

細胞増殖におけるスペルミジンの  
役割に関する研究

甲第9号

別府隆信

細胞増殖におけるスベルミジンの  
役割に関する研究

別府隆信

## 目次

### 総論の部

序論	…	1
第1章 アミノプロピルトランスフェラーゼに対する 選択的阻害剤の利用	…	6
第1節 スペルミジン合成酵素阻害剤 およびスペルミン 合成酵素阻害剤の <i>in vitro</i> における特異性	…	7
第2節 スペルミジン合成酵素阻害剤 およびスペルミン 合成酵素阻害剤の培養細胞における効果	…	9
(1) 単層培養による阻害剤の評価	…	9
(2) 短期的な 4MCHAあるいは APCHA単独投与の影響	・	11
(3) 長期的な 4MCHAあるいは APCHA単独投与の影響	・	15
小括と考察	…	16
第2章 ポリアミンアナログの利用	…	22
第1節 ポリアミン欠乏細胞の調整	…	23
第2節 ポリアミン欠乏細胞へのポリアミンアナログの 効果	…	25
第3節 スペルミン欠乏細胞へのポリアミンアナログの 効果	…	28
小括と考察	…	30
第3章 ハイプシンの高感度測定法の開発と応用	…	33
第1節 ハイプシンの高感度測定法の開発	…	34
(1) 前処理および HPLC条件の検討	…	35

(2) 測定値の信頼性	… 39
第2節 ハイプシンの高感度測定法の応用	… 42
(1) 薬物処理細胞への応用	… 42
(2) アナログ添加実験への応用	… 44
小括と考察	… 46
結 論	… 48
謝 辞	… 50
実験の部	… 51
引用文献	… 61

## 略号

### 1) ポリアミンおよびポリアミン生合成酵素等に関する略号

Put:	プトレシン
Spd:	スペルミジン
Spm:	スペルミン
AcSpd:	N <sup>1</sup> -アセチルスペルミジン
AcSpm:	N <sup>1</sup> -アセチルスペルミン
AdoMet	S-アデノシルメチオニン
DeAdoMet	脱炭酸化-S-アデノシルメチオニン
MTA	メチルチオアデノシン
ODC:	オルニチン脱炭酸酵素 (EC 4.1.1.17)
AdoMetDC:	アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (EC 4.1.1.50)
SpdSyn:	スペルミジン合成酵素 (EC 2.5.2.16)
SpmSyn:	スペルミン合成酵素 (EC 2.5.1.22)
SSAT:	スペルミジン／スペルミン -N <sup>1</sup> -アセチル基転移酵素
PAO:	ポリアミン酸化酵素

### 2) ポリアミン合成酵素阻害剤に関する略号

DFMO:	$\alpha$ -difluoromethylornithine
AOAP:	1-aminooxy-3-aminopropane
AbeAdo:	5'-{[(Z)-4-amino-2-butenyl]methylamino}-5'-deoxy-adenosine
AdoDato:	S-adenosyl-1,8-diamino-3-thiooctane
AdoDatad:	S-adenosyl-1,12-diamino-3-thio-9-azadodecane
4MCHA:	<i>trans</i> -4-methylcyclohexylamine

ANB:	<i>exo</i> -2-aminonorbornane
APCHA:	N-(3-aminopropyl)-cyclohexylamine
APANB:	N-(3-aminopropyl)- <i>exo</i> -2-aminonorbornane
APBA:	N-(3-aminopropyl)butylamine

### 3) ポリアミンアナログに関する略号

NSpd:	norspermidine
HSpd:	homospermidine
APCad:	N-3-aminopropylcadaverine
N4MSpd:	N-4-methylspermidine
N8MSpd:	N-8-methylspermidine
TAP:	tris-(3-aminopropyl)amine
1APP:	1-(3-aminopropyl)-4-aminomethylpiperidine
4APP:	4-[N-(3-aminopropyl)aminomethyl]piperidine

### 4) その他の略号

eIF-5A:	eukaryotic translation initiation factor 5A
CMC:	carboxymethyl cellulose
OPA:	<i>o</i> -phthalaldehyde
HPLC:	high performance liquid chromatography
PBS:	phosphate-buffered saline
DTT:	dithiothreitol
DMF:	dimethylformamide

# 序 論

ポリアミンは生物界に広く存在する低分子の塩基性化合物であり、多くの種類が発見されてきたが、ジアミンを含めて代表的なものはプトレシン、スペルミジン、スペルミンの3種である。とりわけ哺乳動物細胞にはこの3種が存在し、細胞の増殖や分化にともないそれらの量が複雑に変動することが報告されており、増殖・分化において重要な役割を演じていることに疑う余地はない<sup>1,2)</sup>。

分子レベルでのポリアミンの役割は、有機塩基という化学構造上の特性から単に陽イオンとしての働きばかりでなく、多くの生体高分子との静電的結合、水素結合、疎水結合などを通して生体高分子の立体構造に影響を与え、ひいてはそれらの機能発現に影響を与えると考えられる(Fig. 1)。しかし、それを実証するのは容易ではなく、核酸研究の分野における *in vitro* の実験から、スペルミジンやスペルミンが特

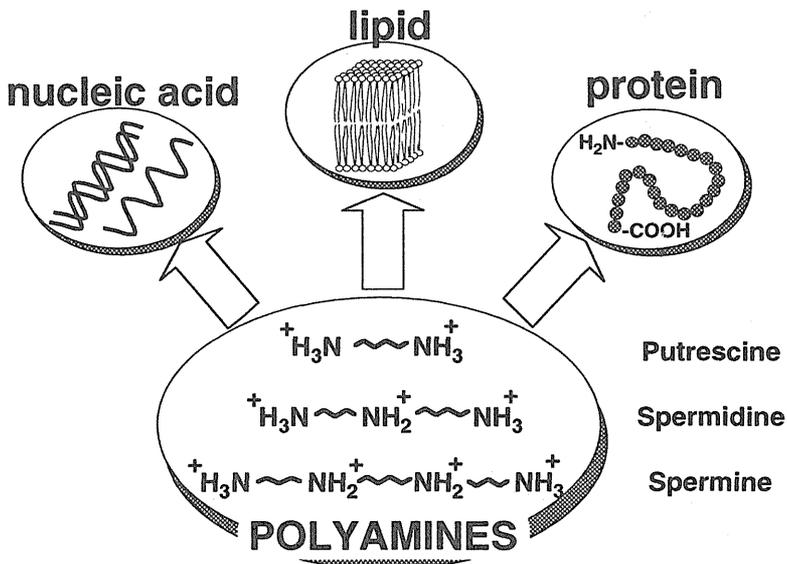


Fig. 1 Interaction of polyamines with biological macromolecules

定の塩基配列からなる核酸と相互作用して立体構造に変化を与えたり安定化したりすることが明らかにされつつある程度で<sup>3)</sup>、他の生体高分子、例えばタンパク質、膜成分などとの相互作用については、確かな証拠はあっても分子レベルでのアプローチは皆無といってもよい。したがって、個々の生体高分子とポリアミンとの相互作用が分子レベルで具体的に明らかになり、それらの総合された結果として種々の生理現象を理解するに至るまでには未だ多くの方法論の進歩が必要であるのはいままでのない。

現状で、いろいろな生理現象あるいは生体反応におけるポリアミンの役割を研究する方法は、細胞内ポリアミンを人為的に操作することにより得られる応答を解析し、ポリアミンの機能する場の情報を得ようとするものである<sup>4,5)</sup>。そのために最もよく用いられるのがポリアミン代謝酵素阻害剤である。先ず哺乳動物におけるポリアミンの生合

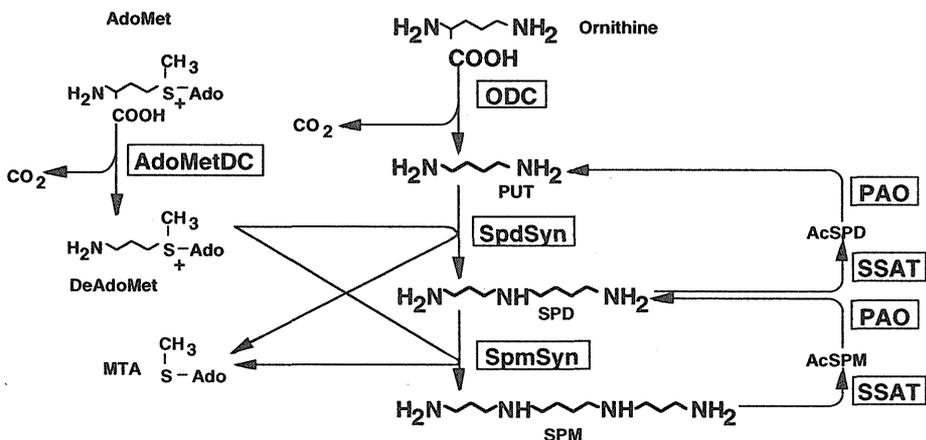


Fig. 2 Polyamine biosynthetic pathway

PUT: Putrescine, SPD: Spermidine, SPM: Spermine, AdoMet: *S*-Adenosylmethionine, DeAdoMet: Decarboxylated-*S*-Adenosylmethionine, MTA: 5'-Methylthioadenosine, ODC: Ornithine Decarboxylase, AdoMetDC: *S*-Adenosylmethionine Decarboxylase, SpdSyn: Spermidine Synthase, SpmSyn: Spermine Synthase, SSAT: Spermidine/Spermine *N*'-Acetyltransferase, PAO: Polyamine Oxidase

成経路を Fig. 2 に示す. オルニチンは誘導酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) によりプトレシン (PUT) になる. 一方, *S*-アデノシルメチオニン (AdoMet) は同様に誘導酵素である *S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (AdoMetDC) により, 脱炭酸化 *S*-アデノシルメチオニン (DeAdoMet) になり, そのアミノプロピル基がスペルミジン合成酵素 (SpdSyn) によりプトレシンの一方のアミノ基に転移されトリアミンであるスペルミジン (SPD) が合成される. さらに, DeAdoMet のアミノプロピル基がスペルミン合成酵素 (SpmSyn) によりスペルミジンの 8 位のアミノ基に転移され対称テトラミンであるスペルミン (SPM) が合成される. この経路の中で ODC により生成するプトレシンが AdoMetDC を活性化し DeAdoMet を増加させるため, ODC はポリアミン生合成の律速酵素と呼ばれている. 一方, スペルミンは誘導酵素であるスペルミジン・スペルミン-*N*<sup>1</sup>-アセチル基転移酵素 (SSAT) によりアセチル化され, *N*<sup>1</sup>-アセチルスペルミン (AcSPM) になると, ポリアミン酸化酵素 (PAO) によりスペルミジンが生成し, さらにスペルミジンは SSAT により *N*<sup>1</sup>-アセチルスペルミジン (AcSPD) になった後, PAO によりプトレシンになる逆経路も存在する. このようにポリアミン生合成経路に 6 種の酵素が関与しており, それぞれの酵素に対する阻害剤が開発されている. 中でも ODC 阻害剤は最も広く使用され, 酵素自殺基質として有名な  $\alpha$ -ジフルオロメチルオルニチン (DFMO) はポリアミンの役割研究に広く使用され, 多くの貴重な結果を提供してきた. 代表的な阻害剤を Fig. 3 にまとめ, 主なものについて, それらを培養細胞に投与したときの細胞内ポリアミン量および DeAdoMet 量への影響と細胞の生育に及ぼす影響を, これまでの報告に基づき Table. 1 にまとめた. 例えば, 培養細胞に DFMO を投与すると ODC 阻害の結果, プトレシンばかりでなくスペルミジンも著しく減少し, 一方, スペル

ミンは余り変化せずに細胞の増殖は停止する<sup>4)</sup>。一方, AdoMetDC阻害剤のAbeAdoを細胞に投与しても同様に増殖は停止するが, その時はDeAdoMetが供給されないために著しくプトレシンが蓄積し, スペルミジンとスペルミンは著しく減少することが報告されている<sup>4)</sup>。このような両実験結果だけから単純に判断しても, プトレシン, スペルミンよりはスペルミジンの減少が細胞増殖の停止に直接関与しているので

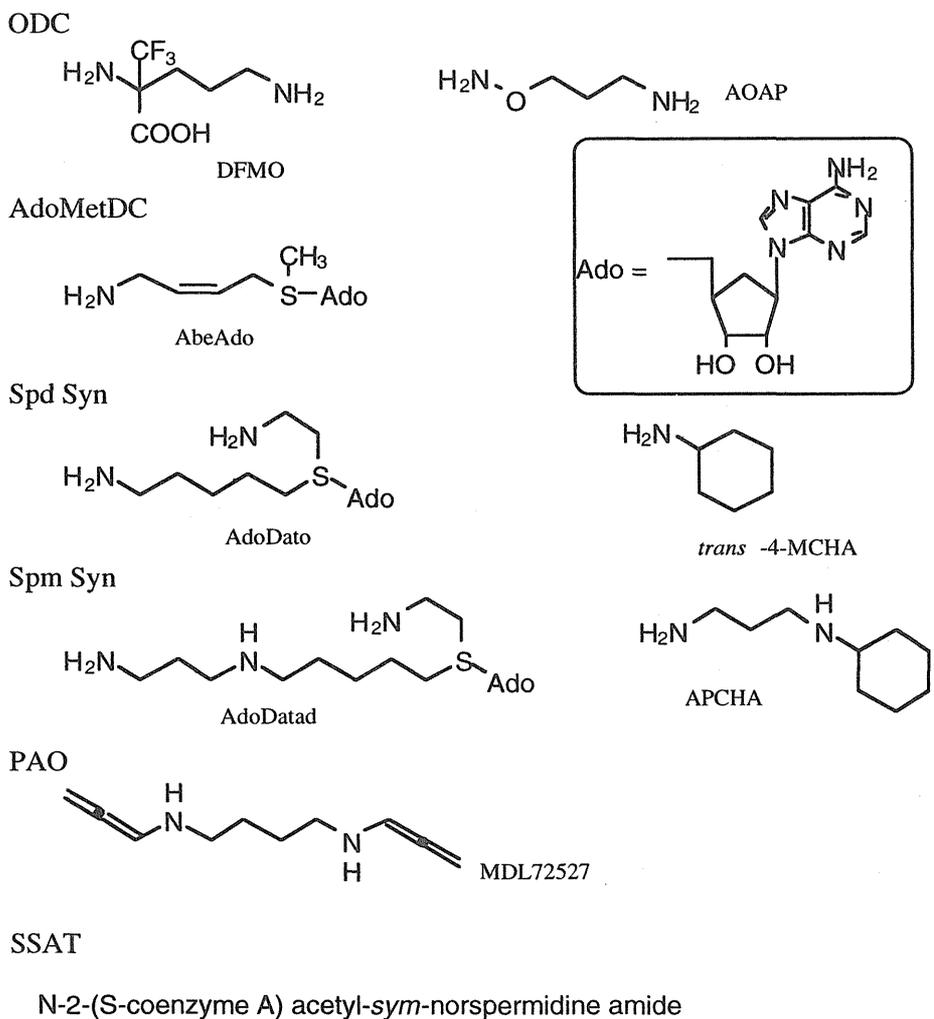


Fig. 3 Structures of key inhibitors of polyamine biosynthesis

Table 1 Effect of inhibitors of polyamine biosynthesis on polyamine content and cell growth

Inhibitor	Target	Put	Spd	Spm	Total polyamine	DeAdoMet	Growth
DFMO	ODC	↓	↓	NC <sup>a</sup>	↓	↑	↓↓↓
AbeAdo	AdoMetDC	↑↑	↓	↓	↑	↓	↓
AdoDato	Spd Syn	↑	↓	↑	NC	↑	NC
AdoDatad	Spm Syn	↓	↑	↓	NC	↑	NC

a) NC, little or no change

はないかと予想されるが、現状では確かな証拠を得るまでには至っていない。したがって、スペルミジンとスペルミンの個々の役割をを調べるためには、これら2つの誘導酵素の阻害剤の利用だけでは限界があり、スペルミジン合成酵素とスペルミン合成酵素に対する選択的阻害剤が必要と考えられた。

