

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32525

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860044

研究課題名(和文) RNAの構造変化に基づくポリアミンによる細胞増殖促進・生存率維持の機序解明

研究課題名(英文) Regulation of cell growth and cell viability by polyamines at the level of translation depending on the structural changes of polyamine-RNA complexes

研究代表者

照井 祐介 (TERUI, YUSUKE)

千葉科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：60433687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ポリアミンは、主としてRNAと相互作用し細胞増殖因子として働く。ポリアミンにより、翻訳レベルで合成促進をうける細胞増殖や生存率維持に必要な蛋白質をコードする遺伝子群は、ポリアミンモジュロンと命名されている。大腸菌では酸化ストレス下、真核細胞では細胞増殖に関わる蛋白質を同定し、ポリアミンの細胞増殖・生存率維持に果たす役割を明確にした。

大腸菌における酸化ストレスの除去に関して、ポリアミンはSoxR、EmrR及びGshAを翻訳レベルで合成促進し、生存率維持に寄与することを明らかにした。真核細胞の翻訳伸長因子eEF1A遺伝子をポリアミンモジュロンと同定し、eEF1Aの合成促進機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：Polyamines exist mostly as polyamine-RNA complexes in cells. It was found that polyamines enhanced the synthesis of specific proteins at the level of translation, which are important for cell growth and cell viability. A group of genes whose expression is enhanced by polyamines at the level of translation be referred to as a "polyamine modulon".

In this study, we looked for new members of polyamine modulon under oxidative stress conditions in Escherichia coli. It was found that synthesis of SoxR, EmrR, and GshA proteins was enhanced by polyamines at the level of translation. It was found that synthesis of eEF1A was enhanced by polyamines at the level of translation among various translation factors in mammalian cells. The CR sequence existed in eukaryotic mRNAs, which regulates protein synthetic activity and influences polyamine stimulation of protein synthesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ポリアミン 細胞増殖 細胞生存率 翻訳 酸化ストレス CR配列 大腸菌 動物細胞

1. 研究開始当初の背景

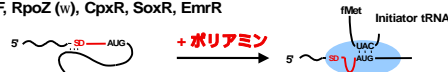
生物界に広く存在するポリアミン(プトレスシン、スペルミジン、スペルミン)は、生命に必須な低分子生理活性アミンであり、細胞増殖因子として機能する。ポリアミンは主として RNA と相互作用し、構造変化を引き起こすことで、特定蛋白質合成を促進することにより機能を発揮する。ポリアミンにより、翻訳レベルで合成促進をうける細胞増殖や生存率維持に必要な蛋白質をコードする遺伝子群をポリアミンモジュロンと命名し、これまでに大腸菌において 11 種を同定した。そのうち 9 種は転写因子であることから、ポリアミンが多く遺伝子発現を調節し、細胞増殖を促進していることが示された。さらに最近、大腸菌の生存率維持やバイオフィーム形成能の上昇に必要な蛋白質をコードする 6 種のポリアミンモジュロンを同定した。

ポリアミンモジュロンのコードする mRNA は、翻訳効率の悪い mRNA であり、1) 翻訳開始に重要な Shine-Dalgarno (SD) 配列と開始コドンが離れている場合、2) 開始コドンが AUG ではなく GUG や UUG の場合、及び 3) mRNA の翻訳領域に終止コドンが存在する場合であり、ポリアミンが RNA の特定構造(二本鎖を形成しない bulged-out 構造)に結合して構造変化を引き起こすことにより、翻訳レベルでの発現上昇をおこすことが明らかになりつつある(図 1)。

本研究では、原核細胞ばかりでなく、真核細胞においても普遍的なポリアミンの役割解明を目指し、以下の 2 テーマに関して研究を展開した。

1. Shine-Dalgarno (SD) 配列と開始コドンが離れている場合

OppA, Fecl (*s*¹⁸), RpoE (*s*²⁴), RpoN (*s*⁵⁴), Fis, H-NS, StpA, RMF, RpoZ (*w*), CpxR, SoxR, EmrR



