ポリアミン Polyamine

Vol.2 No.2 Oct. 2015

巻頭言 川喜田正夫 <mark>シリ</mark>ーズ ポリアミン研究 河合 剛太 照井 祐介 シリーズ 実験手技ノート 中村篤央 森谷俊介 学会報告 鈴木 秀之 学会レビュー 松本靖彦 田島彩沙 Dan Ge 吉田 健人

日本ポリアミン学会

The Japanese Society of Polyamine Research

奈良 未沙希

ポリアミン Polyamine

Vol. 2 No. 2 Oct. 2015

巻頭言

学会で育ち、学会を育てる - 若い研究者と学会へのエール - 川喜田 正夫 40

シリーズ ポリアミン研究

ポリアミンとRNA構造 河合 剛太 41 ポリアミンによる蛋白質合成促進 照井 祐介 46

シリーズ 実験手技ノート

GC-MSを用いたポリアミンの分析 中村 篤央 54 質量分析計を用いたポリアミンの分析 森谷 俊介 59 編集部より筆者への質問コーナー 67

学会報告

日本農芸化学会2015年度大会におけるシンポジウム開催のご報告 鈴木 秀之 72

学会レビュー

International Conference on Antimicrobial Resistance, Novel Drug Discovery and Development:Challenges and Opportunitiesに参加して 松本 靖彦 81 2015 GRS&GRCに参加して 田島 彩沙 83 Gordon Research Conference — Polyamines 2015 Dan Ge 84 Gordon Research Seminar及びGordon Research Conferenceに参加して 吉田 健人 85 2015年ゴードン研究会議「ポリアミン」に参加して 奈良 未沙希 86

事務連絡 89

編集後記 90



学会で育ち、学会を育てる - 若い研究者と学会へのエール -

川喜田 正夫 東京都医学総合研究所

学会は本来、権威の縛りから離れて会員が自由な知的活動を同学の士と共有できる場であることにその意義があります。創刊号の巻頭に大島会長がお書きになったのもほぼ同じ趣旨のことでありました。私も、「日本ポリアミン学会」が会員にとって永くそのような活動の場であり続けてほしいと強く願っています。そして、そのような学会を作り上げる役割の担い手として、大学院生やポストドクター、メーカー所属の研究者など、20代、30代の若い研究者たちに大きな期待を寄せています。

幸いなことに、この学会の前身である「日本ポリアミン研究会」立ち上げ以来の古参メンバーも含めて、会員の中には、ご自身が「権威あるいは権威者」だと考えておいでの方は一人としておられないように私には見受けられます。その空気の中で、「日本ポリアミン研究会」からは「日本ポリアミン学会」の立ち上げの中心になって下さった方々の多くが立派に育ってこられました。この学会に集う若い研究者たちには、是非ともそのよき伝統を引き継いでいってほしいと思うのです。

そのために一つの提案をしたいと思います。それは、<この学会を全員参加型の学会にしようではないか>ということです。主体的に参加することを通じて学会を自分たちのものだと実感することは、学会を自分たちの手で育てていくという大きな実りを生み出す原動力ですが、同時に、それぞれの積極的な参加の営みそのものが、自らが研究者として成長していくための貴重な糧を手にする途でもあるのです。小さな学会を育てる一方で、自身は大きく育っていってほしい、私はそう願います。

学会誌上で前号から始まった「シリーズ 実験手技ノート」はその意味でもよい企画だと思います。 多くの若いメンバーに、それぞれが得意とする実験手技について、どんどん執筆・紹介していってほしいと思います。「編集部より筆者への質問コーナー」も記事を身近に引きつける面白い趣向だと思いました。後続号に読者から筆者への質問や提案が寄せられ、それを契機に新たなフォーラムが形成されていったら・・・。楽しい想像です。さらに新しい企画が読者からも提案されて、学会誌を中心に学会員の交流の輪が広がり、お互いの顔がよく見える学会になっていくことを期待します。

大学院生であった20代の頃を思い起こして、学会、研究会の年会のフロアで手を挙げて口を挟むのには正直、気後れがありました。それでも、<折角学会に参加したら、1回は手を挙げて質問してから帰ってこい>という先輩のきつい助言は、駆け出し者にはプレッシャーではありましたが、今になれば大切な、有り難い助言であったと思います。小さな学会なら、それもできそうには感じませんか? やってみようか、とは思いませんか?

若い研究者たちの気後れ、遠慮、引っ込み思案には、身に覚えがないでもありませんが、それがつのると、結局誰かが「権威」に祭り上げられてしまい学会の硬直化が起こります。それが私の気がかりです。この学会に集う若い研究者たちが、私の気がかりを杞憂に終わらせてくれることを、そして、この学会が知的な若々しさをいつまでも保ち続けてくれることを願っています。

ポリアミンとRNA構造

河合剛太

千葉工業大学工学部生命環境科学科

(275-0016 習志野市津田沼2-17-1)

連絡先 河合剛太 e-mail: gota.kawai@p.chibakoudai.jp

1. はじめに

生体内において、ポリアミンは主としてRNAと結合して存在していると考えられている¹⁾。特に、tRNAとポリアミンとの結合については、X線結晶構造解析によってその詳細が明らかにされている(図1)。筆者はこれまで、五十嵐一衛先生、大島泰郎先生および松藤千弥先生との共同研究として、ポリアミンとRNAとの相互作用の解析を進めてきた。本稿では、ポリアミンとRNAとの相互作用に関するこれまでの研究内容について紹介する。

2. ポリアミンとATP

動物細胞において、ポリアミン、ATPおよび Mg²⁺はそれぞれ数mM程度存在しており、それら

が相互作用している可能性は高い。ATPとさまざまな酵素との結合がポリアミンの影響を受けていると考えられる。また、ポリアミンがATPとMg²+の複合体と相互作用するという報告もある²)。そこで、NMR法によってATPとスペルミン(Spm)の相互作用を解析した(図2)³)。Mg²+非存在下ではATPのリン酸基のシグナルは大きくは変化しないが、Mg²+存在下ではリン酸基のシグナルは広幅化し、特に β リン酸基のシグナルの広幅化が顕著であった。一方、ATPのプロトンシグナルはMg²+およびSpmの影響をほとんど受けないことから、Spmがトリリン酸基に結合していること、およびその相互作用はMg²+の影響を受けることが明らかとなった。また、ATP:Mg²+:Spmの複合体中の分子数

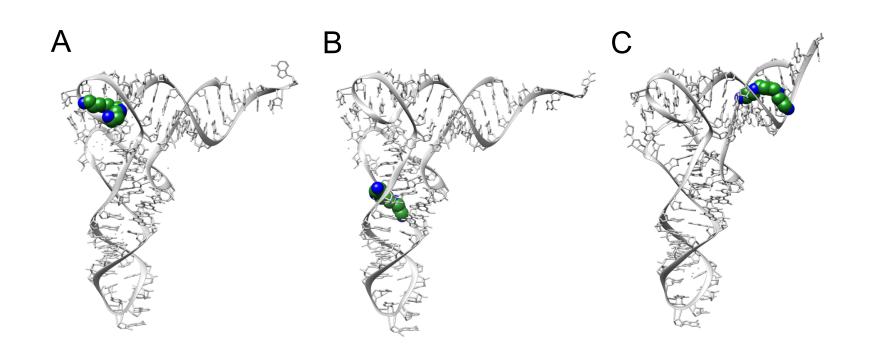


図1 tRNAに結合したスペルミン

A: yeast tRNA^{Phe}のTループに結合(PDB ID: 1EVV)、B: yeast tRNA^{Phe}のDアームに結合(1TN2)、C: yeast tRNA^{Asp}のアクセプタステムに結合(2TRA)。いずれも主溝側に結合している。

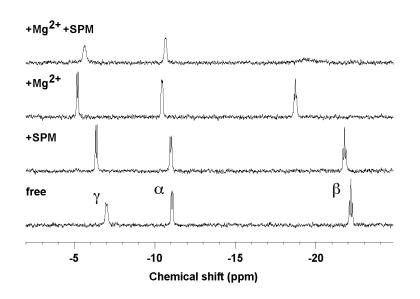


図2 ATPの³¹P-NMRスペクトル

3 mM ATPを用い、 pH 7.8および298 Kで測定した。スペルミンおよび Mg^2 +をそれぞれ終濃度で3 mMとなるように加えた。

の比は2:2:1であり、この分子比で電荷がゼロとなる。同様な結果が、GTP、CTPおよびUTPでも得られている。これらのことは、ヌクレオチドトリリン酸(NTP)を利用した生化学反応を考えるとき、ポリアミンの存在を考慮する必要があることを示している。

3. ポリアミンとRNAステムループ

大腸菌では、特定のタンパク質の翻訳効率が、ポリアミンの濃度を介して制御されていることが知られており(ポリアミンモジュロン)⁴⁾、いくつかの

系についてポリアミンとの相互作用解析も行われて いる5-7)。ポリアミンモジュロンにおける制御は、 mRNAの二次構造の変化、コドン・アンチコドン 相互作用におけるwobble塩基対の安定化、あるい はsuppressor tRNAの構造の安定化などによって行 われていると考えられている。これらの現象には、 ポリアミンとRNAとの相互作用が必須であり、そ の基本的な組み合わせはRNAステムループとポリ アミンとの相互作用と考えることができる。特に、 RNAが内部ループあるいはバルジループを含む場 合に、ポリアミンとの特異的な相互作用が起こると 思われる。千葉大学の東らによって、図3に示した RNA (U6-34) を用いたスペルミジン (Spd) との 相互作用解析が行われた8)。このRNAは、ヒトの U6 snRNAの一部に相当し、インフルエンザウイル スのNS1タンパク質に由来するペプチドとの相互作 用が解析され、その二次構造がNMR法によって明 らかとされているものである⁹⁾。このRNAとペプチ ドとの相互作用がSpdによって阻害されることか ら、SpdがRNAのコンホメーション変化を起こして いる可能性が示唆された。そこで、SpdがRNAのコ ンホメーションに与える影響が詳しく解析された。 図3は、SpdあるいはMg²⁺の添加によるRNAの化学 シフトの変化をまとめたものである。図中の赤色 は、Mg²⁺の添加によって変化せず、Spdの添加によ ってある一定以上の変化が観測された残基を示して

図3 U6-34とSpdの相互作用

A. アデニン塩基のH8の化学シフト変化。B. アデニン塩基のH2の化学シフト変化。C. グアニン塩基のH8の化学シフト変化。D. ピリミジン塩基のH5/H6の化学シフト変化。赤:Spdのみによって変化。緑:SpdおよびMg²+のいずれによっても変化。青:変化なし。白抜き:SpdとMg²+の添加によってシグナルが消失。

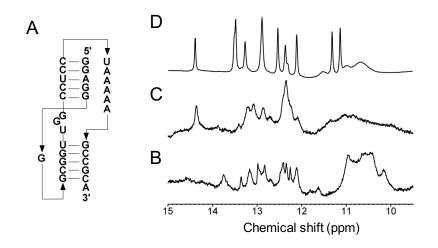


図4 TaaとRNAシュードノットとの相互作用

A. 大腸菌transfer-messenger RNAに含まれるシュードノットRNA。B.シュードノットRNA単独のNMRスペクトル。C. Taa存在下のNMRスペクトル。D. Mg²⁺存在下のNMRスペクトル。

おり、バルジアウト残基およびこれに近接した残基に限られている。一方、緑色はSpdあるいはMg²⁺のいずれの添加によって、ある一定以上の化学シフト変化が観測された残基を示しており、ステムを含む分子全体に観測されている。このことから、ポリアミンは、RNAのステムにも結合するが、バルジアウト残基の存在する領域に強く結合することが示唆された。

東京慈恵会医科大学の小黒らは、SpmとSpdを区別できるRNAアプタマーの取得に成功している¹⁰⁾。このアプタマーは、ステムループを2つもつ二次構造であることが分かっているが、結合により強く関与していると考えられているステムループには内部ループが存在していることから、この領域がスペルミンとの特異的な結合に関与している可能性があり、NMR法による相互作用解析が進められている¹¹⁾。

4. 分岐状ポリアミンとRNAの相互作用

高度好熱菌などの好熱性の細菌には、Spmよりも長い直鎖状ポリアミンのほかに、tetrakis(3-aminopropyl)ammonium(Taa)などの分岐状ポリアミンが含まれていることが知られており、RNAの熱安定化に寄与していると考えられている₁₂)

図4は、大腸菌のtransfer-messenger RNAに含 まれる4つのシュードノットの一つ(PK1)とTaa の相互作用を解析した例である。PK1は、Mg2+に 依存してシュードノット構造を形成する¹³⁾。Mg²⁺あ るいはTaaが存在しない場合には、PK1はシュード ノットを形成せず、10-11 ppm付近にステム構造に 含まれない塩基に由来するシグナルが多数重なって 観測される。これは、多くの分子がランダムなコン ホメーションとなっていることを示している。PK1 にMg²⁺を加えるとスペクトルが大きく変化し、シ ャープなシグナルが観測されるようになる。これ は、シュードノット構造の形成を示している。一 方、Taaを加えた場合にも10-11 ppmのシグナルは ほぼ消失し、比較的シャープなシグナルが観測され る。特に、14.5 ppm付近にはAU塩基対の形成を示 すシグナルが観測されており、その化学シフトは Mg²⁺存在下でのAU塩基対のものと一致している。 非変性条件で電気泳動を行うと、Taa存在下におい て移動度が大きくなることからRNAのコンホメー ションがコンパクトになることが分かっており、こ れらのことは、PK1がTaa存在下でシュードノット 構造を形成していることを示唆している。

tRNAの場合にも、非変性条件の電気泳動を行うと、Taaの結合によってtRNAの移動度が大きくなることから、TaaはtRNAのコンホメーションをコ

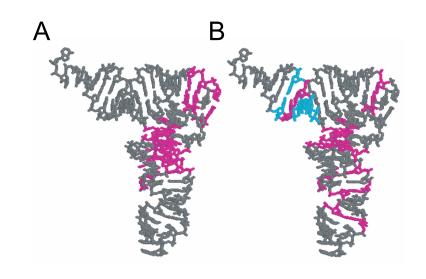


図5 tRNAと分岐状ポリアミンの相互作用(NMR法)

A. yeast tRNA^{Phe}の立体的相互作用部位(赤)。 B. Taaとの相互作用。赤: 化学シフト変化あるいは広幅化。青: 小さな化学シフト変化。

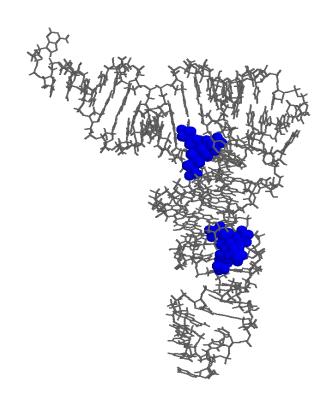


図6 ドッキングシミュレーションによる相互作用解析 yeast tRNAPheとTaaの相互作用を解析した。エネルギーの低い2つの結果について示してある。PDB ID: 1EVVの構造を用いた。

ンパクトにすることが示唆されている。図5は、yeast tRNAPheとTaaとの相互作用を、tRNAのイミノプロトンの化学シフト変化によって解析した結果である。Taaによって化学シフトが変化する領域がtRNAの立体的相互作用部位とよく一致していることがわかる。一方、図6は、プログラムICM-Pro (molsoft社)を用いて行ったyeast tRNAPheに対するTaaのドッキングシミュレーションの結果である。Taaは、アンチコドンステムとDステムの分岐部位付近およびDステムとTステムの間に結合することが示唆されている。NMR法による解析によっても同様な位置に化学シフト変化が観測されており、Taaはこれらの部位に結合してtRNAの立体構造を安定化していると考えられる。

以上の結果は、TaaがRNAの立体的相互作用を形成している部位に選択的に結合することによって、RNAの立体構造を安定化していることを示している。

5. 今後の展望

ポリアミンは塩基性物質であることから、酸性物質であるRNAとは静電的に相互作用する。したがって、ポリアミンとRNAには非特異的な結合が存在する。しかしながら、以上に示したNMR法によるさまざまな解析によって、ポリアミンはRNAの特徴的な立体構造を認識し、特異的に結合することも解明できる。今後、RNAとポリアミンの相互作用に関する研究をさらに進め、ポリアミンの機能発現のメカニズムに迫りたいと考えている。

参考文献

- 五十嵐一衛:ポリアミン研究-これ迄の取り組み. ポリアミン、1: 2-6 (2014)
- 2. Günther T, Vormann J, Konstanczak P, & Schäfer A: Interactions of polyamines in the measurement of free magnesium concentration by mag-fura-2 and ³¹P-NMR. Biochim. Biophys. Acta. 1192: 281-285 (1994)
- 3. Meksuriyen D, Fukuchi-Shimogori T, Tomitori H, Kashiwagi K, Toida T, Imanari T, Kawai G, & Igarashi K: Formation of a complex containing ATP, Mg²⁺, and spermine, structural evidence and biological significance. J. Biol. Chem. 273: 30939-30944 (1998)
- 4. Igarashi K, & Kashiwagi K: Polyamine modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines. J. Biochem. 139: 11-16 (2006)
- 5. Yoshida M, Meksuriyen D, Kashiwagi K, Kawai G, & Igarashi K: Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA): Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon AUG in OppA mRNA. J. Biol. Chem. 274: 22723-22728 (1999)
- 6. Yoshida M, Kashiwagi K, Kawai G, Ishihama A, & Igarashi K: Polyamine enhancement of the synthesis of adenylate cyclase at the translational level and the consequential stimulation of the synthesis of the RNA polymerase σ^{28}

