

# ポリアミンの生理的役割の探索

白幡 晶\*

## 生合成阻害剤の利用

ポリアミンはそのコンホメーションを自由に変えることで、種々の生体高分子に作用して、それらの機能に影響を与え、細胞増殖や分化など基本的な細胞機能を補助するために重要な役割を演じているだろう。しかし、ポリアミンが、どこで、どのような作用をしているのか、その詳細は不明である。ポリアミンの生合成阻害剤は、そのようなポリアミンの役割を少しずつ明らかにしつつ、その生理的な重要性に新しい視点を加えている。

“生体アミン”という言葉を目にすると、カテコールアミンやヒスタミン、アセチルコリンなど、微量で強い生理活性を持つホルモンや神経伝達物質を思い浮かべる人が多いのではないだろうか。しかし、ほとんどの細胞に最も多量に存在する生体アミンは、スペルミジン、スペルミンに代表されるポリアミンである。細胞や組織の種類によって、また細胞が細胞周期のどの時期にあるかによって、ポリアミン量は大きく異なるが、通常はサブミリモルからミリモルの濃度で存在している。このように存在量だけから見ると、比較的人目につきやすく、扱い易く思えるポリアミンではあるが、実際には、その扱い難さのために、未だにその役割の詳細は明らかになっていない。増殖の盛んな細胞に多いこと、核酸とのユニークな反応性、さらに無細胞系で高分子合成に影響を与えることなどから、増殖や分化の過程で何らかの役割を演じているものと、その重要性は以前から指摘されてはいた<sup>(1-8)</sup>が、確かにポリアミンが細胞の増殖や維持に必須の成分であることが明らかになったのは、ごく最近のことなのである。

本稿では、そのようなポリアミンの生理的な役割を探し出すために用いられている、哺乳動物細胞におけるポリアミンの生合成阻害剤に焦点を当て、ポリアミンの役割に関する最近の研究の動向を概説したい。

### 阻害剤開発の背景

一口にポリアミンといっても、よく教科書に見られるような、“3個以上のアミノ基を持つ非蛋白性の脂肪族アミン”という定義に当てはまるものは、天然にすでに10種以上見いだされている。しかし、耐熱性菌など特殊な環境に生育する微生物を除けば、バクテリアなど原核細胞生物ではスペルミジン、哺乳動物など真核細胞生物ではスペルミジンとスペルミンが主要なポリアミンである。スペルミジンの前駆体であるジアミンのプトレシンをポリアミンに含める場合もあるが、ここでは区別して扱うことにする。

図1に示すように、ポリアミンはメチレン鎖3個あるいは4個を単位とするきわめて単純な構造をしている。窒素原子間の距離が比較的小さいために、鎖状分子の中に位置するイミノ基の塩基性が、両端のアミノ基に比べて下がっている<sup>(4)</sup>ことが多少予想外ではあるが、細胞内の中性条件下では、すべての窒素原子がイオン化している多価陽

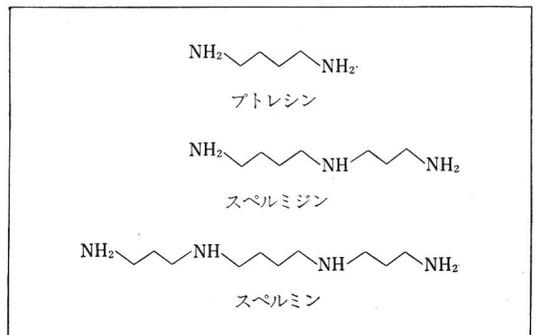


図1 ■プトレシンおよびポリアミンの構造

Search for Physiological Role of Polyamines by Inhibitors of Biosynthesis

\* Akira SHIRAHATA, 城西大学薬学部

イオンであると考えてよいだろう。また、ポリアミンの生理的作用は、多価陽イオンという点で、 $Mg^{2+}$  や  $Ca^{2+}$  などの作用と混同される場合が多いが、点電荷として作用する無機イオンと、長い鎖の中に一定の間隔で複数の電荷をもつポリアミンとは、基本的に異なった作用を持ち得ることは明らかだろう。このようなことを念頭において、生合成阻害剤を用いて役割を探る研究の背景を振り返ってみたい。

ポリアミンは、ほんとうに高分子の機能に影響を与えるのだろうか？ 構造から推察されるポリアミンの作用は、核酸や膜成分など陰性電荷に富んだ高分子を対象に調べられてきた<sup>(5)</sup>。核酸を沈殿させたり、酵素的、化学的あるいは物理的分解から保護すること、バクテリアや哺乳動物から単離された tRNA には一定の割合でポリアミンが結合していることなどは、古くから知られた典型的な例である。もう少し複雑な無細胞系を用いた実験では、ポリアミンが蛋白合成を促進すること、さらにその際、翻訳の誤りも少なくすることが示されている。その他、トポイソメラーゼ活性や、DNA の B 型と Z 型コンホメーションの遷移にも影響を与えることが明らかになっている。これらの作用は、その特異性が示されていない場合もあるため、すべてを生理的な役割と結びつけるには異論もあるが、ポリアミンは確かに試験管内では数々の高分子の機能に影響を与えるのである。

