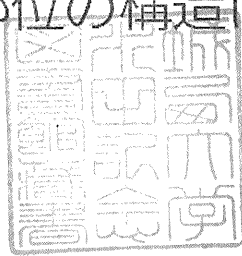


ポリアミンと親和性をもつ蛋白の
結合部位の構造に関する研究

(63571024)



平成2年度科学研究費補助金 (一般研究C) 研究成果報告書

平成3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

細胞の増殖・分化を含む種々の生理的条件下で複雑に変動するポリアミンが、生体内高分子に結合してその高次構造に変化を与え、多くの生体反応の調節に深く関わっていることは想像に難くない。ポリアミンの生理的役割に関するこれまでの膨大な研究は、専ら現象論的な記述に止まり、ポリアミンの作用する場における分子レベルでの研究は、それを推進するための方法論の制約などにより、余り行われていない。そのような状況にあって、核酸とポリアミンとの相互作用に関しては、親和力が強いために、X線解析などの手法を導入して、分子レベルでの解析が進められている。一方、ポリアミンと蛋白との相互作用については、*in vitro*の実験で多くの酵素活性がポリアミンにより影響を受けるという報告があるにもかかわらず、その親和力が比較的弱いと考えられるために、蛋白のポリアミン結合部位を分子レベルで追求する試みはこれまで全く行われていないのが現状である。

本研究の主眼は、そのような研究を進めるために必要な方法論の開発、すなわち、ポリアミン結合部位を持つアミノプロピル基転移酵素をモデル蛋白として、各種立体制限ポリアミンアナログを用いるポリアミン結合部位構造の解析、及びポリアミン親和性蛋白を類別するために必要なアフィニティー吸着体の調製、の2点である。な

お、本研究の過程でアミノプロピル基転移酵素の新しい阻害剤を開発し、またそれに関連して、新しいアミノプロピル基転移反応も見いだした。さらに、新たに開発したアフィニティー吸着体がスベルミン合成酵素の精製のために有用であることも見いだした。これらもあわせて報告する。なお、参考のために既報の論文3部についてその別刷コピーを本報告書末尾に付け加える。

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 （ “ ” ・助手）

研究経費

昭和63年度	1,100千円
平成元年度	600 “
平成2年度	400 “
計	2,100 “

研究発表

(1)学会誌等

Shirahata, A., Morohoshi, T. and Samejima, K. (1989). Trans-4-methylcyclohexylamine, a potent new inhibitor of spermidine synthase. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 3220-3222.

Shirahata, A. and Samejima, K. (1990). Inhibitors acting at putrescine or spermidine binding site of aminopropyltransferase. "The Biology And Chemistry of Polyamines" Edited by S.H. Goldemberg & I.D. Algranati, IRL Press.

Shirahata, A. Morohoshi, T. Fukai, M. Akatsu, S. and Samejima, K. (1991). Putrescine or spermidine binding site of aminopropyltransferases and competitive inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 41, 205-212.

Shirahata, A. Zhu, C. Akatsu, S. Suzuki, Y. and Samejima, K.. Polyamine-linked sepharose: preparation and application to mammalian spermine synthase. (発表予定).

Shirahata, A. Hosoda, H. Takahashi, N. and Samejima, K.. Spermidine synthase can transfer aminopropyl moiety to secondary amino group of 4-aminomethylpiperidine or N-monomethylputrescine. (発表予定).

(2)口頭発表

シンポジウム

白幡 晶, 諸星 徹, 深井真佐代, 赤津 栄, 鮫島啓二郎: アミノプロピル基転移酵素における活性部位構造の解析と新規阻害剤の開発, 第9回メディシナルケミストリーシンポジウム, 1988.11.29(東京).

Shirahata, A. Morohoshi, T. Fukai, M. Akatsu, S. Beppu, T. Takahashi, N. and Samejima, K.. Active site of aminopropyltransferases and development of inhibitors. Gordon Research Conferences "polyamine" 1989.6.18-22 (Newport RI, U.S.A.).

白幡 晶: ポリアミン生合成阻害剤は制ガン剤になり得るか, 第6回日本ポリアミン研究会, 1990.1.17, 18.(千葉).

Shirahata, A. Beppu, T. Takahashi, N. Hosoda, H. and Samejima, K.. Effects of aminopropyltransferase inhibitors acting at putrescine or spermidine binding site on polyamine content in cultured rat hepatoma (HTC) cells and in rat tissues. 1990 International symposium on polyamines in molecular and medical biology. 1990.11.11-15 (Kyoto).

学会発表

白幡 晶, 諸星 徹, 深井真佐代, 赤津 栄, 鮫島啓二郎: スペルミジン合成酵素およびスペルミン合成酵素の活性部位の類似性と阻害剤の検索, 第5回日本ポリアミン研究会, 1989.1.27, 28(大阪).

深井真佐代, 白幡 晶, 赤津 栄, 鮫島啓二郎: 哺乳動物スペルミン合成酵素における活性部位構造の解析と阻害剤の開発, 日本薬学会第109年会, 1989.4.4-6(名古屋).

諸星 徹, 白幡 晶, 鮫島啓二郎: 哺乳動物スペルミジン合成酵素の新規阻害剤の開発, 日本薬学会第109年会, 1989.4.4-6(名古屋).

白幡 晶, 高橋紀雄, 別府隆信, 赤津 栄, 細田晴美, 鮫島啓二郎: 新規アミノプロピル基転移酵素阻害剤の *in vitro* および *in vivo* のポリアミン代謝への影響, 第6回日本ポリアミン研究会, 1990.1.17, 18(千葉).

別府隆信,高橋紀雄,白幡 晶,鮫島啓二郎: 新規ポリアミン生合成阻害剤のHTC細胞の増殖及びポリアミン代謝への影響, 第110年会日本薬学会, 1990.8.21-23(札幌).

白幡 晶,高橋紀雄,別府隆信,赤津 栄,細田晴美,鮫島啓二郎: 新規アミノプロピル基転移酵素阻害剤のラット組織中のポリアミン代謝への影響, 第110年会日本薬学会, 1990.8.21-23(札幌).

赤津 栄,白幡 晶,鮫島啓二郎: ラット及びブタ脳スベルミン合成酵素の精製と抗血清の調製, 第110年会日本薬学会, 1990.8.21-23(札幌).

細田晴美,白幡 晶,高橋紀雄,檜山憲弘,鮫島啓二郎: スベルミン合成酵素は2級のアミノ窒素にアミノプロピル基を転移できるか, 第110年会日本薬学会, 1990.8.21-23(札幌).

鈴木保利,白幡 晶,鮫島啓二郎: ポリアミン親和性高分子を検索するための新規アフィニティー吸着体の調製, 第110年会日本薬学会, 1990.8.21-23(札幌).

別府隆信,白幡 晶,鮫島啓二郎: 新規ポリアミン生合成阻害剤を用いたHTC細胞におけるポリアミン量の調節, 第34会日本薬学会関東支部大会, 1990.11.10(千葉).

山下法久,白幡 晶,鮫島啓二郎: スベルミン誘導体のポリアミン欠乏細胞への効果, 第112年会日本薬学会, 1991.3.28-30(東京).

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112年会日本薬学会, 1991.3.28-30(東京).

