

ポリアミン Polyamine

Vol.3 No.2
Nov. 2016

巻頭言

柏木 敬子

シリーズ ポリアミン研究

坂本 明彦、富取 秀行

シリーズ 実験手技ノート

高尾 浩一

最新の研究紹介

渡辺 健太

阪中 幹祥

最新の論文紹介

西村 和洋

松本 靖彦

学会報告

五十嵐 一衛

日本ポリアミン学会

The Japanese Society of Polyamine Research

ポリアミン Polyamine

Vol. 3 No. 2
Nov. 2016

巻頭言

ポリアミン研究の新展開・多彩化を目指して 柏木 敬子 37

シリーズ ポリアミン研究

ポリアミンの酸化分解により産生されるアクロレインの細胞毒性と疾患 坂本 明彦、富取 秀行 38

シリーズ 実験手技ノート

HPLCを用いたポリアミン分析 その② 高尾 浩一 47

質問コーナー 54

最新の研究紹介

加齢に伴うアクロレイン産生の増加とグルタチオンの減少による脳梗塞の悪化 渡辺 健太、植村 武史、五十嵐 一衛 57

カルボキシシルスペルミジン脱炭酸酵素は、腸内常在菌最優勢種の一つである *Bacteroides thetaiotaomicron* のスペルミジン生合成に必須であり、その正常な生育に重要である
阪中 幹祥、栗原 新 57

最新の論文紹介

リボソームに結合したハイプシン化された翻訳因子eIF5Aの構造 西村 和洋 58

ポリアミン代謝の亢進によるジカ熱の原因ウイルスの増殖（複製）抑制 松本 靖彦 58

学会報告

第4回ポリアミンの機能並びに臨床応用に関する国際会議に参加して 五十嵐 一衛 60

事務連絡 61

編集後記 63





ポリアミン研究の新展開・多彩化を目指して

柏木 敬子

千葉科学大学薬学部

ポリアミン学会誌は、2014年から年2回発行され、今回で通算第6号となりました。広報委員会の多大な御尽力に感謝申し上げます。

学部4年生で千葉大学薬学部・五十嵐先生のもとでポリアミン研究の一端を始めさせて頂き、あいだに4年間の会社員経験を挟んで、35年間ポリアミン研究に携わって参りました。1年に1回のポリアミン研究会・ポリアミン学会年会では、長年ポリアミン研究に携わってこられた方々ばかりでなく、フレッシュな会員の方にもお会いでき、情報交換を行い、研究の大切な拠りどころになっています。また、一般の方々にも時折、「何を研究しているの？」と尋ねられ、「ポリアミン」と答えられる幸せを感じています。勿論、ポリアミンって何？と必ず聞かれますが。

さて、ポリアミン学会誌発行の目的は、学会員相互を繋ぎ、若手研究者の育成に役立てると共に、広く社会へ情報発信することだと思われそうですが、もう一つの目的として、ポリアミン学会が、「日本学術会議協力学術研究団体」としての認定を目指していることが挙げられると思います。「日本学術会議協力学術研究団体」になると“正式な学会”として認められたことになり、国際会議開催のための科学研究費などの申請も可能となります。また、年会開催の際、一部の企業では“正式な学会”以外への出張が認められておらず、ポリアミンに興味があっても参加できないという事例があり、正式な学会にならないとポリアミン研究人口の増加の妨げにもなると思われします。この「日本学術会議協力学術研究団体」としての認定には、定期的な学会誌の発行と、一定人数以上の学会員が必要です。現在、定期的な学会誌発行はなされていますが、会員数が、少し不足していると伺っております。

ポリアミン学会の会員を増やすにはどうしたら良いか？簡単に解決できる課題ではありませんが、ポリアミンに少しでも関連する学際領域との共同研究を進め、新展開・多彩化を目指すことも良い方策と考えられます。この点に関して、第6回トランスグルタミナーゼ研究会・日本ポリアミン学会合同学術集会が、第89回日本生化学会大会前日の9月24日に仙台で開催されました。トランスグルタミナーゼは様々な疾患との関連が報告されており、ポリアミンはトランスグルタミナーゼの基質になることは判っていますが、その他は不明であり、ポリアミン研究の新領域になると思われします。その他、国外のポリアミン研究者に会員になっていただくことや、少しでもポリアミンに興味を持っている研究者や企業の方に年会への参加を勧め、更には会員になっていただく等、評議員の一人として、少しでも会員増加を目指して協力できればと思っております。

ポリアミン研究の拠点となるポリアミン学会の更なる発展を、心より願っております。



ポリアミンの酸化分解により産生される アクロレインの細胞毒性と疾患

坂本明彦、富取秀行

千葉科学大学薬学部病態生化学研究室

(〒288-0025 千葉県銚子市潮見町15-8)

連絡先 坂本明彦、e-mail: asakamoto@cis.ac.jp

1. はじめに

ポリアミンは細胞増殖因子として機能する一方で、ポリアミン酸化酵素により酸化分解を受けるとアクロレイン ($\text{CH}_2=\text{CHCHO}$) という非常に毒性の強い物質を産生する。本稿では、ポリアミンから産生されるアクロレインの毒性機序やアクロレインが関与する疾患について概説する。

2. 生体内外におけるアクロレイン産生

アクロレインは、最も単純な不飽和アルデヒドであり、非常に反応性が高く、強い刺激臭を発する化

学物質である。生体外においてアクロレインは、石油、石炭、プラスチックや木材の燃焼により生成され、揚げ物、アルコール飲料、焦げた肉などの食事性のものやタバコの煙にも含まれているが、生体内でも産生される。生体内では、スレオニンの分解、不飽和脂肪酸における脂質過酸化や抗癌性腫瘍薬であるシクロフォスファミドの代謝、そしてポリアミンの酸化分解によって産生されることが知られている^{1,2)}。ポリアミンから産生されるアクロレインは、2つのポリアミン酸化分解経路により産生される。スペルミンがスペルミンオキシダーゼ

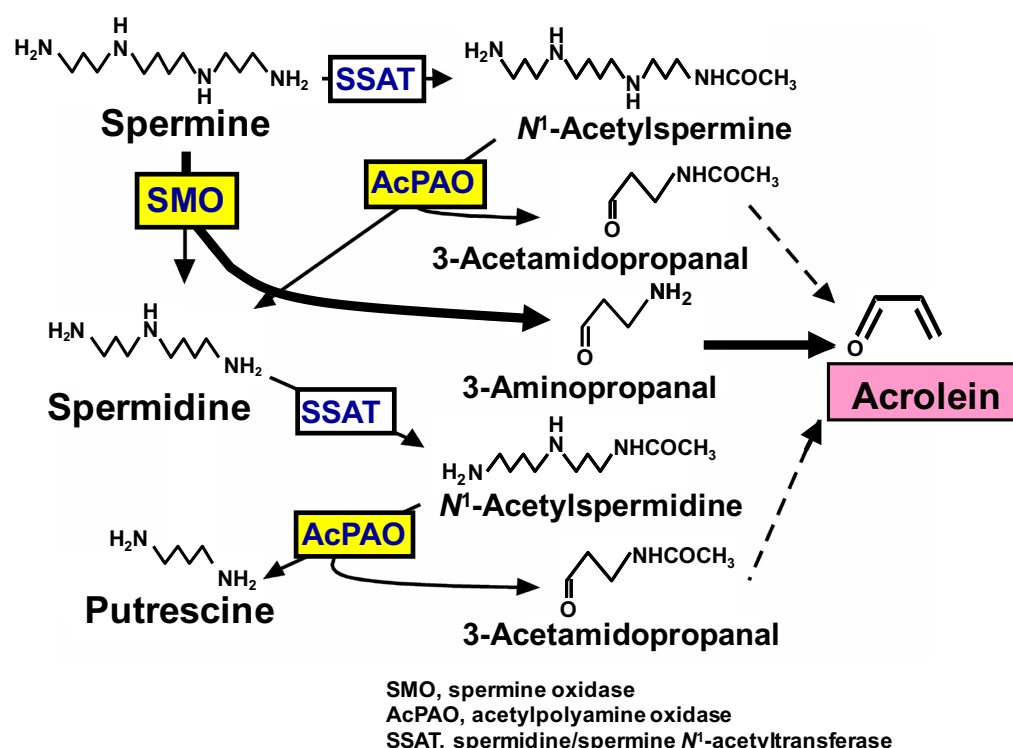


図1 ポリアミン酸化分解によるアクロレインの産生

ポリアミンの酸化分解によるアクロレインの産生経路を示した。アクロレイン産生はスペルミンからスペルミンオキシダーゼ (SMO) により産生される経路と、スペルミン及びスペルミジンからスペルミジン/スペルミンN¹-アセチルトランスフェラーゼ (SSAT) 及びN¹-アセチルポリアミンオキシダーゼ (AcPAO) によって産生される経路が存在する。

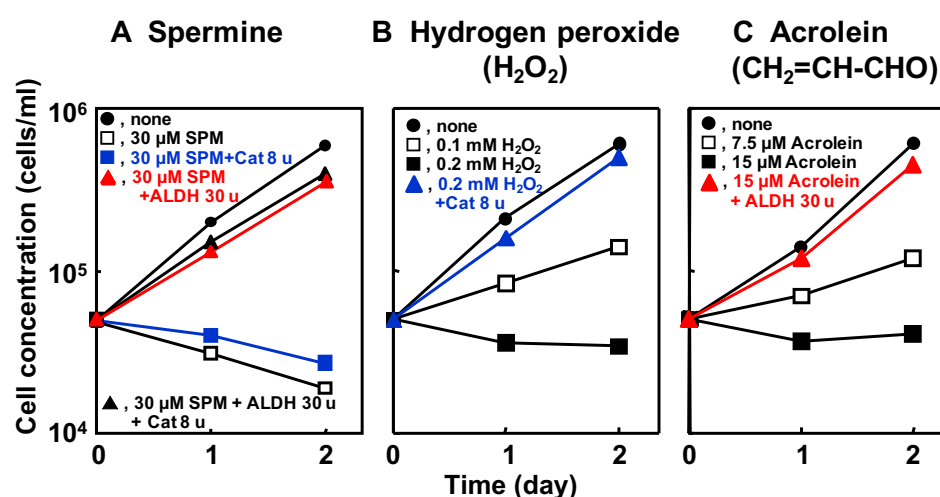


図2 スペルミン、過酸化水素及びアクロレインの細胞毒性の比較

マウス乳がん細胞FM3Aを用いて、スペルミン (SPM)、過酸化水素 (H₂O₂) 及びアクロレインの細胞毒性を比較した。培地中に30 μMのSPMを添加すると、細胞増殖が著しく阻害された。SPM添加による増殖阻害は、H₂O₂の分解酵素であるカタラーゼ (Cat) を添加しても回復しないが、アクロレインを分解する酵素であるアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) の添加により回復した (A)。また、H₂O₂は200 μMで細胞増殖阻害を示すが、Catを添加することにより回復が見られた (B)。一方、アクロレインは15 μMで細胞増殖を阻害し、ALDHを添加することにより回復が見られた (C)。

(SMO) により酸化されて生じる3-アミノプロパナールから自発的にアクロレインが産生される経路と、スペルミン及びスペルミジンがスペルミジン/スペルミン N¹-アセチルトランスフェラーゼ (SSAT) 及びN¹-アセチルポリアミンオキシダーゼ (AcPAO) によって産生される3-アセトアミドプロパナールより生じる経路が存在する。このとき、等量の過酸化水素 (H₂O₂) も産生される (図1)。3-アミノプロパナールからは効率的にアクロレインが産生されるが、3-アセトアミドプロパナールは比較的安定なためアクロレイン産生の効率が低い。ポリアミンは細胞内にmMオーダーで存在することから、生体内におけるアクロレイン産生に対し、寄与度が高いと考えられている。

