

ポリアミン

Polyamine

Vol.2 No.1
Apr. 2015

巻頭言

松藤 千弥

シリーズ ポリアミン研究

柏木 敬子

シリーズ 実験手技ノート

森屋 利幸

東 恭平

学会レビュー

早田 邦康

草薙 大輔

年会報告

石田 真巳

会計報告

学会より

日本ポリアミン学会

The Japanese Society of Polyamine Research

ポリアミン Polyamine

Vol. 2 No. 1
Apr. 2015

巻頭言

学会を「世界への扉」に 松藤 千弥 1

シリーズ ポリアミン研究

原核細胞及び真核細胞のポリアミン輸送系の性質とその生理的意義 柏木 敬子 2

シリーズ 実験手技ノート

はじめに 大城戸 真喜子 12

HPLC によるポリアミン分析 森屋 利幸 15

ポストカラム HPLC 法によるポリアミン分析 東 恭平 19

編集部より筆者への質問コーナー 26

学会レビュー

The Third International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives への参加報告 早田 邦康 28

日本分子生物学会に参加して 草薙 大輔 30

年会報告

第 6 回年会総括 石田 真巳 31

日本ポリアミン学会 第 6 回評議員会議事録 32

日本ポリアミン学会 第 6 回総会議事録 34

会計報告 36

学会より 37

編集後記 39





学会を「世界への扉」に

松藤 千弥

日本ポリアミン学会 事務局長

東京慈恵会医科大学 学長

学会誌「ポリアミン」の通算第3号発行の運びとなりました。毎号読み応えのある内容で、会員相互をつなぐ媒体として今後がとても楽しみです。広報委員会の献身的なご努力に敬意を表します。

創刊号の巻頭言では大島泰郎会長が「自由と自主の精神」の大切さを、第2号では大澤仲昭先生が「学際性」という本学会が誇るべき特長を、それぞれ説いてくださいました。私は本学会に期待されているもうひとつの役割、「世界への扉」について書いてみたいと思います。

本学会の前身である日本ポリアミン研究会が発足したのは1985年ですが、その翌年の1986年には日本で最初の国際ポリアミン会議が開かれました。その後1990年、1996年、2004年と国際会議の開催を重ねました。世界中のポリアミン研究のコミュニティはそれほど大きいわけではありませんが、適度な数の研究者がアメリカを中心として、イタリア、北欧、イスラエルなどに散らばっています。最近ではアジア諸国にも研究者が増えているようですが、日本は以前からポリアミン研究が盛んな国のひとつです。世界のポリアミン研究者は、国際会議で日本に来るのを楽しみにしているようなふしがあります。最近の国際会議は、日本ポリアミン学会の第1回年会を兼ねて静岡県御殿場市で開催された「2010 国際ポリアミン会議 -医学・生命科学への展開-」でした。日本ポリアミン学会は世界への扉として誕生したことになります。

もともと日本ポリアミン研究会は、手軽な自由参加を優先し、年会費を徴収せずに運営されてきました。これを学会に改組した最大の理由は財政的なものだったのです。ポリアミン研究会当時は、大澤仲昭先生が理事長を務められていた日本国際ポリアミン研究基金が財政基盤であり、ポリアミンの医療応用への期待や国の好調な経済のおかげで手厚い支援が得られていました。しかし2000年代になると企業等からの寄付がなかなか集まらなくなりました。国際会議には、会場費や海外からの講演者の招聘などでお金がかかります。日本で国際会議を開催していくには、学会として自己資金を準備しなければならなかったのです。今学会では、皆さんの年会費や、賛助会員などからの寄付を、こつこつ貯めている状況です。一方、ホームページは自前で作り、学会誌もご覧のように電子出版の形にして支出を抑えています。次の国際会議のためにも、皆さんが年会費を納めてくださることが大切であることをどうかご理解ください（つい事務局長らしいことを書いてしまいました）。

本学会の「世界への扉」としての役割は、国際会議の開催だけではありません。アメリカで隔年開催される「ポリアミンに関するゴードン会議」をはじめ、世界各地の関連会議の情報を届けたり、若手研究者の渡航補助をしたりしています。私自身の経験からも、研究による国際交流は、研究を前進させ、キャリアを作り、視野を広げる貴重な機会であり、何よりも楽しみであります。本学会がみんなの「世界への扉」として役立てるように、ご協力をお願いいたします。

原核細胞及び真核細胞のポリアミン輸送系の性質とその生理的意義

柏木 敬子

千葉科学大学薬学部病態生化学研究室

(〒288-0025 銚子市潮見町 15-8)

連絡先 柏木敬子、e-mail: kkashiwagi@cis.ac.jp

細胞増殖・分化に重要な役割を果たすポリアミン[プトレッシン (PUT), スペルミジン (SPD), スペルミン (SPM)]^{1,2)}の細胞内濃度は、生合成、分解、輸送により調節されている。本総説では、大腸菌、酵母、原生動物、植物及び哺乳動物で、これまで同定されているポリアミン輸送系の性質とその生理的意義について解説する。

1 はじめに

ポリアミンは、低分子生理活性物質として、 Mg^{2+} 、ATP、グルタチオンと共に、細胞内に mM オーダーの濃度で存在し、主として RNA との結合により、蛋白質合成や RNA の機能調節に

関与している²⁾。このポリアミンの細胞内濃度調節には、ポリアミン輸送が生合成、分解と共に、非常に重要な役割を担っている。このポリアミン輸送系について、筆者らの知見を中心にして、これまでに明らかになったことを以下に述べる。

2 大腸菌のポリアミン輸送系

大腸菌でこれまでに判明しているポリアミン輸送系を示す(図1)³⁾。細胞の外側の pH が中性の場合は、ABC (ATP binding cassette) 輸送系に属する PotA, B, C, D の4種の蛋白質から成る SPD 優先取り込み系と、PotF, G, H, I の4種の蛋白質から成る PUT 取り込み系が機能し、ポリ

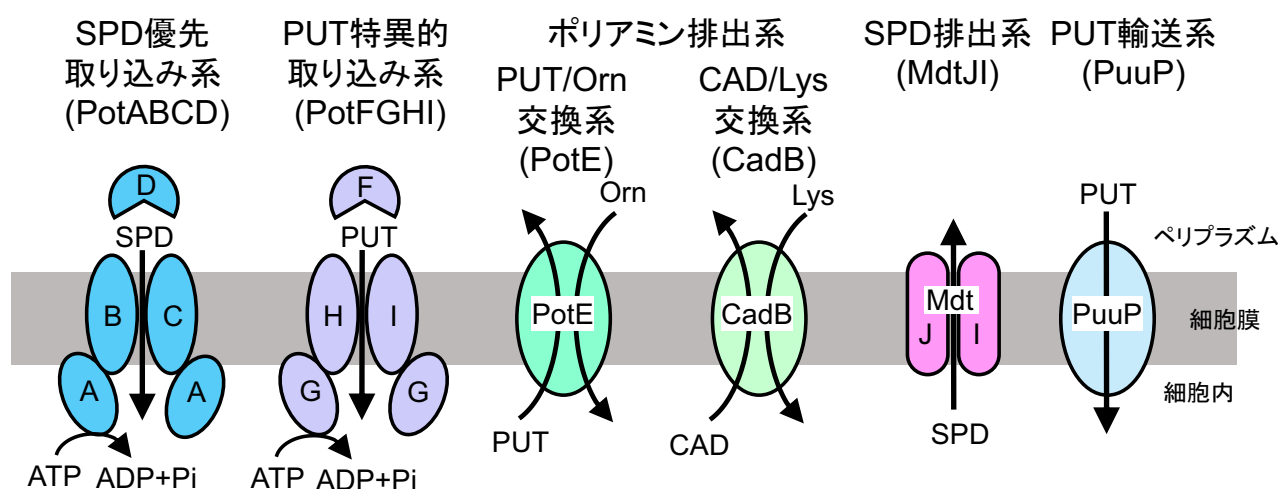


図1. 大腸菌のポリアミン輸送系

大腸菌には ABC 輸送系に属する2種のポリアミン取り込み系 (SPD 優先取り込み系 PotABCD 及び PUT 特異的取り込み系 PotFGHI), APC 輸送系に属する2種のポリアミン排出系 (PUT/ オルニチンアンチポーター PotE 及びカダベリン/ リジンアンチポーター CadB), SMR に属する SPD 排出系 (MdtJI) 及び PUT 輸送系 (PuuP) が存在する。

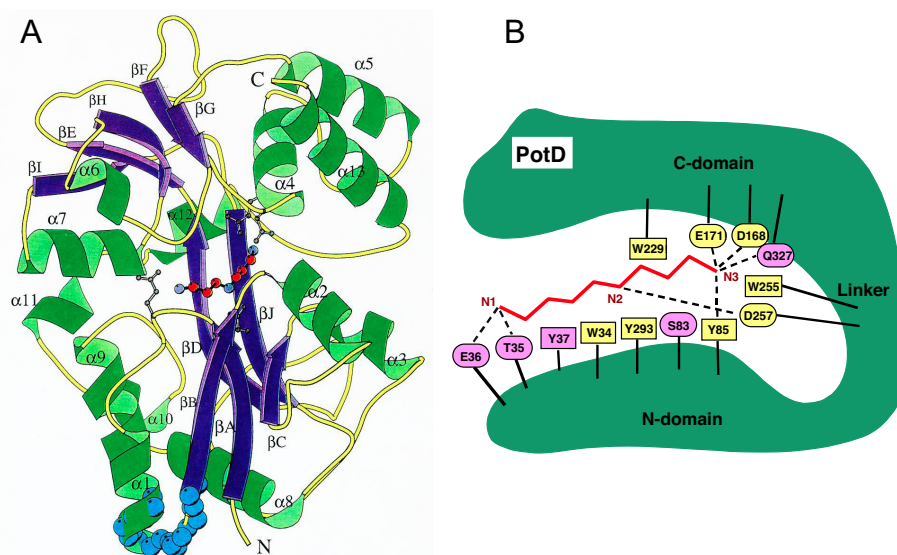


図2. PotD 蛋白質の結晶構造 (A) と基質 SPD 認識に関わるアミノ酸残基 (B)

A. N-ドメインが下に、C-ドメインが上に書かれている。 α -ヘリックスを緑で、 β -シートを紫で、コイルとループ構造を黄色で、及び、ABC 輸送系の基質結合蛋白質間で保存されている配列を青で示した。基質 SPD は二つのドメイン間の溝に存在している。SPD 結合部位を 4 個の酸性アミノ酸残基の側鎖で示した。B. 酸性アミノ酸残基、セリン及びスレオニンを楕円で、芳香族アミノ酸残基を長方形で示した。結晶構造解析及びアミノ酸変異蛋白質の活性測定より、SPD 認識に強く関与するアミノ酸残基を黄色で、中程度に関与するアミノ酸残基をピンクで示した。SPD をジグザグ構造の赤で示し、極性相互作用を破線で示した。

アミン濃度を調節している。PotABCD 系の基質結合蛋白質である PotD の SPD 結合部位が X 線結晶構造解析で明らかとなり⁴⁾、かつ、SPD を

認識する PotD 蛋白質中のアミノ酸残基も明らかとなっている (図 2)⁵⁾。また、取り込みに必要なエネルギーである ATP の ATPase である PotA

1	MGQSKLKNQ	PSSLSPLVQL	AGIRKCFDGK	EVIPQLDLTI	NNGEFLTLG	50
			C26T	F27L	F45L	
51	PSGCGKT TVL	RLIAGLETVD	SGRIMLDNED	ITHVPAENRY	VNTVFQSYAL	100
	C54T	L60F	L76P		ABC signature	
101	FPHMTVFENV	AFGLRMQKTP	AAEITPRVME	ALRMVQLETIF	AQRK THQLSG	150
		Walker motif B	LDE SLSALDY	V135M		
151	SGQDR AIAR	AVVNKPRLL	D172N	KLRKQMONE	KALQRKLGIT	200
201	FVFTVDQEE	ALTMSDRIV	MRDGRIEQDG	TPREIYEPEK	NLFVAGFIGE	250
251	INMFNATVIE	RLDEQVRAN	VEGRECNIV	NFAVEPGQK	HVLLRPEDLR	300
					E297K	
301	VEEINDDNHA	EGIGYVRER	NYKGMTLESV	VELENGKMV	VSEFFNEDDP	350
351	DFDHSLDQKM	AINWVESWEV	VLADEEHK			378

図3. PotA 蛋白質のアミノ酸配列と活性に関与するアミノ酸変異

378 残基から成る PotA 蛋白質のアミノ酸配列中の、ABC 輸送系の ATPase に保存されている Walker motif A, ABC signature 及び Walker motif B を示した。赤字で示した変異体は、random mutagenesis により得られた SPD 輸送活性と ATPase 活性が低下した変異体 (F27L, F45L, L60F, L76P, D172N 及び E297K) である。PotA E297K 変異体では輸送活性及び ATPase 活性が低下するばかりでなく、SPD による ATPase 活性阻害が減弱したことから、PotA の C 末端側が SPD による feedback 阻害に関わることが明らかになった。その他、Cys²⁶ は 8-azido ATP 結合部位であるとともに、PotA 二量体化に必要であり、Cys⁵⁴ は膜貫通蛋白質 PotB との相互作用に関わっている。PotA V135M 変異は、SPD 輸送欠損株の大腸菌 NH1596 における変異である⁴⁰⁾。