- subunit. J. Biol. Chem. 276: 16289-16295 (2001)
- 7. Yoshida E, Kashiwagi K, Kawai G, Ishihama A, & Igarashi K: Polyamines enhance synthesis of the RNA polymerase σ^{38} subunit by suppression of an amber termination codon in the open reading frame. J. Biol. Chem. 277: 37139-37146 (2002)
- Higashi K, Terui Y, Inomata E, Katagiri D, Nomura Y, Someya T, Nishimura K, Kashiwagi K, Kawai G, & Igarashi K: Selective structural change of bulged-out region of double-stranded RNA containing bulged nucleotides by spermidine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 370: 572-577 (2008)
- Someya T, Hosono K, Morimura K, Takaku H,
 & Kawai G: Recognition of a bulged RNA by peptides derived from the influenza NS1 protein. J. Biochem. 143: 339-347 (2008)
- 10. 小黒明広、柳田明日美、天野亮、坂本泰一、河合剛太、松藤千也: 等温滴定型カロリメーターを用いたRNAアプタマーとスペルミンの相互作用解析. 日本ポリアミン学会第6回年会、品川(2014)
- 11. 柳田明日美、藤枝裕大、小黒明広、松藤千也、河 合剛太:スペルミンに結合するRNAアプタマーの 結合様式のNMR法による解析. 日本ポリアミン学 会第6回年会、品川(2014)
- 12. Terui Y, Ohnuma M, Hiraga K, Watashima E & Oshima T: Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophiles*. Biochem. J. 388: 427-433 (2005)
- 13. Nameki N, Chattopadhyay P, Himeno H, Muto A, & Kawai G: An NMR and mutational analysis of an RNA pseudoknot of *E. coli* tmRNA involved in trans-translation. Nucleic Acids Res. 27: 3667-3675 (1999)

ポリアミンによる蛋白質合成促進

照井 祐介

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 照井祐介、e-mail: <u>yterui@cis.ac.jp</u>

1. はじめに

ポリアミンは、細胞増殖・生存率に必須な生理活性物質であるにもかかわらず、その機能解明は非常に遅れている。ポリアミンは細胞内では主にRNAと結合して存在することから、ポリアミンによる細胞増殖促進効果は、蛋白質合成促進によって起こると考えられる。本稿では、現在明らかとなっているポリアミンによる細胞増殖促進・生存率維持に関するメカニズムについて解説する。

2. ポリアミンと蛋白質合成

ポリアミンがRNAとの相互作用により、蛋白質の合成促進・翻訳精度の上昇・リボソームの会合促進などの働きをすることが、千葉大学名誉教授五十嵐一衛博士の研究グループを中心として多数報告されている¹⁻⁶⁾。特に、ポリアミンが核酸との相互作用において、K+やMg²⁺イオンなどのカチオンとは違う機構で立体構造を変化させ、様々な面で細胞増殖促進に寄与していることが示された。

(1) 蛋白質の合成促進^{1,2)}

In vitroの蛋白質合成系では、大腸菌S30画分抽出液を用いたポリフェニルアラニンの合成、及びウサギ網状赤血球溶血液を用いたオルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) の合成がポリアミンにより促進されることが報告されている。また、ウシリンパ球におけるチミジンキナーゼの合成が、ポリアミンにより促進されることが報告されている。いずれの蛋白質の場合もポリアミンがmRNAに結合して構造を変化させることに起因して、翻訳効率を促進することが明らかとなっている。

(2) 翻訳精度の上昇3,4)

動物細胞において、ポリアミンによるtRNAのアミノアシル化(20種のうち特にIIe-tRNA)の形成反応の促進と、アミノアシルtRNAのリボソームへの結合促進が報告されている。アミノアシルtRNAのリボソームへの結合過程において、ミスリーディング(読み間違い)が起こると蛋白質合成が阻害さ

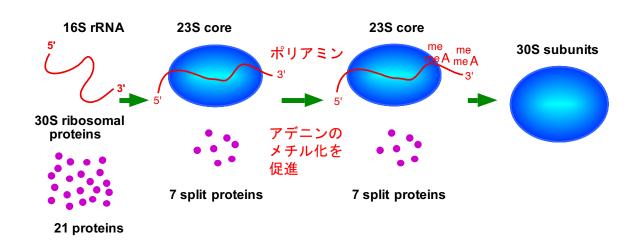


図1 ポリアミンによるリボソームの成熟促進

ポリアミンが、16S rRNA中のアデニンのメチル化を促進することにより、30Sサブユニットの会合促進が起こる。

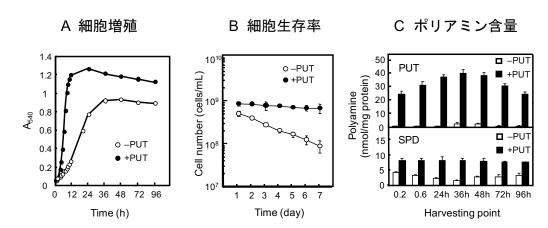


図2 E. coli ポリアミン生合成酵素欠損株MA261における細胞増殖、細胞生存率及びポリアミン含量

MA261を用いて、ポリアミン添加の有無における細胞増殖 (A)、細胞生存率 (B)、細胞内ポリアミン含量 (C)を測定した。細胞増殖において、ポリアミン非存在下では、細胞増殖及び細胞生存率が低下するが、ポリアミンを添加すると著しい上昇が見られた。このときの細胞内ポリアミン含量を見ると、添加されたPUTは細胞内に取り込まれ、尚且つPUTからのSPD合成が増加していることがわかる。

れるが、このミスリーディングの割合がポリアミンにより低下することが明らかとなっている。

(3) リボソームの会合促進5,6)

大腸菌のリボソームの30Sサブユニットは、16S rRNAと21個のリボソーム蛋白質から成っている。ポリアミンが、16S rRNA中のアデニンのメチル化を促進することにより、30Sサブユニットの会合の促進が起こることが報告されている(図1)。この効果により、全体の蛋白質合成が約2倍促進することが明らかとなっている。

3. ポリアミンモジュロン

大腸菌などの微生物は、生育環境が変化した際に素早く対応する能力を持っている。この適応能力は、大腸菌が生育環境からの刺激に応じて細胞内でつくる蛋白質の種類を常に変化させていることに起因する。著者らは、ポリアミンこそが環境応答に必要な蛋白質の合成を調節している物質であると考えた。

大腸菌のプトレッシン生合成酵素欠損株 (MA261) を用いて、ポリアミンの有無で細胞増殖速度を比較してみたところ、培地にプトレッシン (PUT) を添加することで、細胞増殖が3倍~5倍上昇し、生存率は7日目で10倍上昇するという知見を見出した(図2) 7)。MA261は、細胞内でPUT

を合成することはできないが、培地にPUTを加えると、細胞外のPUTを取り込み、PUTからスペルミジン(SPD)を合成することが可能な大腸菌株である。大腸菌においてポリアミンによる全体の蛋白質合成促進は、30Sサブユニットにおける16S

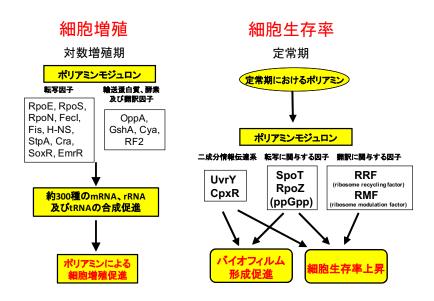


図3 細胞増殖及び細胞生存率におけるポリアミンモジュロンの役割

ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進をうける蛋白質をコードする遺伝子群はポリアミンモジュロンと命名され、現在までに大腸菌において20種類が同定されている。これまでに同定されたポリアミンモジュロンの多くが転写因子をコードしている。特に、プロモーター領域を認識するRNAポリメラーゼのシグマ因子のうちシグマ70以外のシグマ因子がポリアミンモジュロンもしくはポリアミンモジュロンによって転写が促進されるシグマ因子であり、遺伝子の発現に非常に深く関わっていることが明らかとなった。

表1 同定されたポリアミンモジュロン

生物種	蛋白質	機能
大腸菌	ОррА	栄養源であるオリゴペプチドを輸送する蛋白質
	Cya	アデニル酸シクラーゼ:細胞応答の引き金となる細胞内調節
		因子(セカンドメッセンジャー)であるcAMP合成酵素
	Fis	rRNA及びtRNA合成の転写因子
	RF2	蛋白質合成終結因子
	Fecl	RNA ポリメラーゼ $\sigma^{\!\scriptscriptstyle 18}$ サブユニット(鉄輸送に関与)
	RpoE	RNA ポリメラーゼ $\sigma^{\!\scriptscriptstyle 24}$ サブユニット (細胞膜の合成に関与)
	RpoS	RNA ポリメラーゼ σ^{38} サブユニット $(ストレス応答に関与)$
	RpoN	RNAポリメラーゼ σ^{54} サブユニット (窒素源の合成に関与)
	Cra	糖代謝(解糖系や糖新生)に働く転写因子
	H-NS	鞭毛やリボソーム蛋白質の転写因子
	StpA	熱ショック応答に関わる転写因子
	RMF	70S リボソームを100S ダイマーにして保存させる蛋白質
	RRF	蛋白質合成を円滑にするため、リボソームの機能をリサイクル
		させる蛋白質
	SpoT	緊縮応答時に転写を調節するセカンドメッセンジャーである
		グアノシン4リン酸 (ppGpp) 合成調節酵素
	RpoZ	RNAポリメラーゼ ωサブユニット (ppGppの機能調節に関与)
	UvrY	バイオフィルム形成制御の情報伝達に関与する蛋白質
	CpxR	銅の無毒化に関与する二成分情報伝達系のレスポンスレギュ
		レーター
	SoxR	スーパーオキシドデスムターゼの転写因子
	EmrR	システイン排泄蛋白質の合成酵素に関与する負の転写因子
	GshA	グルタチオン合成酵素
酵母	COX4	シトクロムC 酸化酵素活性の制御に関与するサブユニット
動物細胞	Cct2	アクチン、フィブリン等の蛋白質の折りたたみに関与する
		細胞質シャペロン
	Hnrpl	翻訳やmRNAの安定化、スプライシングに関与
	Pgam1	解糖系の酵素
	eEF1A	翻訳伸長因子

rRNA中のアデニンのメチル化による会合促進により、約2倍上昇したが、MA261は3倍~5倍で細胞増殖促進が起こる⁸⁾。よって、全体の蛋白質合成促進機構に加え、別の新たな蛋白質合成促進機構が考えられた。そこで、どのような蛋白質がポリアミンにより強く発現促進を受けるのかを検討したところ、細胞増殖に重要な役割を果たす蛋白質が、ポリアミンにより強く発現促進を受けることが明らかとなった⁹⁾。ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進をうける細胞増殖や生存率維持に必要な蛋白質を

コードする遺伝子群を同定し、「ポリアミンモジュロン」と命名した。

大腸菌では、対数増殖期において細胞増殖に重要な役割を果たす蛋白質12種を、定常期において生存率に重要な役割を果たす蛋白質8種を同定した7-22)(表1)。これらのポリアミンモジュロンのうち13種が転写因子として機能することから、ポリアミンが多くの遺伝子発現を調節し、細胞増殖や生存率維持に寄与していることが明らかとなった(図3)。真核細胞では、酵母で1種、動物細胞で4種

	大腸 (pH 7.5 10 mM Mg		ラット肝臓 (pH 7.5 2mM Mg ²⁺ 150 mM K ⁺)		
	プトレスシン mM (%)	スペルミジン mM (%)	スペルミジン mM (%)	スペルミン mM (%)	
総量	32.2 (100)	6.88 (100)	1.15 (100)	0.88 (100)	
フリー	12.5 (38.8)	0.26 (3.8)	0.08 (7.0)	0.02 (2.3)	
DNA	3.0 (9.3)	0.35 (5.1)	0.05 (4.3)	0.05 (5.7)	
RNA	15.4 (47.9)	6.17 (89.7)	0.90 (78.3)	0.75 (85.2)	
リン脂質	0.46 (1.4)	0.05 (0.7)	0.07 (6.1)	0.04 (4.5)	
ATP	0.84 (2.6)	0.05 (0.7)	0.05 (4.3)	0.02 (2.3)	

表2 大腸菌とラット肝臓におけるポリアミン分布

を同定した²³⁻²⁵⁾(表1)。いずれも細胞増殖に必要な蛋白質であり、ポリアミンの細胞増殖への重要性が示された。

4. ポリアミンによるポリアミンモジュロンの合成 促進メカニズム

ポリアミンは細胞内では主にRNAと結合して存在しており(表2)^{26,27)}、ほとんど全ての蛋白質はポリアミンと直接結合していないため、ポリアミンによる細胞増殖・生存率維持に関するメカニズムの1つとして、ポリアミンがmRNAの特定構造に結合することによって構造変化が起こり、翻訳が促進さ

れることが考えられた。大腸菌の全ゲノムが解読され、細胞増殖に必須の蛋白質の大部分が明らかとなった。細胞増殖・生存率に関わる重要な遺伝子のmRNAの構造を調べてみたところ、翻訳効率の悪い構造を有しているmRNAが多数あることが示唆され、次の①~③のような特徴があることが明らかとなった。

- ① 翻訳開始に重要なシャイン・ダルガーノ (SD) 配列と開始コドンが離れている。
- ② 開始コドンがAUGではなくGUGやUUGである。
- ③ mRNAの翻訳領域に終止コドンが存在する。

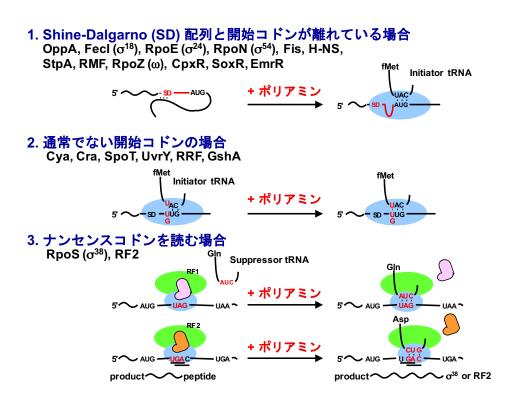


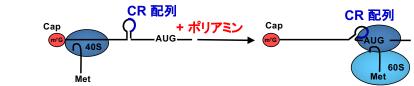
図4 大腸菌のポリアミンモジュロン及びその発現調節機構

ポリアミンモジュロンのmRNAの3つの特徴を示した。1つ目は、翻訳開始に重要なSD配列と開始コドンとの距離が離れているmRNAである。2つ目は、開始コドンがAUGではなく、UUGやGUGといったmRNAである。3つ目は、ORF中に終止コドンが存在するmRNAである。ポリアミンはこのような特徴ある翻訳効率の悪いmRNAの蛋白質合成を促進する。

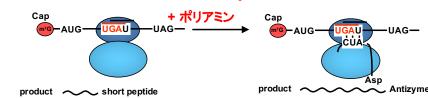
1. Ribosome shuntingが起きる場合: Cox4, Cct2



2. CR配列と開始コドンの距離が離れている場合: eEF1A



3. ORF中に終止コドンがある場合: Antizyme



4. メカニズム不明: Hnrpl, Pgam1

図5 真核細胞のポリアミンモジュロン及びその発現調節機構

ポリアミンモジュロンの翻訳促進機構の3つの特徴を示した。1つ目は、リボソームシャンティングが起きる特徴を持つmRNAでは、ポリアミンがリボソームシャンティングを促進する。2つ目は、CR配列と開始コドンとの距離が離れている場合、ポリアミンがmRNAの構造を変化させ、蛋白質合成を促進する。3つ目は、アンチザイムのようにORF中に終止コドンが存在する場合、ポリアミンはフレームシフトを促進する。他にもメカニズムは不明であるが、ポリアミンにより蛋白質合成が促進されるタンパク質がある。

ポリアミンにより強く合成促進を受けるポリアミ ンモジュロン蛋白質は、翻訳効率が悪いmRNAの 特徴を有していた。これらの蛋白質のmRNAの特 定構造(2本鎖を形成しないバルジ構造やステム・ ループ構造) に、ポリアミンが結合して構造変化を 引き起こすことにより、翻訳レベルでの発現を上昇 させることが示された^{28,29)} (図4)。①のmRNAで は、ポリアミンがバルジ構造を有するmRNAに結 合することによって、SD配列と開始コドン付近の 構造が変化し、相対的な距離が縮まることで、翻訳 開始複合体形成の効率を高めた。②のmRNAで は、ポリアミンが開始コドンとfMet-tRNAとの相 互作用を高めて翻訳開始を促進した。③のmRNA では、ポリアミンが終止コドンのリードスルー(終 止コドンが読み過ごされ、実際の蛋白質より長鎖の ペプチドが合成される現象)や+1フレームシフト を促進し、目的とする蛋白質合成の効率を高めた。 ポリアミンはこのように特徴ある翻訳効率の悪い mRNAの蛋白質合成を促進させた。

真核生物のポリアミンモジュロンのmRNAにおいても翻訳効率が悪い構造を有していることが示唆された²⁵⁾。現在までに明らかとなっている真核細胞におけるポリアミンモジュロンの翻訳促進機構は、3種類の特徴がある(図5)。

- ① 酵母のCOX4、動物細胞のCct2のmRNAの5'-非翻訳領域には、ポリアミンが結合すると予想されるステム・ループ構造が存在した。そこで詳細に検討したところ、ポリアミンがその領域に結合してリボソームシャンティング(40Sリボソームサブユニットが5'-非翻訳領域上のステム・ループ構造を飛び越えること)を引き起こし、蛋白質合成を促進することが明らかとなった。
- ② 原核生物と同様なSD配列が存在することが明らかとなり、18S rRNAとの相補的な配列を発見し、complementary sequence to 18S rRNA「CR配列」と命名した。ポリアミンがバルジ構造を有するmRNAに結合することによって、CR配列と開始コドン付近の構造が変化し、

