

ポリアミンの細胞毒性

村 上 恵 子, 細 川 好 孝, 吉 野 昌 孝
(愛知医大・医・生化*)

Cytotoxic Effects of Polyamines

Keiko MURAKAMI, Yoshitaka HOSOKAWA and Masataka YOSHINO
Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine

Summary

Prooxidant effects of polyamines were analyzed by using permeabilized yeast cells and purified yeast glutathione reductase.

1. Polyamine stimulated NADH-dependent inactivation of aconitase in the presence of cyanide, implying that the superoxide-generating enzyme with NADH was activated by polyamines. Polyamines further stimulated NADPH-dependent inactivation of aconitase in the presence of menadione and cyanide, suggesting the activation of NADPH/naphthoquinone-dependent production of superoxide. The order of effectiveness of polyamines as activators was spermine > spermidine. Putrescine showed little effect.

2. Glutathione reductase, the principal enzyme scavenging reactive oxygen species, was inhibited by polyamines.

Polyamine-dependent production of reactive oxygen and the inhibition of the activity scavenging reactive oxygen may explain the cytotoxic effects of these compounds.

ポリアミン (スペルミン, スペルミジン, プトレシン) はタンパク合成の促進因子として知られている¹⁾が,他にも多くの酵素を活性する機能を持つことが明らかになっている。われわれはエネルギー代謝,とくにTCAサイクルの酵素の活性化を報告して来た²⁻⁵⁾。ポリアミンはさらにDNAと結合して転写調節ひいては細胞増殖にかかわる成長因子としての働き^{6,7)},またアンチオキシダントとして細胞死を防ぐ働きも報告されている⁸⁾。しかし一方でポリアミンはアミノオキシダーゼによって酸化的に分解される際,活性酸素を産生し⁹⁾,さらに細胞死を誘導することが見出されている¹⁰⁾。今回はポリアミンの活性酸素生成に注目し,その生成と分解に対するポリアミンの効果を検討した。

材料と方法

1. 試薬と実験材料

パン酵母, NADP依存性イソクエン酸脱水素酵素, グルタチオンレダクターゼーオリエンタル酵母。スペルミン, スペルミジン, プトレシン, 酸化型グルタチオン (GSSG) ーシグマ。NADH, NADP, NADPHーロッシュ。

2. 透過性パン酵母の調製

市販のパン酵母を4倍量の0.5 M ソルビトールを含む

0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し, 緩衝液と等量のトルエンを加えた。43°Cで2分間加温後, 遠心分離によって上清を除き, 4倍量の0.5 M ソルビトールを含む50 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) に懸濁した。これによって酵母は透過性を増しアコニターゼ活性を細胞そのまま (*in situ*) で測定できるようになる¹¹⁾。

3. アコニターゼの失活

10 mg/mL の透過性パン酵母をポリアミン, NADH, NADP あるいは NADPH とともに 50 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) 中で5分間加温後, 800 × g にて5分間遠心し, 沈殿した酵母を4倍量の0.5 M ソルビトールを含む50 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) に懸濁した。

4. 活性酸素を処理する酵素の阻害

スーパーオキシドアニオンラジカルを処理する Cu/ZnSOD, シトクロム c オキシダーゼに対してシアン化カリウムを添加した。

5. アコニターゼ活性の測定

5 mM クエン酸, 0.25 mM NADP, 4 mM MgCl₂, 10 mU/mL NADP-イソクエン酸脱水素酵素, 100 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.8), 1 mg/mL パン酵母存在下に 340 nm の

*所在地: 愛知県愛知郡長久手町岩作雁又 21 (〒480-1195)

吸光度増加を測定して算出した。

6. グルタチオンレダクターゼの測定

各濃度の GSSG, NADPH, 100 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.8) 存在下に 340nm の吸光度減少を記録して算出した。

結果

透過性酵母のアコニターゼは 0.1mM の NADH とシアン化カリウム存在下で失活し、この失活はスベルミンの添

加により増強される一方、NADH なしでは失活は起きなかった (Fig. 1A)。この結果は酵母が NADH を基質としてスーパーオキシドアニオンラジカルを産生する酵素活性を持ち、スベルミンはこの酵素を活性化することを示すと考えられる。スベルミジンもこの失活を増強したが、プトレシンには効果がなかった (Fig. 1B)。

0.1 mM NADPH はそれのみではシアン化カリウム存在下でも失活効果を持たないがメナジオンを同時に加えることによりアコニターゼを失活させた。スベルミンはこの効果を増強した (Fig. 2A)。スベルミンは NADPH なしで

