

バイオモジュレーターとしてのポリアミン ーその機能と制御システム

課題番号 11470482

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金[基盤研究(B)(2)]研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 五十嵐 一衛
(千葉大学薬学部教授)

はしがき

生理活性物質ポリアミン（プトレスシン、スペルミジン、スペルミン）の機能は、生命の維持に必須なイオンチャネル（NMDA受容体、K⁺チャネル等）の活性を調節する機能と、細胞増殖時に増加するポリアミンによる蛋白質合成促進や蛋白質のリン酸化の促進による情報伝達のリモジュレーションの二つに大別される。前者はポリアミンの新研究分野として最近確立した分野であり、ポリアミンと蛋白質との相互作用に基づいている。一方、後者はポリアミンとRNA、DNA及びATPとの相互作用に基づいている。ポリアミンと蛋白質との相互作用に関しては、我々はポリアミンの輸送系を構成するポリアミン受容体の構造をX線結晶構造解析により世界で初めて明らかにした。このポリアミン受容体とNMDA受容体のアミノ酸配列のホモロジー検索を行い、NMDA受容体上のポリアミン結合に関与していると思われるアミノ酸残基を他アミノ酸残基に変換した変異NMDA受容体を作製し、ポリアミンの効果を測定することにより、ポリアミン結合部位の一部を同定した。ポリアミンによる促進に関わるアミノ酸残基はアゴニスト結合領域の更にN末端側に位置しており、この領域を調節領域と命名し、その構造と機能を解析中である。一方、大腸菌の細胞増殖時にポリアミンにより合成促進を受ける蛋白質として、栄養供給に関与するオリゴペプチド結合蛋白質（OppA）とアデニル酸シクラーゼを同定した。この両蛋白質のポリアミンによる合成促進はいずれも翻訳レベルで起こり、OppAの場合は開始反応に重要なmRNA上のShine-Dalgarno（SD）配列がポリアミンにより弛緩されることが原因であり、アデニル酸シクラーゼの場合は開始コドンがAUGでなく効率の悪いUUGであり、このUUG依存のfMet-tRNA_fのリボソームへの結合をポリアミンが促進するためであることを見出した。すなわち、両蛋白質合成において、ポリアミンが開始反応を異なるメカニズムでリモジュレートしていることを明らかにした。

研究組織

研究代表者	五十嵐一衛	（千葉大学薬学部教授）
研究分担者	柿沼喜己	（千葉大学薬学部助教授）
研究分担者	柏木敬子	（千葉大学薬学部助手）
研究分担者	西村和洋	（千葉大学薬学部教務職員）

研究経費

平成11年度	9,700千円
平成12年度	5,100千円
計	14,800千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. F. Antognoni, S. Del Duca, A. Kuraishi, E. Kawabe, T. Fukuchi-Shimogori, K. Kashiwagi, and K. Igarashi: Transcriptional inhibition of the operon for the spermidine uptake system by the substrate binding protein PotD. *J. Biol. Chem.* **274**, 1942-1948 (1999)
2. H. Tomitori, K. Kashiwagi, K. Sakata, Y. Kakinuma, and K. Igarashi: Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**, 3265-3267 (1999)
3. S. Iwata, Y. Sato, M. Asada, M. Takagi, A. Tsujimoto, T. Inaba, T. Yamada, S. Sakamoto, J. Yata, T. Shimogori, K. Igarashi, and S. Mizutani: Anti-tumor activity of antizyme which targets the ornithine decarboxylase (ODC) required for cell growth and transformation. *Oncogene* **18**, 165-172 (1999)
4. T. Masuko, K. Kashiwagi, T. Kuno, N. D. Nguyen, A. J. Pahk, J. Fukuchi, K. Igarashi, and K. Williams: A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the *N*-methyl-D-aspartate receptor: Effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Mol. Pharmacol.* **55**, 957-969 (1999)
5. T. Masuko, T. Kuno, K. Kashiwagi, T. Kusama, K. Williams, and K. Igarashi: Stimulatory and inhibitory properties of aminoglycoside antibiotics at *N*-methyl-D-aspartate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 1026-1033 (1999)
6. M. Yoshida, D. Meksuriyen, K. Kashiwagi, G. Kawai, and K. Igarashi: Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA): Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon AUG in OppA mRNA. *J. Biol. Chem.* **274**, 22723-22728 (1999)
7. K. Nishimura, K. Kashiwagi, Y. Matsuda, O. A. Jänne, and K. Igarashi: Gene structure and chromosomal localization of mouse *S*-adenosylmethionine decarboxylase. *Gene* **238**, 343-350 (1999)
8. A. Apirakaramwong, K. Kashiwagi, V. S. Raj, K. Sakata, Y. Kakinuma, A. Ishihama, and K. Igarashi: Involvement of ppGpp, ribosome modulation factor and stationary phase-specific sigma σ^S in the decrease in cell viability caused by spermidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 643-647 (1999)
9. K. Igarashi, and K. Kashiwagi: Polyamine transport in bacteria and yeast (Review). *Biochem. J.* **344**, 633-642 (1999)
10. K. Sakata, K. Kashiwagi, and K. Igarashi: Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme. *Biochem. J.* **347**, 297-303 (2000)
11. M. Kai, T. Higo, J. Yokosuka, C. Kaito, E. Kajita, H. Fukamachi, E. Takayama, K. Igarashi, and K. Shiokawa: Overexpression of *S*-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) activates the maternal program of apoptosis shortly after MBT in *Xenopus* embryos. *Int. J. Develop. Biol.* **44**, 507-510 (2000)
12. S. Hayashi, K. Nishimura, T. Fukuchi-Shimogori, K. Kashiwagi, and K. Igarashi: Increase in cap- and IRES-dependent protein synthesis by overproduction of translation initiation factor eIF4G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 117-123 (2000)
13. K. Kashiwagi, A. Kuraishi, H. Tomitori, A. Igarashi, K. Nishimura, A. Shirahata, and K. Igarashi: Identification of the putrescine recognition site on polyamine transport protein PotE.