2. 通常でない開始コドンの場合

Cya, Cra, SpoT, UvrY, RRF, GshA



3. ナンセンスコドンを読む場合

RpoS (*s*³⁸), RF2

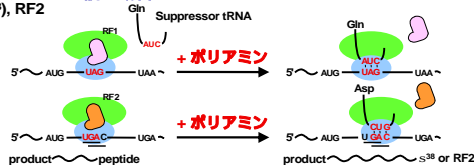


図 1 ポリアミンによるポリアミンモジュロンの翻訳促進機構：ポリアミンモジュロン mRNA の 3 つの特徴を示す。1 つ目は、翻訳開始に重要な Shine-Dalgarno 配列(SD 配列)と開始コドンとの距離が離れている mRNA である。2 つ目は、開始コドンが AUG ではなく、UUG や GUG といった mRNA である。3 つ目は、ORF 中に終止コドンが存在する mRNA である。ポリアミンはこのような特徴ある翻訳効率の悪い mRNA の蛋白質合成を促進する。

2. 研究の目的

(1) 酸化ストレス条件下における大腸菌ポリアミンモジュロンの同定

酸化ストレスは、種々の疾患を引き起こすことが知られており、酸素から発生する活性酸素種が生体分子に障害を与えるため、微生物はそれらから身を守る防御機構を有している。最近、大腸菌がポリアミン存在下では、スーパーオキシドや過酸化水素などの活性酸素種の酸化ストレスに対して抵抗性が上昇することを見出した。酸化ストレス除去に關与するスーパーオキシドデスムターゼの転写因子である SoxR、薬剤耐性に關わる薬剤排出蛋白質の転写因子である EmrR、及びグルタチオン生合成酵素である GshA をコードする遺伝子がポリアミンモジュロンであると判明したので、これら 3 種の蛋白質のポリアミンによる合成促進機構と酸化ストレス防御機構に果たす役割を解析し、生理的意義の解明を行った。

(2) 動物細胞におけるポリアミンモジュロンの探索とポリアミンによる翻訳促進機構の解明

動物細胞の新規ポリアミンモジュロンの候補として、翻訳伸長因子の eEF1A をコードする遺伝子を見出した。この mRNA の 5' - 非翻訳領域にはこれまで報告された真核細胞のポリアミンモジュロンとの共通性が見出せず、新たな翻訳促進機構が示唆された。このポリアミンによる新しい eEF1A 合成促進機構を分子レベルで解明を行った。

3. 研究の方法

(1) 酸化ストレス条件下における大腸菌ポリアミンモジュロンの同定

酸化ストレス除去に關与するスーパーオキシドデスムターゼの転写因子である SoxR、薬剤排出蛋白質の転写因子である EmrR 及びグルタチオン生合成酵素である GshA の合成が、ポリアミンにより翻訳レベルで強く発現促進をうけることを Western blotting 及び Northern blotting を用いて見出した。また、これら遺伝子の mRNA 構造の検討を行ったところ、他のポリアミンモジュロンの mRNA と同様、SD 配列と開始コドンが離れているか、もしくは開始コドンが AUG でない翻訳効率の低い mRNA であり、ポリアミンが RNA の二本鎖を形成しない bulged-out 構造に結合して構造変化を引き起こし、蛋白質合成を促進する可能性が示唆された。そこで、ポリアミンによる合成促進に SD 配列と開始コドンの距離が關与しているかを、SD 配列と開始コドンの距離を通常的位置にした変異 mRNA をコードするプラスミドを作製して、ポリア

ミンの促進効果が消失するかどうかを検証した。さらに翻訳開始領域の RNA を合成し、円二色性 (CD) を用いた物理化学的手法を用い、ポリアミンによる RNA の構造変化とポリアミンの結合部位を解析した。また、SoxR、EmrR 及び GshA 遺伝子を組み込んだプラスミドを作製し、ポリアミン生合成欠損株に導入後、ポリアミン非存在下でこれら遺伝子を過剰発現させ、細胞生存率及び細胞内グルタチオン量が上昇するかどうか検証した。

