

ポリアミンモジュロンによる細胞増殖と生存率の調節

●五十嵐 一衛

千葉大学大学院薬学研究院

〈研究の目的と進め方〉

低分子塩基性生理活性物質であるポリアミン（プトレスシン、スペルミジン、スペルミン）は細胞増殖・分化に重要な役割を果たしている。このポリアミン濃度は細胞内での生合成・分解と細胞内外への輸送により細胞増殖に応じて厳密に調節されており、大腸菌ではこれらポリアミン濃度調節に関わる遺伝子は全体のゲノムサイズの実に0.6%にも達している。ポリアミンは細胞内では主としてRNAと結合して存在しており、その構造を変えることによりいろいろな生理作用を発揮すると考えられている。私共はこれまでに、大腸菌のポリアミン生合成酵素欠損株をポリアミン存在下あるいは非存在下で培養し、ポリアミンの蛋白質合成に対する役割を分子レベルで解析し、以下の知見を得た。この生合成酵素欠損株はポリアミンの培地中への添加により増殖速度が3～5倍上昇するが、ポリアミンは16S rRNAのアデニンのメチル化を促進することにより30Sリボソーム亜粒子のアセンブリを促進して全体の蛋白質合成を促進すること、及び栄養源としてオリゴペプチドを細胞内に取り込む際に必要なオリゴペプチド結合蛋白質（OppA）の合成並びにアデニル酸シクラーゼ（Cya）の合成を翻訳レベルで強く促進することを見出した。その結果、大腸菌にはポリアミンにより翻訳レベルで発現調節を受けるポリアミンモジュロンが存在するのではないかという考えに至った。本研究では、ポリアミンにより翻訳レベルで発現促進を受ける蛋白質の更なる同定と、その合成促進に関わるメカニズムを分子レベルで解析し、ポリアミンモジュロンの細胞増殖及び生存率に果たす役割解明を目指す。

〈研究開始時の研究計画〉

1. ポリアミンにより翻訳レベルで発現調節を受ける遺伝子群（ポリアミンモジュロン）の更なる探索を行ったところ、大腸菌の生存率に関わるRNAポリメラーゼ開始因子の一種であるs38の合成がポリアミンにより翻訳レベルで促進を受けることが明らかとなった。このポリアミンによる合成促進メカニズムを明らかにする。
2. ポリアミンモジュロンによりコードされている3種の蛋白質のうち、2種が転写因子であった。従って、DNAマイクロアレイによりポリアミンによって転写レベルで合成促進を受けるmRNAを同定し、それらmRNAの発現を調節している転写因子を選定する。その後、これら転写因子をコードしているmRNAの構造を解析して、OppA mRNAのようにShine-Dalgarno (SD) 配列が明瞭でないmRNAか、開始コドンがAUGではなく非効率的なUUGまたはGUGであるmRNAを選択し、これらmRNAからの転写因子の合成が翻訳レベルでポリアミンにより促進を受けるかどうか検討することにより、新しいポリアミンモジュロンを同定する。
3. 大腸菌でs38因子と共に細胞の生存率に強く関与しているRMF (ribosome modulation factor) の合成は高濃度ポリアミンにより翻訳レベルで強く阻害される。このRMFの合成が種々のポリアミン濃度でどのように変化

するかを検討する。また、このRMF mRNAもSD配列が明瞭でないので、種々の変異RMF mRNAを作製し、ポリアミンによる合成調節を分子レベルで解析する。

〈研究期間の成果〉

1. s38因子のポリアミンによる翻訳レベルにおける合成促進メカニズムを、ポリアミン生合成欠損株MA261を100 µg/mlプトレスシン存在下または非存在下で培養することにより検討した。これまでにポリアミンによる合成促進が明らかとなっているOppA合成の場合は、OppA mRNAのSD配列（開始コドンAUGより11ヌクレオチド上流）が通常的位置（開始コドンAUGより6または7ヌクレオチド上流）より離れており、ポリアミンによりOppA mRNAの構造が変化してSD配列と開始コドンAUGの相対距離が近づくためであった。また、Cya合成の場合はCya mRNAの開始コドンが非効率なUUGであり、UUG依存のfMet-tRNAのリボソームへの結合がポリアミンにより促進されるためであった。RpoS (s38) mRNAの場合は、多くの大腸菌で33番目のコドンが終止コドンUAGであり、この終止コドン依存Gln-tRNA^{supE}のリボソームへの結合がポリアミンにより促進されるためであった（図1参照、文献1）。
 2. プトレスシンの添加により発現が上昇するmRNAをDNAマイクロアレイにより同定した。対数増殖期（A540 = 0.5）で発現している約2,700種のmRNAの中でポリアミンにより発現が上昇する約300種のmRNAを同定した。特にポリアミンによる発現が上昇するmRNA群として、エネルギー産生に関わるmRNA群と鉄輸送に関わるmRNA群が同定された。これらmRNA群の発現を調節している転写因子のmRNAの中でSD配列が開始コドンAUGより離れているmRNAを探索したところ、いくつかのエネルギー産生に関わるmRNA群、rRNA、ある種のtRNAの転写因子であるFisと鉄オペロンの転写因子であるFecI (s18) のmRNAがそれに相当した。従って、FisとFecI合成に対するポリアミンの効果を検討したところ、両蛋白質の合成はポリアミンにより翻訳レベルで合成促進を受けることが明らかとなり、FisとFecIをコードしているfis、fecI遺伝子は新しいポリアミンモジュロンであることが明らかとなった（文献4）。
- 次に、大腸菌で唯一+1 frameshiftで合成されるRF2合成がポリアミンにより促進を受けるかどうか検討した。その結果、RF2量が少ない対数増殖初期にポリアミンにより+1 frameshiftが促進されることが明らかとなり、RF2をコードするprfBもポリアミンモジュロンであることが明らかとなった。RF2は終止コドンUAGを強く認識するが、UAAの認識は弱い。対数増殖初期に増加するリボソーム蛋白質mRNAはそのほとんどがUAA終止コドンを有しており、これらmRNA群の翻訳効率を上昇させるのにポリアミンによるRF2合成促進が貢献していることが示唆された（投稿中）。