それでは無細胞系で示される作用は実際に細胞の中でも起こっているのだろうか？ また、ポリアミンは細胞の機能にどの程度重要なのだろうか？ 細胞機能とポリアミンとの関係が最も端的に示されたのは増殖との関係である<sup>(6)</sup>。ある種の細胞ではポリアミンを培養液に加えると増殖速度を増すことが知られている。また、いろいろな刺激によって増殖を開始する細胞を用いると、刺激を与えてから増殖を開始するまでの間にポリアミンが増加する。癌細胞のように増殖を続ける細胞では、ポリアミン量と増殖速度との間に正の相関が認められており、またその量は DNA 合成が始まる少し前に増加することが明らかになってい

る。これらのことはいずれも、ポリアミンが増殖因子であることを示唆しており、無細胞系の実験で示されるポリアミンの作用とも矛盾しない。そこで、このことをより直接的に確かめるために、細胞内のポリアミン量を人為的に低下させ、その影響を観察する方法がとられるようになった。

ポリアミン量を低下させるためにこれまでにとられてきた方法は 2 つある。一つはバクテリアなど微生物の研究を中心に行なわれてきた方法<sup>(7)</sup>で、生合成酵素を欠損した変異株を分離し、その細胞に対するポリアミンの影響を観察するものである。分離した変異株をポリアミンを含まない培地で培養すると、細胞は増殖を停止するか、増殖速度に著しい低下が起こる。そこにポリアミンを添加すると、正常に近い増殖速度で増殖を始める。これらの一連の研究により、バクテリアを含めた数種の微生物では、ポリアミンが正常な増殖速度を維持する上で必須の成分であることが明らかになっている。

もう一つの方法は、特異的な生合成阻害剤を用いてポリアミン代謝を調節し、その影響を観察しようというものである。哺乳動物細胞では、いくつかの例外を除いて目的とした変異株を得ることが難しいため、この方法がポリアミンの役割を知る上で数少ない研究手段を提供することになる。実際、阻害剤を用いることで、哺乳動物細胞でははじめて、ポリアミンが必須の増殖因子であることが明らかになっている。そして、これらの生合成阻害剤が、ポリアミンの生理的な重要性に新しい視点を加える研究を可能にしているのである。

---

### ポリアミンの生合成と細胞内濃度の調節

---

哺乳動物細胞では、図 2 に示すように、ポリアミンはアルギニンからオルニチン、プトレシンを経て合成される。多くの微生物や高等植物はアルギニンからアグマチンを経てプトレシンに至る経路を持っているが、哺乳動物ではそれがいないために、オルニチンを経由し、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) によりプトレシンを生じる経路だけが働いている。生じたプトレシンは、2 つの異なったアミノプロピル基転移酵素であるスペルミジン合

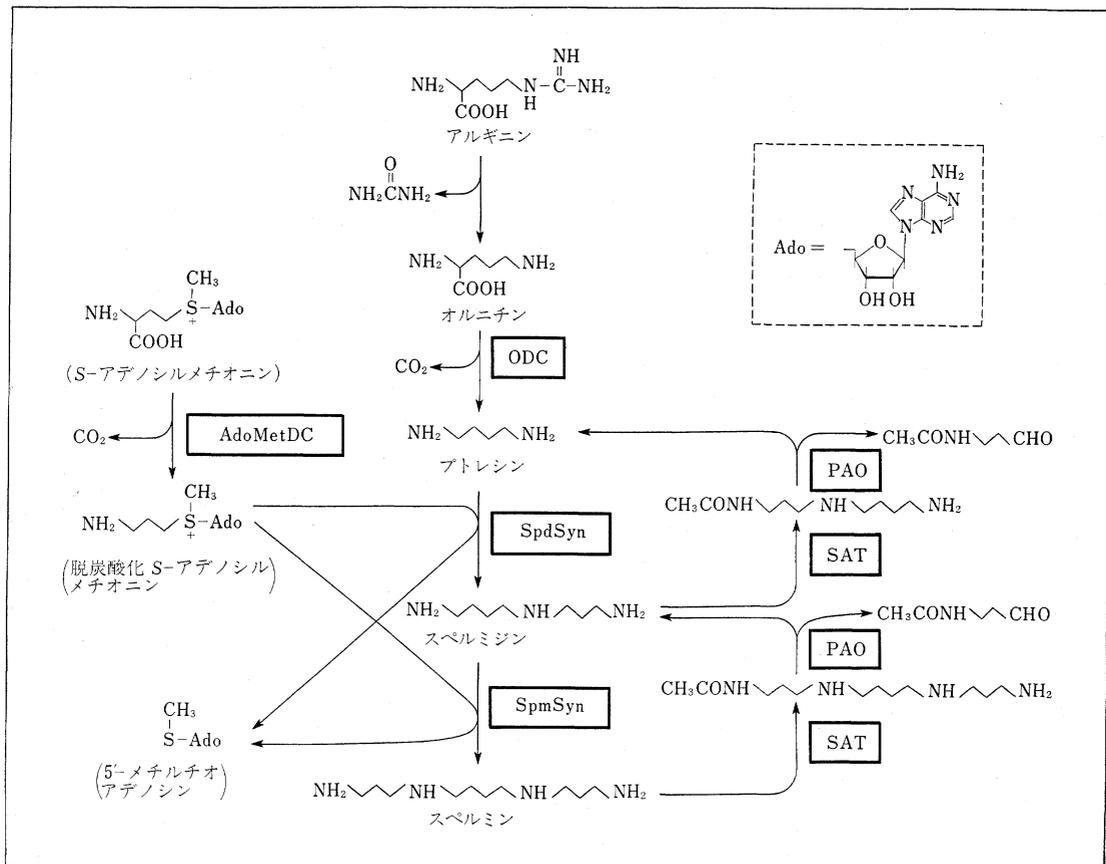


図 2 ■ ポリアミンの生合成および逆経路

ODC: オルニチン脱炭酸酵素, AdoMetDC: *S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素, SpdSyn: スペルミジン合成酵素, SpmSyn: スペルミン合成酵素, PAO: ポリアミン酸化酵素, SAT: スペルミジン/スペルミン *N*<sup>1</sup>-アセチル基転移酵素