- J. Biol. Chem.* **275**, 36007-36012 (2000)
14. K. Shiokawa, M. Kai, T. Higo, C. Kaito, J. Yokoska, Y. Yasuhiko, E. Kajita, M. Nagano, Y. Yamada, M. Shibata, T. Muto, J. Shinga, H. Hara, E. Takayama, H. Fukamachi, Y. Yaoita, and K. Igarashi: Maternal program of apoptosis activated shortly after midblastula transition by overexpression of *S*-adenosylmethine decarboxylase in *Xenopus* early embryos. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **126**, 149-155 (2000)
 15. K. Igarashi, and K. Kashiwagi: Polyamines: Mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 559-564 (2000)
 16. H. Tomitori, K. Kashiwagi, T. Asakawa, Y. Kakinuma, A. J. Michael, and K. Igarashi: Multiple polyamine transport systems on the vacuolar membrane in yeast. *Biochem. J.* **353**, 681-688 (2001)

(2) 口頭発表

1. 塩川光一郎, 甲斐理武, 柴田幹士, 安彦行人, 肥後剛康, 横須賀純一, 信賀順, 高山英次, 深町博史, 五十嵐一衛: *S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (SAMDC) 過剰発現はツメガエル初期囊胚にアポトーシスを引き起こす。日本ポリアミン研究会-第14回研究発表会, 平成11年1月
2. 柏木敬子, 富取秀行, 坂田かおり, 柿沼喜己, 五十嵐一衛: 酵母のポリアミン輸送蛋白質遺伝子の同定。日本ポリアミン研究会-第14回研究発表会, 平成11年1月
3. 西村和洋, 柏木敬子, 白幡晶, O. A. Jänne, 五十嵐一衛: マウス*S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (SAMDC) の遺伝子構造と機能解析。日本ポリアミン研究会-第14回研究発表会, 平成11年1月
4. D. Meksuriyen, 福地智美, 富取秀行, 柏木敬子, 戸井田敏彦, 今成登志男, 河合剛太, 五十嵐一衛: ATP-Mg²⁺-スペルミン複合体形成とその生物学的意義。日本ポリアミン研究会-第14回研究発表会, 平成11年1月
5. A. Apirakaramwong, 柏木敬子, 五十嵐一衛: ポリアミンによるppGpp合成促進に基づく細胞死。日本薬学会第119年会, 平成11年3月
6. D. Meksuriyen, 福地智美, 富取秀行, 柏木敬子, 戸井田敏彦, 今成登志男, 五十嵐一衛, 河合剛太: ATP-Mg²⁺-スペルミン三者複合体形成とその生理的意義。日本薬学会第119年会, 平成11年3月
7. 坂田かおり, 柏木敬子, 五十嵐一衛, 白幡晶: アンチザイム合成に必要なフレームシフトを誘導するジアミンの構造。日本薬学会第119年会, 平成11年3月
8. 大木祐二, 西村和洋, 福地智美, 柏木敬子, 五十嵐一衛, 白幡晶: デオキシスバガリンによるeIF5Aのハイブシン化の阻害。日本薬学会第119年会, 平成11年3月
9. 柏木敬子, F. Antognoni, S. Del Duca, 倉石愛子, 河辺絵里, 福地智美, 五十嵐一衛: スペルミン取り込み系オペロンの基質結合蛋白質PotDによる転写阻害。日本薬学会第119年会, 平成11年3月
10. 五十嵐一衛: 細胞増殖因子ポリアミンと蛋白質・核酸との相互作用。第17回物性物理化学研究会, 平成11年6月
11. 吉田円, D. Meksuriyen, 柏木敬子, 河合剛太, 五十嵐一衛: ポリアミンによるOppA蛋白質合成促進機序。第1回日本RNAミーティング (日本RNA学会年会), 平成11年8月
12. 西村和洋, 柏木敬子, 松田洋一, 中津史, 大野博司, 齋藤隆, 五十嵐一衛: マウス*S*-アデノシル

