

NMDA 受容体によるポリアミンの輸送ならびに
シェーグレン症候群におけるポリアミン代謝物：
アクロレイン抱合タンパク質の上昇

2015 年

廣瀬 直雄

目次

1. NMDA 受容体によるポリアミンの輸送	1
1-1. 序論	2
1-2. 実験方法	8
1-3. 結果	12
1-4. 考察	22
2. シェーグレン症候群におけるポリアミン代謝物： アクロレイン抱合タンパク質の上昇	24
2-1. 序論	25
2-2. 実験方法	27
2-3. 結果	30
2-4. 考察	40
3. 結論	42
4. 参考文献	43
5. 論文目録	54
6. 謝辞	55
7. 審査委員	56

第 1 章 NMDA 受容体によるポリアミンの輸送

1-1.序論

ポリアミンは、生物に普遍的に存在する生理活性アミンであり、第一級アミンを2つ以上もつ（直鎖）脂肪族炭化水素の総称である。生体内においては、主として2価カチオンのプトレッシン〔 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 〕(PUT)、3価カチオンのスペルミジン〔 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 〕(SPD)、4価カチオンのスペルミン〔 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 〕(SPM)の3種類が存在している (Fig. I-1)。ポリアミンは生体内においては主としてRNAと相互作用して存在し、RNAの構造変化を引き起こすことで、特定の蛋白質の発現を翻訳レベルで調節し、細胞の増殖・分化に寄与している。[1,2]

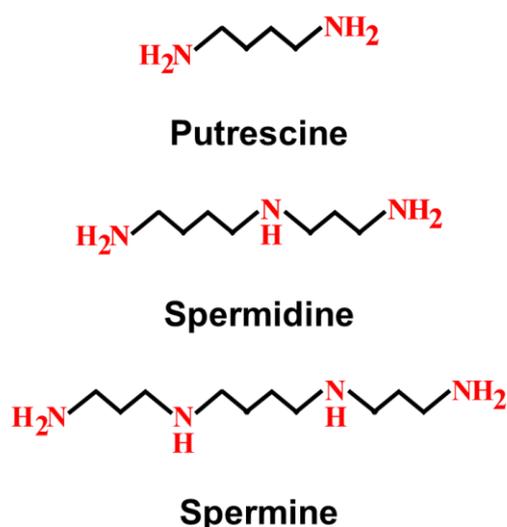


Fig. I-1 Structures of polyamines

NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartate) 受容体は、中枢神経系における興奮性シナプス伝達を担うグルタミン酸受容体の一種である。グルタミン酸受容体は、イオンチャネルを内蔵したチャネル型グルタミン酸受

容体と、G 蛋白と共役した代謝型グルタミン酸受容体に大別され、其々に多くのサブタイプが存在する [3-7]。NMDA 受容体は、一般的なグルタミン酸受容体が透過する Na^+ に加えて、2 価のカチオンである Ca^{2+} に対しても高い透過性を有する。NMDA 受容体のチャネル開口には、アゴニストであるグルタミン酸およびグリシンの存在に加え、細胞膜の脱分極による Mg^{2+} 閉塞阻害からの解除が必要である。長期増強において、後シナプス側での Ca^{2+} -Calmodulin dependent kinase II の活性化が必須であることから、高い Ca^{2+} 透過性を示す NMDA 受容体の脳機能における重要性が示唆される。このような特性により、NMDA 受容体は、記憶、学習の細胞レベルでの基盤と考えられているシナプス可塑性など、脳高次機能への関連が注目されてきた [8]。生体内においては主にグリシン結合部位が存在する GluN1 および、グルタミン酸結合部位が存在する GluN2 (2A-2D)のサブユニットが存在し、それぞれ細胞外 N 末端領域に大きなアミノ酸配列をもつ R-domain、アゴニストであるグルタミン酸およびグリシンが結合する A-domain、膜貫通領域である membrane domain(M1-M4)、細胞内の cytoplasmic domain から構成されている。GluN1 と GluN2 が M2 領域を取り囲むようにヘテロテトラマーを形成し、チャネル孔を形成している (Fig.I-2)。

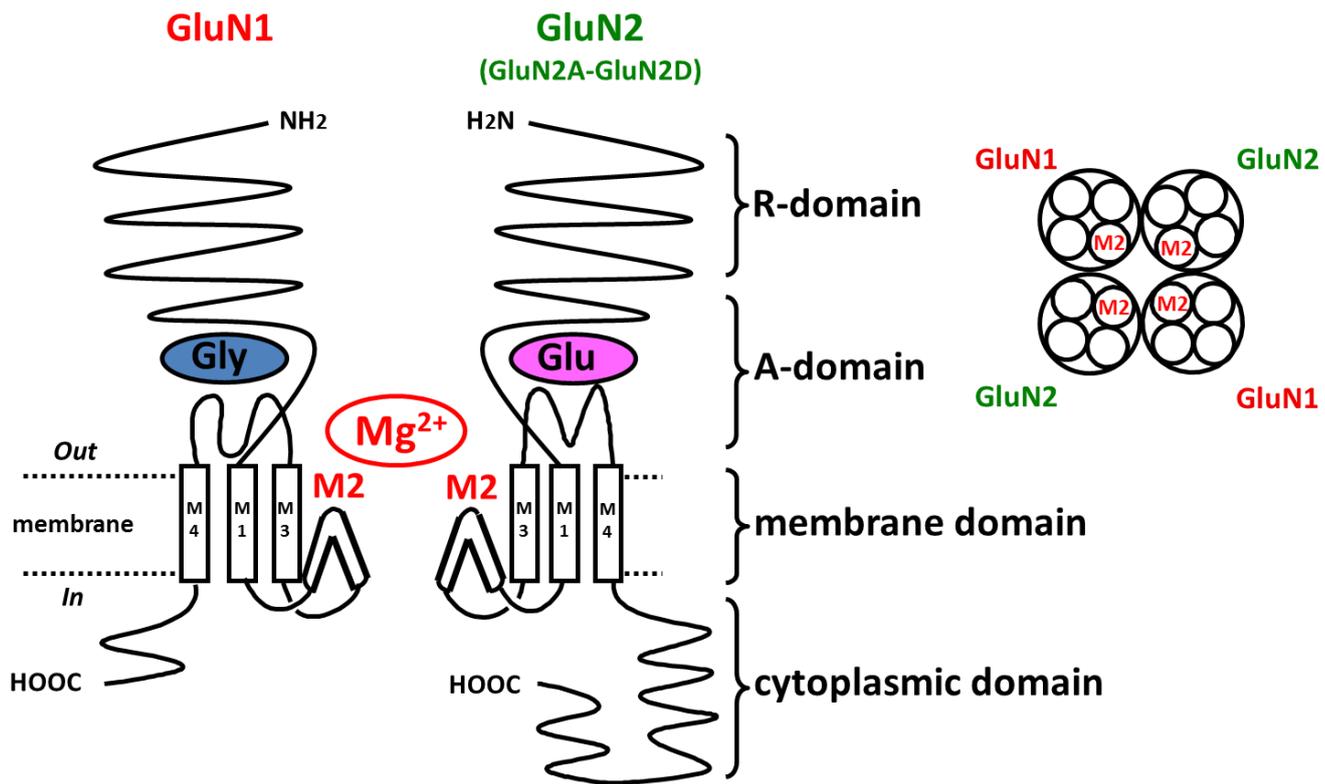


Fig. I-2 Structures of NMDA receptor.

GluN1 サブユニットには 8 種類の splicing variant が存在し、GluN2 サブユニットには 2A-2D の 4 つの遺伝子が存在する [9-13]。GluN1 サブユニットは脳全体に発現しているのに対し、GluN2 サブユニットの発現は脳の部位や発生過程により異なる。GluN2A、GluN2B は脳組織広範囲に発現しているのに対し、GluN2C は小脳顆粒細胞に発現し、GluN2D は成体ではほとんど認められず、幼弱期に発現する [14]。各サブユニットの機能は標的遺伝子破壊法により解析され、GluN1 および GluN2B のノックアウトマウスは生後すぐに死亡するのに対し、GluN2A のノックアウトマウスでは成長には異常が認められないが、記憶形成に重要な海馬 CA1 領域の長期増強に異常がみられた。また、海馬 CA1 領域の GluN1 および GluN2B をノックアウトしたマウスにおいても記憶形成に障害が認められた [15-18]。このことから、NMDA 受容体は生体に必須であるとともに、記憶形成に深く関与していることが示唆されている。

ポリアミンは細胞増殖促進因子であり、細胞増殖が盛んな組織に多く含まれているが、脳組織にも多く存在する。神経系において SPM はシナプス前細胞から放出され、脱分極時 (-20 mV) には NMDA 受容体の N 末領域への結合に依存した促進作用、静止電位 (-70 mV) では電位依存的チャネルブロック作用を有する。NMDA 受容体の活性は、様々な生理活性物質によって厳密に調節されているが、私達はポリアミン、特に SPM が NMDA 受容体の活性を調節していることを今まで報告してきた [19-23]。また、SPM による促進効果に関与する結合サイトは細胞外 N 末端領域にある R-domain に局在し [24,25]、SPM による阻害作用に関与するのは NMDA 受容体のチャネル孔領域に局在

していることを明らかにしてきた[26,27]。さらに、私達はこれまでに、SPMの構造を基にチャンネルブロッカーの開発を行う過程で、固定電位を-100~-170 mVにするとポリアミン誘導体のブロック作用が減弱すること、及びその減弱効果はGluN1のチャンネルポア領域に位置するアルギニン残基(N616)に変異が入ると顕著である事を見出している(Fig.I-3) [30]。すなわち、ポリアミンがNMDA受容体を透過する可能性が考えられた[28-32]。本研究では、NMDA受容体がポリアミン取り込み能を有するかどうかをアフリカツメガエルの卵母細胞、およびHEK293細胞を用いて詳細に検討した。

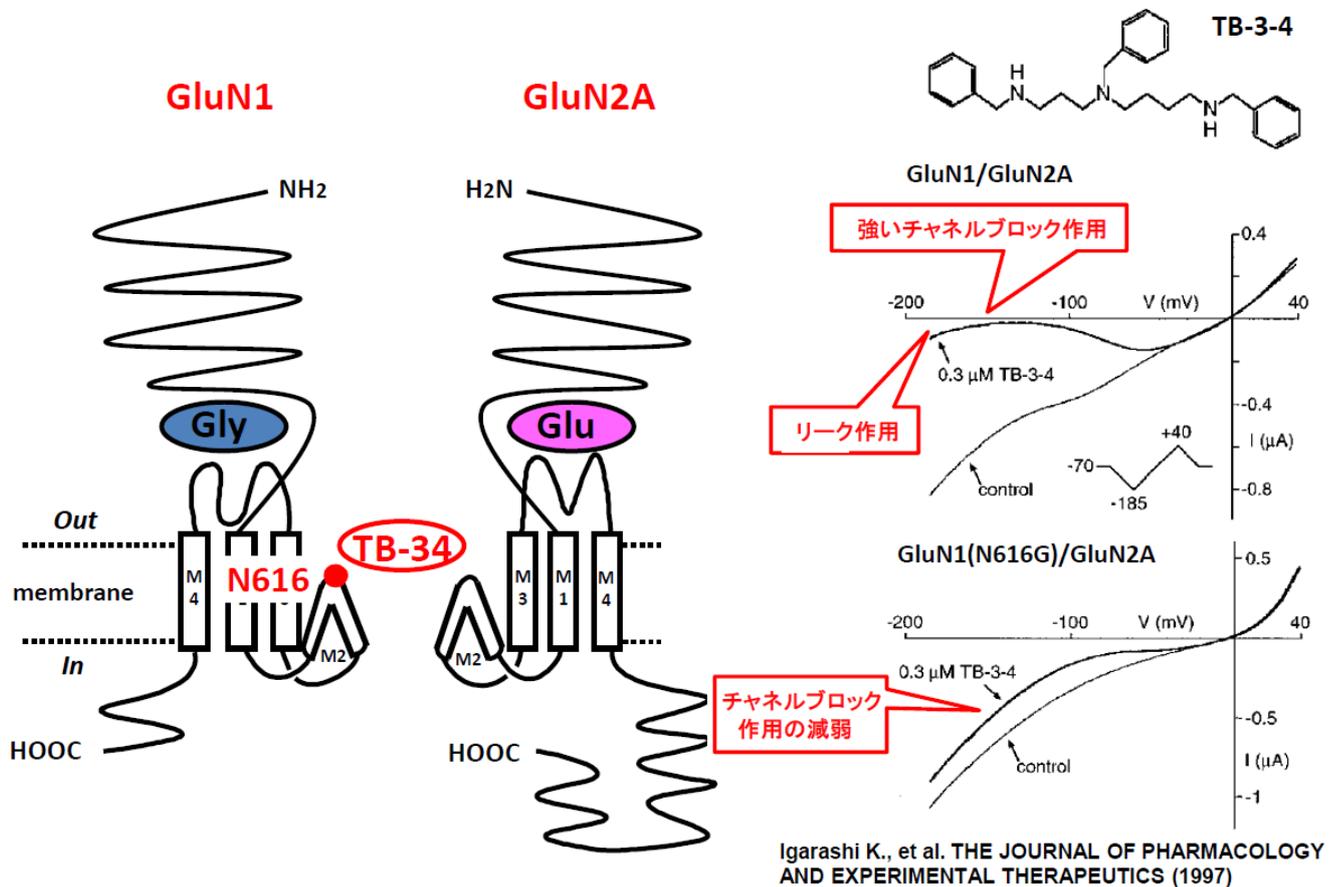


Fig. I-3 Permeation of TB-3-4 through mutant NMDA channels.