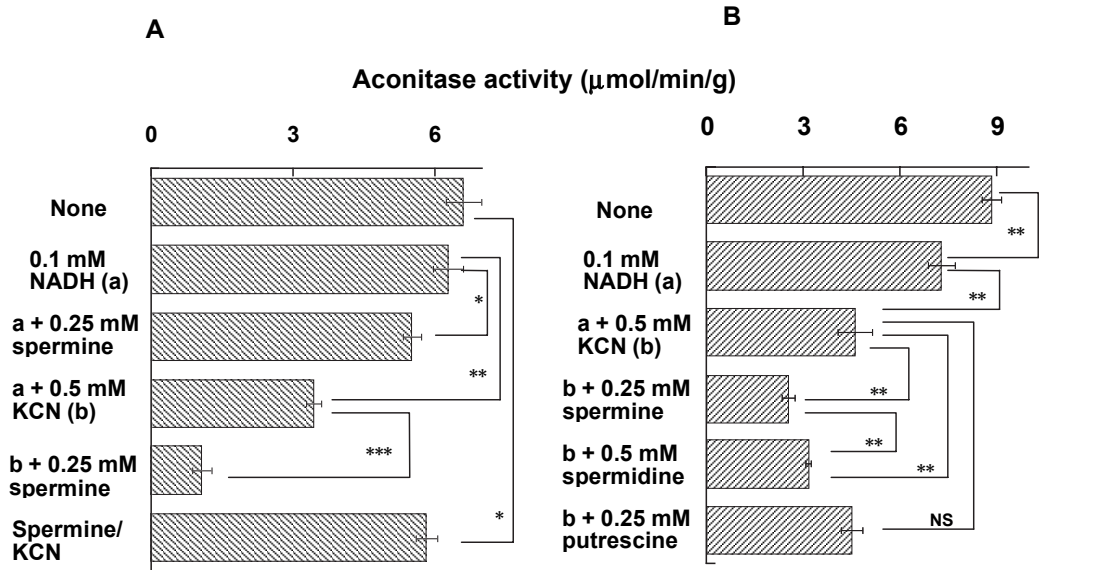


Fig. 1 Effects of polyamines on the activity of aconitase in permeabilized yeast cells in the presence of NADH and KCN. Baker's yeast cells were permeabilized according to the method reported previously⁸⁾. Permeabilized yeast cells (10 mg/mL) were mixed with 0.1 mM NADH, 0.5 mM KCN and polyamines at the indicated concentrations in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1). After incubation at 37°C for 5 min, cells were collected by centrifugation at 800 × g for 5 min and suspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.1) containing 0.5 M sorbitol at the concentration of 200 mg/mL. Aconitase activity was determined by the coupling with NADP-isocitrate dehydrogenase, and the reaction mixture contained 5 mM citrate, 0.25 mM NADP, 4 mM MgCl₂, 10 mU/mL of NADP-isocitrate dehydrogenase and 1 mg/mL of yeast in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8). The increase in the absorbance at 340 nm was recorded. NS, not significant; *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001.

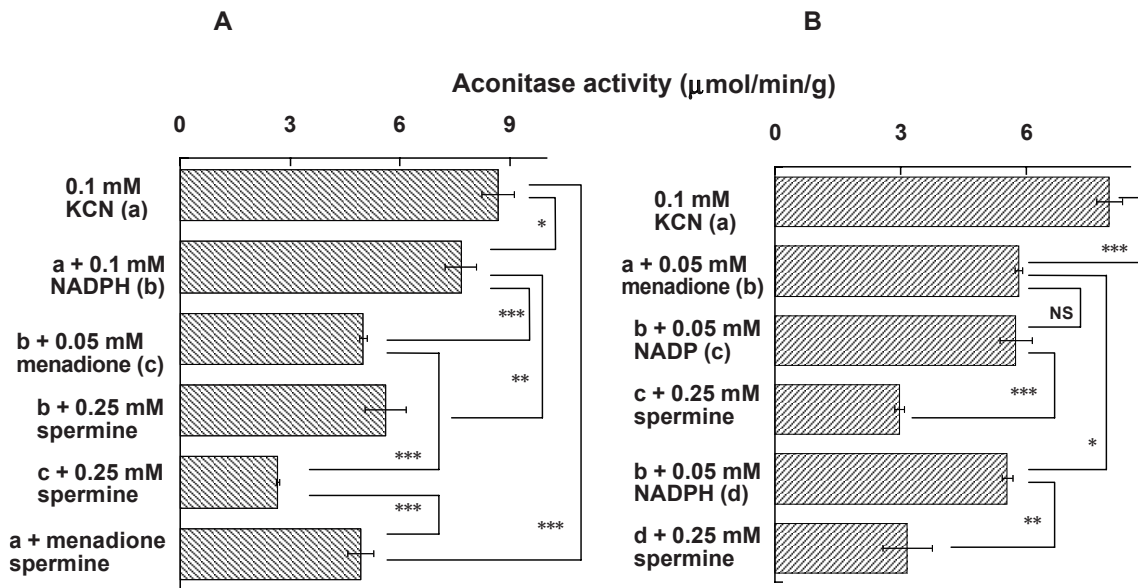


Fig. 2 Effect of spermine on the activity of aconitase in permeabilized yeast cells in the presence of NADP(H), menadione and KCN. Experimental conditions and symbols used were similar to those in Fig. 1.

