

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22501019

研究課題名（和文） 細胞内ポリアミンの蛍光モニタリングシステムによるがん細胞の可視化

研究課題名（英文） Fluorescent visualization of cancer cells by monitoring cellular polyamines

研究代表者

松藤 千弥 (MATSUFUJI SENYA)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：50192753

研究成果の概要（和文）：

細胞内のポリアミン濃度が高値となるとアンチザイム(AZ)が翻訳フレームシフト機構によって発現することを利用し、AZのフレームシフト配列を2つの蛍光タンパク質(EGFP, Keima-Red)の間に連結したコンストラクトを作製し培養細胞に導入した。しかし、ポリアミンにより促進される翻訳フレームシフトのプロダクトであるKeima-Redの発現がほとんど確認されず、ポリアミン応答性に問題があった。そこでN末端にHA-タグを付加し、アンチザイム1遺伝子の全配列と蛍光タンパク質EGFPの単独使用のコンストラクトに改良すると、ポリアミンの添加に対しEGFPの蛍光強度の明らかな増加が観察された。また、細胞内のフレームシフトプロダクトの発現解析からもポリアミンによる明らかな発現上昇がみられた。培養細胞レベルでのポリアミン応答の詳細な解析を継続中である。

研究成果の概要（英文）：

We are developing a novel method to visualize cancer cells by combining the polyamine-dependent frameshift mechanism of AZ, an endogenous cellular polyamine sensor, and the fluorescent protein techniques. We created a polyamine sensor construct with frameshift region of AZ1 mRNA flanked by two fluorescent proteins (EGFP and Keima-Red). When the construct was transfected into the cells, however, polyamine-dependent increase of Keima-Red fluorescence was not observed. Therefore, we improved the sensor construct using the entire protein coding region of AZ1 mRNA with EGFP gene that is inserted immediately downstream of the pseudoknot structure. Cells transfected with this construct showed polyamine-dependent increase of EGFP fluorescence and frameshift product. Further analysis of polyamine response in the cells is continued.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生化学、分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がんの特性、ポリアミン、翻訳調節、蛍光タンパク質、アンチザイム

1. 研究開始当初の背景

ポリアミンは細胞増殖に必須の生体アミンであり、タンパク質・核酸合成の活発な組織に多く存在する。特に細胞増殖の活発ながん組織のポリアミンは常に高値となることが知られている。実際、尿中のポリアミンを測定し、がんを診断する製品も市販されている。哺乳類のポリアミンは主にプトレッシン、スペルミジン、スペルミンの3種が存在する。細胞内のポリアミンの濃度調節は、アンチザイム(AZ)というタンパク質によって厳密に制御されている。ポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素(ODC)は、オルニチンの脱炭酸反応を触媒し、プトレッシンを合成する。

アンチザイムはODCに結合し、その活性を阻害するとともに26Sプロテアソームに引渡し、分解を促進する。但しこの分解にはユビキチン化は伴わない。AZの発現はポリアミン促進性の翻訳フレームシフトという非常にユニークな発現機構により行われている。すなわち、細胞内のポリアミン濃度が低い時、アンチザイムはODCに結合できない短いタンパク質(非活性型)として合成される。これはアンチザイムのmRNA上に存在する終止コドン(UGA)によって翻訳が終結するためである。ところが、ポリアミン濃度が高くなると、翻訳フレームシフトが促進され、リボソーム上でペプチジルtRNAがmRNAの3'方向へ1塩基シフトすることでコドンの読み枠が変わり、ODC結合能を有する活性型アンチザイムが合成されODCを分解促進させることによって細胞内のポリアミン濃度を減少させる。このように細胞内ポリアミンの濃度調節は負のフィードバックループとなっている。この翻訳フレームシフト機構によるポリアミン制御メカニズムは研究代表者が発見した

(Matsufuji S, et al. Cell 80:51-60, 1995)。

本研究は、がん細胞がポリアミン高値となることに着目し、その濃度変化を追跡、定量可能なシステムを開発することにより、がん研究におけるがん細胞や組織のイメージング技術の確立を目指し開始された。

具体的には、アンチザイムのユニークな遺伝子発現機構であるポリアミン促進性翻訳フレームシフトと蛍光タンパク質の技術を融合し、細胞内のポリアミンの濃度変化を可視化および定量的にモニター可能なシステムの開発を行う。本システムを細胞や実験動物個体においてがんのマーカータンパクなどと組み合わせて用いれば、発がんや転移のメカニズム研究に有効なツールとなる。

