

大腸菌の細胞生存率維持に果たすポリアミンの役割 Increase in cell viability by polyamines in *Escherichia coli*

薬科学専攻 坂本 明彦
英語 Akihiko Sakamoto

【目的】

ポリアミン (プトレスシン、スペルミジン、スペルミン) はウイルスからヒトに至るまで広く生物界に存在する低分子塩基性生理活性物質である。生体内で見出される主なポリアミンとしては、大腸菌などの原核細胞にはプトレスシンとスペルミジンが、酵母や哺乳類などの真核細胞にはスペルミジンとスペルミンが含まれており、細胞内には数 mM から数十 mM のオーダーで存在する。細胞内のポリアミンは主として核酸、特に RNA と相互作用することにより蛋白質・核酸合成を促進し、細胞増殖因子として機能する。ポリアミンは RNA に結合し、構造を変化させることで特定蛋白質合成を翻訳レベルで促進する。ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進をうける蛋白質をコードする遺伝子群は“ポリアミンモジュール”と命名され、大腸菌で 12 種が同定されている。そのうち 8 種が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。

当研究室では、ポリアミンの蛋白質合成促進機構を分子レベルで明らかにしてきた。ポリアミンモジュールの 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 ではなく非効率的な 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 (Fig. 1)。

最近、当研究室では、大腸菌ポリアミン要求株 MA261 を用いて、7 日間培養における細胞生存率をポリアミンの有無で検討した。その結果、ポリアミン非存在下では細胞生存率は低下するが、ポリアミンを添加することで生存率が維持されることを見出した。また、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) がポリアミンモジュール蛋白質であり、ポリアミンが RMF の合成促進を介して生存率維持に寄与していることを報告した。これまでの大腸菌のポリアミンモジュールは、対数増殖期において見出され、主に細胞増殖に関わる重要な蛋白質をコードする遺伝子であった。しかし、定常期において見出されたポリアミンモジュールは *rmf* のみであり、定常期におけるポリアミンの生理機能はあまり解明されていない。そこで本研究では、定常期において生存率維持に対するポリアミンの役割を明らかにするため、1) 定常期における新規ポリアミンモジュールの同定及びその生理的意義の解明、2) ポリアミンによるバイオフィーム形成能及び細胞生存率上昇機序の解明を試みた。

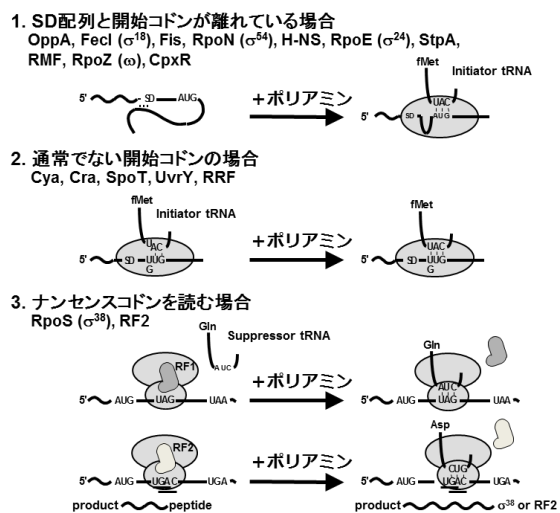


Fig. 1 ポリアミンによるポリアミンモジュールの翻訳促進機構

【方法及び結果】

1. 定常期における新規ポリアミンモジュロンの同定及びその生理的意義の解明

1) 細胞内 ppGpp 含量の上昇及びポリアミンによる SpoT と RpoZ の発現促進

当研究室では、ポリアミンが RMF の合成を促進することで、細胞生存率維持に寄与していることを明らかにした。本研究では、種々の環境変化に適応して生存率を上昇させる際に、ポリアミンがどのように機能するかを明らかにするため、定常期における新規ポリアミンモジュロンを探索した。