(2) 動物細胞におけるポリアミンモジュロンの探索とポリアミンによる翻訳促進機構の解明

ポリアミンが RNA と相互作用し、翻訳レベルで特定蛋白質の発現上昇をもたらすことから、真核細胞の翻訳因子に注目した。抗体が入手可能な翻訳因子 19 種について、マウス乳がん FM3A 細胞を用い、正常細胞とポリアミン欠乏細胞で発現量の差を検討した結果、ポリアミンモジュロンの候補として、翻訳伸長因子の eEF1A を見出した。この蛋白質の mRNA は、5' 非翻訳領域に stem and loop 構造が存在するが、長さが短く、他の真核細胞のポリアミンモジュロンのように ribosome shunting が起こるのに必要な 18S ribosomal RNA との相補部位が存在しない。しかし、開始コドンから上流 26-45 塩基の hairpin 構造部分に 18S rRNA に対する相補配列 (complementary sequence to 18S rRNA: CR) を上流 33-39 塩基に見出した。また、他の翻訳因子やハウスキープ遺伝子約 50 種の mRNA について CR 配列を探索したところ、開始コドンから上流 20-30 塩基に集中して存在していた。従って、eEF1A 合成のポリアミンによる促進機構は、CR 配列と開始コドン AUG が離れているために起こるという原核生物と似た翻訳促進機構が考えられた。そこで、このポリアミンによる合成促進メカニズムを、eEF1A の 5' 非翻訳領域を EGFP につないだ wild type のプラスミドとポリアミン作用部位の候補を変異させた 5' 非翻訳領域を EGFP につないだ数種の変異プラスミドを作製し、NIH3T3 細胞に形質転換して、ポリアミンによる蛋白質合成促進効果が消失するかどうかを検証した。CR 配列については、CR 配列を欠損させた変異体及び位置を変異させた mRNA を作製して、蛋白質合成能及びポリアミンの効果を調べた。

4. 研究成果

(1) 酸化ストレス条件下における大腸菌ポリアミンモジュロンの同定

大腸菌ポリアミン生合成酵素欠損株 MA261 を用いて、細胞増殖 (図 2A)、細胞生存率 (図 2B)、細胞内グルタチオン量 (図 2C) 及びカルボニル化蛋白質量 (図 2D) をポリア

ミン及び 0.6 μM K_2TeO_3 の有無で測定した。その結果、 K_2TeO_3 により大きく低下した細胞増殖及び細胞生存率はポリアミンの添加で回復した。また、ポリアミンにより細胞内グルタチオン量は顕著に増加した。さらに、酸化ストレスによる蛋白質損傷のマーカーであるカルボニル化蛋白質量もポリアミンの添加により低下した。