I-V curves were constructed by voltage-ramps from -185 to +40 mV (see inset in GluN1/ GluN2A) at cells expressing GluN1/ GluN2A , GluN1(N616Q)/GluN2A and GluN1(N616G)/ GluN2A receptors.

Responses to 10 μ M glutamate (with 10 μ M glycine) were measured in the absence (control) and presence of 0.3 mM TB-3-4. Leak currents have been subtracted.

1-2 実験方法

1-2-1 NMDA 受容体クローン

本研究では rat GluN1 クローンとして、exon-5 の 21 アミノ酸を欠いた GluN1A バリエントを用いた[33]。このクローンは中西重忠博士 (Osaka Bioscience Institute, Osaka, Japan) より快く譲渡して頂いた。また、rat GluN2A 及び rat GluN2B クローンは P. H. Seeburg 博士 (Center for Molecular Biology, University of Heidelberg, Germany) より快く譲渡して頂いた[34]。

1-2-2 卵母細胞への NMDA 受容体発現と電位固定法

ポリアミンの透過性を検討すべく以下の実験を行った。雌の成体アフリカツメガエルは、株式会社埼玉実験動物供給所から購入した。NMDA 受容体の GluN1 および GluN2 の capped cRNA の調製、RNA の注入、卵母細胞の調製は Williams の方法に従った[35]。卵母細胞には GluN1 と GluN2 cRNA の比が 1:5 (GluN1;0.1-4 ng, GluN2;0.5-20 ng) になるようにアフリカツメガエル卵母細胞に注入することで、NMDA 受容体を発現させた。受容体の活性測定は電位固定法を用い、電流の測定には二電極膜電位固定用増幅器 GeneClamp500B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) を使用した。電極は 3 M KCl で満たし、抵抗値 0.4~4 M Ω のものを使用した。測定では Ba²⁺-SOS (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM BaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.5) で連続的に灌流し、多くの場合、Ca²⁺によって起こる Cl⁻の電流を防ぐために、測定時に K⁺-BAPTA(1 個の卵母細胞につき 40 mM K⁺-BAPTA を

100nl) を卵母細胞に注入した後、測定を行った。NMDA 受容体の活性化はアゴニストであるグルタミン酸 (Glu) およびグリシン (Gly) を 30 μ M の濃度で投与することで行い、実際に流れた電流量を測定した。本研究において Na^+ の代わりに各カチオンの透過性を検討する際は、 Ba^{2+} -SOS に含まれる NaCl (最終濃度 100 mM) を、イオン条件が等張になるよう種々の濃度の Ca^{2+} 又はポリアミンに置換した灌流液を調製した。具体的には、2 価カチオンの Ca^{2+} は 50 mM、PUT (2 価) は 50 mM、SPD (3 価) は 33.3 mM、または SPM (4 価) 25 mM となるようにそれぞれ調製した。得られたデータは Digidata 1322A interface を用いて pCLAMP8 (Axon Instruments) によって記録した。I-V カーブの作成は、-150 mV から +50 mV まで 25 秒以上かけて持続的に固定電位を上げ、流れる電流の変化を測定することで行った。この際、Glu、Gly 非存在下で測定を行った結果を、10 μ M Glu、Gly を加えて測定を行った結果から差し引くことで、より正確な I-V カーブを作成した。

1-2-3 GluN1、GluN2 注入卵母細胞における SPD および Ca^{2+} の輸送活性

GluN1 および GluN2 の cRNA を上記の方法にて卵母細胞に注入し、注入後 3 日後に SPD および Ca^{2+} の輸送活性を測定した。5 個の卵母細胞を 0.2 mL の NaCl 緩衝液 (HEPES-KOH、pH7.4、135 mM NaCl、10 mM Glucose、30 μ M Glu、30 μ M Gly) に入れ、30°C 10 分プレインキュベーションした後、様々な濃度の [^{14}C]SPD (9.25 MBq/mmol) 又は [^{45}Ca]CaCl₂ (46.25 MBq/mmol) を添加し、30°C、60 分間インキュベーションした。インキュベーション後、卵母細胞を 5mM SPD 又は CaCl₂

を含む 2 mL の cold NaCl 緩衝液にて 3 回洗浄し、5% TCA を 0.2 mL 添加し細胞を破砕した。TCA 処理後、0.2 mL の 1M NaOH を用いて卵母細胞を可溶化した後、0.3 mL を液体シンチレーションカウンターに供した。タンパク質定量は Lowry らの方法に従って行った[36]。[¹⁴C] SPD 又は [⁴⁵Ca] CaCl₂ の比活性から蛋白質 (1 mg) あたりに細胞内へ取り込まれた基質の量を算出し、Lineweaver-Burk プロットを用いて *K_m* 値、*V_{max}* 値を算出した。

1-2-4 HEK293 細胞を用いた NMDA 受容体におけるポリアミンの輸送活性の測定

1. プラスミドの作製

pcDNA3.1(+)-GluN1A の作製は以下の通り行った。pBS-GluN1A を HindIII および NotI で処理し、GluN1A 遺伝子 (約 4 kbp) を低融点アガロースを用いた電気泳動法により分離し、切り出した後、飽和フェノールおよびフェノール・クロロホルム溶液で抽出後、pcDNA3.1 (+) の同じサイトに挿入した。

pcDNA3.1/Zeo (-)-NR2A の作製は以下の通り行った。pBS-GluN2A を Eco52I および EcoRI で、pcDNA3.1/Zeo(-) は NotI および EcoRI で処理した後、得られた DNA 断片を 1A と同様に低融点アガロース電気泳動法により分離し、抽出した。抽出した pcDNA3.1/Zeo(-) (約 5 kbp) に GluN2A 遺伝子 (約 5 kbp) を挿入した。

pcDNA3.1/Zeo (-)-GluN2B の作製は以下の通り行った。pBS-GluN2B (ε2φ2B) を SalI および EcoRI で、pcDNA3.1/Zeo(-) は XhoI および EcoRI で処理した後、得られた DNA 断片を 1A と同様に

低融点アガロースを用いた電気泳動法により分離し、抽出した。抽出した pcDNA3.1/Zeo(-) (約 5 kbp) に GluN2B 遺伝子 (約 5 kbp) を挿入した。

2. 形質導入

HEK293 細胞 は、10%ウシ胎児血清、100 units/ml ペニシリン G、50 units/ml 硫酸ストレプトマイシンを含む DMEM 培地で 95%air/5%CO₂、37°C の条件下で培養した。NMDA 受容体遺伝子の形質導入は以下の通り行った。1×10⁶ 細胞をポリ-D-リジン処理した 6 ウェルディッシュに播種し、一晚培養した。GluN1 と GluN2A 又は 2B を 1:5 の割合で調製した 2 μg のプラスミド DNA をリポフェクタミン 2000 を用いて形質導入した。

3. 輸送活性

形質導入した細胞を 1 mL の NaCl 緩衝液 (HEPES-KOH、pH7.4、135 mM NaCl、10 mM Glucose、30 μM Glu、30 μM Gly) に入れ、30°C 10 分プレインキュベーションした後、様々な濃度の [¹⁴C]SPD (37 MBq/mmol) を添加し、30°C、60 分間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を 5mM SPD を含む 2mL の NaCl buffer) にて 3 回洗浄し、5% TCA を 0.2 mL 添加し細胞を破砕した。TCA 処理後、0.2mL の 1M NaOH を用いて卵母細胞を可溶化した後、0.3 mL を液体シンチレーションカウンターに供した。タンパク質定量は Lowry らの方法に従って行った [36]。 [¹⁴C] SPD の比活性から蛋白質 (1 mg) あたりに細胞内へ取り込まれた基質の量を算出し、Lineweaver-Burk プロットを用いて *K_m* 値、*V_{max}* 値を算出した。

1-3 結果

1-3-1 カチオン透過による電流の測定

Ba²⁺-SOS に含まれる 100 mM NaCl を 50 mM PUT 又は 25 mM SPM に置換したところ、Na⁺溶液に比べて 10-25%程度の電流が流れた (Fig.I-3)。一方、33.3 mM SPD で調製した緩衝液では、流れる電流量が PUT および SPM に比べて多く GluN1/GluN2A 受容体では Na⁺と比較して約 65%、GluN1/GluN2B 受容体では約 85%の電流が流れた。以上の結果より、NMDA 受容体は 3 価カチオンである SPD を優先的に取り込むことが示唆された。

I-V カーブを用いて、50 mV から -150 mV へと電圧を変化させた時に流れる電流量を、Na⁺、Ca²⁺および各ポリアミンで調製した緩衝液で調べた (Fig.I-4)。その結果、SPD で調製した緩衝液では、-20mV の脱分極電位から -70mV の静止膜電位の広い電位の範囲において、GluN1/GluN2A 受容体および GluN1/GluN2B 受容体ともに Na⁺と同等の電流が流れることが明らかとなった。

-70mV の静止膜電位では、NMDA 受容体のチャンネル孔は Mg²⁺によりブロックされている [37,38]。そこで Mg²⁺存在下における各カチオンの透過性を調べた (Fig.I-5, Fig.I-6)。その結果、Na⁺による電流は Mg²⁺添加により 90%以上阻害された。一方、ポリアミンおよび Ca²⁺による電流では、Mg²⁺による阻害効果は 3~4 割程度であり Na⁺に比べて弱いことが明らかとなった。

1-3-2 卵母細胞に発現させた NMDA 受容体の SPD および Ca^{2+} 輸送活性

卵母細胞に発現した NMDA 受容体が直接 SPD を取り込むかどうかを明らかにすべく以下の検討を行った(Fig.I-7)。NMDA 受容体を発現させた卵母細胞を 30 μM Glu、30 μM Gly、 ^{14}C SPD (9.25MBq/mmol) 又は ^{45}Ca CaCl₂ (46.25 MBq/mmol)を含む NaCl 緩衝液 (0.5mL)に入れ、30℃、60 分間インキュベーションした。その結果、GluN1/GluN2A および GluN1/GluN2B を発現した卵母細胞では、SPD の濃度依存的な取り込みが認められ、*K_m* 値がそれぞれ 2.2 および 2.7 mM、*V_{max}* 値は 6.3 および 14.9 pmol/min/mg protein であった。SPD の取り込みは GluN1/GluN2A よりも GluN1/GluN2B がわずかに大きかった。一方、 Ca^{2+} も SPD 同様に濃度依存的な Ca^{2+} の取り込みが認められ、GluN1/GluN2A 及び GluN1/GluN2B の Ca^{2+} に対する *K_m* 値はそれぞれ 4.6 および 3.3 mM、*V_{max}* 値は 13.8 および 12.2 pmol/min/mg protein であったことから、SPD は Ca^{2+} と同程度 NMDA 受容体によって取り込まれることが明らかとなった。

次に NMDA 受容体による SPD 取り込み機構を調べた(Fig.I-8)。GluN1-GluN2A および GluN1-GluN2AB による SPD 取り込みは、 Ca^{2+} (2 mM)、又はチャンネルブロッカーであるメマンチン (10 μM)を添加することで約 50%阻害されたことから、SPD は Ca^{2+} と同様に NMDA 受容体のチャンネル孔を通過することが示唆された。更に、NMDA 受容体による SPD 取り込みはアゴニストである Glu および Gly 依存的であることが明らかとなった。

1-3-3 HEK293 細胞に発現させた NMDA 受容体のスペルミジン輸送活性

培養細胞においても NMDA 受容体が SPD を取り込むかどうかを調べるため、以下の検討を行った。ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞に GluN1 + GluN2A または GluN2B cDNA を形質導入して培養した後、30 μ M Glu、30 μ M Gly 及び [14 C] SPD (37 MBq/mmol) を含む NaCl 緩衝液で 37 $^{\circ}$ C、30 分インキュベーションした。GluN1/GluN2A と GluN1/GluN2B に SPD 取り込みの *K_m* 値はそれぞれ 3.3 および 4.2 mM であり、卵母細胞で得られた結果と同程度であった。*V_{max}* 値は、526、250 pmol/min/mg protein であった (Fig.I-9)。GluN1/GluN2A を発現させた HEK293 細胞における SPD 取り込みの *V_{max}* 値が、GluN1/GluN2B よりも高かった理由として、GluN2B の発現が GluN2A の発現よりも低い可能性が考えられた。SPD 取り込みはプロトン循環阻害剤である 10 μ M CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) によって阻害されたことから、NMDA 受容体による SPD の取り込みは膜電位依存的であることが示唆された。また、SPD 取り込みは Mg²⁺ (1 mM) 存在下ではほとんど影響をうけなかったが、Ca²⁺ (2 mM) 存在下では著しく阻害されたことから、SPD 取り込みは Mg²⁺ には影響を受けず、Ca²⁺ と同様な経路で NMDA 受容体を通過することが示唆された (Fig.I-9)。

