

ポリアミンの調節と癌

鮫島啓二郎

Regulation of Polyamine and Cancer

Keijiro SAMEJIMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado City 350-0295, Japan

(Received March 17, 2006)

This review describes my work in the field of polyamine research for the last 35 years. My research started with developing the improved synthesis of decarboxylated *S*-adenosylmethionine and then moved to the purification of spermidine synthase from rat prostate. I also took considerable efforts to find the synthetic procedure for various polyamines with high yield in order to prepare ¹⁵N-labeled polyamines. On the basis of these methodological work, I searched for the inhibitor of spermidine synthase and found *trans*-4-methylcyclohexylamine (MCHA), the most effective one at the present time. I also developed a new analytical method for polyamines using stable isotope and ionspray ionization mass spectrometry (IS-MS). Based on these studies I examined the role of polyamines in liver regeneration and found that oral administration of MCHA effectively changed the concentration of polyamines and inhibited the hepatic growth. I also found the close relationship between the concentration ratio of spermidine to spermine and the extent of liver regeneration. These results may shed new light on the control of cell growth by polyamine *in vivo*.

Key words—polyamine; spermidine synthase; *trans*-4-methylcyclohexylamine; decarboxylated *S*-adenosylmethionine; ¹⁵N-labeled polyamine; mass spectrometry

1. はじめに

この総説は、筆者の30年余に亘る研究を振り返り、目的に向けて歩んできた道を纏めたものである。大学に入学した1955年の秋に母を癌で亡くし、そのとき治療に使われたナイトロミンに関心を持ち、開発に関わった故石館守三先生の主宰する薬品分析化学教室の門を叩いた。研究室に入ってみて驚いたのは、故吉田富三先生のグループを含む日本の癌研究をリードする学者、研究者との出会いであり、自分が恵まれた環境にあることをつくづく感じた。そのような出会いから癌研究を行う際の心構えとして、動物個体を抜きにして真の癌研究はありえない、すなわち癌細胞を使った研究でもそれが試験管内実験である限り癌研究とは言まいと自らに言い聞かせた。大学院時代はアゾ色素発癌に関する研究を通じて化学合成の楽しみを味わい、自分のテー

マを選ぶ条件としては生体成分を対象にして化学合成ができることを漠然と考えていた。田村善蔵先生の下では助手として、人參中のピフィズス因子の検索及びスモン研究に従事し、生物試料から微量成分を分析するという化学研究の基本ともいべき貴重な経験をさせて頂いた。今自分を振り返ってみると、これらの研究がバックボーンとなって以後の研究人生に大きく影響を及ぼしてきたことを改めて強く感じている。

2. ポリアミンとの出会い

ちょうどアポロ宇宙船が月に着陸した頃の1969年にロッシュ分子生物学研究所の故 Sydney Udenfriend 博士の研究室に留学した。与えられたテーマは、当時注目されていた脳内の生理活性ペプチドの検索で、そのためには高感度なペプチド検出法がまず必要であり、その結果開発したのがニンヒドリン蛍光法^{1,2)}である。これはロッシュグループによる一級アミンの蛍光試薬フルオレサミンの開発に繋がった。開発の経過についてはファルマシア³⁾を参照されたい。当時、最先端のポストカラム自動検出装置であったテクニコンのオートアナライザーにニン

城西大学薬学部 (〒350-0295 坂戸市けやき台 1-1)
現住所: 武蔵野大学薬学研究所 (〒202-8585 西東京市新町 1-1-20)
e-mail: samejima@musashino-u.ac.jp
本総説は、平成17年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

ヒドリン蛍光法を組み込み、CM セルロースの小カラムで脳内ペプチド分画を分析していたとき、塩基性の強い物質が溶出する位置に2つの目立つピークが現れた (Fig. 1)。既知の塩基性ペプチドでは説明がつかず、初めの大きなピークを分離精製し加水分解してアミノ酸を分析したところアミノ酸が検出されず、それがスペルミジンであり、他の1つはスペルミンであることを標品と比べて同定した。そのときは単純な既知低分子化合物ということでは少しがっかりしたが、帰国して取り寄せた論文別刷りなど⁴⁻⁶を読むうちに、ポリアミンが細胞の増殖・分化と密接に関わっており、癌の診断と治療の両面で研究対象になり得る化合物であると考えられ、上記したテーマ選択の条件に合った生体成分であることを確信した。1973年に勸東京生化学研究所に移りポリアミン研究を開始しようとしていたとき、尿中ポリアミンの測定が癌の診断に役立つという Russel らの報告⁷が話題を呼び、ポリアミンに関心を持つ研究者も増え、それまでの古典的な測定法に代わるよりよいポリアミン分析法の開発が望まれていた。ちょうど、市販前の高価なフルオレサミン1グラムが Udenfriend 博士から送られてきたので、それを使うポリアミン分析法の開発から始めることにした。フルオレサミン標識ポリアミンを逆相系の HPLC で分離定量する方法の開発経過に関しては、筆者の分担した総説⁸ (ポリアミンの調節を目指した方法論の開発) を参照されたい。

3. 研究目標の設定

有核細胞が増殖するときセントラルドグマに先立ちポリアミンが合成され準備される。ポリアミン生

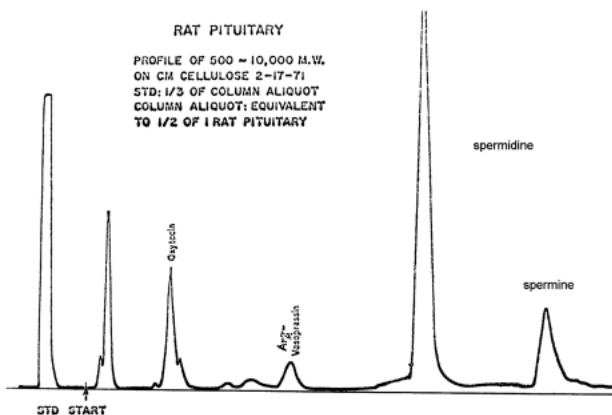


Fig. 1. Memorial Chromatogram

合成の基本経路を Fig. 2 に示す。まずオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) が誘導されついで *S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (AdoMetDC) が誘導され、ODC により生成したプトレシンが AdoMetDC を活性化して脱炭酸化 *S*-アデノシルメチオニン (dcAdoMet) を生成し、構成酵素であるスペルミジン合成酵素がプトレシンに dcAdoMet のアミノプロピル基を転移してスペルミジンが合成される。同様に、構成酵素であるスペルミン合成酵素がスペルミジンにアミノプロピル基を転移してスペルミンが合成される。この経路をみればポリアミン生合成の律速酵素が ODC であることは一目瞭然であり、ODC に研究者の関心が集まるのは当然であった。したがって、ポリアミンを調節して細胞増殖を調節し癌の治療に役立たせようとする研究の主流は ODC を標的にして行われてきた。研究目標の設定に当たり、情報量の多い ODC や AdoMetDC を研究対象にすれば、後発研究者は追いつくのに精一杯になるのは明らかだった。そこで、当時あまり手掛けられていなかった両構成酵素、特にスペルミジン合成酵素を対象にしようとした。それに決めたもう1つの主な理由は、スペルミジンが生物界で中心的なポリアミンであり細胞増殖時にかかわらず増加するという事実があり、例え ODC, AdoMetDC が誘導されてもスペルミジン合成酵素が阻害されればスペルミジンは合成されないはずだと思ったからである。しかし、全く白紙の状態からのポリアミン研究への参入で、研究目標をそれだけに絞るには不安があり、研究の進展を検証しながら必要に応じて目標に修飾を加え広範囲な関連研究ができるように、

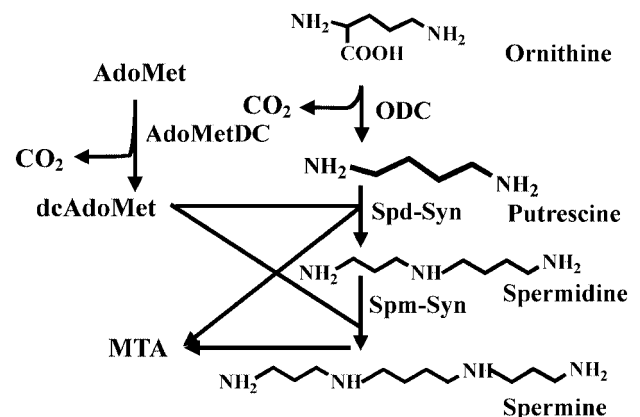


Fig. 2. Main Pathway of Polyamine Biosynthesis

「ポリアミンの調節」をテーマとして最終的には癌の治療を夢見て研究を進めることにした。

4. 目覚しい研究の進歩の中で (1973—1984年)