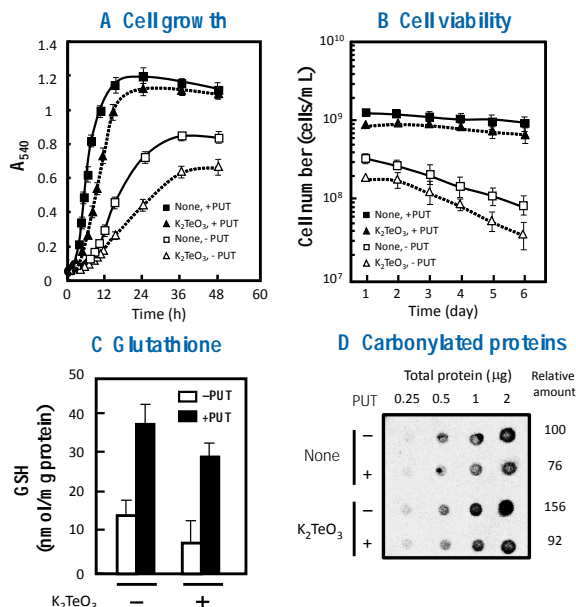


図 2 酸化ストレス下における大腸菌ポリアミン要求株 MA261 の細胞増殖、細胞生存率、細胞内グルタチオン量及びカルボニル化蛋白質

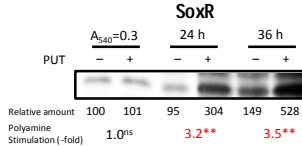
K_2TeO_3 存在下において、ポリアミンによる酸化ストレス除去に関与する転写因子 SoxR の蛋白質発現量の変化を Western blotting により比較した (図 3A)。ポリアミンにより、酸化ストレス下において SoxR の発現量が増加したが、RpoD の発現量には変化が見られなかった。soxR mRNA の SD 配列と開始コドンの位置を通常のもの 7 塩基に変え、lacZ と融合させたプラスミドを作製した (図 3B)。SoxR- β -Gal の合成量を比較した結果、通常のもの SD 配列では、酸化ストレス下、ポリアミンにより 2.9 倍の増加を示したが、距離を短くしたものは 1.4 倍に減少した (図 3C)。同様に薬剤排出蛋白質の転写因子である EmrR 及びグルタチオン合成酵素である GshA においても、ポリアミンにより大きく発現促進された。また、これら mRNA はポリアミンモジュロンに特徴的な配列を有していた (図 3D)。

K_2TeO_3 存在下、EmrR、SoxR 及び GshA 蛋白質を過剰発現させ、細胞内グルタチオン量、細胞増殖及び生存率の変化を比較した結果、ポリアミン非存在下において、それぞれの過剰発現株で細胞内グルタチオン量の上昇、細胞増殖及び生存率の著しい回復が見られた。

従って、ポリアミンが SoxR、EmrR 及び GshA を翻訳レベルで合成促進し、酸化ストレス下において細胞増殖及び生存率維持に

寄与することを明らかにした (図 4)。

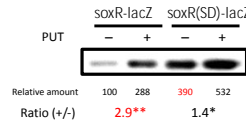
A Western blotting of SoxR



B Sequences of SD sequence and initiation codon regions

T GAG GTA AAG CGA TTT ATG GAA pMW soxR-lacZ
 T CTC CGA GGT CGA TTT ATG GAA pMW soxR(SD)-lacZ
 SD sequence initiation codon