成酵素 (SpdSyn) とスペルミン合成酵素 (Spm·Syn) によって、スペルミジン、そしてスペルミンへと変換される。このときのアミノプロピル基の供与体としては、脱炭酸化 *S*-アデノシルメチオニンが用いられるが、これは *S*-アデノシルメチオニンから *S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (AdoMetDC) によって作られる。

ポリアミンは、この 4 つの不可逆反応を触媒する酵素によって生成するが、一度アセチル化を受けたあとに酸化的に分解されることで、プトレジンにまで戻る逆経路も存在する。その際、両ポリアミンのアセチル化はスペルミジン/スペルミン *N*<sup>1</sup>-アセチル基転移酵素 (SAT) によって、またアセチルポリアミンのプトレジンあるいはスペルミジンへの変換はポリアミン酸化酵素 (PAO) に

よって行なわれる。逆経路は、ポリアミンの再利用と過剰なポリアミンの排泄に働いているのではないかと考えられているが、その生理的な意味は不明である。

細胞内のポリアミン量およびその前駆体量は、組織や細胞の種類によって大きく異なるが、正常ラットの肝臓を例にとると、組織 1 グラム当りスペルミジンとスペルミンがそれぞれ 1 μmol、プトレジンが 10 nmol、脱炭酸化 *S*-アデノシルメチオニンが 1 nmol 程度存在する。また、アセチルポリアミンは検出できないほど少ない。このような存在量のアンバランスは、それぞれの生合成酵素の細胞内における活性量と対応している。SpdSyn と SpmSyn、および PAO は基質を速やかに生成物にすべく準備されており、比較的活性

は高い。一方、ODC, AdoMetDC および SAT の活性は正常組織では著しく低く、ホルモンや薬物などの刺激でポリアミン量が増加する際に上昇する。したがって、細胞内のポリアミン量は、状況に応じて活性量を変化させるこれら3つの酵素によって調節されている<sup>(8)</sup>と考えてよいだろう。

ODC, AdoMetDC および SAT は、いろいろな刺激に対して活性を変化させるが、細胞内のポリアミン量によっても調節を受けている。培養細胞に生合成阻害剤を投与し、ポリアミン量を減少させると、ODC や AdoMetDC の活性は上昇し、逆にその培養液にポリアミンを添加して細胞内のポリアミン量を増加させると、それらの活性は急激に低下する。そして、このような変動は、両酵素の半減期が非常に短い (<1時間) ことで説明されるように、きわめて短時間のうちに起こる。この活性変動のこまかなメカニズムは現在も論争中<sup>(9)</sup>であるが、酵素蛋白量の変動であることが明らかになっており、翻訳過程および分解過程にポリアミンが作用している可能性が示されている。最近、両酵素の mRNA を用いた無細胞系の翻訳実験<sup>(10)</sup>で、両酵素の蛋白合成がポリアミンによって抑えられることも示されており、ポリアミン量の変化に素早く対応できる翻訳レベルでの調節の可能性は大きくなっている。

一方、SAT 活性は、ODC や AdoMetDC と違って、細胞内のポリアミン量が多いときや、代謝されにくいポリアミンアナログ体を投与したときなどに増加することが知られている。そして、ポリアミンアナログを用いた研究では、活性の上昇は酵素蛋白量の増加を伴っており、やはり翻訳レベルでの調節が示唆されている<sup>(11)</sup>。

この他の調節としては、プトレンシンが AdoMetDC に直接働いて活性化すること、また AdoMetDC がプロエンザイムから活性化酵素に変換される過程にもプトレンシンが働き、その変換を促進することが知られている。

ここに示されるように、ポリアミンの生合成は細胞内のポリアミン量を厳密に調節するように仕組みられている。そして、細胞内のポリアミン量に素早く対応できるように、真核細胞では少し特殊

な、酵素蛋白量そのものを短時間のうちに変化させることができるメカニズムを用いて調節されている。調節機構が特殊で複雑であることは、ポリアミンの役割を考える場合、その重要性に一つの根拠を与えるが、阻害剤を用いて特定のポリアミン量を変化させようとする際には大きな障害になり、結果の解釈を難しいものにするようになる。