ポリアミンの発見は、17世紀後半、顕微鏡の発明者 Leewenhoek がヒト精液からスペルミンのリン酸塩の結晶を観察⁹⁾したときであり、その化学構造が決定されたのがおよそ 250年後の 1926年^{10,11)}であるということに象徴されるように、ポリアミンは古くて新しい化合物である。筆者が研究を始めたのは構造決定から 50年足らずのときであるが、既に生合成経路、核酸との結合、細胞増殖における重要性などは常識になっていた。その上、癌診断がクローズアップされ、周辺学問の進歩も相まって、ポリアミン研究が一段と進展し始めた頃だった。それからのおよそ 10年間の進歩は目覚しく毎年のように総説や単行本¹²⁻²⁴⁾が出版され、広い学問分野に亘るポリアミン研究の全体像はとても把握できなかった。多くの成果があった中で印象に残っているのは、ポリアミン代謝経路において生合成の逆経路の確立²⁵⁾や、dcAdoMet からアミノプロピル基が脱離して生成する 5'-メチルチオアデノシンの糖部分がメチオニンに再生される機構の解明、²⁶⁻²⁸⁾及び ODC の酵素自殺基質である α -ジフルオロメチルオルニチン (DFMO) の登場²⁹⁾である。DFMO は直ちに脚光を浴び、その成果はトップジャーナルに相ついで報告³⁰⁻³³⁾され、これで癌の治療も間近いのではないかと思わせるほどだった。そのような中でスペルミン合成酵素阻害の意味は薄れる一方であったが、研究を続ける支えとなったのは、スペルミン合成酵素が阻害されればスペルミンは合成されないということ、及び目的達成に必要な方法論の開発は学問的に価値があるということである。フルオレサミン関連を除き研究所時代の主な成果を以下

の 3項目に分けて記す。

4-1. 基質 dcAdoMet の合成 当時、アミノプロピル基転移酵素研究に必須な dcAdoMet は微生物由来の AdoMetDC を使って AdoMet を脱炭酸化し、カラムクロマトグラフィーで精製するという手間の掛かるやり方³⁴⁾で得ていた。これがアミノプロピル基転移酵素に関する研究を制約していた理由の 1つと言える。したがって、化学合成により調製できれば研究の進展に役立つことは言うまでもなかった。化学合成については 1963年に Jamieson が既に報告³⁵⁾しており、フラビアン酸塩として結晶化し同定している。合成法は総説⁸⁾に記したので詳細は省くが、S-5'-deoxyadenosyl(5')-3-thiopropylamine (ATPA) をギ酸・酢酸混液に溶かして過量のヨードメチルを加え、6日間暗所に放置してメチル化し、できた dcAdoMet の硫酸塩が EtOH に非常に溶解難いという性質を利用して精製する方法である。この方法は時間が掛かり副生成物の増加が避けられず、メチル化のみにしか適用できなかった。そこでアルキル化を促進する目的でギ酸・酢酸に溶ける過塩素酸銀を加えたところ、メチル化は 3時間程度ですみ、さらに大きなアルキル基の導入も可能となり一連の dcAdoMet 誘導体を合成³⁶⁾することができた (Chart 1)。しかし硫酸塩は油状で得られ実際に利用するにはそのままでは取り扱い難い。そこで、EtOH 中で水分含量を減らし粉末化して用いることにした。ところで、このようにして化学合成した dcAdoMet は、NMR でも明らかのように、スルホニウム基の絶対配置 S, R のものがほぼ 1:1 で存在するジアステレオマーである。ちょうどその頃、細胞内の AdoMet のスルホニウム基における絶対配置は S であることが証明³⁷⁾されたので、自然界の dcAdoMet も S であろうと考えられた。合成

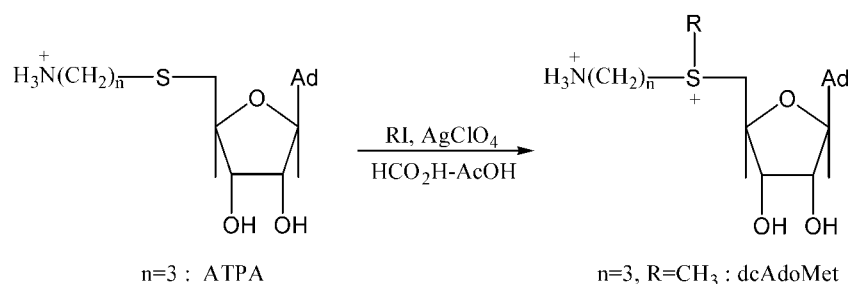


Chart 1. Syntheses of dcAdoMet and Its Analogs

dcAdoMet を将来酵素反応に適用するとき、共存する *R* が好ましくない影響を及ぼすかも知れないという心配は残った。しかし、スルホニウム化合物のキラル不安定性³⁸⁾は古くから知られており、AdoMet でもキラル不安定性が報告³⁹⁾されて、合成 dcAdoMet から純粋な *S* を分離するのは将来の挑戦課題にすることにした。その後まもなく *N*-アセチル dcAdoMet の *S*, *R* が HPLC で分離⁴⁰⁾されたことを付記する。

4-2. スペルミジン合成酵素の精製 微生物からの酵素精製は比較的容易で、大腸菌由来のスペルミジン合成酵素の精製は既に報告⁴¹⁾されていた。その頃は複雑な系である哺乳動物由来酵素の精製に関心が移っており、スペルミン合成酵素、⁴²⁾ ODC、^{43,44)} AdoMetDC、^{45,46)} の精製が相ついで報告され、ポリアミン合成酵素の中で残るはスペルミジン合成酵素だけになった。困難だった酵素の精製が相ついで成功したのは、有用性が評価されて間もないアフィニティクロマトグラフィーの導入があったからである。本酵素についても精製の鍵を握るのはアフィニティクロマトグラフィーのデザインにあった。酵素精製に先立ち、ラットの前立腺由来の粗酵素を用いて、化学合成した dcAdoMet 及びその誘導体の基質性を調べる実験を行った。生成するスペルミジンをフルオレサミン標識ポリアミンの HPLC 法⁴⁷⁾で測定して調べた結果、dcAdoMet のおおよそ 50% が利用されることが分かり、予想通り酵素はジエステレオマーの一方のみを認識していることが分かった。さらに、誘導体の中で dcAdoMet のスルホニウムメチル基がエチル、プロピル、ブチル基に置換

されたアナログが、その順にスペルミジン生成量は減少したが、基質になること⁴⁸⁾が分かった。この事実は、スペルミジン合成酵素の活性部位にある dcAdoMet のスルホニウムメチル基は外側に向いていることを暗示し、アフィニティカラムのデザインに役立った。すなわち、基質を担体に固定化するとき、往々にして酵素の認識にとって重要な基質中のアミノ基のような官能基を利用するので、酵素との親和性が落ちるのが普通であるが、ATPA のチオエーテルをアルキル化してスルホニウムにしながら固定化できれば、酵素は ATPA よりもそれをよく認識する可能性があり理想的なりガンドになるだろうと考えた。担体としてはセファロースを用いるため、固定化には緩和な反応条件が必要である。そこでブロム酢酸などを用いて検討し、5%酢酸水溶液中 ATPA と室温で放置したところ目的のスルホニウム化合物が生成することが分かり、その結果調製したのが ATPA-セファロースである (Fig. 3)。再現性よく調製するためには ATPA との反応後の後処理で気泡をできるだけ除くことが必要であり、そのことに気付くまでおおよそ 1 年を費やし断念寸前だった。苦勞の甲斐があって、DEAE-セルロース段階までの粗酵素分画を ATPA-セファロースにかけ、合成した dcAdoMet を含む緩衝液で溶出することにより比活性は一挙に 120 倍上がり、電気泳動でほとんど単一なバンドとして精製酵素を得ることができた。⁴⁹⁾ 関連文献は総説⁸⁾を参照されたい。