もある程度の失活効果を示した。NADPH/ナフトキノンを基質とする活性酸素生成酵素にはポリアミン（あるいはカチオン）が必須であると推測される。NADPもNADPHと同程度の失活効果を示し、NADPH依存性脱水素酵素の基質を必要としなかった (Fig. 2B)。

NADP/メナジオン/シアン存在下でポリアミンの有効濃度を検討した結果を Fig. 3 に示す。スベルミンもスベ

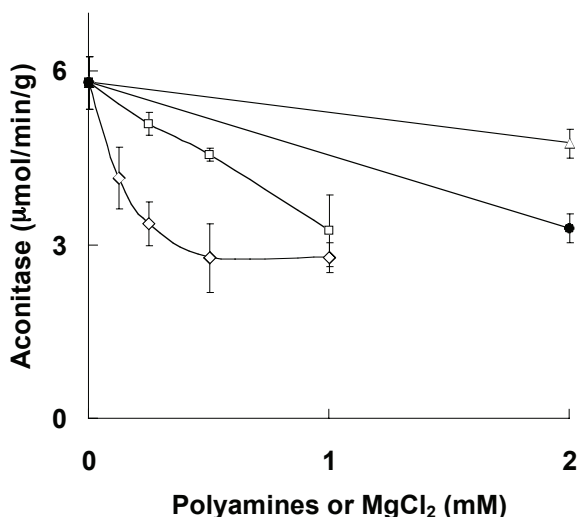


Fig. 3 Effects of polyamines and MgCl₂ on the activity of aconitase in permeabilized yeast in the presence of 0.02 mM NADP, 0.05 mM menadione and 0.1 mM KCN. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 1. ◇, spermine; □, spermidine; △, putrescine; ●, MgCl₂.

ルミジンも最終的に得られる効果は同じだが、スベルミンの方が低濃度で有効だった。プトレシンの効果は金属イオンのマグネシウムより弱かった。

活性酸素の処理系には還元型グルタチオンが重要である。グルタチオンを還元するグルタチオンレダクターゼ（精製酵素）に対するスベルミンの効果を検討した。有効阻害濃度は10 mM 前後ではほぼ生理的濃度と考えられる。GSSG濃度の変化で阻害の強さは変化せず (Fig. 4A), スベルミンの作用はNADPHに対して競合的と考えられた (Fig. 4B)。スベルミジンも阻害を示したが、プトレシンの効果は弱かった (data not shown)。

考 察

ポリアミンは低濃度でNADHあるいはナフトキノンを基質として活性酸素を生成する酵素を活性化し、高濃度でグルタチオンレダクターゼを阻害することが示された。酵母の活性酸素生成酵素については以前に本会で報告した^{12, 13)}。グルタチオンレダクターゼは活性酸素処理に重要であり、その阻害はヒトに溶血を来す（一方でマラリアに有効である）ことが知られている¹⁴⁾。細胞内濃度のポリアミン（スベルミン）による活性酸素の生成およびグルタチオンレダクターゼの阻害は、ポリアミンのプロオキシダント作用を説明できる。しかしポリアミン、とくにスベルミンは多くの生物における成長因子であり、酵母細胞の好気条件における増殖過程には必須である。さらに活性酸素処理に

