の繰り返し構造を基本骨格とする直鎖の酸性多糖である。CS の生合成は橋渡し領域 (キシロース、ガラクトース、ガラクトース、グルクロン酸) に GalNAc を付加することから始まる<sup>3</sup>。CS 生合成の模式図を Fig. 20 に示す。続いて、コンドロイチン合成酵素 1 (CHSY1)、CHSY2、CHSY3 及びコンドロイチン重合化因子 (CHPF) のうち2種の酵素が CS 鎖を伸長し、コンドロイチン 4-O-硫酸基転移酵素 (C4ST) により GalNAc の C4 位の水酸基に硫酸基が付加するとコンドロイチン 4 硫酸が合成され、N-アセチルガラクトサミン 4 硫酸 6-O-硫酸基転移酵素 (GalNAc4S-6ST) によりコンドロイチン 4, 6 硫酸が合成される。また、コンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素 (C6ST) により GalNAc の C6 位の水酸基に硫酸基が付加するとコンドロイチン 6 硫酸が合成され、ウロノシル 2-O-硫酸基転移酵素 (UST) によりコンドロイチン 2, 6 硫酸が合成される<sup>3,73</sup>。CS の量や硫酸化パターンは生物種や組織により異なり<sup>74</sup>、加齢に伴い CS 硫酸化パターンが変化することが報告されている<sup>12-15</sup>。