4-3. ¹⁵N-標識ポリアミンの合成 NMR を用いてポリアミンの窒素原子の酸解離定数を求めるために天然存在比の ¹⁵N を測定する共同研究⁵⁰⁾で、高

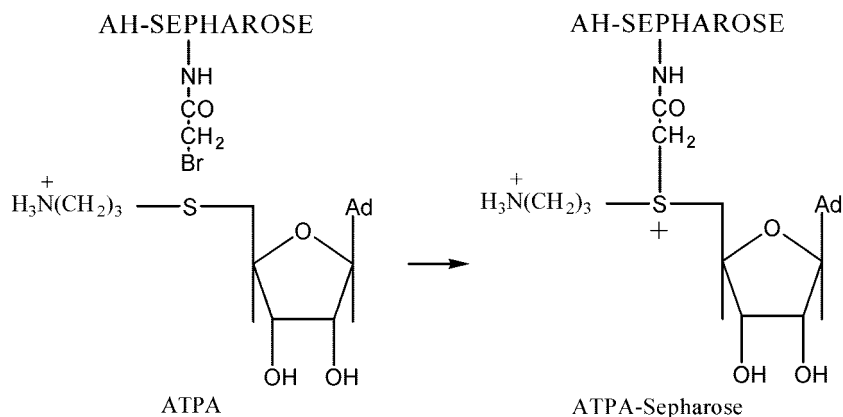


Fig. 3. Preparation of ATPA-Sephacrose⁴⁹⁾

濃度のポリアミンが必要であり、それが生体内に存在するポリアミン濃度とはあまりにかけ離れていたことがこの合成を思い立たせた発端である。同時に¹⁵N-標識ポリアミンは質量分析装置で測定でき、ラジオアイソトープ標識体に比べて汚染の心配もなく、動物を使うトレーサー研究に利用できるかもしれないという期待もあった。合成を行うに当たり、¹⁵Nが高価なため、¹⁵N-硫酸アンモニウムを出発物質として各段階の収率はできるだけ上げることが必要条件にして検討した。硫酸の¹⁵Nをポリアミンに組み込むための原料、¹⁵N-フタルイミドカリの合成は十分満足できる収率で得られ、したがって¹⁵N-プトレシンはGabriel法で問題なく合成できた。ポリアミンの合成で面倒なのはアミノプロピル基の導入である。例えば、塩基存在下でアミノ基を保護したプロピルハライドでプトレシンをアルキル化しようとする、試薬自身でβ脱離反応を起こしてしまい目的化合物は全く得られない。当時、アミノプロピル基の導入はアクリロニトリルとプトレシンを反応させたのち、アンモニア飽和エタノール中で高温高压接触還元してさらに減圧蒸留あるいは陽イオン交換樹脂で精製するという大変な作業だった。¹⁵N-標識アミノプロピル基導入試薬としては¹⁵N-(3-ブロモプロピル)フタルイミドぐらいしか考えられず、これを利用するには塩基非存在下でのアルキル化の条件が必要であり、調べた結果アセトニトリル中でKF-Celite存在下還流する方法⁵¹⁾がみづかり問題は解決した(Chart 2)。反応生成物を比較的簡便なカラム操作で精製し、保護基をはずしたのち、塩酸塩として再結晶するだけで純品が得られるこの方法は、ニトリルの還元操作を含まない好収率なポリアミン合成法として、応用面も広く優れた方法⁵²⁾になった。この方法で合成した¹⁵N-標識スペルミジン全8種の存在比を電子衝撃イオン化質量分析により測定する方法⁵³⁾やヘキサアミンまでのポリアミンをGC及びGC-MSで分析する方法⁵⁴⁾などの

概略は総説⁸⁾を参照されたい。

5. 動物実験を目指して(1984—2004年)

1980年代前半までに、尿や血液中のポリアミンを測定して癌を診断するのは、炎症性疾患などと区別できず難しいことが分かり一時のブームは収まったが、ポリアミンの生理的意義解明のための研究及び癌治療に向けた研究は、DFMOを中心に益々盛んになった。さらに、ポリアミンの膜輸送系を利用して細胞内に取り込まれ天然ポリアミンを枯渇させて細胞死に至らしめるという、ビスエチルスぺルミンのようなポリアミンアナログが新たに登場し、大きな注目を浴びた。これらの阻害剤を用いた研究を含めてポリアミン研究は数えきれぬほど報告され、遺伝子工学や分子生物学の目覚ましい進歩も相まって、試験管内研究は益々盛んに行われてきた。全体像の把握は総説や単行本⁵⁵⁻⁶⁵⁾を参照されたい。スペルミジン合成酵素阻害関係については、阻害剤としてシクロヘキシルアミン^{66,67)}や遷移状態化合物を模してデザイン合成されたS-adenosyl-1,8-diamino-3-thiooctane (AdoDATO)⁶⁸⁾が1980年に報告された。培養細胞に対するAdoDATOの効果をみるとスペルミジンは減りスペルミンは増えその和は変わらず、極端にスペルミジンを減らしスペルミンを増やしても細胞増殖には影響がないこと⁶⁹⁾が分かった。それ以来本酵素阻害に関心を持つ研究者はさらに減り、時代遅れの研究とみなされるようになっていった。そのような状況の中で、また情報の洪水の中で、始めに立てた研究目標に修飾を加えるべきかどうかについて自問しながら、これでよいと思った理由は、動物個体を対象にして確かな情報は依然としてないということである。研究所時代に築いた土台を基にして、最終的には動物個体のスペルミジン合成酵素の阻害を目指し研究を続けた。そのためにはよりよい阻害剤の開発そしてよりよいポリアミン分析法の開発があれば目的達成に役立つと考えた。ここでは、実用的な阻害剤の開発と安定同位体を用

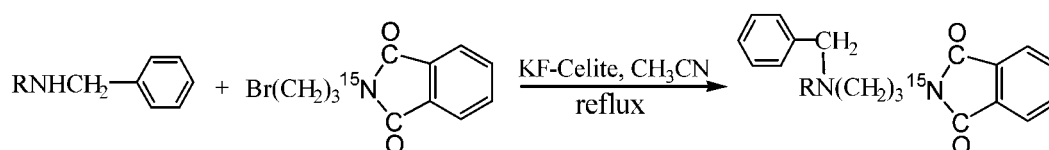


Chart 2. Introduction of Aminopropyl Group

いるポリアミン分析法の開発に大別して、実験経過を記す。

5-1. 実用的な阻害剤の開発 上記したように、AdoDATO は最も強力な阻害剤であるが、化学合成に手間が掛かり量の供給に難点があり、また分子サイズが大きく投与したとき吸収や代謝の問題が予想され、動物実験には向いていなかった。さらに、細胞増殖が盛んなときには dcAdoMet 濃度が高まり結合部位で AdoDATO と競合してその阻害能力が弱められることも試験管内実験で予測⁷⁰⁾された。そこで、スペルミジン合成酵素のプトレシン結合部位で競合的に働き阻害するシクロヘキシルアミンを参考にして、より強力で選択的な阻害剤を探した結果、比較的簡単な化合物である *trans*-4-methylcyclohexylamine (MCHA), *exo*-2-aminonorborene, *n*-butylamine, *n*-amylamine 等が見つかった。⁷¹⁾ 中でも MCHA はシクロヘキシルアミンより 5—10 倍強く本酵素を阻害し、早速、培養細胞を用いてその効果を調べたところ、既に AdoDATO で報告されていた結果と矛盾するような点は特になかった。⁷²⁾ また、飲料水に MCHA を混ぜてラットに与えると組織中のスペルミジン濃度は下がりスペルミン濃度は上がり、見掛け上ラットに異常は認められず、培養細胞で得られた結果と合わないような点は見当たらなかった。⁷²⁾ ただ、対照群に比べて体重増加率が少し減少する傾向がみられたが、それは MCHA の入った飲料水をラットが忌避して水をあまり飲まなかったせいだろうとして深くは考えなかった。しかし、動物実験で MCHA の効果がみられたことは確かな事実であり、将来よりよい阻害剤が開発されれば再度試すことにして、そのときはそれ以上の究明は行わなかった。

