

平成21年 5月20日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18790061

研究課題名（和文）骨・軟骨代謝におけるポリアミンのモジュレーター機能解析

研究課題名（英文）Study on modulator function of polyamine in bone and cartilage metabolism

研究代表者

池口 文彦（IKEGUCHI YOSHIHIKO）

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：00364711

## 研究成果の概要：

スペルミジンやスペルミンに代表されるポリアミンは、真核細胞の増殖などに関わる生体内物質として知られています。この研究では、細胞内ポリアミン量を変化させることによって、軟骨細胞が異常に石灰化することが初めて分かりました。そして、その因子となるポリアミンの新規標的分子を見つけ出しました。さらに、スペルミンのない遺伝子変異マウスの関節部分を用いることにより、ポリアミン量によって軟骨・骨代謝に異常が見られることが初めて分かりました。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	240,000	3,540,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬学、ポリアミン、骨・軟骨代謝、分化、前駆軟骨細胞 ATDC5、トランスジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

スペルミジンやスペルミンに代表されるポリアミンは、真核細胞の増殖や分化過程に関わる生体内物質として知られている。ポリアミンの標的分子として核酸、NMDA受容体及びチャンネル分子そして翻訳後修飾に

関わる eIF5A タンパクなどが報告されているものの、ポリアミンの機能の詳細は不明であるといつてよい。また、本研究代表者らは、スペルミン合成酵素欠損者（シュナイダー・ロビンソン症候群）が精神遅滞、小脳異常、骨粗鬆症などの症状をもつことを報告

している。同症候群にスペルミンの減少と骨粗鬆症などの骨異常が見られていることから、ポリアミンが骨代謝に深く関わっていることを示唆している。そして、スペルミン合成酵素遺伝子及び低リン血症原因遺伝子を欠損したGy雄マウスには、骨軟化を伴う低リン血症に加え、低体長、低体重、不妊症、突然死などの特徴が見られる。そこで、本研究代表者らはヒトスペルミン合成酵素過剰発現マウスを作製し、交配によりスペルミン合成酵素欠損Gy雄マウスにスペルミンを回復させた。その結果、正常に成長し不妊症及び突然死が解消したことを最近報告した。これら遺伝子変異マウスはスペルミンの有無により成長に変化が見られることから、まずは骨格に注目し、ポリアミンと骨代謝の関連を調べるにはよいモデルとなりうると考えている。

## 2. 研究の目的

ポリアミン量変化の骨代謝に及ぼす影響の検討は未開拓であり、本研究はポリアミン合成酵素阻害剤及び本研究代表者らが作成した遺伝子変異マウスを用いて骨代謝におけるポリアミンの役割を細胞レベル及び動物レベルで調べることを目的としている。

## 3. 研究の方法

(A) ポリアミンの軟骨前駆細胞石灰化に及ぼす影響、(B) スペルミン合成酵素遺伝子改変マウスの骨・軟骨代謝の変化を調べた。

(A) ポリアミン化合物の軟骨細胞石灰化に及ぼす影響

(1)軟骨細胞を用い、ポリアミン合成酵素阻害剤などのポリアミン化合物の石灰化に及ぼす影響を、アルカリホスファターゼ活性測定及びアリザリンレッド染色そして免疫染色などの染色結果を指標に評価する。さらに、

オルニチン脱炭酸化酵素などポリアミン生合成に関連した酵素の活性測定を行い、石灰化との関連性を検討する。(2)ポリアミン化合物の軟骨細胞石灰化に影響を与えた因子を調べるため、SOX9やRunx2などの分化マーカータンパク質のmRNAレベルにおける発現量を解析し、ポリアミンの新規標的分子を探索する。

(B) スペルミン合成酵素遺伝子変異マウスの骨代謝変化の評価

正常のマウス、スペルミン合成酵素遺伝子及び低リン血症原因遺伝子欠損のGy雄マウス、スペルミン合成酵素過剰発現マウス及びスペルミンを回復させたGy雄マウスの4種類のマウスを用いて比較評価を行い、スペルミンによって生じた差異を解析する。具体的には骨形態計測、生化学検査そして骨切片を作成しアザン染色、そしてオステオポンチン、VEGFなどの免疫染色により評価し、骨代謝変化を解析する。

## 4. 研究成果

(A) ポリアミンの軟骨前駆細胞石灰化に及ぼす影響

軟骨前駆細胞 ATDC5 を用い、ポリアミン関連酵素阻害剤などのポリアミン類縁体を培地に添加し、細胞内ポリアミン濃度を変化させ、その石灰化に及ぼす影響を、アリザリンレッド染色、アルシアンブルー染色を指標に評価した。その結果、細胞内スペルミジンを減少させ、スペルミンを増加させるスペルミジン合成酵素阻害剤 MCHA (*trans*-4-Methylcyclohexylamine) は、石灰化を抑制することがわかった。一方、細胞内スペルミンを枯渇させ、スペルミジンを増加させるスペルミン合成酵素阻害剤 APCHA (*N*-(3-Aminopropyl)cyclohexylamine) は、石灰化を促進させることがわかった。