環境応答には緊縮応答因子グアノシン 4 リン酸 (ppGpp) によるシグナル伝達が重要であることが知られている。MA261 を用いてポリアミンによる細胞内 ppGpp 含量を比較したところ、定常期において ppGpp 含量がポリアミンにより上昇することを見出した。そこで、ppGpp 合成調節酵素である SpoT 及び、ppGpp と RNA ポリメラーゼとの相互作用に必要な RpoZ の蛋白質発現量をポリアミンの有無で比較したところ、定常期において SpoT 及び RpoZ の発現がポリアミンにより促進された (Fig. 2A)。このとき mRNA 量に変化が見られなかったことから、SpoT 及び RpoZ はポリアミンにより翻訳レベルで発現促進されることが明らかとなった (Fig. 2B)。spoT mRNA の開始コドンは UUG であり、また rpoZ mRNA の SD 配列は開始コドンより上流 11 塩基に位置しており、これらは翻訳効率の悪い mRNA である。これらの特徴がポリアミンによる合成促進に関与するか調べるため、各遺伝子の翻訳開始領域を含み、wild type (spoT-lacZ 及び rpoZ-lacZ) と開始コドンや SD 配列を通常的位置に変え lacZ と融合させた spoT(ATG)-lacZ 及び rpoZ(SD)-lacZ を作製し、ポリアミンによるβ-galactosidase (β-Gal) の発現量の変化を比較した (Fig. 2C)。wild type ではポリアミンによりβ-Gal の発現が促進されたが、開始コドンや SD 配列を通常にしたものは、ポリアミンによる合成促進効果が減少した (Fig. 2D)。これらの結果より、ポリアミンによる SpoT と RpoZ の合成促進は開始コドンや SD 配列の位置に依存して引き起こされることが示された。したがって、ポリアミンはこれら翻訳効率の悪い mRNA に結合することで構造を変化させ、SpoT 及び RpoZ を翻訳レベルで促進することが明らかとなり、spoT 及び rpoZ を定常期における新規ポリアミンモジュロンと同定した。