本システムの基本コンセプトは、2つの蛍光タンパク質遺伝子(シアン色の ECFP と赤色の Keima) の間にアンチザイムのフレームシフト配列を連結し、細胞内ポリアミン濃度が低い時には ECFP タンパク質のみが発現し細胞がシアン色に、ポリアミン濃度が高くなると、アンチザイムの翻訳フレームシフトにより Keima 蛍光タンパク質も発現し、シアン色と赤色の両方が観察されるという特色を持つ。この2つのタンパク質は励起波長が共に 440nm であるが、蛍光波長のピークが ECFP は 475nm 付近に、keima は 620nm 付近と大きく離れている特長を持つ。したがって、1つの波長のレーザー光で2色の検出が可能であり、さらに2つのタンパク質の蛍光スペクトルは完全に分離しているためクロス検出されることはなく、より正確な定量が可能となる。本システムは、タンパク質相互作用を検出するものではなく、蛍光エネルギー移動(FRET)が起こらない条件が望ましいので、

この2つの蛍光タンパク質を用いることは、非常に有効である。さらにこのシステムのアンチザイムフレームシフトユニット配列をタンデムに重複させることにより、フレームシフトが起こる効率を低減しポリアミンがより高濃度の時にのみ起こるようにすれば、がん細胞のみで細胞や組織が赤色蛍光を発すると考えられる。つまり、フレームシフトの効率を調節することでポリアミンに対する感度を調節するのである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん細胞がポリアミン高値となることに着目し、その濃度変化を追跡、定量可能なシステムを開発することにより、がん研究におけるがん細胞や組織のイメージング技術を確立することである。具体的には、アンチザイムのユニークな遺伝子発現機構であるポリアミン促進性翻訳フレームシフトと蛍光タンパク質の技術を融合し、細胞内のポリアミンの濃度変化を可視化および定量的にモニター可能なシステムの開発を行う。本システムを細胞や実験動物個体においてがんのマーカータンパクなどと組み合わせて用いれば、発がんや転移のメカニズム研究に有効なツールとなる。

3. 研究の方法

(1) 細胞内ポリアミンモニター・コンストラクトの作成

細胞内ポリアミンモニターシステムの開発
本システムの基本コンセプトは、2つの蛍光タンパク質遺伝子(シアン色の ECFP と赤色の Keima) の間にアンチザイムのフレームシフト配列を連結し、細胞内ポリアミン濃度が低い時には ECFP タンパク質のみが発現し細胞がシアン色に、ポリアミン濃度が高くなると、アンチザイムの翻訳フレー

ムシフトにより Keima 蛍光タンパク質も発現し、シアン色と赤色の両方が観察されるという特色を持つ。この2つのタンパク質は励起波長が共に 440nm であるが、蛍光波長のピークが ECFP は 475nm 付近に、keima は 620nm 付近と大きく離れている特長を持つ。したがって、1つの波長のレーザー光で2色の検出が可能であり、さらに2つのタンパク質の蛍光スペクトルは完全に分離しているためクロス検出されることはなく、より正確な定量が可能となる。本システムは、タンパク質相互作用を検出するものではなく、蛍光エネルギー移動(FRET)が起こらない条件が望ましいので、この2つの蛍光タンパク質を用いることは、非常に有効である。アンチザイムのフレームシフトに必要な配列はフレームシフト効率を考え、最適であろうと考えられる長さの候補をいくつか作製する。場合によっては、フレームシフト配列自体を改変することによってフレームシフト効率の調整を行う。

例えば、フレームシフト配列には、シェードノットと呼ばれる RNA 構造が存在することがフレームシフト効率を上げるために重要であることがわかっているので、このシェードノット構造を改変することによりフレームシフト効率が調整可能か検討する。

(2) 培養細胞におけるポリアミンモニターシステムの機能確認

作製したベクターを CHO 細胞に一過性に発現させた後、ポリアミン存在下、非存在下の条件で培養し、蛍光顕微鏡下において観察する。

(3) 細胞内ポリアミンモニターシステムのマウス個体への導入

培養細胞ポリアミンモニターシステムがマ

ウス個体で応用可能であるか試みる。培養細胞用に作製したポリアミンモニター・コンストラクトをトランスジェニックマウス作製用ベクターに導入しトランスジーンとする。場合によってはプロモーターの変更なども行う。トランスジェニックベクター作製以降は外部業者に委託する。トランスジーン対象マウスは、大腸がんのモデルマウスとして知られている C57BL/6J-ApcMinヘテロマウス用いる。このマウスは小腸や大腸にがんが発生しやすい特徴を持ち、この解析に適している。