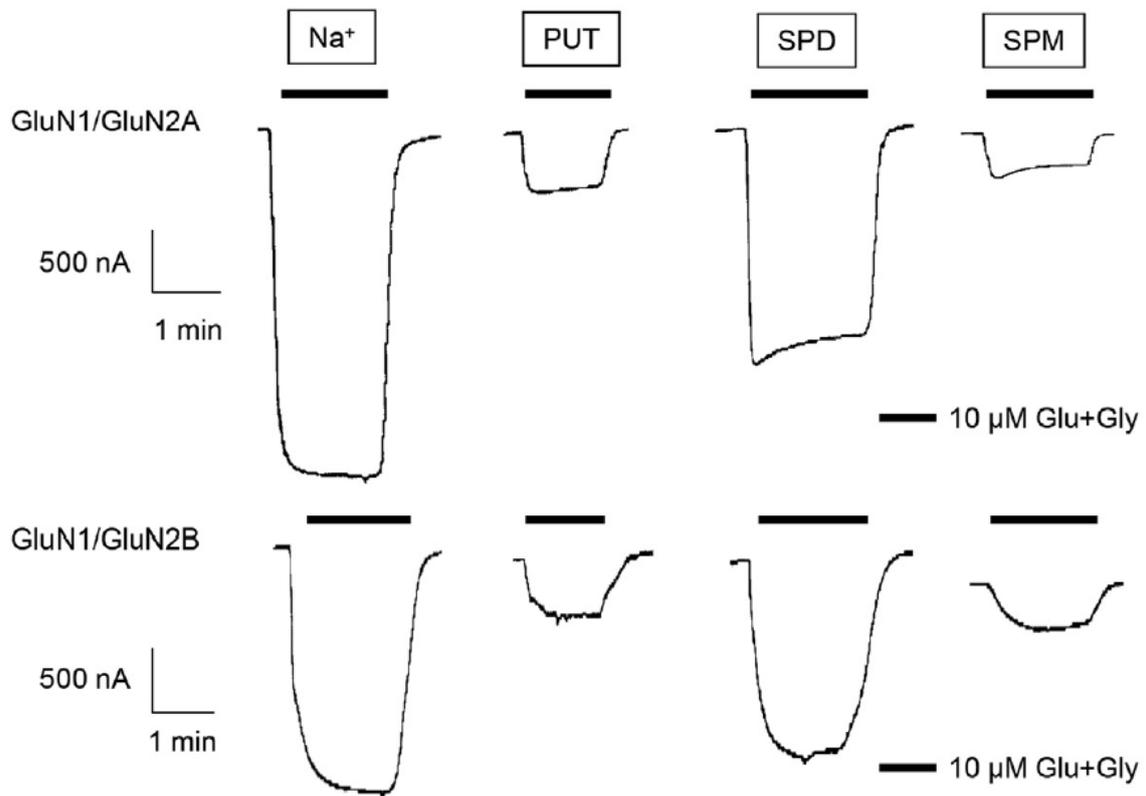


Fig.I-3. Currents through NMDA receptors expressed from combinations of GluN1 and GluN2A or GluN2B. Currents carried by Na^+ (100 mM) or polyamines [50 mM putrescine, $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, 33.3 mM spermidine, $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, or 25 mM spermine, $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$] in the presence of 10 mM glutamate with 10 mM glycine were measured in oocytes expressing GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B and voltage-clamped at 70 mV. PUT, putrescine; SPD, spermidine; SPM, spermine.

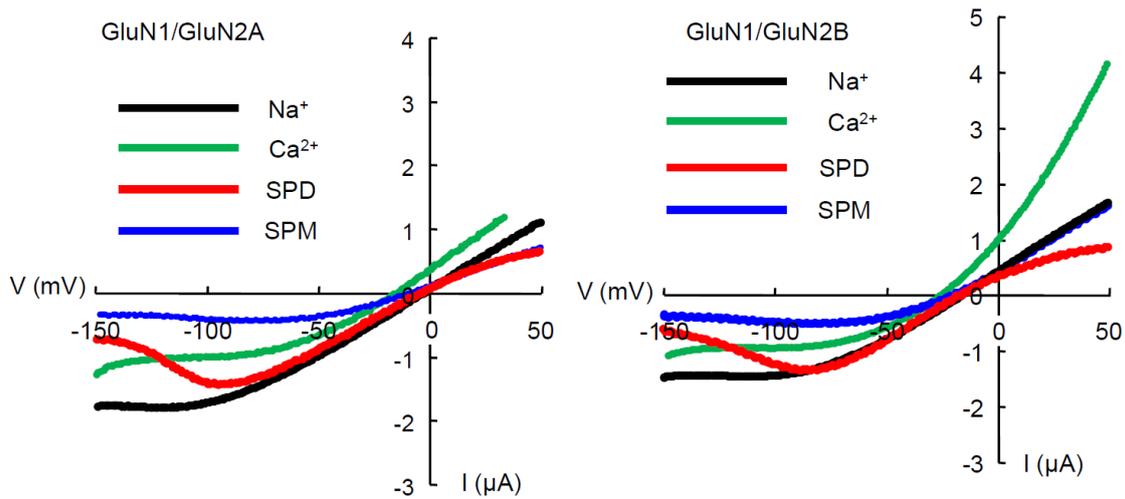


Fig.I-4. I-V relationships of GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B in the presence of various extracellular cations as the main charge carrier for inward currents. I-V curves were measured by slow (25 s) voltage ramps from 150 mV to +50 mV with 100 mM Na⁺-buffer, 50 mM Ca²⁺-buffer, 33 mM spermidine³⁺-buffer or 25 mM spermine⁴⁺-buffer.

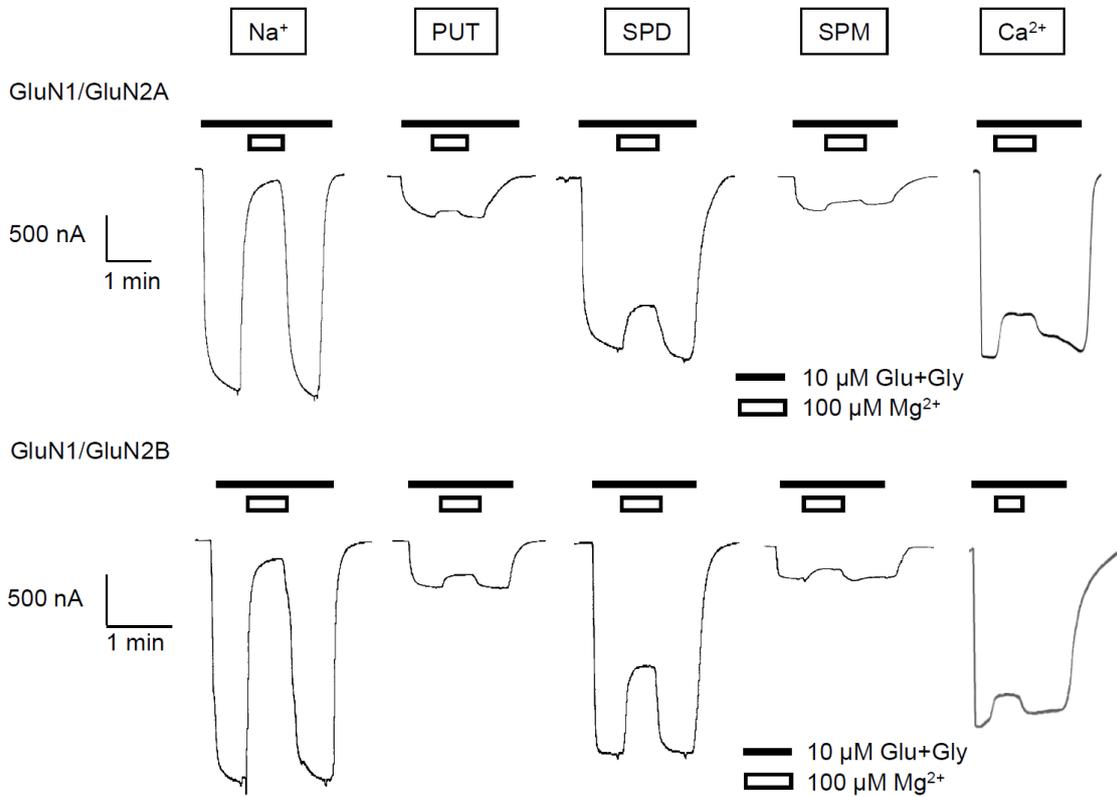


Fig.I-5. Effect of Mg^{2+} on inward currents in oocytes expressing GluN1/GluN2A or GluN1/GluN2B and voltage-clamped at -70 mV. Effect of 100 mM Mg^{2+} on inward currents by GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B in oocytes was measured in the presence of various cation buffers shown in the legend of Fig.I-3. Where indicated, 100 mM Mg^{2+} were added. Ca^{2+} currents were measured using different oocytes.

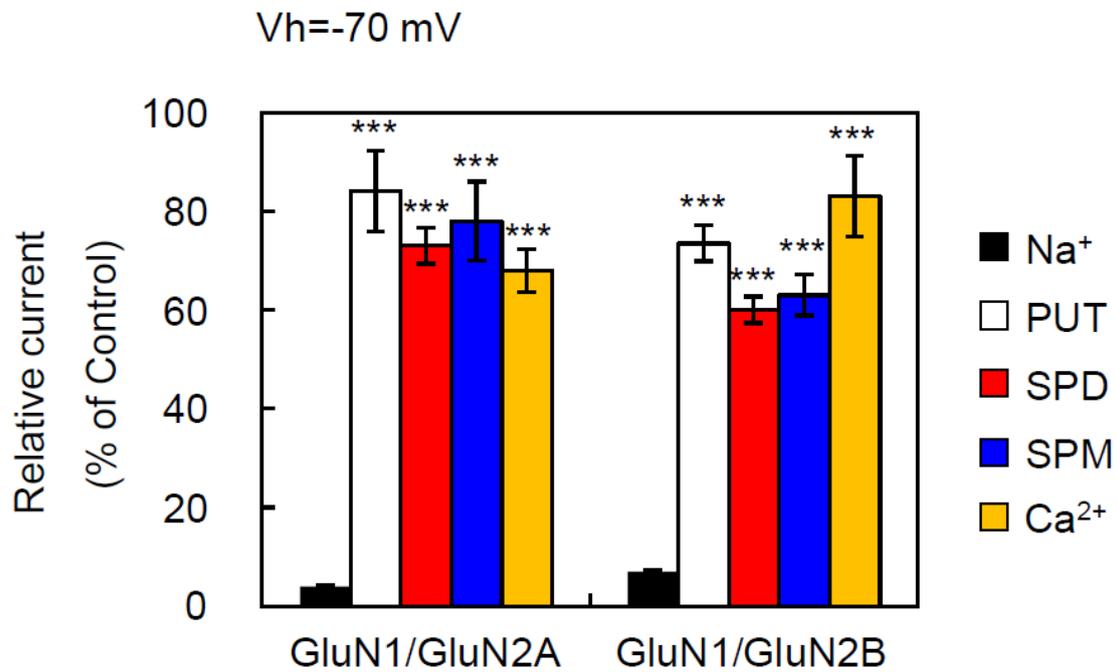
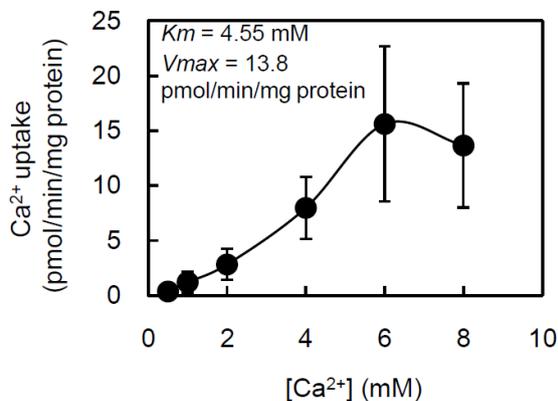
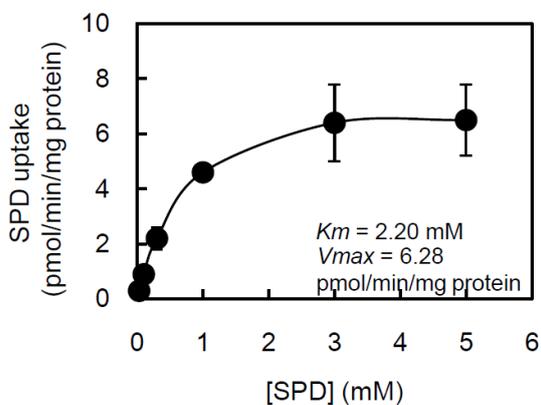


Fig.I-6. Currents measured in the presence of 100 mM Mg²⁺ were expressed as the percentage of control current in the absence of Mg²⁺. Values are mean \pm S. E.M. from 5 to 8 oocytes. Data were analyzed by one way ANOVA with post hoc TukeyKramer multiple comparison test, and a statistical difference is shown by probability values. ***p < 0.001 compared with the degree of inhibition by Mg²⁺ of currents induced by Na⁺. PUT, putrescine; SPD, spermidine; SPM, spermine.