白幡らはこれまでにスペルミジン合成酵素およびスペルミン合成酵素に対する選択的で強力な阻害剤の開発に成功してきた。本研究はその様な阻害剤の利用を考慮しながら、細胞増殖におけるポリアミン、特にスペルミジンの役割に注目して行ったものである。

第1章では、新規スペルミジン合成酵素阻害剤およびスペルミン合成酵素阻害剤を用いることにより、スペルミジンとスペルミンのどちらが細胞の増殖に必要であるのかを調べ<sup>6)</sup>、第2章では、ポリアミンのアナログを利用して、スペルミジンあるいはスペルミンに特異的な作用があるのかどうかを調べた。第3章では、スペルミジンに特異的な作用としてハイプシンに注目し、先ずハイプシンの高感度分析法を開発し<sup>7)</sup>、続いて細胞の増殖とハイプシンの関係について調べた。

## 第1章 アミノプロピルトランスフェラーゼに対する選択的阻害剤の利用

ポリアミン生合成に関わる2つのアミノプロピル基転移酵素，すなわちスペルミジン合成酵素およびスペルミン合成酵素は，活性部位にプトレシンあるいはスペルミジンの結合部と DeAdoMet の結合部を有している．これまで両酵素に対する強力な阻害剤は，そのような活性部位における両基質の遷移状態をモデルにした化合物で，スペルミジン合成酵素に対する選択的阻害剤としては，S-adenosyl-1,8-diamino-3-thiooctane (AdoDato)，スペルミン合成酵素に対しては S-adenosyl-1,12-diamino-3-thio-9-azadodecane (AdoDatad) などが開発されてきた．しかし，このような阻害剤を培養細胞に適用すると，確かにスペルミジン合成酵素やスペルミン合成酵素を阻害してそれぞれのポリアミン量をある程度減少させることができたが，完全な枯渇までには至らなかった．その理由として，これら阻害剤によるポリアミン量の減少が AdoMetDC を誘導し，基質である DeAdoMet が著しく蓄積して，それがアデノシル基を持つこれらの阻害剤の効果を減弱させてしまうためと考えられている．そこで，*in vivo*でも有効な両酵素に対する阻害剤として，本研究室では両酵素のプトレシンまたはスペルミジン結合部位で競合する阻害剤の開発を行ってきた．その結果，*in vitro*実験で，DeAdoMet の過剰存在下でもきわめて強力で働く阻害剤を複数見いだしてきた<sup>8,9)</sup>．本研究ではその中から，スペルミジン合成酵素阻害剤として *trans*-4-methylcyclohexylamine (4MCHA)，*exo*-2-aminonorborene (ANB)，また，スペルミン合成酵素阻害剤として *N*-(3-aminopropyl)-cyclohexylamine (APCHA)，*N*-(3-aminopropyl)-*exo*-2-aminonorborene (APANB)，*N*-(3-aminopropyl)butylamine (APBA) を

とりあげて検討した。

本章ではこれら新規阻害剤が、培養細胞中のポリアミン代謝を選択的に阻害できるかどうかを調べるとともに、細胞増殖において、スペルミジンおよびスペルミンがそれぞれ独自の役割を持っているかどうかを調べることを目的とした。なお、培養細胞としてはポリアミン研究で古くから用いられているラット肝癌由来 HTC細胞を使用し、種々の薬物の影響を短期的に調べるときには単層培養で、長期的に調べるときや多くの細胞を必要とするときには浮遊培養で実験を行った。

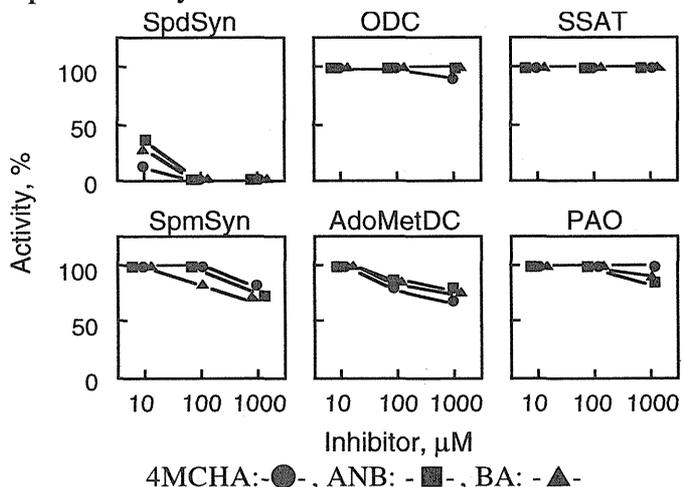
## 第1節 スペルミジン合成酵素阻害剤およびスペルミン合成酵素阻害剤の *in vitro*における特異性

本研究で用いた阻害剤は、もともとプトレシンあるいはスペルミジンの類似体としてデザインされたものであるため、プトレシンあるいはスペルミジンを基質や活性化因子とする他のポリアミン生合成酵素類に対して直接作用し、細胞内でそれらの活性に影響を与えることが考えられる。そこで、培養細胞を用いた実験を始めるにあたり、6種のポリアミン生合成酵素に対する *in vitro*での影響を調べた。スペルミジン合成酵素とスペルミン合成酵素は完全精製したものをを用い、他の酵素は、それぞれの酵素の調製法に従って、ラットの肝臓から調製した粗抽出液を用いた。阻害剤の濃度が、10, 100, 1000  $\mu$ M濃度のときの酵素活性の阻害効果を、阻害剤を加えないときの値に対する百分率で比較した(Fig. 4)。

スペルミジン合成酵素阻害剤は、どれもスペルミジン合成酵素活性を 100  $\mu$ M濃度でほとんど完全に阻害しているのに対して、他の酵素活性に対してはほとんど影響を与えなかった(Fig. 4A)。特に、4MCHA

は、 $10\mu\text{M}$ 濃度でもスペルミジン合成酵素活性を90%以上阻害し、特異性高く阻害していることがわかった。また、スペルミン合成酵素阻害剤は、調べたいずれの阻害剤も、 $10\mu\text{M}$ 濃度でスペルミン合成酵素をほぼ完全に阻害し、他の酵素に対しては $100\mu\text{M}$ 濃度でも活性にはほとんど影響を与えず、きわめて特異的に働きうることがわかった (Fig. 4B).

(A) Spermidine synthase inhibitors



(B) Spermine synthase inhibitors

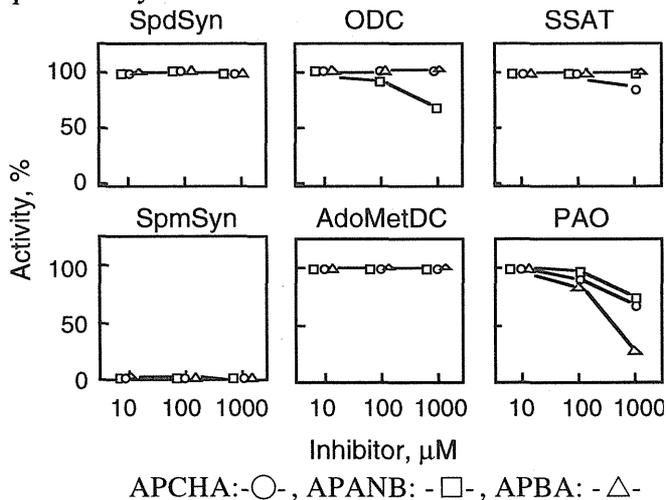


Fig. 4 Effects of aminopropyltransferase inhibitors on six polyamine biosynthetic enzymes

## 第2節 スペルミジン合成酵素阻害剤およびスペルミン合成酵素阻害剤の培養細胞における効果

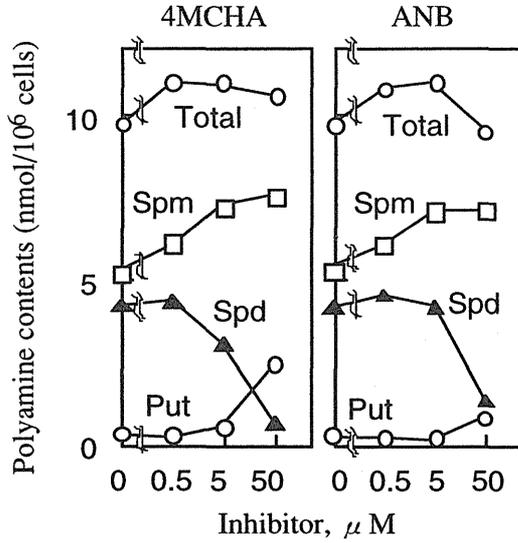
### (1) 単層培養による阻害剤の評価

まず、4MCHA, ANB, APCHA, APANB, APBAについて、単層培養した HTC細胞に対する影響を調べた。3日間シャーレで前培養し対数増殖期にある細胞を集めて再びシャーレにまき、1日後に細胞の接着を確認してから、種々の阻害剤を含む培地と交換して実験を開始した。スペルミジン合成酵素阻害剤の4MCHA および ANBについては投与2日後のポリアミン量 (Fig. 5A), また、スペルミン合成酵素阻害剤の APCHA, APANB, APBAについては投与3日後のポリアミン量を示した (Fig. 5B)。

スペルミジン合成酵素阻害剤である4MCHAおよび ANBは、ここに示した  $50\mu\text{M}$ までの濃度範囲では増殖に影響を与えず、両者とも濃度に依存して細胞内のスペルミジン量を減少させた。この時、プトレシンは増加し、全ポリアミン量はほとんど変化しなかった。この結果は、これまでにスペルミジン合成酵素阻害剤として最も強力で特異的であるとされている AdoDato を培養細胞に投与したときに得られる結果<sup>10, 11)</sup>と同じ傾向を示した (Table 1)。プトレシン量の増加は、スペルミジンへの合成速度が低下した結果プトレシンが蓄積したと考えることによって、また、スペルミン量の増加は、蓄積した DeAdoMetのために、既存のスペルミジンが効率よくスペルミンに変化したと考えることによって説明される<sup>12)</sup>。これらのことから、4MCHAおよび ANB共にスペルミジン合成酵素に選択的に作用することが示唆された。なお、細胞内に4MCHA, ANBは、 $50\mu\text{M}$ 投与で、 $10^6$  cellあたりそれぞれ検出限

界の 0.5nmol以下であった。

(A) Spermidine synthase inhibitors



(B) Spermine synthase inhibitors

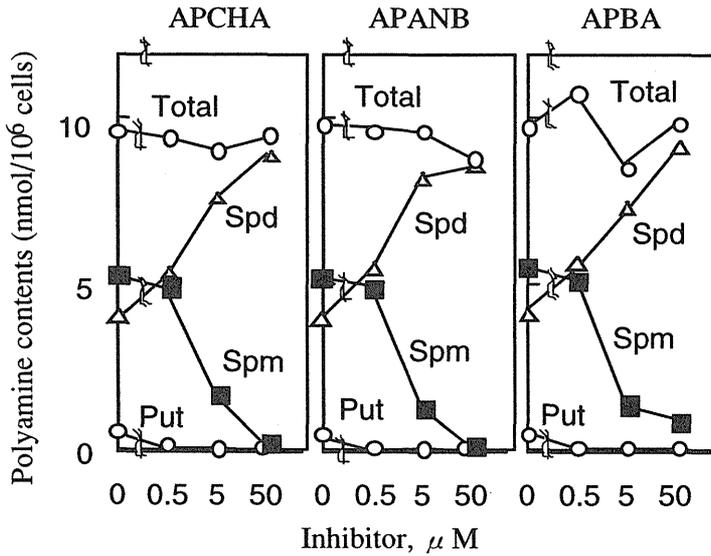


Fig. 5 Effects of aminopropyltransferase inhibitors on polyamine content in HTC cells cultured in monolayer

スペルミン合成酵素阻害剤であるAPCHA, APANB, APBAを投与すると、濃度に依存してスペルミン量は減少し、それに代わってスペルミジン量が増加した。その際、プトレシンはほとんど検出されないくらいまで減少した。また、ここに示した $50\mu\text{M}$ までの濃度範囲では、いずれの阻害剤も増殖には影響を与えなかった。この結果は、スペルミン合成酵素阻害剤としては最も強力で選択的であるとされているAdoDatadを培養細胞に投与したときの結果<sup>13,14)</sup>や、われわれとは独立にAPBAを見だし、培養細胞に投与したときの結果<sup>15)</sup>と同じ傾向を示した。スペルミジン量の増加は、スペルミンへの合成速度が低下した結果、スペルミジンが蓄積したと考えることによって、また、プトレシンの減少は、蓄積したDeAdoMetのために、プトレシンが効率よくスペルミジンに変化したと考えることによって説明される<sup>12)</sup>。これらのことから、培養細胞においてもこれら阻害剤が調べた濃度範囲で、選択的にスペルミン合成酵素に作用することが示唆された。なお、APCHA, APANB, APBAは、 $50\mu\text{M}$ 投与で、 $10^6$  cellあたりそれぞれ2nmol, 3nmol, 2nmol検出された。これらの阻害剤は投与量を増すことによって、更にスペルミン量を減少させたが、APBAは $500\mu\text{M}$ 濃度で細胞を肥大化させ、また、APANBは $500\mu\text{M}$ 濃度で著しく細胞数を減少させた。一方、APCHAは $500\mu\text{M}$ 濃度の投与でも細胞数の著しい減少はみられなかった。

## (2) 短期的な4MCHAあるいはAPCHA単独投与の影響

単層培養の実験で比較的毒性が少なく、効果的にスペルミジンおよびスペルミン合成を阻害した4MCHAおよびAPCHAについて、浮遊培養したHTC細胞に短期(2日間)投与したときの影響を調べた(Fig. 6)。

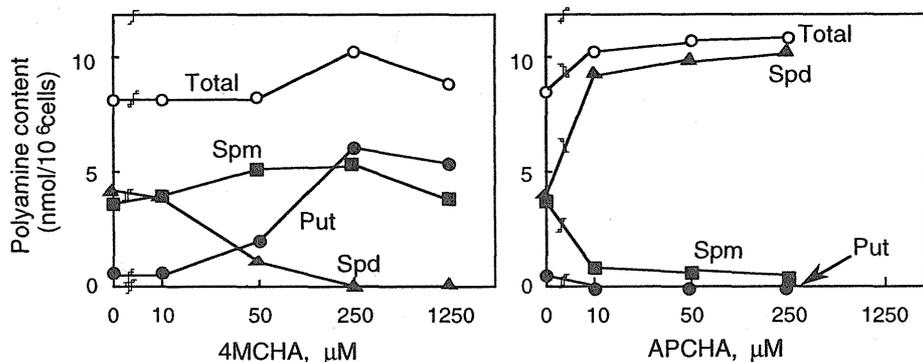


Fig. 6 Effect of 4MCHA or APCHA on polyamine content in HTC cells cultured in suspension for 2 days

4MCHAでは、1250  $\mu$  M濃度の投与で対照に比べて細胞数の減少がみられたが、250  $\mu$  M濃度以下ではみられなかった。ポリアミン含量への影響は、単層培養の結果と同様であったが、4MCHA濃度が高くなるとスペルミン量の蓄積がみられなかった。このことは、これまでに報告されているスペルミジン合成酵素阻害剤<sup>10, 11, 16)</sup>ではみられないことであり、4MCHAが非常に強力にスペルミジン合成を阻害した結果と考えられた。

APCHAでは、1250  $\mu$  M濃度で細胞は死滅したが、250  $\mu$  M濃度以下では細胞数に影響はなかった。ポリアミン量への影響は単層培養の結果と同様であった。

ポリアミン自身あるいはポリアミンアナログとしてデザインされたいくつかの化合物が、ポリアミン生合成酵素遺伝子に作用して、その発現に影響を与えることが明らかになっている。従って、これらの阻害剤の投与が、生合成酵素の誘導や抑制に影響を与えるかどうかは阻害剤の効果を理解する上で重要であると考え、誘導酵素として知られている ODC, AdoMetDC, SSATの活性、および AdoMetDCによって生成される DeAdoMet量を測定した。Table 2 には、250  $\mu$  M および 1250  $\mu$  M