研究成果

1. 立体制限ポリアミンアナログと

アミノプロピル基転移酵素

1-1 スペルミジン合成酵素のプトレシン結合部位の解析

スペルミジン合成酵素は、S-アデノシルメチオニン (AdoMet)の脱炭酸により生成する脱炭酸化AdoMet(deAdoMet)を基質として、そのアミノプロピル基をもう一方の基質であるプトレシンに転移し、スペルミジンを合成する酵素である。本酵素の比較的強力な阻害剤として、プトレシンに対して競合的な阻害様式を示すシクロヘキシルアミンが知られている。この知見にもとずき、プトレシン分子の自由な動きを制限した構造を含むいろいろな化合物を用いて、スペルミジン合成酵素に対する阻害性および基質性を系統的に調べれば、酵素のプトレシン結合部位に関して何らかの空間的な情報が得られるのではないかと考え、まず、シクロアルカン骨格を持つアルキルアミン類の阻害性を調べた (Table 1)。ここで用いた酵素はブタ肝より精製したものを用い、活性は $[^3\text{H}-\text{CH}_3]\text{-deAdoMet}$ から遊離する $[^3\text{H}]\text{-メチルチオアデノシン (MTA)}$ を測定して行った。表中の数値は、対照の50%阻害を示す化合物の濃度 (IC_{50})を示している。1.0mMにおいても阻害

Table 1 シクロアルカン骨格をもつアルキルアミン類の
スベルミジン合成酵素に対する阻害効果

No	Structure	IC ₅₀ (μ M)	(%Inhibition at 1 mM)	No	Structure	IC ₅₀ (μ M)	(%Inhibition at 1 mM)
1		8.1		14		68	
2		103		15		>1000	(33.2)
3		>1000	(40.4)	16		>1000	(8.2)
4a)		>1000	(37.0)	17		>1000	(<1.0)
5a)		300		18		19	
6		430		19a)		15	
7		1.7		20		30	
8a)		330		21		>1000	(18.5)
9		>1000	(29.1)	22		>1000	(<1.0)
10		108		23		>1000	(<1.0)
11		>1000	(<1.0)	24		5.5	
12		>1000	(<1.0)	25		107	
13		>1000	(<1.0)				

a) a mixture of cis and trans isomers.

が50%に達しないものについてはそのときの阻害率をカッコ内に示す。今回、阻害性について検討した化合物は市販品もしくは本研究室で合成したものを用い、その純度は元素分析で確認した。シクロヘキシルアミン(1)は既に報告されているように強い阻害性を示した。そのメチル置換体(2-7)では、trans-4-メチル置換体(7)のみが(1)より著しく強い阻害性を示し、結合部位において4位の方向にアルキル基を許容する空間の存在を示唆した。しかし、4-エチル置換体(8)では、阻害性は低下した。4位のアル

キル基の効果をみるためにモデルとして用いたアニリン誘導体(9-13)でも、メチル置換体(10)が他に比べ強い阻害を示した。つぎに、シクロヘキサン骨格とアミノ基との距離の影響をみるために用いたアミノアルキルシクロヘキサン(14-17)では、(14)で(1)の8倍、その他では著しく阻害性が減じた。また、シクロペンチルアミン類(18, 19)、シクロヘプチルアミン(20)は若干阻害性が減じた。ノルアダマンタン、アダマンタンおよびノルボルナン骨格を有する固定されたコンホメーションをもつ化合物では、*exo*-2-アミノノルボルナン(24)が(1)より強い阻害性を示した。以上の結果から、プトレシン結合部位にはプトレシンあるいは(1)のアミノ基と結合する陰電荷が存在し、その横に数種のシクロアルカンを許容し得る少し出張りをもった空間が存在することが示唆された。

このように、比較的広い疎水空間の存在が考えられたので、シクロアルカンより大きな自由度を持つ鎖状アルキルアミンについてもつぎに検討した。炭素数3-7の鎖状アルキルアミンについて調べた結果をTable 2に示す。アミノ基が結合している炭素にメチル基を導入した化合物(31-35)は、(1)に類似した構造を一部有するため、強い阻害性を期待したが、結果は弱かった。むしろ、メチル基を導入してない*n*-ブチルアミン(27)、*n*-アミルアミン(28)および*iso*-アミルアミン(38)のほうが、(1)よりも強い阻害性を示した。以上のことより、鎖状アルキルアミ

Table 2 鎖状アルキルアミン類のスペルミジン合成酵素に対する阻害効果

No	Structure	IC ₅₀ (μM)	No	Structure	IC ₅₀ (μM)
26	NH ₂ ~	35	33	NH ₂ ~	450
27	NH ₂ ~	3.8	34	NH ₂ ~	150
28	NH ₂ ~	3.6	35	NH ₂ ~	>1000
29	NH ₂ ~	104	36	NH ₂ ~	45
30	NH ₂ ~	>1000	37	NH ₂ ~	20
31	NH ₂ ~	1000	38	NH ₂ ~	7.8
32	NH ₂ ~	250			

ン類もプトレシン結合部位に強く結合することが示唆された。

つぎに、これらの化合物が確かにプトレシン結合部位に入っているかどうかを確認する目的で、(1)よりも強い阻害性を示した(7), (28), (24)について、Kineticsを調べた結果をFig.1に示す。図中、直線横の数値は用いた化合物のμM濃度を示している。どの化合物についても、濃度を変えて得られた直線がY軸上で全て交差していることから、プトレシンに対し競合的な阻害剤であることがわかった。また、みかけのKi値からもこれらの化合物が(1)よりも強い阻害性を有していることが示された。

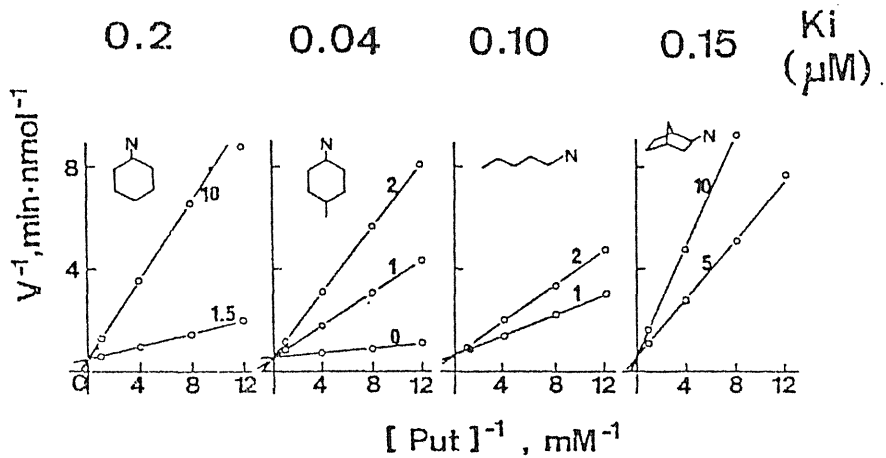

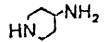
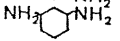
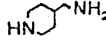
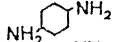
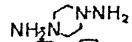
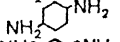
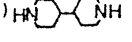
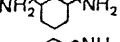
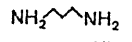
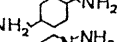
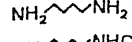
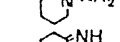

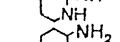
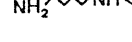
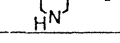


Fig.1 プトレシン類似体によるスペルミジン合成酵素阻害のKinetics実験

つぎにアミノプロピル基が転移されるプトレシンの一方のアミノ基が、先に推定した活性部位にある疎水空間の何処に位置しているのかを調べるために、シクロヘキサンおよびピペリジン骨格を有するジアミン類を中心に、基質性について検討した。その結果をTable 3に示す。数値は、 $10\ \mu\text{M}$ $^3\text{H-deAdoMet}$ 存在下、 1mM プトレシンを基質として用いたときの酵素反応によって生じる $^3\text{H-MTA}$ 量を100%とし、プトレシンの代わりに類似化合物 1mM を加えた場合に生じた $^3\text{H-MTA}$ 量をプトレシンのそれに対する比率(%)で示している。調べた化合物のうちtrans-1,4-ジアミノシクロヘキサン(42)は比較的高い $^3\text{H-MTA}$ を生成した。

Table 3 ジアミン類のスペルミジン合成酵素における基質性

No	Structure	%MTA Production ^{a)}	No	Structure	%MTA Production
39 ^{b)}		<1.0	48		<1.0
40 ^{b)}		<1.0	49		2.7
41		(cis) ^{c)} 3.6	50		<1.0
42		(trans) 11.6	51 ^{b)}		<1.0
43 ^{b)}		<1.0	52		<1.0
44 ^{b)}		<1.0	53		100
45		<1.0	54		18
46		<1.0	55		<1.0
47		<1.0			

a) MTA production at 1 mM of diamines in the presence of 10 μ M deAdoMet.

