

細胞内ポリアミンの作用点となる蛋白質の検索
(課題番号 09672285)

平成 9 年度～平成 11 年度
科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成 12 年 3 月
研究代表者 白 幡 晶
(城西大学薬学部)

- M. Saminathan, T. Antony, A. Shirahata, L.H. Sigal, T. Thomas, and T.J. Thomas,
 Ionic and Structural Specificity Effects of Natural and Synthetic Polyamines on the Aggregation and
 Resolubilization of Single-, Double-, and Triple-Stranded DNA
 Biochemistry, 38, 3821 - 3830(1999) 2 2 1
- T. Antony, T. Thomas, A. Shirahata and T.J. Thomas
 Selectivity of Polyamines on the Stability of RNA-DNA Hybrids Containing Phosphodiester and
 Phosphorothioate Oligodeoxyribonucleotides
 Biochemistry, 38, 10775 - 10784(1999) 2 3 1
- R. M. Thomas, T. Thomas, M. Wada, L.H. Sigal, A. Shirahata and T.J. Thomas
 Facilitation of the Cellular Uptake of a Triplex-Forming Oligonucleotide by Novel Polyamine
 Analogues: Structure-Activity Relationships
 Biochemistry, 38, 13328 - 13337(1999) 2 4 1
- N. Shah, T. Thomas, A. Shirahata, L.H. Sigal and T.J. Thomas
 Activation of nuclear factor κ B by polyamines in breast cancer cells
 Biochemistry, 38, 14763 - 14774(1999) 2 5 1
- N. Furuumi, D. Amano, Y.J. Xu, K. Samejima, M. Niitsu, and A. Shirahata
 Ionspray ionization-mass spectrometric separation and determination of heptafluorobutyryl
 derivatives of polyamines
 Anal. Biochem., 265, 253-259(1998) 2 6 4
- K. Nishimura, M. Liisanantti, Y. Muta, K. Kashiwagi, A. Shirahata, M. Janne, K. Kankare, O.
 Janne, and K. Igarashi
 Structure and activity of mouse S-adenosylmethionine decarboxylase gene promoters and properties of
 the encoded proteins
 Biochem. J., 332, 651-659(1998) 2 7 1
- M. Wada, D. Amano, H. Hosoda, A. Shirahata, K. Samejima, and A. E. Pegg
 Primary structure of rat spermidine synthase: An example of refining the cDNA-derived amino acid
 sequence
 Biol. Pharm. Bull., 22, 889-895(1999) 2 8 0

研究成果 目次

	頁
ビオチン標識ポリアミンの合成とポリアミン作用蛋白質の検出	1
モルモット組織トランスグルタミナーゼに対するビオチン標識ポリアミンの基質性	4 9
スペルルミジン過剰蓄積を伴う細胞死とヒストン分解	8 9
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-	1 3 2
T. Thomas, G.D. Kulkarni, M.A. Gallo, N. Greenfield, J.S. Lewis, <u>A. Shirahata</u> , and T.J. Thomas Effect of natural and synthetic polyamines on the conformation of an oligodeoxyribonucleotide with the estrogen response elements Nucl. Acid Res., 25, 2396-2402 (1997)	1 6 9
K. Takao, Y.J. Xu, K. Samejima, <u>A. Shirahata</u> and M Niitsu Preparation and Usefulness of Some Fluorogenic Substrate for Assay of Arginyl-tRNA-Protein Transferase by HPLC Anal. Biochem., 267, 373-381 (1999)	1 7 6
Thomas Antony , T. Thomas, A. Shirahata, L.H. Sigal and T.J. Thomas Selectivity of Spermine Homolos on Triplex DNA Stabilization Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 9, 221-231(1999)	1 8 4
K. Igarashi, <u>A. Shirahata</u> , A.J. Pahk, K. Kashiwagi, and K. Williams Benzyl-polyamine; novel, potent N-methyl-D-aspartate receptor antagonist J. Pharmacol. Exp. Therp., 283, 533-540(1997)	1 9 5
T.J. Thomas, C. Ashley, T. Thomas, <u>A. Shirahata</u> , L.H. Sigal And J.S. Lee: Pyrimidine- purine^pyrimidine triplex DNA stabilization in the presence of tetramine and pentamine analogues of spermine, Biochem. Cell Biol., 75, 207-215(1997)	2 0 7
Muthusamy Saminathan, N. Shah, T. Antony, S. Haddad, P. Amenta, <u>A. Shirahata</u> , T.J. Thomas and T. Thomas Antitumor effects of bis(ethyl)polyamine analogs on mammary tumor development in FVB/NTgN(MMTVneu) transgenic mice Cancer Lett., 146, 15-23(1999)	2 1 2

許 泳吉、高尾浩一、鮫島啓二郎、白幡 晶、新津 勝：アルギニルトランスフェラーゼに対する蛍光性基質の開発、日本薬学会第 118 年会、1998 年 3 月（京都）

高尾浩一、許 泳吉、鮫島啓二郎、白幡 晶、新津 勝：アルギニルトランスフェラーゼに対する新規蛍光性基質の性質、日本生化学会大会第 71 回、1998 年 10 月（名古屋）

松鹿美帆、藤原栄一、和田牧子、白幡 晶：ビオチン標識ポリアミンによるポリアミン作用蛋白質の検出、日本生化学会大会第 71 回、1998 年 10 月（名古屋）

許 泳吉、古海直美、鮫島啓二郎、新津 勝、白幡 晶：ラット肝ホモジネート中高分子吸着および解離ポリアミンの測定 再生肝への応用、日本ポリアミン研究会 第 14 回、1999 年 1 月（大阪）

栗田伸人、許 泳吉、鮫島啓二郎、白幡 晶：HTC 細胞における水容積の測定 遊離ポリアミン濃度測定のための基礎検討、日本ポリアミン研究会 第 14 回、1999 年 1 月（大阪）

西村和洋、柏木敬子、白幡 晶、Olli A. Janne、五十嵐一衛：マウス S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素（SAMDC）の遺伝子構造と機能解析、日本ポリアミン研究会 第 14 回、1999 年 1 月（大阪）

藤原栄一、松鹿美帆、和田牧子、白幡 晶：ビオチン標識ポリアミンにより標識される細胞内蛋白質の検出、日本ポリアミン研究会 第 14 回、1999 年 1 月（大阪）

和田牧子、村石由里弥、亀井千恵子、田 玉順、白幡 晶：ラット S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素に対する不可逆阻害剤の阻害様式の比較、日本ポリアミン研究会 第 15 回、2000 年 1 月（大宮）

(3) 出版物

なし

T.J. Thomas, C. Ashley, T. Thomas, A. Shirahata, L.H. Sigal And J.S. Lee: Pyrimidine-purine[^]pyrimidine triplex DNA stabilization in the presence of tetramine and pentamine analogues of spermine, *Biochem. Cell Biol.*, 75, 207-215(1997)

(2) 口頭発表

学会発表

T. Ozawa, A. Shirahata, S. Shibata, M. Wada and K. Samejima: Synthetic diacetyl substrates for rat polyamine oxidase. *The Gordon Research Conferences on Polyamines*、第 12 回、1997 年 6 月 (米国ニューハンプシャー)

古海直美、天野大介、鮫島啓二郎、新津 勝、白幡 晶 : 肝ホモジネート中ポリアミンの類別を目指して、生体成分の分析化学シンポジウム 第 12 回、1997 年 8 月 (広島)

古海直美、天野大介、鮫島啓二郎、新津 勝、白幡 晶 : IS-MS によるポリアミンの新規定量法の開発と肝ホモジネート中ポリアミンの分画測定、日本ポリアミン研究会 第 13 回、1998 年 1 月 (東京)

和田牧子、天野大介、細田晴美、白幡 晶、鮫島啓二郎 : MALDI-TOF-MS の活用によるラットスペルミジン合成酵素の一次構造の究明、日本ポリアミン研究会 第 13 回、1998 年 1 月 (東京)

柏木敬子、五十嵐一衛、白幡 晶、A.J. Pahk、K. Williams : ベンジルポリアミンによる NMDA 受容体の阻害効果、日本薬学会第 118 年会、1998 年 3 月 (京都)

古海直美、天野大介、許 泳吉、鮫島啓二郎、新津 勝、白幡 晶 : IS-MS による肝ホモジネート中ポリアミンの分画測定、日本薬学会第 118 年会、1998 年 3 月 (京都)

和田牧子、天野大介、細田晴美、白幡 晶、鮫島啓二郎 : ラットスペルミジン合成酵素の一次構造、日本薬学会第 118 年会、1998 年 3 月 (京都)

Thomas Antony , T. Thomas, A. Shirahata, L.H. Sigal and T.J. Thomas
Selectivity of Spermine Homologs on Triplex DNA Stabilization
Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 9, 221-231(1999)

K. Takao, Y.J. Xu, K. Samejima, A. Shirahata and M Niitsu
Preparation and Usefulness of Some Fluorogenic Substrate for Assay of Arginyl-tRNA-
Protein Transferase by HPLC
Anal. Biochem., 267, 373-381 (1999)

M. Wada, D. Amano, H. Hosoda, A. Shirahata, K. Samejima, and A. E. Pegg
Primary structure of rat spermidine synthase: An example of refining the cDNA-derived
amino acid sequence
Biol. Pharm. Bull., 22, 889-895(1999)

N. Furuumi, D. Amano, Y.J. Xu, K. Samejima, M. Niitsu, and A. Shirahata
Ionspray ionization-mass spectrometric separation and determination of
heptafluorobutyryl derivatives of polyamines
Anal. Biochem., 265, 253-259(1998)

K. Nishimura, M. Liisananntti, Y. Muta, K. Kashiwagi, A. Shirahata, M. Janne, K.
Kankare, O. Janne, and K. Igarashi
Structure and activity of mouse S-adenosylmethionine decarboxylase gene promoters
and properties of the encoded proteins
Biochem. J., 332, 651-659(1998)

K. Igarashi, A. Shirahata, A.J. Pahk, K. Kashiwagi, and K. Williams
Benzyl-polyamine; novel, potent N-methyl-D-aspartate receptor antagonist
J. Pharmacol. Exp. Therp., 283, 533-540(1997)

T. Thomas, G.D. Kulkarni, M.A. Gallo, N. Greenfield, J.S. Lewis, A. Shirahata, and T.J.
Thomas
Effect of natural and synthetic polyamines on the conformation of an
oligodeoxyribonucleotide with the estrogen response elements
Nucl. Acid Res., 25, 2396-2402(1997)

研究組織

研究代表者： 白幡 晶 (城西大学・薬学部・助教授)

研究経費

平成 9年度	2600	千円
平成 10年度	500	千円
平成 11年度	500	千円
計	3,600	千円

研究発表

(1) 学会誌等

M. Saminathan, T. Antony, A. Shirahata, L.H. Sigal, T. Thomas, and T.J. Thomas,
Ionic and Structural Specificity Effects of Natural and Synthetic Polyamines on the
Aggregation and Resolubilization of Single-, Double-, and Triple-Stranded DNA
Biochemistry, 38, 3821 - 3830(1999)

T. Antony, T. Thomas, A. Shirahata and T.J. Thomas
Selectivity of Polyamines on the Stability of RNA-DNA Hybrids Containing
Phosphodiester and Phosphorothioate Oligodeoxyribonucleotides
Biochemistry, 38, 10775 - 10784(1999)

R. M. Thomas, T. Thomas, M. Wada, L.H. Sigal, A. Shirahata and T.J. Thomas
Facilitation of the Cellular Uptake of a Triplex-Forming Oligonucleotide by Novel
Polyamine Analogues: Structure-Activity Relationships
Biochemistry, 38, 13328 - 13337(1999)

N. Shah, T. Thomas, A. Shirahata, L.H. Sigal and T.J. Thomas
Activation of nuclear factor κ B by polyamines in breast cancer cells
Biochemistry, 38, 14763 - 14774(1999)

Muthusamy Saminathan, N. Shah, T. Antony, S. Haddad, P. Amenta, A. Shirahata, T.J.
Thomas and T. Thomas
Antitumor effects of bis(ethyl)polyamine analogs on mammary tumor development in
FVB/NTgN(MMTVneu) transgenic mice
Cancer Lett., 146, 15-23(1999)

2) ポリアミンの枯渇、蓄積により影響を受ける細胞機能の解析

- スperlルミジン過剰蓄積を伴う細胞死とヒストン分解
- 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-
- Ionspray ionization-mass spectrometric separation and determination of heptafluorobutyryl derivatives of polyamines

3) ポリアミンアナログの合成とその作用についての検討

- Ionic and Structural Specificity Effects of Natural and Synthetic Polyamines on the Aggregation and Resolubilization of Single-, Double-, and Triple-Stranded DNA
- Selectivity of Polyamines on the Stability of RNA-DNA Hybrids Containing Phosphodiester and Phosphorothioate Oligodeoxyribonucleotides
- Facilitation of the Cellular Uptake of a Triplex-Forming Oligonucleotide by Novel Polyamine Analogues: Structure-Activity Relationships
 - Selectivity of Spermine Homologs on Triplex DNA Stabilization
 - Activation of nuclear factor κ B by polyamines in breast cancer cells
 - Antitumor effects of bis(ethyl)polyamine analogs on mammary tumor development in FVB/NTgN(MMTVneu) transgenic mice
 - Benzyl-polyamine; novel, potent N-methyl-D-aspartate receptor antagonist
 - Effect of natural and synthetic polyamines on the conformation of an oligodeoxyribonucleotide with the estrogen response elements
- Pyrimidine-purine[^]pyrimidine triplex DNA stabilization in the presence of tetramine and pentamine analogues of spermine,

4) その他

- Primary structure of rat spermidine synthase: An example of refining the cDNA-derived amino acid sequence
- Structure and activity of mouse S-adenosylmethionine decarboxylase gene promoters and properties of the encoded proteins

はしがき

ポリアミン（プロレシン，スペルミジン，スペルミン）は，細胞増殖因子として作用する．しかし，試験管内において高分子との反応が数多く報告されているにも関わらず，細胞内におけるポリアミンの作用機構の詳細は不明な点が多い．一方，ポリアミンの生合成阻害剤，代謝拮抗剤が，増殖抑制試薬として機能することが明らかになっており，ポリアミンの構造類似体は抗がん剤として大きな可能性を持っている．ポリアミンの動態は，常に遺伝子の発現過程と密接に関わっており，その細胞内における特異的作用点の特定は細胞機能の分子的理解に重要な情報を提供する可能性が高い．

これまでに，申請者は，ポリアミン生理機能の探索を目的として，新たに開発したスペルミジンおよびスペルミン合成の阻害剤あるいは系統的に合成したスペルミジンの構造類似体を用いてポリアミンの増殖への影響を検討し，スペルミジン構造に特異的で増殖に必須な作用部位の存在を明らかにした．そして，スペルミジンの特異的作用部位として eIF-5A 前駆体蛋白のハイプシン化を想定し，培養細胞におけるハイプシン含量の追跡を可能にする蛋白結合性ハイプシンの微量定量法を開発した．また，ポリアミンそのものが細胞内に過剰に蓄積するとミトコンドリアの障害を伴う増殖阻害がおこること，系統的に合成したポリアミン構造類似体のうちビスエチルペンタアミン誘導体が細胞内に蓄積して強い抗がん活性を示すことを報告している．

本研究は，ポリアミンの作用点となる高分子を種々の新規な方法論を用いて検索することで，ポリアミンの枯渇および過剰蓄積による増殖阻害のメカニズムを明らかにすることを目指している．本研究計画ではポリアミンに由来する eIF-5A の成分であるハイプシン量の低下と，ポリアミンの枯渇による増殖停止との関連も課題に取り上げる予定であったが，十分な成果が得られなかったため本報告書では，研究成果を以下の3点に整理して報告する。

1) 機能性ポリアミンアナログの合成と応用および細胞内ポリアミン作用蛋白質の検出

- ビオチン標識ポリアミンの合成とポリアミン作用蛋白質の検出
- モルモット組織トランスグルタミナーゼに対するビオチン標識ポリアミンの基質性
- Preparation and Usefulness of Some Fluorogenic Substrate for Assay of Arginyl-tRNA-Protein Transferase by HPLC

ビオチン標識ポリアミンの合成と
ポリアミン作用蛋白質の検出

はじめに

スペルミジン、スペルミンに代表されるポリアミンは、ウイルスおよびバクテリアから人に至るほとんどの生物種に存在する直鎖脂肪族アミンである。ポリアミンの細胞内濃度は、生合成・代謝経路及び細胞内外への取り込み-排出系によって厳密に調節されており、増殖や分化過程における必須因子として機能することが、ポリアミン生合成に特異的な阻害剤を用いた様々な研究によって明らかになっている^{1,2)}。ポリアミンの主作用は核酸に対するものであると考えられてきたが、ポリアミンがトランスグルタミナーゼなどによって酵素的にタンパクを架橋したり³⁾、他のタンパク成分との解離平衡反応に基づいてタンパクの構造変化をもたらすことなどの作用に関与する可能性も指摘されている⁴⁾。しかし、これらポリアミンが細胞のどの部分のどこに作用することが細胞機能にとって重要であるのかは、未だ明確でない。

本研究では、細胞内外におけるポリアミンの親和性部位や作用部位を明らかにすることを目的として、細胞内の酵素によってポリアミンと共有結合しうるタンパクや、ポリアミンに親和性を持つタンパクを容易に検出できるような標識ポリアミンアナログを設計・合成した(第1章)。次に、合成した標識ポリアミンアナログを用いて、培養細胞におけるポリアミン作用タンパクの検出が可能かどうかの検討を行った(第2章)。

のタンパクを転写する。次に、人工膜上のビオチン標識タンパクに酵素標識したアビジンを作用させ、ビオチンとアビジンの複合体を形成させれば、標識酵素の活性を色素法や化学発光法によって検出することにより、間接的にビオチン標識ポリアミンの存在の確認が可能となると考えた。特に、化学発光法で検出すれば、放射性同位体と同程度の感度で検出でき、ビオチン結合タンパクの検出限界は 10^{-15} g であるとされている⁷⁾。

また、ビオチン分子を分離に利用する場合、アビジンをアフィニティー担体と結合させたカラムを用いてタンパクを精製することが可能である。従来、この方法では、アビジンとの結合が強すぎてカラムに吸着したタンパクの溶出が困難であるとされていたが、最近、4量体アビジンに代えて、結合能の低い1量体をアフィニティー担体に結合することで、簡便な溶出条件で回収率よくビオチン標識成分の回収が可能になっている。

以上のメリットを考慮して、ビオチンを最適な標識分子の一つであると考えた。

一方、ポリアミンの作用タンパクを明らかにするための標識ポリアミンは、タンパクと共有結合する部分をもつ必要がある。本研究では、作用タンパクとして、トランスグルタミナーゼ (TGase) などの酵素によりポリアミンが架橋を形成するものと、ポリアミンが比較的強い親和性で結合するタンパクを想定した。そこで、作用タンパクと酵素的に結合する可能性のある末端の1級アミノ基をもつポリアミンアナログ、および、光標識 (フォトアフィニティラベル) により共有結合を生成しうるアジドベンゾイル基を導入したポリアミンアナログ、の2種のポリアミンアナログの合成を計画した。

第1章

ビオチン標識ポリアミンの合成

1-1 標識化合物の設計

フォトアフィニティーラベル化試薬などの標識化合物は、高感度検出を目的として放射性同位体を用いるのが一般的である⁵⁾。しかし、放射性同位体で検出されたタンパクを分離・精製する場合、タンパクが極微量しか存在しないため多くの困難が予想される。したがって、極めて微量の存在が予想されている未知のポリアミン作用タンパクやポリアミン輸送タンパクなどを検出・精製するには、分離手段にも利用可能な標識体を選択する必要があると思われた。そこで、本研究では、バクテリアが産生するビタミンであるビオチンを標識物質として選択した。

ビオチンは、卵白に存在するアビジン、あるいは *Streptomyces avidinii* に含まれるストレプトアビジンと極めて強い親和性 ($K_a=10^{15}M^{-1}$) で特異的に結合することが知られている⁶⁾。アビジンおよびストレプトアビジンは、4つのサブユニットから構成されており、一つのサブユニットにビオチン1分子が結合することも明らかになっている。特異的な強い親和性で作用するアビジンとビオチンの反応は、多くの検出・精製系で利用可能であり、そのための市販キットも入手可能である。

ビオチンをポリアミンの標識分子として選択した際に考慮した利用法を Fig.1 に示した。すなわち、ビオチン分子を標識タンパクの検出に応用する場合、ビオチン標識ポリアミンをタンパクに結合させ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で標識したタンパクを分離し、人工膜にそ

1-2 モノアシルポリアミンを合成するための基礎検討

設計したポリアミンアナログの合成には、ポリアミンの末端にある一級アミノ基の一方にビオチニル基 (**B**) あるいはアジドベンゾイル基 (**AB**) を選択的に導入する必要がある (**Fig.2**)。当研究室では、ベンジル基で保護した二級アミノ基にプロモアルキルフルイミドを反応させ、フルイミド基で保護されたアミノアルキル基を導入して鎖を延長する長鎖ポリアミンの合成法をすでに確立している^{8) 9)}。したがって、フルイミド基とは性質を異にする保護基をもつアミノアルキル基が導入できれば、保護の選択的な除去が可能になり、モノアシルポリアミンアナログの合成がより容易になるのではないかと考えた。

そこで、フルイミド基による保護とは異なり、酸で容易に分解を受ける *tert*-ブトキシカルボニル (**Boc**) 基でアミノ基が保護されたプロモアルキルアミンを、アルキル鎖延長のための候補化合物として検討することから実験を開始した。

この目的に利用可能な **Boc** 基で保護されたプロモアルキルアミンの合成法は、すでに報告されているが、合成原料が入手困難である場合が多く、種々のアルキル鎖をもつポリアミン標識体の合成に利用するには問題があると思われた。そこで、入手が容易なジプロモアルカンを用いて合成原料として使うことができる、**Bis-boc** 基で保護されたプロモアルキルアミンの合成法 (**Fig.3**) をまず検討した。その結果、化合物 **1** を **NaH** を用いてナトリウム塩としたものにジプロモアルカンを反応させ、その生成物をシリカゲルカラムで分離精製することにより、化合物 **2a** および、化合物 **2b** を収率よく得ることができた。

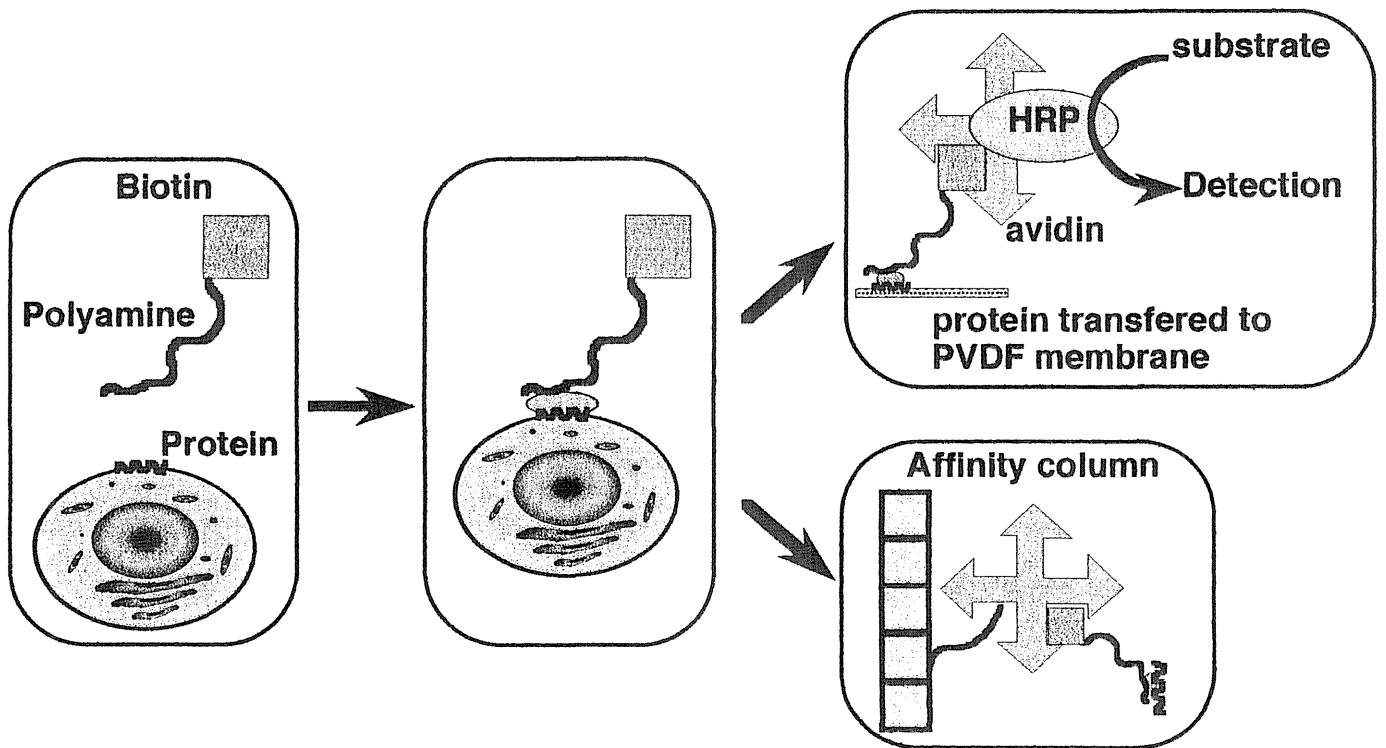
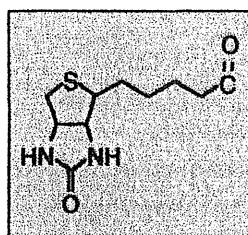
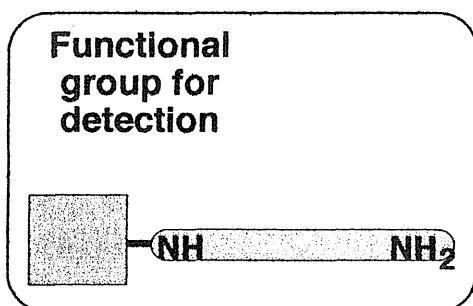
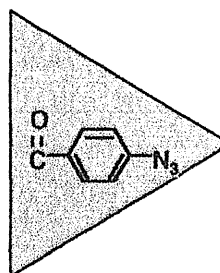
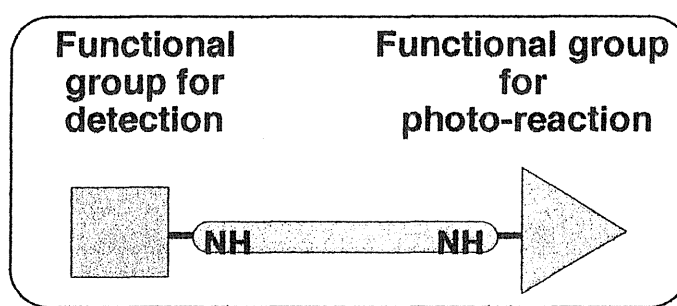


Fig.1 Detection and separation of biotin-labeled protein

この化合物を用いるモノアシルポリアミンの合成が可能かどうかを調べるために、まず、**Fig.4** に示すように **N¹-アセチルテルモスペルミン (9)** の合成に利用することを検討した。すなわち、化合物 **3** の 二塩酸塩を出発原料として、一方のアミノ基に **3-フタルイミドプロピル基**を導入後、化合物 **2b** を反応させ、生成した化合物 **5** にヒドラジンを作用させた後、アセチル化を行い、化合物 **7** を得た。**TFA** によって化合物 **7** の **Bis-boc** 基を脱離させ、化合物 **8** とした後、氷酢酸中の接触還元によりベンジル基を脱離し、計算量の塩酸飽和エーテルを加え、結晶化した。その結果、目的物 **N¹-アセチルテルモスペルミン (9)** の 三塩酸塩 を収率よく得ることができ、当研究室で行っているポリアミン合成法に化合物 **2b** を用いることでモノアシルポリアミンの合成が簡便に行えることがわかった。



Biotinyl group (B)



Azidobenzoyl group (AB)

Fig.2 Schematic structures of biotinyl polyamines

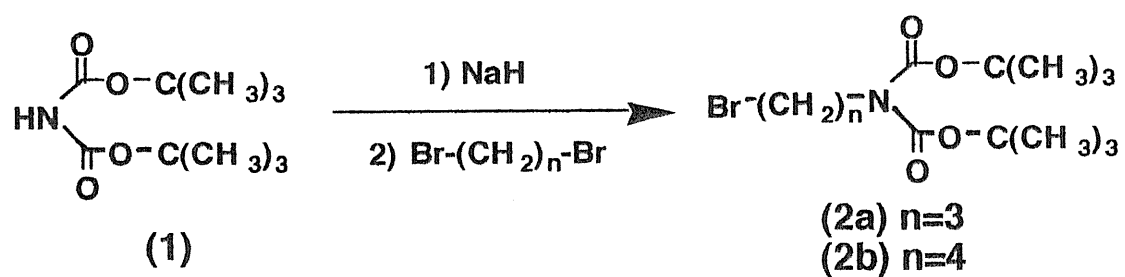


Fig.3 Synthesis of Bis(t-butyl) N-bromoalkylimino-dicarboxylate

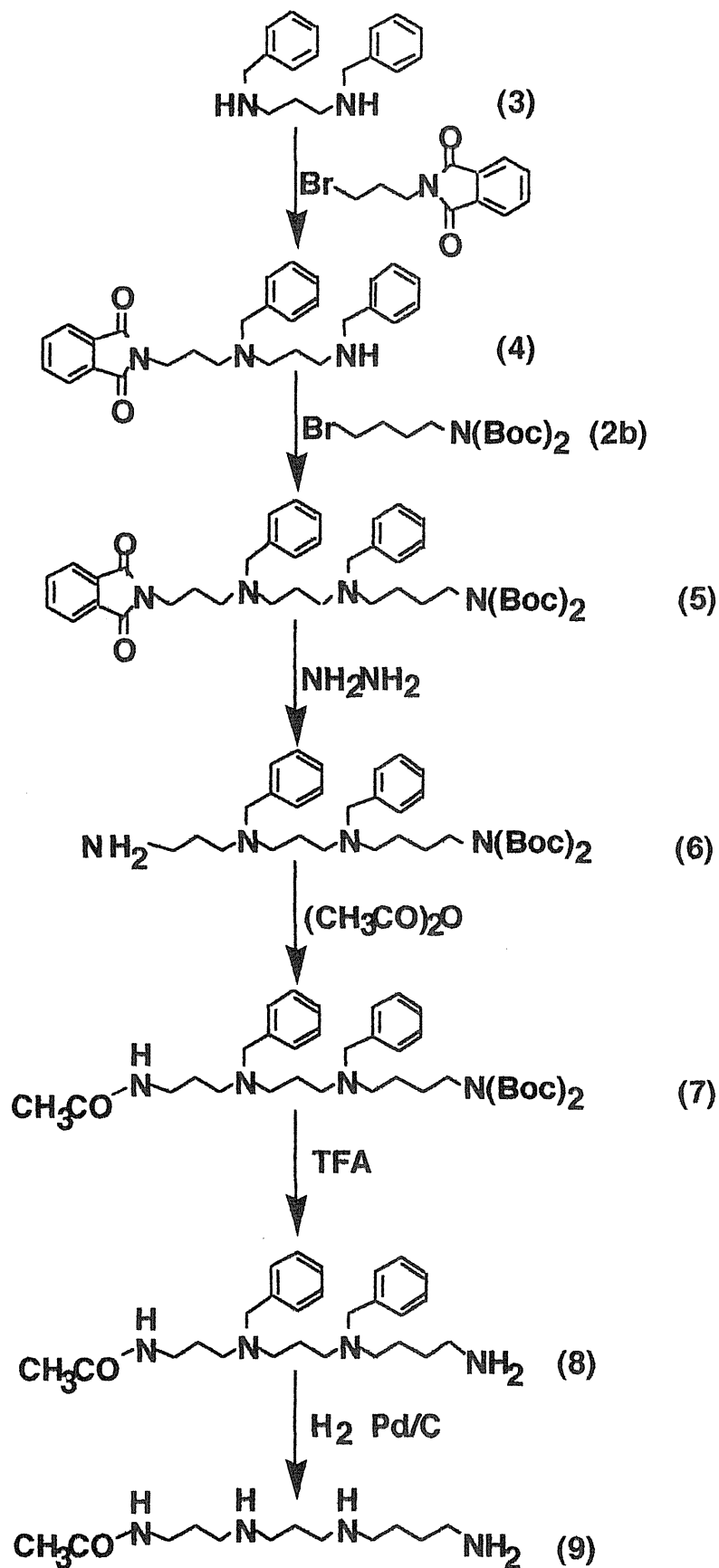


Fig.4 Synthesis of N¹-acetylthermospermine

1-3 ビオチニルポリアミンの合成法の検討

1-2 で **Bis-boc** 保護がモノアシルポリアミンの簡便な合成に有用であることが分かったので、化合物 **1** を用いてビオチニルカダベリン (**B-5**) の合成を **Fig.5** に示す経路で試みた。すなわち化合物 **1** を **NaH** によりナトリウム塩とした後、化合物 **11** と反応させ、生成した化合物 **12** をヒドラジン分解した。これにより生成した一級アミノ基をもつ化合物 **13** に、ビオチンの活性化エステル (**10**) を反応させ、得られた化合物 **14** に、計算量の塩酸飽和エーテルを加え、**Bis-boc** 基を脱離させた。その結果、化合物 **11** から収率約 10%で **B-5** (**15**) の塩酸塩を得ることができた。

つぎに、**Fig.4** で行った合成法に応用して、**Fig.6** に示すように長鎖のビオチニルポリアミン、**B-3333** の合成を試みた。すなわち、トリアミンのトリベンジル体である化合物 **16** に **N-(3-プロモプロピル) フタルイミド** および化合物 **2a** を順次反応させた後、ヒドラジン分解して化合物 **19** とした。これにビオチンの活性化エステルを反応させて生成する化合物 **20** の **Bis-boc** 基をトリフルオロ酢酸で脱離した。その結果、収率よく化合物 **21** を得ることができた。しかし、ベンジル基の脱離のために化合物 **21** の接触還元を行ったところ、脱ベンジル化が非常に困難であり、目的物である **B-3333** を得ることはできなかった。種々還元条件を変えても反応が進行しなかったため、対象化合物を変えてモノアシルジベンジルトラミンの脱ベンジル化について検討した。その結果、アシル基がアセチル基のときは接触還元が進行するのに対して、ナフトアセチル基やダンシ

能基の大きさや疎水性などが還元反応の阻害に関与していることが考えられた。そこで、ベンジル保護を用いるビオチニルポリアミンの合成をここで断念した。

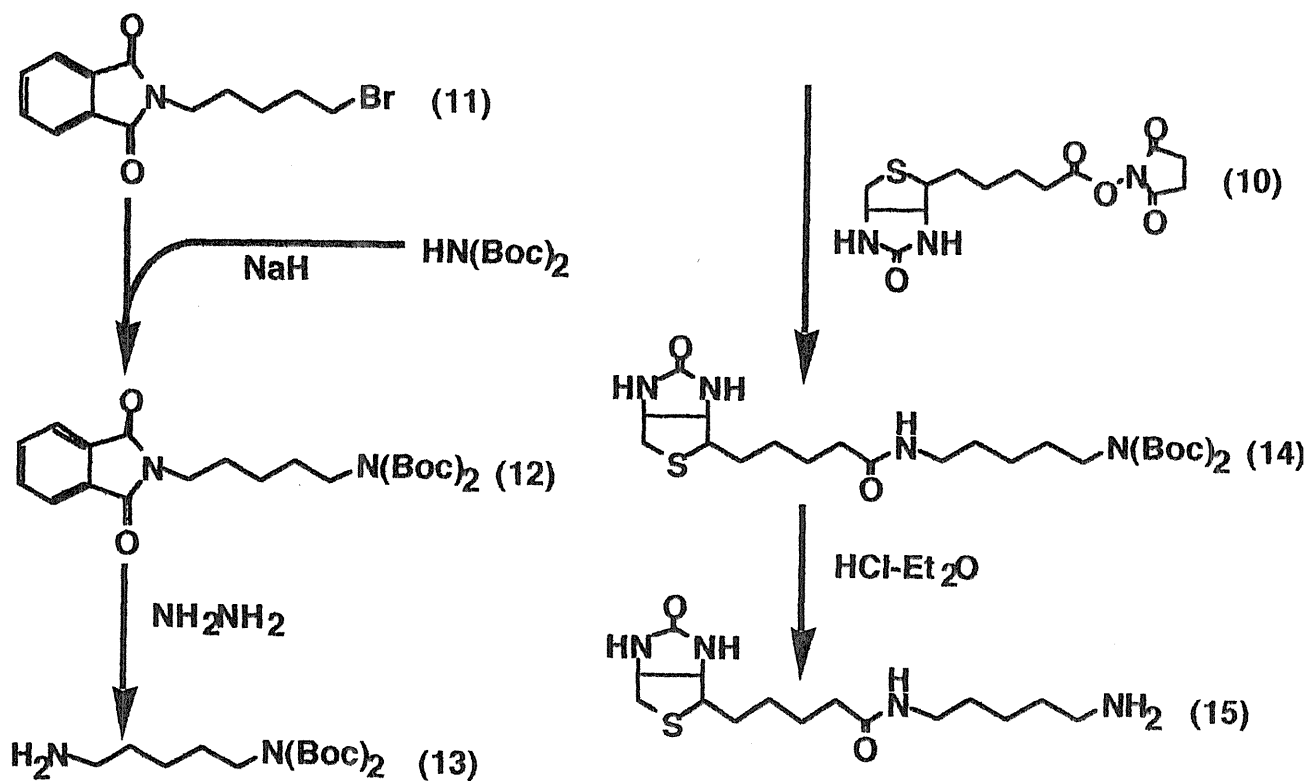


Fig.5 Synthesis of N-biotinyl cadaverine (B-5)

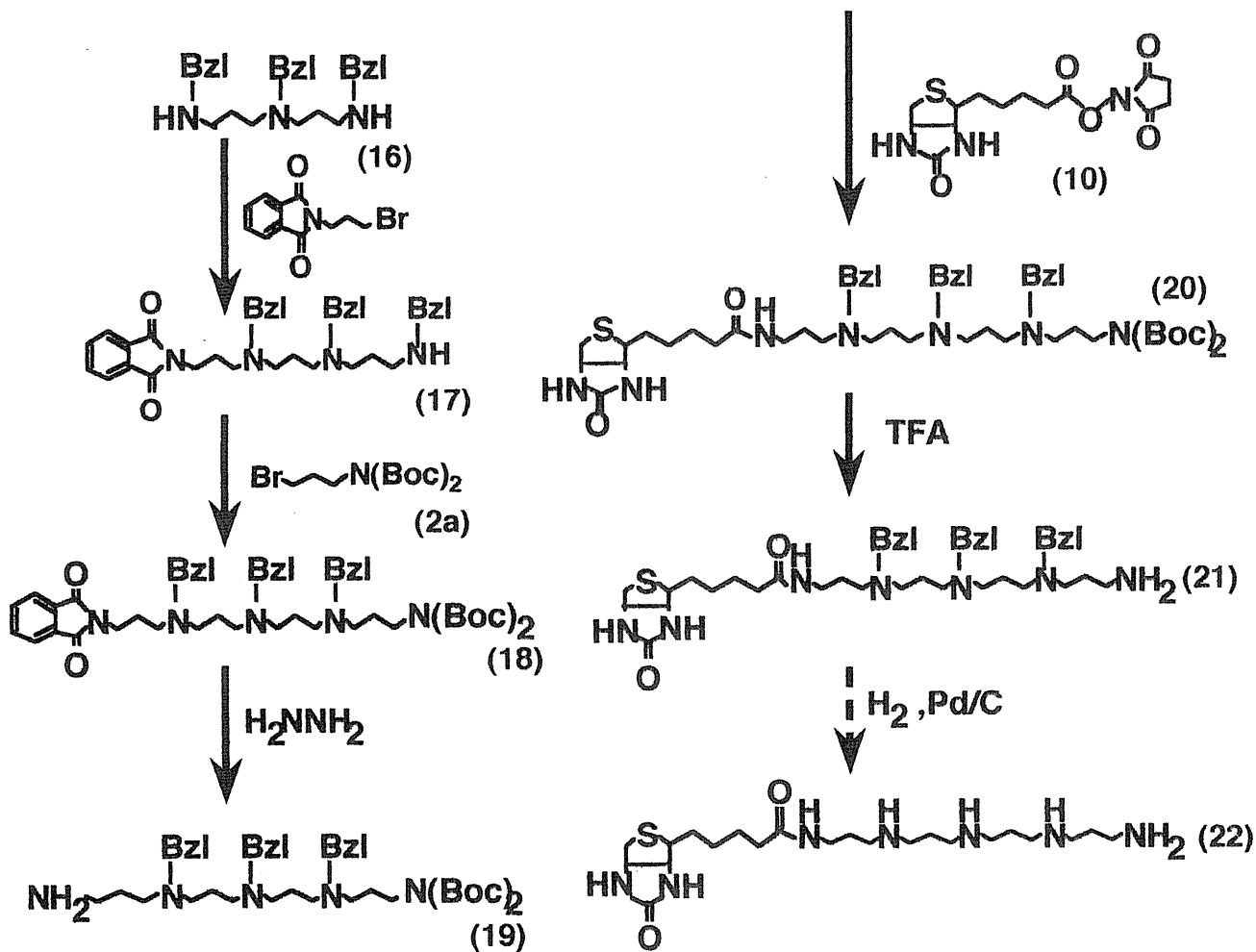


Fig.6 Synthetic route from tribenzyl norspermidine to N^1 -biotinyl-1,15-diamino-4,8,12-triazapentadecane (B-3333)

1-4 活性化エステルによるポリアミンのビオチニル化 と HPLC による精製

これまでに検討した合成経路がビオチン標識長鎖ポリアミン合成には不適であると思われたので、過剰のポリアミンに、活性化エステルとしたビオチンあるいはアジド安息香酸を反応させ、生成した反応混合物を逆相カラムに注入し、HPLCで目的物を精製する方法を試みた。その際、通常の分析用カラムを用いたHPLCによる分離では、5 mg程度の生成物の分取が限界であるので、分取用カラムを用いることを検討した。Fig.7には、B-3333 (22)の合成法を示した。すなわち、ビオチン活性化エステル(10)と化合物23の塩酸塩を、トリエチルアミン存在下反応させ、反応生成物について、HPLCで分取し、精製を行い、化合物22のトリフルオロ酢酸塩を得た。その際の反応液のHPLCのクロマトグラムをFig.8に示した。この方法を応用し、N¹-biotinyl-1,12-diamino-4,9-diazadodecane (B-343)、及びN¹-biotinyl-1,13-diamino-5,9-diazatridecane (B-434)についても同様に合成・精製した。

AB-B-3333の合成法をFig.9に示した。すなわち、4-アジド安息香酸の活性化エステル(25)と化合物23をトリエチルアミン存在下反応させ、反応生成物を一度HPLCで分取した。溶離液を留去後、生成物とビオチンの活性化エステルを反応させ、反応生成物について、再びHPLCで分取し、精製を行い、化合物28のトリフルオロ酢酸塩を得た。

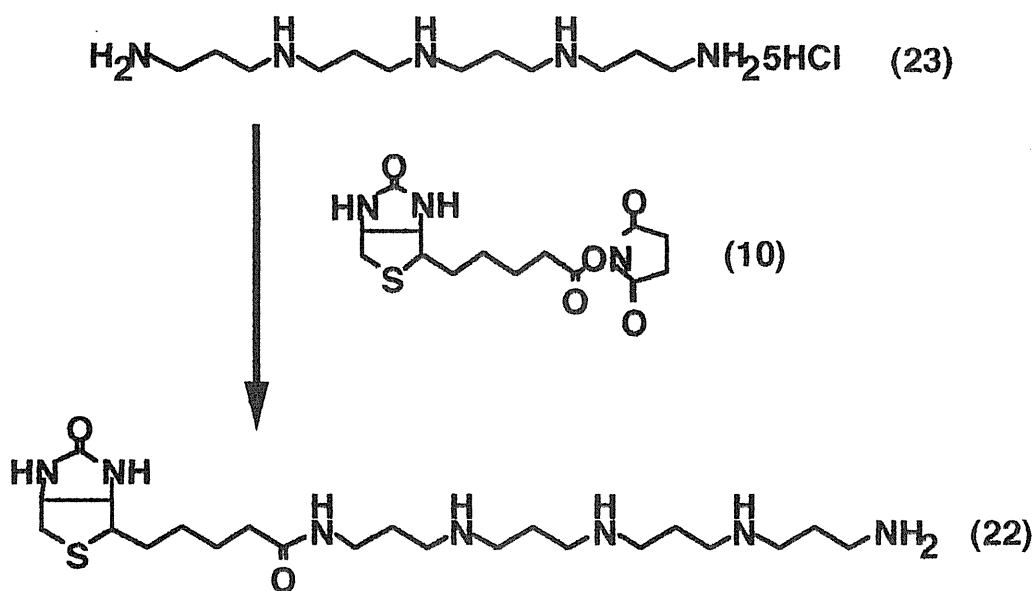


Fig.7 Synthesis of B-3333

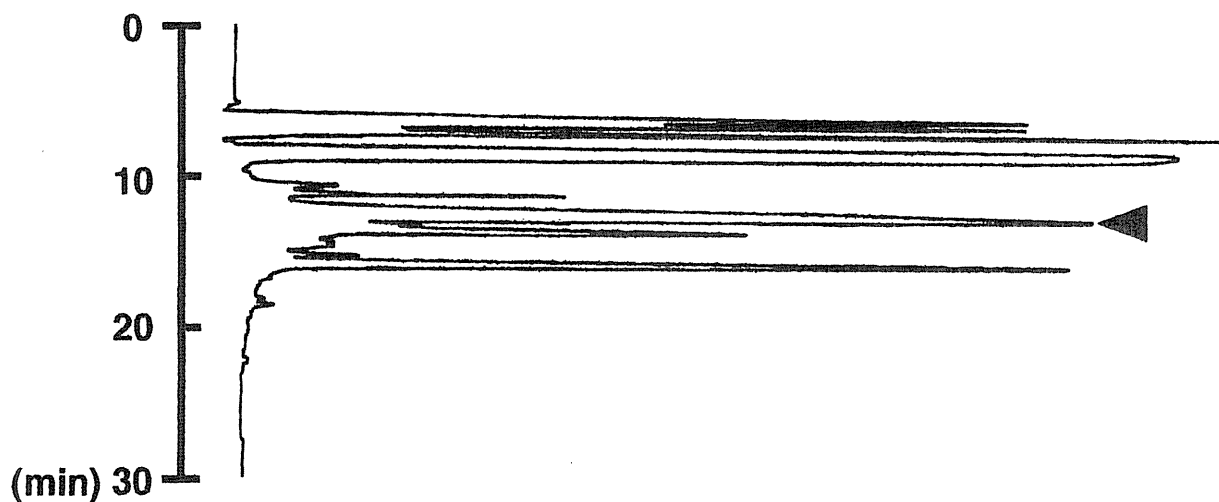


Fig.8 Chromatogram of reaction products of 3333 with succinimido ester of biotin

Peak marked with an arrow () was collected

1-5 まとめと考察

当研究室で行っているプロモアルキルフタルイミドを用いるポリアミン合成法にビス-*t*-ブトキシカルボニル (**Bis-boc**) 保護のプロモアルキルアミンを適宜用いることで、ポリアミン鎖の延長と選択的な保護基の脱離が可能になり、モノアセチルポリアミンが簡便に合成できた。