4MCHA投与、および 250  $\mu$  M APCHA投与における DeAdoMet量と AdoMet量を示した。4MCHAあるいは APCHAいずれの場合も著しい DeAdoMetの蓄積が明らかになり、両阻害剤が細胞内で DeAdoMetを基質とする反応を強力に阻害していることが示唆された。1250  $\mu$  Mの 4MCHAでは、DeAdoMetの蓄積は対照の 100倍以上に達した。また、この時 DeAdoMet量の蓄積が大きい試料ほど AdoMet量も多くなる傾向が見られ、細胞内における AdoMetDC活性の DeAdoMetによる生産物阻害がおきている可能性が考えられた。Table 3 には、250  $\mu$  Mの 4MCHA あるいは APCHAを投与したときの 2日目までの細胞内酵素活性を示した。ODCは、細胞の増殖サイクルと共に著しく活性が変動したり、血清中の増殖因子などの刺激により活性が上昇したりすることが知られている<sup>17)</sup>。4MCHA投与により、1日目の ODC活性は、植え継ぎ前の細胞に比べ、3.7倍上昇したが、対照と比較すると2倍であり、また2日目には活性の上昇は対照とほぼ同じレベルまで低下した。一方、APCHA投与では対照と比べて差はなかった。AdoMetDCは、ODCと異なり、継代による増殖因子の刺激では著しい活性の変動を示さないが、4MCHA投与により対照の 8.2倍、また、APCHA投与により対照の 2.6倍活性が上昇した。SSATはポリアミンからプトレシンへの変換にかかわる律速酵素であり、本酵素もまたさまざまな刺激で誘導される<sup>18)</sup>ため、阻害剤投与により観察されたスペルミジンあるいはスペルミンの減少が本酵素の誘導による可能性も考えられた。しかしここで示されるように、4MCHA、APCHAの投与はいずれも SSAT活性に影響を与えなかった。

Table 2 AdoMet and DeAdoMet content in HTC cells cultured for 2days in the presence of 4MCHA or APCA

Treatment		AdoMet (pmol/10 <sup>6</sup> cell)	DeAdoMet
Control		480	<5
4MCHA	250 $\mu$ M	1100	160
	1250 $\mu$ M	1600	510
APCHA	250 $\mu$ M	800	60

Table 3 Effect of 4MCHA or APCA on activities of ODC, AdoMetDC and SSAT in HTC cells

Enzyme	Day	Control	4MCHA 250 $\mu$ M	APCHA 250 $\mu$ M
ODC	0	10.8 (1.0)		
	1	19.5 (1.8)	40.2 (3.7)	16.7 (1.5)
	2	12.5 (1.2)	9.1 (0.8)	14.5 (1.3)
AdoMetDC	0	1.1 (1.0)		
	2	1.0 (0.9)	9.0 (8.2)	2.9 (2.6)
SSAT	0	8.1 (1.0)		
	1	11.6 (1.4)	9.3 (1.1)	9.3 (1.1)
	2	8.0 (1.0)	9.1 (1.1)	8.6 (1.1)

Enzyme activities were measured as described in Experimental section. Relative values to those of control at day 0 are expressed in the table.

### (3) 長期的な4MCHAあるいはAPCHA単独投与の影響

哺乳動物細胞におけるポリアミンの代謝はSSATの誘導がなければ分解はおそく、阻害剤によるポリアミン量の減少は細胞分裂による希釈効果に依存している面が大きい。従って、より完全なポリアミン量の枯渇とその影響を観察するためには、長期的に阻害剤を投与することが必要である。そこで、阻害剤を含む培地でHTC細胞を浮遊培養し、2日目毎に継代し、細胞内ポリアミン量、および増殖への影響を8日目まで調べた。

4MCHAを250 $\mu$ M、あるいは1250 $\mu$ Mとなるように投与して培養したときの結果をFig. 7に示した。250 $\mu$ M投与では、スペルミジン量は1日目から著しく減少し、2日目以後、対照の約2%にまで減少した。その際、プトレシン量は、2日目で、対照のスペルミジン量を越えるレベルまで増加した。一方、スペルミン量はほぼ一定値を維持した。1250 $\mu$ M投与では、2日目以後、スペルミジン量は対照の1%まで減少し、スペルミン量も1日目以後減少しつづけた。このことは基質であるスペルミジン量がスペルミン合成に必要な量以下に減少したことを示唆した。既に報告されているスペルミジン合成酵素阻害剤ではこのようなスペルミンの減少は見られず、4MCHAが非常に強力な阻害剤であることが明らかになった。250 $\mu$ M濃度では、スペルミジン量が対照の2%まで減少したにもかかわらず、増殖速度にはほとんど影響を与えなかった。1250 $\mu$ M濃度では、増殖速度は徐々に減少し、5日目で増殖は停止した。つぎに、APCHAを250 $\mu$ Mあるいは、1250 $\mu$ M濃度となるように投与して培養したときの結果をみると、1250 $\mu$ M投与では、ポリアミン量に大きな変化がないまま細胞は3日目に死滅したが、Fig. 7に示すように250 $\mu$ M投与では細胞の倍加時間(1日)と

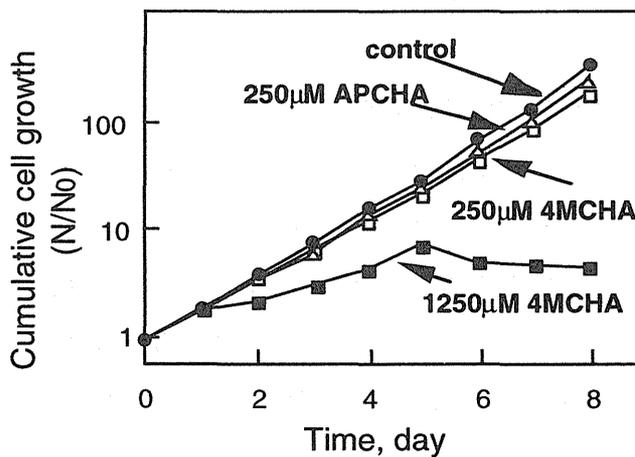
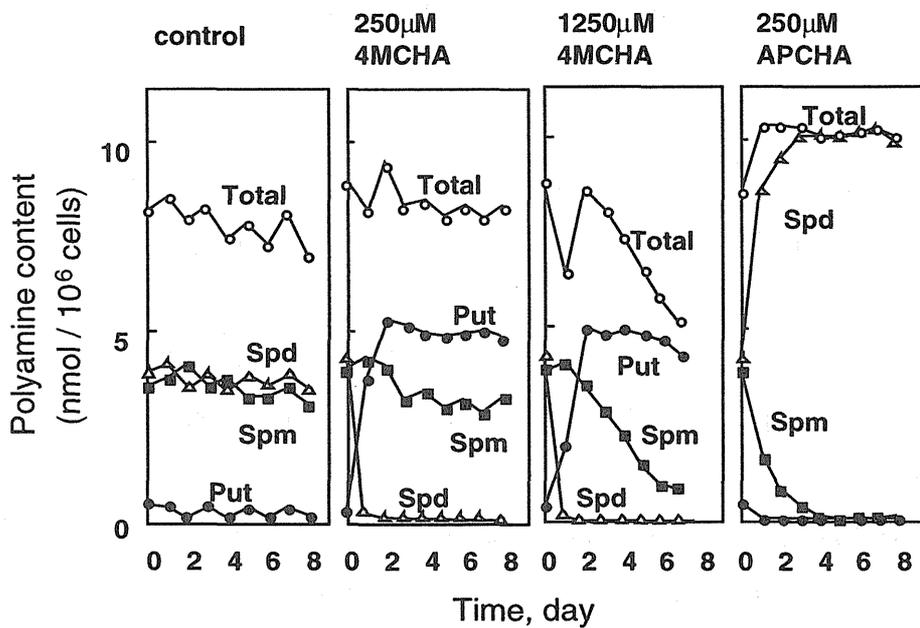


Fig. 7 Long-term effect of 4MCHA or APCHA on polyamine content and growth of HTC cells

共に細胞内のスペルミン量は減少し続け、5日目には対照の1%以下になった。ほぼ完全なスペルミンの枯渇が実現し、細胞内ポリアミンの99%以上がスペルミジンとなった。このとき、細胞数は対照と変化なく、細胞増殖には全く影響が出なかった。このことにより、HTC細胞では細胞増殖に関与するスペルミンの機能のほとんどがスペルミジンによって代用できることが示唆された。

## 小括と考察

細胞内でポリアミンと相互作用する高分子は数多くあることが知られており<sup>19)</sup>、本研究で用いたポリアミンアナログ型の阻害剤が、細胞内で目的の酵素に対して特異的に作用することについては当初疑問があった。しかし、Fig. 4に示すように、プトレシンあるいはスペルミジンを基質、生成物あるいは活性化因子とする酵素類に対して、それら阻害剤は目的とした酵素のみに強い阻害効果を示し、予想以上の特異性が明らかになった。この結果は、ポリアミンが作用するときには種々のコンホメーションをとっており、酵素側のポリアミン結合部位構造がそれぞれかなり異なっていることを示している。従って、シクロアルカン骨格をもつ4MCHA, ANB, あるいはAPCHA, APANBは単なる鎖状分子に比べて種々のコンホメーションがとりにくく、もしそのような化合物がある高分子に対して効果を示した場合には、その高分子のポリアミン結合部位でのコンホメーションを推定するのに役立つであろう。

浮遊培養細胞を用いて得られた結果は、4MCHAとAPCHAが細胞内のスペルミジンあるいはスペルミンを選択的に枯渇させる上で、きわ

めて有用であることを重ねて明らかにした。スベルミジン合成酵素阻害剤として、これまでに最も特異的であり、強力であるとされている AdoDato を、SV3T3 細胞に投与すると、Fig. 7 に示されるような今回得られた 4MCHA の効果とほぼ同様の効果があることが既に明らかになっている<sup>10, 11)</sup>。しかし、毒性が見られるほどの比較的高濃度の AdoDato を用いても、4MCHA に比べると阻害の程度は弱く、12 日間培養を続けてもスベルミジンの減少は対照の 10% 程度であり、スベルミン量は、対照の 2 倍以上増加する。このときのスベルミン量の増加は、スベルミジン合成が阻害された結果蓄積する DeAdoMet が、完全に阻害されないために合成が続いている少量のスベルミジンを効率よくスベルミンに変換するためであると考えられる。従って、このことは AdoDato 投与によるスベルミジン合成酵素の阻害の不完全さを物語っている。一方、1250  $\mu$  M 4MCHA の投与 (Fig. 7) は、スベルミジンを対照の 1% 以下まで減少させるだけでなく、スベルミン量も減少させ、このとき DeAdoMet 濃度の蓄積も著しかった。これらの結果は 4MCHA が、細胞内のスベルミジン合成酵素を阻害する上で、これまでになく強力であることを示しており、AdoDato のようなアデノシル基をもつ阻害剤は、阻害の結果として蓄積する DeAdoMet のために、細胞内で有効に働かないものと思われる。

一方、スベルミン合成酵素阻害剤として、これまでに最も特異的であり、強力であるとされている AdoDatad を SV3T3 細胞に投与した場合も、Fig. 7 に示されるような APCHA の効果とほぼ同様の効果があることが既に明らかになっている<sup>13, 14)</sup>。しかし、この化合物も AdoDato と同様、スベルミン合成の阻害の結果蓄積する DeAdoMet の影響を受けて、予想したほどの効果が出ないことが指摘されている<sup>20)</sup>。本研究では、APCHA が、これまでの阻害剤では達成できなかった細

胞内スペルミンのほぼ完全な枯渇を初めて達成し得るほどの効力をもつことを示すことが出来た(Fig. 7). 以上の結果は, アミノプロピル基転移酵素阻害剤として, 両酵素のプトレシンあるいはスペルミジン結合部位に作用する化合物を選択することに, 十分意味があったことを改めて示している.

細胞内ポリアミン量の調節は予想外に複雑であることが最近明らかになっている<sup>12)</sup>. これまでの調節研究は, ODC阻害剤である DFMOを主に用いて行なわれてきており, 機能研究と同様, どのポリアミンがどこに作用するか不明であるが, ポリアミンが ODC, AdoMetDC, SSAT, あるいは, トランスポーターなどの遺伝子に作用して, 遺伝子の発現を調節している可能性が示唆されている. Table 3の結果はそれぞれのポリアミンがどの遺伝子に作用するかを考える上で興味深い. ODC活性は, APCHA投与で変化せず, 4MCHA投与で上昇した. 従って, スペルミンには ODCを調節する特異的な作用はなく, スペルミジンは ODC活性を上昇させる何らかの特異的な作用があることが考えられる. AdoMetDC活性は 4MCHAあるいは APCHAの投与で上昇した. 上記したように, AdoDato, あるいは AdoDatadの投与で細胞内に AdoMetDCが蓄積することは Peggらによりすでに報告されている<sup>11, 14)</sup>. その報告によると, スペルミジンが酵素遺伝子の転写過程に作用し, スペルミンは翻訳過程に作用すると推察している. 本研究で得られたポリアミン量と酵素活性の関係も, AdoMetDCがスペルミジンおよびスペルミンによって異なったメカニズムにより調節されているという仮説<sup>12)</sup>に矛盾しない. しかし, APCHA処理に比べて AdoMetDC活性の上昇が大きい 4MCHA処理では, 蓄積するDeAdoMet量も大きいこと, また, DeAdoMetは AdoMetDCの活性部位に作用して酵素蛋白の分解を遅らせる可能性があることを考慮すると, APCHA, 4MCHA投与によ

るDeAdoMetの蓄積がAdoMetDC活性の上昇の要因になっている可能性も否定できない。

増殖とポリアミン量との関係は、DFMOを用いた多くの培養細胞実験で明らかにされてきた<sup>12)</sup>。ほとんどの場合、DFMOは、細胞内のプロトレシンとスペルミジンを枯渇させ、可逆的に増殖を停止させることが示されてきた。その際スペルミン量には影響がないことが多いことから、増殖にはスペルミジンが重要であると考えられてきた。一方、細胞内のスペルミンを減少させることはごく最近まで達成できなかったため、DNAへの強い結合性などを示す *in vitro* の結果から、スペルミンはクロマチン構造の維持に重要で、スペルミン量の減少は細胞生存率を著しく下げると予想されてきた<sup>11)</sup>。しかし、最近、AdoDatoや AdoDatadが合成され、それらを培養細胞に投与した結果、スペルミジンあるいはスペルミンが対照の10%程度まで減少しても、その分スペルミンあるいはスペルミジン量が増加すれば、細胞の増殖速度には影響が出ないことが明らかになっている<sup>11,14)</sup>。そして、Peggはこの結果を基に、スペルミジンとスペルミンは共通の機能を持っており、どちらも細胞増殖を補助できるとする仮説を提案している<sup>12)</sup>。本研究では、ポリアミンの減少をスペルミジンでは対照の2%、あるいはスペルミンを対照の1%以下までにした場合でも、増殖速度に影響が出ないことを明らかにした。本研究の結果はHTC細胞内に存在する大部分のポリアミンの機能に関しては、Peggの仮説を支持するものであり、ポリアミンのうちスペルミジンとスペルミンは相補的に機能することがわかった。この結果はまた、細胞増殖においてそれぞれのポリアミンに特異的な働きがあるならば、通常の2%程度のスペルミジンが機能する作用部位が存在する可能性を示した。

しかし、その可能性を確かめるためにこの微量のスペルミジンをさ

らに減少させると、スペルミンも減少し細胞の増殖にも影響がおよんでしまうため、スペルミジン合成酵素阻害剤の利用だけでは限界があり、細胞増殖におけるスペルミジンの役割を調べるためには新たな方法論の導入が必要となった。

## 第2章 ポリアミンアナログの利用

ポリアミンのアナログは、ポリアミンの関与が予測される核酸の転写や翻訳などにおいて、スペルミジンやスペルミンと比較するために、専ら試験管内実験で利用されてきた<sup>21)</sup>。本章では、培養細胞実験でポリアミンとそのアナログを比較することにより、細胞の増殖においてポリアミンが特異的な作用を持っているのかどうかを調べることを目的とした。