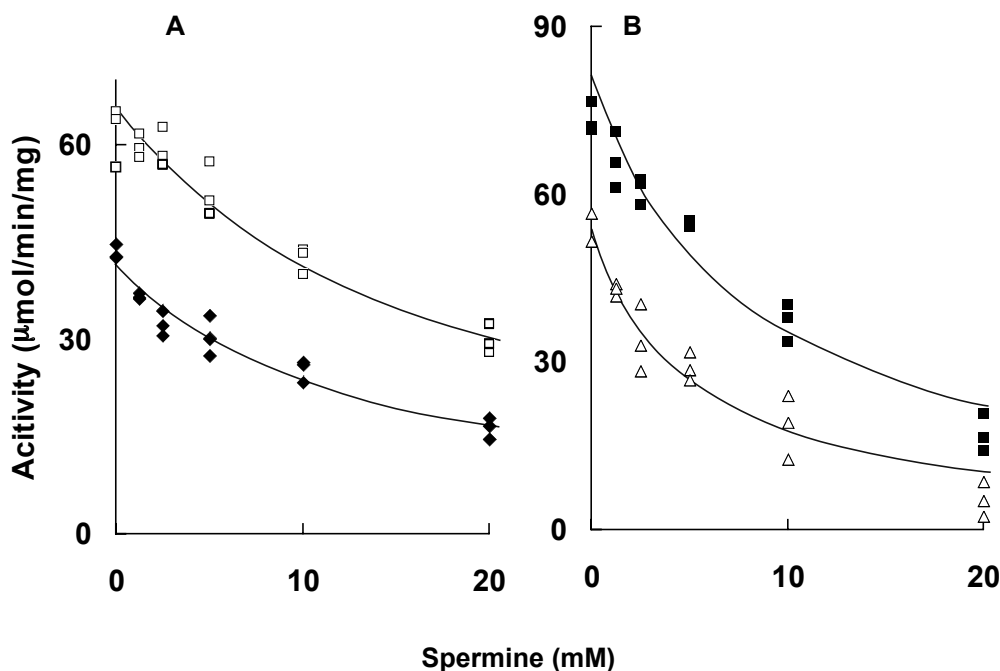


Fig. 4 Effect of spermine on the activity of yeast glutathione reductase (GR). Purified enzyme at the concentration of 0.5 or 1 μg/mL was mixed with GSSG and NADPH in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8) at 37°C. The decrease in the absorbance at 340 nm was recorded. Fig. 4A. Activity of GR in the presence of 0.05 mM NADPH and the indicated concentrations of GSSG and spermine. ◆, GSSG 0.05 mM; □, GSSG 0.1 mM. Fig. 4B. Activity of GR in the presence of 0.1 mM GSSG and indicated concentrations of NADPH and spermine. △, NADPH 12.5 μM; ■, NADPH 25 μM.

必須のNADPHを再生するグルコース6-リン酸脱水素酵素, NADP-イソクエン酸脱水素酵素は低濃度のスペルミンで強力に活性化される⁵⁾。活性酸素生成酵素が, 中でもNADPHを基質とする酵素がスペルミンによる活性化を受けることはパラドキシカルな結果であり, その生理的意義についてはさらに探求が必要であると考ええる。

参考文献

- 1) Hunter AR, Farrell PJ, Jackson RJ, Hunt T (1977) The Role of polyamines in cell-free protein synthesis in the wheat-germ system, *Eur J Biochem* 75: 149-157.
- 2) Yoshino M, Murakami K (1980) The role of AMP deaminase reaction in the regulation of phosphofructokinase in yeast. Role of polyamine, *Biochem Int* 1: 84-90.
- 3) Yoshino M, Murakami K, Yamada Y (1990) Reversal by polyamine of the aluminum-induced inhibition of hexokinase from human brain, *Biomed Res* 11: 215-218.
- 4) Yoshino M, Yamada Y, Murakami K (1991) Activation by spermine of citrate synthase from porcine heart, *Biochim Biophys acta* 1073: 200-202.
- 5) Tanemura Y, Murakami K, Haneda M, Yoshino M (2004) Polyamine enhances the regeneration of reduced glutathione by the activation of NADP-dependent dehydrogenases in yeast, *Biomed Res* 25: 69-74.
- 6) Pegg AE (1986) Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes, *Biochem J* 234: 249-262.
- 7) Thomas T, Thomas TJ (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications, *Cell Mol Life Sci* 58: 244-258.
- 8) Matkovics B, Kecskemeti V, Varga SI, Novak Z, Kertesz Zs (1993) Antioxidant properties of di- and polyamines, *Comp Biochem Physiol* 104B: 475-479.
- 9) Marra M, Lombardi A, Agostinelli E, Giuberti G, Zappavigna S, Tempera G, Vitale G, Bifulco A, Abbruzzese A, Garaglia M (2008) Bovine serum amine oxidase and spm potentiate docetaxel and interferon- α effects in inducing apoptosis on human cancer cells through the generation of oxidative stress, *Biochim Biophys Acta* 1783: 2269-2278.
- 10) Schipper RG, Penning LC, Albert, Verhofstad AAJ (2000) Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors?, *Seminars in Cancer Biol* 10: 55-68.
- 11) Murakami K, Nagura H, Yoshino M (1980) Permeabilization of yeast cells: Application to study on the regulation of AMP deaminase activity *in situ*, *Anal Biochem* 105: 407-413.
- 12) 村上恵子, 羽根田みや子, 吉野昌孝 (2006) メナジオンによる活性酸素の生成, *微量栄養素研究* 23: 63-68.
- 13) 村上恵子, 細川好孝, 吉野昌孝 (2009) アロエ成分のアントラキノン化合物による活性酸素種の生成, *微量栄養素研究* 26: 50-53.
- 14) Färber PM, Arscott LD, Williams Jr. CH, Becker K, Schirmer RH (1998) Recombinant Plasmodium falciparum glutathione reductase is inhibited by the anti-malarial dye methylene blue, *FEBS lett* 422: 311-314.