次に、このような困難を克服するために工夫され、開発されてきたポリアミンの生合成阻害剤を紹介する。

---

### ポリアミンの生合成阻害剤

---

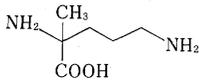
ここで扱う主な阻害剤の名称および構造は図3に示した。

#### 1. オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の阻害剤

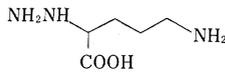
ポリアミン合成における律速酵素として、ODC は長年阻害剤開発のターゲットになってきた。初期の研究で、 $\alpha$ -メチルオルニチンや  $\alpha$ -ヒドラジノオルニチンなどが阻害剤として開発され、ポリアミン合成の阻害が細胞の増殖停止につながるらしいことが明らかになったが、これらの阻害剤は、ポリアミン濃度への影響が充分でなく、限られた目的にしか利用できなかった。そこで、さらに強力で特異的な阻害剤として合成されたものが、自殺基質酵素阻害剤といわれる一群の化合物である。中でも、最も多くの研究に用いられ、現在のポリアミン研究の基礎を築いたともいえる阻害剤が  $\alpha$ -ジフルオロメチルオルニチン、DFMO である。

DFMO はオルニチンアナログとして ODC の活性部位に入り脱炭酸化を受ける際に不安定な化学種を生成し、酵素を不可逆的に阻害するようデザインされている。この反応は、DFMO が活性部位に入らなければ起こらないため、特異性が高く、さらに、非常に効率よく定量的に進行するので強力な阻害剤になり得るのである。DFMO を培養細胞に投与すると、ODC の失活によってプトレンシンとスペルミジン量が著しく減少し、多くの場合、細胞は増殖を停止する。そして、その効果がポリアミン合成の阻害に基づくものかを確か

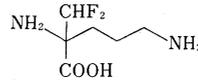
1) ODC の阻害剤



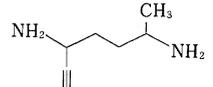
$\alpha$ -メチルオルニチン



$\alpha$ -ヒドラジノオルニチン

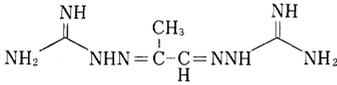


DFMO

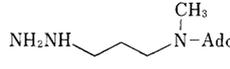


MAP

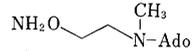
2) AdoMetDC の阻害剤



MGBG



MZHPA

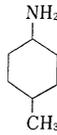


MAEOA

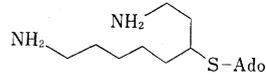
3) SpdSyn の阻害剤



シクロヘキシルアミン

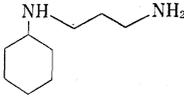


*trans*-4-MCHA

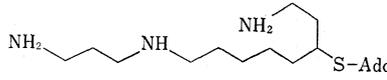


AdoDato

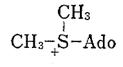
4) SpmSyn の阻害剤



APCHA

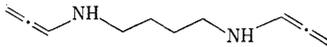


AdoDatad



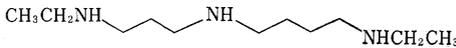
ジメチルアデノシルスルホニウム

5) PAO の阻害剤

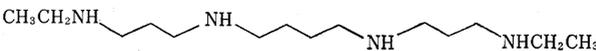


MDL 72527

6) その他



BESpd



BESpm

図 3 ■ ポリアミンの生合成を阻害する化合物

DFMO:  $\alpha$ -ジフルオロメチルオルニチン, MAP: (2R, 5R)- $\delta$ -メチルアセチレニックプロレシン, MGBG: メチルグリオキサールビス(グアニルヒドラゾン), MZHPA: 5'-デオキシ-5'-[N-メチル-N-(3-ヒドラジノプロピル)] アミノアデノシン, MAEOA: 5'-デオキシ-5'-[N-メチル-N-[2-(アミノオキシ)エチル]]-アミノアデノシン, AdoDato: S-アデノシル-1, 8-ジアミノ-3-チオオクタン, AdoDatad: S-アデノシル-1, 12-ジアミノ-3-チオ-9-アザドデカン, *trans*-4-MCHA: *trans*-4-メチルシクロヘキシルアミン, APCHA: N-(3-アミノプロピル) シクロヘキシルアミン, BESpd: ビス(エチル)スペルミジン, BESpm: ビス(エチル)スペルミン

めるために、プロレシンあるいはポリアミンを添加すると、細胞は正常に増殖を始める。

DFMO は非常に強力であるので、細胞内のすべてのポリアミン量を減少させることができるように思われるが、スペルミン量にはほとんど影響を与えることができない。その理由は次のように

説明されている<sup>(12)</sup>。すなわち、ODC 阻害の結果としてスペルミジンが減少すると調節機構が働き、AdoMetDC 活性が上昇する。その際、細胞内における脱炭酸化 S-アデノシルメチオニンは、その消費が減少し供給が増加するため、著しく蓄積する。そして、この蓄積により、失活を免れた

ODC によって生ずる少量のプトレシンが、効率よくスペルミンにまで変換されてしまうというものである。DFMO は ODC に特異的で強力であるにもかかわらず、脱炭酸化 S-アデノシルメチオニンの異常な蓄積など、細胞はポリアミンの調節機構によって生ずる 2 次的な影響を受けるのである。

DFMO は市販されてはいないが、Merrell Dow 社から供与を受けることができ、毒性もほとんどないので、多くの培養細胞系や動物に対して、ポリアミン代謝の阻害を目的とした実験に現在も用いられている。しかし、これまで述べた調節機構の他に、DFMO の長期使用によって、ODC 遺伝子の増幅が起こることも報告されており、ポリアミン量の人為的な調節を ODC だけを阻害することにより達成するのは非常に困難であることも明らかになっている。