一般的に、*in vitro* の実験系でポリアミンが種々の反応におよぼす影響は、プトレシン、スペルミジン、スペルミンの順に強くなり、また、ポリアミンのアナログも塩基性が強くなるほど、その作用も強くなる傾向を示し、ポリアミン構造の違いによる影響はほとんど見られないのが普通である<sup>22, 23)</sup>。そのようなアナログの効果を培養細胞で調べた例は少なく、DFMOや AbeAdo でポリアミン合成を阻害した L1210 細胞を用い、ポリアミンアナログを培地に添加して細胞内に取り込ませ、ポリアミンとアナログの効果を比較したものが報告されているだけである<sup>24, 25)</sup>。Porter らによる DFMO を用いた例では、メチレン鎖の異なる種々の鎖状ジアミンやトリアミン、例えば aminopropylcadaverine を DFMO と同時に L1210 細胞に投与すると増殖速度は低下し、増殖の回復は培地に添加したスペルミジンが細胞内に取り込まれて生じるスペルミン量との間に相関が見られたことから、細胞増殖におけるスペルミンの重要性を指摘した<sup>24)</sup>。一方、Pegg らによる AbeAdo を用いた例では、AbeAdo で 16 日間 L1210 細胞を処理すると、プトレシンが蓄積しスペルミジンとスペルミンが著しく減少して増殖は停止した。そのような細胞にポリアミンを添加すると、ポリアミンの取り込み系が活性化されているために、ポリアミンは速やかに細胞内に取り込まれ、

スペルミンよりはスペルミジンの方が速やかに増殖を回復した。また、スペルミジンアナログの 1-methylspermdine ではわずかに増殖を回復させる程度であった<sup>25)</sup>。

本研究は、ODC 阻害剤の AOAP (1-aminooxy-3-aminopropane) を HTC 細胞に投与して増殖を停止させ、それに種々のスペルミジンアナログを投与して増殖の回復を指標にしながら細胞増殖におけるスペルミジンの役割を調べていこうとするものである。HTC細胞に AOAP を適用する実験系はこれまでに報告がなく、先ず AOAP を使用するための条件検討からはじめた。

### 第 1 節 ポリアミン欠乏細胞の調整

ポリアミン欠乏細胞を調整するため、DFMO は最も広く用いられている ODC 阻害剤であるが、培養細胞では通常 5mM の高濃度が必要とされている。一方、近年開発された AOAP は、より低い濃度でも DFMO と同様の効果が得られることが報告されている<sup>26)</sup>。本研究では、ODC 阻害剤とポリアミンアナログとを併用するため、薬物の副作用をできるだけ減らすことを考慮して、低い濃度でも ODC を阻害することのできる AOAP を実験に用いることにした。

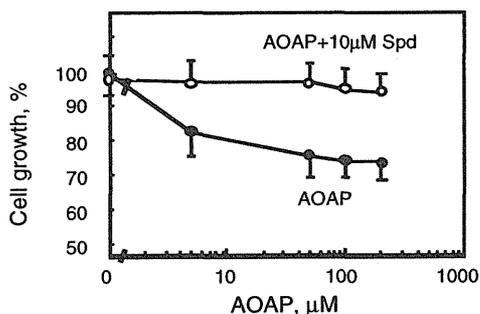


Fig. 8 Inhibition of growth of HTC cells treated with AOAP for 2 days and its recovery with spermidine

浮遊培養で48時間毎に継代し、対数増殖しているHTC細胞を用い、AOAPを投与して48時間後の細胞数を比較した(Fig. 8). その結果、5  $\mu$ Mでも増殖の抑制は観察されたが、50  $\mu$ M以上の濃度でその抑制効果はほぼ一定であった。また、各濃度のAOAPと10  $\mu$ Mのスペルミジンを用いたとき、AOAP 50  $\mu$ Mまでは対照とほとんど変わりなく細胞は増殖したことから、以後の実験にAOAPは50  $\mu$ Mを使用することにした。アナログの効果を長期的に調べるために、浮遊培養で48時間毎に継代して維持した細胞を実験に使用した。Fig. 9に示すように、50  $\mu$ M AOAPにより細胞の増殖は48時間でほとんど止まり、96時間で

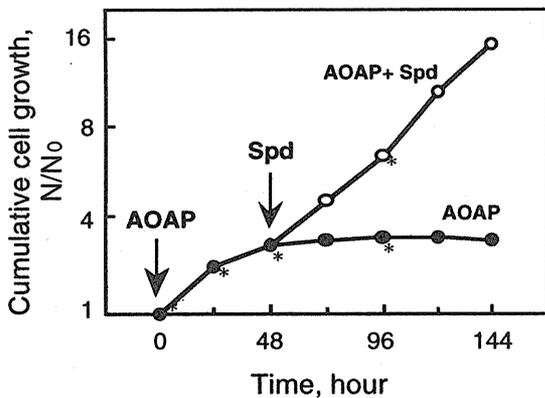


Fig. 9 Long-term effect of AOAP on growth of HTC cells and growth recovery of arrested cells with spermidine

Table 4 Effects of AOAP on polyamine contents in HTC cells

Treatment	Time (hr)	Put	Spd	Spm	Total
		nmol/10 <sup>6</sup> cells			
Control	0	0.5	4.0	4.0	8.5
AOAP	24	< 0.1	0.1	4.0	4.1
AOAP	48	< 0.1	< 0.1	3.1	3.1
AOAP	96	< 0.1	< 0.1	2.8	2.8
AOAP+Spd	(48)	< 0.1	6.3	2.2	8.5

Polyamine contents were measured at the asteriske points in Fig. 9.

完全に停止した。AOAP処理 48時間目の継代のときに、AOAPとともに  $10\mu\text{M}$  のスペルミジンを含む培地で培養すると、細胞の増殖は通常の対数増殖速度と変わらないまでに増殖は回復した。また、その時のポリアミン量を調べると AOAPの処理時間が増す毎にプトレシンとスペルミジンの著しい減少とスペルミン量の緩やかな減少が見られ、48時間目にスペルミジンを添加したことにより細胞が培地中のポリアミンを取り込んで生育していることがわかった (Table 4)。このことから AOAPによる増殖の抑制は薬物の毒性によるものではなく、ポリアミン量の減少が原因であり、ポリアミン欠乏細胞の増殖はポリアミンの添加により可逆的に回復できるものであることがわかった。

## 第2節 ポリアミン欠乏細胞へのポリアミンアナログの効果

ポリアミン欠乏細胞へアナログを投与して細胞の増殖を調べる実験はこれまでも別の実験系で行われてきたことは先に述べたとおりである。しかしながらそれらの実験は比較的短期間であったり、用いられたアナログも鎖状のものに限られていたために、アナログの構造の違いによる細胞増殖への影響はあまりみられなかった。そこで本研究では、ポリアミンアナログが細胞の増殖に与える影響をよりはっきり区別できないかと考え、分子内の自由度を制限したアナログやアミノ基をアルキル化したアナログなどを用い、比較的長期間調べた。

実験に用いた化合物を Fig. 10 に示す。スペルミジンとは炭素鎖数が異なるアナログとして norspermidine (NSpd), homospermidine (HSpd), N-3-aminopropylcadaverine (APCad) や、窒素原子をアルキル化した N-4-methylspermidine (N4MSpd), N-8-methylspermidine (N8MSpd), tris-(3-aminopropyl)amine (TAP), あるいはピペリジン骨格を持つ 1-(3-

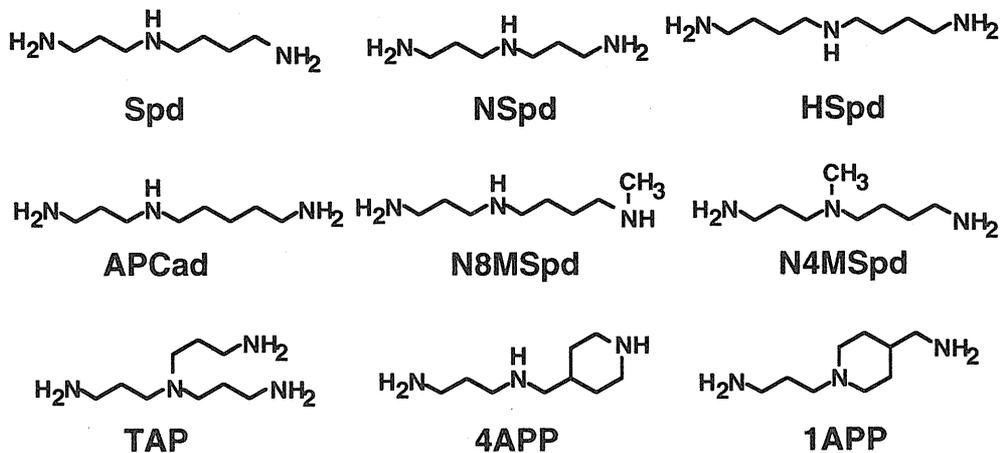


Fig. 10 Spermidine analogs

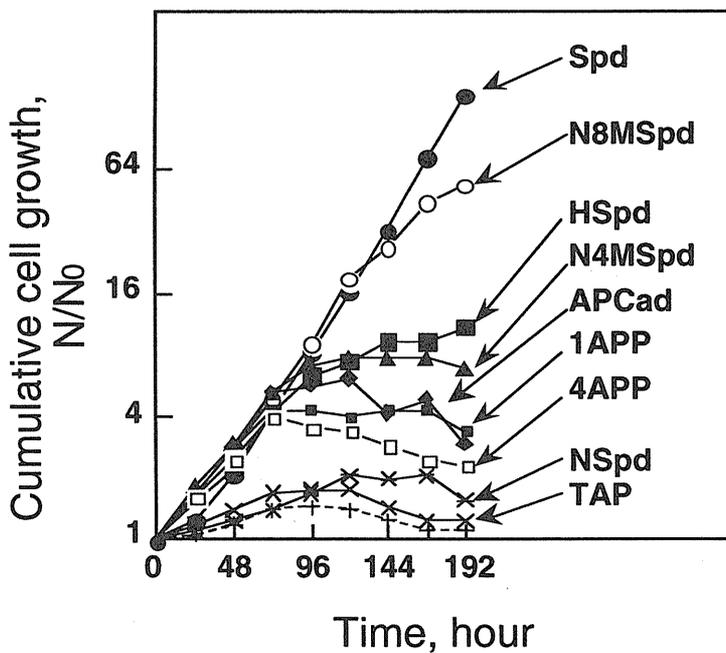


Fig. 11 Effect of spermidine and its analogs on AOAP-arrested HTC cells

aminopropyl)-4-aminomethylpiperidine (1APP), 4-[N-(3-aminopropyl)-aminomethyl]piperidine (4APP) を用い、各  $10 \mu\text{M}$  を Fig. 9 のスベルミジンの代わりに培地に添加し、48時間毎に薬物を含む新しい培地と交換しながら192時間まで細胞の増殖を調べた。その結果、Fig. 11 に示すように、スベルミジンは通常対数増殖速度と変わらないまでに増殖を回復させたのに対し、アナログではどれも長期的には完全に回復させることはできず、HSpd, N4MSpd, APCad, 1APP, 4APPはその構造の違いによらずどれも72時間まで増殖を一時的に回復させ、N8MSpdは168時間まで増殖を回復させ、いずれもその後増殖は停止した。一方、NSpdとTAPには増殖の回復は見られず、破線で示すAOAPのみを処理した細胞の増殖曲線とほとんど変わらなかった。細胞に取り込まれたアナログの量を調べてみると、どれも  $6\text{-}16\text{nmol}/10^6 \text{ cell}$  (N8MSpd, 14.1; N4MSpd, 8.6; HSpd, 10.4; 1APP, 13.9; APCad, 5.6; 4APP, 14.6; NSpd, 17.4) であったのに対して、増殖の回復が見られなかったTAPは細胞内に取り込まれていないことがわかった。

アナログの添加により72時間まで一時的に増殖が回復した現象から、細胞の増殖におけるポリアミンの役割の一つとして、必ずしもポリアミンでなくても構わない、アナログでも代用できる特異性の低い作用部位があると思われた。また、72時間までの一時的な増殖回復の後、5種類のアナログでおおよそ同じ時期に増殖が再停止したことから、その原因は加えられたアナログの種類によるものではなく、細胞の増殖に関与する内在性の因子が供給されないままに細胞分裂によってある閾値以下にまで減少した結果ではないかと考えられた。この増殖再停止も培地にスベルミジンを添加することにより再び回復したことから、アナログでは代用できないポリアミン構造に特異性の高い作用の存在が強く示唆された。

### 第3節 スペルミン欠乏細胞へのポリアミンアナログの効果

細胞内ではスペルミジンとスペルミンは互いに変換が可能のため (Fig. 2), 上記再停止した細胞へのスペルミジン添加による増殖の回復が本当にスペルミジンの機能によるのかすぐには断言できない。そこで、本節ではどちらのポリアミンが増殖に必須であるのかを調べるために、第1章で用いたスペルミン合成酵素阻害剤 APCHA を利用した。すなわち、細胞の増殖に影響しないように  $250\mu\text{M}$  の APCHA を5日間投与してスペルミン量を検出限界以下に減らし、代わりにスペルミジンが蓄積した細胞を用いて (Table 5), APCHA 存在下 AOAP 処理して増殖停止した細胞へのアナログの添加実験を行った。アナログとしては HPLC での分離や検出感度の良い 1APP を選び使用した。

Fig. 12 に増殖曲線を示すように、APCHA の前処理なしでは72時間で増殖は停止したのに対して (Fig. 12A), APCHA で前処理した細胞では72時間目以降も増殖は続いた (Fig. 12B)。増殖速度に違いが見られた96時間目のポリアミン量を比較すると、増殖の停止した APCHA 処

Table 5 Polyamine content of APCHA-treated HTC cells

Treatment	Put	Spd	Spm	Total
	(nmol/ $10^6$ cells)			
control	0.5	4.0	4.0	8.5
$250\mu\text{M}$ APCHA 5 days	< 0.1	10.0	< 0.1	10.0

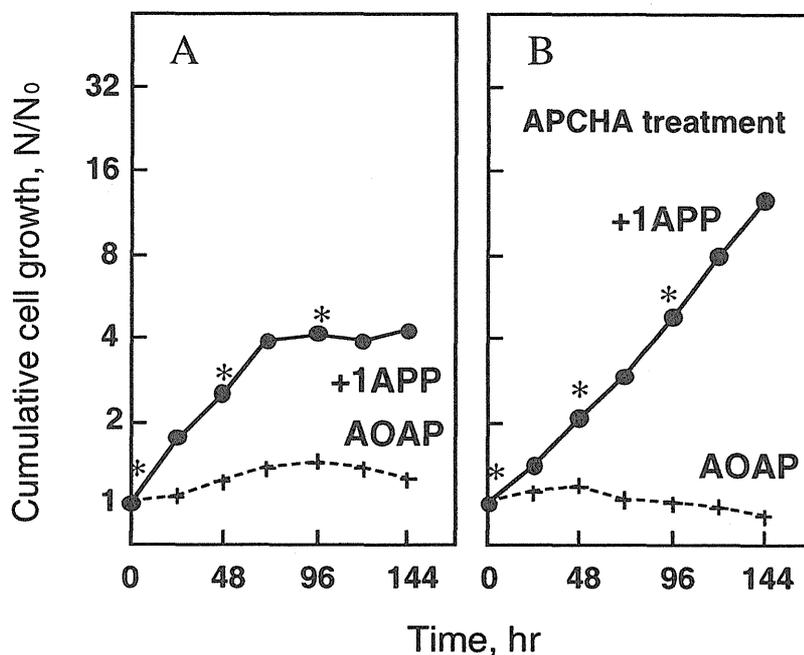


Fig. 12 Effect of treatment of APCHA on cell growth of AOAP-arrested HTC cells with 1APP

Table 6 Polyamine contents after the addition of 1APP

Treatment	Time (hr)	Put	Spd	Spm	1APP
		(nmol/10 <sup>6</sup> cells)			
1APP	0	< 0.1	< 0.1	3.7	0.0
	48	< 0.1	< 0.1	1.0	16.8
	96	< 0.1	< 0.1	0.5	20.0
1APP +APCHA	0	< 0.1	4.3	< 0.1	0.0
	48	< 0.1	1.1	< 0.1	18.8
	96	< 0.1	0.5	< 0.1	21.0

Polyamine contents were measured at the asterisked points in Fig. 12.

