

---

細胞死を誘導するポリアミン代謝阻害剤の開発

---

(課題番号 12672158)

平成 12 年度～平成 14 年度

科学研究費補助金 (基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 15 年 3 月

研究代表者 白幡 晶

( 城西大学薬学部教授 )

## はしがき

スペルミジン、スペルミンに代表されるポリアミンは、その生合成が遺伝子発現と密接に関わり、細胞増殖因子として作用する。従ってその類似体あるいは生合成阻害剤は、細胞機能の調節試薬として働く可能性が高く、特に抗がん剤、抗寄生虫薬開発の観点から多くの研究が進められてきた。しかし、当該酵素の遺伝子増幅などが起こり、生合成阻害剤単独による増殖抑制が困難であることから、抗寄生虫薬として利用されていることを除き、臨床的には有用な生合成阻害剤の開発には至っていない。

一方、ポリアミンやその類似体の蓄積はアポトーシスあるいは細胞死を起こす。このことは細胞内ポリアミンの過剰蓄積が、増殖抑制の実現に効果的であることを示唆している。しかし、ポリアミンの蓄積を実現できる細胞系が限られるため、細胞死のメカニズムは不明である。単にポリアミンを過剰に投与するだけでは蓄積が起きないことは明らかになっており、ポリアミンの過剰蓄積を実現するためには、ポリアミンの代謝経路を遮断する化合物の開発が最も有効であると考えられる。

本研究は、ポリアミン蓄積の影響、ポリアミンの蓄積による細胞死のメカニズム解明を目指して、ポリアミン代謝酵素の1つである、spermidine / spermine - N<sup>1</sup> - acetyltransferase (SSAT) の強力な阻害剤を設計・開発し、培養細胞、および動物組織への効果を詳細に検討することを目的とした。

本研究ではまず SSAT 阻害剤の検討で有用となる蛍光基質を用いる SSAT 活性測定法を確立した。次に開発した系を利用することで、これまでにない強力な SSAT 阻害活性を有するポリアミン類似体を見出した。その際 SSAT の基質結合部位には、疎水性化合物と結合する領域が存在する可能性を明らかにした。

一方、スクリーニングに供する目的で合成した種々の類似体の培養細胞への効果を検討し、これまでの報告と同様、種々の細胞系の増殖阻害、アポトーシスを誘導することを明らかにした。

また、ポリアミン及びその類似体の過剰蓄積における細胞内分布及び遊離ポリアミン濃度の評価系を検討し、限外ろ過法を応用した新規測定法を確立した。

本研究計画では見出した SSAT 阻害剤の動物への投与も行う予定であったが、その毒性の強さのために不可能となった。そこで本報告書では、細胞レベルでの評価に焦点を絞り、研究成果を以下の3点に整理して報告する。

### 1) SSAT 活性測定法の開発と阻害剤の検索

- 蛍光基質を用いた HPLC によるスペルミジン/スペルミン N<sup>1</sup>-アセチル転移酵素活性測定法の開発

- N<sup>1</sup>-ダンシルノルスペルミンを用いた SSAT 活性測定法の速度論的解析と培養細胞由来試料への応用
- 2) ポリアミン類似化合物の合成とその培養細胞への効果
- Molecular correlates of the action of bis(ethyl)polyamines in the breast cancer cell growth inhibition and apoptosis
  - Regulation of estrogenic and nuclear factor  $\kappa$ B functions by polyamines and their role in polyamine analog-induced apoptosis of breast cancer cells
  - Inhibition of cell growth through inactivation of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) by deoxyspergualin
- 3) ポリアミンの過剰蓄積によるポリアミン細胞内分布への影響
- 限外ろ過法を用いた細胞内遊離ポリアミン濃度測定のための基礎検討
  - Measurements of macromolecule-bound and ultra-filtrable polyamines in rat liver homogenized without buffer
  - Changes in intracellular concentrations of amino acids and polyamines during the apoptosis of HL-60 cells
  - DNA condensation by polyamines : A laser light scattering study of structural effects
  - Polyamine structural effects on the induction and stabilization of liquid crystalline DNA : potential applications to DNA packaging, gene therapy and polyamine therapeutics
- 4) その他
- Effect of dehydroepiandrosterone on oleic acid formation in the liver of rats, mice and guinea pigs
  - Covalent linkage of polyamines to peptidoglycan in *Anaerovibrio lipolytica*
  - Self-assembly of an oligodeoxyribonucleotide harboring the estrogen response element in the presence of polyamines : ionic, structural, and DNA sequence specificity effects
  - Identification of the putrescine recognition site on polyamine transporter protein PotE
  - A molecular beacon strategy for the thermodynamic characterization of triplex DNA : Triplex formation at the promoter region of cyclin D1

## 研究組織

研究代表者： 白幡 晶 (城西大学・薬学部・教授)

## 研究経費

交付決定額 (3,900)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	2,900	0	2,900
平成13年度	500	0	500
平成14年度	500	0	500

## 研究発表

### (1) 学会誌等

T. Hirano, M. Sato, A. Shirahata and Y. Kamio

Covalent linkage of polyamines to peptidoglycan in *Anaerovibrio lipolytica*

J. Bacteriol., 182 (4), 1154-1157, 2000

H. Sakagami, E. Fujiwara, Y. Yokote, K. Akahane, K. Asano, M. Kochi, E. Hara and A Shirahata

Changes in intracellular concentrations of amino acids and polyamines during the apoptosis of HL-60 cells

Anticancer research, 20, 265-270, 2000

J. S. Lewis, T. J. Thomas, A Shirahata and T. Thomas

Self-assembly of an oligodeoxyribonucleotide harboring the estrogen response element in the presence of polyamines : ionic, structural, and DNA sequence specificity effects

Biomacromolecules, 1, 339-349, 2000

C. A. Faaland, T. J. Thomas, S. Balabhadrapathruni, T. Langer, S. Mian, A Shirahata, M. A. Gallo and T. Thomas

Molecular correlates of the action of bis(ethyl)polyamines in the breast cancer cell growth inhibition and apoptosis

Biochem. Cell Biol., 78, 415-426, 2000

Y. J. Xu, N. Furuumi, K. Samejima, M. Niitsu and A Shirahata  
Measurements of macromolecule-bound and ultra-filtrable polyamines in rat liver  
homogenized without buffer  
Bio. Pharm. Bull., 23 (9), 1021-1026, 2000

K. Kashiwagi, A. Kuraishi, H. Tomitori, A. Igarashi, K. Nishimura, A Shirahata and  
K. Igarashi  
Identification of the putrescine recognition site on polyamine transporter protein  
PotE  
J. Biol. Chem., 275 (17), 36007-36012, 2000

N. Shah, T. J. Thomas, J. S. Lewis, C. M. Klinge, A Shirahata, C. Gelinas and T.  
Thomas  
Regulation of estrogenic and nuclear factor  $\kappa$ B functions by polyamines and their  
role in polyamine analog-induced apoptosis of breast cancer cells  
Oncogene, 20, 1715-1729, 2001

T. Antony, T. Thomas, L. H. Shigal, A Shirahata and T. J. Thomas  
A molecular beacon strategy for the thermodynamic characterization of triplex DNA :  
Triplex formation at the promoter region of cyclin D1  
Biochemistry, 40, 9387-9395, 2001

V. Vijayanathan, T. Thomas, A Shirahata and T. J. Thomas  
DNA condensation by polyamines : A laser light scattering study of structural  
effects  
Biochemistry, 40, 13644-13651, 2001

K. Imai, N. Kudo, M. Koyama, A Shirahata and Y. Kawashima  
Effect of dehydroepiandrosterone on oleic acid formation in the liver of rats, mice  
and guinea pigs  
Jpn. J. Pharmacol., 86, 437-447, 2001

K. Nishimura, Y. Ohki, T. Fukuchi-Shimogori, K. Sakata, K. Saiga, T. Beppu, A  
Shirahata, K. Kashiwagi and K. Igarashi  
Inhibition of cell growth through inactivation of eukaryotic translation initiation

factor 5A (eIF5A) by deoxyspergualin  
Biochem. J., 363, 761-768, 2002

M. Saminathan, T. Thomas, A Shirahata, C. K. S. Pillai and T. J. Thomas  
Polyamine structural effects on the induction and stabilization of liquid crystalline  
DNA : potential applications to DNA packaging, gene therapy and polyamine  
therapeutics  
Nucleic Acids Research, 30 (17), 3722-3731, 2002

(2) 口頭発表

和田 牧子, 亀井 千恵子, 岩崎 聖子, (千葉大) 柏木 敬子, 五十嵐 一衛, 白幡 晶 : 大腸菌 S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素に対するアミノプロペニル構造を有する阻害機構、日本ポリアミン研究会 第16回 (滋賀) 2001年1月

亀井 千恵子, 栗田 伸人, 白幡 晶 : 細胞容積とポリアミン濃度の関係、日本ポリアミン研究会 第16回 (滋賀) 2001年1月

亀井 千恵子, 栗田 伸人, 鮫島 啓二郎, 白幡 晶 : HTC 細胞における遊離ポリアミン濃度測定のための基礎検討、日本薬学会 第121回 (札幌) 2001年3月

田 玉順, 和田 牧子, 亀井 千恵子, 岩崎 聖子, 白幡 晶 : 二機能性標識試薬を用いる酵素活性部位構造解析のための基礎検討、日本薬学会 第121回 (札幌) 2001年3月

岩崎 聖子, 和田 牧子, 白幡 晶 : HPLC を用いる脱炭酸化 S-アデノシルメチオニンの高感度定量法の開発、日本ポリアミン研究会 第17回 (東京) 2002年1月

深澤 一昭, 宮武 晋治, 岡本 政治, 高尾 浩一, 白幡 晶 :  $N^1$ -Dansylnorspermine を用いた spermidine/spermine  $N^1$ -acetyltransferase (SSAT) 活性測定法の開発、日本ポリアミン研究会 第17回 (東京) 2002年1月

和田 牧子, 岩崎 聖子, 白幡 晶 : ラット S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の化学的構造解析、日本ポリアミン研究会 第17回 (東京) 2002年1月

寺澤 友基子, 杉田 義昭, 白幡 晶 : アクロレインの高感度定量法開発のための検出試薬の検討、日本薬学会 第122回 (千葉) 2002年3月

岩崎 聖子, 和田 牧子, 白幡 晶: HPLC を用いる S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の活性測定法の開発、日本薬学会 第 122 回 (千葉) 2002 年 3 月

深澤 一昭, 宮武 晋治, 岡本 政治, 高尾 浩一, 白幡 晶: HPLC による蛍光基質を用いた spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase (SSAT) 活性測定法の開発、日本薬学会 第 122 回 (千葉) 2002 年 3 月

佐々木 ひとみ, 竹田 昇, 鮫島 啓二郎, 和田 牧子, 白幡 晶, 長野晃三: ラットスペルミジン合成酵素の三次構造に関する考察、日本薬学会 第 122 回 (千葉) 2002 年 3 月

高尾 浩一, 杉田 義昭, 白幡 晶: ラット肝臓由来ポリアミン酸化酵素の新規アフィニティーカラムによる精製、日本薬学会 第 122 回 (千葉) 2002 年 3 月

岡本 政治, 深澤 一昭, 宮武 晋治, 和田 牧子, 高尾 浩一, 白幡 晶: グアニジノ化合物の合成とそれらの細胞への影響、日本薬学会 第 122 回 (千葉) 2002 年 3 月

和田 牧子, 町田 真弓, 白幡 晶: S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素タンパク質のプロテインによる安定化、日本生化学会大会 第 75 回 (京都) 2003 年 10 月

寺澤 友基子, 斉藤 千佳子, 御供 陽子, 杉田 義昭, 白幡 晶: 3,5-dimethoxyaniline を用いるアクロレインの蛍光定量法の開発、日本薬学会関東支部大会 第 46 回 (東京) 2003 年 10 月

高尾 浩一, 宮武 晋治, 深澤 一昭, 杉田 義昭, 白幡 晶: 蛍光標識ポリアミンの細胞への取り込み、日本薬学会関東支部大会 第 46 回 (東京) 2003 年 10 月

渡邊 寿子, 合田 ひとみ, 鮫島 啓二郎, 和田 牧子, 白幡 晶, 長野 晃三: 哺乳動物スペルミジン合成酵素の三次元構造と選択的阻害剤のデザイン、日本ポリアミン研究会 第 18 回 (東京) 2003 年 2 月

宮武 晋治, 深澤 一昭, 高尾 浩一, 白幡 晶: 蛍光基質を用いた細胞内 spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase (SSAT) 活性の測定、日本ポリアミン研究会 第 18 回 (東京) 2003 年 2 月

鳥越俊彦, 大島 真, 高尾 浩一, 吉田 仁, 白幡 晶, 佐藤 昇志: ポリアミンによ

る抗原提示阻害機序の解析-内在性ポリアミン濃度との相関性について-、日本ポリアミン研究会 第 18 回（東京）2003 年 2 月

高尾 浩一，宮武 晋治，深沢 一昭，杉田 義昭，白幡 晶：蛍光標識ポリアミンの細胞への取り込み、日本ポリアミン研究会 第 18 回（東京）2003 年 2 月

杉田 英章，岡本 政治，町田 真弓，高尾 浩一，白幡 晶：Deoxyhypusine synthase 阻害剤の HTC 細胞への効果、日本薬学会 第 123 回（長崎）2003 年 3 月

渡邊 寿子，合田 ひとみ，鮫島 啓二郎，和田 牧子，白幡 晶，長野 晃三：プロレシン結合部位を目指したスペルミジン合成酵素阻害剤のデザインと合成、日本薬学会 第 123 回（長崎）2003 年 3 月

佐藤 優子，鮫島 啓二郎，白幡 晶：ラット各臓器のホモジネート限外ろ液中ポリアミン濃度の測定、日本薬学会 第 123 回（長崎）2003 年 3 月

### （3）出版物

なし



## 研究成果

### 目次

	頁
蛍光基質を用いた HPLC によるスペルミジン／スペルミン N <sup>1</sup> -アセチル転移酵素 活性測定法の開発	1
N <sup>1</sup> -ダンシルノルスペルミンを用いた SSAT 活性測定法の数値論的解析と培養細胞 由来試料への応用	34
限外ろ過法を用いた細胞内遊離ポリアミン濃度測定のための基礎検討	99
T. Hirano, M. Sato, <u>A. Shirahata</u> and Y. Kamio Covalent linkage of polyamines to peptidoglycan in <i>Anaerovibrio lipolytica</i> J. Bacteriol., 182 (4), 1154-1157, 2000	
	145
H. Sakagami, E. Fujiwara, Y. Yokote, K. Akahane, K. Asano, M. Kochi, E. Hara and <u>A Shirahata</u> Changes in intracellular concentrations of amino acids and polyamines during the apoptosis of HL-60 cells Anticancer research, 20, 265-270, 2000	
	149
J. S. Lewis, T. J. Thomas, <u>A Shirahata</u> and T. Thomas Self-assembly of an oligodeoxyribonucleotide harboring the estrogen response element in the presence of polyamines : ionic, structural, and DNA sequence specificity effects Biomacromolecules, 1, 339-349, 2000	
	155
C. A. Faaland, T. J. Thomas, S. Balabhadrapathruni, T. Langer, S. Mian, <u>A Shirahata</u> , M. A. Gallo and T. Thomas Molecular correlates of the action of bis(ethyl)polyamines in the breast cancer cell growth inhibition and apoptosis Biochem. Cell Biol., 78, 415-426, 2000	
	166
Y. J. Xu, N. Furuumi, K. Samejima, M. Niitsu and <u>A Shirahata</u> Measurements of macromolecule-bound and ultra-filtrable polyamines in rat liver homogenized without buffer Bio. Pharm. Bull., 23 (9), 1021-1026, 2000	
	178
K. Kashiwagi, A. Kuraishi, H. Tomitori, A. Igarashi, K. Nishimura, <u>A Shirahata</u> and	

- K. Igarashi  
 Identification of the putrescine recognition site on polyamine transporter protein PotE  
*J. Biol. Chem.*, 275 (17), 36007-36012, 2000 184
- N. Shah, T. J. Thomas, J. S. Lewis, C. M. Klinge, A Shirahata, C. Gelinas and T. Thomas  
 Regulation of estrogenic and nuclear factor  $\kappa$ B functions by polyamines and their role in  
 polyamine analog-induced apoptosis of breast cancer cells  
*Oncogene*, 20, 1715-1729, 2001 190
- T. Antony, T. Thomas, L. H. Shigal, A Shirahata and T. J. Thomas  
 A molecular beacon strategy for the thermodynamic characterization of triplex DNA :  
 Triplex formation at the promoter region of cyclin D1  
*Biochemistry*, 40, 9387-9395, 2001 203
- V. Vijayanathan, T. Thomas, A Shirahata and T. J. Thomas  
 DNA condensation by polyamines : A laser light scattering study of structural effects  
*Biochemistry*, 40, 13644-13651, 2001 212
- K. Imai, N. Kudo, M. Koyama, A Shirahata and Y. Kawashima  
 Effect of dehydroepiandrosterone on oleic acid formation in the liver of rats, mice and  
 guinea pigs  
*Jpn. J. Pharmacol.*, 86, 437-447, 2001 220
- K. Nishimura, Y. Ohki, T. Fukuchi-Shimogori, K. Sakata, K. Saiga, T. Beppu,  
A Shirahata, K. Kashiwagi and K. Igarashi  
 Inhibition of cell growth through inactivation of eukaryotic translation initiation factor  
 5A (eIF5A) by deoxyspergualin  
*Biochem. J.*, 363, 761-768, 2002 231
- M. Saminathan, T. Thomas, A Shirahata, C. K. S. Pillai and T. J. Thomas  
 Polyamine structural effects on the induction and stabilization of liquid crystalline  
 DNA : potential applications to DNA packaging, gene therapy and polyamine  
 therapeutics  
*Nucleic Acids Research*, 30 (17), 3722-3731, 2002 239
-

蛍光基質を用いた HPLC によるスペルミジン／スペルミン

N<sup>1</sup>-アセチル転移酵素活性測定法の開発

## まえがき

スペルミジン、スペルミンに代表されるポリアミンはその生合成律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の活性が細胞増殖刺激に対して早い時期に上昇することや、核酸と強く相互作用することから、細胞内における遺伝子発現過程に重要な働きをするものと考えられている<sup>1)</sup>。ポリアミンは ODC、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (AdoMetDC)、スペルミジン合成酵素 (spd syn)、スペルミン合成酵素 (spm syn) の 4 種の酵素によって生合成されるが、Fig. 1 に示すように、一度スペルミジン/スペルミン  $N^1$ -アセチル転移酵素 (SSAT) によってアセチル化された後ポリアミン酸化酵素 (PAO) により酸化的に分解される経路も存在する。この経路はポリアミンの過剰な蓄積を防ぐものと考えられているが、組織が傷害を受けたときにも著しく SSAT 活性が上昇することが知られており<sup>2)</sup>、詳細な役割は不明である。他のポリアミン合成、代謝系には有効な阻害剤が開発されているのに対して、生細胞における SSAT の有効な阻害剤は未だ見出されておらず、未知の部分の多い酵素であるといえる。

当研究室では SSAT の活性部位の立体構造の解析を進め、強力な阻害剤を開発することを目指して研究を進めている。その際必要となる SSAT の活性測定は従来、基質にスペルミジン、 $[1-^{14}\text{C}]$ -アセチル CoA を用いて、生成する  $N^1$ -アセチルスペルミジンの放射能を計数する RI 活性測定法で行なわれてきた<sup>3)</sup>。しかし本法は基質が高価でまた測定操作が繁雑であり、阻害剤候補化合物をスクリーニングするには適していない。

そこで本研究では、阻害剤スクリーニングに有用な簡便で安価な HPLC による SSAT 活性測定法の確立を目的として、研究を開始した。

本論では、第 1 章で酵素タンパクの入手のために行った SSAT 遺伝子導入とその発現の結果について記す。第 2 章では SSAT 蛍光基質の合成、基質性の確認について記す。第 3 章では第 2 章で確立した HPLC 法を応用して、SSAT 阻害剤のスクリーニングを行った結果について記す。

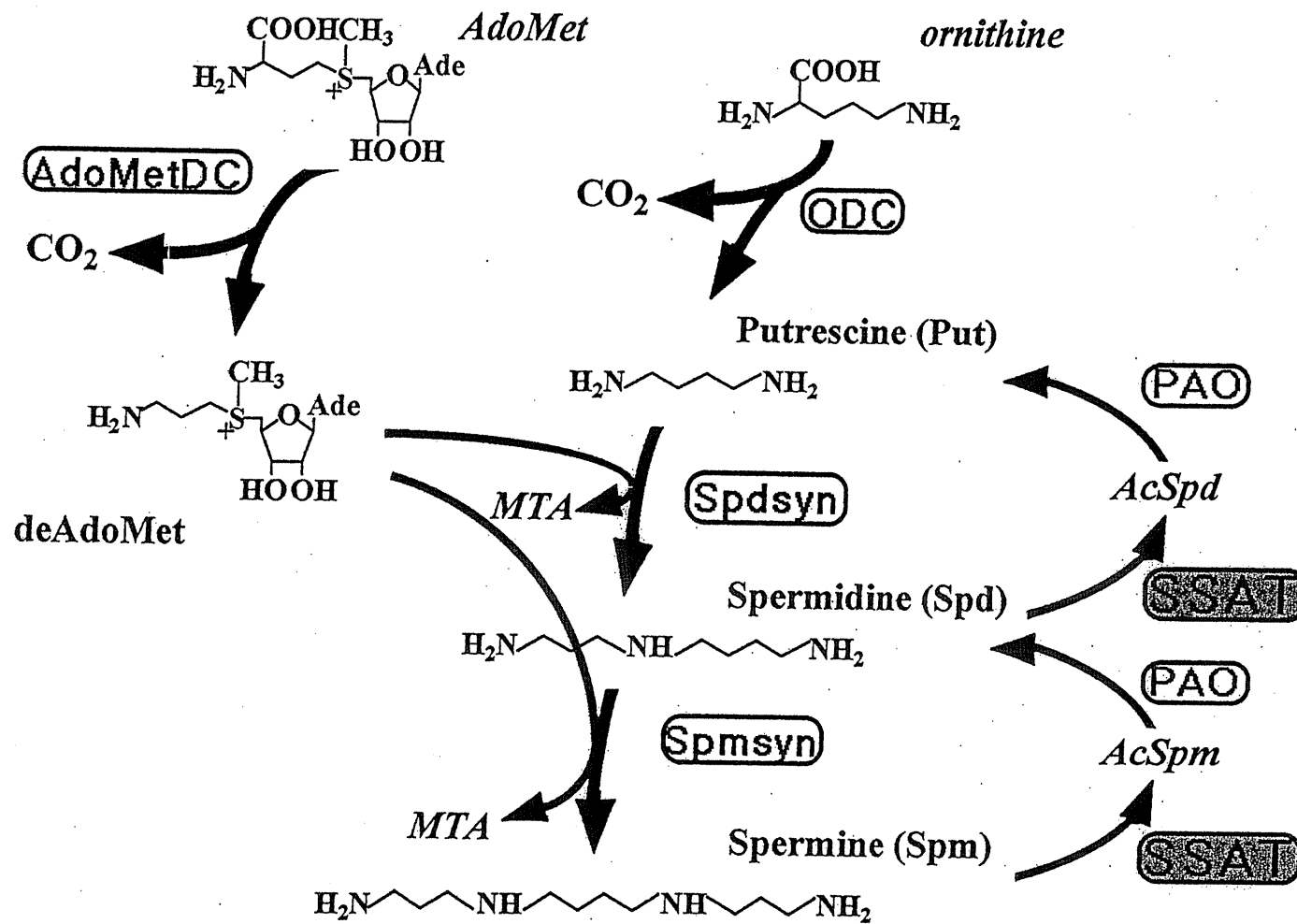


Fig. 1 Polyamine biosynthetic pathway

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, Spd syn; スペルミジン合成酵素  
 Spm syn; スペルミン合成酵素, PAO; ポリアミン酸化酵素, SSAT; スペルミジン/スペルミン *N*<sup>1</sup>-アセチル転移酵素

## 第1章 ヒト SSAT 遺伝子の大腸菌への導入及び SSAT タンパクの確認

### 1-1 ヒト SSAT 遺伝子の大腸菌への導入と確認

研究を開始するにあたり、SSAT タンパクは非常に不安定であり<sup>4)</sup>、動物組織から精製して酵素を供給するのは困難であると考え、入手したヒト SSAT 遺伝子挿入プラスミド pQE-30<sup>5)</sup>(Fig. 2) を用いて、大腸菌内でヒト SSAT タンパクを生成させることで、酵素タンパクを得ることを検討した。

ここで用いたプラスミドはマルチクローニングサイトに目的タンパクの遺伝子を挿入することにより、そのタンパクの N 末端にヒスチジンが 6 個結合した His-tagged protein が転写、翻訳されるように設計されているものである。

ヒト SSAT 挿入プラスミド pQE-30 (pQE-30/hSSAT) をコンピテントな *E.coli* (XL-1 Blue supercompetent cell) にヒートショック法で導入し、アンピシリン含有培地で培養し、プラスミド導入株のセレクションを行った。

その結果プラスミドが導入されてアンピシリン耐性となったものが、極めて低効率であったが、数個のコロニーとして検出された。

そこで次に X gal によるプラスミドクローニングサイトへの挿入の確認を行った<sup>6)</sup>。

先に示したプラスミド pQE 30 は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子 (*lac Z*) を持っている。 $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる X gal を培地に加えておくと、X gal が青色に発色するため、このプラスミドを持った *E.coli* は青いコロニーを形成する。またこのベクターは *lac Z* の途中にマルチクローニングサ

イトを設けてあり、クローニングサイトに目的遺伝子が挿入されると、*lac Z*が分裂され、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の活性がなくなるようにデザインされている。

したがって、このベクターのように目的遺伝子を挿入したものをトランスフェクトし、選択薬剤と X gal を含むプレートにコロニーを発現させると、目的遺伝子が入らずにセルフライゲーションしたベクターを持つコロニーは青く染まり、目的遺伝子が入ったベクターを持つコロニーは $\beta$ -ガラクトシダーゼが不活性化されているため発色せず白くなる。

アンピシリンで選択したコロニーを X gal 培地中で培養すると、出現したコロニーは全て白色であり、マルチクローニングサイトへの挿入プラスミドであることを確認した。



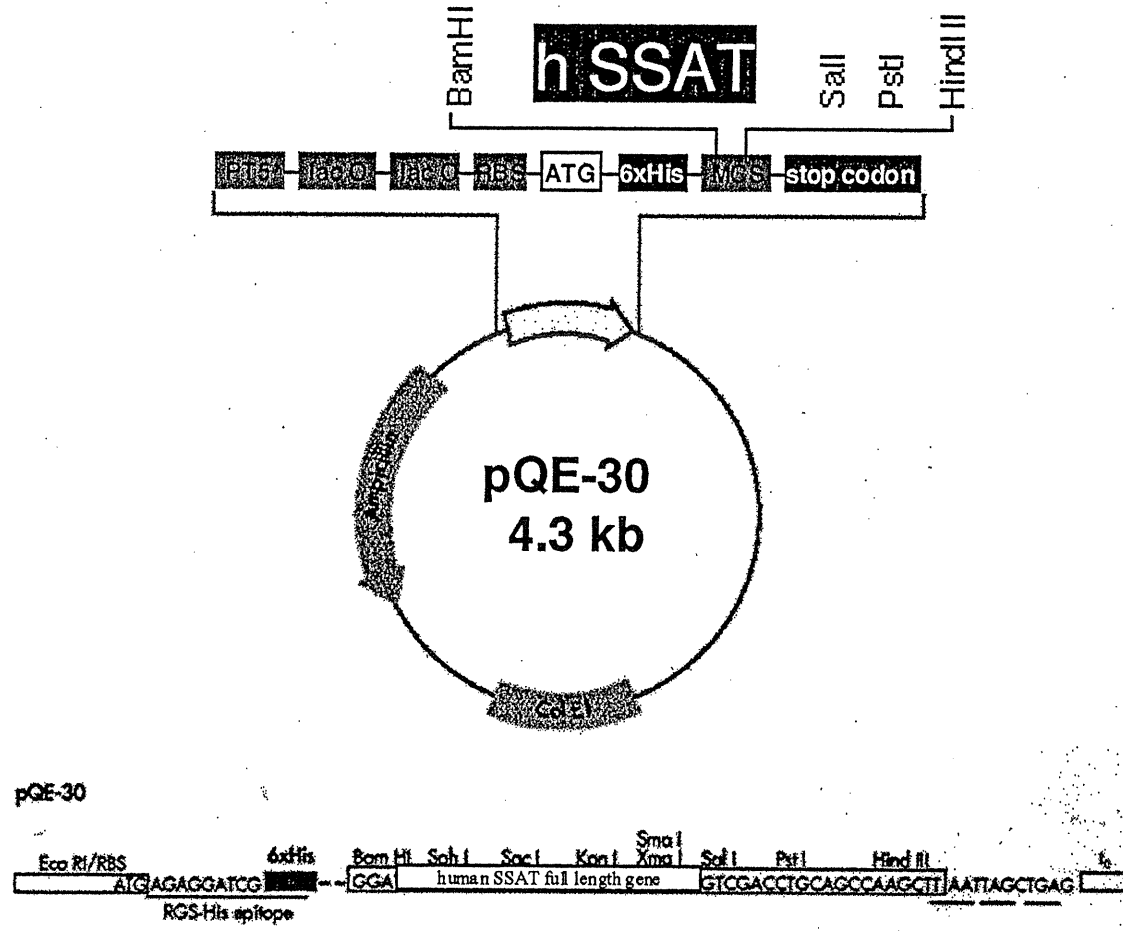


Fig.2 Graphic map of pQE-30

## 1-2 SSAT タンパクの発現と確認

次に、選択したコロニーを用いて、常法により、Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) により導入遺伝子の発現を誘導し<sup>7)</sup>、大腸菌を懸濁培養して調製した。

そして、細胞溶解剤である Bugbuster で His-tagged human SSAT を抽出したのち、その His-tag を利用して精製を行った。

複数のヒスチジン配列はコバルト等の 2 価のカチオンに強い親和性があり、このカチオンを含むメタル樹脂 (Fig. 3) を固定相に用いたカラムによって精製が可能である<sup>8)</sup>。

その結果、湿重量 1 g の大腸菌から 8.3 mg の His-tagged タンパクを得た。

精製タンパクを SDS-ポリアクリドゲル電気泳動<sup>9)</sup> (SDS-PAGE) に供したところ、分子量約 2 万の位置に単一のバンドを確認した (Fig. 4)。また、matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI TOF-MS) 分析を行うと、His-tagged human SSAT の遺伝子配列から計算される分子量 21,219 と近似した、21201.1 (m/z) にイオンピークを検出し、42417.4 (m/z) にダイマー、10607.6 (m/z) に 2 価と思われるイオンピークを確認した。

また、RI 法による SSAT 活性の確認を行ったところ、精製タンパク液の数万倍希釈溶液について酵素量及び、反応時間に依存しての活性の上昇を確認した (data not shown)。

これらのことから、精製タンパクは His-tagged human SSAT であり、培養した大腸菌は高濃度の SSAT を含んでいるものと結論した。

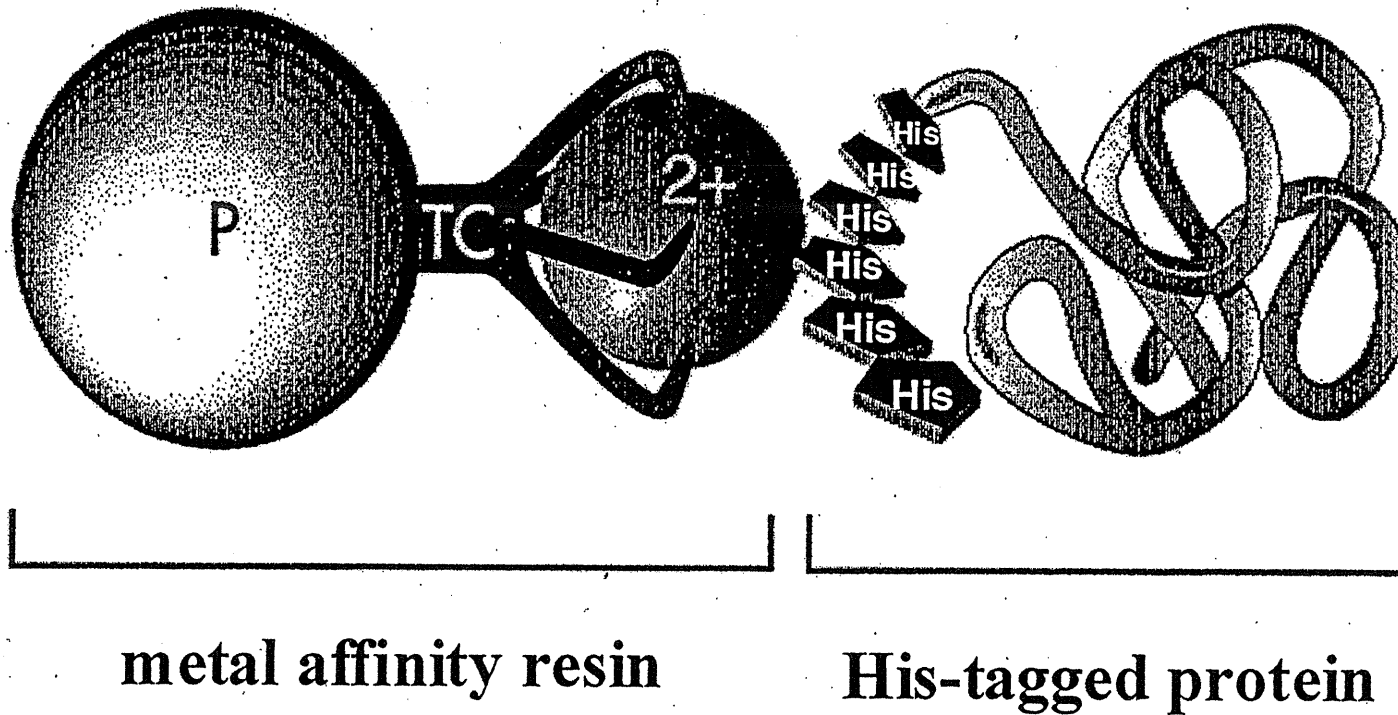
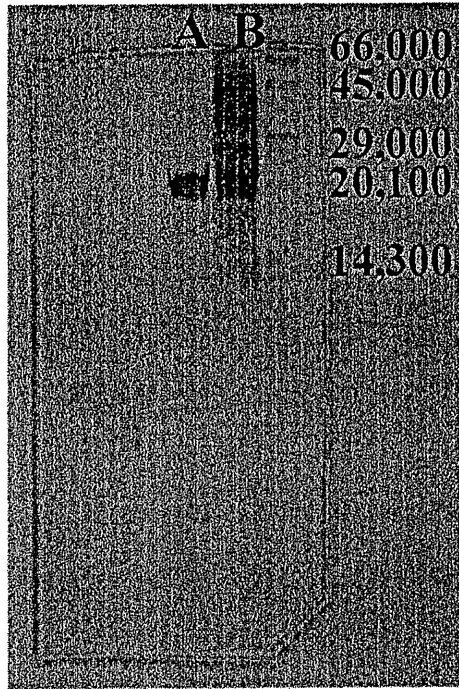


Fig. 3 Interaction of His-tagged SSAT with metal affinity resin

1.