しかし、ビオチニル基、ダンシル基やナフトアセチル基のような、かさ高く、疎水性の高いものを官能基として導入した場合、ポリアミン鎖の二級アミノ基の保護基として用いているベンジル基の脱離が困難であることがわかった。原因は不明であるが、ベンジル基及びアシル基の疎水性が大きくなったために、反応条件下化合物がミセル状となり触媒との接触が阻害されるためではないかと考えている。

また、別法として、ベンジル基による保護を用いない合成経路も検討したが、保護基が隣接するためか保護基の導入が困難となり、現在導入可能な保護基及び保護条件を検討中である。

本研究で、保護基を利用した合成が困難であったことから、大きくその発想を転換し、合成したいポリアミンアナログの骨格をもつ塩酸塩に対し、直接導入したい官能基の活性エステルを反応させ、**HPLC**で分離精製を行うという方法を試みた。この方法により、6段階を経て合成を試みた **B-3333** について、1段階で目的物を得ることができた。また、巨大な分取用カラムを用いることにより、多量の目的物を得るのに短時間で分離精製できることがわかった。この方法を応用すれば、ポリアミンの作用解明のために用いられる様々なバリエーションのポリアミンアナログ体を、短時間で合成、精製することができ、これからのポリアミン研究に、

多いに役立つものと思われる。

実験の部

〈試薬〉

(+)-Biotin99%、**di-tert-butyl iminodicarboxylate** は Aldrich 社から購入した。**N-hydroxysuccinimide**、**N,N' - dicyclohexylcarbodiimide(DCC)**、**1,3-dibromopropane**、**1,4-dibromobutane**、**triethylamine** は東京化成工業(株)から購入したものをを用いた。**sodium hydride (in oil)**、**ninhydrin**、また、すべての反応に用いた溶媒、**HPLC**に用いた溶媒は和光純薬工業(株)から購入した。**10%palladium carbon** は小島化学薬品(株)から、酸化白金触媒はファインケミカル社から購入したものをを用いた。

〈合成した化合物〉

本研究に用いた化合物は以下のように合成した。

Di-tert-butyl N- (4-bromopropyl) iminodicarboxylate (2a)

DMF 50.00ml に **di-tert-butyl iminodicarboxylate (1)** を **10.86g (50mmol)** 溶かした溶液に、**NaH 2.60g** を加え、**30分間** 攪拌した。この反応溶液に **1,3-dibromopropane 20ml (200mmol)** を加え、**15時間** 反応させたのち、**NaBr** をガラスフィルターでろ去し、**DMF** を減圧留去した。この残渣をシクロヘキサンに溶解し、生成物をシリカゲ

ルカラム (150g) で分離・精製し (酢酸エチル : シクロヘキサン = 20 : 1 で溶出)、**di-tert-butyl N- (4-bromopropyl) iminodicarboxylate (2a)** を 11.98g (35.45mmol) 得た (収率 ; 70.9%、Fab-MS、m/z=337.90)。

Di-tert-butyl N- (4-bromobutyl) iminodicarboxylate (2b)

DMF 36.00ml に **di-tert-butyl iminodicarboxylate (1)** を 5.98g (36mmol) を溶かした溶液に、**NaH 2.00g** を加え、30 分間攪拌した。この反応溶液に、**1,4-dibromobutane** を 22.6ml (188mmol) 加え、15 時間反応させたのち、**NaBr** をガラスフィルターでろ去し、**DMF** を留去した。残渣をシクロヘキサンに溶解し、生成物をシリカゲルカラム (100g) で分離・精製し、**di-tert-butyl N- (4-bromobutyl) iminodicarboxylate (2b)** を 1.02g (2.74mmol) 得た (収率 ; 7.6%、Fab-MS、m/z=351.9)。

N¹-Acetylthermospermine (9)

N,N'-dibenzyl-1,3-diaminopropane⁹⁾ (3) の二塩酸塩を 3.75g (11.5 mmol)、**4N-NH₄OH : CHCl₃ = 1 : 1** で 3 回抽出し、**CHCl₃** 層を集め、減圧留去して油状の化合物 **3** を 2.74g (10.77mmol) 得た。この化合物 **3** と、**N- (3-bromopropyl) phthalimide** を 2.89g (10.78mmol)、及び **KF-Celite** を 10g、アセトニトリル 100ml 中、12 時間加熱還流し反応させた。反応溶液中の **KF-Celite** をガラスフィルターでろ去した後、溶媒を減圧留去した。この油状の反応混合物について、シリカゲルカラムを使って分離精製し、**N- (3-phthalimidopropyl) -N,N'-dibenzyl-1,3-**

diaminopropane (4) を **1.49g (3.37mmol)** 得た (収率; **31.3%**)。化合物 **4** を **1.49g (3.38mmol)** と、化合物 **2a** を **1.19g (3.38mmol)**、及び **KF-Celite 3.38g** を、アセトニトリル **34ml** 中で、**12** 時間加熱還流し反応させた。反応溶液中の **KF-Celite** をガラスフィルターでろ去した後、溶媒を減圧留去した。この油状の反応混合物について、シリカゲルカラムを使って分離・精製し、**N-(3-phthalimidopropyl)-N'-[4-bis(t-butoxycarbonyl) imido]butyl-N,N'-dibenzyl-1,3-diaminopropane (5)** を **1.51g (2.22mmol)** 得た (収率; **65.7%**)。化合物 **5** を **1.51g (2.22mmol)**、メタノール **22.15ml** 中に溶解し、ヒドラジーン水和物 **0.92ml** を添加して、**3** 時間加熱還流して反応させた。反応溶液は減圧濃縮した後、**4N-NH₄OH : CHCl₃=1 : 1** で抽出し、油状の **N-(3-acetamidopropyl)-N'-4-[bis(t-butoxycarbonyl) imido]butyl-N,N'-dibenzyl-1,3-diaminopropane (6)** を **1.06g (1.98mmol)** 得た (収率; **89.2%**)。ピリジン **10ml** に化合物 **6** を **1.06g (1.98mmol)** 溶解し、無水酢酸 **0.5ml** を添加して、**12** 時間加熱還流し反応させた。反応液に水 **1** 滴を加えて反応を止めた後、溶媒を減圧留去した。残渣について **4N-NH₄OH : CHCl₃=1 : 1** で抽出し **N-(3-acetamidopropyl)-N'-4-[bis(t-butoxycarbonyl) imido]butyl-N,N'-dibenzyl-1,3-diaminopropane (7)** を **0.98g (1.83mmol)** 得た (収率; **92.4%**)。化合物 **7** を **0.49g (0.91mmol)**、水 **2ml** に溶解し、**TFA** を **1ml** 加えて氷中で **30** 分攪拌した。この反応溶液の溶媒を減圧留去し、残渣について **4N-NH₄OH : CHCl₃=1 : 1** で抽出し **N-(3-acetamidopropyl)-N'-(4-aminobutyl)-N,N'-dibenzyl-1,3-diaminopropane (8)** を **0.26g (0.65 mmol)** 得た (収率; **71.4%**)。化合物 **8** を **0.26g (0.65mmol)**、氷酢酸 **5ml** に溶

解し、触媒としてパラジウム炭素を **50mg** 添加した。この混合液の入ったナス型フラスコ内を水素で置換し、オイルバスで **60℃** に加熱して接触還元を行った。**50** 分後水素消費量が低下したのを確認して反応を止め、触媒をフィルターろ去し、溶媒を減圧留去した。この残渣に、計算量の塩酸飽和エーテル (**2.91ml**) を加え、粗結晶を得た。この後さらに再結晶を行い、**N¹-acetylthermospermine (9)** の三塩酸塩 **0.06g (0.17mmol)** を得た (収率; **26.1%**)。

Biotinylcadaverine (15)

DMF に **di-tert-butyl iminodicarboxylate (1)** を **1.6g (7.34 mmol)** 溶解し、**NaH** を少しずつ加えて **4** 時間攪拌したまま放置し、この溶液に **5-bromopentylphthalimide (11)** を **2.6g (8.8mmol)** 加え、**18** 時間反応させた。**NaBr** をガラスフィルターでろ去後、**DMF** を留去し、この残渣をベンゼンに溶解してシリカゲルカラムで分離・精製し、減圧・濃縮して **N,N-bis (t-butoxycarbonyl) -N'-phthaloylcadaverine (12)** を **3.23g (7.48mmol)** 得た (収率; **100%**)。メタノール **150ml** に化合物 **12** を **3.17g (7.34mmol)** 溶解し、ヒドラジーン水和物 **1.9ml(7.5mmol)** を加えて、**3** 時間加熱還流して反応させた。メタノールを留去後、この残渣について **4N-NH₃/CHCl₃** で抽出し、**N,N-bis (t-butoxycarbonyl) cadaverine (13)** を得た (収率; **100%**、**IS-MS**、**m/z=303**)。

DMF 1ml に化合物 **13** を **266mg (0.88mmol)** 溶解し、ビオチン活性エステル¹⁰⁾ (**10**) **300mg (0.88mmol)** を加えて攪拌、**15** 時間加熱還流して反応させた。**DMF** を留去後、この残渣についてシリカゲルカラムで分離・精製を行い (クロロホルムで溶出)、**N,N-bis (t-butoxy-**

carbonyl) **N¹-biotinylcadaverine (14)** を得た (収率 ; 6.5%) 。

化合物 **14** に、計算量の塩酸飽和エーテルを加え、室温で攪拌放置し、**N¹-biotinylcadaverine (15)** の塩酸塩の粗結晶を得た (収率 30.0%、Fab-MS、 $m+H/z=328$) 。

N¹-Biotinyl-N⁷- (3-bromopropyl) -N¹,N⁴,N⁷-tribenzylnorspermidine
(22)

N¹,N⁴,N⁷-tribenzylnorspermidine⁹⁾ (16) の塩酸塩結晶 **5.2g (10mmol)** を **4N-NH₃/CHCl₃** で抽出して得た、遊離型化合物 (16) を **163.58g (9mmol)**、**N-(3-bromopropyl) phthalimide** を **2.43g (9mmol)**、及び **KF-Celite 9.9g** を、アセトニトリル **90ml** に溶解し、加熱還流しながら **18** 時間反応させた。**KF-Celite** をガラスフィルターでろ去した反応液の溶媒を留去した後、この残渣についてシリカゲルカラムで分離・精製し、**N¹- (3-phthalimidopropyl) -N⁷-[4-bis- (t-butoxycarbonyl) imido] propyl-N¹,N⁴,N⁷-tribenzylnorspermidine (17)** を得た (収率 ; 29.8%、Fab-MS、 $m+H/z=538$)。化合物 **17** を **3.0g (5.05mmol)**、化合物 **2a** を **2.68g (7.92mmol)**、及び **KF-Celite 6.6g** を、アセトニトリル **66ml** に溶解し、加熱還流しながら **18** 時間反応させた。**KF-Celite** をガラスフィルターでろ去した反応液について溶媒を留去し、この残渣についてシリカゲルカラムで分離・精製し **N¹- (3-phthalimidopropyl) -N⁷-[4- (t-butoxy-carbonyl) imido]propyl-N¹,N⁴,N⁷-tribenzylnorspermidine (18)** を得た (収率 ; 9.3%、Fab-MS、 $m+H/z=846$)。メタノール **100ml** に化合物 **18** を **4.3g (5.00mmol)** 溶解し、ヒドラジーン一水和物 **1.3ml**

(7.5mmol、 $d=1.029$) を添加して、加熱還流しながら 4 時間反応させた。反応液の溶媒を留去後、この残渣について $4N-NH_3/CHCl_3$ で抽出し、 N^1 - (3-aminopropyl) - N^7 -[4- (t-butoxycarbonyl) imido]propyl- N^1,N^4,N^7 -tribenzylnorspermidine (19) を得た (収率; 84.4%、Fab-MS、 $m+H/z=646$)。化合物 19 を 209mg (0.325mmol)、及びビオチンの活性エステル (10) 110mg (0.325mmol) を、DMF 0.5ml に溶解して攪拌しながら室温で 8 時間反応させた。DMF を留去後、この残渣についてシリカゲルカラムで分離・精製を行い、 N^1 -Biotinyl- N^7 -[4- (t-butoxycarbonyl) imido]propyl- N^1,N^4,N^7 -tribenzylnorspermidine (20) を得た (収率; 30.0%、Fab-MS、 $m+H/z=941$)。TFA (トリフルオロ酢酸) 0.2ml に、化合物 20 を 100mg (0.106mmol) 溶解し、氷中で 1.5 時間、室温で 1 時間反応させた。TFA を留去後、 $4N-NH_3/CHCl_3$ で抽出し、 N^1 -Biotinyl- N^7 - (3-aminopropyl) - N^1,N^4,N^7 -tribenzylnorspermidine (21) を得た (収率; 69.0%、Fab-MS、 $m+H/z=741$)。

N^1 -Biotinyl-1,12-diamino-4,9 -diazadodecane (B-343)

ビオチン活性化エステル (10) を 94mg (0.3mmol) 溶解したジオキサン 1ml と、50% ジオキサン水溶液 2.0ml に溶解した 1,12-diamino-4,9-diazadodecane の塩酸塩 209mg (0.6mmol) を混合したのち、ジオキサン 1.0ml 及びトリエチルアミン 0.84ml (6mmol) を加え、攪拌したまま室温で一晩反応させた。翌日、反応液中に生成した結晶をろ去した後、ろ液を留去し、白色の結晶を得た。この反応生成物について、HPLC 溶離液に溶解後、HPLC で分取し、精製を行った。分取した画分を

減圧濃縮し、**B-343** の TFA 塩を得た（収率 65.2 %、Fab-MS、 $m+H/z=471$ ）。

N'-Biotinyl-1,13-diamino-5,9 -triazatridecane (B-434)

ビオチン活性化エステル (10) 94mg (0.3mmol) を溶解したジオキサン 1ml と、50%ジオキサン水溶液 2.0ml に溶解した **1,13-diamino-5,9-diazatridecane** の塩酸塩 217mg (0.6mmol) を混合した後、ジオキサン 1.0ml 及びトリエチルアミン 0.84ml (6mmol) を加え、攪拌したまま室温で一晩反応させた。翌日、反応液中に生成した結晶をろ去した後、ろ液を減圧濃縮し、白色の結晶を得た。この反応生成物について、HPLC 溶離液に溶解後、HPLC で分取し、精製を行った。分取した画分を減圧濃縮し、**B-434** の TFA 塩を得た（収率 69.1 %、Fab-MS、 $m+H/z=471$ ）。

N¹-Azidobenzoyl-N¹⁵-biotinyl-1,15-diamino-4,8,12-triazapentadecane (28)

アジド安息香酸の活性化エステル (25) 65mg (0.25mmol) を溶解したジオキサン 1ml と、50%ジオキサン水溶液 2.0ml に溶解した化合物 23 の塩酸塩 214mg (0.5mmol) を混合した後、ジオキサン 1.0ml 及びトリエチルアミン 0.84ml (6mmol) を加え、攪拌したまま室温で一晩反応させた。翌日、反応液中に生成した結晶をろ去し、さらに、ろ液を減圧濃縮し、黄白色の結晶を水で洗って得たろ液を留去後、化合物 26 の結

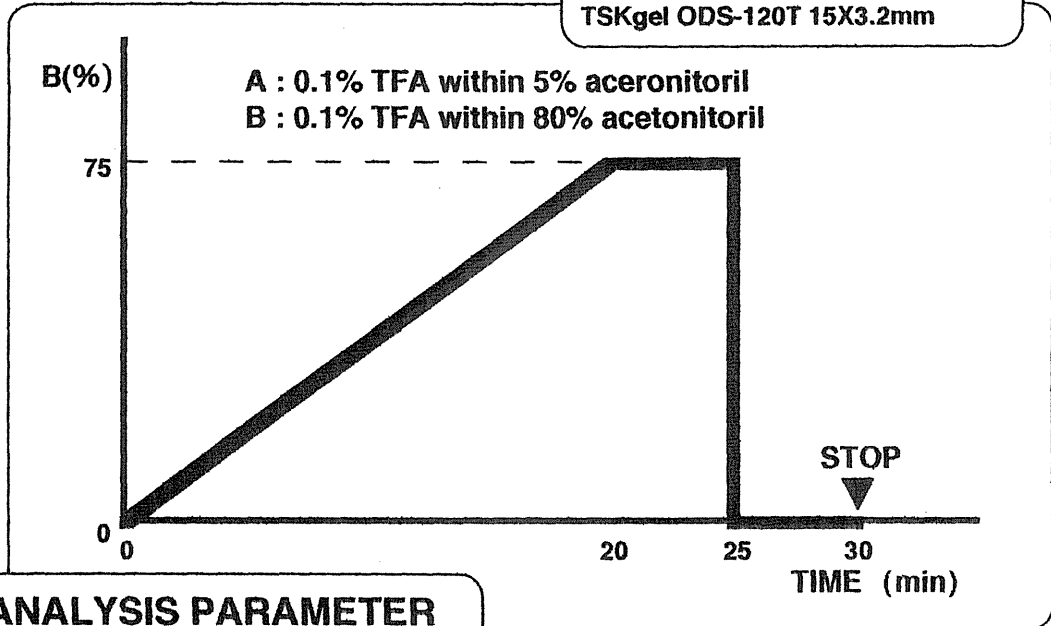
晶を得た。この反応生成物について、**HPLC** 溶離液に溶解した後、**HPLC** で分取し、精製を行った。さらに、ビオチン活性化エステル (**10**) **82mg** (**0.24mmol**) を溶解したジオキサン **0.25ml** と、化合物 **26** を **80mg** (**0.2mmol**) 溶解した **50%**ジオキサン水溶液 **2.0ml** を混合した後、トリエチルアミン **0.56ml** (**4mmol**) を加え、攪拌したまま室温で一晩反応させた。翌日、反応液中に生成した結晶をろ去した後、ろ液を減圧濃縮し、白色の結晶を得た。この反応生成物について、**HPLC** 溶離液に溶解し、**HPLC** で分取し、精製を行い、化合物 **28** の **TFA** 塩を得た (収率 **49.8%**、**Fab-MS**、 $m+H/z=616$)。

〈HPLC〉

HPLC の条件は、**Fig.10** に示した。すなわち、分析カラムに、**INERTSIL PREP-ODS 6.0 × 250mm**、分取カラムに、**INERTSIL PREP-ODS 20 × 250mm** を用い、ガードカラムは各々、**TSKgel ODS-120T 15 × 3.2mm**、**INERTSIL PREP-ODS 6.0 × 250mm** を用いた。移動相は、**0.1%TFA** を含む **5%**アセトニトリル溶液と、**0.1%TFA** を含む **80%**アセトニトリル溶液のリニアグラジェントを用いた。流速は分析時 **0.8ml/min**、分取時 **8.0ml/min** とし、検出波長は **B-3333**、**B-343**、**B-434** については **220nm**、**AB-B-3333** については **300nm** における吸光度測定により行った。

HPLC (Shimadzu)
SPD6A UV SPECTROPHOTOMETRIC DETECTOR
LC-6A LIQUID CHROMATOGRAPH

HPLC Packed Column
INERTSIL PREP-ODS 20.0X250mm
INERTSIL PREP-ODS 6.0X250mm
HPLC Guard column
INERTSIL PREP-ODS 20X50mm
TSKgel ODS-120T 15X3.2mm



ANALYSIS PARAMETER
WAVELENGTH : 220nm or 300nm
FLOW RATE : 0.8 or 8.0ml/min

Fig.10 Chromatographic conditions for separation of biotinylpolyamines

第2章

ビオチン標識ポリアミンによって標識される

細胞タンパク成分の検出

2-1 ビオチニルポリアミンを用いる標識とその標識タンパクの検出

ポリアミンは、トランスグルタミナーゼ (**TGase**)、すなわちタンパク-グルタミン:アミン- γ -グルタミルトランスフェラーゼの基質となることが知られている³⁾。**TGase**は、タンパク中のグルタミン残基と、リジン酸基あるいはポリアミンの末端一級アミノ基を交換し、新たなアミド結合を生成するカルシウム依存性の酵素である。この酵素は、細胞が分化したり、アポトーシスが生じる際、その活性が大きく変動し、タンパクの架橋がシグナルとなる細胞機能の調節に関与すると推察されている¹¹⁾。**TGase**の作用産物と考えられる **N¹, N⁸-bis (γ -glutamyl) spermidine** がアポトーシスを起こした細胞¹²⁾や組織¹³⁾の酵素消化物中に検出されることが報告されており、動物体内でもポリアミンが**TGase**の基質になることは明らかであるが、細胞内でポリアミンが結合し得るタンパクに関する情報はほとんどない。

そこで、細胞内でポリアミンが結合し得るタンパクを検索することをめざして、第1章で合成した標識ポリアミンアナログのうち、末端に一級アミノ基をもち、トランスグルタミナーゼの基質となるであろう3種のビオチニルポリアミン及びビオチニルカダベリン (**B-5**) を用いて検討を行った。

2-1-a トランスグルタミナーゼに対する基質性の検討

TGase の基質となる多くのタンパクの中で、**Casein** は、入手が容易なことから試験管内における **TGase** 反応の検出に用いられている。一方、**B-5** は化学的なビオチン標識試薬としてすでに市販されており、**TGase** によってカゼインに結合することも報告されている¹⁴⁾。その際のビオチニルカダベリン標識タンパクの検出には、先にも述べた **HRP** 標識アビジンとの複合体の形成が利用されている。そこで、第 1 章で合成した化合物が **TGase** の反応を調べるのに有用かどうかを知るために、まず、モルモット由来の酵素を用い、基質タンパク間の架橋を防ぐためにアミノ基をメチル化したジメチルカゼインを基質として、本研究で合成した **B-5** の反応性および標識タンパクの検出感度を市販品 (**Pierce** 社) と比較した。

その結果、反応生成物を電気泳動後、色素染色すると **Fig.11A** に示すように、合成品、市販品ともにカルシウム依存的に一部の分子量が増加し、酵素反応が進行していることが示唆された。同じ試料を電気泳動後、人工膜に転写して **HRP** 標識アビジンを用いてビオチンの存在を検出すると、**Fig.11B** に示すように、カルシウム依存的に強いバンドがジメチルカゼインと一致する移動位置に検出され、前章で合成した **B-5** が **TGase** 反応の検出に有用であることが確認された。

次に、前章で合成したビオチニルポリアミンである **B-343**、**B-434** および **B-3333** と **B-5** について、**TGase** によるジメチルカゼインへの結合反応を調べて、基質性の検討を行った。その結果、**Fig.12** に示すように、ビオチニルポリアミンは、**Ca²⁺**存在下 **B-5** と同様、**TGase** によりジ

メチルカゼインに対して十分な反応性を示した。プロッティングの様子から、**B-5**よりもビオチニルポリアミンのほうが検出されたバンドが濃く、反応性がよいように思われたので、**B-5** および **B-343** について反応の時間経過を調べた。その結果、**Fig.14** に示すように、反応時間が短い場合では **B-343** は **B-5** より明らかに 5～6 倍感度よく検出された。

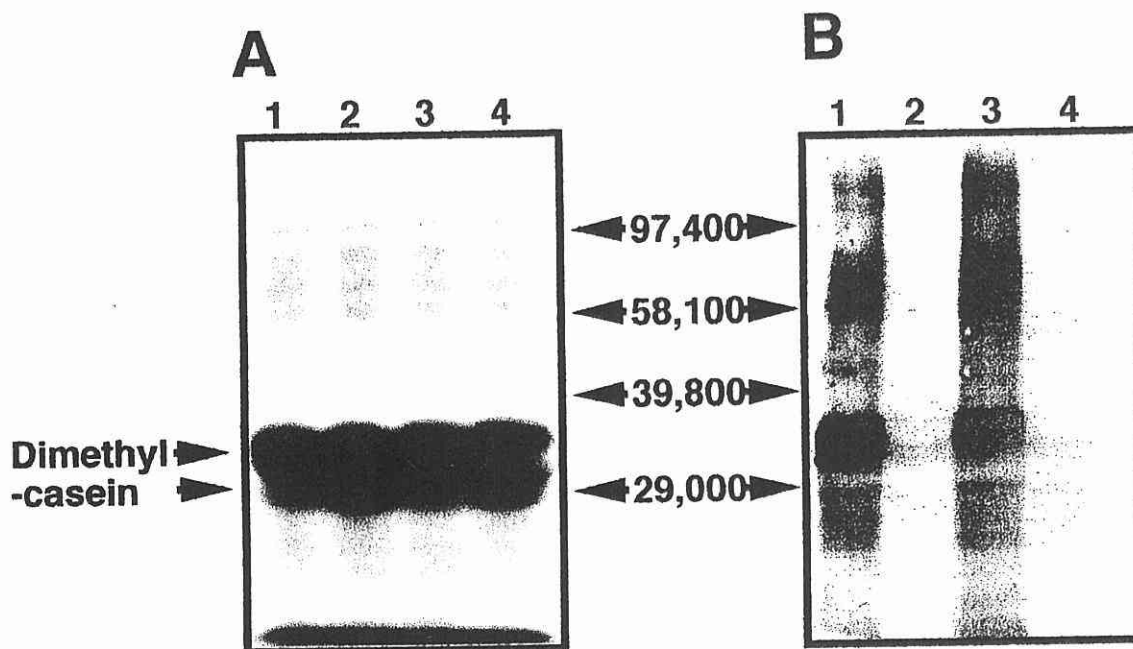


Fig.11 Detection of TGase reaction products between B-5 and dimethylcasein

**Panel A:Detection of protein by coomasie brilliant blue stain
Panel B:Detection of biotinylated protein with HRP-avidin by
Konica Immunostein Kit.**

**lane 1=B-5, Ca²⁺ addition; lane 2=B-5, EDTA additin; lane 3=B-5
(pierce), Ca²⁺ addition; lane 4=B-5(Pierce), EDTA addition**

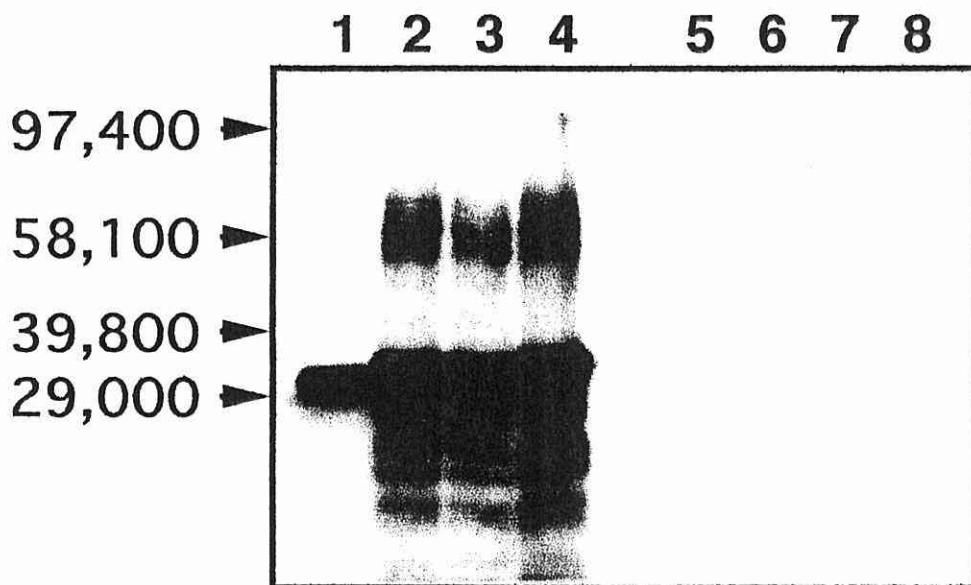


Fig.12 Detection of biotinylpolyamine conjugated with dimethylcasein by TGase

Reaction products in the presence of Ca^{2+} (lane1-4) or EDTA (lane5-8) were analyzed. Biotinylated dimethylcasein was detected with HRP-avidin by Super Signal CL.

lane1,5=B-5; lane2,6=B-343; lane3,7=B-434; lane4,8=B-3333

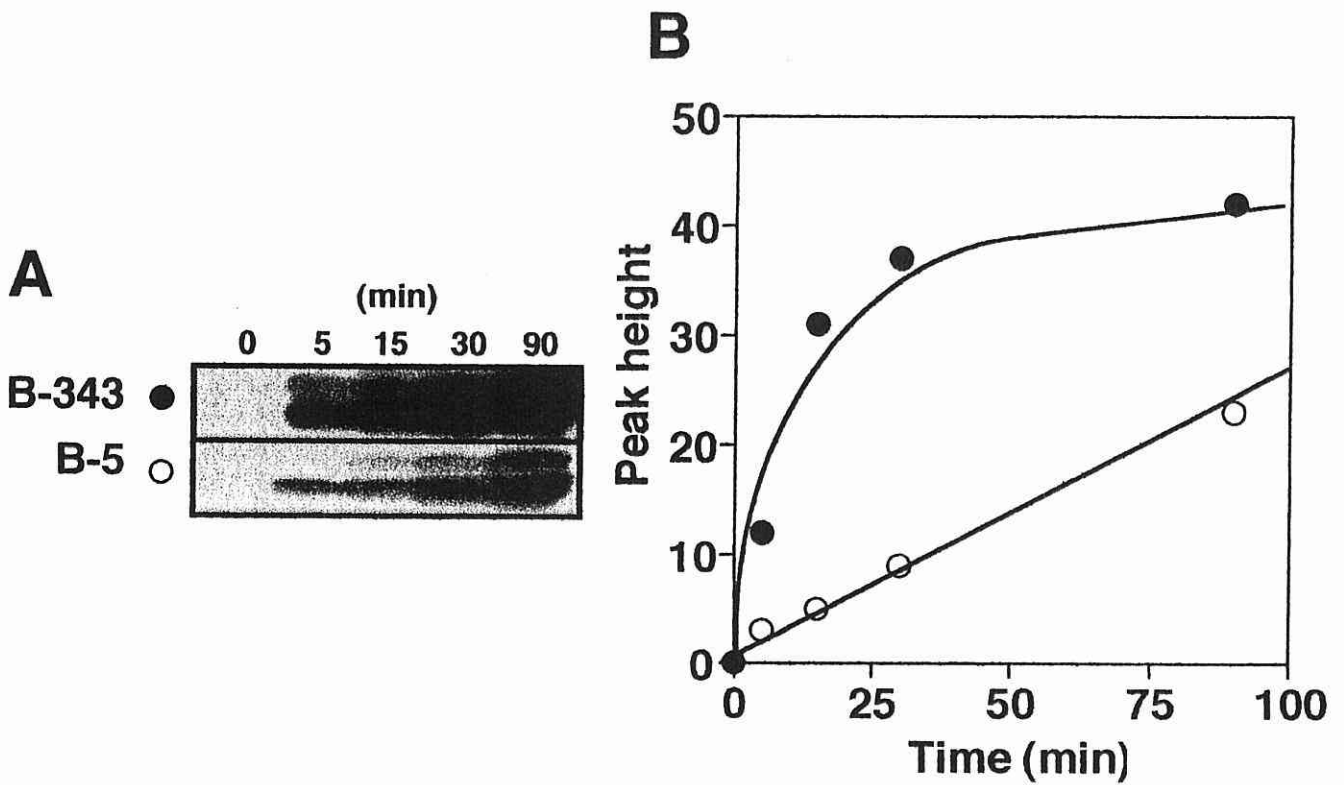


Fig.13 Time dependency of reaction of B-5 or B-343 with dimethylcasein by TGase

Panel A:Detection of biotinylated dimethylcasein

Panel B:Relation between reaction time and peak height in scanned electro phoretogram of blots in Panel A

2-1-b ビオチニルポリアミン投与細胞におけるビオチン標識タンパクの検出

合成したビオチン標識ポリアミンが **TGase** の基質になることが明らかになったので、これらのポリアミンが細胞内に取り込まれれば、細胞内のタンパクとの作用を検出できるのではないかと考えた。そこで、ビオチニル化合物 4 種について、ラット肝癌由来 **HTC** 細胞に投与して、標識されるタンパクの有無を調べた。その際、細胞はポリアミン輸送系を活性化して化合物が細胞内に入りやすくするために、ポリアミン合成阻害剤で前処理したものを用いた。すなわち、オルニチン脱炭酸酵素阻害剤である 1-アミノオキシ-3-アミノプロパン (**AOAP**)¹⁵⁾ を含む培地で細胞を培養することで細胞内ポリアミン濃度を低下させ、ポリアミン輸送系の活性を増大させた **HTC** 細胞に、4 種のビオチン標識化合物を各々投与し、24 時間培養した。その全細胞成分を **SDS**-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (**SDS-PAGE**) 後、膜に転写し、発光検出を行った結果を **Fig.14** に示した。

いずれの化合物についても複数のバンドが検出され、これらの化合物に由来するビオチンが細胞成分タンパクに結合したことが示唆された。その際、すべての化合物に共通のバンドも検出されたが、いくつかのバンドは化合物に特有であった。特に分子量 **35,000** に出現したバンドは **B-5** に特有であり、また、分子量 **50,000**~**60,000** に出現したバンドは、**B-434** に特有だった。

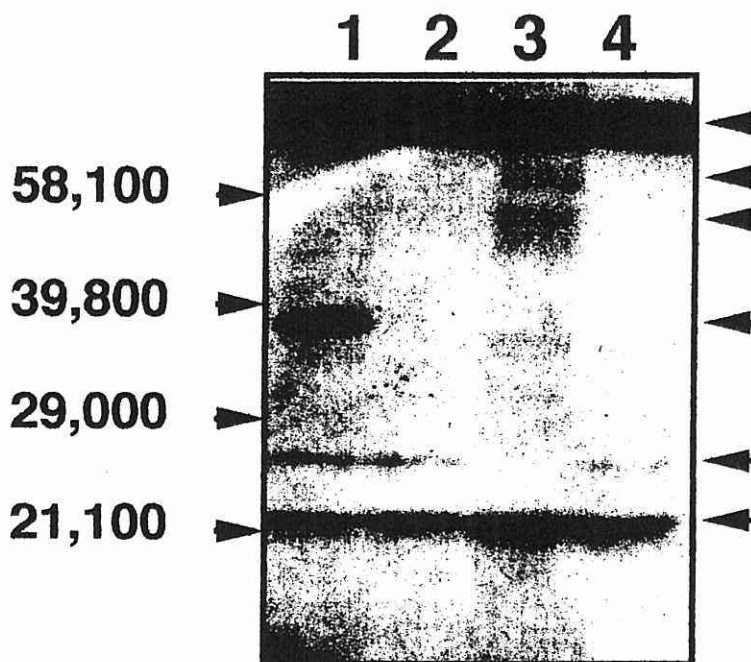


Fig.14 Detection of biotinylpolyamine-conjugated protein in HTC cells cultured in the presence of biotinylpolyamine

Whole cell extracts from HTC cells treated with biotinylated polyamine were analyzed (lane1=B-5;lane2=B-343;lane3=B-434;lane4=B-3333) .Biotinylated protein was detected with HRP-avidin by Super Signal CL.

2-2

アジドベンゾイルピオチニルポリアミンの利用

フォトアフィニティー標識に使われる官能基として選択したアジド基は、光によって分解し、反応性の高いナイトレンを生じ、親電子的反応や、ラジカル的な水素引き抜き反応によって、溶媒あるいは近傍に存在する化学種と反応することが知られている⁵⁾。タンパクの標識実験に先立ち、アジド化合物の紫外線による分解を確認するために、**365.0 nm**と**253.7 nm**の2種のランプを照射したときの化合物のスペクトル変化を調べた。その結果、**Fig.15**に示すように、照射光波長が**365.0nm**では、ほとんど吸収スペクトルの変化が見られなかったのに対し、**253.7nm**では、極大吸収波長の経時的な変化が見られた。この変化したスペクトルは等吸収点をもっており、化合物が光によって分解し、溶媒である水と反応して主に単一の成分に変化していることが示唆された。

そこで、実際に使用する **AB-B-3333** を水に溶解して **253.7 nm** の紫外線をあて、経時的にその吸収スペクトルを測定した。**Fig.16** に示すように、極大吸収波長の同様な経時的変化が観察され、約5分で完全に **AB-B-3333** が分解することが示唆された。この検討より、光標識条件を、**253.7 nm** の紫外線を5分当てることとした。

ポリアミンの細胞内濃度はポリアミン生合成に関わる酵素活性と細胞内外へのポリアミン取り込み-排出系によって調節されている。抗がん効果をねらった細胞内ポリアミン量の低下を実現するために、多くのポリアミン生合成酵素の阻害剤が開発され、抗がん剤としての臨床試験も行われてきた¹⁶⁾。しかし、このような阻害剤による組織ポリアミン量の低下が輸送系の活性化を起し、細胞外からのポリアミンの供給が薬物の効果

を低下させることも明らかになってきた。従って、ポリアミン輸送系の同定と単離は、抗がん剤開発の面からも急務の課題であり、多くの研究機関がその検出と単離にしのぎを削っているのが現状である。細胞膜上には、このようなポリアミン輸送系タンパク¹⁷⁾やポリアミンがモジュレーターとして働くイオンチャネル¹⁸⁾の存在が明らかになっており、また、これらのタンパクはポリアミンのメチレン鎖長と陽電荷の数を主に認識することも示されている。

そこで、本研究では、フォトアフィニティプローブとして合成したアジドベンゾイルビオチニルポリアミンである **AB-B-3333** を、**Fig.17** に示すように、培養細胞膜上のポリアミン親和性タンパクの検出に応用することを試みた。すなわち、プラスチックシャーレに入れた **HTC** 細胞に、**AB-B-3333** 共存下、氷上で紫外線を照射し、細胞成分を遠心により分画後、ビオチン化タンパクを分離検出した。その結果を **Fig.18** に示した。細胞質画分にはバンドは検出されなかったが、細胞膜を多く含むと思われる画分と核および細胞を含む画分に、数本のバンドが検出された。その際、紫外線を照射したときにのみ観察されるバンドが分子量約 **100,000** の位置に検出された。このバンドは、標識体に対して **10** 倍過剰量のスペルミジンを共存させて紫外線を照射したときには検出されないことから、ポリアミンに親和性を持つタンパクであることが示唆された。

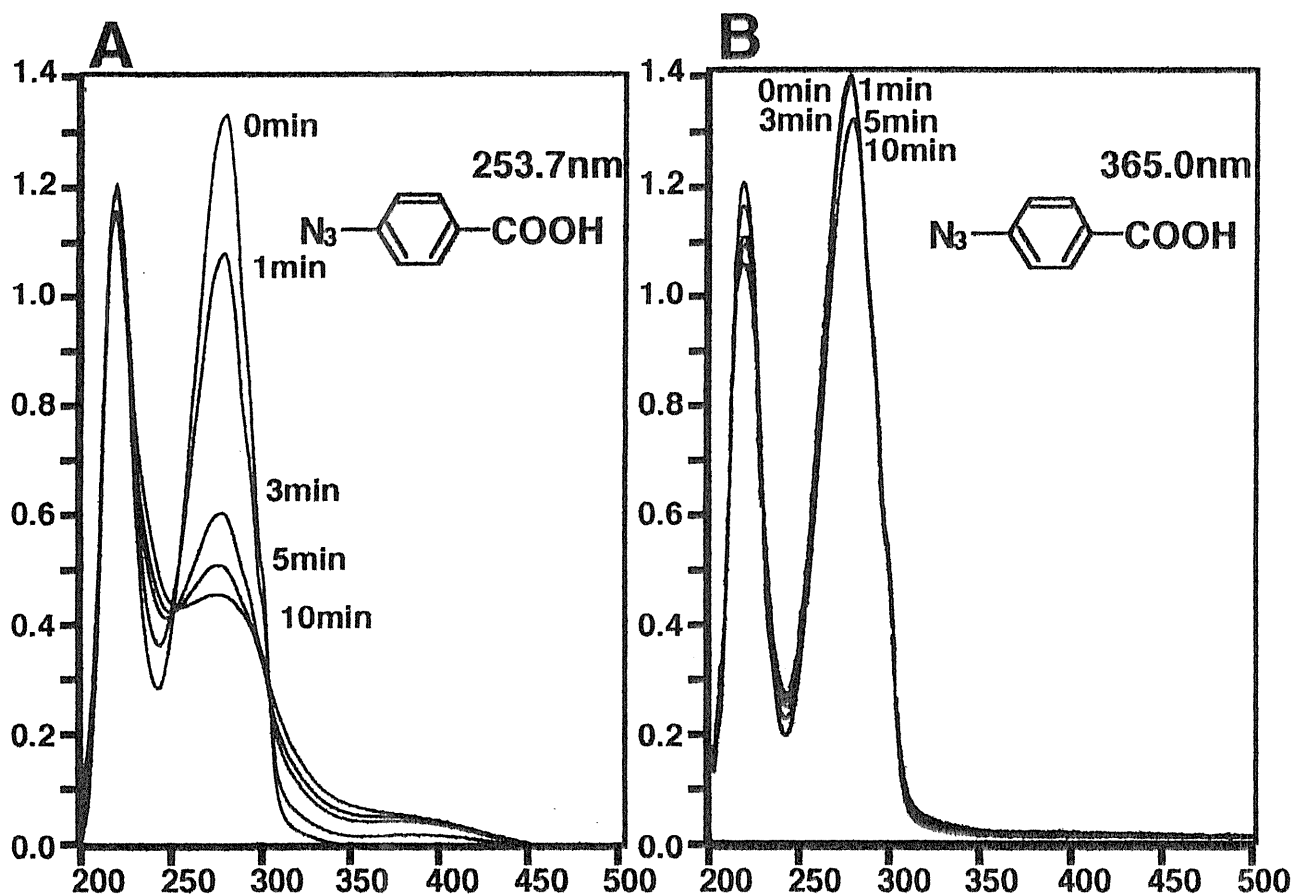


Fig.15 Effect of UV irradiation on spectra of 4-azidobenzoic acid

Panel A: irradiation at 253.7nm

Panel B: irradiation at 365.0nm

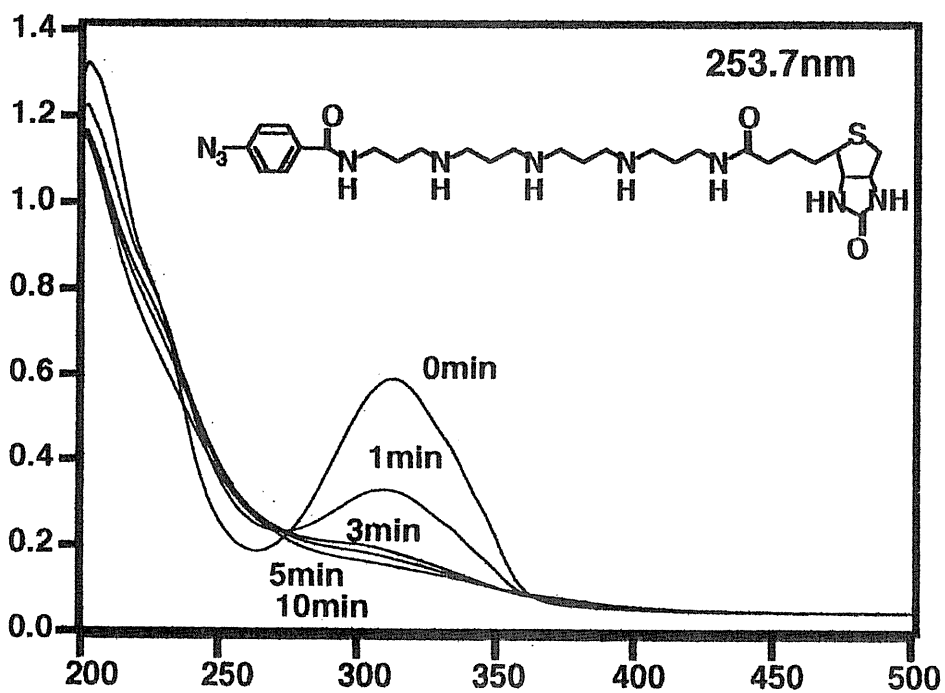


Fig.16 Effect of UV(253.7nm) irradiation on spectra of AB-B-3333

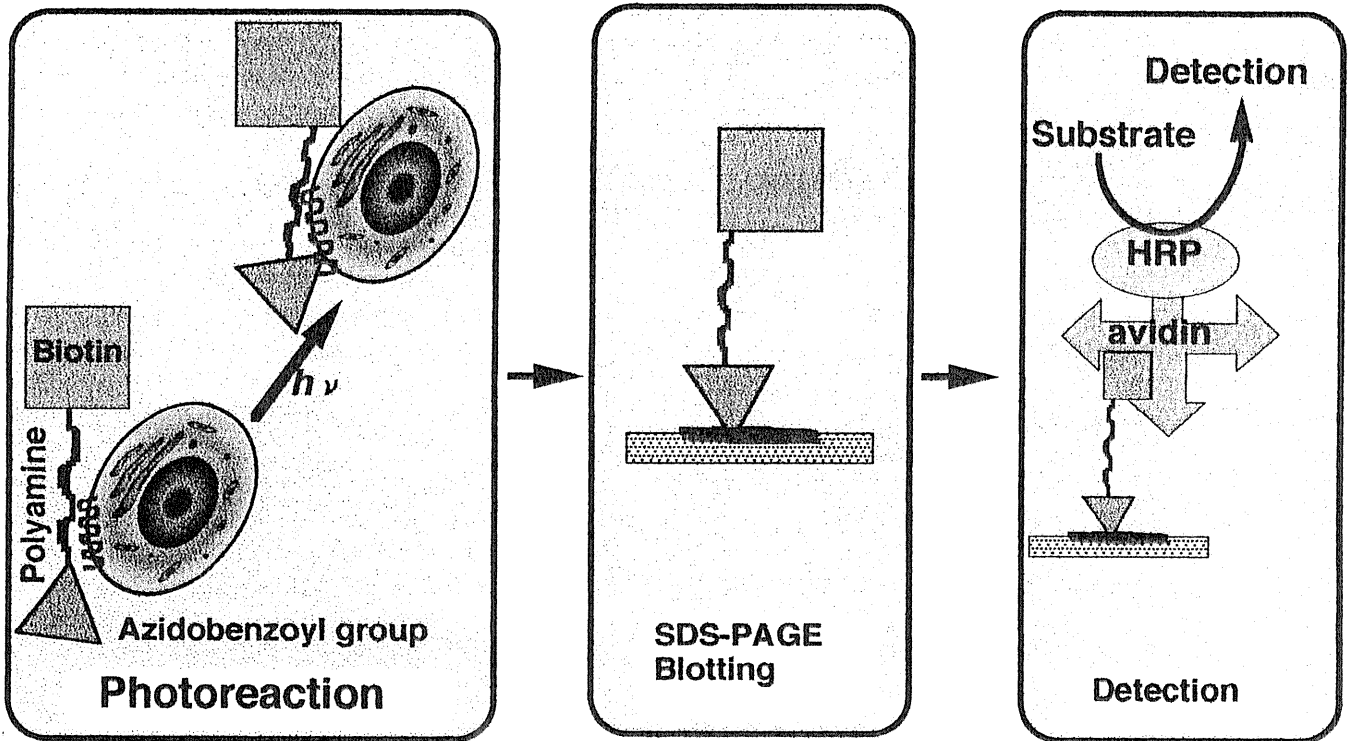


Fig.17 Scheme of labeling, blotting and detection of cell surface polyamine binding protein

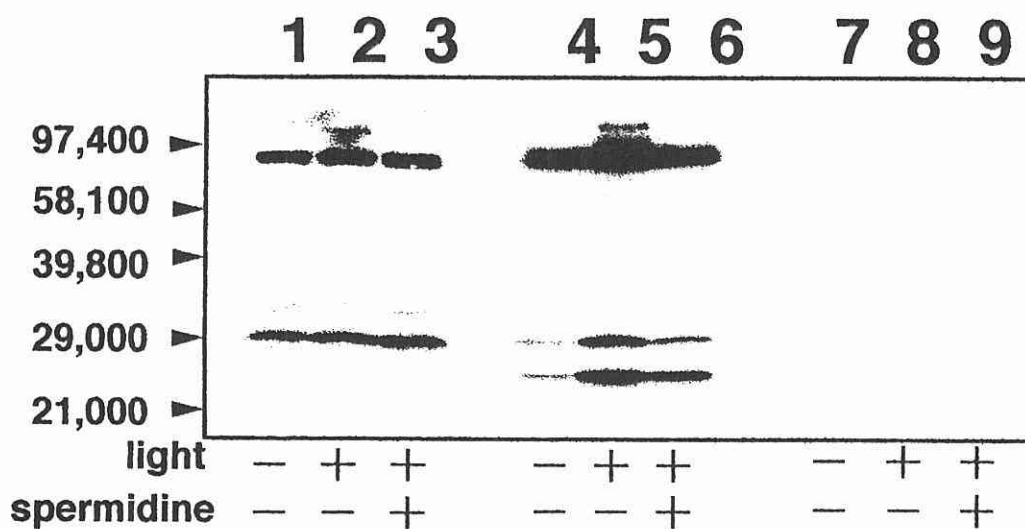


Fig.18 Detection of AB-B-3333-labeled protein in crude subcellular fractions of HTC cells

Plasma membrane rich fraction (lane1,2,3), nuclei and whole cell rich fraction (lane4,5,6) and cytosol fraction (lane7,8,9) were analyzed from HTC cells treated with (lane2,3,5,6,8,9) or without (lane1,4,7) UV light in the presence of AB-B-3333. Ten fold excess of spermidine was added during photoaffinity labeling(lane3.6.9).