b) A mixture of cis and trans isomers.

c) The sample contained 2% of trans isomer.

cis体(41)についても若干その生成が認められたが、後に2%の(42)が混入していることがNMRにより確認されたので、この(41)における 3 H-MTAの生成は(42)によるものと思われる。また、4-アミノメチルピペリジン(49)やモノメチルプトレシン(54)のような第2アミンをもつ化合物についても、 3 H-MTAの生成が認められた。いくつかの化合物について、認められた 3 H-MTAの生成が、わずかなプトレシンの混入によるものではないことを確かめる意味も含めて、Kineticsを調べた。Table 4に示すように、(42)、(49)、(54)の化合物の V_{max} がプトレシンと著しく異なることから、これらの化合物は確かに基質性を有すること

Table 4 プトレシン類似体のKineticsデータ

No	Structure	Km (mM)	Vmax (nmol/min/mg)
53	<chem>NCCCCN</chem>	0.09	515
42	<chem>Nc1ccc(N)cc1</chem> (trans)	0.10	68
49	<chem>Nc1ccncc1</chem>	2.2	37
54	<chem>NCCCCNC</chem>	2.2	280

がわかった。特に、(42)に比較的強い基質性が認められたことから、アミノプロピル基が転移されるプトレシンのアミノ基は、先の阻害性実験で強い阻害性を示した(7)のメチル基が結合する疎水空間に位置することが示唆された。

以上の阻害性及び基質性の結果と、アミノプロピル基転移反応がピンポン反応でないことにもとずきFig.2に示すような結合部位モデルを推定した。すなわち、プトレシン結合部位にはプトレシンの一方のアミノ基と結合する陰電荷とその近辺に広がる比較的広い疎水空間があり、アミノプロピル化されるもう一方のプトレシンのアミノ基は活性部位の疎水空間に位置する、とするモデルである。

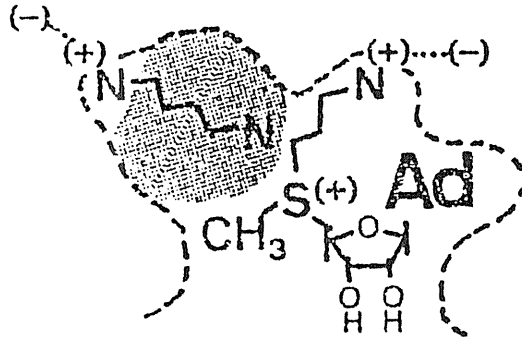


Fig.2 スペルミジン合成酵素の活性部位モデル

1-2 スペルミン合成酵素阻害剤の開発と

活性部位構造の解析

スペルミン合成酵素は、スペルミジン合成酵素と同様に deAdoMet を基質として、そのアミノプロピル基をスペルミジンのメチレン鎖4個側の1級アミンに転移して、対称なポリアミンであるスペルミンを合成する酵素である。したがって、スペルミジン合成酵素の活性部位構造のモデル (Fig.2) から、スペルミン合成酵素の活性部位構造を Fig.3 のモデルのように示すことは、前者のプトレシン結

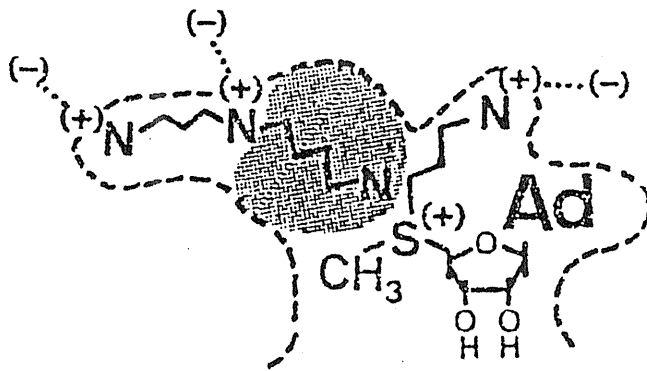
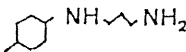
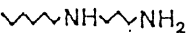
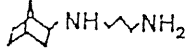
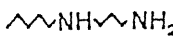
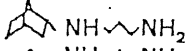
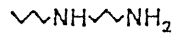
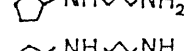
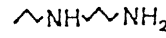
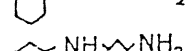
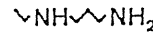



Fig.3 スペルミン合成酵素のスペルミジン結合部位の構造

合部位が後者ではスペルミジン結合部位に対応することから、妥当と思われる。このモデルにもとずけば、スペ

ルミジン合成酵素を強く阻害した化合物にアミノプロピル基を導入すれば、それらはスベルミン合成酵素活性を強く阻害することが予想されたので、実際にそれらを合成し、ラット脳由来精製スベルミン合成酵素に対する阻害性を調べた (Table 5)。活性はスベルミジン合成酵素の

Table 5 N-(3-アミノプロピル)アルキルアミン類のスベルミン合成酵素に対する阻害効果(1)

No	Structure	IC ₅₀ (μ M)	No	Structure	IC ₅₀ (μ M)
56		0.50	62		>100
57		0.27	63		4.2
58		10	64		0.42
59		7.5	65		11
60		0.17	66		>100
61		1.1			

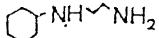
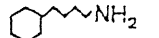
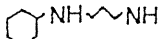
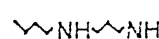
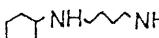
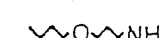
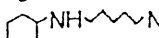
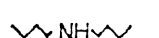
場合と同様に [³H]-MTAを測定して行った。まず、スベルミジン合成酵素に対して強い阻害性を示したシクロヘキシルアミン、exo-2-アミノノルボルナン、trans-4-メチルシクロヘキシルアミン等にアミノプロピル基を導入した化合物(56-61)についてのIC₅₀を比較した。最初予想したように、N-(3-アミノプロピル)trans-4-メチルシクロヘキシルアミン(56)、N-(3-アミノプロピル)exo-2-アミノノルボルナン(57)、N-(3-アミノプロピル)シクロヘキ

シルアミン(60)が比較的強い阻害を示した。

また、同様にスペルミジン合成酵素に対して強い阻害を示したn-ブチルアミン、n-アミルアミンについてもそれらのアミノプロピル化体が強い阻害を示すことが期待されたので、N-(3-アミノプロピル)部分の一方の窒素から炭素鎖を伸ばした化合物(62-66)を比較してみた。はじめの予想どおり、n-ブチルアミンにアミノプロピル基を導入したものの(64)、n-アミルアミンにアミノプロピル基を導入したものの(63)は、比較的強い阻害を示した。

つぎに、先の活性部位のモデルで仮定したアミノプロピル部分の必要性を調べるために、(60)のアミノプロピル部分をアミノエチル、アミノブチル、アミノペンチルに置き換えた化合物について、それぞれのIC₅₀を求めた(Table 6, 化合物67-69)。予想どおり、N-(3-アミノプロ

Table 6 N-(3-アミノプロピル)アルキルアミン類の
スペルミン合成酵素に対する阻害効果(II)

No	Structure	IC ₅₀ (μ M)	No	Structure	IC ₅₀ (μ M)
57		37	17		>100
(60)		0.17)	(64)		0.42)
68		7.0	70		>100
69		>100	71		>100

ピル)シクロヘキシルアミンよりも強い阻害を示す化合物は見つからなかった。また、1,3-ジアミノプロパン部分の2つの窒素の必要性を調べるために、窒素を炭素に置き換えた化合物(17および71)、窒素を酸素に置き換えた化合物(70)の IC_{50} を求めてみた。(17)と(60)を比較すると、(60)の IC_{50} が著しく低いことから、この化合物の3位の窒素が活性部位に結合するのに必要であることが示唆された。また、(64)と(70)とを比較してみても同様のことが言えた。また、(64)と(71)との比較では、やはり(64)の方が著しく低い IC_{50} を示すので、1位の窒素も活性部位結合に有効であることが推察された。