蛋白質中の活性に関与するアミノ酸残基と、SPD による feedback 阻害に関わるアミノ酸残基が同定された⁶⁾。ATPase の活性中心は ABC 輸送系間で保存性の高い PotA 蛋白質の N 末端側に存在し、SPD による feedback 阻害に関わるアミノ酸残基は PotA 蛋白質の C 末端側に存在していた (図 3)⁶⁾。さらに、膜貫通領域を構成する PotB, PotC 蛋白質に関しては、細胞膜への蛋白質の挿入, PotD 蛋白質との結合, SPD の認識, ATPase 活性に関与するアミノ酸残基を同定した (図 4)⁷⁾。また、ポリアミンが細胞内で過剰になると、両取り込み系は、ATPase の阻害により

feedback 阻害を受けた。

次いで、APC (amino acid-polyamine-organocation) 輸送系に属する PotE (PUT / オルニチンアンチポーター) と CadB (カダベリン / リジンアンチポーター) の性質を明らかにした (図 1)^{8,9)}。これらの輸送系は外部環境が酸性の条件下で細胞外に存在するオルニチンまたはリジンを取り込み、細胞内で脱炭酸し、PUT またはカダベリンを排出し、環境を中性化する。両輸送系ともオルニチン脱炭酸酵素遺伝子 (*speF*) またはリジン脱炭酸酵素遺伝子 (*cadA*) とオペロンを形成している。PotE と CadB は 12 膜貫通領域を有し、

A PotBとPotC蛋白質アミノ酸残基のスペルミジン取り込み活性における機能

機能	PotB					PotC					
	W8	Y43	W100	L110	Y261	W46	D108	E169	S196	D198	D199
細胞膜への挿入	○										
PotDとの結合		○	○	○		○	○		○	○	
スペルミジン認識				○	○		○			○	○
ATPase活性			○		○		○	○		○	

B PotABCD複合体によるスペルミジン取り込みモデル

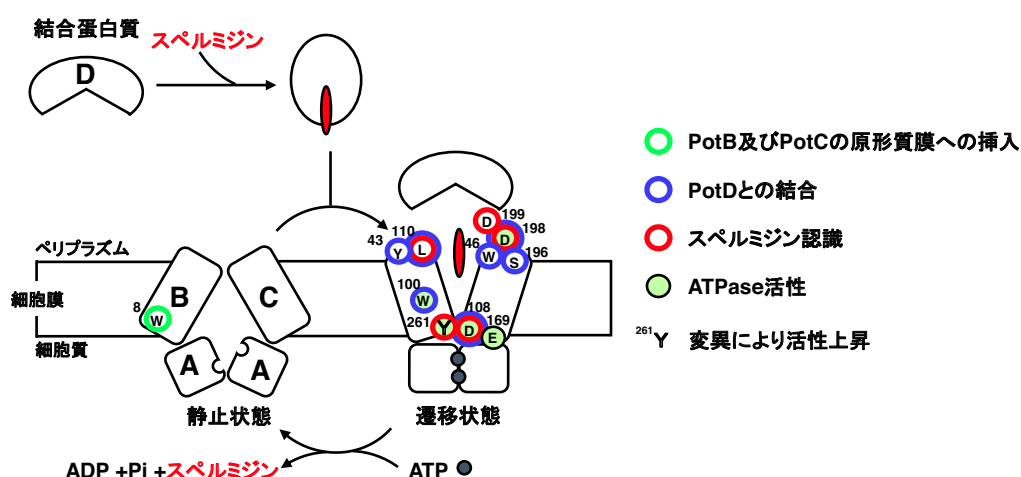


図4. PotABCD 輸送系における SPD 取り込みモデル

A. PotB と PotC のアミノ酸残基の機能。B. SPD 取り込みモデル。PotB Trp⁸ 残基は PotB 及び PotC の細胞膜への挿入に関与し、PotB Tyr⁴³, Trp¹⁰⁰, Leu¹¹⁰, PotC Trp⁴⁶, Asp¹⁰⁸, Ser¹⁹⁶, Asp¹⁹⁸ は、PotABC 複合体と PotD 蛋白質との結合に必要であり、PotB Leu¹¹⁰, Tyr²⁶¹, PotC Asp¹⁰⁸, Asp¹⁹⁸, Asp¹⁹⁹ は膜貫通領域を SPD が通過する際の SPD の認識に関与し、PotB Trp¹⁰⁰, Tyr²⁶¹, PotC Asp¹⁰⁸, Glu¹⁶⁹, Asp¹⁹⁸ は ATPase 活性に関与する⁷⁾。ペリプラズムに存在する PotD に SPD が結合し、PotB と PotC が形成する膜貫通領域を通り、PotA ATPase による ATP の加水分解エネルギーを利用して SPD が細胞内に取り込まれる。SPD が細胞内に充分存在するときは、SPD は PotA の C 末端側に作用して ATPase を阻害し、SPD 取り込みを阻害する。

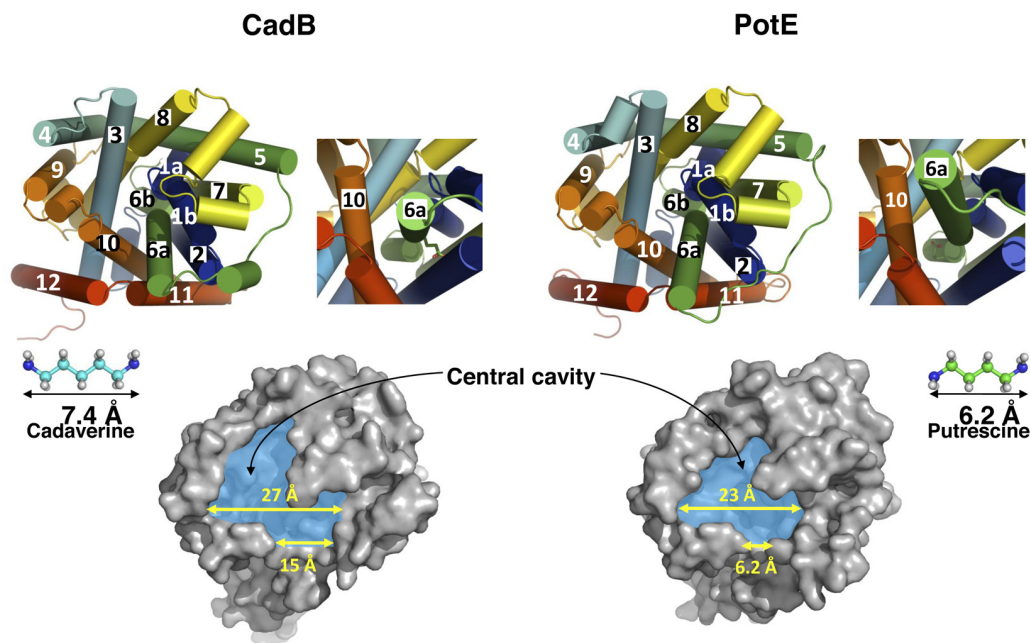


図5. CadB と PotE の中心溝の違い

結晶構造が報告された AdiC (アグマチン / アルギニンアンチポーター) の構造⁴¹⁾に基づき, CadB と PotE の構造モデルを作製し, 基質結合部位である中心溝を示した。上図は細胞外から見た図で, 白四角内に黒字で番号を示してある膜貫通領域が中心溝を形成している。CadB と PotE の中心溝を形成する膜貫通領域 10 と 6a の角度の違いを右の拡大図で示した。下図は中心溝を示し, カダベリン ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$) を結合する CadB の方が, PUT ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$) を結合する PotE より, 中心溝が大きい¹⁰⁾。

12 膜貫通領域で形成される基質認識に関わる中心腔の大きさは, 基質に対応しており, CadB の方が PotE に比べ, 大きかった (図 5)¹⁰⁾。

この他に, 過剰 SPD を排出する系として, SMR (small multidrug resistance) 輸送系に属する 4 ヶ所の膜貫通領域を有する MdtJ と MdtI 蛋白質が同定された (図 1)¹¹⁾。SPD の排出には両蛋白質が必要であり, 活性に必要なアミノ酸残基は主として細胞質に存在した。大腸菌には 33 種の低分子物質を排出する輸送系が存在するが, MdtJI 輸送系のみが SPD の排出に関与していた。

また, グルコースの代わりに PUT を炭素源として大腸菌を培養した場合には, PUT が細胞内にある程度蓄積しても feedback 阻害がかからない PuuP 蛋白質が機能する (図 1)^{12,13)}。この場合, 高濃度の PUT がグルタミン酸, コハク酸に変換され, 大腸菌は増殖可能となる¹⁴⁾。その他に,

新しい PUT 輸送蛋白質として Km 値がやや高い (155 μM) YeeF が報告されている¹⁵⁾。

3 酵母と原生動物のポリアミン輸送系

出芽酵母でこれまでに判明しているポリアミン輸送系を図 6 に示す。取り込み系としては AGP2¹⁶⁾, GAP1¹⁷⁾, DUR3¹⁸⁾ 及び SAM3¹⁸⁾ の 4 種が報告されている。AGP2 は SPD との親和性は高いが輸送活性が低く, 環境応答のセンサーとして働いており, 主として DUR3 と SAM3 がポリアミン輸送活性を担っている^{18,19)}。DUR3 の PUT 及び SPD に対する Km 値はそれぞれ 479 μM と 21.2 μM , SAM3 の PUT 及び SPD に対する Km 値はそれぞれ 433 μM と 20.7 μM である。酵母の野生株 (YPH499) は培地中に PUT が存在しなくとも増殖するが, ポリアミン生合成律速酵素オルニチン脱炭酸酵素を欠損する (Δ

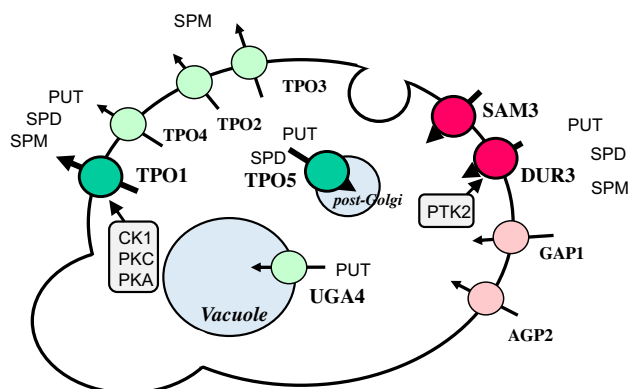


図6. 出芽酵母のポリアミン輸送系

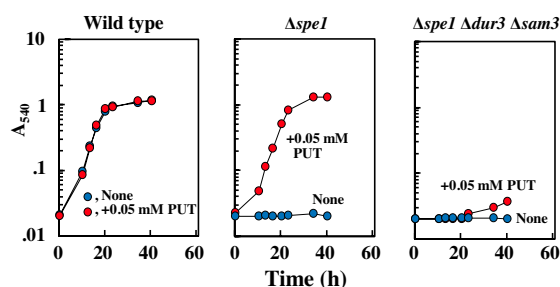
出芽酵母では、細胞膜のポリアミン取り込み系として、AGP2, GAP1, DUR3 及び SAM3 が同定され、AGP2 は環境応答のセンサーとして働き、輸送活性の大部分は DUR3 と SAM3 が担っている。DUR3 は PTK2 による Thr²⁵⁰, Ser²⁵¹ 並びに Thr⁶⁸⁴ のリン酸化により活性化される。UGA4 は液胞に PUT を取り込む。ポリアミン排出系として細胞膜に TPO1 ~ TPO4 が存在し、TPO5 蛋白質が post-Golgi 分泌小胞に存在するが、主として TPO1 と TPO5 が排出蛋白質として機能する。TPO1 は、protein kinase C (PKC) 及び casein kinase 1 (CK1) による Ser¹⁹ 並びに Thr⁵² のリン酸化により活性化され、cAMP-dependent protein kinases 1 と 2 (PKA) による Ser³⁴² のリン酸化により細胞膜への挿入が促進される。

spe1) と、増殖には PUT が必要になる (図 7A)。この株で、DUR3 と SAM3 の遺伝子を欠損させると、どちらか一方の遺伝子欠損で、PUT を加えても増殖が遅くなり、両方の遺伝子を欠損させると、増殖が著しく遅くなった (図 7A)。この増殖速度は細胞内ポリアミン濃度と強く相関していた (図 7B)。この事実は、DUR3 と SAM3 が酵母の主たるポリアミン取り込み系であることを示している。また、polyamine transport protein kinase 2 (PTK2) により DUR3 の Ser²⁵⁰, Thr²⁵¹ 及び Thr⁶⁸⁴ 残基がリン酸化され、DUR3 が活性化されることを明らかにした¹⁸⁾。排出系としては TPO1 ~ 4 蛋白質が細胞膜に存在し、TPO5

蛋白質が post-Golgi 分泌小胞に存在するが、主として TPO1 と TPO5 が排出蛋白質として機能する^{20,21)}。また、TPO1 は protein kinase C 及び casein kinase 1 により活性化され、cAMP-dependent protein kinases 1 と 2 により細胞膜への挿入が促進される²⁰⁾。その他に、UGA4 蛋白質が液胞に存在し、PUT を液胞中に蓄積する²²⁾ (図 6)。

原生動物には高親和性のポリアミン輸送系が存在する。*Leishmania major* の LmPOT1 は PUT を優先的に取り込み、SPD も取り込むことができる。PUT に対する K_m 値は 10.2 μ M である²³⁾。また、ポリアミン生合成系を有しない *Trypanosoma cruzi* では SPD を主に取り込む輸送

A. プトレッシン存在下及び非存在下の細胞増殖



B. ポリアミン含量

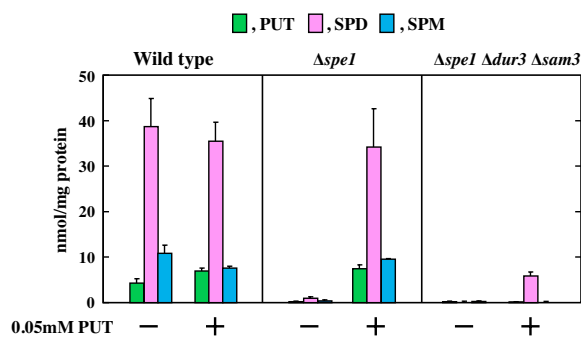


図7. 出芽酵母 DUR3 と SAM3 によるポリアミン取り込み

A. PUT 存在下及び非存在下における細胞増殖。酵母の野生株 (YPH499) では培地中の PUT 有無に関係なく細胞増殖するが、オルニチン脱炭酸酵素欠損株 ($\Delta spe1$) では、培地に PUT が存在しないと増殖しない。 $\Delta spe1$ に加え DUR3 と SAM3 遺伝子欠損株 ($\Delta spe1 \Delta dur3 \Delta sam3$) では、培地に PUT を加えても増殖が非常に遅くなる。B. ポリアミン含量。ポリアミン含量は細胞増殖と良く相関する。