GluN1/GluN2A



GluN1/GluN2B

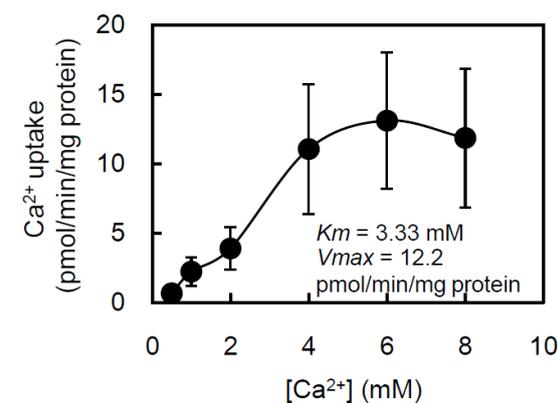
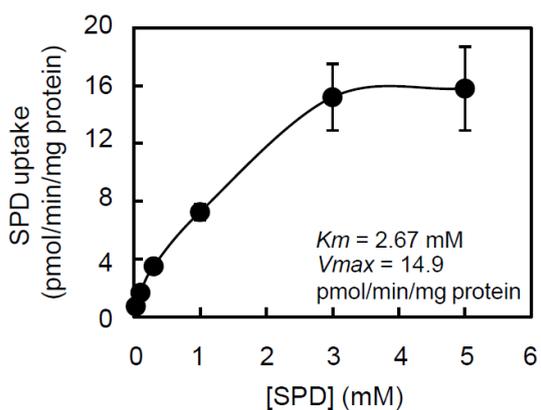


Fig.I-7. Spermidine and Ca²⁺ uptake by GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B was measured in the presence of various concentrations of spermidine and Ca²⁺, and the K_m and the V_{max} values were measured according to the Lineweaver-Burk plot. Values are mean \pm S. E. M. of fifth times experiments. SPD, spermidine.

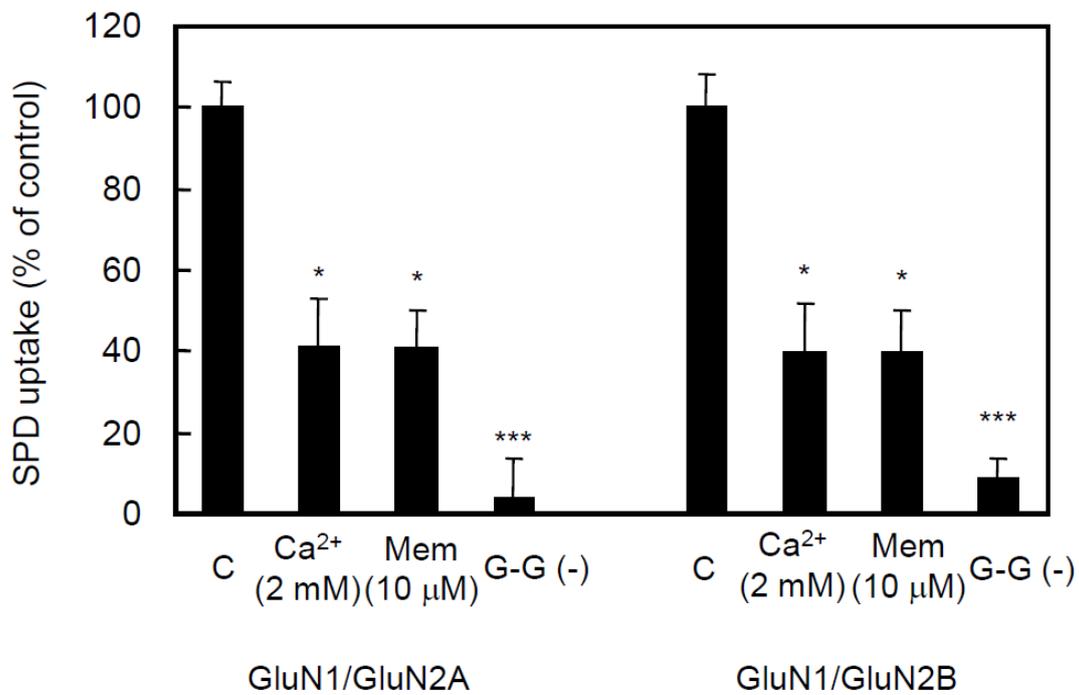


Fig.I-8. Spermidine and Ca²⁺ uptake by GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B expressed in *Xenopus* oocytes. Spermidine uptake was measured using 1 mM [¹⁴C] spermidine in the presence of 2 mM Ca²⁺ or 10 mM memantine (Mem), or in the absence of glutamate and glycine [G-G(-)]. Spermidine uptake by GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B in control cells was 6.18 and 7.23 pmol/min/mg protein, respectively. *p < 0.05; ***p < 0.001 compared with spermidine uptake under the standard conditions.

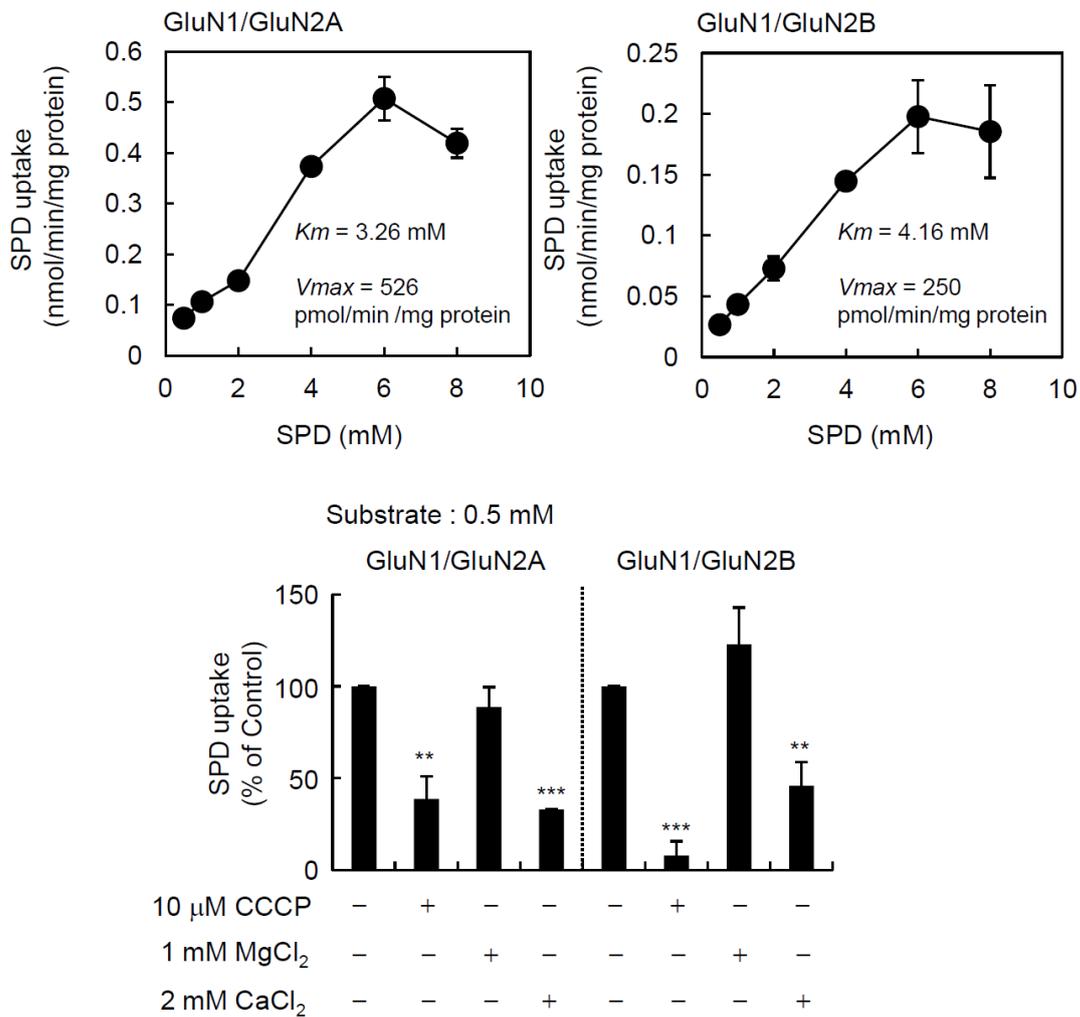


Fig.I-9. Spermidine uptake through GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B expressed in HEK293 cells. Spermidine uptake was measured as described in Materials and methods by changing the concentration of spermidine or in the presence of 10 mM CCCP, 1 mM Mg²⁺ or 2 mM Ca²⁺. Spermidine uptake by GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B in control cells was 70.2 and 34.0 pmol/min/mg protein, respectively. Values are mean \pm S. E. M. of triplicate determinations. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with spermidine uptake under the standard conditions. SPD, spermidine.

1-4 考察

NMDA 受容体を介した電流は、細胞外 Mg^{2+} によって電位依存的に阻害される。 -70 mV の静止膜電位の卵母細胞に Mg^{2+} ($100\text{ }\mu\text{M}$)を添加すると NMDA 受容体を介した Na^+ 流入が著しく阻害されるが、ポリアミン、特に SPD または Ca^{2+} に置換した緩衝液では Mg^{2+} による阻害が Na^+ に比べ減弱していた (Fig.I-5)。この結果は、生理条件下 (すなわち Mg^{2+} 存在下)においても細胞外 SPD 濃度が高濃度であれば、SPD は NMDA 受容体(GluN1/GluN2A および GluN1/GluN2B)を透過できることを示唆している。

また、NMDA 受容体を発現させた卵母細胞による [^{14}C] SPD の取り込みに対する Ca^{2+} 、およびチャネルブロッカーであるメマンチン [23,39]、アゴニストの効果を調べたところ、 Ca^{2+} 、メマンチン投与により取り込み量が半減し、また細胞外グリシン、グルタミン酸に依存していることが明らかとなった (Fig.I-8)。以上の結果より SPD の取り込みは NMDA 受容体の活性化が必要であり、 Ca^{2+} と SPD は共通の経路を共有して NMDA 受容体チャネルを通過することが考えられる。

また HEK293 細胞を用いた検討では、NMDA 受容体による [^{14}C]SPD 輸送活性が脱共役剤である CCCP によって阻害されたこと、卵母細胞で得られた結果と同様に Mg^{2+} ではなく Ca^{2+} 添加により阻害されたことから、SPD の取り込みは膜電位依存的であり、NMDA 受容体における SPD の透過経路は Ca^{2+} と共通であることが示唆された。(Fig.I-9)。以上の結果より、NMDA 受容体は生理条件下、すなわち Mg^{2+} 存在下では Na^+ は透過しないこと、SPD は Ca^{2+} と同様に取り込まれることが明らかとなった。

シナプス間隙における細胞外ポリアミン濃度は低いと想定されるが、SPD は、シナプトソームとシナプス小胞に mM 濃度で存在し[19]、これは活性化された NMDA 受容体を介した SPD の透過を引き起こす。NMDA 受容体を介した Ca^{2+} の流入は、正常な状態下でのシナプス可塑性に関与している [28,29]。SPD は、タンパク合成の特異的種類の促進を通じて細胞の増殖分化に関与し [2,40]、NMDA 受容体を介して入った SPD が Ca^{2+} と共に神経可塑性の工程において役割を果たし得ることを可能にする。従って、明白な疑問は、NMDA 受容体を介したポリアミンの流入は生理学的に意義があるかどうかである。

真核細胞におけるポリアミンの総濃度は、 Ca^{2+} よりも高いが、ラット肝では 78% の SPD が、85% の SPM が RNA と結合して存在し、フリーの SPD および SPM はそれぞれ 7%、2.3% と低い [41]。従って、SPD の流入は、神経細胞興奮に追従するフリー Ca^{2+} における一過的な上昇と同じように、シナプス後細胞において短期的な局所効果をもつことが考えられる。Fig.I-8 におけるデータは、他の細胞外ポリカチオン非存在下における NMDA 受容体を介した SPD と Ca^{2+} の取り込みは、量的に類似していることを示唆している。たとえ生理的な細胞外 Ca^{2+} 濃度において SPD 流入が 60% 減少したとしても、SPD の流入は神経細胞における、短期的、局所的な作用を引き起こすのに十分である。ポリアミン、特に SPM は R-domain (N 末端領域) へ結合を介して NMDA 受容体の活性を増強することも報告してきた。我々の結果は、ポリアミン、特に SPD と SPM は、NMDA 受容体の活性増強だけでなく、NMDA 受容体を透過し、可塑性のような局所的過程、または神経細胞におけるポリアミン含量の維持に貢献していることが考えられた。