C Western blotting of SoxR-β-Gal



D Western blotting of EmrR and GshA

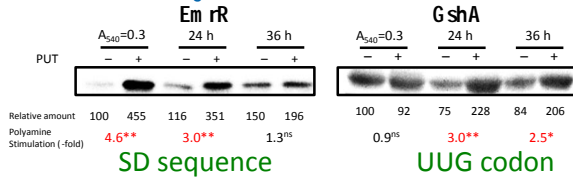


図 3 ポリアミンによる SoxR、EmrR 及び GshA 蛋白質の翻訳レベルにおける合成促進

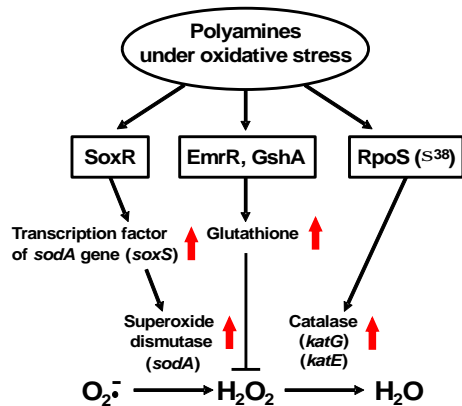


図 4 ポリアミンによる酸化ストレス除去機構

(2) 動物細胞におけるポリアミンモジュロンの探索とポリアミンによる翻訳促進機構の解明

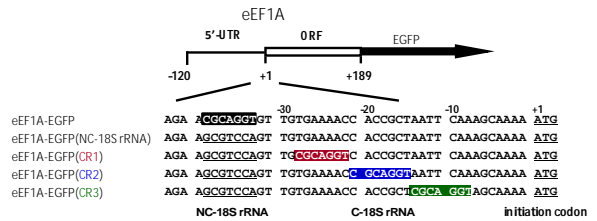
マウス乳がん FM3A 細胞を用いて、オルニチン脱炭酸酵素阻害剤である DFMO を培地に添加し、細胞内のポリアミン量を減少させた。この細胞を用いて、計 19 種の翻訳因子について、ポリアミンによる蛋白質発現量の変化を Western blot 法により検討した結果、19 種の内、18 種はポリアミンによる発現量の著しい変化は見られなかった (図 5A)。しかし、伸長因子である eEF1A の蛋白質発現量がポリアミンにより 3.1 倍増加していることを見出した (図 5B)。さらに、mRNA 量に変化が見られなかったことから (図 5C)、eEF1A はポリアミンにより、翻訳レベル合成促進されることが示唆された。



図 5 種々の翻訳因子の蛋白質発現に対するポリアミンの効果とポリアミンによる eEF1A の翻訳レベルにおける合成促進

eEF1A mRNA のポリアミン作用部位を探索するため、eEF1A 5' -UTR の予測二次構造を Zuker の方法を用いて構築したところ、ポリアミン結合予想部位の loop 構造中に 18S rRNA の 3'末端付近との相補配列を見出した。この 18S rRNA との相補配列を CR 配列と命名し、更なる検討を行った。まず、CR 配列を欠損させた変異体 NC-18S rRNA を鋳型に、多くの翻訳因子でみられた位置に CR 配列を移動させた 2 種類の変異体 CR1 及び CR2、さらに大腸菌の SD 配列と同程度の位置まで近づけた変異体 CR3 を作製し、同様の方法を用いてポリアミンによる促進効果を検討した (図 6A)。その結果、変異体 CR1 及び CR2 を導入した細胞ではそれぞれ 1.1 倍、1.2 倍とポリアミンによる蛋白質合成促進効果が減少した。また、両変異体ともポリアミンの有無に関係なく、蛋白質発現量が増加した。一方、変異体 CR3 では wild type と同様の結果が得られた (図 6B)。これらの結果から、CR 配列は、通常 17~32 塩基に存在すること、またポリアミンは CR 配列の位置が通常とは異なる mRNA からの蛋白質合成を促進することが示唆された。

A. Structure of eEF1A-EGFP fusion genes



B. Western blotting of eEF1A-EGFP

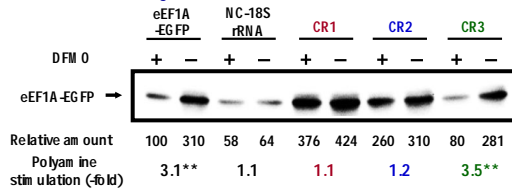


図 6 CR 配列の位置の変異によるポリアミン促進効果の変化

本研究により、CR 配列と開始コドンとの距離が離れている場合、ポリアミンが mRNA の構造を変化させ、蛋白質合成を促進させるという真核細胞のポリアミンモジュロンの新たな翻訳促進機構が明らかとなった(図7)。

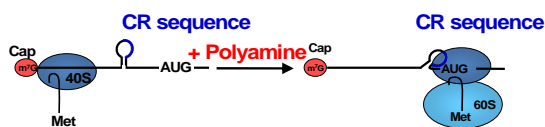


図7 真核細胞におけるポリアミンモジュロンの新たな発現調節機構

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

SAKAMOTO Akihiko, TERUI Yusuke, YOSHIDA Taketo, YAMAMOTO Taku, SUZUKI Hideyuki, YAMAMOTO Kaneyoshi, ISHIHAMA Akira, IGARASHI Kazuei, KASHIWAGI Keiko, The members of polyamine modulon under oxidative stress conditions: two transcriptional factors (SoxR and EmrR) and a glutathione synthetase (GshA). *PLoS One* vol. 10(4), e0124883 (2015) 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0124883. eCollection 2015.