系として、TcPAT12が同定され²⁴⁾、SPD に対する K_m 値は 14 μM である。さらに PUT のみを取り込む輸送系として TcPOT1.1 と TcPOT1.2 が同定された²⁵⁾。TcPOT1.1 と TcPOT1.2 の PUT に対する K_m 値は、それぞれ 158 μM と 385 μM であった。また両蛋白質はカダベリンも取り込むことができ、 K_m 値は、それぞれ 18 μM と 4 μM であった。これら PUT 輸送蛋白質は、細胞増殖に重要な SPD を合成するのに重要である。

4 植物におけるポリアミン輸送系

除草剤として用いられるポリアミン類似化合物であるパラコートの *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) への取り込みの研究過程で、L 型アミノ酸輸送系 (LAT) の 1 種である RMV1 (AtLAT1) がポリアミンを輸送することが明らかとなった²⁶⁾。RMV1 は 490 アミノ酸残基からなり、12 膜貫通部位を有する蛋白質であり、パラコート、PUT、SPD、SPM に対する取り込み

の K_m 値は、それぞれ 24.4, 56.5, 2.2, 0.6 μM である。また、パラコートの取り込みはプロトン勾配の阻害剤である CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) により阻害される。また、*Oryza sativa* (コメ) で、前述の *Leishmania major* の LmPOT1 及び *Trypanosoma cruzi* の TcPAT12 とのホモロジーに基づき、SPD 優先輸送系 OsPUT1 が²⁷⁾、さらに OsPUT2 と OsPUT3.1 並びにシロイヌナズナで AtPUT1 – AtPUT3 が同定された。6 種の輸送系の K_m 値は、PUT で 25 ~ 45 μM 、SPD で 1 ~ 15 μM である²⁸⁾。これら植物のポリアミン輸送系はいずれも LAT 輸送系に属し、シロイヌナズナでは RMV1/AtLAT1/AtPUT3, PAR1/AtLAT4/AtPUT2 及び AtLAT3/AtPUT1 である。RMV1/AtLAT1/AtPUT3 は細胞膜に、PAR1/AtLAT4/AtPUT2 はゴルジ膜に、AtLAT3/AtPUT1 は小胞体に存在する²⁹⁾。

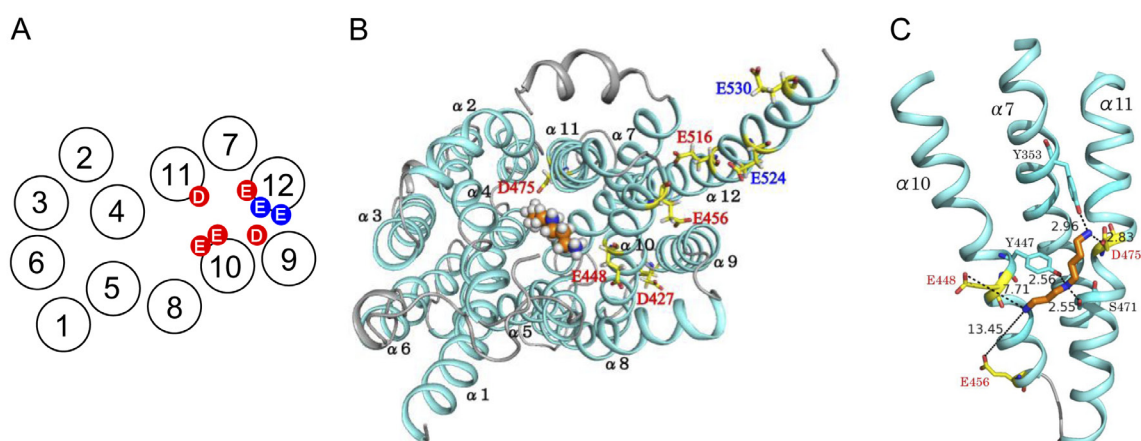


図8. ヒト有機カチオン輸送系 hOCT2 のスペルミジン結合モデル

A. hOCT2 のポリアミン取り込み活性に関わる酸性アミノ酸残基の膜貫通領域 1 ~ 12 上の位置。アグマチン、PUT 及び SPD の取り込みに関わるアミノ酸残基を赤で、PUT と SPD 取り込みに関わるアミノ酸残基を青で示した。B. 細胞質側からのモデル。12 個の α ヘリックスを水色で示し、結合する SPD を水素は白、炭素はオレンジ、窒素は青で示した。C. 側面からの SPD 結合部位。SPD 結合に関わる酸性アミノ酸残基と共に結合に関わると考えられる芳香族アミノ酸残基 (Tyr³⁵³ と Tyr⁴⁴⁷) 及び極性アミノ酸 (Ser⁴⁷¹) を示し、各アミノ酸残基と SPD の 1 級及び 2 級アミノ基との距離 ($\text{\AA}$) を示した。

5 哺乳動物のポリアミン輸送系

哺乳動物のポリアミン輸送系は、細胞内ポリアミン量が減少すると誘導され³⁰⁾、過剰になるとオルニチン脱炭酸酵素の分解を促進するアンチザイムにより阻害される^{31,32)}。そのポリアミン輸送系の3種のポリアミンに対する K_m 値は μM オーダーであること³⁰⁾が明らかとなっているが、細胞膜に存在し、ポリアミンに対する親和性や輸送活性が高いポリアミン輸送系の本体は依然として明らかとなっていない。一方、近年ポリアミン輸送系についていくつか報告がなされた。

最初にポリアミン輸送系と報告されたのは、ヒトのカチオン-Cl⁻共輸送系 CCC9A (SLC12A8A) である³³⁾。この輸送系は前述の APC ファミリーに属している。SPD を優先的に取り込み、SPD に対する K_m 値は約5 μM と親和性は高いが、輸送活性はあまり高くない。また、酵母の AGP2 とホモロジーを有するヒトのカルニチントランスポーター CT2 (SLC22A16) は SPD を側鎖にもつ抗がん性抗生物質ブレオマイシン A5 の輸送系と報告されている³⁴⁾。カルニチンに対する K_m 値は8 μM であり、SPD も輸送し、 K_m 値は0.35 μM と親和性は非常に高いが、輸送活性は低い。

最近、Nichols と私共のグループは^{35,36)}、OCT2 (organic cation transporter 2) (SLC22A2) が PUT, アグマチン, SPD 取り込み活性を有することを証明した。しかしながら、PUT, アグマチン, SPD に対する K_m 値は、それぞれ7.50 mM, 3.27 mM, 6.76 mMと親和性が低く、本来のポリアミン輸送系と異なっていた。しかし、OCT2 はポリアミンが低濃度でも有意な輸送活性があり、いろいろな臓器に存在していることから、ポリアミン輸送の補助的役割を果たしていると考えられる。また、変異体の活性測定より同定したポリアミンの認識部位は12膜貫通領域の後半部に集中しており(図8)、構造は

大腸菌の PotE や CadB と異なっている(図4参照)。

大腸の上皮細胞で PUT の排出系として、PUT / アルギニンアンチポーター活性を有する SLC3A2/y⁺LAT 複合体が同定されている³⁷⁾。SLC3A2 はスペルミジン / スペルミン N^1 -アセチルトランスフェラーゼと親和性があるので、 N^1 -アセチルスペルミジンも排出されると考えられている。

また、脳の記憶形成や脳梗塞時の細胞障害に関与するグルタミン酸受容体の1種である NMDA (N -メチル-D-アスパラギン酸) 受容体は、ポリアミン、特に SPM により神経興奮時に活性化される。この際、SPM はシナプス小胞に蓄積されており、神経興奮時にシナプス間隙に遊離される³⁸⁾。このシナプス小胞にポリアミンを蓄積させるポリアミン輸送蛋白質が最近同定された (SLC18B1)³⁹⁾。SPM, SPD に対する K_m 値は94 μM と4.2 mMで、SPMに高い親和性を有している。SLC18B1 は48 kDaで、ポリアミン取り込みはATP依存性である³⁹⁾。

6 今後の展望

以上述べたように、哺乳動物の細胞膜に存在するポリアミンに対する親和性が高く、輸送活性の高いポリアミン輸送蛋白質が未だ同定されていない。この蛋白質が同定されると、原核・真核細胞のポリアミン輸送系の全貌が明らかになり、ポリアミンの細胞増殖・分化に果たすポリアミン輸送の役割が明確になると思われる。近い将来、このポリアミン輸送蛋白質が同定されることを祈念して筆をおきたい。

参考文献

1. Pegg AE: Mammalian polyamine metabolism and function. IUBMB Life. 61:880-894 (2009)

2. Igarashi K, & Kashiwagi K: Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol.* 42:39-51 (2010)
3. Igarashi K, & Kashiwagi K: Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol Biochem.* 48:506-512 (2010)
4. Sugiyama S, Vassilyev DG, Matsushima M, Kashiwagi K, Igarashi K, & Morikawa K: Crystal structure of PotD, the primary receptor of the polyamine transport system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 271:9519-9525 (1996)
5. Kashiwagi K, Pistocchi R, Shibuya S, Sugiyama S, Morikawa K, & Igarashi K: Spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. Identification of amino acids involved in polyamine binding in PotD protein. *J Biol Chem.* 271:12205-12208 (1996)
6. Kashiwagi K, Innami A, Zenda R, Tomitori H, & Igarashi K: The ATPase activity and the functional domain of PotA, a component of the spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 277:24212-24219 (2002)
7. Higashi K, Sakamaki Y, Herai E, Demizu R, Uemura T, Saroj SD, Zenda R, Terui Y, Nishimura K, Toida T, Kashiwagi K, & Igarashi K: Identification and functions of amino acid residues in PotB and PotC involved in spermidine uptake activity. *J Biol Chem.* 285:39061-39069 (2010)
8. Kashiwagi K, Shibuya S, Tomitori H, Kuraishi A, & Igarashi K: Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 272:6318-6323 (1997)
9. Soksawatmaekhin W, Kuraishi A, Sakata K, Kashiwagi K, & Igarashi K: Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 51:1401-1412 (2004)
10. Tomitori H, Kashiwagi K, & Igarashi K: Structure and function of polyamine-amino acid antiporters CadB and PotE in *Escherichia coli*. *Amino Acids.* 42:733-740 (2012)
11. Higashi K, Ishigure H, Demizu R, Uemura T, Nishino K, Yamaguchi A, Kashiwagi K, & Igarashi K: Identification of a spermidine excretion protein complex (MdtJI) in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 190:872-878 (2008)
12. Kurihara S, Tsuboi Y, Oda S, Kim HG, Kumagai H, & Suzuki H: The putrescine Importer PuuP of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 191:2776-2782 (2009)
13. Terui Y, Saroj SD, Sakamoto A, Yoshida T, Higashi K, Kurihara S, Suzuki H, Toida T, Kashiwagi K, & Igarashi K: Properties of putrescine uptake by PotFGHI and PuuP and their physiological significance in *Escherichia coli*. *Amino Acids.* 46:661-670 (2014)
14. Kurihara S, Kato K, Asada K, Kumagai H, & Suzuki H: A putrescine-inducible pathway comprising PuuE-Ynel in which gamma-aminobutyrate is degraded into succinate in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 192:4582-4591 (2010)
15. Kurihara S, Suzuki H, Oshida M, & Benno Y: A novel putrescine importer required for type 1 pili-driven surface motility induced by extracellular putrescine in *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem.* 286:10185-10192 (2011)
16. Aouida M, Leduc A, Poulin R, & Ramotar D: AGP2 encodes the major permease for high affinity polyamine import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 280:24267-24276 (2005)
17. Uemura T, Kashiwagi K, & Igarashi K: Uptake of putrescine and spermidine by Gap1p on the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 328:1028-1033 (2005)
18. Uemura T, Kashiwagi K, & Igarashi K: Polyamine uptake by DUR3 and SAM3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 282:7733-7741 (2007)
19. Aouida M, Rubio-Teixeira M, Thevelein JM, Poulin R, & Ramotar D: Agp2, a member of the yeast amino acid permease family, positively regulates polyamine transport at the transcriptional level. *PLoS One.* 8:e65717 (2013)
20. Uemura T, Tachihara K, Tomitori H, Kashiwagi K, & Igarashi K: Characteristics of the