第 2 章 シェーグレン症候群におけるポリアミン代謝物：
アクロレイン抱合タンパク質の上昇

2-1 序論

一次シェーグレン症候群(pSS)は、全身性の自己免疫疾患であり、主に唾液腺および涙腺に影響を及ぼし、腺細胞の破壊により唾液分泌や涙液分泌の減少が引き起こされ、口腔乾燥および目の乾燥(ドライアイ)が現れる[42,43]。核内転写因子であるシェーグレン症候群A (SSA、Ro)及びシェーグレン症候群B (SSB、La)蛋白質を認識する自己抗体が、頻繁にpSS患者の血清中に確認される[44,45]。また、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)、特にgellatinases (MMP-2及びMMP-9)が、pSS患者の組織損傷に関与していると考えられる[46-48]。

毒性の強い不飽和アルデヒドであるアクロレイン ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$) は、ポリアミン代謝酵素によってSPDおよびSPMから産生され、脳梗塞や慢性腎不全などの組織障害に関与している(Fig. II-1)[49-52]。様々な病態をもたらす酸化ストレスは、2種の化合物によって引き起こされると考えられている。ひとつは、superoxide anion radical ($\text{O}_2\cdot^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2) および、hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)のような反応性酸素種 (ROS)、もう一方は、acroleinやhydroxynonenalのような不飽和アルデヒドである[53,54]。我々は、アクロレインの毒性はROSのそれよりも顕著であることを明らかにしてきた[55,56]。通常、細胞内ではグルタチオンによって中和され毒性が抑えられている。しかし、炎症などによって、細胞外にポリアミンおよびポリアミン代謝酵素が漏出すると、細胞内のようにグルタチオンによる中和が起こらず、毒性が発揮される。我々は今まで、脳梗塞、無症候性脳梗塞、アルツハイマー病、シェーグレン症候群がアクロレインの関与する疾患として明らかにしてきた。蛋白質中のリジン残基と2分子のアクロレイ

ンがマイケル付加反応をすることによって、MP-リジンおよびFDP-リジンを形成し、蛋白質の立体構造を変化させることによってアクロレインの毒性を発揮する。我々はアクロレイン抱合アルブミンが一次シェーグレン症候群 (pSS)患者の唾液中で増加することを見出し、アクロレイン抱合蛋白質 (PC-Acro)がバイオマーカーとして期待できることを報告してきた[57]。しかしながら、患者の唾液には未同定のアクロレイン抱合タンパク質が2種残っていたので、本研究ではタンパク質の同定とアクロレイン抱合による影響を検討した。

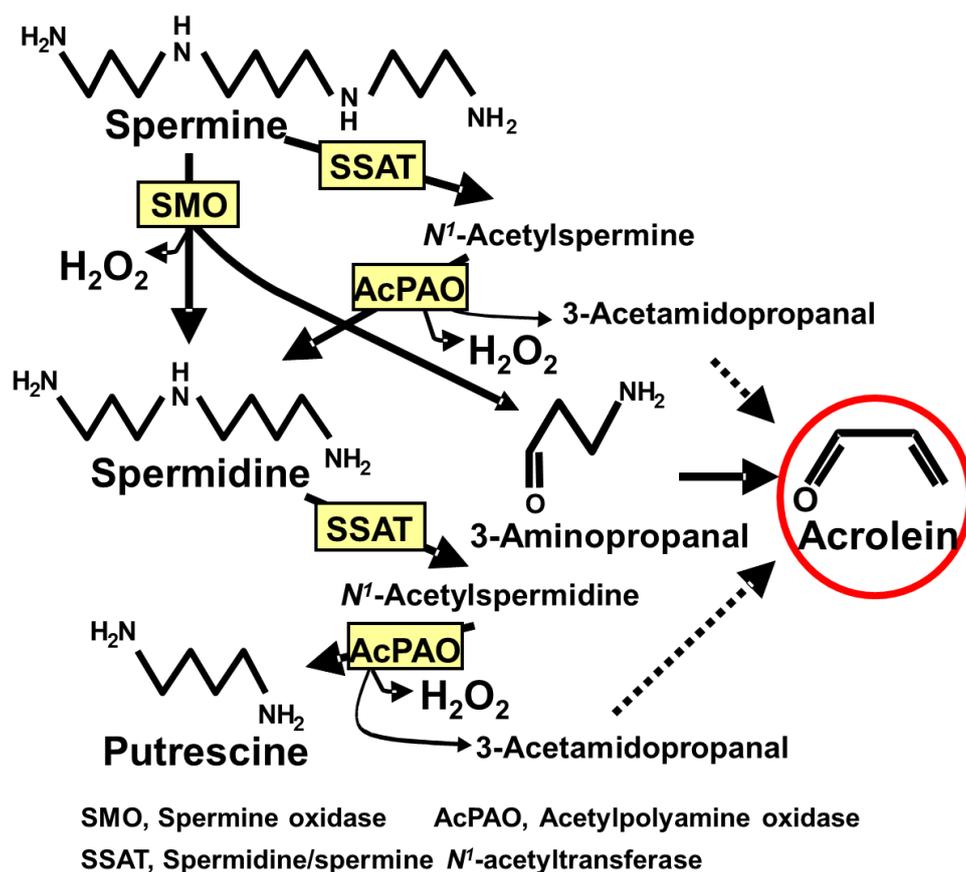


Fig. II-1 Polyamine catabolic pathways of animal cells.

2-2 実験方法

2-2-1 対象および唾液の採取

11人の女性 pSS(68.8±9.4歳)患者と、日本のシェーグレン症候群研究グループが提案した pSS の診断基準を満たさない 10人の健常人女性(72.0±6.8歳)を対照として調査した[58,59]。インフォームドコンセントは、被験者毎にとり、研究プロトコルは千葉大学大学院薬学研究科および新潟県立加茂病院の倫理委員会によって承認された。実験はヘルシンキ原則宣言に従って行われた。pSS患者と対照被験者は、新潟県加茂病院で9:00から午前12:00の間に、同じ順序で、同じ歯科評価、手順を受けた。インタビュー、経口臨床検査、唾液や血液の採取は、すべて同じ医師が行った。全混合唾液を10分間パラフィンを噛むことにより収集した。収集した後ただちに、唾液試料を4℃で5分間、10,000×gで遠心分離し、上清を使用するまで-80℃で凍結保存した。

2-2-2 抗 SS-A(Ro)および抗 SS-B(La)活性測定

唾液中 SS-A(Ro)、SS-B(La)抗体の濃度は ELISA 法によって測定した。SS-A(Ro)は Abnova 社(Taiwan)、SS-B(La)は Trinity Biotech 社(Ireland)の ELISA キット用い、それぞれのマニュアルに従った。

2-2-3 唾液中免疫グロブリンの精製

唾液中の免疫グロブリンは、PANSORBIN cells (Merck Millipore, USA)のマニュアルに従い、蛋白質 500μg と PANSORBIN cells 30μL を混合して精製した。10,000×g 5分間の遠心分離にて免疫

グロブリン- PANSORBIN cell 複合体が得られる。リン酸バッファーにて沈殿を洗浄後、SDS-sample buffer と共に 1 分間ボイルすることによって免疫グロブリンが得られる。ライトチェーンおよびヘビーチェーンは、12%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にて分離した。蛋白質定量は Bradford 法を用いた[60]。

2-2-4 Western blot によるアクロレイン抱合蛋白質の検出

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離したタンパク質のいずれかでゲルをクマシーブリリアントブルー R-250(CBB)で染色し、又は PVDF 膜(Immobilon P, Merck Millipore, USA)に転写した。蛋白質中のリジン残基のアミノ基とアクロレインが付加反応によって形成された PC-Acro [N ϵ -(3-formyl-3,4-dehydropiperidino)lysine (FDP-lysine), and N ϵ -(3-methylpyridinium)lysine (MP-lysine) in protein]は、ECL plus Western blot analysis system (GE Healthcare, UK) で抗アクロレイン化抗体(FDP-lysine and MP-lysine) (NOF Corporation, Japan)を用いて検出した[61]。

2-2-5 質量分析

質量分析によるアクロレイン抱合アミノ酸の同定は Cai および吉田らの方法に従った[62, 63]。SDS-PAGE で分離した抗体のバンドを切り出した後、ジチオスレイトールで還元し、アクリルアミドでアルキル化した。トリプシン処理又はエンドプロテイナーゼ Asp-N で 37°C で一昼夜蛋白質分解処理した後、得られたペプチド断片を逆相系充填剤(Inertsil ODS-3, 3 mm, GL science, Japan)を充填した nano ESI

spray (100 mm i.d. × 375 mm o.d.)を用いて流速 200 nl/min で分離し、質量分析装置(LCQ Deca XP: Thermo Finnigan, USA)で解析した。得られた MS/MS データは、NCBI nr 20120123 又は Mascot Version 2.3 (Matrix Science)で解析した。

2-2-6 統計処理

統計分析は Mac の GraphPad Prism version 6.0d (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com)を用いて行った。二群間の差は、Student's *t*-test にて比較した。複数のグループの比較のために、一方向 ANOVA を用いたボンフェローニの多重比較検定を行った。

2-3 結果

2-3-1 免疫グロブリンのアクロレイン化と自己免疫活性の測定

患者唾液中に見出された未同定の PC-Acro を明らかにし、アクロレイン付加による蛋白質活性の変化を調べるため、以下の検討を行った。シェーグレン症候群は自己免疫疾患であることから、免疫グロブリン (Ig) を PANSORBIN[®] cells を用いて精製した後、ウェスタンブロット (WB) 法によって検出することで pSS 患者と健常人でアクロレイン暴露の度合いを比較した。その結果、pSS 患者の唾液中の Ig のアクロレイン化は、健常人に比べて優位に高いことが明らかとなった (Fig.II-2)。次に、シェーグレン症候群の疾患マーカーである抗 SSA (Ro) 抗体および抗 SSB (La) 抗体の活性を調べた。その結果、pSS 患者唾液中では健常人と比較して抗 SSA (Ro) 抗体および抗 SSB (La) 抗体の活性が高いことが明らかとなった (Fig.II-3)。pSS 患者唾液中にアクロレイン抱合型 Ig が多かったこと、自己免疫活性が高かったことから、アクロレインが自己免疫活性に影響するかどうかを検討した。健常人より得られた唾液中タンパク質に対して 12.5、25 および 50 μ M のアクロレインを暴露した後、唾液中抗体の SSA (Ro) および SSB (La) タンパク質に対する認識能を調べた。その結果、アクロレインを暴露すると、アクロレインの濃度依存的に自己免疫活性が高まることが明らかとなった (Fig.II-4)。

2-3-2 アクロレインによる抗原認識能への影響

Igのアクロレイン化が抗原認識に影響を及ぼしているかどうかを明らかにするため、アクロレイン処理または未処理の抗アルブミン抗体を調製し、WB法によりヒト血漿アルブミンの検出を行った。その結果、25 μ Mおよび50 μ Mアクロレインを2時間曝露した抗アルブミン抗体ではアクロレイン未処理の抗体と比較して認識能が低下した(Fig.II-5)。また、アクロレイン処理により抗原認識に影響を及ぼすか調べるために、ヒト血漿タンパク質10 μ gを用いてWB法を行ったところ、アルブミンの他、25 kDaおよび100 Daの別のタンパク質への認識能が増加する傾向が観察された(Fig.II-5)。

2-3-3 免疫グロブリンの精製とアクロレイン化部位の特定

アクロレインがIgの免疫原性に影響を及ぼすことが明らかとなったため、Igに対するアクロレインの結合部位の同定を試みた。唾液を11人のpSS患者から採取し、実験方法に記載したように、免疫グロブリンを精製した。SDS-PAGEより得られた免疫グロブリンの軽鎖および重鎖中のアクロレイン抱合アミノ酸残基は、トリプシンおよびAsp-Nで消化したペプチドを用いたLC-MS/MS(液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析)により同定した(Fig.II-6)。システイン残基は、マイケル付加反応によりアクロレインと抱合されると、消化されたペプチドのN末端のアミノ基にシッフ塩基を形成する[62,64,65]。アクロレイン抱合アミノ酸としては、*N*m-propanal histidine, *N*-(3-methylpyridium)lysine (MP-Lys) および *N*-(3-formyl-3,4-dehydropiperidino)lysine (FDP-Lys) がある[61,63,66]。アクロレイ

ン抱合システイン及びリジン残基を有するペプチドの MS / MS スペクトルの例を Fig.II-6 に示す。定常領域におけるアクロレイン抱合アミノ酸は、lamda 軽鎖 (Lys43)、 kappa 軽鎖 (Lys75, Lys80, His81, Lys82 and Cys86)、 alpha-2 重鎖 (Cys300)、 gamma-1 重鎖 (Cys27 and Lys30) および gamma-重鎖 (Cys297 and Lys300) の合計 11 か所に同定された (Fig.II-7)。また、可変領域と考えられるペプチド上に 24 か所のアクロレイン抱合アミノ酸が同定された (Table 1)。