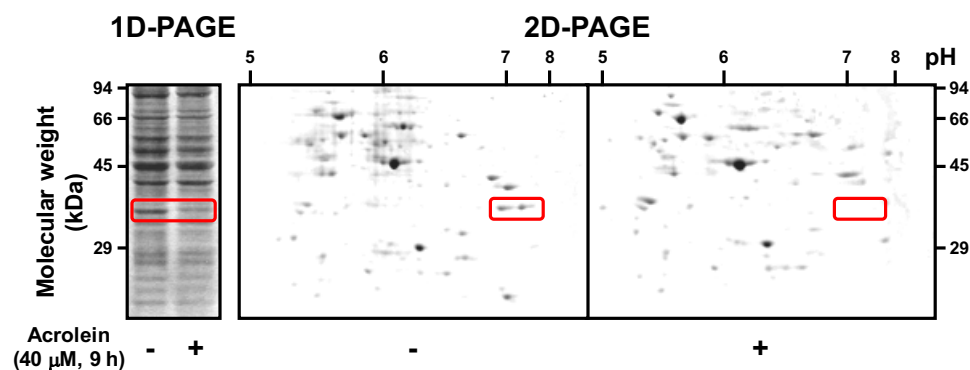
3. アクロレインの細胞毒性

細胞増殖因子として働くポリアミンを培養細胞の培地に添加すると、細胞が死んでしまう。培地にはウシ血清を添加するが、ウシ血清中にはアミノオキシダーゼが含まれており、ポリアミンも基質として酸化分解されて、アクロレインと過酸化水素を生じる。一般的に、過酸化水素を代表とする活性酸素は、がんや生活習慣病などの様々な疾患の原因や症状悪化に寄与すると考えられている。したがって、

ポリアミンを添加した際に細胞が死滅した原因は、過酸化水素であると推測された。しかし、Igarashiらの研究グループで、過酸化水素とアクロレインの毒性の強さを比較したところ、培養細胞が同程度死滅する濃度は、過酸化水素が200 μMであるのに対し、アクロレインは15 μMであった。培養細胞の種類によっても異なるが、アクロレインの方が10倍以上も毒性が強いことが明らかとなり、培養細胞にポリアミンを添加した際に死滅する主な原因はアクロレインであることが示された (図2) ³⁾。

アクロレインは、酸化ストレスの一種であると考えられており、酸化ストレスに関連する研究が進んでいる。酸化ストレスとは、生体内で発生した活性酸素種と抗酸化ストレス因子とのバランスが崩れ、細胞膜破壊、DNAやミトコンドリアの機能障害、アポトーシスなどを起こすことである。生体内における酸化ストレス防御機構には、Keap1-Nrf2系と呼ばれるストレス応答型転写制御システムがあり、酸化ストレスにより活性化され、転写因子であるNrf2が抗酸化防御因子を誘導し、酸化ストレスから生体を守っている⁴⁾。しかし、アクロレインの強い求電子性により酸化ストレス防御機構が破綻すると、核酸や蛋白質などの生体因子が障害を受ける。

A アクロレイン抱合蛋白質の同定



Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のアミノ酸配列

1 MVKVG VNGFG RIGRLVTRAA ICSGKVEIVA INDPFIDLNY MVYMFQYDST HGKFNGTVKA
 61 ENGKLVINGK PITIFQERDP TNIKWGEAGA EYVVESTGVF TTMEKAGAGHL KGGAKRVIIS
 121 APSADAPMFV MGVNHEKYDN SLKIVSNASC TTNCLAPLAK VIHDNFGIVE GLMTTVHAIT
 181 ATQKTVDGPS GKLWRDGRGA AQNIIPASTG AAKAVGKVIP ELNGKLTGMA FRVPTPNVSV
 241 VDLTCRLEKP AKYDDIKKVV KQASEGPLKG ILGYTEDQVV SCDFNSNSHS STFDAGAGIA
 301 LNDNFVKLIS WYDNEYGYSN RVVDLMAYMA SKE

B アクロレイン抱合によるGAPDHの核移行とアポトーシス惹起

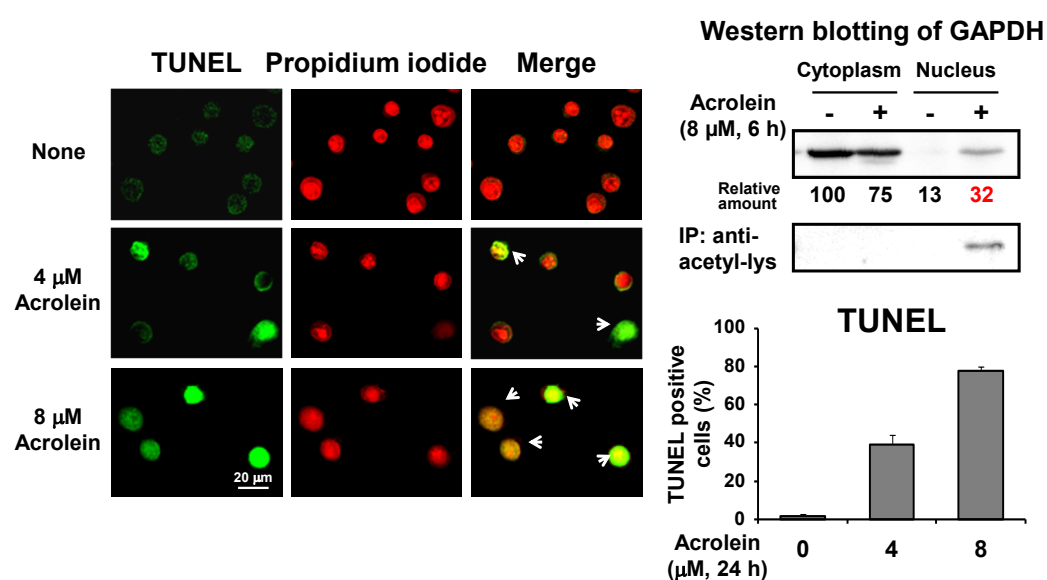


図3 アクロレイン抱合蛋白質の同定及びアクロレイン抱合GAPDHによるアポトーシス惹起

FM3Aを40 μMのアクロレインで37°C、9時間処理し、1次元及び2次元電気泳動を行った。アクロレイン処理によって消失した蛋白質 (赤枠) をLC-MS/MSにより解析し、得られた11個のペプチド断片 (赤字) のアミノ酸配列を解析した結果、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) に相当した (A)。さらに、アクロレイン抱合GAPDHによる細胞死メカニズムを解析したところ、アクロレイン抱合GAPDHは核内に移行し、アポトーシスを引き起こした (B)。

(1) アクロレインによる蛋白質障害

アクロレインは強い求電子性により、求核性の生体分子と速やかに反応する。特に、ターゲットになる生体分子が蛋白質である。アクロレインは蛋白質に含まれるシステイン、リジン、ヒスチジン残基とマイケル付加反応やシッフ塩基を形成する^{5,6)}。これらのアミノ酸残基は、酵素の活性中心であった

り、酸化ストレスのセンサーとして働く役目を担ったりと生体内で非常に重要である。筆者らは、アクロレインの毒性機構を解明するために、細胞培養系を用いてアクロレイン抱合蛋白質を探索した結果、その一つとして、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を同定した (図3A)。また、アクロレインはGAPDHの活性中心である

Cys-150とCys-282に抱合し、細胞内ATP量を低下させると共に、不活化したGAPDHを核内移行し、アポトーシスを引き起こした(図3B)。これらのことから、アクロレインの細胞毒性機序の一つとして、アクロレインがGAPDHを不活化し、細胞死をもたらすことが明らかとなった⁷⁾。また、2分子のアクロレインが蛋白質中のリジン残基と結合することにより、Protein conjugated-acrolein (PC-Acro) として N^{ϵ} -(3-Formyl-3,4-dehydropiperidino)lysine (FDP-lysine) 及び N^{ϵ} -(3-Methylpyridinium)lysine (MP-lysine) を形成することが知られている^{8,9)}。FDP-lysineには不飽和カルボニル基が存在し、これがさらにグルタチオンのようなチオール化合物と反応し¹⁰⁾、他の蛋白質の求核性部位と架橋形成する¹¹⁾。このようにアクロレインは、蛋白質中のアミノ酸残基に結合することにより、蛋白質を不活化させることが報告されている^{1,12)}。アクロレインが結合した蛋白質は、異常蛋白質となり小胞体ストレス(ERストレス)を引き起こす。臍帯静脈内皮細胞においてアクロレインは、ERストレス及びそれに対応するERストレス応答を誘発し、炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-6及びIL-8の発現を増加させることが報告されている¹³⁾。

(2) アクロレインの代謝

これまでアクロレインの毒性機序について述べてきたが、生体内にはアクロレインの毒性を除去する機構が備わっている。生体外もしくは生体内のアクロレインに暴露されると、抗酸化ストレス因子であるグルタチオン(GSH)、システイン及びチオレドキシンと急速に反応し、解毒される。特にGSHとは良好に反応し、いくつかの酵素反応を経て、メルカプツール酸2-carboxyethyl mercapturic acid (CEMA) 及び 3-hydroxypropyl mercapturic acid (3-HPMA) として尿中に排泄されることが知られている¹⁴⁾。筆者らは、細胞レベルにおけるアクロレイン代謝機構の解明を試みた。マウス神経芽細胞腫Neuro2aを用いて、変異導入剤で処理しアクロレインに暴露することで、アクロレイン耐性細胞Neuro2a-ATD1 (Acrolein toxicity

decreasing Neuro2a) の単離に成功した(図4A, B)。Neuro2a-ATD1の性質を解析したところ、細胞内グルタチオン量が親株の1.5倍を示した。また、グルタチオン合成酵素の発現量が転写レベルで増加していた。そこで、グルタチオン合成酵素に関わる転写因子を探索したところ、酸化ストレスで活性化されるAP-1やNF- κ Bが恒常的に活性されていた。さらに、アクロレイン暴露によりGSHが減少すること、親株よりPC-Acro量が低下していることが認められた(図4C)。したがって、Neuro2a-ATD1は細胞内グルタチオン量を増加させることで、アクロレインに耐性を示すこと、及び細胞レベルにおいてもアクロレイン代謝にグルタチオンが重要な役割を果たすことが示された¹⁵⁾。最近、性質の異なるアクロレイン耐性細胞Neuro2a-ATD2の単離に成功した(図4D, E)。Neuro2a-ATD2の細胞内GSH量は、親株と比べ、変化は見られなかったが、細胞内PC-Acro量が有意に減少していた(図4F)。そこで、アクロレイン産生酵素であるポリアミン酸化酵素(AcPAO及びSMO)の発現量を比較した結果、親株より低下していた(図4G)。これら遺伝子上流の転写因子を探索したところ、AP-1を構成する蛋白質であるFosB及びC/EBP β の発現低下が認められた。また、親株でこれらの転写因子をsiRNAによりノックダウンさせると、AcPAO及びSMOの発現が抑制された。さらに、AcPAOまたはSMOを過剰発現させたNeuro2a細胞ではアクロレインに対する感受性が著しく増加した。したがって、Neuro2a-ATD2ではポリアミン酸化酵素の発現を抑制し、内在性のアクロレイン量を低下させることでアクロレイン耐性を獲得していることが明らかとなった¹⁶⁾。

4. アクロレインと疾患

アクロレインは、強い細胞毒性を示すことから通常、生体内において積極的には産生されず、細胞障害を受けたときに産生されると考えられる。Igarashiらの研究グループでは、脳梗塞患者の血中においてSMO活性、AcPAO活性、及びPC-Acro量が増加することを見出した。脳梗塞の大きさはPC-