多くの化合物をスクリーニングして阻害剤を探すやり方は MCHA の発見で止め、スペルミジン合成酵素の活性部位構造を明らかにしてから不可逆的な阻害剤をデザインするという到達目標を立て、まず一次構造を決める研究から始めた。折しも cDNA 配列からタンパク質の一次構造を決める方法や質量分析装置の飛躍的進歩が始まろうとしていた頃で、精製酵素を選択的な切断酵素でペプチド断片にして各ペプチドを HPLC で分離し、それぞれについて Edman 法によりアミノ酸配列を決めるというそれまでの常套手段が、年毎に時代遅れの方法になって

いった頃だった。相変わらずラット前立腺からスペルミジン合成酵素を精製してはアミノ酸配列を決める実験を続けているうちに、大腸菌,⁷³⁾ ヒト,⁷⁴⁾ マウス,⁷⁵⁾ ラット⁶¹⁾ の cDNA 由来アミノ酸配列が報告され完全に遅れをとった。しかし、それらの配列を比較してみると、幸か不幸かラットの N 端側及び C 端側配列がヒトとマウスの配列と大幅に違っておりそれを確かめる必要が出てきた上に翻訳後修飾の可能性も考えられたので、本研究を断念せずに継続することにした。ちょうど MALDI-TOF MS⁷⁶⁾ が普及し始め、ヒトとマウスの cDNA の結果を参考にしながら、ペプチド断片の質量を測定して配列を確かめていくことにした。長鎖のペプチドで C 端側の配列が Edman 法では決められなかったものもこのやり方で確かめることができ、ラットの配列とマウスの配列が 98.7% の相同性があり、ラットとヒトでも 96% の相同性があること、及び N 末端がアセチル化されておりそれ以外には翻訳後修飾はないことなど⁷⁷⁾ が分かった。この結果は哺乳動物間でアミノ酸配列がよく保存されていることを強く印象付けた。

ラット由来酵素の三次構造研究を始めるに当たり、精製酵素を多量集めるのは不可能なことから、結晶酵素が必要な X 線回折法や比較的高濃度が必要な NMR 法は適用できなかった。ちょうど、タンパク質の一次構造や二次構造から三次構造を推定する理論的な研究も盛んになりつつあった頃で、東京大学名誉教授の長野晃三先生のご指導を頂きながら、当面、微量酵素を使って三次構造推定に役立つ情報を集めようと考え、酵素に含まれる 10 個のシステイン残基について、それらが SH か SS かを MALDI-TOF MS で決めることにした。タンパク質中のシステイン残基の同定法は還元剤の有無で比較するのが一般的である。本酵素は還元剤非存在下で変性剤の作用を受け難いために、選択的切断酵素で切断されるペプチド断片はわずかししか得られない。したがって酵素法では明確な結果が得られなかった。そこで化学的方法により、システイン残基で選択的に切断^{78,79)}したり、二官能試薬を用いたりして検討した結果、N 端側から 25 番目のシステイン残基 (C25) が SS として存在することが確認され、残りの 9 残基中 6 残基は SH であることが証明されたが 3 残基はどうしても結論が得られなかった。ち

ようどその頃、細菌 *Thermotoga maritima* 由来スペルミジン合成酵素の X 線回折による三次構造が報告⁸⁰⁾された。哺乳動物の酵素が 2 量体であるのに対してこの細菌の酵素は N 端側のポリペプチドが絡み合う構造の 4 量体を形成していた。哺乳動物の酵素とのアミノ酸配列の類似度は 34% であり、特に活性部位に位置する部分の配列は極めて類似することが分かり、この細菌の酵素を参照して哺乳動物の酵素の三次構造を推定することは十分可能であると考えられた。折しもホモロジーモデリングが普及し始め、web サイトである Swiss-Model protein modeling server を利用して、ラットの酵素の三次構造モデルを作成することができた (Fig. 4)。⁸¹⁾ N 端側の 26 残基及び C 端側の 3 残基については *T. maritima* 酵素との相同性が低いため、その部分の三次構造はモデリングされなかった。得られた構造から帰属できなかった 3 システイン残基について SS の可能性を調べたが、それらが他のシステイン残基も含めて SS を形成できる分子間距離に位置しておらず、SH に帰属するのが妥当であると結論した。したがってジスルフィド結合の C25 の相手になるシステイン残基は同一プロトマー中には存在しないことになり、それを説明する必要が生じた。*T. maritima* に続いて 2 量体の *Bacillus subtilis*, *Pyrococcus furiosus* などの細菌由来スペルミジン合成酵素の三次構造が相ついで web サイトでみられ、いずれもラット酵素の N 端側 37 個のアミノ酸を含むペプチドに相当する部分が β -hairpin 構造で絡み合いプロトマー同士の結合に係わっていることが分かった。ラットの C25 がこのペプチド部分に

位置していることを考えると、2つのプロトマーの C25 同士でジスルフィド結合を形成している可能性は高かった。それを直接 MALDI-TOF MS で証明しようとしたが、上記したように還元剤非存在下での変性剤に対する本酵素の抵抗性のために、SS を保持した目的ペプチド断片を検出することはできなかった。その後、4 量体からなる *T. thermophilus* 酵素のプロトマー同士の結合にジスルフィド結合が関与していることが X 線回折により証明⁸²⁾され、哺乳動物酵素も恐らく 2 量体形成にジスルフィド結合が関与しているに違いないと考えている。ホモロジーモデリングによる活性部位構造は *T. maritima* とラットではほとんど同じで、生物進化の過程で保持されてきたことを物語っている。特にプロレシン結合部位に gatekeeping loop と名付けられた部分があり、これはプロレシンが結合するとそれを覆うような役割をしていると考えられる。このようなダイナミックな酵素反応の複雑さは、活性部位構造から阻害剤をデザインすることの難しさを思わせた。

そこで、活性部位構造を参考にしながらもう一度阻害剤開発を試みるに当たり、立体構造が決められている環状の MCHA と自由度の大きい直鎖状の *n*-butylamine (BA) をタイプの違う 2 つのモデル化合物として、新たに化合物をデザイン、合成してそれらの精製酵素に対する阻害性を、化学合成した [methyl-¹⁴C] dcAdoMet を含む活性測定系で測定した。なお、挑戦課題だった化学合成した dcAdoMet の *S*, *R* を分離して酵素活性に及ぼす効果を調べたところ、*S*, *R* 体の混合と精製した *S* 体のみで活性値に差は認められず、*R* 体は共存しても構わない

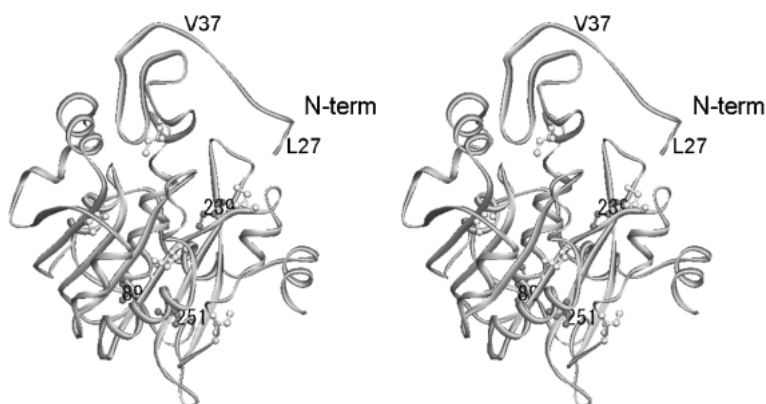


Fig. 4. Stereo-view of a Model of Rat Spermidine Synthase⁸¹⁾

こと⁸³⁾が分かった。得られた測定結果から IC₅₀ 値を比べたところ (Table 1), MCHA のアナログの中では MCHA に勝るものはなかったが, BA アナログの中では 5-amino-1-pentene (APE) が最も強い阻害性を示し, その IC₅₀ 値は MCHA と同じ値⁸¹⁾を示した。この結果から動物実験には MCHA と APE を候補として用いることにした。