軟骨前駆細胞ATDC5において、ポリアミン関連酵素阻害剤などのポリアミン類縁体による細胞内ポリアミン濃度変化により石灰化に及ぼした因子を探索した。その結果、RT-PCRにより分化マーカーとして知られるSOX9、Runx2などの因子の発現量について異常がみられることを初めて示すことができた。

#### (B) スペルミン合成酵素遺伝子改変マウスの骨・軟骨代謝の変化

正常マウス、スペルミン合成酵素遺伝子及び低リン血症原因遺伝子欠損のG $\gamma$ 雄マウス、スペルミン合成酵素過剰発現マウス及びスペルミンを回復させたG $\gamma$ 雄マウスの4種類のマウスの大腿骨などの比較評価を行い、ポリアミン量の変化によって生じた差異を解析した。骨・軟骨代謝に重要な役割を果たすことが知られているオステオポンチン、VEGF 及びその受容体タンパク質などの抗体を用いる免疫組織化学的染色法などにより評価したところ、異常な発現量変化があることがはじめてわかり、ポリアミン量により骨・軟骨代謝に変化が生じることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

Wu, H., Min, J., McCloskey, D. E., Ikeguchi, Y., Loppnau, P., Michael, A. J., Pegg, A. E., Plotnikov, A. N., Crystal structure of human spermine synthase: implications of substrate binding and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.*, 283, 16135-16145 (2008).

Wu, H., Min, J., Ikeguchi, Y., Zeng, H., Dong, A., Loppnau, P., Pegg, A. E., Plotnikov, A. N., Structure and mechanism of spermidine synthases. *Biochemistry*, 46, 8331-8339 (2007).

Ito, T., Sugita, Y., Ikeguchi, Y., Shirahata, A., Formation of

polyamine-modified peptides during protein digestion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 356, 159-162 (2007).

Ito, T., Sugita, Y., Takao, K., Ikeguchi, Y., Shirahata, A., Amine modification of digested peptide at C-terminal end during protein digestion by protease. *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 1838-1843 (2007).

[学会発表] (計31件)

内野幸恵、池口文彦、伊藤俊行、山寄健一、人見清隆、白幡 晶、トランスグルタミナーゼの基質交換特性に基づく活性測定法の検討、日本ポリアミン研究会 第23回研究発表会、2009年

麻生裕美、梅澤一成、井上 学、伊藤俊行、池口文彦、白幡 晶、MALDI-TOF MS 分析によるシステイン含有タンパク質の定量法の開発、日本薬学会 第129年会、2009年

坂口花織、池口文彦、山寄健一、白幡 晶、ポリアミンの筋芽細胞分化に及ぼす影響、日本薬学会 第129年会、2009年

石井育美、池口文彦、山寄健一、和田政裕、真野 博、白幡 晶、スペルミン合成酵素阻害剤による脂質代謝への影響、日本薬学会 第129年会、2009年

日下部真彦、池口文彦、金子宜令、渡邊亮介、山寄健一、五十嵐一衛、白幡 晶、蛍光基質を用いる HPLC 法による細胞内デオキシハイプシン合成酵素活性の測定、日本薬学会 第129年会、2009年

柴崎朋子、池口文彦、伊藤俊行、平松富都志、高尾浩一、杉田義昭、白幡 晶、加水分解反応に伴うポリアミン修飾化合物の生成の可能性の検討、日本薬学会 第129年会、2009年

内野幸恵、池口文彦、伊藤俊行、山寄健一、人見清隆、白幡 晶、トランスグルタミナーゼの新規活性測定法の検討、日本薬学会 第 129 年会、2009 年

麻生裕美、梅澤一成、井上 学、伊藤俊行、池口文彦、白幡 晶、MALDI-TOF MS 分析によるシステイン含有タンパク質の定量法の開発、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年

石井育美、池口文彦、山寄健一、和田政裕、真野 博、白幡 晶、脂肪細胞における細胞内ポリアミン量の変化による脂肪蓄積への影響 第二報、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年

池口文彦、ポリアミンによる脂質代謝調節、第 14 回創薬を目指した生理活性物質研究会・第 43 回未来開拓研究会 合同大会、2008 年

金子宜令、日下部真彦、渡邊亮介、手塚淑人、五十嵐一衛、池口文彦、白幡 晶、新規 DHS 活性測定法の確立とその応用、日本薬学会 第 128 年会、2008 年

住吉亜由里、上田登茂子、手塚淑人、池口文彦、白幡 晶、コンホメーション変化を指標とするプロテオーム解析法の開発、日本薬学会 第 128 年会、2008 年

櫻井健人、山崎雅恵、鮫島啓二郎、村上安子、手塚淑人、中野純一、三浦偉俊、池口文彦、白幡 晶、<sup>15</sup>N-オルニチンを用いる ESI-MS による ODC 活性測定法の開発、日本薬学会 第 128 年会、2008 年