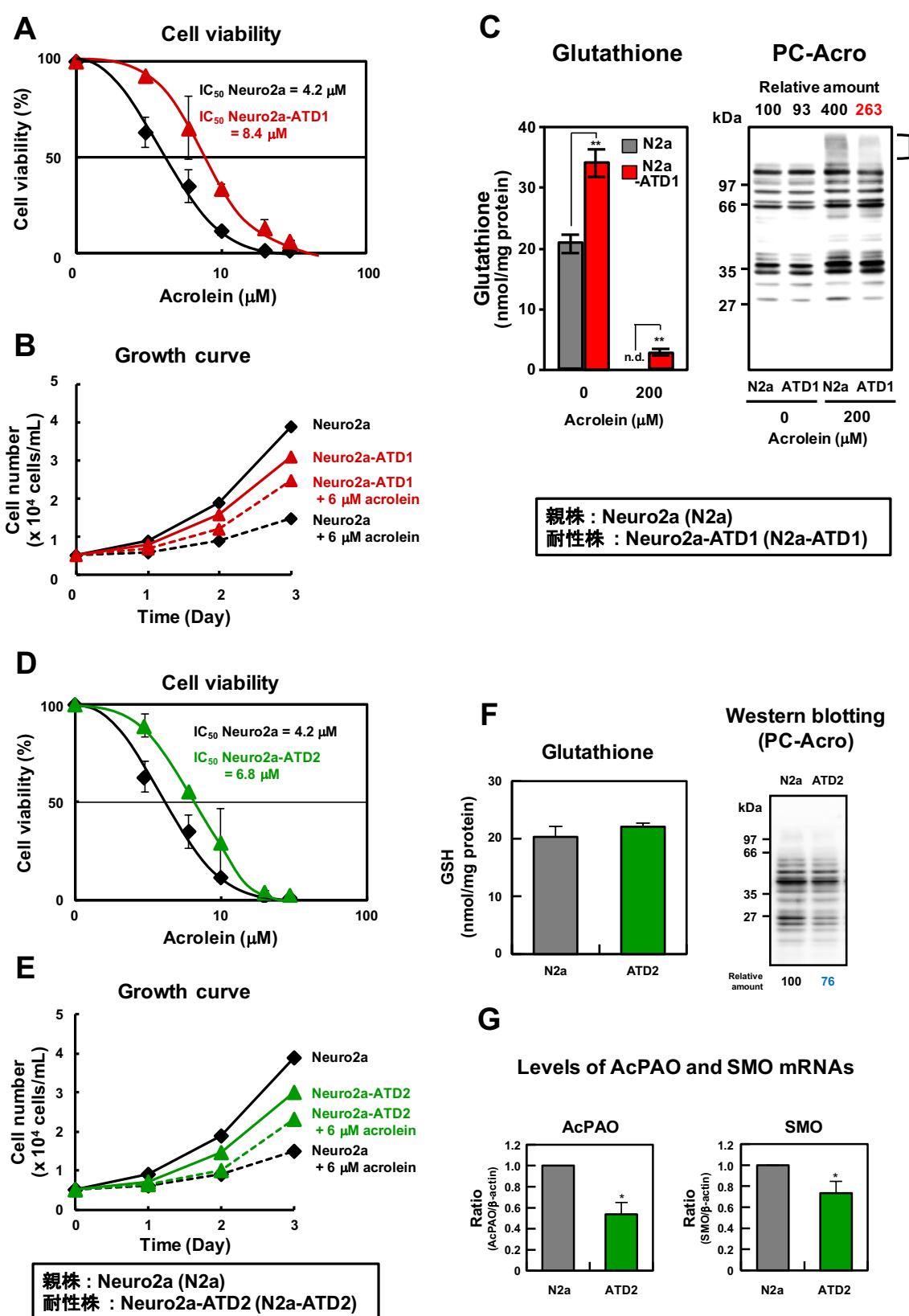


図4 アクロレイン毒性除去機構の解明

マウス神経芽細胞腫Neuro2a (N2a) を変異導入剤で処理し、アクロレイン耐性細胞Neuro2a-ATD1 (ATD1) を樹立した。0~30 μ Mアクロレインを添加した培地でN2a及びATD1細胞を3日間培養し、Cell viabilityからIC₅₀を算出した。アクロレインに対するIC₅₀はN2aが4.2 μ M、ATD1は8.4 μ Mを示した (A)。アクロレイン6 μ M添加時におけるN2a及びATD1の細胞増殖速度を比較した (B)。アクロレインを暴露した際に細胞内グルタチオンが著しく減少すること及び蛋白質抱合型アクロレイン (PC-Acro) がATD1で低下していた (C)。2つ目のアクロレイン耐性細胞をNeuro2a-ATD2 (ATD2) と命名し、アクロレインに対するIC₅₀は6.8 μ Mを示した (D)。ATD1と同様に、アクロレイン6 μ M添加時におけるN2a及びATD2の細胞増殖速度を比較した結果、ATD2の細胞増殖はあまり阻害されなかった (E)。ATD2の細胞内グルタチオン量を測定した結果、Neuro2aと比べ、変化は認められなかったが、PC-Acro量は低下していた (F)。ポリアミン酸化酵素であるAcPAO及びSMOの発現量が低下していた (G)。

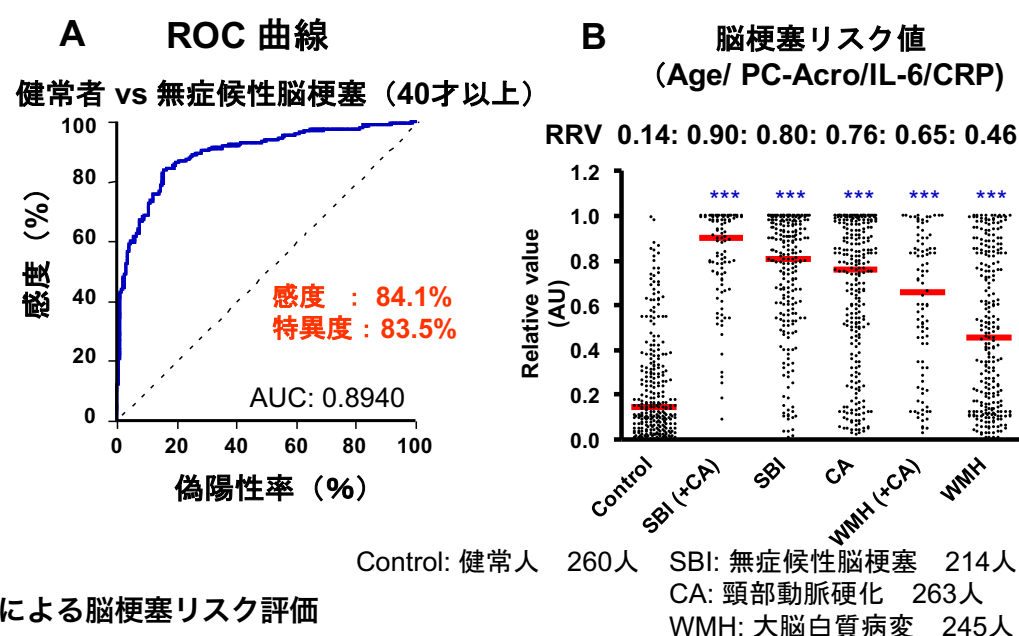


図5 アクロレイン測定による脳梗塞リスク評価

脳梗塞の前段階である無症候性脳梗塞 (SBI) を、年齢、PC-Acro、インターロイキン-6 (IL-6) 及びC反応性蛋白質 (CRP; 肺炎球菌の細胞壁のC多糖と反応する血清中 β グロブリン) を測定した (A)。脳梗塞リスク値 (RRV: Relative risk value) を0~1として表し (1に近い方が脳梗塞のリスクが高い)、脳梗塞の危険因子である頸部動脈硬化 (CA) が0.76、大脳白質病変 (WMH) においても0.46と顕著な上昇が認められた (B)。

Acro量や総ポリアミンオキシダーゼ (SMO + AcPAO) 活性に相関し、PC-Acroとポリアミンオキシダーゼが脳梗塞の良いバイオマーカーとなることを見出した¹⁷⁾。また、インターロイキン-6 (IL-6) やC反応性蛋白質 (CRP) 量を測定し、年齢を加味することで、脳梗塞の前段階である無症候性脳梗塞 (Silent brain infarction: SBI) を約84%の精度で発見できることを報告した (図5)¹⁸⁾。次に、脳梗塞モデルマウスを用いて、脳梗塞部位におけるポリアミンとアクロレインの関係性について解析したところ、梗塞部位のPC-Acro量が約30倍に増加し、スペルミンやスペルミジン量が減少することを明らかにした。アクロレイン除去剤を投与すると、梗塞巣の拡大が有意に抑制され、脳梗塞の症状悪化にアクロレインが深く関与すること、またアクロレインの除去が脳梗塞の治療に有効であることが実験的に証明された (図6)^{19,20)}。さらに、アルツハイマー病患者の血中アクロレイン量の増加や尿中アクロレイン代謝物である3-HPMAが脳梗塞及びアルツハイマー病患者尿で有意に減少することを見出しており、細胞障害性疾患においてアクロレインが関与していることが証明されつつある^{21,22)}。最近では、Tsutsuiらによって、アクロレインとポリアミンが8員環化合物を形成し、アルツハ

イマー病発症の原因の一つとして考えられているアミロイドペプチドの凝集を抑え、アミロイドペプチドの細胞毒性を軽減するという報告がされた²³⁾。脳疾患以外にも、がん¹⁴⁾、たばこを長期間吸入することで肺や気道が炎症する慢性閉塞性肺疾患 (COPD)^{24,25)}、動脈硬化症²⁶⁾、涙腺や唾液腺を標的とする臓器特異的な自己免疫疾患の原発性シェーグレン症候群患者の唾液中²⁷⁾など多くの疾患に関与していることが報告されている。今後、アクロレインが原因や症状・予後を悪化させる疾患が見出され、それら疾患の治療法の開発が期待される。

5. おわりに

ポリアミンは核酸、主にRNAと相互作用することで蛋白質合成を促進し、細胞増殖因子として機能する。しかし、酸化分解を受けると低濃度で細胞を死滅させるという逆の反応を起こすアクロレインを産生する。アクロレインの毒性機序は、徐々に明らかになりつつあるが、未だ不明な点が多い。アクロレインは強い毒性から細胞死に着目されがちであるが、生理機能に関しても非常に興味を持たれる。