相対的な距離が縮まることで、翻訳開始複合体形成の効率を高めることが示唆された。

③ アンチザイムのようにORF中に終止コドンが存在する場合、ポリアミンはフレームシフトを促進させた。

この他、ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進される蛋白質がいくつかあるが、真核細胞の蛋白質合成開始反応機序は、原核細胞の蛋白質合成開始反応とは異なるため、完全なるメカニズムの解明には未だ至っていない。今後明らかにしていきたい。

おわりに

ポリアミンモジュロンの研究を通して、細胞に何 らかの原因でストレスがかかったとき、ポリアミン はストレスを除去する蛋白質の翻訳効率を上昇さ せ、細胞自体を活性化させるという新たな機能の存 在が示唆された。ポリアミンの細胞増殖促進機構を 調べることにより、原核生物におけるバイオフィル ムの新規形成機構の発見、真核細胞におけるCR配 列の発見など、様々な研究分野の発展の手掛かりに なることも興味深いことの1つである。また、最 近、老化の原因といわれている酸化ストレスにおい て解毒に関わる転写因子群及び動物細胞における翻 訳伸長因子などの細胞増殖に重要な遺伝子群がポリ アミンモジュロンであることが明らかになり、原核 生物から真核生物へ至る共通性や普遍性という非常 に興味深い謎の解明にもつながることが期待され る。

参考文献

- 1. Atkins JF, Lewis JB, Anderson CW, Gesteland RF.: Enhanced differential synthesis of proteins in a mammalian cell-free system by addition of polyamines. J Biol Chem. 250: 5688–5695 (1975)
- 2. Igarashi K, Sugawara K, Izumi I, Nagayama C, Hirose S.: Effect of polyamines of polyphenylalanine synthesis by *Escherichia coli* and

- rat-liver ribosomes. Eur J Biochem. 48: 495–502 (1974)
- 3. Jelenc PC, Kurland CG.: Nucleoside triphosphate regeneration decreases the frequency of translation errors. Proc Natl Acad Sci U S A. 76: 3174–3178 (1979)
- 4. Igarashi K, Kashiwagi K, Aoki R, Kojima M, Hirose S.: Comparative studies on the increase by polyamines of fidelity of protein synthesis in *Escherichia coli* and wheat germ cell-free systems. Biochem Biophys Res Commun. 91: 440–448 (1979)
- 5. Echandi G, Algranati ID.: Defective 30S ribosomal particles in a polyamine auxotroph of *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun. 67: 1185–1191 (1975)
- 6. Igarashi K, Kashiwagi K, Kishida K, Watanabe Y, Kogo A, Hirose S.: Defect in the split proteins of 30-S ribosomal subunits and undermethylation of 16-S ribosomal RNA in a polyamine-requiring mutant of *Escherichia coli* grown in the absence of polyamines. Eur J Biochem. 93: 345–53 (1979)
- 7. Terui Y, Tabei Y, Akiyama M, Higashi K, Tomitori H, Yamamoto K, Ishihama A, Igarashi K, Kashiwagi K.: Ribosome modulation factor, an important protein for cell viability encoded by the polyamine modulon. J Biol Chem. 285: 28698–28707 (2010)
- 8. Igarashi K, Kashiwagi K.: Polyamine Modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines. J Biochem. 139: 11–16 (2006)
- 9. Igarashi K, Kashiwagi K.: Modulation of cellular function by polyamines. Int J Biochem Cell Biol. 42: 39–51 (2010)
- 10. Igarashi K, Terui Y, Kashiwagi K.: The polyamine modulon: Genes encoding proteins whose synthesis is enhanced by polyamines at the level of translation In: Kusano T, Suzuki H, editors. Polyamines, a universal molecular nexus for growth, survival and specialized modulation: Springer; 131–141. (2015)

- Igarashi K, Saisho T, Yuguchi M, Kashiwagi K.: Molecular mechanism of polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein. J. Biol. Chem. 272: 4058-4064 (1997)
- 12. Yoshida M, Meksuriyen D, Kashiwagi K, Kawai G, Igarashi K.: Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA). Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon AUG in OppA mRNA. J. Biol. Chem. 274: 22723-22728 (1999)
- 13. Yoshida M, Kashiwagi K, Kawai G, Ishihama A, Igarashi K.: Polyamine enhancement of the synthesis of adenylate cyclase at the translational level and the consequential stimulation of the synthesis of the RNA polymerase σ^{28} subunit. J. Biol. Chem. 276: 16289-16295 (2001)
- 14. Yoshida M, Kashiwagi K, Kawai G, Ishihama A, Igarashi K.: Polyamines enhance synthesis of the RNA polymerase σ^{38} subunit by suppression of an amber termination codon in the open reading frame. J. Biol. Chem. 277: 37139-37146 (2002)
- 15. Yoshida M, Kashiwagi K, Shigemasa A, Taniguchi S, Yamamoto K, Makinoshima H, Ishihama A, Igarashi K.: A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon. J. Biol. Chem. 279: 46008-46013 (2004)
- 16. Higashi K, Kashiwagi K, Taniguchi S, Terui Y, Yamamoto K, Ishihama A, Igarashi K.: Enhancement of +1 frameshift by polyamines during translation of polypeptide release factor 2 in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 281: 9527-9537 (2006)
- 17. Terui Y, Higashi K, Taniguchi S, Shigemasa A, Nishimura K, Yamamoto K, Kashiwagi K, Ishihama A, Igarashi K.: Enhancement of the synthesis of RpoN, Cra, and H-NS by polyamines at the level of translation in *Escherichia coli* cultured with glucose and glutamate. J. Bacteriol. 189: 2359-2368 (2007)

- 18. Terui Y, Higashi K, Tabei Y, Tomitori H, Yamamoto K, Ishihama A, Igarashi K, Kashiwagi K.: Enhancement of the synthesis of RpoE and StpA by polyamines at the level of translation in *Escherichia coli* under heat shock conditions. J. Bacteriol. 191: 5348-5357 (2009)
- 19. Igarashi, K, Kashiwagi K.: Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 271: 559-564 (2000)
- 20. Terui Y, Akiyama M, Sakamoto A, Tomitori H, Yamamoto K, Ishihama A, Igarashi K, Kashiwagi K.: Increase in cell viability by polyamines through stimulation of the synthesis of ppGpp regulatory protein and *ω* protein of RNA polymerase in *Escherichia coli*. Int J Biochem Cell Biol. 44: 412–422 (2012)
- 21. Sakamoto A, Terui Y, Yamamoto T, Kasahara T, Nakamura M, Tomitori H, Yamamoto K, Ishihama A, Michael AJ, Igarashi K, Kashiwagi K.: Enhanced biofilm formation and/or cell viability by polyamines through stimulation of response regulators UvrY and CpxR in the two-component signal transducing systems, and ribosome recycling factor. Int J Biochem Cell Biol. 44: 1877–1886 (2012)
- 22. Sakamoto A, Terui Y, Yoshida T, Yamamoto T, Suzuki H, Yamamoto K, Ishihama A, Igarashi K, Kashiwagi K.: Three members of polyamine modulon under oxidative stress conditions: two transcription factors (SoxR and EmrR) and a glutathione synthetic enzyme (GshA). PLOS one 10: e0124883 (2015)
- 23. Nishimura K, Okudaira H, Ochiai E, Higashi K, Kaneko M, Ishii I, Nishimura T, Dohmae N, Kashiwagi K, Igarashi K.: Identification of proteins whose synthesis is preferentially enhanced by polyamines at the level of translation in mammalian cells. Int J Biochem Cell Biol 41: 2251-2261 (2009)
- 24. Uemura T, Higashi K, Takigawa M, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K.: Polyamine modulon in yeast-Stimulation of COX4 synthesis by

- spermidine at the level of translation. Int J Biochem Cell Biol 41: 2538-2545 (2009)
- 25. Terui Y, Sakamoto A, Yoshida T, Kasahara T, Tomitori H, Higashi K, Igarashi K, Kashiwagi K.: Polyamine stimulation of eEF1A synthesis based on the unusual position of a complementary sequence to 18S rRNA in eEF1A mRNA. Amino Acids 47: 345-356 (2015)
- Miyamoto S, Kashiwagi K, Ito K, Watanabe S, Igarashi K.: Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys. 300: 63–68 (1993)
- 27. Watanabe S, Kusama-Eguchi K, Kobayashi H, Igarashi K.: Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. J Biol Chem. 266: 20803–20809 (1991)
- 28. Higashi K, Terui Y, Suganami A, Tamura Y, Nishimura K, Kashiwagi K, Igarashi K.: Selective structural change by spermidine of the bulged-out region of double-stranded RNA and its effect on RNA function. J. Biol. Chem. 283: 32989-32994 (2008)
- 29. Higashi K, Terui Y, Inomata E, Katagiri D, Nomura Y, Someya T, Nishimura K, Kashiwagi K, Kawai G, Igarashi K.: Selective structural change of bulged-out region of double-stranded RNA containing bulged nucleotides by spermidine. Biochem Biophys Res Commun. 370: 572-577 (2008)

GC-MSを用いたポリアミンの分析

中村 篤央

協同乳業株式会社研究所技術開発グループ

(190-0182 東京都西多摩郡日の出町平井20-1)

連絡先 中村篤央 e-mail: <u>a-nakamura@meito.co.jp</u>

【はじめに】

ポリアミンの分析方法としては、高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いた分析方法が比較的簡易で汎用性が高く主流である。我々の研究室でもポリアミンの定量は分析効率の良いHPLCによる方法で行っているが、ポリアミンの質量分析を目的とした実験にはガスクロマトグラフ-質量分析装置(GC-MS)を使用している。そこで、本稿では「シリーズ実験手技ノート第2弾」として、GC-MSを用いたポリアミンの分析方法について紹介する。

ガスクロマトグラフィー (GC) は、気体を移動相とするカラムクロマトグラフィーであり、液体クロマトグラフィーと比較し理論段数が高いため、分離が良く高感度で分析できる特徴を持っている。そのため、多成分系混合試料、微量成分の定性・定量分析に広く用いられている。一方でGCはその原理上、熱に不安定な物質や難揮発性成分は直接測定できない。このような物質は官能基を修飾し、①熱安定性を高め、②沸点を下げることで揮発性に変え、③極性を低下させることで目的成分ピークの分離を改善する誘導体化が必要である¹)。ポリアミン検出においても、この誘導体化のための前処理が必要である。

一般にGCは、多成分を含む試料から各成分を分離することは得意であるが、GCだけでは分離した各成分の正確な同定は困難である。GCに質量分析装置 (MS) を結合したGC-MSは、GCで分離した単一成分についてマススペクトルを測定することにより成分の定性を行い、MSにより検出されたイオンの強度により定量を行うことができる。GC-MSに使用されている質量分析装置のイオン化法で最も一般的なものは、電子衝撃イオン化(EI)法であ

り、当社で使用しているGCMS-QP2010装置(島 津)もEI法を用いている。EI法では分子イオンとし てイオン化した後に、高い内部エネルギーの作用に より分子の開裂が発生し、フラグメントイオンが生 成される。この開裂は成分の構造に特有なパターン で起こるため、EI法で得られたフラグメントイオン を含んだマススペクトルを解析することにより、成 分の定性が可能となる。また、成分特有のイオンの みを検出する選択イオン検出法 (SIM) を用いるこ とでさらに高感度な分析が可能であり、高感度な定 量、未知物質の同定、安定同位体の質量分析におい ては、GC-MSの使用は有効である。このような特 性から、GC-MSを用いるポリアミン分析手法も論 文中に散見され2,3)、我々も安定同位体を用いたト レース試験の分析にGC-MSを使用している。以下 に、我々のグループで行っているポリアミンの Ethylchloroformate (ECF) , Trifluoroacetic anhydride (TFAA) による2段階の誘導体化法、 GC-MSによる分析条件、及び主要ポリアミンのマ ススペクトルを記載する。また、その応用例として GC-MSを用いた、腸内菌叢によるアルギニン (Arg) からのプトレッシン (Put) 産生について の実験データも紹介する。

【実験手法】

サンプル調製

・各種サンプル(糞便/菌体/組織抽出液/培養上清など)400 μlに等量の冷20% Trichloroacetic acid (TCA) と内部標準として0.01% 1,6-Diaminohexaneを10 μl添加する。十分に撹拌した後、氷冷で20分間静置し、15,000 × gで10分間、4°Cで遠心分離し、タンパク質が除去された

図1 誘導体化されたPut及びSpdの構造式

上清を得る。定量用外部標準として、段階希釈 したポリアミン溶液も同様に処理する。

・上清300 μl × 2本を新しいチューブにとり、ジエチルエーテルを1 ml添加し1分間撹拌を行う。 15,000 × gで5分間、4°Cで遠心分離し、脂質および低極性の有機物を含むジエチルエーテル層を可能な限り除去する。この操作を2回繰り返す。 遠心濃縮機でジエチルエーテルを除去する。

✔ポイント

抽出効率、誘導体化率の補正のために内部標準として自然界に存在しない1,6-Diaminohexaneを使用した。1,7-Diaminoheptaneをスペルミジン(Spd)・スペルミン(Spm)用に、重水素で標識化したD4Putや1,3-DiaminopropaneをPut用の濃度計算用の内部標準とし使用している文献もある。

我々はより正確に定量するために内部標準で補正後 に外部標準で定量化を行っている。

誘導体化

ECFによる誘導体化

- ・2本を1本のチューブにまとめ、5M NaOHでpH 11~12に合わせる。pH調整後の溶液500 μlを2 mlチューブに測り取る。
- ・50 μlのECFを含む1 mlのジエチルエーテルを加 えボルテックスで室温30分間振盪する。
- ・15,000 × g で5分間、4°Cで遠心分離しジエチルエーテル層を φ13スクリューキャップ試験管(ガラス製)に移す。この抽出を2回繰り返す。
- ・35 °Cに温めたブロックヒーター上でN₂ガスを当 てながらジエチルエーテルを飛ばす。約5分間。

TFAAによる誘導体化

- ・100 μlの酢酸エチルとTFAA 200 μlを加え、混合 する。
- ・キャップをしっかり締め75 °Cに温めたブロック ヒーターで1時間加熱する。
- ・35 °Cに温めたブロックヒーター上で N_2 ガスを当てながら乾燥させる。
- ・200 µlの酢酸エチルで溶解し、GC-MS用のガラスバイアルにパスツールピペットを使い、全量を移す。ECF、TFAA誘導体化後のポリアミンの構造式を図1に示す。

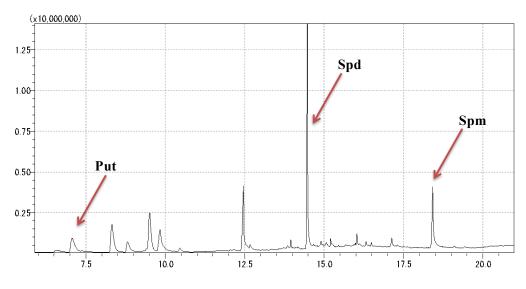


図2 Put、Spd、SpmのTICモードでのクロマトグラム

GC-MS条件

GC

- ・カラム: Equity-5 (30 m×0.25 mm×0.25 μm Sigma-Aldrich)
- ・カラム温度: 140 °C \rightarrow 8 °C/min \rightarrow 190 °C (4 min) \rightarrow 20 °C/min \rightarrow 300 °C (4 min) \rightarrow 20°C/min \rightarrow 320 °C (4 min)
- ・インジェクション方法 : Splitless法

・キャリアガス : He

流速 : 1 ml/min
 ・注入量 : 2 μL
 ・注入口温度 : 260 ℃

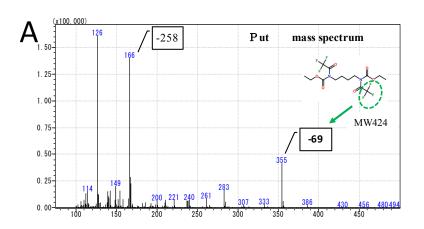
MS

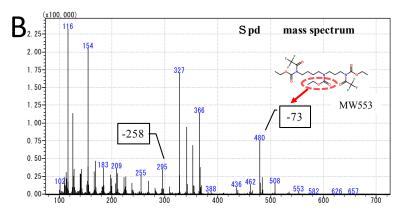
- ・イオン源温度 : 150 °C ・インターフェース温度 : 250 °C
- ・分析モード : Total ion chromatogram (TIC) or Selected ion monitoring (SIM)
- ・TIC スキャンレンジ: m/z 50-800
- ・SIM モニタリングイオン Put: *m/z* 355、Spd: *m/z* 480、Spm: *m/z* 609 etc.