理をしていない細胞ではスペルミンが $0.5 \text{ nmol}/10^6 \text{ cell}$ であるのに対して、増殖を続けている APCHA 処理細胞ではスペルミジンが  $0.5 \text{ nmol}/10^6 \text{ cells}$  と同量残っており、このとき取り込まれたアナログの量はほとんど同じであった (Table 6). これらのことからアナログ添加による増殖の再停止は、スペルミンではなくスペルミジンの欠乏によることが強く示唆された。

## 小括と考察

本章においては、AOAPで増殖停止した HTC細胞に、スペルミジンあるいはそのアナログを投与して増殖の回復を調べる実験系を用い、細胞増殖におけるポリアミンの作用にはアナログでも代用できる特異性の低い作用と、アナログでは代用できないスペルミジンに特異性の高い作用があることを示した。

HTC細胞の増殖を全く補助しなかった TAPは、比較的特異性が低いとされているポリアミン取り込み系の基質にはならず、細胞には取り込まれていなかった。一方、NSpdは  $17.4 \text{ nmol}/10^6 \text{ cell}$  取り込まれていたにも関わらず細胞の増殖を補助しなかった。これまでの報告で、ガン細胞を移植したマウスに NSpdを投与したとき NSpdがガン細胞の増殖を強く抑制すること<sup>27)</sup>、また、培地にポリアミンを添加しないと増殖できない酵母を用いた研究では、実験に用いた多くのアナログが増殖を補助したのに対して、NSpdは補助しなかったことが報告されている<sup>28)</sup>。このような NSpdに特異的な細胞の増殖抑制作用は、ポリアミンの機能探索のみならず、細胞増殖抑制剤を開発する対象としても興味深い。また、N8MSpdが他のアナログよりも長期間増殖を回復させ

ることのできた理由として、他のアナログよりもスペルミジンの機能をより多く代用することができたこと、また8位のアミノ基に付くメチル基が代謝されてスペルミジンが生成したことなどが考えられるが、詳細については調べていない。

本研究において最も注目すべき現象は、多くのアナログが一時的に細胞の増殖を回復させることができたことである。この現象は、AOAPを DFMOに変えても、また、HTC細胞をマウス白血病由来 L1210細胞に変えても同様に観察されたことから、哺乳動物細胞に共通した現象であることが考えられた。これまでにアナログなどを用いて調べられてきた *in vitro* 実験から、核酸の転写や翻訳などへのポリアミンの影響が、ポリアミン構造には余り関係なく特異性の低いものであったことを考えあわせると、本研究においてアナログ添加により短期間細胞の増殖が回復する間、アナログがその様な特異性の低い作用を補い、細胞内に残っていた少量のポリアミンが特異性の高い作用を担っていたものとも考えられる。引き続いておこる増殖の再停止の原因は、細胞分裂によって細胞内の少量のポリアミンがさらに減少したために特異性の高い作用が機能できなくなったことが考えられる。特異性の高い作用を担っているポリアミンが APCHAを用いた実験からスペルミンではないことが示され、本章においても細胞増殖におけるスペルミジンの必要性が強く示唆された。

Table 7 には、細胞増殖においてポリアミンの関与が予測され、*in vitro* 実験でその効果が報告されている作用をまとめてみた。そのほとんどの作用において、スペルミジンとスペルミンは同等かもしくはスペルミンの方が強い作用を示すが、スペルミンでは機能できずスペルミジンのみが機能できる唯一の作用として、翻訳後修飾による eIF-5A 蛋白に含まれるハイプシンの生成がある。われわれはスペルミジンの

特異的作用点としてこのハイプシンに注目し、ハイプシンと細胞増殖との関連性を次に調べた。

Table 7 細胞増殖において関与が予想されるポリアミンの作用

作用	スペルミジン	スペルミン
核酸の安定化・機能発現		
クロマチン濃縮	○	◎
B-Z変換	○	◎
tRNAの安定化	○	◎
DNAの複製		
トポイソメラーゼの活性化や阻害	○	○
蛋白合成		
翻訳の促進	○	◎
誤訳の防止	○	◎
翻訳後修飾		
eIF-5Aのハイプシン化	◎	×
トランスグルタミナーゼによる架橋	○	○

### 第3章 ハイプシンの高感度測定法の開発と応用

ハイプシン [ $N^{\epsilon}$ -(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine] はリジンの  $\epsilon$ -アミノ基にアミノブチル基が結合した塩基性アミノ酸であり、真核生物にのみ存在する。当初、ハイプシンは牛の脳のトリクロロ酢酸抽出液から遊離アミノ酸として見いだされその構造が決定された<sup>29)</sup>。その後、蛋白質中の構成アミノ酸として存在していることがわかり、哺乳動物細胞には普遍的に存在することが明らかとなった<sup>30)</sup>。とりわけ細胞の増殖が盛んな組織に多く存在し、このハイプシン含有蛋白質が、蛋白質の合成開始因子 eIF-5A (以前は eIF-4D) であることが 1984年 Parkらの研究により明らかにされた<sup>31)</sup>。現在までのところハイプシンを含有する蛋白質は eIF-5A だけであり、その半減期は長く、通常 24時間以上あることなどが報告されている<sup>30, 32)</sup>。

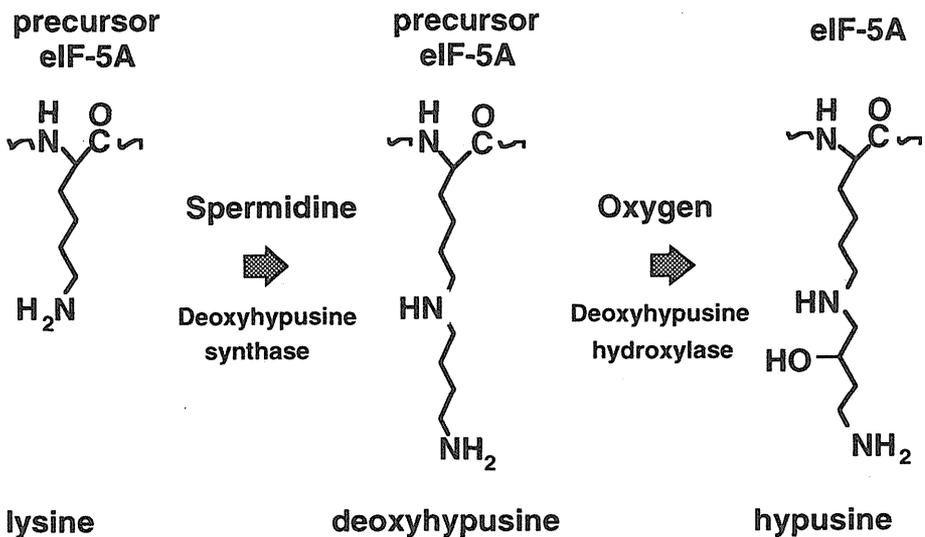


Fig. 13 Biosynthesis of hypusine

ハイプシン残基は eIF-5A前駆体蛋白の2段階からなる翻訳後修飾により生合成される<sup>33, 34)</sup> (Fig. 13). 1段階目は, eIF-5A前駆体蛋白の50番目のリジン側鎖のアミノ基にスペルミジンのアミノブチル基が転移して, デオキシハイプシン [ $N^{\epsilon}$ -(4-aminobutyl)lysine] ができる. 2段階目は, このアミノブチル基のC2位が水酸化を受けてハイプシンになる. ハイプシン生合成の最初の反応に関わるデオキシハイプシン合成酵素はスペルミジンに対して基質特異性, 親和性ともに高く, 通常の細胞内スペルミジン濃度で速やかにデオキシハイプシンを含む eIF-5A前駆体を生成する. さらに, この前駆体はデオキシハイプシンヒドロキシラーゼにより速やかに水酸化を受け eIF-5Aになるため, eIF-5Aの前駆体はほとんど検出されないことが報告されている<sup>35)</sup>. この eIF-5A前駆体蛋白のハイプシン化は, *in vitro*での蛋白合成反応においては必須と考えられているが, *in vivo*での反応において必須であるかどうかは不明である.

本章では, 生体試料中のハイプシンとデオキシハイプシンの高感度測定法をまず確立し, その方法を HTC細胞中のハイプシン測定に応用し, ハイプシン量と細胞増殖との関係を調べた.

## 第1節 ハイプシンの高感度測定法の開発

生体試料中のハイプシン量は, ラットの臓器を例にすると, 1mg蛋白あたり数十pmolであるために<sup>36, 37)</sup>, その測定には通常多量の試料が必要である. 培養細胞のように多量の試料が得られない場合, できるだけ高感度なハイプシン測定法が必要であった.

これまでの微量ハイプシンの測定は, 放射標識スペルミジンを用いて標識されたハイプシン含有蛋白を測定するものが大部分で, 細胞中

に含まれる非標識体も含めた全ハイプシン量を測定しているものではない<sup>38-40)</sup>。全ハイプシンを定量するためには蛋白試料を先ず加水分解する必要があり、その結果生じる多量のアミノ酸などがHPLCでの分析をさまたげるために、ハイプシンの測定には精密分析に先立ち必ず前処理を行わなければならない。これまでに報告されているハイプシンの分析方法は、蛋白の加水分解試料をまずイオン交換カラムで前処理し、ハイプシンの溶出分画を集めHPLCで分析するものである<sup>41-45)</sup>。HPLCもそのほとんどがイオン交換カラムを用いたもので、分離や検出感度が充分ではなかった。また、最近開発された *o*-phthalaldehyde (OPA) プレラベル標識による逆相 HPLC を用いた方法は、5pmol まで検出が可能であったが、OPA との蛍光生成物が非常に不安定なことから測定値の信頼性に問題が残っている<sup>45)</sup>。

本節ではそのようなハイプシンを測定するため、加水分解前に構造類似の内部標準物質を添加することを念頭に置き、前処理法と HPLC 条件を種々検討し、検出感度と再現性の向上を目指した。

### (1) 前処理および HPLC 条件の検討

微量生体成分の分離分析において、内部標準物質の利用は有用であるが、ハイプシンの分析に内部標準物質を用いた例はこれまでにない。種々条件検討を重ねた結果、内部標準物質を添加して加水分解した蛋白試料をカルボキシメチルセルロース(CMC)陽イオン交換カラムで前処理し、逆相イオン対 HPLC とポストカラムラベル OPA 蛍光検出することにより、高感度で選択的な分析法を開発した(Fig. 14)<sup>7)</sup>。

本研究では、前処理の間中ハイプシンやデオキシハイプシンとともに挙動し、HPLC 上ハイプシンやデオキシハイプシン、あるいは夾雑

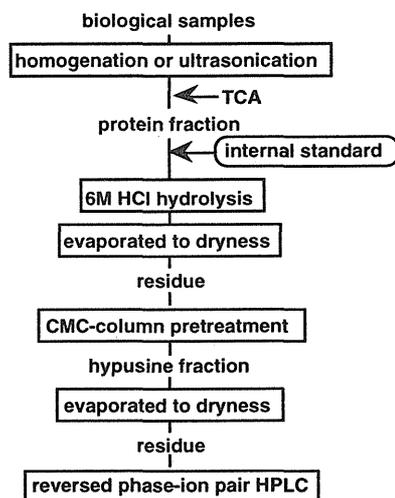


Fig. 14 Outline of the method

ピークに重ならないような内部標準物質として、デオキシハイプシンに構造類似の  $N^{\delta}$ -aminobutylornithine,  $N^{\epsilon}$ -aminopentyllysine を化学合成し検討した。内部標準物質は、試料を超音波粉碎あるいはホモジネートして得られた粗抽出液を 10% トリクロル酢酸で処理し、沈殿した蛋白分画を同試液で十分に洗浄した後に加えた。蛋白の加水分解は常法に従い、生成する多量のアミノ酸や夾雑物の除去には CMC カラムを用いた。溶離液には揮発性のピリジン-酢酸緩衝液 (pH5.0) を用い、この緩衝液の濃度を変えて段階溶離し、ハイプシン、デオキシハイプシンおよび内部標準物質を含むジアミン分画を集めた。これまでに報告されている前処理法では、ポリスチレンあるいはアクリル系担体の陽イオン交換カラムが用いられており、担体への非特異的な吸着のために疎水性の成分が除きにくいことや、微量な試料では特に回収率の減少が問題であった。親水性基材である CMC カラムを用いることにより、加水分解で生じる多くのアミノ酸や疎水性の夾雑物を効果的に除去することができ、また回収率も向上した。逆

相イオン対 HPLCでは、pH2.0 の移動相を用いることにより、ハイプシン類をトリアミン分画に溶出させ、前処理で除去できなかった夾雑物をさらに分離するのに効果的であった。また、イオン対試薬としてアルキル鎖の短いヘキサンスルホン酸は分離度の向上に効果的であった。HPLCの検出には OPA によるポストカラム蛍光標識法が、感度、精度、選択性の点からも良好であった。この分析法を用いることにより、生体試料中のハイプシン 1pmol を S/N が 3 で検出することができた。Fig. 15 にはハイプシンなどの標準品の HPLCクロマトグラムを例示し、Table 8 には、この HPLC条件でハイプシンの測定を妨害する可能性がある塩基性アミノ酸の保持時間を参考のために示す。以上の検討結果に基づき、内部標準物質には、実際の試料を測定したときに夾雑物とピークが重なる心配のない  $N^{\epsilon}$ -aminopentyllysine を選択した。

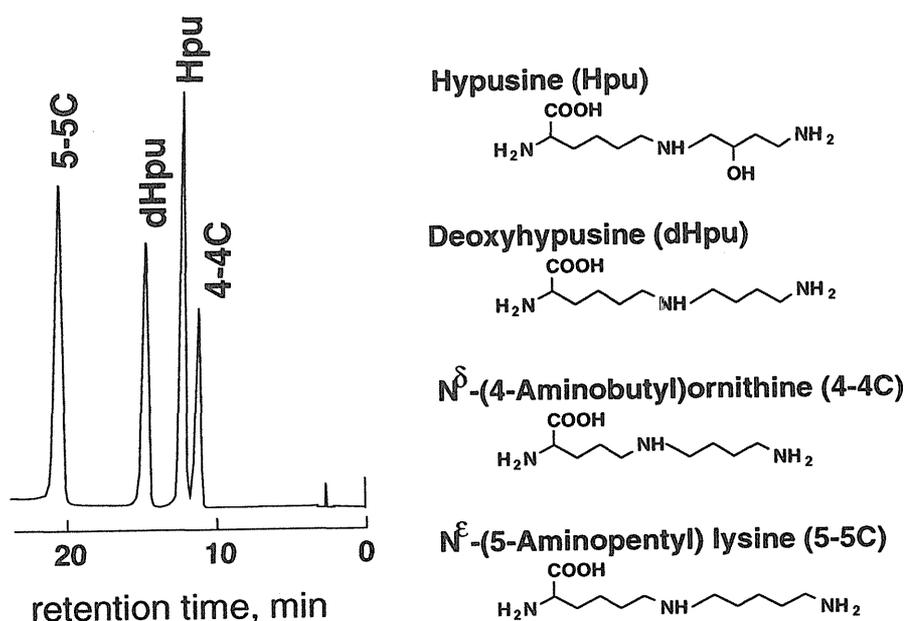


Fig. 15 HPLC and selection of internal standard

Table 8 Retention properties of di and polyamines, basic aminoacids and their derivatives in the HPLC

Compound	Retentin time (min)	Compound	Retentin time (min)
L-Ornithine	4.6	1,6-Diaminohexane	12.4
L-Lysine	5.4	Hypusine	14.4
L-Histidine	5.6	N <sup>G</sup> -Methyl- L-Arginine	15.5
Putrescine	6.2	Deoxyhypusine	17.2
N <sup>ε</sup> -Methyl- L-Lysine	6.4	N <sup>G</sup> N <sup>G</sup> -Dimethyl- L-Arginine	18.6
Cadaverine	7.3	L-Homoarginine	19.9
3-Methyl-histamine	7.7	Norspermidine	21.0
Histamine	8.3	Spermidine	21.1
1-Methyl-histamine	9.4	N <sup>ε</sup> -Aminopentyllysine (5-5C)	24.2
L-Arginine	11.0	1,7-Diaminoheptane	31.2