アクロレインは素早く生体内の分子と反応してしまうため、動向を掴むことが難しい。最近、細胞から産生されたアクロレインを細胞が生きたまま可視

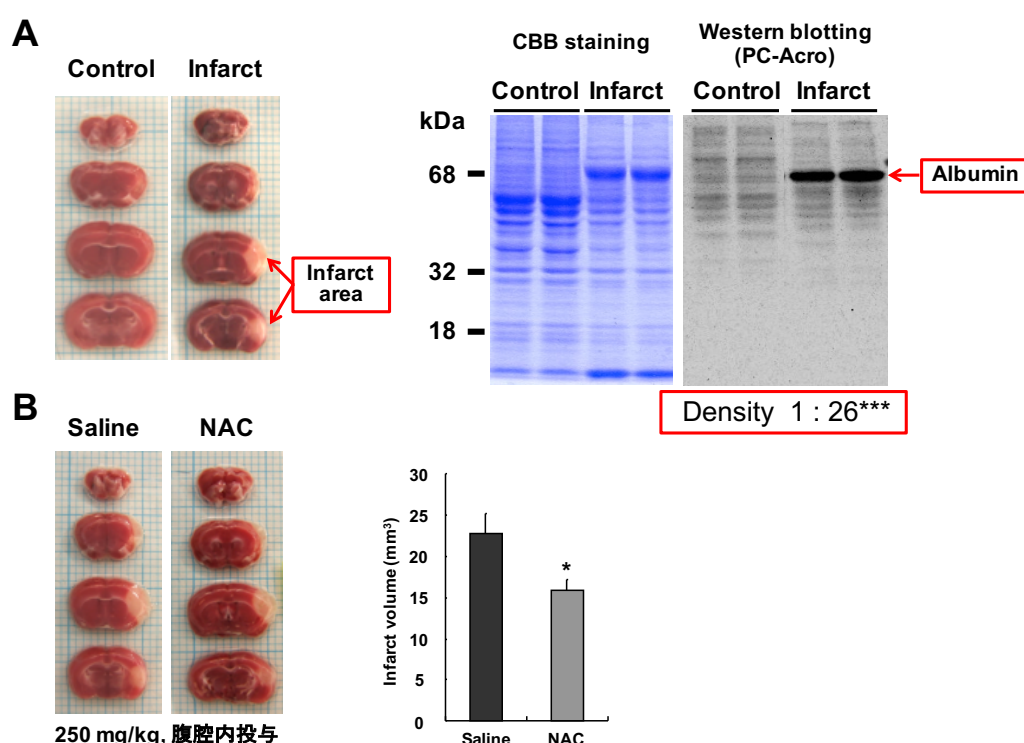


図6 脳梗塞モデルマウスにおける蛋白質抱合型アクロレイン及びアクロレイン除去剤による梗塞巣の減少

脳梗塞モデルマウスを用いて、梗塞部位の蛋白質抱合型アクロレイン (PC-Acro) 量を比較した。梗塞部位のPC-AcroをWestern blotting法により調べた (A)。また、アクロレイン除去剤である*N*-acetylcysteine (NAC) を腹腔内に投与すると、生理食塩水 (Saline) と比べ、梗塞巣の有意な減少が認められた (B)。

化することができる化合物が見出された²⁸⁾。このような試薬の開発がさらに期待され、アクロレインはこれからますます発展していく研究分野である。この拙文を読み、アクロレインに興味を持った方々によって、アクロレインの毒性、並びにアクロレインが関与する疾患の究明が進行することを期待する。

参考文献

1. Stevens JF., Maier CS. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res*. 52:7-25 (2008)
2. Moghe A., Ghare S., Lamoreau B., Mohammad M., Barve S., McClain C., Joshi-Barve S. Molecular mechanisms of acrolein toxicity: relevance to human disease. *Toxicol Sci*. 143:242-255 (2015)
3. Sharmin S., Sakata K., Kashiwagi K., Ueda S., Iwasaki S., Shirahata A., Igarashi K. Polyamine cytotoxicity in the presence of bovine serum amine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 282:228-235 (2001)
4. Suzuki T., Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med*. 88:93-100 (2015)
5. Pizzimenti S., Ciamporcerio E., Daga M., Pettazzoni P., Arcaro A., Cetrangolo G., Minelli R., Dianzani C., Lepore A., Gentile F., Barrera G. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol*. 4:242 (2013)
6. Zarkovic N., Cipak A., Jaganjac M., Borovic S., Zarkovic K. Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *J Proteomics*. 92:239-247 (2013)
7. Nakamura M., Tomitori H., Suzuki T., Sakamoto A., Terui Y., Saiki R., Dohmae N., Igarashi K., Kashiwagi K. Inactivation of GAPDH as one mechanism of acrolein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 430:1265-1271 (2013)
8. Uchida K., Kanematsu M., Sakai K., Matsuda T., Hattori N., Mizuno Y., Suzuki D., Miyata T.,

- Noguchi N., Niki E., Osawa T. Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:4882-4887 (1998)
9. Furuhashi A., Ishii T., Kumazawa S., Yamada T., Nakayama T., Uchida K. N^{ϵ} -(3-methylpyridinium)lysine, a major antigenic adduct generated in acrolein-modified protein. *J Biol Chem*. 278:48658-48665 (2003)
10. Furuhashi A., Nakamura M., Osawa T., Uchida K. Thiolation of protein-bound carcinogenic aldehyde. An electrophilic acrolein-lysine adduct that covalently binds to thiols. *J Biol Chem*. 277:27919-27926 (2002)
11. Kuhla B., Haase C., Flach K., Lüth HJ., Arendt T., Münch G. Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. *J Biol Chem*. 282:6984-6991 (2007)
12. Aldini G., Orioli M., Carini M. Protein modification by acrolein: relevance to pathological conditions and inhibition by aldehyde sequestering agents. *Mol Nutr Food Res*. 55:1301-1319 (2011)
13. Haberzettl P., Vladykovskaya E., Srivastava S., Bhatnagar A. Role of endoplasmic reticulum stress in acrolein-induced endothelial activation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 234:14-24 (2009)
14. Kaye CM. Biosynthesis of mercapturic acids from allyl alcohol, allyl esters and acrolein. *Biochem J*. 134:1093-1101 (1973)
15. Tomitori H., Nakamura M., Sakamoto A., Terui Y., Yoshida M., Igarashi K., Kashiwagi K. Augmented glutathione synthesis decreases acrolein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 418:110-115 (2012)
16. Uemura T., Nakamura M., Sakamoto A., Suzuki T., Dohmae N., Terui Y., Tomitori H., Casero RA Jr., Kashiwagi K., Igarashi K. Decrease in acrolein toxicity based on the decline of polyamine oxidases. *Int J Biochem Cell Biol*. 79:151-157 (2016)
17. Tomitori H., Usui T., Saeki N., Ueda S., Kase H., Nishimura K., Kashiwagi K., Igarashi K. Polyamine oxidase and acrolein as novel biochemical markers for diagnosis of cerebral stroke. *Stroke*. 36:2609-2613 (2005)
18. Yoshida M., Higashi K., Kobayashi E., Saeki N., Wakui K., Kusaka T., Takizawa H., Kashiwado K., Suzuki N., Fukuda K., Nakamura T., Watanabe S., Tada K., Machi Y., Mizoi M., Toida T., Kanzaki T., Tomitori H., Kashiwagi K., Igarashi K. Correlation between images of silent brain infarction, carotid atherosclerosis and white matter hyperintensity, and plasma levels of acrolein, IL-6 and CRP. *Atherosclerosis*. 211:475-479 (2010)
19. Saiki R., Nishimura K., Ishii I., Omura T., Okuyama S., Kashiwagi K., Igarashi K. Intense correlation between brain infarction and protein-conjugated acrolein. *Stroke*. 40:3356-3361 (2009)
20. Saiki R., Park H., Ishii I., Yoshida M., Nishimura K., Toida T., Tatsukawa H., Kojima S., Ikeguchi Y., Pegg AE., Kashiwagi K., Igarashi K. Brain infarction correlates more closely with acrolein than with reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*. 404:1044-1049 (2011)
21. Yoshida M., Mikami T., Higashi K., Saiki R., Mizoi M., Fukuda K., Nakamura T., Ishii I., Nishimura K., Toida T., Tomitori H., Kashiwagi K., Igarashi K. Inverse correlation between stroke and urinary 3-hydroxypropyl mercapturic acid, an acrolein-glutathione metabolite. *Clin Chim Acta*. 413:753-759 (2012)
22. Igarashi K., Yoshida M., Waragai M., Kashiwagi K. Evaluation of dementia by acrolein, amyloid- β and creatinine. *Clin Chim Acta*. 450:56-63 (2015)



23. Tsutsui A., Zako T., Tong B., Yamaguchi Y., Maeda M., Tanaka K. 1,5-Diazacyclooctanes, as exclusive oxidative polyamine metabolites, inhibit amyloid- β (1-40) fibrillization. *Advanced Science*. 1600082 (2016)
24. van der Toorn M., Smit-de Vries MP., Slebos DJ., de Bruin HG., Abello N., van Oosterhout AJ., Bischoff R., Kauffman HF. Cigarette smoke irreversibly modifies glutathione in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 293:L1156-1162 (2007)
25. Kitaguchi Y., Taraseviciene-Stewart L., Hanaoka M., Natarajan R., Kraskauskas D., Voelkel NF. Acrolein induces endoplasmic reticulum stress and causes airspace enlargement. *PLoS One*. 7:e38038 (2012)
26. Srivastava S., Sithu SD., Vladyskovskaya E., Haberzettl P., Hoetker DJ., Siddiqui MA., Conklin DJ., D'Souza SE., Bhatnagar A. Oral exposure to acrolein exacerbates atherosclerosis in apoE-null mice. *Atherosclerosis*. 215:301-308 (2011)
27. Higashi K., Yoshida M., Igarashi A., Ito K., Wada Y., Murakami S., Kobayashi D., Nakano M., Sohda M., Nakajima T., Narita I., Toida T., Kashiwagi K., Igarashi K. Intense correlation between protein-conjugated acrolein and primary Sjögren's syndrome. *Clin Chim Acta*. 411:359-363 (2010)
28. Pradipta AR., Taichi M., Nakase I., Saigitbatalova E., Kurbangalieva A., Kitazume S., Taniguchi N., Tanaka K. Uncatalyzed click reaction between phenyl azides and acrolein: 4-formyl-1,2,3-triazolines as "clicked" markers for visualizations of extracellular acrolein released from oxidatively stressed cells. *ASC Sensors*. 1:623-632 (2016)



HPLCを用いたポリアミン分析 その②

ダンシル誘導体化によるポリアミンのHPLC分析

高尾 浩一

城西大学薬学部薬科学科生物有機化学研究室

(埼玉県坂戸市けやき台1-1)

連絡先 高尾 浩一、e-mail: ktakao@josai.ac.jp

・はじめに

本シリーズは、「これからポリアミン研究を始める学生（研究者）の皆さんを対象にしている。」とのことなので、いくつか異なる分析法も少し紹介します。これまでポリアミンのHPLCによる分析法については、飛躍的な機器の進歩に合わせて様々な方法が開発され報告されて来ました。それぞれの方法に長所と短所があり、また、皆さんが持っている機器によっても選択する分析法が変わります。例えば、持っているポンプが1台なのか2台なのか、検出器は紫外可視分光光度検出器か蛍光検出器のかなど、各自の環境に合わせて方法を選択する必要があります。先のシリーズ 実験手技ノート HPLCを用いたポリアミン分析その①にて、森屋先生と東先生がご紹介されていたo-フタルアルデヒド（OPA）ポストカラムラベルイオン交換HPLC法^{1,2)}は、汎用性が高く、試料の前処理も比較的簡便な方法でした

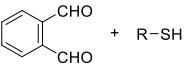
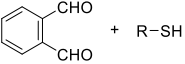
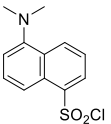
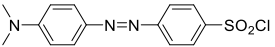
表1 HPLC分析に必要なポンプの台数

ラベル方法	分離	使用するポンプの数
プレラベル	アイソクラティック	1
プレラベル	グラディエント	2
ポストラベル	アイソクラティック	2
ポストラベル	グラディエント	3

が、溶離液と反応液の送液にポンプは2台必要になり、蛍光検出器も必要になります。もし1台しかポンプがなければどうしましょうか、そんなときにも使えるのが溶離液の送液のみでよいプレラベルによる分析法です。もちろん、ポンプが2台あればグラディエント溶出ができ、分析時間の短縮、高感度化が可能になりますので、実際にはポンプ2台は持っていたいところです。

表2には筆者がこれまでに実施したことのあるHPLCを用いるポリアミンの分析法をまとめました。

表2 HPLCを用いたポリアミン検出のための誘導体化と分離

検出法	誘導体化試薬	反応するアミン	カラム	分離	検出
OPAラベル (ポストラベル)	 + R-SH	1級	スルホン酸系	アイソクラティック イオン交換	蛍光 (Ex 345 nm Em 450 nm)
OPAラベル (ポストラベル)	 + R-SH	1級	ODS	アイソクラティック イオン対逆相	蛍光 (Ex 345 nm Em 450 nm)
ダンシル化 (プレラベル)		1級および2級	ODS	アイソクラティック リニアグラディエント 逆相	蛍光 (Ex 340 nm Em 515 nm)
ダブシル化 (プレラベル)		1級および2級	ODS	リニアグラディエント 逆相	可視 (436 nm)