5-2. 安定同位体を用いるポリアミン分析法の開発

化学合成した ¹⁵N- 標識ポリアミンを動物に投与して体内動態研究に役立たせたいと考えていたときに, 緩和なイオン化法で, 目的化合物をフラグメントイオンに分解せず検出できるエレクトロスプレーイオン化による質量分析法⁸⁴⁾が普及し始めた。もしポリアミンが質量の違いで瞬時に分離, 定量できれば, 時間の掛かる分離操作が省け, 従来の分析法に比べて優れた方法になるだろうと思ひ, ¹⁵N- 標識ポリアミンを内標準物質とする分析法の開発に取り組んだ。イオン化にはエレクトロスプレーと原理的に同じイオンスプレーを用いた。実際に試すと, ポリアミンは質量が小さく質量分析で直接測定しても多くの夾雑イオンの中に埋没してしまうため, 誘導体化して質量を大きくする必要があった。誘導体化試薬の選択としては, 同一化合物の質量分布ができるだけ広がらないようにするため, 天然存在比 100% の ¹⁹F を含む無水ヘプタフルオロ酪酸 (HFB) を選んだ。誘導体化した HFB- ポリアミンを正イオン測定用の溶媒を用いてイオンスプレーイオン化マスペクトロメトリー (IS-MS) で測定すると, H⁺, NH₄⁺, Na⁺, K⁺ を付けた 4 種のイオンピーク群になりそのままでは実用性に乏しかった。そこで IS-MS の条件をいろいろ検討しているときに, 負

イオン測定用の溶媒 (0.5% AcONH₄ - 50% CH₃CN) で正イオン測定モードにたまたま切り換えたところ, NH₄⁺ を付けたイオンが主イオンピークとして現われ, H⁺ を付けたイオンピークを極端に低くすることができ, Na⁺, K⁺ を付けたイオンは消滅した。このようにして設定した条件の下で各ポリアミンは ¹⁵N- 標識ポリアミンとのイオン強度比から同時定量することができ, ユニークなポリアミン分析法⁸⁵⁾が誕生した。この方法は, 限外ろ過を利用するラット肝ホモジネート中の吸着形及び解離形ポリアミンの解析に応用⁸⁶⁾され, 有用な知見を得るのに役立った。

さらに, この方法を修飾して ¹⁵N- 標識ポリアミンより質量の大きいポリアミンを内標準物質にすれば, 天然及び ¹⁵N- 標識ポリアミンを同時に測定することができ, ¹⁵N- 標識ポリアミンをトレーサー化合物として利用できることになる。そこで ¹⁵N- 標識ポリアミンより質量の大きいものとして, プトレシンの 1,4- 位の N 及び C を ¹⁵N, ¹³C に代え, ¹⁵N- 標識ポリアミンよりさらに質量 2 高めた ¹³C, ¹⁵N- 標識ポリアミンを合成⁸⁷⁾した。これらを内標準物質とする方法は期待通り信頼できる方法⁸⁸⁾であることが分かった (Fig. 5)。早速, ¹⁵N- 標識ポリアミンをラットに経口投与してポリアミンの体内動態研究に応用⁸⁹⁾した。その結果, 腸管からのプトレシン, スペルミジン, スペルミンの吸収はほとんど同じで濃度依存性があり, 受動拡散機構によること, 組織中にはスペルミンよりスペルミジンが取り込まれ易いこと, 腸管から吸収された過量のポリアミンは速やかに腎臓に集まり排泄に向かうこと, プトレシンは吸収されてからアミン酸化酵素による活発な代謝を受けていると思われることなど, 興味ある知見を得ることができた。このようにして開発した ¹³C, ¹⁵N- 標識ポリアミンを内標準物質として用いる方法を, 通常天然ポリアミンを測定する場合にも用いる標準法 (IS-MS 法) に決めた。さらにオートインジェクタを装着して半自動化することにより多数試料の測定に合った方法になり, 後述する動物組織中ポリアミンの測定に活用された。

さらに IS-MS 法の拡張の 1 つとして, ポリアミンのほかにジアセチルスペルミンも含めて同時測定する方法⁹⁰⁾に応用した。この方法において, アセチル化されたポリアミンの HFB 誘導体は測定条件で

Table 1. IC₅₀ Values of BA and MCHA Analogs

BA analogs	IC ₅₀ (μM)	MCHA analogs	IC ₅₀ (μM)
BA	3.8	MCHA	1.7
<i>n</i> -pentylamine	3.6	<i>cis</i> -Isomer ^{a)}	430
<i>n</i> -hexylamine	105	CHA ^{b)}	17
4-amino-1-butene	13.5	<i>trans</i> -4-ethylCHA	135
5-amino-1-pentene	1.7	4,4-dimethylCHA	>1000
6-amino-1-hexene	22	4-methylCHA	60
5-amino-1-pentyne	20	<i>trans</i> -4-hydroxyCHA	85
6-amino-1-hexyne	40		

a) *cis*-4-methylcyclohexylamine, b) cyclohexylamine.

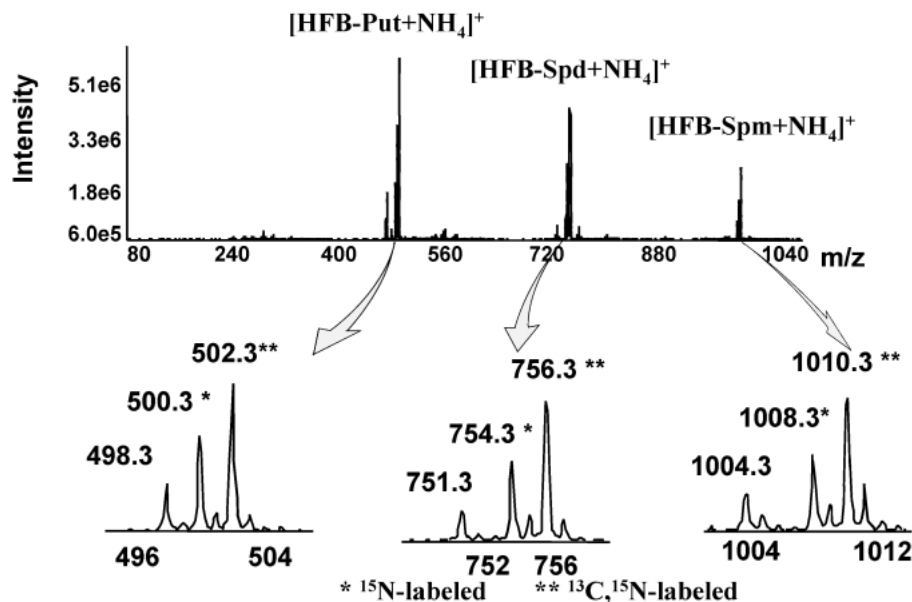


Fig. 5. Simultaneous Mass Analyses of HFB-polyamines⁸⁸⁾
Put: putrescine, Spd: spermidine, Spm: spermine.

主イオンピークが NH_4^+ ではなく H^+ が付いたイオンであったのは興味があった。近年になって癌患者尿中でジアセチルスベルミンが増えることが報告⁹¹⁾され、患者の予後を予測する指標として利用されている carcinoembryonic antigen より優れているという報告もあり注目されている。測定法がなく見逃されていたジアセチルスベルミンを測定することにより、一度下火になった癌診断への可能性が再び高まるかも知れない。ELISA 法で測定した患者尿中のジアセチルスベルミンの値と本法による値とがよい相関を示し、両方法の信頼性が証明された。

6. 目標の達成そして癌 (2004—2006 年)

長年に亘る検討から、スベルミジン合成酵素阻害剤は MCHA と APE に絞り、ポリアミンは IS-MS 法で測定することにして、ラットに投与する実験を開始することにした。タイプの違う 2 種類の阻害剤で得られる結果が一致すればより選択的阻害の結果と考えてもよいので、両阻害剤を並行して使う予定であったが、ラットに経口投与して組織中ポリアミン濃度を測定しその効果を調べたところ、MCHA では明らかな効果を示す投与量で APE は全く効果を示さなかった。⁹²⁾ 恐らくアミン酸化酵素により分解されたと考えられ、APE は動物実験には適していないことが分かった。結局、本研究の初期に見出された MCHA が現状では動物実験に最も適した阻