MAP のような DFMO よりさらに強力な阻害剤の開発は現在も進められている<sup>(12)</sup>。

## 2. S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (AdoMetDC) の阻害剤

AdoMetDC を阻害する目的で多く用いられてきた阻害剤は MGBG だろう。もともとは抗白血病薬として知られていたが、後に AdoMetDC の強力な競合的阻害剤であることが明らかになり、ポリアミン研究に広く用いられるようになった。一般に、MGBG は培養細胞に投与すると、スペルミジンおよびスペルミン量を減少させ、増殖を停止させることができる。この増殖の停止は当初、AdoMetDC の阻害の結果であると考えられていた。しかし、後に、ポリアミン代謝への種々の作用や、ミトコンドリアに蓄積して間接的に高分子合成に影響を与えることなどが明らかになり、現在では、特異的な効果を期待する研究にはあまり用いられなくなっている。

最近、MGBG に代わる特異的な阻害剤として、不可逆的に酵素反応を阻害する化合物が報告されている<sup>(13)</sup>。それらはアデノシル骨格にヒドラジノ基あるいはアミノオキシ基を持つ側鎖を結合した化合物であり、活性部位に存在するピルビン酸

残基のカルボニル基との反応を期待してデザインされている。培養細胞に、代表的な化合物である MHZPA や MAOEA を投与した場合、スペルミジン、スペルミン、脱炭酸化 S-アデノシルメチオニン量の減少とプトレシン量の増加が観察され、AdoMetDC の阻害で予想されるポリアミンの代謝パターンが示される。さらに、スペルミジンおよびスペルミンが減少すると、細胞は DFMO の場合と同様、スペルミジンの添加によって回復可能な増殖の停止を起こす。このときのプトレシン量と脱炭酸化 S-アデノシルメチオニン量は、DFMO を用いた場合と著しく異なっており、これら 2 つの酵素の阻害剤を用いることで、ポリアミン、特にスペルミジン量の減少が及ぼす影響を特定することが可能である。

しかし、MHZPA および MAOEA は細胞内で安定でなく、長期的な効果を期待できないことから、さらに安定で強力な阻害剤の開発が望まれている。

AdoMetDC を阻害する新しい試みとして、上記のような酵素の活性部位と反応するような阻害剤ではなく、AdoMetDC がプロエンザイムから活性な酵素に変換されるプロセッシングの過程を阻害する化合物の利用も提案されている<sup>(12)</sup>。

## 3. アミノプロピル基転移酵素の阻害剤

ODC や AdoMetDC が阻害剤開発のターゲットになってきたのとは対照的に、アミノプロピル基転移酵素の研究は立ち遅れていた。しかし、ポリアミンの生合成調節が非常に強力で、これまでにある ODC や AdoMetDC の阻害剤だけでは、細胞内で阻害効果を長く維持することが困難であることが明らかとなり、活性の変動がほとんどない SpdSyn および SpmSyn に対する阻害剤が再認識されるに至っている。

これまでに報告されている阻害剤の中で、両酵素に対して、それぞれ最も強力で特異的なものは、SpdSyn に対しては AdoDato であり、SpmSyn に対しては AdoDatad であろう。両者とも転移反応を模した基質複合体としてデザインされている。培養細胞に投与すると、両者ともそれぞ

れとり込まれ、AdoDato ではスペルミジン量の減少とスペルミン量の増加、AdoDatad ではスペルミジン量の増加とスペルミン量の減少が観察される。その際、細胞の増殖速度には変化はなく、プトレシンおよびポリアミン量の和も変化しない。したがって、細胞内のスペルミジンあるいはスペルミンにそれぞれ特異的な役割があるならば、その役割を特定する上で有用になりうる化合物である。ただし、AdoDato, AdoDatad, いずれの場合にも細胞内に脱炭酸化 S-アデノシルメチオニンが蓄積すると報告されている<sup>(12)</sup>。したがって、脱炭酸化 S-アデノシルメチオニンと酵素の活性部位を競合するこれらの阻害剤がよい効果を維持できない可能性もある。

一方、シクロヘキシルアミン（初期の報告ではジシクロヘキシルアミンと誤って呼ばれていた）は、種々の化合物のスクリーニングから偶然発見された、プトレシンに競合的な SpdSyn の阻害剤である。特異性に関する報告がなかったため、利用は限られていたが、後に、ある程度特異的に作用することが示されている。また、プトレシンに競合的であることから、脱炭酸化 S-アデノシルメチオニン量が増加しても阻害効果に影響を受けない利点を持っている。

最近、このようなシクロヘキシルアミンの利点に着目し、両酵素の活性部位構造の解析とプトレシンあるいはスペルミジンに競合的な種々の化合物の検索が進められ、強力ないくつかの阻害剤が見いだされている<sup>(14,15)</sup>。それらの中で最も強力であったものは SpdSyn では *trans*-4-MCHA であり、SpmSyn では APCHA であった。両者は培養細胞のポリアミン代謝に、それぞれ AdoDato あるいは AdoDatad と同様の影響を与え、特異的に働くことが示唆されている<sup>(14)</sup>。これらの化合物はすでに市販されているため大量に入手が可能で、動物実験などに用いる上では非常に有用だろう。