2-3 まとめと考察

本研究により、ビオチニルポリアミンが **TGase** の基質になり、**B-5** に比べて効率よくタンパク成分に結合し得ることが明らかになった。基特異性を論じるためにはさらに詳細な検討が必要であるが、**Fig.12** に示されるように、生理的状況下で3つ以上の陽電荷をもつこれらの化合物と結合したジメチルカゼインが感度よく検出されたことは、**TGase** がポリアミンを生理的基質として認識していることを示唆している。末端にアミノプロピル構造を持つ **B-343**、**B-3333** とアミノブチル構造を持つ **B-434** で若干の検出感度に差があることも、基質認識の差を反映しているのではないかと考えている。**TGase** の生理的意義は未知の部分が多く、高感度な検出が可能なこれらの化合物を利用すれば、**TGase** の新たな作用を検索する際にも有用であろうと思われる。

ラット肝がん由来 **HTC** 細胞にビオチニルポリアミンを投与すると、投与した化合物の構造に特有な標識タンパクが検出された。検出されたタンパクが必ずしも **TGase** がポリアミン部分を認識して標識したものでなく、二次的な標識である可能性もあるが、構造に依存して標識タンパクの種類が変化したことは、これらの化合物がポリアミン作用タンパクの検索に有用であることを示唆している。

当研究室では、ポリアミン欠乏細胞にスペルミジンを投与することによって細胞内にポリアミンが急激に蓄積し、細胞が死に至ることを報告してきた¹⁹⁾。この細胞死は **TGase** 阻害剤によって一部抑制される（未発表）ことから、ビオチニルポリアミンによって、この細胞死のメカニズム解明に新たなアプローチができるものと期待している。

AB-B-3333による光標識は、細胞表面に存在するポリアミン親和性タンパクの検出に有用であった。

これまで、ポリアミンの輸送担体の研究は、主に大腸菌で行われており、担体タンパクのクローニングおよびその構造解析の段階に進んでいる¹⁷⁾。しかし、哺乳動物細胞におけるポリアミンの輸送系は様々なポリアミンアナログを用いた実験により、その存在が示唆されているに過ぎず、タンパクとしての検出はなされていない。

1995年、**Porter**らは放射性同位体標識のアジド構造および一級アミノ基をもつポリアミンアナログを用いて、マウス白血病細胞の膜上に存在するポリアミン親和性タンパクの存在を報告した²⁰⁾。彼らはこの報告の中で、低濃度の標識体共存下の紫外線照射によって標識される分子量約**110,000**のタンパクを輸送系の候補タンパクとしている。しかし、このタンパクの標識は標識体の**1000**倍過剰量のスペルミジンによっても完全には阻害されず、ポリアミンに対して特異的な親和性を有するかどうか明確でない。

本研究で用いた**AB-B-3333**は**Porter**らの標識体とは構造が異なり、また検出タンパクの分子量も一致しないことから**Porter**らが検出したタンパクと今回検出されたタンパクとは異なるものと考えている。また、**10**倍量のスペルミジンの共存下の紫外線照射によって標識が阻害されることから、検出されたタンパクが、スペルミジンに親和性をもつタンパクであることは明らかであろうと思われる。検出されたタンパクが、ポリアミンの輸送系に関わるタンパクであるか不明であるが、前述のアビジンカラムを用いることで精製も可能であろうと考えており、今後検出タンパクの精製と同定を検討する予定である。

実験の部

〈試薬〉

新生仔牛血清 (NBS) は Cell Culture Laboratories 社、MEM-Earle Medium は大日本製薬、Swim's S-77 Medium 及び Trypsin-EDTA 溶液は Sigma 社のものを用いた。spermidine は Aldrich 社から購入したものを用いた。培養細胞に投与したポリアミンアナログ、1-aminooxy-3-aminopropane (AOAP) は、当研究室で合成したものを用いた。また、培養実験に用いた他の生化学試薬については、Sigma 社あるいは Aldrich 社のものを用いた。Bovine serum albumin (BSA) は、生化学工業株式会社から、avidine-horseradish peroxidase conjugate、coomassie brilliant blue R-250 は、Bio-Rad 社から、transglutaminase (TGase)、dithiothreitol (DTT)、塩化カルシウム、EDTA、ジメチルカゼイン (casein, N,N-dimethylated)、biotinylated SDS molecular weight markers、N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) は Sigma 社、コニカイムノステイン 1000 はコニカ社、5-(biotinamide)pentylamine、Super Signal Substrate (Western blotting) は Pierce 社から購入したものを用いた。その他、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、蛋白転写に用いた試薬は、和光純薬工業株式会社、Sigma 社、Bio-Rad 社、Aldrich 社、から購入したものを用いた。

〈タンパク定量〉

タンパク定量は、**coomassie brilliant blue R-250** 試薬を用いる、**Bradford 法**²¹⁾により行った。標準タンパクとして **BSA** を用いた。

〈SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動²²⁾〉

調製した試料に、同量の電気泳動用緩衝液 (**28mM NaH₂PO₄**、**72mM Na₂HPO₄**、**1% SDS**、**1.1% mercaptoethanol**、**36% urea**) を添加し、沸騰水浴中で **10 min** インキュベーションしたものを電気泳動用試料とした。泳動に用いた濃縮ゲルは、**5% [acrylamide : N,N'-methylene-bis(acrylamide)=1 : 1]** (**3×14cm**)、泳動ゲルは、**10% [acrylamide : N,N'-methylene-bis(acrylamide)=1 : 1]** (**10×14cm**) を用い、ゲル当たり **30mA** の電流を流して泳動を行った。

〈タンパクの検出 **coomassie brilliant blue R-250** による染色〉

SDS-PAGE を行ったゲルに、染色液 A (**EtOH 50ml**、**H₂O 120ml**、**35% HCHO 30ml**、**coomassie brilliant blue R-250 0.2g**) で **1 時間** 処理し、次に染色液 B (**EtOH 50ml**、**H₂O 150ml**、**35% HCHO 2ml**、**coomassie brilliant blue R-250 0.25g**) で一晩処理した。続いて、脱色液 C (**EtOH 125ml**、**H₂O 375ml**、**35% HCHO 5ml**) で約 **3 時間** 処理

した。

〈ビオチン標識タンパクの検出〉

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったゲルをブロッキング緩衝液 C (Tris-HCl 1.208g、H₂O 320ml、MeOH 80ml ; pH 9.5) に浸したろ紙の上に乗せ、メタノールで処理して緩衝液 C に浸した Immobirone-P (transfer membrane) を乗せ、ブロッキング緩衝液 B (tris-HCl 0.0604g、H₂O 160ml、MeOH 40ml) 、ブロッキング緩衝液 A (tris-HCl 7.28g、H₂O 160ml、MeOH 40ml) に浸したろ紙を各々乗せて 100mA で 1 時間 30 分通電を行った。通電後の Immobirone-P は、3%ゼラチンを含む TBS 溶液 (Tris-HCl 2.42g/l、NaCl 26.74g/l ; pH 7.5) で一晩ブロッキング処理を行った。

ブロッキングを行った Immobirone-P は TTBS 溶液 (0.05% tween-20 を含む TBS) で 5 分間洗った後、TTBS で 10,000 倍に希釈した avidine-horse radish conjugated で 1 時間、室温で処理を行った。続いて、TTBS で 5 分間 5 回、さらに TBS で 5 分間洗浄して検出を行った。

コニカイメージステイン 1000 による発色法での検出：氷冷下、暗所で発色試薬を調製し、洗浄した Immobirone-P を 5 分間から 30 分間処理した。

スーパーシグナルによる発光法での検出：以下の操作はすべて暗

室で行った。発光試薬を調製し、**Immobilone-P** を 5 分間処理し、適当な大きさに切った X 線フィルムに 2 秒から 120 分間露光させた。フィルムはフジフィルム社の現像液に 2 分、定着液に 1 分、洗浄液に 10 分から 20 分さらしたあと、流水で十分濯いで自然乾燥した。

〈トランスグルタミナーゼの基質性の検討²³⁾〉

10mM tris-HCl、5mM DTT、1mM ビオチン標識化合物、2mg/ml transglutaminase、及び 10mM CaCl₂ 又は EDTA を加えて、よく混和し、10mg/ml Dimethyl casein を添加して反応を開始した。反応は、37℃の恒温槽で 1 時間 30 分行い、反応停止には、飽和 EDTA 溶液を反応溶液の 1/10 量添加した。

〈培養細胞²⁴⁾〉

ラット肝癌由来 HTC 細胞は、大日本製薬から入手したものを、-80℃で保存していたものを、浮遊培養で立ち上げ、実験に用いた。浮遊培養に用いる培地 (Swim's S-77 (+50mM tricine、+2g/l glucose、+2mM glutamine、+0.05mM L-cystine、+0.5g/l NaHCO₃) +10% NBS) に、細胞を 1~4×10⁵cells/ml になるように、48 時間ごとに植え継ぎ、対数増殖期の細胞を実験に用いた。

〈AOAP 処理²⁵⁾〉

ろ過滅菌した **100 μ M AOAP** の溶液を投与した培地 (**Swim's S-77 +10% NBS**) に、上記の浮遊培養の条件で細胞を **1~4 \times 10⁵cells/ml** になるように植え継ぎ、**48** 時間培養した。

〈ビオチニル化合物を投与した細胞試料の調製法〉

AOAP 処理を行い、ポリアミン輸送系を活性化したポリアミン欠乏状態のラット肝癌由来 **HTC** 細胞を **1.5 \times 10⁷cells** 集め、**100 μ M** の **AOAP** を含んだ培地に再懸濁し、**3.5cm** のプラスチックシャーレに蒔いた。このシャーレに、**100 μ M** のビオチニル化合物を添加し、**37 $^{\circ}$ C**、**24** 時間培養を行った。この細胞を **PBS** で洗い、遠心して集めた細胞を凍結融解で破碎した後、さらに超音波破碎 (**30** 秒毎 **5** 回) を行い、試料を電気泳動に供した。

〈吸光スペクトルの測定〉

測定は、**Simazu** の **Multi-Spec 1500** を用いて行った。

〈アジドベンゾイルビオチニル化合物で標識した細胞試料の調製法〉

基本的には **Porter** の方法²⁰⁾を参考にして行った。

通常培養のラット肝癌由来 **HTC** 細胞を 6.4×10^6 cells 集め、**HEPES** 緩衝液に再懸濁させ、**3.5cm** のプラスチックシャーレに蒔いた。これを暗室下、氷上で平衡化した後、このシャーレに、 $100 \mu\text{M}$ の **AB-B-3333** を添加した。ポリアミン親和性蛋白の確認に **spermidine** を **AB-B-3333** の **10** 倍量添加した。このシャーレは **5** 分間 **254nm** の紫外線を照射し、アジドをタンパクと結合させた後、アジドの分解を目的として、**DTT** を添加した。この細胞は **PBS** で洗い、遠心して集めた後、ペレットの **2** 倍量の培養液 (**0.05M boric acid**、**0.15M NaCl**、**1mM MgCl₂**、**1mM CaCl₂**) を添加してよく攪拌し、さらに、ペレットの **100** 倍量の低張溶液 (**0.02M boric acid**、**0.2mM EDTA**) を **10** 分間かけて添加し、**20** 分間攪拌した。さらに、ペレットの **8** 倍量のホウ酸溶液 (**0.5M boric acid**) を添加して **5** 分間攪拌した。この溶液は、**450×g** で **10** 分間、**2℃** で遠心し、核画分をとり、さらに、**12,000×g** で **30** 分間、**2℃** で遠心し、膜画分を分離した。膜画分は、**0.5% triton X 100** の **PBS** 溶液に溶解し、それぞれの画分は電気泳動の試料に供した。

引用文献

- 1) Pegg,A.E., *Cancer Res.*, 48, 759 (1988)
- 2) 白幡 晶, *化学と生物*, 28, 162 (1990)
- 3) Im,M-J.,Russell,M.A.,Feng,J-F., *Cell. Signal.* 9, 477 (1997)
- 4) Marton,L.J.,Morris,D.R., *Inhibitipn of polyamine metabolism*,
McCann,P.P.,Pegg,A.E.,Sjoerdsma(eds.), pp79 Academic
press, N.Y., (1987)
- 5) 谷澤 和隆,畑中 保丸,金岡 祐一, *化学と生物実験ライン* 14, pp51
広川書店 (1991)
- 6) Gitlin,G.,Bayer.E.A.,Wilchek,M., *Biochem.J.*, 242, 923 (1987)
- 7) Mattson,D.L.,Bellehumeur,T.G., *Anal.Biochem.*, 240, 306 (1996)
- 8) Samejima.K.,Takada.Y.,Kawase.M.,Okada.M.,kyogoku.Y.,
Chem.Pharm.Bull., 32, 3428 (1984)
- 9) Niitsu.M.,Samejima.K., *Chem.Pharm.Bull.*, 34, 1032 (1986)
- 10) Becker,J.M.,Wilcheck,M.,Haynes,L.W., *Int.J.Devl Neuroscience*
11, 709 (1993)
- 11) Greenberg,C.S.,Birckbichler,P.J.,Rice,R.C., *FASEB J.*, 5, 3071
(1991)
- 12) Piacentini,M.,Fesus,L.,Farrace,M.G.,Ghibelli,L.,Piredda,L.,
Melino,G., *Eur.J.Cell.Biology*, 54, 246 (1991)
- 13) Martinet,N.,Beninati,S.,Nigra,T.P.,Folk,J.E., *Biochem.J.* 271,
305 (1990)
- 14) Jeon,W.M.,Lee,K.N.,Bickbichler,P.J.,Conway,E.,Patterson,M.K.,
Anal.Biochem., 182, 170 (1989)
- 15) Poulin,R.,Secrist,J.A.,Pegg,A.E., *Biochem.J.*, 263, 215 (1989)
- 16) Schecher,P.J.,Barlow,J.L.R.,Sjoerdsma,A., *Inhibitipn of
polyamine metabolism*,
McCann,P.P.,Pegg,A.E.,Sjoerdsma(eds.), pp345 Academic
press, N.Y., (1987)

- 17) Sugiyama,S.,Vassilyev,D.G.,Matsushima,M.,Kashiwagi,K., Igarashi,K.,Morikawa,K., *J.Biol.Chem.*, 271, 9519 (1996)
- 18) Forsythe,I.D., *Current Biology*, 5, 1248 (1995)
- 19) Shirahata,A.,Kobayasi,M.,Fukazawa,T.,Agata,M.,Samejima,K., *Tokyo International Symposium On Polyamines (Abstracts)* pp15, October 21-25, 1996, Kanagawa, Japan
- 20) Felschow,D.M.,MacDiarmid,J.,Bardos,T.,Wu,R.,Woster,P.M., Porter,C.W., *J.Biol.Chem.*, 270, 28705 (1995)
- 21) Bradford,M.M., *Anal.Biochem.*, 72, 248 (1976)
- 22) Laemmli,U.K., *Nature (London)*, 227, 680 (1970)
- 23) Singh,R.N.,McQueen,T.,Metha,K., *Anal.Biochem.*, 231, 261 (1995)
- 24) Beppu,T.,Shirahata,A.,Takahashi,N.,Hosoda,H.,Samejima,K., *J.Biochem.*, 117, 339 (1995)
- 25) Beppu,T.,Shirahata,A.,Samejima,K., *Biol.Pharm.Bull.*, 19, 1 (1996)

モルモット組織トランスグルタミナーゼに対する
ビオチン標識ポリアミンの基質性

緒言

哺乳動物細胞には、スペルミジン、スペルミンおよびそれらの前駆体であるプトレシンが普遍的に存在し、これらポリアミンの細胞内濃度は、Fig. 1 に示されるような生合成、代謝経路、および、細胞内外への取り込み-排出系によって厳密に調節されている。ポリアミンは、細胞増殖や分化過程における必須因子であることが明らかになっているが、細胞のどこに、どのように作用することが細胞機能の調節に重要であるのか、その作用の詳細は不明である^{1,2)}。分子レベルでのポリアミンの役割は、有機塩基という化学構造上の特性から単に陽イオンとしての役割ばかりでなく、多くの生体分子との静電的結合、水素結合、疎水結合などを通して、生体高分子の立体構造に影響を与え、それらの機能発現に影響を与えると考えられる。核酸との相互作用が強く、生合成が核酸の生合成と期を同じくして起こることなどから、ポリアミン作用の中心は核酸との相互作用にあるものと推察されるが、最近、細胞の生存に必須である真核細胞翻訳開始因子eIF-5Aの翻訳後修飾にスペルミジンが基質として働くことなど、細胞成分への化学結合の重要性が示されており、細胞内タンパク質のポリアミンによる化学修飾がその機能発現に重要である可能性は高い。

細胞内タンパク質にポリアミンそのものによる化学修飾が起こるとすれば、組織トランスグルタミナーゼ(TGase)による修飾の可能性が最も高い。本酵素は、その存在がFolkらにより最初に報告されたもので、Fig. 2 に示されるように、Ca²⁺存在下タンパク質中の特定のグルタミン残基におけるアミド窒素と近傍のリジン酸基のε-アミノ基あるいはポリアミンなどの末端一級アミノ基を交換する反応を触媒する³⁾。Folkらは、ポリアミンがこの反応に関与する際、両端のアミノ基がグルタミン残基と反応し、架橋を形成することも明らかにした。タンパク質の分子内あるいは分子間架橋はその立体構造の変化を引き起こし、それらが膜タンパク質であれば、膜の流動性の変化など情報伝達系への多大な影響を与えることも予想される。実際組織TGase活性は、アポトーシスや細胞の分化過程に大きく変動し、また細胞内情報伝達過程に重要な役割を果たすGタンパクとの関与も示され、活性の発現が細胞機能の調節に関わることが示唆される^{4,5)}。しかし一方、本酵素の基質タンパク質の特異性、低分子基質となるポリアミンの構造特異性など酵素化学的な基本情報は少ない。

平成9年度修士論文において当研究室の松鹿は、生細胞中で Fig. 3 に示されるビオチン標識ポリアミンによって標識されるタンパク質が複数検出されることを報告した⁶⁾。その際、検出されるタンパク質はポリアミン構造によって異なる場合があり、生細胞中のポリアミンが、生理的に種々のタンパク質を修飾する可能性が示唆された。本研究では、松鹿が培養細胞について行った実験を再検討すると共に、細胞内ポリアミンによる化学修飾に最も関与が予想される組織TGaseに対するビオチン標識ポリアミンの基質性を検討し、細胞内におけるポリアミンおよびビオチン標識ポリアミンの挙動を知る上で有用な情報を得ることを目的として実験に着手した。

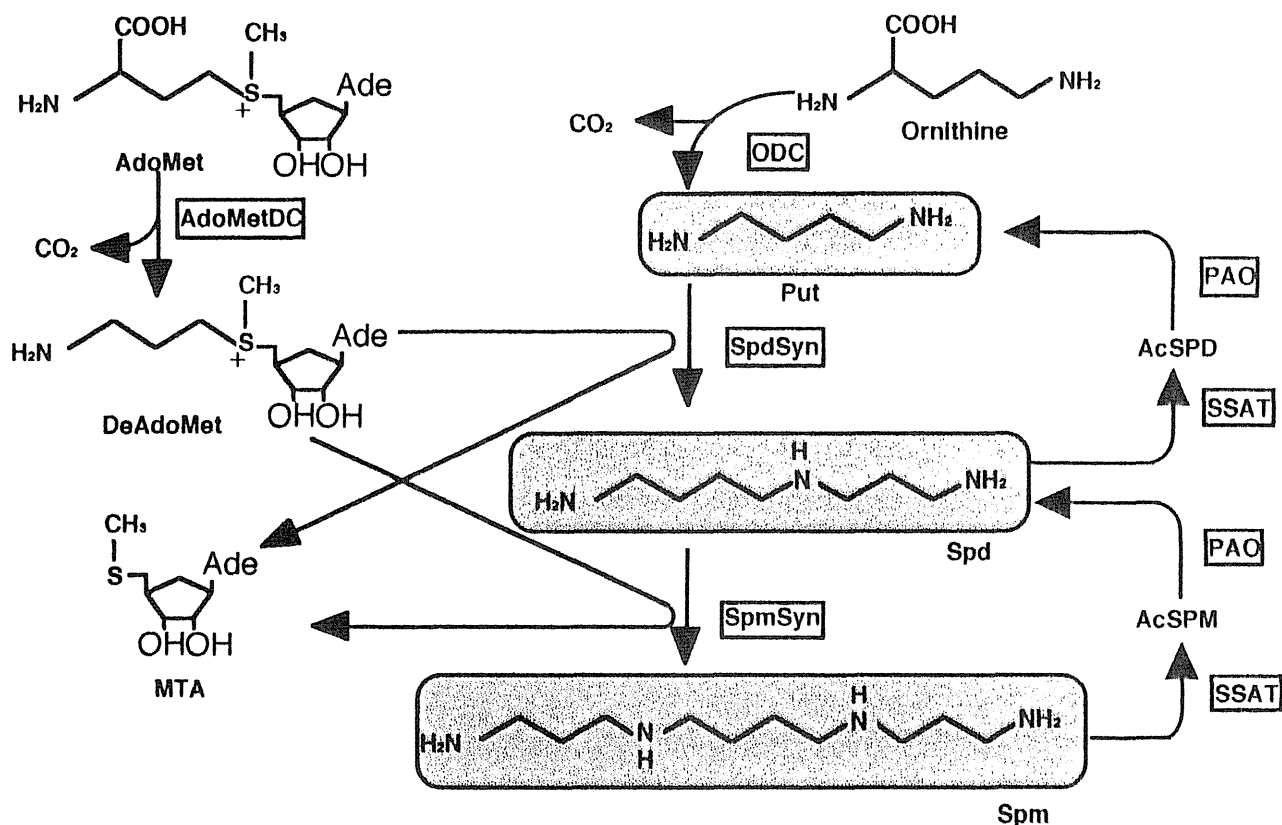


Fig.1 Polyamine biosynthesis and interconversion pathway

PUT: putrescine, SPD: spermidine, SPM: spermine, AdoMet: S-adenosylmethionine, deAdoMet: decarboxylated adoMet, MTA: 5'-methylthioadenosine, ODC: ornithine decarboxylase, AdoMetDC: S-adenosylmethionine decarboxylase, SpdSyn: spermidine synthase, SpmSyn: spermine synthase, SSAT: spermidine/spermine N 1-acetyltransferase, PAO: polyamine oxidase, AcSPD: N 1-acetylspermidine, AcSPM: N 1-acetylspermine

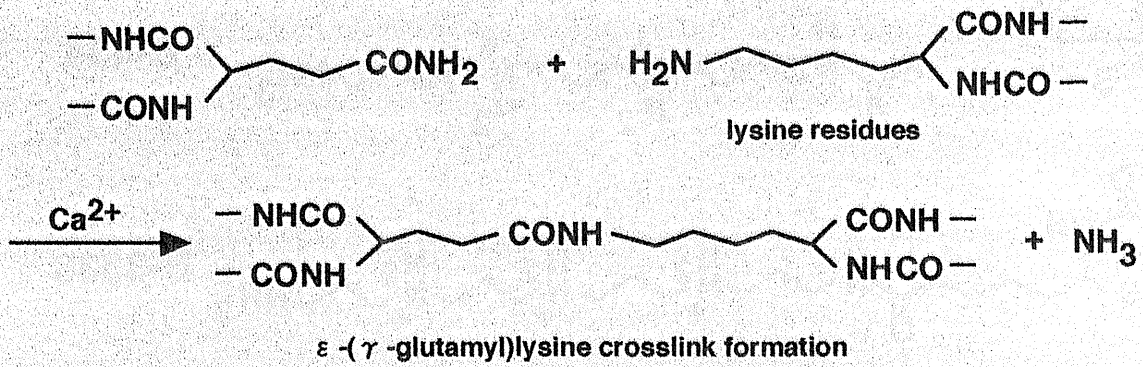
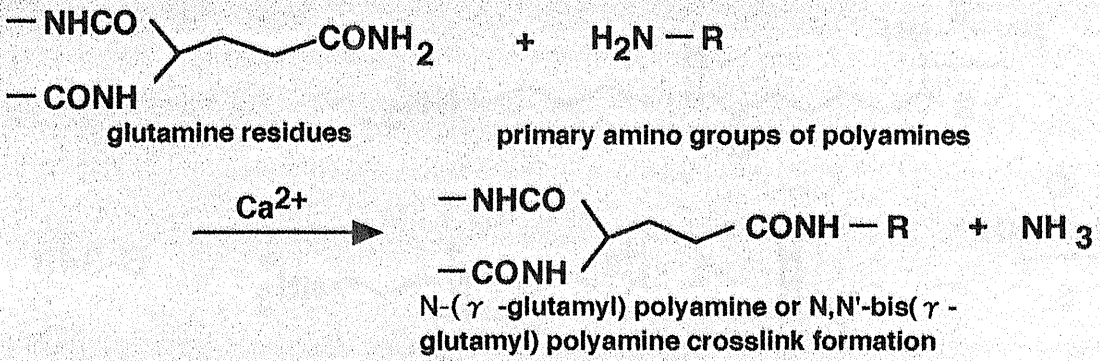


Fig.2 Reaction of transglutaminase(TGase)

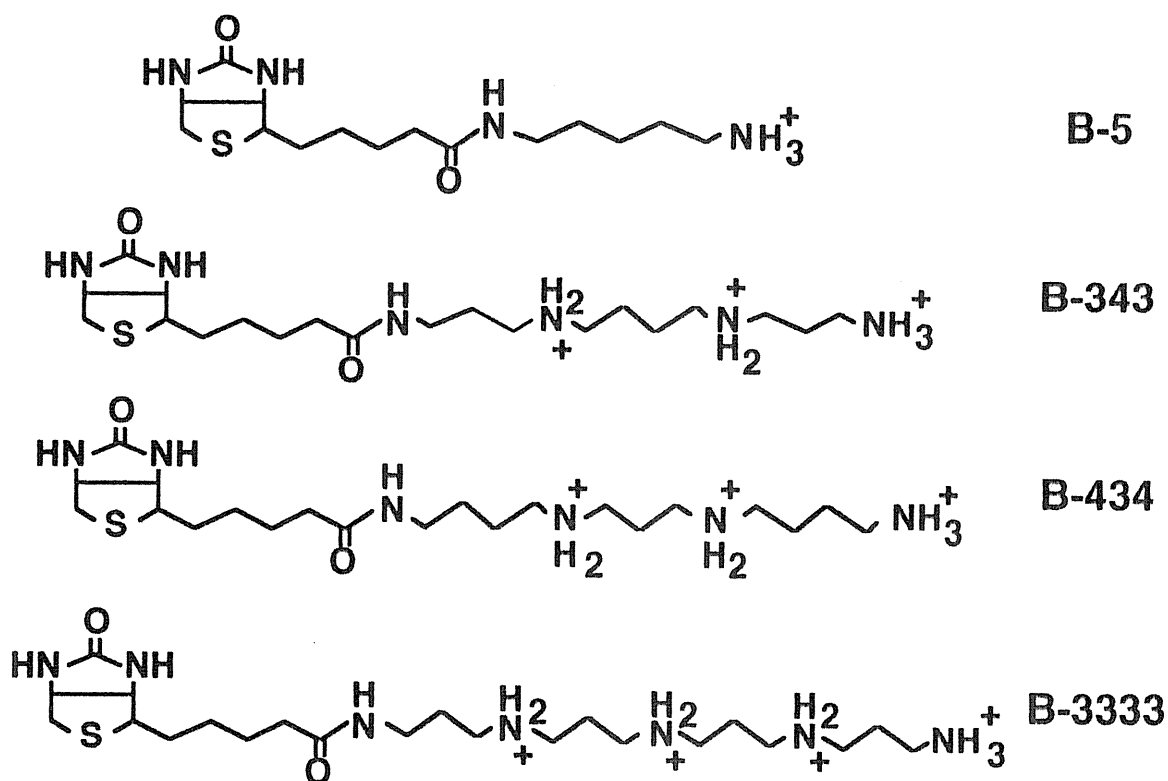


Fig.3 Structures of biotinylpolyamines used in the present study

第一章 HTC細胞内タンパク質のビオチン標識ポリアミンによる標識

平成9年度修士論文で松鹿は、新規に合成したB-5、B-343、B-434、B-3333など4種のビオチン標識ポリアミンを細胞内に投与すると、ビオチンで標識されるタンパク質が生成することを報告した。その際松鹿は、オルニチン脱炭酸酵素阻害剤であるAOAPにより細胞内ポリアミン量を低下させることでポリアミン輸送系を活性化したHTC細胞に、ビオチン標識ポリアミンを作用させどのようなタンパク質が標識されるかを調べた。その結果、投与するビオチン化合物によって異なる標識タンパク質が検出されることも明らかにしたが、培地中に存在する血清アミノキシダーゼが結果に影響する可能性が考えられた。血清アミノキシダーゼは、ポリアミンの末端アミノ基に作用して脱アミノ化し、アルデヒド体を生じさせることで知られる。したがって、血清アミノキシダーゼによってビオチン標識ポリアミンから生じるアルデヒド体がタンパク質に結合することも考えられる。そこで、ポリアミンの酸化が牛血清中でほぼ抑えられる条件として血清アミノキシダーゼ阻害剤であるアミノグアニジン1 mM濃度を共存させて、ビオチン標識ポリアミンの投与実験を行い、同様の標識タンパク質が検出されるかをまず調べてみることにした。

本章では、ビオチン標識ポリアミンによって標識されるタンパク質の存在をアミノグアニジン存在下培養した細胞について再度確認した実験、および、ビオチン標識ポリアミンの種類により標識されうる細胞内タンパク質について、市販の組織TGaseを用いて検討した実験について記す。

第一節 生細胞内でビオチン標識ポリアミンにより標識されるタンパク質の検出

アミノグアニジン存在下、AOAPにより輸送系を活性化したHTC細胞について行ったビオチン標識ポリアミンの投与実験の結果をFig.4に示す。検出されたいくつかのタンパク質の分子量に違いはあったが、松鹿の結果と同様、複数のビオチン標識タンパク質が検出され、用いたビオチン標識ポリアミンの構造により異なるタンパク質が検出された。分子量 100KDa および 70KDa に検出されたタンパク質のように4種の化合物に共通なパン

ドもあったが、分子量 50KDa および 45KDa および 35KDa には B-5 によって特有に標識されるタンパク質が検出された。また、分子量 64KDa 付近には、特に B-343 によって濃く検出されるタンパクが検出され、ポリアミン構造により、細胞内における挙動が異なることが示唆された。この挙動の違いは、細胞内への取り込み量が異なるためか、化合物の細胞内局在が異なるためか、あるいは標識の過程が異なるためかのどれかであると考えられた。当初、細胞内のビオチン標識ポリアミン量をHPLCにより定量することを試みたが、取り込み量が少なく、検出限界以下であり、取り込みについての結論を得ることができなかった。そこで、タンパク質の標識過程に関与が予想される組織TGaseに対するこれらビオチン標識ポリアミンの基質性を次節のように調べることにした。

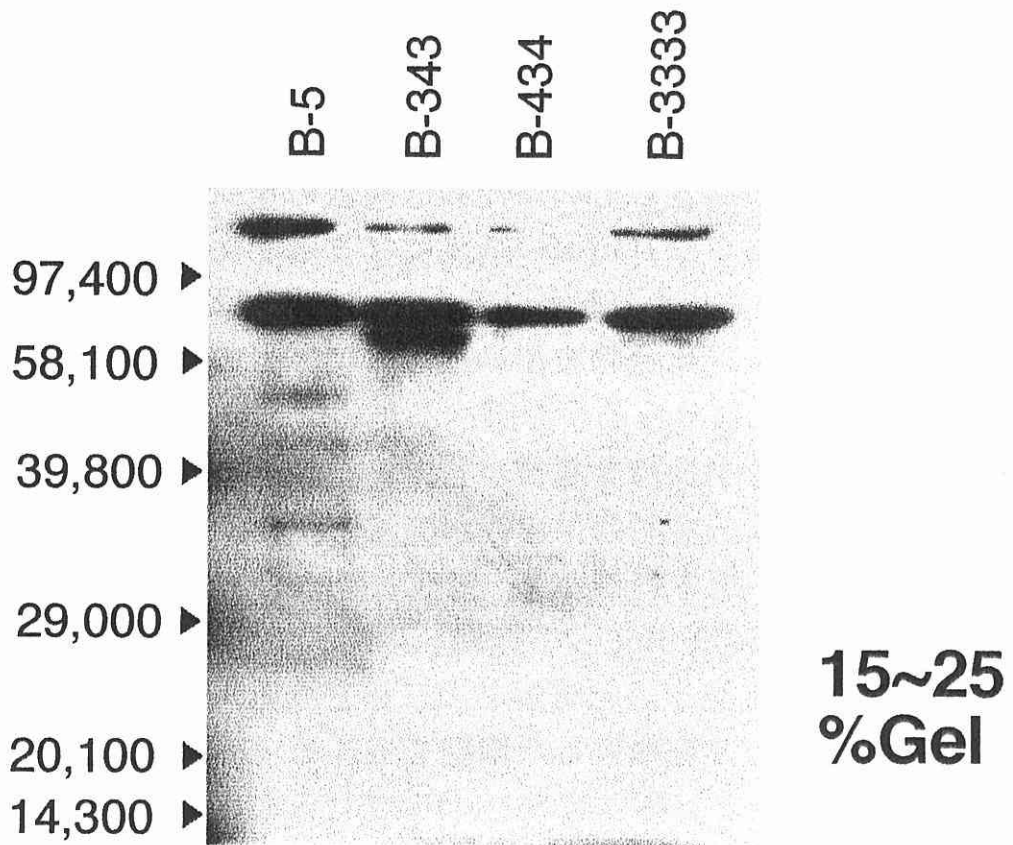


Fig.4 Detection of biotinylpolyamine-conjugated proteins in HTC cells cultured in the presence of biotinylpolyamine

第二節 HTC細胞抽出液をタンパク基質として用いるビオチン標識ポリアミンの組織TGaseに対する基質性の検討

組織TGaseは、ポリアミンを基質とし、先に述べたように、特定のタンパク質のグルタミン残基におけるアミド窒素とポリアミンの末端アミノ基を交換することで知られる。しかし、TGaseによって生理的にポリアミンが結合するタンパク基質としては精巢内のタンパク質の報告があるのみで、多くの場合同定にまでは至っていない。ビオチン標識ポリアミンは、末端アミノ基にビオチンが結合しているため、複数の電荷をもつポリアミンの基本構造を保持しており、TGaseの基質になる可能性は高い。また、ポリアミン基質の構造の違いにより結合するタンパク質が異なる可能性もある。そこで、4種のビオチン化合物を用いた場合に、どのような細胞内タンパク質がTGaseの基質になりうるかを調べるために、ラット肝癌由来HTC細胞からの細胞抽出液をタンパク基質として、組織TGaseに対する基質性を調べた。組織TGaseは一次配列保存性が高く、種によってその特性に大きな違いがないことが予想されるので、HTC細胞がラット由来の細胞であることから、同じ齧歯類のモルモット組織TGaseについて実験を行った。

対数増殖期のHTC細胞を凍結融解および超音波処理により破碎後、透析により細胞内ポリアミンを除去した細胞をモルモット組織TGaseによりビオチン標識ポリアミンと反応させると、Fig.5に示したように、いずれの場合も非常に多くのタンパク質がビオチン標識されることがわかった。B-5を基質として用いた場合は若干検出感度が低いものの、他のビオチン標識ポリアミンでは検出されるバンドの染色濃度に差が見られず、TGaseが基質タンパク質に対して著しい特異性を示すわけではないことが示唆された。

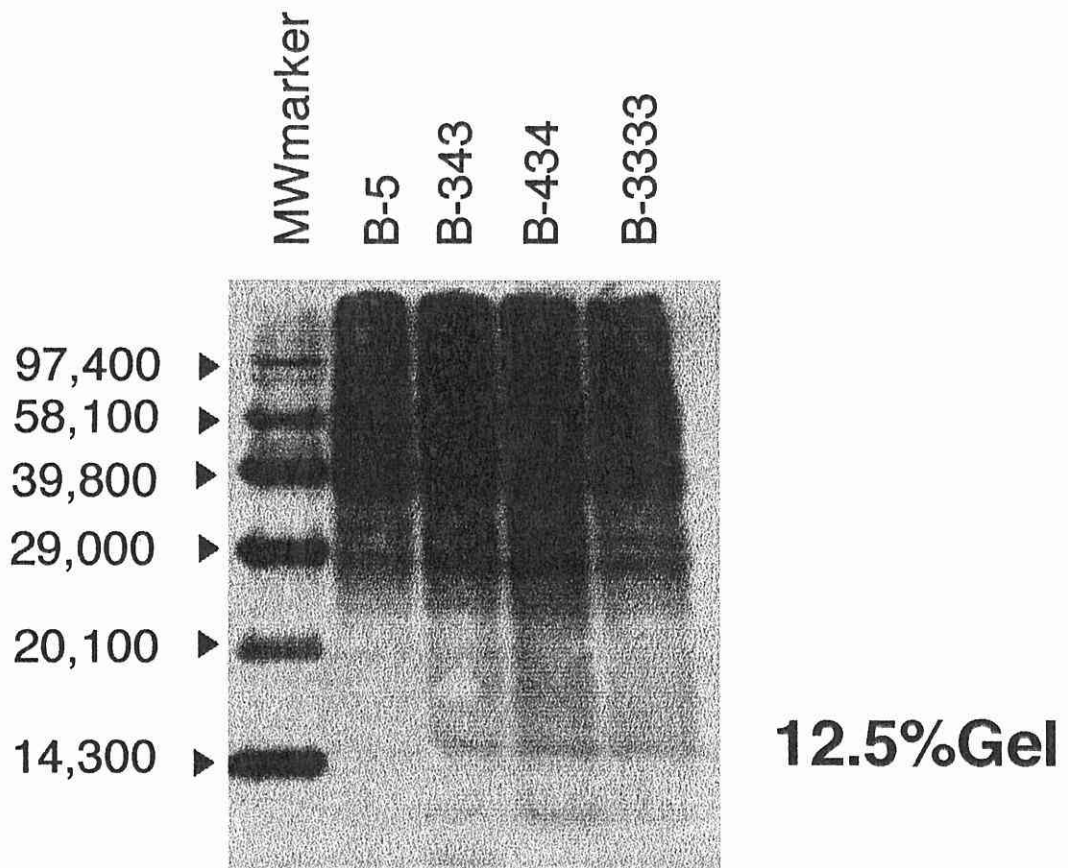


Fig.5 Conjugation of biotinylpolyamine with cell extract of HTC cells by TGase

第三節 まとめと考察

高感度で検出でき、標識タンパク質の分離が容易なビオチンによって標識されたポリアミンを用いることで、生細胞内のタンパク質の標識が起こることをアビジン-パーオキシダーゼ複合体を用いるウェスタンブロット法で確認できることを、当研究室の松鹿は平成9年度修士論文において明らかにした。本章では、まず培養細胞を用いてビオチン標識ポリアミンによって標識されるタンパク質の検出を再確認することを行った。血清アミノオキシダーゼ阻害剤であるアミノグアニジンと共存させて、ポリアミンの輸送系を活性化したHTC細胞にビオチン標識ポリアミンを投与すると、従来TGaseの基質として用いられているB-5を投与したときとは異なるタンパク質が検出された。その際特に、B-343を用いた場合には分子量64KDaに強いバンドが検出され、ビオチン標識ポリアミンのポリアミン構造の違いによって、細胞内における挙動が異なることが示唆された。その挙動の違いは不明であるが、1 mM濃度のアミノグアニジンの共存によっても、検出バンドに構造特異性が見られることから、血清アミノオキシダーゼによるビオチン標識ポリアミンの分解に関わる可能性は低いものと思われる。

次に、ビオチン標識ポリアミンと細胞内タンパク質との結合に関与が予想される組織TGaseを用いて、HTC細胞の抽出液とビオチン標識ポリアミンを試験管内で反応させると、非常に多くのタンパク質がビオチン標識された。このことは、細胞内には低活性であるがTGaseが存在することは知られており、ビオチン標識ポリアミンが十分量存在すれば多数のタンパク質が基質になることを示している。したがって、細胞内で標識されるタンパク質がビオチン標識ポリアミンによって異なる理由は、もしその標識にTGaseが関与するならば、その細胞内における局在の相違や基質性の相違が原因であるものと推察される。現在これらの課題に結論を得るべく、ビオチン標識ポリアミンの定量法の開発、および、蛍光色素で標識されたポリアミンを用いる細胞内ポリアミンの局在を明らかにする研究が当研究室で進行中である。

第二章 ジメチルカゼインを基質として用いるビオチン標識ポリアミン のモルモット組織トランスグルタミナーゼに対する基質性の検討

前章でモルモット組織TGaseにより、HTC細胞の抽出液中の種々のタンパク質が、ビオチン標識ポリアミンによって標識されることを明らかにした。組織TGaseの基質特異性など、その酵素化学的特性に関しては、タンパク質中のグルタミン残基とリジン残基の間の架橋反応に関する研究が中心であり、不明の点が多く、ポリアミンと基質タンパク質との反応に関する情報は限られている。生理的ポリアミンと基質タンパク質との反応は主に放射性同位体標識されたポリアミンが、トリクロロ酢酸処理における不溶性画分に取り込まれる量を指標に解析されている。この方法では、放射性同位体を用いるため不便なばかりでなく、ポリアミンの両端のアミノ基が反応することも考慮する必要があり、反応速度論的解析は複雑になる。TGaseの活性測定にビオチン標識ポリアミンを利用できれば、放射性同位体を用いない高感度な活性測定法として期待できる。

本章では、基質タンパク質間の架橋反応を防ぐためにタンパク質中のアミノ基をメチル化したジメチルカゼインをタンパク質基質として、ビオチン標識ポリアミンの基質性を、ウェスタンブロット法および新たに開発したマイクロプレートを用いるTGaseの活性測定法を用いて調べた結果について記す。

第一節 ウェスタンブロット法による基質性の検討

ジメチルカゼインをタンパク質基質にして、1 mMビオチン標識ポリアミン存在下、モルモット組織TGaseを作用させた溶液について、アビジン-パーオキシダーゼ複合体を用いるウェスタンブロットを行った。その結果、Fig.6に示すように、ジメチルカゼインの分子量を示す位置にCa²⁺依存的に濃いバンドが検出され、ビオチン標識ポリアミンが、ジメチルカゼインをタンパク質基質にした場合にも良い基質になることが明らかになった。その際、TGaseの基質として汎用されているB-5に比べ、反応性が高いように思われた。なお、分子量65 KDa付近に出現したバンドは、ジメチルカゼインの2量体が、ビオチン標識ポリアミンと結合したものであると考えられる。

前章で、細胞抽出液について検討した場合に比べ、ビオチン標識ポリアミンが、B-5より顕著に濃く検出されていたので、実際に結合したビオチン標識化合物量を知るために、結合ポリアミン量を測定した。Fig.6と同様に酵素反応した試料を、トリクロロ酢酸で処理し、生成したペレットを完全加水分解後、HPLCにより対応するポリアミン量を測定した結果をFig.7に示す。検出ポリアミン量は、B-5の加水分解によって生じるカダベリンより、ビオチン標識ポリアミンから生じるポリアミンの方が、1.5倍~2倍多く検出され、ビオチン標識ポリアミンがタンパク質に多く取り込まれたことがわかった。この結果は、ウェスタンブロットによる、顕著な染色後の違いを完全には説明するものではないが、B-5に比べ、確かにビオチン標識ポリアミンがモルモット組織TGaseの基質になりやすいことが明らかになった。