2.

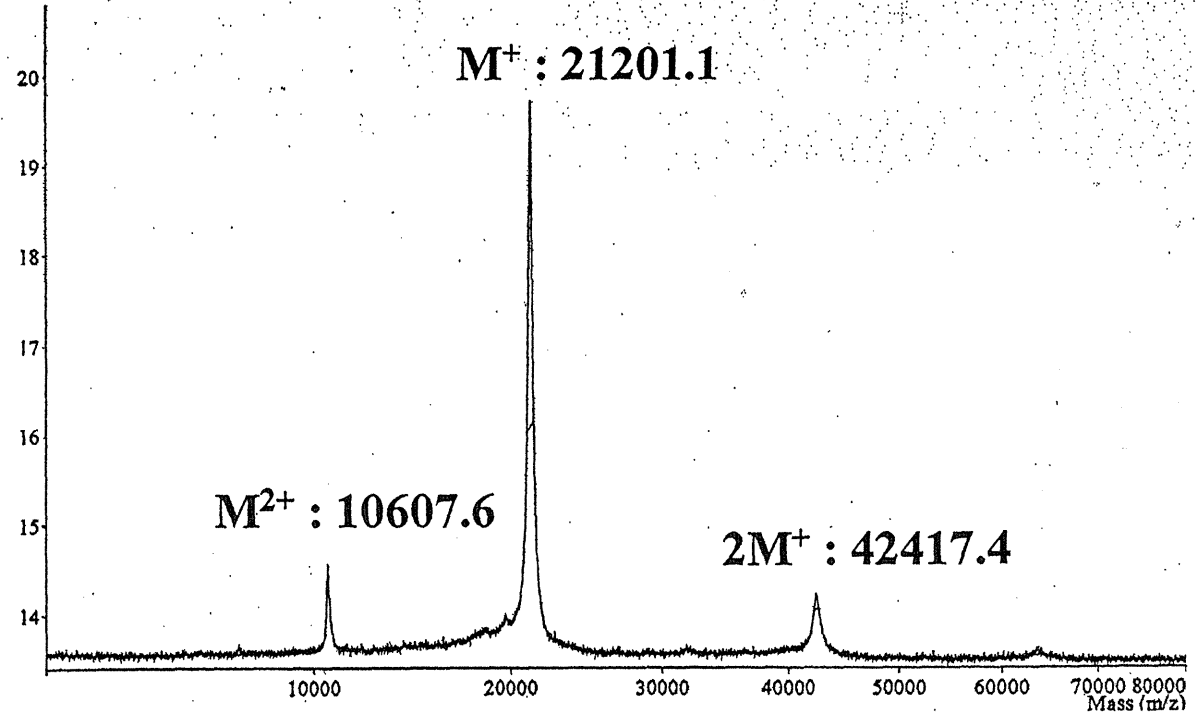


Fig. 4 Analysis of purified His-tagged human SSAT

1 : SDS-PAGE : Lane A; the purified protein, Lane B ; the crude extract from transfected *E.coli*  
2 : spectra of MALDI-TOF-MS of the purified protein

## 第2章 HPLCによるSSAT活性測定法の確立

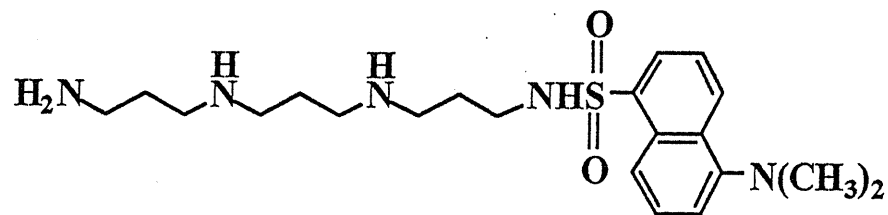
HPLCによるSSAT活性測定法を検討するにあたり、当初、生成物の検出法として、2種類の可能性を考えた。1つは、生体ポリアミンを基質として生成するアセチルポリアミンを検出する方法と、人工基質を用いアセチル化された基質を検出する方法である。前者の場合、従来のポストカラム検出法によるポリアミン検出を用いる限り約10 pmolの生成物の検出が限界であり<sup>10)</sup>、生体試料中のSSAT活性測定に応用可能な検出系としては不適當であると思われた。そこで、生体試料中の活性測定にも応用できる方法となることも念頭におき、新たに高感度な検出が可能な、蛍光人工基質を用いる後者の方法を検討することにした。

これまで、SSATの基質として報告されているものは天然のポリアミンであり、蛍光団等のついた化合物が基質となる報告はない。そこで、複数の人工基質となりうる化合物の合成から着手した。

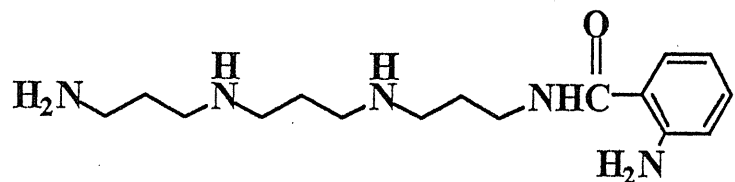
## 2-1 SSAT 蛍光基質候補化合物の合成

SSAT 蛍光基質候補化合物としては、ポリアミンで最も SSAT に対して基質親和性が高いとされているノルスペルミン<sup>11)</sup>を母核として用い、酵素基質認識に影響を与えにくいと考えられる比較的分子サイズの小さな蛍光団を結合した、*N*<sup>1</sup>-ダンシルノルスペルミン (DNS-NSpm)、*N*<sup>1</sup>-アントラニルノルスペルミン (ANT-NSpm)、*N*<sup>1</sup>-ニトロベンゾキサジアゾールノルスペルミン (NBD-NSpm) を選択し、合成した (Fig. 5)。

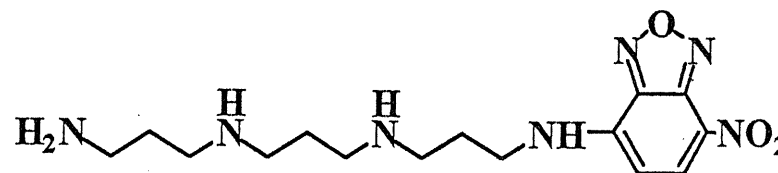
これら蛍光基質の候補化合物の合成は Fig. 6 に示すように、当研究室で行われているモノ置換ポリアミンの合成法を応用して合成した<sup>12)</sup>。即ち、ノルスペルミンの一方の一級アミノ基をトリフルオロ酢酸エチルと反応させトリフルオロアセチル化したのち、Boc 化によりもう一方の一級アミノ基及び二級アミノ基を保護し、さらにトリフルオロアセチル化したのち、蛍光団を反応させて標識し、Boc 基を脱保護した。



***N*<sup>1</sup>-Dansylnorspermine  
(DNS-NSpm)**



***N*<sup>1</sup>-Anthranylnorspermine  
(ANT-NSpm)**



***N*<sup>1</sup>-NBD-norspermine  
(NBD-NSpm)**

Fig. 5 Fluorescent substrate of SSAT

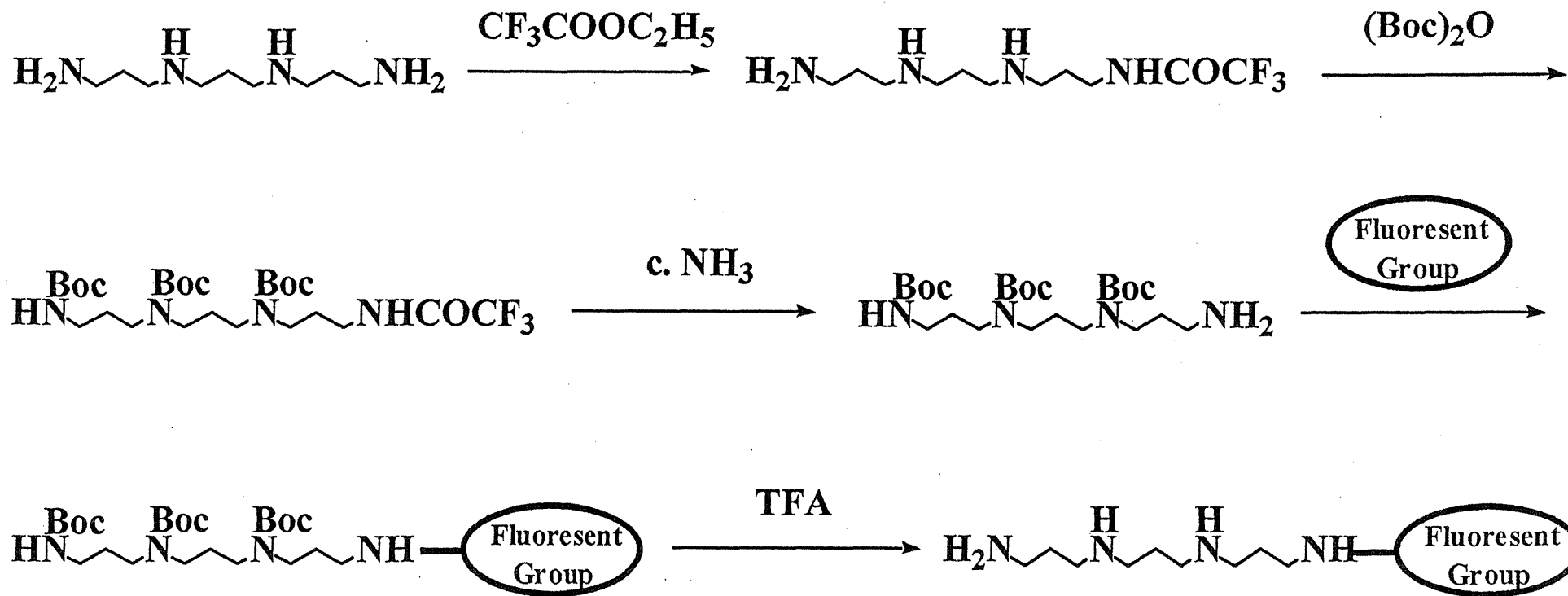


Fig. 6 Synthesis of fluorescent substrate



## 2-2 蛍光基質の SSAT に対する基質性の確認

合成した SSAT 蛍光基質及びスペルミジンについて RI 法によって SSAT に対する基質性の確認を行った。用いた酵素試料は、前章でメタル樹脂を用いて精製した His-tagged human SSAT が不安定で数日で失活することから、凍結保存した His-tagged human SSAT を発現させた大腸菌を使用直前に細胞溶解剤で処理し、遠心上清を高倍率に希釈したものとした。

酵素量及び反応時間とアセチル化される基質量の関係を調べると、いずれの基質についても酵素量依存的、反応時間依存的に生成物量は直線的に増加し、基質となることがわかった(Fig. 7)。その際、スペルミジンと比較して、1/5 の基質性ではあったが、合成した蛍光基質の中で DNS-NSpm が最も SSAT に対して基質性が高いことを確認した。

そこで、この DNS-NSpm から生成するアセチル体を HPLC 上で検出できるかを次に調べた。

RI 法と同様の反応条件で、SSAT 存在下、アセチル CoA と反応させた。DNS-NSpm をイオン対逆相 HPLC で検出すると、Fig. 8 に示すように、DNS-NSpm の保持時間より短い位置に 1 つのピークを検出した。そのピークは別途合成したアセチル体のピークと一致した (Fig. 8 C, D)。

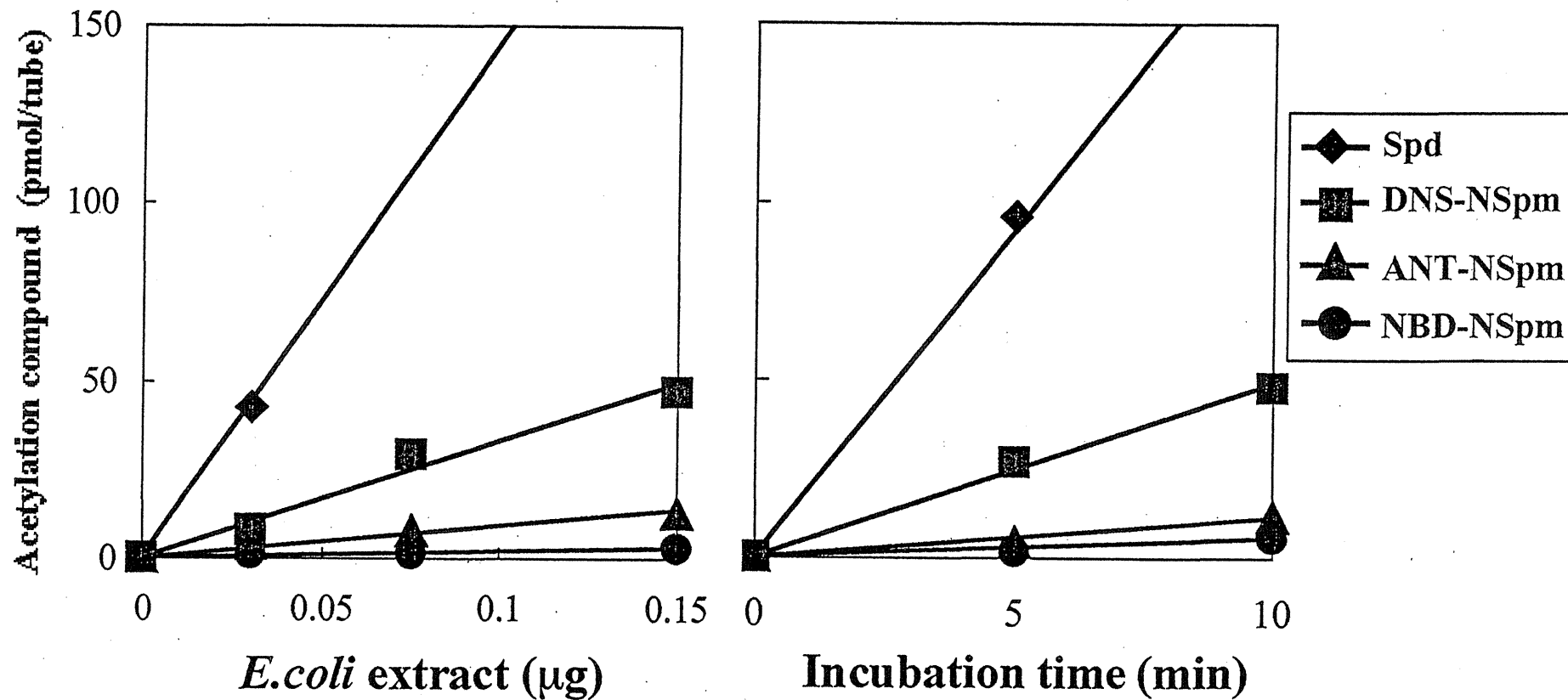


Fig. 7 Acetylation of synthetic substrate with  $^{14}\text{C}$ -acetylCoA in the presence of SSAT

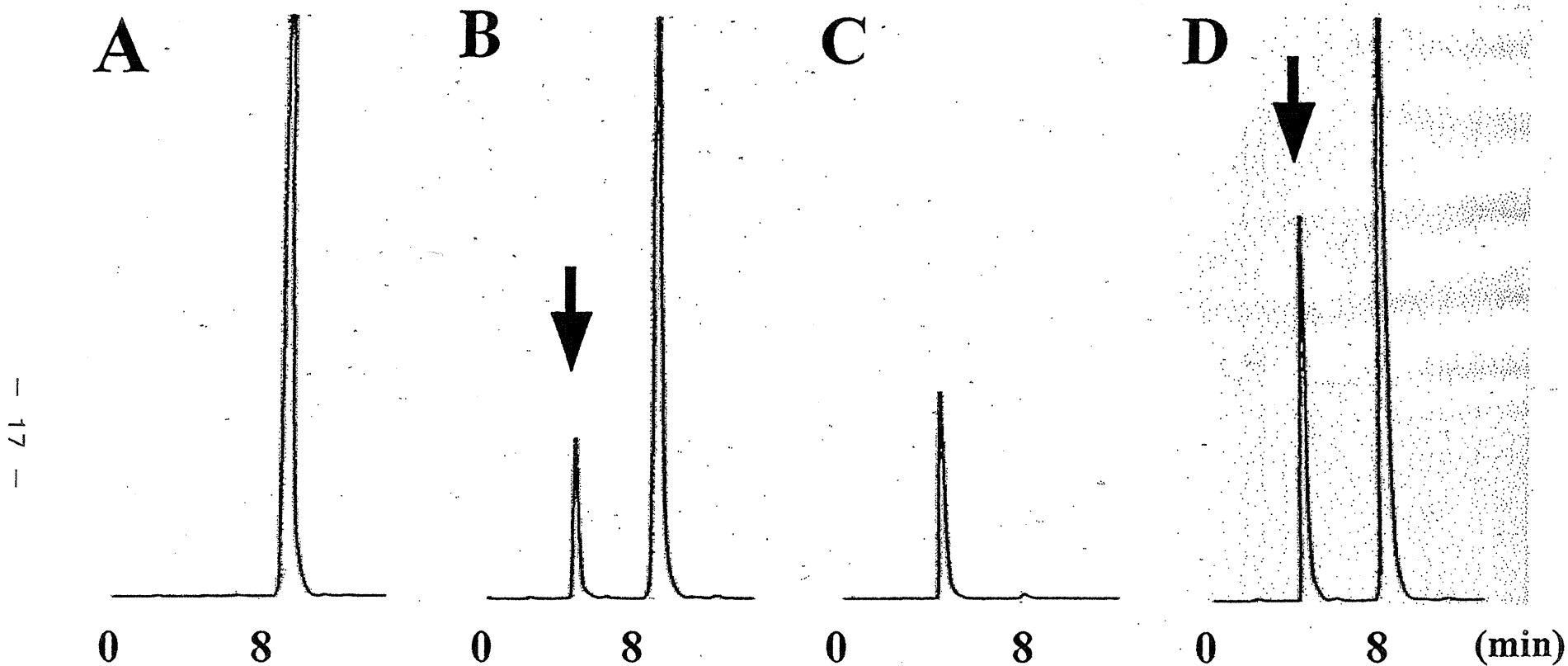


Fig. 8 Acetylation of DNS-NSpm with SSAT

Enzyme reaction mixture was treated with 10 % trichloroacetic acid and the supernatant was injected into HPLC after centrifugation. The arrow indicated the peak of reaction product. A ; before incubation, B ; 10 min incubation, C ; Ac-DNS-NSpm (100 pmol), D ; 10 min incubation + Ac-DNS-NSpm (100 pmol)

### 2-3 DNS-NSpm の SSAT に対するスペルミジンとの競合性の確認

Fig. 9 は、スペルミジンをそれぞれ 0, 50, 100  $\mu\text{M}$  となるように加えた反応溶液について、基質濃度を変化させて調べた活性を HPLC により測定し、Lineweaver-Burk Plot で示したものである。スペルミジンの共存によっても、 $V_{\text{max}}$  は変化せず、 $K_{\text{m}}$  がスペルミジン量依存的に増加し、スペルミジンが SSAT に対し、DNS-NSpm と競合していることがわかった。

すでに Pegg らは、ラット精製 SSAT を用いて反応速度論的な解析を行い、SSAT による酵素反応は基質結合部位にスペルミジンおよびアセチル CoA が順番に結合する Bi-Bi 反応であることを報告している。したがって、本来  $K_{\text{m}}$  値の測定には、両基質濃度を変化させて詳細な解析が必要になるが、今回はスペルミジンが共存しないときの競合実験の結果から、アセチル CoA の濃度が 7.3  $\mu\text{M}$  における見かけの  $K_{\text{m}}$  値を算出した。その結果、見かけの  $K_{\text{m}}$  値は 3.0  $\mu\text{M}$  となり、以前同条件で測定されたノルスペルミジンの見かけの  $K_{\text{m}}$  (9  $\mu\text{M}$ ) と同等か若干小さいことがわかった。このことにより、DNS-NSpm の基質結合部位への結合に、DNS アミドプロピル基の疎水性が関与する可能性が示唆された。

### 2-4 ヒト組換え体 SSAT を用いる阻害剤スクリーニング条件の確立

これまでに検討した結果を踏まえて、Fig. 10 に示すヒト組換え体 SSAT を用いる阻害剤のスクリーニング条件を設定した。

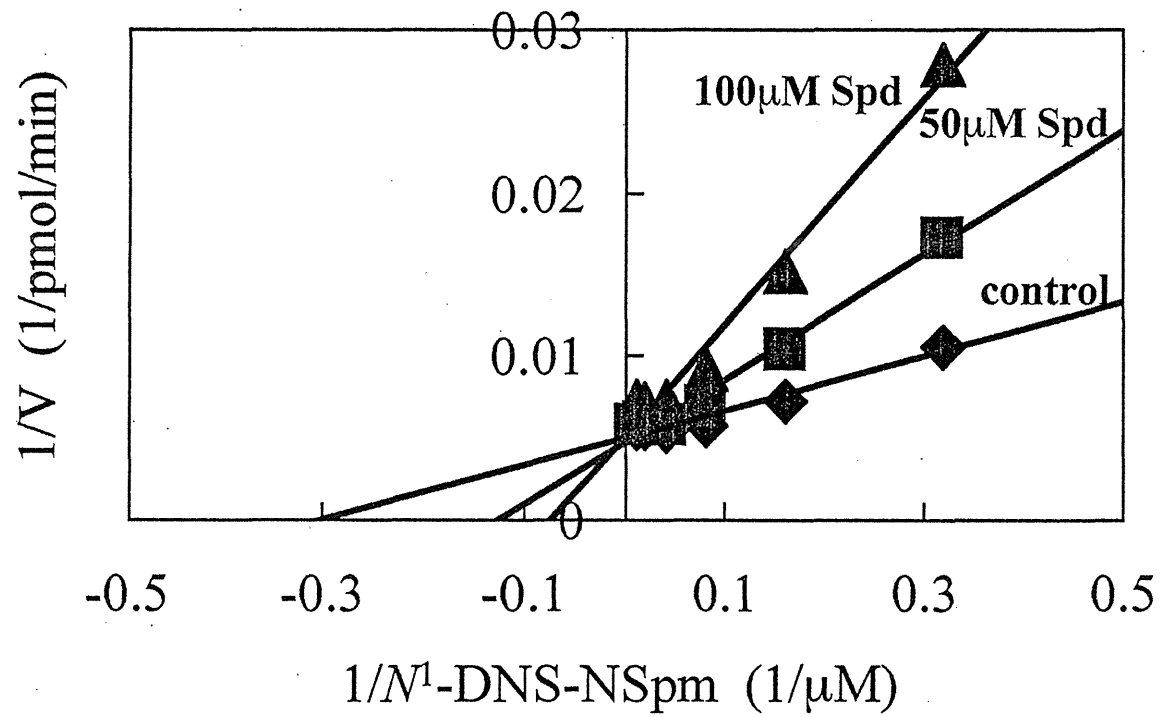


Fig. 9 Inhibition of SSAT by Spermidine

## Experimental conditions

0.1 M Tris/HCl buffer (pH 7.8)  
7.3  $\mu$ M Acetyl CoA  
50  $\mu$ M *N*<sup>1</sup>-Dansylnorspermine  
Enzyme solution

---

100  $\mu$ L

Incubated at 30 °C for 10 min

↓  
Added 20  $\mu$ L of 60% TCA

↓  
Centrifuged at 1,2000 x g for 2 min

↓  
Injected 10  $\mu$ L of supernatant to HPLC

## HPLC conditions

Column: TOSOH ODS 80Ts (25 °C)

Mobil phase: 0.1%TFA and 8 mM sodium octanesulfonate in 75% (v/v) MeOH

Flow rate: 1.0 mL/min

Detection: Ex 333 nm Em 544 nm

Fig. 10 Assay for SSAT by HPLC method

### 第3章 SSAT阻害剤及び候補化合物の阻害強度の比較

SSAT を阻害する化合物の検索は、これまでに数多く報告されているが、細胞に投与して特異的な作用を示すことが確かめられた化合物の報告はない。しかし、特異的ではないが、比較的強い阻害効果をもつものとして、抗寄生虫薬であるベレニル (Ber) やペンタミジン (Pen)、抗ガン候補化合物として開発が進められているジエチルノルスペルミン (DE333) 及びジエチルスペルミン (DE343) などが知られている<sup>13, 14)</sup>。そこで、本研究で開発したスクリーニング法をこれらの化合物などに適用し、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を比較した。種々の濃度の阻害剤を共存させたときの活性の変化を Fig. 11 に示し、その阻害剤の構造と IC<sub>50</sub> を Table 1 に示した。既知の SSAT 阻害剤の IC<sub>50</sub> 値は DE333 < DE343 < Ber < Pen の順であり、これまでの報告とほぼ一致した。しかし、いずれの IC<sub>50</sub> 値も基質濃度 (50 μM) より大きく、基質である DNS-NSpm がこれらの既知阻害剤よりも強く活性部位に作用することが示唆された。疎水性基を有するポリアミンアナログが強い阻害を示すことが示唆されたので、芳香環をもつ Tos 基を有する N<sup>1</sup>-トシルノルスペルミン (Tos-333) を合成し調べたところ、基質濃度 (50 μM) に近い IC<sub>50</sub> 値 (90 μM) を示した。また、アミノプロピル基が 1 つ少ない N<sup>1</sup>-トシルノルスペルミジン (Tos-33) の IC<sub>50</sub> 値は Tos-333 のそれに比べて約 70 倍大きく、ノルスペルミジン構造を酵素は強く認識することが示唆された。

さらに、疎水性基として長鎖のアルキル鎖を有する N<sup>1</sup>, N<sup>7</sup>-ジヘキシルノルスペルミジン (DH33)、N<sup>1</sup>, N<sup>3</sup>-ジデシル-1, 3-ジアミノプロパン (DD3) についても調べたところ、これまでに報告されている最も強力な SSAT 阻害剤の 1 つである DE333 と比較して、DH33 で約 7 倍、DD3 で約 70 倍強い阻害を示すことがわかった。

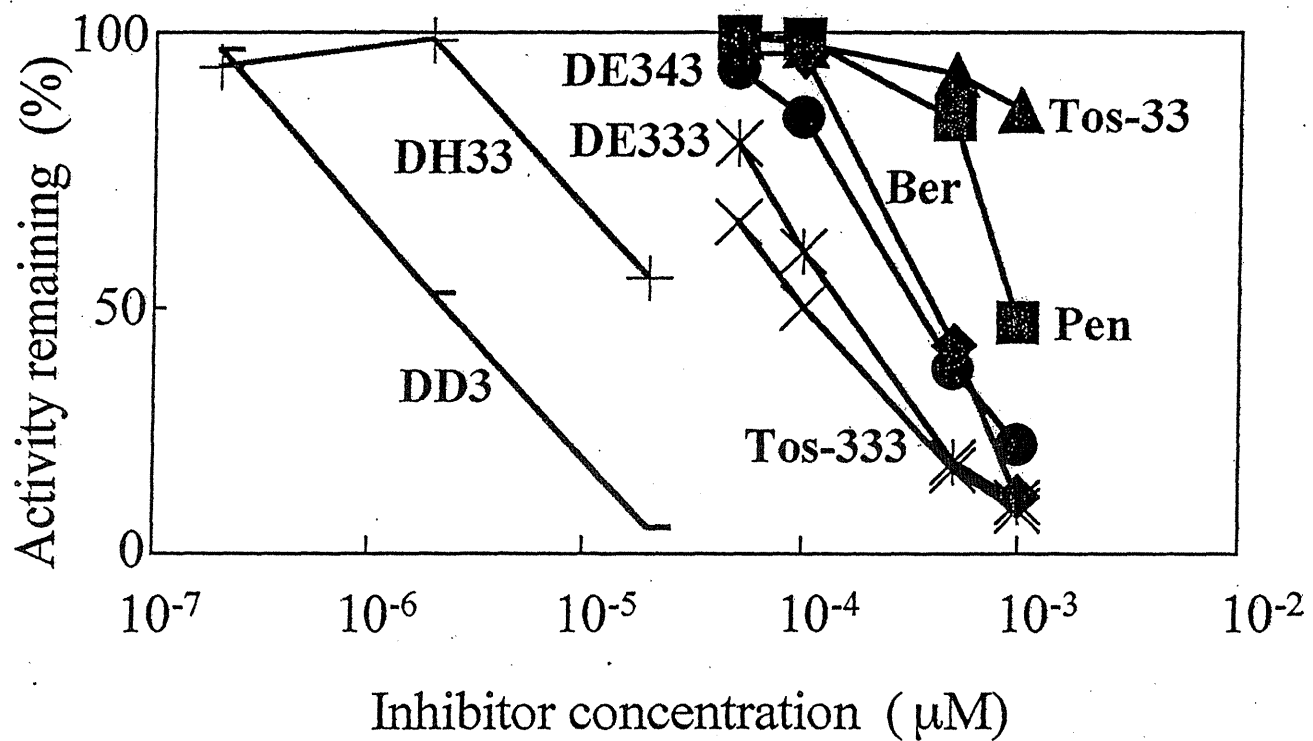
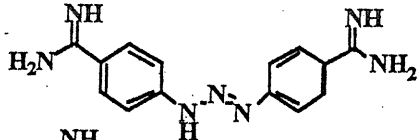
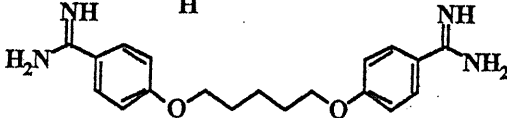
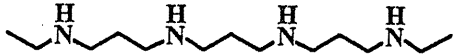
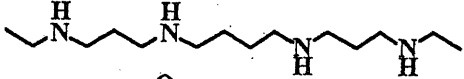
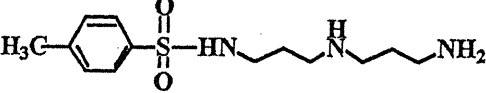

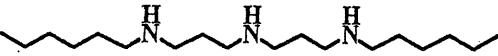
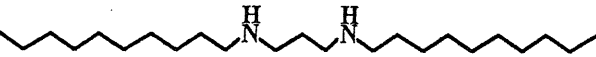


Fig. 11 Inhibition of SSAT by Inhibitors



Table 1 IC<sub>50</sub> for SSAT

Compound	Structure	IC <sub>50</sub> (μM)
Berenil (Ber)		370
Pentamidine (Pen)		1061
Diethylnorspermine (DE333)		140
Diethylspermine (DE343)		340
N <sup>1</sup> -Tosylnorspermidine (Tos-33)		6210
N <sup>1</sup> -Tosylnorspermine (Tos-333)		90
Dihexylnorspermine (DH33)		21
Didecyl-1,3-diaminopropane (DD3)		2

#### 第4章 まとめと考察

本研究により、組換え体ヒト SSAT の基質となる蛍光標識ノルスペルミンを合成した。その中で最も基質性の高かった DNS-NSpm を基質として用い、酵素反応により生成するアセチル体を HPLC で検出することにより阻害剤スクリーニングに有用な簡便で安価な SSAT 活性測定法を確立した。本法はオートサンプラーと組み合わせることで、一日に 100 から 200 検体の測定も可能であり、広範囲な構造を有する化合物の SSAT 活性阻害化合物のスクリーニング法としてきわめて有用であると思われる。

