

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32525

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790084

研究課題名(和文)RNAとの相互作用に基づくポリアミンによる遺伝子発現制御機序の解明

研究課題名(英文)Mechanism of regulation of gene expression by polyamines at the level of translation depending on the interaction of polyamines with RNA

研究代表者

照井 祐介 (TERUI, YUSUKE)

千葉科学大学・薬学部・講師

研究者番号：60433687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ポリアミンは、主にRNAと相互作用し細胞増殖因子として働く。本研究では、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ールと命名し、バイオフィーム形成や生存率に関与する大腸菌の新規ポリアミンモジュールの探索を行った。UvrY、CpxR、RRFの3種を同定し、ポリアミンがこれらのmRNAに結合して構造を変え、バイオフィーム形成能や細胞生存率を上昇させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Polyamines are essential for normal cell growth and cell viability. Polyamines exist mostly as polyamine-RNA complexes in cells. A group of genes whose expression is enhanced by polyamines at the level of translation be referred to as a "polyamine modulon". Since biofilm formation is also involved in cell viability, we looked for proteins involved in biofilm formation and cell viability whose synthesis is stimulated by polyamines at the level of translation in *Escherichia coli*. It was found that the synthesis of UvrY, CpxR and RRF was increased by polyamines at the level of translation. The results indicate that polyamines are necessary for both biofilm formation and cell viability.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ポリアミン 細胞増殖 細胞生存率 バイオフィーム 大腸菌 プトレスシン スペルミジン 翻訳

1. 研究開始当初の背景

ポリアミン(プトレスシン、スペルミジン、スペルミン)は、生物界に広く存在する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働く。核酸、中でも 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。ポリアミンにより、翻訳レベルで合成促進を受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 14 種を同定した。そのうち 9 種は転写因子であることから、ポリアミンが多くの遺伝子発現を調節し、細胞増殖を促進していることが明らかとなった。さらに最近、定常期において 70S リボソームを 100S ダイマーにして保存し、生存率を上げる役目を示す ribosome modulation factor (RMF)、環境応答に関わるセカンドメッセンジャーであるグアノシン 4 リン酸 (ppGpp) 合成調節酵素である SpoT 及び RNA ポリメラーゼのサブユニットである RpoZ がポリアミンモジュロン蛋白質であり、ポリアミンが RMF、SpoT 及び RpoZ の合成促進を介して大腸菌の生存率維持に貢献していることを明らかにした。

ポリアミンモジュロンの 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 (2 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)。

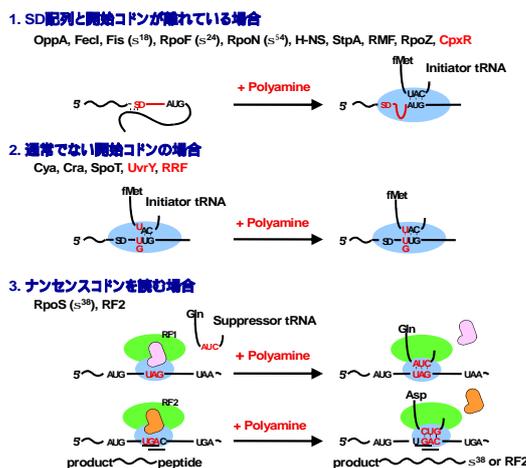


図 1 ポリアミンによるポリアミンモジュロンの翻訳促進機構：ポリアミンモジュロン mRNA の 3 つの特徴を示す。1 つ目は、翻訳開始に重要な Shine-Dalgarno 配列(SD 配列)と開始コドンとの距離が離れている mRNA である。2 つ目は、開始コドンが AUG ではなく、UUG や GUG といった mRNA である。3 つ目

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

細菌は飢餓ストレスにさらされたとき、細菌が排泄する多糖などで囲まれた細菌の集合体 (バイオフィーム) を形成し、排水溝のぬめりや歯垢などとなり、生存率を上昇させている。医療面においても難治性細菌のバイオフィーム形成による抗生物質耐性が問題となっている。また、食品産業において、食品製造設備面のバイオフィームが食品汚染の原因となり、深刻な被害が報告されている。申請者らは、最近、バイオフィーム形成に重要な役割を果たすグアノシン 4 リン酸 (ppGpp) の生合成及び機能に關与する SpoT (ppGpp 合成調節酵素) と RpoZ (RNA ポリメラーゼのサブユニット) をコードする遺伝子がポリアミンモジュロンであることを明らかにした。本研究では、多くの細菌に存在するバイオフィーム形成の second messenger である c-di-GMP 合成に関わる二成分制御系蛋白質の UvrY、及び重金属ストレス (特に銅イオン) で発現する CpxR 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 2 種の蛋白質のポリアミンによる合成促進機構とバイオフィーム形成に果たす役割を解析し、生理的意義の解明を行った。

