



生体高分子のポリアミン作用部位を  
探索するための方法論の開発

(03671029)



平成5年度 科学研究費補助金 (一般研究C) 研究成果報告書

平成6年3月

研究代表者 鮫島啓二郎  
(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が，細胞増殖・分化をはじめとする色々な生理的出来事に呼応して複雑に変動し，多くの生体高分子の機能発現の調節に深く関わっていることはこれまでの研究から疑う余地はない．しかし，ポリアミンがどのような生体高分子にどのように働いてその作用を発現するのかについては，とりわけ実際の細胞では何もわかっていないのが現状である．

ポリアミンと生体高分子との結合は，一部共有結合したものを除けば，平衡反応であり，ポリアミンの種類，また，細胞環境によりその平衡定数は大きく変動するに違いない．細胞内におけるポリアミンの役割を明らかにするためには，このように多様で複雑な系を取り扱い，その詳細を解明していくことが必要である．ポリアミン研究の困難さはそのような点にあり，この分野の研究の進展に貢献するためには，ポリアミンの結合状態を解析したり，ポリアミンの作用部位を特定したり，類別したりするための何らかの方法の開発が望まれている．

われわれは昭和63年度～平成2年度の本科学研究（一般研究C）において，ポリアミン結合蛋白のモデルでもあるアミノプロピルトランスフェラーゼの活性部位をポリアミンの立体制限アナログを用いて検索し，得られた情報から，それら酵素に対する強力な新規阻害剤を開発し，また二級アミノ基へのアミノプロピル基転移反応の発見，酵素精製のための新規アフィニティカラムの開発などの有用な成果をあげてきた．

本研究は，それらの研究の延長線上にあり，ポリアミンの生理的

意義の解明に役立つ有用な化合物または方法論の開発を主眼として行ったものである。はじめに、ポリアミンの機能研究への応用を目指して、5-カルボキシスペルミンの評価を行った。つぎに、ポリアミンの立体制限アナログを用いる一連の研究として、阻害剤によりポリアミン欠乏状態にした細胞にポリアミンまたはアナログ体を加えて生育を調べる実験系を作成し、各種実験から得られた有用な知見をまとめた。さらに、本研究課題に関連して、スペルミジン合成酵素の活性部位に存在すると考えられるスルフヒドリル基の標識について記述し、また、アミノプロピル基供与体である脱炭酸化S-アデノシルメチオニンの放射性誘導体の調製とそのジアステレオマーの分離についても有用な成果が得られたので、合わせて記述する。なお、本論文末尾には、上記に関連した既報論文2報に加えて、当研究室と共同研究により遂行された本研究課題関連論文2報も付け加える。

## 研究組織

研究代表者：鮫島啓二郎（城西大・薬・教授）  
研究分担者：白幡 晶（城西大・薬・講師）

## 研究経費

|       |         |
|-------|---------|
| 平成3年度 | 1,700千円 |
| 平成4年度 | 300千円   |
| 平成5年度 | 200千円   |
| 計     | 2,200千円 |

## 研究発表

### (1) 学会誌等

Shirahata, A., Chang Lie Zhu, Akatsu, S., Suzuki, Y. and Samejima, K. (1991). Polyamine-Linked Sepharose: Preparation and application to mammalian spermine synthase. *Protein Expression And Purification.*, 2, 229-234.

Shirahata, A., Takahashi, N., Beppu, T., Hosoda, H. and Samejima, K. (1992). Effect of inhibitors of spermidine synthase and spermine synthase on polyamine synthesis in rat tissues. *Biochem. Pharmacol.*, 45, 1897-1903.

Frydman, L., Rossomando, p.c., Frydman, V., Fernandez, C. O., Frydman, B. and Samejima, K. (1992). Interaction between natural polyamines and tRNA : An <sup>15</sup>N NMR analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 9186-9190.

Basu, H. S., Pellarin, M., Feuerstein, B. G., Shirahata, A., Samejima, K., Deen, D. F. and Marton, L. J. (1993). Interaction of a polyamine analogue, 1,19-bis-(Ethylamino)-5,10,15-triazanonadecane (BE-4-4-4-4), with DNA and effect on growth, survival, and polyamine levels in seven human brain tumor cell lines. *Cancer Res.*, 53, 3948-3955.

## (2)口頭発表

### シンポジウム

Shirahata, A. (Invited speaker): Polyamine analogs as inhibitors of aminopropyltransferases and for analyzing functions of polyamines in cell growth. Tenth Gordon Research Conference on Polyamine. 1993.6.21-25 (Colby-sawyer North).

白幡 晶, 深沢孝史, 鮫島啓二郎: 哺乳動物細胞におけるポリアミン機能の探索, 第10回日本ポリアミン研究会, 1994.1.26,27(東京)

### 学会発表

白幡 晶, 山下法久, 上田哲也, 細田晴美, 鮫島啓二郎: HTC細胞の増殖におけるポリアミン機能の分離, 第8回日本ポリアミン研究会, 1992.1.20,21(三重)

上田哲也, 別府隆信, 白幡 晶, 鮫島啓二郎: 細胞増殖におけるスペルミジンの特異的作用点の存在, 第9回日本ポリアミン研究会, 1993.1.20,21(埼玉)

別府隆信, 白幡 晶, 鮫島啓二郎: HTC細胞におけるポリアミン量の調節, 第111年会日本薬学会, 1991.3.28-30(東京)

山下法久, 白幡 晶, 鮫島啓二郎: スペルミジン誘導体のポリアミン欠乏細胞への効果, 第111年会日本薬学会, 1991.3.28-30(東京)

細田晴美, 白幡 晶, 高崎秀樹, 鮫島啓二郎: ラットスペルミジン合成酵素のSH試薬感受性部位の特定の試み, 第64回日本生化学会大会, 1991.10.2-5(東京)

高崎秀樹, 白幡 晶, 細田晴美, 鮫島啓二郎: 化学合成した $[^{14}\text{C}$ -メチル]脱炭酸化S-アデノシルメチオニンを用いるアミノプロピル基転移酵素の活性測定, 第64回日本生化学会大会, 1991.10.2-5(東京)

小林謙一, 白幡 晶, 鮫島啓二郎: 5-カルボキシスペルミンアナログの合成とDNAの結合能, 第113年会日本薬学会, 1993.3.29-31(大阪)

山下法久, 白幡 晶, 上田哲也, 細田晴美, 鮫島啓二郎: HTC細胞の増殖におけるポリアミン機能の分離, 第112年会日本薬学会, 1992.3.29-31(福岡)

上田哲也, 白幡 晶, 細田晴美, 内藤由美, 鮫島啓二郎: ポリアミン欠乏細胞におけるジアミン類の増殖補助効果, 第112年会日本薬学会, 1992. 3. 29-31 (福岡)

高崎秀樹, 白幡 晶, 細田晴美, 鮫島啓二郎:  $^{14}\text{C}$ 脱炭酸化S-アデノシルメチオニンの化学合成と, HPLCによるそのジアステレオマー分離の試み, 第112年会日本薬学会, 1992. 3. 29-31 (福岡)

上田哲也, 白幡 晶, 鮫島啓二郎: 細胞増殖におけるポリアミンの特異的作用点の存在, 第113年会日本薬学会, 1993. 3. 29-31 (大阪)

深沢孝史, 上田哲也, 白幡 晶, 鮫島啓二郎: ポリアミン欠乏細胞におけるスペルミジン毒性, 第113年会日本薬学会, 1993. 3. 29-31 (大阪)

細田晴美, 白幡 晶, 鮫島啓二郎: スペルミジン合成酵素活性部位周辺のSH基含有ペプチドの分析, 第113年会日本薬学会, 1993. 3. 29-31 (大阪)