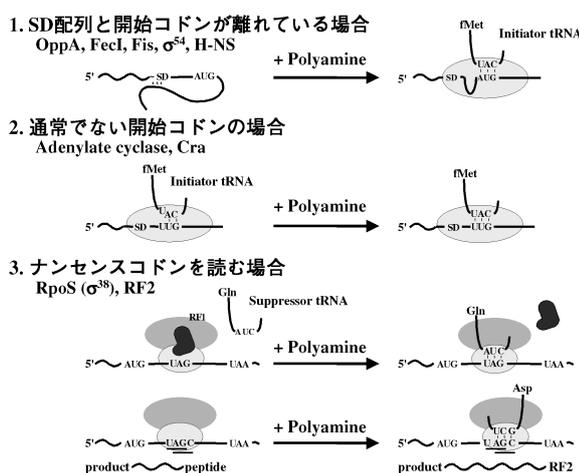


図1 ポリアミンによる蛋白質合成のモジュレーション

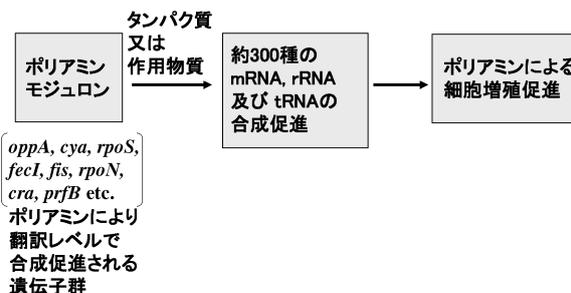


図2 ポリアミンによる大腸菌細胞増殖促進メカニズム：ポリアミンモジュロンの役割

表1 ポリアミンにより転写レベルで発現上昇する遺伝子群

	Gene
Genes regulated by σ^{38} (σ^S)	<i>acnA, aidB, aldB, appB, bolA, cbpA, cfa, dacC, deoD, dps, elaB, fic, frdD, gabP, gadA, gadB, hdeA, hdeB, hyaC, katE, katG, ldcC, msyB, narY, osmC, osmE, osmY, otsA, otsB, pfkB, poxB, psiF, slp, sodC, sufS, tala, treA, treF, uspB, wrbA, xasA, yah0, ybaS, ybaT, ybaY, ybgA, ybgS, ybhE, ybhP, ybjP, ycaC, yccJ, ycfH, ycgB, yddX, ydiZ, yeaG, yebF, yfcG, yfeT, ygaF, yhc0, yhiE, yhiN, yhiU, yhiV, yhjD, yiaG, yjbJ, yidI, yjdJ, yjgR, ynhG, yohF, yqjC, yajD</i>
Genes regulated by Cya	<i>agaZ, cdd, flag, flgM, flhB, fliA, fliD, fliG, fliH, fliI, fliM, fliN, fliQ, malP, manX, manY, manZ, ptsG, sdhA, sdhB, sdhD, tsr, ubp, ugpQ</i>
Genes regulated by FecI (σ^{18})	<i>fecA, fecB, fecC, fecD, fecE</i>
Genes regulated by Fis	<i>adhE, nuoA, nuoB, nuoD, nuoG, nuoH, nuoI, nuoK, nuoL, hupA, ptsG</i>
Genes regulated by σ^{54} (σ^N)	<i>astB, glnH, hycC, hypC, hype, pspA, rtca, rtcB, oat</i>
Genes regulated by Cra	Activation; <i>acnA</i> Repression; <i>fruB, glk</i>
Genes regulated by H-NS	Activation; <i>flgA, flgI, rplA, rplB, rplC, rplF, rplI, rplK, rplL, rplN, rplQ, rpmG, rpsN, rpsQ, rpsS</i> Repression; <i>appY, aslB, csgA, cspC, cspG, cspI, cyoA, feoB, ftn, gnd, hha, ompC, ompF, pf1B, rfaI, rfaK, spy, wcaI, ycbW, ydbD, ydeP, yedV, ygaP, yhiX, ynaE</i>