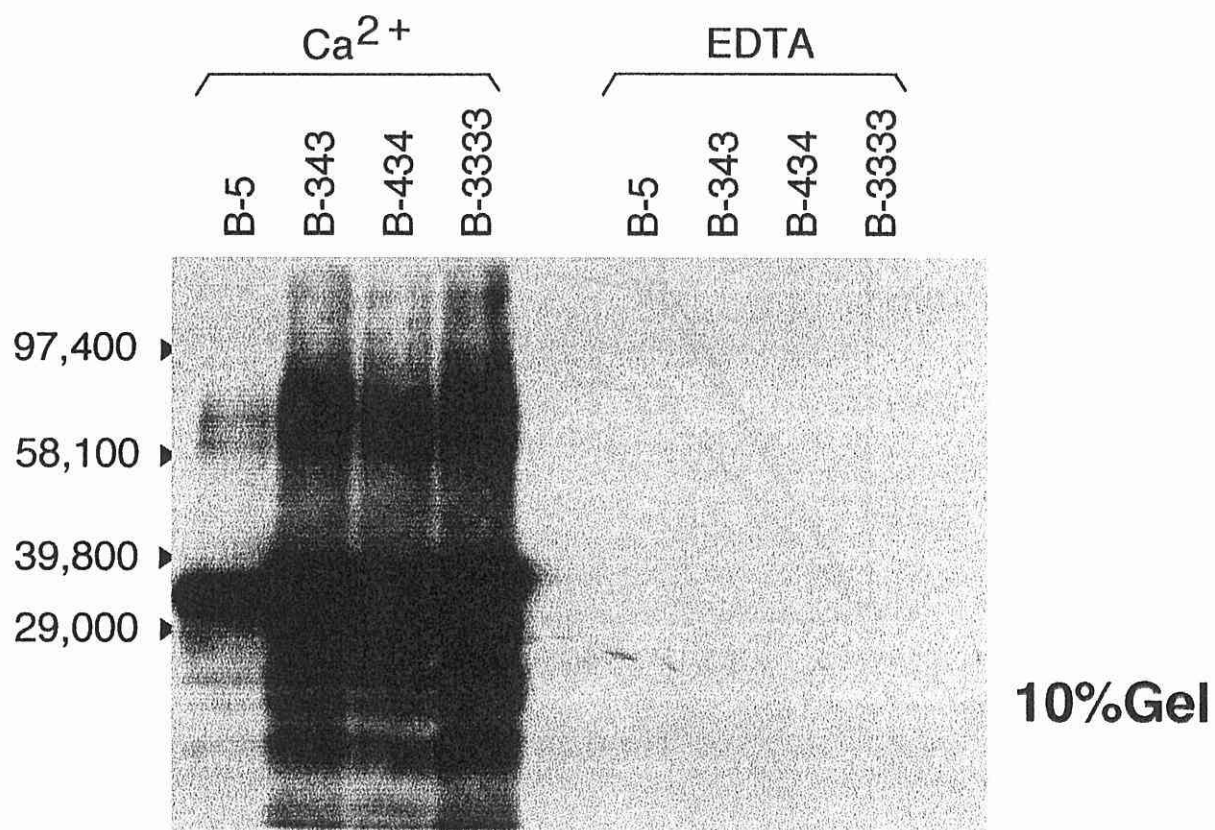


Fig.6 *Detection of biotinylpoyamine conjugated with dimethylcasein by TGase*

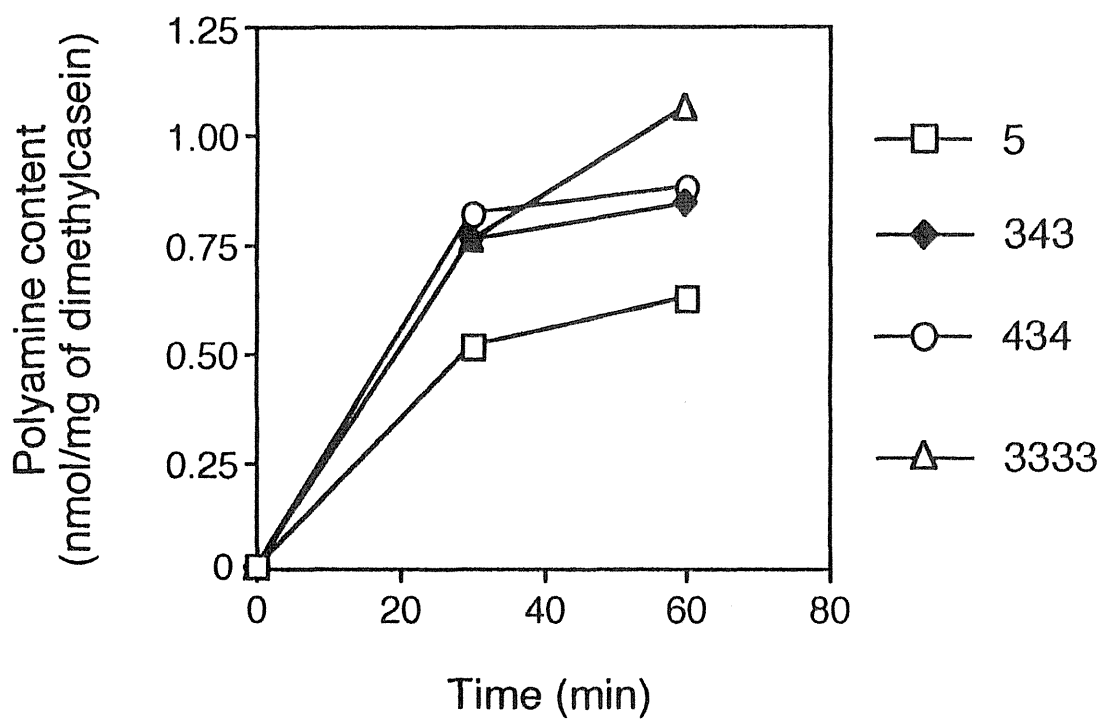


Fig.7 *Content of polyamine incorporated into dimethylcasein by TGase reaction*

第二節 マイクロプレート法を用いるトランスグルタミナーゼ活性測定法の検討

ウェスタンブロット法の結果は、定量化しにくく構造の異なるビオチン標識ポリアミンの基質性の違いを解析するには困難であると思われた。そこで最近、TGase活性測定法として報告されている、マイクロプレートを用いる方法にビオチン標識ポリアミンを用いることを試みた。

これまでにマイクロプレートを用いたTGaseの測定法として、ジメチルカゼインおよびB-5を基質とする方法が2種報告されている。一つは試験管内で酵素反応を行った後、ビオチン化されたタンパク基質をプラスチックプレートのウェル内面に吸着させ、アビジン-酵素複合体により標識ビオチン量を検出⁷⁾するもので、もう一種は、あらかじめ基質であるジメチルカゼインをウェルに吸着させた後、ウェル内で酵素反応を行い、吸着したジメチルカゼインがビオチン化された量を検出する方法⁸⁾である。当初、前者の方法にビオチン標識ポリアミンの利用を試みたが、ビオチン化タンパク質のウェル内面への吸着性が悪かったため、後者の方法で種々条件を検討することでTGase活性測定法の確立を試みた。

確立した活性測定法の詳細は以下のようなものである。すなわち、80℃20分の加温処理したジメチルカゼインをウェル内面に吸着させた後、用いるアビジン-酵素複合体の非特異的な吸着を防ぐために、0.5%スキムミルクでブロッキングしたものをプレートとして用いた。このプレートのウェル内でビオチン標識化合物を用いて37℃の酵素反応を行った後、アビジン-アルカリホスファターゼ複合体を標識ビオチンに作用させた。反応液を取り除いたウェルを洗浄した後、アルカリホスファターゼの基質である*p*-ニトロフェノールリン酸エステルを加え、生成する*p*-ニトロフェノールを405nmで測定し、TGase活性は、この条件下一分間に上昇する405nmにおける吸光度によって表した。ジメチルカゼインに標識されたビオチンにアビジンが吸着されることによって、アルカリホスファターゼの活性が高くなるという活性測定法である。この方法はB-5を用いる測定法として報告されているものであり、また、報告されている試薬の入手が困難であるものもあったので、入手可能な試薬を用いて方法を確立するにあたり測定条件の検討を以下のように行った。

ジメチルカゼインの加温による前処理：ジメチルカゼインを室温で溶解させると白濁し、遠心によって不溶分を除いても、上澄溶液は透明とはならない。また、沸騰水浴でジメチルカゼインのアルカリ溶液を加温すると溶液は強いアンモニア臭を示す。ジメチルカゼインの変性状態および溶解条件が実際の活性測定に影響を与えるかどうかを調べるために、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のモルモット組織TGaseを用いて加温条件と活性の関係を調べた。その結果、Fig.8に示すように、室温で処理したときより加温したジメチルカゼインを用いた測定の方が活性が高く、また加温温度が高く処理時間が長くなるにつれ活性が低くなる傾向が見られた。これらの結果から用いるジメチルカゼインは80 $^{\circ}\text{C}$ 20 分の加温処理を行うものとした。

ブロッキングに用いるタンパク質の影響：プラスチックプレートのウェル内面にジメチルカゼインを吸着させた後、アビジン-酵素複合体の非特異的吸着を防ぐために用いるブロッキングタンパク質は、報告により異なる場合が多い。牛血清アルブミン(BSA)あるいはスキムミルクを用いる場合が多いが、その使い分けの基準は明らかでない。今回、予備検討においてBSAをブロッキングタンパク質として用いた場合に、TGase活性が高く得られる傾向が見られたので、スキムミルクとBSAについて、ブロッキングに用いたときの活性への影響を同様のTGase濃度を用いて調べた。その結果、Fig.9に示すように、0.5%のスキムミルクを用いた場合には、TGaseを加えない対照では活性が見られなかったのに対して、BSAを用いた場合には、対照にも活性が見られ、BSAそのものがビオチンを吸着するか、アビジン-酵素複合体に対する親和性をもつことが示唆された。従って本測定法では、スキムミルクを用いることとした。

最終的に確立設定した条件により、酵素濃度と活性との関係を調べた結果をFig.10に示す。TGase活性は酵素濃度が高いときは一定となったが、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで酵素濃度とほぼ直線関係にあり、TGase活性を定量しうることを確認した。活性が一定値以上にならないのは、ウェル内面で、ビオチン標識ポリアミンと結合しうるジメチルカゼインのグルタミン残基に限りがあるためと考えられる。

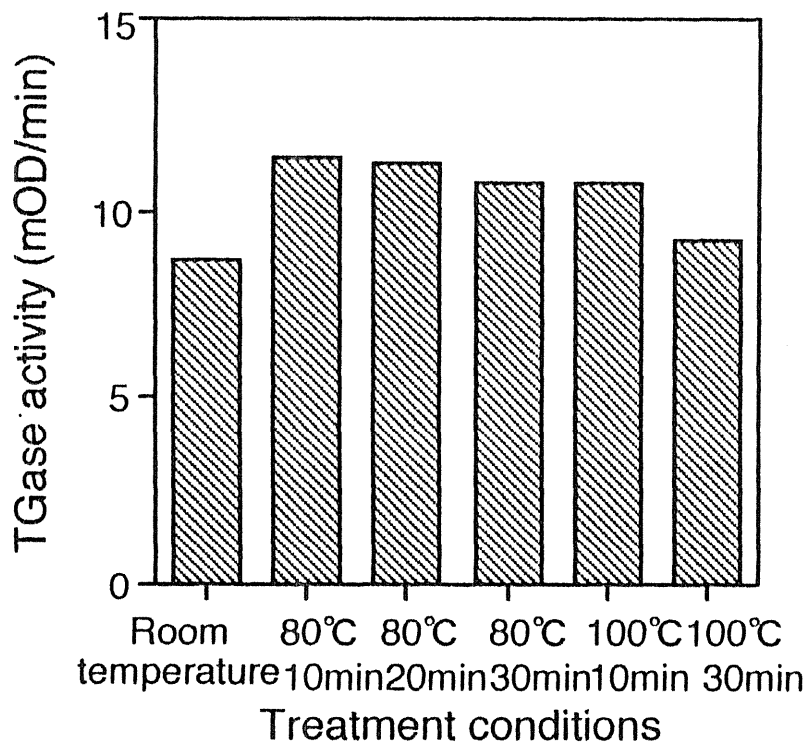


Fig.8 Treatment conditions of dimethylcasein

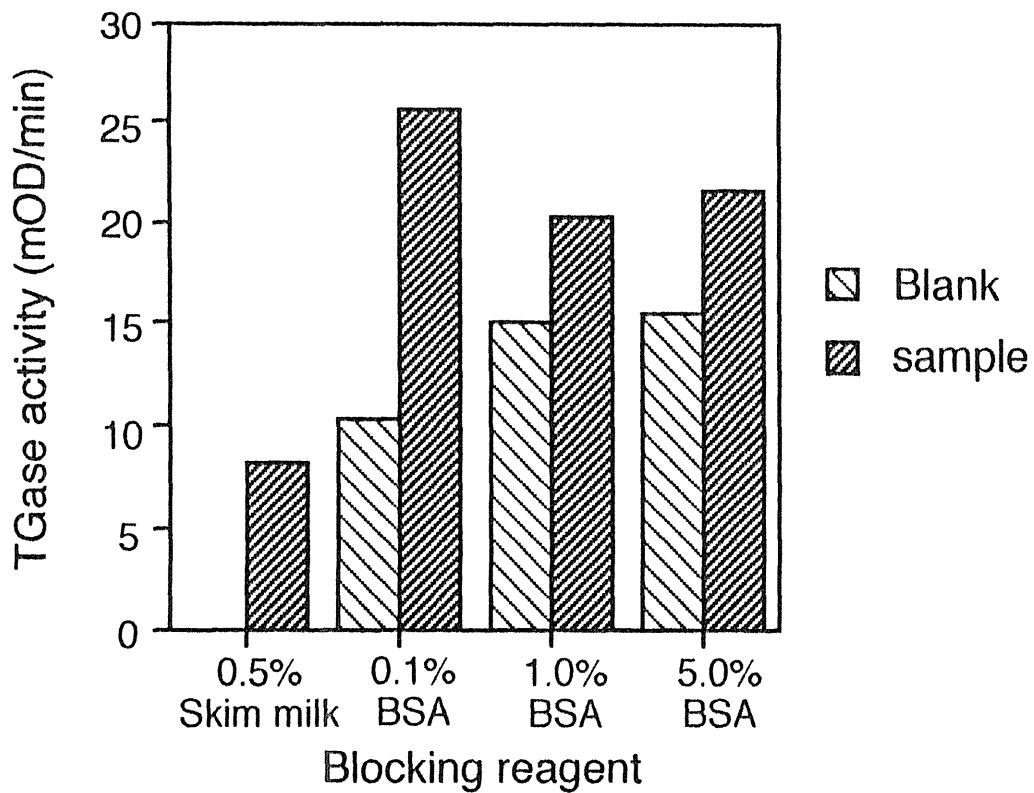


Fig.9 Effect of Blocking reagent (BSA)

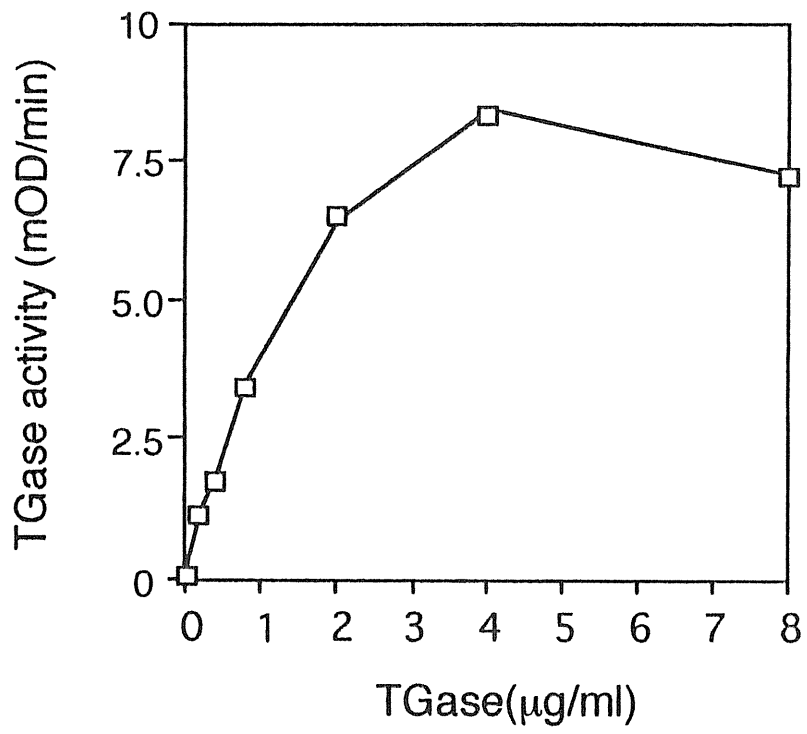


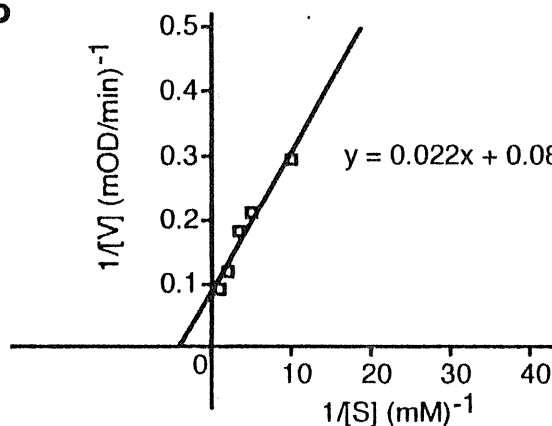
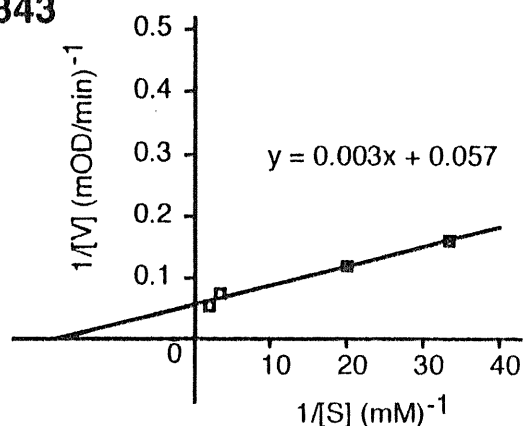
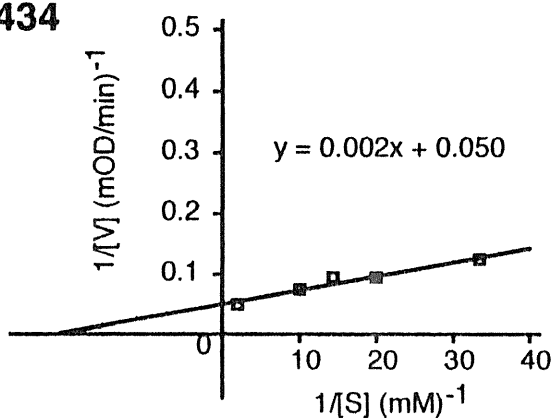
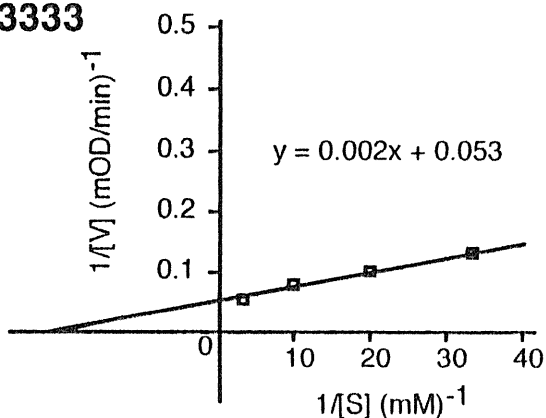
Fig.10 *Effect of TGase concentration*

第三節 モルモット組織トランスグルタミナーゼに対するビオチン標識 ポリアミンの基質性およびポリアミンの阻害性

前節の条件検討をふまえて、種々の基質濃度について活性を測定し、反応速度論的解析を行った。その結果、Fig.11に示したように、みかけの V_{max} はビオチン標識ポリアミンの方がB-5に比べ大きく、 K_m についてはB-5が250 μM であるのに対して、B-343では50 μM 、B-434では40 μM 、B-3333では40 μM と1/6~1/5 倍ほど小さく、ビオチン標識ポリアミンが従来の基質であるB-5に比べ低濃度で使用可能な基質として有用であることが示唆された。その際、ポリアミン構造の違いにより K_m 値に相違がないこともわかった。すなわち陽電荷を1 つしかもち得ないB-5よりも末端が2 つ以上の陽電荷をもつビオチン標識ポリアミンの方が、酵素に対する親和性が高く、酵素は2 つの電荷を強く認識していることを示しているものと思われる。

細胞内に存在するポリアミンによってビオチン標識ポリアミンによる標識がどのような影響を受けるかを知るために、0.5 mM B-5、0.5 mM B-343を用いて、TGaseに対するポリアミンによる阻害効果を調べた。その結果、Fig.12に示したように、B-5ではB-343に比べて低濃度で活性が阻害され、ポリアミンによる阻害の違いが両者の K_m の違いを反映することがわかった。また、ジアミンであるプトレシン、トリアミンであるスペルミジン、テトラアミンであるスペルミンによる阻害の強さに差はなく、0.5 mM B-343を用いる活性測定に対し、0.5 mM濃度でいずれも50 %阻害を示すことから、生理的ポリアミンとビオチン標識ポリアミンの酵素に対する親和性はほぼ同じであることが示唆された。TGaseは、Fig.13に示すように、生理的ポリアミンの末端のジアミン構造を認識していることが示唆された。TGaseの認識には末端のジアミン構造が重要であることが示されたので、アミノ基に挟まれたメチレン鎖の数が2~7 個のジアミンについてTGase活性の阻害効果について調べた。すると、Fig.14に示したように、メチレン鎖が2 個のジアミンについては阻害効果が弱く、メチレン鎖が3 と4 個のものが強く阻害され、それ以上のものではメチレン鎖が3 と4 個のものに比べ弱い阻害効果を示した。このことは、組織TGaseが生理的な基質として、ポリアミンを認識していることを強く示唆しているものと思われる。

第一章で示したように、生細胞内におけるビオチン標識ポリアミンの挙動を調べるためには、細胞内におけるポリアミンの取り込み系を活性化したり、ポリアミンの分解酵素の阻害剤などを培地に加える必要が生じる。それらの多くはアミノ基を有していることから、TGaseに影響を与える可能性がある。そこで、今回開発した活性測定法を用いて、ポリアミンの生合成や代謝に影響を与えるFig.15に示す阻害剤や試薬がTGase活性に影響を与えるかどうかを調べた。その結果、Fig.16に示すように、TGaseはアミノプロピル構造を持つAPCHAおよびAOAPに阻害効果が見られ、高濃度にこれらの化合物を用いる場合にはTGaseへの影響を考慮する必要があることが示唆された。なお、1級アミノ基をエチル基で保護したBE-333、BE-343、BE-4444で2級アミノ基を末端にもつ化合物は、TGase活性への影響がほとんどないことが示され、TGaseは2級アミノ基をほとんど認識しないこともわかった。

B-5**B-343****B-434****B-3333**

	B-5	B-343	B-434	B-3333
Apparent Vmax (mOD/min)	11.5	17.5	20.0	18.9
Apparent Km (μM)	250	50	40	40

Fig.11 Apparent Km determination for biotinylpolyamine

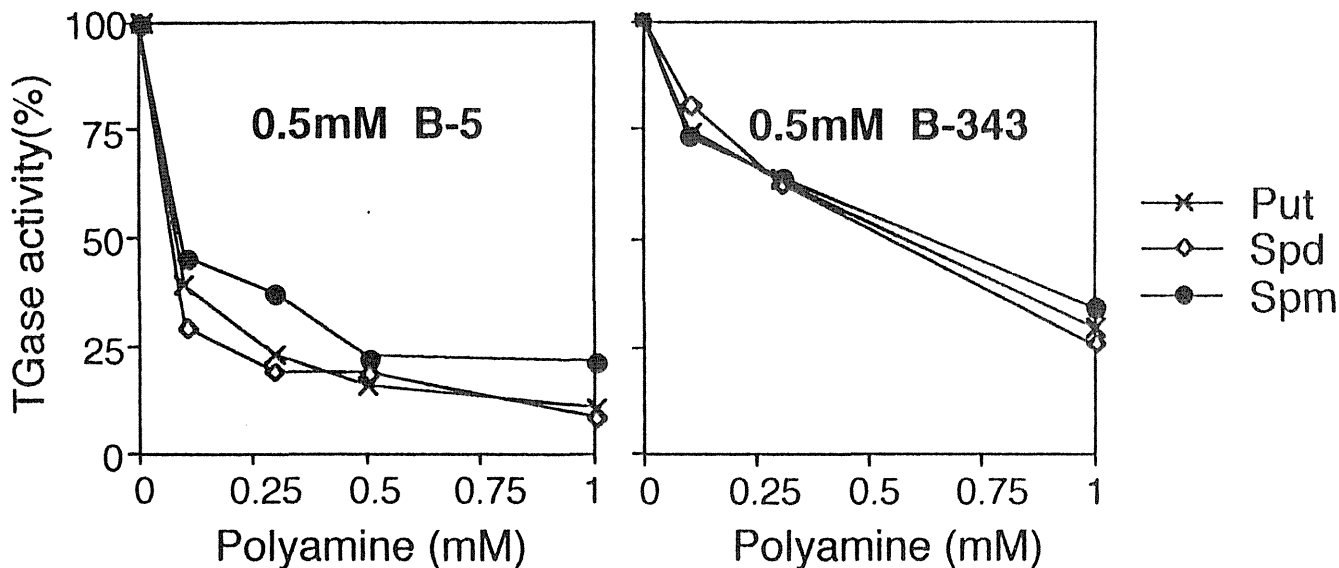


Fig.12 Effect of polyamines on TGase activity

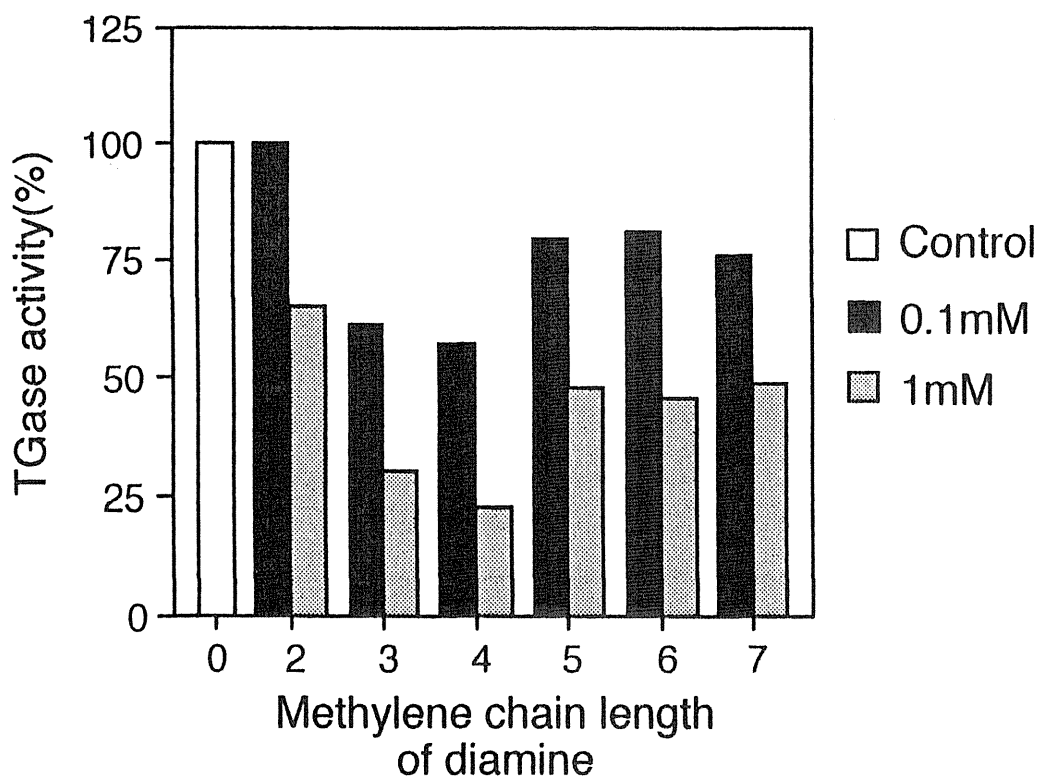
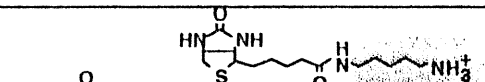
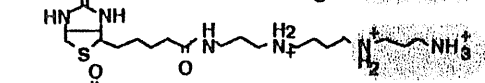
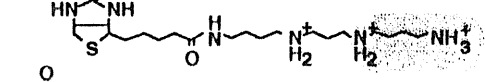
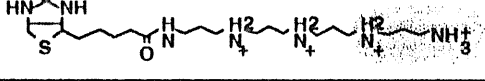


Fig.13 Effect of diamines on TGase activity

Compound	Structure	Substrate activity
B-5		+
B-343		+ +
B-434		+ +
B-3333		+ +

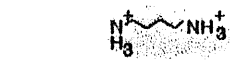
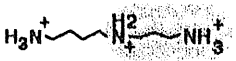
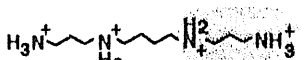
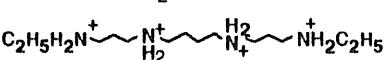
Compound	Structure	Inhibition
Put		+ +
Spd		+ +
Spm		+ +
BE-343		—

Fig.14 Substrate activity of biotinylpolyamines and inhibition of polyamines for TGase

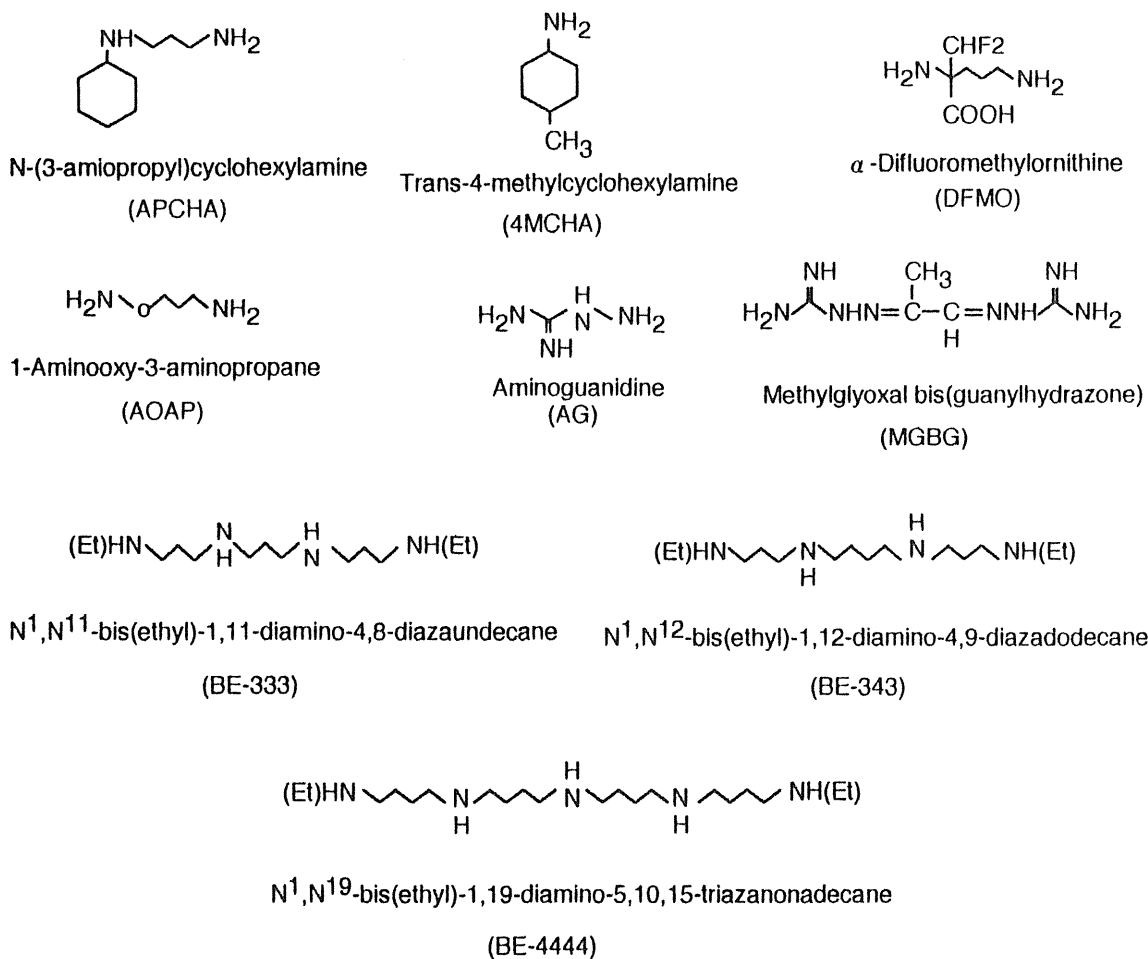


Fig.15 Structures of inhibitors of polyamine biosynthesis

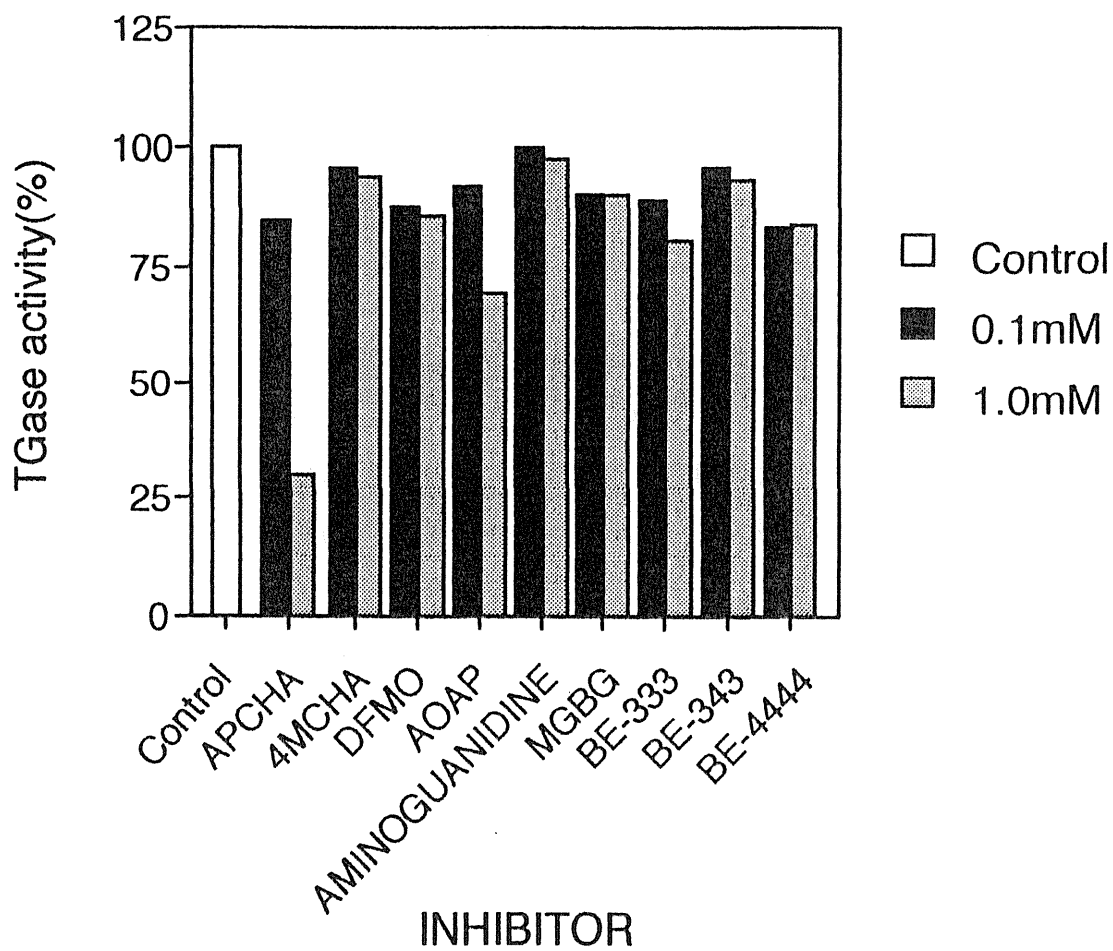


Fig.16 Effect of polyamine biosynthesis inhibitor on TGase activity

第四節 まとめと考察

ビオチン標識ポリアミンは、ジメチルカゼインをタンパク基質としてTGaseとCa²⁺存在下反応させると、効率よくジメチルカゼインと結合し、ビオチン標識されたジメチルカゼインは、ウェスタンブロットにより、従来TGaseの基質として汎用されているB-5に比べて顕著に高感度に検出された。ジメチルカゼインに取り込まれたポリアミン量を、完全加水分解後測定すると、実際、B-5に比べ、多くの取り込みがあることを確認した。しかし、ブロット膜におけるB-5とビオチン標識ポリアミンによる標識ジメチルカゼインの染色強度の差は、取り込み量の差だけでは説明できないため、人工膜へ吸着されたジメチルカゼインに結合しているビオチン分子が、ポリアミン鎖長が長い分、B-5に比べ、アビジン-酵素複合体に認識されやすい可能性も示唆される。

ビオチン標識ポリアミンは本研究においてマイクロプレートを用いるTGaseの活性測定法における基質としても有用であることが明らかになった。その際、種々の基質濃度について行った反応速度論的解析から、みかけのKm値はB-5に比べ、1/5~1/6と小さく低濃度で使用できる基質であることも示された。TGaseによって、より低濃度で認識されることは、細胞内における *in situ*なTGase活性の検出にもビオチン標識ポリアミンが有用であることが示唆される。

生理的ポリアミンによる阻害実験によって、ビオチン標識ポリアミンがポリアミンと同程度にTGaseにより認識されること、また、TGaseが生理的ポリアミンの末端のジアミン構造を認識していることが明らかになった。これらの結果は、生理的条件下、ポリアミンがTGaseによって結合するタンパク質の検出にビオチン標識ポリアミンが有用であることを示していると思われる。

今回の研究結果は、生細胞中でビオチン標識ポリアミンが構造特異的に複数のタンパク質を標識する事実を説明するものではないが、TGaseが関わる生細胞内のポリアミンの反応を考える上で重要な基礎情報になるものと考えられる。

実験方法

1. 試薬

新生仔牛血清(NBS)はCell Culture Laboratories社, 培養実験に用いた他の生化学試薬はすべてSigma社あるいはGibco Laboratories社のものを用いた。牛血清アルブミン(BSA), トランスグルタミナーゼ(TGase), Dithiothreitol(DTT), ジメチルカゼイン(Casein, N, N-Dimethylated), ビオチン化SDS分子量マーカー, クマシーブリリアントブルーR-250はSigma社、アビジン-パーオキシダーゼ複合体, アビジン-アルカリホスファターゼ複合体はBio-Rad社、5-(biotinamido)pentylamine(B-5), Super Signal Substrate(Western blotting)はPierce社, Immobilon-P(transfer membrane)はMillipore社から購入したものを用いた。96穴マイクロタイタープレートはFalcon社(Cat.No 3915)のタンパク質の吸着性の高いポリスチレン・プロバインド(PRO-BIND™)を用いた。その他の化学試薬およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動, 蛋白転写に用いた試薬は、和光純薬工業株式会社, Sigma社, Bio-Rad社から購入したものを用いた。培養細胞に投与したポリアミンアナログおよび1-aminooxy-3-aminopropane(AOAP)は、当研究室で合成したものを用いた。

B-343を除くビオチン標識ポリアミンは、ビオチン活性化エステル⁹⁾に2倍モルのポリアミンを反応させた後、生成物を分取用HPLCにより精製したものを用いた⁹⁾。また、B-343(N¹-biotinyl-1,12-diamino-4,9-diazadodecane)は新規に以下のような合成法を開発し、合成したものを用いた

(Fig.17)。300 mLのナスフラスコ中、MeOH 10 mLにspermine 1 g(4.9 mmol)を溶解し、CF₃COOC₂H₅を0.70 g(4.9 mmol)加え、アセトンドライアイス中で1時間反応させ、さらに氷冷下で1時間反応させた。そこにDi-t-Butyl dicarbonateを4.28 g(19.6 mmol)加え、室温で1時間反応させた後、濃アンモニア水30 mLおよびMeOH120 mLを加え、50℃の水浴中で16時間放置した。溶媒を留去し、この残渣をクロロホルムに溶解してシリカゲルカラムで分離・精製し(クロロホルム：メタノール：NH₃ = 100：10：0.5で溶出)、減圧・濃縮してN⁴, N⁹, N¹²-tri(t-butoxy-carbonyl)

spermineを1.52 g得た¹⁰⁾(収率 ; 61.8 %)。この化合物500 mg(0.99 mmol)をDMF 2 mLに溶解し、ビオチン活性化エステルを646 mg(1.9 mmol)加えて攪拌し、12時間50℃に加熱して反応させた。DMFを留去後、この残渣についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム : メタノール = 10 : 1で溶出)を行った後、分離画分を減圧・濃縮してN¹-biotinyl-N⁴, N⁹, N¹²-tri(t-butoxy-carbonyl)spermineを得た(収率 ; 68.4%)。得られたN¹-biotinyl-N⁴, N⁹, N¹²-tri(t-butoxy-carbonyl)spermineにHCl-Et₂Oを加えて室温で一夜放置して、B-343を得た。(収率 ; 28.7%)

2. トランスグルタミナーゼに対する基質性の検討¹¹⁾

1.5 mLサンプルチューブに全量を50 µLとして、10 mM Tris-HCl(pH8.5), 5 mM DTT, 1 mM ビオチン標識化合物, 10 mM CaCl₂ またはEDTA, 2 mg/mLまたは0.2 mg/mL TGase(gunia pig)を加えて、よく混和した後、10 mg/mL ジメチルカゼインまたは2 mg/mL 細胞抽出液を添加して反応を開始した。反応は、37℃の恒温槽で30分~60分行い、反応停止には、飽和EDTA溶液を反応溶液の1/10量添加した(Fig.19)。

3. ジメチルカゼインに取り込まれたポリアミン量の測定

酵素反応の反応液に、10%トリクロロ酢酸溶液を1 mL添加した後、15分間遠心して得られたペレットに、6 N HClを1 mL加えた。密封後120℃24時間加水分解した後、溶媒を留去した。この残渣を水100 µLに溶解して試料溶液とし、*o*-フタルジアルデヒド-ポストカラムHPLC¹²⁾によりポリアミン測定を行った(Fig.20)。

4. 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℃で保存していた細胞を懸濁培養に供して用いた。培地は、Swim's S-77に50 mM トリシン, 2 g/L グルコース, 2 mM グルタミン, 0.05 mM L-シスチンおよび0.5 g/L NaHCO₃を加えて調製し、培養時に体積比で10% NBSおよびペニシリンGを100 unit/mLになるように加えて用いた。

懸濁培養では $1\sim 10\times 10^5$ cells/mLになるように48 時間毎に植え継ぎ¹³⁾対数増殖期の細胞を実験に用いた。細胞数は、細胞懸濁液を0.4 % トリパンブルー溶液で2 または4 倍に希釈したのち、Burker-Turk型血球測定盤上で計数した。その際、血球測定盤の枠に全体が入っていない細胞は二つで一つの細胞として計数した。測定は5 視野について行い、最高・最低数を除外して3 回の平均を細胞数とした。

5. ビオチン標識化合物を投与した細胞試料の調製法

対数増殖期にある細胞を、血清アミノキシダーゼ阻害剤であるアミノグアニジン(AG)を1 mMになるように加えた培地で48 時間前処理した。48 時間後から上記条件に100 μ M AOAPを加えた培地でさらに48 時間処理し、ポリアミン輸送系を活性化したポリアミン欠乏状態の細胞に100 μ M ビオチン標識化合物を投与し、37 $^{\circ}$ Cで24 時間培養を行った。この細胞をPBSで洗い、遠心して集め凍結融解後、超音波破碎(30 秒毎5 回)を行い、1018 \times gで5 分間遠心した上清を試料とし、電気泳動に供した(Fig.18)。

6. タンパク定量¹⁴⁾

タンパク定量は、クマシーブリリアントブルー 試薬(Bio-Rad社)を用いるBradford法により行った。マイクロプレートに段階希釈した試料を10 μ L入れ、クマシーブリリアントブルー試薬を200 μ L加えた。測定は、プレートリーダー(Bio-Tec Instruments社 EL 312e)を用い、600 nm で測定した。標準タンパクとしてはBSA を用いた。

7. ビオチン標識タンパク質のウェスタンブロット法^{15,16)}

電気泳動用緩衝液(0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 10 % メルカプトエタノール, 40 % グリセロール, 10 % SDS)を試料と同量添加し、沸騰水浴中で3 分間加熱したものを電気泳動用試料とした。泳動ゲルは、10 %、12.5 %(第一化学薬品株式会社 マルチゲル 12.5 Gel size 84 \times 90 \times 1.0 mm)、15~25 %(第一化学薬品株式会社 グラジエントゲル 15/25 Gel size 84 \times 90 \times 1.0mm) [acrylamide : N, N'-methylene-bis(acrylamide) = 1 : 1] (10 \times

14 cm)を用い、ゲル当たり30 mAの電流を流して泳動を行った。泳動後ゲル中のタンパクは、セミドライトランスファー装置(Bio-Craft社)により膜に転写した。即ち、陰極液のプロッティング緩衝液C(Tris-HCl 1.51 g, pH 9.5, H₂O 400 mL, MeOH 100 mL)に浸したろ紙の上にゲルを乗せ、その上にメタノールで前処理して緩衝液B(Tris-HCl 1.51 g, H₂O 400 mL, MeOH 100 mL)に浸したImmobilon-Pを乗せた。さらに、緩衝液B および緩衝液A (Tris-HCl 18.2 g, H₂O 400 mL, MeOH 100 mL)に浸したろ紙を順次乗せて膜1 cm²当たり1.5~2 mA, 30 分で通電した。次に取り出したImmobilon-PをTBS(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl)で洗浄後、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なった。ブロッキングを行ったImmobilon-PはTTBS溶液(0.05 % Tween20-TBS)で5 分間洗った後、TTBSで10,000 倍に希釈した アビジン-パーオキシダーゼ複合体で1 時間、室温で反応させた。次にTTBSで5 分間5 回、さらにTBSで5 分間洗浄して検出を以下の様に暗室で行った。

調製した発光試薬でImmobilon-Pを5 分間処理し、Immobilon-Pより一回り大きく切ったX線フィルムに1 分から90 分間露光させた。フィルムはフジフィルム社の現像液に2 分、 定着液(0.3 % 酢酸水溶液)に1 分、洗浄液に10 分~20 分さらした後、流水中で十分に洗浄後、自然乾燥した(Fig.19)。

8. マイクロプレートによるTGase活性測定⁸⁾

96 穴マイクロタイタープレートに20 mg/mLジメチルカゼインを200 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで1 時間インキュベーションしてウェル内面に吸着させた。このジメチルカゼイン溶液としては0.1 M Tris-HCl(pH 8.5)に懸濁後、80 $^{\circ}$ Cの水浴で20 分間加温して溶解し、12,000 \times gで20 分間遠心した上清をフィルター(0.45 μ M)にかけたものを用いた。吸着されていないジメチルカゼインを取り除いた後、ウェルは0.5 %スキムミルクで30 分間ブロッキングした後、0.1 M Tris-HCl(pH 8.5)を250 μ L加えて二回洗った。ウェル内面のジメチルカゼインとビオチン標識化合物の反応は、 反応液全量を200 μ Lとして、0.1 M Tris-HCl(pH 8.5), 5 mM CaCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ビオチン標識化合物, 2 μ g/mL TGaseを加え37 $^{\circ}$ Cで 1 時間インキュベートして行った。反応液を取り除いた後、200 mM EDTAを250 μ L加え二回

洗って反応を止め、さらに、0.1 M Tris-HCl(pH 8.5)を250 μ L加え二回洗い、さらに、0.5 %スキムミルクで300 倍に希釈したアビジン-アルカリホスファターゼ複合体を200 μ L加え室温で1 時間インキュベーションした。ウェルは0.01%TritonX-100 250 μ Lで一回洗い、さらに、0.1 M Tris-HCl(pH 8.5)250 μ Lで4回洗った。0.1 M Tris-HCl(pH 8.5)160 μ Lおよび0.75 mM *p*-ニトロフェノールリン酸エステル40 μ Lをウェルに加えた。TGase活性は20 分~30 分の10 分間に上昇する405 nmの吸光度からmOD/minとして算出した(Fig.21)。