上記のGC-MS 測定条件で3種のポリアミン標準物質を分析したTotal Ion Chromatogram (TIC) モードのクロマトグラフを図2に示す。Put、Spd、Spmのマススペクトルを図3に示す。各ポリアミンで特徴的なマススペクトルが得られることが分かる。未知の成分であれば全フラグメントイオンが得られるTICモードでの分析が必要となるが、既知の成分であれば特異的なフラグメント (Put:m/z166・m/z355、Spd:m/z295・m/z480、Spm:m/z424・m/z609など)をSIMモードで測定することで、より高感度に定量分析を行うことができる。

【GC-MSを用いたポリアミン分析例】

腸内菌叢がArgからPutを産生していることを確認するために安定同位体ラベル化Argを用いて実施した実験を紹介する。





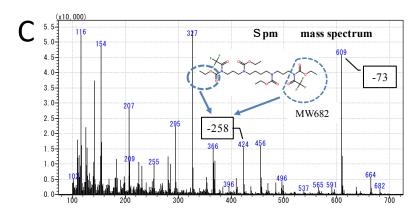


図3 各ポリアミンのマススペクトルと代表的な開裂パターン

- (A) ジアミンであるPutでは、69のイオンフラグメントが 開裂したm/z 355と、258のイオンフラグメントが開裂した m/z 166 の特徴的なイオンフラグメントが検出される。
- (B) Spdでは、73のイオンフラグメントが開裂した*m/z* 480と、258のイオンフラグメントが開裂した*m/z* 295の特徴的なイオンフラグメントが検出される。(C) Spmでは、Spd同様*m/z* 73のイオンフラグメントが開裂した*m/z* 609と、258のイオンフラグメントが開裂した*m/z* 424のイオンフラグメントが検出される。73のイオンフラグメントの開裂パターンをSpdのマススペクトルに記す。258のイオンフラグメントの開裂パターンをSpmのマススペクトルに記す。

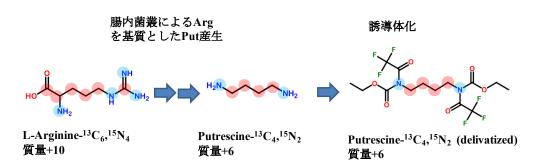


図4 安定同位体ラベル化アルギニン(¹³C₆, ¹⁵N₄ Arg·1 HCl) から産生されるPutとその誘導体物

●は¹³C、 ●は¹⁵Nを示す。

腸内菌叢によるArgを基質としたPut産生の証明 方法

- ・大腸にカテーテルを挿入したラット (SD、雄性、8週齢) に安定同位体ラベル化アルギニン (¹³C₆,¹⁵N₄ Arg・1 HCl) 6.6 mg/kg body weightをイソフルラン麻酔下で大腸へ直接注入し、6時間後に開腹し結腸内容物を採取した。
- ・結腸内容物をPBSで抽出し、前述の方法で誘導体 化を行いGC-MSにて分析を行った。
- ・安定同位体ラベル化アルギニン (¹³C₆, ¹⁵N₄ Arg・
 1 HCl) から産生されるPutの質量は+6となる (図4)。

結果

検出されたPutのマススペクトルを図5に示す。通 常のPutのフラグメントイオンm/z 355に対し+6の m/z 361 (図5赤矢印)、m/z 166に対し+50m/z 171 (イオン開裂によりPut骨格中の窒素1原子も外れるので+5となる)のマススペクトルが検出され(図5青矢印)、安定同位体ラベル化アルギニン($^{13}C_6,^{15}N_4$ Arg·1 HCl)からPutがラット大腸内で産生されたことが示された。総Put量に対するラベル化Putの比率は約44 %であることが確認された(表1) 4 。

【おわりに】

本稿ではECFとTFAA を用いた誘導体化法²⁾ を紹介したが、その他にもECFとPenta-fluoropropionyl anhydride を用いる誘導体化法にてポリアミンをGC-MSで分析する手法もある³⁾。カラムの種類、カラム温度、溶離液(グラジエント)、流速といった可変パラメータが多いHPLCと

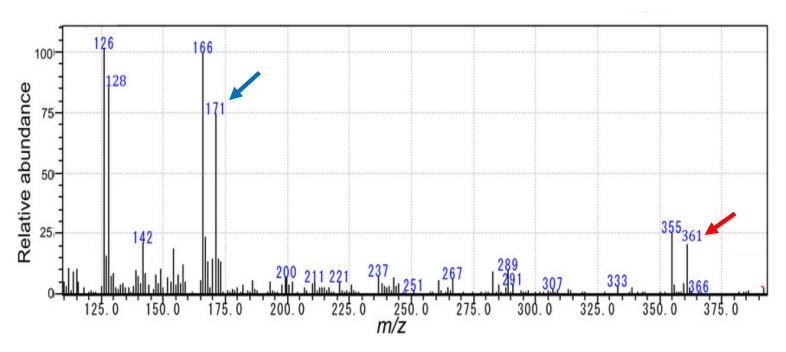


図5 安定同位体ラベル化アルギニン(¹³C₆, ¹⁵N₄ Arg・1 HCI)から産生されたと考えられるPutのマススペクトル

	5 Lu - ++-L	
表丨	Putに占める安定同位	立体標識化Putの割合

		Peaks		
	m/z	Relative abundance (%)	m/z	Relative abundance (%)
Normal	166	97.7	355	25
Labeling	171	73.4	361	20.1
Ratio of labeling (%)		42.9		44.6

比較すると、GC-MSは可変パラメーターが少ないため、計測したいポリアミンの種類、夾雑物の有無により適した誘導体化法を選択することが望ましい。本稿で紹介したECFとTFAAを用いた誘導体化法は、文献中²⁾では6時間以内に分析することが推奨されている。誘導体化法によっては安定性が変わるので注意が必要である。

参考文献

- 1. 小川 茂, 2008. GC/MS,LC/MS のための誘導体化, ぶんせき 7: 332-336.
- 2. Chen, G.G., Turecki, G. and Mamer, O.A., 2009. A quantitative GC-MS method for three major polyamines in postmortem brain cortex. J Mass Spectrom 44: 1203-1210.
- 3. Choi, M.H., Kim, K.R. and Chung, B.C., 2000. Determination of hair polyamines as Nethoxycarbonyl-N-pentafluoropropionyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 897: 295-305.
- 4. Kibe, R., Kurihara, S., Sakai, Y., Suzuki, H., Ooga, T., Sawaki, E., Muramatsu, K., Nakamura, A., Yamashita, A., Kitada, Y., Kakeyama, M., Benno, Y. and Matsumoto, M., 2014. Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. Sci Rep 4: 4548.

質量分析計を用いたポリアミンの分析

森谷 俊介

東京都医学総合研究所 幹細胞

(156-8506東京都世田谷区上北沢2-1-6)

連絡先 森谷 俊介、e-mail: moriya-ss@igakuken.or.jp

1.はじめに

1980年代以来、ポリアミンの測定にはHPLC法による測定が広く普及し、使用されている。学会誌の前号にもあったように、HPLC法は現在でも多くの先生方によって測定対象により様々な工夫や改良がなされ、依然としてポリアミン分析の主流である。一方で、これまで取り扱いの難しかったGC-MS、LC-MS、NMRなどの精密機器がやや扱いやすくなり、各分野の利用が急速に進んでいる。我々は、こうした機器を使い、生体試料中のポリアミン量を正確に、効率よく測定することを目的として、質量分析装置(LC-(Q)TOF/MS)を利用した新しいポリアミン分析法の開発を行ってきた。質量差によって物質を検出・識別するこの分析法は、さらにポリアミン代謝酵素の活性測定への応用も可能である。

本稿では、これまで我々が検討してきたポリアミンの分析法について紹介する。

2.質量分析による測定のアウトライン

本稿で紹介する測定法は、安定同位体標識ポリアミンを用いた、LC-(Q) TOF/MSによるフローインジェクション測定である。フローインジェクション測定は、測定時にカラムを使用した分離を行わないため、分析時間が短く、操作が単純で、再現性も高い。また、質量数が異なるだけで物理的・化学的性質はほぼ変わらない安定同位体標識ポリアミンを内部標準物質として用いることで、固相抽出などの操作による損失や測定時のイオン化過程での分子イオンの損失によるシグナルの低下などの影響を最小化して、測定対象と内部標準物質の分子イオンピー

クのシグナル強度比から測定対象を精密に定量化することが可能となる。

この方法では、測定前処理に先だって試料に内部標準物質を添加し、その後、ポリアミンの固相抽出、誘導体化の操作を行う。そして、一度の測定で複数のポリアミン成分を同時に測定できる(図1)ため、多量の試料を効率良く測定できる。

固相抽出は、フリーおよびモノアセチル体ポリアミンの測定とジアセチル体ポリアミンの測定(とくに N^1 , N^8 -diacetylspermidine(DiAcSpd))とでは、操作が異なるため、後述のように測定対象に適した操作を選択する必要がある。

質量分析計は、(Q)TOF型の質量分析計を用いる。試料であるポリアミンの誘導体化を行い、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法によりイオン化して、測定する。さらに、この方法の発展として、MS/MS分析を用いることで、アセチルスペルミジン異性体である N^1 -acetylspermidine(N^1 AcSpd)と N^8 -acetylspermidine(N^8 AcSpd) の同定を、試料前処理の手間などは変わらず、行うことができる。

以下に、操作の手順や注意点などを尿検体中のポリアミン測定を実験例とし、解説する。

3.測定法の詳細

安定同位体標識ポリアミンー

ポリアミンの定量は、未知濃度の試料に既知濃度の内部標準物質を添加し、それらのシグナル強度比から濃度を求める内部標準添加法を用いる。そのために、各ポリアミン成分の内部標準物質となる安定

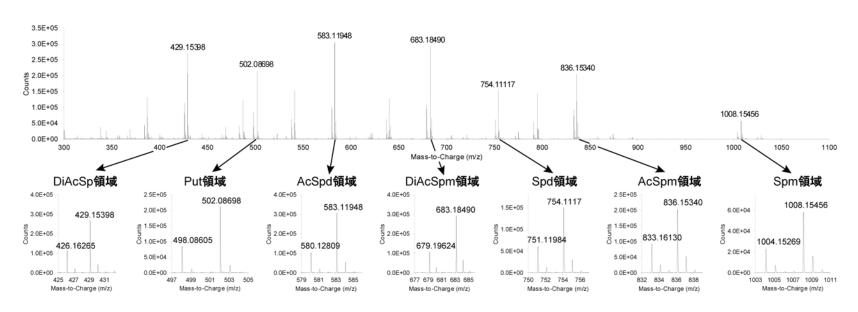


図1. TOF/MS分析による3種のポリアミンおよび4種のアセチルポリアミンの誘導体の同時測定結果

上図はm/z 100 ~ 1100のスキャン範囲のスペクトル。下図は各ポリアミン測定域の拡大図。TOF/MS 分析のAcSpd 領域では N^1 AcSpd と N^8 AcSpd が同一の分子イオンピークとして測定されるが、MS/MS 分析を用いれば2つの分離定量が可能である (図2を参照)。

同位体標識ポリアミンが必要である。ここでは、以下の物質をそれぞれの参考文献の記載にしたがって 準備した。

 $1,4^{-13}C_2,1,4^{-15}N_2$ -putrescine • 2HCl $(^{13}C_2,^{15}N_2$ -Put) $^{-1)}$ 、

1,4,8- 15 N₃-spermidine • 3HCl (15 N₃-Spd) $^{2)}$ (acetyl-1,2- 13 C₂]- N^1 -acetylspermidine • 2HCl (13 C₂-N 1 AcSpd) $^{3)}$ (

[acetyl-1,2- 13 C₂]- N^{8} -acetylspermidine • 2HCl (13 C₂- N^{8} AcSpd) $^{3)}$

 $1,4,7^{-15}N_3-N^1$ -acetylspermidine • 2HCl ($^{15}N_3$ - N^1 AcSpd) $^{4)}$ 、

1,4,8- 15 N₃- N^1 , N^8 -diacetylspermidine • HCl (15 N₃-DiAcSpd) $^{5)}$ 、

 $1,4,9,12^{-15}N_4$ -spermine • 4HCl ($^{15}N_4$ -Spm) $^{2)}$,

4,9,12- 15 N₃- N^1 -acetylspermine • 3HCl (15 N₃- N^1 AcSpm) $^{3)}$

1,4,9,12- 15 N₄- N^1 , N^{12} -diacetylspemine • 2HCl (15 N₄-DiAcSpm) $^{4)}$

質量分析では、物質を構成する元素組成の質量ピークの他に、この構成元素の天然同位体による質量数の異なる同位体イオンのピークも検出される。安

定同位体標識ポリアミンは、検出時における天然ポリアミンの同位体イオンピークの影響を避けるため、通常、天然ポリアミンの主同位体のみからの精密質量(モノアイソトピック質量)から3 ~ 4質量数が大きくなるよう設計し、合成した。

N¹AcSpd、N®AcSpd分析には天然AcSpdより質量数2大きい内部標準物質を準備した。これは、MS/MS分析を行う際に天然AcSpd由来の分子イオンと安定同位体標識AcSpd由来の分子イオンの両方に対して、十分な衝突エネルギーを与えられるようにすることと、天然AcSpdの同位体イオンピークの影響を最小限にすることの2つの要素を同時に考慮したためである。

フリーポリアミン、モノアセチルポリアミンの固相 抽出一

測定試料は、イオン化の抑制などの感度低下の要因となる塩や測定対象以外の夾雑物を極力除去するために、固相抽出によって部分精製して用いた。試料からのポリアミン固相抽出は、陽イオン交換樹脂を用い、Put、Spd、Spm、N¹AcSpd、N³AcSpd、N¹AcSpm、DiAcSpmを固相抽出した。陽イオン交換カラムには、CM-セルロース樹脂(和光純薬、Cat#: 033-19361)を使用し、PierceTMDisposable Columns, 2 mL (Thermo Scientific,

Inc.、Cat#: 29920) に0.3 mLの樹脂を充填して、使用した。

試料に測定対象となるポリアミンに対応した内部標準物質を任意濃度(目安としては測定対象のポリアミンの3~10倍程度)添加した。この溶液にトリクロロ酢酸溶液を終濃度3~5%となるように添加し、遠心分離により、除タンパクを行った。この遠心上清はカラムにロードする前に50 mMピリジンを用いて、中和した。

カラム操作には、揮発性の酸・塩基を用いたピリジン/酢酸緩衝液(Pyr/AcOH)を使用している。 不揮発性塩を使用すると、MS測定でのイオン化の際に塩によるイオン化への阻害やイオンソースへの沈着などによる感度低下が起こるため、使用を避ける必要がある。試料をロードしたカラムはイオン強度(塩濃度)を変えることによる、2段階のステップワイズ洗浄を行った。溶出は1 M Pyr/AcOHで行い、溶出してきたポリアミン画分を回収した。

この画分は、遠心エバポレータ(CVE-3100、東京理化器械)に冷却トラップ(UT-2000、東京理化器械)と真空ポンプ(GCD-051X、ULVAC KIKO, Inc.)を連結した装置を用いて一度乾固させた後、0.1 M塩酸/70%エタノールを添加して溶解し、再び乾固させた。一度目の乾固で、溶媒の除去が不完全であると、塩酸添加の際にピリジン塩酸塩を生じ、測定時の妨害となる。塩酸の添加操作により、溶出したポリアミンは酢酸塩から塩酸塩へ置換される。誘導体化の前に塩酸塩に置換することは、後の誘導体化の際に混合酸無水物の生成を避けるために重要な操作である。混合酸無水物は、誘導体化の際にポリアミンのアセチル化を引き起こし、定量に影響を与える。

多量の夾雑物が混在する生体試料の測定においては、しばしばイオン化の抑制によって測定が妨害され、分析の信頼性が低下することがあるが⁶⁾、安定同位体標識ポリアミンを用いた我々の測定条件下ではイオン化の抑制は起こらなかった。仮に、抑制が起こった場合でも、内部標準物質添加法⁵⁾を使用しているので、イオン化の抑制によるエラーを最小限にすることができる。

以下に、この方法で尿検体を処理した代表的な実 験例を示す。

実験例)尿検体からのPut、Spd、Spm、N¹AcSpd、N⁸AcSpd、N¹AcSpm、DiAcSpmの固相抽出

- 1. 1.5 mLチューブに尿検体0.2 mLを採取し、 40 μM ¹³C₂, ¹⁵N₂-Putを25 μL (final. 1 nmol/tube) 、40 μM ¹⁵N₃-Spdを50 μL (final. 2 nmol/tube) 、40 μM ¹⁵N₄-Spmを50 μL (final. 2 nmol/tube) 、40 μM ¹⁵N₃-N¹AcSpdを12.5 μL (final. 0.5 nmol/tube) 、40 μM ¹⁵N₃-N¹AcSpmを12.5 μL (final. 0.5 nmol/tube) 、40 μM ¹⁵N₄-DiAcSpmを12.5 μL (final. 0.5 nmol/tube) 、40 μM ¹⁵N₄-DiAcSpmを12.5 μL (final. 0.5 nmol/tube) 添加した。
- 10%トリクロロ酢酸溶液を0.3 mL添加し、
 20,000 x g、4°C、15分間遠心を行った。
- 3. 遠心で得た上清を新しい容器に回収し、50 mMピリジンを2 mL添加した。
- 4. 作製したCM-セルロースカラム (樹脂容量0.3 mL) は、樹脂容量の10倍量 (3 mL) の1 M Pyr/AcOHで洗浄後、10倍量 (3 mL) の10 mM Pyr/AcOHで平衡化を行った。
- 4.で準備したCM-セルロースカラムに試料を ロードし、10 mM Pyr/AcOHで3 mL、100 mM Pyr/AcOHで3 mL、カラム洗浄を行っ た。以下のカラム操作は、いずれも自然流下 で行った。
- 6. 1 mLの1 M Pyr/AcOH で溶出を行い、ねじ 口試験管に回収した。
- 7. 回収したサンプルを37°Cに設定した遠心エバポレータにセットし、真空ポンプで-100 kPa以下の減圧度で乾固させた。(約2時間)
- 8. 試料に0.1 M塩酸/70%エタノールを0.1 mL 添加した。
- 9. 再び、遠心エバポレータで乾固した。 (約20 分)

DiAcSpdおよびDiAcSpmの固相抽出一

ジアセチル体ポリアミンは、フリーおよびモノアセチル体ポリアミンに比べ電荷が弱い。そのため、とくにDiAcSpdは、CM-セルロースカラムを用いる上述の方法では十分に回収できない。そこで、DiAcSpd、DiAcSpmの定量に際しては、強陽イオン交換カラムを使用して対象物質を固相抽出する方法をとることとした。ここでは、より効果的に固相抽出を行うため、陽イオン交換カラムの使用前に、強陰イオン交換カラムにより、試料中の陰イオン性物質を吸着除去する方法を紹介する。固相抽出に使用する陰イオン交換カラム・陽イオン交換カラムとしてはOasis MAX 1 cc Vac Cartridge (Waters Corp.、Cat#: 186000366) とOasis MCX 1 cc Vac Cartridge (Waters Corp.、Cat#: 186000252) を用いた。