出島秀樹, 白幡 晶, 細田晴美, 鮫島啓二郎: 脱炭酸化S-アデノシルメチオニンのスルホニウムにおける異性体分離定量の試み, 第113年会日本薬学会, 1993. 3. 29-31 (大阪)

深沢孝史, 白幡 晶, 鮫島啓二郎: スペルミジンの毒性と細胞死, 第114年会日本薬学会, 1994. 3. 29-31 (東京)

細田晴美, 吉田千香, 白幡 晶, 鮫島啓二郎: ラットスペルミジン合成酵素の活性部位のアミノ酸配列について, 第114年会日本薬学会, 1994. 3. 29-31 (東京)

出島秀樹, 白幡 晶, 細田晴美, 鮫島啓二郎: 脱炭酸化S-アデノシルメチオニンの異性体分離定量法の確立, 第114年会日本薬学会, 1994. 3. 29-31 (東京)

## 研究成果

### 1. 5-カルボキシスペルミンのポリアミン機能研究への応用

5-カルボキシスペルミンは、その5位のカルボキシル基に種々の機能分子を導入することにより、スペルミン構造を有する標識化合物などの調製に利用でき、これまでもその誘導体がポリアミン研究に応用されてきた。しかし、機能研究においてそのスペルミン構造部分がどの程度スペルミンに類似しているのかについては明らかではなく、本研究は、その点を明らかにすることを主な目的として行ったものである。まず、従来法に比べ比較的高収率な5-カルボキシスペルミンの合成法を確立し、それを用いて種々の標識モデル化合物を調製した。確立した合成法をFig. 1にまとめる。

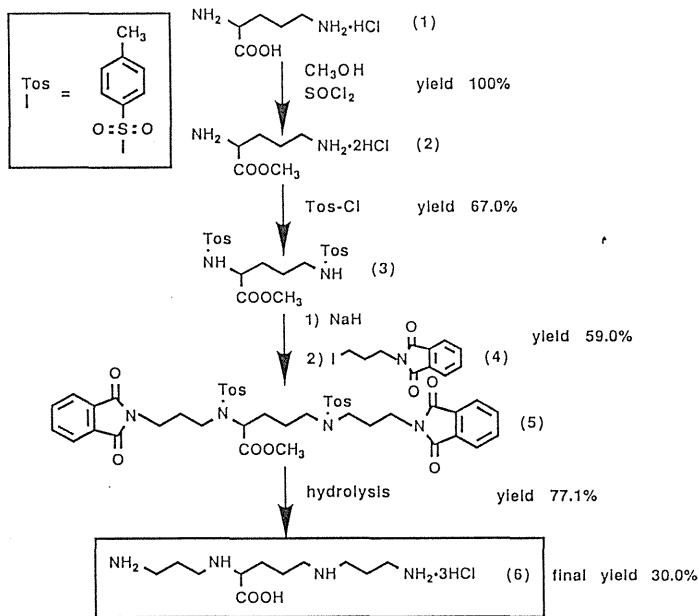


Fig. 1 5-カルボキシスペルミンの合成法

つぎに、標識モデル化合物としては、フェニルアジドあるいはベンゼンジアゾニウム構造をもつ標識体を念頭におき、Fig.2に示す化合物を種々合成した。

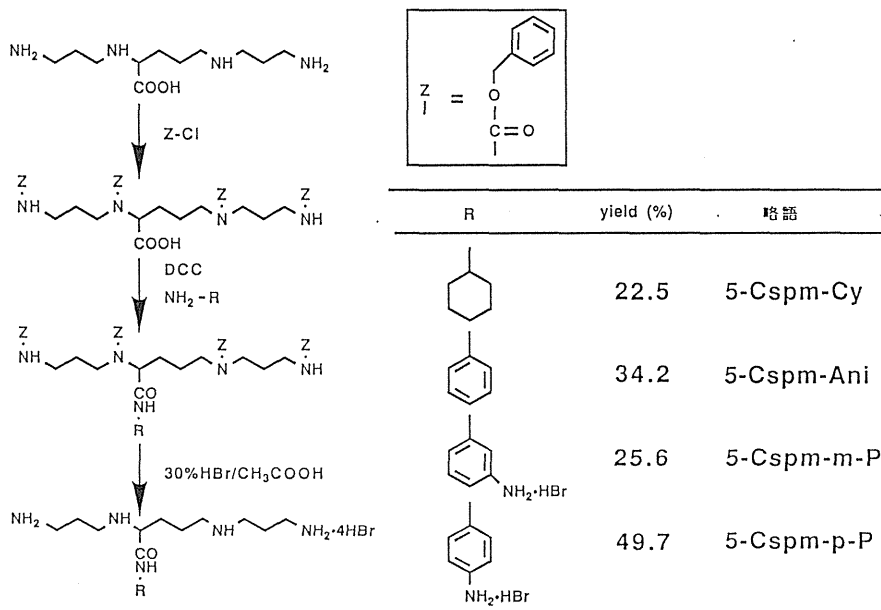


Fig.2 5-カルボキシスperlmin誘導体の合成法

このようにして合成したスperlminアナログおよび各種ポリアミン関連化合物とDNAとの結合の強さをつぎに検討した。ある化合物のDNAへの結合特性を検討する場合、DNAのコンホメーション変化であるB-Z変換やDNAのアグリゲーションおよびDNAの融解温度(T<sub>m</sub>)に与える影響を調べる方法などが知られている。本研究では、DNA-エチジウムブロミド複合体からのエチジウムブロミドの追い出し効果を調べる比較的簡便な方法を採用した。その原理は次のようである。



546nmでDNAあるいはエチジウムブロミドをそれぞれ励起すると，エチジウムブロミドのみが弱いながらも600nm付近に極大波長を持つ蛍光を生ずる．そして蛍光のないDNAとエチジウムブロミドを混ぜるとエチジウムブロミドがDNAにインターカレーションし，蛍光強度を増加させる．そこにポリアミンのようなDNAに結合する化合物を加えると，その化合物によってエチジウムブロミドが追い出され蛍光強度は低下する．従って，蛍光強度を低下させやすい化合物は，DNAにより強く結合すると考えられる (Fig. 3)．ポリアミンとアナログの比較

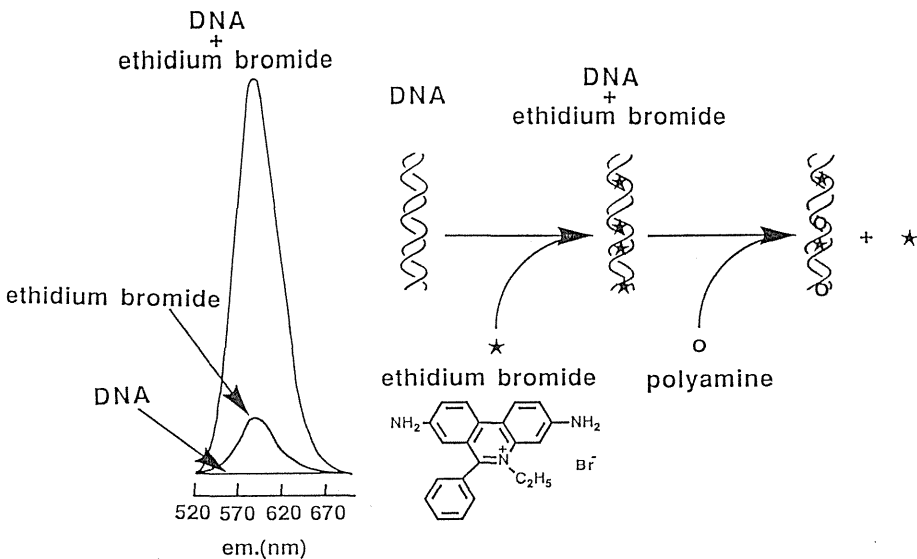


Fig. 3 DNA-エチジウムブロミド複合体形成阻害の原理

には蛍光強度を50%低下する化合物の濃度であるIC<sub>50</sub>値を用いた．

天然ポリアミンであるスペルミジン，スペルミン，およびその前駆体であるプトレシン，さらに8種類のそれらのアナログについて調

べた結果, 蛍光に影響を与える IC<sub>50</sub> 値から3つのグループに分けることができた (Table 1).

