

平成25年度

# 博士論文

大腸菌の細胞生存率維持に果たすポリアミンの役割

千葉科学大学

大学院薬科学研究科

薬科学専攻

坂本 明彦

平成26年3月

# 目 次

	ページ
【略称】	1
【序論】	4
第1章 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	
【目的】	15
【材料と方法】	16
【結果】	22
【考察】	35
第2章 ポリアミンによるバイオフィルム形成能及び細胞生存率上 昇機序の解明	
【目的】	38
【材料と方法】	39
【結果】	43
【考察】	55
【参考文献】	57
【総括】	66
【謝辞】	67
【主論文目録】	68
【審査委員】	69

## 【略称】

A	Adenine
ADC	Arginine decarboxylase
ATP	Adenosine triphosphate
AUH	Agmatine ureohydrolase
C	Cytosine
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CD	Circular dichroism
c-di-GMP	Cyclic dimeric guanosine monophosphate
CRP	Cyclic adenosine monophosphate receptor protein
CuSO <sub>4</sub>	Copper(II) sulfate
dcAdoMet	Decarboxylated <i>S</i> -adenosyl-L-methionine
DDW	Deionized distilled water
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Em	Erythromycin
fMet	<i>N</i> -Formylmethionine
G	Guanine
HCl	Hydrochloric acid
HPLC	High performance liquid chromatography

$K_2HPO_4$	Dipotassium phosphate
KCl	Potassium chloride
$KH_2PO_4$	Monopotassium phosphate
KOH	Potassium hydroxide
$MgSO_4$	Magnesium sulfate
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
n.d.	Not detected
$(NH_4)_2SO_4$	Ammonium sulfate
n.s.	Not significant
ODC	Ornithine decarboxylase
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
ppGpp	Guanosine tetraphosphate
PUT	Putrescine
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
SAMDC	<i>S</i> -Adenosylmethionine decarboxylase
SAT	Spermidine acetyltransferase
SD	Shine-Dalgarno
SDS	Sodium dodecyl sulfate
S.E.	Standard error

SPD	Spermidine
SPDS	Spermidine synthase
SPM	Spermine
SSC	Saline-sodium citrate buffer
T	Thymine
TCA	Trichloroacetic acid
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethane
tRNA	Transfer ribonucleic acid
U	Uracil
WT	Wild type

## 【序論】

### 1) ポリアミン

ポリアミンは、ウイルスから人に至るまで生物界に広く存在する低分子塩基性生理活性物質であり、複数個のアミノ基を有する脂肪族炭化水素の総称である。現在までに 20 種類以上のポリアミンが同定されているが、生体内で見出されるポリアミンは、主に 2 価のプトレスシン [PUT:  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ]、3 価のスペルミジン [SPD:  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ]、4 価のスペルミン [SPM:  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ] の 3 種であるが、生物によって含まれているポリアミンが異なる (Fig. 1)。このうち大腸菌などの原核細胞には PUT と SPD が、酵母や哺乳類などの真核細胞には主に SPD と SPM が含まれている【1】。ポリアミンは細胞内において、1 価カチオンを除いた低分子物質としては  $\text{Mg}^{2+}$ 、ATP と共に三大構成成分であり、大腸菌や動物細胞には数 mM から数十 mM のオーダーで存在する。3 種のポリアミンは同じような生理作用を発揮するが、その有効濃度は  $\text{SPM} < \text{SPD} < \text{PUT}$  であり、同じ作用を示すのに SPD は SPM の 3~5 倍、PUT は SPM の 50 倍以上の濃度が必要である【2】。

### 2) ポリアミンの生合成

ポリアミンの細胞内濃度は、生合成・分解・細胞内外への輸送により厳密に制御されている【3, 4】。大腸菌では、遺伝子全体の 0.6% がこれらに関わる遺伝子であり、輸送系の遺伝子はその半分を占めている。

ポリアミンの生合成経路を Fig. 2 に示す。ポリアミンの生合成において、大腸菌は PUT と SPD を合成し、PUT の合成には 2 つの経路が存在する。1 つ目はオルニチンを出発物質として、オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC; *speC*) により合成される。この ODC は、ポリアミン生合成における律速酵素の 1 つである。2 つ目はアルギニンを出発物質として、アルギニンデカルボキシラーゼ (ADC; *speA*) により脱炭酸され、次いでアグマチンが、アグマチンウレオヒドロラーゼ (AUH; *speB*) により脱ウレアさ