3. 研究の方法

グルコース飢餓において、バイオフィーム形成制御に関わる蛋白質の一つである UvrY が、定常期にポリアミンにより翻訳レベルで強く発現促進を受けることを Western blotting 及び Northern blotting を用いて見出した。uvrY mRNA も他のポリアミンモジュロンの mRNA と同様、開始コドンが AUG ではなく翻訳効率の悪い UUG であった。そこで、ポリアミンによる合成促進に翻訳効率の悪い開始コドンが関与しているかを、開始コドンを部位特異的変異導入により変異させたプラスミドを作製し、ポリアミンによる合成促進効果が消失するかどうかを検証した。

ポリアミン生合成酵素欠損株にポリアミン非存在下で UvrY を過剰発現させ、バイオフィーム形成が上昇するかどうかバイオフィーム形成能を測定した。

重金属を培地に添加して培養した際、細菌の生育は阻害されるが、バイオフィーム形成は上昇することが報告されている。申請者らは、銅イオン存在下、多くの細菌に存在するバイオフィーム形成の second messenger である c-di-GMP 合成に関わる二成分制御系蛋白質の CpxR が、定常期にポリア

ミンにより翻訳レベルで強く発現促進をうけることを見出した。*cpxR* mRNAも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翻訳効率の低いmRNAであり、ポリアミンがRNAの特定構造(2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高い。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関与しているかを、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。

UvrYと同様、ポリアミン生合成酵素欠損株にCpxRを過剰発現させ、ポリアミン非存在下においてバイオフィーム形成が上昇するかどうかを検証した。

4. 研究成果

大腸菌のポリアミン要求株 MA261 をポリアミン有無で培養し、バイオフィーム形成を測定したところ、ポリアミン存在下では、定常期においてバイオフィーム形成が著しく上昇した(図2)。

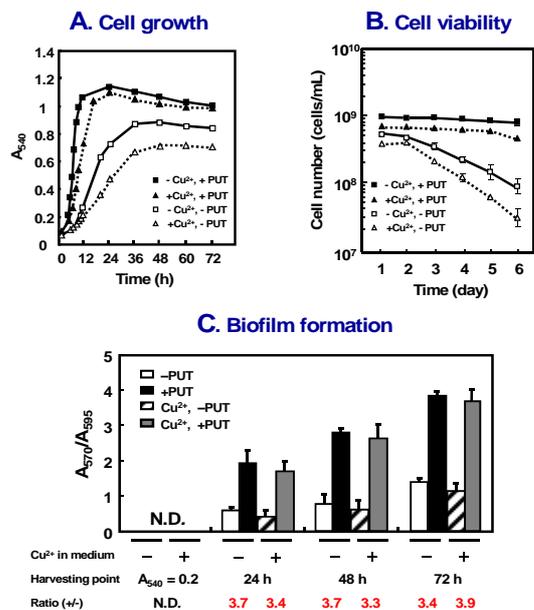
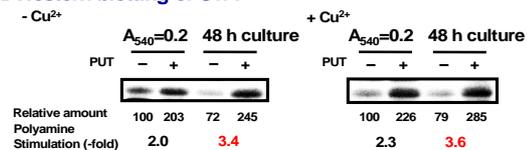


図2 大腸菌ポリアミン要求株 MA261 における細胞増殖、細胞生存率及びバイオフィーム形成能: MA261 を用いて、細胞増殖 (A)、細胞生存率 (B) 及びバイオフィーム形成能 (C) をポリアミン及び銅の有無で測定した。バイオフィーム形成は銅存在下において、低下することが知られている。ポリアミン非存在下では、細胞増殖、細胞生存率及びバイオフィーム形成能は低下するが、ポリアミンを添加すると著しい上昇がみられた。また、銅

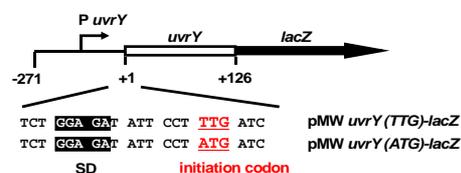
存在下、ポリアミン非存在下においてもそれぞれ著しい低下がみられたが、ポリアミンを添加することで顕著な上昇がみられた。