本法で用いる合成基質である DNS-NSpm は、組換え体 SSAT に対してかなり小さな見かけの  $K_m$  値を示すため、共存成分の影響を受けにくく SSAT 活性測定に有用と思われる。一方、このことは DNS 構造が活性部位に存在する疎水性の部位と相互作用していることを示すものであり、スペルミジンとは競合しない疎水性基を有する化合物が、本法の活性を強く阻害する可能性も否定できない。したがって、今回本法により見出された強力な阻害化合物が細胞内で有効な阻害剤となるためには、詳細な検討が今後さらに必要であることはいうまでもない。しかし、本研究により最も強力とされている既知の阻害剤よりも  $IC_{50}$  値の小さな化合物が見出されたことは、SSAT の阻害剤開発、SSAT の生理機能解明に向け、新たな視点を提供するものと思われる。

## 実験の部

### 試薬・材料

遺伝子導入、スクリーニングにおいて使用した、human SSAT 挿入プラスミド pQE-30 (pQE-30/hSSAT)はペンシルベニア州立大学 A. E. Pegg 教授より供与されたものを用いた。Epicurian Coli XL1-Blue cells は STRATAGENE 社から、Bugbuster は Novagen 社から、Triptone、Yeast extract、Agar、Ampicillin は和光純薬工業株式会社から、MgCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、D-(+)-Glucose、Tetracycline は Sigma 社から購入した。

酵素精製で使用した TALON Purification Kit は CLONTECH 社から購入した。

RI 活性測定において使用した、スペルミジン塩酸塩は東京化成工業株式会社から、Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)は Sigma 社から、[1-<sup>14</sup>C]-AcetylCoA は室町薬品株式会社から購入した。

蛋白定量において、標準蛋白として用いた牛血清アルブミン (BSA) は生化学工業株式会社のもの、クマシーブリリアントブルー試薬は Bio-Rad 社から購入した。

HPLC による活性測定で使用した、AcetylCoA は Sigma 社から、トリフルオロ酢酸、1-オクタンスルホン酸ナトリウム、HPLC 用蒸留水及び HPLC 用メタノールは和光純薬工業株式会社から購入した。

SDS-ポリアクリドゲル電気泳動で用いた電気泳動用グラジエントゲルプレートマルチゲル 15/25 は第一化学薬品株式会社から購入した。

SSAT 蛍光基質の合成において使用した、*N,N'*-Bis(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine (norspermine)は Aldrich 社から、トリエチルアミン、二炭酸ジ-*tert*-

ブチル、トリフルオロ酢酸エチル、ダンシルクロリド、イサト酸無水物、4-Chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl)は東京化成工業株式会社から購入した。

### 遺伝子導入

大腸菌への遺伝子導入操作はヒト SSAT 挿入プラスミド pQE-30 (pQE-30/hSSAT)を *E.coli* (XL-1 Blue supercompetent cell) にヒートショック法により導入した。即ち *E.coli* 液 100  $\mu$ l に 1.42 M  $\beta$ -Mercaptoethanol 1.7  $\mu$ L 加え、氷中で 10 分間インキュベーション後、ヒト SSAT 挿入プラスミド溶液 1  $\mu$ L 加え、氷中で 30 分間インキュベーション後、42°C で 45 秒間インキュベーションし、再び氷中で 2 分間インキュベーションして遺伝子を導入した。

### セレクトション

遺伝子導入を行った溶液に、SOC medium (1 L あたり triptone 20.0 g、yeast extract 5.0 g、NaCl 0.5 g、1 M MgCl<sub>2</sub> 10.0 mL、1 M MgSO<sub>4</sub> 10.0 mL、20% glucose 20 mL を含む) 0.9 mL を添加し、37°C、1 時間インキュベーション後、LB-amp agar medium plate (1 L あたり triptone 10.0 g、yeast extract 5.0 g、NaCl 10.5 g、agar 20.0 g、ampicillin 50 mg を含む) 25 mL に 200  $\mu$ L を蒔き、37°C、24 時間インキュベーションし、発現したコロニーをクローンとし、そのコロニーを LB-amp agar medium plate に 2.0% X-gal 100  $\mu$ L、10 mM IPTG 100  $\mu$ L を塗布した LB-amp - X-gal agar medium plate に植えた後、37°C、24 時間インキュベーションし白いコロニーが発現することにより遺伝子導入を確認した。

### 大腸菌培養

遺伝子導入した大腸菌のコロニーを 1 つ取り、LB-amp medium (1 L あたり triptone 10.0 g、yeast extract 5.0 g、NaCl 10.5 g、ampicillin 50 mg を含む) 300 mL に蒔き、37°C で振とう培養した。OD<sub>600</sub>を確認し、OD<sub>600</sub>が 0.6~0.7 で 1 M IPTG 150  $\mu$ L を加え、更に一晩培養後この培養液を 9,200 x g、15 分間遠心して大腸菌のペレットを得た。

### 酵素精製

ヒト SSAT 遺伝子導入大腸菌 1.0 g に bugbuster 5.0 mL 加え、氷中で 30 分間攪拌した後、4,000 x g、20 分間遠心しその上清を酵素原液とした。酵素原液 3.0 mL を取り、TALON metal affinity resin 2 mL 中に加え、20 分振とうして SSAT を吸着させた後、700 x g、5 分間遠心し、その上清を除き、Extraction/wash buffer (300 mM NaCl を含む、50 mM リン酸緩衝液 pH7.0) を 20 mL 加え、10 分間振とうして洗浄した後、700 x g、5 分間遠心し上清を除き、樹脂をカラムに移し、Extraction/wash buffer 5.0 mL で洗浄後、Elution buffer (300 mM NaCl、150 mM イミダゾールを含むリン酸緩衝液) 5 mL で溶出し精製液とした。

### 蛋白定量

蛋白定量は、標準蛋白として牛血清アルブミンを用いて Bradford 法により行った。

### SDS-ポリアクリドゲル電気泳動

試料溶液に等量の電気泳動サンプル緩衝液 [0.1 M Tris/HCl (pH 7.6), 4 % SDS, 12% Mercaptoethanol, 20% Glycerol, 0.01% Bromophenol blue] を加え、90°C、20分間処理し冷後、電気泳動用グラジエントゲルプレートマルチゲル 15/25 を用いて、SDS-ポリアクリドゲル電気泳動を行い分離した。

ゲルをクマシーブリリアントブルー染色し、バンドを検出した。即ち、ゲルを染色液 A (EtOH 25 mL, H<sub>2</sub>O 60 mL, 35 % HCHO 15 mL, Coomassie brilliant blue R-250 0.125 g) で1時間処理し、次に染色液 B (EtOH 25 mL, H<sub>2</sub>O 75 mL, 35% HCHO 1 mL, Coomassie brilliant blue R-250 0.125 g) で3時間処理した。続いて脱色液 C (EtOH 125 mL, H<sub>2</sub>O 375 mL, 35 % HCHO 5 mL) で約3時間処理しバンドを検出した。

### RI 法による SSAT 活性測定

0.1 M トリス/塩酸緩衝液 (pH 7.8)、3.0 mM スペルミジン、0.4  $\mu\text{Ci/mL}$  [1-<sup>14</sup>C]-アセチル CoA の混合溶液と酵素溶液をそれぞれ 37°C、2 分間プレインキュベーションしたのち、混合溶液に酵素溶液を加え反応溶液を 100  $\mu\text{L}$  とし 30°C、10 分間インキュベーションし、1 M ヒドロキシルアミンを 20  $\mu\text{L}$  加え反応を停止させ、3,000 x g、5 分間遠心後、その上清 50  $\mu\text{L}$  を取り、ホスホセルロースディスクに乗せた。そのディスクをを水・エタノールで洗浄後エコノフロア-10 mL の入ったバイアルビンに入れ、液体シンチレーションカウンターで計数し、その放射活性を測定した。

### $N^1, N^4, N^8$ -トリボックノルスペルミンの合成

$N, N'$ -Bis(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine(norspermine) 0.9 g (4.78 mmol) をメタノール 100 mL に溶かし、トリフルオロ酢酸エチル 570  $\mu$ L を添加し、アセトンドライアイス冷下で 6 時間反応させた。この反応液に二炭酸-*tert*-ブチル 6.26 g(28.68 mmol)を添加し室温で 21 時間反応させた。この反応溶液に濃アンモニア水 35 ml を添加し室温で 16 時間反応させた。その後溶媒を留去し、クロロホルム・メタノール・アンモニア水を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、 $N^1, N^4, N^8$ -トリボックノルスペルミンを得た。(1.54 g, 収率 66.1%, FAB-MS: 489[C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>]<sup>+</sup>)

### $N^1$ -ダンシルノルスペルミンの合成

$N^1, N^4, N^8$ -トリボックノルスペルミン 0.2 g (0.41 mmol) をメタノール 2 mL に溶かし、トリエチルアミン 0.26  $\mu$ L(2.0 mmol)、ダンシルクロライド 107.9 mg(0.4 mmol) 添加後室温で 16 時間反応させた。なおこの操作以降はすべて遮光条件で行った。その後、溶媒を留去しクロロホルム・メタノール・アンモニア水を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、 $N^1$ -ダンシル  $N^4, N^8, N^{11}$ -トリボックノルスペルミンを得た。(0.24 g, 収率 82.4%, FAB-MS: 721[C<sub>36</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S]<sup>+</sup>)

$N^1$ -ダンシル  $N^4, N^8, N^{11}$ -トリボックノルスペルミン 0.24 g (0.33 mmol) にトリフルオロ酢酸 0.79 mL を添加して、室温で 3 時間反応させ脱保護し、トリフルオロ酢酸を留去後、エタノール 5.0 mL に溶かし、2.0 M 塩酸飽和エーテル 1.6 mL を添加し  $N^1$ -ダンシルノルスペルミン・四塩酸塩を得た。(0.23 g, 収率 51.2%, FAB-MS : 422[C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S]<sup>+</sup> Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S·4HCl·H<sub>2</sub>O : C, 44.45 ; H,

6.93 ; N, 12.34. Found : C, 43.02 ; H, 7.33 ; N, 11.73)

### $N^1$ -アントラニルノルスペルミンの合成

$N^1, N^4, N^8$ -トリボックノルスペルミン 0.2 g (0.41mmol) をメタノール 2mL に溶かし、トリエチルアミン 0.26 $\mu$ L (2.0 mmol)、イサト酸無水物 65.3 mg (0.41 mmol) を添加し、室温で 7 時間反応させた。なおこの操作以降はすべて遮光条件で行った。その後、溶媒を留去しクロロホルム・メタノール・アンモニア水を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、 $N^1$ -アントラニル  $N^4, N^8, N^{11}$ -トリボックノルスペルミンを得た。(90.0 mg, 収率 37.0%, FAB-MS: 608[C<sub>31</sub>H<sub>53</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>]<sup>+</sup>)

$N^1$ -アントラニル  $N^4, N^8, N^{11}$ -トリボックノルスペルミン 90 mg (0.15 mmol) にトリフルオロ酢酸 300  $\mu$ L 添加して、室温で 4 時間処理し、トリフルオロ酢酸を留去後、エタノール 5.0 mL に溶かし、2.0 M 塩酸飽和エーテル 1.6 mL を添加し  $N^1$ -アントラニルノルスペルミン・四塩酸塩を得た。(181.32 mg, 収率 6.55%, FAB-MS : 308[C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O]<sup>+</sup> Anal. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O · 4HCl: C, 42.40 ; H, 7.34 ; N, 15.45. Found : C, 42.65 ; H, 7.33 ; N, 15.52)



### $N^1$ -NBD-ノルスペルミンの合成

$N^1, N^4, N^8$ -トリボックノルスペルミン 0.2 g (0.41 mmol) をメタノール 2 mL に溶かし、トリエチルアミン 0.26  $\mu$ L (2.0 mmol)、4-Chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl) 100 mg 0.50 (mmol) を添加し、55°C、3 時間反応させた。なおこの操作以降はすべて遮光条件で行った。その後、溶媒を留去しクロロホルム・メタノール・アンモニア水を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、 $N^1$ -NBD- $N^4, N^8, N^{11}$ -トリボックノルスペルミンを得た。(191 mg, 収率 73.2%, FAB-MS: 652[C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>]<sup>+</sup>)

$N^1$ -NBD- $N^4, N^8, N^{11}$ -トリボックノルスペルミン 155 mg (1.45 mmol) にトリフルオロ酢酸 520  $\mu$ L 添加して、室温で 3 時間処理し、トリフルオロ酢酸を留去後、エタノール 5.0 mL に溶かし、2.0 M 塩酸飽和エーテル 0.7 mL を添加し  $N^1$ -NBD-ノルスペルミン・四塩酸塩を得た。(184.0 mg, 収率 23.9%, FAB-MS : 352[C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> Anal. Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> · 3HCl: C, 39.10 ; H, 6.12 ; N, 121.28. Found : C, 38.44 ; H, 5.89 ; N, 20.54)

### HPLC 法による SSAT 活性測定

0.1M トリス/塩酸緩衝液 (pH 7.8)、50  $\mu$ M  $N^1$ -DNS-NSpm、7.3  $\mu$ M [1-<sup>14</sup>C]-アセチル CoA の混合溶液と酵素溶液をそれぞれ 30°C、2 分間プレインキュベーションした後、混合溶液に酵素溶液を加え反応溶液を全量 100  $\mu$ L とし酵素反応を開始させた。10 分間反応後、60% TCA 20  $\mu$ L 加え、12,000 x g、2 分間遠心し徐タンパクし、その上清 10  $\mu$ L をイオン対逆相 HPLC を用いて分析した。測定条件は、分析カラム : TOSOH ODS 80Ts ; 溶離液 : 0.1% TFA, 8.0 mM オクタンズルホン酸ナトリウム含有 75%(V/V) メタノール ; 流速 : 1.0 mL/min ; 蛍光検

出波長 : Ex 333 nm Em 544 nm で行った。

- 1) Tabor, C. W., and Tabor, H., *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 749-790 (1984)
- 2) A. E. Pegg, *Cancer Res.*, **48**, 759 (1988)
- 3) P. R. Libby, *J. Biol. Chem.*, **253**, 233 (1978)
- 4) Persson. L., Pegg. A.E., *J. Biol. Chem.*, **259**, 12364-12367 (1984)
- 5) A. E. Pegg, *Biocemistry*, **38**, 2462-2470 (1999)
- 6) Zuidema. D., Schouten. A., Usmany. M., Maule. A. J., Belsham. G. J., Roosien. J., *J. Gen. Virol.*, **71**, 2201-2209 (1990)
- 7) Liu. X. Q., Zhang. S., Pan, X. M., Wang. C. C., *Protein. Sei.*, **8**, 2085-2089 (1999)
- 8) A. Volcov, *J. Mol. Biol.*, **262**, 595-599 (1996)
- 9) V. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 10) Beppu. T., Shirahata. A., Takahashi. A., Hosoda. H. and Samejima. K., *J. Biochem.*, **117**, 339 (1995)
- 11) F. D. Ragione, A. E. Pegg, *Biochem. J.*, **213**, 701-706 (1983)
- 12) Andrew. J., Geall. and Ian. S., Blagbrough, *Tetrahedron*, **56**, 2449-2460 (2000)
- 13) P. R. Libby, C. W. Porter, *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 830-832 (1992)
- 14) Wu. R., Saab. N. H., Huang. H., Wiest. L., Pegg. A. E., Casero. R. A. Jr., Woster. P. M., *Bioorg. Med. Chem.*, **4**, 825-836 (1996)

N<sup>1</sup>-ダンシルノルスペルミンを用いた SSAT 活性測定法の  
速度論的解析と培養細胞由来試料への応用

【 略 号 】

ODC : ornithine decarboxylase  
AdoMetDC : S-adenosylmethionine decarboxylase  
SpdSyn : spermidine synthase  
SpmSyn : spermine synthase  
SSAT : spermidine / spermine  $N^1$ -acetyltransferase  
PAO : polyamine oxidase  
Put : putrescine  
Spd : spermidine  
Spm : spermine  
AdoMet : S-adenosylmethionine  
DeAdoMet : decarboxylated S-adenosylmethionine  
MTA : 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine  
NSpd : norspermidine  
 $N^1$ -DNS-NSpm :  $N^1$ -dansylnorspermine  
AcDNS-NSpm :  $N^1$ -acetyl- $N^{11}$ -dansylnorspermine  
DENSPM :  $N^1, N^{11}$ -diethylnorspermine  
 $N^1$ -Tosyl-NSpd :  $N^1$ -tosylnorspermidine  
 $N^1$ -Tosyl-NSpm :  $N^1$ -tosylnorspermine  
 $N^1, N^{11}$ -Ditosyl-NSpm :  $N^1, N^{11}$ -ditosylnorspermine  
RI : radio isotope  
HPLC : high performance liquid chromatography  
TFA : trifluoroacetic acid

## 【 緒 論 】

スペルミジン、スペルミンに代表されるポリアミンはその生合成律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の活性が細胞増殖刺激に対して早い時期に上昇することや、核酸と強く相互作用することから、細胞内における遺伝子発現過程に重要な働きをするものと考えられている<sup>1)</sup>。ポリアミンの生合成は ODC、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (AdoMetDC)、スペルミジン合成酵素 (SpdSyn)、スペルミン合成酵素 (SpmSyn) の4種の酵素が担っている。また、一度スペルミジン/スペルミン  $N^1$ -アセチル基転移酵素 (SSAT) によってアセチル化された後ポリアミン酸化酵素 (PAO) により酸化的に分解される代謝経路も存在する。(Fig. 1)

この経路はポリアミンの過剰な蓄積を防ぐものと考えられているが、組織が傷害を受けたときにも著しく SSAT 活性が上昇することが知られている<sup>2)</sup> など、詳細な役割は未だ不明である。また、他のポリアミン合成・代謝系の酵素には有効な阻害剤が開発されているのに対して、生細胞における SSAT の有効な阻害

剤は見出されておらず、未知の部分の多い酵素である。

これまで、当研究室では SSAT に対する強力な阻害剤を開発することを目指して研究を進めてきている。従来、SSAT の活性測定は、基質にスペルミジン、[1-<sup>14</sup>C]-アセチル CoA を用いて、生成する *N*<sup>1</sup>-アセチルスペルミジンの放射線を計数する RI 法が用いられてきた<sup>3)</sup> が、本法は基質が高価であり、また測定操作が繁雑であるため、昨年、当研究室の深沢は新規の蛍光基質である *N*<sup>1</sup>-Dansyl norspermine (*N*<sup>1</sup>-DNS-NSpm) を用いた HPLC による簡便な SSAT 活性測定を試み、本酵素の阻害剤スクリーニング法として有用であることを示した<sup>4)</sup>。

本研究では、HPLC による SSAT 活性測定法の高感度化を試み、更に本法の詳細な活性測定条件を検討した後、細胞内 SSAT 活性測定への応用を目的とし、更に阻害剤スクリーニングのための条件検討も行うことにした。

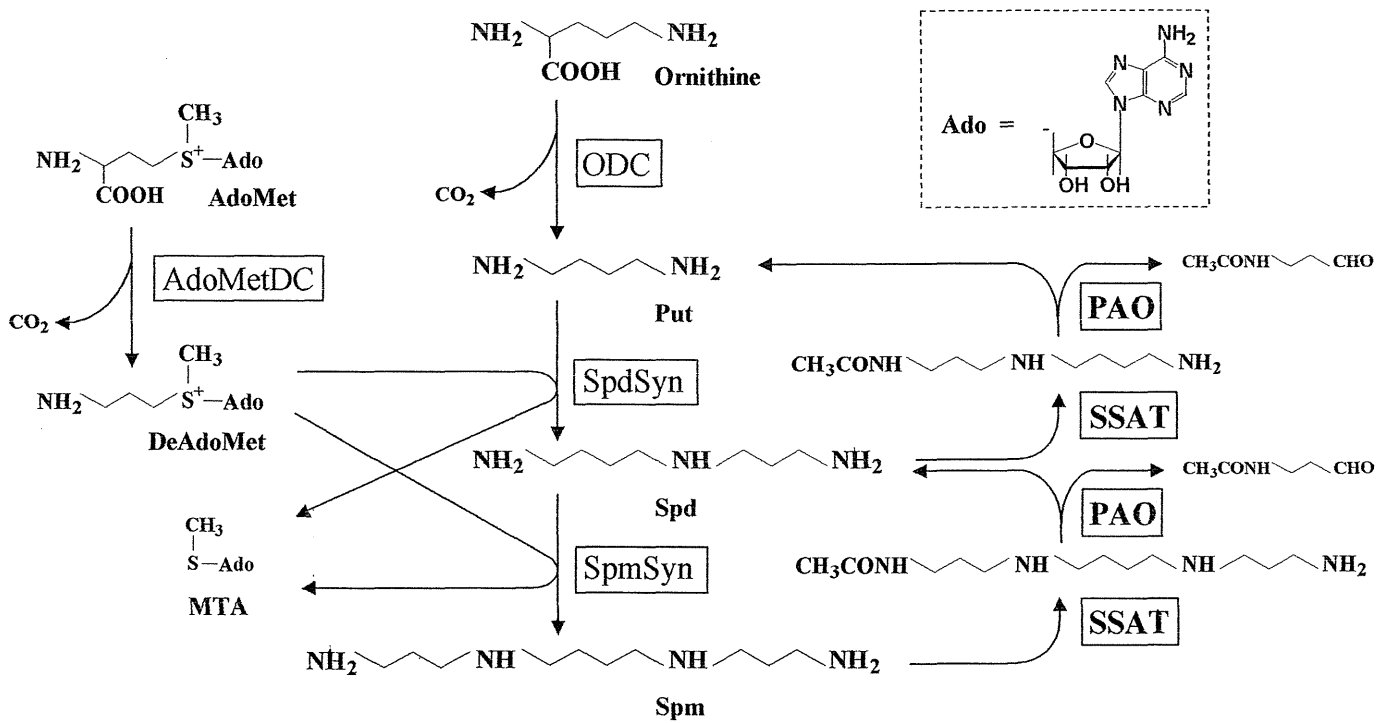


Fig. 1 Biosynthesis and interconversion of polyamine



## 【 本 論 】

### 第1章 HPLC による SSAT 活性測定法の簡便化及び高感度化

HPLC による SSAT 活性測定法を低レベルな細胞内 SSAT 活性測定へ応用するためには、高感度化が望まれたため、基質として用いる  $N^1$ -DNS-NSpm の合成法の検討を行い、HPLC チャート上での夾雑ピークの除去を行った。更に蛍光団としてダンシル基を有する生成物である AcDNS-NSpm の蛍光強度が有機溶媒濃度により変動することが予想されたため、溶離液の組成も検討した。これまで蛍光検出器は FL SPECTRO PHOTO METER / S-3350 (SOMA) を用いていたが、最新機種である SHIMADZU の RF-10A<sub>XL</sub> を用いることで更なる高感度化を計り、また、本法をオートインジェクション化することでより簡便化することにした。

## 1-1 $N^1$ -DNS-NSpm の合成法の検討

HPLC による SSAT 活性測定法では HPLC チャート上での夾雑ピークを除去することで、より高感度な活性測定が可能となる。特に生成物である AcDNS-NSpm のリテンションタイム付近における夾雑ピークは低レベルな細胞内 SSAT 活性測定を行う際の妨げとなるため、基質として用いる  $N^1$ -DNS-NSpm の合成過程においてできるだけ除去することが望まれた。

実際に本研究において基質として用いた  $N^1$ -DNS-NSpm の合成法は、まずノルスペルミンの一方の一級アミノ基だけをトリフルオロアセチル基で保護した後、Boc 基により残りの一級及び二級アミノ基を保護した。その後 c.  $\text{NH}_3$  水を用いてトリフルオロアセチル基を脱保護し、トリ Boc 基保護ノルスペルミンを得た。ここで、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、より純度の高いトリ Boc 基保護ノルスペルミンを得た<sup>5)</sup>。これを原料としてダンシル化後、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、Boc 基を脱保護した後に塩酸塩とした。得られた結晶はエタノールと水を用いて再結晶を行った。

(合成の部参照)

得られた  $N^1$ -DNS-NSpm の純度を蛍光検出波長 (Ex 333 nm Em 544 nm) で HPLC により確認したところ、基質に対する夾雑ピーク高さは 0.1%未満であり、高純度な化合物が得られたことを確認した。( data not shown )

## 1-2 AcDNS-NSpm の蛍光強度への有機溶媒濃度の影響

基質及び生成物の構造中には蛍光団としてダンシル基を有しており、その性質上、有機溶媒濃度が高いほど強い蛍光強度を与えることが予想された。しかし、これまでの HPLC 条件検討においては基質と生成物の分離を優先的に考えており、有機溶媒濃度に対する蛍光強度の影響を詳細には検討していなかった。

そこで、有機溶媒としてメタノール、アセトニトリル、それぞれ 0~90% (v/v) 溶液を溶媒として用い、5  $\mu$ M AcDNS-NSpm 溶液を調製した。蛍光検出波長を Ex 333 nm、Em 544 nm に固定し、このときの蛍光強度を測定し、90% メタノール (v/v) 溶液を溶媒としたときに与えた蛍光強度を 100 として示した。(Fig. 2)

この結果より有機溶媒濃度依存的に AcDNS-NSpm の蛍光強度は上昇し、これまで溶離液に用いられている 75% (v/v) メタノール溶液の条件においては約 80 の蛍光強度を与えることが確認された。また、種々メタノール濃度における励起及び蛍光スペクトルを測定した結果、メタノール濃度による励起及び蛍光スペクトルに大きな変化は見られなかった。(data not shown)

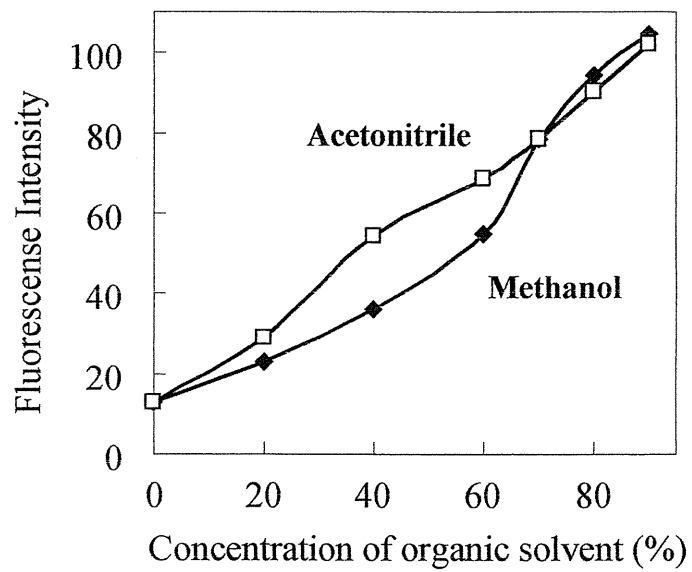


Fig. 2 Effect of organic solvent concentration on AcDNS-NSpm fluorescence

### 1-3 HPLC 条件の検討

1-2 の結果をもとに HPLC 条件を確立した。( Fig. 3 )

その結果、基質である  $N^1$ -DNS-NSpm と生成物である

AcDNS-NSpm のピークは明瞭に分離され、活性測定試料 1 検体

につき約 10 分で測定可能であり、オートインジェクション化に

より一日に 100 検体の活性測定が可能となった。

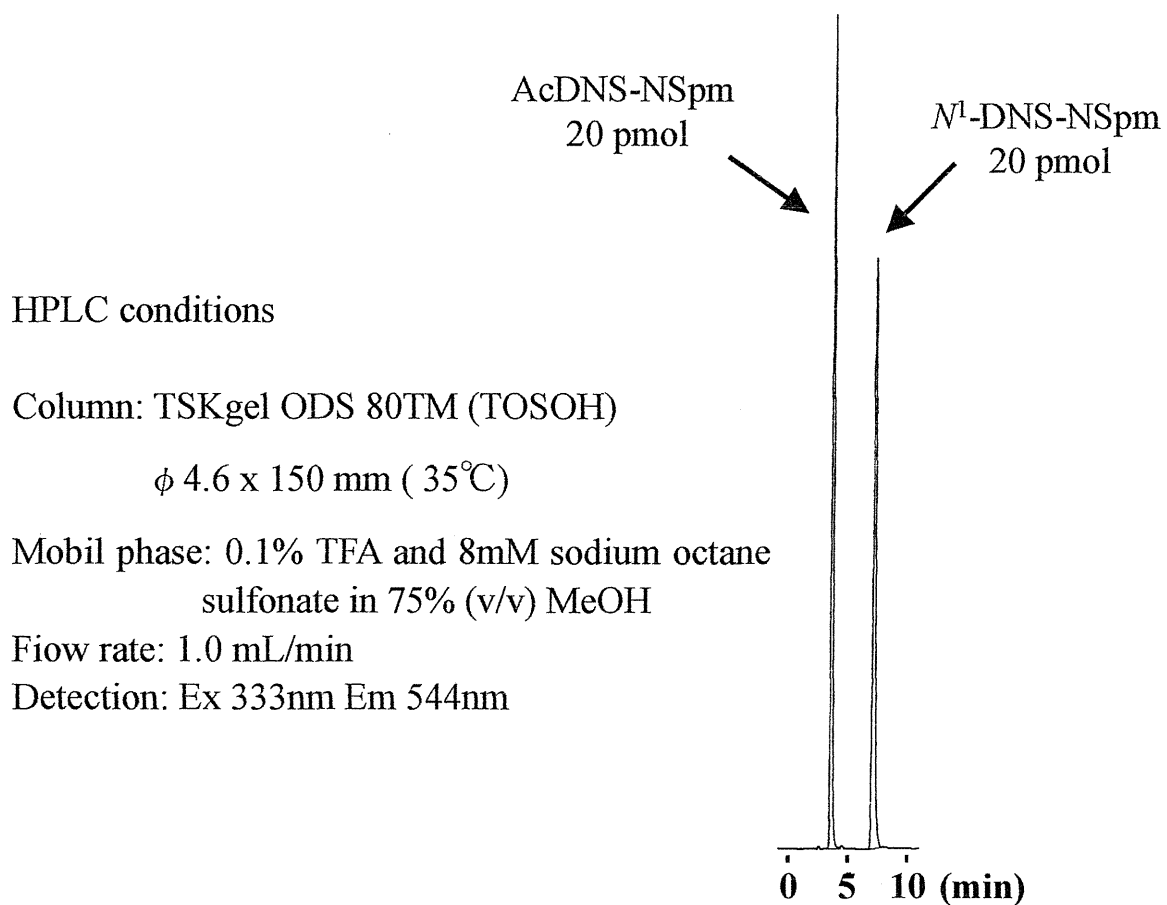


Fig.3 Separation of AcDNS-NSpm and  $N^1$ -DNS-NSpm  
by ion-pair RP-HPLC

#### 1-4 蛍光検出器の選択と検出限界

1-3 において確立した HPLC 条件を用いることで、より高感度な生成物 (AcDNS-NSpm) の検出を可能とし、更に基質と生成物ピークを短時間のうちに明瞭に分離可能なことから、高感度化及び簡便化へと繋がった。また、ここでは蛍光検出器として用いていた FL SPECTRO PHOTO METER / S-3350 (SOMA) を、最新機種である SHIMADZU の RF-10A<sub>XL</sub> に変更することで、更に感度は上昇した。

以上、種々の高感度化を目的とした検討を行った後に AcDNS-NSpm の標品を用いて検量線を作成したところ、30 fmol ~ 20 pmol まで良好な直線が得られ、S/N 比 3 における検出限界は 30fmol であった。(Fig. 4)



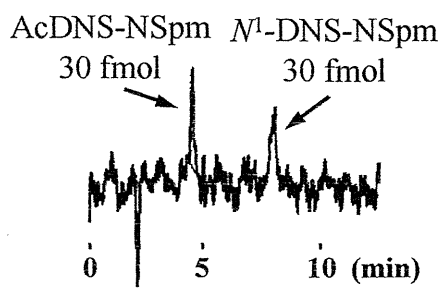
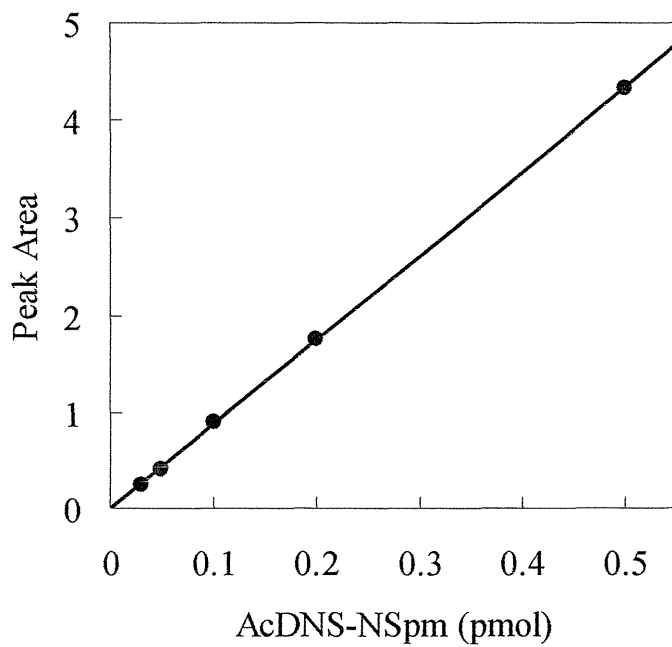