Table 1 仔牛胸腺DNA-エチジウムブロミド複合体形成阻害

| [ I ]      |                             | [ II ]     |                             | [ III ]     |                             |
|------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|
| COMPOUND   | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | COMPOUND   | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | COMPOUND    | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |
| spm        | 1.9                         | spd        | 29                          | put         | 2500                        |
| 5-Cspm-m-P | 2.5                         | 5-Cspm-Anl | 39                          | 5-Cspdp-Anl | 710                         |
| 5-Cspm-p-P | 3.2                         | 5-Cspm-Cy  | 54                          | Orn-Anl     | 2400                        |
|            |                             | 5-Cspm     | 115                         | 5-Cspdp     | 2400                        |

従来, DNAに対するポリアミンの結合性はポリアミンのチャージ数に依存することが知られている. 従って, 5-カルボキシスペルミンアナログのスペルミン骨格部分は, DNAに対しスペルミンに近い親和性を与えるだろうと予想したが, 5-カルボキシスペルミンのカルボキシル基にアニリンやシクロヘキシルアミンを結合した化合物の IC<sub>50</sub> 値はスペルミジンに相当するものだった. また, 導入分子にアミノ基が2つある m-フェニレンジアミン, p-フェニレンジアミンを用いた場合は, スペルミンと同様の IC<sub>50</sub> 値を示し, 5-カルボキシスペルミンの1つのアミノ基の塩基性は, かなり弱くなっていることが示唆された. [ III ] 類に示すようにプトレシンとオルニチンアナログおよびスペルミジンアナログの IC<sub>50</sub> 値にあまり差がないことを考え合わせると, スペルミンアナログの4位のアミノ基の pKa がかなり低下していることが示唆された. いずれにしろ, これらの結果から,

5-カルボキシスベルミンアナログのスベルミン骨格部分はエチジウムブロミドを追い出す能力に関して、スベルミンと同じではないことが明らかになり、今後は6-カルボキシスベルミンのような化合物を検討する必要があると思われる。

## 2. HTC細胞におけるポリアミン代謝の調節

### 2-1 新規アミノプロピルトランスフェラーゼ阻害剤の効果

当教室で新たに開発した阻害剤のうち、スペルミジン合成酵素阻害剤としては、trans-4-methylcyclohexylamine(4-MCHA)を、スペルミン合成酵素阻害剤としてはN-(3-aminopropyl)cyclohexylamine (APCHA)を主に用いて実験を行った。培養実験に先立ち、これら阻害剤がもともとプトレシンあるいはスペルミジンの類似体としてデザインされたものであり、他のポリアミン生合成酵素類にも直接作用し細胞内でそれらの活性に影響を与えることが考えられたため、まず、ポリアミン生合成酵素に対する影響をin vitroで調べた。その結果、いずれの阻害剤も極めて特異性が高いことがわかった。

つぎに、阻害剤の効果を見るために長期投与の培養条件を検討した。哺乳動物細胞におけるポリアミンの代謝回転は遅く、阻害剤によるポリアミン量の低下は細胞分裂による希釈効果に依存している面が大きい。従って、より完全なポリアミン量の枯渇とその影響を観察するためには、長期的な阻害剤の投与が必要である。そこで、阻害剤を含む培地でHTC細胞を浮遊培養し、2日目毎に継代し、細胞内ポリアミン量、および増殖への影響を8日目まで調べた。

4-MCHAを250  $\mu$ M、あるいは1250  $\mu$ M投与して培養したときの結果をFig. 4に示した。250  $\mu$ M投与では、スペルミジン量は1日目から著しく減少し、2日目以後、対照の約2%にまで低下した。その際、プトレシン量は、2日目で、対照のスペルミジン量を越えるレベルまで上昇した。一方、スペルミン量はほぼ一定値を維持した。1250  $\mu$ M投与で

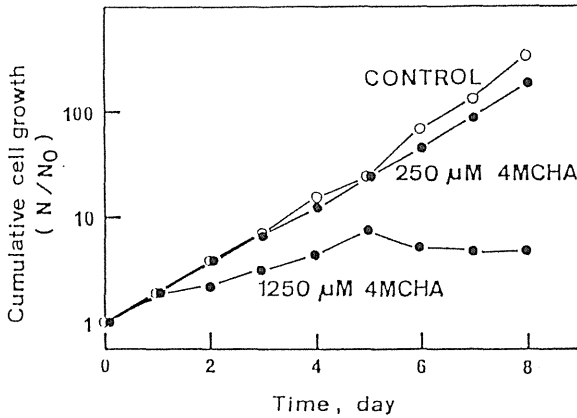
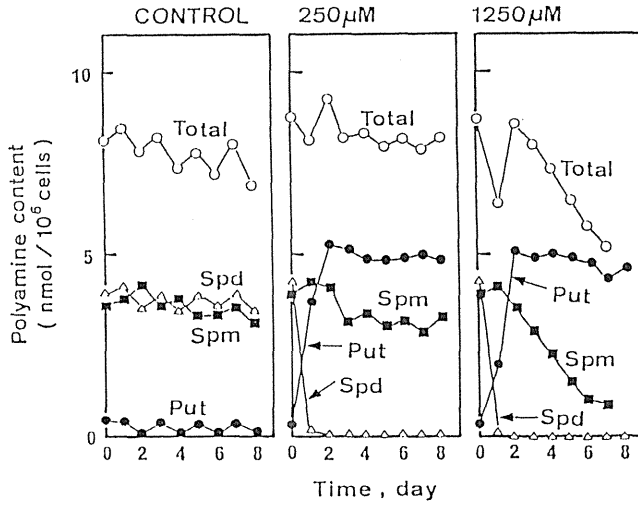


Fig. 4 4MCHA長期投与によるHTC細胞の生育とポリアミン含量の推移

は、2日目以後、スペルミジン量は対照の1%まで低下し、スペルミン量も1日目以後減少しつづけた。このことは基質であるスペルミジン量がスペルミン合成に必要な量以下に低下したことを示唆した。既に報告されているスペルミジン合成酵素阻害剤ではこのようなスペルミンの低下は見られず、4-MCHAが非常に強力な阻害剤であることがわかった。250  $\mu$ M濃度では、スペルミジン量が対照の2%まで低下

したにもかかわらず，増殖速度にはほとんど影響を与えなかった。  
 1250  $\mu$ M濃度では，増殖速度は徐々に低下し，5日目で増殖は停止した。

APCHAを250  $\mu$ Mあるいは，1250  $\mu$ M濃度となるよう投与して培養したときの結果をFig. 5に示した。1250  $\mu$ M投与では，ポリアミン量に