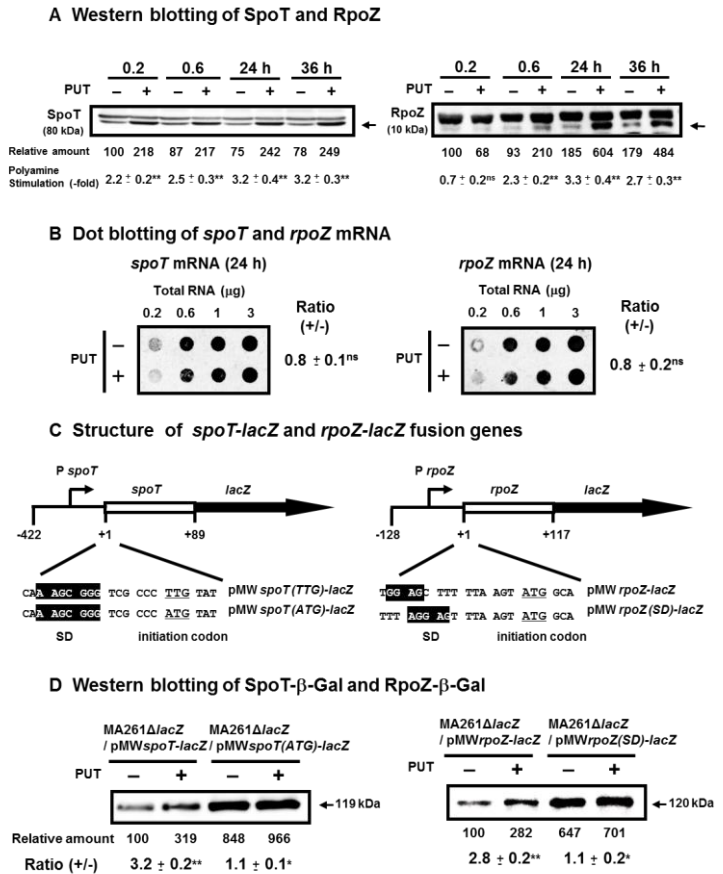


Fig. 2 ポリアミンによるSpoT及びRpoZ蛋白質の翻訳レベルにおける合成促進

2) ポリアミン非存在下における SpoT 及び RpoZ による細胞生存率の上昇

ppGpp は、貧栄養状態になったときに RNA ポリメラーゼの活性を制御し、特定の遺伝子を制御することで細胞生存に関わることが知られている。ppGpp の合成や機能に関わる SpoT 及び RpoZ がポリアミンにより合成促進されることが明らかになったことから、これらの蛋白質が細胞生存率に関与するか検討するため、spoT 及び rpoZ の開始コドンや SD 配列を変えポリアミンに依存せずに蛋白質が発現するプラスミドを作製し、MA261 に形質転換し細胞生存率を調べた。MA261 においてポリアミン非存在下では生存率は低下するが、これらを過剰発現させた株では、ポリアミン非存在下で生存率が上昇した。このことから、SpoT 及び RpoZ は細胞生存率に関与していることが示された。また、SpoT 過剰発現株における細胞内 ppGpp 含量の上昇が見られたことから、SpoT により ppGpp が合成され、RpoZ により ppGpp の機能が促進されたことにより、生存率が上昇したと考えられる。以上の結果より、ポリアミンは SpoT 及び RpoZ を翻訳レベルで合成促進し、SpoT がアミノ酸飢餓以外の ppGpp 合成を促進させ、RpoZ が ppGpp と複合体を形成することにより、 σ^{70} 以外の RNA ポリメラーゼ σ サブユニット依存の転写を制御する ppGpp の機能を上昇させることによって、大腸菌の生存率維持に寄与していることが明らかとなった。

2. ポリアミンによるバイオフィーム形成能及び細胞生存率上昇機序の解明

1) ポリアミンによるバイオフィーム形成能の上昇

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。また、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。本研究では、バイオフィーム形成及び生存率維持に対するポリアミンの役割をさらに解明するため、これらに関与する新規ポリアミンモジュロンの探索及び生理的意義の解明を行った。

また、銅イオンがバイオフィームを抑制することが知られているため、銅イオン存在下においても検討した。MA261 を用いて、銅イオン及びポリアミンの有無によるバイオフィーム形成能を測定したところ、ポリアミン存在下では銅イオンの有無にかかわらず、バイオフィーム形成能が著しく上昇した (Fig. 3)。

微生物には、環境の変化を感知し適応するため、二成分情報伝達系というセンサーシステムがある。二成分情報伝達系は、環境変化を感知するセンサーヒスチジンキナーゼとキナーゼによりリン酸化され下流の遺伝子発現を調節するレスポンスレギュレーターと呼ばれる蛋白質からなり、いくつかの二成分情報伝達系がバイオフィーム形成に関与していることが知られている。そこで、二成分情報伝達系のレスポンスレギュレーターである UvrY 及び CpxR の発現量をポリアミンの有無で比較したところ、定常期においてポリアミンにより翻訳レベルで発現促進された。また、翻訳の終了段階でリボソームと mRNA を解離させ、リボソームを次の翻訳にリサイクルさせる ribosome recycling factor (RRF) についても検討した結果、RRF もポリアミンにより翻訳レベルで発現促進されることが明らかとなった。UvrY 及び RRF (*frr*) の mRNA の開始コドンは非効率的な開始コドンであり、*cpxR* mRNA の SD 配列は開始コドンより上流 10 塩基と通常より離れており、これまでのポリアミンモジュロンの mRNA と同様な特徴を有していた。これらの特徴がポリアミンによる蛋白質