二章では HS とポリアミンの関係性に焦点を当て解析を行ったが、本章では CS に注目し、CS 生合成に対するポリアミンの効果調べた。

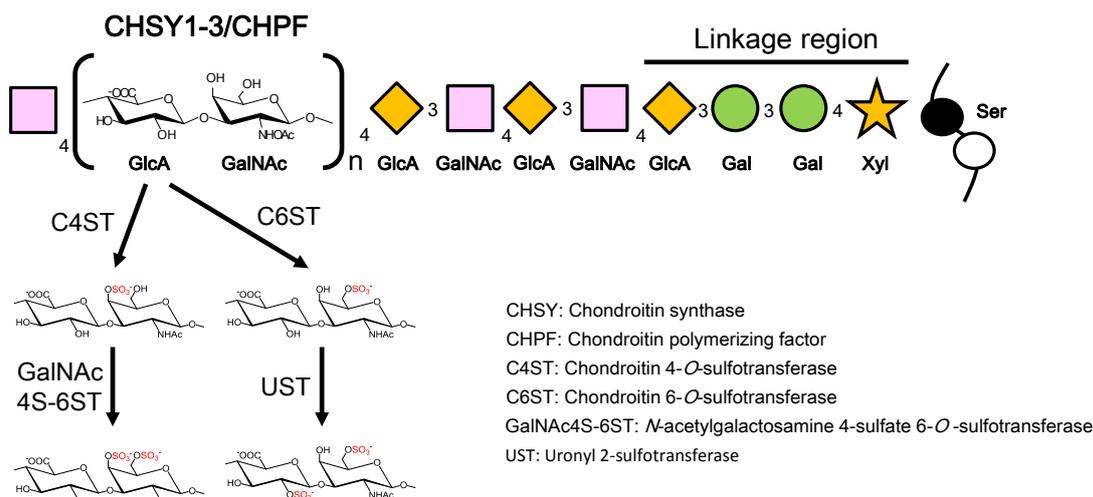


Figure 20. Conventional scheme for CS biosynthetic machineries

## 4-1.実験方法

### 1) CS 二糖組成分析

二章と同様の方法で細胞を調製し、一章と同様の方法で CS 二糖組成分析を行った。

### 2) Western Blotting

二章と同様の方法で蛋白質を検出した。Table 8 に使用した抗体を示す。

### 3) PCR による mRNA の検出

二章と同様の方法で細胞から mRNA を抽出し、PCR を行った。Table 9 に使用したプライマーを示す。

## 4-2.結果

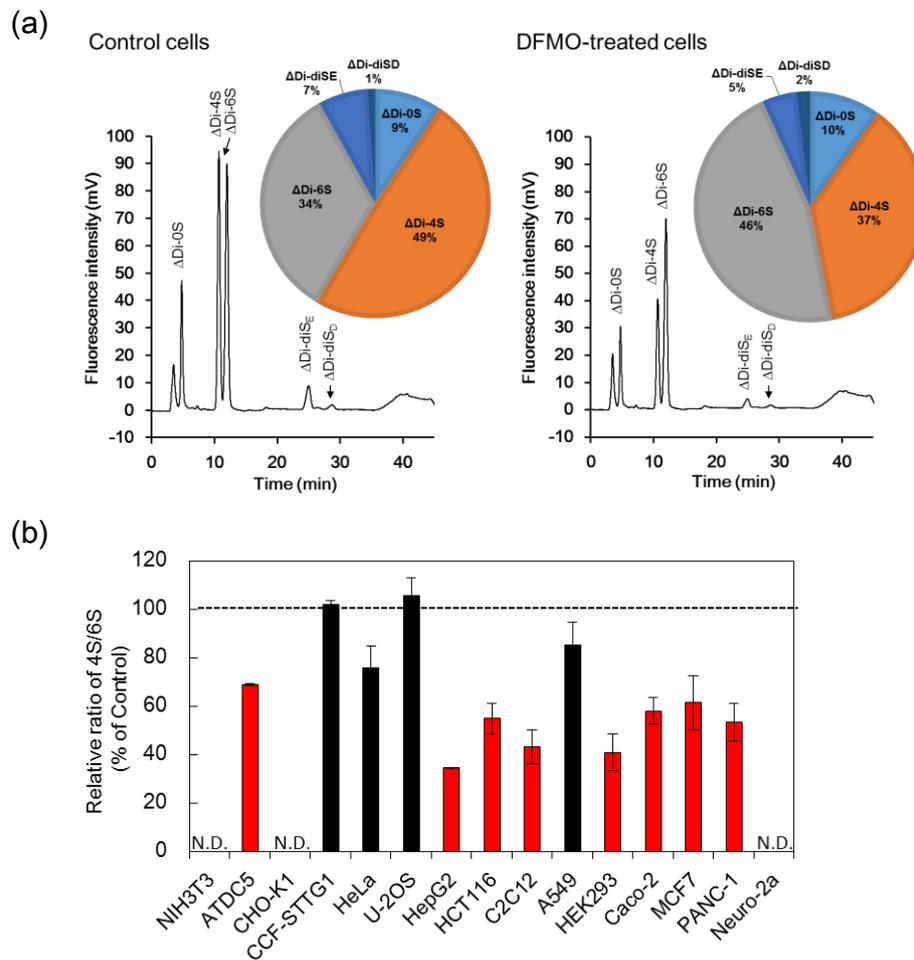
### 細胞内ポリアミン量減少による CS 硫酸化パターンの変化

HSと同様にCS生合成におけるポリアミンの影響を検討するため、異なる臓器由来の細胞15種にDFMOを添加し、細胞内ポリアミン量を減少させた後、CS発現量及び硫酸化パターンを調べた。その結果、CS量に変化は認められなかったものの (Fig. 21a; Table 12)、GalNAcの4位が硫酸化されたGlcA-GalNAc4S及びGalNAcの6位が硫酸化されたGlcA-GalNAc6Sを有する細胞12種のうち8種で、ポリアミン量減少によりCSの4S/6S比の減少が認められた (Fig. 21b; Table 12)。