さらに、スベルミジン結合部位に上記阻害剤が本当に結合していることを証明するために、Kinetics実験を行い、それらがスベルミジンと競合的であることを確認した(Fig.4)。なお、ラット脳スベルミン合成酵素に対するスベルミジンの K_m 値はほぼ $500\mu M$ である。

以上の結果から、Fig.3のモデルで仮定したスベルミン合成酵素のスベルミジン結合部位構造は妥当であることが証明された。

なお、上記の各阻害剤が、これまで、スベルミン合成酵素の強力かつ選択的阻害剤といわれているS-メチル-MTA[$AdoS^+(CH_3)_2$]と比べて、どの程度有効であるかをみたところ、 $AdoS^+(CH_3)_2$ の IC_{50} が約 $80\mu M$ であったのに対して、N-(3-アミノプロピル)シクロヘキシルアミンの

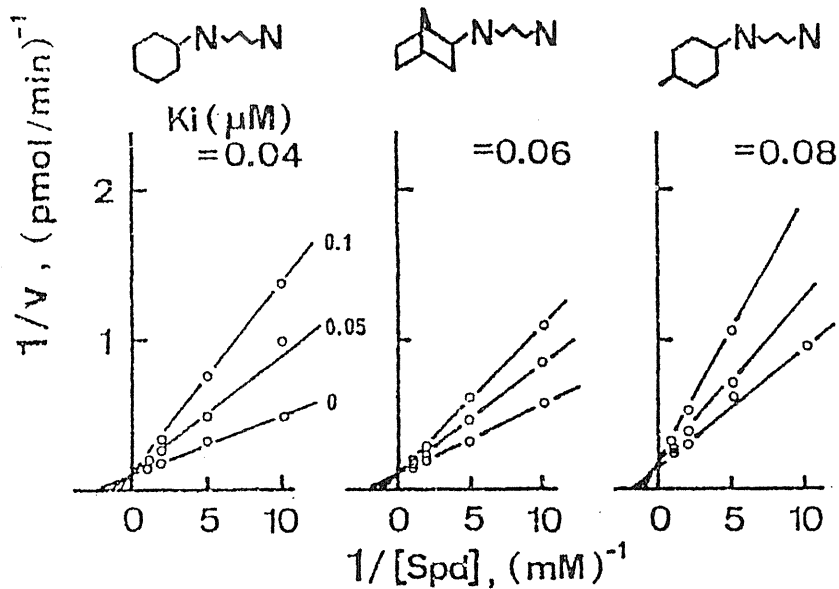


Fig.4 スペルミジン類似体によるスペルミン合成酵素阻害のKinetics実験
 IC_{50} は、 $0.2 \mu\text{M}$ であり、ほぼ400倍も強い阻害を示すことがわかった。

つぎに、スペルミン合成酵素の活性部位のより具体的な全体像を作りあげるために、まず、窒素原子あるいはその隣の炭素原子にメチル基を導入した化合物を用いて、疎水空間の横に位置する1,3-ジアミノプロパン構造の結合部位を調べた。その結果、Table 7に示すように、メチル基の導入は著しく阻害効果を弱め、1,3-ジアミノプロパン構造の結合部位は比較的狭い空間であることが示唆された。引続き、deAdoMet結合部位に関する情報を得る

Table 7 N-(3-アミノプロピル)アルキルアミン類の
スベルミン合成酵素に対する阻害効果(III)

Structure	IC ₅₀ (μ M)	Structure	IC ₅₀ (μ M)
	0.17		0.42
	30		7.9
	4.3		100

ことを計画した。もし deAdoMet のアミノ基やスルホニウムイオンの陽性電荷が結合する場所があるなら、より長鎖のポリアミンであるテトラアミンなどを用いて、その陽性電荷の位置が調べられるのではないかと考え、deAdoMet 濃度を変えて、鎖状ポリアミン類似体の阻害効果を比較した (Fig.5)。その結果、対照として用いた N-(3-アミノプロピル)プロピルアミン (APPA) のように構造的にスベルミンより小さい化合物では、deAdoMet 濃度による阻害効果への影響は認められなかったが、3-4-3, 3-5-3, 3-6-3, 3-5 (ポリアミンおよびその類似体は、窒素原子には含まれるメチレン鎖の数の組合せで示す: 例えば 3-4-3 はスベルミンを示す) では明らかな阻害効果の差がみられた。即ち、これらの阻害剤は deAdoMet 濃度が低

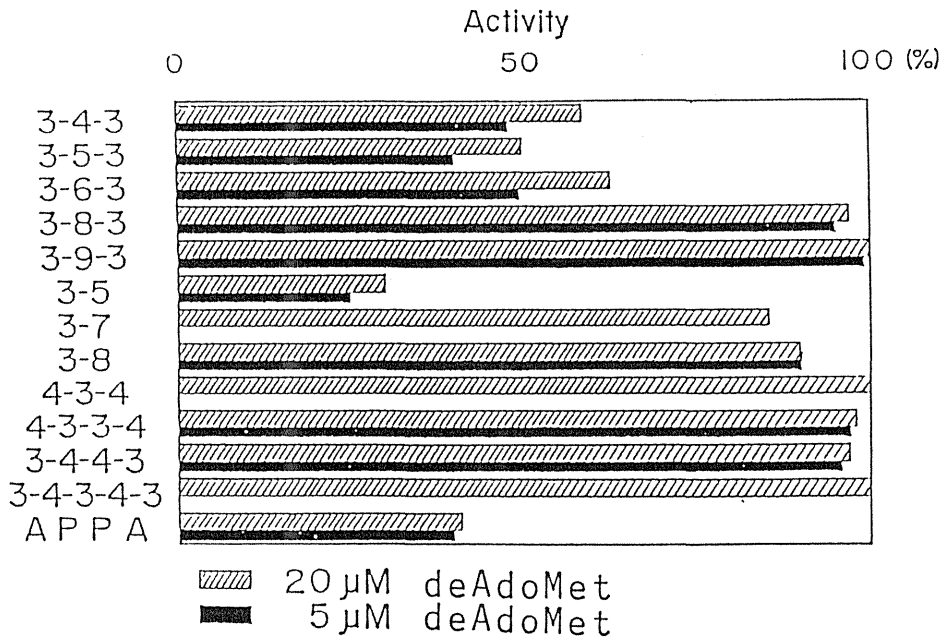


Fig.5 deAdoMetの濃度の違いによる鎖状ポリアミン類似体の阻害効果

いときに、より強い効果を示した。従って、これらの化合物はdeAdoMetの結合部位にも作用しており、そこには2つの陽性電荷を結合する場所があることが示唆された。

得られた結果を総合すると、哺乳動物スベルミン合成酵素の活性部位は、Fig.6に示すように、疎水空間をはさんで、スベルミジンの1,3-ジアミノプロパン構造の結合部位とdeAdoMetのアミノプロピルスルホニウム構造の結合部位に、それぞれ2つの陰性電荷が存在することが推察された。

1-3 新しいアミノプロピル基転移反応

スペルミジン合成酵素のプトレシン結合部位構造を調べるために行った基質性の実験 (Table 3) において, trans-1,4-ジアミノシクロヘキサンのほかに4-アミノメチルピペリジン (49) およびモノメチルプトレシン (54) がわずかでも基質性を示したことは興味があった。結論として得られた Fig. 2 のモデルにしたがえば, プトレシンの一方のアミノ基を吸着する陰電荷が存在する周辺部分は, 立体的に制約がありそうで (Table 2), (49) および (54) の2級アミン部分是对応する陽電荷としてその陰電荷に吸着しにくいのではないかと考えられた。代わりにそれらの1級アミン部分が対応する陽電荷として吸着するなら, 必然的に2級アミンがアミノプロピル化されることになる。そこで両化合物につき, 予想されるアミノプロピル誘導体 (Fig. 7) を2種ずつあらかじめ別途合成し, それを標品として, (49) および (54) を添加して得られる酵素反応生成物および培養細胞生成物を比較検討した。

精製ラットスペルミジン合成酵素を用い, (49) および (54) をアミノプロピル受容体として *in vitro* でインキュベートした後, HPLC で生成物の挙動を調べた。(49) を添加した場合 (Fig. 8), 酵素を加えずに行ったコントロールにも若干生成物のあることがわかった。(49) の両アミノ