試料中に、測定対象となるポリアミンに対応した内部標準物質を任意濃度(目安としては測定対象のポリアミンの3~10倍程度)添加し、トリクロロ酢酸による除タンパクを行った。除タンパク後の試料は、0.5 M炭酸ナトリウム水溶液を用い、pHを中性よりややアルカリ側へと調整した。これをOasis MAX Cartridgeにロードし、素通り画分と超純水1mLでの洗浄画分を回収した。次に、素通り+洗浄画分のpHを0.1 M塩酸によって中性よりやや酸性側に調整し、Oasis MCX Cartridgeにロードした。カラムを0.1 M塩酸、メタノールで洗浄後、28%アンモニア水(和光純薬、Cat#: 016-03146)の10倍メタノール希釈液で溶出した。

アンモニアで溶出した遊離塩基形のポリアミンは、一般的に塩酸塩と比べると不安定である。ジアセチル体はフリーポリアミンほど不安定ではないが、一層の安定化のために、一度減圧乾固を行った後、0.1 M塩酸/70%エタノールを添加し、塩酸塩に置換し、再び乾固させた。

以下に、この方法で尿検体を処理した代表的な実 験例を示す。 実験例)尿検体からのDiAcSpd、DiAcSpm の固相 抽出

- 1. 1.5 mLチューブに尿検体0.2 mLを採取し、 $40~\mu M^{-15}N_3$ -DiAcSpd、 $40~\mu M^{-15}N_4$ -DiAcSpm を各 $12.5~\mu L$ ずつ添加した(final. 各0.5~nmol/tube)。
- 10%トリクロロ酢酸を0.2 mL添加し、20,000 x g、4°C、15分間、遠心を行った。
- 3. 遠心上清を新しいチューブに回収し、0.5 M 炭酸ナトリウム水溶液を0.15 mL添加した。
- 4. Oasis MAX Cartridgeは、メタノール1 mLで 洗浄後、超純水1 mLで平衡化した。以下のカ ラム操作は、いずれも自然流下で行った。
- 5. Oasis MAX Cartridge に試料をロードし、素 通り画分を回収した。さらに、超純水1 mLで カラムを洗浄し、素通りした洗浄液も同じ容 器に回収した。
- 6. 素通り画分に0.1 M塩酸を0.4 mL添加した。
- 7. Oasis MCX Cartridgeは、メタノール1 mLで 洗浄後、超純水1 mLで平衡化した。
- 8. 素通り画分をOasis MCX Cartridgeにロード し、0.1 M塩酸2 mL、メタノール2 mLで順次 カラムを洗浄した。
- 9. 28%アンモニア水/メタノール (1: 9) 1 mL で溶出させた。
- 10. 溶出画分を37°Cに設定した遠心エバポレータ にセットし、真空ポンプで-100 kPa以下の減 圧度で乾固した。(約1時間)
- 11. 試験管中の試料に0.1 M塩酸/70%エタノール を0.1 mL、添加した。
- 12. 再び、遠心エバポレータで乾固した。

ポリアミンの誘導体化一

ポリアミンは分子量が100~300程度と小さく、 検出の際にベースラインノイズの大きい検出域にある。これを誘導体化することで、質量数が増大し、 ベースラインノイズの少ない検出しやすいm/z域へシ グナルが移動する結果、検出感度が改善する。誘導 体化にはまた、イオン化効率を高め、感度を向上さ せる効果もある。誘導体化試薬には、ヘプタフルオ ロ酪酸無水物 (Sigma-Aldrich, Inc.、cat#: 394912) を用いた。フッ素含有誘導体化試薬には、フッ素 (¹⁹F) の天然存在比が 100%であるため、試薬による誘導体化後の同位体イオンピークの影響を無視することができる利点がある。

試料にアセトニトリル、ヘプタフルオロ酪酸無水物を添加し、密閉系で反応させた。ヘプタフルオロ酪酸無水物は、試料中に水が残っていると加水分解するため、誘導体化の前の乾固は十分に行う必要がある。また、固相抽出が終わった段階で、試料の-20°Cでの保存が可能であるが、冷凍保存した試料を誘導化する際は、湿気を避けるために常温に戻してから開封するというような注意を払う必要がある。反応終了後は窒素ガスを吹き付けることで、試料を乾固させた。乾固した試料を0.2%酢酸アンモニウム、0.05%ギ酸/50%アセトニトリル溶液1mLで溶解させた。検出に適した濃度に調整するため、さらに同じ溶解液で10倍希釈を行い、測定試料とした。

ポリアミンは、誘導体化によりアシル化を受け、 遊離アミノ基にヘプタフルオロ酪酸1分子が付加される。しかし、アセチル基が付加しているアミノ基 に対してはヘプタフルオロ酪酸が導入されないため、質量分析においてはアセチル体ポリアミンとフ リー体ポリアミンの質量数 (m/z) が逆転して検出 される。

以下に代表的な実験例を示す。

実験例) 固相抽出後の試料の誘導体化

- 1. 乾固した試料が入ったねじ口試験管中に、アセトニトリル0.1 mL、ヘプタフルオロ酪酸無水物20 μLを添加した。
- 2. ねじ蓋をしっかりと閉め、ブロックヒータで 100° C、30分間加熱した。
- 3. 反応終了後、窒素ガスを溶液に吹き付け、乾 固した。
- 乾固させた試料を0.2%酢酸アンモニウム、
 0.05%ギ酸/50%アセトニトリル1 mLで溶解させた。

5. 測定に適当な濃度へ調整するため、試料溶液 を20 µL分取し、溶解液を0.18 mL添加した。

LC-TOF/MS分析を用いたポリアミン測定一

測定には、Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system (Agilent Technologies, Inc.) を使用し、ESI法のイオンソースとしてDual ESIを用いた。移動相としては、0.2%酢酸アンモニウム、0.05%ギ酸/50%アセトニトリルを使用した。測定には、カラムを使用せず、流速0.1 ml/minの移動相に試料1 μ Lをロードし、装置に注入、ポリアミンの検出を行う。その他の測定条件は表1に示した。

表1. TOF/MS分析の分析条件

装置	A gilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system
イオンソース	Dual ESI
イオン化モード	ESI (+)
乾燥ガス	N ₂ , 350°C, 10 mL/min
ネブライザー	N ₂ , 35 psi
キャピラリー電圧	3500 V
フラグメンター電圧	130 V
スキャン範囲	100 ~ 1100
移動相	0.2%酢酸アンモニウム、0.05%ギ酸/50%アセトニトリル
移動相流量	0.1 mL/min
カラム	なし
注入量	1 μL
分析時間	60 sec

誘導体化されたポリアミンの分子イオンは、Put、Spd、Spmはアンモニウムアダクト([M+NH4]+)として、AcSpd(N¹AcSpdとN8AcSpd)、DiAcSpd、N¹AcSpm、DiAcSpmはプロトンアダクト([M+H]+)として検出される。従って、各ポリアミン成分とそれに対応した内部標準物質は以下のm/zで検出された。Put(m/z 天然ポリアミン、498 : 安定同位体標識ポリアミン、

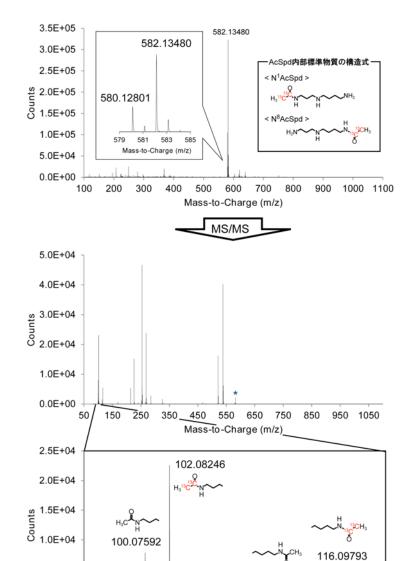


図2. AcSpd分子イオンのMS/MS分析によるN¹AcSpdとN⁸AcSpdの同定

Mass-to-Charge (m/z)

114.09163

101 103 105 107 109 111 113 115 117 119

5.0E+03

0.0E+00

99

(上図) TOF/MS分析によるAcSpdの測定結果(m/z 100 ~ 1100)。(中図) TOF/MS分析で検出されたAcSpdに対して、MS/MS 分析を行った際のプリカーサーイオン(★印)から生じたフラグメントイオンの測定結果(m/z 50 ~ 1100)。(下図) MS/MS分析におけるアセチルアミドプロピル基(m/z 100: 102)とアセチルアミドブチル基(m/z 114: 116)領域の拡大図。

502) 、Spd (*m/z* 751: 754) 、AcSpd (*m/z* 580: 583) 、DiAcSpd (*m/z* 426: 429) 、Spm (*m/z* 1004: 1008) 、N¹AcSpm (*m/z* 833: 836) 、DiAcSpm (*m/z* 679: 683) (図 1 参照)。

AcSpdについては、TOF/MS分析ではN¹AcSpdとN8AcSpdの2種類の異性体が同一の分子イオンピ

ークとして検出される。以下に述べるように、この 2種類の異性体はMS/MS分析によって分離定量する ことができる。

MS/MS 分析を用いたN¹AcSpd、N8AcSpd の定量

TOF/MS分析でAcSpd領域に検出される天然 AcSpdと安定同位体標識AcSpdの2つのシグナルを 与える成分に対し、選択的に衝突エネルギーを与え ることでMS/MS分析によるN¹AcSpd、N⁸AcSpdの 定量が行える。測定試料からのNIAcSpd、 N⁸AcSpdの固相抽出は、"フリーポリアミン、モノ アセチルポリアミンの固相抽出"の項で述べたとお りCM-セルロースカラムを用いて行う。ただしここ では、内部標準物質として天然ポリアミンより質量 数が2大きい¹³C₂-N¹AcSpdと¹³C₂-N⁸AcSpdをそれ ぞれ終濃度0.5 nmol/tubeとなるように添加した。 この内部標準物質を用いた場合、TOF/MS分析にお いて、誘導体化されたAcSpdはプロトンアダクトと して、*m/z*値は580と582に検出される(図2、上 図)。この2つのピーク成分(プリカーサーイオ ン) の強制的フラグメンテーションを起こさせるた め、装置のコリジョン電圧を34 Vに設定し、プリ カーサーイオンに対し衝突エネルギーを加える。す ると、N¹AcSpd (またはN⁸AcSpd) からはそれぞ れ、中心にある二級アミンと N^1 (または N^8)側の 炭素の間で解裂した、アセチルアミドプロピル基 (またはアセチルアミドブチル基) に由来するフラ グメントイオンが検出された(図2、中図と下 図)。この時、内部標準物質ではアセチルアミドプ ロピル基(またはアセチルアミドブチル基)内に標 識された2個の炭素があるため、天然のAcSpd分解 物より質量数2大きな分子イオンが検出される。し たがって、N¹AcSpdに由来するアセチルアミドプ ロピル基 (m/z 100: 102) と、N⁸AcSpdに由来す るアセチルアミドブチル基 (m/z 114: 116) を、そ れぞれ、内部標準物質との比較によって、同定・定 量することができる。

4.おわりに

この方法を用いれば、ポリアミン代謝の経路に関係する全3種類のポリアミンおよび4種類のアセチルポリアミンを同時に測定することができる。そして、対応する内部標準物質とのピーク面積比に基づいてそれぞれの成分の量を正確に求めることができる。質量分析装置の前段にカラムを使用しないため、測定は迅速に行える。さらに、MS/MS分析を利用すればN¹AcSpdとN®AcSpdの異性体を同定、定量することもできる。ここでは、2種類の異性体の内部標準物質として¹3C2-N¹AcSpdと¹3C2-N®AcSpdを利用し、MS/MS分析により生じるフラグメントイオンを内部標準物質との面積比に基づいて定量する方法について説明した。

私たちは現在、この方法をポリアミン代謝酵素の 活性測定に応用したいと考えて研究を進めている。 酵素活性の測定に関しては、これまでも種々の方法 が工夫され、利用されている。しかし、その中に は、たとえばオキシダーゼ反応の活性値を反応の産 物である過酸化水素の量から求めるなど、間接的に 活性値を求める方法も多い。そのため、内在性物質 による妨害や副反応の影響を受けやすく、とくに 種々の細胞成分や酵素が混在する生体試料中の弱い 酵素活性を正確に測定することが困難であった。安 定同位体標識ポリアミンを基質として反応させれ ば、天然物とは質量の異なる生成物が生じる。上述 の実験に用いたものよりもさらに質量の大きい標識 ポリアミンを準備し、それを内部標準物質として用 いれば、ここで説明した方法と同様に酵素反応の生 成物を直接かつ正確に定量することができる。

5.謝辞

本稿を執筆するに当たり、川喜田正夫先生、鮫島 啓二郎先生、お二人の先生方には多くのご指導をい ただきました。厚く御礼を申しあげます。

参考文献

- 1. Xu YJ, Hara T, Samejima K, Sasaki H, Kobayashi M, Takahashi A, Niitsu M, Simultaneous determination of endogenous and orally administered ¹⁵N-labeled polyamines in rat organs. Anal Biochem. 301 (2): 255-260 (2002).
- 2. Hara T, Xu YJ, Sasaki H, Niitsu M, Samejima K, Syntheses of [13C,15N]-labeled polyamines, J Labelled Cpd Radiopharm. 43 (10): 1005-1011 (2000).
- 3. Moriya S, Iwasaki K, Samejima K, Takao K, Kohda K, Hiramatsu K, Kawakita M. A mass spectrometric method to determine activities of enzymes involved in polyamine catabolism. Anal Chim Acta. 748: 45-52 (2012).
- Kobayashi M, Samejima K, Hiramatsu K, Kawakita M. Mass spectrometric separation and determination of N¹,N¹²-diacetylspermine in the urine of cancer patients. Biol Pharm Bull. 25 (3): 372-374 (2002).
- 5. Samejima K, Hiramatsu K, Takahashi K, Kawakita M, Kobayashi M, Tsumoto H, Kohda K. Identification and determination of urinary acetylpolyamines in cancer patients by electrospray ionization and time-of-flight mass spectrometry. Anal Biochem 401 (1): 22-29 (2010).
- 6. Bruins CH, Jeronimus-Stratingh CM, Ensing K, van Dongen WD, de Jong GJ. On-line coupling of solid-phase extraction with mass spectrometry for the analysis of biological samples: I. Determination of clenbuterol in urine. J Chromatogr A 863 (1): 115-122 (1999).

..コラム: 質量分析の用語説明

質量分析が身近になり論文で目にする機会が多くなっていると思います。本稿でもいくつかの関連用語を使用していますが、馴染みのない用語について簡単に説明します。

LC- (Q) TOF/MS

Liquid Chromatography—quadrupole Time-of-Flight/Mass Spectrometry (液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析計) の略。装置としてはHPLCの後に四重極飛行時間((Q)TOF) 型の質量分析計(MS) を連結させたもの。TOF/MS分析は、イオン化された試料が真空中で飛行する時間を計測することにより対象の質量を測定する分析法である。試料に由来するシグナル(分子イオンピーク) から試料の分子量情報が得られる。

フローインジェクション測定

測定ではLC部でカラム分離を行うのが通常だが、カラムを使用せず移動相の流れに試料をのせてMSに注入する分析法をフローインジェクション測定という。LC部を使用せずシリンジを用いて試料を直接連続注入する分析法をインフュージョン測定という。

イオンソースとイオン化法

LC部から移動してきた試料を、MS部への注入前でイオン化させる部位をイオンソースという。イオン化法には様々な方法があるが、本稿ではエレクトロスプレーイオン化(ESI) を用いている。E-SIは一般的に試料に対してマイルドなイオン化法の一つと言われている。

MS/MS分析

本稿で用いた質量分析装置の構造は2台のMSが直列に結合されたものである。TOF/MS分析ではイオン化された試料を1台のMSを使用し測定しているが、MS/MS分析では、1台目で検出されたある特定のイオン(プリカーサーイオン) にさらに衝突エネルギーを与え、生じた二次イオン(フラグメントイオン) を2台目のMSで質量分離し、検出している。MS/MS分析では、目的の物質由来のフラグメントイオン情報を得ることで、対象の構造解析などが行える。

モノアイソトピック質量と同位体イオンピーク

多くの元素には天然の同位体存在比が存在するため、測定を行った際には質量数が異なるいくつかのシグナルが検出される。試料分子を構成する各元素の主同位体のみからの精密質量をモノアイソトピック質量といい、同位体元素を含む元素で構成された質量を同位体イオンピークという。

アダクトイオン

試料のイオン化は、過程の最後で電子が試料に付加されてイオン化が完了する。イオン化条件、分子種の極性、移動相の特性などにより多様なアダクトイオンが検出されが、正イオン測定モードの測定では、プロトン、アンモニウムなどが付加したプロトンアダクト、アンモニウムアダクトがよく形成され、検出される。