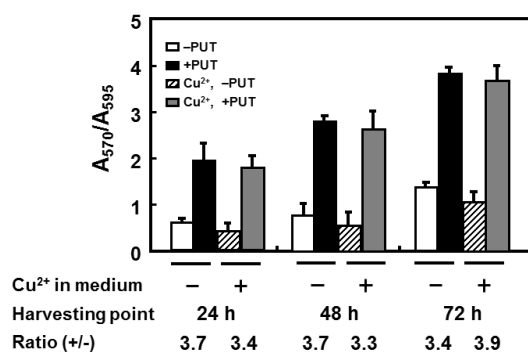


Fig. 3 ポリアミンによるバイオフィーム形成能の上昇

合成促進に関与しているか *spoT* や *rpoZ* と同様に *lacZ* 融合遺伝子を作製し検討したところ、wild type ではポリアミンによるβ-Gal の合成促進が見られたが、開始コドンや SD 配列を変えたものはポリアミンによる合成促進効果が減少した。これらの結果から、*uvrY*、*cpxR* 及び *frr* を定常期における新規ポリアミンモジュロンと同定した。

2) ポリアミンモジュロン蛋白質によるバイオフィーム形成及び細胞生存率上昇

二成分情報伝達系や ppGpp がバイオフィーム形成に関与していることが知られているため、ポリアミンに依存せずにポリアミンモジュロン蛋白質が発現するプラスミドを作製し、定常期に見出されたポリアミンモジュロン蛋白質によるバイオフィーム形成能及び細胞生存率を調べた。その結果、UvrY、CpxR、SpoT 及び RpoZ を過剰発現させた株では、ポリアミン非存在下でバイオフィーム形成能が上昇した。RMF、RRF 過剰発現株においてはバイオフィーム形成能に変化は見られなかった。一方、細胞生存率においては RMF、RRF、SpoT 及び RpoZ を過剰発現株では、6~8 倍と著しい上昇が見られたが、UvrY、CpxR 過剰発現株では、2~4 倍の上昇が認められた。これらの結果より、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。

【結論】

本研究では、定常期におけるポリアミンモジュロンを 5 種同定した。転写 (SpoT、RpoZ) や翻訳 (RMF、RRF) に関与する因子、二成分情報伝達系の構成蛋白質 (UvrY、CpxR) がポリアミンモジュロン蛋白質であり、ポリアミンはこれらを翻訳レベルで合成促進することにより、細胞生存率やバイオフィーム形成に寄与していることが明らかとなった。また、ポリアミンは特定蛋白質を翻訳レベルで合成促進し、対数増殖期では細胞増殖を促進し、定常期では細胞生存率を上昇させるというポリアミンの新たな生理機能が明らかとなった (Fig. 4)。

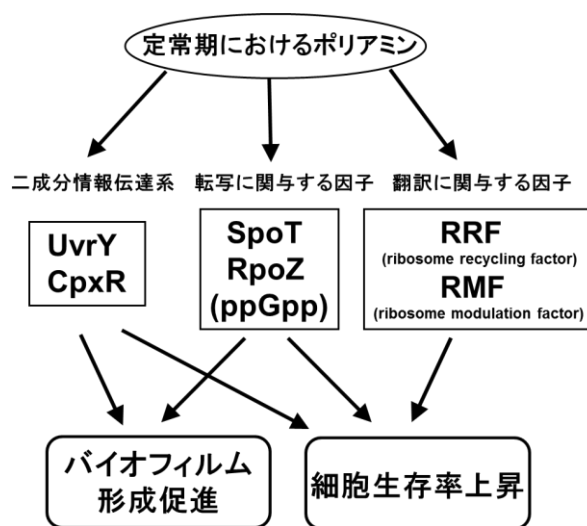


Fig. 4 定常期におけるポリアミンの役割

【文献】

- 1) Terui Y., Akiyama M., Sakamoto A., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K., Kashiwagi K.
“Increase in cell viability by polyamines through stimulation of the synthesis of ppGpp regulatory protein and ω protein of RNA polymerase in *Escherichia coli*.” *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012;44:412-422.
- 2) Sakamoto A., Terui Y., Yamamoto T., Kasahara T., Nakamura M., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Michael A. J., Igarashi K., Kashiwagi K.
“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.” *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012;44:1877-1886