Fig.4 Calibration curve for AcDNS-NSpm

## 第2章 細胞内 SSAT 活性測定への応用

通常、細胞内の SSAT 活性は低く、RI 法での測定だけが可能であった<sup>6)</sup>。しかしながら、基質にスペルミジン、[1-<sup>14</sup>C]-アセチル CoA を用いて、生成する[1-<sup>14</sup>C]標識された N<sup>1</sup>-アセチルスペルミジンの放射線を計数する RI 法では、前処理として生成する[1-<sup>14</sup>C]標識された N<sup>1</sup>-アセチルスペルミジンをフィルターに吸着後、[1-<sup>14</sup>C]-アセチル CoA の洗浄操作が必要となる。しかし、この前処理では[1-<sup>14</sup>C]-アセチル CoA がフィルターに残る可能性は否定できず、低レベルな SSAT 活性測定においては誤差が大きくなるため、正確な活性測定ができていないか疑問点であった。

そこで、本章ではまず 25 μM DENSPM 投与し、SSAT 活性を誘導した細胞試料について本法の細胞試料への応用を検討し、細胞試料における本法の活性測定条件を確立した。その後、本法が RI 法と比較してどれほどの感度を有するか検討した後、25 μM DENSPM 投与細胞と無処理細胞における詳細な SSAT 活性の経時変化を測定した。

## 2-1 $N^1$ -DNS-NSpm を用いた SSAT 活性測定法の細胞試料への

### 応用

25  $\mu$ M DENSPM を 24 時間投与し SSAT 活性を誘導した細胞試料を用いて 10 分間インキュベーション時における

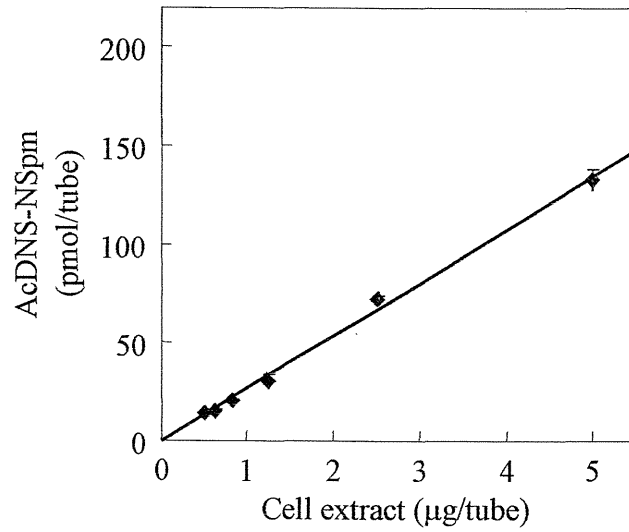
AcDNS-NSpm 生成の細胞試料濃度依存性及び細胞試料 5.0

$\mu$ g/tube における反応時間依存性を調べた。(Fig. 5) その結果、細胞

試料濃度依存的及び反応時間依存的に生成物量は増加し、本

法は細胞試料に応用可能であった。

**1. Dose dependency**  
**(Incubation time : 10 min)**



**2. Time dependency**  
**(Cell extract : 5.0 µg/tube)**

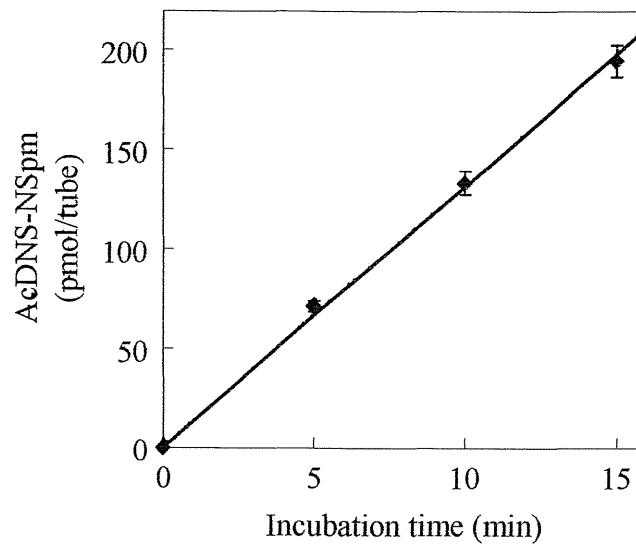


Fig.5 Acetylation of  $N^1$ -DNS-NSpm with acetyl-CoA in the presence of SSAT from HTC cells

## 2-2 細胞試料における活性測定条件の確立

これまで RI 法を用いた Rat<sup>7)8)</sup>、Human<sup>9)</sup>、Chicken<sup>10)</sup> における SSAT 活性測定の結果があり、それぞれポリアミン及び Acetyl-CoA の基質親和性に違いがみられた。ここでは、ラット肝がん由来 HTC 細胞内 SSAT に対する  $N^1$ -DNS-NSpm 及び Acetyl-CoA の真の  $K_m$  値を求めることで基質親和性を確認し、細胞試料を測定する際の基質濃度条件を決定した。

$N^1$ -DNS-NSpm と Acetyl-CoA の真の  $K_m$  値は、Simon らの方法<sup>11)</sup> に準じて測定、算出した。即ち、 $N^1$ -DNS-NSpm (2~40  $\mu$ M) 及び Acetyl-CoA (10~100  $\mu$ M) を用いて種々の濃度における AcDNS-NSpm の生成速度を比較した。その結果、生成速度の  $N^1$ -DNS-NSpm 濃度依存的な飽和曲線が各 Acetyl-CoA 濃度で得られ、(Fig. 6) 各 Acetyl-CoA 濃度に関して二重逆数プロットを行った結果、1 点に集約する直線群が得られ、基質である  $N^1$ -DNS-NSpm が SSAT によってアセチル化される一連の反応は、典型的な二基質二生成物反応 (Bi-Bi 反応) であることが示された。(Fig. 7)

更に、Acetyl-CoA 濃度の逆数に対して、Fig. 7 で得られた各直線における Y 軸切片 ( $1/V^{app}$ ) 及び傾斜 ( $K_m^{app}/V^{app}$ ) を再プロットし解析した結果 (Fig. 8)、 $N^1$ -DNS-NSpm の真の  $K_m$  値は約 11  $\mu$ M、Acetyl-CoA の真の  $K_m$  値は約 13  $\mu$ M であることがわかり、RI 法で用いていた Acetyl-CoA 濃度が不十分であることも示唆された。(Fig. 9 括弧内) この結果をもとに、本法に用いる基質濃度を決定し、活性測定条件を確立した。(Fig. 9)

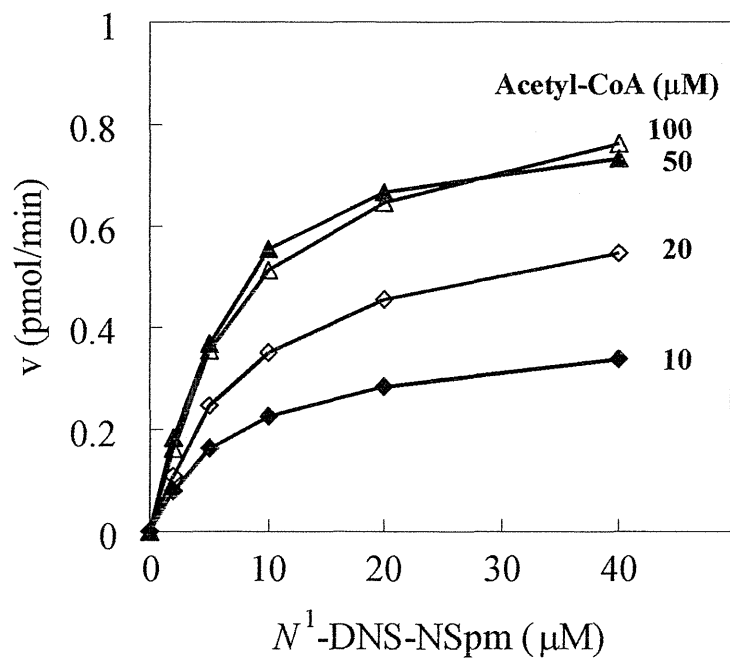


Fig. 6 Dependence of SSAT activity on the concentration of  $N^1$ -DNS-NSpm in the presence of various acetyl-CoA concentrations

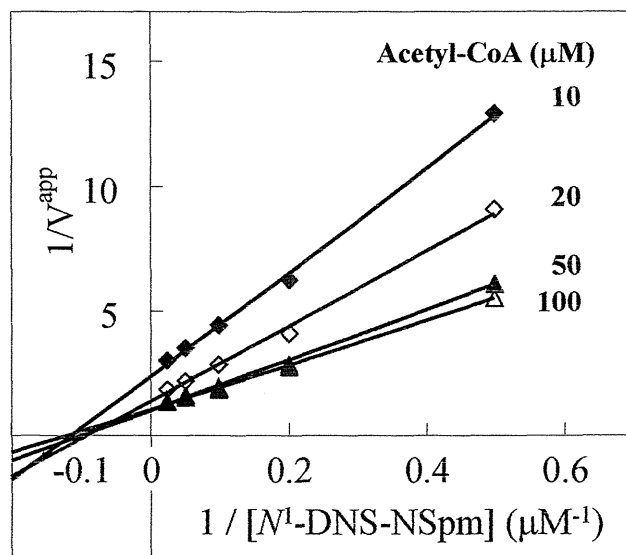


Fig. 7 Double-reciprocal plots of the data of Fig. 6



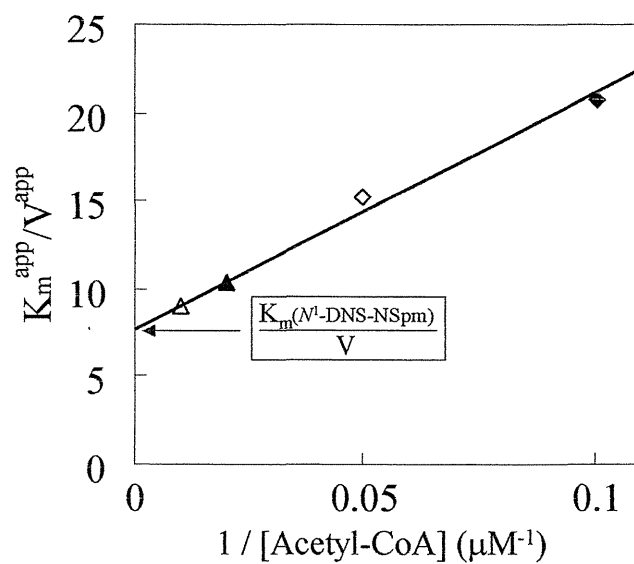
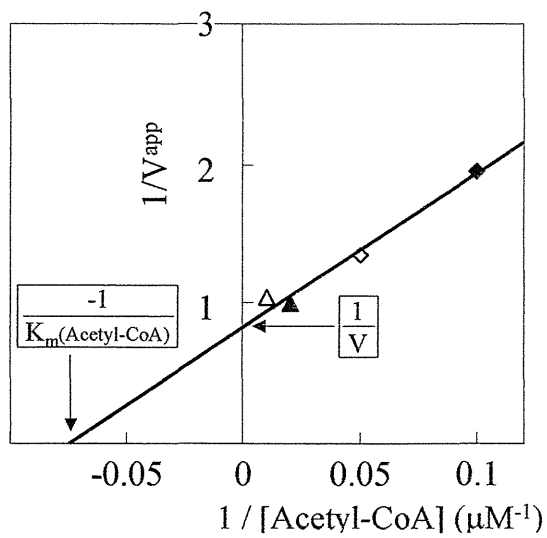


Fig. 8 Secondary plots of the slopes and intercepts of the straight lines shown in Fig. 7 versus the reciprocal of the acetyl-CoA concentration

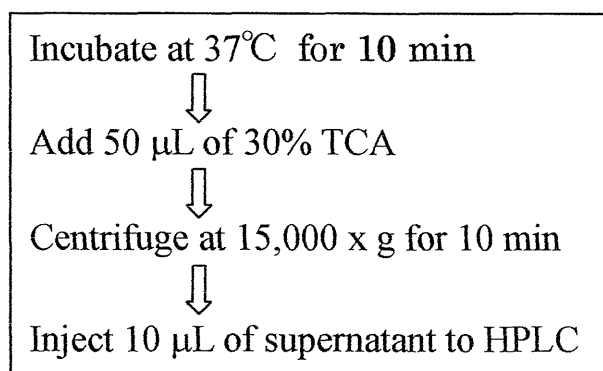
## Experimental conditions

	Present	( Previous )
Tris-HCl buffer ( pH 7.8 )	0.1 M	
Acetyl-CoA	50 $\mu$ M	( 7.3 $\mu$ M )
<i>N</i> <sup>1</sup> -DNS-NSpm	40 $\mu$ M	( 50 $\mu$ M )
Enzyme solution		

---

100  $\mu$ L

## Protocols



## HPLC conditions

Column: TSKgel ODS 80T<sub>M</sub> (TOSOH)  $\phi$  4.6 x 150 mm (35°C)

Mobil phase: 0.1% TFA and 8mM sodium octanesulfonate  
in 75% (v/v) MeOH

Flow rate: 1.0mL/min

Detection: Ex 333nm Em 544nm

Fig. 9 Assay for SSAT by HPLC method

## 2-3 $N^1$ -DNS-NSpm、NSpd、Spd に対する見かけの $K_m$ 値及び

### $V_{max}$ 値の比較

2-1 では本法の細胞試料への応用が可能であることを示し、2-2 では実際に細胞試料に応用する際の活性測定条件を確立した。

ここでは、生成物量という観点から、本法と RI 法とを比較するために本法で用いる蛍光基質と RI 法で基質として用いられるスペルミジン及びノルスペルミジン等の天然ポリアミンを用いた場合の最大反応速度を比較検討した。

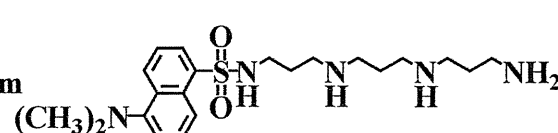
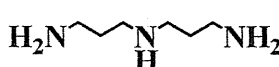
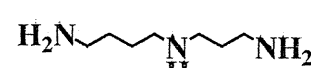
同一細胞試料を用いて 50  $\mu$ M Acetyl-CoA における  $N^1$ -DNS-NSpm、Norspermidine (NSpd)、Spermidine (Spd) の見かけの  $K_m$  値及び  $V_{max}$  値を測定した。その結果、見かけの  $K_m$  値はそれぞれ 10、15、26 ( $\mu$ M)、 $V_{max}$  値はそれぞれ 1.0、0.8、2.3 (pmol/min) であった。また、Spd の  $V_{max}$  を 100(%)としたときの反応速度を算出した。(Table 1)

この結果より、 $N^1$ -DNS-NSpm と Spd の見かけの  $K_m$  値及び反応速度の間に大きな差が見られないことから、 $N^1$ -DNS-NSpm を基質として用いる本法と、Spd を基質として用いる RI 法の一定

時間における生成物量は同等であることが示唆された。したがって、生成物の検出においてより高い感度を有する本法の方が RI 法と比較して高い感度を有することが示された。

また、 $N^1$ -DNS-NSpm と NSpd における見かけの  $K_m$  値の間にも大きな差が見られないことから、 $N^1$ -DNS-NSpm のもつダンシルアミドプロピル構造が基質認識において大きな影響を与えていないことも示唆された。

Table 1 Substrate specificity of SSAT in HTC cell

Compound	Structure	Apparent $K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	Maximal rate of reaction (%)
$N^1$ -DNS-NSp <sub>m</sub>		10	130
sym-Norspermidine		15	300
Spermidine		26	100

## 2-4 25 $\mu$ M DENSPM 投与による HTC 細胞内 SSAT 活性の経

### 時変化

本法の細胞試料への応用として SSAT の誘導剤として知られる DENSPM を 25  $\mu$ M の濃度で投与し、ラット肝がん由来 HTC 細胞内の SSAT 活性の経時変化を測定した。( Fig. 10 )

その結果、25  $\mu$ M DENSPM 投与後、8 時間目に採取した試料から SSAT 活性は上昇し、48 時間後には無処理の細胞に対して約 800 倍の活性上昇が見られた。また、このときの無処理の細胞では、0 時間から 48 時間において SSAT 活性に大きな変動は見られなかった。

今回の実験では 25  $\mu$ M DENSPM 投与による細胞の成長阻害は確認されなかった。( Fig. 11 )

24 時間培養した無処理の細胞  $2.5 \times 10^6$  cells における試料について活性測定を行った結果、Acetyl-CoA 無添加時には確認できなかった生成物である AcDNS-NSpm のピークが Acetyl-CoA 添加時では 1.3 pmol のピークとして検出された。( Fig. 12-1. 矢印 )  
尚、基質由来の夾雑ピークが生成物である AcDNS-NSpm のピー

クと重なることから、( Fig. 12-1. 破線矢印 ) 溶離液の組成を変更し夾雑ピークと分離したところ活性測定の結果は通常の HPLC 条件で行った結果と同一であり、夾雑ピークの影響はほとんど見られないことが示された。( Fig. 12-2 )

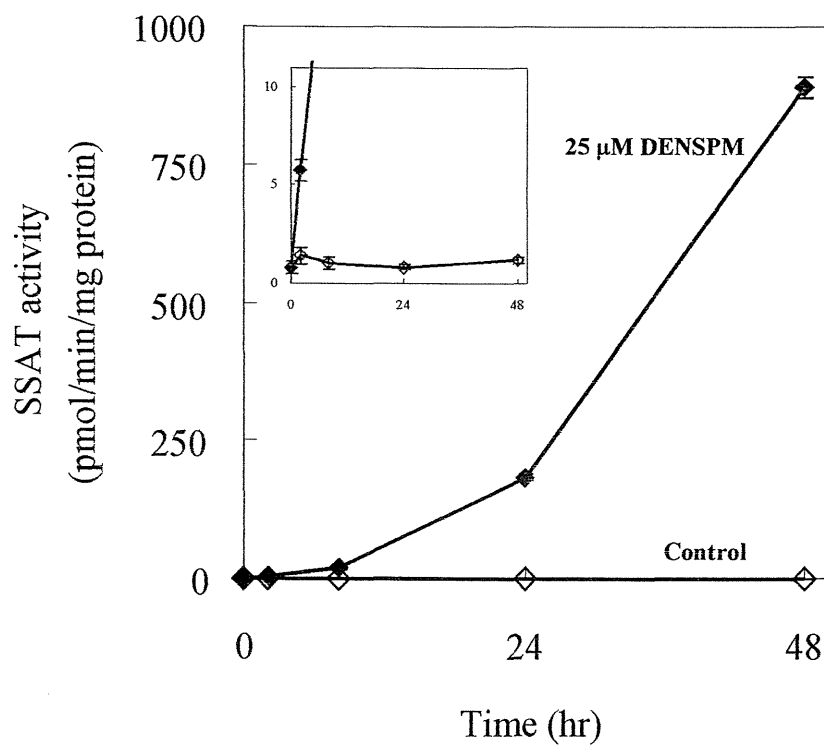


Fig. 10 Induction of SSAT activity in HTC cells treated with 25 $\mu\text{M}$  DENSPM



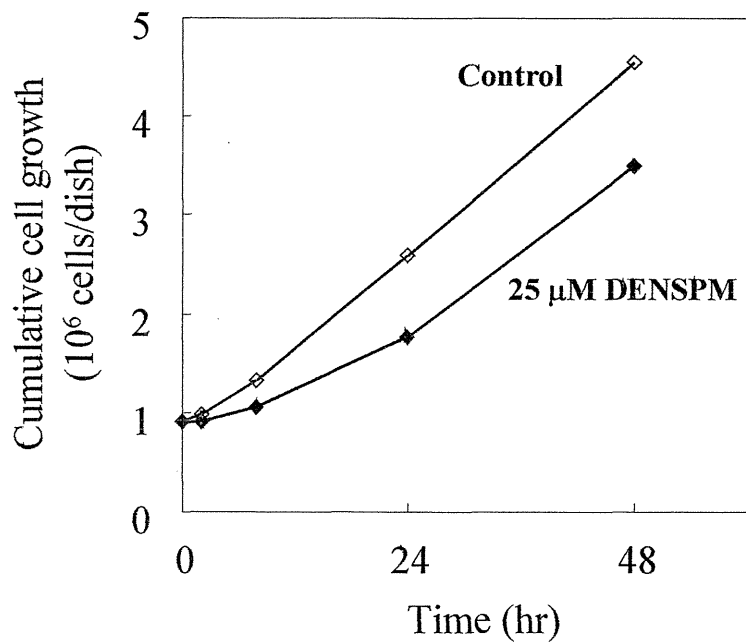


Fig. 11 Growth curves of HTC cells treated with  $25 \mu\text{M}$  DENSPM

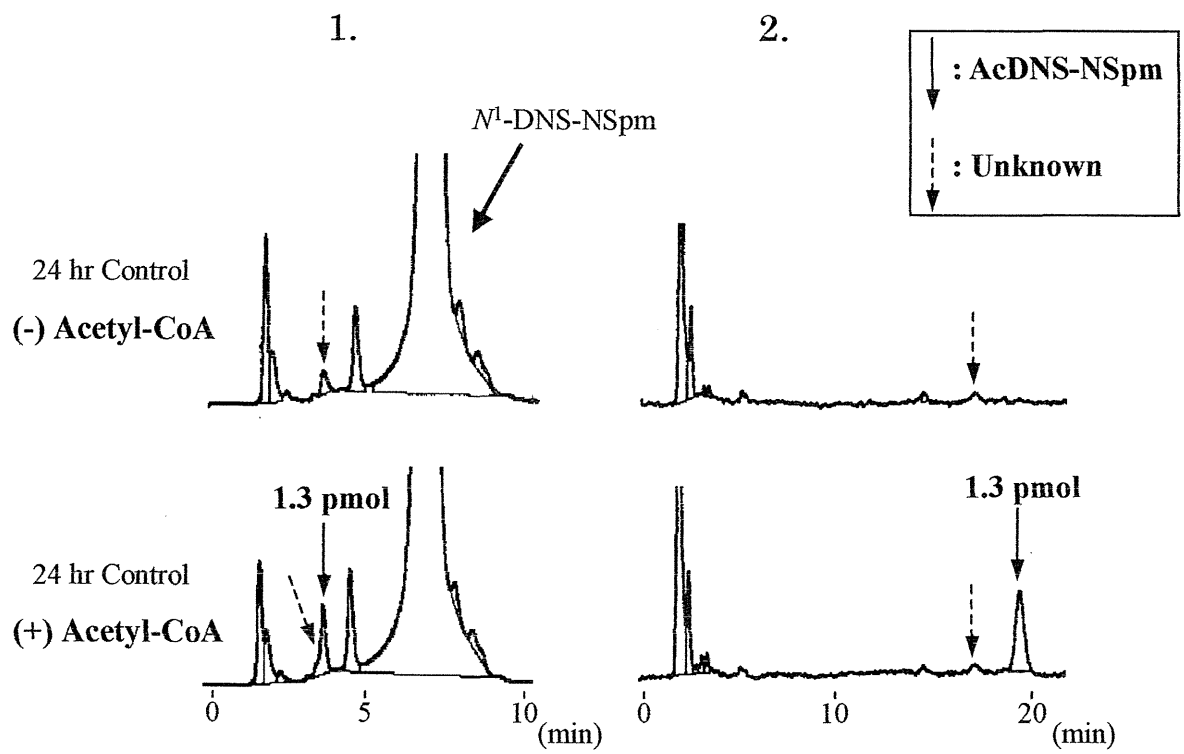


Fig. 12 Chromatogram for reaction mixture using control cell extract

### 第3章 h-SSAT 阻害剤スクリーニング法の確立及び阻害剤候補化合物の阻害効果

当研究室では h-SSAT 遺伝子導入大腸菌を所有しており、精製した h-SSAT を用いた本酵素に対する強力な阻害剤の開発を目指している。そこで、本章ではまず h-SSAT を用いる阻害剤スクリーニング系を確立し、更に本法を用いて阻害剤候補化合物のスクリーニングを行った。

## 第1節 h-SSAT 阻害剤スクリーニング法の条件検討

### 3-1-1 h-SSAT に対する $N^1$ -DNS-NSpm 及び Acetyl-CoA の真の

#### $K_m$ 値の算出

h-SSAT を用いた阻害剤スクリーニング法の条件を決めるにあたり、h-SSAT に対する  $N^1$ -DNS-NSpm と Acetyl-CoA の真の  $K_m$  値を求めた。

$N^1$ -DNS-NSpm ( 0.5~100  $\mu\text{M}$  ) 及び Acetyl-CoA ( 1~10  $\mu\text{M}$  ) を用いて種々の濃度における AcDNS-NSpm の生成速度を算出し、1-2 と同様の方法<sup>10)</sup> で両基質の真の  $K_m$  値を求めたところ、 $N^1$ -DNS-NSpm の真の  $K_m$  値は約 12  $\mu\text{M}$ 、Acetyl-CoA の真の  $K_m$  値は約 28  $\mu\text{M}$  であった。( data not shown )

### 3-1-2 $N^1$ -DNS-NSpm の Acetyl-CoA 認識部位への影響

$N^1$ -DNS-NSpm のダンシルアミドプロピル構造が SSAT における Acetyl-CoA 認識部位を Acetyl-CoA と競合している可能性が示唆されるため、高濃度の Acetyl-CoA 条件 (5~200  $\mu$ M) を用いて SSAT 活性を測定し、Acetyl-CoA 認識部位への影響を調べた。(Fig. 13)

50、100、200  $\mu$ M における Acetyl-CoA 大過剰な条件において、SSAT 活性に大きな変化が見られないことから、 $N^1$ -DNS-NSpm の有するダンシルアミドプロピル構造が Acetyl-CoA と競合している可能性は低いことが示唆された。また、50  $\mu$ M 以上の  $N^1$ -DNS-NSpm 濃度において基質あるいは生成物阻害によるものと思われる SSAT 活性の低下が確認された。

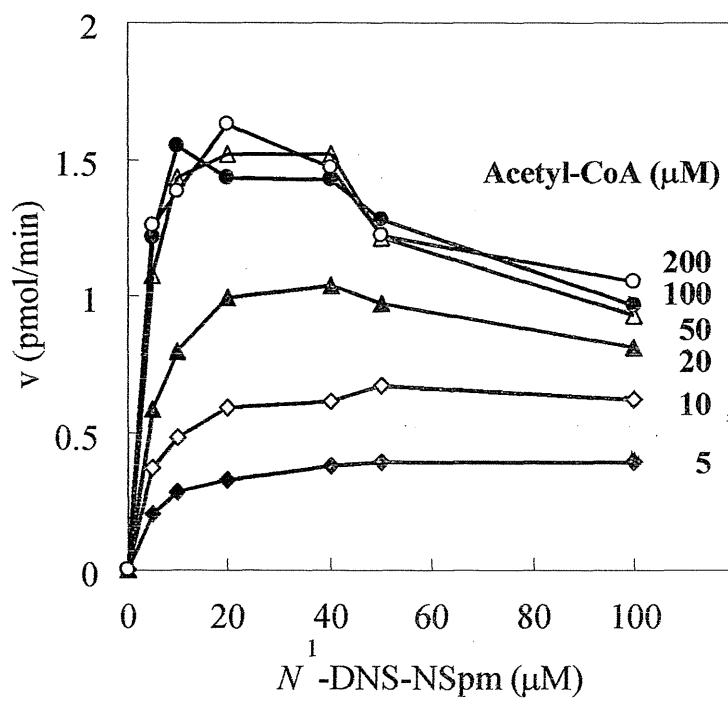


Fig. 13 Dependence of SSAT activity on the concentration of  $N^1$ -DNS-NSpm in the presence of various acetyl-CoA concentrations

### 3-1-3 BSA 添加による h-SSAT 活性への影響

本法を SSAT 阻害剤スクリーニングに応用するにあたり、細胞内に混在する多種多様なタンパク質の影響を考慮するため BSA (0.1~1.0 mg/mL) を用いてその効果を調べた。(Fig. 14)

その結果、BSA 無添加に対して 1.0 mg/mL BSA では約 50%の活性上昇がみられた。これは酵素溶液を高倍率で希釈しているために不安定化していた SSAT が BSA 添加により安定化したものと考えられた。

以上の結果より、h-SSAT を用いた阻害剤スクリーニング時には酵素を安定化させる目的で反応液中に 1.0 mg/mL BSA を添加する条件を決定した。

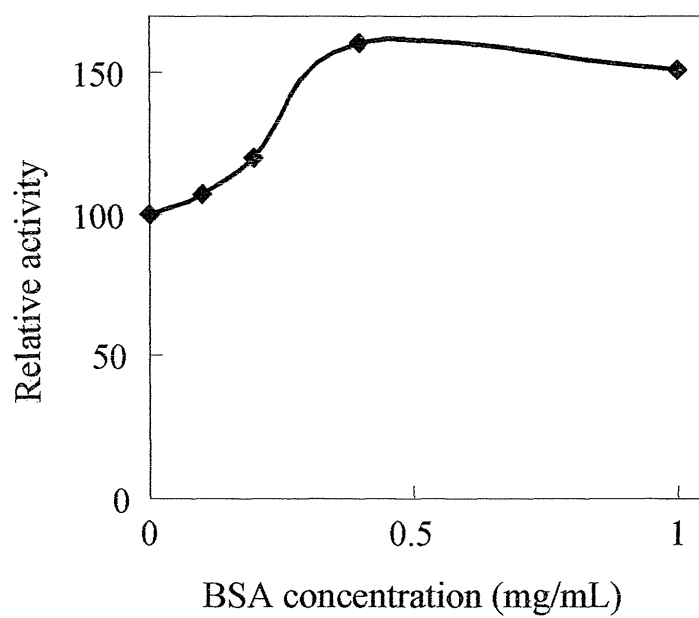


Fig. 14 Effect of BSA-addition on SSAT activity



## 第2節 h-SSAT 阻害剤候補化合物による阻害効果

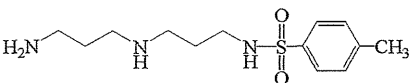
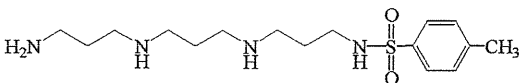
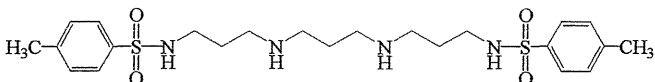
h-SSAT 阻害剤候補物質として、ポリアミン骨格及び置換基の数の異なる3種の化合物  $N^1$ -Tosyl norspermidine ( $N^1$ -Tosyl-NSpd)、 $N^1$ -Tosyl norspermine ( $N^1$ -Tosyl-NSpm)、 $N^1, N^{11}$ -Ditosyl norspermine ( $N^1, N^{11}$ -Ditosyl-NSpm) を合成し、それぞれの  $IC_{50}$  を算出して阻害効果を比較した。また、このとき 1.0 mg/mL BSA 添加による各化合物の阻害効果に及ぼす影響も同時に調べた。(Table 2)

この結果より、 $N^1$ -Tosyl-NSpd に比べ  $N^1$ -Tosyl-NSpm の  $IC_{50}$  の方が低いことから、h-SSAT におけるポリアミン骨格の認識はより電荷の多い方が優位であることが示唆された。また、 $N^1$ -Tosyl-NSpm に比べ  $N^1, N^{11}$ -Ditosyl-NSpm の  $IC_{50}$  の方が低いことから、ポリアミン骨格の両端には立体障害の大きい置換基を持つ方が阻害効果が大きく、ポリアミン認識部位の両側には疎水的な立体空間をもつことが示唆された。

さらに、BSA 添加により  $IC_{50}$  が高くなる傾向がみられた。Tosyl 基を2つ有する  $N^1, N^{11}$ -Ditosyl-NSpm では  $IC_{50}$  が2倍となり特に顕著にこの傾向がみられた。これより、添加した BSA が極性の

低い Tosyl 基に何らかの影響を与えていることが示唆された。そこで、今後 h-SSAT 活性部位の構造推察を目的とする阻害剤スクリーニング時には BSA を添加しないこととした。しかし、先にも述べたとおり本来細胞内には多種多様なタンパク質が混在することから、h-SSAT に対する強力な阻害剤の開発を目的とする阻害剤ランダムスクリーニング時には 3-1-3 において検討したとおり 1.0 mg/mL BSA を添加することとした。

Table 2 IC<sub>50</sub> for SSAT

Compound	Structure	IC <sub>50</sub> (μM)	
		BSA (+)	BSA (-)
<i>N</i> <sup>1</sup> -Tosyl-NSpd		830	640
<i>N</i> <sup>1</sup> -Tosyl-NSpm		400	300
<i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>11</sup> -Ditosyl-NSpm		160	80

#### 第4章 h-SSAT に対する抗体の作成

SSAT の Western blotting を行う際の 1 次抗体として、また活性測定時に基質として用いる  $N^1$ -DNS-NSpm や SSAT 阻害剤候補物質が実際に SSAT 特異的であることを確認するために h-SSAT に対する抗体を作成することは非常に有用である。そこで、h-SSAT 遺伝子導入大腸菌より精製した h-SSAT を抗原溶液として Freund's complete adjuvant と混ぜてエマルジョンを作り、蛋白量として 250  $\mu$ g を家兎 2 羽に感作した。4 週間後に抗原溶液を Freund's incomplete adjuvant と混ぜてエマルジョンを作り、蛋白量として 100  $\mu$ g の追加免疫を行い、その 1 週間後に採血した。更に、感作から 8 週間後に蛋白量として 200  $\mu$ g の二度目の追加免疫を静注で行い、その 1 週間後に採血し、抗体産生の有無をドット・ブロット法で行った結果、抗体の産生は確認できなかった。(実験の部参照)