害剤であるということになり、MCHA をラットに経口投与する実験系で検討を行うことにした。得られた成果を以下の 2 項目に分けて記す。

6-1. MCHA によるラット組織中ポリアミン濃度の調節⁹²⁾ ドンリュウラット (雄, 6 週齢) を使い、MCHA は生理食塩液に溶かして毎日 1 回強制経口投与し 7 日目に組織を採取してポリアミンを測定した。各組織によりポリアミン濃度は異なるが、MCHA の投与量を増やすにつれてスベルミジン濃度の減少及びスベルミン濃度の緩やかな増大がみられた (Fig. 6)。プトレシンは肝、腎では低濃度を維持していたが、代謝回転が活発で ODC 誘導のために比較的高い値を示す小腸、脾では上昇傾向を示した。これは MCHA によりプトレシンからスベルミジンへの合成が抑制されたためにプトレシンが余剰になったのが理由と考えられ、試した全部の組織を通して MCHA による ODC 誘導の形跡はなかった。ポリアミン濃度の総和については、MCHA の投与量が増すにつれて、腎ではほぼ同じ値を保ち続け培養細胞の結果と矛盾はなかったが、肝、小腸、脾では明らかに減少傾向があった。これはスベルミジンの顕著な減少に対してそれに見合うスベルミンの増大がなかったためである。恐らく、MCHA により誘導される AdoMetDC が dcAdoMet 濃度を高めても、スベルミン合成に使われる遊離型のスベル

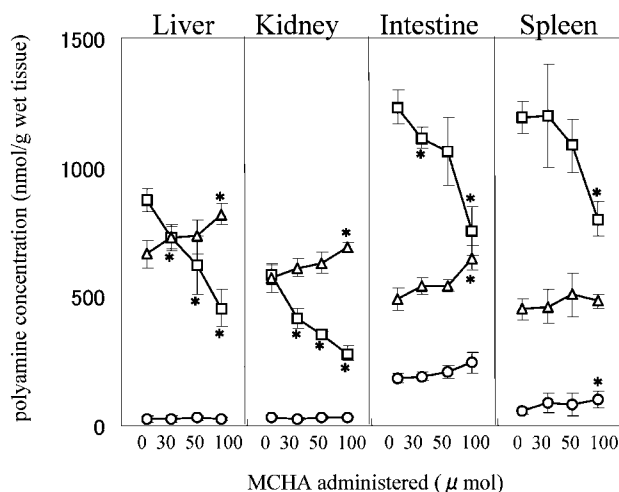


Fig. 6. Changes in Polyamine Levels in Rat Tissues Administered Different Doses of MCHA Once Daily for One Week⁹²⁾

○: putrescine, □: spermidine, Δ: spermine. * $p < 0.01$, significance of the differences between control and MCHA-treated rats.

ミジン⁵⁹⁾が不足したためと考えられる。また、長期投与(1ヵ月)実験も行い、2週目以後でも1週目で観察された傾向が持続され、それに正常な成長に伴う変化が加わっただけで、その間にポリアミン濃度を対照ラットのそれに戻すような変化はみられなかった。成長の間中、スベルミン濃度は各組織であまり差はなく変わらなかったのに対して、スベルミジン濃度は各組織で大きな差があり、小腸を除けば成長に応じて減少する傾向がみられた。したがってスベルミジン:スベルミン比(spd:spm)の値は小腸を除けば成長に伴い低くなる傾向があり、MCHA投与群は対照群の下降傾向と並行して低い値を保ち続けた。以上の結果から、MCHAを長期継続投与しても見掛け上障害を与えずに、spd:spmの値が下がったラットを調整できることが分かった。

なお、MCHAとスベルミジンを同時経口投与すると、スベルミジンの取り込みはわずかしきみられず、全ポリアミンの減少がみられた。これはMCHAによるスベルミジンの減少に見合うスベルミンの増加がなかったためだった。その理由として、同時投与のスベルミジンがMCHAによるAdoMetDCの誘導を抑制したためと考えられ、MCHAと少量のスベルミジンの同時投与は組織中の全ポリアミン濃度を減少させる方法になることが分かった。なお、スベルミンの同時投与ではそのよ

うな効果は全くみられなかった。

6-2. MCHAによるラットの肝再生抑制⁹³⁾

MCHAの経口投与によるラット組織中のspd:spm値の低下は、有核細胞が増殖を停止していくときにみられるspd:spm値の低下と似ており、細胞増殖系に及ぼすMCHAの効果を見ることは特に興味があった。そこで、細胞増殖系として肝再生系を選び検討することにした。始め、ドンリュウラットにMCHA 50 μmolを毎日1回強制経口投与し7日目に2/3の部分肝切除を行い、MCHAの投与は続けながら経口的に再生肝を採取して、ポリアミン濃度、体重に対する再生肝重量比、DNA合成の目安として使われるproliferating cell nuclear antigen(PCNA)標識指標などの推移を調べた。そのとき、MCHA投与群と対照群の2日目の再生肝において、spd:spm値とPCNA標識指標の間により相関(相関係数0.925)がみられたので、その相関を確かめるために以下の検討を行った。

SDラット(雄、6週齢)に0.02%及び0.04%のMCHA塩酸塩を含む飲料水を自由に飲ませ、7日目と8日目に部分肝切除して10日目に全ラットの再生肝を採取して、それぞれ部分肝切除後3日目及び2日目の再生肝として分析した。3日目の再生肝で、体重に対する再生肝重量百分率をみると、対照群に比べて0.02%及び0.04%MCHA処置群は有意差をもって減少しており、MCHAによる肝再生抑制効果がみられた。ポリアミン濃度の測定結果は、スベルミジンが高値を示し、2日目の再生肝では3群間で差はみられず、3日目の再生肝で3群間に差がみえ始めたが依然として高値を維持していた。スベルミンは、処置群において、2日目の再生肝で既に対照群に比べて有意差を持って増大していた。そこで、各ラットについて、体重に対する再生肝重量百分率とspd:spm値をプロットして相関をみたのがFig. 7である。3日目の再生肝ではその相関係数は0.952となり、spd:spm値と肝再生の間に密接な関係があることが明らかになった。2日目の再生肝では相関係数は0.776であったが時間とともによい相関にシフトしていく様子も明らかになった。同じ再生肝について、PCNA標識指標と有糸分裂細胞指標を測定した結果がTable 2である。2日目の再生肝のPCNA標識指標とspd:spm値の間にはある程度の相関が認められたが、3日目の再生肝で

は全く認められなかった。一方、3日目の再生肝の有糸分裂細胞指標をみると、3群間で明らかに有意の差がみられMCHAによる肝再生抑制効果と矛盾していない。そこで、0.04% MCHA 処置群にみられるPCNA 標識指標の高値と有糸分裂細胞指標の低値は、細胞周期においてS期の細胞がM期に移行するのが抑制されS期に蓄積されたと考えれば説明できる。また、そのような見方で2日目の再生肝にみられるPCNA 標識指標とspd : spm 値との相関は、G₁期の細胞がS期に移行するのに制約が掛かった状態と考えられ、いずれにせよspd : spm 値を下げるにより細胞周期の進行に制約が掛かり、その結果として肝再生の抑制がみられたと結論することができた。培養細胞を用いて、細胞周期におけるODCの二相性の誘導(G₁/SとG₂/M)^{57,94)}はよく知られており、そのときに恐らくスペルミジ

ンを必要とする細胞内反応があり、この結果はそれとよく合っている。

細胞の増殖、分裂がポリアミンの濃度や相対比の変化により影響されることは多くの現象から議論の余地はない。しかし、それを具体的に証明することは難しかったが、スペルミジン合成酵素を阻害することによりspd : spm 値との密接な関係が始めて明らかになった。肝再生系のみならず、代謝回転が盛んな小腸や皮膚でもMCHAによる抑制効果が観察されており、正常細胞においてspd : spm 値が下がることは細胞分裂にとっては抑制的雰囲気を作ると考えられる。これまで、ポリアミンを調節して細胞増殖を抑制しようとする研究は、細胞死を目指してポリアミンを枯渇又は減らすことに関心が向けられてきたが、spd : spm 値を下げる考え方があることを本研究は示した。これは細胞死を目指すのではなく細胞増殖抑止を目指している。この考え方を癌の治療にいかに関結び付けていくかは今後の課題であるが、動物個体との関連で増殖速度が遅くなれば癌との共生も夢ではないだろうし、また、正常細胞の増殖を抑えることによりS期選択的に働く薬剤に対する正常細胞の感受性が低められるならば、その薬剤の用量増加や毒性軽減に繋がるかも知れない。それが可能としても、MCHA及びその代謝物が生体に対しどのような好ましくない影響を及ぼすかについて十分検討が必要であることはいうまでもない。