- polyamine transporter TPO1 and regulation of its activity and cellular localization by phosphorylation. *J Biol Chem.* 280:9646-9652 (2005)
21. Tachihara K, Uemura T, Kashiwagi K, & Igarashi K: Excretion of putrescine and spermidine by the protein encoded by YKL174c (TPO5) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 280:12637-12642 (2005)
 22. Uemura T, Tomonari Y, Kashiwagi K, & Igarashi K: Uptake of GABA and putrescine by UGA4 on the vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 315:1082-1087 (2004)
 23. Hasne MP, & Ullman B: Identification and characterization of a polyamine permease from the protozoan parasite *Leishmania major*. *J Biol Chem.* 280:15188-15194 (2005)
 24. Carrillo C, Canepa GE, Algranati ID, & Pereira CA: Molecular and functional characterization of a spermidine transporter (TcPAT12) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun.* 344:936-940 (2006)
 25. Hasne MP, Coppens I, Soysa R, & Ullman B: A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol.* 76:78-91 (2010)
 26. Fujita M, Fujita Y, Iuchi S, Yamada K, Kobayashi Y, Urano K, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, & Shinozaki K: Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:6343-6347 (2012)
 27. Mulangi V, Phuntumart V, Aouida M, Ramotar D, & Morris P: Functional analysis of OsPUT1, a rice polyamine uptake transporter. *Planta.* 235:1-11 (2012)
 28. Mulangi V, Chibucos MC, Phuntumart V, & Morris PF: Kinetic and phylogenetic analysis of plant polyamine uptake transporters. *Planta.* 236:1261-1273 (2012)
 29. Fujita M, & Shinozaki K: Identification of polyamine transporters in plants: paraquat transport provides crucial clues. *Plant Cell Physiol.* 55:855-861 (2014)
 30. Kakinuma Y, Hoshino K, & Igarashi K: Characterization of the inducible polyamine transporter in bovine lymphocytes. *Eur J Biochem.* 176:409-414 (1988)
 31. Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K, & Ichihara A: Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature.* 360:597-599 (1992)
 32. Suzuki T, He Y, Kashiwagi K, Murakami Y, Hayashi S, & Igarashi K: Antizyme protects against abnormal accumulation and toxicity of polyamines in ornithine decarboxylase-overproducing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8930-8934 (1994)
 33. Daigle ND, Carpentier GA, Frenette-Cotton R, Simard MG, Lefoll MH, Noel M, Caron L, Noel J, & Isenring P: Molecular characterization of a human cation-Cl⁻ cotransporter (SLC12A8A, CCC9A) that promotes polyamine and amino acid transport. *J Cell Physiol.* 220:680-689 (2009)
 34. Aouida M, Poulin R, & Ramotar D: The human carnitine transporter SLC22A16 mediates high affinity uptake of the anticancer polyamine analogue bleomycin-A5. *J Biol Chem.* 285:6275-6284 (2010)
 35. Sala-Rabanal M, Li DC, Dake GR, Kurata HT, Inyushin M, Skatchkov SN, & Nichols CG: Polyamine transport by the polyspecific organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3. *Mol Pharm.* 10:1450-1458 (2013)
 36. Higashi K, Imamura M, Fudo S, Uemura T, Saiki R, Hoshino T, Toida T, Kashiwagi K, & Igarashi K: Identification of functional amino acid residues involved in polyamine and agmatine transport by human organic cation transporter 2. *PLoS One.* 9:e102234 (2014)
 37. Uemura T, Yerushalmi HF, Tsapralis G, Stringer DE, Pastorian KE, Hawel L, 3rd, Byus CV, & Gerner EW: Identification and characterization of a diamine exporter in colon epithelial cells. *J Biol Chem.* 283:26428-26435 (2008)
 38. Masuko T, Kusama-Eguchi K, Sakata K, Kusama T, Chaki S, Okuyama S, Williams K, Kashiwagi K, & Igarashi K: Polyamine transport, accumulation, and release in brain. *J*

- Neurochem. 84:610-617 (2003)
39. Hiasa M, Miyaji T, Haruna Y, Takeuchi T, Harada Y, Moriyama S, Yamamoto A, Omote H, & Moriyama Y: Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. Sci Rep. 4:6836 (2014)
40. Kashiwagi K, Hosokawa N, Furuchi T, Kobayashi H, Sasakawa C, Yoshikawa M, & Igarashi K: Isolation of polyamine transport-deficient mutants of *Escherichia coli* and cloning of the genes for polyamine transport proteins. J Biol Chem. 265:20893-20897 (1990)
41. Gao X, Zhou L, Jiao X, Lu F, Yan C, Zeng X, Wang J, & Shi Y: Mechanism of substrate recognition and transport by an amino acid antiporter. Nature. 463:828-832 (2010)



シリーズ 実験手技ノート 第1弾

HPLC を用いたポリアミン分析 その①

はじめに

大城戸 真喜子

東京慈恵会医科大学分子生物学講座
(105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8)

連絡先 大城戸真喜子、e-mail: mohkido@jikei.ac.jp

本号より、「シリーズ 実験手技ノート」の掲載を開始します。第1弾は、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いたポリアミン分析①です。

カラムの選択、溶離液、条件など研究室によって異なるのではないかと思います。また論文の method には載らないようなちょっとしたコツもあると思います。今回は HPLC によるポリアミン検出法として最も汎用されている、ポストカラム HPLC 法によるポリアミン分析について、森屋利幸先生、東恭平先生に寄稿をお願いしました。これから HPLC を用いてポリアミン分析をはじめようと思っている方にも分かりやすい内容になっていると思います。またこのシリーズを読んで、「うちのラボではこんな方法で分析しているよ」「こんなカラムを使っているよ」などの情報を、ポリアミン学会広報委員会宛までお寄せいただければ幸いです。実験シリーズの中で HPLC を用いたポリアミン分析その②、その③・・・も企画できればと考えています。

お二人のポリアミン分析の紹介の前に、分離カラムの種類、ポリアミンの特性、アミノ基の誘導体化について簡単に説明したいと思います。なお HPLC の詳しい原理については、専門書や、カラム販売会社のテクニカルレポートなどを参考にしてください。

＜カラムの種類＞

カラムの種類には、イオン交換カラム、順相カラム、逆相カラムなどがあります。イオン交換分離では、イオンの引き合う力、反発し合う力を利用します。陽イオン交換カラムには、-に荷電した交換基 ($-\text{RSO}_3^-$ や $-\text{RCOO}^-$ など) が基材 (シリカゲルやポリマーゲル) に固定されていて、そこを通過する+に帯電した溶質や移動相中の+イオンを親和性に応じて吸着保持します。緻密に充填できるシリカゲルを基材とした方が一般的に理論段数や分離度はあがりますが、塩基性溶質の場合、後述するようなピークテーリングがおきやすいです。

順相分離は、カラム内固定相に存在する吸着点への溶質の吸着現象を利用します。用いられる充填剤にはシリカゲル、アルミナ、活性炭などがあります。中でもシリカゲルが汎用され、シリカゲルのシラノール基の (Si-OH) の酸素原子や水素原子が水素結合性溶質に対する吸着点となります。一方シリカゲルのシラノール基は弱酸 (pK_a 3.5) で、溶離液の pH がシラノール基の pK_a より高い場合シラノール基が解離して (Si-O^-) と上述の陽イオン交換体ともなります。この場合塩基性溶質が強く保持され、ピークのテーリングをひきおこします¹⁾。

逆相分離では、シリカゲルなどの基材に導入し

た脂肪族の疎水性基 (C18, C8, C4, ...) や芳香族の疎水性基 (フェニル, ナフチルなど) が、疎水性溶質を保持しやすい性質を利用します。逆相カラムはシリカゲルを基材として用いたものが主流で、なかでも C18 (オクタデシル基) が結合した ODS (Octa Decyl Silica) カラムが最も使用されています。基材としてポリマーを用いた場合、ODP (Octa Decyl Polymer), C8P, C4P などと表記されることがありますが、統一的なものではなさそうです。一昔前^⑥はポリスチレンの意味で使われていたことも一因かもしれません。

逆相分離において、イオン性化合物の保持を強めて分析する手法のひとつにイオンペア試薬を用いた分離方法があります。イオンペア試薬には目的の溶質とは反対のイオン性と疎水性を有するものを選びます。移動層に添加されたイオンペア試薬は逆相カラムの表面に保持されて、逆相固定相にイオン交換能が生まれ、イオン性化合物が保持されるようになります²⁾。

基材としてシリカゲルが使われている場合、必ず未修飾のシラノール基が残存してします。シラノール基は上述のように塩基性溶質に影響し、ピークテーリングを引き起こす要因となります。シラン化合物によるエンドキャップにより残存シラノール基を除く工夫がされたカラムも市販されるようになりましたが、加水分解されやすくシラノール基に戻ってしまう欠点があります。完全にシラノール基を除去することは難しいようです。塩基性溶質としてポリアミンを分離する際のカラムの基材としては、ポリマーゲルが好まれている気がします。

＜ポリアミンの特性を利用した分離と検出＞

ポリアミンは、炭素骨格部分の疎水性と多価のアミノ基によるイオン性を有します。このポリアミンの性質と上述の充填剤の特性を考慮すると、ポリアミン分離カラムとして、陽イオン交換カラムや、イオンペア試薬を併用した逆相カラム^{3) 4)}などが候補としてあがってきます。またカラムではないですが、シラノール基との吸着を利用した薄層分離もよく用いられています。

ポリアミンは紫外吸収がないために、検出可能な何らかのアミノ基の誘導体化反応 (ニンヒドリン誘導体化、*o*-フタルアルデヒド (OPA) 誘導体化やダンシル化など) が必要になります。この反応をカラムの分離後に行う場合をポストカラム誘導体化、分離前に行う場合をプレカラム誘導体化といいます。ポストカラム誘導体化では未反応試薬は検出されてはならないという制限があり、使用できる試薬の種類に限られます (現在はニンヒドリンと OPA のほぼ 2 種類に限られます)。一方、通常、親水性が強いために逆相分離に不向きとされているアミノ酸やポリアミンに、疎水性の高い官能基をアミノ基に修飾するような誘導体化ができれば、逆相カラムでの分離が可能となります^{3) 5)}。また、誘導体化により塩基性溶質でなくなれば、理論段数の高い ODS カラムを用いた分離も可能となります。このように、ポリアミンの誘導体化を分離の前に行うのか、後に行うのかによっても分離カラムの選別は変わってきます。

プレカラム誘導体化は、試料と直接に混合されることから、反応効率が試料中の共存成分や溶媒の種類の影響を受けやすい、反応後の精製が煩雑

	誘導体化	誘導体化試薬	カラムの種類	カラム品名, 充填剤品名	基材	粒子径	交換基	カラムサイズ	分離
森屋先生	ポストカラム	OPA	陽イオン交換カラム	MCI GEL CK-10S (三菱化学株式会社)	ポリマー (スチレン系)	11 μm	RSO3-	6.0 mm I.D. × 8 cm	アイソクラティック
東先生	ポストカラム	OPA	陽イオン交換カラム	TSKgel Polyaminepak (東ソー株式会社)	ポリマー (スチレン系)	7 μm	RSO3-	4.6 mm I.D. × 5 cm	アイソクラティック

で回収率に影響する、などの欠点があります。その点、ポストカラム誘導体化法は、反応の自動化が可能で、試料調整が容易で、定量性、再現性に優れるという利点があり⁵⁾、ポリアミンの分析に広く汎用されています。

本稿では、森屋先生、東先生に広く汎用されている「ポストカラム HPLC によるポリアミンの検出」について、ノウハウを紹介していただきます。お二人が本稿で用いているカラムや分離方法など表にまとめました。

参考文献

1. 中村洋 監修,「ちょっと詳しい液クロのコツ 分離編」, 丸善出版 (2007)
2. 中村洋 監修,「液クロを上手につかうコツ 誰も教えてくれないノウハウ」, 丸善出版 (2004)
3. Tabor, T., Tabor, CW., Methods in enzymology. Academic Press, 1983, 94 polyamines.
4. ポリアミンとそのアセチル誘導体分析 Shodex テクニカルレポートより <http://www.shodex.com/ja/dc/04/04/06.html>
5. アミノ酸分析法 LCtalk53 号 より <http://www.an.shimadzu.co.jp/hplc/support/lib/lctalk/53/53intro.htm>



HPLC によるポリアミン分析

森屋 利幸

共和化工株式会社環境微生物学研究所
(東京都町田市忠生 2-15-5)

連絡先 森屋 利幸、e-mail: toshiyuki.moriya@kyowa-kako.co.jp

ポリアミンは分子中に複数のアミノ基を持つため、陽イオン交換カラムを用いた HPLC による分析が可能です。しかし、ポリアミン分子には、紫外吸収がありません。そのため、ポリアミンをカラムで分離した後に *o*-フタルアルデヒド (OPA) でラベルし、蛍光検出器を用いて検出します。このシステムでの分析は、

- 1, 比較的普及した HPLC に若干の変更を加えるだけで分析できること。
 - 2, 前処理が簡便であること。
 - 3, 定量性が優れていること。
 - 4, 発色剤を使用しないで運転することで分取用にも使用できること。
 - 5, 高感度であり比較的少ない試料で分析ができること。
- などの多くの利点があります。

以下に、著者らのグループで行っているポリアミンの抽出から前処理、そして、分析の一連の操作を述べます。操作は、高度好熱菌のポリアミンの分析を例にしています。なお、この分析手法は、Methods in Molecular Biology 720:81-111 にも詳しく述べましたので、参照していただければと思います¹⁾。

材料

ポリアミン抽出及び前処理

15% (w/v) トリクロロ酢酸水溶液
シリンジフィルター (DISMIC 25HP020AN (0.2 μ m))

分析

溶離液

Type1 溶離液

クエン酸三カリウム一水和物	32.5 g
塩化カリウム	150 g
1.0 N 塩酸	65 ml
2-プロパノール	50 ml
30% Brij L23 solution	10 ml
水	1 リットル
ヘメスアップ	

Type2 溶離液

クエン酸三カリウム一水和物	32.5 g
塩化カリウム	126 g
1.0 N 塩酸	65 ml
2-プロパノール	50 ml
30% Brij L23 solution	10 ml
水	1 リットル
ヘメスアップ	

水は、超純水またはイオン交換水を使用します。

溶離液は使用前に 0.2 μ m のフィルターで濾過します。量が多いので吸引濾過が便利ですが、濾過前に Brij を添加すると、濾過中に激しく発泡することがあります。その場合には吸引強度を調節してゆっくり吸引する必要があります。溶離液は脱気してから使用することが望ましいですが、強く脱気し過ぎると 2-プロパノールが揮発して濃度に変化してしまい、溶出時間にズレが生じて

しまうので、脱気の状態はできるだけ合わせたほうが再現性が良くなります。

発色試薬

水	968 ml
o- フタルアルデヒド	1 g
水酸化ナトリウム	16.0 g
ホウ酸	24.7 g
EtOH	10 ml
2-メルカプトエタノール	2 ml
30% Brij L23 solution	20 ml