Level of PC-Acro in immunogloblins

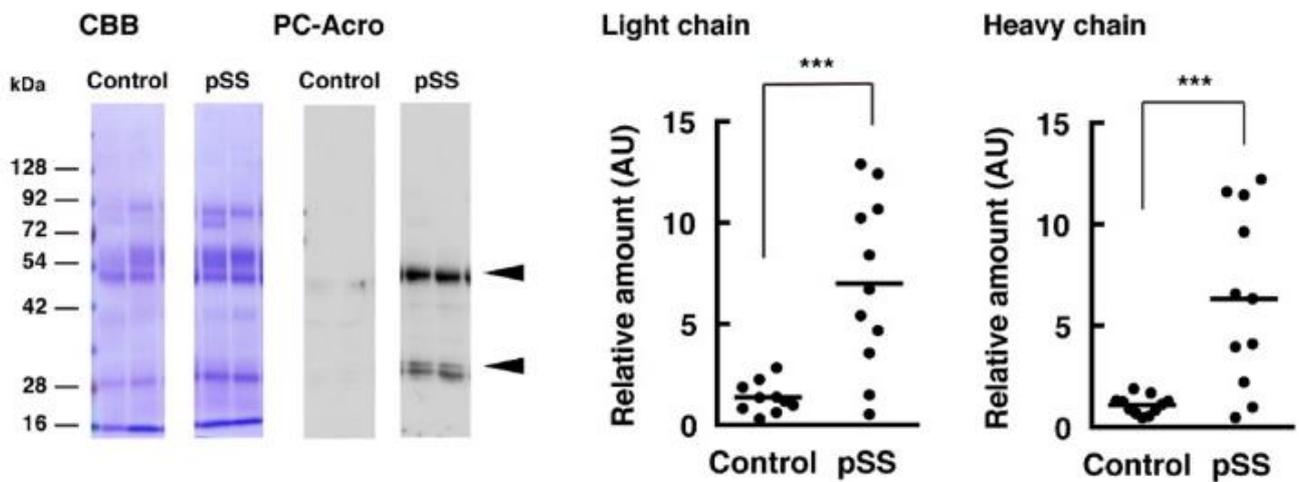
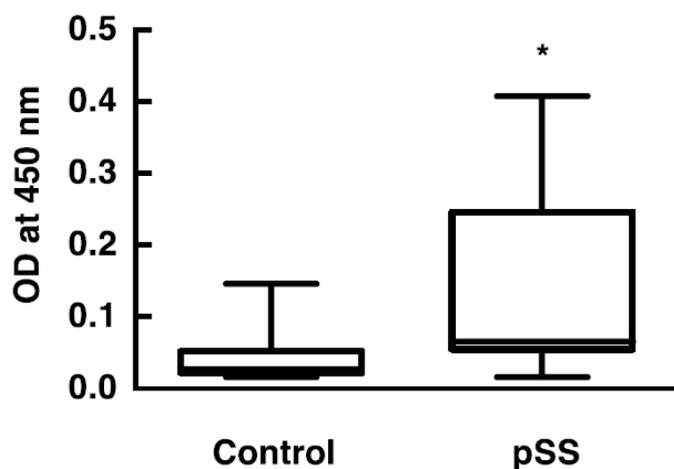


Fig.II-2. Levels of PC-Acro in light and heavy chains of immunoglobulins in saliva from control and pSS subjects were measured by Western blotting after gel electrophoresis using proteins purified by PANSORBIN® cells. Black circle indicates each value and horizontal line indicates mean value. The average value of control subjects was defined as the relative amount 1. The levels of immunoglobulins and PC-Acro of two typical control and pSS subjects were also shown.

Autoimmune activities in saliva

Anti-SSA (Ro) activity in saliva



Anti-SSB (La) activity in saliva

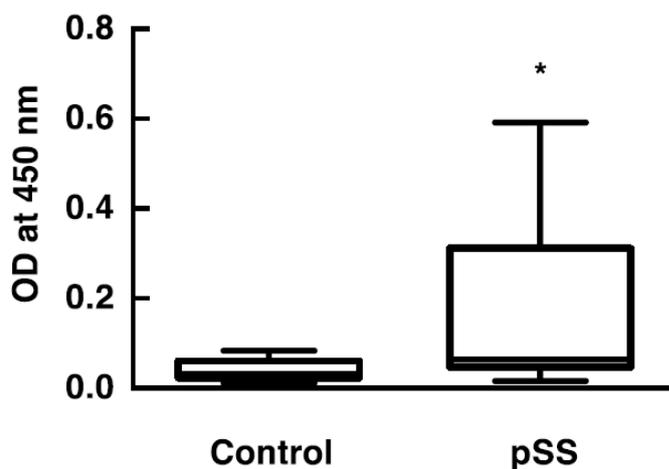
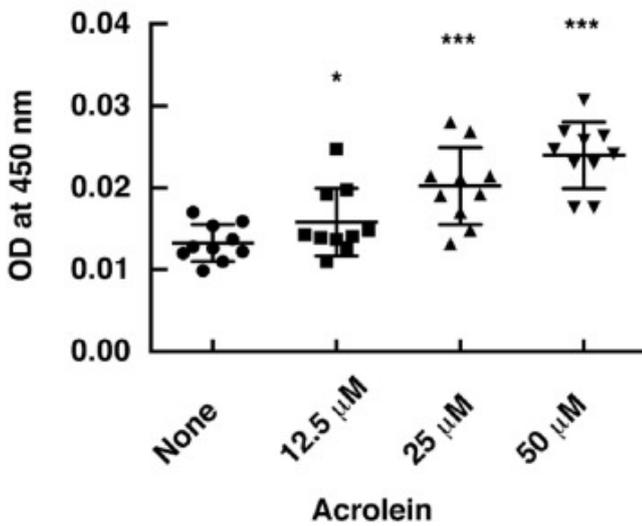


Fig.II-3. The level of anti-SSA (Ro) and anti-SSB (La) antibodies was compared in saliva from control subjects and pSS patients. Horizontal line within box indicates median, the bottom and the top of boxes indicate the 25th and 75th percentiles, and whiskers (vertical lines) indicate the 5th and 95th percentiles. Median values of anti-SSA (Ro) and anti-SSB (La) of control subjects and pSS patients were 0.027 and 0.063, and 0.032 and 0.064, respectively.

Anti-SSA (Ro) activity in saliva



Anti-SSB (La) activity in saliva

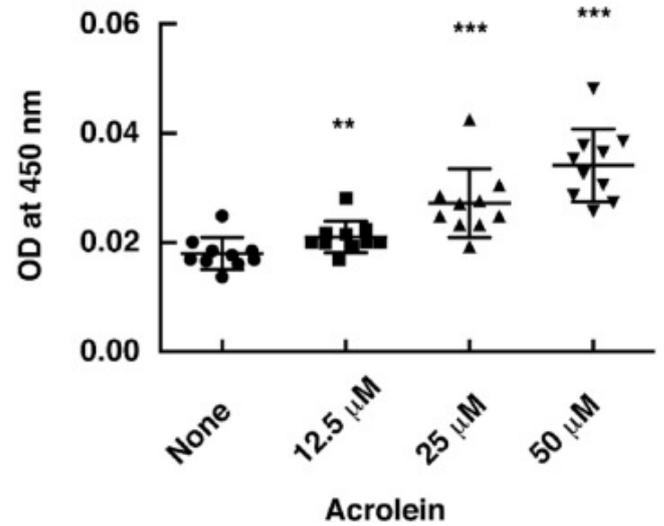
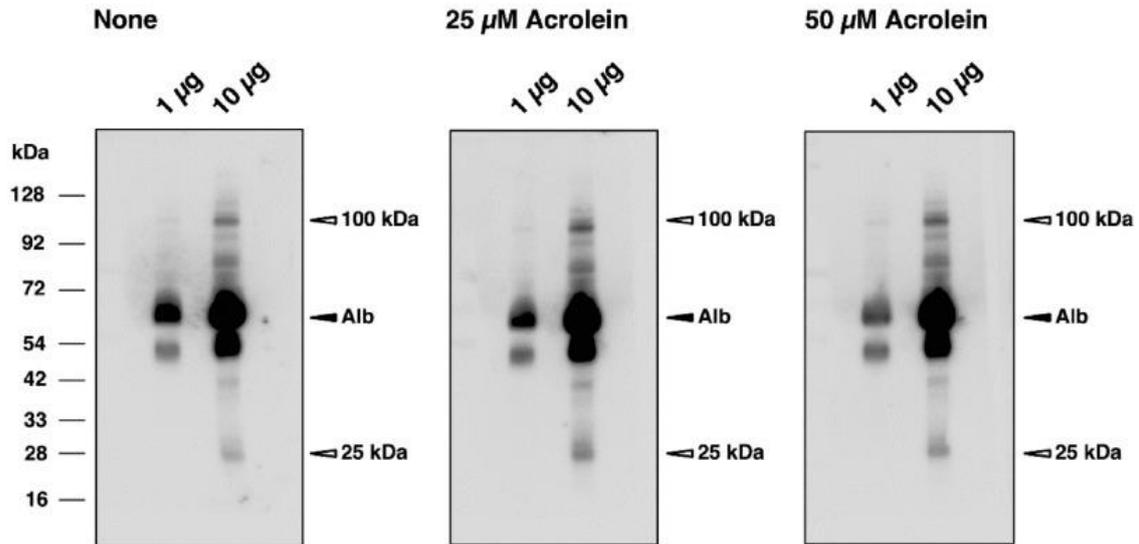


Fig.II-4. Increase in autoimmune activity of saliva treated with acrolein. Saliva from control subjects was treated with various concentrations (shown in the figure) of acrolein at 37 °C for 24 h, and ability to recognize SSA (Ro) and SSB (La) proteins was tested. Data are shown as mean \pm S.D. (horizontal lines) together with each value. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

A. Western blotting



B. Determination of bands

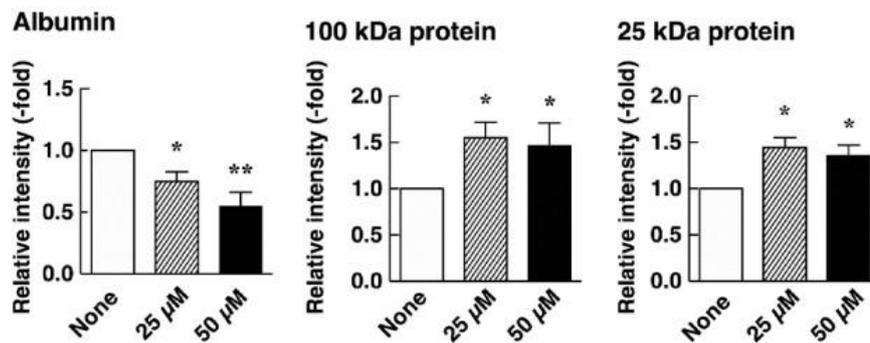


Fig.II-5. Modification of the recognition activity of human anti-albumin antibody by acrolein. One μg and 10 μg proteins of human plasma (Rockland Immunochemicals Inc.) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and Western blotting was performed using human anti-albumin antibody (R & D Systems). Where indicated, anti-albumin antibody (40 $\mu\text{g}/0.05$ ml) was treated with either 25 or 50 $\mu\text{mol}/\text{l}$ acrolein at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h in phosphate-buffered saline, pH 7.4. A. Western blotting. B. Relative intensity of three proteins in Western blotting.