これまでに筆者は、OPAポストラベルでは、イオン交換HPLC¹⁻³⁾とイオン対逆相HPLC^{4,5)}をそれぞれ用いる方法、紫外可視分光光度検出器で測定できるダブシル化法⁶⁾などを実施した経験があります。例えば、イオン交換HPLCでは、高塩濃度の溶離液を用いるため、ポンプをはじめとした機器等へのダメージが問題になりますが、試料の前処理が簡便で、ほとんどの試料に適用できる利点があります。イオン対逆相HPLCは機器へのダメージは少ないものの、一般に、高感度化や測定時間短縮のために、CM-セルロースやBond-Eluteなどを用いた試料の前処理が必要になります。ダブシル化法は、蛍光検出器がなくとも測定できるのですが、感度が低いいため試料が十分確保できる時に応用できます。この他にもそれぞれの方法に関して種々条件がありますが、残念ながらすべてを紹介することはできないので、ご興味のある方は引用文献をご参照ください。

ここからは、表に示した方法の中でもダンシル化法⁷⁻⁹⁾を用いたポリアミン分析に焦点を絞って紹介しようと思います。付録にも記載しましたが、OPAポストカラムラベルイオン交換HPLC法では、1級アミンを持つポリアミンのみが検出可能です。従って、ジエチルポリアミンなど2級アミンしかもたないポリアミンを直接分析することはできません。一方、ダンシル化やダブシル化では2級アミンとも反応するのでジエチルポリアミンの検出が可能になります。ここが大きな違いになります。ダンシル化やダブシル化以外にもOPAを用いたプレラベル化法^{10,11)}も報告されていますが、筆者は、OPAポストラベルイオン交換HPLC法を用いた際、後述のようにアミノプロピル部分との反応性や反応生成物の安定性に不安が有り、OPAプレラベル化法を用いた経験がありません。また、前述のように、プレラベル誘導体化法は、ポンプが1台でも測定が可能になりますが、実際には、スペルミンなどの溶出が遅く測定時間が長くなることや、溶出の遅いピークの幅が広がるため、感度が落ちる欠点があります（溶出時間の遅い成分と早い成分を異なる溶離液で別途測定して用いることで感度を稼ぐことは可能です）。

そこで、今回は、ポリアミンのダンシル誘導体化とリニアグラディエント溶出を用いるHPLC分析法を紹介します。

・実験方法

<ポリアミン測定用サンプルの調製>

1. 試料（培養細胞、動物組織、植物など）に0.1 M 塩酸を4倍容加えます。
Ex) 約100 mg に 400 μ L加えます。
塩酸を用いてホモジネーションすることでポリアミンを効率よく抽出できます。
培養細胞などに10% トリクロロ酢酸を直接加えて処理することもあります。
2. ここに内部標準物質としてアミノプロピルカダベリン (3-5) を約20 μ Mになるように添加します。
Ex) 1 mM 3-5を20 μ L加えます。
構造の類似したポリアミンやジアミン (図1) を内部標準物質とする内部標準法を用いることで定量をより簡便に行えます。
3-5などのポリアミンの溶解には0.01 M塩酸を用います。これにより保存による変化を抑制できると考えられています。3-5は合成品なので、内部標準物質に市販の1,7-ジアミノヘプタンを用いることもできます。
3. 調製した試料をポリトロンホモジナイザーで均質化した後、遠心分離します。
Ex) 10,000 x g、5分程度。
4. 上清150 μ Lをサンプルチューブに移し、20% トリクロロ酢酸水溶液150 μ Lを加え良く攪拌した後、遠心分離します。
Ex) 10,000 x g、10分程度。
トリクロロ酢酸による除たんぱく操作をしつかり行うために良く攪拌します。
5. 上清をポリアミン測定用試料として、ダンシル誘導体化に用います。

なお、この上清（ポリアミン測定用試料）をOPAポストカラムラベルイオン交換HPLC法で直接

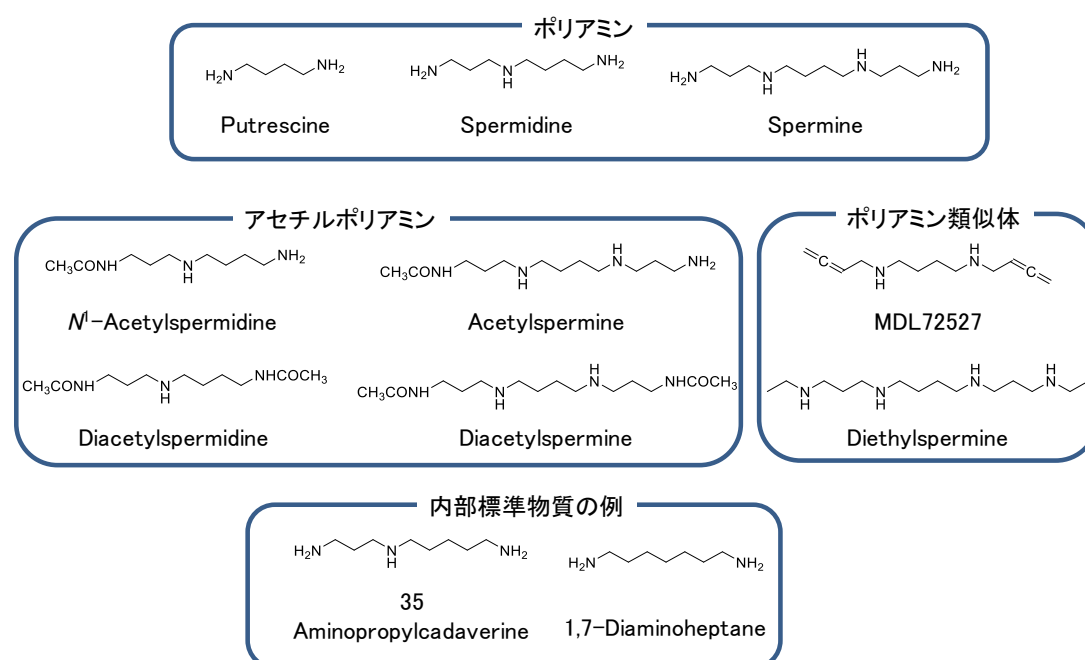


図1 ポリアミンとアセチル体と内部標準物質の構造

分析することも可能です（筆者は、内部標準物質に3-5を用いています）。

＜ダンシル誘導体化＞

1. ポリアミン測定用試料50 μLを1.5 mLサンプルチューブに移します。
2. ダンシルクロリドのアセトン溶液（10 mg/mL）300 μLを加えます。
ダンシルクロリドは、純度の高いものを用いることで夾雑ピークを軽減できます。
ダンシルクロリドのアセトン溶液は使用日に用事調製しています。
ダンシルクロリドが古くなると不溶物が多くなる傾向があります。
3. 飽和炭酸ナトリウム水溶液を50 μL加えます。
飽和溶液は使用前に良く攪拌します。保存中に溶液内で濃度差ができることがあり、攪拌しないとダンシル誘導体化が不十分になることがあります。
4. 70℃で15分間、または室温で1晩放置します。
以下の操作を省略し、Bond-Elutなどを用いた固相抽出によりダンシル誘導体を粗精製してHPLCで測定することもできます。

5. 100 mg/mL プロリン水溶液 50 μLを加えます。
過剰なダンシルクロリドの除去。
生成するダンシルプロリンが引き続く抽出操作で水層に移動し除かれます。
6. 70℃で5分間、または室温で30分間放置します。
黄色だった溶液の色が薄くなります。
7. トルエン500 μL加え、良く攪拌します。
アセトンも入っているのでトルエン層は500 μLより多くなります。
8. 遠心後、有機相（上層のトルエン層）500 μLを別のチューブに移し、遠心エバポレーターを用いて溶媒を留去します。
500 μL以上回収しても問題ありません。
機器がない場合、窒素気流下で蒸発乾固または加温して溶媒留去します。
溶媒が残っているとHPLCでの分離に影響することがあります。
9. 残渣にアセトニトリル：水＝1：1混液200 μLを加え溶解し、遠心後、上清を逆相HPLCで分析します。
不溶物が残ることがありますが、遠心上清を用いれば問題ありません。

<逆相HPLC>

1. 溶離液Aに20%アセトニトリル、溶離液Bに100%アセトニトリルを用いたリニアグラディエント溶出を用います。
カラムは一般的なODSカラムを用い、流速1 mL/min、カラムオーブン40°C、蛍光検出器 Ex 340 nm、Em 515 nmに設定します。
条件検討が済んでいれば、溶離液Aに60%アセトニトリルを用い、下記タイムプログラムを変更しても構いませんが、初めて行う場合は、装置ごとに多少分離状況が異なると思うので、溶離液Aに20%アセトニトリルを用いて濃度の調節が可能な状態にしておくことをお奨めします。
2. 測定開始前に、B濃度を50%で装置を平衡化します。
3. ポンプコントロールのタイムプログラムでは、サンプルインジェクション後、0~10分までB濃度50%、10~30分にかけてB濃度を50%~100%にリニアグラディエントで変更し、30~45分はそのままB濃度100%で溶出後、45~60分はB濃度を50%に戻して平衡化後、次のサンプルをインジェクションします。
ダンシル誘導体は構造中にアミンを含むので、トリフルオロ酢酸などを加えてピークをシャープにしたいと考える方もいるかも知れませんが、ダンシル誘導体は、酸性領域での感度が著しく低下するので避けた方が良いでしょう。
4. サンプル測定に先立ち、水または試料の溶解に用いる溶媒を用いてブランク測定を行い、クロマトグラムのベースラインを確認します。
5. ダンシル化したスタンダードの測定を実施し、クロマトグラムでピークを確認します。
溶出ピークの確認後、状況に応じてグラディエントの条件を変更します。

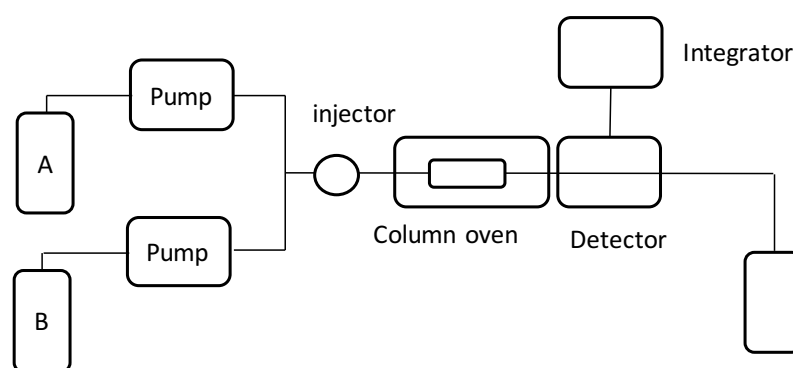


図2 ダンシル誘導体測定用逆相HPLCシステムの構成

測定条件が決まったら、スタンダードの濃度を変更し、定量可能な範囲を確認します。

6. ダンシル誘導体化後の試料を測定し、内部標準物質のピークを基準に試料中のポリアミン濃度を算出します。

今回紹介した溶離液の条件では、溶出の早いアセチルポリアミンが試薬由来のピークと重なり、分析できませんでした。20%の溶離液濃度からグラディエントを開始することで、測定時間は長くなるものの、分析可能になりました。より理想的な分離を得るために文献をご確認いただき、装置の最適な条件をご検討ください^{7,12,13}。

以上のようにダンシル誘導体化によるポリアミンの分析は感度が高く、様々な試料に適用可能ですが、前処理に時間と手間がかかる欠点があります。試料の前処理という点では、OPAポストカラムラベルイオン交換HPLCの方が圧倒的に簡便な方法になりますが、測定に用いることのできる試料量が少ない場合や、毒物である2-メルカプトエタノールの使用やホウ酸の使用による環境への負荷を考えた廃液処理などの点からダンシル誘導体化法を用いるケースも増えています。