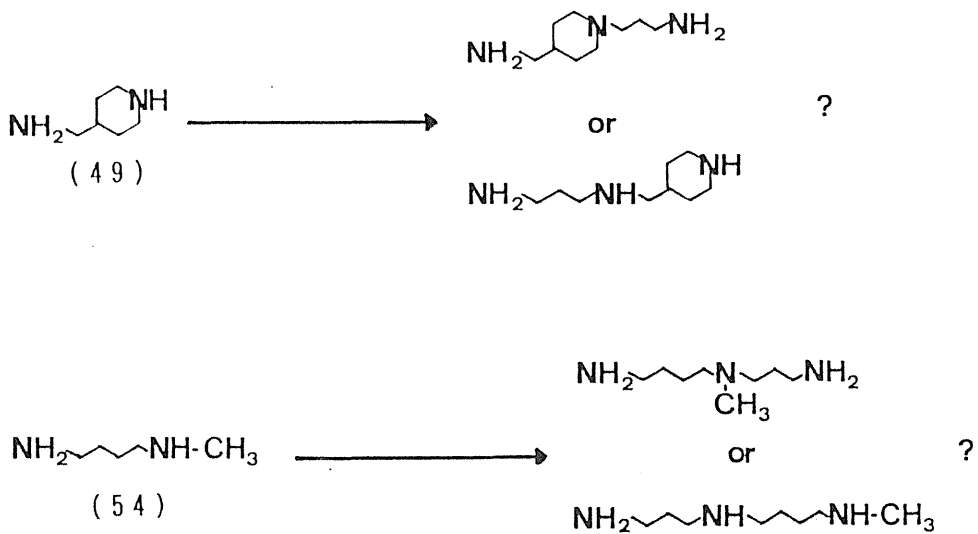


Fig.7 (49)および(54)のアミノプロピル誘導体2種の構造

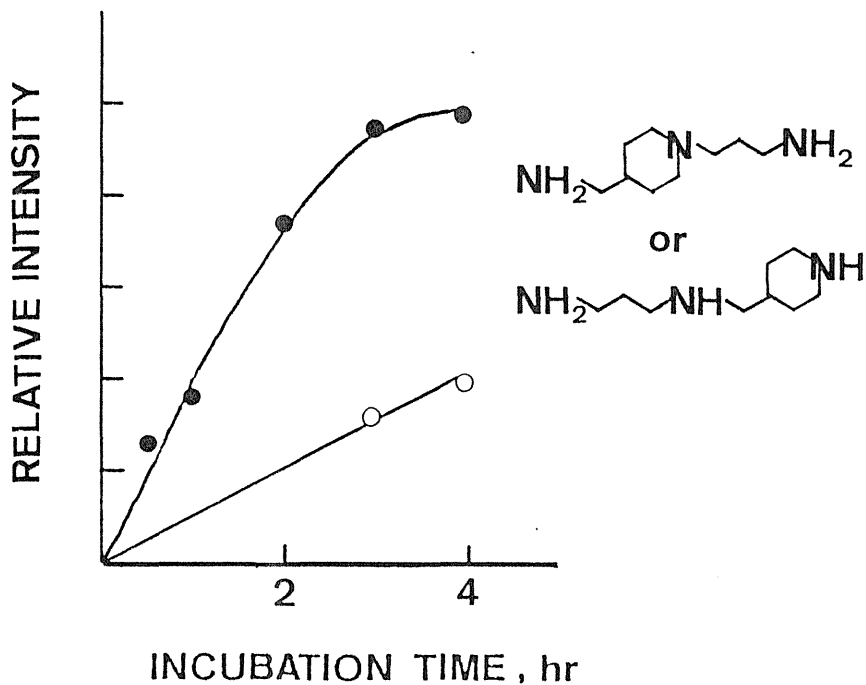


Fig.8 酵素反応生成物の反応時間による変化
 ●—● (49)存在下, ○—○ コントロール

プロピル誘導体はHPLCで同じ位置に溶出され、かつ生成物の量が極めて少なかったため、ポリアミンオキシダーゼによる両生産物の反応性の違いを利用する間接的な方法で調べたところ、酵素存在下での生成物は2級アミンがアミノプロピル化されたもので、非酵素的な生成物は1級アミンがアミノプロピル化されたものであることを強く暗示した。また、(54)を添加した場合、両アミノプロピル誘導体はHPLCで分離検出できたので、直接培養時間に伴う挙動を調べることができた。その結果(Fig.9)、この場合も非酵素的なアミノプロピル化が若干進行し、それ

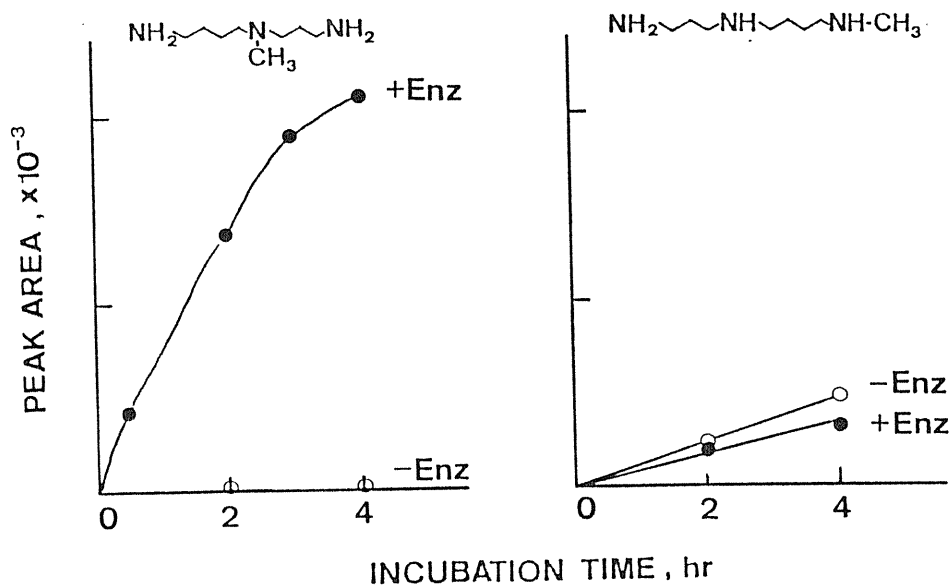


Fig.9 酵素生成反応物と非酵素反応生成物との区別

は1級アミンの方がアミノプロピル化されたものであり、これとは対比的に酵素反応で生成するものは、全て2級アミンがアミノプロピル化されたものであることが強く示唆された。さらにこれらの生成物を、ダンシル誘導体にした後、TLCにより分離し、標品と比較することにより、2級アミンの酵素的アミノプロピル化を確認した (Fig.10).

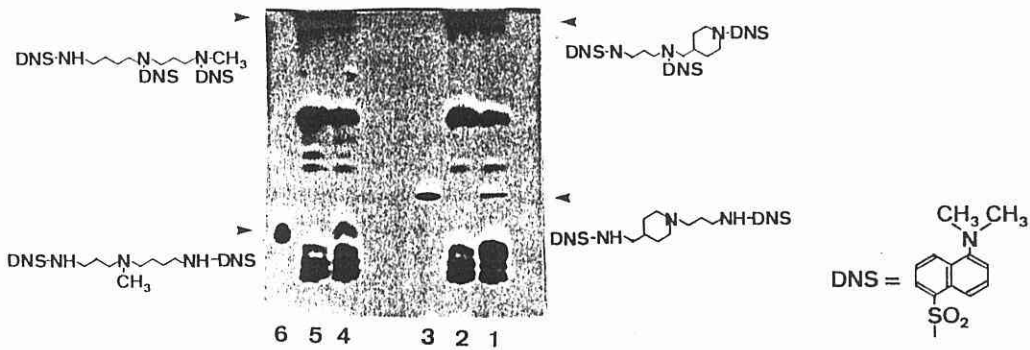


Fig.10 Dansyl(DNS)化した酵素反応生成物および生成物標品のTLCによる分析
 lane 1:(49)を基質としてincubation +Enz
 lane 2:(49)を基質としてincubation -Enz
 lane 3:生成物標品
 lane 4:(54)を基質としてincubation +Enz
 lane 5:(54)を基質としてincubation -Enz
 lane 6:生成物標品