れて合成される経路である。SPD は、*S*-アデノシルメチオニンが、もう 1 つの律速酵素である *S*-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ (SAMDC; *speD*) により脱炭酸された脱炭酸化 *S*-アデノシルメチオニン (dcAdoMet) から供給されるアミノプロピル基と PUT からスペルミジンシンターゼ (SPDS; *speE*) によって合成される。また、細胞内でポリアミンが過剰になると、スペルミジンアセチルトランスフェラーゼ (SAT; *speG*) により SPD はアセチル化され、不活化される【5】。

### 3) ポリアミンの細胞内分布

ポリアミンの細胞内分布は、大腸菌やラット肝臓で報告されている【6, 7】。SPD と SPM は遊離の状態で存在することはほとんどなく、PUT のみが大腸菌において約 40% 遊離状態で存在している。また、ポリアミンは大腸菌及びラット肝臓において主として RNA と結合している。大腸菌では PUT の 48%、SPD の 90%、ラット肝臓では SPD の 78%、SPM の 85%が RNA と結合している (Table 1)。また、RNA に対するポリアミン結合量をヌクレオチドあたりに換算すると、大腸菌では PUT と SPD がそれぞれ 3.5、1.4 分子/100 ヌクレオチド、ラット肝臓では SPD と SPM がそれぞれ 1.2 と 1.0 分子/100 ヌクレオチド結合している。すなわち、RNA のリン酸基の約 15%はポリアミンとイオン結合しており、ポリアミンの生理作用は RNA との相互作用により引き起こされることが強く示唆される。また、ポリアミンの DNA への結合には、塩基特異性が存在する。ポリアミンが DNA と結合する場合、2 本鎖でかつ GC (グアニン・シトシン) 含量が高いほど優先的に結合する性質を持っている【8, 9】。この点は、多岐にわたるポリアミンの生理作用を理解する上で重要である。

### 4) 細胞増殖必須因子としてのポリアミン

ポリアミンの生理的役割は多岐にわたり、その主なものとして、核酸、特に RNA と相互作用することにより蛋白質や核酸合成を促進し、細胞増殖因子として機能することが知られている【10】。ポリアミンの増殖因子としての役割は、1949 年に乳酸菌の 1 種である *Hemophilus purainfluenzae* の生育に PUT と SPD が必須であることが初めて報

告された【11】。その後、がん患者の尿中でポリアミンが増加することが報告され、ポリアミンが細胞増殖に関与することが示唆された【12】。細菌では大腸菌でポリアミンを合成できない菌株が分離され、外からポリアミンを加えるとその細胞増殖が著しく増加することにより、ポリアミンの細胞増殖因子としての地位を確立した【13】。次いで、酵母【14】やチャイニーズハムスター卵巣細胞【15】においてもポリアミンを合成できない細胞株が分離され、ポリアミンを外から加えると細胞増殖が開始することが明らかとなった。また、SAMDC ノックアウトマウスは、+/-ヘテロ接合体では生存可能であることが報告され、-/-ホモ接合体は3.5日胚までは卵由来のSPDにより生存できるが、3.5日胚以降の生存は不可能であることが報告された【16】。しかし、3.5日胚はSPDを添加すると増殖が可能となったことから、細胞死はSPDとSPMに依存しており、真核細胞ではポリアミンが細胞増殖必須因子であることが明らかとなった。

#### 4) ポリアミンとRNAの相互作用

ポリアミンがRNAとの相互作用により、蛋白質の合成促進や翻訳精度の上昇、リボソームの会合促進などの働きをすることが報告されている。*in vitro*では、大腸菌のポリフェニルアラニン合成、エールリッヒ腹水がん細胞系のアデノウイルスRNA依存性の蛋白質合成、ウサギ網状赤血球無細胞系のODC合成などがポリアミンによって促進されることが明らかになっている【17-19】。大腸菌のオリゴペプチド結合蛋白質や、ウシリンパ球のチミジンキナーゼの合成は*in vitro*、*in vivo*両系でポリアミンにより強い促進を受けた【20】。いずれの蛋白質の場合も、ポリアミンはmRNAの構造を変化させることによって翻訳を促進していた。