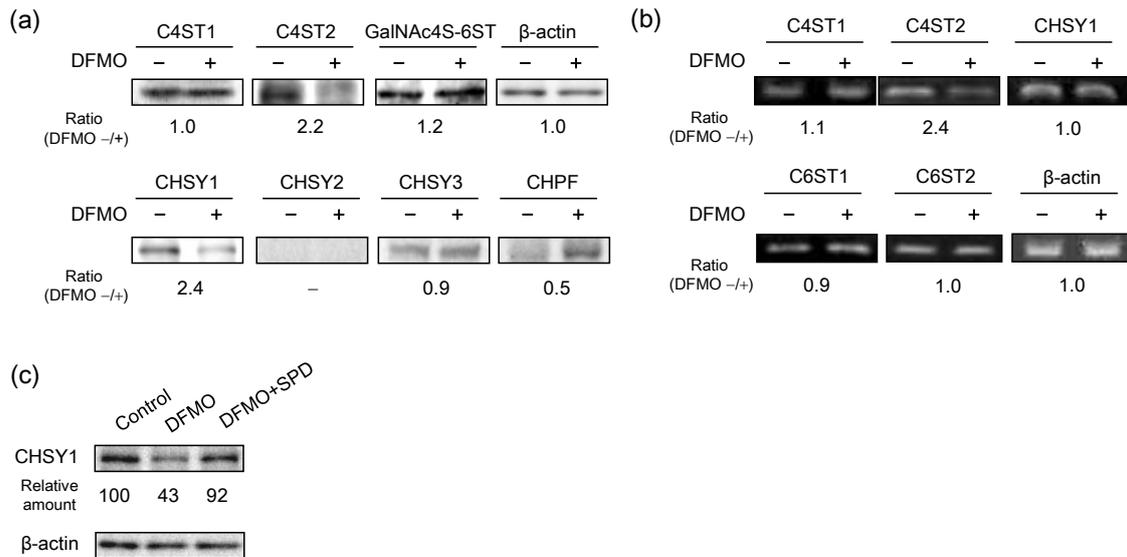
### ポリアミンに対して感受性を示すコンドロイチン硫酸生合成遺伝子の探索

CSの硫酸化パターンにポリアミンが影響を及ぼすことが明らかとなったため、コンドロイチン硫酸基転移酵素及びコンドロイチン合成酵素がポリアミンによる発現制御を受けていることが考えられた。CS生合成過程における伸長酵素としてCHSY1、CHSY2、CHSY3、CHPFが、GalNAcの4位を硫酸化する酵素としてC4ST1、C4ST2、GalNAc4S-6STがそれぞれ同定されている<sup>3,73</sup>。そこで、DFMOを用いてポリアミンの有無で細胞を培養した際の各酵素の発現量をWestern-blotting法により検討した (Fig. 22a)。その結果、CS伸長酵素であるCHSY1とCS硫酸化酵素であるC4ST2 2種の発現量が、細胞内ポリアミン量減少により減少していた (Fig. 22a)。更に、それぞれの酵素のmRNA発現量をRT-PCR法により確認したところ、C4ST2 mRNAの発現量は減少していたが、CHSY1 mRNA量に変化は見られなかった (Fig. 22b)。以上の結果より、ポリアミンによりCHSY1は翻訳レベルで、C4ST2は転写レベルで合成促進を受けることが明らかとなった。

続いて、DFMO添加によるCHSY1の発現量減少がポリアミンの減少に基づくものか調べるため、細胞内ポリアミン量を回復させた際にCHSY1発現量が変化するかどうかを調べた (Fig. 22c)。DFMOを添加し培養した細胞にスペルミジンを追加することでポリアミン量を回復させた結果、ポリアミン量の回復に伴いCHSY1発現量が回復していた (Fig. 22c)。



**Figure 21. Levels and disaccharide compositions of chondroitin sulfate in normal and DFMO treated cells. (a)** Chromatogram and disaccharide compositions of CS in HCT116 cells cultured with or without DFMO. CS purified from  $1 \times 10^7$  cells was treated with 50 mIU of Chase and then submitted to HPLC. Note that disaccharide composition of CS changed in DFMO-treated cells.  $\Delta$ Di-OS is  $\Delta$ UA (1 $\rightarrow$ 3) *N*-acetylgalactosamine (GalNAc),  $\Delta$ Di-4S is  $\Delta$ UA (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc4S, where S is sulfo,  $\Delta$ Di-6S is  $\Delta$ UA (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc6S,  $\Delta$ Di-UA2S is  $\Delta$ UA2S (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc,  $\Delta$ Di-diS<sub>E</sub> is  $\Delta$ UA (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc4S6S,  $\Delta$ Di-diS<sub>B</sub> is  $\Delta$ UA2S (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc4S,  $\Delta$ Di-diS<sub>D</sub> is  $\Delta$ UA2S (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc6S, and  $\Delta$ Di-TriS is  $\Delta$ UA2S (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc4S6S **(b)** Determination of the 4-sulfation/6-sulfation ratios (4S/6S ratios) of CS in 15 kinds of cells. 4S/6S ratios of CS are shown as percent of control (DFMO non-treated cells). N.D: not detected. Data are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. (n=3). Detailed expression level and disaccharide composition of CS in 15 types of control and DFMO-treated cells are shown in Table 12.



**Figure 22. CHSY1 and C4ST2 synthesis are enhanced by polyamines** (a) Effect of polyamine depletion on the expression level of Chondroitin 4-Sulfotransferase and Chondroitin Sulfate Synthase proteins in HCT116 cells. For Western blotting of C4ST, CHSY and β-actin, 20 μg (C4ST1,2, GalNAc4S-6ST, CHSY1-3,CHPF) or 5 μg (β-actin) of protein of whole cell lysate, prepared from cells cultured with or without DFMO, was used. (b) Effect of polyamine depletion on the expression level of mRNAs of CHSY1 and Chondroitin Sulfotransferase in HCT116 cells. (c) Effects of 5 mM DFMO and/or 25 μM spermidine (SPD) on the expression level of CHSY1 in HCT116 cells. To avoid the degradation of SPD, 1 mM aminoguanidine, an inhibitor of serum amine oxidase, was added together with SPD in culture medium for 3 days.

**Table 12.** Level and composition of unsaturated disaccharides in CS of control and DFMO treated cells. Experiments are expressed as the mean of three independent experiments.