ジメチルアデノシルスルホニウムは脱炭酸化 S-アデノシルメチオニンに競合的な SpmSyn 阻害剤である。SpmSyn 阻害剤として培養細胞に投与して、はじめてスペルミン量を著しく減少させ

ることができた化合物であるが、AdoMetDC にも阻害作用を示すため特異的とはいえない。

現在使用できる阻害剤はほとんどが競合的に作用し、効力に限界があるので、特異性の高い不可逆的な阻害剤の開発が望まれている。

#### 4. 逆経路における酵素阻害剤

PAO の阻害剤としては、すでに非常に強力な自殺基質酵素阻害剤が開発されている<sup>(16)</sup>。その一つである MDL 92527 を培養細胞に投与した場合、PAO の阻害に基づくと思われるアセチルポリアミンの異常な蓄積が観察されるが、スペルミジン、スペルミン量には変化がなく、増殖速度にも変化が見られない。同様のことは動物実験でも確かめられており、PAO の阻害はポリアミン量を調節する上であまり有効でないと考えられている。また、このことから逆経路の生理的な意味を軽視する向きもあるが、ホルモン刺激により SAT 活性が上昇することも知られており、逆経路の生理的な意味は SAT の阻害剤を用いて調べる必要があるだろう。しかし、細胞レベルで効果がある SAT の阻害剤は報告されていない。

#### 5. 間接的に生合成を阻害する化合物

種々の生合成阻害剤がポリアミンの調節機構によって、その効果に制限を受けることは述べてきたが、ここで紹介する BESpd と BESpm は、その調節機構を逆手にとって、ポリアミン量を減少させるよう巧妙に設計された化合物である<sup>(17)</sup>。これらの化合物は、ポリアミンの両端のアミノ基をエチル化しただけのものであるが、ポリアミンのとり込み機構を利用して細胞内に入り、ポリアミンアナログとして ODC, AdoMetDC 活性を抑制し、ポリアミン量を減少させる。さらに、実験に用いた白血病細胞では増殖因子としてのポリアミンの代わりにはならないので増殖は停止する。そして、これらの効果はスペルミジンの投与によって完全ではないが回復する。

もともとこれらの化合物は、制癌剤をめざして設計されたものであり、特定のポリアミン量を特異的に変化させる目的で用いるのには不適当であ

ろうが、阻害機構はポリアミン研究に新しい視点を提供している。すなわち、ポリアミンのアナログ体を用いることで、ポリアミンの役割を区別することができるということである。最近、スペルミンのアナログ体が、ODC と AdoMetDC の調節を区別して行なう<sup>(18)</sup>ことも明らかになっており、特定の酵素の調節部位に選択的に働く化合物が開発できる可能性も出てきている。このような化合物が開発されれば、生理的なポリアミンの役割を探し出す上で非常に有用であることは間違いないだろう。

## ポリアミンの役割

次に、生合成阻害剤を用いて進められているポリアミンの役割に関する研究の現状を、いくつかのテーマに分けて説明する。

### 1. 増殖とポリアミン

哺乳動物細胞の増殖にポリアミンが必須の成分であることは、DFMO を中心とする阻害剤を用いることで正常細胞、癌細胞を問わず確かめられてきた<sup>(12)</sup>。DFMO は、少数の例外はあるが、培養細胞の増殖速度を著しく低下させ、その影響は可逆的で、プトレンシンやポリアミンの添加で回復される。このような DFMO による可逆的な増殖の停止が確かに細胞内のスペルミジン量の減少によるものかは、AdoMetDC の阻害剤である MHZPA や MAOEA によっても同様の可逆的な増殖停止が起こることによって示されている。ODC あるいは AdoMetDC の阻害剤のポリアミンおよびその前駆体量への影響は、スペルミジン量が減少する以外はすべて逆である。したがって、両者を用いた実験から、これらの阻害剤による増殖の停止はスペルミジン量の減少に基づくと考えられることができる。

細胞内のスペルミジン量を減少させることは、AdoDato を用いることによっても実現できる。しかし、AdoDato の投与でスペルミジン量のある程度減少させても、増殖速度の低下は観察されない。この結果は DFMO の結果と一見矛盾するようだが、AdoDato の場合、細胞内のスペルミン量

がかなり増加しており、増加したスペルミンが増殖におけるスペルミジンの役割を代用すると考えることによって説明される。後にも述べるように、細胞増殖においては、スペルミジンとスペルミンは同じ役割を持ち得る可能性は大きい。

DFMO による増殖速度の低下のほんとうの理由はまだ明らかでない。DFMO によって細胞周期がどこで停止するかを調べた結果では、正常細胞と癌細胞では少し異なるが、DNA の合成期あるいはその少し前であることが示されている。また、スペルミジン量の減少に引き続く増殖速度の低下は DNA の複製が阻止されているためらしいことは、この他いくつかの研究結果からも支持される<sup>(6)</sup>。しかし、DFMO 処理した細胞から抽出した核を用いて、無細胞系で DNA の複製能力を調べると、対照に比べて確かに複製能力は低下しているが、その低下はポリアミンの添加により回復しないという報告もある。したがって、ポリアミンが直接 DNA の複製に関わっているかどうかは明らかでない。むしろ、スペルミジン量が減少したことによる最初の影響は、蛋白合成に見られるという報告<sup>(19)</sup>もあり、DNA 合成の変化が、蛋白合成能の低下を介した二次的な影響である可能性も指摘されている。蛋白合成へのポリアミンの影響はすでに無細胞系の実験で数多く示されており、DFMO による増殖の停止が DNA 合成に関わる特定の蛋白質<sup>(20)</sup>の合成速度が低下することに基づくことは充分ありうることである。