## (2) 測定値の信頼性

HPLCの検出限界は 1pmolであり，前処理カラムからの絶対回収率も70%以上あることから，ハイプシンが数十pmolしか含まれない試料からでもこの方法により測定が可能となった．実際の細胞試料を測定したときのクロマトグラムを Fig. 16A に示す．矢印で示すハイプシンの溶出時間にピークが認められたが，このピークの成分がハイプシンだけに由来するものかを調べる必要がある．そこで，ハイプシンのアミノエタノール構造を利用して，過ヨウ素酸による酸化的分解を検討したところ，Fig. 16B に示すように完全にそのピークが消失した．したがって矢印で示したピークの成分はハイプシンに由来していると思われる．

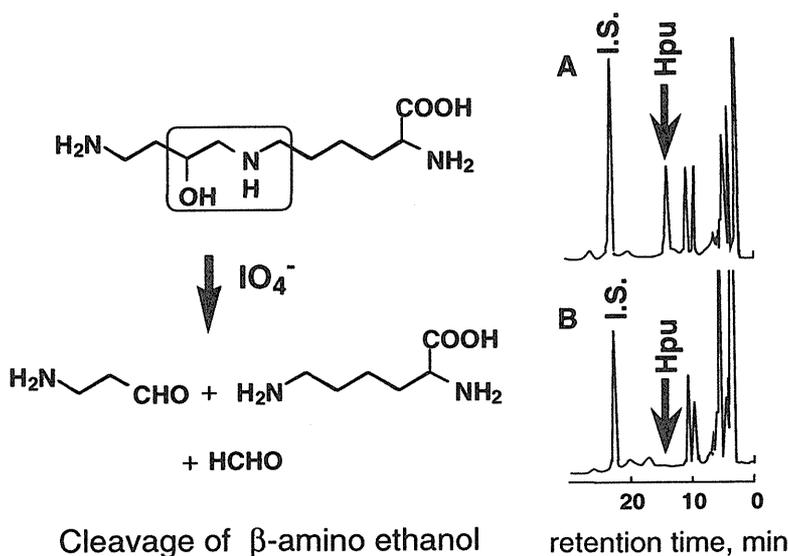


Fig. 16 Evidence of hypusine

つぎに、この分析法の精度を調べるため、HTC細胞の蛋白 1mgにハイプシンとデオキシハイプシンを 0-400pmol, および内部標準物質を 500pmolずつ加え、定量法に従い検討した(Fig. 17). 添加した標準品の量とハイプシン量およびデオキシハイプシン量に対する内部標準物質の比は調べた範囲内で良好な直線性を示し、相関係数はハイプシンが0.999, デオキシハイプシンが0.998, c.v.値は7.6%と良好であった.

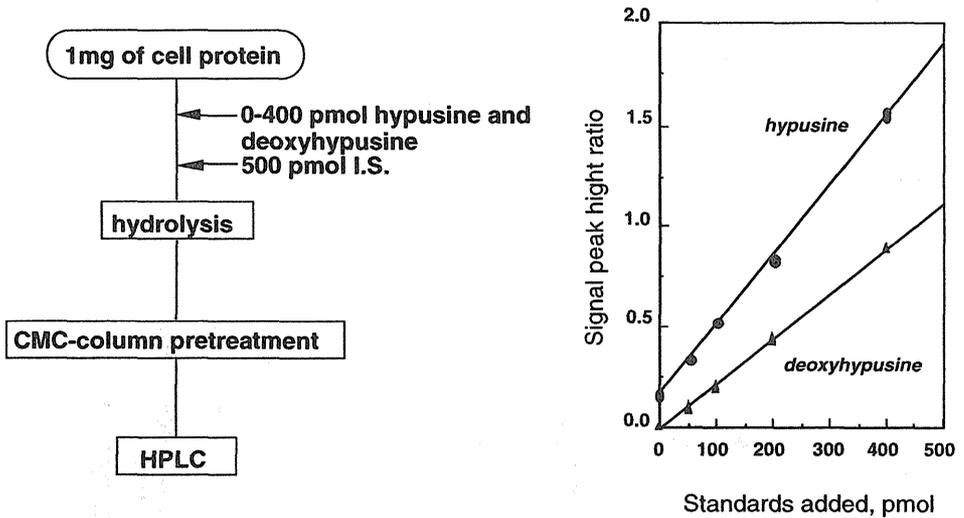


Fig. 17 Accuracy of the method

以上の結果から、本法により数 mgの微量蛋白試料からでもハイプシンとデオキシハイプシンを測定できることが示された。なお、本法を用いてラットの各臓器におけるハイプシン量を測定した結果を Table 9 にまとめた。得られた値はこれまでに報告された値<sup>36,37)</sup>とくらべ、脳を除き大きな矛盾はなかった。

Table 9 Hypusine contents in rat organs

Tissue	This work (pmol/mg)	Sano et al. <sup>36)</sup> (nmol/g)	Folk et al. <sup>37)</sup> (pmol/mg)
Brain	33.8 ± 4.3 *	8.0	10.5
Kidney	19.7 ± 1.9	15.6	12.9
Liver	21.8 ± 1.6	16.0	13.8
Lung	23.6 ± 1.5	11.7	13.5
Spleen	24.9 ± 1.4	20.7	25.5
Testis	34.7 ± 3.3	39.9	67.2

\*Average ± S.D. for 5 determinations

## 第2節 ハイプシンの高感度測定法の応用

培養細胞中のハイプシン量は、これまで高感度測定法がなかったためにほとんど調べられていなかった。本節では開発した方法を種々の薬物を投与した HTC細胞に適用し、細胞中のハイプシン量の変動を調べた。

### (1) 薬物処理細胞への応用

AOAPおよびデオキシハイプシンヒドロキシラーゼ阻害剤であるミモシンを添加して得られた実際のクロマトグラムを Fig. 18 に示し、他の薬物処理も含めてハイプシンとデオキシハイプシンの測定結果を Table 10 にまとめた。Fig. 18 中、controlの細胞ではこれまでに報告されてきた知見と同様に、ハイプシンのみが検出されデオキシハイプシンは検出されず、AOAP投与細胞ではハイプシン量の減少がみられた。

Table 10 Hypusine and deoxyhypusine contents in HTC cells treated with drugs

Treatment	Time (hr)	Hypusine (pmol/mg of protein) (%)	Deoxyhypusine (pmol/mg of protein)
Control	0	46.0 ± 2.9	100
	24	53.5 ± 2.2	116
	48	43.3 ± 4.0	94
50 μM AOAP	48	21.6 ± 2.5	47
100 μM L-Mimosine	48	23.9 ± 3.1	52
100 μM α-Bipyridyl	48	15.6 ± 1.5	34
100 μM 1,3-Diaminopropane	48	50.7 ± 1.4	110
100 μM 1,6-Diaminohexane	48	26.7 ± 2.1	58
100 μM 1,7-Diaminoheptane	48	18.6 ± 2.9	40
100 μM 1,8-Diaminooctane	48	41.1 ± 2.2	89

また、ミモシン投与細胞ではデオキシハイプシンの蓄積が観察され、ハイプシン量が減少することが認められ、同様にデオキシハイプシンヒドロキシラーゼ阻害剤である  $\alpha$ -ビピリジル投与でも予想通りの結果が得られた (Table 10). また、*in vitro* でデオキシハイプシン合成酵素を阻害することが報告されている<sup>46,47)</sup>種々のジアミン類を投与すると、1,3-ジアミノプロパンではハイプシン量の減少が見られなかったのに対して、1,7-ジアミノヘプタンは培養細胞においてもデオキシハイプシンの合成を阻害することが初めてわかった。

そこで、1,7-ジアミノヘプタンの効果をさらに確かめるために、浮遊培養で8日間処理すると、Fig. 19 に示すように、 $10\ \mu\text{M}$  の濃度では緩やかな増殖速度の低下とハイプシン量の減少が見られ、 $100\ \mu\text{M}$  の

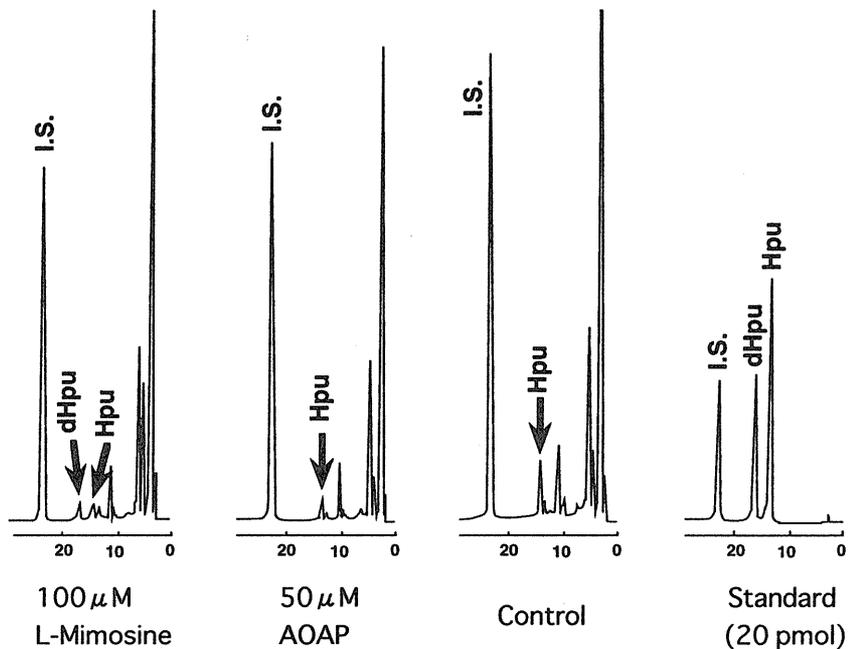


Fig. 18 Chromatograms of hypusine and deoxyhypusine in HTC cells

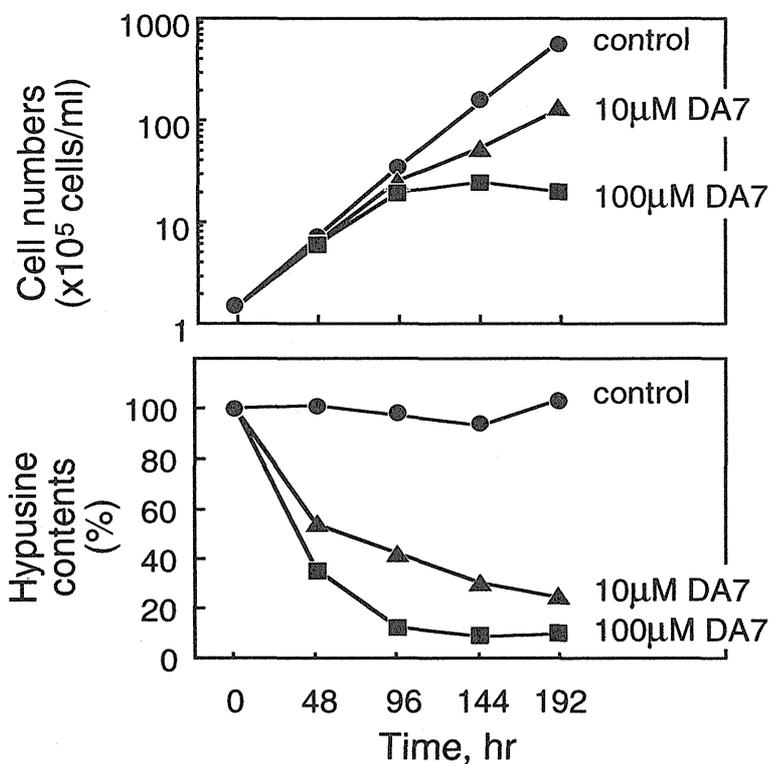


Fig. 19 Effect of 1,7-diaminoheptane on cell growth and hypusine content on HTC cells

処理では増殖は96時間目で停止し、この時までハイプシン量は急激に減少し続け、96時間目以降は変化せず対照の約10%を保った。この時の増殖停止の原因がハイプシン量の減少によるとは断言できないが、ハイプシン量を直接測定することにより初めて細胞の増殖にハイプシンが関与する可能性を示した。

## (2) アナログ添加実験への応用

つぎに、本法を第2章で行ったアナログ添加実験に応用した。すな

わち、AOAP処理して増殖停止した細胞にスペルミジンアナログの1APPを添加して一時的な増殖の回復がみられた後、再停止する現象にeIF-5Aが関与しているのかどうかを調べた。

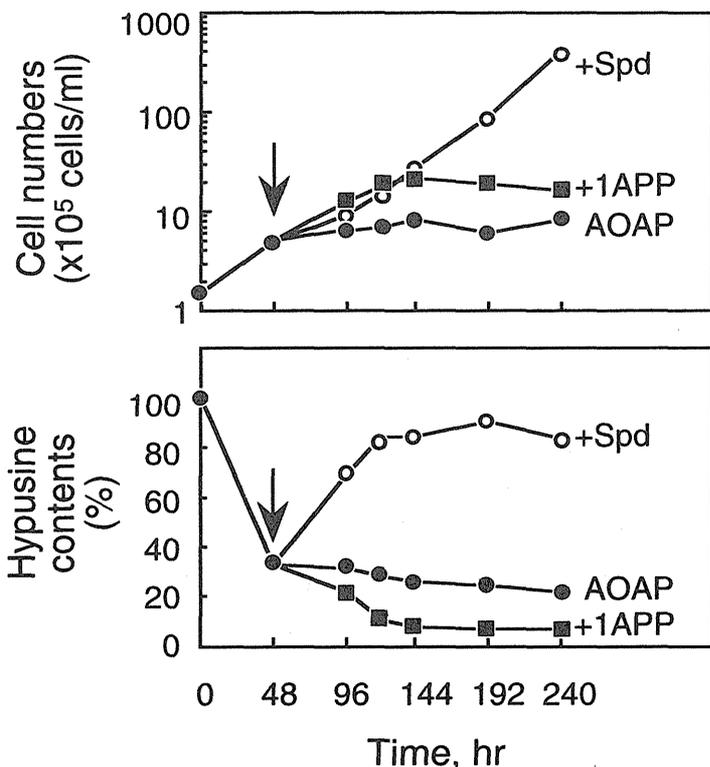


Fig. 20 Cell growth and hypusine contents of HTC cells cultured in the presence of drugs

Fig. 20 にみられるように、AOAPの処理でスペルミジン量が減少しながら細胞が増殖・分裂を続ける48時間目まで、蛋白量あたりのハイプシン量は減少しつづけ、48時間目以降、増殖が停止するとハイプシン量の大きな変化はなかった。また、48時間目にスペルミジンを加えると細胞の増殖回復と共にハイプシン量も回復していることがわかった。一方、1APPを添加したとき、一次的に増殖が回復する48から

120時間目の約3回細胞分裂を繰り返す間、ハイプシン量はさらに減少をつづけ、120時間目以降、再び増殖が停止してからはハイプシン量は対照の約10%を保った。ポリアミンアナログ投与による細胞増殖の再停止の原因が、直接ハイプシンの減少だけによるものかどうかはわからないが、ハイプシン量の減少が増殖の停止を引き起こした可能性が強く示唆された。

## 小括と考察

eIF-5Aは真核細胞生物に広く存在し、さらにそのアミノ酸配列は種を問わず良く保存されていることから、生命維持に働く基本的な蛋白であろうと思われる。eIF-5Aの細胞増殖への関与は、これまで専ら酵母を用いて研究されてきており、eIF-5A前駆体蛋白のハイプシン化を受ける50番目のリジンをアルギニンに変えた遺伝子を持つ変異株は、増殖も生存もできずハイプシン化の重要性が示されてきた<sup>48)</sup>。また、eIF-5A前駆体蛋白の遺伝子発現を抑えると数回の分裂の後に増殖は停止する<sup>49)</sup>。この増殖停止の原因は細胞内のeIF-5Aが細胞分裂により希釈され、増殖に必要な最低限の量以下まで減少してしまうからではないかと考えられる。その増殖停止までの分裂回数はおよそ3-4回であり、eIF-5Aが新たに合成も分解も起こらないとすると酵母の増殖に必要なeIF-5Aの量は6-13% ( $1/2^4$ - $1/2^3$ )ではないかと考えられる。