Cell	DFMO	Unsaturated disaccharide (%)								Total amount ng/mg protein	4S/6S ratio
		$\Delta$ Di-0S	$\Delta$ Di-4S	$\Delta$ Di-6S	$\Delta$ Di-UA2S	$\Delta$ Di-diS <sub>E</sub>	$\Delta$ Di-diS <sub>B</sub>	$\Delta$ Di-diS <sub>D</sub>	$\Delta$ Di-triS		
NIH3T3	-	13.5	83.8	ND*	ND*	ND*	2.7	ND*	ND*	392.1	ND*
	+	17.7	80.0	ND*	ND*	ND*	2.3	ND*	ND*	305.4	
ATDC5	-	5.9	90.8	1.1	ND*	2.1	ND*	ND*	ND*	968.6	81.0
	+	14.8	81.2	1.5	ND*	2.5	ND*	ND*	ND*	577.6	55.7
CHO-K1	-	5.2	88.8	ND*	ND*	ND*	6.0	ND*	ND*	372.3	ND*
	+	5.7	88.8	ND*	ND*	ND*	5.5	ND*	ND*	581.8	
CCF-STTG1	-	19.9	61.0	15.7	ND*	2.2	0.6	0.4	ND*	2659.6	3.9
	+	10.7	68.3	17.2	ND*	2.5	0.6	0.6	ND*	3443.4	4.0
HeLa	-	5.9	69.0	18.4	ND*	1.4	3.0	1.1	ND*	1041.9	3.9
	+	5.3	65.6	23.1	ND*	0.9	2.9	2.3	ND*	1099.3	2.8
U-2OS	-	59.0	19.8	20.2	ND*	ND*	ND*	0.5	ND*	680.2	0.9
	+	44.6	25.1	28.4	ND*	ND*	ND*	1.9	ND*	987.2	0.9
HepG2	-	3.9	83.0	7.4	ND*	5.6	ND*	ND*	ND*	199.0	11.2
	+	4.0	74.1	19.3	ND*	2.6	ND*	ND*	ND*	258.1	3.8
HCT116	-	9.4	48.7	33.3	ND*	7.0	ND*	1.0	ND*	123.8	1.5
	+	10.0	36.9	46.4	ND*	4.9	ND*	1.8	ND*	93.8	0.8
C2C12	-	77.6	20.0	1.8	ND*	0.6	ND*	ND*	ND*	592.5	11.1
	+	85.9	11.3	2.4	ND*	0.3	ND*	ND*	ND*	300.0	4.7
A549	-	5.4	79.1	10.0	ND*	5.0	ND*	0.5	ND*	687.3	7.9
	+	14.9	70.2	10.5	ND*	3.9	ND*	0.6	ND*	566.3	6.7
HEK293	-	5.7	83.9	3.8	ND*	2.0	3.8	0.7	ND*	103.0	23.0
	+	8.7	74.8	8.7	ND*	1.4	4.7	1.7	ND*	96.5	8.8
Caco-2	-	12.1	12.0	75.9	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	7.2	0.2
	+	10.9	7.5	81.6	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	10.7	0.1
MCF7	-	11.3	66.2	1.6	ND*	20.9	ND*	ND*	ND*	106.7	41.7
	+	12.5	66.2	2.7	ND*	18.6	ND*	ND*	ND*	133.0	24.8
PANC-1	-	75.0	10.4	12.9	ND*	1.7	ND*	ND*	ND*	178.9	0.8
	+	71.2	8.4	18.8	ND*	1.7	ND*	ND*	ND*	148.0	0.4
Neuro-2a	-	42.3	57.7	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	1.8	ND*
	+	46.1	53.9	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	4.0	

\*ND, not detected

### 4-3. 考察

本章では CS とポリアミンの関係性に焦点を当て、培養細胞を用いて CS 生合成に対するポリアミンの効果を調べた。まず、細胞内ポリアミン量を減少させた際の CS 発現量、硫酸化パターンの変化を調べた (Fig. 19; Table12)。その結果、HS とは異なり CS 発現量は大きく変化しなかったが (Fig. 19a; Table12)、ポリアミン量減少により CS の 4S/6S 比が減少していた (Fig. 19b; Table12)。続いて、ポリアミンにより発現調節を受ける CS 合成酵素を探索したところ、CHSY1 は翻訳レベルで、C4ST2 は転写レベルでポリアミンにより合成促進を受けることが明らかとなった (Fig. 20a,b)。以上の結果から、加齢に伴い CS 硫酸化パターンが変化するメカニズムの一端を解明することができたと考えている。一方で、細胞内ポリアミン量減少時に CHPF の発現量増加が認められた (Fig. 20a)。このことは細胞内ポリアミン量減少による CHSY1 発現量の減少に伴う代償機構であると考えられるが、詳細は検討中である。