## 【 まとめと考察 】

本研究において、HPLCによるSSAT活性測定法に、基質として用いていた $N^1$ -DNS-NSpmを繰り返し精製すること、及び蛍光検出器にSHIMADZUのRF-10A<sub>XL</sub>を用いることで高感度検出を可能にし、従来用いていたRI法と比較して、簡便で安価だけでなく、高感度なSSAT活性測定法を確立したことは、今後のSSAT研究において極めて有用であると考えられる。また、本活性測定法の細胞試料への応用から、DENSPM投与によりSSAT活性を誘導した試料だけでなく、低レベルな無処理細胞内SSAT活性を高感度に測定するが可能になった。即ち、本酵素活性の小さな変動を追跡することで、これまでに報告のある本酵素活性とApoptosisの詳細な関係や、これまであまり調べられていなかったSSAT活性の低下を追跡することで新たな知見が得られるものと考えられる。

今回、その条件を確立したh-SSATを用いる簡便なSSAT阻害剤スクリーニング法の利用により、今後の本酵素に対する強力な阻害剤の開発及び本酵素の活性部位構造の推察に大きく寄与

するものと考えられる。

また、これにより最近報告された本酵素の持つ *N*-アセチル基転移酵素活性の薬物代謝への関与<sup>12)</sup>、肝障害モデルラットやアルコール投与ラット<sup>13)</sup>における本酵素活性誘導による組織傷害性、及び傷害性の軽減を狙った本酵素阻害剤の開発が可能になるものと考えられる。

## 【 実験材料と方法 】

### 〈試薬〉

ラット肝がん由来 HTC 細胞 (Morris 7288c) 及び MEM-Eagle 粉末培地、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシンは、大日本製薬株式会社から購入した。ペトリディッシュ ( $\phi$  10cm) は、旭テクノガラス株式会社から購入した。

h-SSAT 遺伝子導入大腸菌は、ペンシルベニア州立大学 A. E. Pegg 教授より供与されたプラスミドを用い、深沢が調製したものをを用いた。

大腸菌の培養において使用した、Tryptone、Yeast extract、Agar、Ampicillin は和光純薬工業株式会社から、MgCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、D-(+)-Glucose、Tetracycline は Sigma 社から購入した。

酵素精製において使用した、TALON Purification Kit は CLONTECH 社から購入した。

蛋白定量において使用した、牛血清アルブミン(BSA)は生化学工業株式会社から、Coomassie brilliant blue R-250 試薬は Bio-Rad 社から購入した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において使用した、電気泳動用グラジエントゲル 15/25 は第一化学薬品株式会社から購入した。

抗原の調製において使用した、Freund's adjuvant は SIGMA 社から購入した。

血清の評価において使用した、Poly vinylidene difluoride (PVDF) メンブレンは MILLIPORE 社から、HRP 標識抗体 (Goat Anti-Rabbit IgG) は Bio-Rad 社から、発色試薬液 (コニカムイムノステイン HRP-1000) は KONICA 社から購入した。

合成において使用した、  
*N,N'*-Bis(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine (norspermine)、  
Di-*tert*-butyl dicarbonate、は Aldrich 社から購入した。Triethylamine、  
Trifluoroacetic Acid Ethyl Ester、1-Dimethylaminonaphalene-5-sulfonyl  
Chloride (DNS-Cl)、Isatoic Anhydride、  
4-Chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl)、*p*-Toluenesulfonyl  
Chloride (Tosyl-Cl)は東京化成工業株式会社から購入した。Acetic  
Anhydride は関東化学株式会社から購入した。



### $N^1, N^4, N^8$ -TriBocnorspermine の合成

$N, N'$ -Bis(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine (Norspermine) 0.9 g (4.78 mmol) をメタノール 100 mL に溶解し、Trifluoroacetic Acid Ethyl Ester 570  $\mu$ L を加え、アセトシンドライアイス冷下で 6 時間反応させた。この反応溶液に Di-*tert*-butyl dicarbonate 6.26 g (28.68 mmol) を加え、室温で 21 時間反応させた。さらにこの反応溶液に濃アンモニア水 35 mL を加え、室温で 16 時間反応させたのち、メタノールを減圧留去した。この油状の反応混合物をシリカゲルカラム(70g)で分離・精製し(クロロホルム：メタノール：濃アンモニア水 = 20 : 1 : 0.1 で溶出)、 $N^1, N^4, N^8$ -TriBocnorspermine を 1.54g (3.15 mmol) 得た。(収率 : 66.1%、FAB-MS : 489  $[C_{24}H_{48}N_4O_6]^+$ ) このうち、1.24g (2.54 mmol) をクロロホルム 12.7 mL に溶かし、0.2 M  $N^1, N^4, N^8$ -TriBocnorspermine 溶液とし、以後の実験に用いた。また、このとき同時に  $N^4, N^8$ -DiBocnorspermine 1.05 g (クロロホルム : メタノール : 濃アンモニア水 = 5 : 1 : 0.1 で溶出) も得た。(FAB-MS : 389  $[C_{19}H_{40}N_4O_4]^+$ ) このうち、1.03 g (2.65 mmol) をクロロホルム 13.25 mL に溶かし、0.2 M  $N^4, N^8$ -DiBocnorspermine 溶液とし、以後の実験に用いた。

### $N^1$ -Dansylnorspermine の合成

0.2 M  $N^1, N^4, N^8$ -TriBocnorspermine 溶液 2 mL (0.4 mmol) に溶媒としてメタノール 2 mL を加え、Triethylamine 260  $\mu$ L (2.0 mmol)、DNS-Cl 107.9 mg (0.4 mmol) 添加後室温で 16 時間反応させたのち、メタノールを減圧留去した。この油状の反応混合物をシリカゲルカラム(8g)で分離・精製し(クロロホルムで溶出)、 $N^1$ -Dansyl- $N^4, N^8, N^{11}$ -TriBocnorspermine を 0.24g (0.33 mmol) 得た。

(収率 : 82.5%, FAB-MS : 721 [ $C_{36}H_{59}N_5O_8S$ ])

$N^1$ -Dansyl- $N^4, N^8, N^{11}$ -TriBocnorspermine 0.24g (0.33 mmol) に Trifluoroacetic Acid 790  $\mu$ L を添加して、室温で 3 時間反応させ脱保護し、Trifluoroacetic Acid を減圧留去後、エタノール 5.0 mL に溶解し 2.0 M 塩酸飽和エーテル 0.8 mL を添加し

$N^1$ -Dansylnorspermine・四塩酸塩を 0.14 g (0.25 mmol) 得た。なお

これら一連の操作は遮光条件下で行った。(収率 : 62.5%,

FAB-MS : 422 [ $C_{21}H_{30}N_5O_2S$ ]<sup>+</sup>, Anal. Calcd for  $C_{21}H_{35}N_5O_2S \cdot 4HCl \cdot$

$H_2O$ : C, 44.45; H, 6.93; N, 12.34. Found: C, 43.02; H, 7.33; N, 11.73)

## $N^1$ -Anthranylnorspermine の合成

0.2 M  $N^1, N^4, N^8$ -TriBocnorspermine 溶液 2 mL (0.4 mmol) に溶媒としてメタノール 2 mL を加え、Triethylamine 260  $\mu$ L (2.0 mmol)、Isatoic Anhydride 65.3 mg (0.4 mmol) 添加後室温で 7 時間反応させたのち、メタノールを減圧留去した。この油状の反応混合物をシリカゲルカラム (8g) で分離・精製し (クロロホルム : メタノール : 濃アンモニア水 = 30 : 1 : 0.1 で溶出)、 $N^1$ -Anthranylnorspermine を 90 mg (0.15 mmol) 得た。(収率 : 37.5%, FAB-MS : 608 [ $C_{31}H_{53}N_5O_7$ ]<sup>+</sup>)

$N^1$ -Anthranylnorspermine  $N^4, N^8, N^{11}$ -TriBocnorspermine 90 mg (0.15 mmol) に Trifluoroacetic Acid 300  $\mu$ L を添加して、室温で 4 時間反応させ脱保護し、Trifluoroacetic Acid を減圧留去後、エタノール 5.0 mL に溶解し 2.0 M 塩酸飽和エーテル 0.8 mL を添加し  $N^1$ -Anthranylnorspermine・四塩酸塩を 32 mg (0.07 mmol) 得た。なおこれら一連の操作は遮光条件下で行った。(収率 : 17.5%, FAB-MS : 308 [ $C_{16}H_{29}N_5O$ ]<sup>+</sup>, Anal. Calcd for  $C_{16}H_{29}N_5O \cdot 4HCl$  : C, 42.40 ; H, 7.34 ; N, 15.45. Found : C, 42.65 ; H, 7.33 ; N, 15.52)

### $N^1$ -NBD-norspermine の合成

0.2 M  $N^1, N^4, N^8$ -TriBocnorspermine 溶液 2 mL (0.4 mmol) に溶媒としてメタノール 2 mL を加え、Triethylamine 260  $\mu$ L (2.0 mmol)、NBD-Cl 100 mg (0.5 mmol) 添加し、55°C、3 時間反応させたのち、メタノールを減圧留去した。この油状の反応混合物をシリカゲルカラム(8g)で分離・精製し(クロロホルム：メタノール：濃アンモニア水 = 40 : 1 : 0.1 で溶出)、 $N^1$ -NBD- $N^4, N^8, N^{11}$ -TriBocnorspermine を 191 mg (0.29 mmol) 得た。(収率 : 72.5%, FAB-MS : 652 [ $C_{30}H_{49}N_7O_9$ ]<sup>+</sup>)

$N^1$ -NBD- $N^4, N^8, N^{11}$ -TriBocnorspermine 155 mg (0.24 mmol) に Trifluoroacetic Acid 520  $\mu$ L を添加して、室温で 3 時間反応させ脱保護し、Trifluoroacetic Acid を減圧留去後、エタノール 5.0 mL に溶解し 2.0 M 塩酸飽和エーテル 0.6 mL を添加し  $N^1$ -NBDnorspermine・四塩酸塩を 60 mg (0.13 mmol) 得た。なおこれら一連の操作は遮光条件下で行った。(収率 : 32.5%, FAB-MS : 352 [ $C_{15}H_{25}N_7O_3$ ]<sup>+</sup>, Anal. Calcd for  $C_{15}H_{25}N_7O_3 \cdot 4HCl$  : C, 39.10 ; H, 6.12 ; N, 21.28. Found : C, 38.41 ; H, 5.92 ; N, 20.70)

### $N^1$ -Acetyl- $N^{11}$ -Dansylnorspermine の合成

0.2 M  $N^4, N^8$ -DiBocnorspermine 溶液 4 mL (0.8 mmol) に溶媒としてメタノール 4 mL を加え、Triethylamine 520  $\mu$ L (4.0 mmol)、DNS-Cl 100 mg (0.37 mmol) を少量ずつ TLC で確認しながら添加し、室温で 33 時間反応させた。メタノールを減圧留去した後、この油状の反応混合物をシリカゲルカラム(8g)で分離・精製し (クロロホルム : メタノール : 濃アンモニア水 = 10 : 1 : 0.1 で溶出)、 $N^1$ -Dansyl- $N^4, N^8$ -DiBocnorspermine を 0.31 g (0.5 mmol) 得た。(収率 : 62.5%, FAB-MS : 622 [ $C_{31}H_{51}N_5O_6S$ ]<sup>+</sup>)

$N^1$ -Dansyl- $N^4, N^8$ -DiBocnorspermine 0.29 g (0.47 mmol) に溶媒としてクロロホルム 2 mL を加え、Triethylamine 305  $\mu$ L (2.35 mmol)、Acetic Anhydride 44.4  $\mu$ L (0.47 mmol) 添加後室温で 4 時間反応させたのち、メタノールを減圧留去した。この油状の反応混合物をシリカゲルカラム(8g)で分離・精製し (クロロホルム : メタノール : = 50 : 1 で溶出)、

$N^1$ -Acetyl- $N^{11}$ -Dansyl- $N^4, N^8$ -DiBocnorspermine を 87 mg (0.13 mmol) 得た。(収率 : 27.7%, FAB-MS : 663 [ $C_{33}H_{53}N_5O_7S$ ])

$N^1$ -Acetyl- $N^{11}$ -Dansyl- $N^4, N^8$ -DiBocnorspermine 87 mg (0.13

mmol)に Trifluoroacetic Acid 287  $\mu\text{L}$  を添加して、室温で 3 時間反応させ脱保護し、Trifluoroacetic Acid を減圧留去後、エタノール 5.0 mL に溶解し 2.0 M 塩酸飽和エーテル 0.7 mL を添加し  $N^1$ -Acetyl- $N^{11}$ -Dansylnorspermine・三塩酸塩を 29 mg (0.05 mmol) 得た。なおこれら一連の操作は遮光条件下で行った。(収率 : 6.6%, FAB-MS : 464 [ $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ ]<sup>+</sup>, Anal. Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_3\text{S} \cdot 3\text{HCl} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$  : C, 46.00 ; H, 7.080 ; N, 11.67. Found : C, 45.94 ; H, 6.82 ; N, 11.47)

#### $N^1$ -Acetylnorspermidine の合成

$N^1, N^4$ -DiBocnorspermidine 500 mg (1.5 mmol) に溶媒としてメタノール 5 mL を加え、Triethylamine 970  $\mu\text{L}$  (7.5 mmol)、Acetic Anhydride 142  $\mu\text{L}$  (1.5 mmol) 添加後室温で 4 時間反応させたのち、メタノールを減圧留去した。この油状の反応混合物をシリカゲルカラム(12g)で分離・精製し(クロロホルム:メタノール: = 80 : 1 で溶出)、 $N^1$ -Acetyl- $N^4, N^8$ -DiBocnorspermidine を 448 mg (1.2 mmol) 得た。(収率 : 81.3%, FAB-MS : 373 [ $\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$ ])

$N^1$ -Acetyl- $N^4, N^8$ -DiBocnorspermidine 448 mg (1.2 mmol) に

Trifluoroacetic Acid 2 mL を添加して、室温で 6 時間反応させ脱保護し、Trifluoroacetic Acid を減圧留去後、エタノール 5.0 mL に溶解し 1.0 M 塩酸エーテル 3.0 mL を添加し

$N^1$ -Acetylnorspermidine · 二塩酸塩を 230 mg ( 0.90 mmol ) 得た。

(収率 : 62.0%, FAB-MS : 173 [ $C_8H_{19}N_3O_1$ ]<sup>+</sup>, Anal. Calcd for  $C_8H_{19}N_3O_1 \cdot 2HCl$  : C, 39.03 ; H, 8.60 ; N, 17.07. Found : C, 38.78 ; H, 8.50 ; N, 17.00)

#### $N^1$ -Tosylnorspermine の合成

0.2 M  $N^1, N^4, N^8$ -TriBocnorspermine 溶液 3 mL ( 0.6 mmol ) に溶媒としてメタノール 2 mL を加え、Triethylamine 390  $\mu$ L ( 3.0 mmol )、Tosyl-Cl 114.4 mg ( 0.6 mmol ) 添加後室温で 16 時間反応させたのち、メタノールを減圧留去した。この油状の反応混合物をシリカゲルカラム( 10 g ) で分離・精製し ( クロロホルムで溶出 )、 $N^1$ -Tosyl-  $N^4, N^8, N^{11}$ -TriBocnorspermine を 0.33 g ( 0.51 mmol ) 得た。

(収率 : 85.6%, FAB-MS : 643 [ $C_{16}H_{27}N_4O_2S_1$ ]<sup>+</sup>)

$N^1$ -Tosyl-  $N^4, N^8, N^{11}$ -TriBocnorspermine 0.33g ( 0.51 mmol ) に

Trifluoroacetic Acid 1.1 mL を添加して、室温で 16 時間反応させ

脱保護し、Trifluoroacetic Acid を減圧留去後、エタノール 5.0 mL に溶解し 1.0 M 塩酸エーテル 1.8 mL を添加し

$N^1$ -Tosyl norspermine・三塩酸塩を 0.11 g (0.24 mmol) 得た。収率：

40.3%, FAB-MS : 343  $[C_{16}H_{27}N_4O_2S_1]^+$ , Anal. Calcd for

$C_{16}H_{27}N_4O_2S_1 \cdot 3HCl$  : C, 42.53 ; H, 7.36 ; N, 12.40. Found : C, 41.86 ;

H, 7.04 ; N, 12.04)

#### $N^1, N^{11}$ -DiTosyl norspermine の合成

$N^4, N^8$ -DiBocnorspermine 溶液 0.52 g (1.3 mmol) に溶媒としてメタノール 4 mL を加え、Triethylamine 870  $\mu$ L (6.7 mmol)、Tosyl-Cl 0.51 g (2.68 mmol) を添加し、室温で 16 時間反応させた。メタノールを減圧留去した後、この油状の反応混合物をシリカゲルカラム(35 g) で分離・精製し (ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1 で溶出)、 $N^1, N^{11}$ -Ditosyl- $N^4, N^8$ -DiBocnorspermine を 0.36 g (0.5 mmol) 得た。(収率 : 39.7%, FAB-MS : 697  $[C_{23}H_{33}N_4O_4S_2]^+$ )

$N^1$ -Dansyl- $N^4, N^8$ -DiBocnorspermine 0.36 g (0.5 mmol) に Trifluoroacetic Acid 1.2 mL を添加して、室温で 4 時間反応させ脱保護し、Trifluoroacetic Acid を減圧留去後、エタノール 5.0 mL に



溶解し 1.0 M 塩酸エーテル 2.7 mL を添加し

$N^1, N^{11}$ -Ditosyllnorspermine・二塩酸塩を 280 mg ( 0.49 mmol ) 得た。

なおこれら一連の操作は遮光条件下で行った。(収率：38.9%，

FAB-MS：497 [ $C_{23}H_{33}N_4O_4S_2$ ]<sup>+</sup>)

#### 有機溶媒濃度による AcDNS-NSpm の蛍光強度への影響

有機溶媒としてメタノール、アセトニトリルを用い、それぞれ 0～90% (v/v) に DNS-NSpm 5  $\mu$ M となるように調製した。蛍光検出波長を Ex 333 nm、Em 544 nm に固定し、このときの蛍光強度を測定するとともに、メタノールでは励起及び蛍光スペクトルも測定した。分光光度計は RF-5000 (島津製作所) を使用した。

#### イオン対逆相 HPLC 測定条件

分析カラム：TSKgel ODS 80T<sub>M</sub> (TOSOH)  $\phi$  4.6mm $\times$ 150mm；カラム温度：35 $^{\circ}$ C；溶離液：0.1% TFA, 8.0 mM オクタンスルホン酸ナトリウム含有 75% (v/v)メタノール；流速：1.0 ml/min；蛍光検出器：RF-10A<sub>XL</sub> (SHIMADZU)；蛍光検出波長：Ex 333 nm Em 544 nm で行った。

## 細胞培養

ペトリディッシュ（φ10cm）に培地（10%NBS 及び 1 mM アミノグアニジンを含む MEM-Eagle 培地）10mL を加えて 37℃、95% air – 5% CO<sub>2</sub>、pH7.5、0.5-5.0 x 10<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。

細胞を 0.5 x 10<sup>6</sup> cells / petri dish となるように播き 24 時間後に 25 μM DENSPM 投与を開始し、一定時間ごとに細胞を集めた。

## 細胞試料の調製

一定時間培養後、培地を除き PBS 3 mL x 3 回洗浄し、遠心して集めた細胞に PBS 100 μL 加え、超音波破碎機 VP-30S (TAITEC、OUTPUT CONTROL 5、PULS、DUTY CYCLE 50%) を用いて 30 sec x 3 回、氷冷下超音波破碎した試料を 4℃、105,000 x g で 30 分間超遠心し、その上清について 0.1 M Tris-HCl buffer で 24 時間透析したものを酵素溶液とした。また、DENSPM を投与した細胞は PBS 500 μL を加え、超遠心後、その上清について同様に透析したものを酵素溶液とした。

## 細胞試料における活性測定条件の検討

0.1 M Tris-HCl buffer ( pH 7.8 )、 $N^1$ -DNS-NSpm ( 2~40 $\mu$ M )、  
Acetyl-CoA ( 10~100 $\mu$ M )及び酵素溶液 20  $\mu$ L (25 $\mu$ M DENSPM  
投与細胞試料) を含む反応液 100  $\mu$ L について、37°Cで 10 分間  
酵素反応を行った後、30% TCA 50  $\mu$ L を加え除タンパクし、  
15,000 x g、10 分間遠心後、その上清 10  $\mu$ L についてイオン対逆  
相 HPLC を用いて分析した。

$N^1$ -DNS-NSpm、NSpd、Spd に対する見かけの  $K_m$  値及び  $V_{max}$  の  
算出

0.1 M Tris-HCl buffer ( pH 7.8 )、NSpd または Spd ( 2~40 $\mu$ M )、  
50  $\mu$ M Acetyl-CoA 及び酵素溶液 20  $\mu$ L (25 $\mu$ M DENSPM 投与細胞  
試料) を含む反応液 100  $\mu$ L について、37°Cで 10 分間酵素反応  
を行った後、30% TCA 50  $\mu$ L を加え除タンパクし、15,000 x g、  
10 分間遠心後、その上清 10  $\mu$ L について OPA ポストカラムイオ  
ン対逆相 HPLC を用いて分析した。

OPA ポストカラムイオン対逆相 HPLC 測定条件

分析カラム : Shiseido CAPCELLPAK C18 UG120 S5  $\phi$  4.6 mm  $\times$   
150 mm ; カラム温度 : 室温 ; 溶離液 : 10 mM ヘキサンスルホン

酸ナトリウム、8%アセトニトリル、0.02 M リン酸 Buffer( pH 2.0 ); 流速 : 1.0 mL/min ; OPA 反応液 : 0.8 M ホウ酸、0.8 M KOH、0.3% 2-メルカプトエタノール、3 mM *o*-フタルアルデヒド( OPA )、0.1% Brij-35 ; OPA 流速 : 0.5 mL/min ; 反応槽温度 : 70°C ; 蛍光検出波長 : Ex 360 nm Em 450nm で行った。

#### 25 $\mu$ M DENSPM 投与による HTC 細胞内 SSAT 活性の経時変化

0.1 M Tris-HCl buffer ( pH 7.8 )、40  $\mu$ M *N*<sup>1</sup>-DNS-NSpm、50  $\mu$ M Acetyl-CoA 及び酵素溶液を含む反応液 100  $\mu$ L について、37°C で 10 分間酵素反応を行った後、100% TCA 10  $\mu$ L を加え除タンパクし、12,000 x g、10 分間遠心後、その上清 20  $\mu$ L についてイオン対逆相 HPLC を用いて分析した。また、25  $\mu$ M DENSPM を投与した細胞の活性測定では、30% TCA 50  $\mu$ L を加え、12,000 x g、10 分間遠心し、その上清 10  $\mu$ L についてイオン対逆相 HPLC を用いて分析した。

#### 活性測定に用いる h-SSAT 酵素溶液の調製

h-SSAT 遺伝子導入大腸菌 0.2 g に bugbuster 1.0 mL を加え、氷中で 30 分間攪拌した後、4,000 x g、20 分間遠心し、その上清に

ついて 1,0000 倍希釈したものを酵素溶液とした。

### h-SSAT に対する DNS-Nspm 及び Acetyl-CoA の真の Km 値の算出

0.1 M Tris-HCl buffer ( pH 7.8 )、 $N^1$ -DNS-NSpm ( 0.5~100  $\mu$ M )、Acetyl-CoA ( 0.5~200 $\mu$ M )及び酵素溶液 20  $\mu$ L を含む反応液 100  $\mu$ L について、37°Cで 10 分間酵素反応を行った後、30% TCA 50  $\mu$ L を加え除タンパクし、15,000 x g、10 分間遠心後、その上清 10  $\mu$ L についてイオン対逆相 HPLC を用いて分析した。

### h-SSAT に対する Apparent Km 値の算出 (Norspermidine)

0.1 M Tris-HCl buffer ( pH 7.8 )、Norspermidine ( 2~40 $\mu$ M )、50  $\mu$ M Acetyl-CoA 及び酵素溶液 20  $\mu$ L を含む反応液 100  $\mu$ L について、37°Cで 10 分間酵素反応を行った後、30% TCA 50  $\mu$ L を加え除タンパクし、12,000 x g、10 分間遠心後、その上清 10  $\mu$ L についてイオン対逆相 HPLC を用いて分析した。

### BSA 添加による h-SSAT 活性への影響

0.1 M Tris-HCl buffer ( pH 7.8 )、40  $\mu$ M  $N^1$ -DNS-NSpm、50  $\mu$ M Acetyl-CoA、BSA ( 0~1.0 mg/mL )及び酵素溶液 20  $\mu$ L を含む反

応液 100  $\mu\text{L}$  について、37°Cで 10 分間酵素反応を行った後、30% TCA 50  $\mu\text{L}$  を加え除タンパクし、15,000 x g、10 分間遠心後、その上清 10  $\mu\text{L}$  についてイオン対逆相 HPLC を用いて分析した。

#### h-SSAT に対する阻害剤候補物質の $\text{IC}_{50}$ の算出

0.1 M Tris-HCl buffer ( pH 7.8 )、40  $\mu\text{M}$   $N^1$ -DNS-NSpm、50  $\mu\text{M}$  Acetyl-CoA、阻害剤候補物質( 10~1000 $\mu\text{M}$  )及び酵素溶液 20  $\mu\text{L}$  を含む反応液 100  $\mu\text{L}$  について、37°Cで 10 分間酵素反応を行った後、30% TCA 50  $\mu\text{L}$  を加え除タンパクし、15,000 x g、10 分間遠心後、その上清 10  $\mu\text{L}$  についてイオン対逆相 HPLC を用いて分析した。

#### 大腸菌に用いる培地の調製 (1L あたり)

##### SOB Medium (液体培地)

Tryptone 20.0 g、Yeast extract 5.0 g、NaCl 0.5 g を蒸留水 1 L に溶かし、オートクレーブ滅菌後に 1 M  $\text{MgCl}_2$  10 mL、1 M  $\text{MgSO}_4$  10 mL、2 M D-(+)-Glucose 10 mL を 0.42  $\mu\text{m}$  フィルターを用いて無菌的に加えた。

##### LB-ampicillin-tetracycline agar Medium (寒天培地)

Tryptone 10.0 g、Yeast extract 5.0 g、NaCl 10.0 g、Agar 20.0 g を蒸留水 1 L に溶かし、オートクレーブ滅菌後に 50 mg/mL ampicilline 1 mL、5 mg/mL tetracycline 2.5 mL を 0.42  $\mu$ m フィルターを用いて無菌的に加えた。

### 大腸菌の継代と保存

LB-ampicillin-tetracycline agar Medium を用いて線画培養し、h-SSAT 遺伝子導入大腸菌のシングルコロニーをピックアップしたものを SOB Medium 3mL 中で懸濁した。37°C、オーバーナイト、200 rpm で振とう培養した後、オートクレーブ滅菌済みの 50%グリセロール 300  $\mu$ L と菌液 700  $\mu$ L とを凍結用チューブに入れてよく混合し、-80°Cのフリーザーに入れて凍結保存した。この際、数十本に分注しておき、以後の大腸菌の継代・培養に用いた。また、一度溶かしたフリーズストックはオートクレーブ滅菌し、使い捨てとした。

### 大腸菌培養

滅菌済み試験管に無菌的に SOB Medium 3 mL を取り、h-SSAT 遺伝子導入大腸菌液のフリーズストックから氷の小片を試験管

に移し、懸濁した。37°C、200 rpm で試験管培養し、オーバーナイトカルチャーをつくった。滅菌済み 500 mL 振とうフラスコに SOB Medium 200 mL を入れ、50 mg/mL ampicilline 0.2 mL、5 mg/mL tetracycline 0.5 mL を 0.42  $\mu$ m フィルターを用いて無菌的に加えた。ここにオーバーナイトカルチャー 0.5 mL を無菌的に加え、37°C、200 rpm で振とう培養した。OD<sub>600</sub>を確認し、OD<sub>600</sub>が 0.6~0.7 で 1M IPTG 150  $\mu$ L を加え、さらにオーバーナイトで培養後この菌液を 9,200 x g、15 分間遠心して集菌した。得られた大腸菌のペレットは適量の洗い用 Buffer (pH 8.0) (10 mM Tris-HCl、200 mM NaCl、2.5 mM Putrescine)を加え、攪拌後再び 9,200 x g、15 分間で遠心した。この操作を 2 回行い、最終的に得られた大腸菌のペレットを 15 mL のサンプルチューブに 0.2 g ずつ分注し-30°Cで保存し、以後の実験に用いた。

### 酵素精製

h-SSAT 遺伝子導入大腸菌 1.0 g に bugbuster 5.0 mL を加え、氷中で 30 分間攪拌した後、4,000 x g、20 分間遠心しその上清を酵素原液とした。酵素原液 3.0 mL を取り、TALON metal affinity resin



2.0 mL 中に加え、20 分間振とうして SSAT を吸着させた後、700 x g、5 分間遠心し、その上清を除き、Extraction/wash buffer (pH 7.0) (50 mM リン酸 Buffer、300 mM NaCl) を 20 mL 加え、10 分間振とうして洗浄した後、700 x g、5 分間遠心し上清を除き、樹脂をカラムに移し、Extraction/wash buffer (pH 7.0) 5.0 mL で洗浄後、Elution buffer (50mM リン酸 Buffer、150 mM イミダゾール、300 mM NaCl) 5 mL で溶出し精製液とした。

#### 蛋白定量

蛋白定量は、牛血清アルブミン(BSA)を標準蛋白とし、Coomassie brilliant blue R-250 試薬を用いる Bradford 法で行った。

#### SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

試料溶液に等量の電気泳動サンプルバッファー [0.5M Tris-HCl (pH 6.8)、10% SDS、12%  $\beta$ -Mercaptoethanol、20% Glycerol] を加え、70°C、15 分間加熱した。冷後 0.4% Bromophenol blue 飽和溶液を 10% (v/v) になるように加え、電気泳動用グラジエントゲルプレートマルチゲル 15/25 を用い、ゲルあたり 15 mA の電流を流して泳動を行った。

### 蛋白の検出 Coomassie brilliant blue R-250 による染色

SDS-PAGE を行ったゲルに、染色液 A (EtOH 50 mL、H<sub>2</sub>O 120 mL、35% HCHO 30 mL、Coomassie brilliant blue 0.2 g) で 1 時間処理し、次に染色液 B (EtOH 50 mL、H<sub>2</sub>O 150 mL、35% HCHO 2 mL、Coomassie brilliant blue 0.5 g) で一晩処理した。続いて脱色液 C (EtOH 125 mL、H<sub>2</sub>O 375 mL、35% HCHO 5 mL) で 3 時間処理しバンドを検出した。

### 抗体の調製

TALON 樹脂により精製した h-SSAT を MILLPORE BIOMAX-10K を使用して濃縮した後、0.42  $\mu\text{m}$  のフィルターにかけ滅菌し、これを抗原溶液とした。

抗原溶液を Freund's complete adjuvant と 1 : 1 で混ぜてエマルジョンを作り、蛋白量として 250  $\mu\text{g}$  家兔に感作した。4 週間後に抗原溶液を Freund's incomplete adjuvant と 1 : 1 でエマルジョンを作り、蛋白量として 100  $\mu\text{g}$  追加免疫を行った。その 1 週間後に採血し、血清を得た。感作から 8 週間後に蛋白量として 200  $\mu\text{g}$  二度目の追加免疫を静注で行った。その 1 週間後に採血し、血

清を得た。

抗体産生の有無はドット・ブロット法で行った。メタノールで前処理した後、TBS 溶液 (pH 7.5) (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl) で平衡化させた Poly vinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに抗原溶液を蛋白量として 200 ng スポットした。このとき、ポジティブコントロールとして、AdoMetDC 200 ng も同時にスポットした。TBS 溶液で 5 分間洗浄し、3%ゼラチンを含む TBS 溶液で 1 時間ブロッキング処理を行った後、TTBS 溶液 (0.05% Tween20-TBS) で 5 分間 3 回洗浄した。メンブレンを各スポットに切り分けた後、TTBS 溶液で 1,000 倍に希釈したコントロール抗血清、追加免疫後抗血清、AdoMetDC 抗体とそれぞれ 1 時間、室温で反応させた。各メンブレンを TTBS 溶液で 5 分間、3 回洗浄した後、TTBS 溶液で 10,000 倍に希釈した HRP 標識抗体 (Goat Anti-Rabbit IgG) と 1 時間、室温で反応させた。TTBS 溶液で 5 分間、3 回洗浄し、TBS 溶液で 5 分間、1 回洗浄したものを発色試薬液 (コニカムイムノステイン HRP-1000) 中に浸し、10 分間、室温で反応させた後、蒸留水でメンブレンを洗浄した。

【 引用文献 】

- 1) Tabor, C. W. and Tabor, H. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 749-790.
- 2) Pegg A. E. (1988) *Cancer Res.* **48**, 759-774.
- 3) Libby P. R. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 233-237.
- 4) 深澤一昭, 城西大学大学院平成 13 年度修士論文
- 5) Geall A. J. and Blagbrough I. S. (2000) *Tetrahedron* **56**, 2449-2460.
- 6) McCloskey D. E. and Pegg A. E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 28708-28714.
- 7) Della R. F. and Pegg A. E. (1982) *Biochemistry* **21**, 6152-6158.
- 8) Pegg A. E. and Bergeron R. J. (1990) *Biochem. J.* **267**, 331-338.
- 9) Libby P. R. and Porter C. W. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 238-244.
- 10) Shinki T. and Suda T. (1989) *Eur. J. Biochem.* **183**, 285-290.
- 11) Simon W. A. and Hofer H. W. (1978) *Eur. J. Biochem.* **88**, 175-181.
- 12) BRAS A. P. M. et al. (2001) *Drug. Metab. Dispos.* **29**, 676-680.
- 13) Perin A. and Sessa A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta.* **1156**, 113-116.