・付録

前回のOPAを用いる方法^{1,2}の紹介ではアセチルポリアミンの測定結果がなかったため、参考にクロマトグラムを紹介します。

アセタミド部分の極性が高いのでリテンションタイムが早くなります。本文中でも述べましたがOPAによる標識は、1級アミンとの反応なので、ジアセ

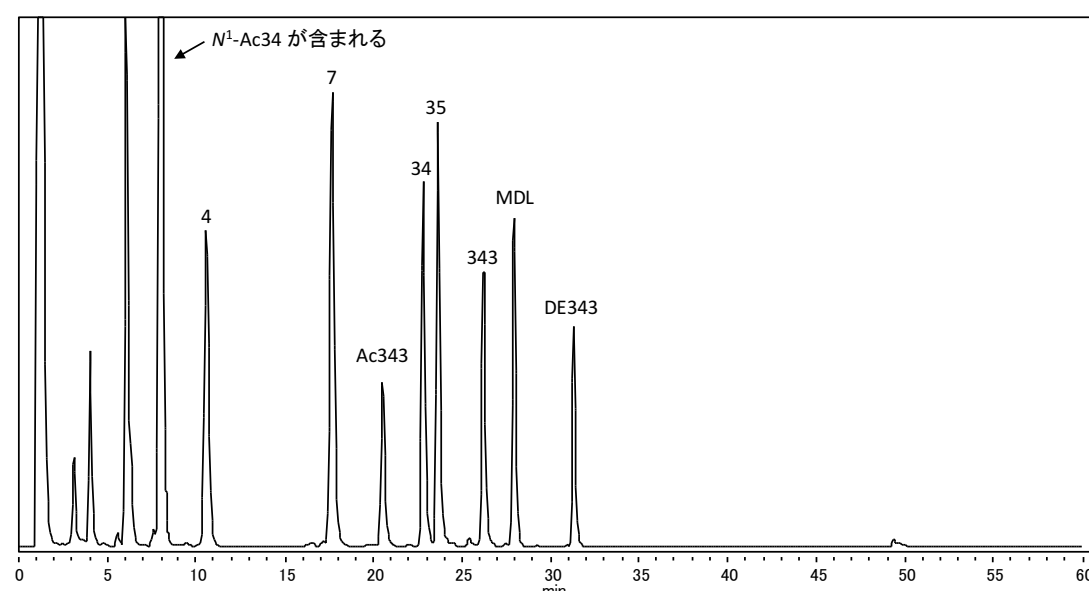


図3 ダンシルポリアミンのHPLCクロマトグラム (A)

ポリアミンの測定には、100 μ MのPutrescine (4)、1,7-Diaminoheptane (7)、Spermidine (34)、3-5 (35)、Spermine (343)、 N^1 -Acetylspermidine (N^1 -Ac34)、 N^1 -Acetylspermine (Ac343)、 N^1,N^{12} -Diethylspermine (DE343)、MDL72527 (MDL) を含む標準液を用いてダンシル誘導体化を行い、試料を10 μ Lインジェクションした。

チルポリアミンについては直接検出することはできません。(定量のために加水分解してからの測定は可能です。)

筆者の用いている条件を下記に示します。(試薬については、アミノ酸分析用など比較的純度が高い

ものを用いています。場合によっては特級試薬などでの代用も可能ですが、初めて行う場合は入手可能であれば分析用試薬の使用をお奨めします。)

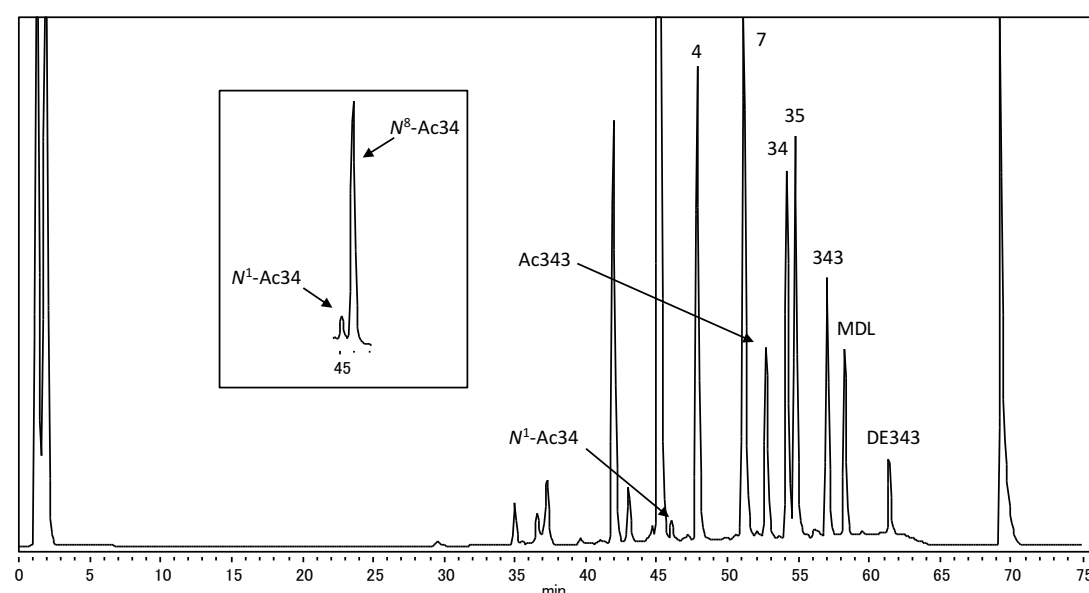


図4 ダンシルポリアミンのHPLCクロマトグラム (B)

ポリアミンの測定には、100 μ MのPutrescine (4)、1,7-Diaminoheptane (7)、Spermidine (34)、3-5 (35)、Spermine (343)、 N^1 -Acetylspermidine (N^1 -Ac34)、 N^1 -Acetylspermine (Ac343)、 N^1,N^{12} -Diethylspermine (DE343)、MDL72527 (MDL) を含む標準液を用いてダンシル誘導体化を行い、試料を10 μ Lインジェクションした。

枠内に N^1 -Acetylspermidine (N^1 -Ac34) と N^8 -Acetylspermidine (N^8 -Ac34) のクロマトグラムを示した。

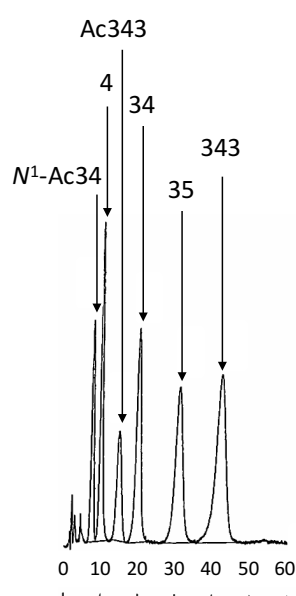


図5 OPAポストラベルイオン交換HPLCのクロマトグラム

ポリアミンの測定には、Spermineの反応性を考慮して、10 μ M N^1 -Acetylspermidine (N^1 -Ac34)、10 μ M Putrescinene (4)、10 μ M Spermidine (34)、10 μ M Aminopropylcadaverine (35)、30 μ M Spermine (343) の標準液を10 μ Lインジェクションした。

カラムには、三菱化学のMCI GEL CK10Sを4.6 mm ϕ x 8 cmのステンレスカラムに充填して用います。

溶離液には、2 M 塩化ナトリウムを含む0.28 M クエン酸緩衝液（水酸化ナトリウムを用いてpH 5.5にする）を用いて、メタノール濃度12.5%になるように混合後、0.46 μ mのフィルターを用いてろ過し、超音波処理により脱気した混液を用います。

OPA液には、6 mM OPA、0.4 M ホウ酸、0.2% 2-メルカプトエタノールを溶かし、水酸化カリウムを用いてpH 10.4にした後、0.46 μ mのフィルターを用いてろ過し、0.1%になるように20% Brij-35水溶液を加え混合後、超音波処理により脱気して用います。

溶離液の流速は、0.5 mL/min、OPA液の流速は、0.25 mL/min です。

分離やリテンションタイムの調節のために、2:1の比のまま流速を変更して用いることもあります。

また、溶離液のNaCl濃度を下げるとポリアミン溶出のリテンションタイムが遅くなりますので、溶

出の早いピークを良好に分離できる可能性があります。また、測定したいポリアミンに合わせて流速やカラム長を変更します。（例えば、長鎖ポリアミンの測定では流速を2倍にしたりします。）

以前にも記載がありますが、生体試料によってはプロレシンのピークと重なる成分（ヒスタミンなど）の妨害により、リテンションタイムの早い成分の定量ができないことがあります。

OPAとアミノプロピル部分の反応性が悪く、さらに反応生成物の安定性も低いため、OPA液との混合後の流路について、検出器までの長さを調節して最適な条件を決めます。（筆者の場合はカラムオープン兼リアクションオープンの温度を65°Cにセットし、OPA液との混合後の流路を60 cmにしています。標品に用いるスペルミン濃度は他のポリアミンの3倍にしています。）

・謝辞

本原稿を書きながら、筆者が学部生・院生時代を過ごした、城西大学薬学部薬品分析化学教室のことを思い出しました。当時は、鮫島啓二郎教授のもと、白幡晶先生、新津勝先生がポリアミン研究を行っていました。今回紹介したポリアミン測定法は、当時から引き継いでいるもので、これからポリアミン研究を始める皆様のご参考になれば幸いです。