7. おわりに

ポリアミンとの出会いから35年、動物でのスペルミジン合成酵素の阻害を目指して愚直に研究を続けてきた。ポリアミン研究の中でこの分野はあまり関心が払われてこなかったこともあり、研究の各段階で手造りの方法論の導入が必要だった。また、研究を進める上で大きな壁に立ち向かったとき、その折々に周辺学問の進歩が後押ししてくれ、問題解決

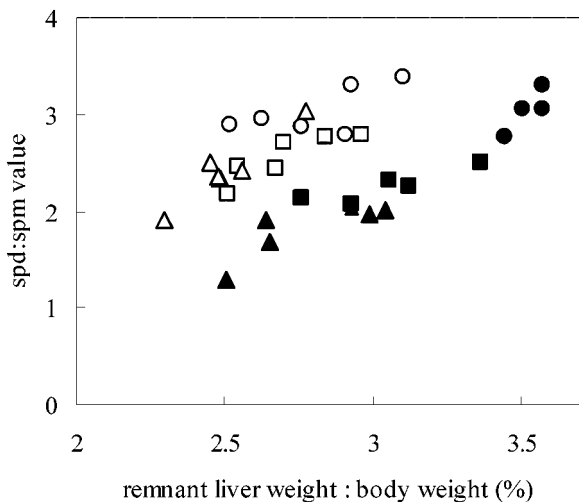


Fig. 7. Correlation between the Spd: Spm Value and the Percentage Ratio of Remnant Liver Weight to Body Weight on Day 2 and Day 3 after Partial Hepatectomy⁹³⁾

On day 2; ○: control rats, □: 0.02% MCHA-treated rats, △: 0.04% MCHA-treated rats, on day 3; ●: control rats, ■: 0.02% MCHA-treated rats, ▲: 0.04% MCHA-treated rats.

Table 2. Percentage Index of PCNA Positive Cells and Mitotic Cells in Total Hepatocytes of Remnant Liver on Days 3 and 2 after PH

	Day 3 after PH		Day 2 after PH	
	PCNA	Mitotic cells	PCNA	Mitotic cells
Control	76.6 ± 14.1	2.2 ± 0.5	88.5 ± 6.4	2.1 ± 0.9
0.02% MCHA	75.6 ± 7.7	1.0 ± 0.7*	85.2 ± 5.4	1.2 ± 0.4
0.04% MCHA	84.7 ± 8.7	0.5 ± 0.4***	77.3 ± 5.3*	1.2 ± 0.7

Values in the Table are shown as %, mean ± S.D. (n=4-6). * p<0.05, *** p<0.001, significance of the differences between control and 0.02% or 0.04% MCHA.

の力となり、幸い初期の目標を達成することができた。MCHAによるスベルミジン合成酵素の阻害で分かったことは、ODCは誘導されずAdoMetDCは誘導され、スベルミジンの経口投与はAdoMetDCの誘導を抑制すること、及びspd:spm値が下がると細胞周期の進行が遅れ生育抑制に繋がることなどである。スベルミジン合成酵素の阻害はODCの誘導がないため結果の解釈が容易であった。ポリアミンの調節を考えるとこれらの知見は重要であり、将来、癌治療に向けた一石になることを望んで止まない。

テーマを母からもらい、長きに亘る研究の間に父親、妻の両親を癌で失い、その上、学生時代から癌をとともに語り合い、将来の共同研究を誓い合った親愛なる級友、東京大学医科学研究所教授(ウイルス)故 渋谷 博博士、及び小山市市民病院長(外科)故 原 啓一博士まで若くして癌で亡くし、その度に天を仰ぎ慨嘆し自分の宿命を感じながら研究に取り組んできた。その間1日たりとも忘れない敬愛する彼らに得られた成果を捧げる。

謝辞 言うまでもなく、本研究は私を支えてくれた多くの人達の協力の賜物である。(財)東京生化学研究所時代の所員及び城西大学薬学部時代の教職員の皆さんを始めとして、薬品分析化学教室で昼夜を分かたず研究に没頭してくれた大学院生の皆さんの献身的な協力に対し、改めて心から厚く御礼を申し上げます。なお、本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金により行われた。重ねて御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Samejima K., Dairman W., Udenfriend S., *Anal. Biochem.*, **42**, 222–236 (1971).
- 2) Samejima K., Dairman W., Stone J., Udenfriend S., *Anal. Biochem.*, **42**, 237–247 (1971).
- 3) Samejima K., *FARUMASHIA*, **10**, 56–60 (1974).
- 4) Smith T. J., *Endeavour*, **XXXI**, 22–28 (1972).
- 5) Cohen S. S., “Introduction to the Polyamines,” Prentice-Hall, Inc., N.J., 1971.
- 6) Bachrach U., “Function of Naturally Occurring Polyamines,” Academic Press, Inc., New York, 1973.
- 7) Russell D. H. (eds.), “Polyamines in Normal and Neoplastic Growth,” Raven Press, New York, 1973.
- 8) Samejima K., *Yakugaku Zasshi*, **117**, 690–699 (1997).
- 9) Leeuwenhoek A. van., *Philos. Trans. R. Soc.*, **12**, 1040 (1678).
- 10) Dudley H. W., Rosenheim O., Starling W. W., *Biochem. J.*, **20**, 1082 (1926).
- 11) Wrede F., Fanslow H., Strack E., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **161**, 66 (1926).
- 12) Tabor C. W., Tabor H., *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 285–306 (1976).
- 13) Williams-Ashman H. G., Corti A., Tadolini B., *Ital. J. Biochem.*, **25**, 6–32 (1976).
- 14) Campbell R. A., Morris D. R., Bartos D., Daves C. D., Bartos F. (eds.), “Advances in Polyamine Research Vol. 1 and 2,” Raven Press, New York, 1978.
- 15) Caldarera C. M., Zappia V., Bachrach U. (eds.), “Advances in Polyamine Research Vol. 3,” Raven Press, New York, 1981.
- 16) Jänne J., Pösö H., Raina A., *Biochim. Biophys. Acta*, **473**, 241–293 (1978).
- 17) Maudsley D. V., *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 153–161 (1979).
- 18) Raina A., Jänne J., *Med. Biol.*, **59**, 269–461 (1981).
- 19) Morris D. R., Marton L. J. (eds.), “Polyamines in Biology and Medicine,” Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1981.
- 20) Scalabrino G., Ferioli M. E., *Adv. Cancer Res.*, **35**, 151–267 (1981).
- 21) Scalabrino G., Ferioli M. E., *Adv. Cancer Res.*, **36**, 1–102 (1982).
- 22) Pegg A. E., McCann P. P., *Am. J. Physiol.*, **243**, c212–c221 (1982).
- 23) Minisymposium, *Fed. Proc.*, **41**, 3061–3088 (1982).
- 24) Tabor H., Tabor C. W. (eds.), “Methods in Enzymology Vol. 94, Polyamines,” Academic Press, New York, 1983.
- 25) Pegg A. E., Hibasami H., Matsui I., Bethell D. R., *Adv. Enzyme Reg.*, **19**, 427–451 (1981).
- 26) Ferro A. J., Barrett A., Shapiro S. K., *J. Biol. Chem.*, **253**, 6021–6025 (1978).
- 27) Backlund P. S., Smith R. A., *J. Biol. Chem.*,