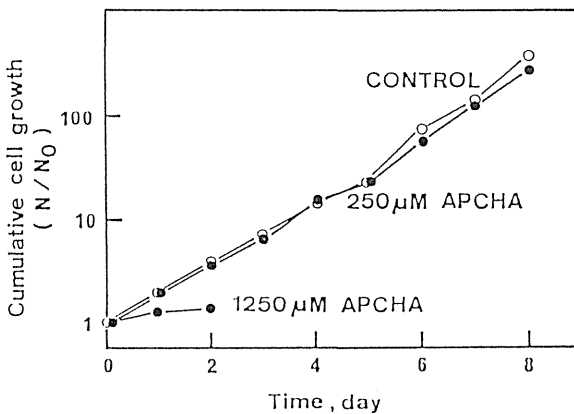
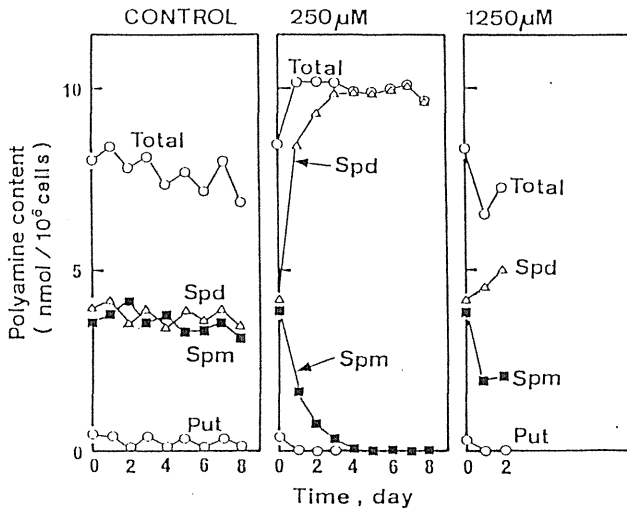


Fig. 5 APCHA長期投与によるHTC細胞の生育とポリアミン量の推移

大きな変化がないまま細胞は3日目に死滅したが、250  $\mu$  M投与では、細胞の倍加時間(1日)と共に細胞内のスペルミン量は半減し続け、5日目には対照の1%以下になった。ほぼ完全なスペルミンの枯渇が実現し、細胞内ポリアミンの99%以上がスペルミジンとなった。このとき、細胞数は対照と変化なく、細胞増殖には全く影響が出なかった。このことにより、HTC細胞では細胞増殖に関連するスペルミンの機能のほとんどがスペルミジンによって代用できることが示唆された。なお、スペルミンの消失を実現できたのはこれがはじめてである。

以上の結果およびこれまで開発されてきた各種アミノプロピルトランスフェラーゼ阻害剤との比較実験から、4-MCHA、APCHAが選択性、阻害の強さの両面から、非常に有用な阻害剤であることが証明された。

## 2-2 スペルミジンアナログのポリアミン欠乏細胞に対する効果

培養細胞に強力なODC阻害剤を与えると、多くの場合、スペルミジンおよびその前駆体であるブトレシン量の低下と共に、増殖速度が著しく遅くなる。そこに、スペルミジンを投与すると、細胞はポリアミン量の回復にともない増殖を開始する。つまり、細胞をこのようなポリアミン欠乏状態にすると、外から加えたポリアミンに依存した増殖を観察することが可能になる。そこで、加えるポリアミンを各種アナログ体にして増殖の回復を調べれば、それらの増殖に対する効果がくらべられるであろうと考えた。

まず、HTC細胞をポリアミン欠乏状態にする検討から始めた。これまで、細胞内ポリアミン量を低下させるために用いられてきた阻害剤は $\alpha$ -ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)である。DFMOは、ODCに対する酵素自殺基質であり、その高い選択性のために繁用されてきたが、細胞内への取り込み率が低いために、投与の際には数mM濃度を用いなければならなかった。今回の実験計画を立てるに当たり、複数の薬物を同時に投与することを考慮し、単独薬物濃度はできるだけ低い方が良いと考えられたので、低濃度でDFMOと同じ効果を示すことが報告されている1-アミノオキシ-3-アミノプロパン(AOAP)を検討し、懸濁培養で50  $\mu$ M AOAPの条件によりポリアミン欠乏細胞を調製した。

ポリアミン欠乏細胞にアナログ体を投与して増殖を比較する研究はこれまでも行われてきた。それらの結果は、スペルミジンとアナログ体による増殖回復能に余り差はなく、ポリアミンによる増殖回復作用が特異性の低いものであることを示唆してきた。しかし、い



ずれの研究も短期的な効果を調べたものであり、また化合物も鎖状のアナログ体に限定されていた。そこで、より明確な増殖回復能の差が得られることを期待して、アナログ体投与の期間を8日間とし、Fig. 6に示すようなピペリジン構造をもつ化合物も含めたアナログ体

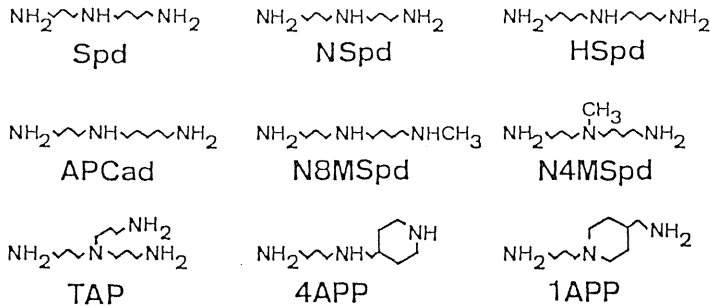


Fig. 6 スペルミジンおよびスペルミジンアナログ

について検討した。すなわち、メチレン鎖の異なるノルスペルミジン(NSpd)、ホモスペルミジン(HSpd)、アミノプロピルカダベリン(APCad)のほか、それぞれ8位および4位の窒素がメチル化されているN8メチルスペルミジン(N8MSpd)、N4メチルスペルミジン(N4MSpd)、3級アミノ基を持つテトラアミンであるトリスアミノプロピルアミン(TAP)、ピペリジン骨格をもつN-アミノプロピル-4-アミノメチルピペリジン(4APP)および1-アミノプロピル-4-アミノメチルピペリジン(1APP)などである。

Fig. 7には、50 μM A0APをアナログ体投与の2日前に培地に投与してポリアミン欠乏細胞を調製し、そこに0日目から2日継代ごとに10 μMの各アナログ体を投与し続けたときの増殖回復効果を示す。その結果、アナログ体の効果は3つのパターンに分けられるように思われ

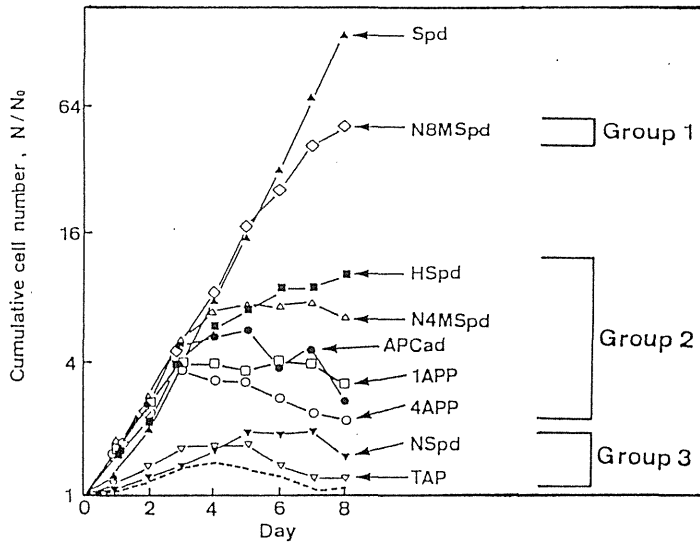


Fig.7 スペルミジンあるいはスペルミジンアナログの  
ポリアミン欠乏細胞に対する増殖回復効果

た. すなわち, N8メチルスペルミジンのようにかなり長期間スペルミジンに類似して増殖するグループ1, 3日目あるいは4日目まではスペルミジン投与と同様の回復を示し, それ以降増殖を停止してしまうグループ2, そして, ノルスペルミジン, トリスアミノプロピルアミンのように増殖の回復が見られないグループ3である.