また、ポリアミンは、大腸菌のリボソームの30Sサブユニットの会合にも寄与している(Fig. 3)。大腸菌のリボソームの30Sサブユニットは、16S rRNAと21個のリボソーム蛋白質から成っている。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って、30Sサブユニットの形成を促進している【17, 21】。

このように、ポリアミンはRNAの立体構造を変化させ、様々な面で蛋白質合成に重要な役割を果たすことで細胞増殖促進に寄与していると考えられる。



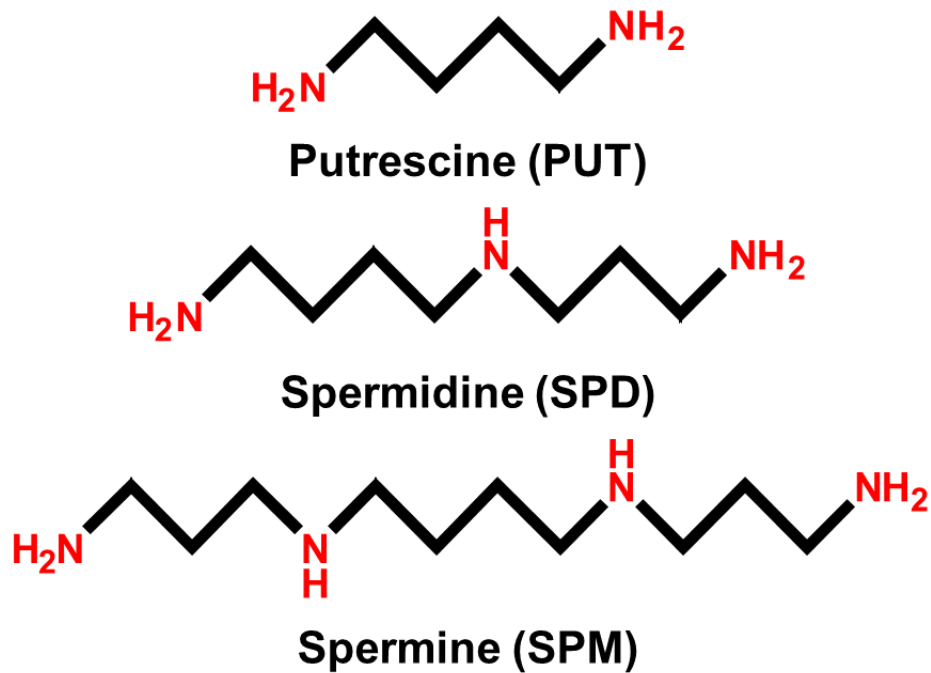
## 5) ポリアミンモジュロン

ポリアミンは、mRNAに結合し構造を変化させることで、特定蛋白質の合成を翻訳レベルで促進させることが明らかとなっている【22, 23】。ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進される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、現在までに対数増殖期においてOppA (オリゴゴペプチド輸送蛋白質)、Cya (アデニル酸シクラーゼ)、RpoS (RNAポリメラーゼ $\sigma^{38}$ サブユニット)、RF2 (蛋白質合成終結因子)、Cra (糖代謝に関わる転写因子)、RpoN (RNAポリメラーゼ $\sigma^{54}$ サブユニット)、H-NS (環境応答のグローバルな転写因子)、FecI (RNAポリメラーゼ $\sigma^{18}$ サブユニット)、Fis (rRNA及びtRNAの転写因子)、RpoE (RNAポリメラーゼ $\sigma^{24}$ サブユニット)、StpA (heat-shock応答に関わる転写因子) の11種が同定されている【24-30】。これらの遺伝子群は、いずれも細胞増殖に重要な役割を果たす蛋白質であり、8種が転写因子として機能する。これらポリアミンモジュロンは、栄養源や培養温度を変化した際に発現量が増加し、OppA、Cya、RpoS、FecI、Fis、RF2は0.4% glucose 存在下、RpoN、Cra、H-NSは0.1% glucose と0.02% glutamic acidを栄養源とする培地、RpoE、StpAは0.1% glucoseと0.02% glutamic acidの培地で42 °Cにした場合、それぞれポリアミンにより発現促進を受けた。