- 256, 1533–1535 (1981).
- 28) Trackman P. C., Abeles R. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **103**, 1238–1244 (1981).
- 29) Metcalf B. W., Bey P., Danzin C., Jung M. J., Casara P., Vevert J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 2551–2553 (1978).
- 30) Fozard J. R., Part M.-L., Prakash N. J., Grove J., Schechter P. J., Sjoerdsma A., Koch-Weser J., *Science*, **208**, 505–508 (1980).
- 31) Luk G. D., Marton L. J., Baylin S. B., *Science*, **210**, 195–198 (1980).
- 32) Bacchi C. J., Nathan H. C., Hutner S. H., McCann P. P., Sjoerdsma A., *Science*, **210**, 332–334 (1980).
- 33) Pegg A. E., Seely J., Zagon I. S., *Science*, **217**, 68–70 (1982).
- 34) Oka T., Perry J. W., Kano K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **79**, 979–986 (1977).
- 35) Jamieson G. A., *J. Org. Chem.*, **28**, 2397–2400 (1963).
- 36) Samejima K., Nakazawa Y., Matsunaga I., *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1480–1485 (1978).
- 37) Cornforth J. W., Reichard S. A., Talalay P., Carrell H. L., Glusker J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 7292–7300 (1977).
- 38) De la Haba G., Jamieson G. A., Mudd S. H., Richards H. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3975–3980 (1959).
- 39) Wu S.-E., Huskey W. P., Borchardt R. T., Schowen R. L., *Biochemistry*, **22**, 2828–2832 (1983).
- 40) Wagner J., Hirth Y., Piriou F., Zakett D., Claverie N., Danzin C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **133**, 546–553 (1985).
- 41) Bowman W. H., Tabor C. W., Tabor H., *J. Biol. Chem.*, **248**, 2480–2486 (1973).
- 42) Pajula R.-L., Raina A., Eloranta T., *Eur. J. Biochem.*, **101**, 619–626 (1979).
- 43) Kameji T., Murakami Y., Fujita K., Hayashi S., *Biochim. Biophys. Acta*, **717**, 111–117 (1982).
- 44) Seely J. E., Pösö H., Pegg A. E., *Biochemistry*, **21**, 3394–3399 (1982).
- 45) Seyfried C. E., Oleinik O. E., Degen J. L., Resing K., Morris D. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **716**, 169–177 (1982).
- 46) Poso H., Pegg A. E., *Biochemistry*, **21**, 3116–3122 (1982).
- 47) Samejima K., Kawase M., Sakamoto S., Okada M., Endo Y., *Anal. Biochem.*, **76**, 392–406 (1976).
- 48) Samejima K., Nakazawa Y., *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 241–246 (1980).
- 49) Samejima K., Yamanoha B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **216**, 213–222 (1982).
- 50) Takeda Y., Samejima K., Nagano K., Watanabe M., Sugeta H., Kyogoku Y., *Eur. J. Biochem.*, **130**, 383–389 (1983).
- 51) Ando T., Yamawaki J., *Chem. Lett.*, 45–46 (1979).
- 52) Samejima K., Takeda Y., Kawase M., Okada M., Kyogoku Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3428–3435 (1984).
- 53) Samejima K., Furukawa M., Haneda M., *Anal. Biochem.*, **147**, 1–9 (1985).
- 54) Niitsu M., Samejima K., Matsuzaki S., Hamana K., *J. Chromatogr.*, **641**, 115–123 (1993).
- 55) Tabor C. W., Tabor H., *Microbiol. Rev.*, **49**, 81–99 (1985).
- 56) Pegg A. E., *Biochem. J.*, **234**, 249–262 (1986).
- 57) McCann P. P., Pegg A. E., Sjoerdsma A. (eds.), “Inhibition of Polyamine Metabolism,” Academic Press, Inc., San Diego, 1987.
- 58) Pegg A. E., *Cancer Res.*, **48**, 759–774 (1988).
- 59) Davis R. H., Morris D. R., Coffino P., *Microbiol. Rev.*, **56**, 280–290 (1992).
- 60) Sessa A., Perin A., *Agents Actions*, **43**, 69–77 (1994).
- 61) Pegg A. E., Poulin R., Coward J. K., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **27**, 425–442 (1995).
- 62) Marton L. J., Pegg A. E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **35**, 55–91 (1995).
- 63) Seiler N., Delcros J. G., Moulinoux J. P., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28**, 843–861 (1996).
- 64) Cohen S. S., “A Guide to the Polyamines,” Oxford Univ. Press, Oxford, 1998.
- 65) Thomas T., Thomas T. J., *J. Cell Mol. Med.*, **7**, 113–126 (2003).
- 66) Hibasami H., Tanaka M., Nagai J., Ikeda T., *FEBS Lett.*, **116**, 99–101 (1980).
- 67) Batchelor K. W., Smith R. A., Watson N. S., *Biochem. J. Lett.*, **233**, 307–308 (1985).
- 68) Tang K.-C., Pegg A. E., Coward J. K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **96**, 1371–1377 (1980).

- 69) Coward J. K., Pegg A. E., *Adv. Enzyme Regul.*, **26**, 107–113 (1987).
- 70) Shirahata A., Morohoshi T., Samejima K., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3220–3222 (1988).
- 71) Shirahata A., Morohoshi T., Fukai M., Akatsu S., Samejima K., *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 205–212 (1993).
- 72) Shirahata A., Takahashi N., Beppu T., Hosoda H., Samejima K., *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 1897–1903 (1993).
- 73) Tabor C. W., Tabor H., *J. Biol. Chem.*, **262**, 16037–16040 (1987).
- 74) Wahlfors J., Alhonen L., Kauppinen L., Hyvönen T., Jänne J., Eloranta T. O., *DNA Cell Biol.*, **9**, 103–110 (1990).
- 75) Myohanen S., Wahlfors J., Alhonen L., Jänne J., *DNA Seq.*, **4**, 343–346 (1994).
- 76) Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M., *Science*, **246**, 64–71 (1989).
- 77) Wada M., Amano D., Hosoda H., Shirahata A., Samejima K., Pegg A. E., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 889–895 (1999).
- 78) Wu J., Gage D. A., Watson J. T., *Anal. Biochem.*, **235**, 161–174 (1996).
- 79) Wu J., Watson J. T., *Anal. Biochem.*, **258**, 268–276 (1998).
- 80) Korolev S., Ikeguchi Y., Skarina T., Beasley S., Arrowsmith C., Edwards A., Joachimiak A., Pegg A. E., Savchenko A., *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 27–31 (2002).
- 81) Goda H., Watanabe T., Takeda N., Kobayashi M., Wada M., Hosoda H., Shirahata A., Samejima K., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1327–1332 (2004).
- 82) Ganbe T., Ohnuma M., Sato T., Kumasaka T., Oshima T., Tanaka N., Abstracts of papers, International Conference on Polyamines, Chiba, 2004, p. 98.
- 83) Dejima H., Kobayashi M., Takasaki H., Takeda N., Shirahata A., Samejima K., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1005–1008 (2003).
- 84) Karas M., Hillenkamp F., *Anal. Chem.*, **60**, 2299–2301 (1988).
- 85) Furuumi N., Amano D., Xu Y.-J., Samejima K., Niitsu M., Shirahata A., *Anal. Biochem.*, **265**, 253–259 (1998).
- 86) Xu Y.-J., Furuumi N., Samejima K., Niitsu M., Shirahata A., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1021–1026 (2000).
- 87) Hara T., Xu Y.-J., Sasaki H., Niitsu M., Samejima K., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, **43**, 1005–1011 (2000).
- 88) Xu Y.-J., Hara T., Samejima K., Sasaki H., Kobayashi M., Takahashi A., Niitsu M., *Anal. Biochem.*, **301**, 255–260 (2002).
- 89) Kobayashi M., Xu Y.-J., Samejima K., Goda H., Niitsu M., Takahashi M., Hashimoto Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 285–288 (2003).
- 90) Kobayashi M., Samejima K., Hiramatsu K., Kawakita M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 372–374 (2002).
- 91) Hiramatsu K., Miura H., Kamei S., Iwasaki K., Kawakita M., *J. Biochem. (Tokyo)*, **124**, 231–236 (1998).
- 92) Kobayashi M., Watanabe T., Xu Y.-J., Tatemori M., Goda H., Niitsu M., Shirahata A., Samejima K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 569–573 (2005).
- 93) Kobayashi M., Takao K., Shiota Y., Sugita Y., Takahashi M., Nakae D., Samejima K., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 863–867 (2006).
- 94) Ackermann J. M., Pegg A. E., McCloskey D. E., *Prog. Cell Cycle Res.*, **5**, 461–468 (2003).