Table 2には2日目における $10^6$ 細胞あたりのアナログ体量をグループ別に示す. トリスアミノプロピルアミン投与では細胞内に蓄積が認められず, 増殖が回復しないのは細胞内に取り込まれないためかもしれない. なお, その他のアナログ体の蓄積と構造あるいは増殖への効果に目立った相関は認められなかった. これらのことから, グループ1および2のアナログ体は短期的には増殖を回復する能力が

Table 2 スペルミジンあるいはスペルミジンアナログ  
の細胞蓄積量

|         | ANALOG | nmol / $10^6$ Cells | ANALOG | nmol / $10^6$ Cells |
|---------|--------|---------------------|--------|---------------------|
| Group 1 | N8MSpd | 14.9                | N4MSpd | 8.6                 |
| Group 2 | HSpd   | 10.4                | 1 APP  | 13.9                |
|         | APCad  | 5.6                 | 4 APP  | 14.6                |
| Group 3 | NSpd   | 17.4                | TAP    | < 0.1               |
|         | Spd    | 8.3                 |        |                     |

あることがわかった。さらに、構造的にも取り込み量においても異なった5種のアナログ体が同じ時期に増殖の停止を引き起こすことから考えて、グループ2における3日目以降の増殖の停止には、共通する何らかの要因があると考えられた。

そこで、グループ2における増殖の停止が何故起こるのかを調べるため、1APPを代表に選びさらに検討を加えた。アナログ体による増殖の停止がポリアミン量の低下によるものならば、アナログ体投与の際に少量のスペルミジンを同時に投与すれば増殖の停止は起こらないのではないかと考えた。そこで、 $10\mu\text{M}$  1APPおよび種々の濃度のスペルミジンをポリアミン欠乏細胞に投与し続けたときの効果を調べた。その結果、Fig. 8に示すように、 $0.1\mu\text{M}$  スペルミジン同時投与では、スペルミジン未添加の時と同様、3日目以降の増殖が見られなかった。 $0.3\mu\text{M}$  スペルミジン同時投与では不完全ながらも増

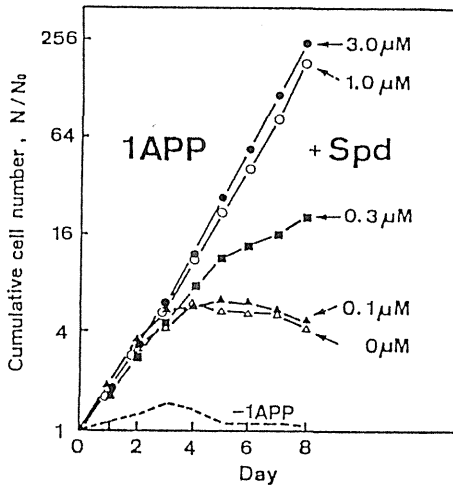


Fig. 8 1APPとスペルミジンによるポリアミン欠乏細胞の回復効果

殖することが認められ、 $1\mu\text{M}$ または $3\mu\text{M}$  スペルミジンの同時投与では対照と同様の増殖曲線を示した。このことは、3日目以降の増殖の停止にスペルミジン量の低下が関わっていることを示すと共に、1APPによる3日目までの増殖が、1APPだけでなく残存する微量のスペルミジンによるものであることも示していると思われた。そこで、増殖停止が観察される前日の2日目における細胞内ポリアミンと1APP量を測定した。その結果、Table 3に示すように、細胞内スペルミジンあるいはスペルミン量の増加が増殖の回復につながると思われた。また、不完全ながら増殖が回復した $0.3\mu\text{M}$  スペルミジン同時投与および増殖の回復が見られなかった $0.1\mu\text{M}$  スペルミジン同時投与において、1APPの蓄積量に大きな差が見られなかったことから、3日目以降の増殖の停止にアナログ体の蓄積量が直接関与していないと思われた。

Table 3 1APPとスペルミジンによるポリアミン欠乏細胞のポリアミン量および1APP蓄積量

| TREATMENT                 | POLYAMINE CONTENT |        |     |      |
|---------------------------|-------------------|--------|-----|------|
|                           | PUT               | SPD    | SPM | 1APP |
| -1APP                     | <0.1              | <0.1   | 3.6 | /    |
| 1APP<br>+ 0 $\mu$ M Spd   | <0.1              | (<0.1) | 1.0 | 16.8 |
| 1APP<br>+ 0.1 $\mu$ M Spd | <0.1              | (<0.1) | 0.9 | 13.0 |
| 1APP<br>+ 0.3 $\mu$ M Spd | <0.1              | (<0.2) | 1.4 | 11.4 |
| 1APP<br>+ 1.0 $\mu$ M Spd | <0.1              | (0.5)  | 1.8 | 9.9  |
| 1APP<br>+ 3.0 $\mu$ M Spd | <0.1              | (3.1)  | 2.3 | 5.7  |

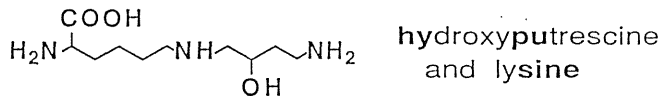
以上の結果およびAPCHAを用いた他の実験結果などから、この増殖の停止は、1APPの毒性によるものではなく、細胞内のスペルミジンが欠乏したためであると結論した。すなわち、この増殖の停止は、ポリアミン欠乏細胞に残存するスペルミジンの濃度が細胞分裂によりさらに低下したために生じたものと考えられる。

### 2-3 ポリアミンの特異的作用点の探索

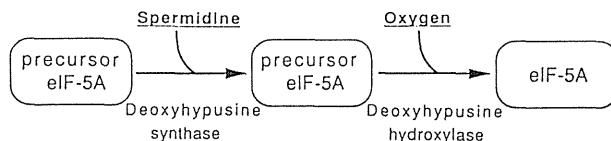
2-2で得られた結果をまとめると、ポリアミン量を低下させて増殖が停止したHTC細胞にスペルミジンを添加すると、増殖は完全に回復するが、1APPのようなスペルミジンアナログを添加すると、細胞内1APP量の増加に伴い一時的に増殖が回復し、次いで停止する。この現象は、通常細胞内に存在するポリアミンの役割の可成りの部分が一時的にせよアナログ体で代用できるが、アナログ体では代用できない生体ポリアミン(スペルミジン)に特異的な作用部位が存在することを示唆している。さらに、この現象が一般的なことかどうかを調べるために、阻害剤をDFMOにかえたり、細胞をL1210にかえて同様な実験を行ったところ、同じ現象が再現性よく観察された。また、ポリアミン欠乏HTC細胞にスペルミジンアナログのかわりにプトレシンアナログまたはスペルミンアナログを加えても、一時的増殖の回復に続く増殖停止の現象は広く観察された。

そこで、生体ポリアミンの特異的な作用部位が何かを調べるに当たり、アナログ体による増殖の停止とスペルミジンが直接関与しているハイプシン合成との関係に着目した。ハイプシンは、翻訳開始因子であるeIF-5A蛋白に含まれるアミノ酸である。その生合成は、前駆体eIF-5A蛋白の特定のリジン側鎖へスペルミジンのアミノブチル基がデオキシハイプシン合成酵素により転移され、次いで水酸化されて行われる(Fig.9)。In vitroの実験から、このデオキシハイプシン合成酵素はスペルミジンに対して特異性が高いこと、また、酵母を用いた実験から、ハイプシンに変換されるリジンを他のアミノ酸に変えた変異株では正常に増殖できないことなどが明らかになっ