さらに、培養細胞 (HTC cell) に、オルニチン脱炭酸酵素阻害剤であるDFMOを加え、細胞中のプロレシン、スペルミジンをほとんど減少させると同時にdeAdoMet濃度を高め、(49)および(54)を投与した時にそれらのアミノプロピル化生成物ができやすい状態にして、生成物の検討を行った。

4日培養した細胞をHPLCで分析した結果をFig.11に示す。

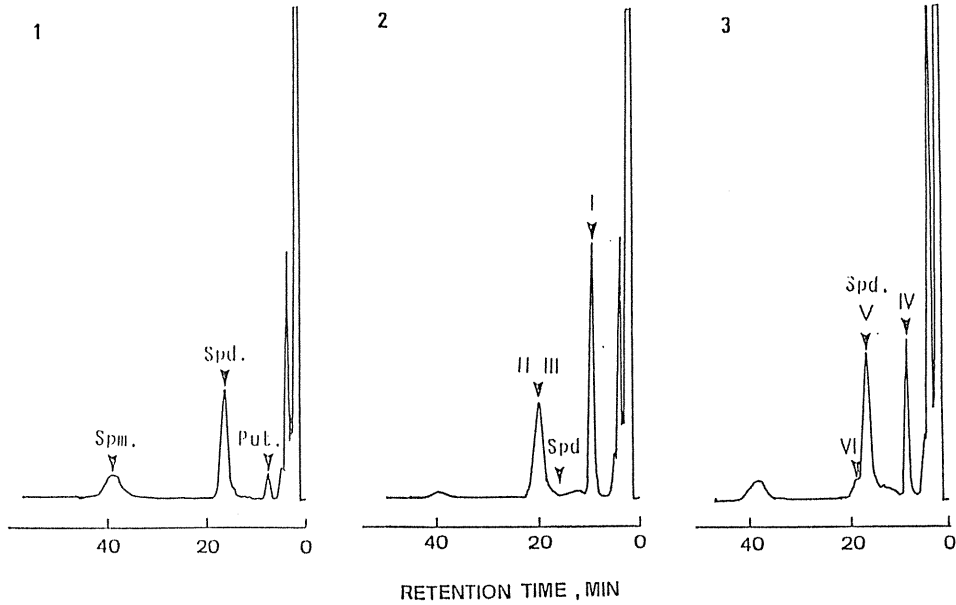


Fig.11 HTC細胞における(49)および(54)のアミノプロピル誘導体の生成
1: control細胞
2: (49)処理細胞
3: (54)処理細胞

(49)および(54)のそれぞれ2種類のアミノプロピル誘導体の存在は、HFB誘導体にした後、GC-MSにより最終的に同定・確認した。

以上の検討結果から、スペルミジン合成酵素は2級アミンにもアミノプロピル基を転移できることが初めて証明された。

2. ポリアミンをリガンドにもつアフィニティー吸着体

2-1 デザインと調製

構造からも容易に推察されるように、ポリカチオン、あるいは自由度の大きな鎖状分子としてのポリアミンは、陰性電荷に富む核酸、膜成分、酸性蛋白質など非常に多くの高分子成分に作用し、その機能に影響を与えることが試験管内ではすでに確かめられている。しかし、どの高分子にどのように作用するのが生理的に重要なのかを明らかにするのは、作用点の多様性が考えられて非常に難しい。そこで、ポリアミンの機能研究におけるこのような基本的な問題を解決するためには、数多くあるポリアミンの作用を、そのアクセプターの結合部位の構造によって区別したり、あるいはアクセプターの親和性の違いによって区別するような研究の進め方が有効なのではないかと我々は考えている。本研究では、そのようなポリアミンのアクセプターを系統的に分離し、生理的に重要な意味を持つポリアミン親和性高分子を検索するために有用なアフィニティー吸着体の開発を目的としている。

ポリアミンは溶液中で多くのコンホメーションをとりうる鎖状の分子であるから、アクセプター側のポリアミン結合部位の構造も一様でないことが予想される。吸着体におけるリガンドと担体との結合位置と、それに吸着

されるアクセプター側のモデルを，スペルミンを例にして Fig.12 に示す。窒素原子の塩基性にあまり影響を

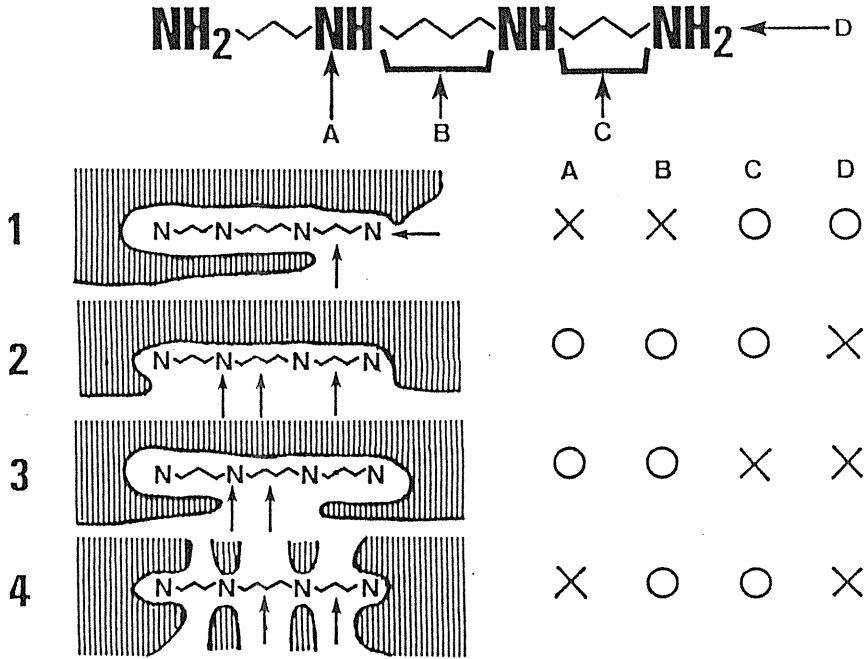


Fig.12 担体の結合位置と，それらによって分離が可能になるアクセプター構造
 A:2級のアミノ窒素と結合
 B:ブチル部分に結合
 C:プロピル部分に結合
 D:末端アミノ基と結合
 例として1,2,3,4のアクセプター構造を示した。

与えずに，2級のアミノ窒素，末端のアミノ窒素，ブチル部分あるいはプロピル部分に側鎖をつけて担体に結合した場合，アクセプター側の構造によっては，それらがアクセプターの吸着に必ずしも有効に働くとは限らない。

したがって、ポリアミン親和性高分子を広範囲に検索するためには、異なった結合様式を持つ複数の吸着体を用いる必要があるだろう。

ここでは、末端アミノ基を介するポリアミン-セファロースではなく、中央部の側鎖を介した結合様式をもつ吸着体 (Fig.13) の調製を計画した。そのために、合成原料

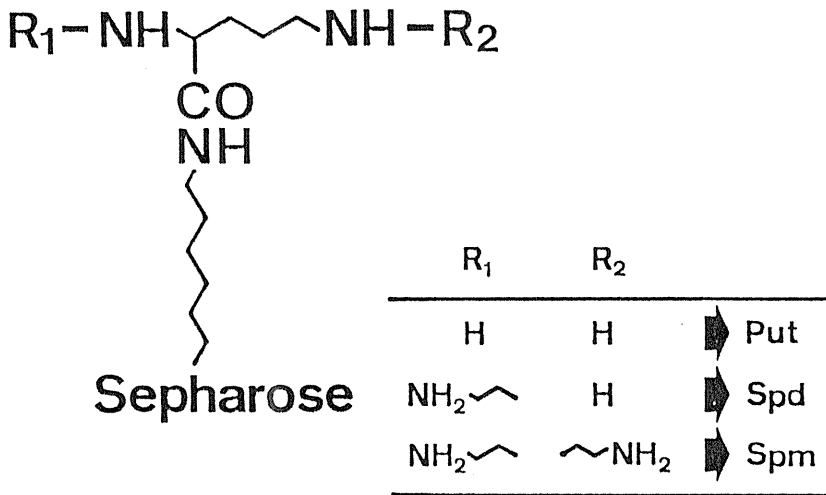


Fig.13 アフィニティー吸着体のデザイン

としてオルニチンを用い、そのカルボキシル基を利用してセファロースに結合することを考えた。すなわち、プトレシナナログとしてはオルニチンを用い、スベルミジンアナログとしてはオルニチンの α 位のアミノ基にアミノプロピル基を導入したN-(3-アミノプロピル)オルニ

チン(以下 APO と略す), およびスペルミンアナログとしては両アミノ基にアミノプロピル基を導入した N,N'-ビス(3-アミノプロピル)オルニチン(以下 BAPO と略す)をリガンドにすることとした. APO, BAPO の合成方法を Fig. 14, 15 にそれぞれ簡単にまとめる.