メチオニン脱炭酸酵素遺伝子 (AMD1) の発現調節とターゲッティング。第72回日本生化学会大会, 平成11年9月

13. 林聡子, 福地智美, 西村和洋, 柏木敬子, 五十嵐一衛: 蛋白質合成開始効率に果たすeIF4Gの役割。第72回日本生化学会大会, 平成11年9月
14. 吉田円, 柏木敬子, 石浜明, 五十嵐一衛: ポリアミンによる σ^s の合成促進機序と鞭毛発現量の解析。第72回日本生化学会大会, 平成11年9月
15. 柏木敬子, 倉石愛子, 小林名都子, 五十嵐一衛: プトレスシン輸送蛋白質PotEの基質認識部位の同定。第72回日本生化学会大会, 平成11年9月
16. 坂田かおり, 柏木敬子, 五十嵐一衛: アンチザイムによるポリアミン輸送系の調節。第72回日本生化学会大会, 平成11年9月
17. 富取秀行, 柏木敬子, 柿沼喜己, 五十嵐一衛: 酵母ポリアミン輸送蛋白質の機能解析。第72回日本生化学会大会, 平成11年9月
18. 久野智子, 益子崇, 柏木敬子, 五十嵐一衛, K. Williams: NMDA受容体N末端領域のスペルミン・イフェンプロジル結合部位の解析。第72回日本生化学会大会, 平成11年9月
19. 柏木敬子, 倉石愛子, 印南朱, 富取秀行, 小林名都子, 五十嵐一衛: ポリアミン輸送蛋白質の活性発現に関わるアミノ酸残基の同定。第21回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 平成11年11月
20. 塩川光一郎, 甲斐理武, 肥後剛康, 横須賀純一, 安彦行人, 梶田恵理, 深町博史, 高山英次, 矢尾板芳郎, 五十嵐一衛: ツメガエル卵にセットされたアポトーシスプログラム。第22回日本分子生物学会年会, 平成11年12月
21. 甲斐理武, 肥後剛康, 高山英次, 矢尾板芳郎, 五十嵐一衛, 塩川光一郎: ツメガエル胚における「監視」機構としての母性アポトーシス。第22回日本分子生物学会年会, 平成11年12月
22. 肥後剛康, 高山英次, 甲斐理武, 横須賀純一, 田嶋正二, 五十嵐一衛, 三浦謹一郎, 水本清久, 塩川光一郎: SAMDC過剰発現で誘導したツメガエル初期囊胚でのアポトーシスのキャップアナログによるレスキュー。第22回日本分子生物学会年会, 平成11年12月
23. K. Igarashi: Molecular mechanism of polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein. 6th International Congress on Amino Acids, Bonn, F. R. G., 平成11年8月
24. K. Kashiwagi, H. Tomitori, A. Kuraishi, K. Sakata, Y. Kakinuma and K. Igarashi: Polyamine transport in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. 6th International Congress on Amino Acids, Bonn, F. R. G., 平成11年8月
25. K. Nishimura, K. Kashiwagi, Y. Matsuda, O. A. Jänne and K. Igarashi: Gene structure of S-adenosylmethionine decarboxylase and its localization on mouse chromosome. 6th International Congress on Amino Acids, Bonn, F. R. G., 平成11年8月
26. K. Kashiwagi, A. Kuraishi and K. Igarashi: Identification of amino acid residues in PotE involved in putrescine uptake and excretion. 1999 Polyamine Gordon Conference, Oxford, U. K., 平成11年8月
27. K. Sakata, K. Kashiwagi and K. Igarashi: Regulation of polyamine transport by the antizyme. 1999 Polyamine Gordon Conference, Oxford, U. K., 平成11年8月
28. M. Yoshida, D. Meksuriyen, K. Kashiwagi, G. Kawai and K. Igarashi: Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA): involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon AUG in OppA mRNA. 1999 Polyamine Gordon Conference, Oxford, U. K., 平成11年8月
29. K. Shiokawa, M. Kai, T. Higo, J. Yokoska, M. Shibata, Y. Yasuhiko, M. Nagano, E. Takayama, K. Igarashi and H. Fukamachi: Overexpression of S-adenosylmethionine