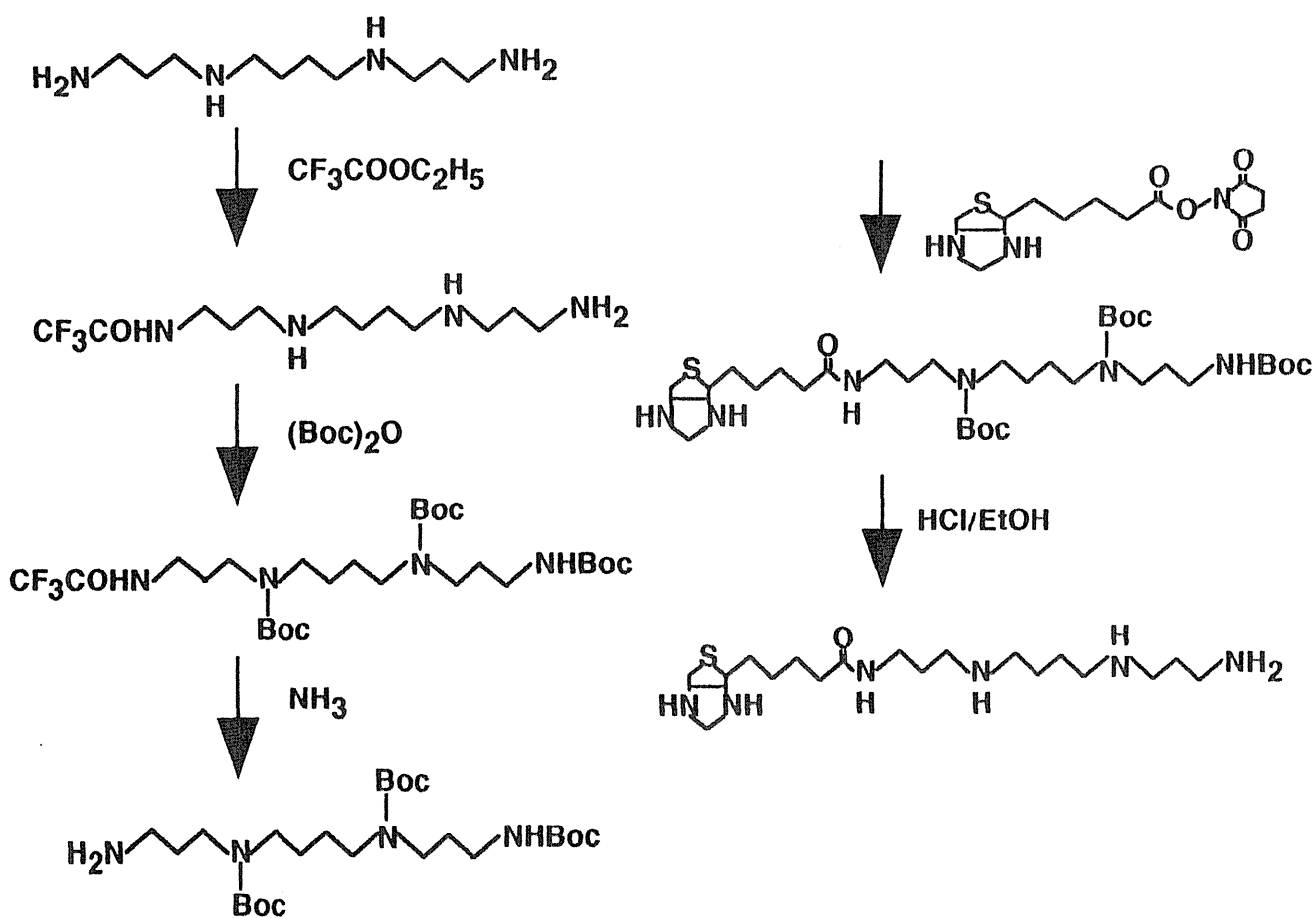


Fig.17 Synthesis of *N*¹-biotinyl-1,12-diamino-4,9-diazadodecane(B-343)

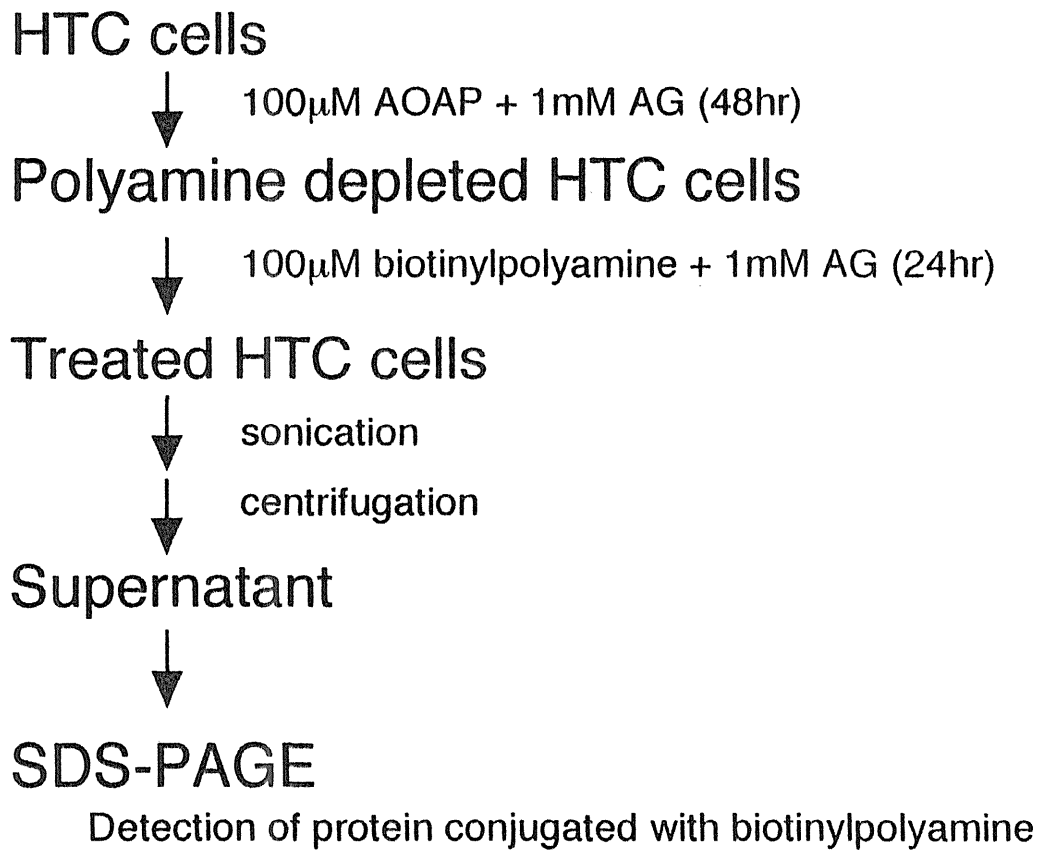


Fig.18 Procedures for cell culture experiment

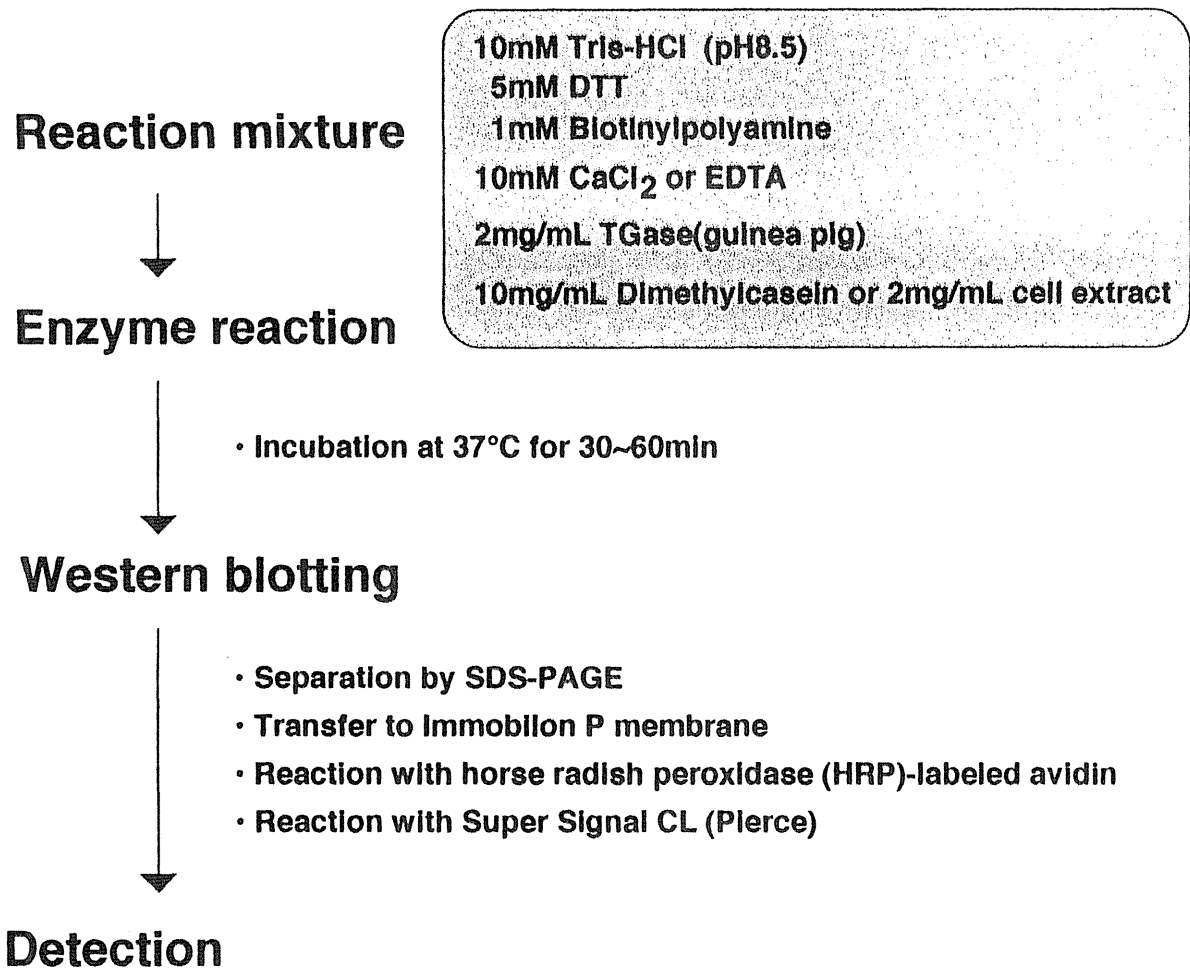


Fig.19 Reaction conditions for TGase and detection of proteins conjugated with biotinylpolyamine

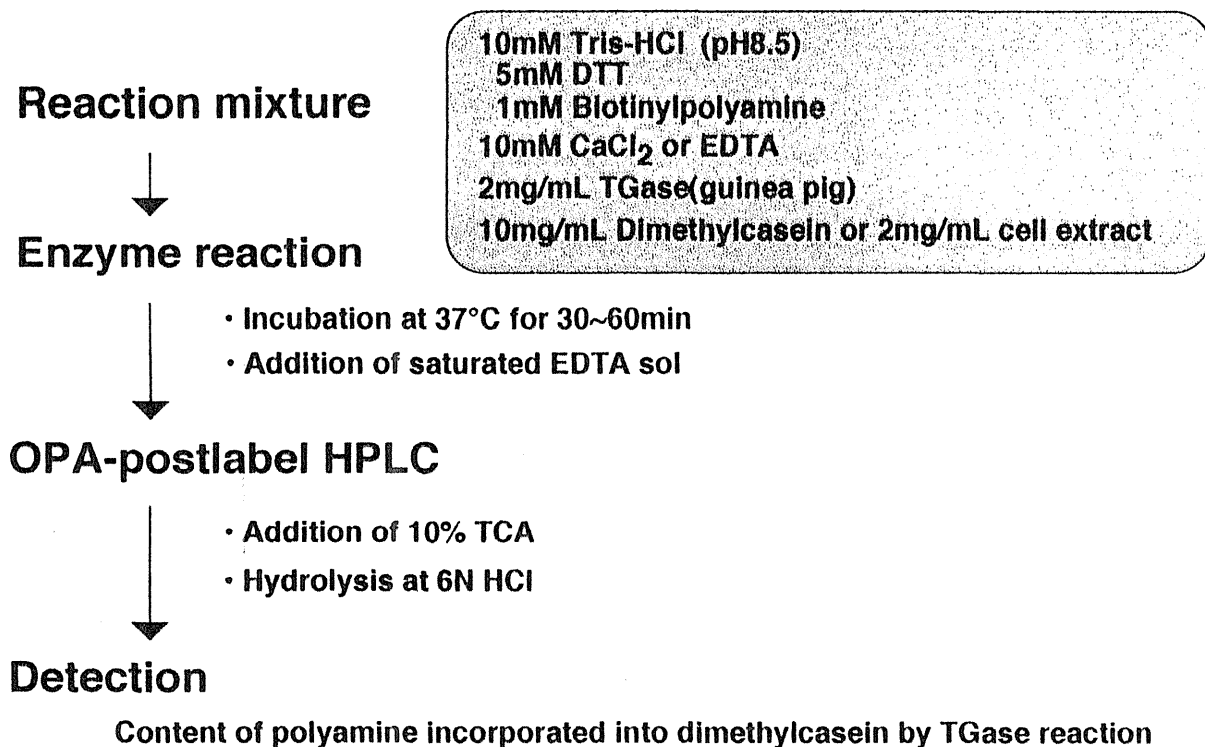


Fig.20 Procedures for content of polyamine incorporated into dimethylcasein by TGase reaction

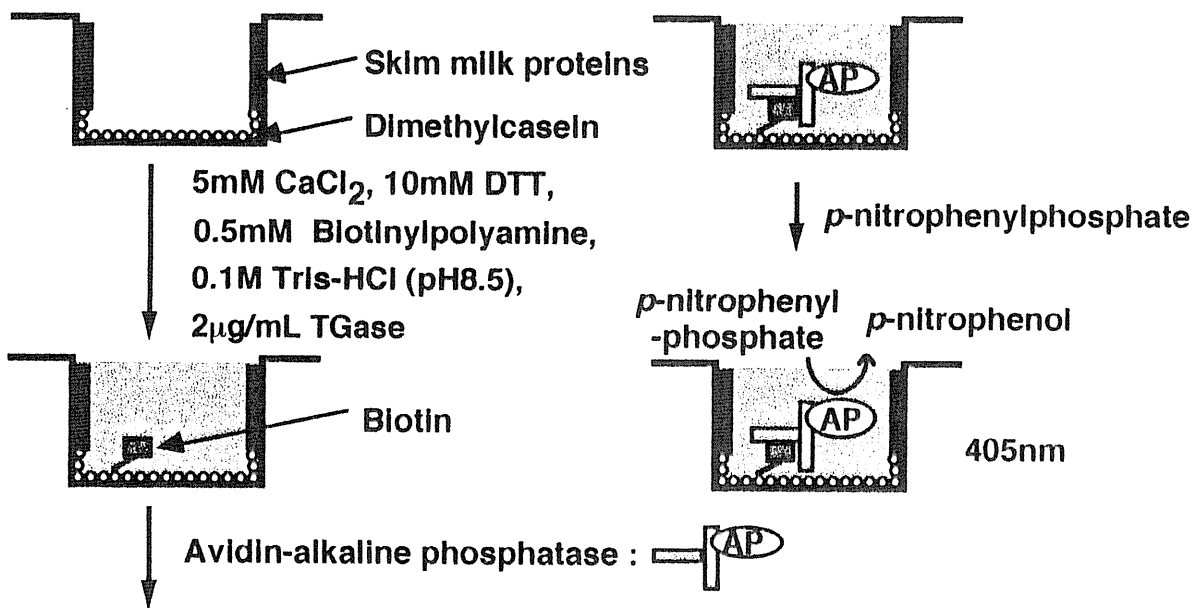


Fig. 21 Procedure for microplate assay of transglutaminase

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, 1988.
- 2) 白幡 晶, *化学と生物*. 28 : 162-171, 1990.
- 3) J.E. Folk, TRANSGLUTAMINASES, *Ann. Rev. Biochem.* 49 : 517-531, 1980.
- 4) 伊倉 宏司, 佐々木 隆造, *化学と生物*. 29 : 81-89, 1991.
- 5) 伊倉 宏司, *生化学*. 第69巻, 第6号 : 416-420, 1997.
- 6) 松鹿美帆, ビオチン標識ポリアミンの合成とポリアミン作用タンパク検出への応用, 城西大学大学院平成九年度修士論文.
- 7) Jianwen Zhang, Mathieu Lesort, Rodney P. Guttman, Gail V. W. Johnson, Modulation of the in Situ Activity of Tissue Transglutaminase by Calcium and GTP, *J. Bio. Chem.* 273 : 2288-2295, 1998.
- 8) Charles S. Greenberg, A Microtiter Plate Transglutaminase Assay Utilizing 5-(Biotinamido)pentylamine as Substrate, *Anal. Biochem.* 205 : 166-171, 1992.
- 9) Becker. J. M, Wilchek. M, Katchalski. E, Irreversible Inhibition of Biotin Transport in Yeast by Biotinyl-*p*-nitrophenyl Ester, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68 : 2604-2607, 1971.
- 10) Ian S. Blagbrough, Practical Synthesis of Unsymmetrical Polyamine Amides, *Tetrahedron Lett.* 39 : 439-442, 1998.
- 11) Singh. R. N, Mcqueen. T, Mehta. K, Detection of the Amine Acceptor Protein Substrates of Transglutaminase with 5-(Biotinamido) Pentylamine, *Anal. Biochem.* 231 : 261-263, 1995.
- 12) A. Shirahata, N. Takahashi, T. Beppu, H. Hosoda, K. Samejima, Effect of inhibitors of spermidine synthase and spermine synthase on polyamine synthesis in rat tissues, *Biochem. Pharmacol.* 45(9) : 1897-1903, 1993.

13) 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.

14) Bradford. M. M, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254, 1976.

15) U.K.Laemmi, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature(London)* 227 : 680-5, 1970.

16) 西方敬人, バイオ実験イラストレイテッド ⑤ タンパクなんてこわくない, 秀潤社, 1997.

スペルルミジン過剰蓄積を伴う細胞死と
ヒストン分解

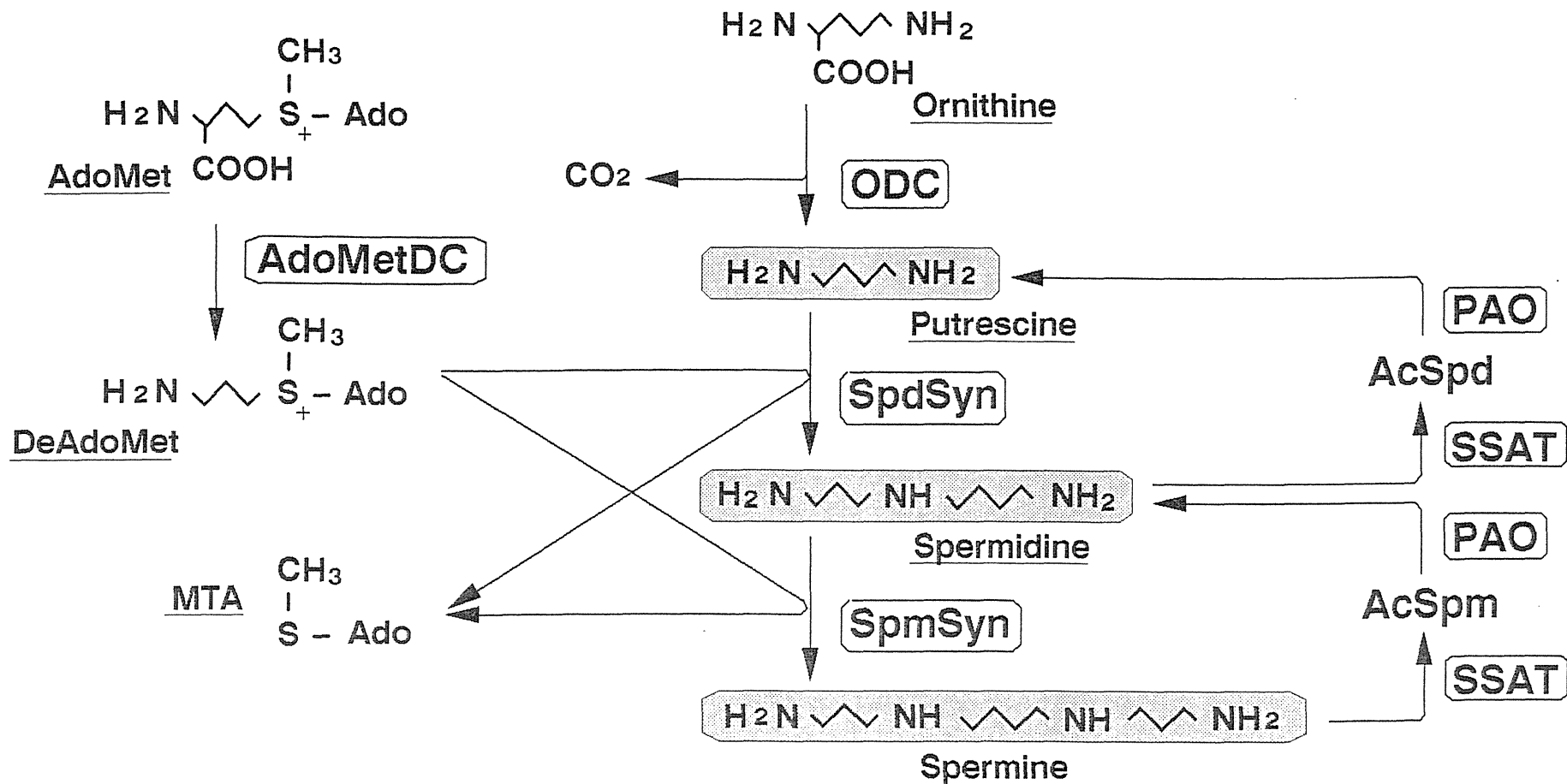
【 緒 言 】

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のプトレシンは、鎖状の脂肪族アミンであり、細胞増殖や分化過程の必須因子として機能している¹⁾。ポリアミンは、試験管内の反応において、DNAのB-Z変換やトポイソメラーゼ活性など多くの生体反応に影響を与えることが明らかになっている。また、ポリアミンに特異的な阻害剤を用いた様々な研究結果は、ポリアミンが核における複製や転写、膜機能そして蛋白合成に関わる多くの細胞内成分に働きかけ、主に、高分子の3次元構造に影響を与え、その機能を調節していることを示唆している。これらの成果は、増殖因子としてのポリアミンの機能に関するものであるが、最近、細胞死に関わる新たな可能性が指摘されるようになった。すなわち、細胞内ポリアミンを枯渇させると、上記の機能に関わる活性が低下して増殖が停止する²⁾のに対して、特殊な条件下、人為的に細胞内ポリアミン濃度を上昇させると、増殖の阻害あるいは細胞死が起きる^{3) 4)}ことが、いくつかの培養細胞系で最近明らかになった。しかし、Fig. 1 に示したようなポリアミン生合成経路あるいは代謝経路により細胞内ポリアミン量は極めて厳密に調節されている¹⁾ため、種々の細胞系でポリアミンの蓄積を実現させるのは困難であり、ポリアミンの蓄積が与える細胞機能への影響やその際観察される細胞死の直接の原因は明確ではない。

当研究室では、これまでオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) 阻害剤を用いてポリアミン欠乏状態にした培養細胞に対する、ポリアミンおよびポリアミンアナログ体の増殖補助作用の違いを観察して、ポリアミンに特異的な作用点を見いだすことを試みてきた⁵⁾。Fig. 2 には、当研究室の深沢が平成5年度修士論文において報告⁶⁾した結果を模式的に示した。すなわち、細胞内ポリアミン合成を ODC 阻害剤である AOAP により阻害すると、プトレシンおよびスペルミジン量は著しく低下し、細胞増殖は停止するが、増殖停止直後にスペル

ミジンを投与すると、細胞は速やかにスペルミジンを取り込み、増殖は回復する。一方、この増殖停止期間すなわちポリアミン欠乏状態の期間を延長した後スペルミジンを投与すると、一時的な細胞数の減少が観察され、その際、細胞内スペルミジン量が通常の6~7倍に過剰蓄積すること、また、電子顕微鏡下、細胞容積の縮小化、膜表面の平滑化、核の凝縮そしてミトコンドリアの障害などが観察されることを報告した (Fig. 3)。また、当研究室の縣は、ポリアミン欠乏細胞が細胞死にいたるまで投与スペルミジンを細胞内に蓄積する原因を検討した⁷⁾。その結果、スペルミジンの過剰蓄積が、取り込み系の活性化の度合いや代謝活性の違いによるものではなく、AOAPの投与期間の延長により活性化された取り込み系の抑制(フィードバック)に関わる新たな蛋白の合成が低下するためであることが示唆された。

本研究は、スペルミジンを過剰蓄積した細胞の成分蛋白の変動を追跡することにより、スペルミジン過剰蓄積による細胞機能への影響やその際観察される細胞死の原因を探ることを目的とした。



-92-

Fig.1 Biosynthesis and interconversion of polyamine

AdoMet: S-Adenosylmethionine , DeAdoMet: Decarboxylated AdoMet , MAT: 5'-Methylthioadenosine

ODC: Ornithine Decarboxylase , AdoMetDC: S-Adenosylmethionine Decarboxylase

SpdSyn: Spermidine Synthase , SpmSyn: Spermine Synthase

SSAT: Spermidine/Spermine N¹-Acetyltransferase , PAO: Polyamine Oxidase

AcSpd: N¹-Acetylspermidine , AcSpm: N¹-Acetylspermine

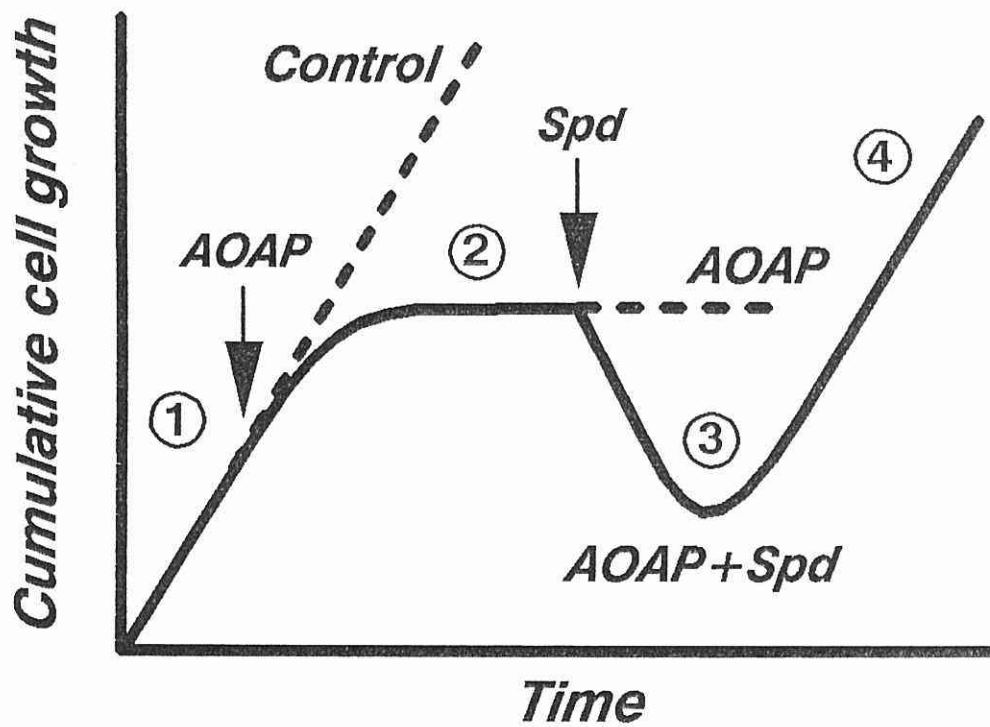


Fig.2 Effect of provision of Spermidine on growth of polyamine-depleted cells

① **Control**

② **AOAP**

③ **AOAP + Spd**

④

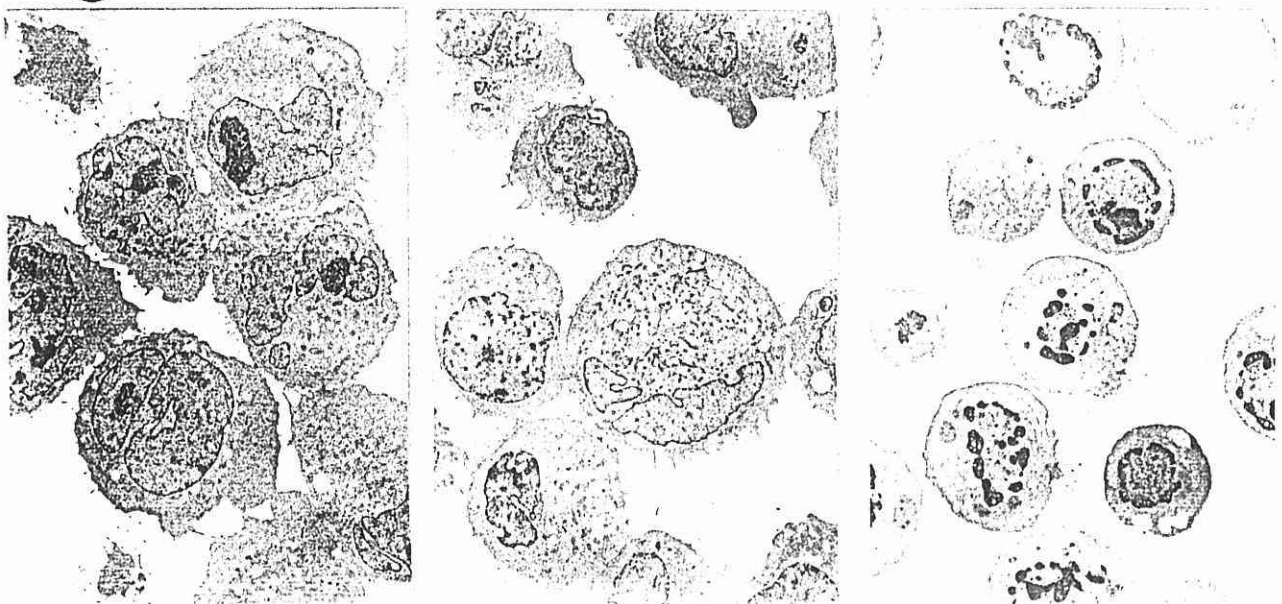


Fig.3 Electron micrographs of HTC cells

【 本 論 】

1. スペルミジン蓄積細胞における細胞成分蛋白の変化

細胞内において、ポリアミンにより活性化を受ける多くの作用は、高濃度のポリアミンによって阻害を受ける²⁾。したがって、ポリアミン過剰蓄積に基づく細胞の増殖阻害は、高濃度のポリアミンによる蛋白合成の抑制が原因であるとする報告³⁾もある。また、本実験系では、スペルミジン蓄積細胞において、細胞容積の縮小や核の凝縮などアポトーシス類似の形態的变化が観察されることから、細胞内における成分蛋白の再編が起きている可能性もある。そこで、スペルミジンの蓄積が細胞の成分蛋白にどのような変化を及ぼすかを調べるために、薬物処理した細胞の成分蛋白を電気泳動的に観察することを試みた。

1 - 1. 不溶性成分を含有する細胞試料の蛋白定量法

蛋白の変動を電気泳動的に観察するにあたり、電気泳動用細胞試料の蛋白量を統一して行う必要がある。しかし、細胞を超音波破碎して得た沈殿画分などの不溶性成分を含む細胞試料液は、その不溶性成分を一定量分取することが困難であるため、一度、その不溶性成分を可溶化した後、蛋白定量を行うことにした。すなわち、不溶性成分を含む細胞試料を SDS およびメルカプトエタノールを含む電気泳動用試料緩衝液に可溶化した試料について、トリクロロ酢酸を加えて析出させた蛋白をアルカリに再溶解し、Bradford 法⁹⁾による蛋白定量を行った。この蛋白の定量法を用いるにあたり、電気泳動用試料緩衝液に可溶化した蛋白を定量的に回収できるかを確認するため、通常、標準蛋白として用いている牛血清アルブミンを用いて添加・回収を行った結果を Fig. 4 にしめす。25 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で蛋白は 95% 以上で検出されたことから、不溶性成分を含む細胞試料液の蛋白定量にはこの方法を用いることにした。

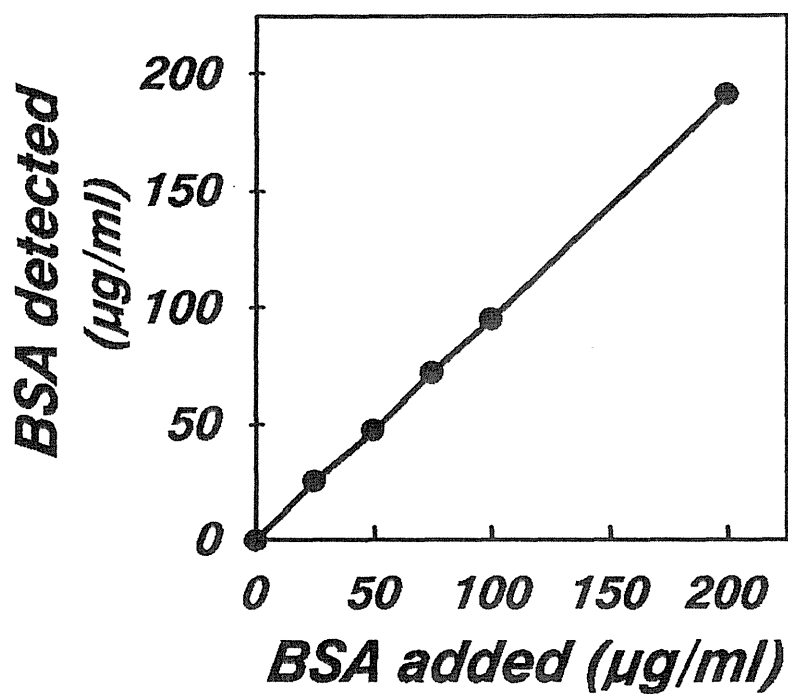


Fig.4 Addition-Recovery for BSA protein solubilized with SDS-PAGE sample buffer by Bradford-Method

1-2. スペルミジン蓄積細胞における細胞成分蛋白の変化

肝再生の過程で観察されるアポトーシスでは、細胞の断片化が起き、アポトーシス小体の生成が知られている¹⁰⁾。この小体は、新たに生じる架橋蛋白を含み、超音波処理により破壊されず、蛋白分解酵素に抵抗性があり、遠心により沈殿画分に回収される。そこで、蛋白成分の電気泳動的観察を行うにあたり、このような小体の生成の可能性を配慮し、細胞破碎試料を遠心操作により分画したものを泳動に供した。

100 μ M AOAP で 4 日間処理した細胞に 10 μ M Spd を投与して 1 時間、12 時間、24 時間および 48 時間後の細胞を超音波破碎して得た細胞試料（上清および沈殿画分）について、分離ゲルの濃度を変えて電気泳動を行った。その結果、Fig. 5 に示すように、上清では、スペルミジン投与後、再現性よく大きな変動を示す蛋白のバンドは検出されなかった。また、沈殿画分では高分子量側に大きく変化のある泳動パターンは観察されず、架橋蛋白の生成は確認できなかった。しかし、Fig. 6-A に示すように、沈殿画分において、低分子量側では、スペルミジン投与後、経時的にいくつかのバンドが薄くなり、新たに出現してくる低分子量のバンドが検出された。これらバンドの変動は、Fig. 6-B に示した増殖曲線におけるスペルミジン投与後の細胞数の減少によく対応していることから、スペルミジンの蓄積が細胞の成分蛋白に影響を与えていることが示唆された。また、強度に変化のあったこれらのバンドは、分子量から核蛋白であるヒストンと考えられ、過剰蓄積したスペルミジンの核成分への影響が示唆された。

さらに、Spd 投与後の細胞の沈殿画分で検出されたバンド強度の変化が、AOAP 処理のみでは起こらないことを確かめるため、処理した細胞の沈殿画分について電気泳動を行った。その結果、Fig. 7 に示すように、低分子量側でバンド強度に若干の変動がみられたものの、AOAP 処理日数を 6 日まで延長してもヒストンと思われるバンドの強度に変化は見られなかった。

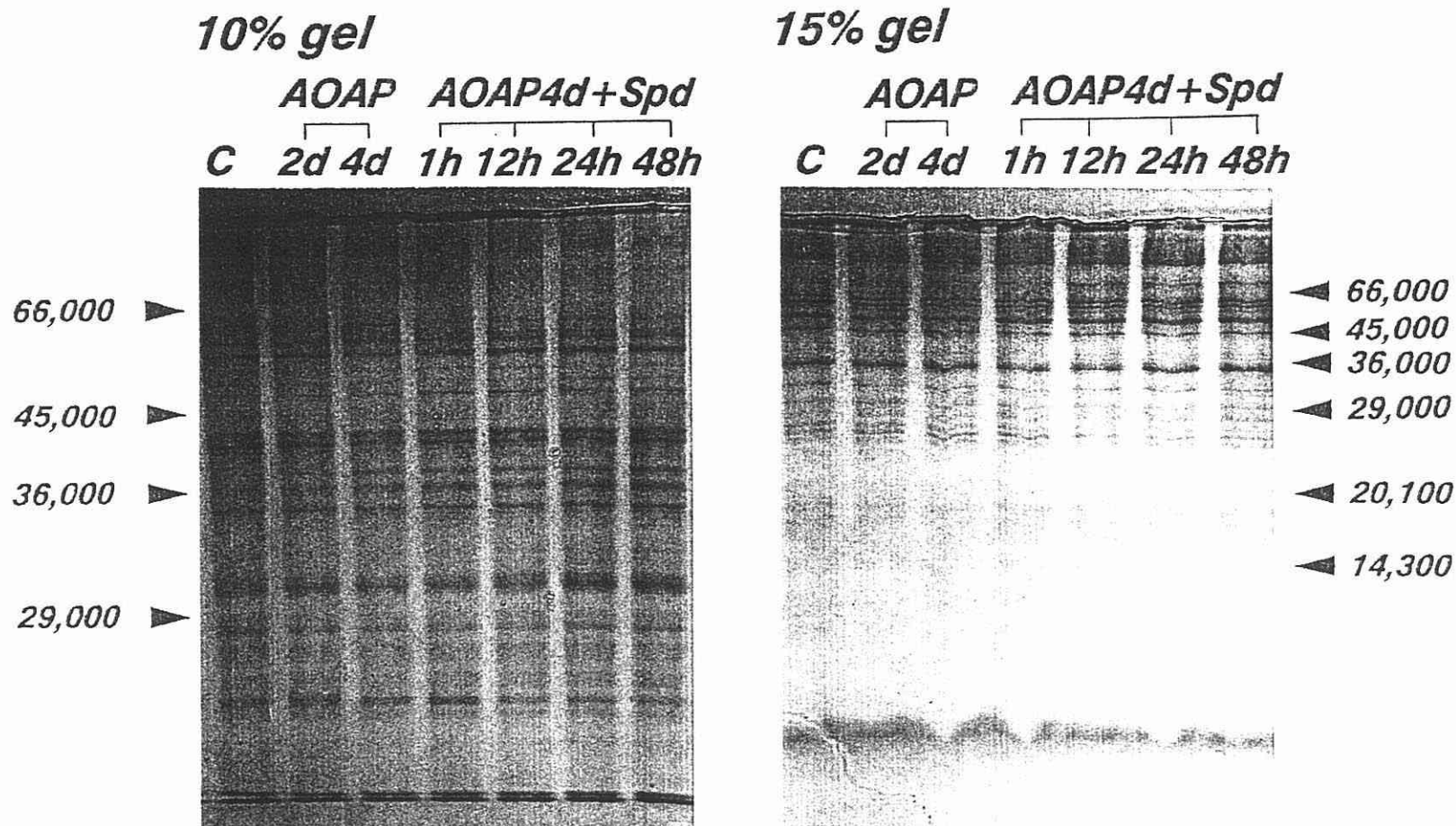


Fig.5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for supernatant of cell homogenate (Coomassie brilliant blue stain)

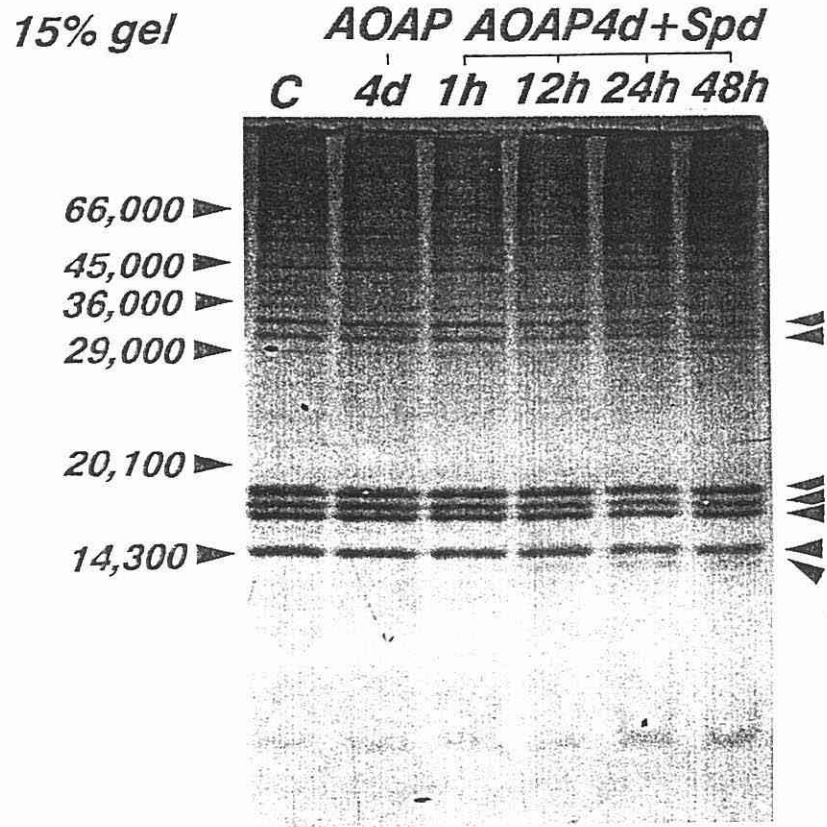
C: コントロール細胞の上清

AOAP 2d, 4d: 100 μ M AOAP を含む培地中で 2 日間 あるいは 4 日間処理した細胞の上清

AOAP 4d + Spd 1~48h: 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した後、100 μ M AOAP

及び 10 μ M Spd を含む培地中で 1~48 時間培養した細胞の上清

(A) *Coomassie brilliant blue stain*



(B)

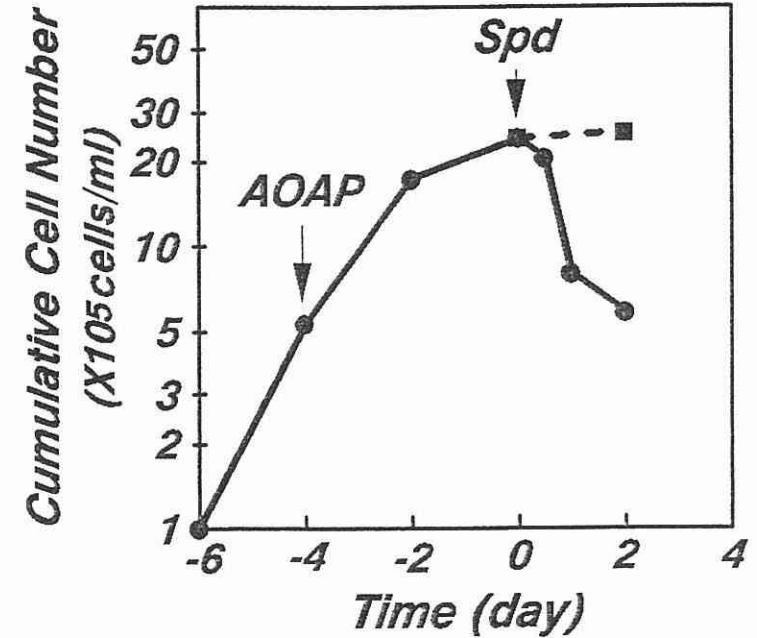


Fig.6 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for precipitate of cell homogenate

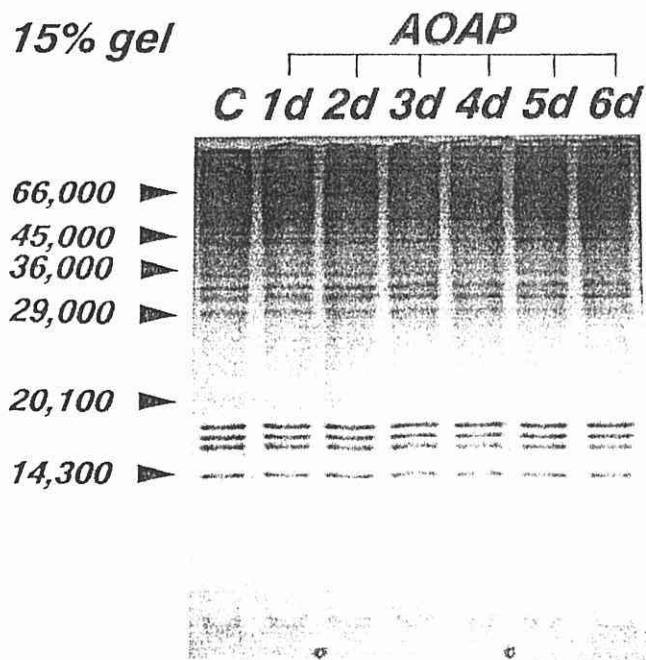
(A) スペルミジン蓄積細胞における沈殿画分の電気泳動図

C: コントロール細胞の沈殿画分、 AOAP 4d: 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した細胞の沈殿画分

AOAP 4d + Spd 1~48h: 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した後、100 μ M AOAP 及び 10 μ M Spd

を含む培地中で 1~48 時間培養した細胞の沈殿画分

(B) 100 μ M AOAP で処理した細胞に 10 μ M Spd を投与したときの増殖曲線



**Fig.7 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
 for nucleus fraction of cells treated
 with AOAP
 (Coomassie brilliant blue stain)**