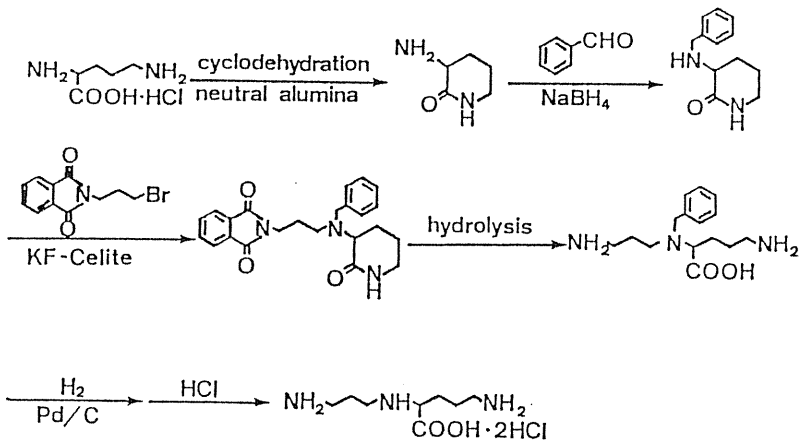


Fig. 14 APOの合成

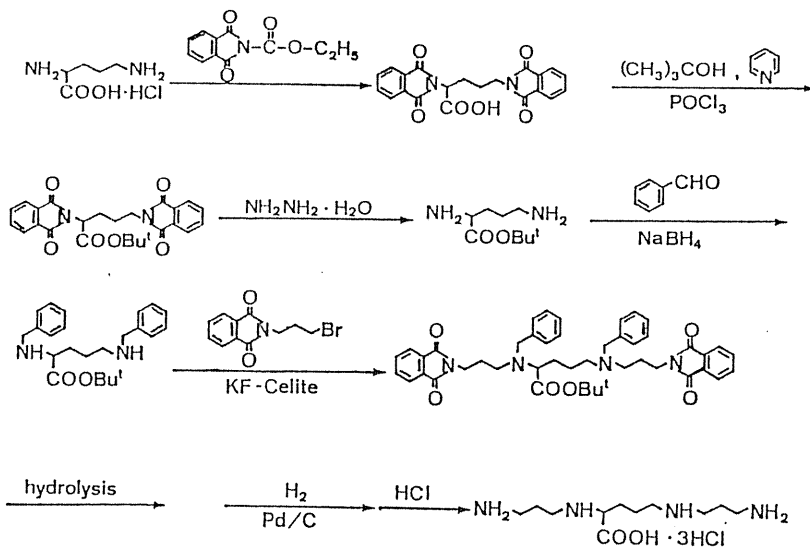


Fig. 15 BAPOの合成

セファロースへの固定化は、オルニチンでは、Fig.13に示すように、EAH-セファロースとアミド結合で可能であったが、APO, BAPOの場合には、固定化する際に必要な2級アミンの保護が不十分なため同様な方式をとることができなかつた。そこで、APO, BAPOのアミンをベンジルオキシカルボニル化して保護した後、そのカルボキシル基にベンジルチオプロピルアミンをアミド型で結合し、ベンジル基を除去してAPO, BAPOのメルカプトプロピルアミド体に誘導した。一方、EAH-セファロースはN-(γ -マレイミドブチロキシ)コハク酸イミド(GMBS)でマレイミドブチロイル化して、これにAPO, BAPOのメルカプトプロピルアミド体を固定化したアフィニティー吸着体を調製した(Fig.16)。なお、セファロースへのAPO, BAPOの結合量は、それぞれ0.7, 1.7 μ mol/ml gelであつた。

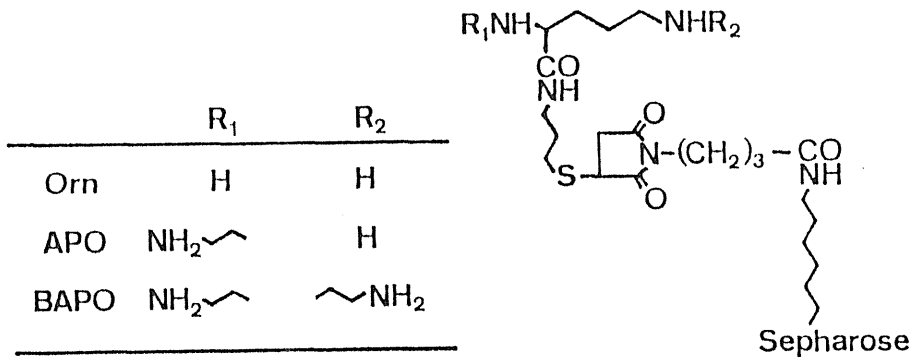


Fig.16 APO, BAPOをリガンドとするアフィニティー吸着体

2-2 スペルミン合成酵素精製への応用

調製した吸着体には、ポリアミン構造が含まれるが、それらが、ポリアミンとして機能するかどうかは明らかではない。未知のポリアミン親和性高分子をこれらの吸着体により検索する際には、吸着体中に固定化されているポリアミン構造が、ポリアミンとして機能することが前提となる。そこで、すでにポリアミンに親和性をもつことが明らかになっている高分子を対象として、調製した吸着体が、それらの高分子に吸着するかどうかを調べることにした。

ポリアミン親和性高分子としては、ポリアミンを活性化因子にしたり、基質、あるいは生成物とするポリアミンの生合成酵素をモデル蛋白として検討した。対象とした蛋白質をTable 8に示す。吸着体に対するこれらの酵

Table 8 調製した吸着体に対する結合性を調べたポリアミン生合成酵素

Enzyme	Polyamine	Ligand linked with carrier
S-Adenosylmethionine Decarboxylase	Putrescine(activator)	L-Ornithine D-Ornithine
Spermidine Synthase	Putrescine(substrate) Spermidine(product)	L-Ornithine DL-APO
Spermine Synthase	Spermidine(substrate) Spermine(product)	DL-APO L-BAPO

素の親和性は、それぞれの吸着体を詰めた小カラムに精製各酵素をかけたのち、塩濃度の違う緩衝液、あるいはプトレシンやポリアミンを含む緩衝液による酵素活性の溶出のされ方により、その強さを調べた。その結果、特異的な吸着が確認できた組み合わせは、L-BAPO-セファロースとスベルミン合成酵素であった。ブタ脳由来精製スベルミン合成酵素は、0.3MのNaClを含む緩衝液では溶出されず、1mMのスベルミジンを含む同緩衝液により溶出された。