溶離液と同様に、水は超純水またはイオン交換水を使用します。

発色試薬はポリアミンの性質にかかわらず同一の組成のものです。

予め OPA 1 g に対して EtOH を 10 ml の溶液を調整しておきます (4°C 保存)。この溶液を 1 リットルの発色試薬に対して 10 ml、2-メルカプトエタノールを 2 ml を共に使用直前に加えます。

機器の構成

図 1 に、機器の構成を示しました。No.1 ポンプで溶離液を送液します。オートサンプラーで打ち込まれた試料はカラムで分離されます。分離条件を一定に保つため、カラムオープンでカラムを 55°C で保温しています。カラムで分離されたポリアミンは、No.2 ポンプで送液される発色試薬と混合され蛍光ラベルされます。この後、蛍光検出器で検出し記録します。

使用しているカラムは、GL-Sciences Inc. (Tokyo, Japan) のもので、樹脂は MCIGEL CK-10S (MITSUBISHI CHEMICAL、Tokyo, Japan) (ベースポリマー: スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、交換基: RSO_3^- 、平均粒径 11 μm) を使用しています。平均粒径やカラムサイズなどが異なりますが、同様のカラムが、東ソー株式会社から TSKgel Polyaminepak という商品名で販売されています。

操作

ポリアミンの抽出

微生物は、盛んに分裂している対数増殖期と、分裂を停止している静止期では、細胞中のポリア

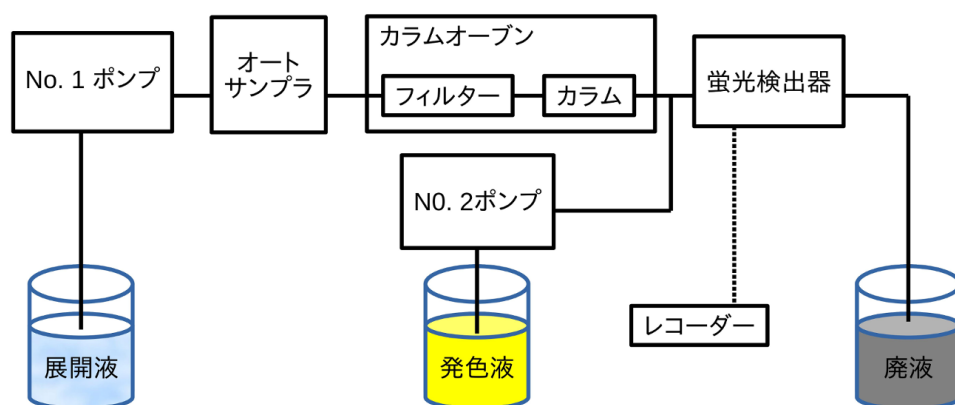


図 1

分析システムの模式図。No.1 ポンプで溶離液を送液し、オートサンプラーから入った試料はカラムで分離後、No.2 ポンプで送液される発色剤と混合し、蛍光ラベルされます。検出は蛍光検出器を用います。

ミン濃度が大きく異なります。概ね、対数増殖期のほうが 1000 倍程度多いと言われています。そのため、特殊な事情を除き、対数増殖期で濁度を合わせて集菌します。

対数増殖期にある細胞は、高濃度のポリアミンを含むので、*Thermus thermophilus* を試料とした場合、概ね 30ml の培地で 660 nm の濁度が 0.5 程度の時に集菌した細胞で十分な分析ができます。

培養液は、5000 x g、10 分程度の遠心で回収します。得られた細胞の湿重量 100 mg に対して、100 μ l の 15%TCA 水溶液を加え、ボルテックスミキサーでは激しく混和します。懸濁液は、最大回転数で、15 分間遠心し上清を得ます。上清は、0.2 μ m のシリンジフィルター (DISMIC 25HP020AN (ADVANTEC、Tokyo、Japan)) で濾過し、試料とします。

TCA を含む水溶液中でポリアミンは安定で、長期間の保存が可能です。分析感度は、100 pmol 程度のポリアミンがチャート中に収まるので、必要に応じて蒸留水で希釈して分析します。

溶離液の選択

常温環境で生育する微生物や動物などは、Putrescine、Spermidine、Spermine の 3 種類のポリアミンを産生しますが、これに加えて、高度好熱菌は Tetrakis (3-aminopropyl) ammonium や Caldopentamine のような分岐型や長鎖型の特殊ポリアミンを生産します。著者らは通常のポリアミンを分析する場合と、特殊ポリアミンを分析する場合で、溶離液を使い分けており、長鎖・分岐型ポリアミンを分析する際に使用する溶離液を Type1 溶離液、一般的なポリアミンの分析に用いる溶離液を Type2 溶離液と称しています。それぞれの溶離液の組成は上述のとおりです。

Type1 溶離液を用いて、通常のポリアミンの分析も可能ですが溶出時間が早くなります。その

ため、アミノ酸を多く含む試料を分析すると、アミノ酸のピークと、Putrescine のピークが重なってしまうことがあります。また、Type2 溶離液で、特殊ポリアミンを含む試料を測定すると、分析終了までに長い時間がかかってしまい、最後のピークはブロードになってしまいます。

Type1 溶離液から Type2 溶離液にグラジエントをかけて分析すると、ピークがブロードになることをある程度防ぐことができますが、送液ポンプをもう一台用意する必要があります。さらに、一回の分析が終わる度にカラムを初期状態に平衡化するため大量の試料を分析する場合には、時間がかかってしまいます。そこで、著者らは分析するポリアミンによりそれぞれ溶離液を使い分けることにしています。

Type2 溶離液で標準ポリアミンを分析すると、概ね 25 分程度必要になります。分析後、カラムを洗浄する必要が無いため、オートサンプラーを使用することで、一晩で 40 サンプル程度を連続的に自動分析することができます。また、Type1 溶離液を用いると、分岐ポリアミンである、Tetrakis (3-aminopropyl) ammonium の分析完了までおよそ 30 分必要になります。

分析条件

分析時の条件は以下のとおりです。

No.1 ポンプ送液速度	2 ml/min
No.2 ポンプ送液速度	0.5 ml/min
カラムオープン温度	55°C
検出器励起波長	320 nm
検出器蛍光波長	450 nm

おわりに

以上の手法は、ポリアミンの分析に関してですが、同じシステムを用いて精製をすることも可能です。まず、通常の分析を行い、溶出時間を把握

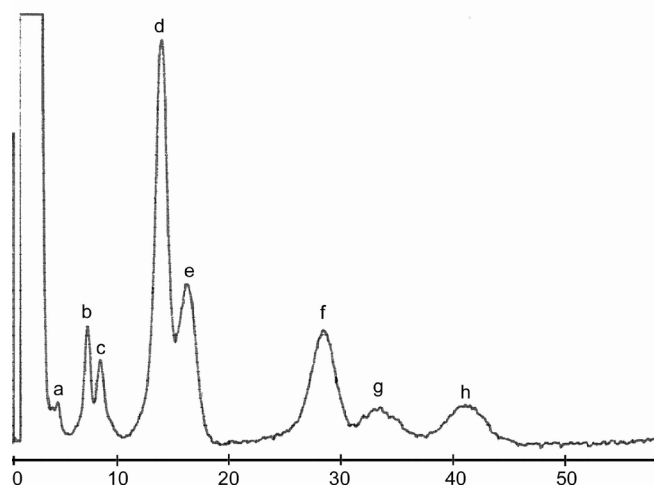


図 2

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 のポリアミン分析チャートの例。溶離液は Type2。a: Putrescine (4), b: Norspermidine (33), c: Spermidine (34), d: Thermine (333), e: Spermine (343) / Thermospermine (334), f: Caldopentamine (3333), g: Homocaldopentamine (3334), h: Tetrakis (3-aminopropyl) ammonium。

します。続いて、No.2 ポンプで送液する液を、発色試薬から超純水に置換し、同様の運転を行います。検出器を見ながらフラクションを回収することはできませんが、溶出時間に合わせて液を回収することでポリアミンの分取を行うことができます。

一般的に溶出の法則はある程度決っており、分子中のアミノ基（1、2、3、4 級の区別なく）の数が少ないものから順次溶出します。一分子中のアミノ基の数が同じ場合、炭素鎖が短い分子から溶出します。更に、直線状ポリアミンのほうが分岐ポリアミンよりも早く溶出します（図 2）。

Agmatine を Type1 溶離液で分析すると、Spermine と近い位置に溶出され分離しにくいですが、Type2 溶離液ではそれぞれ完全に独立したピークになるなど、標準ポリアミン以外のポリアミンが存在するときには、溶離液を変えて確認する必要があります。

Spermine (343) と Thermospermine (334) は Type1 溶離液、Type2 溶離液どちらを用いても分離できません。Thermospermine を含むよ

うな試料である場合、イオン交換カラムを用いた HPLC 以外の分析手法を組み合わせる必要があります。

溶離液は、非常に高濃度の塩化カリウムを含みます。高濃度の塩は金属を腐食させるので、ポンプなどはイナート加工されたモデルを選択したほうが望ましいです。また、分析終了後、そのまま放置すると流路中で塩が析出することがありますので、超純水などで流路やカラムを置換する必要があります。

謝辞

本原稿を執筆するに当たり、大島泰郎先生から多くのご指導をいただきました。厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Oshima T., Moriya T., and Terui Y. Identification, chemical synthesis, and biological functions of unusual polyamines produced by extreme thermopiles. *Methods Mol. Biol.* 2011. 720:81-111

ポストカラム HPLC 法によるポリアミン分析

東 恭平

千葉大学大学院薬学研究院病態分析化学研究室
(260-8675 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1)

連絡先 東 恭平、e-mail: higase@faculty.chiba-u.jp

【はじめに】

ポリアミンは分子中に複数個のアミノ基を有するため、ポリアミン分析では陽イオン交換カラムによる分離と、蛍光誘導体化による高感度検出が可能です¹⁾。このポストカラム HPLC 法では、試料調製が簡便で、定量性、再現性に優れていることから、細胞内ポリアミンの主成分であるプトレッシン (PUT)、スペルミジン (SPD) およびスベルミン (SPM) を測定する他、ポリアミン合成系・分解系酵素の活性を調べる際にも適しています。ポリアミン分析では、一般的にポンプ 2 台、カラムオーブン 1 台、蛍光検出器 1 台、オートサンプラー(又はマニュアルインジェクター) 1 台を必要としますが、私達の研究室では安価な機器で代用できないか検討して参りました。以下に私達の研究室でのポリアミン抽出法、および分析の一連の操作を述べたいと思います。操作は主として大腸菌、酵母および動物細胞の分析を例にしています。

【実験手法】

➤ サンプル調製 (図 1A)

1. マイクロチューブ中に大腸菌、酵母又は動物細胞を回収する。
2. 細胞を 1 mL のリン酸緩衝液 (PBS) で 2 回以上洗浄する。
3. 細胞のペレットを少量 (50 ~ 100 μ L) の滅菌水を用いて懸濁し、等量の 10% トリ

クロロ酢酸 (TCA) を添加する (最終濃度 5%)。

4. 70°C で 30 分ほど過熱した後、4°C で 30 分ほど静置する。
5. 10,000 $\times$ g で 10 分間遠心後、上清をバイアル瓶に移し分析に用いる。ペレットは 0.1N の NaOH に溶解し Lowry 法などの蛋白質定量に用いる。

酵素反応液、細胞抽出液および組織抽出液といった液体サンプルの場合は、最終濃度が 5% になるように TCA を添加し、4 のステップから始めます。酵母など硬い細胞壁を有するサンプルの場合は、ステップ 5 の遠心後に得られたペレットを更に TCA 処理を行うとポリアミンの回収率が良くなることがあります。遠心後に得た上清に浮遊物が存在する場合は、0.22 μ m のシリンジフィルターで濾過する必要があります。ポリアミンの標準品 (PUT、SPD、SPM 等) は、5%TCA で調製します。3 種のポリアミン (100 μ M) が含まれた溶液を用事調製で 5 μ M に希釈した後、オートサンプラーを用いて 20 μ L (100 pmol) を HPLC に供します。

➤ HPLC 条件

溶離液及び反応液の組成は、ポリアミン分析用カラム (東ソー株式会社, TSKgel Polyaminepak) の説明書にほぼ準じます。

◇ 溶離液

→溶離液 1L の調製方法

溶離液 (pH 5.3) の調製方法は以下の通りです。
塩化ナトリウム 117.0 g (2.0 mol/L)、クエン酸三ナトリウム二水和物 27.44 g (93.6 mmol/L)、35% 塩酸 5.25 mL (0.23%)、n- カプロン酸 (ヘキサン酸) 0.08 mL (0.01%)、25% Brij-35 3.2 mL (0.1%)、メタノール 200 mL (20%) /L () 内は最終濃度。上記の試薬に DDW を 800 mL ほど入れた後、水酸化ナトリウムを用いて pH を調整する。次に DDW で 1L にまでメスアップした後、濾過膜 (CORNING 150 mL Bottle Top Filter, 0.22 μ m cellulose acetate) を用いて吸引濾過を行う。最後に、超音波洗浄機に溶離液の入ったボトルごと入れ、ソニケーションを行うと同時に真空ポンプで吸引し、脱気を行う。

→注意点

- ✓ 本 HPLC 法における溶離液の流速は 0.42 mL/min です。1 回の測定に 35 分かかるので、1 サンプルあたり 14.7 mL の溶離液を必要とします。更に測定前に行う LC 流路の液置換、およびベースラインの安定化にも溶離液を必要とします。また、オートサンプラーを用いて O/N で測定することもあるので、私達は通常、必要量 (14.7 mL $\times$ サンプル数) の 1.5 倍量の溶離液を調製しています。
- ✓ 試薬は可能な限り、HPLC 用グレードを用いてください。
- ✓ n- カプロン酸は臭いがきついで、ドラフト内で溶離液に添加して下さい。
- ✓ 1L を調製する際、pH 調整前に水酸化ナトリウムを 5 粒ほど先に溶離液に入れておくと pH 調整が楽です。
- ✓ Brij-35 は泡立つので pH 調整前に添加して下さい。