C : コントロール細胞の沈殿画分

AOAP 1d~6d : 100 μ M AOAP を含む培地中で 1~6 日間処理した細胞の沈殿画分

1-3. スペルミジン蓄積細胞におけるヒストン分解

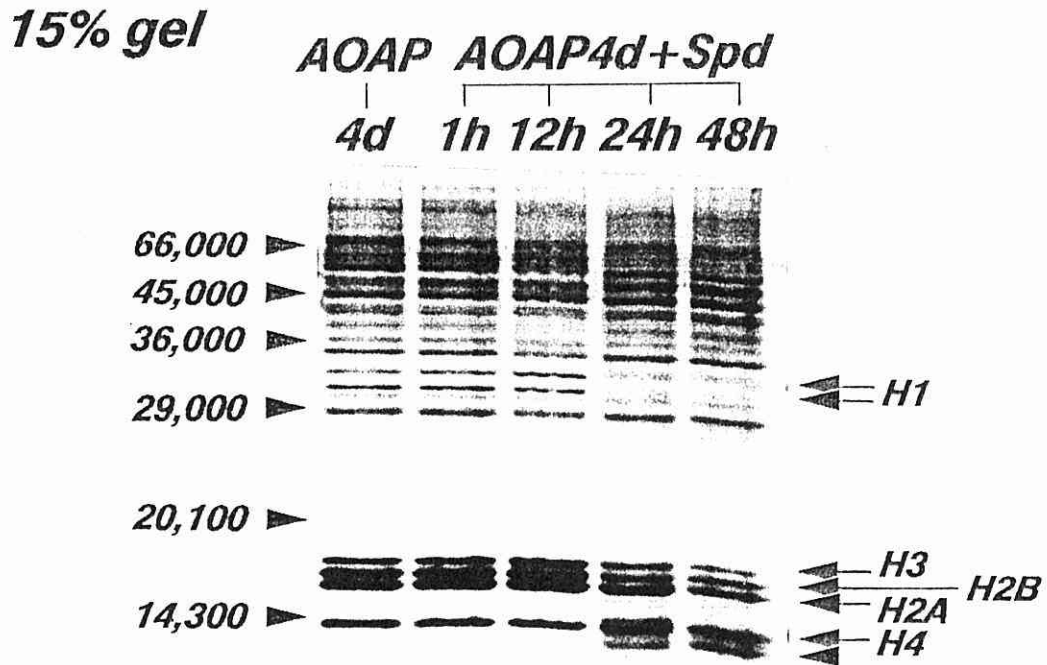
過剰蓄積したスペルミジンによる核成分への影響を調べるために、常法に従い細胞分画を行い核画分を得て、その成分蛋白について電気泳動を行った。その結果、Fig. 8 に示すように、沈殿画分と同様、スペルミジン投与後、ヒストンと思われる成分（ヒストン H1-1、H1-2 および H3）の減少が観察された。

なお、これらバンドのいくつかは、Sigma 社のウシヒストンフラクション（H2B、H3 および H4 を含む）をウサギに免疫して得たポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、検出されたことからヒストンであることを確認した（Fig. 9）。

スペルミジン投与後、ヒストンのバンドの減少だけでなく、各レーンで全体がぼやけ、低分子量側での染色が濃くなる傾向が見られたことから、蛋白分解によるヌクレオソームの構造破壊が進んでいる可能性が示唆された。

次に、スペルミジン投与によるヒストン分解が、スペルミジン過剰蓄積により起きている可能性を探るために、スペルミジン濃度を 10 倍（ $100\mu\text{M}$ ）にしてスペルミジンをより過剰蓄積させ、細胞死への影響を比較した。Fig. 10 には、 $100\mu\text{M}$ スペルミジン濃度を投与した時の増殖曲線を $10\mu\text{M}$ 投与したものと比較して示した。スペルミジン投与後の細胞数の減少は、 $10\mu\text{M}$ および $100\mu\text{M}$ とともに同様の減少を示した。その際、 $10\mu\text{M}$ スペルミジンと同様、細胞容積の縮小が観察された。これらの細胞について、スペルミジン量を測定したところ、投与後 15 時間で、スペルミジン量は約 $46\text{ nmol}/10^6\text{ cells}$ となり、少なくとも、スペルミジン $10\mu\text{M}$ を投与したときの約 1.9 倍、また、コントロール細胞の約 11 倍のスペルミジンを蓄積したことが確認された（Fig. 11）。また、Fig. 12-A には、この時の細胞の核画分についての電気泳動の結果を示した。 $100\mu\text{M}$ スペルミジン投与後、蛋白の分解が

徐々に進んでいることが明瞭に観察された。特に、投与後 15 時間において、ヒストン H 2A、H 2B、H 3 および H 4 のバンド強度にほとんど変化は見られないのに対して、ヒストン H 1 の 2 本のバンドについては、検出はわずかであった。また、このゲルを吸光度計でスキャンして得たチャートを Fig. 12-B に示した。蛋白量を統一して電気泳動したため、スペルミジンの投与後、ヒストン H 2A、H 2B、H 3 および H 4 の各ピークが徐々に小さくなるにつれ、高分子量側のピークが全体的に高くなったが、ヒストン H 1 の 2 本のピークの減少が他のヒストンのピークに比べて速く進んでいることが確認された。これらの結果から、スペルミジン過剰蓄積による細胞死では、細胞死が完全に起きる前の細胞にリンカーであるヒストン H 1 の分解が生じていることが示唆された。



**Fig.8 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
for nucleus fraction of cells
(silver stain)**

AOAP 4d : 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した細胞の核画分

AOAP 4d + Spd 1~48h : 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した後、100 μ M AOAP
及び 10 μ M Spd を含む培地中で 1~48 時間培養した細胞の核画分

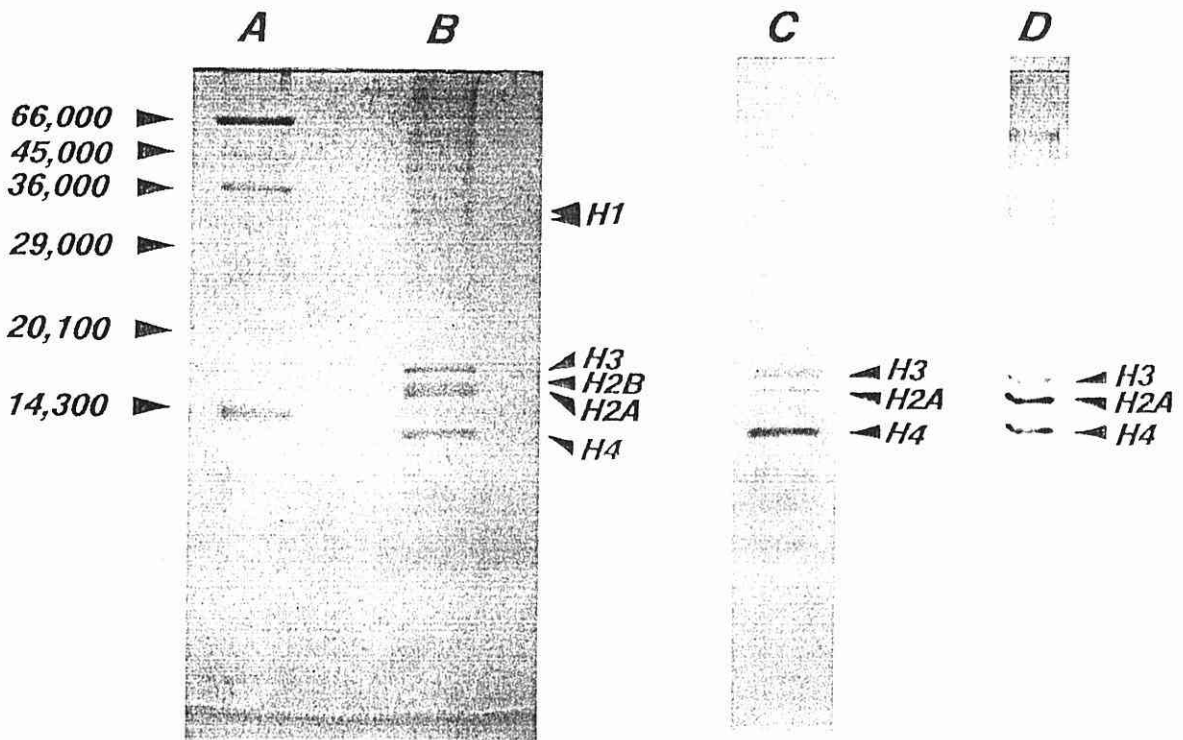


Fig.9 Western blotting for nucleus fraction of HTC cells with antisera raised against bovine histone fraction

A, B, D : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したゲル

A : 分子量マーカー

B : コントロール細胞の核画分

D : 抗原として用いたウシヒストンフラクション

A, B はクマシーブリリアントブルー染色、D は銀染色により検出した

C : ウシヒストンフラクションをウサギに免疫して得た抗血清によるコントロール細胞の核画分に対するウェスタンブロット

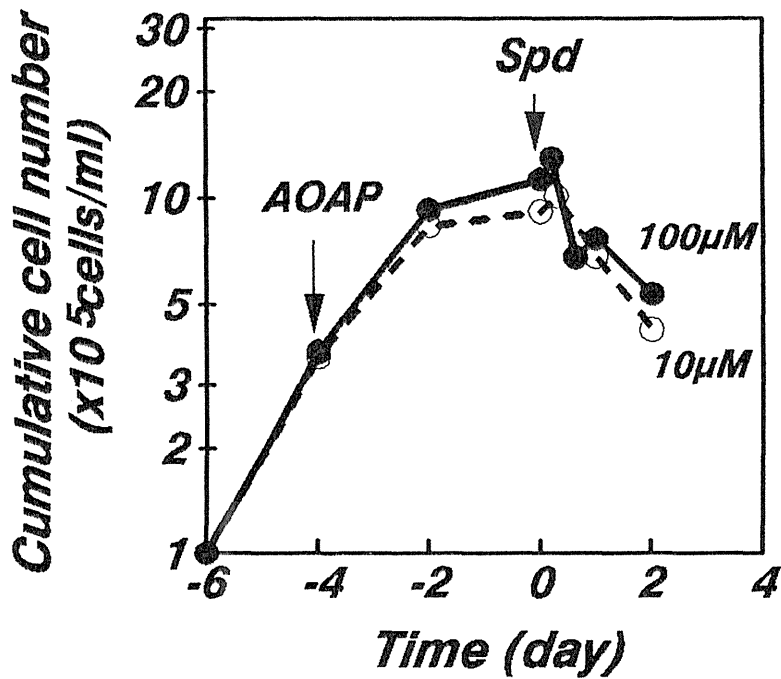


Fig.10 Effect of 100µM spermidine on polyamine-depleted cells

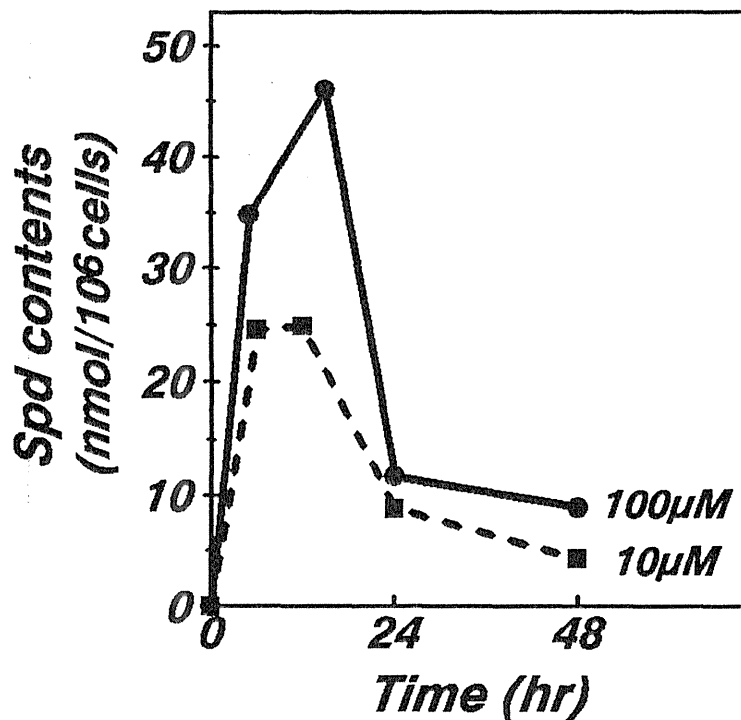


Fig.11 Polyamine contents of polyamine depleted cells administered 10µM and 100µM spermidine

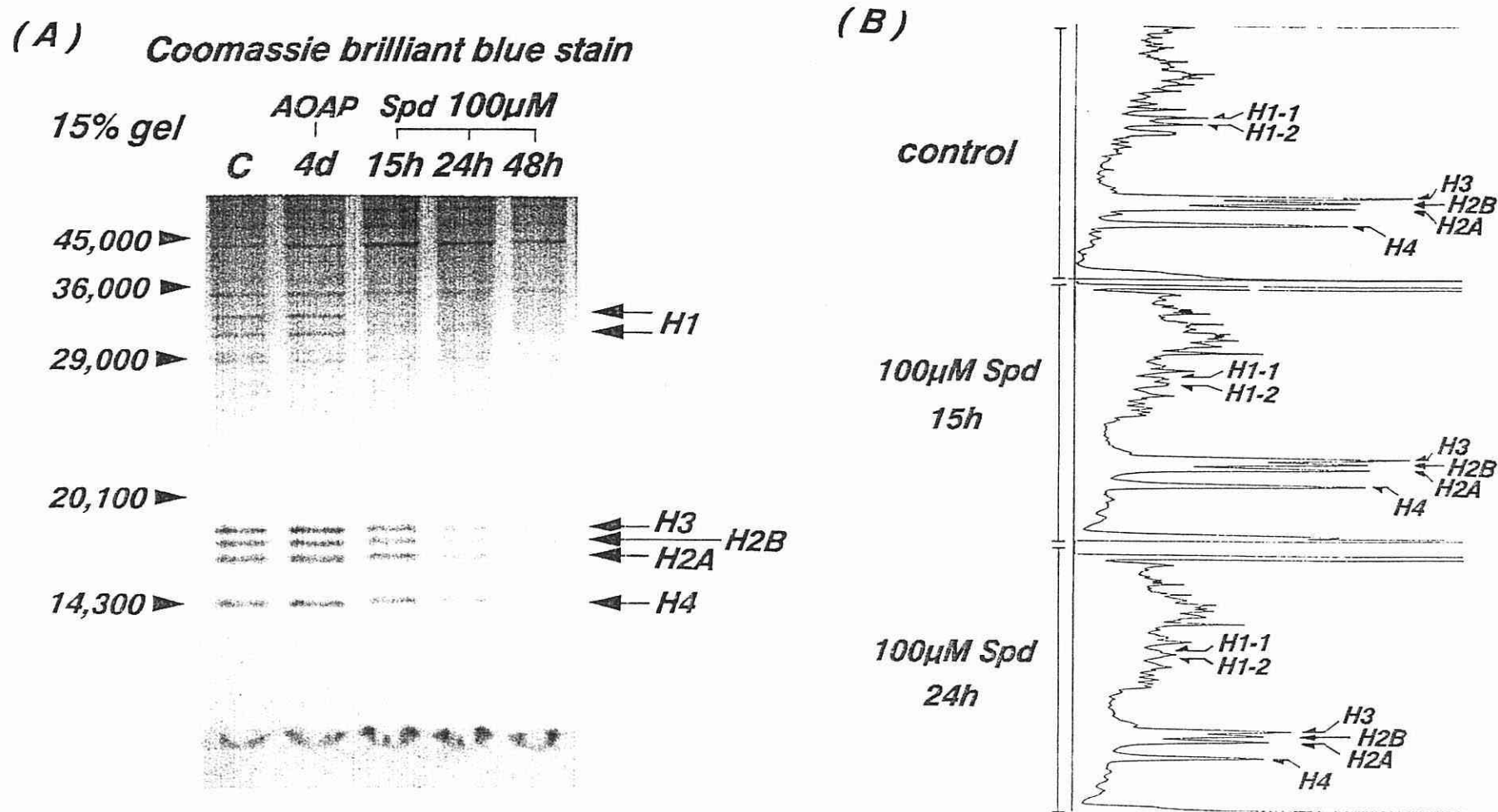


Fig.12 Histone degradation by 100 μ M spermidine administration

- (A) 100 μ M スペルミジンを投与した細胞の核画分についての電気泳動図
 C: コントロール細胞の沈殿画分、AOAP 4d: 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した細胞の沈殿画分
 AOAP 4d + Spd 15~48h: 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した後、100 μ M AOAP 及び 100 μ M Spd を含む培地中で 15~48 時間培養した細胞の沈殿画分
- (B) A のゲルを吸光度計でスキャンして得た各薬物処理細胞の核画分についてのチャート

1-4. 異なる細胞死を起こさせた細胞との比較

スペルミジン投与後に観察されたヒストンの分解が、スペルミジン蓄積細胞に特徴的に起こるものかどうかを調べるため、異なる細胞死を起こさせた細胞の核画分について電気泳動を行い、比較することを試みた。

動物細胞にとって、増殖する最適 pH は通常 7.2~7.6 の範囲にあり、培地 pH の変化は、細胞増殖において致命的な障害を与えるものと考えられる。そこで、塩酸処理により培地 pH を変えて培養し、pH 6.5 の培地での培養後 24 時間において細胞数の減少が観察された細胞を採取した (Fig. 13)。

同様に、細胞増殖に必要な栄養分を補わないよう培地交換せず、長期培養して細胞数の減少が観察された 120 時間後の細胞を採取した (Fig. 14)。

一方、死んだ細胞の核蛋白が、培地中でインキュベーションすることにより、どのように分解されるかを調べるため、細胞を超音波破碎して得た核および細胞断片に培地を加え 24 時間インキュベーションしたもの (Fig. 15)、同様に、採取したコントロール細胞を一度凍結融解して破壊した後、培地を加え 24 時間インキュベーションしたものを採取した。

これら異なる細胞死を起こさせた細胞の核画分あるいは細胞断片について、行った電気泳動の結果を Fig. 16 に示す。スペルミジン投与後の泳動パターンに比べて、pH 6.5 の培地を用いた場合あるいは栄養不足の培地を用いた場合では、ヒストンの分解はわずかであり、2 本のヒストン H1 の分解はほとんど観察されなかった。また、超音波破碎後あるいは凍結融解後インキュベーションした場合には、2 本のヒストン H1 の分解が著しく、ヒストン H3 よりも H2B の分解が進んでおり、さらに新たに別のバンドの出現が観察された。このように、物理的処理後インキュベーションでもヒストンの分解が観察されるが、スペルミジン蓄積細胞における泳動パターンとは異なることが分かった。したがって、スペルミジン蓄積細胞におけるヒストンの分解が、単なる物理的な細胞死の結果ではないことが示唆された。

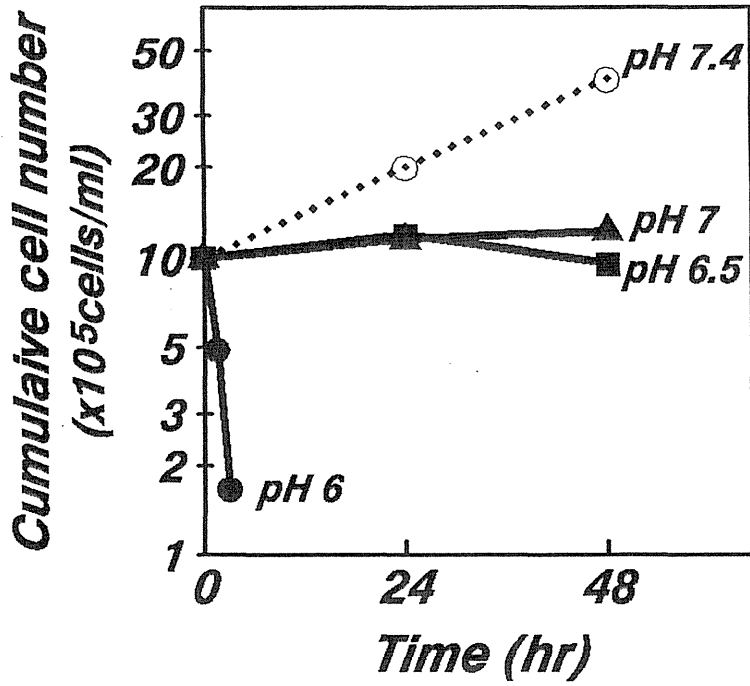


Fig.13 *Effect of acidic medium on growth of HTC cells*

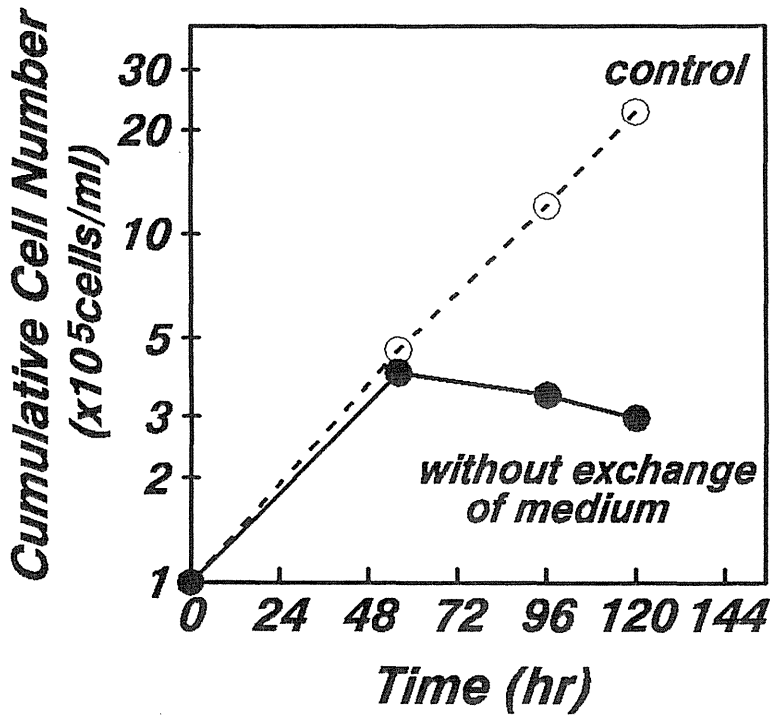
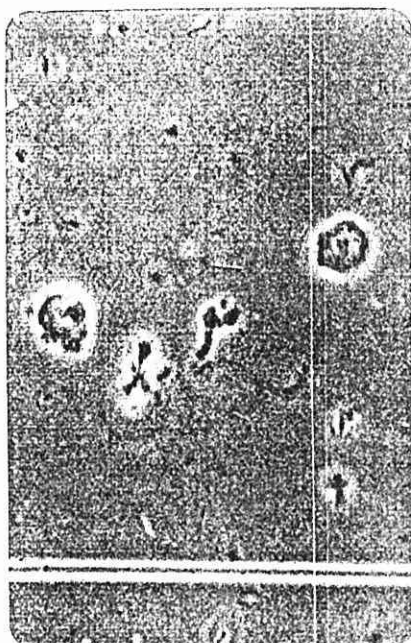


Fig.14 *Growth of HTC cells without exchange of medium*

(A) before incubation



(B) after incubation

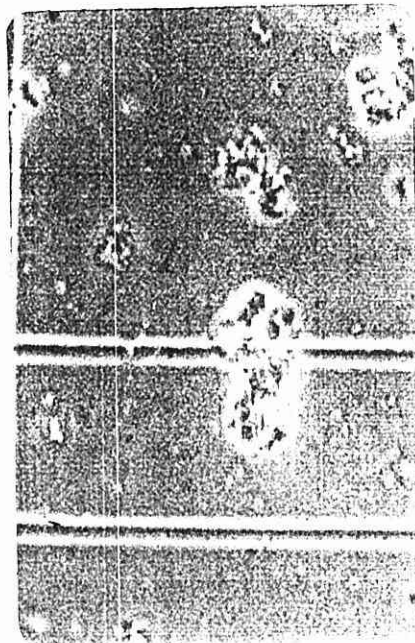


Fig.15 Video-photographs of cell debris incubated for 24h after sonication of HTC cells

15% gel

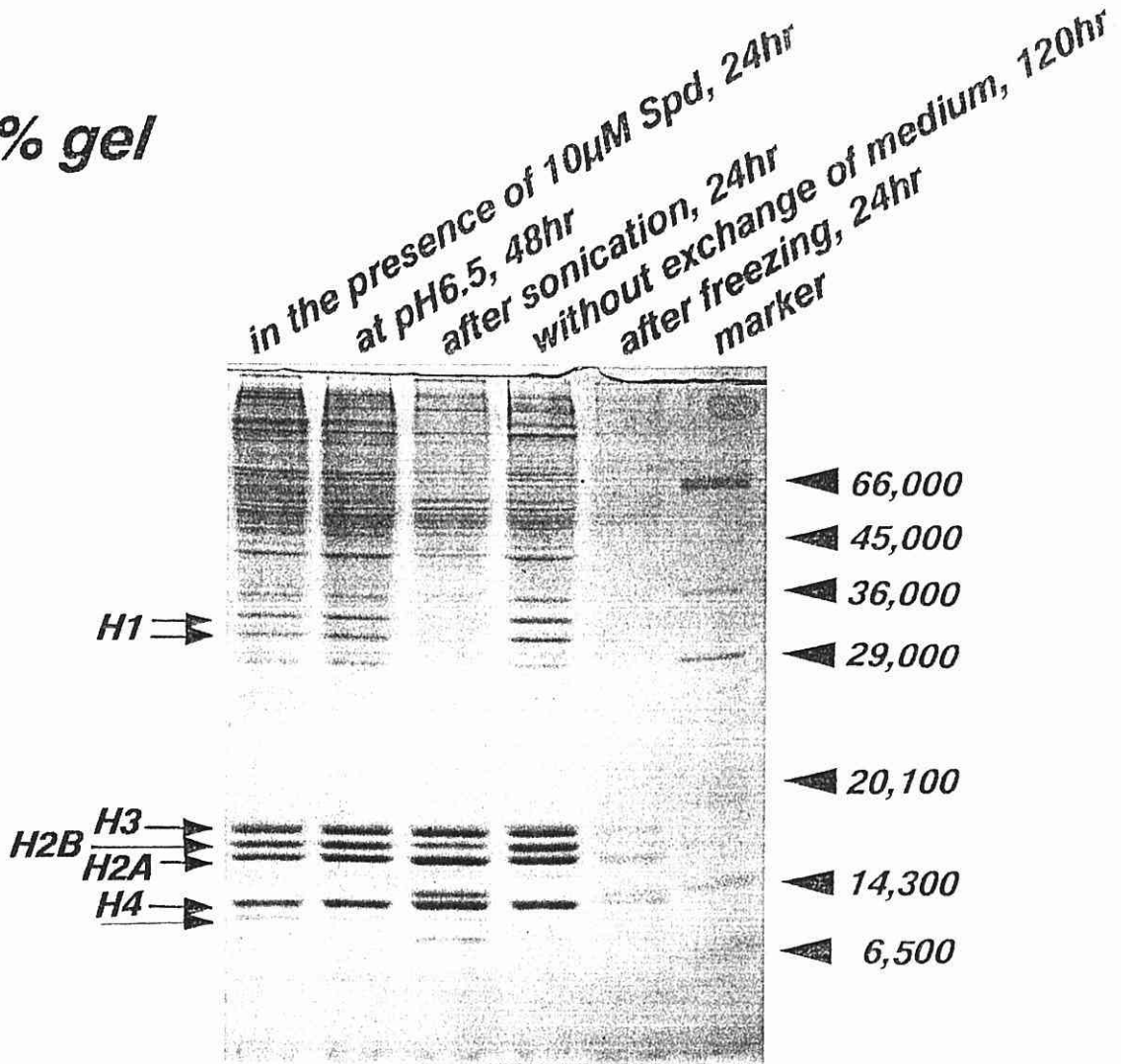


Fig.16 Electrophoretograms for nuclei of cells treated under various conditions (Coomassie brilliant blue stain)

in the presence of 10 μ M Spd, 24h : 10 μ M スペルミジンを投与後 24 時間経過した細胞の核画分

at pH6.5, 48h : 酸性培地 (pH6.5) で 48 時間培養した細胞の核画分

after sonication, 24h : 超音波破碎後、培地中で 24 時間 インキュベーションした細胞

without exchange of medium, 120h : 培地交換せず長期培養を行った細胞の核画分

after freezing, 24h : 凍結融解後、培地中で 24 時間 インキュベーションした細胞あるいは細胞断片

marker : 分子量マーカー

2. スペルミジン蓄積細胞に対する蛋白分解酵素阻害剤およびヌクレアーゼ阻害剤投与の影響

スペルミジン蓄積細胞において観察されるヒストンの分解が細胞死の原因となる可能性が考えられるため、蛋白分解酵素阻害剤の投与による影響を調べることにした。阻害剤としては、本実験系の細胞と類似した細胞形態を示すアポトーシスがセリンプロテアーゼ阻害剤により抑制されることが知られている¹¹⁾ため、セリンプロテアーゼ阻害剤を選択した。阻害剤としては、比較的効果が大きくかつ入手容易な、トリプシントイプ阻害剤である

TLCK (N α -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone)、キモトリプシントイプ阻害剤であるTPCK (N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone) および非特異的に阻害を示す TAME (N α -p-tosyl-L-arginine methyl ester) を用いることにした。

一方、スペルミジン蓄積細胞において、ヌクレオソームの構造破壊が示唆されることから、ヒストンの分解と DNA の切断との関連について調べるため、ヌクレアーゼ阻害剤による影響を調べることにした。そこで、ヌクレアーゼ阻害剤としては、トポイソメラーゼ II を阻害し、アポトーシスを抑制するとされる ATA (Aurintricarboxylic acid)¹²⁾を用いた。

2-1. 蛋白分解酵素阻害剤の影響

各セリンプロテアーゼ阻害剤投与による影響を調べるにあたり、各阻害剤の濃度はヘパトサイトにおいて誘導されるアポトーシスを抑制するとされる濃度¹³⁾を文献に従い選択し、それぞれ 100 μ M TLCK、20 μ M TPCK および 5mM TAME として、HTC 細胞の増殖には影響しないことを確認した後、スペルミジン蓄積細胞において観察されるヒストン分解に対するこれら阻害剤の影響を調べた。尚、各阻害剤とも AOAP で 4 日間処理したポリアミン欠乏細胞に、スペルミジンと同時に投与した。

Fig.17 には、その時の増殖曲線を示した。スペルミジンのみ投与したとき観察される細胞数の減少は、TPCK あるいは TAME 併用投与により、むしろ顕著だったが、TLCK 併用投与では細胞数の減少を若干抑制していることが確認された。これら阻害剤を併用投与した細胞についてポリアミン量を測定したところ、各阻害剤とも 6 時間以内にコントロール細胞の約 6 倍以上の蓄積が観察され、スペルミジンの取り込みに影響がないことがわかった (Fig.18)。

これら投与した阻害剤が細胞内で有効に働いているかどうかを調べるため、細胞の核画分について電気泳動を行った。Fig.19-A に各阻害剤をスペルミジンと同時に投与後、24 時間経過したときの細胞の核画分についての電気泳動図を示した。各阻害剤の投与により、泳動パターンに変化が見られた。すなわち、スペルミジン投与前の細胞では、ヒストンが明瞭に検出されているのに対して、スペルミジン投与後、いくつかのバンド強度が低下するが、TLCK 併用投与により一部のバンド強度に回復傾向がみられた。一方、TPCK あるいは TAME 併用投与では、バンド強度にほとんど回復はみられず、さらに低分子量のバンド強度に影響を与えていることから、ペプチドの断片化を阻害することが示唆された。

さらに、このゲルをスキャンして得たバンド強度から、各ヒストンのコン

トロール細胞に対する残存%を求めた (Fig. 19-B)。TPCK あるいは TAME 併用投与では、リンカーヒストンであるヒストン H1-1 の分解が著しかったのに対して、TLCK 併用投与では、ヒストン H1-1 の残存%が 35% と最も大きく検出されたのをはじめ、全体的にヒストンの残存%が大きいことがわかった。

セリンプロテアーゼ阻害剤である TLCK により、スペルミジン蓄積によるヒストン分解および細胞死が一部抑制されたことから、スペルミジン蓄積による細胞死がヒストン分解による可能性が示唆された。

TLCK 併用投与による細胞死の抑制が不完全であったので、TLCK の濃度を 100、200 および 400 μM に変えて同様の実験を行った。その結果、Fig. 20 に示すように、TLCK 濃度 400 μM ではその毒性により、スペルミジン過剰蓄積による細胞数の減少をさらに促進したが、200 μM までは再現性よく細胞数の減少を抑制することが観察された。この時の細胞内スペルミジン量を調べたところ、Fig. 21 に示すように TLCK 400 μM ではスペルミジンの蓄積量に若干の低下がみられたが、200 μM あるいは 100 μM では、対照と同等かそれ以上の蓄積が見られ、スペルミジン量の差が、細胞数の抑制に直接関係していないことが推察された。Fig. 22 には、各濃度の TLCK をスペルミジンと同時に投与後、24 時間経過した細胞の核画分についての電気泳動の結果を示す。TLCK の濃度が高くなるほどヒストン H1-1 のバンドの強度が大きく検出された。これより、スペルミジン過剰蓄積によるヒストン分解、特にヒストン H1-1 の分解は TLCK により抑制されることが再確認された。

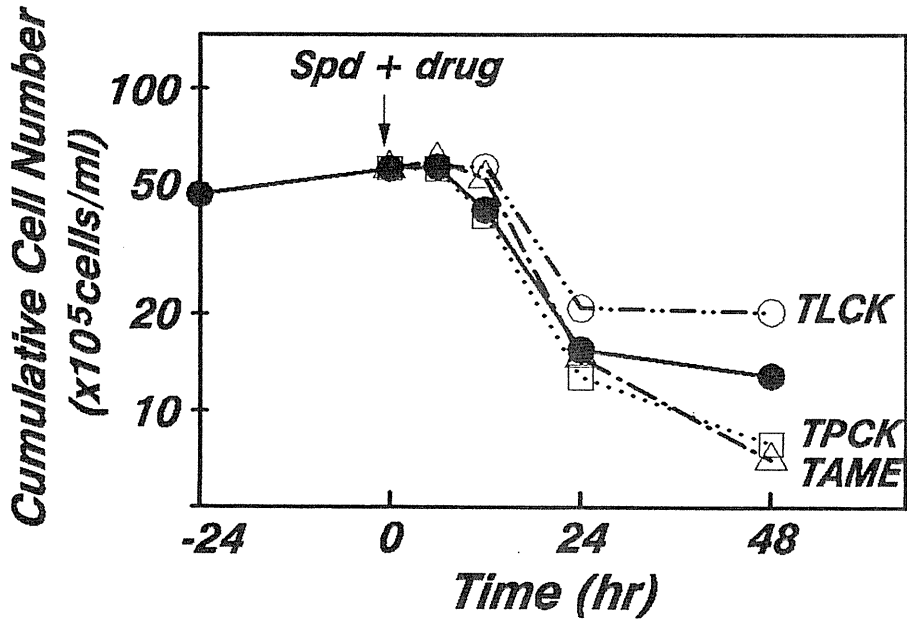


Fig.17 *Suppression of spermidine dependent cell death with serine protease inhibitors*

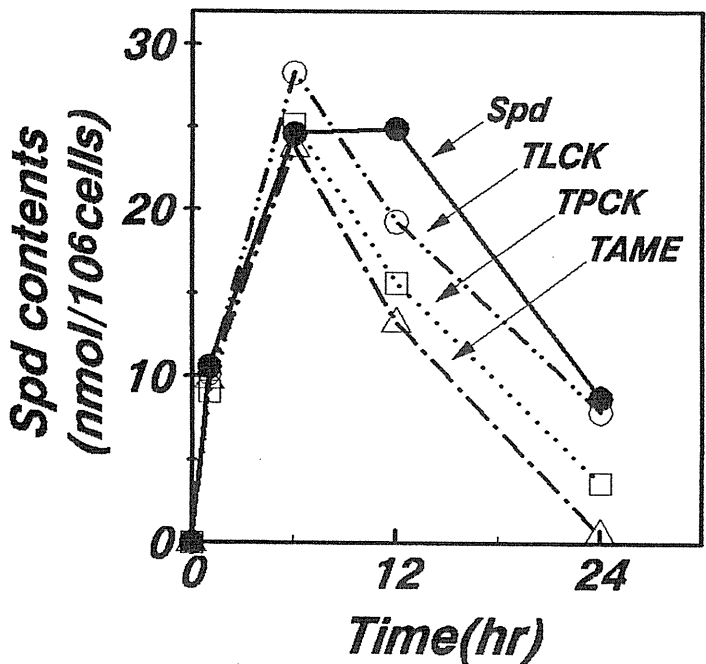


Fig.18 *Effects of serine protease inhibitors on spermidine accumulation*

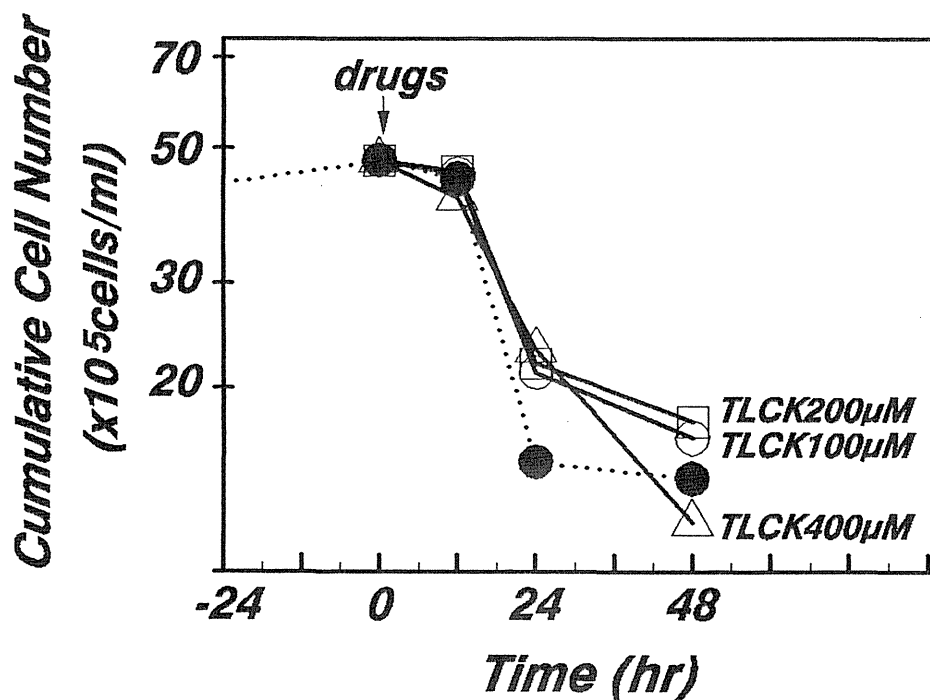


Fig.20 Effect of TLCK concentration on spermidine dependent cell death

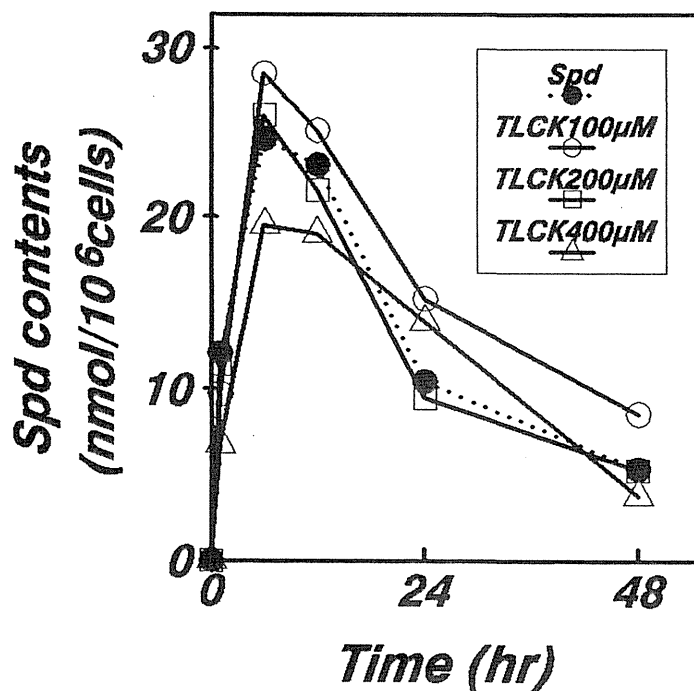


Fig.21 Effect of TLCK concentration on spermidine accumulation

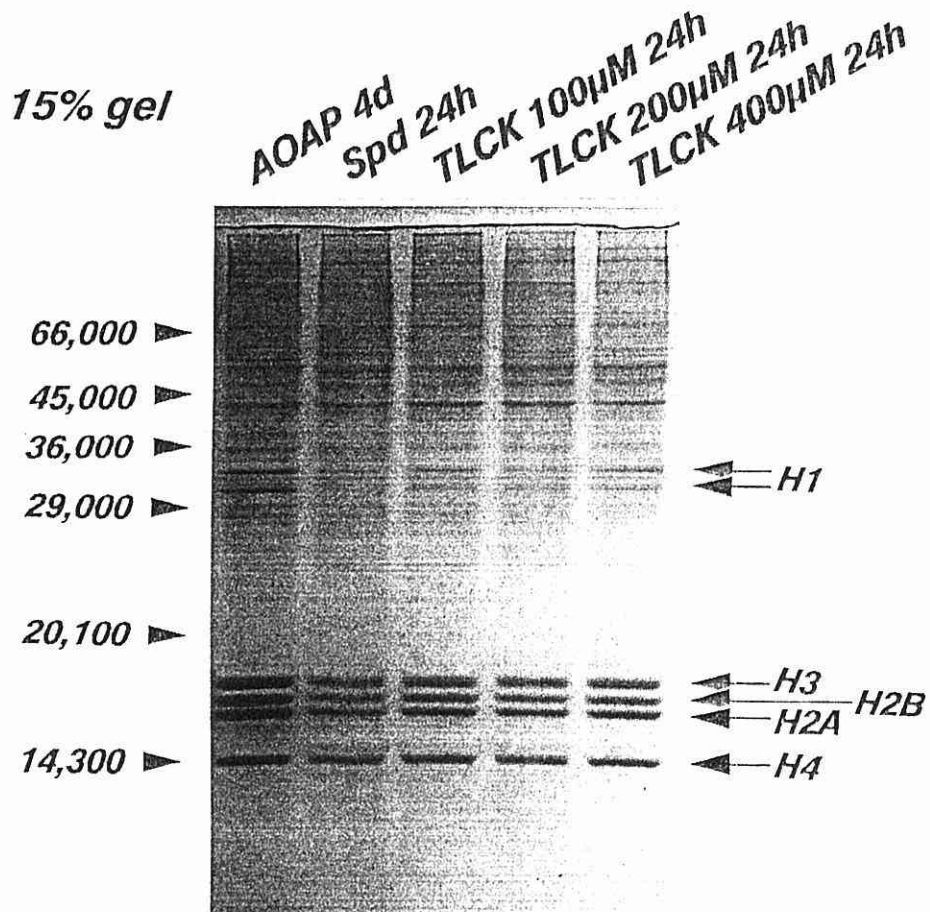


Fig.22 Effect of TLCK concentration on histone degradation in spermidine accumulated cells (Coomassie brilliant blue stain)

AOAP 4d : 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した細胞の核画分

Spd 24h : 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した後、100 μ M AOAP 及び 10 μ M Spd を含む培地中で 24 時間培養した細胞の核画分

TLCK 100 μ M, 200 μ M or 400 μ M 24h : 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した後、100 μ M AOAP、10 μ M Spd 及び TLCK 100 μ M、200 μ M あるいは 400 μ M を含む培地中で 24 時間培養した細胞の核画分

2-2. ヌクレアーゼ阻害剤の影響

ATA 投与にあたり、ATA 単独では HTC 細胞の増殖に影響しないことを確認した後、 $10\mu\text{M}$ および $100\mu\text{M}$ の濃度で、AOAP で 4 日間処理したポリアミン欠乏細胞にスペルミジンと同時に投与した。その結果、Fig. 23 に示すように、ATA $10\mu\text{M}$ および $100\mu\text{M}$ とともに、スペルミジン過剰蓄積による細胞死を抑制しなかった。この際、ポリアミン量を測定したところ、 $10\mu\text{M}$ ATA 投与によりスペルミジンの取り込みが若干抑制されていたが、 $100\mu\text{M}$ ATA 投与ではスペルミジンのみ投与した場合と同様の蓄積が検出された (Fig. 24)。

Fig. 25 には、各濃度の ATA をスペルミジンと同時に投与後、48 時間経過した細胞の核画分についての電気泳動の結果を示した。48 時間において、スペルミジン蓄積細胞に見られるヒストンの分解に、各濃度の ATA 投与による変化はみられなかった。

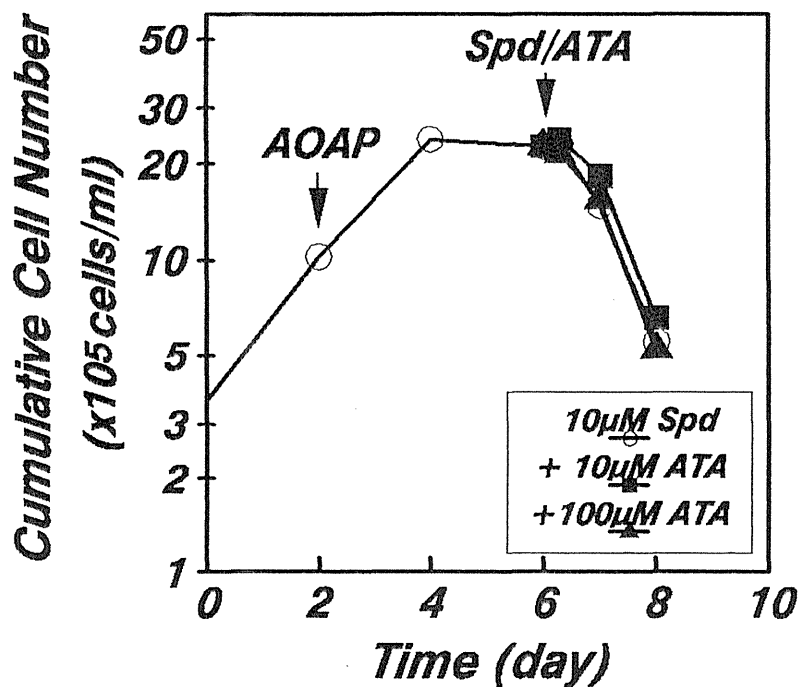


Fig.23 Effect of ATA on spermidine dependent cell death

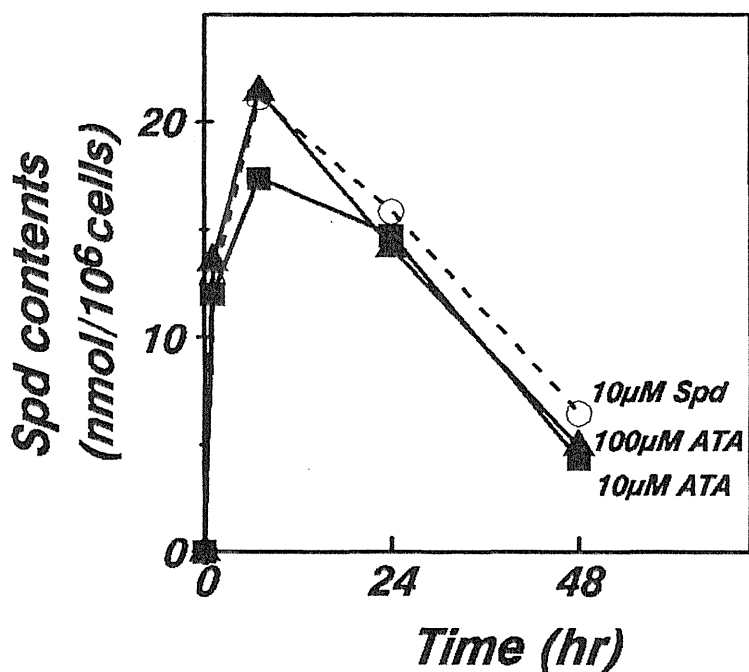


Fig.24 Effect of ATA on spermidine accumulation

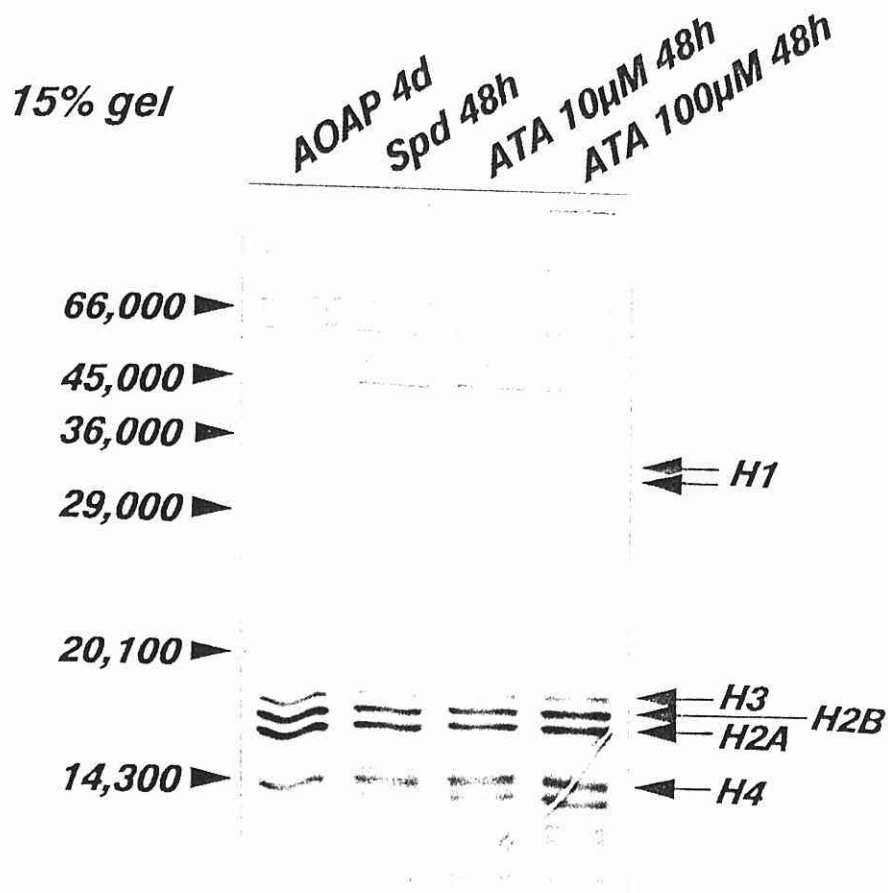


Fig.25 Effect of ATA on Histone Degradation in spermidine accumulated cells (Coomassie brilliant blue stain)