当研究室の山口らにより遺伝子の発現に対して抑制的に作用する G-quadruplex 構造が CHSY1 mRNA 上に存在することが明らかとされ、現在はポリアミンが CHSY1 遺伝子上に存在する G-quadruplex 構造を介して CHSY1 の合成を調節するというメカニズムを検討している (投稿準備中)。また、ポリアミンによる C4ST2 の合成促進が転写レベルで起こることから、C4ST2 の転写に関わる転写因子がポリアミンによる発現調節を受けている可能性が考えられた。そこで、当研究室の朝倉らが C4ST2 の転写に関わる転写因子からポリアミンによる発現調節を受ける転写因子を探索したところ、GCFC2 がポリアミンによる発現調節を受けることを見出した (投稿準備中)。今後は、以上のポリアミンによる CHSY1、C4ST2 発現調節メカニズムを研究することで、CS とポリアミンの関係を明らかとしていきたいと考えている。

## 5.結論

1. ポリアミンは EXT1、EXT2 の合成を翻訳レベルで制御することで HS 発現量を調節していることが明らかとなった。
2. EXT2 の翻訳開始はアミノ酸コード領域の N 末端側で miRNA の一つである let-7b により負に制御されており、ポリアミンは let-7b の制御を解除することで EXT2 の合成を促進することが明らかとなった。
3. ポリアミンは CHSY1 の合成を翻訳レベルで、C4ST2 の合成を転写レベルで制御することで CS 鎖の成熟に関与することが示唆された。

## 6.参考文献

- 1 Roden, L. *Structure and metabolism of connective tissue proteoglycans* *Structure and metabolism of connective tissue proteoglycans*. 267-371 (Plenum press, 1980).
- 2 Bishop, J. R., Schuksz, M. & Esko, J. D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030-1037, doi:10.1038/nature05817 (2007).
- 3 Mikami, T. & Kitagawa, H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 4719-4733, doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.006 (2013).
- 4 Maeda, N. Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease. *Front Neurosci* **9**, 98, doi:10.3389/fnins.2015.00098 (2015).
- 5 Ashikari-Hada, S. *et al.* Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using an octasaccharide library. *J Biol Chem* **279**, 12346-12354, doi:10.1074/jbc.M313523200 (2004).
- 6 Bao, X., Muramatsu, T. & Sugahara, K. Demonstration of the pleiotrophin-binding oligosaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brains. *J Biol Chem* **280**, 35318-35328, doi:10.1074/jbc.M507304200 (2005).
- 7 Sarrazin, S., Lamanna, W. C. & Esko, J. D. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, doi:10.1101/cshperspect.a004952 (2011).
- 8 Mizumoto, S., Ikegawa, S. & Sugahara, K. Human genetic disorders caused by mutations in genes encoding biosynthetic enzymes for sulfated glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **288**, 10953-10961, doi:10.1074/jbc.R112.437038 (2013).
- 9 Nakajima, M. *et al.* Mutations in B3GALT6, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders. *Am J Hum Genet* **92**, 927-934, doi:10.1016/j.ajhg.2013.04.003 (2013).
- 10 Beltrami, G., Ristori, G., Scoccianti, G., Tamburini, A. & Capanna, R. Hereditary Multiple Exostoses: a review of clinical appearance and metabolic pattern. *Clin Cases Miner Bone Metab* **13**, 110-118, doi:10.11138/ccmbm/2016.13.2.110 (2016).
- 11 Li, Y. *et al.* Temtamy preaxial brachydactyly syndrome is caused by loss-of-function mutations in chondroitin synthase 1, a potential target of BMP signaling. *Am J Hum Genet* **87**, 757-767, doi:10.1016/j.ajhg.2010.10.003 (2010).
- 12 Mathews, M. B. & Glagov, S. Acid mucopolysaccharide patterns in aging human cartilage. *J Clin Invest* **45**, 1103-1111, doi:10.1172/JCI105416 (1966).
- 13 Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Tone, Y. & Sugahara, K. Developmental regulation of the sulfation profile of chondroitin sulfate chains in the chicken embryo brain. *J Biol Chem* **272**, 31377-31381 (1997).