バイオフィーム形成に關与する二成分情報伝達系蛋白質である UvrY、CpxR、及び mRNA とリボソームの解離因子であり、翻訳に必須な ribosome recycling factor (RRF) の合成がポリアミンにより翻訳レベルで促進され、mRNA 量に変化が見られなかったことから、これらの遺伝子 3 種を新規ポリアミンモジュロンとして同定した(図3)。

A. Western blotting of UvrY



B. Structure of *uvrY-lacZ* fusion gene



C. Western blotting of UvrY-β-Gal

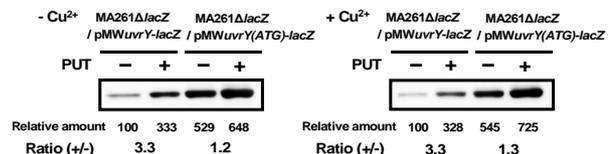


図3 ポリアミンによる UvrY 蛋白質の翻訳レベルにおける合成促進: 銅存在下、非存在下において、ポリアミンによるバイオフィーム形成に關与する二成分情報伝達系蛋白質である UvrY の蛋白質発現量の変化を Western blotting により、比較した (A)。ポリアミンにより、UvrY の発現量が増加した。*uvrY* mRNA の開始コドンを AUG に変え、*lacZ* と融合させたプラスミドを作製した (B)。UvrY-β-Gal の合成量を比較した結果、通常の開始コドンでは、ポリアミンにより 3.3 倍の増加を示したが、AUG に変えたものは 1.2 倍に減少した (C)。

バイオフィーム形成には、二成分情報伝達系や ppGpp の関与が知られているため、UvrY、CpxR、SpoT 及び RpoZ、RMF、RRF 過剰発現株を用い、バイオフィーム形成能及び生存率の変化を比較した。UvrY、CpxR、SpoT 及び RpoZ 過剰発現株では、ポリアミン非存在下でバイオフィーム形成の上昇と生存率の上昇が見られ、RMF と RRF 過剰発現株においては、生存率の上昇のみが認められた(図4)。

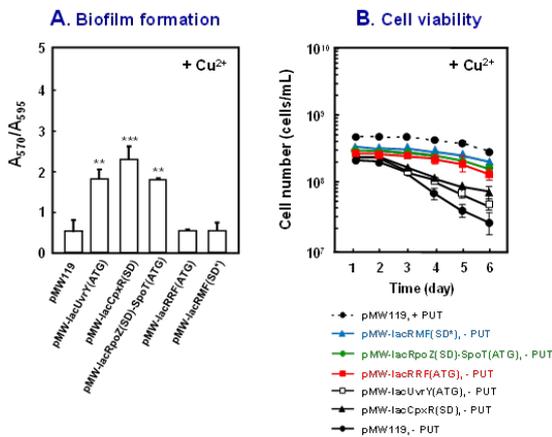


図4 UvrY, CpxR, RRF, SpoT, RpoZ 及び RMF によるバイオフィーム形成能と細胞生存率の上昇: 各蛋白質を過剰発現させ、ポリアミン非存在下でバイオフィーム形成への寄与を調べた。UvrY, CpxR, SpoT 及び RpoZ を過剰発現させた株はバイオフィーム形成が上昇したが、RMF, RRF 過剰発現株では変化がみられなかった (A)。細胞生存率において、UvrY 及び CpxR では、2~4 倍の回復がみられたが、SpoT-RpoZ, RMF, RRF では 6~8 倍の回復がみられた (B)。

従って、生存率上昇にはバイオフィーム形成だけでなく、蛋白質合成の質と量の調節が重要であることが示唆された。ポリアミンによる合成促進機構に関しては、いずれも mRNA 中の SD 配列と開始コドンが離れているか、もしくは非効率的な開始コドンを有する翻訳効率の低い mRNA であり、ポリアミンがこれらの mRNA に結合して構造を変え、翻訳レベルで合成促進し、バイオフィーム形成能や生存率を上昇させることが明らかとなった (図 5)。

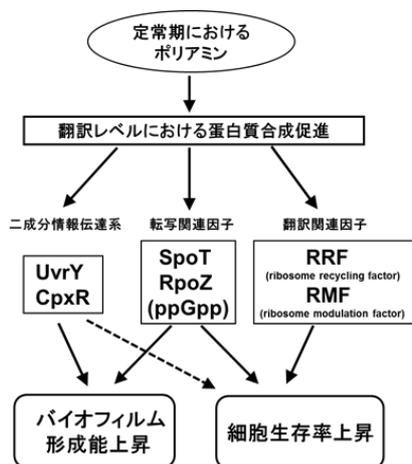


図5 バイオフィーム形成能及び細胞生存率の上昇

本研究により、バイオフィーム形成制御の新たな経路を標的とした新規バイオフィーム形成阻害剤の開発につながる事が期待される。

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9件)