~ 編集部より筆者への質問コーナー ~

<GC-MS を用いたポリアミン測定について>

- Q. 前処理から分析終了までどのくらい時間がかかりますか?
- 中村:検体数にもよりますが、おおよそ前処理に1時間、誘導体化に4時間を要します。GC-MSによる 分析は1検体あたり30分を要します。
- Q. 途中でサンプルを保存できる箇所があったら教えてください。
- 中村:TCAによりたんぱく質を除去し、ジエチルエーテルにより脂質および低極性の有機物を除去した後の水層は-20℃にて保存可能です。
- Q. 操作中、最も気を遣うことは何ですか?
- 中村:TFAAでの誘導体化時に最も気を遣います。以下の点に注意し作業しています。
 - ・TFAAの誘導体化前にN2ガスで十分乾燥させる。水分の移行は反応を阻害します。
 - ・TFAA 200 μ lを添加する前に、酢酸エチルにて試験管の底部と内壁のECFによる誘導体化物を十分に溶解させた後にTFAAを加える。
 - ・TFAAは揮発性が高いため、75℃で1時間反応させる際に完全に密栓できるものを使用する。
- Q. GC用誘導体化法としてシリル化、アシル化、アルキル化などが知られていますが、ポリアミン測定にアシル化を選択した理由を教えてください。
- 中村:ポリアミンのGC用の誘導体化方法としては、アシル化反応を用いた報告が多いです。これはアミノ基に対する反応性と誘導体化物の保持強度が高いことが理由だと考えられます。アシル化剤としてはTFAAの他に無水ペンタフルオロプロピオン酸を用いたポリアミンの誘導体化法も報告されていますが、TFAAの方がピークがシャープであり且つ揮発性が高いとの報告があることからTFAAを採用しました。
- Q. 未反応の無水フルオロアシル化剤や、反応副生成物の酸はどうされていますか? 何か影響ありますか?
- 中村:未反応のTFAAはブロックヒーター上でN2ガス噴射により留去されます。TFAAは腐食性が高いため、後の操作に移行しないようにしっかり乾燥させます。また、留去に際しブロックヒーターごとドラフト内に入れて操作しています。反応副生成物のうち揮発性が高いものについてはしっかりと乾燥させることで、未反応のTFAA同様に留去されると考えられます。揮発性が低いものについてはポリアミンの誘導体化物と同様に酢酸エチルに溶解されていると考えられます。副生成物の影響を少なくするためにGC-MSに注入する量は少ない方が好ましいと考えられます。
- Q. 誘導体化から分析までの時間を考慮すると、一度に何検体まで同時に誘導体化処理可能ですか? 中村:誘導体化物の安定性と GC-MS での測定時間を考慮すると12検体までが安定して測定ができる検 体数と考えられます。

- Q. 有害性や危険性のある試薬については、操作段階、廃棄段階でどのような注意や工夫をすればよい か教えてください。
- 中村:ECF、TFAAは吸引、皮膚へ付着しないように必ずドラフト内で手袋着用の上、操作するように 注意してください。

ECF、TFAAともに水との反応性が高いため、水との接触を避けて保存するように注意してください。

廃液処理は廃棄物処理業者に依頼しています。

<尿サンプルについて、LC-MSシステムを用いたポリアミン測定について>

- Q. 尿サンプルの保管上の注意点があったら教えてください。
- 森谷:採尿した検体に、微生物の繁殖を防ぐために0.05~0.1%程度となるようにアジ化ナトリウムを添加し、-20℃以下で保管しています。アジ化ナトリウムを添加した尿であれば、数日、4℃で保存した試料でもポリアミン測定には問題ありませんでした。
- Q. 前処理から分析終了までどのくらいの時間がかかりますか?
- 森谷:前処理に要する時間は、一度に処理する検体数にもよりますが、これらを大きく左右するのは乾 固操作に用いる遠心エバポレータの能力です。我々の研究室にある遠心エバポレータには一度に 48本まで試験管が架けられますので、この場合の処理時間についてお話します。

前処理は慣れてくれば、その当日中に試料の測定まで行えます。固相抽出に1~2時間、乾固に2~3時間、誘導体化に1~2時間ほどかかります。測定は1検体に対し、1分間の測定、そのまま移動相を流し続けるブランクRUN状態で2分間の洗浄&平衡化を行います(48検体だと、3分×48≒145分かかる)。従って、固相抽出からおよそ9.5時間で測定結果を得ることができます。ですが、普段は夜間中に自動プログラムで測定を行い、翌日に結果を解析するといった流れで操作を行っています。

- Q. 途中で止めてサンプルを保存できる箇所があったら教えてください。
- 森谷:途中で試料を保存できるのは、誘導体化前の乾固した段階です。乾固した試料への湿気を避けるため、試験管の蓋をしっかりと閉め、ジッパー付きビニール袋に入れて、-20°C以下で保存しています。
- Q. 逆に、フリーポリアミン、モノアセチルポリアミンの固相抽出に、DiAcSpd, DiAcSpm 固相抽出 の方法を用いると何か不都合はありますか。
- 森谷:不都合な点は、フリーポリアミンやモノアセチルポリアミンとOasis MCXカラムの相互作用が強く、カラムからの溶出が難しくなることです。そのため、より相互作用の弱く、溶出が容易なCM-セルロースカラム(弱陽イオン交換カラム)を使用しています。2種の固相抽出の使い分けは、ポリアミンがもつ遊離アミノ基の数が基準になります。たとえば、Putには2個の遊離アミノ基がありますが、DiAcSpdには遊離アミノ基が1個しかありません。本文では、DiAcSpmの固相

抽出はOasis MCXカラムを用いると記述しましたが、構造内に遊離アミノ基が2個ありますので、実際にはCM-セルロースカラムでも行えます。

質問内容からは話がずれてしまいますが、CM-セルロースカラムは繰り返し使用することができます。カラムの使用後は、1M Pyr/AcOH (3mL) を用いてカラム洗浄し、保存する場合は4°Cでといった方法で、同じカラムを繰り返し5回ほど使用できます。

- Q. 操作中、最も気を遣うことは何ですか?
- 森谷:試料乾固の際に、溶出溶媒を完全に乾燥させることです。乾固操作は試料の乾燥状態を客観的に示す指標がないため、乾固に十分な時間をかけ、最後は目視で乾燥状態の確認をしています。そのため、急いでいる時などには、わずかに水滴が残っていることを見落として次のステップに進んでしまうことがありました。そうなると、測定の際にノイズが目立ち、良い測定結果が得られなくなります。他には、使用試薬はできるだけLCMSグレードを用いること、操作中にプラスチック類を使用しないことなど気をつけていますが、回避しようのないこともあるので、できる限りの範囲でそれらに注意を払っています。
- Q. LC用誘導体化試薬もいろいろあるようですが、ヘプタフルオロ酪酸を選択した理由を教えてください。
- 森谷:もともとGC-MSでの誘導化剤として使用されており、LC-MSでも他の誘導化剤より修飾後の化合物の揮発性がよくなるのではないかと考えています。また、本稿中にも書きましたが、誘導体化することの目的は、大きな修飾基を付加することで、検出対象の質量を大きくし、ノイズの少ない検出域で測定を行うことによってS/N比を改善させることです。一方、大きな修飾基を付加させると、その修飾基を構成する元素の同位体天然存在比の影響をうけ、元の化合物の同位体イオンピークと付加した修飾基の同位体イオンピークの効果が合わさって、一般に誘導体化化合物の質量分布が幅広くなってしまいます。そうなると、質量数+3の内部標準物質よりさらに大きな質量数の内部標準物質を使用しなくてはならないという問題が生じます。その点、フッ素は19Fの天然存在比が100%であるので、無水ヘプタフルオロ酪酸での修飾後の化合物の同位体イオンピークにはほとんど影響しません。さらに、誘導体化後の化合物が分解などせずに比較的安定であったということも使用の理由の一つです。
- Q. GC-MS誘導体化剤として使用されているものをお使いになられているということでしたが、誘導体化後の乾固試料を適当な溶媒に溶かせば、GC-MSにも転用可能と考えてよろしいでしょうか。
- 森谷:実際にGC-MSで測定を行ったことはありませんが、この誘導体化法は、現在MSに関してご指導をいただいている鮫島先生がGC-MSでポリアミンを測定された際に用いられた方法だということですので、転用は可能です。
- Q. 本試料を他のLC-MS システムで測定したことがありますか。
- 森谷:本稿では Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system を利用していますが、以前に QSTAR Elite Hybrid LC/MS/MS System (AB SCIEX) を利用していた際にも変わりなく測定が できました。しかし、同じ前処理法で調製した試料を、イオントラップ型のOrbitrap LC-MS Q Exactive (Thermo) で測定した際には、ポリアミン検出の感度が悪かったという経験をしたこ

とがあります。各機器のイオン化法の原理は基本的に同じでしたが、検出方法が異なるとずいぶ ん測定結果が変わるものだと感じたことがあります。各メーカーの装置の特徴の違いもあるの で、本稿で紹介した方法がそのまま使用機器に適用できない場合があると思います。

- Q. 未反応の無水フルオロアシル化剤や、反応副生成物の酸はどうされていますか? LC-MS分析に何か影響ありますか?
- 森谷:誘導体化後の試料は乾燥した窒素ガスを吹きかけ、試料を完全に乾燥させますが、この際に未反応の無水へプタフルオロ酪酸や溶媒であるアセトニトリル、また、誘導体化反応の副反応物で生じるヘプタフルオロ酪酸などは、蒸発除去されます。ただ、揮発しない反応副産物があれば測定試料中に混在した状態です。しかし、本稿で紹介した方法での分析の際に、大きな問題が起こったことは特にありません。
- Q. 誘導体化から分析までの時間を考慮すると、一度に何検体まで同時に誘導体化処理可能ですか?
- 森谷:我々の使用している装置では、一度に乾固できる試料数がおよそ48本なので、普段からそのくらいの検体数で誘導体化を行っています。誘導体化後の試料は、4°Cで1日の保存後でも、前日と変わらない測定結果が得られることを確認しています。LC-MS装置には、たいてい冷却機能付きのオートサンプラーが設置されていると思いますので、測定への影響を考えて誘導体化処理数を気にする必要はないのではないかと思います。
- Q. 安定同位体標識ポリアミンのうち、市販されていて購入可能なものがあれば教えてください。
- 森谷:購入する際に気をつけることは、測定対象のポリアミン質量から3以上大きなものであること、しかし、あまり質量数が大きすぎないことが大切です。主なポリアミンについては以下のメーカーで取り扱っているようです。プトレシン:大陽日酸(catNo.59,344-3)やSigma-Aldrich(catNo.491136)、スペルミジン:Sigma-Aldrich(catNo.740780)、スペルミン:Sigma-Aldrich(catNo.705330)。標準物質として利用できる同位体標識ポリアミンは上記の他にも販売されていると思いますが、いずれも高価なものです。もし、本稿でご紹介させて頂いた方法でポリアミンを測定してみたいという方がいらっしゃいましたら、mgオーダーでお譲りすることもできますので、ご連絡ください。
- Q. 有害性や危険性のある試薬については、操作段階、廃棄段階でどのような注意や工夫をすればよい か教えてください。
- 森谷:無水へプタフルオロ酪酸はかなり強いにおいがするので、添加操作や反応時はドラフト内で行ってください。反応時にはしっかり蓋をしめたつもりでも、臭いが漏れてくることがあります。また、無水へプタフルオロ酪酸の保存については、湿気に弱く、加水分解しやすいので、注意してください。操作内では、劇・毒・危険物に指定されている、アセトニトリル、ギ酸、トリクロロ酢酸、ピリジン、メタノールなどを使用していますが、これらについては一般的な取り扱いの注意以上のことはしておりません。廃液については、揮発性で回収が困難なものもありますが、できる限り回収し、廃棄業者に処理をお願いしています。この点については、各施設でそれぞれ規定があるはずですので、それに従ってください。

~ 質量分析をもっと勉強したい人のために ~

書籍

- ・志田保夫ら(2001)「これならわかるマススペクトロメトリー」化学同人
- ・杉浦悠毅ら(2013)「見つける、量る、可視化する! 質量分析実験ガイド〜ライフサイエンス・医学研究で役立つ機器選択、サンプル調製、分析プロトコールのポイント 」(実験医学別冊 最強のステップUPシリーズ)羊土社

web

- ・島津 G C M S 分析の基礎 http://www.an.shimadzu.co.jp/gcms/support/fag/fundamentals/
- ・島津 日常分析の留意点 http://www.an.shimadzu.co.jp/support/support.htm
- · 島津 e-Learning http://www.shimadzu.co.jp/sgs/e-learning/index.html
- ・アジレント 分析基礎講座 http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1000138
- ・アジレント e-セミナー http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=12580
- ・日本分析機器工業会 (JAIMA) 分析の原理 http://www.jaima.or.jp/jp/basic/introduction.html
- ・Waters MS-質量分析装置の原理 http://www.jaima.or.jp/jp/basic/introduction.html
- ・ジーエルサイエンス 技術情報 http://www.gls.co.jp/technique/index.html

日本農芸化学会2015年度大会におけるシンポジウム開催のご報告

世話役:鈴木秀之(京都工芸繊維大学応用生物学系) 栗原新(石川県立大学生物資源環境学部)

シンポジウムのテーマ:ポリアミン研究のさらなる発展と新たな展開をめざした農芸化学と医学薬学との融合

講演タイトルと演者:

「肝臓機能におけるポリアミン代謝の役割」 植村武史(アミンファーマ研究所、京都府立医科大学大学院医学研究科)

「ポリアミンによる大腸菌の生理機能の調節」 照井祐介(千葉科学大学薬学部)

「腸内細菌のポリアミン代謝・輸送系同定の重要性」 栗原新(石川県立大学生物資源環境学部)

「ポリアミンによる哺乳類の寿命延長効果」 早田邦康(自治医科大学さいたま医療センター)

「ポリアミンを含むダイズ胚芽抽出物の開発とスキンケアへの展開」 春日部芳久(東洋紡バイオケミカル事業部)

「腸内常在菌が産生するポリアミンの健康寿命伸長効果」 松本光晴(協同乳業研究所)

概要:

ポリアミン濃度がガン細胞で高いことやプトレッシンの生合成酵素であるオルニチン脱炭酸酵素の活性がガン細胞で亢進することから、ポリアミン研究はガンという疾患との関連を中心に行われてきました。そのため、ポリアミン研究者は、医学・薬学の分野には多いものの、農芸化学の分野でポリアミンの研究をしている研究者は少ないという現状があります。

農芸化学とは、動物・植物・微生物の生命現象、生物が作る物質、食品と健康などを主に化学的な考え方にもとづいて基礎から応用まで広く研究する学問分野です(農芸化学パンフレットよりhttp://www.jsbba.or.jp/wp-content/uploads/file/nougei/jsbba pamphlet.pdf)。近年のポリアミン研究の進展は、従来の疾患を主な対象としたポリアミン研究の枠を越えて、農芸化学分野の研究者の興味を集

めつつあり、食品での利用やバイオオリエンティッドな化学素材としてポリアミンに注目している企業も増えてきました。ポリアミンはRNAの安定化、翻訳制御、タンパク質のポリアミン修飾を通して生物の生理機能を調節しており、その適切な濃度の維持が健康維持に重要なことが分かってきており、基礎研究の対象としても応用研究の対象としても興味深いものです。医学・薬学分野と農芸化学分野で乖離しているポリアミン研究を融合できる方向性を探したいとこのシンポジウムを企画しました。

今年度の日本農芸化学会大会は岡山大学を主会場として、3月26日から29日の4日間に渡って開催されました。私達が企画した上記シンポジウムは最終日の午後からであったため参加者が少ないのではと心配していましたが、シンポジストの先生方にはたいへん興味深いご講演を頂き、最後の演題が終了するまでほぼ満席で、時には立ち見が出るほどの大盛況でした。

以下に、日本農芸化学会の許可を得て講演要旨を転載します。

肝臓機能におけるポリアミン代謝の役割

The role of polyamine metabolism in liver function

植村武史^{1,2}、高坂友和²、池谷博²、五十嵐一衛^{1,3}
¹株式会社アミンファーマ研究所、²京都府立医科大学大学院医学研究科、
³千葉大学大学院薬学研究院

【緒言】

ポリアミン(プトレスシン、スペルミジン、スペルミン)は細胞の増殖、機能に重要な役割を果たす。スペルミン酸化酵素(SMO)は、スペルミンを酸化的に分解し、スペルミジンと過酸化水素及び3-アミノプロパナール(3-AP)を生成する酵素である。3-APは非酵素的に反応性の高い不飽和アルデヒドであるアクロレインへと変換される。我々は、肝細胞において、アセトアルデヒドがSMOを転写レベルで誘導することを見出した。そこで、今回我々は、SMOの肝細胞における生理機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

【結果】

ヒト肝癌由来HepG2細胞では、高濃度のアセトアルデヒドによりSMOが誘導され、ポリアミン代謝に伴うアクロレインの生成が見られた。SMOの細胞内分布を調べた結果、SMOは細胞間に形成される毛細胆管に局在していた。毛細胆管の形成には、SMOが必要であった。毛細胆管の形成時には、SMOとアクチン及びリン酸化Aktの集積がみられた。SMOにより、アクチン及びAkt阻害因子PTENがアクロレイン化されていた。

【考察】

今回我々は、SMOが毛細胆管の形成に重要な役割を果たすことを見出した。毛細胆管の形成には、Aktのリン酸化とアクチンの集積が重要であった。また、SMOによりPTEN及びアクチンがアクロレイン化されることが明らかになった。我々は、他の細胞でビメンチンがアクロレイン化されることを見出している。これらの蛋白質アクロレイン化の毛細胆管の形成における役割を現在検討中である。

毛細胆管は肝細胞間に形成され、分泌された胆汁を総胆管へと導く。毛細胆管の形成障害は、原発性胆汁性肝硬変などの重篤な症状を引き起こす。我々の研究により、飲酒時の肝組織傷害を修復する際、SMOが重要な役割を果たしていることが示唆された。SMO、アクロレインは細胞毒性に注目されてきたが、肝細胞において、生理的に重要な役割を果たしていることが示された。

ポリアミンによる大腸菌の生理機能の調節

Modulation of physiological functions by polyamines in Escherichia coli

○照井祐介 1、五十嵐一衛 2,3、柏木敬子 1

1千葉科学大学薬学部、2千葉大学大学院薬学研究院、3株式会社アミンファーマ研究所

ポリアミンは細胞内に比較的高濃度 (mM オーダー) で存在し、細胞増殖や生存率維持、バイオフィルム形成に必須であることが明らかとなりつつある。しかし、ポリアミンの生理機能は未だ不明な点が多く、分子レベルでの解明が遅れている。ポリアミンは、生命に必須な低分子生理活性アミンであり、ウイルスからヒトに至るほぼ全ての生物に普遍的に存在する。