4. 研究成果

AZのフレームシフト配列（シュードノット構造含む）を2つの蛍光タンパク質（ECFP, Keima-Red）の間に連結したコンストラクトをプラスミドベクターに組み込み培養細胞に導入した。ポリアミンへの感受性の変化を期待し、フレームシフト配列領域を1つ持つコンストラクトとタンデムに連結したコンストラクトを各々作製した。これらは細胞内のポリアミン濃度が低いときにはECFPのみが発現しシアン蛍光が、ポリアミン濃度が高くなるとECFPに加えKeima-Redの赤色蛍光が蛍光顕微鏡下にて観察されることが予想された。これらのコンストラクトを導入した培養細胞に5mMプトレッシンを添加しKeima-Redの蛍光が増強されるか観察した。またオルニチン脱炭酸酵素の阻害剤によりポリアミン濃度を抑えた細胞とインフレームのコンストラクトを導入した細胞の蛍光も観察した。その結果、プトレッシンを添加した細胞ではKeima-Red/ECFPの蛍光強度の増加が観察されたが、非添加細胞と比べ明らかな差が観察されなかった。また阻害剤によりポリアミン濃度を抑えた細胞においてもKeima-Redの蛍光のバックグラウンドが観察された。

そこでフレームシフトさせるための配列にアンチザイム1の全ての塩基配列を使用し、フレームシフト後のプロダクトに緑色蛍光タンパク質EGFPのみを使用したコンストラクトに改変した。具体的には、アンチザイム1をN末端からフレームシフト部位までの配列（シュードノット構造有無の2タイプを作製）とそれ以降に分けてEGFPの配列を挟むように連結した。さらに、抗HA抗体を用いたイムノプロットによるフレームシフトプロダクトの検出が可能なようにHAとFLAGの両タグをN末端に付加した。

CHO細胞にコンストラクトを一過性に発現させ、24時間後にポリアミン（プトレッシン10mM）を7~24時間添加し細胞内のポリアミンの濃度を上昇させた。DFMO（ポリアミン合成の律速酵素であるODCの阻害剤）を添加しポリアミン濃度を低下させた細胞をコントロールとした。これらの細胞に発現したフレームシフトプロダクトを蛍光顕微鏡にて検出した。その結果ポリアミンを添加した細胞で明らかなEGFPの蛍光強度の増加が観察された。また、細胞内のフレームシフトプロダクトの発現を抗HA抗体によるイムノプロットにより解析すると、ポリアミンによる明らかな発現上昇がみられた。

このコンストラクトにおいてアンチザイム1の配列の導入位置を変えずに、HAタグとEGFPの配列を各々ECFPとKeima-Redの蛍光タンパク質の配列に置き換えたコンストラクトを作製し同様の解析を行ったがポリアミン応答性が観察されなかった。AZ1のN末端からフレームシフト部位までの配列の前に蛍光タンパク質が存在することが翻訳フレームシフトには立体障害となっているのかもしれない。今後唯一ポリアミン応答性が確認されたHAタグとEGFP単独使用のコ

ンストラクトで研究を進めるか検討中である。

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 1 件)

Murai N, Murakami Y, Matsufuji S.
Protocols for studying antizyme expression
and function. *Methods Mol Biol*. 2011;
720: 237-67. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

口頭発表

松藤千弥. 細胞内ポリアミン濃度の変動
と維持. 第 2 回日本ポリアミン学会年会
(特別講演) 2011 年 1 月, 宇都宮 [抄録
集 p.39]

松藤千弥. アンチザイムの分子進化. 第
84 回日本生化学会大会 (シンポジウム).
2011 年 9 月, 京都 [抄録集 1S9P]

Matsufuji S. Regulation of c-Myc by
antizyme 2 and its biological significance.
Gordon Research Conference on Polyamines.
June 2011, Waterville Valley, NH, USA.

村井法之. 動物細胞におけるポリアミン
恒常性の維持機構-アンチザイムを中心
に-. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (シ
ンポジウム) 2013 年 3 月, 仙台 [抄録集
4SY05-3]

[図書] (計 1 件)

Ivanov IP, Matsufuji S. Autoregulatory
frameshifting in antizyme gene expression
governs polyamine levels from yeast to
mammals. in Atkins JF, Gesteland RF eds
Recoding: Nucleic Acids and Molecular
Biology 24 pp. 281-300. Springer, New
York, 2010.

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松藤 千弥 (MATSUFUJI SENYA)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50192753

(2) 研究分担者

村井 法之 (MURAI NORIYUKI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60300927

(3) 連携研究者