更に、栄養源としてアミノ酸を添加すると、転写因子であるRpoN (σ^N)、Cra、H-NSの合成がポリアミンにより翻訳レベルで促進を受け、これら蛋白質をコードしている遺伝子群はポリアミンモジュロンと同定された。RpoNとH-NSのポリアミンによる合成促進はSD配列のポリアミンによる構造変化によるものであり、Craの合成促進は非効率的なGUG依存fMet-tRNAのリボソームへの結合促進によるものであった(図1参照、投稿準備中)。

これまでに9種のポリアミンモジュロンが同定されたが、そのうちの7種が転写因子であり、これら7種の転写因子により合成促進を受けるmRNAがポリアミンにより合成促進を受ける約300種のmRNAのうちの約150種を占めた(表1参照)。

これらの結果より、ポリアミンがポリアミンモジュロンによりコードされている蛋白質合成を翻訳レベルで促進し、更にこれら蛋白質または蛋白質により作られる作用物質(オリゴペプチド等)が約300種のmRNA

合成を促進し、その結果としてポリアミンが細胞増殖を促進することが明らかとなった(図2参照、文献5)

3. 大腸菌の静止期の生存率はs38因子と共にRMFに強く依存している(文献2)。このRMF mRNAはSD配列が明瞭でなく、rmf遺伝子はポリアミンモジュロンの可能性が示唆された。このrmf遺伝子欠損株と野生株のDNAマイクロアレイを行ったところ、リボソーム蛋白質mRNA量が欠損株で上昇し、RMFがリボソーム蛋白質mRNA転写の負の調節因子である可能性が示唆された。このrmf遺伝子を対数初期に強制発現させると細胞増殖が阻害された。更にRMF mRNA上に明瞭なSD配列を創ると、RMF合成が一層多くなり、リボソーム合成が阻害され、細胞増殖がより強く阻害された(投稿準備中)。従って、rmfもポリアミンモジュロンであると判定された。

大腸菌の酸性側環境での生育には、カダベリン輸送蛋白質CadBが重要な役割を果たしている(文献3)。カダベリンが細胞内に蓄積するとどのような蛋白質の合

成が翻訳レベルで促進を受けるか検討中である。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ポリアミンの細胞増殖促進作用はポリアミンとDNAの相互作用に基づくと考えている人が依然として多い。しかし、ポリアミンが翻訳レベルで特定mRNAの発現を調節し、細胞増殖に関わっているという考え方は、国内外で徐々に受け入れられてきている。微生物におけるポリアミンモジュロンの同定はここ2、3年で終了させ、この考え方が真核細胞においても正しいことを証明する。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初計画には記されていないが、真核細胞においても翻訳レベルでポリアミンにより合成促進を受ける約10種の蛋白質の同定に成功している。しかしながら、真核細胞の蛋白質合成開始反応機序が原核細胞のそれと著しく異なっているため、ポリアミンによる合成促進メカニズムの解析に非常に時間がかかっている。現在、そのbreakthroughを模索中である。

〈今後の課題〉

上述のように、大腸菌においてポリアミンモジュロンの考え方を確立し、真核細胞においてもポリアミンの細胞増殖促進作用をポリアミンモジュロンの考え方で説明できるようにする。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 0303201627
Yoshida, M., Kashiwagi, K., Kawai, G., Ishihama, A., and Igarashi, K. Polyamines enhance synthesis of the RNA polymerase σ 38 subunit by suppression of an amber termination codon in the open reading frame. *J. Biol. Chem.* 277, 37139-37146 (2002)
2. 0303201614
Raj, V. S., Füll, C., Yoshida, M., Sakata, K., Kashiwagi, K., Ishihama, A., and Igarashi, K. Decrease in cell viability in an RMF, σ 38, and OmpC triple mutant of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 252-257 (2002)
3. 0602031209
Soksawatmaekhin, W., Kuraishi, A., Sakata, K., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 51, 1401-1412 (2004)
4. 0602031224
Yoshida, M., Kashiwagi, K., Shigemasa, A., Taniguchi, S., Yamamoto, K., Makinoshima, H., Ishihama, A., and Igarashi, K. A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon. *J. Biol. Chem.* 279, 46008-46013 (2004)
5. 0602031214
Igarashi, K., and Kashiwagi, K. Polyamine modulon in *Escherichia coli*: Genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines. *J. Biochem.* 139, 11-16 (2006)