### 2. 分化とポリアミン

細胞が分化する際には、多くの場合増殖を伴うので、増殖と分化を区別することはそう簡単でない。しかし、DFMO を中心とした阻害剤を用いることにより、ポリアミンが増殖ばかりでなく分化過程においても重要な役割を持つことが明らかになっている<sup>(21)</sup>。そのようなポリアミンの作用が示される例は多数にのぼっているが、ポリアミンの分化への影響は、ポリアミン濃度が高いことが細胞の分化に必要な場合と、ポリアミン濃度が低いことが分化誘導につながる場合とに大別される。そして、このような一見矛盾した作用は、ポ

リアミンの細胞内での作用が広範囲にわたっていることや、阻害剤を用いてポリアミン量が減少することによって、分化過程における未知のインデューサーあるいはサブプレッサーの合成が低下すると考えることによって説明されている。

### 3. スペルミンの役割

細胞機能とポリアミンの関係はほとんどの場合、DFMOを用いて調べられているので、その結果は細胞機能とスペルミジン量の減少との関係を示すことになり、細胞レベルでスペルミンの役割が示される研究結果は少なかった。しかし、最近開発されたいくつかの阻害剤によって興味ある結果が得られている<sup>(12,15)</sup>。

現在、細胞内のスペルミン量を減少させる方法はいくつか知られているが、DFMOよりさらに強力なDDC阻害剤であるMAPを用いたり、DFMOとAdoDatoを組み合わせることによって、スペルミン量を対照の50%以下にすることができる。その際、細胞は増殖を停止するだけでなく生存率も低下する。同様のことはBESpdを用いても観察されており、プトレンとスペルミジンの枯渇に引き続くスペルミン量の減少は、細胞の生存率の低下に結びつくことが示唆されている。

また、DFMOにより増殖速度が著しく低下する際も、細胞内のスペルミン量に変化はほとんどないが、その細胞にスペルミンを与えると細胞は正常に増殖を開始する。このとき逆経路によって生成するスペルミジン量はごく少量であることが確かめられている。したがって、スペルミンが増殖因子になりうることも示唆されている。

しかし、SpmSyn阻害剤を用いた結果は、上記の結果と一見矛盾する。これらの阻害剤は、細胞内のスペルミン量を対照の5分の1以下にし、それに見合うだけのスペルミジン量を増加させるが、細胞の増殖速度には影響をあまり与えない。すなわち、ここでは、スペルミン量の低下は細胞の増殖速度や生存率には無関係であることが示唆される。今のところ、この食い違いは、スペルミジンとスペルミンがそれぞれの役割を補うことが

できると考えることで説明されている。

スペルミンが真核細胞に特有のものであることを考えれば、細胞の分化など、より高次の細胞機能との関係は興味深い。

### 4. 今後の課題

生合成阻害剤は、細胞の増殖や分化とポリアミンがはっきりと関わりを持つことを明らかにしてきたが、ポリアミンがどこで作用しているかを分子レベルで明らかにすることが現状では非常に困難であることも示してきた。もちろん、より選択的で強力な阻害剤を用いることによって、どこで作用しているのか、その範囲を狭めることはできるだろうが、もっと基本的なところにも問題がある。その一つは、細胞内におけるポリアミンの分布の問題である<sup>(22)</sup>。下等な真核細胞を用いた速度論的研究からは、細胞内のポリアミンのほとんどが、強くどこかに結合しているか、どこかに閉じ込められて存在することが示されており、分布に大きな片寄りがあることが明らかになっている。したがって、細胞の中に自由に動きうるポリアミンの小さなプールがあり、そのポリアミンの濃度が細胞の機能にとって重要な働きをしている可能性は大きい<sup>(12)</sup>。実際、阻害剤を用いて細胞内のポリアミン量を減少させておき、そこにポリアミンを添加した際、ポリアミン量が正常値に達しないうちに細胞の増殖速度や、ODC、AdoMetDCの活性に著しい影響が出る場合もあり、その可能性が強く示唆されている。もし、細胞内で自由に動き得るポリアミンの濃度や分布を調べることができれば、ポリアミンが作用している場がより鮮明になるに違いない。

もう一つの問題点は、ポリアミンが作用している場が非常に多いという点である。多くの場所で作用しているからこそ、作用が重なり合っははっきりと区別できないでいるのが実情だろう。BESpdやBESpmが調節作用というポリアミンの作用の一部と、増殖に必要な作用とを区別しているように、種々のポリアミンアナログを用いることで、複数のポリアミンの作用を、作用を受ける高分子側の構造によって区別することが可能に