- 14 Bayliss, M. T., Osborne, D., Woodhouse, S. & Davidson, C. Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. The effect of age, topographical position, and zone of cartilage on tissue composition. *J Biol Chem* **274**, 15892-15900 (1999).
- 15 Carrino, D. A. *et al.* Age-related differences in human skin proteoglycans. *Glycobiology* **21**, 257-268, doi:10.1093/glycob/cwq162 (2011).
- 16 Oh, J. H., Kim, Y. K., Jung, J. Y., Shin, J. E. & Chung, J. H. Changes in glycosaminoglycans and related proteoglycans in intrinsically aged human skin in vivo. *Exp Dermatol* **20**, 454-456, doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01258.x (2011).
- 17 Keenan, T. D. *et al.* Age-dependent changes in heparan sulfate in human Bruch's membrane: implications for age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 5370-5379, doi:10.1167/iovs.14-14126 (2014).
- 18 Igarashi, K. & Kashiwagi, K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 39-51, doi:10.1016/j.biocel.2009.07.009 (2010).
- 19 Wang, Y. *et al.* Properties of purified recombinant human polyamine oxidase, PAOh1/SMO. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 605-611 (2003).
- 20 Igarashi, K. & Kashiwagi, K. Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol Biochem* **48**, 506-512, doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.017 (2010).
- 21 Watanabe, S., Kusama-Eguchi, K., Kobayashi, H. & Igarashi, K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem* **266**, 20803-20809 (1991).
- 22 Miyamoto, S., Kashiwagi, K., Ito, K., Watanabe, S. & Igarashi, K. Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **300**, 63-68, doi:10.1006/abbi.1993.1009 (1993).
- 23 Sakamoto, A. *et al.* Enhanced biofilm formation and/or cell viability by polyamines through stimulation of response regulators UvrY and CpxR in the two-component signal transducing systems, and ribosome recycling factor. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 1877-1886, doi:10.1016/j.biocel.2012.07.010 (2012).
- 24 Terui, Y. *et al.* Enhancement of the synthesis of RpoE and StpA by polyamines at the level of translation in *Escherichia coli* under heat shock conditions. *J Bacteriol* **191**, 5348-5357, doi:10.1128/JB.00387-09 (2009).
- 25 Terui, Y. *et al.* Ribosome modulation factor, an important protein for cell viability encoded by the polyamine modulon. *J Biol Chem* **285**, 28698-28707, doi:10.1074/jbc.M110.111195 (2010).
- 26 Terui, Y. *et al.* Increase in cell viability by polyamines through stimulation of the synthesis of ppGpp regulatory protein and  $\omega$  protein of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 412-422, doi:10.1016/j.biocel.2011.11.017 (2012).
- 27 Sakamoto, A. *et al.* Three members of polyamine modulon under oxidative stress conditions: two

- transcription factors (SoxR and EmrR) and a glutathione synthetic enzyme (GshA). *PLoS One* **10**, e0124883, doi:10.1371/journal.pone.0124883 (2015).
- 28 Uemura, T. *et al.* Polyamine modulon in yeast-Stimulation of COX4 synthesis by spermidine at the level of translation. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 2538-2545, doi:10.1016/j.biocel.2009.08.010 (2009).
- 29 Nishimura, K. *et al.* Identification of proteins whose synthesis is preferentially enhanced by polyamines at the level of translation in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 2251-2261, doi:10.1016/j.biocel.2009.04.021 (2009).
- 30 Terui, Y. *et al.* Polyamine stimulation of eEF1A synthesis based on the unusual position of a complementary sequence to 18S rRNA in eEF1A mRNA. *Amino Acids* **47**, 345-356, doi:10.1007/s00726-014-1867-z (2015).
- 31 JAENNE, J., RAINA, A. & SIIMES, M. SPERMIDINE AND SPERMINE IN RAT TISSUES AT DIFFERENT AGES. *Acta Physiol Scand* **62**, 352-358, doi:10.1111/j.1748-1716.1964.tb10433.x (1964).
- 32 Nishimura, K., Shiina, R., Kashiwagi, K. & Igarashi, K. Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *J Biochem* **139**, 81-90, doi:10.1093/jb/mvj003 (2006).
- 33 Takigawa, M., Ishida, H., Takano, T. & Suzuki, F. Polyamine and differentiation: induction of ornithine decarboxylase by parathyroid hormone is a good marker of differentiated chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1481-1485 (1980).
- 34 Takano, T. *et al.* The effect of parathyroid hormone (1-34) on cyclic AMP level, ornithine decarboxylase activity, and glycosaminoglycan synthesis of chondrocytes from mandibular condylar cartilage, nasal septal cartilage, and spheno-occipital synchondrosis in culture. *J Dent Res* **66**, 84-87 (1987).
- 35 Takano, T., Takigawa, M. & Suzuki, F. Role of polyamines in expression of the differentiated phenotype of chondrocytes: effect of DL-alpha-hydrazino-delta-aminovaleric acid (DL-HAVA), an inhibitor of ornithine decarboxylase, on chondrocytes treated with parathyroid hormone. *J Biochem* **93**, 591-598 (1983).
- 36 Stepp, M. A. *et al.* Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J Cell Sci* **115**, 4517-4531 (2002).
- 37 Sher, I. *et al.* Targeting perlecan in human keratinocytes reveals novel roles for perlecan in epidermal formation. *J Biol Chem* **281**, 5178-5187, doi:10.1074/jbc.M509500200 (2006).
- 38 Jurjus, R. A., Liu, Y., Pal-Ghosh, S., Tadvalkar, G. & Stepp, M. A. Primary dermal fibroblasts derived from sdc-1 deficient mice migrate faster and have altered alphav integrin function. *Wound Repair Regen* **16**, 649-660, doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00423.x (2008).
- 39 Li, Y. *et al.* Age-dependent alterations of decorin glycosaminoglycans in human skin. *Sci Rep* **3**, 2422, doi:10.1038/srep02422 (2013).