照井祐介, ポリアミンによる蛋白質合成促進 **ポリアミン** vol. 2(2), pp.46-53 (2015) 査読有 <http://www.cis.ac.jp/~kkashiwagi/PolyamineVol2No2Oct2015.pdf>

TERUI Yusuke, SAKAMOTO Akihiko, YOSHIDA Taketo, KASAHARA Takuma, TOMITORI Hideyuki, HIGASHI Kyohei, IGARASHI Kazuei, KASHIWAGI Keiko, Polyamine stimulation of eEF1A synthesis based on the unusual position of a complementary sequence to 18S rRNA in eEF1A mRNA. *Amino Acids* vol. 47, pp.345-356 (2015) 査読有, DOI: 10.1007/s00726-014-1867-z.

SAKAMOTO Akihiko, TERUI Yusuke, HORIE Chihiro, FUKUI Takashi, MASUZAWA Toshiyuki, SUGAWARA Shintaro, SHIGETA Kaku, IGARASHI Kazuei, KASHIWAGI Keiko, Antibacterial effects by protruding and recessed shark skin micropatterned surfaces of polyacrylate plate with a shallow groove. *FEMS Microbiology Letters* vol. 361, pp.10-16 (2014) 査読有, DOI: 10.1111/1574-6968.12604.

[学会発表](計23件)

SAKAMOTO Akihiko, TERUI Yusuke, YOSHIDA Taketo, IGARASHI Kazuei, KASHIWAGI Keiko, Effects of a CR sequence in mRNA and polyamines on protein synthesis. Gordon Research Conference on Polyamines, 2015, 6, 14, 口頭発表、Waterville Valley, USA

YOSHIDA Taketo, SAKAMOTO Akihiko, TERUI Yusuke, YAMAMOTO Taku, YAMAMOTO Kaneyoshi, ISHIHAMA Akira, SUZUKI Hideyuki, IGARASHI Kazuei, KASHIWAGI Keiko, Role of polyamines under oxidative stress conditions in *Escherichia coli*. Gordon Research Conference on Polyamines, 2015, 6, 14, 口頭発表、Waterville Valley, USA

照井祐介, 五十嵐一衛, 柏木敬子, ポリアミンによる大腸菌の生理機能の調節、日本農芸化学会2015年度大会、2015, 3, 29, 口頭発表、岡山大学

吉田健人, 照井祐介, 坂本明彦, 笠原拓馬, 富取秀行, 五十嵐一衛, 柏木敬子, ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進される翻訳伸長因子eEF1Aの促進機構解析、日本薬学会第135年会、2015, 3, 27, 口頭発表、神戸学院大学

吉田健人, 坂本明彦, 照井祐介, 山本拓, 山本兼由, 石浜明, 鈴木秀之, 五十嵐一衛, 柏木敬子, 酸化ストレス下におけるポリアミンの生理機能解析、第87回日本生化学会、2014, 10, 17, ポスター発表、国立京都国際会館

[図書](計1件)

IGARASHI Kazuei, TERUI Yusuke, KASHIWAGI Keiko, The polyamine modulon: Genes encoding proteins whose synthesis is enhanced by polyamines at the level of translation. In *"Polyamines, a universal molecular nexus for growth, survival and specialised metabolism"* (Eds. T. Kusano, and H. Suzuki) pp. 131-141, Springer Japan (2015)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]ホームページ等

http://www.cis.ac.jp/~kyoin_info/PP/yterui.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

照井 祐介 (TERUI, Yusuke)
千葉科学大学・薬学部・准教授

研究者番号: 60433687

(2)研究分担者

(3)連携研究者