AOAP 4d : 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した細胞の核画分

Spd 48h : 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した後、100 μ M AOAP 及び 10 μ M Spd を含む培地中で 48 時間培養した細胞の核画分

ATA 10 μ M or 100 μ M 48h : 100 μ M AOAP を含む培地中で 4 日間処理した後、100 μ M AOAP、10 μ M Spd 及び ATA 10 μ M あるいは 100 μ M を含む培地中で 48 時間培養した細胞の核画分

【 考 察 】

本研究により、スペルミジンの急激な過剰蓄積に基づく細胞死が観察される細胞では、電気泳動的にヒストンの分解が検出されること、そして、そのヒストン分解および細胞死がセリンプロテアーゼの一種であるTLCKにより一部抑制されることが明らかになった。このことはスペルミジンの過剰蓄積を伴う細胞死がヒストン分解によりもたらされることを示唆している。すなわち、細胞内に急激にスペルミジンが蓄積すると、核内に移行してDNAと結合することでヒストンと競合し、核内にあるセリンプロテアーゼに対するヒストンの感受性を高め、その結果としてヒストン分解、細胞死が起こることが推察される。

ポリアミンを培養細胞に投与すると細胞破壊が起こることは古くから知られていた。これは培養液に含まれる血清由来のアミン酸化酵素によってポリアミンが分解されて生じるアクロレインの毒性によるものと考えられていた。しかし最近、本研究でも用いたアミン酸化酵素阻害剤であるアミノグアニジンを追加した培養系やアミン酸化酵素の活性がほとんどないウマ血清を用いた培養系においても、細胞内ポリアミン量が徐々に上昇すると増殖阻害が起こることが報告され、ポリアミン自身に細胞毒性があることが明らかになっている。

現在、生理的ポリアミンの蓄積に基づく細胞死の機構は抗がん剤の候補化合物として注目されるビスエチルポリアミンの作用機構解明の観点から研究が進められている。Igarasi らは、ビスエチルポリアミンの蓄積に伴う増殖阻害が、ミトコンドリアに顕著な障害を与えることを明らかにし、高濃度のスペルミジンあるいはスペルミンを含む培地で細胞を培養したときに観察される増殖阻害も同様の機構によるものと推察している¹⁴⁾。一方、Pegg らは、ビスエチルポリアミンによる増殖阻害がミトコンドリアにおける機能を欠損

した細胞株にも観察されることから、増殖阻害機構がミトコンドリアの障害では説明できないことを指摘している¹⁵⁾。本研究を含めて当研究室で得られたこれまでの結果は、一見矛盾するこれらの研究結果を説明するものと考えている。スペルミジン蓄積細胞について深沢が行った電子顕微鏡観察によれば、アポトーシスに特徴的な形態的变化とともに、ミトコンドリアの膨潤が観察された。したがって Igarashi らが指摘したようにスペルミジンの蓄積がミトコンドリアに障害を与えることは間違いないものと思われる。一方、細胞死の直接の原因がヌクレオソームの構造破壊にあれば、ミトコンドリアの機能を欠損した細胞株においても増殖阻害がおこることは容易に説明される。Igarashi らの観察は徐々にポリアミンが蓄積された細胞についてのものであることから、本研究で観察されるヒストン分解が細胞死の原因となるのは、ポリアミンが急激に細胞内に流入したときに限られる可能性もある。

本研究で観察した細胞のように生理的ポリアミンを急激に過剰蓄積させる培養系は、オルニチン脱炭酸酵素の過剰産生株についての報告がある。

Poulin らは、L1210 細胞のオルニチン脱炭酸酵素過剰産生株に、低張液中ポリアミンを投与すると DNA の断片化を伴うアポトソシスが起きると報告しており、その際細胞内の pH が塩基性に変化することが、細胞死の一因である可能性を論じている¹⁶⁾。しかし、本研究における細胞死は、細胞内の pH 変化のみによっては説明されない。すでに深沢は平成 4 年度の修士論文において、この細胞死はほぼ同濃度蓄積されるスペルミジン類似体によっては起こりにくいことを明らかにしており⁶⁾、単なる塩基性化合物の蓄積に基づく結果ではないことが示唆される。

本研究結果はポリアミン機能の新たな側面を示すものと期待されるが、細胞試料を調製する際の遠心操作のみの分画法では、死細胞由来の核断片の混入の可能性を完全に否定することはできない。従って今後、細胞死の原因に関する明確な結論を得るためには、密度勾配を用いるより精度の高い細胞分

画法により生細胞と死細胞を分画する必要があるだろう。

本細胞系で観察される細胞死と細胞容積の縮小との関係は不明であるが、TLCK 投与により細胞死が一部抑制される際も、光学顕微鏡的には細胞の縮小が観察されること、また、最近、膜電位を維持するために働くカリウムチャンネルの調節にポリアミンが関与することも報告されていることから、細胞容積の調節に関わる種々のイオンチャンネルに高濃度のポリアミンが影響を与える可能性も考えられる。このような現象のメカニズムを明らかにすることは、更なるポリアミン作用の新たな可能性を見いだすことにつながるだろう。

【 実験材料と方法 】

[試薬]

新生仔牛血清 (NBS) は Cell Culture Laboratories 社、MEM-Earle Medium は大日本製薬のものを、Swim's S-77 Medium および Trypsin-EDTA 溶液は Sigma社 のものを用いた。また、培養実験に用いた他の生化学試薬は Sigma 社あるいは Aldrich 社 のものを用いた。培養細胞に投与したポリアミンアナログ体、およびポリアミン欠乏細胞の調製に際して用いた 1-アミノオキシ-3-アミノプロパン (AOAP)、ポリアミン定量時の内部標準物質として用いた N-(3-アミノプロピル)-1,5-ペンタンジアミンは当研究室で合成したものを、用いた。その他の化学試薬は関東化学株式会社あるいは和光純薬工業株式会社の試薬特級を用いた。標準蛋白として牛血清アルブミン (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 社から購入したものを、用いた。ヒストンの抗体調製に用いたウシヒストンフラクションは Sigma 社、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバントは DIFCO LABORATORIES 社、注射用蒸留水は山之内製薬のものを、用いた。ウェスタンブロッティングに用いた Tween20、GAR-HRP conjugate、HRP Color Development Reagent および Nitrocellulose Membrane は Bio-Rad 社、Filter paper は Whatman 社 のものを用いた。

[培養細胞]

ラット肝癌由来 HTC 細胞 (Morris 7288c) は大日本製薬から入手し、-80℃ で保存されていた細胞をまず単層培養により立ち上げた後、浮遊培養に移して実験に用いた。

単層培養：組織培養用シャーレ (φ100mm) に培地 (MEM-Earle+10%NBS) 10ml を加えて 37℃、95%Air-CO₂、pH7.4、0.5-5.0 x10⁶ cells/plate になるように植え継いだ細胞を用いた。継代時は培地を捨て PBS (Phosphate Buffered Saline) [Mg²⁺(-)] 10ml で 2 回洗浄した後、Trypsin-EDTA (0.025%) を 500μl 加え、37℃ でインキュベーターに 3~5 分間おき細胞がシャーレからはがれたことを確認した後、培地 (MEM-Earle+10%NBS) 1ml を加えて Trypsin を失活させた。この浮遊液をさらにピペットで懸濁することで単細胞として細胞数を算定後、新しい培地に蒔いた。細胞数は、0.4% トリパンブルー存在下血球測定盤を用いて計数した。

浮遊培養¹⁷⁾：培地 {Swim' s S-77 (+50mM Tricine, +2g/l Glucose, +2mM Glutamine, +0.05mM L-Cystine, +0.5g/l NaHCO₃) +10% NBS} に細胞を 2-6 x10⁵ cells/ml となるように 48hr 毎に植え継ぎ、体数増殖期の細胞を実験に用いた。

[薬物処理]

ろ過滅菌した薬物の溶液を投与した培地 (Swim' s S-77 + 10% NBS) に、上記の浮遊培養の条件で細胞を 2-6 x10⁵ cells/ml となるように植え継ぎ、48 時間毎に継代を行った。

[細胞の超音波破碎処理]

採取した細胞を PBS (Phosphate Buffered Saline) で 2 回洗浄した後、PBS に懸濁して超音波破碎機 (150W) で 30 秒間 3 回処理し、5000 xg で遠心して上清と沈殿とに分離した。沈殿は PBS に懸濁し沈殿分画とした。

[核画分の調製] ¹⁸⁾

採取した培養細胞を PBS で 2 回、次いで低張液 (10mM Tris-HCl, pH7.5, 2mM MgCl₂) で 1 回洗浄した後、低張液に 3-4 x10⁷ cells/ml になるように懸濁し、5 分間氷冷した。ポッター型ホモジナイザーに移して氷冷下 800 - 1000 rpm でホモジネートした後、600 xg で遠心して得た沈殿部分を 0.25M ショ糖液 (0.25M Sucrose, 10mM Tris-HCl, pH7.5, 2mM MgCl₂) で 1 回洗浄し、核分画とした。

[蛋白定量]

蛋白定量は、クマシーブリリアントブルー試液を用いる Bradford 法により行った。標準蛋白として牛血清アルブミンを用いた。

[SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動] ¹⁹⁾

調製した細胞試料溶液に同量の電気泳動用緩衝液 (28mM NaH₂PO₄, 72mM Na₂HPO₄, 1% SDS, 1.1% Mercaptoethanol, 36% Urea) を加え、室温で一晩放置して調製した電気泳動用試料について、7.5、10 あるいは 15 % {Acrylamide : N,N'-Methylene-bis(acrylamide) = 1 : 1} 分離ゲル (10 x 14 cm) および 5% {Acrylamide : N,N'-Methylene - bis(acrylamide)= 1 : 1} 濃縮ゲル (3 x 14 cm) を用いて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い分離した。

蛋白の検出は以下に示すクマシーブリリアントブルー染色および銀染色により行った。

クマシーブリリアントブルー染色 : 泳動後、ゲルを染色液 A

(EtOH 50ml, H₂O 120ml, 35% HCHO 30ml, Coomassie brilliant blue R-250 0.2g) で 1 時間処理し、次に染色液 B (EtOH 50ml, H₂O 150ml, 35% HCHO 2ml, Coomassie brilliant blue G-250 0.25g) で一晩処理した。続いて脱色液 C (EtOH 125ml, H₂O 375ml, 35% HCHO 5ml) で約 3 時間処理した。

銀染色 : クマシーブリリアントブルー染色したゲルを約 4 時間水洗した後、アンモニア性硝酸銀液 (0.076% NaOH, 0.37% NH₄OH, 0.39% AgNO₃) で 15 分間処理した後、15 分間水洗し、次に現像溶液

(0.005% Citric acid, 0.019% HCHO) で 0.5 ~ 5 分間処理して現像した後、水洗し、停止溶液 (0.005% Citric acid, 0.02% CH₃NH₂) を加え、反応を停止した。

[ヒストンの抗体調製]²⁰⁾

抗原としてウシヒストンフラクション II-S、III-SS および VI-S を用い、それぞれ注射用蒸留水を加え 0.5mg/ml とした抗原溶液 500 μ l をフロイント完全アジュバント 500 μ l とよく混合しエマルジョンとした後、蛋白量が 150 μ g 以上となるようエマルジョンを 3羽の家兎の背中皮内にそれぞれ投与した。約 3週間後、各抗原溶液 250 μ l を注射用蒸留水で 2倍希釈し、フロイント不完全アジュバント 500 μ l とよく混合しエマルジョンとした後、蛋白量が 75 μ g となるようそれぞれ追加免疫を行った。9日後に採血して得た各血清についてドットブロッキングを行ったが、染色が弱く抗体の産生が弱かったので、再度同様に免疫し、17日後追加免疫を行い、7日後に採血して得た各血清についてドットブロッキングを行い各抗体が産生されていることを確認した。

[ウェスタンブロッキング]²¹⁾

コントロール細胞の核画分について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、泳動槽内で電氣的に蛋白質をニトロセルロース膜に 100mA、1.5時間で移した。次に TBS (20mM Tris-HCl, pH7.5, 500mM NaCl) でニトロセルロース膜を洗い、3%ゼラチンを含む TTBS (0.05% Tween20-TBS) でブロッキングした後、1%ゼラチンを含む TTBS で 200倍に希釈した抗血清と一晩反応させた。次いで、TTBS で洗い、抗血清と同様に 3000倍に希釈したパーオキシダーゼ標識第 2抗体を反応させた。次に、TTBS で洗い、さらに TBS で洗うことによって Tween20 を取り除き、HRP Color Development 溶液 {(0.06% HRP Color Development Reagent, 20% MeOH, 0.018% H₂O₂)- TBS} で発色させた。

[ポリアミン量の測定]

細胞を一定量集めた後、PBS で 2 回洗浄し、1500rpm で遠心して得たペレットに 10% となるようにトリクロロ酢酸を一定量加えて除蛋白し、遠心上清をポリアミン分析用試料とした。ポリアミン量の測定は、OPA (o- フタルジアルデヒド) - ポストカラム HPLC 法により行った。内部標準物質として N-(3-アミノプロピル)-1,5-ペンタンジアミンを用いた。

【 引用文献 】

- 1) C. W. Tabor & H. Tabor, *Annu. Rev. Biochem.*, 53, 749 (1990)
A. E. Pegg, *Cancer Res.*, 48, 759 (1988)
白幡 晶, 化学と生物, 28, 162 (1990)
- 2) L. J. Marton et al., *Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35, 55 (1995)
- 3) John L. A. Mitchell et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 1136, 136 (1992)
- 4) R. Poulin et al., *J. Biol. Chem.*, 266 (10), 6142 (1991)
R. Poulin et al., *J. Biol. Chem.*, 268 (7), 4690 (1993)
- 5) 山下 法久, 城西大学大学院平成三年度修士論文
上田 哲也, 城西大学大学院平成四年度修士論文
- 6) 深沢 孝史, 城西大学大学院平成五年度修士論文
- 7) 縣 宗彦, 城西大学大学院平成七年度修士論文
- 8) 五十嵐 一衛, 生化学, 65 (2), 86 (1993)
- 9) M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976)
- 10) M. Piacentini, *FEBS LETTER*, 245 (1, 2), 150 (1989)
- 11) 鈴木 紘一 編, “プロテアーゼと生体機能—分子から病態まで—”,
東京化学同人, 158 (1993)
- 12) A. K. Larsen et al., *Biochem. pharmacol.*, 46 (3), 305 (1995)
- 13) Gregory J. Gores et al., *Am. J. Physiol.*, 268 (4 Pt 1), G613 (1995)
- 14) K. Igarashi et al., *Eur. J. Biochem.*, 209, 689 (1992)
K. Igarashi et al., *Eur. J. Biochem.*, 217, 89 (1993)
K. Igarashi et al., *Eur. J. Biochem.*, 221, 391 (1995)
- 15) A. E. Pegg et al., *Biochem. J.*, 291, 131 (1993)
- 16) R. Poulin et al., *Biochem. J.*, 311, 723 (1995)
R. Poulin et al., *Biochem. J.*, 312, 794 (1995)
- 17) T. Bepp et al., *J. Biochem.*, 117, 339 (1995)

- 18) 日本組織培養学会 編, “組織培養の技術”, 朝倉書店 (1988)
- 19) U. K. Laemmler, *Nature* (London), 227, 680 (1970)
- 20) J. Vaitukaitis et al., *J. Clin. Endocrinol.*, 33, 988 (1971)
- 21) H. Toubin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 76, 4350 (1979)

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-

緒言

哺乳動物細胞中のポリアミンは、図1に示すようなジアミンであるプロトレンシン、および、スペルミジン、スペルミンであり、これらポリアミンの細胞内における量的な変化が、遺伝子発現や細胞機能の調節に重要な役割を果たす¹⁾。これらポリアミンは、4つの合成酵素からなる合成系路と2つの代謝酵素からなる逆経路のバランスによって、細胞内でその濃度を厳密に維持されている。いずれのポリアミンも、図2に示すように核酸、膜成分、蛋白質など様々な化合物と結合することで、その構造に変化を与え、調節因子としての役割を果たすと考えられているが、作用の実体は不明の部分が多い。

我々は、多くの研究にも拘わらず明確なポリアミン作用の実体を捉えられない理由の一つとして、細胞内における遊離型ポリアミン濃度に関する情報が得られない点に注目してきた。ポリアミンは、陰性電荷を持つ高分子と結合平衡状態を保ちながら存在し、細胞内に存在するポリアミンのほとんどは結合型であると考えられている。しかし、種々の生体反応の調節に直接影響を与えるものは、これら高分子と強く結合したポリアミン量の変化よりも、結合していない遊離型ポリアミンの濃度及びその量の変化である。これまでのポリアミン研究では、細胞内のポリアミン量を、トリクロロ酢酸などの除タンパク剤で処理した試料についてのみ調べている。したがってこれらの結果は、結合型と遊離型を合わせた全ポリアミン量の測定であり、遊離型を直接測定した例はない。

昨年度修士論文²⁾において古海は、ラット肝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ポリアミン量と結合型ポリアミン量を求める試みを報告した。古海はその報告の中で、限外ろ過膜により試料をろ過することで、試料中の遊離型ポリアミン濃度の測定が可能であること、ポリアミンが分布しうる領域が独自に考案した希釈法により推察できることを明らかにし、両者の結果から遊離型と結合型の割合の算出が可能であることを示した。しかし、この方法は、ホモジネーション操作により細胞質の細胞外液による希釈が避けられないことなど、生理的条件下の遊離型ポリアミン濃度を求める方法としては問題があるように思われた。培養細胞における遊離型ポリアミン量を測定するためには、ポリアミンが細胞内で分布する容積の測定法や、できるだけ生理的な条件で遊離型ポリアミンを

測定することができる新たな方法論が必要になる。本研究では培養細胞内の遊離型ポリアミン量の割合を簡便に測定する方法の開発を目指して、まず、細胞内ポリアミンの分布可能な領域を評価する上で、細胞内に水が分布する容積が重要な指標になると考え、HTC細胞における水容積を測定する方法を確立した。確立した方法は、種々細胞容積が変化することが知られている条件で処理したHTC細胞の水容積の測定に応用し、その有用性を確認した（第一章）。次に、限外ろ過法を応用して、懸濁培養した細胞の遊離型ポリアミン濃度の測定法を考案し、水容積の測定法と組み合わせてHTC細胞における遊離型ポリアミン量の算出を試みた（第二章）。

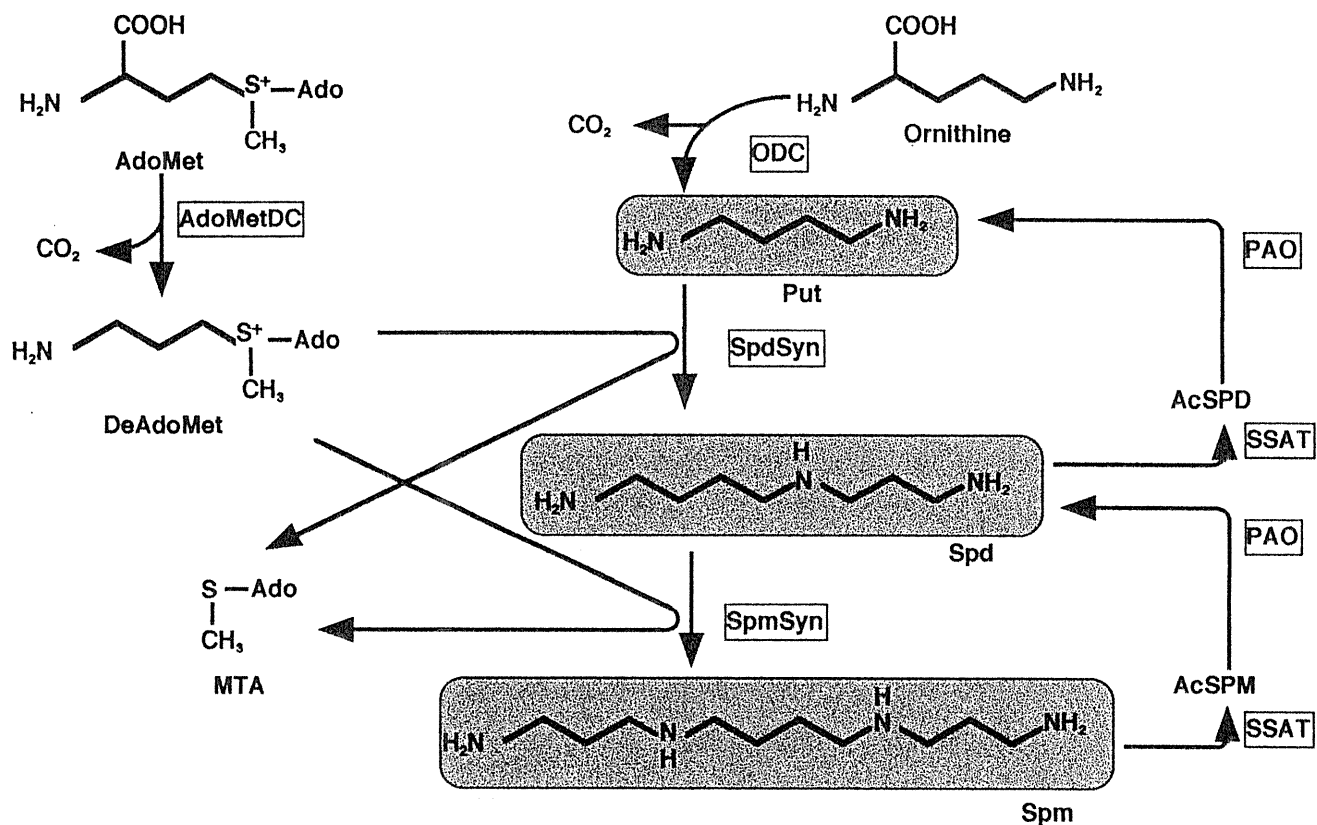


Fig.1 Polyamine biosynthesis and interconversion pathway

PUT: putrescine, SPD: spermidine, SPM: spermine, AdoMet: S-adenosylmethionine, deAdoMet: decarboxylated adomet, MTA: 5'-methylthioadenosine, ODC: ornithine decarboxylase, AdoMetDC: S-adenosylmethionine decarboxylase, SpdSyn: spermidine synthase, SpmSyn: spermine synthase, SSAT: spermidine/spermine N¹-acetyltransferase, PAO: polyamine oxidase, AcSPD: N¹-acetylspermidine, AcSPM: N¹-acetylspermine,

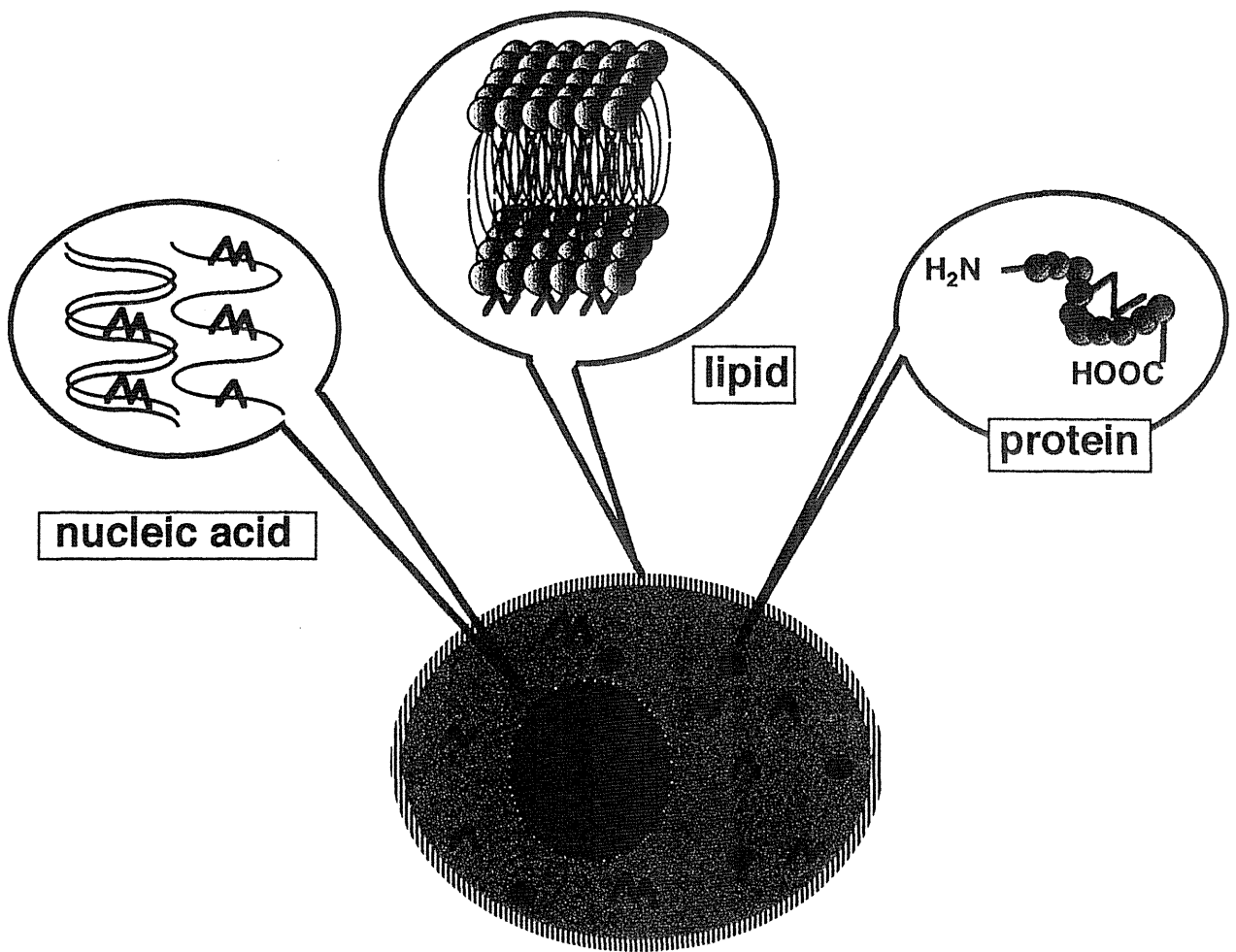


Fig.2 Interaction of polyamines with biological macromolecules

第一章 細胞水容積の測定

ポリアミンは、多価カチオンであることから、水溶性が高く、遊離型は細胞質に分布するものと考えられるが、細胞内のどこにどの程度分布するか、その局在は明らかになっていない³⁾。そこで、分布可能な領域として、水の分布する領域を細胞水容積として一つの指標にとることを検討した。水はポリアミンに比べ分子量も小さく、高分子内への水和などポリアミンが分布し得ない領域に存在する可能性が高い。したがって、ポリアミンの分布する領域に比べ明らかに水は広い領域に分布することが予想されるが、ポリアミンが分布しうる最大の領域を知る上で意味があるものと考えた。

第一節 HTC細胞における水容積の測定法の基礎検討

測定に当たっては、従来から細胞内体積の算出法として用いられている、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いる図3に示すオイル法⁴⁾を採用し、懸濁培養が可能なラット肝がん由来HTC細胞について、細胞水容積の測定が可能かどうかを検討した。この方法では、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を平衡化させた細胞懸濁液を、すみやかにオイル上に重層したのち遠心し、ペレットの持つカウントと細胞数から、 $^3\text{H}_2\text{O}$ が分布可能な領域を細胞一個当たりの水容積として算出する方法である。

まず、遠心操作の後、放射能が細胞ペレットに回収されるかを調べると、図4に示すように、ペレット中のカウントは細胞数に比例して直線的に増加し、この条件で定量的な細胞の分離が可能であることが分かった。

次に、その際、 $^3\text{H}_2\text{O}$ と細胞における水の交換の様子を、ペレット中の放射能から細胞一個当たりの水容積を算出して検討した。その結果、図5に示すように、水容積は10秒間の平衡化の条件で一定の値を示し、速やかに交換が平衡に達することが示唆された。またこのとき、細胞一個あたりの水容積は約 $3000 (\mu\text{m})^3$ であることが分かった。

オイル法では、通常、遠心により得られる細胞ペレット中に巻き込まれる水の量を補正して水容積の算出が行われる⁴⁾。そこで、細胞内に取り込まれないことが知られている ^{14}C -デキストランを培地に添加して、オイル法に供したが、ペレット中の放射能から算出された細胞付着液の容積は水

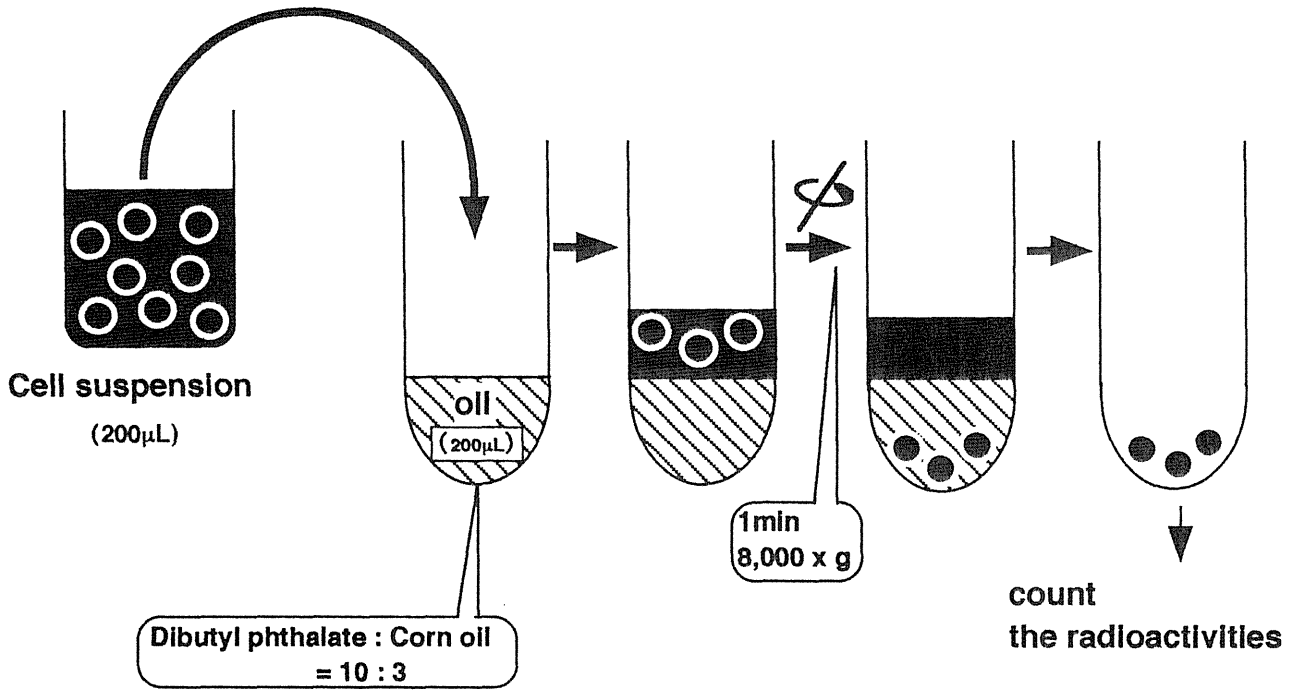


Fig.3 Separation of $^3\text{H}_2\text{O}$ -incorporated cells

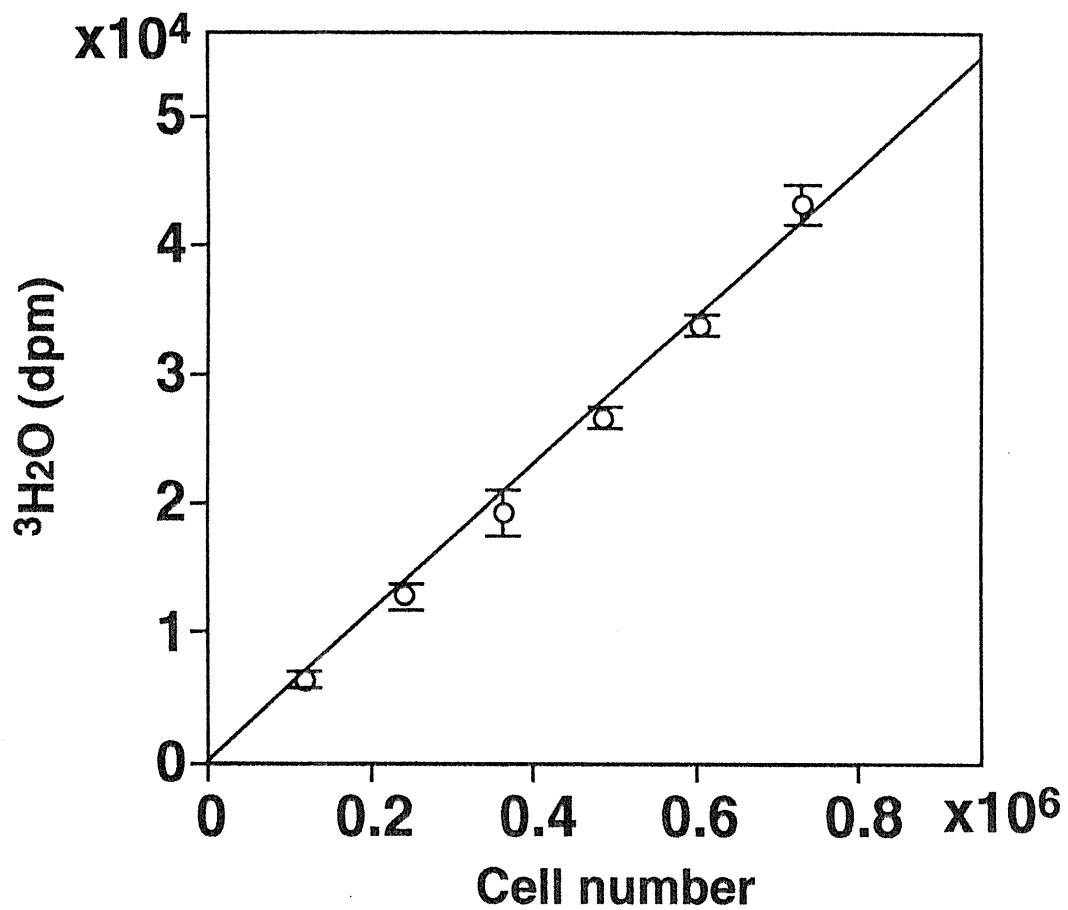


Fig.4 Relationship between cell numbers and radioactivities of $^3\text{H}_2\text{O}$ incorporated into cells

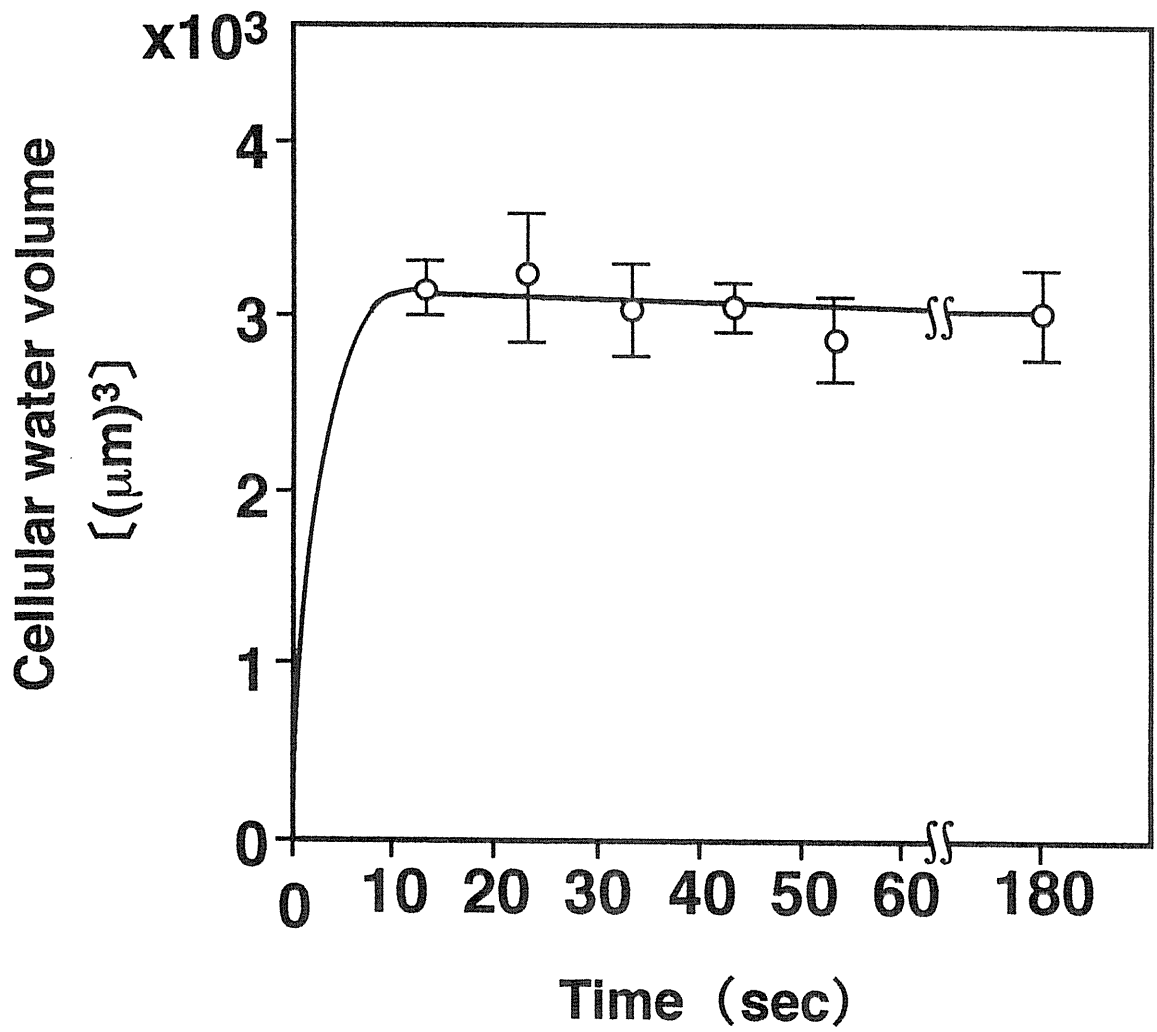


Fig.5 Equilibration of $^3\text{H}_2\text{O}$ exchange in HTC cells

容積の4.5%であった。また、死細胞の影響を見るために、凍結融解により死細胞とした細胞を、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を含む培地に懸濁し、オイル法に供したところ、断片化していない死細胞は、生細胞と同様の水容積を与えることが分かった(図6)。 ^{14}C -デキストランで補正される容積は、死細胞に由来するものも含まれるものと思われること、また、死細胞すべてが ^{14}C -デキストランを取り込むとは考えにくいと思われることから、正確な付着水容積および死細胞に由来する水容積を見積もることは困難と判断し、今回の水容積の測定は、付着水も含めた値として、トリパンプルーを取り込む死細胞も含めた細胞数によって算出した。

表1には細胞容積と今回求めた細胞水容積を比較した結果を示す。細胞容積は、顕微鏡で観察される細胞の直径から、細胞を球と仮定して算出する方法と、 ^{14}C -デキストランの排除体積から算出する2種の方法で求めた。測定した水容積はこれら二つの方法の測定値の約60%であり、細胞における水分含量が約70%であるとする従来の報告と大きな相違はなく、本法によって細胞水容積の測定が可能であることが示唆された。

第二節 塩濃度の細胞水容積に対する影響

細胞容積は、種々の刺激を受けて、変化することが知られている⁵⁾。水は水チャネルを介して自由に通過できるため、細胞膜は半透膜として機能し、培地中の塩濃度やイオンによってその大きさを短時間のうちに変えることが可能である。そこで、オイル法の有用性を確認するため、種々の食塩濃度の溶液に懸濁したHTC細胞の水容積の測定を試みた。

まず、3種の濃度の食塩溶液に細胞を懸濁し、この時の水容積変化を測定した。その結果、水容積は、図7に示すように、塩濃度の高い溶液中では一度減少し、低い溶液中では増加した後に、いずれも一定値に収束した。これは、浸透圧及び塩濃度の変化に細胞が反応したのちに、細胞容積の調節すなわちセルボリュームレギュレーション⁶⁾が起きた結果と考えられた。また、この結果から、浸透圧変化などにより短時間で容積変化が起きる場合でも $^3\text{H}_2\text{O}$ 添加後2分以内に細胞を遠心分離すれば、その影響を確認できることが分かった。

次に、この条件で、懸濁した溶液の塩濃度と水容積の関係を調べた。8種

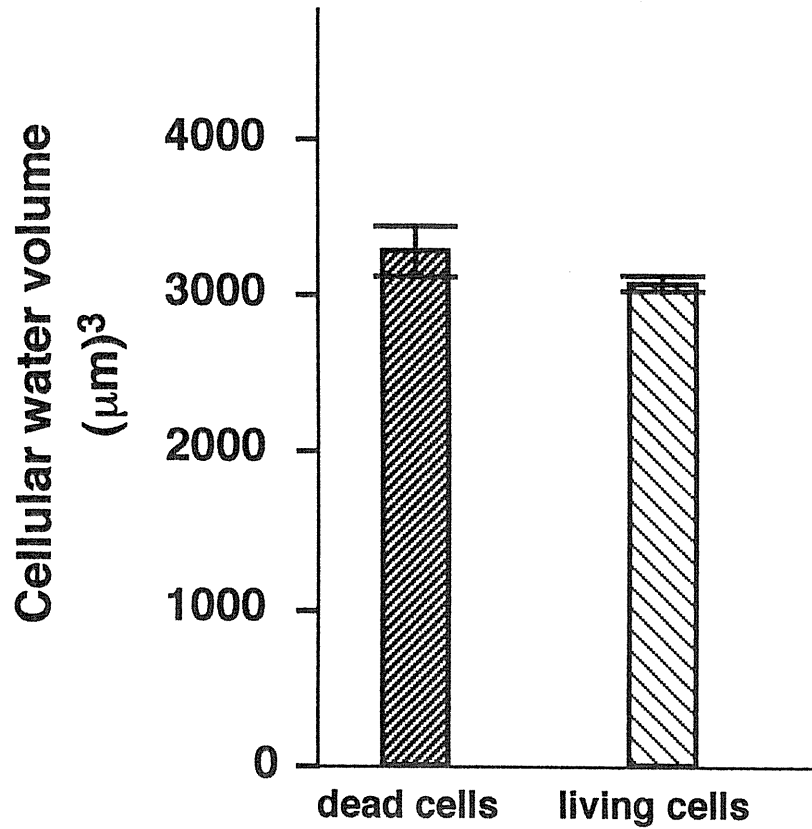


Fig.6 Comparison of cellular water volume with cell volume on dead cells and living cells

The results for cellular water volume are means \pm S.D. for triplicate measurements.