- 40 Huang, G. *et al.* Evaluation of dermal substitute in a novel co-transplantation model with autologous epidermal sheet. *PLoS One* **7**, e49448, doi:10.1371/journal.pone.0049448 (2012).
- 41 LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275 (1951).
- 42 Igarashi, K. *et al.* Formation of a compensatory polyamine by *Escherichia coli* polyamine-requiring mutants during growth in the absence of polyamines. *J Bacteriol* **166**, 128-134 (1986).
- 43 Zhang, F. *et al.* Microscale isolation and analysis of heparin from plasma using an anion-exchange spin column. *Anal Biochem* **353**, 284-286, doi:10.1016/j.ab.2006.01.040 (2006).
- 44 Higashi, K. *et al.* Composition of glycosaminoglycans in elasmobranchs including several deep-sea sharks: identification of chondroitin/dermatan sulfate from the dried fins of *Isurus oxyrinchus* and *Prionace glauca*. *PLoS One* **10**, e0120860, doi:10.1371/journal.pone.0120860 (2015).
- 45 Mizutani, A., Inoue, H. & Takeda, Y. Changes in polyamine metabolism during wound healing in rat skin. *Biochim. Biophys. Acta* **338**, 183-190 (1974).
- 46 Nadanaka, S. *et al.* EXTL2, a member of the EXT family of tumor suppressors, controls glycosaminoglycan biosynthesis in a xylose kinase-dependent manner. *J Biol Chem* **288**, 9321-9333, doi:10.1074/jbc.M112.416909 (2013).
- 47 Nielsen, P. J., Manchester, K. L., Towbin, H., Gordon, J. & Thomas, G. The phosphorylation of ribosomal protein S6 in rat tissues following cycloheximide injection, in diabetes, and after denervation of diaphragm. A simple immunological determination of the extent of S6 phosphorylation on protein blots. *J Biol Chem* **257**, 12316-12321 (1982).
- 48 Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
- 49 Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415 (2003).
- 50 Fukumoto, Y. *et al.* Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology* **62**, 73-82, doi:10.1007/s10616-010-9259-z (2010).
- 51 Jakus, J., Wolff, E. C., Park, M. H. & Folk, J. E. Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines. *J Biol Chem* **268**, 13151-13159 (1993).
- 52 Kozak, M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* **266**, 19867-19870 (1991).
- 53 Jackson, R. J., Hellen, C. U. & Pestova, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 113-127, doi:10.1038/nrm2838

- (2010).
- 54 Roush, S. & Slack, F. J. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* **18**, 505-516, doi:10.1016/j.tcb.2008.07.007 (2008).
- 55 Hutvagner, G. & Simard, M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 22-32, doi:10.1038/nrm2321 (2008).
- 56 Izaurrealde, E. A role for eIF4AII in microRNA-mediated mRNA silencing. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 543-545, doi:10.1038/nsmb.2582 (2013).
- 57 Shen, W. F., Hu, Y. L., Uttarwar, L., Passegue, E. & Largman, C. MicroRNA-126 regulates HOXA9 by binding to the homeobox. *Mol Cell Biol* **28**, 4609-4619, doi:10.1128/MCB.01652-07 (2008).
- 58 Forman, J. J., Legesse-Miller, A. & Coller, H. A. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14879-14884, doi:10.1073/pnas.0803230105 (2008).
- 59 Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A. M., Lim, B. & Rigoutsos, I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* **455**, 1124-1128, doi:10.1038/nature07299 (2008).
- 60 Duursma, A. M., Kedde, M., Schrier, M., le Sage, C. & Agami, R. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA* **14**, 872-877, doi:10.1261/rna.972008 (2008).
- 61 Nelson, P. T. *et al.* Specific sequence determinants of miR-15/107 microRNA gene group targets. *Nucleic Acids Res* **39**, 8163-8172, doi:10.1093/nar/gkr532 (2011).
- 62 Radhakrishnan, P. *et al.* MicroRNA-200c modulates the expression of MUC4 and MUC16 by directly targeting their coding sequences in human pancreatic cancer. *PLoS One* **8**, e73356, doi:10.1371/journal.pone.0073356 (2013).
- 63 Paz, E. A., LaFleur, B. & Gerner, E. W. Polyamines are oncometabolites that regulate the LIN28/let-7 pathway in colorectal cancer cells. *Mol Carcinog* **53 Suppl 1**, E96-106, doi:10.1002/mc.22051 (2014).
- 64 Heo, I. *et al.* TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* **138**, 696-708, doi:10.1016/j.cell.2009.08.002 (2009).
- 65 Deerberg, A., Willkomm, S. & Restle, T. Minimal mechanistic model of siRNA-dependent target RNA slicing by recombinant human Argonaute 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 17850-17855, doi:10.1073/pnas.1217838110 (2013).
- 66 Higashi, K. *et al.* Selective structural change by spermidine in the bulged-out region of double-stranded RNA and its effect on RNA function. *J Biol Chem* **283**, 32989-32994, doi:10.1074/jbc.M806027200 (2008).
- 67 Sikand, K., Singh, J., Ebron, J. S. & Shukla, G. C. Housekeeping gene selection advisory: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and  $\beta$ -actin are targets of miR-644a.