本章ではハイプシンの高感度測定法を開発し、哺乳動物細胞の増殖にeIF-5Aが関与する可能性を初めて示すことができた。HTC細胞に1,7-ジアミノヘプタンを長期間投与して増殖を止めたとき、あるいはAOAPと1APPの処理で一時的な増殖回復後の再停止のとき、どちらもハイプシン量は対象の約10%まで減少していたことから、上記、酵母

の推定値とも合致し、この量が増殖に必要な eIF-5A の閾値である可能性がある。しかし、いずれの場合においても細胞内スペルミジン量は減少していたために、eIF-5A 以外のスペルミジンに特異的な他の因子の関与もあるかもしれない。したがって、ハイプシン量と細胞の増殖の関係を明確に説明するためには、スペルミジン量を減少させずにハイプシン量のみを選択的に減少させることが必要であろう。近年、Parkらにより開発された強力なデオキシハイプシン合成酵素阻害剤 monoguanyl-1,7-diaminoheptane を培養細胞に投与すると、スペルミジン量を減少させずに増殖を停止させることが報告された<sup>50, 51)</sup>。このような知見は哺乳動物細胞の増殖におけるハイプシンの関与を強く示唆するものではあるが、ハイプシン量を測定することができなかつたために明確な結論を得るまでには至っていない。本研究で開発したハイプシンの高感度測定法の応用として、このような実験系への利用が期待される。

また、デオキシハイプシン水酸化酵素阻害剤を HTC 細胞に投与した後測定すると、デオキシハイプシン量は上昇し、ハイプシン量は対象の 50% ほど減少しただけで増殖の停止が見られた。したがって、この時の増殖停止はデオキシハイプシン含有の前駆体蛋白の蓄積が原因とも考えられ、この蛋白が単に eIF-5A の前駆体であるばかりではなく、生理的に重要な役割を有しているのかもしれない。

## 結 論

本研究では新しい方法論を導入しながら，哺乳動物細胞の増殖におけるスペルミジンの役割を追求し，新しい知見を得てきた．それらをまとめると以下のようなになる．

- (1) 培養細胞実験で新規スペルミジン合成酵素阻害剤とスペルミン合成酵素阻害剤の有用性を示した．スペルミン合成酵素阻害剤である APCHA で HTC 細胞を長期間処理し，細胞内ポリアミンのほとんどをスペルミジンとしても細胞は増殖したことから，HTC 細胞の増殖においてスペルミンは必ずしも必要ではないことを示した．また，スペルミジン合成酵素阻害剤である 4MCHA を用いてスペルミジン量を対象の 2% にまで減少させても，スペルミンが存在すれば HTC 細胞は増殖できるが，更に減少させるとスペルミン量も減少し，増殖できなくなることから，細胞増殖における微量スペルミジンの役割を調べるための新しい方法論の必要性を示唆した．
- (2) ODC 阻害剤である AOAP とスペルミジンアナログを HTC 細胞に適用する新しい実験系を用いることにより，細胞増殖におけるポリアミンの機能にはアナログで代用できる特異性の低い部分での相互作用，およびアナログでは代用できない特異性の高い部分での作用の存在を示唆した．また，その実験系に APCHA を併用することにより特異性の高い部分での作用を担うポリアミンはスペルミンではなくスペルミジンであることを特定した．

- (3) スペルミジンに特異的な作用としてハイプシンの関与が考えられたため、新たにハイプシンの高感度測定法を開発し、それを用いて薬物処理した細胞のハイプシン量を測定することにより、細胞増殖とハイプシン量との間に密接な関係があることを見だし、はじめて哺乳動物細胞の増殖にハイプシンが関与している可能性を示した。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり，終始御懇篤なるご指導，御鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬品分析化学教室 鮫島啓二郎 教授に深く感謝致します。

また，数々の有益かつ適切な御助言，御指導を賜りました城西大学新津 勝 講師，白幡 晶 講師，細田晴美 助手に心より感謝するとともに，実験に際し，終始御協力頂きました 高橋紀雄 氏，山下法久 氏，上田 哲也 氏を始めとする城西大学薬学部薬品分析化学教室の諸氏に感謝致します。

本論文の作成にあたり，御校閲と御教示を賜りました副査 城西大学 川嶋洋一 教授，副査 城西大学 谷 覺 教授に深謝致します。

## 実験の部

## 一般事項

### 細胞培養

ラット肝癌由来 HTC細胞 (Morris 7288c) は、大日本製薬から入手し、単層培養あるいは浮遊培養で実験に用いた。薬物を添加する実験にはアミン酸化酵素を阻害するために、1mM アミノグアニジンを培地に添加した。

単層培養：組織培養用シャーレ ( $\phi$  100mm) に培地 (Minimum Essential Medium-Eagle+10%NBS) 10mlを加えて 37°C, 95% air- 5.0% CO<sub>2</sub>, pH7.5, 0.5-5.0x10<sup>6</sup> cells/petri dishとなるように植え継ぎ維持した細胞を実験に用いた。阻害剤実験では、上記の条件で細胞を 0.5-1.0x10<sup>6</sup> cells/100mm petri dish となるように

植継ぎ、24時間後、薬物入り培地と交換した。スペルミジン合成酵素阻害剤の実験では更に48時間、またスペルミン合成酵素阻害剤の実験では72時間培養した。次に培地を除き PBS 10mlで2回シャーレをすすぎ、トリプシン-EDTA (0.025%)を500 $\mu$ l加え、37°C, 10min 放置して細胞がシャーレからはがれたのを確認した後、培地 1mlを加えてトリプシンを失活させ、この浮遊液を更にピペットで懸濁し single cellとして細胞数を算定しポリアミンを測定した。

浮遊培養：培地 (Swim's S-77 (+50mM Tricine+ 2g/l Glucose+ 2mM Glutamine+ 0.05mM L-Cystine+ 0.5g/l NaHCO<sub>3</sub>) +NBS(10%))<sup>17)</sup> に細胞を 1-6 x10<sup>5</sup> cells/mlとなるように植え継ぎ対数増殖期の細胞を実験に用いた。阻害剤を投与する実験には上記の条件で細胞を 1.5 x10<sup>5</sup> cells/mlとなるように植え継ぎ、薬物を加え実験を開始し24時間毎に細胞数を算定、48時間毎に継代を行なった。

### ポリアミン測定用細胞試料の調製

細胞浮遊液を15ml容の遠心管に移し、卓上遠心器で1,200rpm, 3min遠心し、沈殿した細胞をPBS (-) 5mlで洗浄した。内部標準物質として、1,13-diamino-4,10-diazatridecane あるいは 1,9-diamino-4-azanonane を含む10% TCA溶液を一定量加え、除蛋白をかねてポリアミンを抽出し全量を1.5mlのサンプルチューブに移し、HPLC測定時まで冷凍保存した。HPLCにはこの試料を14,000rpm, 10min遠心した後、上清を使用した。

### ポリアミンおよびスペルミジン合成酵素阻害剤およびスペルミン合成酵素阻害剤の測定

ポリアミンおよび阻害剤の測定は陽イオン交換 HPLCを用い、ポストカラムラベル OPA法による蛍光を測定した。分離カラムは日本電子LCR-2 ( $\phi$  4mm x 80mm) を用いカラム温度は80℃とした。溶離液は2M塩化ナトリウム-0.28Mクエン酸緩衝液 (5N NaOHでpH5.5にあわせたもの) に、10-25%容量の HPLC用メタノールを加え調製した。細胞試料のポリアミン測定を行なう際の溶離液には、阻害剤とポリアミンおよび内部標準物質の分離が最もよくなるメタノール濃度を選択して用いた。反応液としては0.4Mホウ酸, 0.4M水酸化カリウム, 0.2% 2-メルカプトエタノール, 6mM OPA, 0.1% Brij-35, 0.1mM EDTA からなるOPA溶液を用い、反応温度は80℃とした。検出は、励起波長365nm, 測定波長450nmの蛍光を測定することで行なった。溶離液の流速は0.86ml/min, 反応液の流速は0.39ml/minとした。

### 第1章に関する実験

## DeAdoMetの測定

DeAdoMetおよび AdoMetは逆相 HPLCを用いた Seiler & Knödgenの方法<sup>52)</sup>で測定した。カラムは TSKgel ODS 80TM (4.6 x150mm)を用い、溶離液 A (0.1M 酢酸ナトリウムに酢酸を加えて調整, pH4.5 +10mM オクタンスルホン酸ナトリウム +10% メタノール) と溶離液 B (0.2M 酢酸ナトリウムに酢酸を加えて調整, pH4.5 + 10mM オクタンスルホン酸ナトリウム +10% メタノール) の割合を 0→40min までに 10→100% とするリニアグラジェントで行い、流速は 0.5ml/min とし、検出は 254nmの吸収を測定することで行った。なお、試料にはポリアミン分析用のものを用いた。

## ODC活性の測定

ラット(SD, オス, 200g)腹腔内にチオアセタミドを 150mg/kgで投与し、20時間後に解剖して得た肝臓を酵素原とした。この操作により ODCの比活性は 150倍に上昇する<sup>53)</sup>。肝臓は 2倍量の緩衝液( (透析用緩衝液: 25mM Tris-HCl pH7.5, 1mM DTT, 0.1mM EDTA) + 0.2M ショ糖) 中でホモジネートし、15,000g x 15min, さらに 105,000g x 60min遠心した上清画分を同じ緩衝液で透析して粗抽出液とした。

酵素活性<sup>54)</sup>は  $[1-^{14}\text{C}]$ オルニチンより遊離する  $^{14}\text{CO}_2$ を測定することで調べた。0.1M Tris-HCl, pH7.4, 400  $\mu\text{l}$ , 0.5mM ピリドキサルリン酸 40  $\mu\text{l}$ , 25mM DTT 40  $\mu\text{l}$ , 10mM L-オルニチン 40  $\mu\text{l}$ , 1.98  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ -DL-オルニチン 0.4  $\mu\text{l}$ , および酵素粗抽出液 (4MCHAまたは APCHAを含む) を合わせ、全量を 1mlとした。この標準測定溶液を試験管に入れ密封し、37°C, 1時間インキュベーションした。6M HCl 500  $\mu\text{l}$ で反応を止めさらに 37°C, 30分でインキュベーションし、遊離する  $^{14}\text{CO}_2$  をハイアミン 200  $\mu\text{l}$ に吸収させた。これを 10mlのシンチレーションカク

テル（エコノフロアー）に溶かした後、液体シンチレーションカウンターで測定した。

### AdoMetDC活性の測定

AdoMetDCの阻害剤であるメチルグリオキサールビスグアニルヒドラゾン（SD, オス, 200g）腹腔内に 80mg/kg となるよう投与し、20-24時間後解剖して得た肝臓を酵素原として用いた。この操作により AdoMetDCの比活性は20倍に上昇する<sup>55)</sup>。肝臓は2倍量の緩衝液（25mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.5, 2.5mM DTT, 2.5mM プトレシン, 0.1mM EDTA）の中でホモジネートした後、105,000g x 30min 遠心した上清画分を上記緩衝液（ただし 0.5mM DTT）で透析して粗抽出液とした。

酵素活性<sup>56)</sup>は [1-<sup>14</sup>C] S-アデノシルメチオニンより遊離する <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> を測定することで調べた。0.5M リン酸緩衝液 pH7.5, 25  $\mu$ l, 25mM DTT 12.5  $\mu$ l, 15mM プトレシン 50  $\mu$ l, 4mM S-アデノシルメチオニン 12.5  $\mu$ l, 0.34mM S-アデノシル-L-[カルボキシ-<sup>14</sup>C] メチオニン 0.7  $\mu$ l, および酵素溶液（4MCHAまたは APCHAを含む）を合わせ、全量を 250  $\mu$ l とした。この標準測定溶液を試験管に入れ密封し、37°C 1時間インキュベーションした。2.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200  $\mu$ l で反応を止め、さらに 30分 37°C でインキュベーションし、遊離する <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> をハイアミン 200  $\mu$ l に吸収させた。これを 10ml のシンチレーションカクテル（エコノフロアー）に溶かした後、液体シンチレーションカウンターで測定した。

### PAO活性の測定

ラットの肝臓を約4倍量の緩衝液（10mM Tris-HCl pH7.4, 0.25M ショ糖）の中でホモジネートした後、15,000g, 13,000rpm, 10min 遠心し、沈

殿分画を 0.1% Triton X-100 を含む透析緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.8, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT) に懸濁し, 25,000g, 16,700rpm, 30min 遠心した。この上清を透析し粗抽出液とした。

酵素活性は Höllta の方法<sup>57)</sup> を一部変えて測定した。0.25M ホウ酸緩衝液 pH9.0, 50  $\mu$ l, 25mM DTT 50  $\mu$ l, 20mM 精製スペルミン (pH7.0) 50  $\mu$ l, 酵素抽出液 50  $\mu$ l, および阻害剤 50  $\mu$ l を加えて全量 250  $\mu$ l とした。その標準測定溶液を 60 分間インキュベーションし, 20% TCA で除蛋白して反応を停止した。これを 10,000rpm, 10min 遠心した上清について, スペルミンより生成するスペルミジンを HPLC で測定した。スペルミジンの測定は, ポリアミンの測定に示す方法で行った。

なお, スペルミンの精製は, 購入したスペルミンを陽イオン交換カラム (DOWEX 50W-X4, H<sup>+</sup> form) に吸着させ, 2-3M HCl で溶出し, スペルミン分画を HPLC で確認して濃縮し, 水-エタノールから再結晶した。この操作により HPLC での純度 93% のスペルミジンが 99% の純度になった。

### SSAT 活性の測定

粗抽出液の調整は Matsui & Pegg<sup>18)</sup> の方法に従ったが, 硫酸分画をする際に緩衝液にスペルミジンを添加すると酵素活性の上昇が認められたので, 下記のように一部変更して行った。四塩化炭素をラット (SD, オス, 200g) 腹腔内に 1.5ml/kg 投与し, 6 時間後解剖して得た肝臓を酵素原として用いた。この操作により SSAT 活性は 50 倍に上昇する。この肝臓を 2 倍量の緩衝液 (50mM Tris-HCl pH7.5, 0.25M ショ糖, 25mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>) でホモジネートし, 上清を透析用緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 0.1M NaCl, 1mM スペルミジン) で透析して SSAT 粗抽出液とした。

活性測定は Libbyの方法<sup>58)</sup>を一部変更して行った。1Mリン酸緩衝液 pH7.8, 20 $\mu$ l, 30mM 精製スペルミジン 20 $\mu$ l, 0.5mM アセチルCoA 20 $\mu$ l, 酵素粗抽出液 100 $\mu$ l (4MCHAまたはAPCHAを含む)を加えて全量 200 $\mu$ lとした標準測定溶液を 30 $^{\circ}$ C, 10分間インキュベートした。20% TCA 200 $\mu$ lで除蛋白し反応を停止させた後, 10,000rpm, 10min 遠心した上清について生成する  $N^1$ -アセチルスペルミジンの量を HPLC で測定した。  $N^1$ -アセチルスペルミジンの定量は, ポリアミンの測定に示す方法で行った。

なお, スペルミジンの精製は, 購入したスペルミジンを陽イオン交換カラム (DOWEX 50W-X4, H<sup>+</sup> form) に吸着させ, 1.5-2M HClで溶出し, スペルミジン分画を HPLCで確認して濃縮し, 水-エタノールから再結晶した。この操作により HPLCでの純度 98%のスペルミジンがほぼ 100%の純度になった。