ポリアミンは主に RNA に結合して構造変化を引き起こし、蛋白質合成を促進することにより細胞増殖因子として働く。私達は、ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進をうけ、細胞増殖に必要な蛋白質をコードする遺伝子群をポリアミンモジュロンと命名し、これまでに大腸菌において 11 種を同定した。そのうち 9 種は転写因子であることから、ポリアミンが多くの遺伝子発現を調節し、細胞増殖を促進していることが示された。さらに最近、大腸菌の生存率維持に必要な蛋白質をコードする 6 種のポリアミンモジュロンを同定した。

大腸菌のポリアミンモジュロンのコードする mRNA は、翻訳効率の悪い特徴を有し、その特徴は大きく3つに分類される。

- 1. 翻訳開始に重要な Shine-Dalgarno (SD) 配列と開始コドンが離れている場合
- 2. 開始コドンが AUG ではなく、GUG や UUG である場合
- 3. mRNA の翻訳領域に終止コドンが存在する場合

このような翻訳効率の悪いmRNAのポリアミンによる蛋白質合成促進メカニズムを解析した結果、ストレスに関与するポリアミンモジュロンをコードする mRNA 中の特定構造(二本鎖を形成しない bulged-out 構造や stem and loop 構造)にポリアミンが結合し、特異的な構造変化を引き起こすことにより、翻訳レベルでの発現を上昇させることが明らかとなった。

本発表では、酸化ストレス下におけるポリアミンモジュロンの生理的意義及びポリアミンと RNA との相互作用に基づく遺伝子発現制御機構を中心に概説する。

腸内細菌のポリアミン代謝・輸送系同定の重要性

Significance of identification of polyamine metabolic and transport system in intestinal bacteria

○栗原新¹、松本光晴²、鈴木秀之³

¹石川県立大学腸内細菌寄付講座、²協同乳業研究所、³京都工芸繊維大学応用生物学系

ポリアミン (PA) はほぼ全ての生物がその細胞内に持ち、細胞増殖促進作用を始めとした様々な重要な役割を果たす生理活性アミンである。PA の主要なものには、プトレッシン (Put)、スペルミジン (Spd)、スペルミン (Spm) がある。2009 年以降、PA 摂取がいくつかの動物の健康寿命伸長に著効を示すことが世界中の研究者から報告されている (表 1)。動物は PA を自ら合成するが、細胞内の PA 濃度は加齢とともに減少する。このため、動物は摂取した食物中に含まれる PA を小腸を通じて積極的に吸収する。一方で、消化管において小腸の下流にある大腸の内腔にも数百! M という多量の PA が存在し、これは腸内細菌叢由来であることが報告されている。したがって、腸管内で腸内細菌叢に PA を効率よく生産させることが出来れば、加齢による体内 PA 減少を補うことで、ヒトの健康寿命を伸長させる効果があると考えられる。

報告年	効果	対象	メカニズム	PA 源	文献
2009	寿命伸長	マウス	炎症抑制	経口摂取	Exp. Gerontol.44:727-32.
2009	寿命伸長	マウス、ハエなど	オートファジー誘導	経口摂取	Nat. Cell Biol. 11:1305-14.
2011	寿命伸長	マウス	炎症抑制	腸内細菌	PLoSOne e23652.
2013	記憶力増強	ハエ	オートファジー誘導	経口摂取	<i>Nat. Neurosci.</i> 16:1453-60.
2014	寿命伸長および認知力向上	マウス	炎症抑制	腸内細菌	Sci. Rep.4:4548.

表1 PAによる健康増進ならびに健康寿命伸長

ヒトが大腸から吸収できる PA は、大腸腸管内腔において腸内細菌の細胞外に存在するものである。したがってその濃度は、腸内細菌による PA 合成・放出と、PA 分解・吸収の平衡の結果であると考えられる。腸管内腔の PA 濃度を最適化するには、腸内細菌の PA 代謝(合成・分解)系ならびに PA 輸送(吸収・放出)系を同定し、その発現調節機構を解析することが有効である。

我々はこれまでに、腸内細菌の一種である大腸菌の新規 PA 分解系遺伝子 6 種および吸収系 2 種、これらの発現を制御する遺伝子 1 種を新規に同定し、新規 PA 放出系遺伝子についても 解析を進めている。細菌の遺伝子機能の推定には、ほとんどの場合、大腸菌での研究結果を もとにした相同性解析が用いられるため、大腸菌の遺伝子機能を新規に同定することは重要

である。しかし、大腸菌は腸内細菌の中では 0.01%にも満たない非常にマイナーな種であるため、腸内細菌優占種の PA 代謝・輸送系遺伝子を同定することも同様に重要である。この腸内細菌優占種の大半を占めるのは Bacteroidetes 門と Firmicutes 門の細菌であるが、Bacteroidetes 門細菌は大腸菌型の PA 合成系ホモログを持たず、独自の PA 合成系を持つことが予想されている。また、PA 輸送系については Bacteroidetes 門、Firmicutes 門双方でこれまでに同定されていない。さらに、プロバイオティクスとして重要なビフィズス菌では、PA 代謝系ホモログは全く見出されない。我々は、腸内細菌優占種上位 56 種 (Nature 4:59-65 (2010))のうち入手可能な 42 種およびビフィズス菌 9 種について、培養上清への PA 蓄積量および培養上清からの PA 吸収量を測定した。この結果を手掛かりとして腸内細菌の新規 PA 代謝・輸送系を同定していく予定である。

腸内細菌叢はヒトー人あたり 200 種類程度の複雑な混合培養系であるため、細菌間の共生関係は腸内細菌叢の PA 生産を理解する上で重要な要素である。我々は遺伝子操作が容易な腸内細菌 2 種(大腸菌および *Enterococcus faecalis*)の混合培養により培養上清への Put 放出量が飛躍的に増加することを見出し、この Put 高生産現象に必要な遺伝子群を同定した。

以上の結果は、混合培養系を用いた有用物質生産機構および腸内細菌の有効代謝産物に着 目した研究に対して、新たな知見を与えると考えられる。

ポリアミンによる哺乳類の寿命延長効果

Polyamine-induced life span extension of mammals

○早田邦康

自治医科大学さいたま医療センター

日本食や地中海食とよばれる食習慣や、全粒粉、豆類、野菜、魚介類などの食品は生活習 慣病予防や老化抑制に寄与していると考えられている。しかし、これらの食品に含まれるど のような成分が健康長寿に寄与するかは不明であった。ポリアミン(スペルミン、スペルミ ジン)はすべての生物の細胞に存在し、アルギニンから合成される物質である。よって、生 物やその関連する物質から成り立つ食物にはポリアミンが含まれる。しかし、食品に含まれ るポリアミンの量は食品の種類で大きく異なっており、健康長寿と関連のある食品は一般的 にポリアミン濃度が高い。我々は、ポリアミンが炎症性サイトカインの産生を抑制し、免疫 細胞の活性化において必須のタンパクである細胞膜分化抗原の一種の lymphocyte function associated antigen 1 (LFA-1)を減少させることを報告した。そして、マウス(Jc1:ICR)を高ポリア ミン餌で飼育すると、老化が抑制され寿命が延長し、これらのマウスでは加齢とともに進行 する遺伝子の異常メチル化が抑制されていることを見出した。ポリアミンと遺伝子のメチル 化に密接な関係がある。すなわち、メチル基のドナーである S-adenosylmethionine (SAM)は SAM decarboxylase (SAMDC)によって Decarboxylated SAM(dcSAM)へ変換され、decSAM はス ペルミジン/スペルミン合成酵素の作用でポリアミンが合成される際にプロピルアミンを供 給する。dcSAM はメチル化酵素である DNA methyltransferase (Dnmt)の活性を抑制するが、ポ リアミン合成酵素の活性が低下すると、dcSAM は増加し、Dnmt 活性は低下する。反対にポ リアミンを細胞外から供給すると、ネガティブフィードバックにより SAMDC の活性が抑制 され、dcSAM が減少し、Dnmt の活性は亢進する。Jurkat 細胞を用いて検討したところ、ポリ アミン合成を阻害した細胞では、Dnmtの活性が低下し、遺伝子の異常メチル化が生じ、LFA-1 のプロモーター領域の脱メチル化が進行し、LFA-1 が増加した。この細胞にポリアミンを加 えると、Dnmtの活性は増強し、遺伝子の異常メチル化は改善され、LFA-1のプロモーター領 域はメチル化され、LFA-1 が減少した。異常メチル化は加齢とともに進行し、癌を含めた生 活習慣病や老化の原因と考えられている。そこで、1,2-demethylhydrazine administrationDMH (DMH) を BALB/c マウス (オス) に投与して、大腸癌の発生を検討したところ、高ポリア ミン餌を食べたマウスでは癌の発生が著明に抑制された。加齢はポリアミン合成低下、Dnmt 活性低下、LFA-1 の増加を含めた pro-inflammatory status の増強、遺伝子の異常メチル化を伴 う。ポリアミンの増加は、これらの変化を改善するように作用することから、健康長寿に寄 与している食成分はポリアミンであると考えられる。

ポリアミンを含むダイズ胚芽抽出物の開発とスキンケアへの展開

Development of polyamine-containing soybean germ extract and its application to skincare cosmetics

○春日部芳久 東洋紡株式会社

プトレシン、スペルミジン、スペルミンなどのポリアミンは、ヒトを含むあらゆる生物に 遍在し、生物の生長や発育に重要な役割を果たしている機能性物質である。近年ではポリアミンとヒトの健康との関係に関心が集っており、機能性食品成分としても注目されている。 ポリアミンには各種の環境ストレスに対する植物の耐性を高める機能があることが知られている。 我々は、クロダネカボチャ (Cucurbitaficifolia) 由来のスペルミジン合成酵素遺伝子 (FSPDI) を過剰発現してスペルミジン含量が野生種の約2倍に高まったシロイヌナズナにおいて、冷温、凍結、高塩、高浸透圧、乾燥、酸化などの種々のストレスに対する耐性が顕著に増大することを認め、スペルミジンはストレスシグナル分子として機能していることを示唆した (Plant Cell Physiol., 45(6), 712-722, 2004)。特に、冷温、高塩により引き起こされる酸化ストレス条件下では、スペルミジンは抗酸化酵素 (SOD) の遺伝子発現を誘導するとともに、各種抗酸化酵素の活性を高めることを明らかにしている (論文投稿中)。

ヒトの組織では、ポリアミンは特に皮膚(表皮組織)に多く含まれている。皮膚は光(紫外線)を受けることで酸化ストレス傷害を被る危険性に常に曝されている。我々は、ポリアミンによる抗酸化酵素の活性化はスキンケアにおいても重要であると考え、さらに、生体内のポリアミン濃度は老化につれて減少していくことから、スキンケアにおけるポリアミン皮膚塗布の有用性が期待できると考えた。

ヒト皮膚の線維芽細胞に、プトレシン、スペルミジン、およびスペルミンを添加して細胞 賦活化作用を評価したところ、いずれのポリアミンにも線維芽細胞の賦活化作用が認められ た。次に、各種の植物材料のポリアミン含量を調べた結果、特にダイズ胚芽とコムギ胚芽に ポリアミンが高濃度に含まれていた。そこで、ダイズ胚芽抽出物を調製し、皮膚の線維芽細 胞を用いて細胞賦活化作用とコラーゲン産生促進作用を評価したところ、高い細胞賦活化作 用とコラーゲン産生促進作用が認められた。また、ダイズ胚芽抽出物水溶液を目尻のシワに6 週間塗布したところ、対照品に比べてシワグレードが低下する傾向が認められた。これらの ことから、ポリアミンを含むダイズ胚芽抽出物は、エージングケアのスキンケア素材として 有用であることが示唆された。

腸内常在菌が産生するポリアミンの健康寿命伸長効果

Polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence

○松本光晴

協同乳業研究所

腸内常在菌の産生する低分子代謝産物を利用した健康増進へのアプローチを行っている研究は少ない。腸内常在菌の代謝産物の多くは、腸管上皮細胞から吸収され、さらに血中に移行すれば全身の細胞へ影響する可能性が考えられるため、極めて重要な腸内環境ファクターの1つと考えられる。我々は同腹の無菌マウスと通常菌叢定着マウスの結腸便の水溶性画分を CE-TOFMS メタボロミクス解析し、約 120 成分が腸内常在菌の影響を受けていることを明らかにしてきた[1]。

その中でも、演者らは、非常に多岐に渡る機能を有し、全生物種(原核生物~哺乳類および高等植物)の細胞内に普遍的に存在する生理活性物質ポリアミンに注目している。ポリアミン(putrescine、spermidine、spermine)は RNA と結合して存在し、様々なストレスから保護し、細胞増殖や分化に重要な役割を果たしている。また、加齢と共に産生能が減弱化し、老年病の原因とされる炎症の抑制を誘導し、腸管バリア機能の成熟・維持作用やオートファジー促進作用も報告されている。そこで、大腸内ポリアミン濃度を適正化すれば、上述した生理効果が得られ、疾病予防の軽減に繋がり寿命伸長効果を得られると仮説を立案し検証してきた。これまでに、ヒト投与試験にて Bifidobacterium animalis subsp. lactisLKM512 菌株投与で腸管内ポリアミン濃度の上昇を認め、抗炎症効果や抗変異原効果等を報告してきた[2,3]。また、10 ヶ月齢マウスに約1年間 LKM512 を投与し、腸内ポリアミン濃度の上昇と共に寿命伸長効果が得られた[4]。更に個体差の大きい腸内常在菌に安定的にポリアミン産生を誘導させる物質としてアルギニンを見出し、14 ヶ月齢よりマウスにアルギニンと LKM512 の混合投与を行い、寿命伸長効果と共に 20 ヶ月齢時点での空間認識記憶力の成績が対照群と比較し高いことを見出した[5]。本シンポジウムでは、我々以外のグループが報告しているポリアミンの健康寿命に関わる報告も併せて紹介する。

- 1. Matsumoto M, et al. Sci Rep 2: 233, 2012.
- 2. Matsumoto M, et al. FEMS Immunol Med Microbiol 31: 181-186, 2001.
- 3. Matsumoto M and Benno Y. Mutat Res 568: 147-153, 2004.
- 4. Matsumoto M, et al. PLoS ONE 6: e23652, 2011.
- 5. Kibe R. et al. Sci Rep 4: 4548, 2014.



International Conference on Antimicrobial Resistance, Novel Drug Discovery and Development: Challenges and Opportunitiesに参加して

松本靖彦

東京大学大学院薬学系研究科微生物薬品化学教室

2015年3月2~3日、インドの首都ニューデリーで、International Conference on Antimicrobial Resistance, Novel Drug Discovery and Development: Challenges and Opportunitiesと題する国際学会(以下、本学会)が行われました。私は、五十嵐一衛先生(株式会社アミンファーマ、千葉大学名誉教授)とともに招待講演者として出席させていただきました。本稿では、インドでの国際学会における五十嵐先生のポリアミンに関する発表や私が感じたいくつかのことについて報告させていただきたいと思います。

[学会の様子]

本学会はインドの研究者ばかりでなく、アメリカ、オーストラリア、イギリスなどから多くの海外招待講演者が招待されておりました。そして、初日は厳格な雰囲気の中、数多くの式典行事とインド政府の方々やインドの大学関係者のスピーチが行われました。これは、本学会がインド政府や多くの企業がサポートして最近開校したSRM UniversityのHaryana校が取りまとめて開催された国際学会であることが影響していると思われました。ひとしきり行事が終わったところで学術的なセッションがスタートし、ほどなくして五十嵐先生が発表することになりました。

五十嵐先生は、病原性細菌のカテーテルなどの医療器具への接着に関わるバイオフィルムの形成へのポリアミンの役割についてと細菌のバイオフィルム形成を抑制する素材の開発に関する発表をされていました。細菌のバイオフィルムの形成は、病院内での日和見感染の拡大に寄与することが知られており、感染制御の観点から大変重要な研究課題であります。よって、細菌のバイオフィルムの形成におけるポリアミンの役割を理解することは医療上の問題解決の糸口になるかもしれません。五十嵐先生の発表により、ポリアミン研究の重要性が感染症分野の研究者にも伝わったと思います。さらに、五十嵐先生は、細菌の増殖を抑制するサメ肌の表面構造に着目した新たな抗菌素材の提案と汎用化についての環境衛生学的な意義について発表され、多くの聴衆から注目を集めておられました。特に公衆衛生的な問題を多く抱えるインドでの発表だったことから、インドの研究者や企業の開発者に大きなインパクトを与えたようで、五十嵐先生が発表後に質問攻めにあっておられる姿を何度か見かけました。

私は二日目にカイコを感染宿主として用いて黄色ブドウ球菌という病原性細菌の感染システムを解明することを目的とした研究について発表しました。初日の招待講演者の発表と質疑応答を聞いて、いくつか思うことがあり、発表前夜にスライドを大幅に組み替えて理解が容易な内容に変更して発表しました。発表後、何人かの研究者から議論を持ちかけられました。発表内容が理解してもらえたようで、ほっとしました。



[学会での出会い]

本学会で、私は、梶昭先生(ペンシルバニア大学)や梶日出子先生(トーマスジェファーソン大学)とお会いしました。学会期間中は、五十嵐先生、梶昭先生、梶日出子先生、招待して下さったSamuel Raj先生(SRM大学)と色々とお話しさせていただく機会がありました。梶昭先生、梶日出子先生とは、何度かお食事をご一緒させていただき、色々なお話を聞かせていただきました。お二人の哲学に触れて大変驚き、大きな刺激を受けました。五十嵐先生とは、学会終了後もインドのいくつかの遺跡を観光して、200年以上前に作られた建造物を見ました。また、博物館で紀元前の飾り物等、歴史的に貴重な物品の数々を見ることができました。Samuel Raj先生は、ご家族の方々を紹介して下さり、お宅に招待してお食事をごちそうして下さりました。Samuel Raj先生のお話から、インドの文化について色々と学べました。本学会では、他にも色々な方々と知り合い、お話させていただく機会がありました。共同研究についての話もありました。学会参加により、素晴らしい出会いがあったことが何より大きな出来事でした。