YAMASHITA Tomoko, NISHIMURA Kazuhiro, SAIKI Ryotaro, OKUDAIRA Hiroyuki, TOME Mayuko, HIGASHI Kyohei, NAKAMURA Mizuho, TERUI Yusuke, FUJIWARA Kunio, KASHIWAGI Keiko, IGARASHI Kazuei, Role of polyamines at the G1/S boundary and G2/M phase of the cell cycle. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* vol. 45, pp.1042-1050 (2013) 査読有

KUMMASOOK Aksarakorn, COOPER Chester R. Jr., SAKAMOTO Akihiko, TERUI Yusuke, KASHIWAGI Keiko, VANITTANAKORN Nongnuch, Spermidine is required for morphogenesis in the human pathogenic fungus, *Penicillium marneffeii*. *Fungal Genetics and Biology* vol. 58-59, pp.25-32 (2013) 査読有

SAKAMOTO Akihiko, TERUI Yusuke, YAMAMOTO Taku, KASAHARA Takuma, NAKAMURA Mizuho, TOMITORI Hideyuki, YAMAMOTO Kaneyoshi, MICHAEL Anthony J., IGARASHI Kazuei, KASHIWAGI Keiko, Enhanced biofilm formation and/or cell viability by polyamines through stimulation of response regulators UvrY and CpxR in the two-component signal transducing systems, and ribosome recycling factor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* vol. 44, pp.1877-1886 (2012) 査読有

TERUI Yusuke, AKIYAMA Mariko, SAKAMOTO Akihiko, TOMITORI Hideyuki, YAMAMOTO Kaneyoshi, ISHIHAMA Akira, IGARASHI Kazuei, KASHIWAGI Keiko, Increase in cell viability by polyamines through stimulation of the synthesis of ppGpp regulatory protein and ω protein of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* vol. 44, pp.412-422 (2012) 査読有

[学会発表](計21件)

KASHIWAGI Keiko, Yamashita Tomoko, NISHIMURA Kazuhiro, SAIKI Ryotaro, OKUDAIRA Hiroyuki, TOME Mayuko, HIGASHI Kyohei, NAKAMURA Mizuho, TERUI Yusuke, FUJIWARA Kunio, IGARASHI Kazuei, Role of polyamines at the G1/S boundary and G2/M phase of the cell cycle, 2013, 6, 16, ポスター発表、Waterville Valley, USA

山下智子、西村和洋、齋木遼太郎、奥平宏之、當銘真悠子、東 恭平、照井祐介、藤原邦雄、柏木敬子、五十嵐一衛、細胞

周期進行におけるポリアミンの機能解析、日本ポリアミン学会第4回大会、2013, 1, 25、口頭発表、松島・大観荘

坂本明彦、**照井祐介**、山本拓、笠原拓馬、富取秀行、山本兼由、石浜明、五十嵐一衛、柏木敬子、ポリアミンによる大腸菌二成分制御系蛋白質UvrY及びCpxR合成促進に基づくバイオフィーム形成上昇、日本薬学会第132年会、2012, 3, 29、口頭発表、北海道大学

坂本明彦、**照井祐介**、山本拓、笠原拓馬、富取秀行、山本兼由、石浜明、五十嵐一衛、柏木敬子、ポリアミンによるバイオフィーム形成能及び生存率の上昇。第85回日本生化学大会、2012, 12, 15、ポスター発表、マリンメッセ福岡

SAKAMOTO Akihiko, **TERUI Yusuke**, YAMAMOTO Taku, KASAHARA Takuma, NAKAMURA Mizuho, TOMITORI Hideyuki, YAMAMOTO Kaneyoshi, MICHAEL Anthony J., IGARASHI Kazuei, KASHIWAGI Keiko, Enhanced biofilm formation and cell viability by polyamines through stimulation of response regulators UvrY and CpxR in the two-component signal transducing systems and ribosome recycling factor. International congress on polyamines, 2012, 9, 2、ポスター発表、Istanbul Kultur University, Turkey

〔図書〕(計0件)

〔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・講師

研究者番号：60433687

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者