細胞試料の酵素活性は [1-<sup>14</sup>C] アセチル-CoAより生じる  $N^1$  [1-<sup>14</sup>C]-アセチルスペルミジンを定量することで行った<sup>58)</sup>。酵素活性測定溶液として, 1M Tris-HCl緩衝液 pH7.8, 10 $\mu$ l, 30mM スペルミジン 10 $\mu$ l, [1-<sup>14</sup>C] アセチル-CoA 10 $\mu$ l, 酵素溶液 70 $\mu$ lを加え全量 100 $\mu$ lとしたものを 37 $^{\circ}$ C, 10分間インキュベーションした後氷水につけ 1M ヒドロキシアミン 20 $\mu$ lを加え反応を停止後, さらに 100 $^{\circ}$ C, 3分間加熱し蛋白を変性させた。これを 7,000rpm, 3,000g, 5min 遠心し, 上清 50 $\mu$ lをリン酸セルロース濾紙 (5cm<sup>2</sup>) にスポットし蒸留水 1mlで 5回, エタノール 1mlで 3回洗浄の後乾燥させて, これを 10mlのシンチレーションカクテル (エコノフロアー) に溶かした後, 液体シンチレーションカウンターで測定した。

### スペルミジン合成酵素活性の測定

スペルミジン合成酵素活性の測定は Rainaらの方法<sup>59)</sup>に従って行った。1.0M リン酸緩衝液 pH7.4, 10 $\mu$ l, 0.1M DTT 5 $\mu$ l, 10mM プトレシン 10 $\mu$ l, 0.5mM DeAdoMet 2 $\mu$ l, 0.128 $\mu$  M <sup>3</sup>H-DeAdoMet (73.8Ci/mmol) 1 $\mu$ l, BSAを含む酵素溶液と蒸留水（あるいは阻害剤）で全量を 100 $\mu$ l とし、標準活性測定液とした。この溶液を 37°C, 10-30分間インキュベーションした後、25mM HCl 0.5mlを加えて反応を止め、10,000rpm, 5min 遠心した上清 0.5mlをセレックス P (H<sup>+</sup> form, 0.5cm<sup>3</sup>) にかけた。カラムにかけた最初の 0.5mlは捨て、つぎに 25mM HCl 1.8mlを3回に分けてカラムにかけ、溶出した <sup>3</sup>H-MTAを直接バイアルにとりシンチレーターを 10ml加え液体シンチレーションカウンターで測定した。

### スペルミン合成酵素活性の測定

標準酵素活性測定液には、0.1M リン酸緩衝液 pH7.4, 1.0mM スペルミジン, 5.0mM DTT, 20 $\mu$  M DeAdoMet ([<sup>3</sup>H]DeAdoMetを含む), 酵素試液の混合溶液 0.1mlを使用した。以後の操作はスペルミジン合成酵素活性と同様に行った。

## 第3章に関する実験

### 試薬

CMセルロース (Serva)およびアミノ酸分析用の酢酸およびヘキサンスルホンサンナトリウムは和光純薬工業, アセトニトリルおよびリン酸2水素ナトリウムはメルク, ピリジンは Pierce の Sequanal Grade のものを用いた。HPLC用の水は Milli Q (ミリポア) により調整した。

## ハイプシン合成

ハイプシンは Bergeron らの方法<sup>60)</sup>を一部変更し epicyanohydrine の代わりに 1,2-epoxy-4-phthalimidobutane を用いて合成した。1,2-epoxy-4-phthalimidobutane の合成は、DMF 中で 4-bromo-1-butene とフタルイミドカリウムを反応させて得た 4-phthalimide-1-butene を *m*-chloroperbenzoic acid で酸化して行った。(Anal. calcd for C<sub>10</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 39.22; H, 8.23; N, 13.72. Found: C, 39.06. H, 7.94; N, 13.65).

## デオキシハイプシンと内部標準物質の合成

デオキシハイプシンと内部標準物質は *N*<sup>α</sup>-phthaloyl-*N*<sup>ε</sup>-toluenesulphonyl-L-lysine ethylester と 1-brom-4-phthaliminobutane あるいは 1-brom-5-phthaliminopentane を NaH 存在下 DMF 中で反応させたものを加水分解して合成した。

デオキシハイプシン (Anal. calcd for C<sub>10</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · 1/4H<sub>2</sub>O: C, 40.75; H, 8.72; N, 14.26. Found: C, 40.62; H, 8.42; N, 14.55.), *N*<sup>ε</sup>-aminopentyl-L-lysine (Anal. calcd for C<sub>11</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: C, 38.78; H, 8.28; N, 12.33. Found: C, 38.53; H, 8.06; N, 12.31.), *N*<sup>δ</sup>-aminobutyl-L-ornithine (Anal. calcd for C<sub>9</sub>H<sub>23</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · 1/2H<sub>2</sub>O: C, 37.90; H, 8.48; N, 14.73. Found: C, 37.94; H, 8.25; N, 14.82.)

## HPLC (Apparatus)

試料の調製に用いた遠心乾燥機は TAITEC 製 VC-960, HPLC の装置は東ソー CCPEII ポンプ, 島津製クロマトレコーダー C-R5A, 検出器には日本分光製 FP-920, インジェクターにはレオダイン Mode7125 あるいは日本分光製オートサンプラー 851-AS, カラムには Shiseido capcell pak C18 UG120 S5 (150 x 4.6mm I.D., ガードカラム 30 x 4.6mm I.D.) を

用いた.

### HPLC(Conditions)

移動相は 10mM sodium hexylsulfate, 3.5%アセトニトリル を含む 0.1M phosphate buffer pH2.0を用いアイソクラテック溶離で行った. 流速は 1.0ml/min, カラム温度は 30℃で行った. 検出はポストラベル OPA法で行い, OPAの反応液には Seiler とKnodgenの方法に従って調整したもの(0.8M Boric acid, 0.8M KOH, 0.3% 2-Mercaptoethanol, 3mM OPA, 0.1% Brij-35) を流速 0.26ml/minで用い, 励起波長 340nm, 検出波長 460nmで行った.

### 細胞の処理

細胞の処理は細胞を PBS500  $\mu$  lに懸濁して超音波粉碎機で処理 (150W x 30sec.)し, その遠心(10,000g x 10min)した上清を粗抽出液として実験に用いた. 蛋白の定量はこの粗抽出液を Bradford法で行い, 標準蛋白には BSAを用いた.

### ラット臓器試料の処理

実験には SDラット オス, 6 週齢 (230-240g), 5 匹を使用した. 摘出した各臓器に 5倍量の PBSを加え, ポリトロンホモジナイザーで 30秒間処理し, 遠心分離(10,000g x10min)した上清についてハイプシンの分析を行った.

### ハイプシン量の測定

0.5~15.0mg 蛋白相当を含む試料の粗抽出液をネジ付き試験管(100 x 16mm I.D.)に入れ, 10%TCA 3mlで蛋白質を変性させ遠心分離した沈澱

をさらに 10% TCA 3ml で洗浄し、アセトンついでエーテル各 3ml で洗浄後乾燥したものに内標として  $N^{\epsilon}$ -アミノペンチルリジンを試験管あたり 0.5-10nmol 加えて 6M HCl 3ml を加え封管し、120°C で 13 時間加水分解した。加水分解物は遠心濃縮機で乾燥後、残渣を水 3ml に溶解し 0.2  $\mu$ m のフィルターで不溶物を除去し、1M ピリジン 100  $\mu$ l で試料を中和して前処理カラムにかけた。前処理カラムには CMC ( $H^+$ form) 1ml を 10ml のポリプロピレン製カラムに充填し、1M ピリジン-酢酸（最終濃度がそれぞれ 1M を含む）1ml でカラムを平衡化したのち水 10ml で洗浄したものをを用いた。前処理の操作は試料をカラムにのせピリジン-酢酸 0.025M 10ml、ついで 0.05M, 0.075M それぞれ 5ml で洗浄し 1.0M ピリジン-酢酸 5ml の溶出分画を遠心乾燥した残渣を 0.01M HCl 200  $\mu$ l に溶解し HPLC の試料とした。

### 過ヨウ素酸酸化

前処理した HTC 細胞の試料に同量の 40mM 過ヨウ素酸ナトリウムを加え、室温で 12 時間反応した。

## 引用文献

- 1) C. W. Tabor, and H. Tabor, *Annu. Rev. Biochem.*, 53, 749-790 (1984).
- 2) A. E. Pegg, *Cancer Res.*, 48, 759-774 (1988).
- 3) L. J. Marton, and D. R. Morris, Inhibition of Polyamine Metabolism, P. P. McCann, A. E. Pegg, and A. Sjoerdsma (eds.), Academic press, New York., pp.79-105. (1987).
- 4) L. J. Marton, and A. E. Pegg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35, 55-91 (1995).
- 5) A. E. Pegg, R. Poulin, and J. K. Coward, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27, 425-442 (1995).
- 6) T. Beppu, A. Shirahata, N. Takahashi, H. Hosoda, and K. Samejima, *J. Biochem.*, 117, 339-345 (1995).
- 7) T. Beppu, A. Shirahata, and K. Samejima, *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1-5 (1996).
- 8) A. Shirahata, T. Morohoshi, M. Fukai, S. Akatsu, and K. Samajima, *Biochem. Pharmacol.*, 41, 205-212 (1991).
- 9) A. Shirahata, N. Takahashi, T. Beppu, H. Hosoda, and K. Samajima, *Biochem. Pharmacol.*, 45, 1897-1903 (1993).
- 10) T. Noguchi, Y. Aramaki, T. Kameji, and S. Hayashi, *J. Biochem.*, 85, 953-959 (1979).
- 11) A. E. Pegg, P. P. McCann, *Am. J. Physiol.*, 243, C212-221 (1982).
- 12) A. E. Pegg, *Cancer Res.*, 48, 759-774 (1988).
- 13) J. K. Coward and A. E. Pegg, *Adv. Enzyme Regul.*, 26, 107-113 (1997).
- 14) A. E. Pegg, R. Wechter, R. Poulin, P. M. Woster, and J. E. Coward, *Biochemistry*, 28, 8446-8453 (1989).
- 15) A. E. Pegg, K. C. Tang, and J. K. Coward, *Biochemistry*, 21, 5082-5089 (1982).
- 16) J. L. A. Mitchell, D. W. Mahan, P. P. McCann, and P. Qasba, *Biochem. Biophys. Acta*, 840, 309-316 (1985).

- 17) P. P. McCann, C. Tardif, P. S. Mamont, F. Schuber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64, 336-341 (1975).
- 18) I. Matsui, and A. E. Pegg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 1009-1015 (1980).
- 19) F. Schuber, *Biochem. J.*, 260, 1-10 (1989).
- 20) 白幡 晶, 化学と生物, 28, 162-171 (1990).
- 21) T. Kakegawa, K. Takamiya, T. Ogawa, Y. Hayashi, S. Hirose, M. Niitsu, K. Samejima, and K. Igarashi, *Arch. Biochem. Biophys.*, 261, 250-256 (1988).
- 22) R. D. Snyder and M. L. Edwards, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176, 1383-1392 (1991).
- 23) M. L. Edwards, R. D. Snyder, and D. M. Stemerick, *J. Med. Chem.*, 34, 2414-2420 (1991).
- 24) R. A. Casero, Jr, R. J. Bergeron, and, C. W. Porter, *J. Cell. Physiol.*, 121, 476-482 (1984).
- 25) T. L. Byers, J. R. Lakanen, J. K. Coward, and A. E. Pegg, *Biochem. J.*, 303, 363-368 (1994).
- 26) R. Poulin, J. A. Secrist, III, and A. E. Pegg, *Biochem. J.*, 263, 215-221 (1989).
- 27) N. J. Prakash, T. L. Bowllin, G. F. Davis, P. S. Sunkara, and A. Sjoerdsma, *AnticancerRes.*, 8, 563-568 (1988).
- 28) K. Hamana, S. Matsuzaki, K. Hosaka, and S. Yamashita, *FEMS Microbiol. Lett.*, 61, 231-236 (1989).
- 29) T. Shiba, H. Mizote, T. Kaneko, T. Nakajima, Y. Kakimoto, and I. Sano, *Biochem. Biophys. Acta*, 244, 523-531 (1971).
- 30) E. D. Gordon, R. Mora, S. C. Meredith, C. Lee, and S. L. Lindquist, *J. Biol. Chem.*, 262, 16585-16589 (1987).
- 31) M. H. Park, H. L. Cooper, and J. E. Folk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78,

- 2869-2873 (1981).
- 32) E. W. Gerner, P. S. Mamont, A. Bernhardt, and M. Siat, *Biochem. J.*, 239, 379-386 (1986).
- 33) M. H. Park, E. C. Wolff, and J. E. Folk, *TIBS*, 18, 475-479 (1993).
- 34) M. H. Park, E. C. Wolff, and J. E. Folk, *Biofactors* 14, 95-104 (1993).
- 35) E. W. Gerner, P. S. Mamnt, A. Bernhardt, and M. Siat, *Biochem. J.*, 239, 379-386 (1986).
- 36) A. Sano, and M. Miyake, Y. Kakimoto, *Biochem. Biophys. Acta*, 800, 135-139 (1984).
- 37) S. Beninati, A. Abbruzzeses, and J. E. Folk, *Anal. Biochem.*, 184, 6-20 (1990).
- 38) M. H. Park, L. C. Cooper, and J. E. Folk, *J. Biol. Chem.*, 257, 7217-7222 (1982).
- 39) K. Y. Chen, *Biochim. Biophys. Acta*, 756, 395-402 (1983).
- 40) T. L. Byers, L. Wiest, R. S. Wechter, and A. E. Pegg, *Biochem. J.*, 290, 115-121 (1993).
- 41) N. Imaoka, and T. Nakajima, *Biochem. Biophys. Acta*, 320, 97-103 (1973).
- 42) A. Sano, and M. Miyake, Y. Kakimoto, *Biochem. Biophys. Acta*, 800, 135-139 (1984).
- 43) S. Beninati, N. Martinet, and J. E. Folk, *J. Chromatogr.*, 443, 329-335 (1988).
- 44) D. Bartig, H. Schemann, and F. Klink, *System. Appl. Microbiol.*, 13, 112-116 (1990).
- 45) S. Beninati, A. Abbruzzeses, and J. E. Folk, *Anal. Biochem.*, 184, 6-20 (1990).
- 46) M. H. Park, and E. C. Wolff, *J. Biol. Chem.*, 263, 15264-15269 (1988).
- 47) J. Jakus, E. C. Wolff, M. H. Park, and J. E. Folk, *J. Biol. Chem.*, 268, 13151-13159 (1993).
- 48) Z. Smit-McBride, J. Schnier, R. J. Kaufman, and J. W. B. Hershey, *J. Biol. Chem.*, 264, 18527-18530 (1989).

- 49) H. A. Kang, and J. W. B. Hershey, *J. Biol. Chem.*, 269, 3934-3940 (1994).
- 50) N. H. Park, E. C. Wolff, Y. B. Lee, and J. E. Folk, *J. Biol. Chem.*, 269, 27827-27832 (1994).
- 51) Y. B. Lee, M. H. Park, and J. E. Folk, *J. Med. Chem.*, 38, 3053-3061 (1995).
- 52) N. Seiler and B. Knödgen, *J. Chromatogr.*, 339, 45-57 (1985).
- 53) H. Inoue, Y. Kato, M. Takigawa, K. Adachi, and Y. Takeda, *J. Biochem.*, 77, 879-893 (1975).
- 54) T. Kameji, Y. Murakami, K. Fujiwara, and S. Hayashi, *Biochem. Biophys. Acta*, 717, 111-117 (1982).
- 55) A. E. Pegg, *Biochem. J.*, 141, 581-583 (1974).
- 56) A. E. Pegg, and H. G. Williams-Ashman, *J. Biol. Chem.*, 244, 682-693 (1969).
- 57) E. Höltta, *Biochemistry*, 16, 91-100 (1977).
- 58) P. R. Libby, *J. Biol. Chem.*, 253, 233-237 (1978).
- 59) A. Raina, T. Eloranta, and R.-L. Pajula, *Methods Enzymol.*, 94, 257-265 (1984).
- 60) R. J. Bergeron, M. X. B. Xia, and O., IV, Phanstiel, *J. Org. Chem.*, 58, 6804-6806 (1993).