なれば、より具体的なポリアミンの役割が見えてくるだろう。

\*

以上、ポリアミンの役割に関する最近の研究の動向を、生合成阻害剤の利用という観点からまとめてみた。

本稿では誌面の都合上、生合成阻害剤の化学療法剤としての可能性についてはほとんど触れなかったが、機能研究と同様、魅力的な分野である。これらの阻害剤は、制癌剤<sup>(23,24)</sup>としての可能性ばかりでなく抗寄生虫薬<sup>(24)</sup>としても大きな可能性をもっている。DFMO はツェツェバエがベクターとなる眠り病の原因寄生虫の駆除に著しい効果を上げており、またエイズにおけるカリニ肺炎に効果があることも報告されている。

また、本稿では細胞レベルでのポリアミンの役割についてだけ扱ったが、中枢神経系におけるポリアミン<sup>(25)</sup>の役割も興味ある課題である。最近、グルタミン酸リセプターのアンタゴニストであるクモ毒の構造が決定され<sup>(26)</sup>、そのクモ毒は、ポリアミン代謝物とジアミンやアミノ酸などが結合したものであることが明らかになっている。ポリアミンあるいはその代謝物が神経伝達の調節に関与する可能性が注目される。

その他、本稿では触れなかった微生物<sup>(22)</sup>、植物<sup>(27)</sup>のポリアミンや、膜機能へのポリアミンの影響<sup>(28)</sup>などについては優れた総説があるので参照されたい。

最後に、本稿執筆の機会を与えてくださいました、東北大学農学部神尾好是助教授、ならびに数々の御助言をいただきました城西大学薬学部鮫島啓二郎教授に感謝いたします。

## 文献

- 1) 岡 孝己: 蛋白質 核酸 酵素, 20, 101 (1975).
- 2) 井上秀夫, 竹田義朗: 生化学, 49, 411 (1977).
- 3) 竹田美文: 代謝, 19, 115 (1982).
- 4) Y. Takeda, K. Samejima, K. Nagano, M. Watanabe, H. Sugeta & Y. Kyogoku: *Eur. J. Biochem.*, 130, 383 (1983).
- 5) L. J. Marton & D. R. Morris: "Inhibition of Polyamine Metabolism", ed. by P. P. McCann *et al.*, Academic Press, London, 1987, p. 79.
- 6) A. Raina, T. Eloranta, R.-J. Pajula, R. Mantijarvi & K. Tumoi: "Polyamines in Biomedical Research", ed. by J. M. Gaugas, Wiley, 1980, p. 35.
- 7) C. W. Tabor & H. Tabor: "The Physiology of Polyamines", Vol. II, ed. by U. B. Bachrach and Y. M. Heimer, CRC Press, 1989, p. 63.
- 8) A. E. Pegg & P. P. McCann: *Am. J. Physiol.*, 243, c212 (1982).
- 9) L. Ghoda, T. van Daalen Wetters, M. Macrae, D. Asherman & P. Coffino: *Science*, 243, 1493 (1989).
- 10) T. Kameji & A. E. Pegg: *J. Biol. Chem.*, 262, 2427 (1987).
- 11) P. R. Libby, R. J. Bergeron & C. W. Porter: *Biochem. Pharmacol.*, 38, 1435 (1989).
- 12) A. E. Pegg: *Cancer Res.*, 48, 759 (1988).
- 13) R. Madhubala, J. A. Secrist, III & A. E. Pegg: *Biochem. J.*, 254, 45 (1988).
- 14) A. Shirahata [ & ] K. Samejima: "The Chemistry and Biology of Polyamines", ed. by I. D. Algranati *et al.*, ICSU Press, Maiami & Paris, 1989, p. 99.
- 15) J. G. Baillon, M. Kolb & P. S. Mamont: *Eur. J. Biochem.*, 179, 17 (1989).
- 16) N. Seiler: "Inhibition of Polyamine Metabolism", ed. by P. P. McCann *et al.*, Academic Press, London, 1987, p. 49.
- 17) C. W. Porter, P. F. Cavanaugh, Jr., N. Stolowich, B. Ganis, E. Kelly & R. J. Bergeron: *Cancer Res.*, 45, 2050 (1985).
- 18) C. W. Porter, J. M. Mains, D. Lee & R. J. Bergeron: *Biochem. J.*, 254, 337 (1988).
- 19) B. B. Rudkin, P. S. Mamont & N. Seiler: *Biochem. J.*, 217, 731 (1984).
- 20) 五十嵐一衛: 生化学, 61, 285 (1989).
- 21) O. Heby, G. D. Luck & J. Schindler: "Inhibition of Polyamine Metabolism", ed. by P. P. McCann *et al.*, Academic Press, London, 1987, p. 165.
- 22) C. W. Tabor & H. Tabor: *Microbiol. Rev.*, 49, 81 (1985).
- 23) 樋廻博重, 塚田哲也, 中島邦夫: 蛋白質 核酸 酵素, 30, 335 (1985).
- 24) P. J. Schechter, J. L. R. Barlow & Sjoerdsma: "Inhibition of Polyamine Metabolism", ed. by P. P. McCann *et al.*, Academic Press, London, 1987, p. 345.
- 25) G. G. Shaw: *Biochem. Pharmacol.*, 28, 1 (1979).
- 26) 中嶋暉躬, 川合述史: 現代化学, 3月号, p. 48 (1989).
- 27) N. Bangi: "The Physiology of Polyamines", Vol. III, ed. by U. Bachrach and Y. M. Heimer, CRC Press, Boca Raton, 1989, p. 107.
- 28) F. Schuber: *Biochem. J.*, 260, 1 (1989).