限外ろ過法を用いた細胞内遊離ポリアミン濃度測定  
のための基礎検討

## 略号表

AdoMet:S-Adenosylmethionine  
AdoMetDC:S-Adenosylmethionine Decarboxylase  
AG:Aminoguanidine  
AOAP:1-Aminoxy-3-aminopropane  
DeAdomet:Decarboxylated S-Adenosylmethionine  
MTA:5'-Methylthioadenosine  
ODC:Ornithine Decarboxylase  
PAO:Polyamine Oxydase  
put:Putrescine  
spd:Spermidine  
SpdSyn:spermidine Syntase  
spm:Spermine  
SpmSyn:spermine Syntase  
SSAT:spermidine/spermine N<sup>1</sup>-Acetyltransferase

## まえがき

ポリアミン(PA)である、スペルミジン(spd)、スペルミン(spm)、及びその前駆体であるプトレシン(put)は細胞内に比較的高濃度で存在し、細胞増殖や分化過程など、さまざまな細胞機能に影響を与えることが知られている<sup>1)</sup>。これらPAは細胞内の生理的条件下において、アミノ基がイオン化した多価陽イオンとなり、核酸、膜成分、タンパク質など、陰電荷を持つ細胞内分子と相互作用する。したがって、PAの細胞内における存在状態としては、他の分子と電氣的に結合している結合型と細胞質に存在している遊離型(遊離PA)の2種類に大別することができる(Fig.1)。

細胞機能へのPAの影響について考察する際にはその結合型と遊離型の存在比がしばしば問題となる<sup>2)</sup>。しかし、これまでの多くの研究は組織あるいは細胞試料の除タンパク上清中のPA量を測定した結果を議論したものであり、その結合型と遊離型を直接細胞試料について、区別して測定した例はいまだない。したがって、両者を区別できる測定法が確立されれば、細胞内におけるPA機能の研究に大いに役立つものと考えられる。

許らは、ラット肝癌のホモジネイトをモデル試料としてホモジネイト中の遊離型PA量と結合型PA量を求める試みを報告し、限外ろ過膜により試料をろ過することで、試料中の遊離型PA濃度の見積もりが可能であることを示した<sup>12)</sup>。しかし、試料として組織ホモジネイトを用いる限り、細胞外液による希釈や過激な細胞破壊により、平衡の再分配が起こる可能性が高く、生理的な遊離型PA濃度の算定には多くの問題点を含んでいるように思われた。

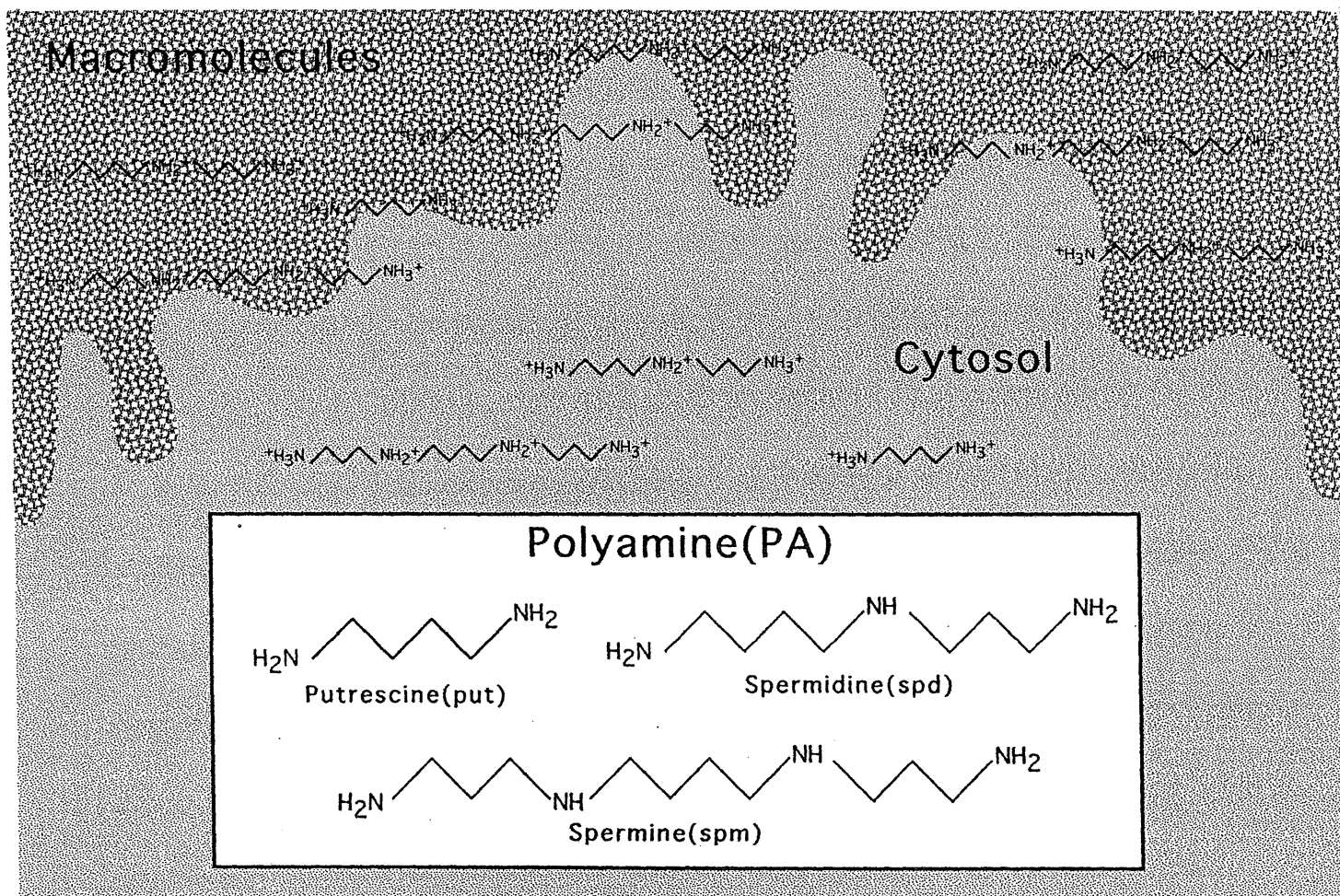
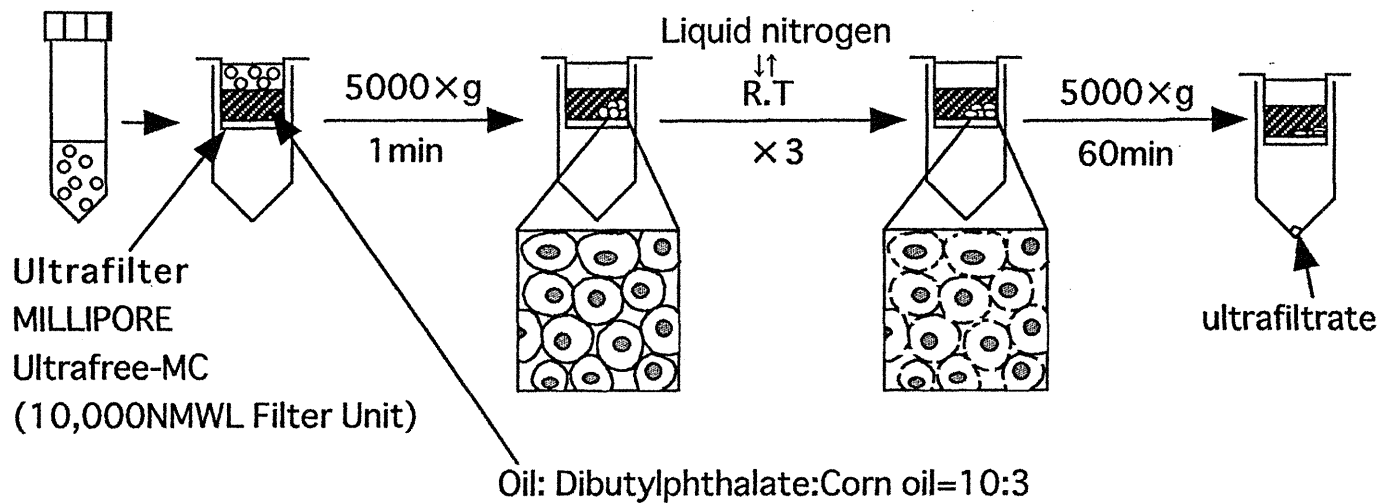


Fig.1 Structure and intracellular distribution of polyamines





<p>Cell: HTC cell(Morris7288c)</p> <p>Cell culture medium: Swim's S-77+Amino acids +10%NBS+penicillinG 100unit/ml</p> <p>Incubation: 37°C</p>
---

Fig.2 Procedure for ultrafiltration method

## 本論

### 第一章 限外ろ過法による遊離ポリアミン測定のための基礎検討

一昨年、当研究室の栗田は、培養細胞内遊離PAの割合を簡便に測定する方法の開発を目指してFig.2に示すような、細胞内液を分取する「限外ろ過法」を考案し、予備的な実験を行った。しかし、この方法を用いて実際に細胞試料への応用を試みるには、いくつかの課題が残されていた。

栗田の試みた限外ろ過法とは、限外ろ過膜上で凍結融解によって破壊した細胞をろ過し、PAが結合している核酸やタンパク質などを通過させずに細胞内液をろ液中に得、その中に含まれる遊離PAの測定を行う方法である。その特徴としては凍結融解という穏和な細胞破壊、即ちホモジネートした細胞試料に比べ、より生理的条件に近い形で細胞内液を得ることができるメリットがある。具体的には、Fig.2に示すように、市販のフィルターユニット中に組み込まれた分画分子量10,000の限外ろ過膜上の油に細胞懸濁液を重層後、遠心して細胞を膜上に分取する。ここで用いる油は細胞の比重よりも軽く培養液よりは重いため、遠心によって細胞懸濁液から細胞を分取することが可能となる。その後凍結融解により細胞膜を破壊し、更に一時間遠心し、細胞内液を採取するものである。

栗田はろ過膜、遠心力等についての検討を行ったので、まず、本法のもつその他の課題についての基礎検討に着手した。Fig.2に示すように細胞を分取するとき、細胞間に細胞外水が巻き込まれ、ろ液中に混在してくる可能性は大きい。したがってその課題とは第一に、本法のように細胞内に含

まれるPAの濃度測定が目的である場合、ろ液中に含まれる細胞外水をどのように見積もるかという問題であると考えた。また、実際に細胞外水の量を見積もれたとしても、その方法が多くの試料に簡便に応用できるかということも大きな問題となる。そこで第二の課題は、ろ液中に含まれる細胞内水の量を簡便に見積もる方法を編みだすこととした。第三に、測定対象であるPAのすべてが限外ろ過膜を通過するかという点を課題とした。

### 1-1 ろ液中に含まれる細胞外水容積の測定

#### 1-1-1 $^3\text{H}_2\text{O}$ および $^{14}\text{C}$ -Inulinを用いた細胞内外水容積の測定

限外ろ過法によって得られるろ液中に含まれる細胞内水と細胞外水を識別するに当たっては、従来より細胞内体積の算出法として用いられているオイル法<sup>4)</sup>を用いた測定を行った(Fig.3)。具体的には、細胞懸濁液に $^3\text{H}_2\text{O}$  (1mCi/mL)、および細胞に取り込まれないことが知られている $^{14}\text{C}$ -Inulin (0.08mCi/mL)をそれぞれ1/100量ずつ添加し、5分後にオイル上に重層した後、5000×gで遠心し、オイル中の細胞ペレットの持つ放射能をカウントすることにより行った。1細胞当たりの容積は、そうして得られた放射能カウントと細胞数より算出した。細胞外水の割合を知るために、 $^3\text{H}_2\text{O}$ および、 $^{14}\text{C}$ -Inulinの放射能から算出したそれぞれの容積比を調べると、5分から120分までのインキュベーションではほとんど変化なく、 $^{14}\text{C}$ -Inulinの示す容積は、 $^3\text{H}_2\text{O}$ の約20%であった(Fig.4)。また、60分間のインキュベーションにおける細胞数とペレット中の放射能の関係を調べると、 $^3\text{H}$ および、 $^{14}\text{C}$ のいずれも原点を通る直線となり、これらの放射能が細胞数に依存して

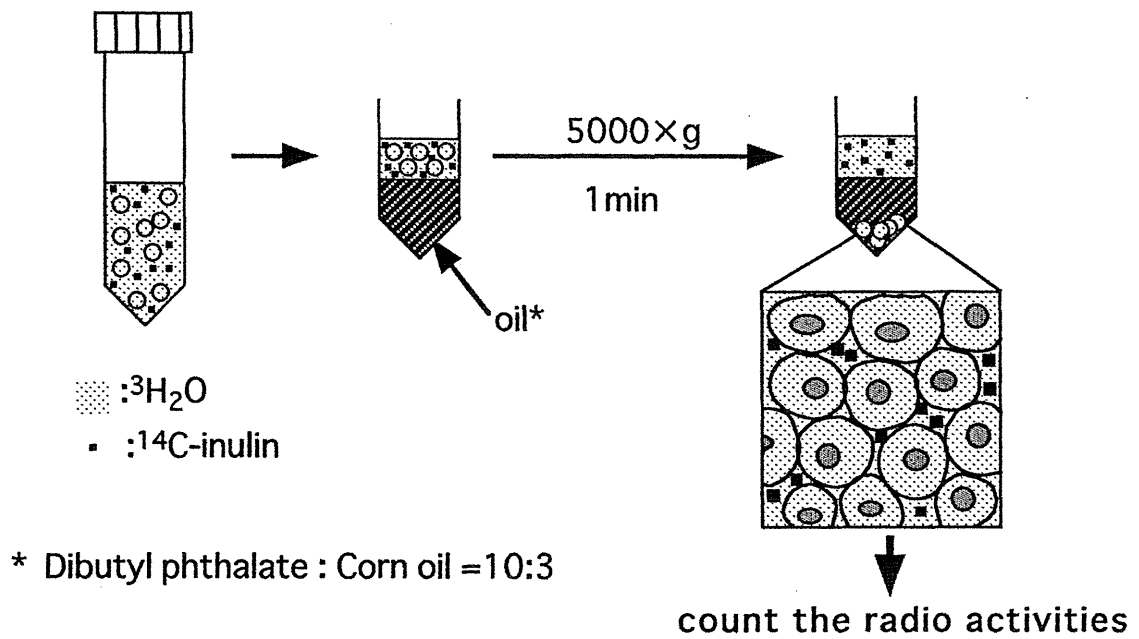


Fig.3 Separation of  $^3\text{H}_2\text{O}$ -incorporated cells by oil method

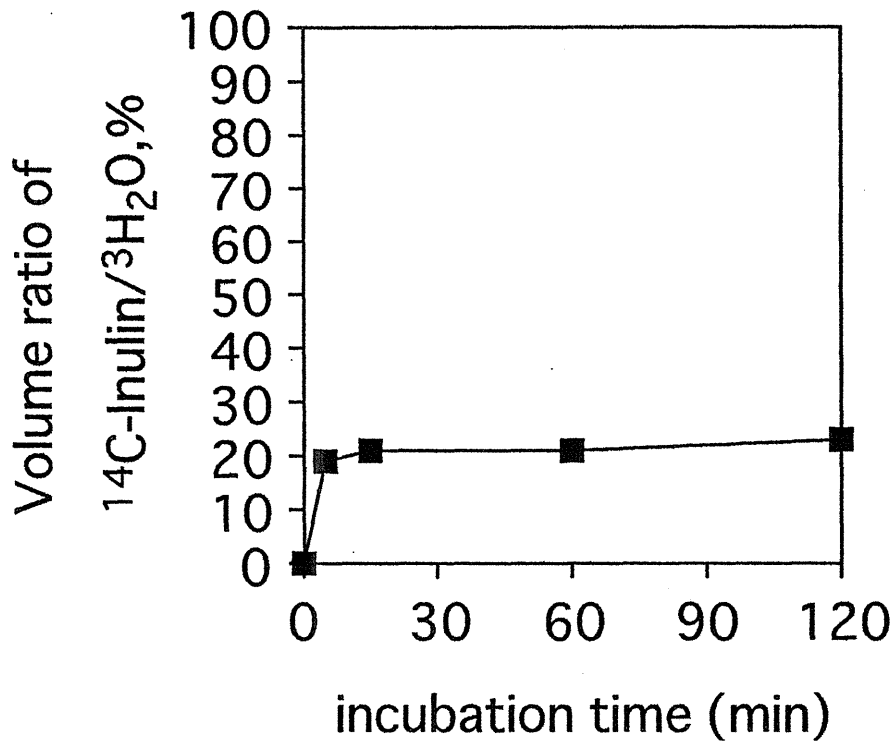


Fig.4 Measurement of extracellular volume with  $^{14}\text{C}$ -Inulin

いることを確認した(Fig.5)。これらの結果から、ペレット中には、20%程度の細胞外水が巻き込まれてくること、更にまた、1細胞当たりの細胞内水容積が、約3pLであることがわかった(Fig.6)。これらの結果は、栗田の算出した実験結果とも矛盾せず、この方法によって、細胞内水と細胞外水の識別が可能であることがわかった。

また、ペレット中水容積の測定のために、よりPAの分布容積に近い値を得ようと考え、 $^3\text{H}_2\text{O}$ より分子量の大きな化合物として $^{14}\text{C}$ -Urea(0.05mCi/ml)を用いた算出方法についても検討した。 $^3\text{H}_2\text{O}$ あるいは $^{14}\text{C}$ -Ureaを含む培地に細胞を懸濁後、ペレット中の $^3\text{H}_2\text{O}$ および $^{14}\text{C}$ -Ureaの放射能を調べると、算出されたそれぞれの容積比は、徐々に上昇し、60分ほどで100%に達した。したがって、1細胞当たりの $^3\text{H}_2\text{O}$ および $^{14}\text{C}$ -Ureaが示す容積は大差なく、 $^{14}\text{C}$ -Ureaを用いた方が細胞懸濁液に加えてからの平衡化に時間がかかることがわかった(Fig.7)。

### 1-1-2 蛍光物質を用いた細胞外水容積測定の検討

isotopeを用いた実験の結果、細胞外水と細胞内水の識別が可能ながわかったが、isotopeで処理された試料はそのままRI施設以外の実験室でPA分析に供することができない。そこで、更に簡便な方法で細胞外水を測定する方法として、細胞膜を通過しないことが知られる蛍光物質を用いた細胞外水容積の測定を試みた。使用した蛍光物質の構造はFig.8に示す。5(6)Carboxyfluorescein(CF)および8-Hydroxypyrene-1,3,6,-trisulfonic acid trisodiumsalt(HPTS)は生理的なpH範囲では細胞内に入りやすく、顕

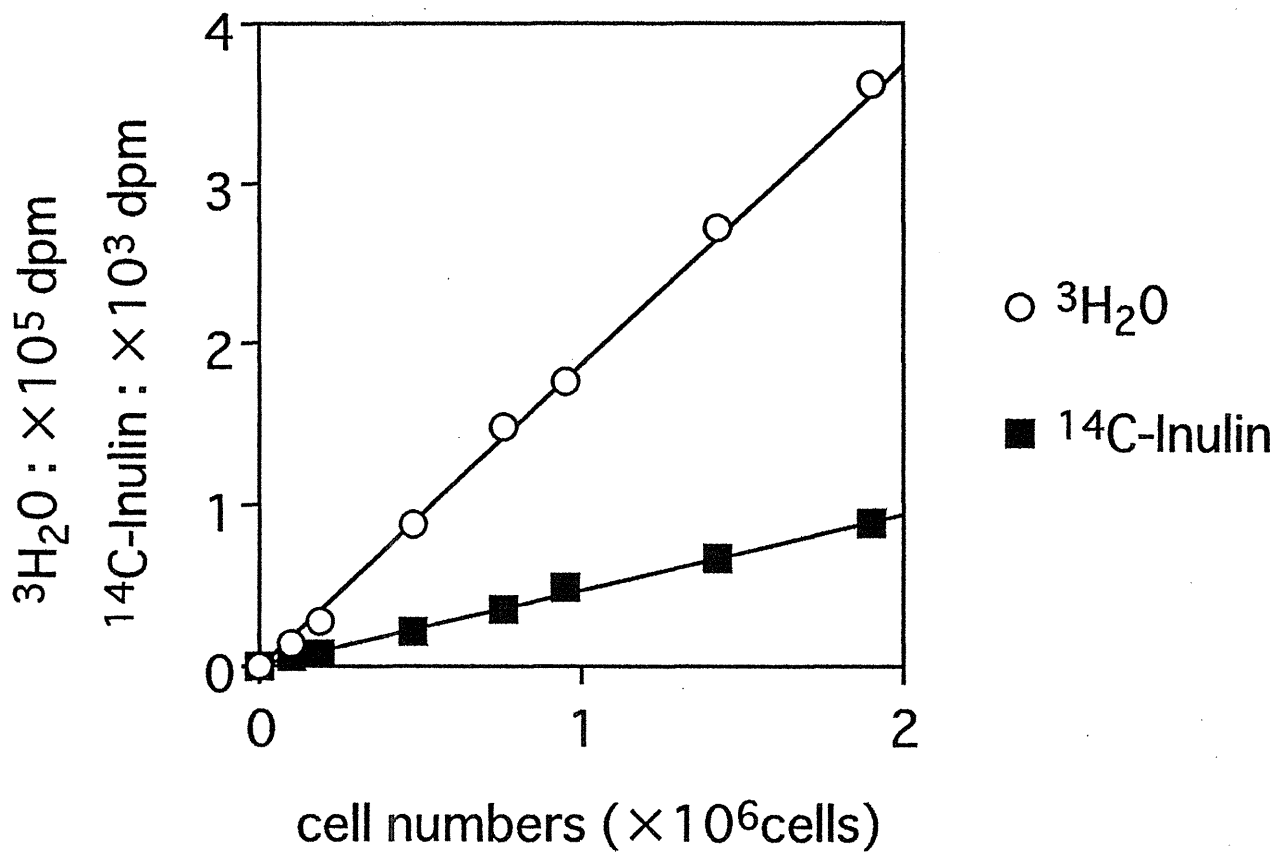


Fig.5 Relationship between cell numbers and radioactivities of  $^3\text{H}_2\text{O}$  and  $^{14}\text{C}$ -Inulin in cell pellet

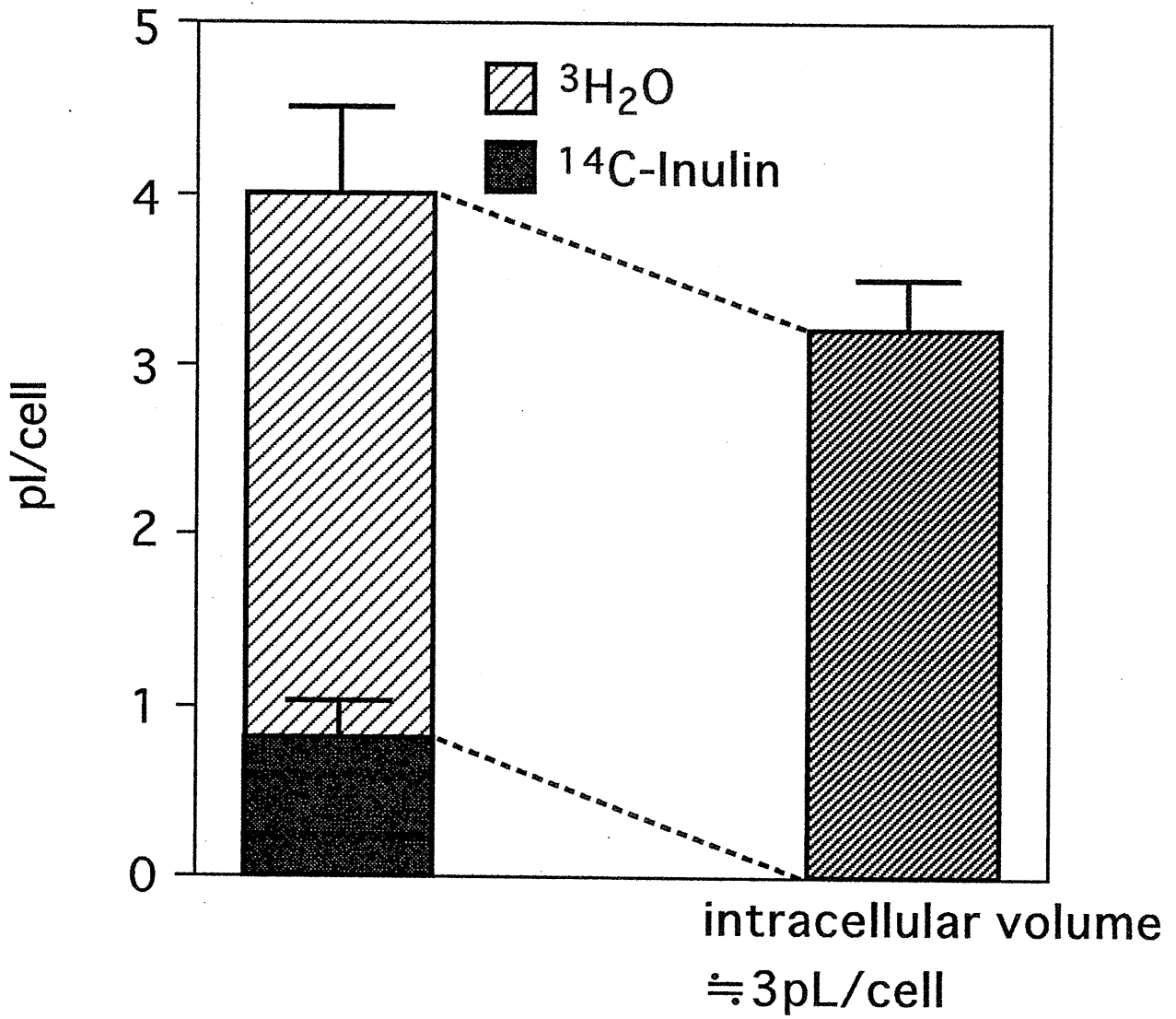


Fig.6 Measurement of cell volume by oil method



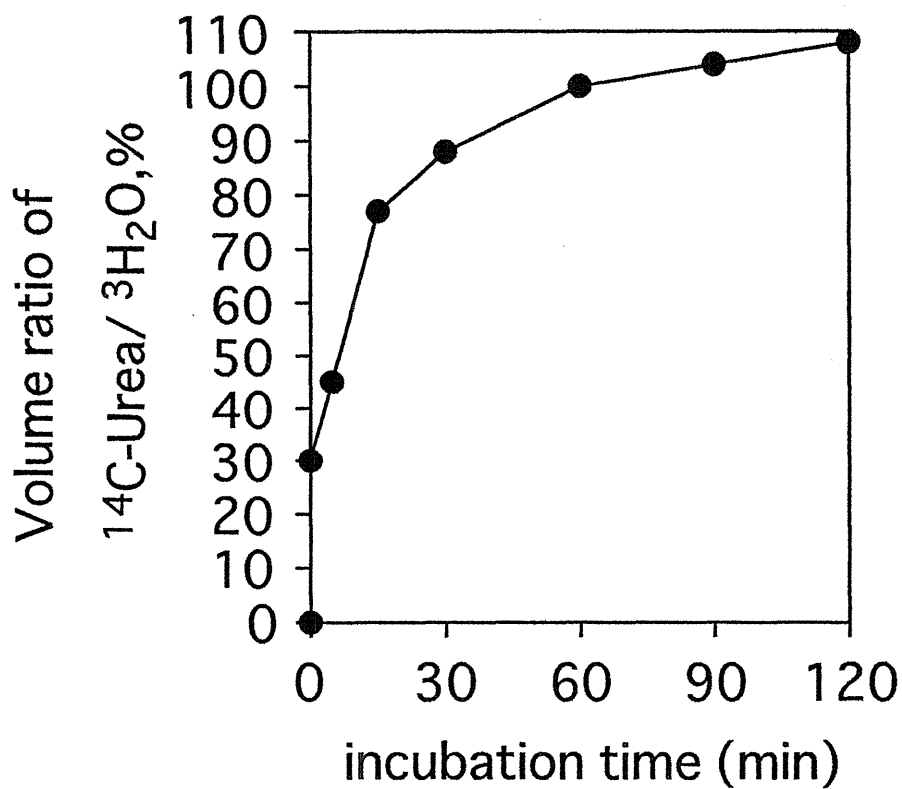
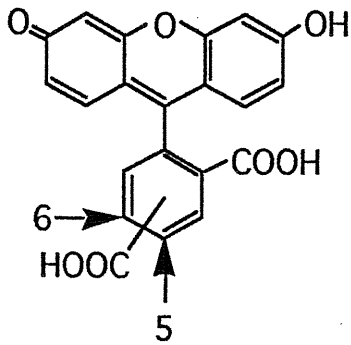
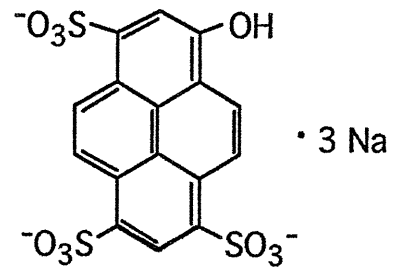


Fig.7 Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -Urea into cell pellet

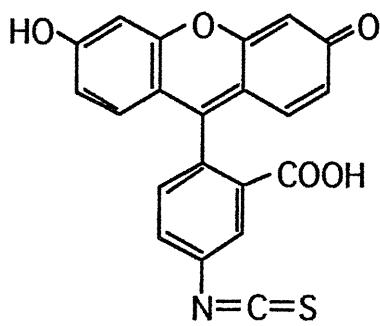
約 $1 \times 10^7$  cells/mlの細胞懸濁液に、 $^3\text{H}_2\text{O}$ 及び $^{14}\text{C}$ -Urea溶液を1/100量添加し、室温(細胞懸濁液中温度:  $21^\circ\text{C}$ )で一定時間放置した後にオイル法によって細胞をペレットとした。



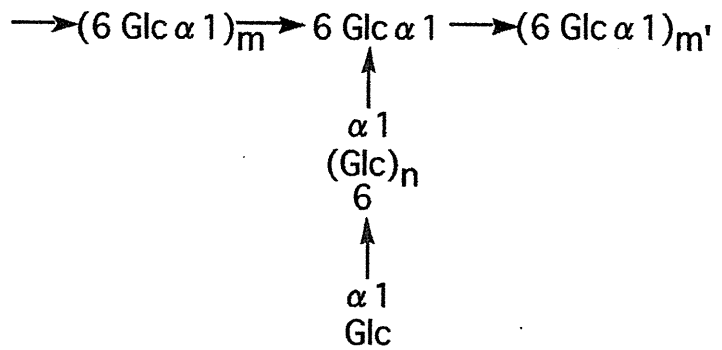
5(6)Carboxyfluorescein (CF)



8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid, trisodium salt (HPTS:pyranine)



Fluorescein isothiocyanate (FITC)



Dextran:  $m+m'+n=23\sim 25$

Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-Dex) (Glc 1 mol : FITC 0.004mol)

Fluorescein isothiocyanate-inulin (FITC-Inulin) (monosaccharide 1 mol : FITC 0.005mol)

Fig.8 Structure of fluorescent compounds

微鏡下で細胞外領域を観察するときなどに汎用される試薬であり<sup>7,8)</sup>、前者は酸性条件下で分子型となるため、pH依存的な細胞膜透過性を持つことで知られる。また、Fluoresceinisothiocyanate-dextran(FITC-dex)およびFluoresceinisothiocyanate-inulin(FITC-inu)は、細胞膜を通過しないとされる分子量5000前後の多糖を蛍光標識したものである。

これらの試薬を細胞懸濁液に投与後、オイル法によって得たペレット中の蛍光物質量の推移を調べると、Fig.9のように、CFとHPTSの示す細胞外水容積は<sup>14</sup>C-Inulinのそれに比べて大きく、インキュベーション時間と共に上昇する傾向にあった。この上昇傾向は、細胞膜への吸着性を予想させ、また、測定結果も安定しなかったため、この実験系にCFとHPTSを適用するには多くの問題点があることがわかった。

一方で、FITC-dex、FITC-inuを用いた場合は、<sup>14</sup>C-Inulinを用いた場合ともほぼ結果は一致しており、これらの物質を用いても、細胞外水の容積測定は可能であると考えられた。

### 1-1-3 <sup>14</sup>C-Inulin、蛍光標識-inulinおよび-dextranの限外ろ過膜通過率の測定

オイル法では、細胞ペレットに細胞外水が20%程含まれているので、限外ろ過法を用いてろ液を分取する時には、ろ液中にも細胞外水が含まれることになる。しかし、ろ液中に含まれる細胞外水量を見積もることができれば、細胞内水におけるPA濃度の測定が可能になる。そこで、オイル法による細胞内外水容積の測定を限外ろ過法に応用し、ろ液中の細胞内水