## Structure of hypusine



## Biosynthesis of hypusine



## Function of eIF-5A



Fig.9 ハイプシンの構造, 生合成およびその機能

ている。このような知見に基づき、ポリアミン量の低下による増殖の停止がハイプシン量の低下に関係しているのではないかと考え、ハイプシン量を測定してみた。これまでと同様、A0APで2日処理し、ポリアミン量を低下させて増殖が停止した細胞に、スペルミジンあるいは1APPを投与した際の細胞内ハイプシン量を経時的に調べた結果をFig.10に示す。ハイプシン量の図中の点線は、ハイプシンの検出限界の5pmol/mg蛋白を示した。その結果、A0APのみ投与において、処理前の-2日目ではハイプシン量があたり60pmol/mg蛋白であったのに対し0日目では20pmol/mg蛋白に低下していた。その後、細胞増殖に伴って低下したが、検出限界以下になることはなかった。また、

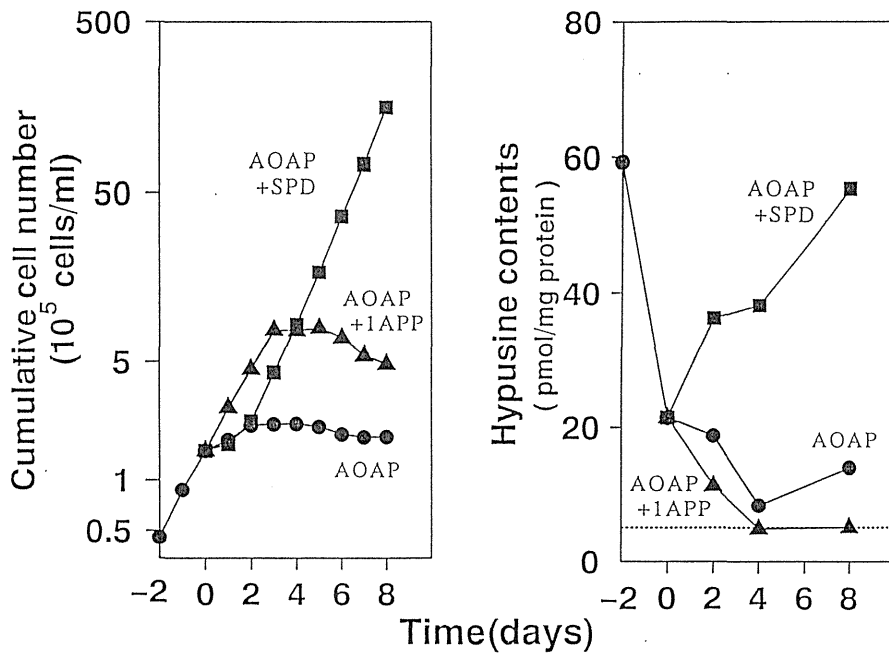


Fig.10 ポリアミン欠乏HTC細胞に1APPを投与したときの増殖とハイプシン量の関係

0日目にスベルミジンを投与すると増殖にともないハイプシン量も回復した。一方，1APP投与では，増殖開始4日目までハイプシン量は低下し続け，4日目以降は検出限界以下になった。これらのことから，1APPによる4日目までの一時的な増殖の回復にはハイプシンが存在し，それ以降での増殖の停止は，ハイプシン量の不足が影響していることが示唆された。



## 2-4 スペルミジン過剰蓄積による細胞死

増殖を停止したAOAP処理HTC細胞にスペルミジンまたはアナログ体を投与して得られる生育の様子をモデル化するとFig. 11のようにな

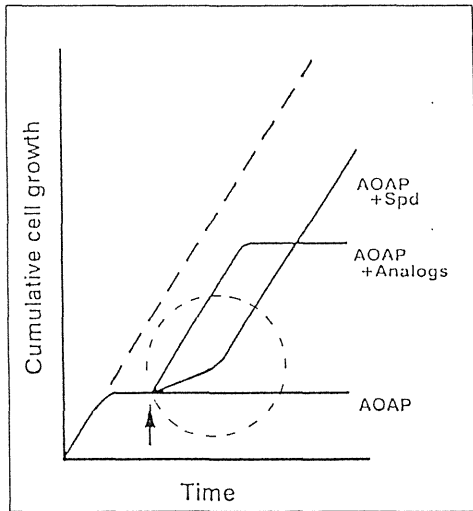


Fig. 11 ポリアミン欠乏HTC細胞におけるスペルミジンとアナログ体の増殖補助効果についての模式図

る。アナログ体投与の場合についての考察は2-3で述べてきた。ここではスペルミジン投与の際に、はじめに見られる増殖の回復の遅れに着目し、その理由を究明した。

正常に増殖している細胞を $10\ \mu\text{M}$ のスペルミジンを含む培地に移してもそのような増殖の遅れは認められないので、この現象はAOAP処理に起因するものであろうと思われた。そこでまず、AOAPで細胞を処理する日数の影響を調べた。 $50\ \mu\text{M}$ 濃度のAOAPで2~4日間処理した

細胞を  $10 \mu\text{M}$  濃度のスペルミジンおよび  $50 \mu\text{M}$  AOAPを含む培地で2日間培養し、増殖曲線を作成した (Fig. 12). その結果、AOAP処理日数

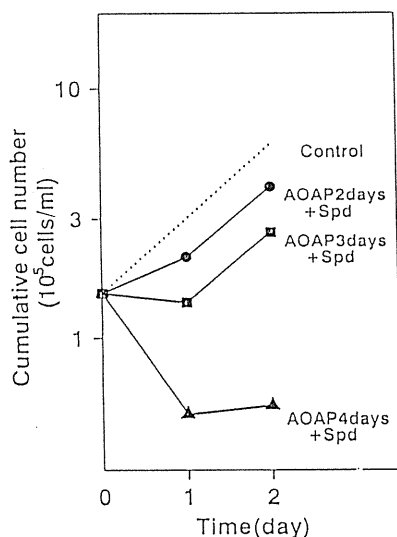


Fig. 12 スペルミジン投与によるHTC細胞の増殖阻害に対するAOAP処理日数の影響

の増加にともない一時的な増殖の回復の遅れは大きくなり、4日処理では細胞数の減少が観察された。Table 4には、スペルミジン投与後

Table 4 スペルミジン投与後1日目 (Fig. 12) の細胞内ポリアミン量

| Treatment      | nmol/10 <sup>6</sup> cells |       |      |
|----------------|----------------------------|-------|------|
|                | Put                        | Spd   | Spm  |
| Control        | 0.46                       | 3.94  | 4.00 |
| AOAP 2days+Spd | 0.36                       | 8.79  | 3.01 |
| AOAP 3days+Spd | 0.38                       | 9.70  | 3.20 |
| AOAP 4days+Spd | 0.77                       | 17.64 | 3.34 |

1日目のポリアミン量を示した。スベルミジン投与前のA0AP処理細胞ではいずれもプトレシンおよびスベルミジンが検出されずスベルミンがコントロール細胞の約50%検出されるのに対して(データ省略), A0AP 2日処理と3日処理で, スベルミジン投与後1日目の細胞ではコントロール細胞の2.5倍, 4日処理ではコントロール細胞の3.6倍量のスベルミジンの蓄積が認められた。細胞数が減少した4日処理のものを, 光学顕微鏡的に見てみると, 多くの細胞が縮小し, 死細胞が増加していた。これらのことから, A0AP処理日数の延長により, スベルミジン投与による一時的な増殖回復の遅れの程度が大きくなり, またそのとき取り込まれるスベルミジン量も多いこと, さらに回復の遅れは細胞死にいたる前段階であることが示唆された。なお, スベルミジン投与による細胞数の減少が細胞内に過剰に蓄積したスベルミジンによるものであることは, スベルミジンの投与量あるいはスベルミジン含有培地での培養時間をかえて調べた実験からも裏づけられた。