現在までに、ポリアミンモジュロンと同定された遺伝子群のmRNAにはそれぞれ共通する特徴があり、主に3つに大別される (Fig. 4)。1つ目は、開始コドンと原核細胞の蛋白質合成開始に重要なShine-Dalgarno (SD) 配列が離れている、もしくはSD配列が不明瞭なmRNAである。ポリアミンはこのmRNAに結合することでSD配列と開始コドン付近の構造を変化させ開始複合体形成を促進する。*oppA*、*fecI*、*fis*、*rpoN*、*hns*、*rpoE*、*stpA*、*rmf* mRNAがこの特徴を有している【28-32】。2つ目は、開始コドンがAUGではなくUUGやGUGのmRNAである。*cya*、*cra* mRNAがこの特徴を有している【25, 28】。ポリアミンは、これら開始コドンとtRNAとの相互作用を高め、翻訳開始を促進する。3つ目は、Open reading frame (ORF) 中に終始コドンがあるmRNAであり、readthroughや+1 frameshiftを促進することで目的とする蛋白質合成を促進する。これは、*rpoS*、*prfB* mRNAの特徴である【26, 27】。また、ポリアミンモジュロンの中に転写因子が多いことから、DNAマイクロアレイにより対数期での遺伝子発現を解析した。対数期では、約2700種のmRNAが発現し、その中で309種がポリアミンによりup-regulationを受け、319種がdown-regulation

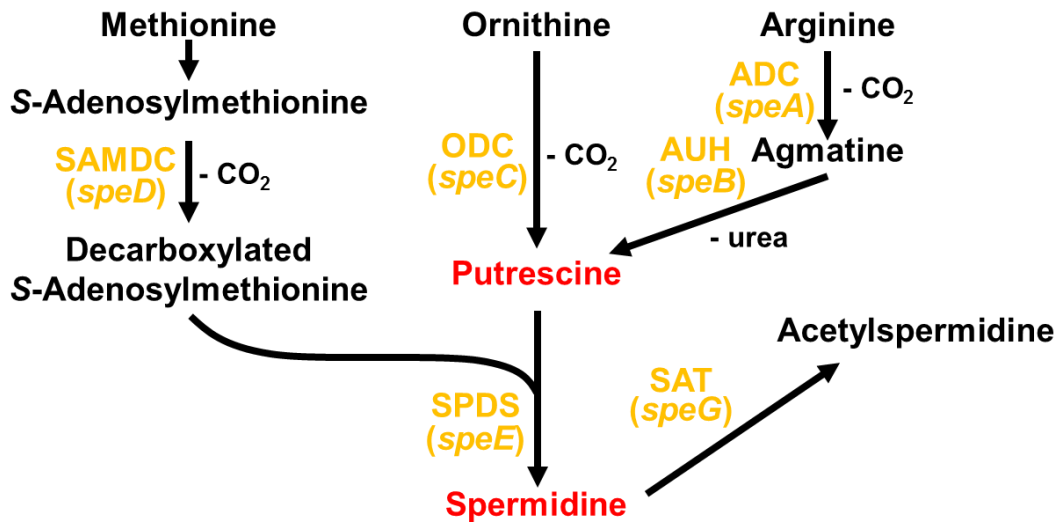
を受けていた。このうち約200種の遺伝子は、ポリアミンモジュロンとして同定された9種の転写因子 (cAMPを含む) の制御下にあった【29】。これらのことは、ポリアミンが様々な条件において細胞増殖に寄与していることを示唆している。

また最近、当研究室でRMF (ribosome modulation factor) を定常期において初めてポリアミンモジュロンとして同定した。ポリアミンはRMFの合成促進を介して、細胞生存率維持に寄与しているという新たな知見を得た【32】。