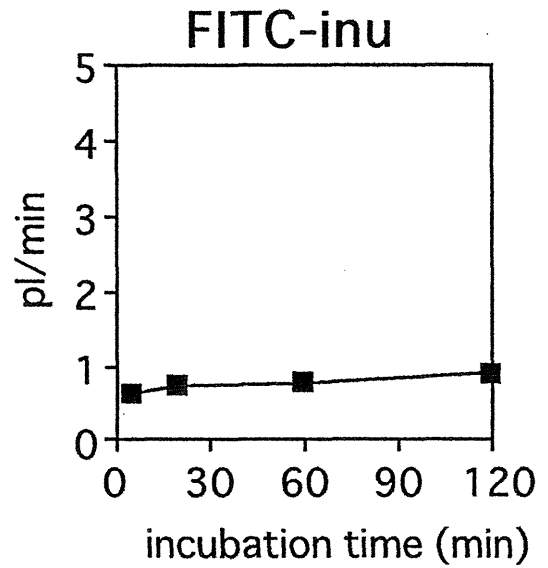
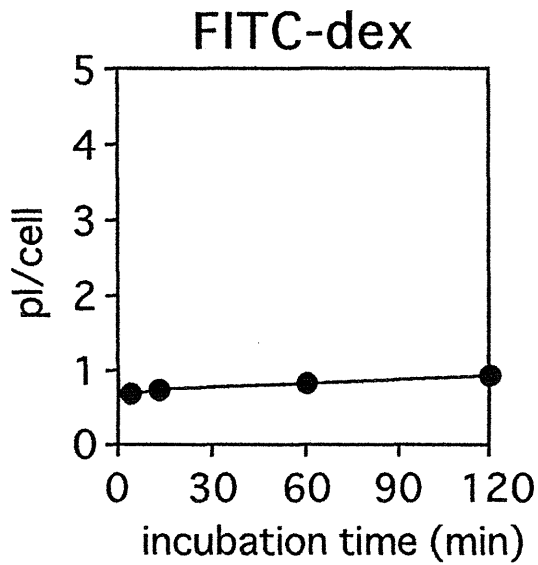
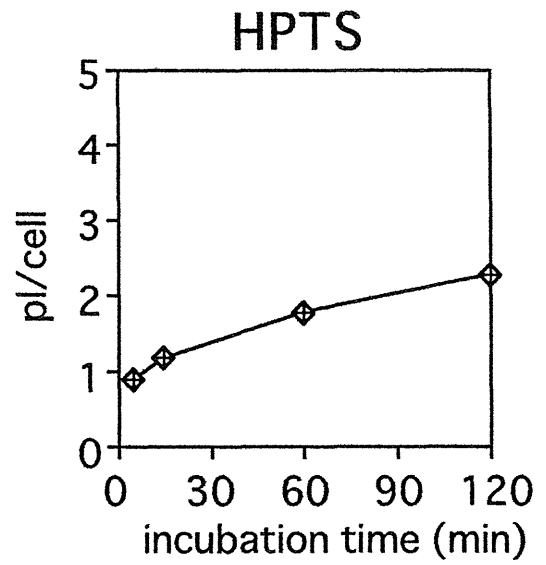
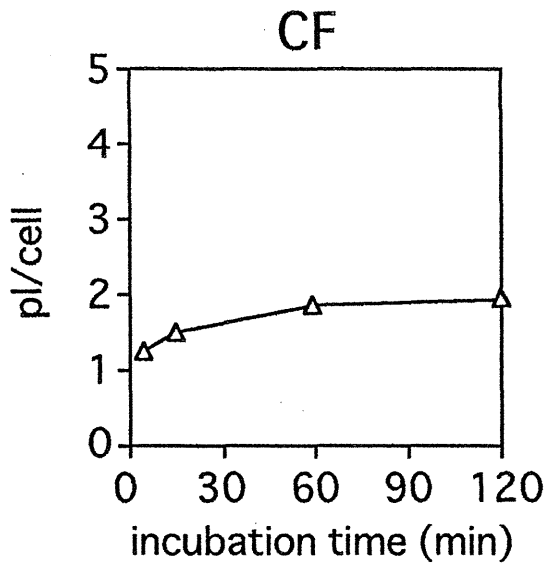


Fig.9 Extracellular volume in cell pellet measured with fluorescent compounds

容積と細胞外水容積の割合について<sup>14</sup>C-Inulinを用いて調べた。

しかし、限外ろ過膜を<sup>14</sup>C-Inulin分子が100%通過していないことが分かったため、細胞試料原液中<sup>14</sup>C-Inulin濃度に対するろ液中濃度の割合、すなわち“<sup>14</sup>C-Inulinの限外ろ過膜通過率”を求めた。

その結果、限外ろ過法に用いている分画分子量10,000の限外ろ過膜では、分子量約5000の<sup>14</sup>C-Inulinは膜を100%通過せず、ろ過膜上にのせる原液量によっても通過率は影響を受け、多くのろ液が膜を通過する場合の方が、通過率は大きくなる傾向があった。原因の詳細は不明だが、おそらく、限外ろ過の分画対象とされているタンパク分子と、直線的な糖鎖であるInulin分子の立体構造上の違いが通過率を小さくし、膜を通過する際に一部が吸着されることによる影響ではないかと考えている。

細胞試料を本法に用いる場合、膜上に分取できる細胞数は $2\sim 4\times 10^6$  cellsで、そのろ液量は微量(5~10  $\mu$ lの範囲)である。この条件での<sup>14</sup>C-Inulin分子の通過率は、約60%であった(Fig.10)。したがって以下、ろ液中に得られる細胞外水量を見積もる際には、この通過率60%を用いることとした。

なお、先述の蛍光物質であるFITC-dex、FITC-inuについても限外ろ過膜通過率の検討を行ったところ、その通過率は著しく低く、20%~30%であった(Fig.11)。原因は明かではないが、inulin分子やdextran分子から分岐している蛍光基が限外ろ過膜の通過を阻むのではないかと考えている。したがって、調べた蛍光標識多糖は全て、本実験には適さなかった。

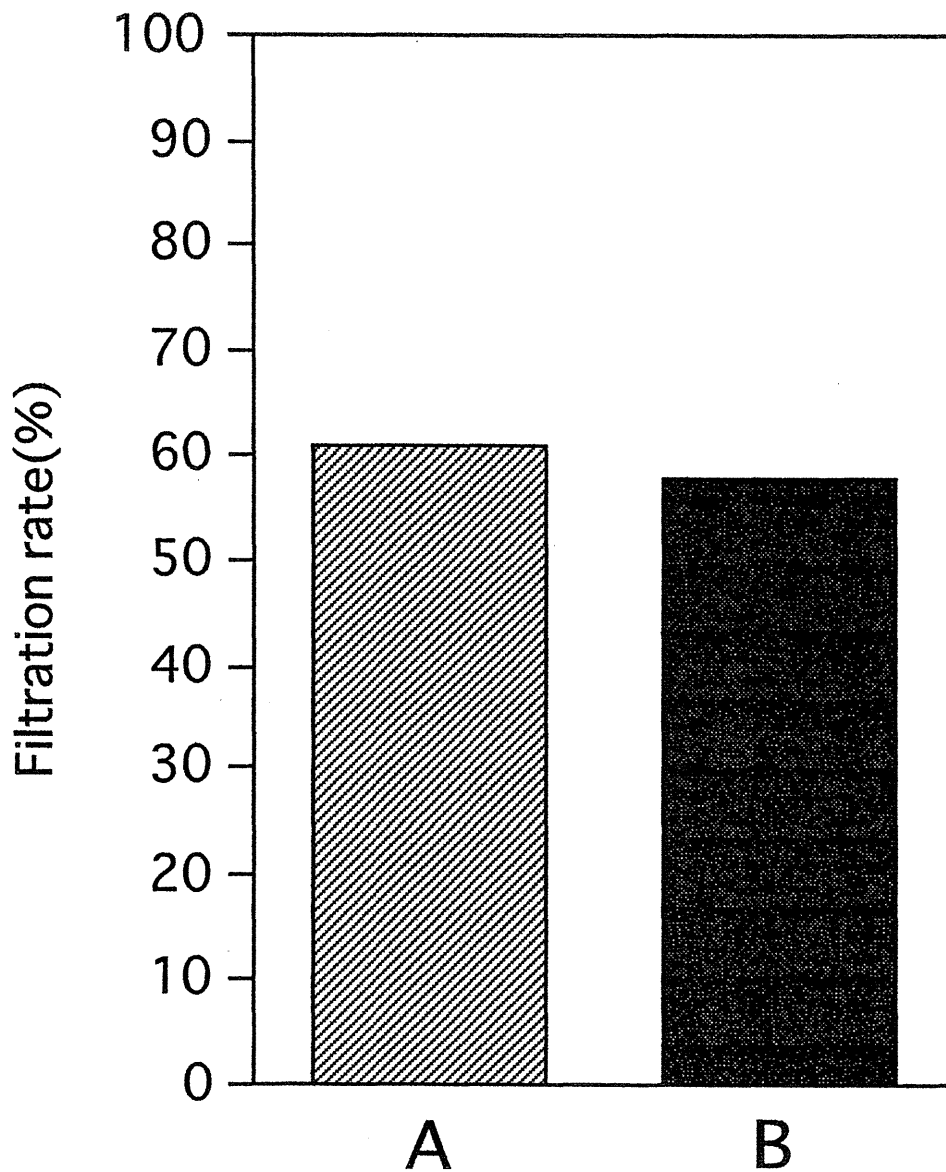


Fig.10 Filtration rate of  $^{14}\text{C}$ -Inulin for ultrafilter membrane

- A) 50mg/mlのBSA溶液中に、 $^{14}\text{C}$ -Inulin、及び $^3\text{H}_2\text{O}$ をそれぞれ1/100量添加したものを限外ろ過膜上に重層し、5000×gで60分間遠心して、限外ろ過を行った。
- B) 培地に $^{14}\text{C}$ -Inulin、及び $^3\text{H}_2\text{O}$ をそれぞれ1/100量添加したものを限外ろ過膜上に重層し、71×gで60分間遠心して、限外ろ過を行った。

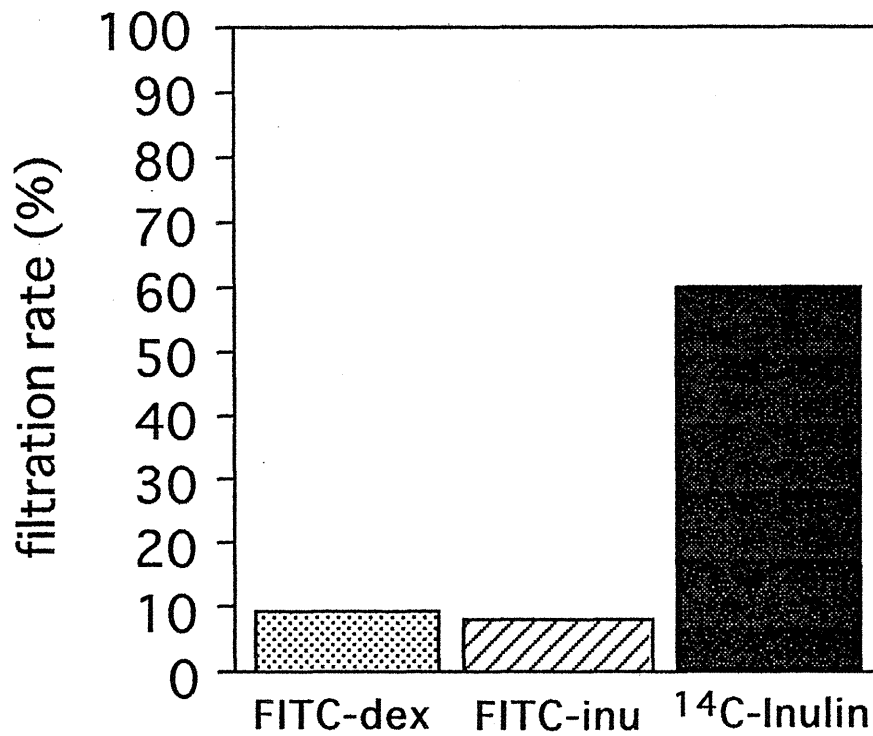


Fig.11 Filtration rate of fluorescence labelled inulin, dextran, and <sup>14</sup>C-Inulin

FITC-dex及び-inuを含む培地、または50mg/mlのBSA溶液を40μl、限外ろ過膜上に重層し、前者を71×g、また後者は5000×gで遠心して、限外ろ過を行った。

## 1-2 限外ろ過法における凍結融解の効果

次に、 $^{14}\text{C}$ -Inulinの通過率を考慮して細胞試料を用いる実験を試みた。

まずは本法によって、ろ液中にどの程度の細胞内液が得られるのかを知るために、凍結融解を行った試料とそうでない試料とのろ液量の差を比較した。

その結果、凍結融解によって、ろ液中の細胞内水量は凍結融解を行わないものに比べて増しており、更に、凍結融解を行わなければ、細胞内水は殆どろ液中に含まれないことが明らかになった(Fig.12)。このことから、凍結融解を行わない場合には細胞破壊が起こらないため、細胞外液のみが膜を通過するのに対し、凍結融解によって細胞破壊が起こった場合には細胞質液のろ過が行われ、細胞内水がろ液中に回収されるものと考えられた。

したがって、限外ろ過法による遊離PAの測定を行う際には、凍結融解を施した試料と施していない試料とを用意し、前者のろ液量、及びPA量から後者のものを差し引けば、細胞内遊離PA濃度の近似が可能であることが示唆された。

## 1-3 PAの限外ろ過膜通過率の測定

以上の実験結果から、分子量が限外ろ過膜の分画分子量より小さい場合でも、100%の分子が通過しているわけではないことが明らかになったため、PA分子の通過率についても検討を行うべきであると考えた。そこで、 $^{14}\text{C}$ -Inulinと同様の方法でPA分子の通過率を調べた。

生理的無機イオンおよび、肝臓細胞内に含まれていると予想されている



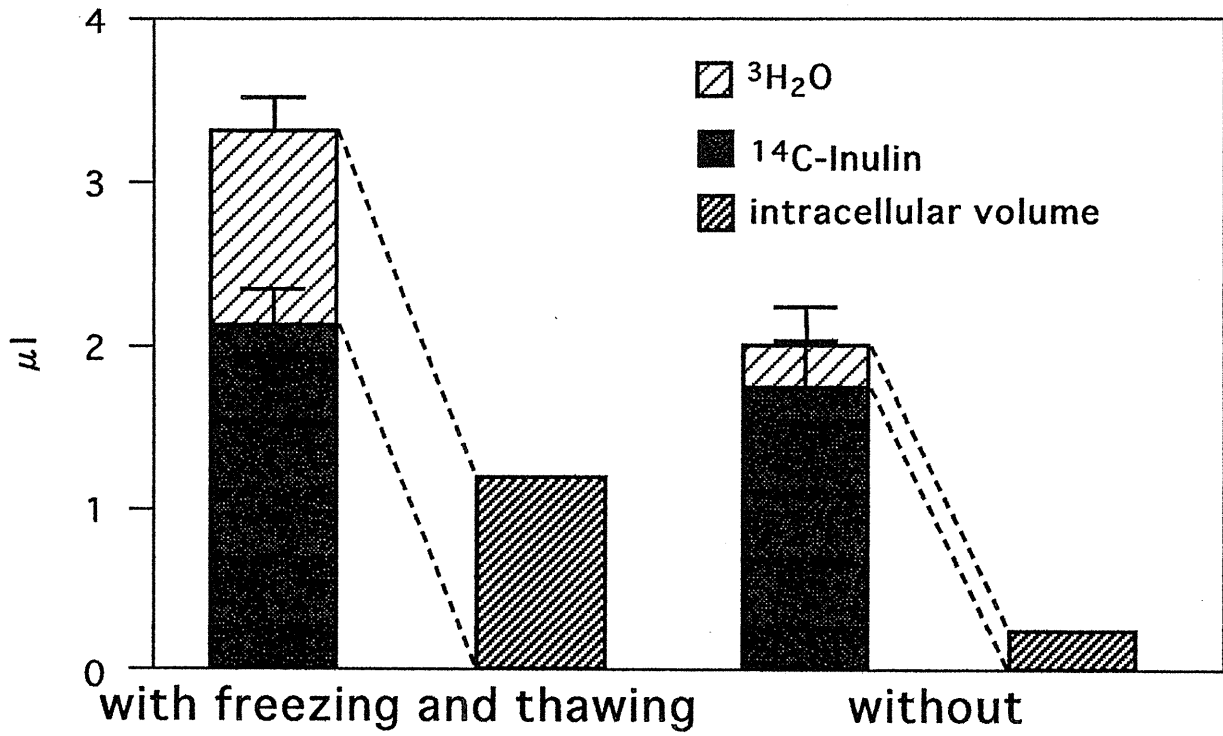


Fig.12 Effect of freezing and thawing of cells on volume of filtrate

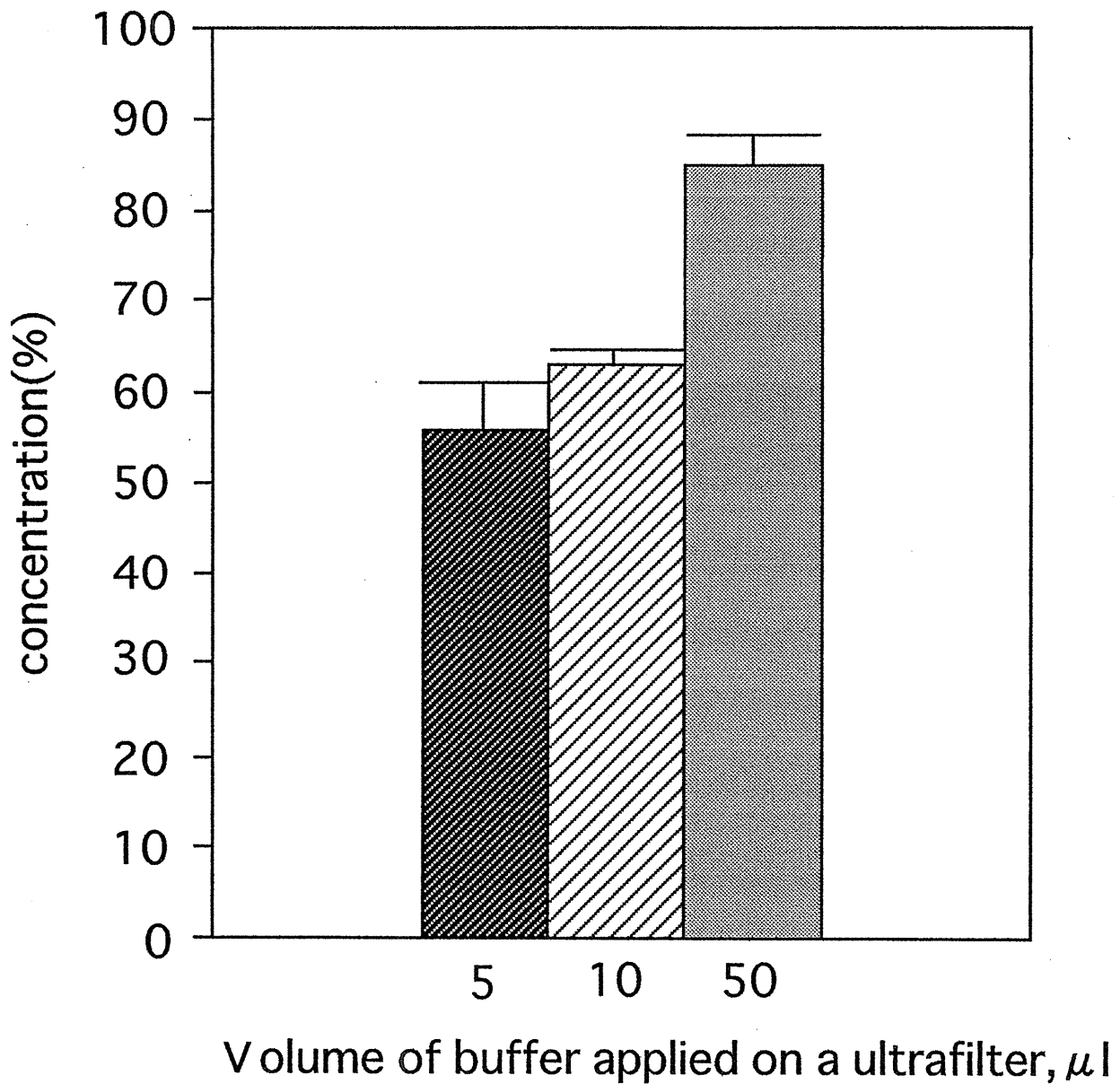
濃度のPut、Spd、Spmを含む溶液をろ過膜上にのせて遠心し、ろ液中のPAを分析することによってその通過率を求めると、膜にのせた原液量が少なく、ろ液量が少ない場合は、PAも限外ろ過膜を100%通過しないことが分かった(Fig13)。このときの通過率は、PAの種類によっても多少の違いがあり、PA分子が長鎖になるにしたがって、その通過率も小さくなるといった傾向も見られたが、その差は全てFig.12の偏差内に収まった。この際、タンパク質の存在がろ過率に影響する可能性を考慮して、50mg/mlとなるように牛血清アルブミンを含めた資料についても通過率を求めたが、結果は同様であった。ろ液量の少ないときの低い通過率は、通過率がPAの電荷数に影響されないことから、膜の表面電荷の関与する吸着ではなく、膜内部へのPA分子の保持が原因であるように思われた。

したがって、通常ろ液量は5~10  $\mu$  l となるように細胞数を調節してろ液を分取するため、その範囲における、ろ過率60%を考慮して細胞内水のPA濃度を計算する必要があることが示唆された。

#### 1-4 まとめと考察

オイル法を用いることによる細胞内水容積の算出が可能であることの確認でき、<sup>14</sup>C-Inulinを用いた細胞外水容積の測定が限外ろ過法を行う際に、ろ液中に混在してくる細胞外水の補正に有用であることが示唆された。

更に簡便な細胞外水容積の測定法の開発を目指して、蛍光物質を用いる方法の検討も行ったが、調べた蛍光物質はこの実験系には不適切であることがわかった。



**Fig.13 Effect of sample volume on filtration rate of polyamine**

PA液(0.15mM put, 10mM spd, 10mM spm, 100mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl, pH7.8)を限外ろ過膜上に重層後、71×gで60分間遠心して得られたろ液試料と、重層した原液中のPA濃度を測定し、比を算出した。

また、限外ろ過膜通過率を求める実験の結果から、分画分子量以下の分子でも、条件によっては限外ろ過膜を100%通過しないということがわかった。そのうえで、 $^{14}\text{C}$ -Inulinの通過率を考慮し、限外ろ過法を細胞試料に応用した結果、細胞を凍結融解しなければ、ろ液の殆どは細胞外水に由来するものであることがわかった。また、PAの限外ろ過膜通過率を調べることで、ろ液量が少量の時は、PAが限外ろ過膜を100%通過せず、5~10 $\mu\text{l}$ のろ液量である場合には、その通過率は約60%であることがわかった。したがって、限外ろ過法による遊離PAの測定を行う際には凍結融解を施した試料と施していない試料とを用意し、前者のろ液量、及びPA量から後者のものを差し引き、さらに通過率を補正すれば、細胞内由来ろ液の濃度測定が可能であることが示唆された。

細胞内におけるPAは必ずしも核酸などの高分子ばかりではなく、ATPなどの低分子ヌクレオチドとも複合体を作って存在していることが知られている。本研究では、このような低分子ヌクレオチドとPAとの複合体については通過率の検討をしていないが、複合体の分子量が1000以下であると仮定すれば、PAと類似の通過率を示すものと思われる。したがって、本法によって測定される限外ろ液中のPAは、遊離型および、低分子ヌクレオチドなどと複合体を形成するPAであると考えられる。

## 第2章 細胞容積とポリアミン濃度の関係

PAが細胞機能に種々の影響を与える分子であることはよく知られているが、細胞容積への影響に関する報告はあまりない。しかし当研究室では以前より、細胞内PA量の低下や蓄積によって、細胞容積に変化が生じる観察結果を得ていたため、限外ろ過法をその実験系へ応用した<sup>5)</sup>。

### 2-1 ポリアミン枯渇細胞及び過剰蓄積細胞と細胞容積変化

まずはこれまでに当研究室で観察されたPA量と細胞容積の関係を確認するための実験を、Fig.14に示すプロトコールに従って行った。細胞試料にはHTC細胞を用い、PA合成律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素阻害剤であるアミノオキシアミノプロパン(AOAP)を培地中300  $\mu$ Mになるように投与した。AOAPの作用点およびPA合成・代謝経路をFig.15に示す。PAの前駆体であるputは、オルニチンがODCの作用を受けて生じるため、AOAPの投与は細胞内のPA量を低下させる。この際、通常2日程度の処理によって増殖停止が起こる。実際、AOAP投与4日間の培養により細胞内のput、及びspdの枯渇が起こり、増殖の停止が確認された<sup>6)</sup> (Fig.16,17)。そこで、その間の細胞容積、及び細胞容積分布の変化をコントロール細胞と比較しつつ、コールターカウンターz2を用いて測定した。その結果、コントロール細胞についてのヒストグラムでは、細胞一つ当たりの容積が2pLの所にピークが観察され、容積平均は約3pLとなり、第一章で測定した、細胞内水容積3pLにほぼ対応する値を示した。一方、AOAP処理細胞では、処理時間が増すに従って細胞容積は徐々に減少し、細胞容積分布も幅狭くシャ

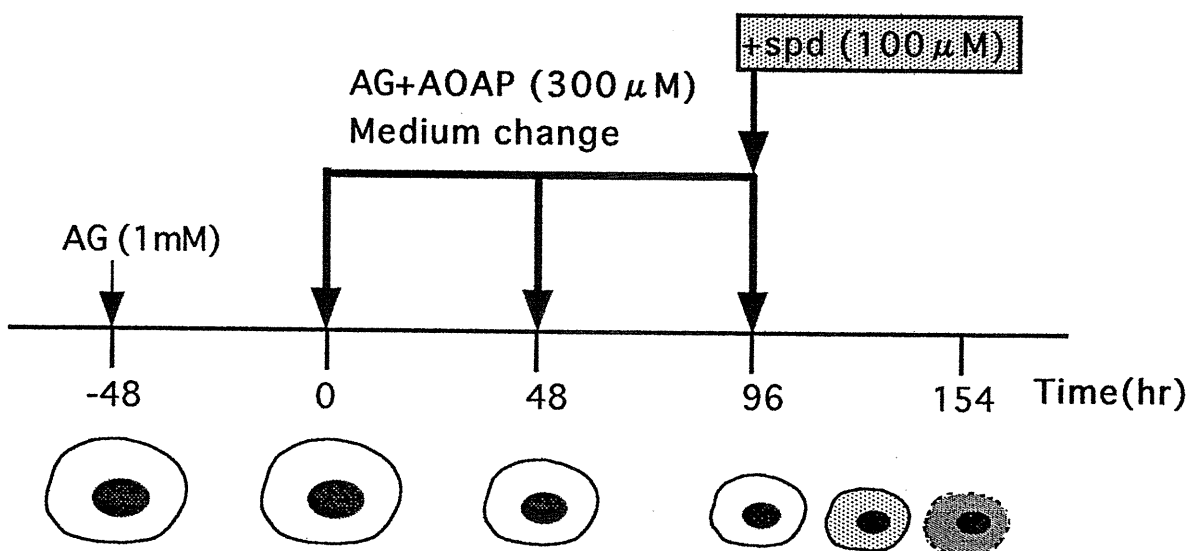


Fig.14 Protocol for cell culture experiment

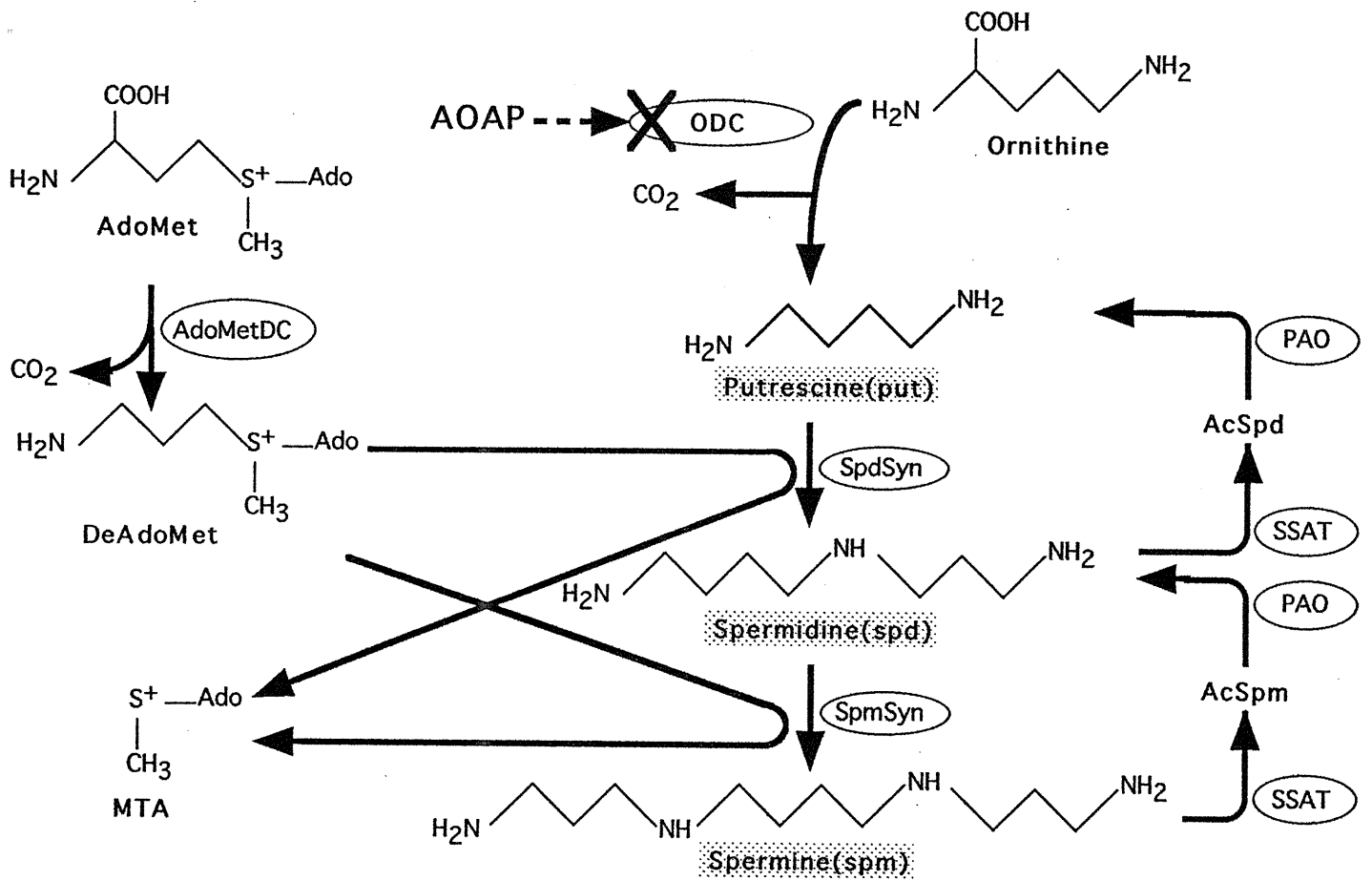


Fig.15 Polyamine biosynthesis and interconversion pathway

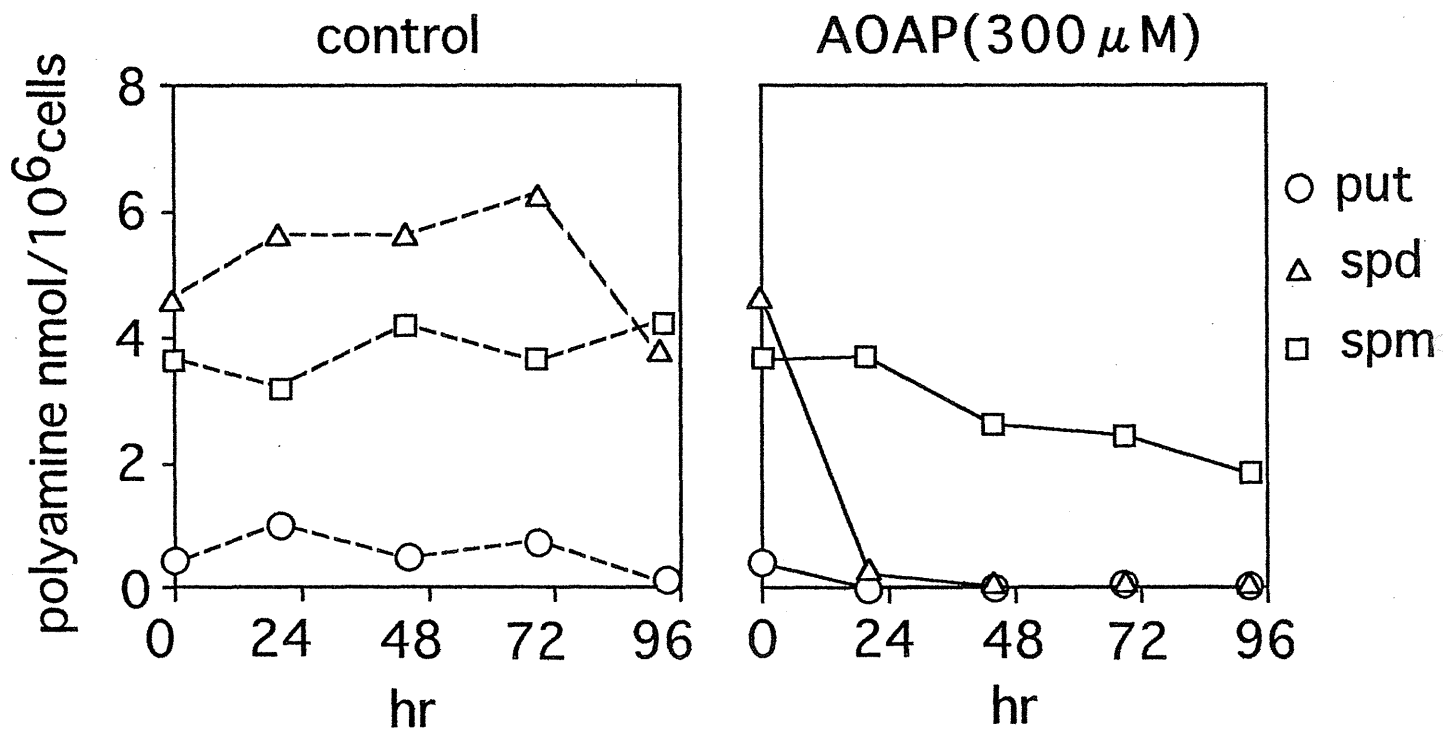


Fig.16 Polyamine content in HTC cells during treatment with or without AOAP



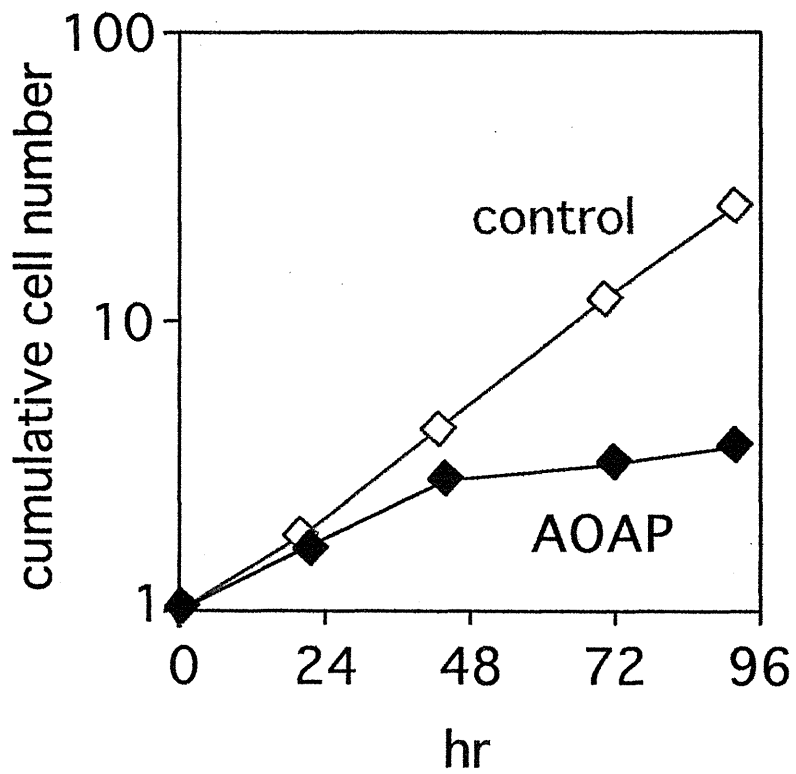


Fig.17 Effect of AOAP treatment on cell growth

ープに変化することがわかった(Fig.18)。Fig.19には、Fig.18の結果における容積平均の推移を示した。

比較的長期間、spdが枯渇した細胞に少量のspdを投与すると、細胞は急激にspdを蓄積する。そこでFig.14に示したように100  $\mu$ Mのspdを投与し、spdの過剰蓄積細胞を調製した。spd投与により、細胞はFig.20に示すように投与後急激にspdを取り込み、5時間で細胞当たりのPAにすると、投与前のコントロール細胞の約15倍、同様にspd投与したコントロール細胞と比較しても8倍のspdを蓄積した。spd投与後の細胞容積の変化を先程と同様にコールターカウンターで調べると、Fig.21に示すようにspdの蓄積に伴って細胞容積は急激に減少し、更にその容積は時間が経過しても回復せず、容積調節機能の消失が認められた。Fig.21に示す細胞容積は、生存している細胞のみが対象であるが、18時間後には殆どの細胞が死に至った。