- decarboxylase (SAMDC) in early *Xenopus* embryos switches on apoptotic program shortly after MBT and inhibits transition from the blastula to gastrula stage. 1999 Polyamine Gordon Conference, Oxford, U. K., 平成11年8月
30. T. Masuko, K. Kashiwagi, T. Kuno, N. D. Nguyen, A. J. Pahk, J. Fukuchi, K. Igarashi and K. Williams: The ifenprodil binding site of the NMDA receptor: identification by site-directed mutagenesis. Society for Neuroscience's 29th Annual Meeting, Miami, U. S. A., 平成11年11月
 31. K. Williams, N. D. Nguyen, T. Masuko, T. Kuno, K. Kashiwagi and K. Igarashi: Residues that differentially affect block of NMDA channels by MK-801, TB-3-4, and memantine. Society for Neuroscience's 29th Annual Meeting, Miami, U. S. A., 平成11年11月
 32. 柏木敬子, 倉石愛子, 西村和洋, 五十嵐一衛: プトレスシン輸送蛋白質PotEの基質認識部位ーポリアミン認識構造の共通性ー。日本ポリアミン研究会ー第15回研究発表会, 平成12年1月
 33. 富取秀行, 柏木敬子, 柿沼喜己, 五十嵐一衛: 酵母ポリアミン輸送蛋白質の機能解析。日本ポリアミン研究会ー第15回研究発表会, 平成12年1月
 34. 無藤友康, 甲斐理武, 近藤公彦, 坂田かおり, 柏木敬子, 五十嵐一衛, 塩川光一郎: アフリカツメガエル受精卵に注入したポリアミンの量的変化について。日本ポリアミン研究会ー第15回研究発表会, 平成12年1月
 35. 五十嵐一衛: ポリアミン研究の方向ー臨床へのメッセージー。日本ポリアミン研究会ー第15回研究発表会, 平成12年1月
 36. 久野智子, 益子崇, 柏木敬子, 五十嵐一衛: NMDA受容体に対するアミノグリコシド系抗生物質のポリアミン様効果。日本ポリアミン研究会ー第15回研究発表会, 平成12年1月
 37. 塩川光一郎, 深町博史, 信賀順, 長野美千代, 甲斐理武, 柴田幹士, 梶田恵理, 安彦行人, 無藤友康, 肥後剛康, 横須賀純一, 垣内力, 柏木敬子, 五十嵐一衛: SAMDCの過剰発現によって見出されたアフリカツメガエル胚に存在するアポトーシス・プログラムと初期発生のしくみ。日本ポリアミン研究会ー第15回研究発表会, 平成12年1月
 38. 印南朱, 富取秀行, 柏木敬子, 五十嵐一衛: スベルミジン優先取り込み系のPotA蛋白質の機能解析。日本薬学会第120年会, 平成12年3月
 39. 久野智子, 益子崇, 柏木敬子, K. Williams, 五十嵐一衛: NMDA受容体のチャンネルブロッカー、MK-801、メマンチン、トリベンジルスベルミジンの作用部位の同定。日本薬学会第120年会, 平成12年3月
 40. 大木祐二, 西村和洋, 柏木敬子, 五十嵐一衛: デオキシスバガリンの細胞増殖阻害機構とeIF5Aの機能。日本薬学会第120年会, 平成12年3月
 41. 吉田円, 柏木敬子, 石浜明, 五十嵐一衛: ポリアミンによる σ^{28} サブユニットとアデニル酸シクラーゼの合成促進機序。第2回RNAミーティング (日本RNA学会年会), 平成12年7月
 42. 柏木敬子, 大木祐二, 西村和洋, 福地智美, 雑賀寛, 五十嵐一衛: デオキシスバガリンによる活性型eIF5A形成の阻害。第2回RNAミーティング (日本RNA学会年会), 平成12年7月
 43. 林聡子, 西村和洋, 福地智美, 柏木敬子, 五十嵐一衛: 翻訳開始因子eIF4G過剰産生によるCap及びIRES依存蛋白質合成活性の上昇。第2回RNAミーティング (日本RNA学会年会), 平成12年7月
 44. 無藤友康, 甲斐理武, 坂田かおり, 柏木敬子, 塩川光一郎, 五十嵐一衛: ポリアミン量の変化によるツメガエル卵の細胞周期調節の仕組み。第73回日本生化学会大会, 平成12年10月
 45. 富取秀行, 柏木敬子, 浅川智子, 柿沼喜己, 五十嵐一衛: 酵母ポリアミン輸送蛋白質TPO1の輸送活性調節。第73回日本生化学会大会, 平成12年10月