つぎに, このスベルミジン過剰蓄積の際に起こる細胞死が, 蓄積したスベルミジンの直接作用によるものか, スベルミジンの代謝産物による二次的なものかを調べた。ポリアミンは, 血清中のアミノ酸化酵素によりアクロレインを生じ細胞毒性を示すことが知られている。本研究ではその反応を防ぐ目的でアミノ酸化酵素阻害剤であるアミノグアニジン培地中に添加している。もし, それでもアミノ酸化酵素が関わっているとすれば, 培地からアミノグアニジンを除けば細胞数の減少はさらに大きくなり, その濃度を増せば細胞数の減少は小さくなるであろう。そこで, アミノグアニジンの濃度を0, 1, 5mMに変化させた場合に, 観察される細胞死がのように影響さ

れるのか、またA0AP処理することによって起こるポリアミン量の低下および増殖速度の低下に、それがどのような影響を与えるのかを調べた。異なった濃度のアミノグアニジン存在下でA0AP処理をした細胞に、スベルミジンを投与したときの細胞数およびポリアミン量を調べた。その結果、Fig. 13に示すように、5mMのアミノグアニジン

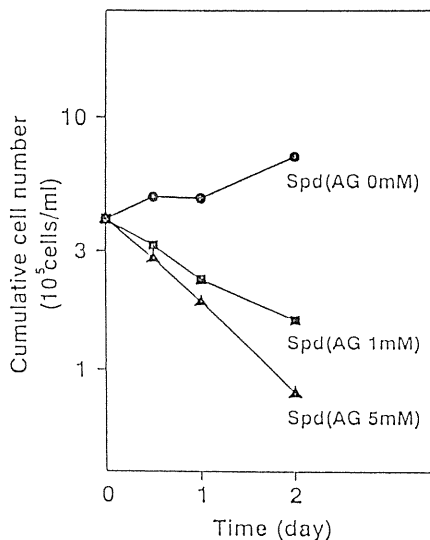


Fig. 13 スベルミジン投与後の増殖におけるアミノグアニジンの効果

対数増殖期の $50\mu\text{M}$  A0AP存在、それぞれの濃度のアミノグアニジンを含む培地で4日間培養後、 $10\mu\text{M}$  スベルミジンと前培養と同濃度のアミノグアニジンを含む培地で2日間培養した

では1mMの場合に比べて若干程度は大きかったが同様の細胞数の減少を示し、アミノグアニジンを投与しないときは細胞数の減少が観察されなかった。これらの結果は、アミノグアニジン濃度を下げても細胞数の減少の程度が大きくなることを示しており、この細胞

数の減少がアミン酸化酵素によって起こるものではないことを示した。そのときのポリアミン量を調べると、Fig. 14に示すように、ス

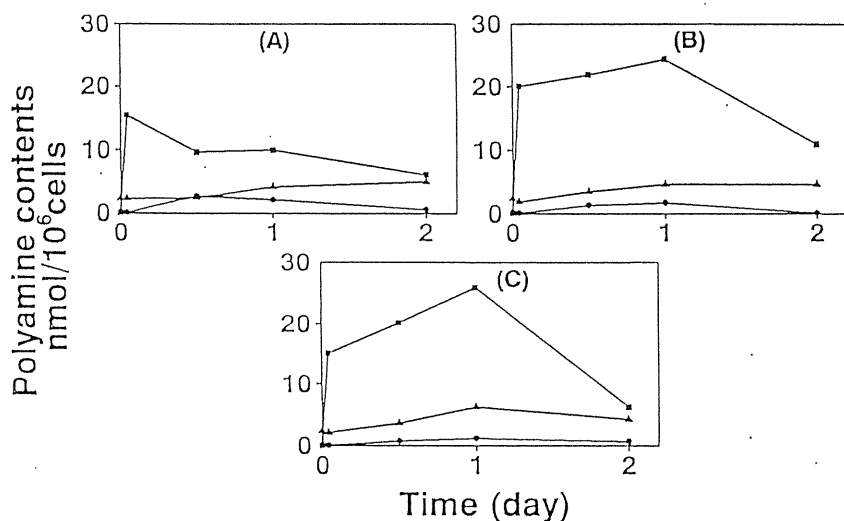


Fig. 14 スペルミジン投与後のポリアミン量におよぼすアミノグアニジンの影響

Fig. 13において、アミノグアニジン濃度が、0mM(A), 1mM(B), 5mM(C)の場合の細胞内ポリアミン量を示した

ペルミジンを投与してから1時間後では、いずれの場合もスペルミジンを15-20nmol取り込んでいるにもかかわらず、24時間後ではアミノグアニジンを投与しない場合はスペルミジン量が約10nmolに低下したのに対して、投与した場合は低下しなかった。このことから、アミノグアニジンはスペルミジンの細胞内への取り込みにはあまり影響しないが、その過剰蓄積を維持する作用があること、またスペルミジンの蓄積が一過性のものではなくある程度持続することが細胞数の減少につながることも示唆された。

スベルミジン過剰蓄積による細胞死は、形態的にはアポトーシスに類似する細胞死であることが明らかになった。アポトーシスでは形態的な変化ばかりでなく、エンドヌクレアーゼの活性化により起こるDNAの断片化も重要な生化学的特徴になっている。また、アポトーシスでは多くの場合、遺伝子発現を伴うので新たな蛋白合成を必要とすることが多い。一方、ポリアミンは一般に蛋白合成系を活性化するが高濃度で強く阻害することが知られている。そこで、今回観察された細胞死がどのような生化学的変化を伴うのかについても検討したところ、DNAの断片化は起こっておらず、蛋白合成能はスベルミジン添加で上昇していた(データ省略)。今回得られた結果は、形態的な変化とDNAの断片化の抑制が同時に起こるという従来アポトーシスでは報告のない結果になった。HTC細胞で観察されたこの細胞死は、生理的な細胞死の一形態と見るよりも、アポトーシスで起こる形態的変化のプロセスに異常に蓄積したポリアミンが働いた結果起こったものと考えるのが妥当だろう。しかし、このスベルミジンの作用は構造特異的であり、何らかの高分子の関与が示唆される。

### 3. スペルミジン合成酵素のスルフヒドリル基

完全精製したスペルミジン合成酵素が、ジチオスレイトール (DTT) のような還元剤がないと速やかに失活することから、本酵素の活性部位には、触媒反応にとり重要なスルフヒドリル基が存在するのではないかと考えられてきた。本研究は、これまで当研究室で行ってきたスペルミジン合成酵素の活性部位構造の解明に関する研究の一環として行ったものであり、そのようなスルフヒドリル基の存在を確かめることを目的としている。

このような研究での問題は、酵素の安定化に必要な DTT を除いた状態でなければ、SH-試薬による検索ができない点であり、そのための実験条件の設定をまず行った。種々検討の結果、0°C で行えば DTT が存在しなくても酵素の失活は抑えられたので、0°C で SH-試薬と精製酵素を反応させた。Fig. 15 にその結果を示す。