## 2-2 限外ろ過法のポリアミン過剰蓄積細胞への応用

細胞質に存在する高分子と結合しないPAは、通常は細胞内PAの数%から十数%であると考えられている。細胞内にはPAが結合し得る核酸の陰電荷がPAの陽電荷に比べて大過剰に存在するため、生理的条件下、細胞内の全PA量が多少変化しても、遊離PA量の全PA量に対する割合は一定に保たれることが推察される。しかし、前節で調製した細胞は、容積が縮小した上に、過剰のspdを蓄積しており、遊離PA濃度の調節に大きな変化が起きている可能性が高い。そこで、前節における急激なspd蓄積と細胞容積の減少に着目し、spdの蓄積がピークに達したときの細胞を限外ろ過法に応

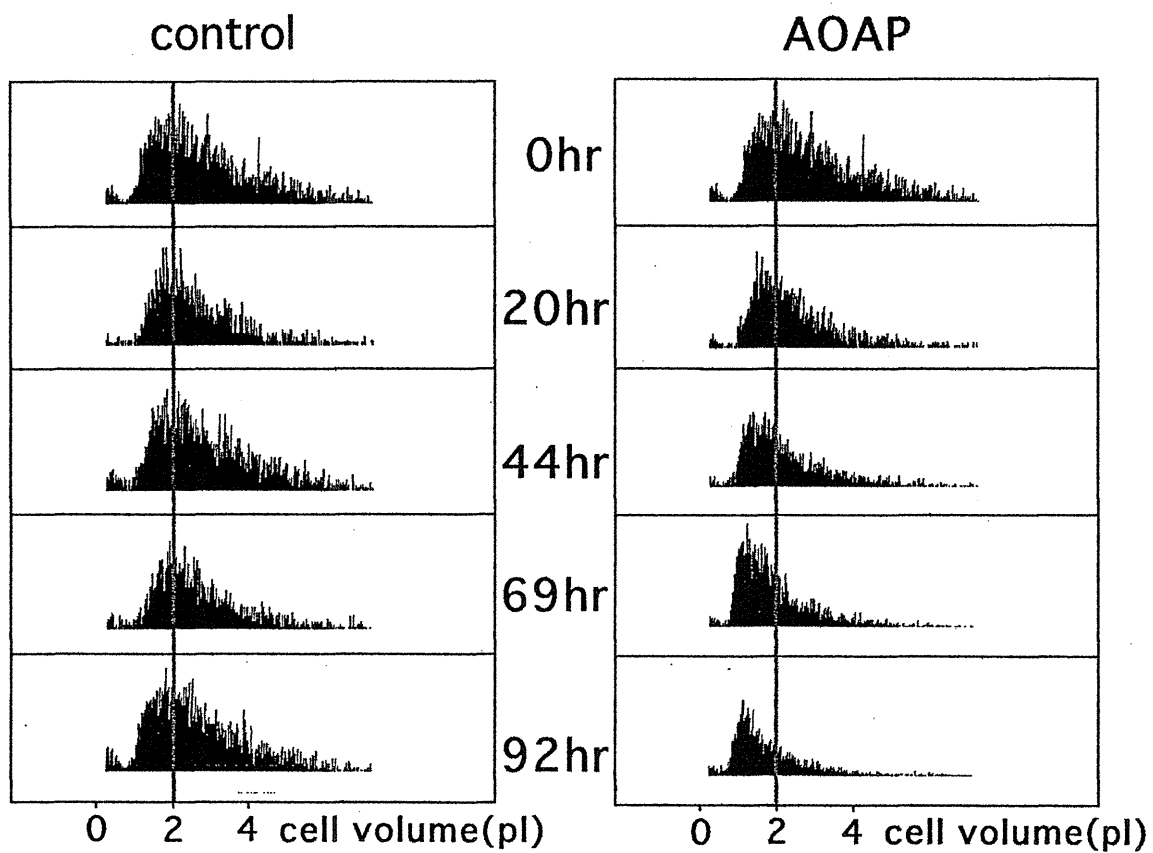


Fig.18 Histogram of cell volume distribution during treatment with AOAP

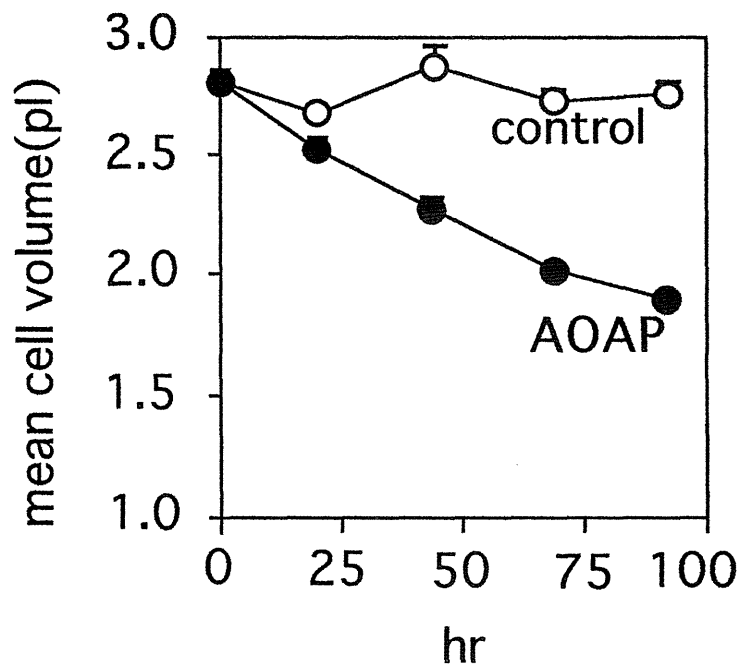


Fig.19 Cell volume changes during treatment with AOAP

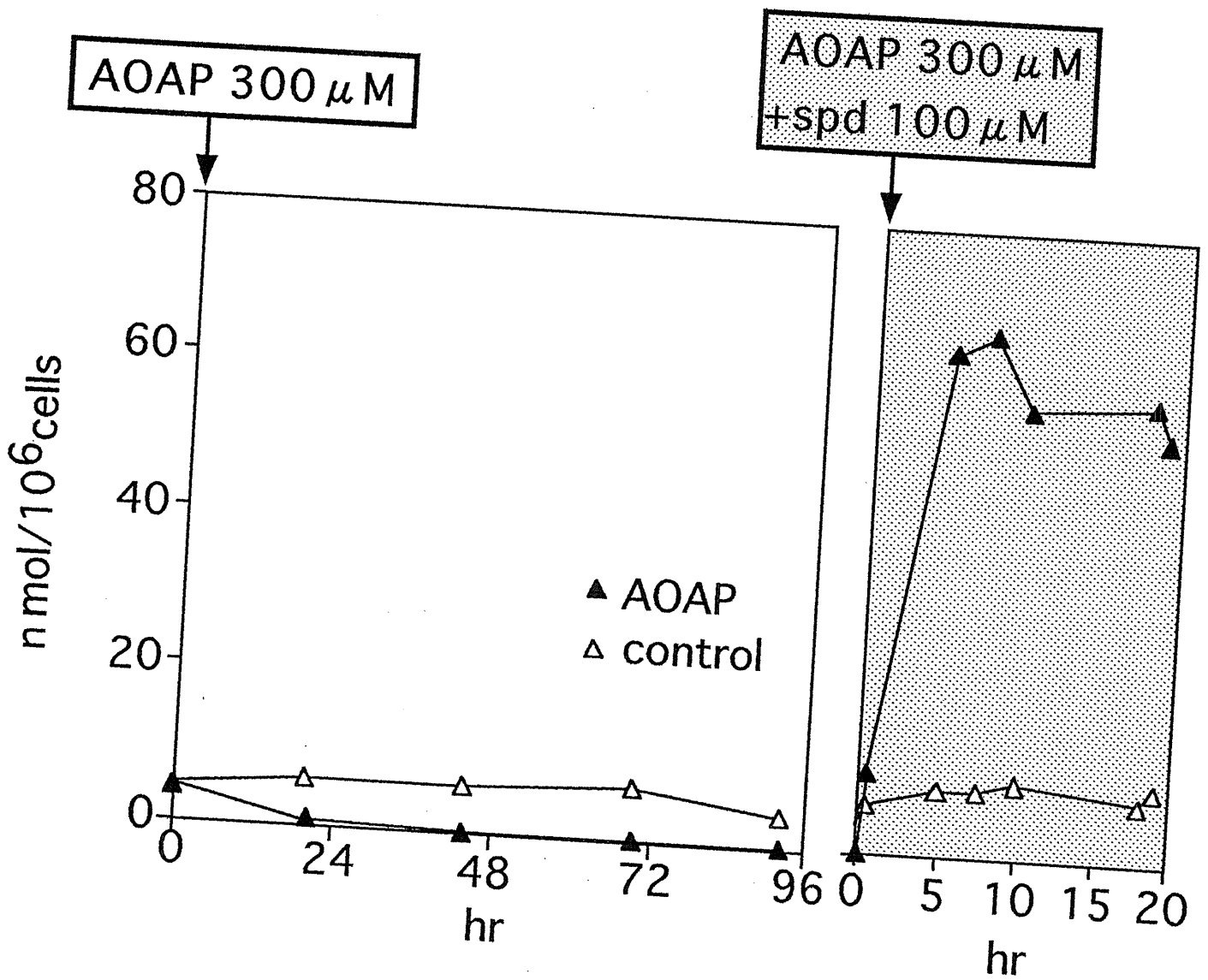


Fig.20 Accumulation spermidine in HTC cells treated with or without AOAP after administration of spermidine

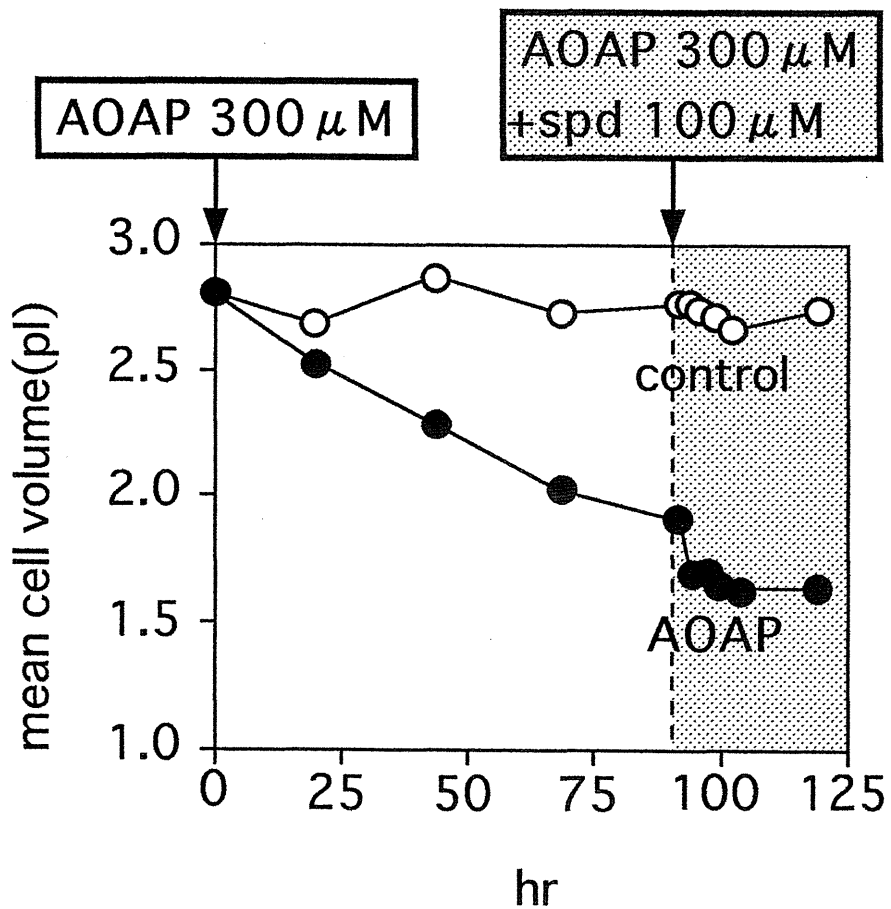


Fig.21 Cell volume changes of HTC cells treated with or without AOAP by administration spermidine

用し、ろ液中のPA濃度を遊離PA濃度の指標として、その変化を調べた (Table.1)。試料としては、spd投与前(A)のコントロール細胞と、AOAP処理細胞、およびspd投与5時間後(B)のコントロール細胞と、AOAP処理細胞を比較した。

Table.1より、spd投与後(B)の $10^6$ 細胞あたりの全spd量は、spd過剰蓄積細胞がコントロール細胞の8倍弱であったのに対して、その時点の細胞のろ液中spd濃度では、60倍以上であった。一方で、spd投与前(A)と投与後(B)、それぞれの時点におけるコントロール細胞の全spd量とろ液中spd濃度を比較すると、全spd量には2倍近くの変化が起こっているにも関わらず、ろ液中のspd濃度はほぼ一定に保たれていた。

### 2-3 まとめと考察

本研究により改良した限外ろ過法を用いることによって、spdを過剰に蓄積した細胞がその容積を縮小し、細胞死に至る際には、細胞質ゾルの限外ろ液中のPA濃度が上昇することが明らかになった。本研究で用いた限外ろ過法により得られるろ液には、低分子ヌクレオチド複合体として存在するPAも含まれる可能性は高いが、このろ液中PA濃度は細胞における遊離PA濃度の指標となるものであり、細胞レベルで細胞内遊離型PAの変動を直接確認した初めての例である。簡便で、多数の検体に応用可能な本法により測定されるPA濃度は、懸濁培養可能な細胞系における遊離PA濃度の調節機構の研究に有用な手段を提供するものと思われる。

PAが分布しうる細胞内容積や、限外ろ過膜の性質、再現性の確認などを

**Table.1 Spermidine accumulation at 5 hour after administration of 100  $\mu$  M spermidine**

Sample	Intracellular total spd content (nmol/10 <sup>6</sup> cells)		Spd concentration in ultrafiltrate (nmol/ $\mu$ l)	
	control	AOAP	control	AOAP
A (+spd,0hr)	3.72	<0.02	0.87	<0.01
B (+spd,5hr)	8.46 (1)	64.1 (7.6)	1.08 (1)	67.3 (62)



さらに厳密に検討してゆく必要はあるが、今後この方法で細胞内全PAと遊離PAとの存在比を正確に求める事を検討し、遊離型と結合型のPA濃度の変動と細胞機能の関係の解明に応用したい。

当研究室ではこれまでに、細胞内PA量の蓄積と細胞容積の関係を、顕微鏡観察、あるいは $^3\text{H}_2\text{O}$ による細胞内水の測定によって明らかにしてきた。今回は、それに加えてコールターカウンターを細胞容積の測定に用いることで、さらなる知見を得ることができた。即ち、AOAP処理を行うと、細胞内PA量の減少と共に、細胞容積の減少も観察されるが、その際、細胞容積の分布が狭い範囲に収束することも明らかになった。このことは、細胞の状態が均一になったことを示しており、一定の細胞周期の細胞が蓄積した状態を示すものではないかと思われる。この細胞容積の減少は、細胞増殖の停止なども伴って徐々に進行するため、一概にPAの直接的な影響であるとは言い切れず原因は不明だが、恐らくPAの枯渇により、タンパク合成が停止し、細胞周期がG1期で停止していることが原因している可能性が高い。

一昨年栗田は、 $^3\text{H}_2\text{O}$ による細胞内水の測定により、spdが枯渇した細胞に急激にspdを蓄積させると更に急激な細胞容積の減少が起こることを見いだしたが、測定精度が悪かったために、有意な細胞容積の減少として捉えることはできなかった。今回、コールターカウンターを用いて細胞容積を測定することで、spd蓄積による細胞容積の減少を明瞭に示すことができた。spdを投与してからのこの細胞容積の変化は、AOAP処理中に観察さ

れる変化に比べて急激であり、更にspd蓄積と共に起こることから、spdが直接細胞容積に与える影響であることが示唆される。

このような細胞容積変化と細胞死が観察されるspd蓄積細胞について行った限外ろ液中spd濃度の測定では、AOAP処理を施したspd投与細胞では、無処理細胞にspdを投与した場合の60倍を越えるPA濃度が検出された。このことは急激かつ過剰な細胞内spdの蓄積によって遊離spdの濃度調節が困難になり、その結果として細胞毒性が現れることを示唆している。また、2倍程度のspdの蓄積が起こっているコントロール細胞では、spd投与によってもろ液中spd濃度に大きな変化はないため、ある程度細胞内にspdを蓄積しても、毒性を現さない範囲で遊離spdを調節できる機構があることも示唆された。

遊離spdの調節機構は不明であるが、細胞内に存在する陰電荷を持つ高分子が、おもにその役割を担うものであると考えられる。本研究に用いた細胞は動物細胞であり、植物細胞のように細胞内小器官が塩基性成分の貯蔵に機能する可能性は小さいが、ミトコンドリアがPAのトランスポーターを有するという報告もあることから、ミトコンドリアが細胞内遊離PA濃度の調節に関与していることも否定できない。特に、本実験系でのspd過剰蓄積細胞で、ミトコンドリアの膨張及び傷害が観察される<sup>9</sup>ことは興味深い。

spd蓄積に伴った細胞容積の減少の後に起こる細胞死の原因は不明である。本実験で観察される細胞死も、浸透圧による細胞収縮によって引き起こされるアポトーシスと同様のメカニズムによって起こる可能性も否定はできないが、本実験系では、DNAの断片化は観察されず、ミトコンドリア

の膨張および傷害も観察されており<sup>9)</sup>、ここで見られたものは壊死に近い細胞死であろうと考えられる。通例、浸透圧が関与するアポトーシスは、30%以上の細胞収縮によって引き起こされるという報告があり<sup>10)</sup>、AOAP処理の過程でそれ以上の細胞収縮が見られても細胞死に至らない本実験系との比較は困難であろう。むしろ高濃度に蓄積されたspdによる毒性が細胞死に関与するものと考えている。spdおよびspmは、核の凝縮を試験管内で促進し、また、核酸に関わる多くの酵素に対して低濃度で活性化、高濃度で阻害を示すことが知られている。また、PAの毒性が細胞内の代謝によってPAから生じるアクロレインや、アミノプロパナールのような有害なアルデヒドによるとする仮説も報告されている。これらのことは、異常に高濃度の遊離PAが、毒性の高い代謝物の生成に関与したり、細胞内の核酸などの高分子に多量に結合し、その機能を阻害した結果生じることを示唆している。細胞に蓄積性の高いPAの類似体は抗ガン剤の候補化合物になっており、PAの細胞毒性の本体は、薬剤開発の観点からも今後のPA研究の重要な課題であろう。

## 実験材料と方法

1.試薬：新生子牛血清(NBS)はJRH Biosciences、アミノグアニジン(AG)はSIGMA社から購入したものを、1-アミノオキシ-3-アミノプロパン(AOAP)は当研究室で合成したものを、 $^3\text{H}_2\text{O}$ (放射比活性：30mCi/ml)、 $^{14}\text{C}$ -inulin(3mCi/mmol)、 $^{14}\text{C}$ -Urea(55mCi/mmol)は室町科学より購入し、放射能を測定する際のシンチレーターカクテルは、和光純薬工業のScintisol EX-H(成分：キシレン,DPO,Bis-MSB,非イオン性界面活性剤)を用いた。オイル法に用いたオイルは、Dibutyl phthalate,Corn oil共にSIGMA社から購入したものを、蛍光試薬は、それぞれ5(6)Carboxyfluoresceinを和光純薬工業より、8-Hydroxypyrene-1,3,6,-trisulfonic acid · trisodiumsalt、Fluoresceinisothiocyanatedextran, Fluoresceinisothiocyanate-inulinはSIGMA社より購入した。その他化学試薬は関東化学あるいは和光純薬工業の試薬特級を用いた。限外ろ過ユニットはMILLIPORE社のUltrafree-MC(10,000 NMWL filter unit)を用いた。

2.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、 $-80^\circ\text{C}$ で保存していたものを $37^\circ\text{C}$ で懸濁培養に供したものを、培地はSwim's S-77に、50mM Tricine, 2g/L Glucose, 2mM Glutamine, 0.05mM L-cystine, 0.5g/L  $\text{NaHCO}_3$ を加えて調製し、培養時に体積比で10%NBS、及びペニシリンGを100unit/mLになるように加えた。実験に用いた細胞は、 $1\sim 10\times 10^5$ cells/mLになるように48hr毎に植え継い

だ対数増殖期のものを用いた。なお、培養実験にはNBS中の血清アミン酸化酵素による影響を除くため、阻害剤であるAGを培地中、1mMになるように添加した。細胞数は、細胞懸濁液を0.4%トリパンブルー溶液で2~8倍に希釈した後、血球測定盤により計数した。その際、血球測定盤の枠に全体が入っていない細胞は計数から除外した。測定は、5視野について行い、最高、最低数を除いた3回の計数値の平均を細胞数とした。なお、トリパンブルーを取り込んで染まった細胞は死細胞として計数から除外した。

3.オイル法による細胞の分離<sup>4)</sup>：約 $2 \times 10^7$  cells/mLとした細胞懸濁液をオイル (Dibutyl phthalate: Corn oil=10:3) 上に重層して60秒間遠心(5000 × g, 1min)し、細胞をペレットとして分取した。

4.細胞内水容積の算出：細胞懸濁液に $^3\text{H}_2\text{O}$ (1mCi/mL)、 $^{14}\text{C}$ -inulin(0.08 mCi/mL)をそれぞれ1/100量ずつ添加し、5min後にオイル法によって細胞を分取した。そして水層の除去、及びオイル層上部の洗浄を行った後、オイル層を綿棒を用いてできるだけ除去したものを、細胞ペレットとして分離した。分離したペレットには溶解剤 (ソルバブル) を200  $\mu\text{L}$  加え、一晚室温で放置後、翌日液体シンチレーションカウンターを用いてそのペレット中の $^3\text{H}$ と $^{14}\text{C}$ の放射能を測定した。ペレットの水容積はその放射能( $^3\text{H}$ )と、水層の単位容積当たりの放射能( $^3\text{H}/\mu\text{L}$ )から算出した。なお、細胞内水容積は、細胞ペレット全体の容積より $^{14}\text{C}$ -inulinの放射能から算出した細胞外水容積を差し引いたものを全体の細胞内水容積とし、更にペレット中の細

胞数より1細胞当たりの値として算出した。

5. 蛍光試薬による細胞外水容積の測定：約 $2 \times 10^7$  cells/mLとした細胞懸濁液に蛍光試薬である5(6)Carboxyfluorescein(pH9, Ex:492nm, Em:517 nm), 8-Hydroxypyrene-1,3,6,-trisulfonicacid · trisodiumsalt(pH9, Ex:454nm, Em:512nm), Fluoresceinisothiocyanate-dextran(pH9, Ex:494 nm, Em:520nm) をそれぞれ0.1M NaOHで10mMに調製したものを、細胞懸濁液に1/100量ずつ添加し、5min後にオイル法によって細胞を分取した。なお、Fluoresceinisothiocyanate-inulin(pH9, Ex:494nm, Em:520nm)に関しては、飽和溶液の上清を用いた。そして、水層の除去、及びオイル層上部をPBSで洗浄した後、オイル層を綿棒を用いてできるだけ除去したものを細胞ペレットとして分離した。分離したペレットにはクロロホルムとpH9のホウ酸bufferを各々500 $\mu$ Lずつ加え、更にピペットでよく混ぜ、bufferにペレット中の蛍光物質を抽出した。その後、5000 $\times$ gで1分間遠心し、蛍光物質の含まれる上層のbufferを15倍希釈し、蛍光光度計で測定した。ペレットの細胞外水容積はその蛍光強度と、水層の単位容積当たりの蛍光強度から算出した。

6. 細胞内PA量の測定：細胞内total PAの測定では、細胞を遠心(5000 $\times$ g, 1min)によってペレットとした後、その上清を除き12.5%トリクロロ酢酸溶液(内部標準物質N-(3-aminopropyl)cadaverine : 2.5nmol/mLを含む)を125 $\mu$ L加えて除タンパクし、その遠心上清を試料とした。限外ろ液中P

Aの測定では、限外ろ過によって得られたろ液に先述のトリクロロ酢酸溶液を80  $\mu$ L加え、遠心した上清を試料とした。

PAの測定は、上記のように調製した試料をHPLCに注入後、分離されたPAを、ポストカラム法によりo-Phthaldialdehyde(OPA)と反応させ、生成する蛍光を測定することで行った(OPA-HPLC法)。分離カラムには、陽イオン交換樹脂(JEOL LC-R-2)を用い、カラム温度は80 $^{\circ}$ Cとした。溶離液は、2M塩化ナトリウム、0.28Mクエン酸緩衝液(NaOHでpH5.5に調製したものに12.5%容量のHPLC用メタノールを混合した後、その溶液を0.45  $\mu$ mのメンブランフィルターによってろ過したものを用いた。反応液としては、0.4Mホウ酸、0.2% 2-メルカプトエタノール、6mM OPA、0.1% Brij-35からなる溶液(pH10.4)を調整後、一晚以上低温室(4 $^{\circ}$ C)で放置したものを用いた。分離されたPAとの反応温度は80 $^{\circ}$ Cとした。溶離液、及び反応液の流速はそれぞれ0.8ml/min、0.25ml/minとした。検出は、励起波長345nm、蛍光波長450nmで行った。試料はオートサンプラーで注入した。

7.Coulter counterによる細胞容積分布の測定：3~8 $\times 10^5$  cells/mLの細胞懸濁液を希釈用溶液(ISOTON)で40倍希釈し、細胞容積分布の測定を行った。

8.限外ろ液の分取：細胞試料にHTC細胞を用い、Fig.1のように約2 $\times 10^7$  cells/mLとした細胞懸濁液から、フィルターユニット中に組み込まれた分画分子量10,000の限外ろ過膜上にオイル法を用いて細胞を分取した。次に

水槽をピペット、及び綿棒で除去し、除いた水槽とほぼ同量のオイルを添加した。その後、試料を密閉するためにチューブの蓋をパラフィルムでおおい、5000×gの遠心を60分間行った。なお、凍結融解を行う試料についてはパラフィルムで密閉した試料を、液体窒素による20分間の凍結と、室温による10分間の融解を3回繰り返す、その細胞膜を破壊した後に、5000×gの遠心を60分間行った。ろ液容積についてはその重量を測定し、比重が約1であるとして算出した。



## 参考文献

- 1) A. E. Pegg, Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy, *Cancer Res.*, 48, 759-774, (1998)
- 2) S. Watanabe, K. Kusama-Eguchi, H. Kobayasi, K. Igarashi, Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver, *J. Biol. Chem.*, 266, 20803-20809, (1991)
- 3) 栗田伸人、HTC細胞における水容積の測定-遊離ポリアミン量測定のための基礎検討-城西大学大学院平成10年度修士論文
- 4) R. M. Wohlhueter, R. marz, J. C. Graff, and P. G. W. Plagemann, A rapidmixing technique to measure transport in suspended animal cells, Applications to nucleoside transport in Novikoff rat hepatoma cells, *Methods Cell Biol.*, 20, 211-36, (1978)
- 5) 深澤孝史、ポリアミン欠乏HTC細胞のスペルミジン過剰蓄積による細胞死、城西大学大学院平成5年度修士論文
- 6) P. P. McCann, C. Tardif, P. S. Mamont, F. Schuber, Biphasic induction of ornithine decarboxylase and putrescine levels in growing HTC cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64, 336-341, (1975)
- 7) D. L. Daleke, K. Hong and D. Papahadjopoulos, Endocytosis of liposomes by macrophages, binding, acidification and leakage of liposomes monitored by a new fluorescence assay, *Biochim. Biophys.*

- Acta, 1024, 352–366, (1990)
- 8)G. M. Kidder, J. Rains, J. McKeon, Gap junction assembly in the preimplantation mouse conceptus is independent of microtubules, microfilaments, cell flattening, and cytokinesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3718–3722, (1987)
- 9)R. S. P. Benson, S. Heer, C. Dive, and A. J. M. Watson, Characterization of cell volume loss in CEN–C7A cells during dexamethasone–induced apoptosis, Am. J. Physiol., 270(Cell Physiol. 39), C1190–1203, (1996)
- 10)D. Haussinger, Regulation and functional significance of liver cell volume, Prog. Liver. Dis., 14, 29–53, (1996)
- 11)S. Waldegger, S. Steuer, T. Risler, August Heidland, G. Capasso, S. Massry, and F. Lang, Mechanisms and clinical significance of cell volume regulation, Nephrol. Dial. Transplant., 13, 867–874, (1998)
- 12)Y. J. Xu, N. Furuumi, K. Samejima, M. Niitsu, A. Shirahata, Measurements of macromolecule–bound and ultra–filtratable polyamines in rat liver homogenized without buffer, Biol. Pharm. Bull., 23(9), 1021–1026, (2000)