[インドでの驚き体験]

また、私は、インド人の時間の捉え方について多く学びました。これは、日本とインドの文化の違いが影響しているのではないかと思いました。

学会のセッションが始まる5分前には海外招待講演者たちは前列に座り待機しておりましたが、多くのインドの方々は開始予定時刻より遅れてきました。学会のセッション開始時間が遅れることもしばしばで、また予定表とは違う順番でセッションが行われており、正直大丈夫かと少し不安になってしまいました。案の定、私は自分の発表予定時間の一時間以上前に急に名前が呼ばれ、いきなり発表することになりました。私は予告なしで予定より早く発表することになった経験がなく少し驚いてしまいましたが、私と同じセッションのインドの研究者は動じることはありませんでした。おそらく、インドの研究者は発表時間の急な変更には慣れており、少しの時間の遅れや変更については私より寛容なのだと思いました。今後、私は、国際学会に招待講演者として出席したときは、発表時間がいつになっても大丈夫なように気持ちを作っていくことにしようと決めました。ただ、時間に追われて生きていないインドの人々の悠然とした立ち居振る舞いは、時間に追われてストレスを過剰に感じてしまう日本人も少しは参考にしてもいいのかもしれないとインドに滞在しているときは思いました。

インドでの学会参加で色々と特殊な経験ができました。人生経験のためにも色々な国で行われる様々な国際学会に参加して行きたいと思いました。特に若い研究者の方々には率先して国際学会で発表し、新しい文化にふれる機会を作って欲しいと思います。



2015 GRS&GRCに参加して

田島彩沙

東京慈恵会医大大学院 医学研究科博士課程4年

私が初めてGordon Research Seminar / Conferences に参加したのは2011年、大学6年生の時でした。当時、国内外を含めて学会への参加も発表の経験もなかった私は、右も左もわからないまま会場に到着し、おなかが痛くなるほど緊張していたのを今でも覚えています。ですが、学会が始まると世界中の様々な国の方が「ポリアミン」という共通のテーマのもと活発に意見交換し、お互いの研究を称えアドバイスし合う姿がとても新鮮で緊張を忘れるほどわくわくしていました。そして、ポスター発表では私の拙い英語を一生懸命聞いて理解しようとしてくれる人がいることが、何よりも嬉しかったです。このとき、国や文化の違いに関係無く対等に様々な人と意見の交換ができる「研究」というものに大変魅力を感じました。そして、初対面な上に他大学の学生である私を暖かく迎えて下さり、今でも学会等で会うたびに気にかけて下さる日本人の先生方との出会いも大きな物でした。実は、その時のGRS&GRCへの参加がきっかけで大学院へと進学することを決心し、現在の私の研究生活があります。

そして2015年、私にとっての2度目のGordon Research Seminar / Conferencesへ参加してきました。4年前とは違い、今回は緊張よりも楽しみな気持ちの方が勝っての参加でした。4年前のGRS&GRC、2年前のトルコでのポリアミン国際学会で出会った海外の大学院生や先生たちと再会できたことも良かったです。また、4年前よりも落ち着いてポスターセッションで説明することができ、そこで自分の研究に興味を持ってもらえたことや質問、アドバイスをもらえたことはとても貴重な経験となりました。更に、今回はshort talk speakerとして選んで頂きました。初めての英語での口頭発表は本当に緊張しましたが、多くの先生方の励ましや支えがあり乗り越えることができました。この場を借りて御礼申し上げます。ありがとうございました。

毎回、私にとっての初めての経験と出会いを与えてくれるGRS&GRCに参加できたことを嬉しく思っています。これらかも、このような場に参加する機会を頂けるよう、日々研究に励んでいきたいと考えおります。

最後になりましたが、今回の渡航にあたり若手研究員補助をいただきましたこと感謝申し上げます。

今年度のポリアミン学会の活動の一環として、6月に開催された2015 Gordon Research Seminar: Polyamines (GRS) & Gordon Research Conference on Polyamines (GRC)に参加する若手研究者に対して参加補助費を交付いたしました。ここでは交付対象者の4名にGRS & GRCへの参加報告を行ってもらいます。なお、GRS & GRCでは発表内容は非公開が原則となっています。そのため、参加報告では発表内容について許可を得ずに掲載することを控えさせて頂いていますので、ご了承願います。



Gordon Research Conference — Polyamines 2015

Dan Ge

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Since last year, I have entered this new area of research on "Preparation of Poly-ion Complex Generated from Chondroitin Sulfate and Spermine and its Effect on Oral Intake". May 2015, my supervisors, Prof. Toida and Assistant Prof. Higashi, encouraged me to participate as a poster presenter in Gordon Research Conference on Polyamines held 06/14/2015 - 06/19/2015 at Waterville Valley in United States. Gordon Research Conference (GRC) is a conference gathering the great scientists of polyamine field from the entire world and affording opportunities for the young scientists to express their own insights.

I really would like to express my sincere appreciation to The Japanese Society of Polyamine Research for providing me the Financial Support to attend GRC. In this conference, not only did I have knowledge of the latest research achievements of polyamines, but I also won an opportunity to discuss with the great scientists coming from the whole world and to exchange our views. During the tea break between the conference sessions, we were able to communicate freely with the participants. This not only encouraged me to try to build up a friendship with the foreign scientists, but also stimulated me to practice my spoken English. And it was also a little advance for my relatively introverted character that I could take advantage of this opportunity to dare to express my own views in public.

Through this conference, I have learned more insights of polyamine field and more techniques related to my study, deepened the comprehension of some researches, and strongly felt that the skillful communication in spoken English was very necessary for the international research work. GRC broadened my horizons, enriched my experiences, extended my experimental considerations and crystallized my research directions. It will become the motivation for my future studies and my career plan. From now on, I determine to work harder and try my every effort to achieve better results.



Gordon Research Seminar及び Gordon Research Conferenceに参加して

吉田健人

千葉科学大学大学院薬学研究科薬学専攻 博士課程2年

今回私は、日本ポリアミン学会より若手会員補助として海外渡航費を援助して頂き、アメリカのニューハンプシャー州Waterville Valleyで行われましたGordon Research Seminars (GRS) 及びGordon Research Conferences (GRC) に参加しました。

私は今回、人生で初めて海外に行き、国際学会に参加しました。国内の学会には5回ほど参加していますが、国際学会ではどのような雰囲気で、どのようにディスカッションが行われるのかなど全く分からず、不安と緊張の中、会場に向かいました。ボストンのホテルからバスで2時間ほどのところにある会場は、木々の生い茂ったとても美しい自然溢れる場所でした。「さすがアメリカ」と言えるような広大な敷地にはリスなども駆け回っており、その圧倒的なスケールに私自身、少し戸惑いながらも受付や宿にチェックインを済ませ、その日の午後から早速行われる口頭、ポスター発表に参加しました。まず、GRCに先駆けて行われる若手研究者による発表の場であるGRSでは、海外の若手研究者による積極的なディスカッションが繰り広げられ、最新のポリアミン研究の成果を聞くことができました。どの研究内容も非常に興味深く、新しいアイディアや考えたこともなかった視点からのディスカッションなどには多くの発見があり、非常に刺激を受けました。

また、GRSの次の日から開かれましたGRCでは、世界中から集まったポリアミン研究の第一人者であるベテランの方々の発表を聞くことができました。GRSではあまり聞くことができなかった包括的なポリアミン研究の発表には、これまで参加したどの学会よりも驚きや発見があり、交わされる熱いディスカッションには強い刺激を受けました。また、お昼の後にあるフリータイムには、大勢の人と山にハイキングに行ったり、自転車を借り会場の周りを走ったりと、多くの人とコミュニケーションを取りながら親睦を深めることができ、非常に有意義な時間を過ごすことが出来ました。

今回私は、このGRS及びGRCに参加し、様々な人の発表を聞き、活発に意見交換できたことで、多くのことを知り、学ぶことが出来ました。私はこの体験をこれからの研究生活に生かしていきたいと考えています。

最後になりましたが、今回このような貴重な体験を支援してくださり、海外渡航費を援助して頂きま した日本ポリアミン学会にこの場を借りて深く感謝致します。ありがとうございました。



2015年ゴードン研究会議「ポリアミン」に参加して

奈良 未沙希

石川県立大学 生物資源環境研究科 応用生命科学専攻 修士1年

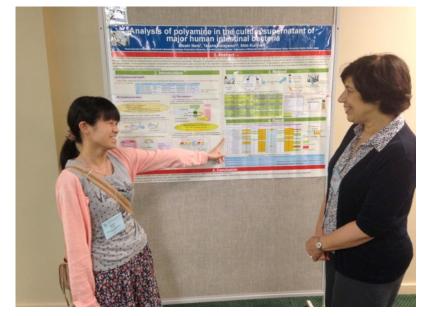
私は2015年6月12日から18日にアメリカ・ニューハンプシャー州で行われたゴードン研究会議 (Gordon Research Conference, GRC) と、これに先立って行われる若手を対象としたゴードン研究 セミナー (Gordon Research Seminar, GRS) に参加しました。大学に入学したときから国際学会に参 加して、自分の研究内容を発表することが夢だったため、それを叶えることができて嬉しかったです。 学会期間中の7日間は毎日が充実しており、様々な体験をすることができました。

ポスター発表

私はGRSとGRC期間中に合わせて2回、ポスター発表を行いました。英語でポスターを作って発表を することは初めての経験でした。これまでに日常生活で英語を使う機会がほとんどなかったため、英語 で文章を書く時はとても苦労し、研究室の先生や大学の英語の先生に指導していただいてようやくポス ターを完成させました。アメリカへ向かう飛行機の中でも、外国人の方が自分の発表内容を理解してく れるのかという不安が消えなかったため、何度も何度も声に出して練習をしました。

いよいよGRSでのポスター発表1日目です。開始後、すぐに外国人学生に英語で「全部説明して」と 言われました。心の準備が整ってないときに来られたので焦りましたが、何回も「Do you understand?」と確認しながら、ゆっくり説明していき、なんとか発表を終えました。自分の英語の発 音に自信がありませんでしたが、1回目の発表を経験して、1単語ずつゆっくりと話し、意味が通じてい

ない時にはジェスチャーや絵を描いて一生懸命相 手に伝えようと努力をすれば相手は理解してくれ ることがわかりました。GRSの発表時間中、休む 間もなくたくさんの参加者が来ましたが、段々と 自信がついてきて、堂々と発表をすることができ るようになりました。GRCでは、外国人学生よ りも外国人の先生方にポスター発表をする機会が 多くなりました(図1)。また、ポスターの近く にいる人に声をかけて発表することができるほど の余裕ができました。しかし、外国人の方からの 質問には上手に対応することができませんでし た。ポスター発表を聞きに来てくれた方全員が質 問をしてくれましたが、質問は聞き慣れない英語 図1次期ゴードン会議(2017年)のチェアをされる Susan の専門用語が多かったので内容を半分も理解する



Gilmour 先生(右)にポスター発表をしていることころで す。



ことができませんでした。何度も質問を聞き返すと、「もういいよ」といって諦められてしまう場面もあったのでとても悔しかったです。普段から英語を聞くことで耳を慣らし、英語の論文を読むことでもっと多くの専門用語を頭に入れておけばよかったと思いました。

口頭発表

GRSとGRCの期間中、口頭発表が毎日行われました。発表中は意味の分からない英単語を電子辞書で引きながら発表を聞きました。私は腸内細菌の研究を行っているためDejea Christine博士のご発表 "The Strange Case of N1, N12 Diacetylspermine: Evidence that Bacterial Biofilms Alter the Colon Cancer Metabolome"



図2 GRC最終日の懇親会では先生と学生の約40人でダンス を踊りました。ダンス後に撮った写真です。

は特に興味深かったです。このような自分の研究分野に近い発表であればなんとなく内容はわかりましたが、自分の知らない専門用語が多く出てくる発表は、スライドのページごとのタイトルしか理解することが出来ませんでした。また、一番驚いたことはたくさんの外国人学生が積極的に質問を行っていることでした。日本の学会では学生が質問をしている場面をあまり見たことがありませんでした。私も学会の口頭発表で質問したことがありません。疑問に思ったことがあっても、こんなこと聞いたら馬鹿にされると思い、なかなか人前で質問をすることができませんでした。外国人学生が質問している光景を見て、人目を気にしてそのようなことを考えている自分が恥ずかしくなりました。私もこれから学会の口頭発表では疑問に思ったことがあれば積極的に質問してみたいと思いました。

研究者の方々との交流

学会期間中は、13時半から16時の自由時間と、学会終了後21時半から0時の懇親会(有志の先生方の出資で費用は無料でした)が毎日設定されており、会期中は学会参加者と三食を共にします。私はでき



図3 GRC 3日目の昼休みに参加したハイキングにて。

るだけ多くの方(特に外国人の方)と仲良くなりたいと考え、毎晩懇親会には終了時間まで参加し(図2)、昼休みは学会参加者と遊び(図3、4)、食事の時には話したことのない外国人の方がいる席に座るようにしました(たまに疲れて日本人がたくさんいるテーブルに座ることもありましたが)。初めのころは、「Hello」とあいさため、会話がなかなか続きませんでした。しかし、自由時間に他の日本人の参加者の方と外国人の方が話す会話を聞いて、どのように話を広げていくか知ることができました。また、学会はとてもフランクな雰囲気だったため、私は積極的に外国人

の方に話しかけることができました。そのため、 日が経つにつれて外国人の方との会話が続くよう になりました。ついにはGRC終了後の会場から 空港まで2時間のバス移動で、隣の席に座られた Georgia State UniversityのLu Chung-Dar先生と途切れることなく話ができるようにな りました。

GRSとGRCに参加して様々な貴重な経験をすることができました。思い切って国際学会での研究発表に挑戦してよかったと思います。また、以上の経験を通して研究に対するモチベーションがさらに上がりました。これからも頑張って研究しようと思います。また、今回の海外渡航に対してご支援いただきました、日本ポリアミン学会の皆様に感謝いたします。



図4 GRC 4日目の昼休みにはアップダウンの激しい砂利道へ サイクリングに行きました。

日本ポリアミン学会第7回年会のご案内

会期:平成27年11月13日(金)13:00~14日(土)15:00(予定)

会場:京都工芸繊維大学 松ヶ崎キャンパス 東部構内 60周年記念館 1階 講義室

住所:606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町1

交通案内(http://www.kit.ac.jp/uni_index/access/)

最寄りの地下鉄松ヶ崎駅からの地図(http://www.kit.ac.jp/uni_index/matsugasaki/)

キャンパスマップ(http://www.kit.ac.jp/uni index/campus-map/)

特別講演:11月13日(金)17:00(予定)

Prof. Enzo Agostinelli (University of Rome)

^rCytotoxicity of polyamine metabolites induces apoptosis on tumor cells: New approaches in cancer therapy by nanocarriers through proteomic studies ^{_}

懇親会:11 月13 日(金)18:00 頃から 60周年記念館 2階 大セミナー室にて

年会担当:鈴木秀之(京都工芸繊維大学)

第7回年会専用e-mail: polyamine@kit.ac.jp

BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)におけるワークショップ開催のお知らせ

【1W8-p】生理活性物質ポリアミンから疾病と健康を考える

オーガナイザー: 村井法之(東京慈恵会医科大学) / 松本 光晴(協同乳業株式会社研究所)

日時:2015年12月1日(火) 14:00 - 16:30

会場:神戸ポートピアホテル 本館地下1階 北野 (第8会場)

BMB2015の際に、開催予定であったTGaseとの学術合同会議は、来年に延期いたしました。



空が青く澄み渡り、高く見える季節となって参りました。今年のポリアミン学会総会では、色づいた 京都で皆様にお目にかかることになるかと思います。

さて、お陰様で本号も、多くの先生方のご協力をたまわり、発刊の運びとなりました。この場をお借りしてお礼申しあげます。

前号よりシリーズ化した「ポリアミン実験手技ノート」。本号ではポリアミンの質量分析についてとりあげました。さまざまな場面でのコツにも触れていただき、大変役立つものと思います。引き続き皆さまの役にたつ実験手技シリーズを企画できればと考えています。「うちのラボではこんな方法で分析しているよ」「うちではこんな前処理しているよ」「うちではこんなカラム使っているよ」など、皆さまからも実験手技に関する情報をドシドシお寄せいただければと思います。また巻頭言で川喜田先生が述べられているように、読者(特に若手メンバー)から筆者への質問や提案も紙面上で展開したいと考えています。今後、取り上げてほしい内容や企画のリクエスト等も含め、お近くの広報委員、もしくは以下広報委員会宛までご意見をお待ちしております。

一般的な教科書を開いても、ポリアミンのことはほとんど掲載されていません。掲載されていても、 わずかに数行、なかには欄外に小さな字で書かれている、といった具合です。ポリアミンは全ての生 物、細胞に存在しているにも拘わらず、残念ながら一般的に認知度が低いです。ポリアミン学会誌は PDF化したデジタル媒体として公開しているので、HPからのダウンロードや、Google検索などを通し てもアクセスできます。もしかしたら学会メンバー以外の人がポリアミンを知る機会にも繋がるのか な、と思います。ポリアミンに興味を持った仲間が増えるように、面白い魅力ある「ポリアミン」を皆 さまと一緒に育てていければと思います。どうぞよろしくお願いいたします。

(広報委員会 委員 大城戸 真喜子)

筆者への質問、取り上げてほしい内容、企画提案、ご意見等をお寄せください。 広報委員会宛 polyamine@jikei.ac.jp

日本ポリアミン学会 学会誌「ポリアミン」 第2巻2号(2015年10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