**Fig. 1** ポリアミンの構造

ポリアミンは窒素を含む低分子の塩基性生理活性物質であり、細菌から人に至るまで生物界に広く存在する。生体内で見出される主なポリアミンは、プトレスシン (PUT)、スペルミジン (SPD)、スペルミン (SPM) の3種類である。このうち大腸菌などの原核細胞には主に PUT と SPD が、酵母や哺乳類などの真核細胞には SPD と SPM が含まれている【1】。



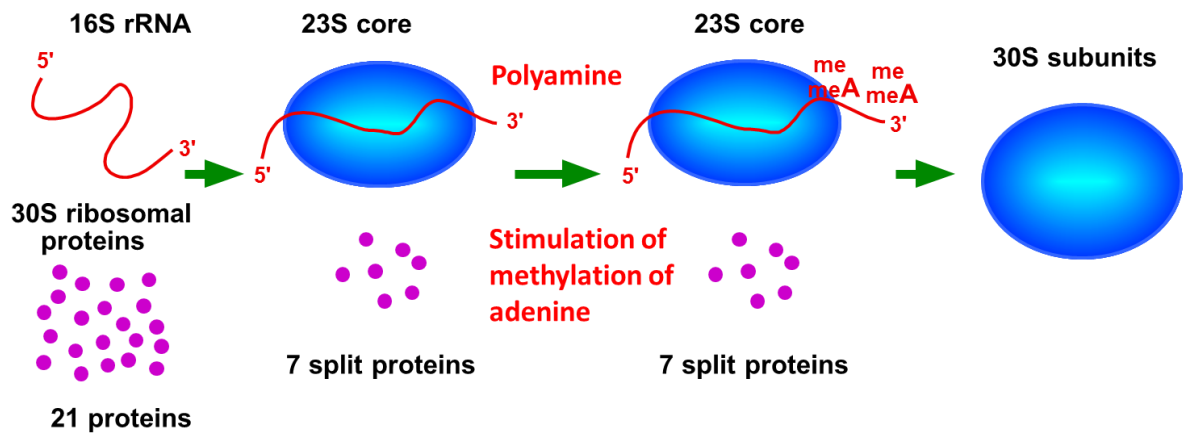
**Fig. 2** 大腸菌におけるポリアミンの生合成

ポリアミンの生合成はオルニチンがオルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) により脱炭酸され、プトレスシン (PUT) が合成される。また、アルギニンがアルギニンデカルボキシラーゼ (ADC) によりアグマチンに変換され、アグマチンはアグマチンウレオヒドロラーゼ (AUH) により PUT に変換される。PUT はスペルミジンシンターゼ (SPDS) によりスペルミジン (SPD) に変換される。SPD の合成に必要なアミノプロピル基は、*S*-アデノシルメチオニンが *S*-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ (SAMDC) により脱炭酸されることにより産生されるデカルボキシアデノシルメチオニン (dcAdoMet) によって供給される [3]。

	<i>Escherichia coli</i> (pH 7.5, 10 mM Mg <sup>2+</sup> , 150 mM K <sup>+</sup> )		Rat liver (pH 7.5, 2 mM Mg <sup>2+</sup> , 150 mM K <sup>+</sup> )	
	Putrescine mM (%)	Spermidine mM (%)	Spermidine mM (%)	Spermine mM (%)
<b>Total</b>	<b>32.2 (100)</b>	<b>6.88 (100)</b>	<b>1.15 (100)</b>	<b>0.88 (100)</b>
<b>Free</b>	<b>12.5 (38.8)</b>	<b>0.26 (3.8)</b>	<b>0.08 (7.0)</b>	<b>0.02 (2.3)</b>
<b>DNA</b>	<b>3.0 (9.3)</b>	<b>0.35 (5.1)</b>	<b>0.05 (4.3)</b>	<b>0.05 (5.7)</b>
<b>RNA</b>	<b>15.4 (47.9)</b>	<b>6.17 (89.7)</b>	<b>0.90 (78.3)</b>	<b>0.75 (85.2)</b>
<b>Phospholipids</b>	<b>0.46 (1.4)</b>	<b>0.05 (0.7)</b>	<b>0.07 (6.1)</b>	<b>0.04 (4.5)</b>
<b>ATP</b>	<b>0.84 (2.6)</b>	<b>0.05 (0.7)</b>	<b>0.05 (4.3)</b>	<b>0.02 (2.3)</b>