高橋幸子、池口文彦、手塚淑人、白幡 晶、SpermineSynthase と相互作用を示すタンパク質の探索、日本薬学会 第 128 年会、2008 年

石井育美、池口文彦、手塚淑人、和田政裕、真野 博、白幡 晶、脂肪細胞における細胞内ポリアミン量の変化による脂肪蓄積への影響、日本薬学会 第 128 年会、2008 年

田代大介、池口文彦、田中 享、手塚淑人、岡崎真理、谷 覺、日比野康英、白幡 晶、神経細胞モデル PC12 の分化および細胞応答におけるポリアミンの役割、日本薬学会 第 128 年会、2008 年

日下部真彦、池口文彦、中山伸朗、手塚淑人、名越澄子、五十嵐一衛、白幡 晶、N<sup>1</sup>-Guanyl-1,7-diaminoheptanene の細胞周期に及ぼす影響、日本薬学会 第 128 年会、2008 年

坂本恵美、場家幹雄、手塚淑人、五十嵐一衛、池口文彦、白幡 晶、ポリアミン酸化酵素活性に対する添加剤の及ぼす影響、日本薬学会 第 128 年会、2008 年

林 香瑠、山寄健一、手塚淑人、池口文彦、白幡 晶、ポリアミン合成酵素阻害剤の作用修飾を目指した誘導体化の検討、日本薬学会 第 128 年会、2008 年

山寄健一、丹波卓也、手塚淑人、池口文彦、白幡 晶、エテノアデノシン誘導体化法を用いるスペルミジン合成酵素 (SpdSyn) 及びスペルミン合成酵素 (SpmSyn) 活性測定法の開発、日本薬学会 第 128 年会、2008 年

永峯康弘、池口文彦、手塚淑人、五十嵐一衛、白幡 晶、ピレン誘導体化法を用いたハイブシンのエキシマー蛍光検出HPLC測定系開発のための基礎検討、日本薬学会 第128年会、2008年

田所治樹、山崎雅恵、鮫島啓二郎、五十嵐一衛、池口文彦、手塚淑人、白幡 晶、15N-スペルミンを用いた ESI-MS によるスペルミン酸化酵素活性測定法の開発、日本薬学会 第128年会、2008年

Ikeguchi, Y., Matsuzawa, A., Ichijo H., Igarashi, K., Shirahata, A., Apoptosis Signal - regulating Kinase 1 affects polyamine contents and the sensitivity of mouse fibroblasts to polyamine analogs  
The 2007 Gordon Research Conference on Polyamines (2007)

林 香瑠、池口文彦、手塚淑人、山崎健一、白幡 晶、ポリアミン合成酵素阻害剤のプロドラッグ化の検討、ポリアミンと核酸の共進化 第6回合同シンポジウム、2007年

田代大介、池口文彦、田中 享、岡崎真理、手塚淑人、谷 覺、日比野康英、白幡 晶  
神経細胞モデル PC12 の分化および細胞応答におけるポリアミンの役割、ポリアミンと核酸の共進化 第6回合同シンポジウム、2007年

石井育美、池口文彦、手塚淑人、五十嵐一衛、和田政裕、真野 博、白幡 晶、細胞内ポリアミン量の制御と脂肪前駆細胞における分化、日本ポリアミン研究会 第21回、2007年

齋田麻実、池口文彦、中谷祥恵、平澤恵理、

石島旨章、Anthony E. Pegg、和田政裕、真野博、白幡 晶、骨病変を有するスペルミン合成酵素遺伝子改変マウスの解析、日本薬学会 第127年会、2007年

梅澤一成、伊藤俊行、井上 学、矢敷実希子、日比野康英、松沢 厚、一條秀憲、手塚淑人、和田牧子、池口文彦、白幡 晶、MALDI-TOF MS 分析による細胞内システイン含有タンパク質の定量法の開発、日本薬学会 第127年会、2007年

山崎雅恵、鮫島啓二郎、手塚淑人、池口文彦、白幡 晶、ESI-MS によるポリアミンのトレーサー実験における前処理法の検討及び細胞への応用、日本薬学会 第127年会、2007年

石井育美、池口文彦、手塚淑人、和田政裕、真野 博、白幡 晶、脂肪前駆細胞分化に対するポリアミンの影響、日本薬学会 第127年会、2007年

梅澤一成、伊藤俊行、井上 学、矢敷美希子、和田牧子、手塚淑人、池口文彦、白幡 晶、タンパク質の断片化に伴うアルキルアミン標識、ポリアミンと核酸の共進化 第5回合同シンポジウム、2006年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池口文彦 (IKEGUCHI YOSHIHIKO)  
研究者番号：00364711