- ✓ 強く脱気しすぎるとメタノールが揮発してしまうので、脱気のしすぎには気を付けて下さい。真空ポンプの吸引力にもよりますが、私達の研究室では約 2 分が目安です。
- ✓ 各ポリアミンの溶出時間は pH によって影響をうけるので、pH 調整は正確に行います。
- ✓ 脱気は溶離液のボトルに回転子を入れ、マグネチックスターラーで回しながら真空ポンプで減圧にしても可能です。

◇ 反応液 (OPA)

反応液 (OPA) の組成は以下の通りです。

ホウ酸 24.53 g (0.4 M)、水酸化カリウム 19.84 g (0.35 M)、2.98 mL 25% Brij-35 (0.1%)、 β -メルカプトエタノール 2 mL (0.2%)、*o*-フタルアルデヒド (OPA) 0.56g (4.18 mM)、メタノール 6.25 mL (0.625%) /L () 内は最終濃度。

→反応液 (OPA) 1L の調製方法

1. ホウ酸 24.53 g、水酸化カリウム 19.84 g をメスシリンダーに入れた後、DDW を約 900 mL 注いで完全に溶解させ、最後に 25% Brij-35 を 2.98 mL 添加してホウ酸溶液とする。
2. 15 mL 遠沈管に OPA 0.56 g を入れ、メタノール 6.25 mL と β -メルカプトエタノール 2 mL を添加して完全に溶解させて OPA 溶液とする。
3. ホウ酸溶液に OPA 溶液を添加した後、1L まで DDW でメスアップして調製した溶液を反応液 (OPA) とする。
4. 濾過膜 (CORNING 150 mL Bottle Top Filter, 0.22 μ m cellulose acetate) を用いて吸引濾過を行う。
5. 最後に、超音波洗浄機に溶離液の入ったボト

ルごと入れ、ソニケーションを行うと同時に真空ポンプで吸引し、脱気を行う。

→注意点

- ✓ 本 HPLC 法における反応液の流速は 0.42 mL/min です。1 回の測定に 35 分かかるので、1 サンプルあたり 14.7 mL の反応液を必要とします。更に測定前に行う LC 流路の液置換、およびベースラインの安定化にも反応液を必要とします。また、オートサンプラーを用いて O/N で測定することも多いので、私達は通常、必要量 (14.7 mL×サンプル数) の 1.5 倍量の反応液を調製しています。
- ✓ Brij-35 は泡立つので、ホウ酸溶液を調製する際はホウ酸と水酸化カリウムを DDW で完全に溶解させてから添加して下さい。
- ✓ 脱気は反応液のボトルに回転子を入れ、マグネチックスターラーで回しながら真空ポンプで減圧にしても可能です。
- ✓ 反応液は遮光瓶に入れるか、又は透明な瓶を

アルミホイルで遮光して下さい。

◇ HPLC 装置

当研究室で用いている HPLC 装置一式 [ポンプ 1 (溶離液用)、ポンプ 2 (反応液用)、恒温水槽、蛍光検出器、PC (システムコントローラ)、陽イオン交換カラム (東ソー株式会社, TSKgel Polyaminepak)] を示します (図 1B)。

一般的なポストカラム HPLC 法は、反応試薬を送るためのポンプシステム (ポンプ 2)、反応コイル (50 cm-10 m 程度) 及び反応炉を必要とするため装置が複雑化しますが、ポリアミン分析では OPA とポリアミンの反応が良く、至ってシンプルに測定できます。

✓ 溶離液用ポンプ (ポンプ 1)

本プロトコルでは、目的のポリアミン (PUT、SPD、SPM) の分離を TDK gel polyaminepak の説明書に記載通り、アイソクラティック溶出でできますので、移動相のポンプは 1 台ですみます。

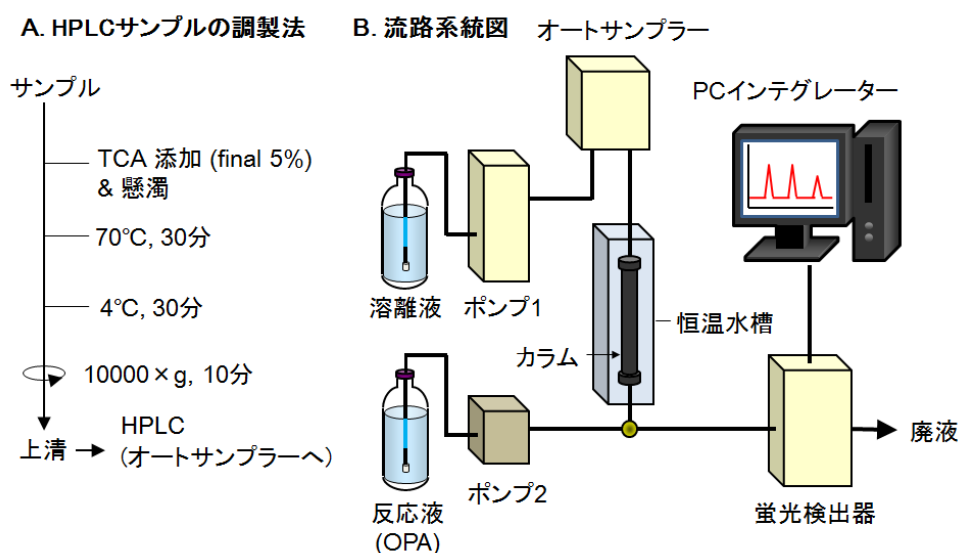


図 1 サンプルの調製方法と分析システムの模式図

(A) サンプルに最終濃度が 5% になるように TCA を添加し懸濁させます。サンプルを 70°C で加熱した後、4°C で冷やします。最後に遠心を行って得られた上清を HPLC に供します。(B) ポンプ 1 で溶離液を送液し、オートサンプラーから入ったサンプルはカラムで分離後、ポンプ 2 から送液された発色液 (OPA) により蛍光誘導体化をうけます。検出は蛍光検出器を用います。

ポンプにグラジエントユニット（二つ以上の溶離液を混合する装置）のオプションは必要としません。また、有機溶媒は気化しやすい、脱気直後から空気の再溶存がはじまる、などの留意は必要ですが、減圧や超音波を用いた溶離液の脱気を直前に行えば、デガッサー（脱気装置）を用いなくても大きな実害を感じません。酸・塩基・高濃度の塩化ナトリウム水溶液に耐性のイナート送液ユニットが望ましいですが、通常のステンレススチールでも測定できます。

✓ 反応液用ポンプ（ポンプ2）

無脈流プランジャーポンプ（日本精密科学株式会社，NP-FX（II）-1U）が送液ユニットの代用機器として用いることができます。一番の利点は、新品の HPLC ポンプに比べ約 1/4 以下の値段であること、ボタンはポンプ ON/OFF の一つしかなく、操作が簡便であることです。

✓ 恒温水槽

サンプル調製時に用いる湯浴の中にカラムを沈めてカラムオープンの代用とします。利点は、カラムオープンに比べ約 1/10 安いことです。

✓ PC インテグレーター

当研究室では、スタンドアローンのノート PC（Windows 7 以上）にクロマトグラム用データ

処理装置ソフト「Chromat-PRO」をインストールし、クロマトグラムのデータ処理に使っています。この Chromat-PRO は操作が簡単で、マニュアルおよびオートサンプラーを用いたデータをそれぞれ取得できます。利点は PC インテグレーターに比べ価格は約 1/5 であること、どの機器メーカーの検出器とも接続可能で、一度に最大 2 つの（蛍光／UV）検出器から同時にデータを取得することが可能です。

✓ オートサンプラー

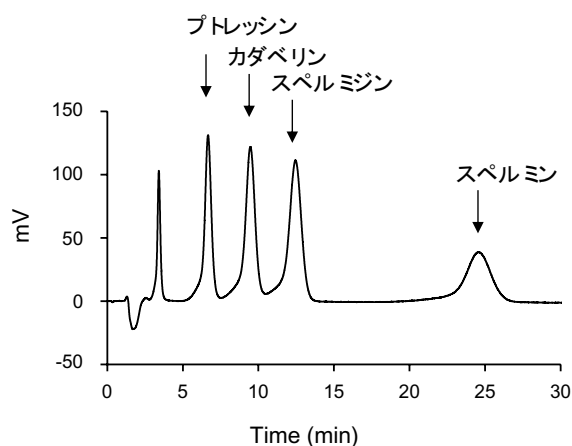
サンプル数が少ないのであれば、マニュアルインジェクターでも良いです。

上記の代替機器で HPLC を組むと、オートサンプラーを手動で操作して連続分析を行う形になりますが、ポンプ 1 と蛍光検出器以外の設備費を大幅に削減することができます。

◇ HPLC 流路の洗浄

測定が終了したら以下の通り流路の洗浄を行います。

1. HPLC のポンプを止める。
2. カラムを外し、カラムの代わりにピークタフユニオンを接続する。



HPLC 条件

カラム: TSKgel Polyaminepak
(東ソー株式会社, 4.6 mm i.d. x 50 mm)
カラム温度: 60°C
溶離液流速 (ポンプ1): 0.42 mL/min
試薬液流速 (ポンプ2): 0.42 mL/min
検出: 励起波長 340 nm, 蛍光波長 455 nm

図2 ポリアミン標準品のクロマトグラム

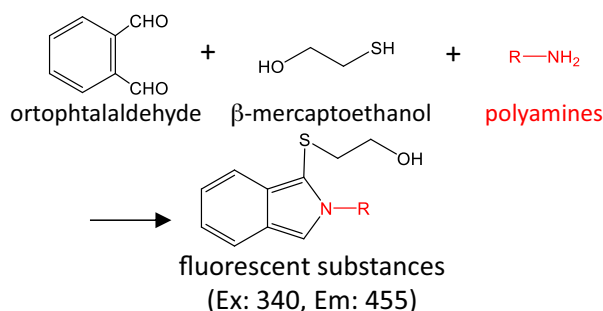


図3 OPAによるポリアミンの蛍光標識

(カラムは溶離液を満たしたままキャップして保管します。)

- インレットチューブを溶離液から脱気水に移す。ドレインバルブを左に1回転させて5分ほどパージする。パージした後、ドレインバルブを閉めて、流速 0.42 mL/min の脱気水で流路を夜通し洗浄する。

➤ ポリアミン測定

種々のポリアミン各 100 pmol のクロマトグラムを図2に示します。pH5.3の溶離液では、PUTは6.7分、カダベリン (CAD) は9.5分、SPDは12.5分、及びSPMは24.6分で検出できます。各ポリアミンの検量線は10 pmol ~ 2500 pmolの範囲で直線となります。サンプル中に含まれるアミノ酸はほぼ5分以内に溶出するため、ポリアミンを正確に定量することができます。オートサンプラーでTCA抽出液 20 µLをHPLCに供し、それぞれのピーク面積からモル数を求めます。

更にLowry法で求めた20 µL分の蛋白質質量を用いて補正すれば、サンプル中に含まれるポリアミン量を nmol/mg protein の単位で決定できます。

→トラブルシューティング

- ✓ ポリアミンのピークを検出できない。

1. 反応液を正確に調製したか確認しましょう。

OPAがポリアミンのアミンと反応するためには、塩基性条件下でβ-メルカプトエタノールが必要です(図3)。

2. ポンプが正常に稼働しているか確認します。ポンプ1はドレインバルブを左に一回転させて、1分間あたりの廃液量をエッペンドルフチューブを用いて測定します。ポンプ2は溶離液と混合する場合である三方活栓(ピークタフティ)に接続した反応液ラインのピークタフコネクターから測定します。正常であれば(流速を0.42 mL/minにする必要はありません、1 mL/minでも良いです)、ポンプ1および2からそれぞれ1分間あたり0.42 mLの溶液を回収できます。回収できなかった場合は、基本的にポンプヘッド内のプランジャーシールが摩耗している可能性が高いです。その際はポンプの説明書を読み、新品のプランジャーシールに交換しましょう。

- ✓ ベースラインが安定しない。

ベースラインが安定しない原因は機器の不良や試薬調製の不備など多く挙げられます。ドリフトが起きた場合は、検出器の汚染、カラムの劣化が考えられ、スパイクが起きた時はシグナルケーブル・電気ケーブルの不良が考えられます。その際はカスタマーセンターに相談しながら対応した方が無難です。

下記では、ベースラインに脈流が生じた場合の

原因特定とその対処法を簡単に述べます。

脈流が生じる原因として、溶離液調製の不備、カラム等の連結部位に気泡が留まっている、又はプランジャーシールの摩耗が考えられます。

調べ方として、

1. カラムを接続した条件で、ポンプ 1 又は 2 を個別に動かします。どちらかのポンプで脈流が起きたら、プランジャーシールの摩耗を疑います。プランジャーシールの場合は、説明書を見ながら交換して下さい。
2. ポンプ 1、2 共に脈流が認められた場合、検出器のセルに気泡がないか確認します。気泡が確認された場合、カラムを外して溶離液の流速を上げる、又は検出器を脱気水で入念に置換した後、2- プロパノールで洗浄すると取れます。検出器の出口を加圧して気泡を抜く操作もありますが、やりすぎるとセルが痛む可能性があります。
3. 蛍光検出器のランプの寿命が近づくとベースラインが安定しないことがあります。ランプが寿命を迎えていた場合は、新品に交換します。
4. 最後に溶離液の脱気がきちんと行われていたかノートで確認します。

✓ ポンプの圧力が高い。

ポンプの圧力が高いまま測定を続けると、カラムおよびポンプが痛みます。

1. カラムを接続した際に圧力が急激に高くなる場合は、カラムを新品に交換して下さい。カラムを逆向きに付けて詰まりを除く、又はカラムを指定された溶液で洗浄することもあります。経験上ほとんど好転しません。サンプル調製時にシリンジフィルターで不溶物を取り除くこと、バイアル瓶の蓋として用いるセプタムを使い回ししないこと等を心掛けて