Identification of acrolein-conjugated amino acid residues in Ig gamma-1 chain C region

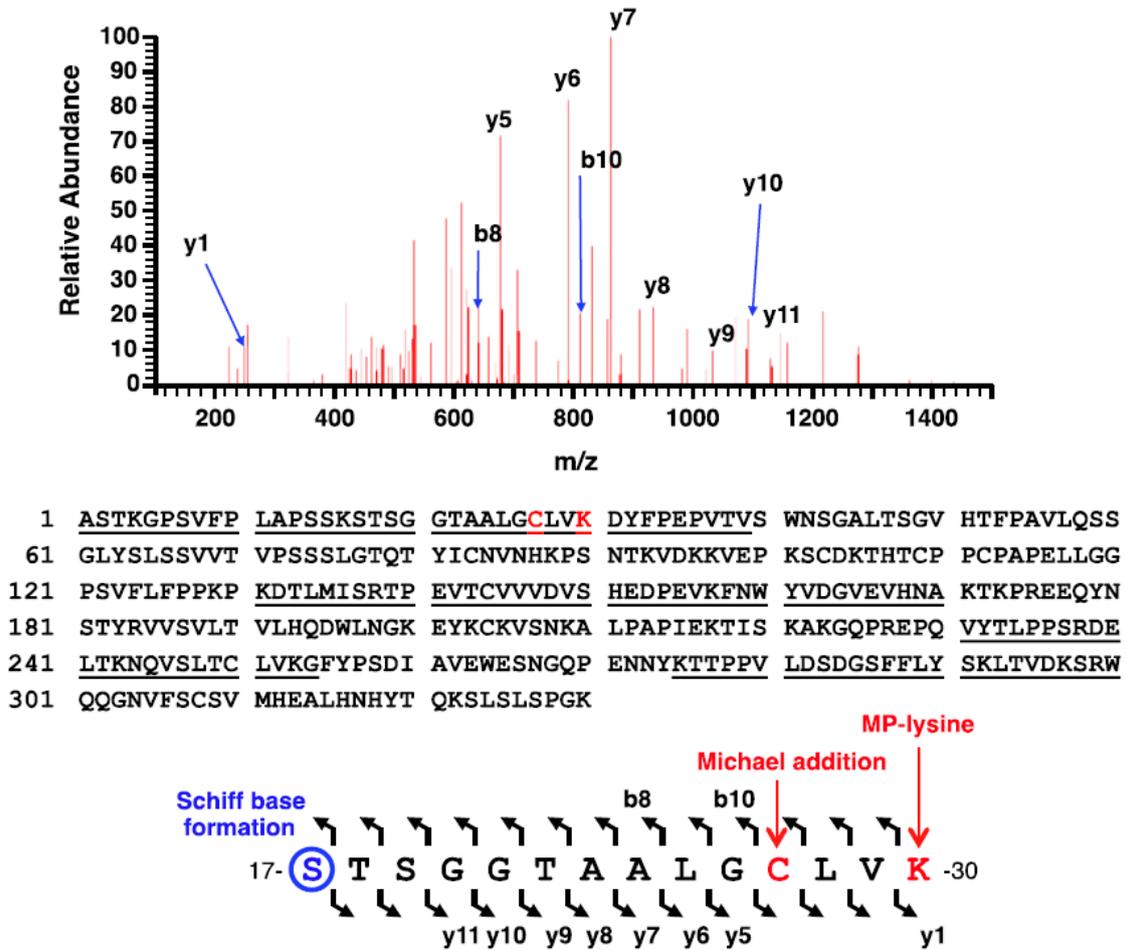


Fig.II-6. MS/MS spectra of Ig gamma-1 chain 16 C region are shown. Amino acid sequence of immunoglobulins is shown together with identified peptides (underlined) by LC-MS/MS. The amino acid residues conjugated with acrolein, Cys²⁷ and Lys³⁰ in Ig gamma-1 chain C region were determined as described in Materials and methods.

Position of acrolein-conjugated amino acid residues in immunoglobulins

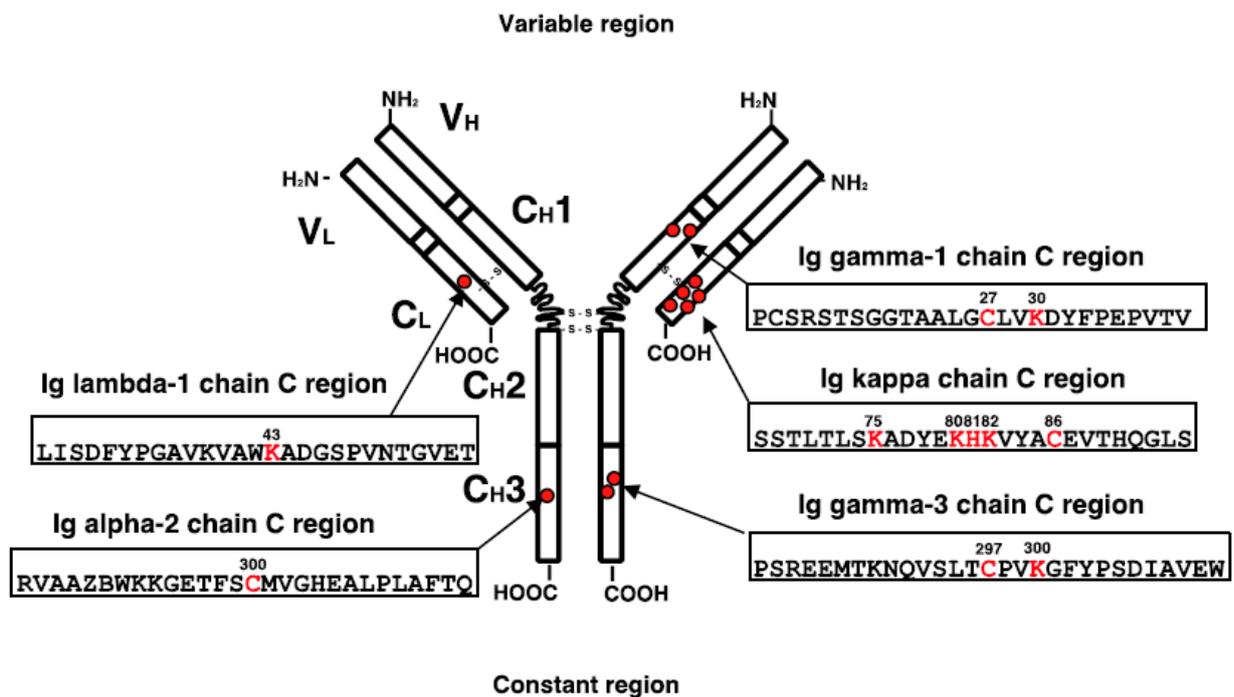


Fig.II-7. Summary of acrolein-conjugated amino acid residues at the constant regions of immunoglobulins is shown. Eleven kinds of the identified acrolein-conjugated amino acid residues (4 cysteine, 6 lysine and 1 histidine residues) are shown in red on the simplified structure of immunoglobulins.

Table 1

Acrolein-conjugated amino acid residues at the variable regions of immunoglobulins purified from saliva of patients with primary Sjögren's syndrome

Variable regions in heavy chain

KSVTCHVKH
MDLMCKKMKH
KTFTCTAAYPESKTPLTATLSKS
RNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKS
GDTFSCMVGHE
NELVTLTCLARGFSPKD
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
GDLYTTSSQLTLPATQCPD
ADKSTGTAYMELSSLTSEDVAVYYCARGAD
KSTSGGTAALGCLVKD
SESTAALGCLVKD
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
KGPSVFPLAPCSR
VDKSRWQQGNVFSCSVMHE
VERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
VEPKSCDKTHTCPPCPAPE

Variable regions in light chain

KLYACEVTHQGLSSPVTKS
RSYSCQVTHEGSTVEKT
HEGSTVEKTVAPTECS

Identified acrolein conjugated amino acid residues (20 cysteine and 4 lysine residues) are underlined in the peptides determined by LC-MS/MS.

2-4 考察

アクロレイン抱合は ADP/ATP translocase 1 [67], アクチン [68], NF- κ B [69] 及び protein tyrosine phosphatase 1B [70] のような酵素の不活性化を引き起こす。最近、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の Cys¹⁵⁰ とアクロレイン結合が、一酸化窒素による同じ残基の S-ニトロシル化と類似して、その活性を阻害することを報告してきた [65]。また、システインが修飾された GAPDH は、核に移行し細胞毒性を引き起こすことが明らかとなっている [71]。

一次シェーグレン症候群は、分泌腺障害を特徴とする全身性自己免疫疾患であるが、その発生機序は解明されていない。本研究では、健康人の唾液をアクロレイン暴露すると自己抗体として SSA や SSB に対する認識能が増加し (Fig.II-4)、一方、抗ヒトアルブミン抗体の場合には、アクロレイン抱合がアルブミン認識能を低下させていた (Fig.II-5)。

実際、LCMSによりアクロレイン抱合を受けたアミノ酸を調べると、免疫グロブリンの可変領域のいくつかのアミノ酸残基、主としてシステイン残基がアクロレインにより修飾されていた (Table 1)。可変領域と定常領域間でのアクロレイン抱合を受けたアミノ酸残基を比較したところ、定常領域では lamda (Lys⁴³)、kappa9 (Lys⁷⁵、Lys⁸⁰、His⁸¹、Lys⁸²、Cys⁸⁶)、alpha-2 (Cys³⁰⁰)、gamma-1 (Cys²⁷、Lys³⁰)、および gamma-3 (Cys²⁹⁷、Lys³⁰⁰) の 11 アミノ酸残基が、可変領域では 24 アミノ酸残基がアクロレイン抱合を受けており、可変領域の方がアクロレイン暴露による影響が大きいことが分かる (Fig.II-7 and Table 1)。

また、定常部位の Ig Kappa Chain C 領域ではジスルフィド結合に近

いアミノ酸残基がアクロレイン抱合を受けていた。通常、タンパク質の立体構造は通常2つのシステイン残基間のジスルフィド結合によって大きく変化することから、定常部位のジスルフィド結合近傍におけるアクロレイン抱合も抗体認識に関与する可能性があると考えられる。

シェーグレン症候群の患者では、唾液中 PC-Acro 量が増加することが明らかとなっている [57]。また、本研究によりアクロレイン曝露を受けた抗体は基質認識能を変化することが明らかとなったことから、自己免疫疾患にアクロレインが関与していることが示唆された。従って、*N*-アセチルシステイン等、アクロレインと反応性の高い SH 基を有する化合物を用いて、pSS 患者の唾液中アクロレインを除去すると症状の進行、又は緩和に効果があるのではないかと考えられる。

3 結論

1. NMDA 受容体は Ca^{2+} と同様にスペルミジン透過能を有し、神経の可塑性、または神経細胞におけるポリアミン量の維持に貢献していることが示唆された。
2. 免疫グロブリンのアクロレイン化が抗原認識能を変化させることにより、自己免疫活性を上昇させ、シェーグレン症候群における細胞障害を増悪させていることが示唆された。

4 参考文献

1. A.E. Pegg, Mammalian polyamine metabolism and function, *IUBMB Life* 61 (2009) 880-894.
2. K. Igarashi, K. Kashiwagi, Modulation of cellular function by polyamines, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 42 (2010) 39-51.
3. H. Sugihara, K. Moriyoshi, T. Ishii, M. Masu, S. Nakanishi, Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 185 (1992) 826-832.
4. M. Hollmann, J. Boulter, C. Maron, L. Beasley, J. Sullivan, G. Pecht, S. Heinemann, Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor, *Neuron* 10 (1993) 943-954.
5. H. Meguro, H. Mori, K. Araki, E. Kushiya, T. Kutsuwada, M. Yamazaki, T. Kumanishi, M. Arakawa, K. Sakimura, M. Mishina, Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs, *Nature* 357 (1992) 70-74.
6. T. Kutuwada, N. Kashiwabuchi, H. Mori, K. Sakimura, E. Kushiya, K. Araki, H. Meguro, H. Masaki, T. Kumanishi, M. Arakawa, M. Mishina, Molecular diversity of the NMDA receptor channel, *Nature* 358 (1992) 36-41.
7. T. Ishii, K. Moriyoshi, H. Sugihara, K. Sakurada, H. Kadotani, M. Yokoi, C. Akazawa, R. Shigemoto, N. Mizuno, M. Masu, S. Nakanishi, Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate

- receptor subunits, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2836-2843.
8. T. V. P. Bliss, G. L. Collingridge, A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus, *Nature* 361 (1993) 31-39.
 9. M. Hollman, S. Heinemann, Cloned glutamate receptors, *Annu. Rev. Neurosci.* 17 (1994) 31-108.
 10. G. M Durand, P. Gregor, X. Zheng, M. V. L. Bennett, G. R. Uhl, R. S. Zukin, Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 9359-9363.
 11. G. M. Durand, M. V. L. Bennett, R. S. Zukin, Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6731-6735.
 12. X. Zheng, L. Zhang, G. M. Durand, M. V. L. Bennett, R. S. Zukin, Mutagenesis rescues spermine and Zn^{2+} potentiation of recombinant NMDA receptors, *Neuron* 12 (1994) 811-818.
 13. R. S. Zukin, M. V. L. Bennett, Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit, *Trends Neurosci.* 18 (1995) 306-313.
 14. M. Watanabe, Y. Inoue, K. Sakimura, M. Mishina, Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs, *NeuroReport* 3 (1992) 1138-1140.
 15. Y. Li, R. Erzurumlu, C. Chen, S. Jhaveri, S. Tonegawa, Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal

- brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice, *Cell* 76 (1994) 427-437.
16. D. Forrest, M. Yazaki, H. D. Soares, M. Sheng, C. Stewart, J. Mogarn, J. Connor, T. Curran, Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death, *Neuron* 13 (1994) 325-338.
 17. J. Tsien, P. Huerta S. Tonegawa, The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory, *Cell* 87 (1996) 1327-1338.
 18. T. Kutsuwada, K. Sakimura, T. Manabe, C. Takayama, N. Katukura, E. Kushiya, R. Natsume, M. Watanabe, Y. Inoue, T. Yagi, S. Akizawa, M. Arakawa, T. Takahashi, Y. Nakamura, H. Mori, M. Mishina, Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice, *Neuron* 16 (1996) 333-344.
 19. T. Masuko, K. Kusama-Eguchi, K. Sakata, T. Kusama, S. Chaki, S. Okuyama, K. Williams, K. Kashiwagi, K. Igarashi, Polyamine transport, accumulation, and release in brain, *J. Neurochem.* 84 (2003) 610-617.
 20. M. Benveniste, M.L. Mayer, Multiple effects of spermine on N-methyl-Daspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones, *J. Physiol.* 464 (1993) 131-163.
 21. K. Williams, Interactions of polyamines with ion channels, *Biochem. J.* 325 (Pt 2) (1997) 289-297.
 22. T. Masuko, K. Kashiwagi, T. Kuno, N.D. Nguyen, A.J. Pahk, J. Fukuchi, K. Igarashi, K. Williams, A regulatory domain (R1-R2) in the amino

- terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein, *Mol. Pharmacol.* 55 (1999) 957-969.
23. K. Kashiwagi, T. Masuko, C.D. Nguyen, T. Kuno, I. Tanaka, K. Igarashi, K. Williams, Channel blockers acting at N-methyl-D-aspartate receptors: differential effects of mutations in the vestibule and ion channel pore, *Mol. Pharmacol.* 61 (2002) 533-545.
24. X. Han, H. Tomitori, S. Mizuno, K. Higashi, C. Full, T. Fukiwake, Y. Terui, P. Leewanich, K. Nishimura, T. Toida, K. Williams, K. Kashiwagi, K. Igarashi, Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-D-aspartate receptor, *J. Neurochem.* 107 (2008) 1566-1577.
25. H. Tomitori, A. Suganami, R. Saiki, S. Mizuno, Y. Yoshizawa, T. Masuko, Y. Tamura, K. Nishimura, T. Toida, K. Williams, K. Kashiwagi, K. Igarashi, Structural changes of regulatory domain heterodimer of N-methyl-D-aspartate receptor subunits GluN1 and GluN2B through the binding of spermine and ifenprodil, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343 (2012) 82-90.
26. K. Kashiwagi, I. Tanaka, M. Tamura, H. Sugiyama, T. Okawara, M. Otsuka, T.N. Sabado, K. Williams, K. Igarashi, Anthraquinone polyamines: novel channel blockers to study N-methyl-D-aspartate receptors, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309 (2004) 884-893
27. L. Jin, M. Miyazaki, S. Mizuno, M. Takigawa, T. Hirose, K. Nishimura,

- T. Toida, K. Williams, K. Kashiwagi, K. Igarashi, The pore region of N-methyl-D-aspartate receptors differentially influences stimulation and block by spermine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327 (2008) 68-77..
28. R. Dingledine, K. Borges, D. Bowie, S.F. Traynelis, The glutamate receptor ion channels, *Pharmacol. Rev.* 51 (1999) 7-61.
29. S.F. Traynelis, L.P. Wollmuth, C.J. McBain, F.S. Menniti, K.M. Vance, K.K. Ogden, K.B. Hansen, H. Yuan, S.J. Myers, R. Dingledine, Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function, *Pharmacol. Rev.* 62 (2010) 405-496.
30. K. Igarashi, A. Shirahata, A.J. Pahk, K. Kashiwagi, K. Williams, Benzyl-polyamines: novel, potent N-methyl-D-aspartate receptor antagonists, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283 (1997) 533-540.
31. J. Chao, N. Seiler, J. Renault, K. Kashiwagi, T. Masuko, K. Igarashi, K. Williams, N1-dansyl-spermine and N1-(n-octanesulfonyl)-spermine, novel glutamate receptor antagonists: block and permeation of N-methyl-D-aspartate receptors, *Mol. Pharmacol.* 51 (1997) 861-871.
32. D. Bowie, M.L. Mayer, Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block, *Neuron* 15 (1995) 453-462.
33. K. Moriyoshi, M. Masu, T. Ishii, R. Shigemoto, N. Mizuno, S. Nakanishi, Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor, *Nature* 354 (1991) 31-37.
34. H. Monyer, R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann, P.H. Seeburg, Heteromeric NMDA

- receptors: molecular and functional distinction of subtypes, *Science* 256 (1992) 1217-1221.
35. K. Williams, Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors, *Mol. Pharmacol.* 44 (1993) 851-859.
36. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
37. L. Nowak, P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet, A. Prochiantz, Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones, *Nature* 307 (1984) 462-465.
38. M.L. Mayer, G.L. Westbrook, P.B. Guthrie, Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones, *Nature* 309 (1984) 261-263.
39. H.S. Chen, J.W. Pellegrini, S.K. Aggarwal, S.Z. Lei, S. Warach, F.E. Jensen, S.A. Lipton, Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity, *J. Neurosci.* 12 (1992) 4427-4436.
40. K. Nishimura, H. Okudaira, E. Ochiai, K. Higashi, M. Kaneko, I. Ishii, T. Nishimura, N. Dohmae, K. Kashiwagi, K. Igarashi, Identification of proteins whose synthesis is preferentially enhanced by polyamines at the level of translation in mammalian cells, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*

- 41 (2009) 2251-2261.
41. S. Watanabe, K. Kusama-Eguchi, H. Kobayashi, K. Igarashi, Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 20803-20809.
 42. HM. Moutsopoulos, BL. Webber, TP. Vlagopoulos, TM. Chused, JL. Decker, Differences in the clinical manifestations of sicca syndrome in the presence and absence of rheumatoid arthritis, *Am. J. Med.* 66 (1979) 733-736.
 43. YT. Konttinen, P. Kangaspunta, O. Lindy, M. Takagi, T. Sorsa, M. Segerberg, et al, Collagenase in Sjögren's syndrome, *Ann. Rheum. Dis.* 53 (1994) 836-839.
 44. F. Franceschini, I. Cavazzana, Anti-Ro/SSA and La/SSB antibodies, *Autoimmunity* 38 (2005) 55-63.
 45. V. Goeb, V. Salle, P. Duhaut, F. Jouen, A. Smail, JP. Ducroix, et al, Clinical significance of autoantibodies recognizing Sjögren's syndrome A (SSA), SSB, calpastatin and alpha-fodrin in primary Sjögren's syndrome, *Clin. Exp. Immunol.* 148 (2007) 281-287.
 46. R. Hanemaaijer, H. Visser, YT. Konttinen, P. Koolwijk, JH. Verheijen, A novel and simple immunocapture assay for determination of gelatinase-B (MMP-9) activities in biological fluids: saliva from patients with Sjögren's syndrome contain increased latent and active gelatinase-B levels, *Matrix. Biol.* 17 (1998) 657-665.
 47. P. Perez, E. Goicovich, C. Alliende, S. Aguilera, C. Leyton, C. Molina, et al, Differential expression of matrix metalloproteinases in labial

- salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome, *Arthritis. Rheum.* 43 (2000) 2807-2817.
48. M. Ram, Y. Sherer, Y. Shoenfeld, Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases, *J. Clin. Immunol.* 26 (2006) 299-307.
49. K. Sakata, K. Kashiwagi, S. Sharmin, S. Ueda, Y. Irie, N. Murotani, et al, Increase in putrescine, amine oxidase, and acrolein in plasma of renal failure patients, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (2003) 143-149.
50. H. Tomitori, T. Usui, N. Saeki, S. Ueda, H. Kase, K. Nishimura, et al, Polyamine oxidase and acrolein as novel biochemical markers for diagnosis of cerebral stroke, *Stroke* 36 (2005) 2609-2613.
51. K. Igarashi, S. Ueda, K. Yoshida, K. Kashiwagi, Polyamines in renal failure, *Amino Acids* 31 (2006) 477-483.
52. R. Saiki, K. Nishimura, I. Ishii, T. Omura, S. Okuyama, K. Kashiwagi, et al., Intense correlation between brain infarction and protein-conjugated acrolein, *Stroke* 40 (2009) 3356-3361.
53. K. Hensley, KA. Robinson, SP. Gabbita, S. Salsman, RA. Floyd, Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 1456-1462.
54. JP. Kehrer, SS. Biswal, The molecular effects of acrolein, *Toxicol. Sci.* 57 (2000) 6-15.
55. S. Sharmin, K. Sakata, K. Kashiwagi, S. Ueda, S. Iwasaki, A. Shirahata, et al, Polyamine cytotoxicity in the presence of bovine serum amine oxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 (2001)

228-235.

56. M. Yoshida, H. Tomitori, Y. Machi, M. Hagihara, K. Higashi, H. Goda, et al, Acrolein toxicity: Comparison with reactive oxygen species, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378 (2009) 313-318.
57. K. Higashi, M. Yoshida, A. Igarashi, K. Ito, Y. Wada, S. Murakami, et al, Intense correlation between protein-conjugated acrolein and primary Sjogren's syndrome, *Clin. Chim. Acta.* 411 (2010) 359-563.
58. T. Fujibayashi, S. Sugai, N. Miyasaka, Y. Hayashi, K. Tsubota, Revised Japanese criteria for Sjogren's syndrome (1999): availability and validity, *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 14 (2004) 425-434.
59. H. Tsuboi, S. Hagiwara, H. Asashima, H. Umehara, A. Kawakami, H. Nakamura, et al, Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjogren's syndrome in Japanese patients, *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 23 (2013) 219-225.
60. MM. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram 13 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
61. K. Uchida, M. Kanematsu, K. Sakai, T. Matsuda, N. Hattori, Y. Mizuno, et al, Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95 (1998) 4882-4887.
62. J. Cai, A. Bhatnagar, WM. Pierce Jr., Protein modification by acrolein: formation and stability of cysteine adducts, *Chem. Res. Toxicol.* 22 (2009) 708-716.

63. M. Yoshida, K. Higashi, L. Jin, Y. Machi, T. Suzuki, A. Masuda, et al, Identification of acrolein-conjugated protein in plasma of patients with brain infarction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391 (2010) 1234-1239.
64. MA. Bradley, WR. Markesbery, MA. Lovell, Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein in the brain in preclinical Alzheimer disease, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 1570-1576.
65. M. Nakamura, H. Tomitori, T. Suzuki, A. Sakamoto, Y. Terui, R. Saiki, et al, Inactivation of GAPDH as one mechanism of acrolein toxicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430 (2013) 1265-1271.
66. A. Furuhata, T. Ishii, S. Kumazawa, T. Yamada, T. Nakayama, K. Uchida, N⁻(3-Methylpyridinium)lysine, a major antigenic adduct generated in acrolein-modified protein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 48658-48665.
67. B. Han, JF. Stevens, CS. Maier, Design, synthesis, and application of a hydrazide-functionalized isotope-coded affinity tag for the quantification of oxylipid-protein conjugates, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3342-3354.
68. I. Dalle-Donne, M. Carini, G. Vistoli, L. Gamberoni, D. Giustarini, R. Colombo, et al, Actin Cys³⁷⁴ as a nucleophilic target of alpha,beta-unsaturated aldehydes, *Free Radic. Biol. Med.* 42 (2007) 583-598.
69. C. Lambert, J. Li, K. Jonscher, TC. Yang, P. Reigan, M.

- Quintana, et al, Acrolein inhibits 14 cytokine gene expression by alkylating cysteine and arginine residues in the NF- κ B1 DNA binding domain, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 19666-19675.
70. DR. Seiner, JN. LaButti, KS. Gates, Kinetics and mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B inactivation by acrolein, *Chem. Res. Toxicol.* 20 (2007) 1315-1320.
71. N. Sen, MR. Hara, MD. Kornberg, MB. Cascio, BI. Bae, N. Shahani, et al., Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis, *Nat. Cell. Biol.* 10 (2008) 866-873.

5 論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Tadao Hirose, Ryotaro Saiki, Yuki Yoshizawa, Masataka Imamura, Kyohei Higashi, Itsuko Ishii, Toshihiko Toida, Keith Williams, Keiko Kashiwagi, and Kazuei Igarashi.: Spermidine, and Ca^{2+} , but not Na^{+} , can permeate NMDA receptors consisting of GluN1 and GluN2A or GluN2B in the presence of Mg^{2+} . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463 (2015) 1190–1195
2. Tadao Hirose, Ryotaro Saiki, Takeshi Uemura, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Satoshi Ito, Hoyu Takahashi, Itsuko Ishii, Toshihiko Toida, Keiko Kashiwagi, and Kazuei Igarashi.: Increase in acrolein-conjugated immunoglobulins in saliva from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clinica Chimica Acta*, 450 (2015) 184–189

6 謝辞

本研究を行うにあたり、4年間という長期間にわたり終始懇切丁寧に御指導して下さった五十嵐一衛名誉教授に心から感謝いたします。先生の仕事に取り組む姿勢から、研究だけでなく、それ以上に多くの大切なことを学ぶことができました。戸井田敏彦教授には、多岐にわたって大変お世話になりました。社会人大学院生としての研究が滞りなく継続できたのは先生のお陰です。心より感謝いたします。適切な御助言や御指導をくださいました、西村和洋准教授、東恭平助教に深く感謝いたします。齋木遼太郎博士研究員には、細かな実験手技を御指導いただき、また、学会発表での御助言など様々な面でお世話になりました。ありがとうございました。植村武史博士研究員、D2 今村正隆氏には多くの実験を手伝っていただきました。ありがとうございました。日々の実験でお世話になりました病態分析化学研究室の現役学生の皆様に感謝いたします。歳の差があるにも関わらず、研究室の仲間として受け入れてくださったおかげで、毎日楽しい研究生活を送ることができました。また、精神的に支えてくださった方、そして大切な友人達に深く感謝いたします。最後に、私の進路について理解を示し、全面的に研究生活を支えてくれた妻と子供たちに深く感謝いたします。

7 主査および副査

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 千葉 寛
副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 山口 直人
副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 村山 俊彦