**Table 1** 大腸菌及びラット肝臓におけるポリアミンの細胞内分布

ポリアミンは大腸菌及びラット肝臓において主として RNA と結合している。大腸菌では PUT の 48%、SPD の 90%、ラット肝臓では SPD の 78%、SPM の 85%が RNA と結合している。

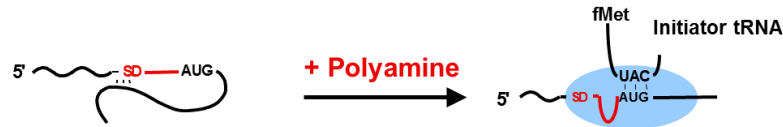


**Fig. 3** ポリアミンによるリボソームの会合促進

ポリアミンは16S rRNAの3'-末端に存在するアデニンのメチル化を促進し、30S リボソーム亜粒子の会合を促進することにより、蛋白質合成を促進する【17】。

### 1. Long distance between Shine-Dalgarno sequence and initiation codon AUG

OppA, Fecl ( $\sigma^{18}$ ), Fis, RpoN ( $\sigma^{54}$ ), H-NS, RpoE ( $\sigma^{24}$ ), StpA, RMF, RpoZ ( $\omega$ ), CpxR



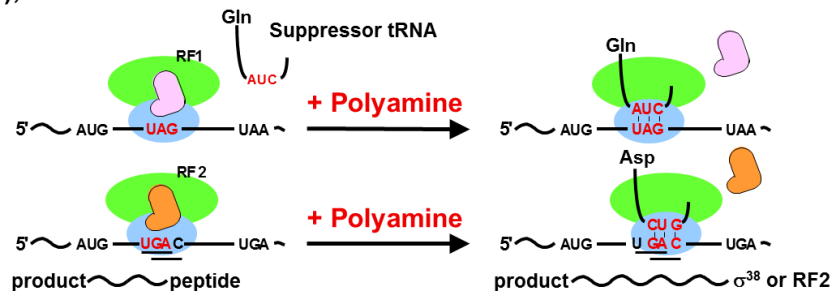
### 2. Initiation on unusual initiation codon

Cya, Cra, SpoT, UvrY, RRF



### 3. Suppression or +1 frameshifting on nonsense codon

RpoS ( $\sigma^{38}$ ), RF2



**Fig. 4** 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

ポリアミンは翻訳効率の悪い mRNA の翻訳を促進する。ポリアミンモジュロンの mRNA には特徴があり、大きく 3 つに分類される。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。ポリアミンは SD 配列と開始コドン付近の構造を変化させ、開始複合体の形成を促進する。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。ポリアミンは開始コドンと fMet-tRNA との相互作用を高めて翻訳開始を促進する。3 つ目は、ORF 中に終止コドンが存在する mRNA である。ポリアミンは終止コドンの readthrough や +1 frameshift を行い、目的とする蛋白質合成を促進する。

## 第1章

# 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



## 【目的】

当研究室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ロンと命名し、これまでに 12 種を同定した【22-32】。そのうち 8 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) がポリアミンモジュロン蛋白質であり、ポリアミンが RMF 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【32】。本研究では、緊縮応答因子グアノシン 4 リン酸 (ppGpp) に着目し、ppGpp 合成調節酵素 (SpoT) 及び RNA ポリメラーゼ $\omega$ サブユニット (RpoZ) とポリアミンとの関係を明らかにし、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の同定と生理的意義の解明を行った。

## 【材料と方法】

### 1) 大腸菌及び培養条件

PUT 生合成酵素欠損株 MA261 (*speB speC gly leu thr thi*) は、ニューヨーク大学 W. K. Maas 先生のご厚意により分与していただいた【33】。MA261 $\Delta$ lacZ::Em は、千葉大学大学院薬学研究院の五十嵐先生のご厚意により分与していただいた【34】。HT283 (*speA speB speC speED thr pro thi*) は、H. Tabor 先生のご厚意により分与していただいた【35】。また、CF1281 ( $\Delta$ relA)、CF1289 ( $\Delta$ relA  $\Delta$ spoT)、CF1638 ( $\Delta$ relA  $\Delta$ rpoZ)、CF1640 ( $\Delta$ relA  $\Delta$ spoT  $\Delta$ rpoZ) は、M. Cashel 先生のご厚意により分与していただいた【36】。