Table.1 Comparison of cellular water volume with cell volume

method of calculation	volume [(μm) ³]
Cell volume calculated from cell diameter	4,600 \pm 1,100
Cell volume calculated from exclusion volume of ¹⁴ C-dextran	5,080 \pm 20
Cellular water volume calculated from Incorporation of ³ H ₂ O	3,070 \pm 40

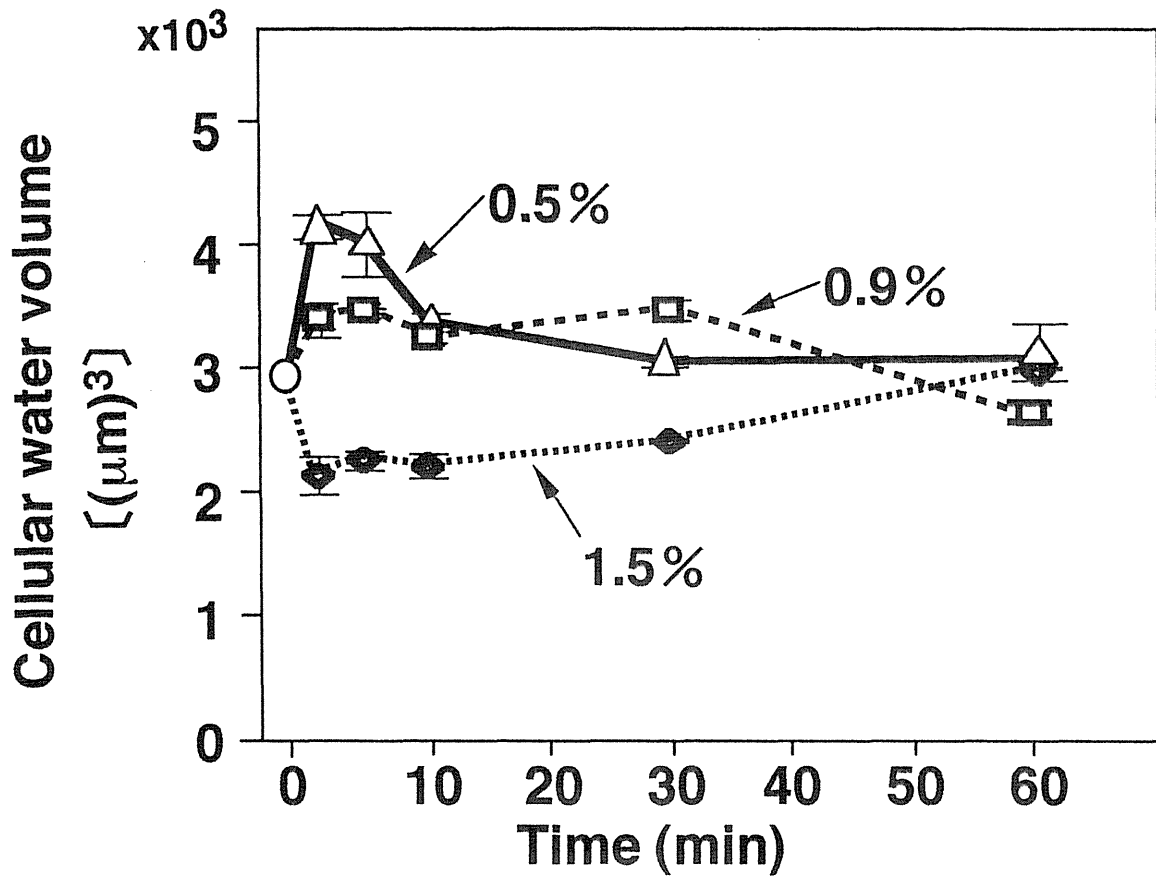


Fig.7 Changes of cellular water volume of HTC cells suspended in NaCl solution

Twenty million cells were suspended in 4mL of the solution of 0.5% NaCl(Δ), 0.9% NaCl(\square) and 1.5% NaCl(\blacklozenge). A 200 μL of each suspension was applied to the oil method. The values were means \pm S.D. for triplicate measurements.

の濃度の食塩溶液に細胞を懸濁し、懸濁後2分以内に細胞を分離し水容積を測定すると、図8に示すように、低張液における細胞容積は大きくばらついたが、どちらも食塩濃度に応じてほぼ同じ傾向で変化し、この方法が生細胞において水容積を測定するのに有用であることが示唆された。

第三節 ポリアミンの細胞内水容積に対する影響

当研究室では、これまでに、細胞内ポリアミン量の変化に伴う細胞容積の変化を観察してきた。そこで、本法を、ポリアミン合成阻害剤やSpdの投与によってポリアミン量を変化させた細胞の水容積の測定に応用した。細胞内のポリアミン合成は、図1に示すように、オルニチンの脱炭酸によりPutが生成されることに始まる。ポリアミン合成の律速酵素は、この反応を触媒するオルニチン脱炭酸酵素であり、その阻害剤の投与は、多くの細胞系でポリアミンの枯渇状態をつくるのに用いられる。当研究室では、オルニチン脱炭酸酵素阻害剤の一つである1-アミノオキシ-3-アミノプロパン (AOAP) をHTC細胞に投与すると、ポリアミンの枯渇に伴い4日間で完全に増殖が停止し、そこに、低濃度のSpdを投与すると、細胞が急激にSpdを蓄積し、その容積が顕微鏡下で縮小することを観察してきた⁷⁾。図9には、300 μ M AOAPおよび100 μ M Spd を細胞に投与したときのSpd量の変化と細胞数の変化を示した。このAOAP処理により、Spd量は処理1日目で検出限界となり、Spdの投与で、投与開始から8時間で対照の7倍の蓄積を示した。一方、このとき、図には示さないが、Put量はSpd量と同様検出限界以下になり、Spm量は対照の50%になった。また、Spd投与では、Put量、Spm量はいずれも対照細胞と同じ含量まで回復したが、Spdのような蓄積は起こらなかった。本研究では、細胞内ポリアミン濃度が細胞の水容積に与える影響を探るために、これらの細胞試料について、水容積の測定を行った。その結果、図10に示すように、水容積は、AOAP処理によりコントロール細胞の70%まで減少し、スペルミジン投与開始から4時間でコントロールの50%まで減少した。またその際、細胞容積を測定すると、水容積の変化とほぼ同様に变化した。

このAOAP処理による水容積の減少は、Spd枯渇後に穏やかに進行することから、細胞内のタンパク合成能がポリアミン量の減少とともに低下し、

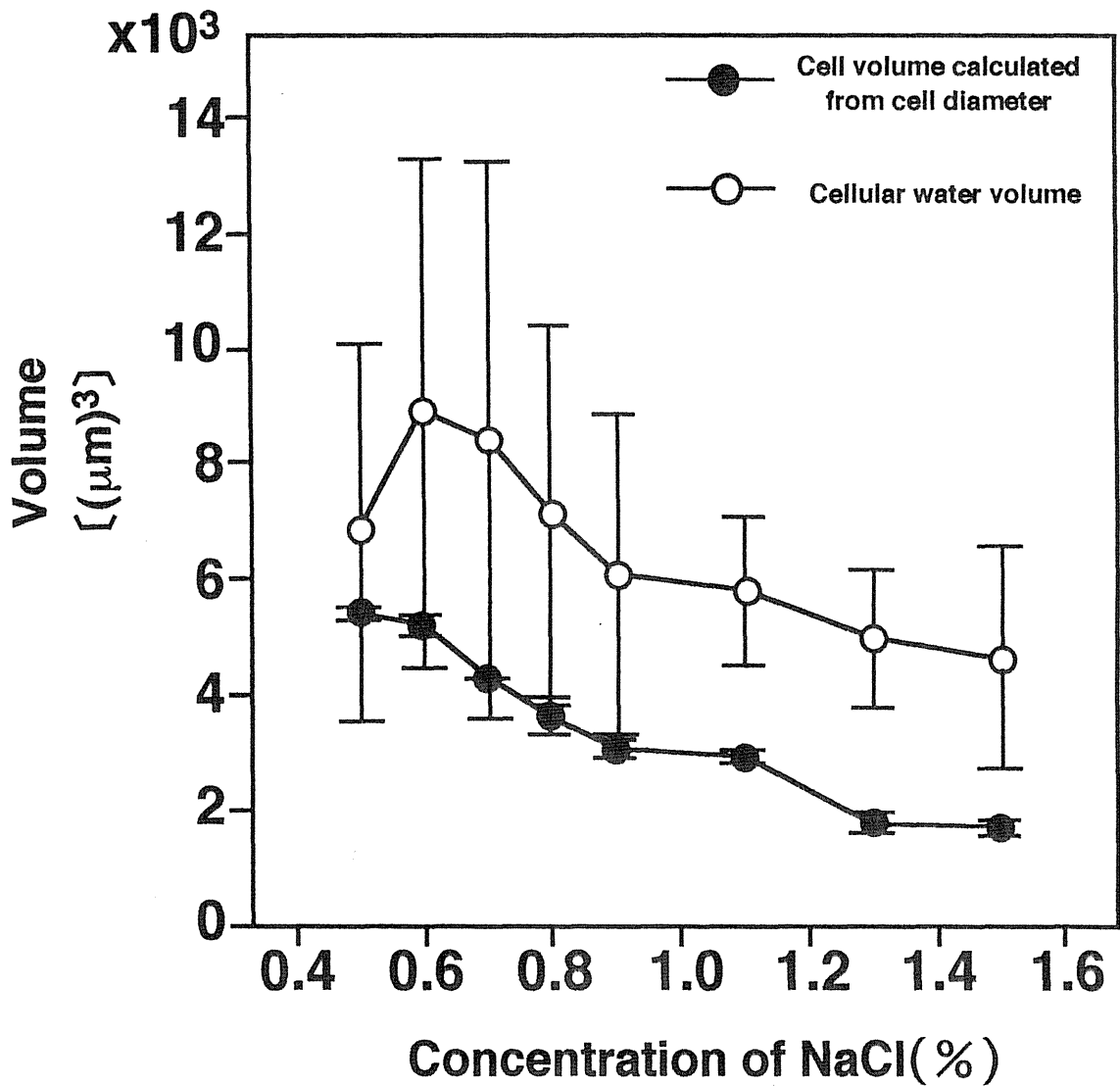


Fig.8 Effect of NaCl concentration on cell volume and cellular water volume

The cells were suspended in the solutions of eight different NaCl concentrations as described in Fig.7. The cell volume was calculated from diameters of cells in the photo-copies of micrograph. The results are means \pm S.D. for 30 cells. The results for cellular water volume are means \pm S.D. for triplicate measurements.

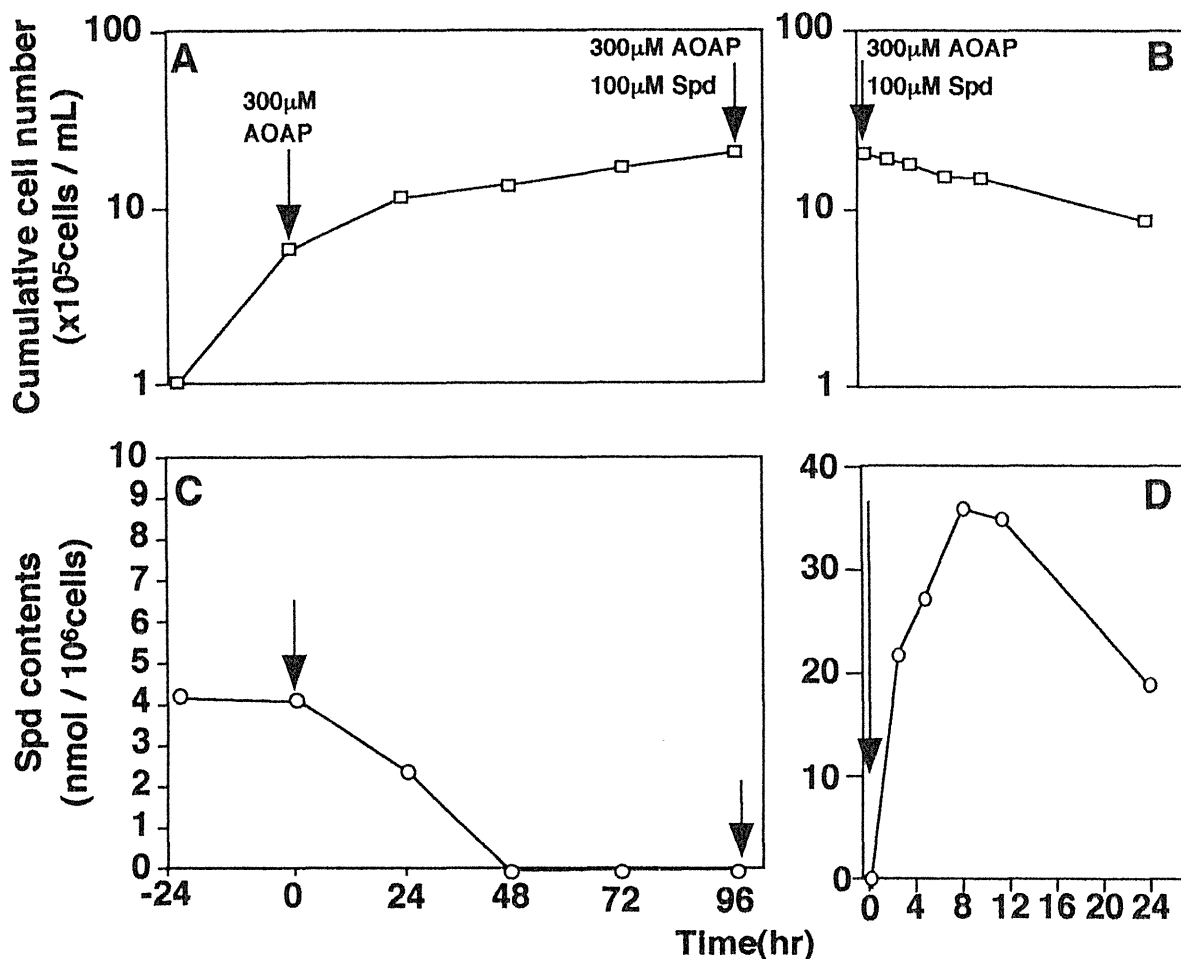


Fig.9 Effect of AOAP and Spd addition on cell numbers and Spd content in HTC cells

HTC cells were cultured in the medium containing 1mM AG during the experiment. The medium was changed every two days. The treatment with 300 μ M AOAP was started at 0 time in the panel A and C. A 100 μ M Spd was added to the medium at 96 hour in the panel A and C (or 0 hour in panel B and D). The results are means for duplicate culture experiments. The panel A and B show the results for cell number. The panel C and D show the results for Spd contents.

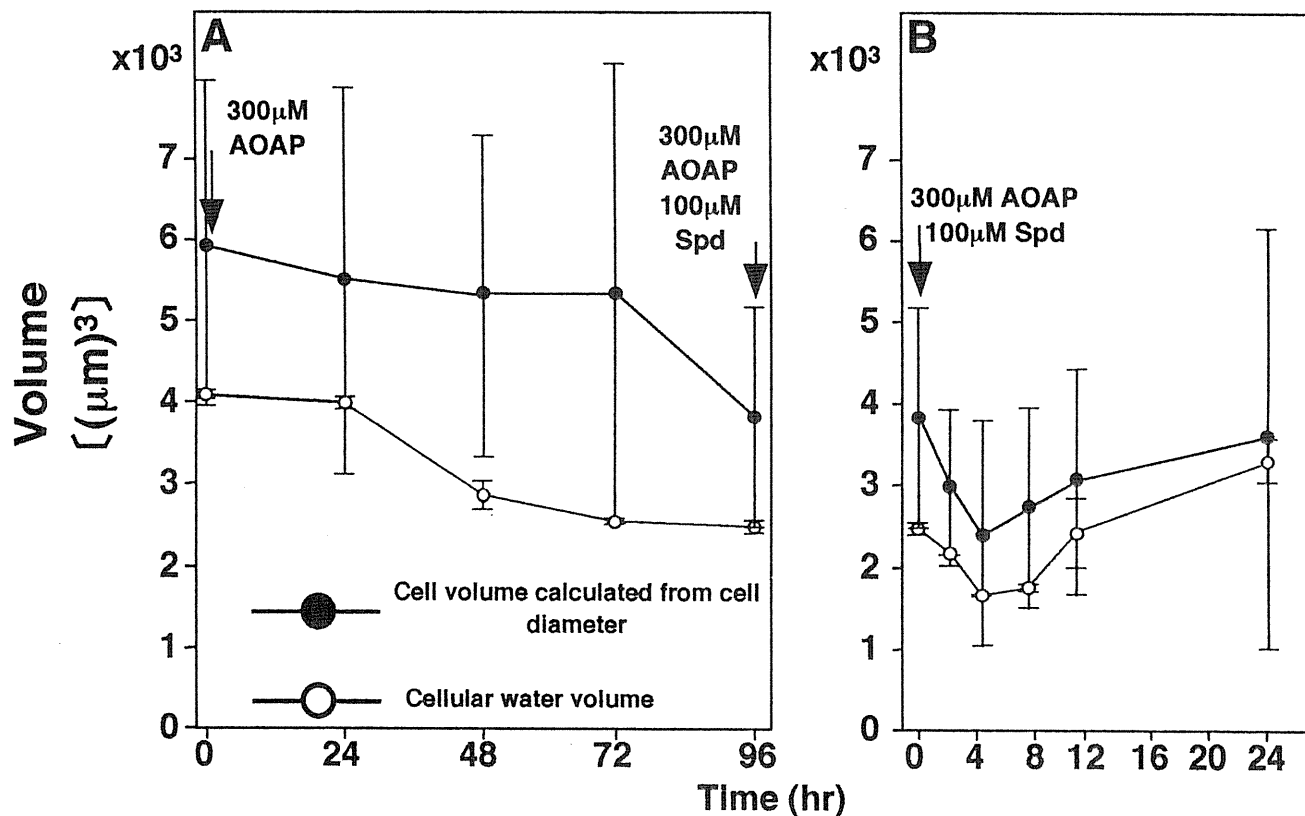


Fig.10 Effect of AOAP and spermidine addition on cell volume and cellular water volume of HTC cells

The culture conditions were the same as described in Fig.9.

細胞機能が抑制された2次的な結果であることが示唆された。これに対してスペルミジン投与後4時間までに起こる水容積の減少は、スペルミジンの蓄積とともに急激に起きることから、AOAP処理による減少とは異なるメカニズムであり、スペルミジンの直接作用であることが示唆された。

第二章 細胞内遊離型ポリアミン濃度測定を試み

平成9年度の修士論文において古海は、ラット肝を緩衝液なしでホモジネイトした試料について、高分子に結合したポリアミンと遊離型ポリアミンの分離に、分画分子量10,000の限外ろ過膜によるろ過が有効であることを示した。しかし、遊離型ポリアミン濃度の測定には、細胞を出来るだけ生理的条件下に近い状態で、遊離型ポリアミンを、高分子に結合したポリアミンと分離する必要がある、細胞外液との新たな結合平衡をつくりうるホモジネーション操作は好ましくないと思われた。そこで、新たな限外ろ過法を検討した。

第一節 細胞質溶液の直接限外ろ過法の考案

新たな限外ろ過法を考案するに当たって、まず、第一章で扱ったオイル法を用いれば、細胞を細胞外液で希釈せずに細胞の分離が可能になることに着目した。当初は、オイル法で分離した細胞の細胞質ゾルを何らかの方法で分離した後、限外ろ過膜でろ過する操作法を検討したが、定量的な細胞質ゾルの回収を可能にする適当な方法が見いだせなかった。

そこで、細胞の分離と限外ろ過を同一の遠心式限外ろ過ユニット中で行う図11に示すような限外ろ過法を検討した。遠心式限外ろ過ユニットは、プラスチック製1.5 mLのマイクロチューブと、下端に限外ろ過膜を接着した円筒状の試料チューブから構成され、試料チューブにある試料が遠心によりろ過され、マイクロチューブにろ液が採取される構造になっている。ろ過膜上でオイル法により分離したHTC細胞を、そのまま凍結融解により破碎し、遠心して図12に示すように、細胞質ゾルを限外ろ過しようとするものである。この方法が可能になるためには、1) 細胞を分離する際、オイルがろ過膜を通過しないものであること、2) 細胞を破碎する条件でろ過膜が破損しないこと、3) 細胞の破碎によって得られる細胞質ゾルの比重が、用いるオイルより大きく、遠心操作でオイル中浮上しないことが要件となると考えた。

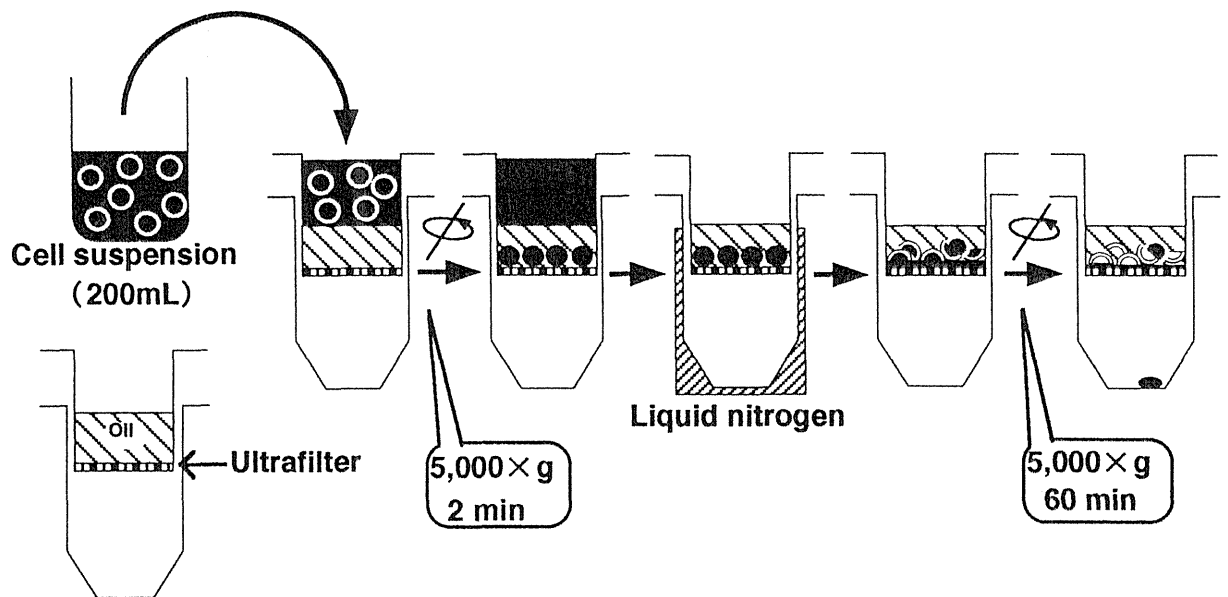


Fig.11 Sample preparation of ultrafiltered-cytosol from HTC cells

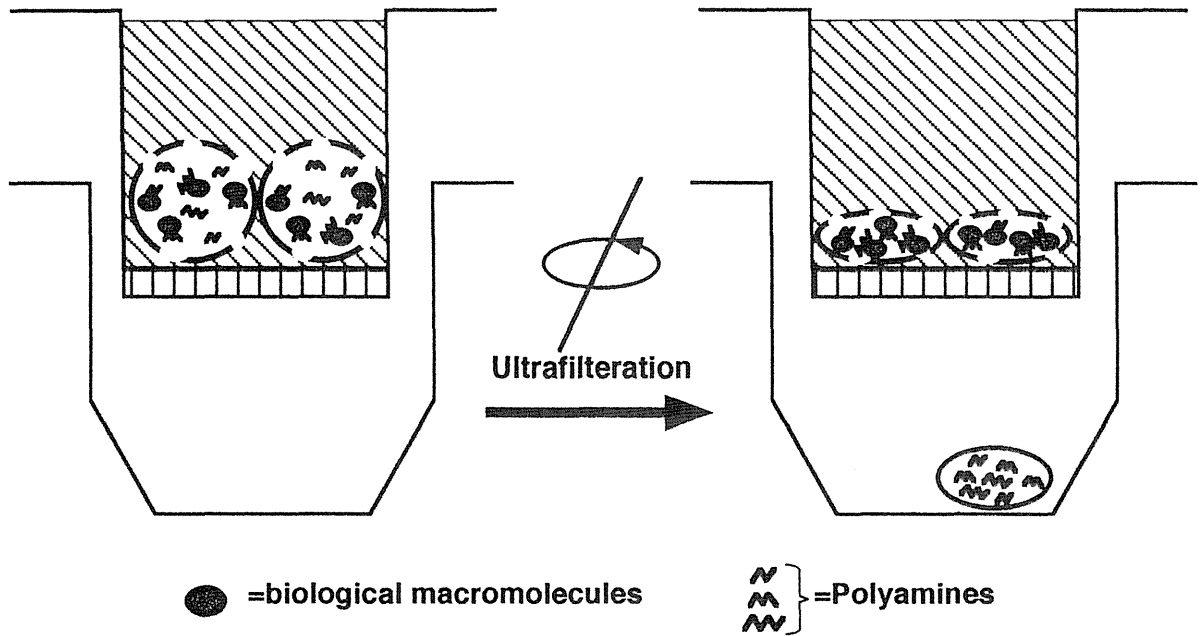


Fig.12 Ultrafiltration of cytosol from HTC cells

第二節 ろ過ユニットの検討

考案した限外ろ過法が可能であるためには、操作過程でろ過膜が破損しないこと、細胞を分離する遠心過程でオイルを保持することが要件となる。そこで、市販のミリポア社製の各種ろ過ユニットについて、ろ過膜上にオイルをのせた状態で、液体窒素により凍結融解を3回繰り返した後、5,000 x g で5分間遠心し、オイルの保持能力を調べた。その結果、表2に示すように、0.45 μm の大きな口径をもつ膜や、ポリエーテルスルホンの限外ろ過膜では、5,000 x g の遠心でオイルが膜を通過した。再生セルロースを限外ろ過膜とするものは、オイルを保持することが分かったが、分画分子量が30,000のものは、凍結融解により破損する確率が高かった。そこで、分画分子量 3,000 のものよりろ過速度の早い分画分子量 10,000の限外ろ過膜を持つ、UFC3LGCを以後の検討に用いた。

第三節 HTC細胞を用いる細胞質ゾルの直接限外ろ過

新規ろ過法により細胞質ゾルが限外ろ過されるかを検討した。まず、対数増殖期にある約 10^6 個のHTC細胞について、この方法で得られるろ液量を、その重量から調べた。その結果、図13に示すように、遠心時間に応じてろ液量が増すことが分かった。このろ液量については、 $^3\text{H}_2\text{O}$ で平衡化した細胞について、ろ液中の放射能からも算出したが、ほぼ同様の結果を得た。

凍結融解によるろ過膜の損傷の可能性を調べるために、ろ液のタンパク成分を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べた。その結果、図14に示すように、ろ液にタンパク成分は検出されず、限外ろ過が有効に働いていることが示唆された。

これらのことから、本法により、細胞質ゾルのろ過が可能であると結論した。

Table.2 Selection of filter unit

Name	filter material	NMWL	oil -retention at 5,000 x g
ULTRAFREE-MC UFC3LTK	Regenerated cellulose	30,000	△
ULTRAFREE-MC UFC3LGC	Regenerated cellulose	10,000	○
ULTRAFREE-MC UFC3LBC	Regenerated cellulose	3,000	○
ULTRAFREE-MC UFC3TGC	Sulfonated polyether	10,000	×
ULTRAFREE-MC UFC3OHV	PVDF	(0.45μm)	×
ULTRAFREE-MC UFC3DEA	DEAE anion exchange		×

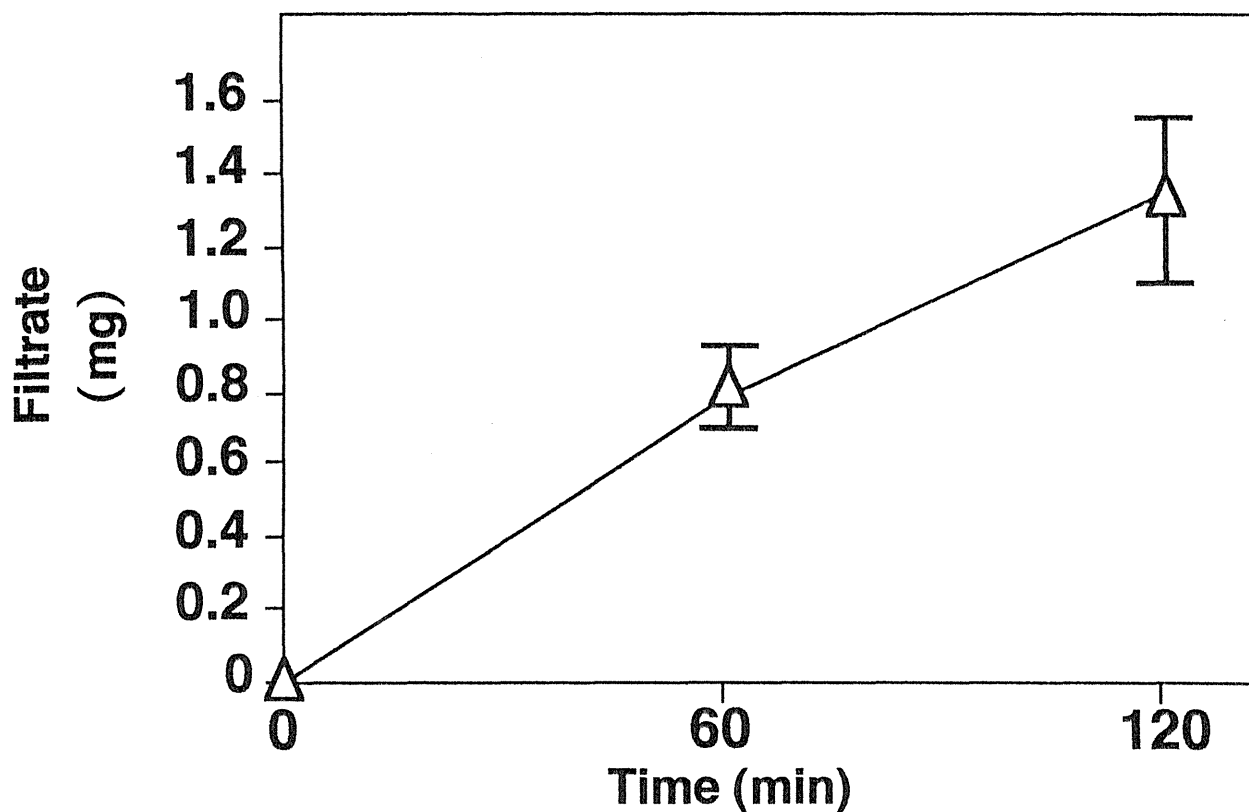


Fig.13 Relationship between amount of filtrate and centrifugation time

The results are means \pm S.D. for four measurements.

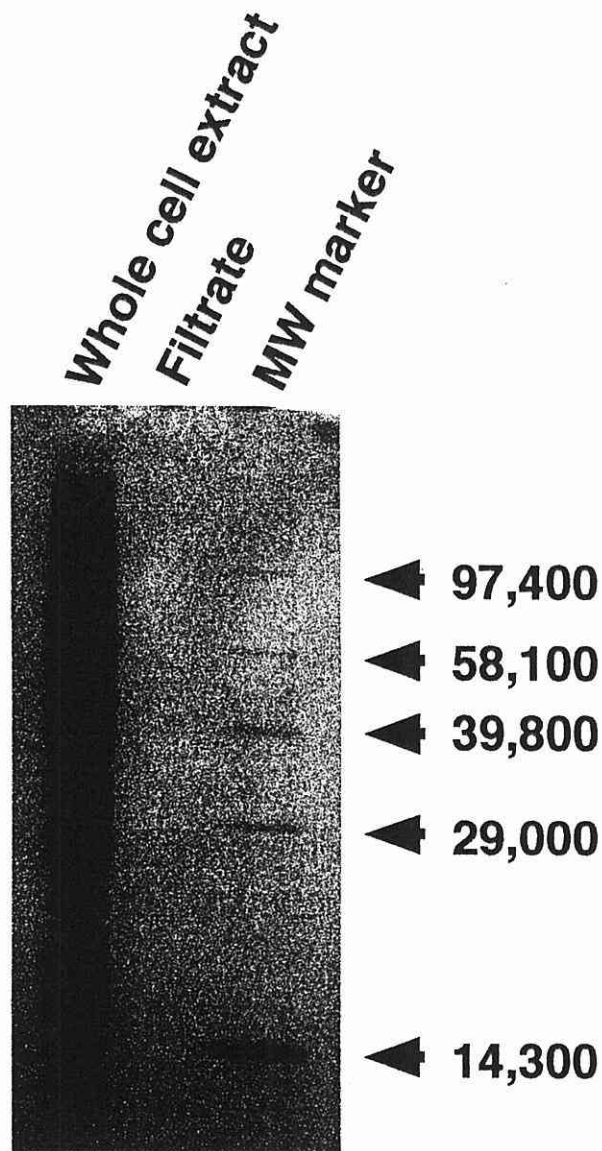


Fig.14 SDS-polyacrylamide electrophoresis of whole cell extract and filtrate.

Left lane, whole cell extract of 2×10^5 cells ; middle lane, $0.6 \mu\text{L}$ of the filtrate which corresponds to the cellular water volume of 2×10^5 cells ; right lane, molecular weight marker. Molecular weights are indicated by arrows.

第四節 ろ液中ポリアミン量の分析

緒言にも述べたように、細胞内のポリアミンは、ほとんどが結合型として存在し、遊離型のポリアミン量はポリアミンの種類により異なり、全ポリアミンの数%から数10%であることが推察されている⁸⁾。したがって、限外ろ過が有効に働いていれば、ろ液中のポリアミン組成および濃度が、全ポリアミン量を測定した場合とは大きく異なることが予想される。そこで、ろ液中のポリアミンを分析した。表3には、ろ液中ポリアミン濃度、および 10^6 個細胞当たりの遊離型および全ポリアミンの含量、遊離型の全ポリアミン量に対する割合をパーセントで示した。遊離型ポリアミン含量は、ポリアミンの分布容積を水容積、 $3,000(\mu\text{m})^3$ と仮定して計算した。全ポリアミン含量に比べてろ液中のポリアミン量は、その組成および量が大きく異なり、限外ろ過が有効に働いていることが示唆された。また、遊離型ポリアミンの割合は、Putが23%、Spdが8%、Spmが2%であり、これまで核酸とポリアミンの親和性からシミュレーションによって予想されてきた割合に近似する結果が得られた⁸⁾。すなわち、本法が遊離型ポリアミンを測定するための簡便な試料調製法として有用であることが示唆された。

Table.3 Concentration and content of free and total polyamine

	Free polyamine		Total polyamine	Free / Total (%)
	nmol/ μ L ^{a)}	nmol/10 ⁶ cells ^{b)}	nmol/10 ⁶ cells ^{c)}	
Put	77	232	990	23
Spd	143	430	5600	8.0
Spm	27	82	4100	2.0

a) The values were represented as the mean of duplicate determinations.

b) The values were calculated from the assumption that free polyamines were equally distributed in cellular water.

[Content] = [concentration] x [cellular water volume] x [cell number]

c) The values were represented as the mean of triplicate determinations.

考察

$^3\text{H}_2\text{O}$ が細胞内水と容易に置換することを利用するオイル法は、従来から細胞内の空間領域を推察する方法として用いられていた⁴⁾が、その方法をHTC細胞における水容積の測定に応用し、簡便に測定する条件を確立した。簡便さに主眼をおいたため、付着水も含めた形で水容積を求める条件となったが、細胞内成分が分布しうる最大容積の算出には十分に意味のある方法と考える。

細胞内外の浸透圧の変化によって、細胞容積は容易に変化するが、その際、細胞の膨張や収縮が持続すると細胞死がもたらされるために、細胞はその容積を調節する独自の機構を持っている⁹⁾。細胞外が低浸透圧あるいは細胞内が高浸透圧になると、細胞は一般に一過性の膨張の後、KClと水を細胞外に流出させてRegulatory Volume Decrease(RVD)と呼ばれる容積調節を行う。一方、細胞外が高浸透圧あるいは細胞内が低浸透圧になると、細胞は一過性の収縮の後、NaClと水を細胞内に流入させてRegulatory Volume Increase(RVI)と呼ばれる容積調節を行う。図7に示される結果は、0.5% NaCl溶液に懸濁した場合にはRVDが、1.5% NaClに懸濁した場合にはRVIが起ることを示唆しており、フローサイトメーターなど光学的に粒子体積を測定する装置によって検出されていたRVDやRVIが、本法によっても簡便に確認できることを示している。本法は、RVDやRVIの原因となる水容積変化を直接検出する方法でもあり、測定値の偏差も比較的小さく、細胞容積調節機構の研究にも簡便で有用な手段として用いることができるだろう。

当研究室では、細胞内ポリアミンの蓄積の影響を調べるうちに、Spdの蓄積により細胞の収縮が起こることを顕微鏡観察により推察してきた。しかし、その際の細胞の大きさを顕微鏡写真上の細胞径から数値化すると、個々の細胞径が大きく異なるため、Spdの蓄積に伴う細胞容積の変化を明瞭に示すには至らなかった。今回、水容積の変化を測定することにより、細胞内Spdの蓄積により水容積が減少することがはじめて明確に示された。また、その際、細胞内ポリアミンの枯渇に伴い水容積が徐々に減少することもはじめて明らかになった。

ポリアミンの枯渇に伴う水容積の減少は、Spdの枯渇に基づく、以下に示すような2次的な影響であろうと考えられる。ポリアミン合成を阻害し

て増殖が停止する場合、細胞内のタンパク合成能が低下し、細胞は細胞周期のG1後期で増殖を停止する。さらにその細胞核の *in vitro* におけるDNA複製能は、ポリアミンを試験管内で添加しても回復しないため、ポリアミンの枯渇に基づいて、S期に入るために必要な細胞周期関連のタンパク合成が起きないことが、増殖停止の主因であろうと考えられている¹⁰⁾。図10に示されるように、水容積の変化が、Spdがほとんど枯渇する1日目には起こらず、増殖がほとんど起こらないAOAP処理2日目以降に起きることからも、Spd低下と直接関連した現象ではないだろう。本実験系では、すでに当研究室の懸が、AOAP処理4日間でタンパク合成能が対照の20%以下になることを確認しており¹¹⁾、タンパク合成能の低下に基づく、コロイド浸透圧の低下や細胞容積調節の機能低下が同時に起こる結果であろうと推察する。

一方、Spdの蓄積の際起こる水容積の減少は、その蓄積とほぼ平行して起こることから、Spdの直接作用であることが示唆される。先にも触れたように、細胞は容積変化に数分で反応する調節機構をもつので、継続的な容積の収縮は、その調節機構に何らかの異常が起きたためであると考えられる。本研究で用いたHTC細胞は、低張溶液中で明確なRVDを示すこと明らかになっているが、その際、細胞膜に存在するCl⁻チャンネルの開口が、KClと水の流出を起こし、細胞を縮小させる機構が提案されている⁶⁾。最近、ポリアミンがK⁺チャンネルなどの細胞膜上のイオンチャンネルの調節に関与することも示唆されており、細胞内に蓄積したSpdが、Cl⁻チャンネルあるいはチャンネル開口までの過程に作用するかどうかを明らかにすることは、今後の興味深い課題であろう。

本研究で考案した限外ろ過法を用いることで、生理的な状態の細胞の細胞質ゾルの効率よい限外ろ過が可能であることが示された。細胞の破碎条件、ろ過膜へのポリアミンの吸着、測定精度などの検討は今後の課題であるが、懸濁培養が可能な細胞における、遊離ポリアミン量測定用の簡便な試料の調製法として有用になるものと思われる。

Watanabeら⁸⁾は、細胞内で、SpdおよびSpmが結合平衡を形成しうる主要な生体成分は、DNA、RNA、リン脂質およびATPであると考え、各ポリアミンとそれらの成分との親和性を実験的に求めた後、ウシリンパ球中に存在するこれらの成分にどの程度ポリアミンが分布しうるかをシミュレー

ションによって算出した。その結果、遊離型ポリアミン量の全ポリアミン量に対する割合は、Spdが15.0%，Spmが5.1%と算出されている。本研究で測定されたろ液中のポリアミン濃度と、水容積をポリアミン分布容積と仮定して算出した遊離型の割合はそれぞれ8%，2%であり、細胞内では大部分のポリアミンが結合型として存在するとする計算結果を支持するものとなった。本研究では、遊離型ポリアミン量の算出に水容積を用いたが、今後、より精度の高い推測を可能にするためには、ろ液中のアミノ酸等、ポリアミンと近似した分子量を持ち、細胞中の成分と強い相互作用を示さない成分の分布も明らかにし、ポリアミン分布容積の指標の一つにする必要があるものと考えている。

実験方法

1. 試薬

新生仔牛血清(NBS)はCell Culture Laboratories社, 培養実験に用いた他の生化学試薬はすべてSigma社あるいはGibco Laboratories社のものを用いた。ポリアミン欠乏細胞の調製に用いた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のものを用いた。放射性同位体物質は $^3\text{H}_2\text{O}$ (95mCi/mL)と ^{14}C -デキストラン(1.5mCi/g)を室町化学より購入し用いた。その他化学試薬は関東化学株式会社あるいは和光純薬工業株式会社の試薬特級を用いた。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用いた。ろ過ユニットは基礎検討に用いた6種類全てMILLIPOA社のものを用いた。放射能を測定する際に用いたシンチレーションカクテルは和光純薬工業社のScintisol EX-H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°C で保存していた細胞を懸濁培養に供して用いた。培地は, Swim's S-77に50 mM Tricine, 2g/L Glucose, 2 mM Glutamine, 0.05 mM L-Cystine, 0.5 g/L 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になるように加えて用いた。懸濁培養では $1\sim 10 \times 10^5$ cells/mLになるように48hr毎¹²⁾に植え継いだ対数増殖期の細胞を実験に用いた。細胞数は, 細胞懸濁液を0.4%トリパンブルー溶液で2又は4倍に希釈したのち, Burker-Turk型血球測定盤上で計数した。その際, 血球測定盤の枠に全体が入っていない細胞は二つで一つの細胞として計数した。測定は5視野について行い, 最高・最低数を除外して3回の平均を細胞数とした。尚, トリパンブルーを取り込んだ細胞は死細胞として計数した。

3. ポリアミン枯渇細胞及び過剰蓄積細胞の調製

対数増殖期にある細胞を、血清アミノオキシダーゼ阻害剤であるAG (アミノグアニジン) を1mMになるように加えた培地で48時間前処理した。48時間後から上記条件にAOAP300 μ M(最終濃度)を加えた培地で96時間処理し細胞内ポリアミンを枯渇させた。ポリアミン過剰蓄積細胞は、上記のように処理したポリアミン欠乏細胞をAG,AOAP共存下Spd100 μ Mを含む培地中で培養し調製した。

4. オイル法による細胞の分離

遠心して濃縮し、約 5×10^6 cell/mLとした細胞懸濁液200 μ Lをオイル (Dibutyl phthalate : Corn oil=10 : 3 , 200 μ L) 上に重層して60秒後に、遠心(10000rpm,1min)し、細胞をペレットとして分離した。

5. 細胞水容積の算出

細胞懸濁液にトリチウム水 (1 mCi/mL) を1/100容量添加し、60秒後にオイル法で分離した。水層のみを除去し、PBS(100 μ L)で油層上部の壁面を洗浄、細胞に触れないように注意しながらできるだけ油層を除去した。分離した細胞に溶解剤 (ソルバブル) 200 μ Lを加え一晩放置した後、その放射能を測定した。このペレットの持つ放射能と、オイル法で分離した上清の単位容量当たりの放射能及びペレット中の細胞数 (死細胞も含む) から細胞水容積の算出を行った。

6. 実測からの細胞容積の算出

ビデオプリンターにより記録した血球測定盤上の細胞(倍率400倍)の顕微鏡写真から、細胞の長径とそれに直行する直径をノギスを用いて測り、平均を算出し、細胞を球として細胞容積を算出した。細胞直径の測定は30個の細胞について行った。

7. ^{14}C -デキストラン排除容積からの細胞体積の算出

あらかじめ重量を測定した試験管に $6\sim 8 \times 10^5$ cell/mLの細胞懸濁液を約6.5mLを採取し、 $80 \times g$, 1 minで遠心してペレットとした。上清を2mL残して除去し、培地に ^{14}C -デキストラン水溶液 ($0.01\mu\text{Ci/mL}$) 300 μL を加え細胞を懸濁した後、遠心して上清を除いた。そのペレット重量から、ペレット容積を比重1.0として算出した。次にペレットに含まれる放射能を測定し、細胞外液量を算出した。ここからペレット中に含まれたデキストラン溶液量を算出した。ペレット容積からペレット中の細胞外液量を引き、細胞のみの容積を算出した。この容積を再懸濁液について計数した細胞数で割ることで細胞一個当たりの細胞容積を算出した。

8. 細胞質ゾルの限外ろ過

限外ろ過膜上でオイル法により細胞を分離後、ろ過ユニットを液体窒素による凍結 (20min)と室温の水による融解 (10min) を三回繰り返して細胞を破碎した。破碎後限外ろ過ユニットの受け側チューブを新しい1.5mLのチューブに取り替えて遠心($5000 \times g$, 2min)し、ろ液を得た。得られたろ液量はチューブの重さを、遠心後チューブの重さから差し引くことで算出した。

9. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動¹³⁾

調製した細胞試量溶液に同量の電気泳動用試料緩衝液(28mM NaH_2PO_4 , 72mM Na_2HPO_4 , 1% SDS, 1.1% mercaptoethanol, 36% urea)を加え、沸騰水浴中で10minインキュベーションしたものを電気泳動試料とした。泳動に用いたゲルは市販のグラジエントゲル「マルチゲル 15/25」(第一化学薬品社)を用いた。蛋白の検出は以下クマシーブリリアントブルー染色により行った。泳動後、ゲルを染色液 A(EtOH 50mL, H_2O 120mL, 35% HCHO 30mL, Coomassie brilliant blue R-250 0.2g)で1時間処理し、次ぎに染色液 B(EtOH 50mL, H_2O 150mL, 35% HCHO 2mL,

Coomassie brilliant blue R-250 0.25g)で一晩放置した。続いて脱色液 C (EtOH 125mL, H₂O 375mL, 35% HCHO 5mL)で約3時間処理したのち、染色像を記録した。

10. ポリアミン量の測定¹⁴⁾

全ポリアミン量の測定では、PBSで1回洗浄した細胞ペレットに、10%トリクロロ酢酸溶液を加え除タンパクし、遠心した上清を定量用試料とした。ろ液におけるポリアミン量の測定では、ろ過により得られたろ液量に10%トリクロロ酢酸を加えて除タンパクし、遠心した上清を試料とした。ポリアミン量の測定はOPA(*o*-フタルジアルデヒド)-ポストカラムHPLC法により行った。

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, 1988.
- 2) 古海直美, IS-MSによるポリアミンの新規定量法の開発と肝ホモジネート中ポリアミンの分画測定, 城西大学大学院平成九年度修士論文.
- 3) L.J. Marton and A.E Pegg, Polyamines as targets for therapeutic intervention, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* .35 : 55-91, 1995.
- 4) R.M. Wohlhueter, R. Marz, J.C. Graff, and P.G. W Plagemann, A rapid-mixing 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) S. Waldegger, J Matskevitch, G.L Busch, F Lang, Introduction to cell volume regulatory mechanisms, *Contrib Nephrol. Basel, Karger* . 123 : 1-7, 1998.
- 6) A.P. Ferachak, R.M. Roman, E.M. Schwiebert , and J.G. Fitz, Phosphatidylinositol 3-Kinase contributes to cell volume regulation through effects on ATP release, *J Biol Chem* .273(24) : 14906-14911, 1998.
- 7) 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五年度修士論文.
- 8) S. Watanabe, K. Kusama-Eguchi, H. Kobayashi, K. Igarashi, Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver, *J Biol Chem* .266 : 20803-20809, 1991.
- 9) 岡田泰伸, Clチャンネルと細胞容積調節及び細胞死, *Mebio*.15(6) : 61-68, 1998.
- 10) L.J. Marton and D.R. Morris, in Inhibition of polyamine metabolism, P.P. McCann, A.E. Pegg, and A. Sjoerdsma (eds.), Molecular and cellular function of the polyamines, Academic press, New York., 79-105, 1987.
- 11) 懸宗彦, ポリアミン欠乏HTC細胞におけるスペルミジン過剰蓄積の機構, 城西大学大学院平成七年度修士論文.
- 12) P.P. McCann, C.Tardif, P.S. Mamont, F.Schuber, Biphasic induction of ornithine decarboxylase and putrescine levels in grwing HTC cells, *Biochem Biophys Res Commun* .64 : 336-341, 1975.

- 13)U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature(London)* .227 : 680-5,1970.
- 14)A.Shirahata, N. Takahashi, T. beppu, H. Hosoda, K. Samejima, Effects of inhibitors of spermidine synthase and spermine synthase on polyamine synthesis in rat tissues,*Biochem Pharmacol* .45(9) : 1897-1903,1993.