ください。

2. カラム無しで圧力が高い場合は、オートサンプラーのニードルの詰まりを疑います。ニードルが詰まった場合、ポンプに負担をかけることを承知で溶離液を用いて押し出したり、超音波で取り除くことを試しますが、経験上ほとんど好転しません。水酸化ナトリウムで洗浄する方法も考えられますが、ポンプヘッドのプランジャーがガラスである場合は、急激に痛む可能性があります。従って、上述の通りサンプル調製とセプタムに注意を払ったほうが良いと思います。

→本ポリアミン分析における課題

私達の分析法では以下の問題点があります。

1. 血漿サンプルや動物細胞培養用の培地には遊離アミノ酸が多く含まれており、プトレッシンピークがアミノ酸ピークと重なって検出できない。
2. トリプトファン (Trp) とカダベリンの溶出時間がほとんど同じである。従って、血漿サンプルで微量の CAD ピークを検出した際は Trp の可能性が高い。標準品 CAD のピークは比較的シャープであるのに対し、Trp のピークはブロードである。
3. カダベリンはヒスタミン (His) と、アグマチン (AGM) は SPM と部分的にピークが重なるので注意する。
4. N^1 -アセチルスぺルミジン (N^1 -AcSPD) は PUT より早く溶出するため、アミノ酸とピークが重なり検出が難しい。 N^1 -アセチルスぺルミン (N^1 -AcSPM) は PUT とピークが部分的に重なる。

従って、血漿サンプル中のポリアミン定量を行う場合は、カラム二つを直列につなげて溶離液及び反応液の流速を共に 0.21 mL/min に設定し

ます。標準品では、 N^1 -AcSPD (15.0 分)、PUT (23.0 分)、 N^1 -AcSPM (26.1 分)、CAD (32.7 分)、His (36.0 分)、SPD (43.7 分)、AGM (78.9 分) 及び SPM (89.6 分) にそれぞれ検出できます。血漿サンプルでは、 N^1 -AcSPD のピークがアミノ酸ピークと重なって検出できないことが多いですが、大腸菌に含まれる N^1 -AcSPD は比較的検出可能です。

謝辞

本原稿を執筆するにあたり、戸井田敏彦先生、植村武史先生に多くのご指導をいただきました。深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Igarashi K, Kashiwagi K, Hamasaki H, Miura A, Kakegawa T, Hirose S, & Matsuzaki S.: Formation of a compensatory polyamine by *Escherichia coli* polyamine-requiring mutants during growth in the absence of polyamines. *J. Bacteriol.* 166: 128-134 (1986)

～ コラム ～ HPLC 解析中の溶離液や反応液のつぎ足し？

溶離液の mess up の水の量が 5ml 違うだけでも、塩の量がわずかに異なっても、pH がわずかにずれていても、脱気による有機溶媒の揮発で成分構成が異なっても、いずれも保持時間に影響します。溶離液をつぎ足した場合はカラムの再平衡化が必要です。つぎ足した反応液中の OPA の劣化やロットの違い、また反応液の温度の違いは、ピークの検出感度に影響します。

溶離液や反応液をつぎ足したら、必要に応じてカラムを再平衡化し、標準物質も再測定しましょう。



～ 編集部より筆者への質問コーナー ～

Q 1. 試薬取扱い上の注意、廃液の際の注意などありますか？

森屋：取り立てて危ない試薬は使っていませんが、毒物指定されてしまったメルカプトエタノールを使いますので、廃液は自治体の指示に従って破棄する事が必要になります。

東：廃液ですが、大学の廃液処理の規定に従い、廃棄します。試薬の取り扱い上の注意は、本文の注意点に書きました。

編集部：使用する化学物質に関する情報は、SDS (safety data sheet) 等より入手できます。万が一に備え誰もがすぐに閲覧できるよう、SDS 等の化学物質情報はプリントし、ファイルとして保管する習慣をつけましょう。

Q 2. ピークが割れたときの対処は？

森屋：原因は複数考えられるので、まずは 2 mol/l KOH 水溶液を流してカラムを洗浄して様子を見ます。それでも改善されない場合には、カラムやラインフィルターと配管の接続部を一度取り外し、付け直して様子を見ます。配管が抜け気味でデッドボリュームができてしまうと、ピーク割れが起きやすくなるそうです。古いカラムの場合には、樹脂が偏ってデッドボリュームができるそうですが、この場合には対応できないので、新しいカラムと交換します。

東：説明書の記載通り、新品カラムに交換します。カラム入口側に充填剤の補充はしません。

Q 3. 圧があがってきたときの対処

森屋：ほとんどの場合、ラインフィルターに汚れが詰まっている事が原因で、ラインフィルターの交換で対応しています。ラインフィルターは超音波洗浄器で洗浄することで、数回は再生・再使用することができるようです。

東：説明書の記載通り、ラインフィルターかエンドフィッティングを交換するとありますが、現在は行っていないです。新品カラムに交換しています。

Q 4. カラムの寿命はどれくらい？

森屋：使用頻度にもよりますが、3 年から 5 年程度かと思われます。分離能が低下して実用に耐えなくなったり、カラムが原因で圧力が上昇し、対処できない場合には交換しています。

東：カラムのロットによります。1000 サンプル測定できたら素晴らしいです。

Q 5. カビ、菌類対策

森屋：現状、カビや菌類で汚染されたという経験はありません。分析終了後は超純水で置換すること、頻繁に使用することで、それらの繁殖を抑えられているのかもしれません。

東：特別なことはしていません。

編集部：今回の溶離液にはでてきませんでしたでしたが、リン酸緩衝など菌の繁殖しやすい溶離液の場合ア

ジ化 Na を添加することがあります。

Q 6. 他に寿命を長持ちさせるために工夫していること

森屋：基本的なことですが、

○空気を入れない、

○使用後に超純水で置換して塩の析出を防ぐ、

○運転中の圧力を確認し、必要以上に高い圧力で運転しない、

などです。

東：ガードカラムを付けたら良いかと思いますが、付けていません。各ポリアミンのピークがブロードしたら即新品に交換しています。

～ HPLC の原理をもっと勉強したい人のために～

< 書籍 >

日本分析化学関東支部編, 「高速液体クロマトグラフィーハンドブック 改訂 2 版」, 丸善出版 (2000)

松下至, 石井考昭, 「これならわかる液体クロマトグラフィー その仕組みと使い方」, 化学同人 (2011)

中村洋 監修, 「液クロを上手につかうコツ 誰も教えてくれないノウハウ」, 丸善出版 (2004)

中村洋 監修, 「ちょっと詳しい液クロのコツ」前処理編, 検出編, 分離編, 丸善出版 (2006, 2006, 2007)

日本分析化学会 編 中村洋監修, 「誰にも聞けなかった HPLC Q&A 」 虎の巻, 龍の巻, 彪の巻, 犬の巻, 武の巻, 筑波出版会 (2001, 2002, 2003, 2004, 2005)

< web >

ジーエルサイエンス 技術情報 <http://www.gls.co.jp/technique/index.html>

島津 日常分析の留意点 <http://www.an.shimadzu.co.jp/support/support.htm>

Shodex HPLC 入門講座 <http://www.shodex.com/ja/kouza/>

資生堂 テクニカルノート <http://hplc.shiseido.co.jp/note/index.html>

化学物質評価研究機構 技術資料

http://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/column_user_support_01.html

東京化成 Chromato Mail

<http://www.tcichemicals.com/ja/jp/product/chromatography/chromatomail/index.html>

The Third International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives への参加報告

(なお、この学会のホームページの URL は、<http://www.fcfar.unesp.br/polyamines2014brazil/> です)

早田 邦康

自治医科大学さいたま医療センター

The Third International Conference on Polyamines は、ブラジルのサンパウロから東に車で約 3 時間 30 分の場所にある Itamambuca Eco Resort (Ubatuba-SP) において 2014 年 8 月 31 日から 9 月 5 日まで開催されました。日本からは地球の反対側、ヨーロッパからも遠い地での開催ということもあり、参加者が少なかったのが残念でした。会場は、温帯雨林（正確な表現かどうかは判りません）の中に建てられたリゾート地で、森林に囲まれ、多くの鳥、リス、カエル、昆虫が生息するところでした。また、少し歩くと、広大なアーチ状の素晴らしいビーチが付属したリゾートです。私たちも会議の合間にこのビーチでのんびり過ごしましたが、海がきれいで最高にくつろげました。このような会がなければ一生知ることができないような場所で学会を開催してくれたエンツォ先生や学会会長のサンドロさんに感謝いたします。

せっかくブラジルまで行ったので、少しだけ観光にも行ってきましたが、そこでの感想です。日本人と比較してブラジル人は話好きの人がとても多いようです。たとえば、タクシーに乗ると 30 分ぐらいの距離だと延々としゃべっています。と思っていたら、ブラジルに生息する動物や鳥も自己主張が強いようです。たとえば、食事をしていた時に地面に食べ物の屑がこぼれたときには、どこからともなく鳥がやってきて、とても“うるさく”鳴き出します。こちらが立ち退かざるを得ないぐらいの大きな声で。あまりにも“うるさい”ので、こぼれていた食べ物の屑を投げて渡すと、すぐに食べて、そのあとはとても静かに小枝に止まっていました。また、かわいい顔のハナグマというアライグマに似た動物がいるのですが、食べ物が入った袋を持っていた若い男性が、中から食べ物を動物に与えた途端、どこからともなく数十匹の大群が現れ、男性の持っている袋にとびかかり、走って逃げようとした男性から袋を奪い取り、瞬く間に食べつくしました。見ていて恐怖さえ感じさせるような光景でした。自然環境が人間にも動物にも影響を与えるのでしょうか？それともたまたまなのでしょうか？

学会の帰りに立ち寄ったサンパウロの町は基本的に車で移動するような街並みで、歩いてぶらぶらできる地域はほとんどありません。サンパウロでもやはり日本人は窃盗のターゲットになっているそうです。現地に住んでいる知り合い曰く、「信号では赤でも立ち止まらず、横断したほうが安全です。」「地下鉄は、現地に溶け込めば大丈夫ですが、日本人が旅行者の雰囲気を漂わせて乗っていると、まずターゲットになります。」とのことでした。ちなみに、サンパウロの街中を少しだけ歩いたのですが、何と若い奴が警察に捕まるところに遭遇しました。もし行く機会があれば、ご注意を！

さて、今回学会参加で最も感動したのは、何と言っても最終前日の夜に開催されたサンバ・パーティ。南米独特の、はじけるようなリズム感。私はかつてロックバンドのドラマー（もちろんど素人）でした。しかし、加齢とともに日本人の遺伝子に刷り込まれた演歌のリズムが優勢になってきており、なかなかロックのリズムや、ましてやサンバのリズムに“のる”ことができなくなっています。それでも、参加者全員が打楽器をもって、リズムを取りながら踊ったのは大変楽しい思い出になりました。そして、サンバダンス！！！！身長1 m 8 0 c m以上の女性が、テレビでよく見るサンバの衣装を着て目の前でダンスを披露してくれました。その迫力！すごいーーーーー！！女性の身にほとんど布がかかっておらず、おしり（大半の場合には偽造だという情報もありますが）がほとんどむき出しなのに、“性的いやらしさ”（言葉は適切ではないかもしれませんが、もっとも表現として正しい）を微塵も感じる事が無い。直観的な印象としては、野生のきれいな動物が跳ね回っているという表現が最も適切な印象です（踊っていた女性には大変失礼な表現かも知れませんが・・・）。彼女たちの全身から湧き出るはじける躍動感には感動さえ覚えました。彼女らが見せてくれた躍動感とリズム感は、日本人がどんなに頑張っても、たぶん真似することができない天然の要素が入ったものではないかと思われました（日本の各地で頑張っている日本人サンバダンサーの方々、ごめんなさい）。

観光と遊びの話だけで最後まで終わろうと思ったのですが、叱られそうなので、少しだけ学術的な話題にふれます。講演の discussion の途中で何度か初日の講演の話が出てきました。私は直接講演を聞いたわけではなく、人から間接的に聞いた話なのですが、その講演の中ではこれまでのポリアミン研究に対する辛辣なコメントがあったようです。我々ポリアミン研究者は、ポリアミンとその阻害剤などを用いた研究結果が臨床においてどのような地位を確立できるのかということに関して答える義務があります。たとえばピロリ菌の除菌はかなりの確率で成功するようになっています。もし、その方法が確立されておらず、癌化の機序を考えた場合には、ポリアミン欠乏食やポリアミン合成阻害剤は治療法の一つとして可能性があると思われます。ところが、現在ピロリ菌の除菌療法がほぼ確立されています。よって、ピロリ菌感染によって誘発される疾患の予防には、ピロリ菌除菌が最も優先される治療であり、ピロリ菌が存在することを前提とした上での除菌以外の対処方法を優先する臨床医はほとんどいないと思います。同様に、発癌予防や癌進行抑制のためにポリアミン合成阻害やポリアミンアップテイク阻害剤を用いた治療を考えた場合、副作用と治療効果のバランスにおいて、患者さんや治療する医師のコンセンサスを得るまでには多くの高いハードルがあるようにも思えます。さらに、手前味噌の話で申し訳ありませんが、ポリアミン欠乏状態は遺伝子の異常メチル化を誘発します。遺伝子の異常メチル化は癌を含む生活習慣病の重要な原因であり、ポリアミン合成阻害やトランスポート阻害によって重大な遺伝子修飾異常を誘発しないか、などの多くの問題を解決する必要があるように改めて考えさせられた会議でした。自分で問題提起しましたが、若い研究者の方々による研究の発展を祈っています。何とんでも日本のポリアミン研究者の数は他の国と比較しても多く、活発な活動が続いています。これは大変喜ばしいことです。ますます、多くの若い研究者がポリアミンの多彩な生物活性に虜にされることを祈っています。