最後に、このような機会を頂きました東京慈恵会医科大学の大城戸真喜子先生並びにポリアミン学会事務局の皆様に感謝申し上げます。

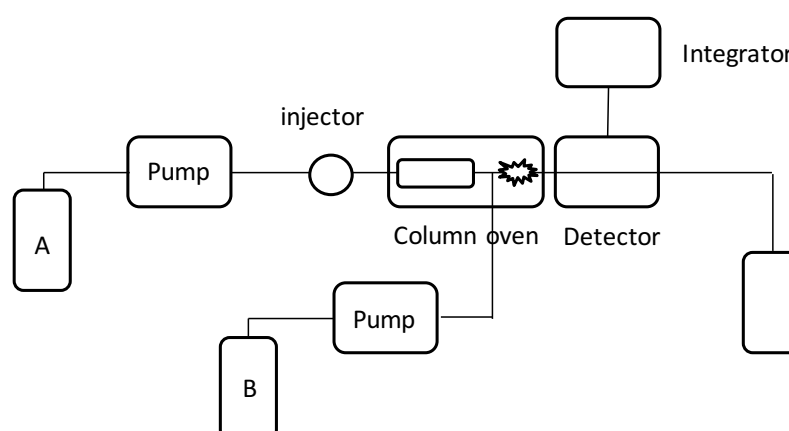


図6 OPAポストラベルHPLCシステムの構成

参考文献

1. シリーズ 実験手技ノート, HPLC によるポリアミン分析, 森屋 利幸, ポリアミン学会誌 Polyamine, Vol. 2, No. 1, 15-18 (2015).
 2. シリーズ 実験手技ノート, ポストカラムHPLC 法によるポリアミン分析, 東 恭平, ポリアミン学会誌 Polyamine, Vol. 2, No. 1, 19-25 (2015).
- <ポストカラムラベルOPAイオン交換HPLC法>
3. Effects of inhibitors of spermidine synthase and spermine synthase on polyamine synthesis in rat tissues., Shirahata A, Takahashi N, Beppu T, Hosoda H, Samejima K., Biochem. Pharmacol., 45 (9), 1897-903 (1993).
- <ポストカラムラベルOPAイオン対逆相HPLC法>
4. Reversed-phase liquid chromatographic separation and simultaneous fluorimetric detection of polyamines and their monoacetyl derivatives in human and animal urine, serum and tissue samples: an improved, rapid and sensitive method for routine application., Löser C, Wunderlich U, Fölsch UR, J. Chromatogr., 430 (2), 249-262 (1988).
 5. Determination of covalently bound hypusine and deoxyhypusine to protein using submilligram of protein samples by HPLC., Beppu T, Shirahata A, Samejima K., Biol. Pharm. Bull., 19 (1), 1-5 (1996).
- <ダブシル誘導体化法>
6. Analysis of polyamines as their dansyl derivatives by reversed-phase high-performance liquid chromatography., Koski P, Helander IM, Sarvas M, Vaara M., Anal. Biochem., 164 (1), 261-6 (1987).
- <ダンシル誘導体化法>
7. Solid-phase extraction and determination of dansyl derivatives of unconjugated and acetylated polyamines by reversed-phase liquid chromatography: improved separation systems for polyamines in cerebrospinal fluid, urine and tissue., Kabra PM, Lee HK, Lubich WP, Marton LJ., J. Chromatogr., 380 (1), 19-32 (1986).
 8. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues., Marcé M, Brown DS, Capell T, Figueras X, Tiburcio AF., J. Chromatogr. B Biomed. Appl., 666 (2), 329-335 (1999).
 9. Effects of conditional overexpression of spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase on polyamine pool dynamics, cell growth, and sensitivity to polyamine analogs., Vujcic S, Halmekyto M, Diegelman P, Gan G, Kramer DL, Janne J, Porter CW., J. Biol. Chem., 275 (49), 38319-38328 (2000).
- <プレカラムラベルOPA法>
10. σ -Phthalaldehyde-N-acetylcysteine polyamine derivatives: formation and stability in solution and in C18 supports., Campíns-Falcó P, Molins-Lagua C, Sevillano-Cabeza A, Tortajada Genaro LA, J. Chromatogr. B Biomed. Sci., 759 (2), 285-297 (2001).
 11. Analysis of polyamines in biological samples by HPLC involving pre-column derivatization with σ -phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine., Dai Z, Wu Z, Wang J, Wang X, Jia S, Bazer FW, Wu G, Amino Acids, 46 (6), 1557-1564 (2014).
- < N^1 -Acetylspermidine及び N^8 -Acetylspermidineの分離>
12. Circadian rhythmicity of polyamine urinary excretion., Hrushesky WJ, Merdink J, Abdel-Monem MM, Cancer Res., 43 (8), 3944-3947 (1983).
 13. Separation of N^1 - and N^8 -acetylspermidine isomers by reversed-phase column liquid chromatography after derivatization with dansyl chloride., Stefanelli C, Carati D, Rossoni C, J. Chromatogr., 375 (1), 49-55 (1986).



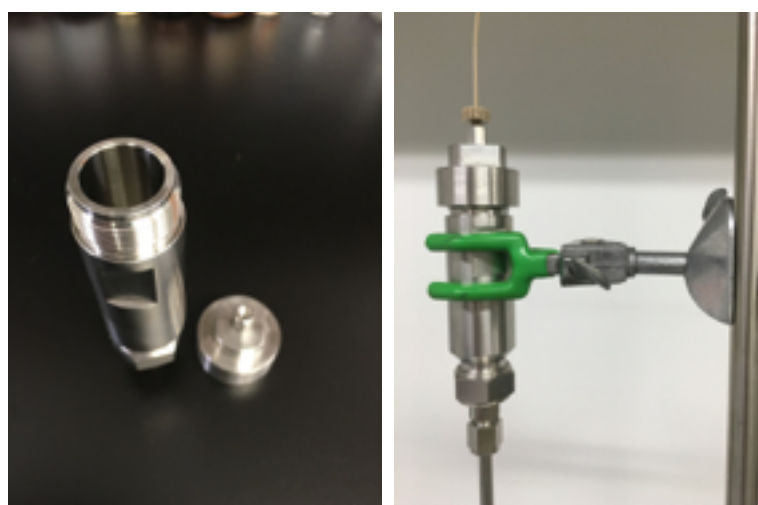
～質問コーナー～

Q1:ご自身でカラムに充填剤を詰められたことがあるようですが、具体的にどのように詰めるのでしょうか。何か必要な工具はありますか。コツや注意する点なども合わせて教えてください。

高尾：写真の器具を用います。「パッカー」という名称で、ジーエルサイエンス社製のものです。用いているHPLC用空カラムのメーカーに合わせたものを購入しました。

カラムの一方のナット部分を外して直接器具と接続します。空のカラムに接続し、樹脂の懸濁液を器具の太い部分に入れた後、ふたをして、HPLCポンプと接続、一定の流速で溶離液（例えば20%メタノール）を流します。樹脂が詰まったら、ふたを外し、懸濁液を加え、同じ操作を繰り返します。

最終的にカラム全体に樹脂を詰めます。（器具のふたを開けた時に底に樹脂が見えるようになります、充填が終わったことを確認できます。）



充填終了後、器具を外し、余分な樹脂を除去後、外してあったフィルター付のナットを装着して完了です。

コツとしては、ビーカーなどを用いて、詰める樹脂を予め溶離液（例えば20%メタノール）に懸濁し、数分間静置後、デカンテーションにより細かい粒子を除く操作を何度か繰り返してから用います。この操作により、カラム圧の上昇を軽減でき、分離も良くなります。

注意点は特にないですが、良く流してしっかり樹脂をカラムに詰めます。

Q2:ご自身で充填剤を詰める利点は？

高尾：ランニングコストが安く済むこと、不具合が出た時にすぐに詰替えられることでしょうか。（試料が詰まって、カラム圧が上昇したら、カラムの詰替えを実施しますが、この際、カラムの入り口部分の樹脂を廃棄して、残りの樹脂は再利用しています。）

Q3:カラムとネジをつなげるときに気をつけている点がありますか？ 規格や素材などの良し悪しなどもあったら教えてください。

高尾：力自慢の方はねじ切ってしまうことがありますので、要注意です。

強めに締めても液が漏れる場合には傷がついているので交換が必要です。



塩が出ている状態で締めたりすると傷がつきます、塩濃度の高い溶離液を用いる場合には使用後の洗浄など、メンテナンスをきちんと行うことや連結部のちょっとした塩の析出などに気付く繊細さが必要です。

また、イオン交換では、溶離液の塩濃度が高いため、適宜、接続部分を水などで洗浄するなど、オシネ（ネジ）部分の手入れを小まめにする事で装置全体の寿命が延びます。

現在、ピーク樹脂のラインやオシネやフェラルを用いています。

編集部：カラムのフィッティングの形状は各社で異なり、異なるカラム使用した場合、デットボリュームを生じる可能性のあるステンレス製のオシネ・フェラルに比べると、PEEK製のオシネ方式は汎用性がありますよね。

高尾：そうかもしれませんね。基本的にはステンレス製のオシネ・フェラルについてはカラムメーカーに合わせたものを用いています。

現在、耐性等の根拠はないのですが、高塩濃度の溶離液を用いているので金属製のものをPEEK製に変更しています。

Q4:イオン交換HPLCのときは、溶離液をフィルターに通していましたが、逆相HPLCのときはフィルターに通さないのですか？

高尾：液体（HPLC用のもの）を混合しただけの場合にはフィルターを通す操作を省いています。固体を溶解した場合は必ずろ過します。

Q5:蒸発乾固後、再溶解した試料はフィルターを通して不溶物を取り除くのもよいですか？

高尾：もちろんです。

本来はの方が良いのですが、コストの面から遠心上清を用いています。

Q6:ガードカラムやラインフィルターはHPLCシステムの中で使っていますか？

高尾：溶離液を吸い上げるところにサクションフィルターを付けています。

ガードカラムは逆相系カラムの使用時に付けたりしますが、現在は、カラムに比較的安価なものをを用いているので付けていません。

Q7:カラムの性能が落ちてきたな、というのはどうやって判断していますか？

高尾：クロマトグラムの形が変化してきます。イオン交換カラムでは、リーディングが起こったり、分離が悪くなったら交換しています。逆相系のカラムでは、圧が上がったり、クロマトグラムのピークが太くなるなど、変化してきたら交換しています。

Q8:イオンペア試薬について少し説明をお願いします。

高尾：例えばイオン対試薬であるオクタンスルホン酸などを用いた場合、スルホン酸部分がアミンなどの陽イオンとイオン対を形成して、アミンを含む化合物の疎水性を見かけ上高め、逆相系では保持時間が延長します。また、テトラブチルアンモニウムなどはカルボン酸など陰イオンとイオン対を形成して同様に疎水性を見かけ上高め、保持時間が延長します。イオン対試薬は、目的成分の保持時間を変化させ、良好な分離を得るために添加します。



Q9:HPLCについてもっと勉強したいと思っている学生さんにお奨めの教科書や専門書やサイトなどあったら、教えてください。

高尾：簡単なものでは、「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、また、より詳しく知りたい方には、版は古いですが、「高速液体クロマトグラフィーハンドブック」丸善などでしょうか。

サイトについては、あまり利用経験はないですが、分析機器関連のメーカーのHPなども参考になりそうです。



加齢に伴うアクロレイン産生の増加とグルタチオンの減少による脳梗塞の悪化

渡辺健太¹、植村武史²、五十嵐一衛^{1,2}

¹千葉大学大学院薬学研究院、²株式会社アミンファーマ研究所

Aggravation of brain infarction through an increase in acrolein production and a decrease in glutathione with aging.

Takeshi Uemura, Kenta Watanabe, Misaki Ishibashi, Ryotaro Saiki, Kyoshiro Kuni, Kazuhiro Nishimura, Toshihiko Toida, Keiko Kashiwagi, Kazuei Igarashi.

***Biochemical and Biophysical Research Communications* 473 (2016) 630-635**

脳梗塞時には細胞増殖因子であるポリアミンが細胞外へと漏出し、毒性の強いアクロレイン ($\text{CH}_2=\text{CHCHO}$) へと代謝される。また、加齢は脳梗塞の重要なリスク因子であるが、そのメカニズムは明らかになっていない。本研究では、加齢による脳梗塞リスク上昇のメカニズムを明らかにするため、脳梗塞モデルマウスを用いて検討を行った。その結果、加齢に伴い、梗塞体積及び梗塞部位、血漿中の蛋白質抱合型アクロレイン量は増加した。また、スペルミン酸化酵素 (SMO) 活性が、加齢により増加していた。一方、アクロレインの毒性解除に関わるグルタチオン量は減少し、グルタチオン合成酵素も減少していた。以上の結果より、加齢による脳梗塞のリスク増加は、SMO活性の上昇によるアクロレイン産生の増加とグルタチオン合成の低下によることが示唆された。

カルボキシシルスペルミジン脱炭酸酵素は、腸内常在菌最優勢種の一つである *Bacteroides thetaiotaomicron* のスペルミジン生合成に必須であり、その正常な生育に重要である

阪中幹祥、栗原新

石川県立大学 生物資源環境学部 腸内細菌共生機構学寄附講座

Carboxyspermidine decarboxylase of the prominent intestinal microbiota species *Bacteroides thetaiotaomicron* is required for spermidine biosynthesis and contributes to normal growth.

Mikiyasu Sakanaka, Yuta Sugiyama, Aya Kitakata, Takane Katayama, and Shin Kurihara. *Amino Acids*, 2016, 48: 2443-51 PMID: 27118128.