ところで、スベルミン合成酵素は、1978年Rainaらによって牛の脳から完全精製された。その方法は、脳のホモジネートの超遠心上清を硫酸分画後、DEAE-セルロースクロマトグラフィーにかけ、さらにその活性分画をスベルミン-セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにかけるステップから成っている。しかし、この精製法では完全精製までに2回のアフィニティークロマトグラフィーを行わなければならない。また、再現性、収率にも問題があり、これはスベルミン-セファロースに対する本酵素の親和性が不十分なためと考えられた。そこで、活性部位構造のモデル(Fig.6)を参考に、また、本酵素のL-BAPO-セファロースへの特異的吸着により支持されるそのモデルの妥当性をさらに確認する意味も含めて、種々の対称ポリアミンを、それらの1級アミンをアミド結合を介して、固定化したアフィニティー吸着体を調製し

(Table 9), スペルミン合成酵素との親和性を検討した。

Table 9 リガンドに用いた対称ポリアミンとそれらの結合量

Ligand	Capacity ($\mu\text{mol/ml}$)
3-4-3	3.4
3-5-3	8.4
3-6-3	5.9
3-8-3	5.2
3-9-3	-
4-3-4	2.5
4-3-3-4	8.3
3-4-4-3	2.0
3-4-3-4-3	2.4

親和性の比較は、調製した吸着体の各小カラムに準精製ラット由来スペルミン合成酵素を流した後、Tris-HCl緩衝液 (pH7.1) にそれぞれ 0.15M NaCl (緩衝液 A), 0.3M NaCl (緩衝液 B), および 0.3M NaCl と 1mM スペルミジン (緩衝液 C) を含む溶離液で順次溶出される酵素活性を測定することにより、行った。緩衝液 A による溶出分画には、調べた全てのカラムで活性はほとんど検出されなかったが、緩衝液 B による溶出分画には、スペルミン (3-4-3)-セファロースを含むほとんどのカラムで活性が確認された。しかし、3-4-4-3, 3-4-3-4-3-セファロースカラムでは、緩衝液 C を流すまで活性はほとんど溶出されず、スペルミン-セファロースに比べて強い親和性を持つことが明らかになった (Fig.17)。

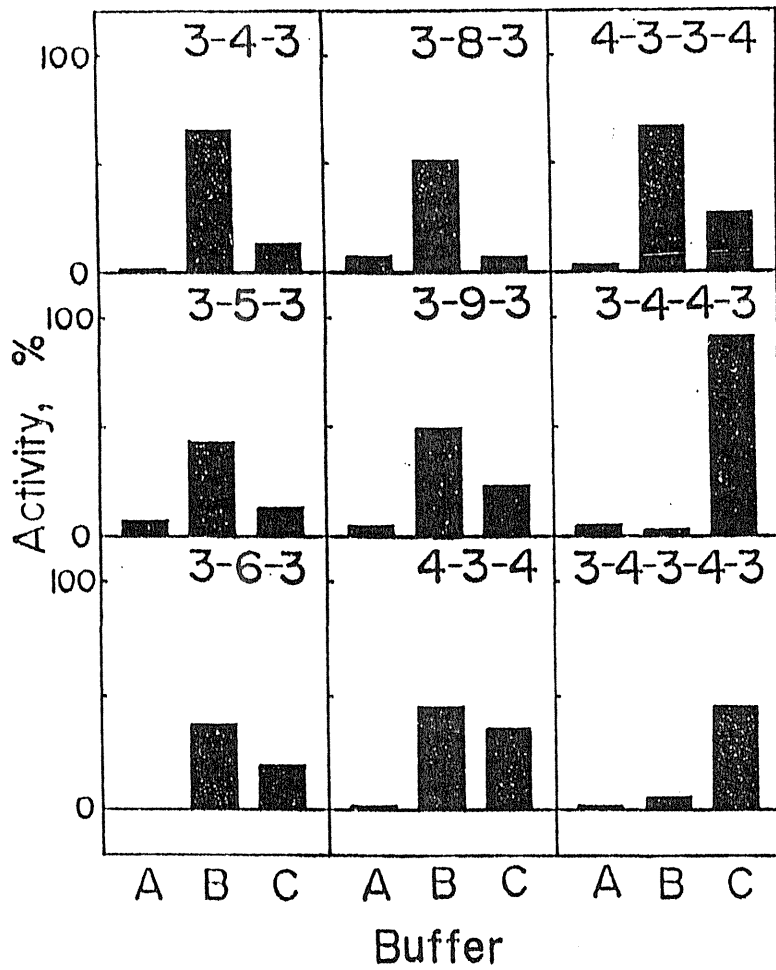


Fig.17 ポリアミンアナログセファロースにおけるスペルミン合成酵素の溶出パターン

ここで、3-4-4-3の異性体である4-3-3-4をリガンドとした吸着体では、酵素の親和性は明らかに減少している。これは一方を固定したリガンドをモデルのスペルミン結合部分に重ねてみれば、活性部位の4つの陰電荷を利用して、より高い親和性を期待できるのが3-4-4-3の方であることは容易にわかる。したがって、この結果はまた、活性部位のモデルの妥当性を支持するものである。

つぎに、3-4-4-3をリガンドとする吸着体およびスペルミン-セファロースを用いて、ラットおよびブタのスペルミン合成酵素を脳組織から精製した結果をTable 10に示す。

Table 10 スペルミン合成酵素の精製

Source	Step	T.P.	T.U.	Yield	S.A.	P.F.
Pig brain (110g)	DEAE-Cellulose	30.1	17.9	100	0.59	1
	3-4-4-3-Sepharose	0.062	15.8	88	255	432
Rat brain (44g)	DEAE-Cellulose	37.0	13.3	100	0.36	1
	3-4-4-3-Sepharose	0.026	11.7	88	450	1250
Rat brain (98g)	DEAE-Cellulose	13.0	14.3	100	1.10	1
	1st. Spm-Sepharose	-	10.4	73	-	-
	2nd. Spm-Sepharose	<0.02	7.4	52	>370	>336

T.P.:Total Protein (mg)
T.U.:Total Units (nmol spm/min)
Yield (%)
S.A.:Specific Activity (nmol spm/min/mg)
P.F.:Purification Fold

スベルミン-セファロースを用いる場合と比べて、完全精製のために1回のアフィニティークロマトグラフィー操作で十分なこと、1回の操作の収率も約90%と良好であること、さらに、再現性に優れていること、などがあげられた。ブタ及びラットから精製した酵素を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、銀染色を行うと、Fig.18に示すように、それぞれ完全な単一バンドとなり、完全精製できたことが確認できた。

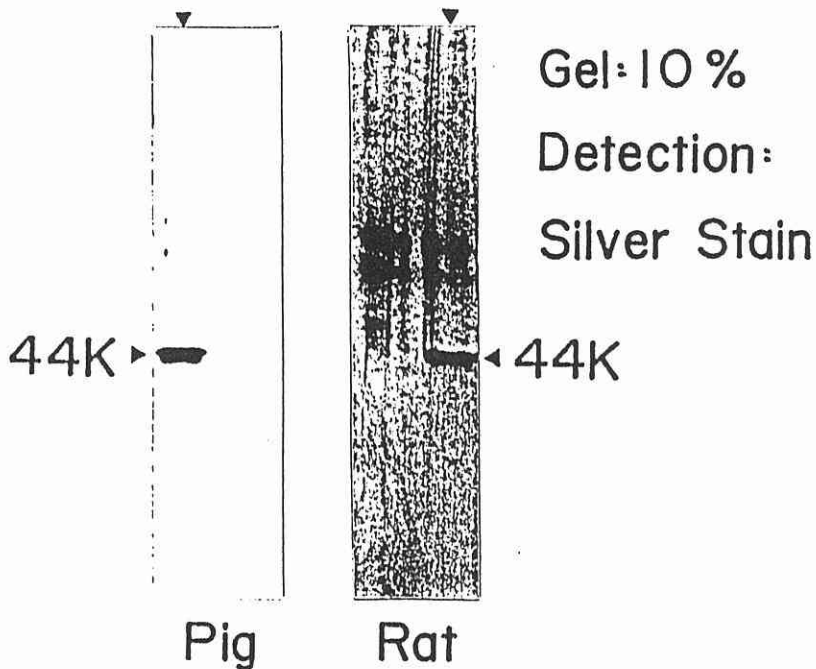


Fig.18 精製スベルミン合成酵素のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動