以上、きわめてバイアスのかかった学術関連の話もしてしまいましたが、「“サンバ”ボケ爺」のたわごとと聞き流していただければ幸いです。

日本分子生物学会に参加して

草薙 大輔

千葉工業大学大学院工学研究科生命環境科学専攻 修士2年

私は学部生のときから卒業研究としてポリアミン研究に携わり、大学院進学後も引き継いで、プロテインを栄養源として利用する Puu 代謝経路の酵素群をコードする遺伝子クラスターの下流に存在する機能未知遺伝子の、Puu 代謝経路への関わりについて研究してきました。研究活動を日々、続けることで得られた研究成果を、第37回日本分子生物学会においてポスター発表しました。今回初めて大きな学会に参加しましたが、ポスター発表の会場については、入ってすぐ企業の新製品の紹介が目飛び込み、想像していた以上に、ポスター発表よりもメインのように感じました。会場では、大腸菌における機能未知蛋白質の機能解析など、私の研究分野に近い研究をしている研究者や、他分野の研究者の間で、大腸菌の培養条件や目的の機能未知遺伝子のさらに下流にはどのような遺伝子が存在するかなど、様々な意見を交換しました。学会に参加することで、他の研究者の研究を知ることだけでなく、自分の研究に活かせる新しいアイデアや意見があり、非常に刺激を受けました。

今まで私は、自分の研究成果を何らかの形で発表することは重要だと分かっていたのですが、発表を積極的にしようという気にはなりませんでした。しかし、今回の学会参加で様々なアイデアと意見を頂き、非常に刺激を受けたので、さらに研究活動に励み、データが揃ったら再び学会で発表し、さらに多くの人からの意見を貰いたいと思えるようになりました。

第 6 回年会総括

年会世話人 石田 真巳

東京海洋大学大学院海洋環境学部門

日本ポリアミン学会第 6 回年会は、平成 27 年 1 月 19 日（月）・20 日（火）の二日間にわたり、東京都港区の東京海洋大学品川キャンパス・楽水会館で開催された。事前登録者 65 名、当日参加者 11 名、東京海洋大学参加者 8 名、延べ 84 名の参加により、活発な発表・討論がおこなわれた。

特別講演は、19 日の夕方、以下のように講演者を招いて 1 時間おこなわれた。

講演者 里見 正隆（（独）水産総合研究センター・中央水産研究所）

演題 『水産食品におけるヒスタミン研究の最前線』

特別講演の内容を簡単に紹介する。ヒスタミン蓄積が食中毒等の問題になりやすい水産食品を主な研究対象として、ヒスタミン蓄積と鮮度の関係、ヒスタミン蓄積の抑制、ヒスタミンに対する基準値、サンプリングの問題点等について、食品業界や国際的指導機関の情報等も交えて講演して頂いた。一般講演（15 分）は、19 日に 10 演題、20 日に 14 演題、計 24 演題が発表された。『微生物とポリアミン（1）、（2）』、『ポリアミンと植物』、『ポリアミンと核酸・細胞』、『ポリアミンと食・健康』および『ポリアミンと医療応用』のセッションに関連演題を集めて発表を行い、活発な討論が行われた。年会の開催日程が大学入試センター試験の翌日というタイトなスケジュールであったにもかかわらず、多数の大学関係者を含む参加、発表があった。また、食品や健康関係の会社からの参加者も 13 名と多かった。基礎研究から産業までポリアミン研究に対する幅広い関心の高さが感じられた。

懇親会は、19 日の晩に東京海洋大学・大学会館・生協食堂ホールで開催され、64 名の参加により有意義な意見交換会を行うことができた。

なお、本年会に対し、株式会社高長様から年会抄録集への広告掲載によるご支援を賜り、また、協同乳業株式会社様からは乳製品のご提供を賜り、年会を盛大にすることができた。ここに記して感謝の意を表する。



日本ポリアミン学会 第6回評議員会議事録

日時：平成 27 年 1 月 20 日（金）11:50 ～ 13:00

会場：東京海洋大学 品川キャンパス 3 号館 3 階「第 3 ゼミナール室」

出席者：五十嵐一衛、大島泰郎、大澤仲昭、岡 孝己、柏木敬子、河合剛太、川喜田正夫、草野友延、
早田邦康、松藤千弥、鈴木秀之、村井法之

1. 役員人事

- 1) 第 8 回年会担当役員に千葉工業大学河合剛太氏および根本直樹氏の両氏を選出した。
- 2) 第 9 回年会担当役員に関西学院大学藤原伸介氏を選出した。

2. 事務局より以下の事業報告がなされた。

- 1) 会員数・会費納入状況
- 2) 学会誌ポリアミン Vol.1 No.1 (2014 年 4 月) および No.2 (2014 年 10 月) を発行した。

3. 以下の事業計画が提案され承認された。

- 1) 第 7 回年会（京都）年会担当役員：鈴木秀之（京都工芸繊維大学）
- 2) 第 8 回年会（千葉）年会担当役員：河合剛太・根本直樹（千葉工業大学）
- 3) 学会誌「ポリアミン」の発行（2 回 / 年を予定）
- 4) 若手海外渡航補助（2015 年 ゴードン会議&セミナー＝発表者に対して 6 名程度）
- 5) トランスグルタミナーゼ・ポリアミン合同学術集会開催
- 6) 第 88 回日本生化学会大会（分子生物学会との合同開催、神戸）
平成 27 年 12 月 1 日（火）～ 12 月 4 日（金）
＊ワークショップ企画応募予定（オーガナイザー：慈恵医大・村井法之、協同乳業・松本光晴）

4. 事務局より平成 25 年度決算および監査が報告され承認された。

5. 事務局より平成 26 年度収支状況について報告があった。

6. 事務局より平成 27 年度予算の報告があり承認された。

7. 事務局より 2015 年開催予定の国際学会について連絡があった。

- ・ Gordon Research conference 2015 Meeting Polyamines
“Polyamines and Their Metabolic Regulation in Biology and Disease”
会期：2015 年 6 月 14 日（日）～ 19 日（金）

会場：Waterville Valley Resort Waterville Valley, NH

・ 14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins

会期：2015 年 8 月 3 日 (月) ～ 8 日 (土)

会場：Vienna-Austria

8. その他

第 6 回総会の議長候補に植村武史氏（株アミンファーマ研究所）、副議長候補に坂本明彦氏（千葉科学大）を推薦することとした。

以上



日本ポリアミン学会 第6回総会議事録

日時：平成 27 年 1 月 20 日（金）14:30 ～ 15:15

会場：東京海洋大学 品川キャンパス 楽水会館 大会議室

議事：

1. 議長および副議長の選出

議長：植村 武史 氏（株式会社アミンファーマ研究所）を選出した。

副議長：坂本 明彦 氏（千葉科学大学）を選出した。

2. 役員人事

評議員会において選出した以下の役員が承認された。

・第 8 回年会担当役員

河合剛太 氏および根本直樹 氏（千葉工業大学）

・第 9 回年会担当役員

藤原伸介 氏（関西学院大学）

3. 事業報告

1) 会員数・会費納入状況

2) 学会誌の発行 ポリアミン Vol.1 No.1 (2014 年 4 月)、No.2 (2014 年 10 月)

4. 事業計画

以下の事業計画が提案され承認された。

1) 第 7 回年会（京都）年会担当役員：鈴木秀之（京都工芸繊維大学）

2) 第 8 回年会（千葉）年会担当役員：河合剛太（千葉工業大学）

3) 第 9 回年会（兵庫）年会担当役員：藤原伸介（関西学院大学）

4) 学会誌「ポリアミン」の発行（2 回 / 年を予定）

5) 若手海外渡航補助（2015 年ゴードン会議&セミナーにおいて発表を予定している学部生、大学院生およびポスドクに対して 6 名程度）

6) トランスグルタミナーゼ・ポリアミン合同学術集会

7) 第 88 回日本生化学会大会（分子生物学会との合同開催、神戸）

平成 27 年 12 月 1 日（火）～ 12 月 4 日（金）

＊ワークショップ企画応募予定（オーガナイザー：慈恵医大・村井、協同乳業・松本）

5. 会計報告

1) 平成 25 年度決算および監査報告がなされ、承認された。

- 2) 平成 26 年度収支状況が報告された。
- 3) 平成 27 年度予算が提案され、承認された。

6. 事務連絡

開催予定の国際会議

- ・ Gordon Research conference(GRC) & Gordon Research Seminer(GRS)

2015 Meeting Polyamines

“Polyamines and Their Metabolic Regulation in Biology and Disease”

会期：2015 年 6 月 14 日 (日) ～ 19 日 (金)

会場：Waterville Valley Resort, Waterville Valley, NH

Chairs: Otto Phanstiel Iv & Keiko Kashiwagi

- ・ 14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins

会期：2015 年 8 月 3 日 (月) ～ 8 日 (土)

会場：Vienna-Austria

以上



会計報告

学会収支一覧（平成26年12月25日）

	平成26年度予算	平成26年度収支 (平成26年12月29日現在)	平成27年度予算
収入の部			
学会費(正会員)	370,000 (一般×80・学生×25)	226,000 (一般51×・学生×11)	370,000 (一般×80・学生×25)
学会費(賛助会員)	30,000 (1社)	30,000 (1社)	30,000 (1社)
その他			
前年度繰越金	1,350,000	1,485,807	1,600,000
利息		118	
その他(第5回年会残金戻し)			
学会費(誤振込)	0	0	0
合計	1,750,000	1,741,925	2,000,000
支出の部			
会議費	50,000	0	50,000
事務費	10,000	1,894	10,000
年会・国際学会等補助	100,000	100,000	150,000
若手学会参加補助	0	0	420,000
学会年会費過払い返金		23,892	0
会報編集委員会(仮名称)	30,000	8,058	30,000
次年度繰越金	1,560,000	1,608,081	1,340,000
合計	1,750,000	1,741,925	2,000,000

単位：円

学会より

○学会費の納入をお願いします

今年度の学会費の納入をお願いいたします。会計年度は4月からとなっております。研究室でまとめて納入される場合は、事務局 (polyamine@jikei.ac.jp、TEL:03-3433-1111(内)2275、FAX:03-3436-3897) まで納入者全員のお名前をお知らせください。これまでの未納分のある方は合わせてご納入ください。よろしくお願いいたします。

1. 会費（年額） 正会員 一般 4,000 円 学生 2,000 円
賛助会員 30,000 円
2. 振込先 三菱東京 UFJ 銀行 虎ノ門支店（支店番号：041）
普通口座 0084363 日本ポリアミン学会 事務局 松藤千弥

○退会の届出をお願いします

卒業等でポリアミン学会を退会される方は事務局までお知らせください。既卒の方については研究室内の代表の方がまとめてご報告くださると助かります。

○2015 GRC & GRS のお知らせ

2015 Gordon Research Conference on Polyamine & Gordon Research Seminar が2015年6月14日から6月19日までの日程（GRSは6/13～6/14）で、米国ニューハンプシャー州で開催されます。GRCの参加締切が2015年5月17日となっております。奮ってご参加ください。詳細は会議HPでご確認ください。

<http://www.grc.org/programs.aspx?id=11973>

○14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins のお知らせ

上記国際会議が2015年8月3日から7日までAustriaのViennaで開催されます。詳細は会議HPでご確認ください。

<http://www.meduniwien.ac.at/icaap/>

○日本ポリアミン学会 第7回年会のお知らせ

会期：平成27年11月13日（金）、14日（土）

会場：京都工芸繊維大学（予定）

年会担当：鈴木秀之（京都工芸繊維大学）

11月は観光シーズンで京都のホテルが取りにくくなると予想されます。早めのご予約をお願いいたします。



○第6回トランスグルタミナーゼ研究会 & ポリアミン学会 合同学術集会のお知らせ

1年おきに、生化学会開催期間中もしくはその前後に、トランスグルタミナーゼ研究会 & ポリアミン学会 合同学術集会が開催されており、今年は第6回開催の年になります。日程や会場などの詳細が決まり次第、ポリアミン学会 HP 上に掲載し、メールでもご案内する予定です。10月発刊予定のポリアミン学会誌にも詳細を掲載いたします。





藤の花が綺麗に咲いて、暑いぐらいの毎日ですが、皆様いかがお過ごしでしょうか。新年度も約一ヶ月が過ぎ、新しい研究室や職場、新しい仲間と新鮮な気持ちで益々ご活躍のことと思います。

ポリアミン学会誌も、この2015年4月号で一周年を迎えます。本号も、柏木先生によるポリアミン輸送系の解説をはじめ、学会レビューなど、読み応えのある内容になっています。特に、今回から始まりましたシリーズ実験手技ノートは、新しくポリアミンの実験を始める方には大変役に立つのではないかと思います。

ポリアミン学会誌は、学会としての情報の蓄積と保存という役割はもちろんですが、世界の第一線で活躍中の先生方の研究を分かりやすく紹介し、また、会員の皆様の情報交換の場として、ポリアミン研究を始めたばかりの方やポリアミンに縁のなかった方にポリアミンを知ってもらい、興味を持って頂いて、我々の仲間になって欲しいという思いで作製しています。巻頭言で松藤先生が述べられているように、ポリアミン研究をきっかけとしてこれから世界へ向かって活躍していく方もおられると思います。ポリアミン研究の歴史と最前線を、日本語の平易な文章で勉強出来る教科書的な存在として、ポリアミン学会誌は必ず役に立つと思います。まだまだ手探りですが、皆様のポリアミン研究をサポートできるよう、今後もますます面白く、役に立つ内容で素敵な学会誌にしていきたいと考えております。この「ポリアミン」は、皆様の多大なるご協力によって出来ております。今後とも、どうぞよろしくお願い致します。

学会誌をよりよくするため、皆様からの感想、ご意見をお待ちしております。

(広報委員会 委員 植村 武史)

**日本ポリアミン学会 学会誌「ポリアミン」
第2巻1号 (2015年4月)**

発行：日本ポリアミン学会

<http://pa.umin.jp/>

polyamine@jikei.ac.jp

製作：日本ポリアミン学会 広報委員会