46. 新田剛, 五十嵐一衛, 山下篤哉, 山本三毅夫, 山本直樹: B細胞のアポトーシスにおけるポリアミンの制御とその役割。第73回日本生化学会大会, 平成12年10月
47. 西村和洋, 柏木敬子, 中津史, 大野博司, 齋藤隆, 五十嵐一衛: S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素遺伝子 (AMD1) ノックアウトマウスの作製と解析。第73回日本生化学会大会, 平成12年10月
48. 坂田かおり, 柏木敬子, 五十嵐一衛: アンチザイムの開始コドンの選択性と細胞内局在性の関係。第73回日本生化学会大会, 平成12年10月
49. 柏木敬子, 林聡子, 西村和洋, 福地智美, 五十嵐一衛: 翻訳開始因子eIF4Gの過剰産生によるCap及びIRES依存蛋白質合成活性の上昇。第73回日本生化学会大会, 平成12年10月
50. 吉田円, 柏木敬子, 石浜明, 五十嵐一衛: ポリアミンによる σ^{28} とアデニル酸シクラーゼの合成促進機序の解析。第73回日本生化学会大会, 平成12年10月
51. 柏木敬子, 富取秀行, 浅川智子, 柿沼喜己, 五十嵐一衛: 酵母液胞膜上に存在するポリアミン輸送系の性質とその調節。第22回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 平成12年11月
52. 五十嵐一衛: 大腸菌のcell viabilityに関わる諸因子。第4回VNC研究会, 平成12年11月
53. 五十嵐一衛: ポリアミン—その機能と濃度調節。日本薬学会北海道支部特別講演会, 平成12年12月
54. 塩川光一郎, 高山英次, 甲斐理武, 肥後剛康, 垣内力, 安彦行人, 深町博史, 矢尾板芳郎, 五十嵐一衛: ツメガエル受精卵にセットされたアポトーシス・プログラムとカスパーゼ。第23回日本分子生物学会年会, 平成12年12月
55. K. Igarashi, K. Sakata, A. Kuraishi, H. Tomitori, and K. Kashiwagi: Polyamine transport in *Escherichia coli* and animal cells. Polyamines 2000 Biological and Clinical Perspectives (2nd European Polyamine Conference), Rimini, Italy, 平成12年6月
56. H. Tomitori, K. Kashiwagi, T. Asakawa, Y. Kakinuma, A. J. Michael, and K. Igarashi: Multiple polyamine transport systems on the vacuolar membrane in yeast. Polyamines 2000 Biological and Clinical Perspectives (2nd European Polyamine Conference), Rimini, Italy, 平成12年6月
57. K. Kashiwagi, S. Hayashi, T. Fukuchi-Shimogori, K. Nishimura, and K. Igarashi: Translational regulation of mRNA having GC-rich 5'-untranslated region of ODC mRNA. Polyamines 2000 Biological and Clinical Perspectives (2nd European Polyamine Conference), Rimini, Italy, 平成12年6月
58. K. Nishimura, Y. Ohki, T. Fukuchi-Shimogori, K. Saiga, K. Kashiwagi, and K. Igarashi: Inhibition of active eIF5A formation by deoxyspergualin. Polyamines 2000 Biological and Clinical Perspectives (2nd European Polyamine Conference), Rimini, Italy, 平成12年6月
59. K. Williams, M. Sharma, T. Kuno, I. Tanaka, K. Kashiwagi, and K. Igarashi: Residue NR2B(R337) does not control the NR2B selectivity of NMDA receptors for ifenprodil. Society for Neuroscience's 30th Annual Meeting, New Orleans, LA, U. S. A., 平成12年11月

(3) 出版物

1. 五十嵐一衛 (分担執筆) : シリーズ医療薬学3 「病態生化学」, 朝倉書店 (1999)