ヒト大腸腸管内に数100 μM という高濃度で存在するポリアミンは、腸内細菌によって生産されており、ヒト健康に重要な役割を果たしている。本研究では、ヒト腸内常在菌最優勢種の一つである *Bacteroides thetaiotaomicron* のスペルミジン生合成系の最終ステップを触媒するカルボキシシルスペルミジン脱炭酸酵素遺伝子 (*casdc*) について解析した。ポリアミンを含まない最少培地で生育させた *B. thetaiotaomicron* の野生株では数10 nmol/mg程度のスペルミジンが存在していた。推定カルボキシシルスペルミジン脱炭酸酵素遺伝子 (*casdc*) を破壊した株では菌体内スペルミジンがほぼ消失し、*casdc* 相補株では野生株とほぼ同濃度のスペルミジンが菌体内に存在していた。また、*casdc* 遺伝子破壊株では、野生株や相補株と比較して生育の遅延が観察された。

リボソームに結合したハイプシン化された翻訳因子eIF5Aの構造

西村和洋

千葉大学大学院薬学研究院病態分析化学研究室

Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome.

Christian Schmidt, Thomas Becker, André Heuer, Katharina Braunger, Vivekanandan Shanmuganathan, Markus Pech, Otto Berninghausen, Daniel N. Wilson and Roland Beckmann

Nucleic Acids Research, 2016, 44: 1944-1951

eIF5Aはスペルミジンによってハイプシン化されて活性型となる翻訳因子である。近年の研究により、ポリプロリン配列を含む蛋白質合成時に起こるリボソームの停止をeIF5Aが回復させる機能を持つことが示されている。本論文ではその機能を裏付けるようにクライオ電子顕微鏡を用いて、酵母80Sリボソーム上に結合するハイプシン化eIF5Aの複合体の構造を3.9 Åという高解像度で解明した。この複合体の構造解析から、ハイプシン化eIF5AはリボソームのPTC（ペプチド鎖転移反応中心）で、P部位のtRNAに隣接して結合し、そのtRNAのCCA末端のA76にハイプシン残基が相互作用することを明らかにした。この結果は、ハイプシン残基がP部位tRNAのCCA末端の向きを安定化してペプチド結合形成を促進するモデルをサポートする重要な報告である。

ポリアミン代謝の亢進によるジカ熱の原因ウイルスの増殖（複製）抑制

松本靖彦

帝京大学医真菌研究センター

Interferon-Induced Spermidine-Spermine Acetyltransferase and Polyamine Depletion Restrict Zika and Chikungunya Viruses.

Bryan C. Mounce, Enzo Z. Poirier, Gabriella Passoni, Etienne Simon-Loriere, Teresa Cesaro, Matthieu Prot, Kenneth A. Stapleford, Gonzalo Moratorio, Anavaj Sakuntabhai, Jean-Pierre Levraud, Marco Vignuzzi

Cell Host Microb, 2016, 20:167-77

ジカ熱は、小頭症の原因となるウイルス感染症である。最近、南米を中心としてジカ熱が流行しており、治療法や予防法の確立が望まれている。Mounceらは、ジカ熱を起こすジカウイルスの増殖（複製）にポリアミンが必要であることを報告した。ウイルスの複製の抑制に関わるtype I インターフェロンがポリアミン代謝に関わるspermidine/spermine N^1 -acetyltransferase (SAT1)の量の増加とジカウイルスの複製の阻害を引き起こした。さらに、阻害剤の処理によりポリアミン量を低下させるとジカウイルスの複製が阻害された。本研究で著者らは、ジカ熱に対する治療や予防のためにはポリアミン合成阻害、もしくはポリアミン代謝の亢進が有用ではないかと提案している。ポリアミンがインターフェロンによる抗ウイルス作用において重要な働きをしていることが示唆された注目の研究である。



「最新の研究紹介」「最新の論文紹介」の原稿募集

「最新の研究紹介」「最新の論文紹介」は今号より開始した新企画です。このコーナーはポリアミン学会員に向け、ポリアミン関連の最新の研究についての有用な情報を提供することを目的としています。

「最新の研究紹介」はポリアミン関連の論文を公表した著者がその研究内容を紹介するコーナーです。皆様が発表した最新の研究を解説した原稿を募集いたします。本学会誌を研究のアピールの場としても利用していただきたいと思います。

「最新の論文紹介」はポリアミン関連の注目の論文を見つけた人がその研究内容を紹介するコーナーです。

「この研究論文は面白いから是非とも紹介したい！！」「この研究論文は重要だから広く学会員に知ってもらいたい！！」と思われた方は是非ご投稿ください。もし同じ論文に複数投稿希望があった場合、投稿者合意の上で全て掲載する予定です。ただし、同一グループからの重複投稿は事務局で調整いたします。原稿を作成する前にあらかじめ事務局に投稿希望の旨を連絡していただけると助かります。

[原稿の形式]

A4版の半分に収まるように作成して下さい（目安として35文字×20行）。書式は本号の形式を参照して頂き、以下の三つの部分で構成して下さい。

1. 日本語の論文のタイトル、本解説文を作成した著者名と所属
2. 論文のタイトル、著者名、雑誌名、発表年、号、ページ
3. 研究内容の要約

投稿はポリアミン事務局宛（polyamine@jikei.ac.jp）でお願いします。

学会員参加型の企画ですので、皆様の積極的なご投稿お待ちしております！！



第4回ポリアミンの機能並びに臨床応用に関する国際会議に参加して

アミンファーマ研究所
五十嵐 一衛

この4th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectivesを、ローマ郊外のチボリでSapienza University of RomeのEnzo Agostinelli教授と共に開催するのは、2006年、2010年に次いで今回が3回目となる。しかし、4thと命名されているのは、2014年にAgostinelli教授がブラジルのSão Paulo State UniversityのSando R.Valentini教授とブラジルで3rdを開催した為である。

この3回の学会の講演数は42題、43題、43題とほぼ同数であるが、ポスター展示数は60題、37題、33題と徐々に減少してきており、世界中のポリアミン研究者の減少が危惧されている。

次回は2018年に台湾での開催が予定されているが、奇数年の2年おきに開催されるポリアミンゴードン研究会議の参加者も減少傾向にあり、台湾での開催を機に、アジアにおけるポリアミン研究者の増加を期待している。

さて、今回の会議には日本人は13名参加しており、全体87名の参加者の中で、国別では第1位であった。開催地チボリはローマから地下鉄で約30分の距離にあり、観光地と離れているため、研究者の皆さんが、研究に関して討論するには適した処に位置しており、各研究者と必要な事は十分に討論する事が出来た。内容もポリアミンのヒト、動物、植物、微生物における役割と多岐に亘り、多くの新知見を学ぶ事が出来た。しかし、欲を言えば、ポリアミンの機能の現象論の解析に止まらず、ポリアミンが何処に作用し、その現象を引き起こすかを、追及してほしいと思っている。また、Agostinelli教授は学会の運営が非常に巧妙で、参加した皆さんが学問的にも社交的にも、十分に充実した時間を過ごす事が出来たと確信している。これ迄のAgostinelli教授の努力に心より感謝したいと思っている。

また、イタリアは美食の国であり、ワイン、食事共に、満喫した。食事はバイキング方式で、多くの種類が提供されたが、可能ならば毎日少しずつ食材が変化すると更に素晴らしかったと思う。

今後はポリアミン研究が、研究者の減少に歯止めをかけ、上昇に向かう事を皆さんと共に祈念し、今回の国際会議の報告とさせていただきます。



日本ポリアミン学会第8回年会のご案内

拝啓

時下ますますご清栄のこととお喜び申し上げます。
さて、日本ポリアミン学会の第8回年会を千葉工業大学にて以下のように開催させていただきます。
大勢の皆様のご参加をお待ち申し上げます。

敬具
第8回年会担当 河合 剛太
根本 直樹

1. 年会概要

会期: 平成29年1月20日(金)13:00～21日(土)15:00(予定)
会場: 千葉工業大学 津田沼キャンパス 2号館 3階 大教室
住所: 275-0016 千葉県習志野市津田沼2-17-1
交通案内 (<http://www.it-chiba.ac.jp/institute/access/>)
最寄りのJR津田沼駅からの地図
(<http://www.it-chiba.ac.jp/institute/access/tsudanuma/index.html>)
キャンパスマップ(<http://www.it-chiba.ac.jp/institute/campus/tsudanuma/>)
特別講演: 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門の山崎和彦博士とアステラス製薬株式会社研究本部創薬化学研究所の新美達也博士を予定しています。
懇親会: 1月20日(金)17:30頃から
会場: 津田沼キャンパス1号館20階ラウンジ

2. 参加費

	事前登録		当日参加	
	年会参加費	懇親会代	年会参加費	懇親会代
正会員	2,000 円	4,000 円	3,000 円	5,000 円
学生会員	0円	2,000 円	2,000 円	3,000 円
非会員	4,000 円	5,000 円	5,000 円	6,000 円
学生非会員	2,000 円	3,000 円	4,000 円	5,000 円

3. 演題の申し込みと講演要旨の提出

演題の申し込みと講演要旨のご提出は平成28年12月5日(月)までをお願いいたします。
学会HPの所定の用紙(8th_PA_endai)にてMS Wordファイルとして作成し、pdf化したものとMS Wordファイルの両方を第8回年会専用メールアドレス polyamine@it-chiba.ac.jp へ添付書類としてお送りください。
講演要旨は「講演要旨記載要領」の指示に従い、A4紙1枚以内でご作成ください。



4. 年会参加の事前登録

事前登録のための年会参加費・懇親会代のお振込みと参加登録票のご提出は平成28年12月5日(月)までをお願いいたします。これを過ぎますと当日参加となりますのでご注意ください。参加登録票は学会HPの所定の用紙(8th_PA_sanka)をご使用ください。

振込先口座: SMBC 三井住友銀行

津田沼駅前支店(店番号:891)

(普通)口座番号 1552565

口座名義; 日本ポリアミン学会 年会担当 根本直樹

【お振込みの際のお願い】

振込人名は、お名前(カタカナ)の後にご所属の略称(カタカナ)を付けてください。

ご所属先の皆さん一括でお振込みいただいても構いませんが、参加登録票は各自1枚ずつ書きいただき、メール添付にてお送りください。

振込時の受領証以外に年会事務局発行の領収書が必要な方は年会当日にお渡しできるよう準備いたしますので、参加登録票の「領収書の要否」の欄にご記載ください。

5. その他

発表者への諸注意やホテル情報等は学会HPに載せています。最新の情報と合わせてご利用ください。

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

6. 問い合わせ先

日本ポリアミン学会第8回年会事務局

275-0016 千葉県習志野市津田沼2-17-1

千葉工業大学 先進工学部 生命科学科 分子細胞進化学研究室

根本 直樹

Tel: 047-478-0159

第8回年会専用メールアドレス: polyamine@it-chiba.ac.jp





日中でも寒さを感じる季節となりましたが、皆さんいかがお過ごしでしょうか。千葉工大では、1月開催の年会準備に向けて慌ただしく動き始めております。年会を準備する側としては、規模が大きくなればそれだけ大変になりますが、やはり多勢の参加を期待して過ごしています。柏木先生の巻頭言にありますように、学会員の数を増やすために年会はどう開催したら良いか。どのように年会参加者を増やし、どう学会員増につなげるかを考えながら準備を進めております。

広報委員会に入れていただいてから、もうすぐ2年が経ちます。通算第3号から携わっていますが、毎回、広報委員会の会議では他の委員に圧倒されています。誌面の連載をどうストーリー展開していくのかという議論に始まり、（世間一般では、皆さん良い年なのですが）若手の立場から、学会をどう盛り上げて行くか。学会員を増やすにはどうしたら良いか。様々なアイデアと熱い議論に圧倒されながらも何とかそこに加わろうとしています。

今号から「最新の研究紹介」「最新の論文紹介」がスタートしました。学会員の皆さんから最新の紹介記事を提供してもらい、学会内外にポリアミン研究をアピールすることで、より活気ある学会を創りたいという想いが込められた企画です。ぜひ紹介記事のご提供をお願いいたします。

（広報委員会 委員 根本直樹）

**日本ポリアミン学会 学会誌「ポリアミン」
第3巻2号(2016年11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