- PLoS One* **7**, e47510, doi:10.1371/journal.pone.0047510 (2012).
- 68 Igarashi, K. & Kashiwagi, K. Modulation of protein synthesis by polyamines. *IUBMB Life* **67**, 160-169, doi:10.1002/iub.1363 (2015).
- 69 Iozzo, R. V. Turnover of heparan sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells. A quantitative biochemical and autoradiographic study. *J Biol Chem* **262**, 1888-1900 (1987).
- 70 Qu, H. *et al.* miRNA-558 promotes tumorigenesis and aggressiveness of neuroblastoma cells through activating the transcription of heparanase. *Hum Mol Genet* **24**, 2539-2551, doi:10.1093/hmg/ddv018 (2015).
- 71 Ishihara, M. & Conrad, H. E. Correlations between heparan sulfate metabolism and hepatoma growth. *J Cell Physiol* **138**, 467-476, doi:10.1002/jep.1041380305 (1989).
- 72 Meijer, H. A. *et al.* Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science* **340**, 82-85, doi:10.1126/science.1231197 (2013).
- 73 Bülow, H. E. & Hobert, O. The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 375-407, doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093433 (2006).
- 74 Li, G. *et al.* Glycosaminoglycanomics of cultured cells using a rapid and sensitive LC-MS/MS approach. *ACS Chem Biol* **10**, 1303-1310, doi:10.1021/acscchembio.5b00011 (2015).

## 7.論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Masataka Imamura, Kyohei Higashi, Katsutoshi Yamaguchi, Kiryu Asakura, Tomomi Furihata, Yusuke Terui, Toshihiko Satake, Jiro Maegawa, Kazunori Yasumura, Ai Ibuki, Tomoko Akase, Kazuhiro Nishimura, Keiko Kashiwagi, Robert J. Linhardt, Kazuei Igarashi, and Toshihiko Toida. : Polyamines release the let-7b-mediated suppression of initiation codon recognition during the protein synthesis of EXT2. Scientific reports, 6 : 33549 (2016)

## 8.謝辞

終わりに臨み、6年間という長期間にわたり終始懇切丁寧に御指導して下さった戸井田敏彦教授に心から感謝致します。適切な御助言や御指導をくださいました、西村和洋准教授、東恭平助教に深く感謝致します。

また本研究に御助言、ご協力頂きました株式会社アミンファーマ研究所 五十嵐 一衛先生、植村 武史博士、病態分析化学研究室の現役学生及び同研究室の卒業生の皆様に心より感謝致します。

細胞を快く提供していただいた神戸薬科大学 生化学研究室 北川裕之 教授、東京慈恵医科大学大学院 分子生物学講座 村井法之講師、千葉大学大学院 薬学研究院 薬物学研究室 助教 降幡知巳先生、千葉大学大学院 薬学研究院 分子細胞生物学研究室山口直人 教授、講師 福本泰典先生、千葉大学大学院 薬学研究院 薬効薬理学研究室 助教 中村浩之先生に心より御礼申し上げます。また、患者の皮膚サンプルを快く提供していただいた横浜市立大学医学部 赤瀬智子教授、前川二郎教授、安村和則診療講師、伊吹愛助教に心より御礼申し上げます。GC<sub>7</sub>を快く提供していただいたNational Institutes of Health Dr. M. H. Parkに心より御礼申し上げます。

最後に、様々な方面で支えて下さいました家族、友人に心より感謝致します。

## 9.審査委員

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 山口 直人

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 伊藤 素行

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 川島 博人