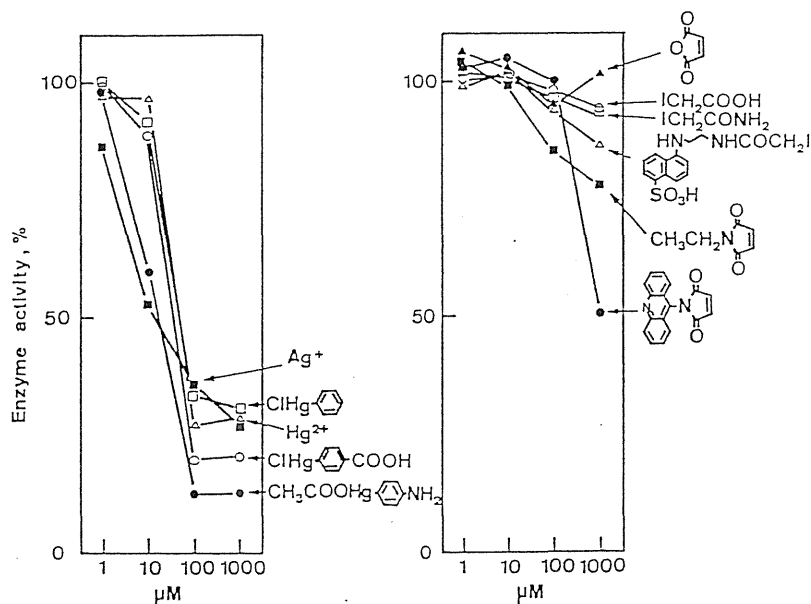


Fig. 15 SH-試薬による精製スペルミジン合成酵素の失活

つぎに、酢酸パラアミノフェニル水銀 (APMA) を用いて、基質であるブトレシンまたは脱炭酸化S-アデノシルメチオニン (deAdoMet) 共存下での失活状態を調べたところ、Fig. 16に示すように、deAdoMet

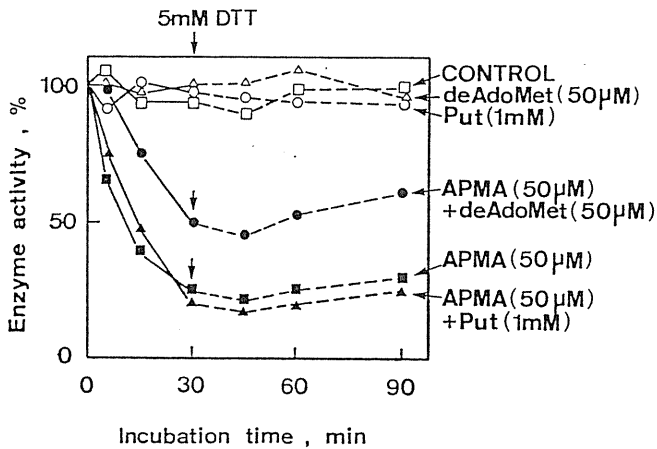


Fig. 16 APMAによる失活におよぼすブトレシンとdeAdoMetの効果

が共存すると、APMAによる失活が抑えられる傾向が認められた。この傾向は他のモノヨード酢酸骨格を有する化合物でも認められ、本酵素には、deAdoMetが結合することにより、SH-試薬と反応性しなくなるスルフヒドリル基が存在することを示唆した。そこで、SH-試薬の中で蛍光標識剤であるN-iodoacetyl-N'-5-sulfo-1-naphthyl ethylene diamine (IAEDANS)を用いて本酵素を標識したところ、Fig. 17に示すように、deAdoMet共存下でその蛍光が著しく抑制されることがわかった。この結果は、活性部位にスルフヒドリル基が存在することを強く示唆しており、将来、活性部位構造を分子レベルで解析する上での重要な手がかりとなるとと思われる。



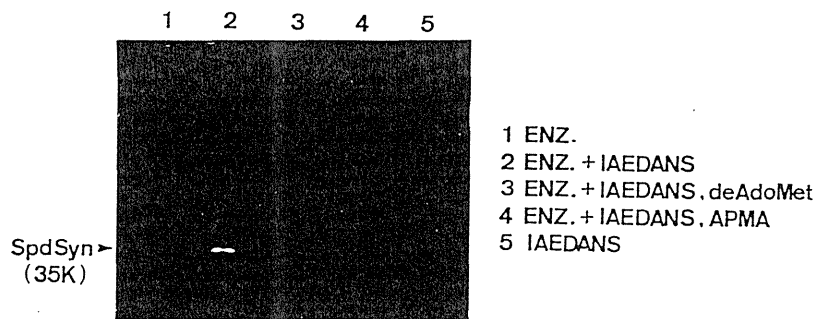


Fig. 17 AEDANS標識スperlミジン合成酵素

#### 4. メチル-<sup>14</sup>C標識脱炭酸化S-アデノシルメチオニンの化学合成とジアステレオマーの分離

脱炭酸化S-アデノシルメチオニン (deAdoMet) はこれまで触れてきたように、アミノプロピルトランスフェラーゼの基質であり、ポリアミン研究を進める上で重要な化合物である。これまで、deAdoMetのラジオアイソトープ標識体は生化学的な調製法に頼るしかなく、また化学合成したdeAdoMetはジアステレオマーで、その分離方法はなく、そのまま使用されてきた。本研究は、実際に生物界で利用される立体配置をもつ [メチル-<sup>14</sup>C] deAdoMetの化学的調製法に関するものである。

標識 deAdoMetの合成法は、Fig. 18に示すように、S-アデノシル-5

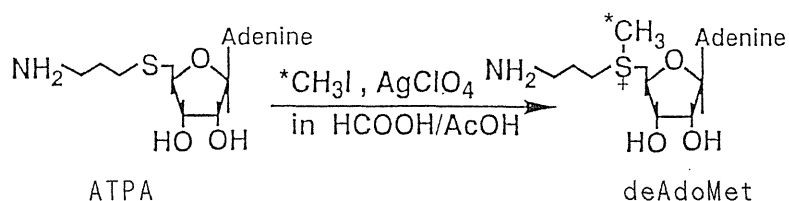


Fig. 18 [メチル-<sup>14</sup>C] deAdoMetの化学合成

<sup>14</sup>C-3-チオプロピルアミン (ATPA) を過塩素酸銀の存在下、ギ酸/酢酸溶液中で、 [<sup>14</sup>C]-ヨウ化メチルでメチル化して行う。そこで、 [<sup>14</sup>C]-ヨウ化メチルを有効に利用するための反応条件を詳細に検討し、至適条件下で、 [<sup>14</sup>C]-ヨウ化メチルから [メチル-<sup>14</sup>C] deAdoMetの回収率をホスホリルセルロースカラムクロマトグラフィーによる精製も含めて90%以上にすることができた。

つぎに、deAdoMetのマレイル誘導体およびテトラヒドロフタロイル誘導体につき、そのジアステレオマーの分離条件を検討中、逆相HPLCでアセトニトリルの組成を低くすることによりdeAdoMet両異性体がそのまま分離できることを初めて見出した (Fig. 19).

Column : TSK gel ODS-80T<sub>m</sub> (φ4.6 X 75mm)

Mobile phase : A mixture of acetonitrile(5%) and phosphate buffer(0.2M), pH4.0, containing sodium 1-octanesulfonate(8mM) and EDTA(0.1mM)

Flow rate : 0.7ml/min

Detection : UV(254nm)

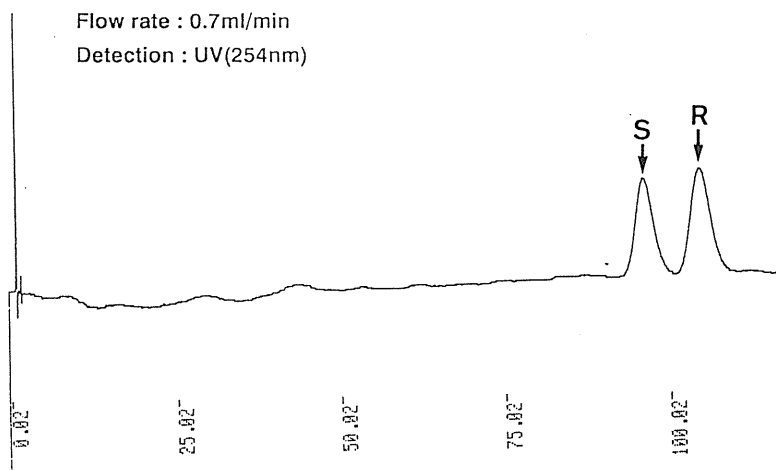


Fig. 19 deAdoMetジアステレオマーの分離