MA261、MA261 $\Delta$ lacZ::Em は、L-Broth (LB) (1 % Trypton、0.5% Yeast Extract、0.5% NaCl) で一晩通気培養した。その菌液を Medium A [22.4 mM glucose (0.4%)、40.2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、22.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.7 mM sodium citrate、7.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.41 mM MgSO<sub>4</sub>、6  $\mu$ M thiamine、40  $\mu$ M biotin、0.8 mM leucine、0.8 mM threonine、0.7 mM methionine、1 mM serine、1 mM glycine、0.6 mM ornithine、pH 6.8]に加え、37 °C で 24 時間通気培養して、ポリアミンを枯渇させた。さらに新しい Medium A に植菌し、0.6 mM (100  $\mu$ g/mL) putrescine dihydrochloride を必要に応じて加え、37 °C で培養した。HT283 は、Yoshida らの方法で培養した【26】。細胞増殖は、吸光度 540 nm の波長で測定した。また、<sup>35</sup>S] methionine でラベルする際は、Medium A の methionine を終濃度 3  $\mu$ g/mL に調製し培養を行った。Cell viability の測定は、上記の培養を行い、培養から 24 時間毎に希釈したものを 1.5% Agar-LB プレートに撒き 37 °C で一晩培養した。プレートに出現したコロニーを数え、7 日間この操作を続け生存率を算出した。

### 2) プラスミドの作製

大腸菌 W3110 からの total chromosomal DNA の調製は、Wilson らの方法に従った【37】。作製したプラスミドは、Maniatis らの方法【38】に従って MA261 もしくは MA261 $\Delta$ lacZ::Em に形質転換した。プライマーの合成は、北海道システムサイエンス社に依頼した。本実験で使用したプライマーの配列を Table 2 に示す。作製したプラスミドは、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列

を確認した。

pMW-lacSpoT の作製のため、まず鋳型として total chromosomal DNA、プライマーとして P1 及び P2 を用いて PCR を行った。この PCR 産物を BamHI 及び EcoRI で処理し、pMW119 (Nippon Gene) の同制限酵素サイトに挿入し、pMW-lacSpoT を作製した。開始コドンを変異させた pMW-lacSpoT(ATG) は、overlap extension PCR 法【39】を用いて作製した。1st PCR は、鋳型として pMW-lacSpoT を用い、プライマーとして pMW-lacSpoT(ATG) は P1 と P4、P2 と P3 をそれぞれ用いた。PCR 産物中に含まれるプライマーを DNA Cleaner (Wako) を用いて除去した後、これらの PCR 産物を鋳型 DNA とし、P1 と P2 のプライマーを用いて 2nd PCR を行った。pMW-lacSpoT と同様の方法を用いて BamHI、EcoRI で処理した断片を pMW119 に挿入し、pMW-lacSpoT(ATG) を作製した。

pMW $spoT$ -lacZ の作製のため、W3110 の total chromosomal DNA を鋳型としてプライマー P5 と P6 を用いて PCR を行った。この PCR 産物を XmaI で処理後、pMC1871【40】の同制限酵素サイトに挿入し、pMC $spoT$ -lacZ を作製した。このプラスミドを SalI で処理後、 $spoT$ -lacZ を含む断片を pMW119 の同制限酵素サイトに挿入し、pMW $spoT$ -lacZ を作製した。pMW $spoT$ (ATG)-lacZ は、上記と同様に overlap extension PCR 法を用いて作製した。

その他のプラスミド pMW-lacRpoZ、pMW-lacRpoZ(SD)、pMW $rpoZ$ -lacZ、pMW $rpoZ$ (SD)-lacZ、pMW-lacRpoZ-SpoT、pMW-lacRpoZ(SD)-SpoT(ATG)、pMW $rpoZ$ [-28(+A)]-lacZ、pMW $rpoZ$ [-28(+G)]-lacZ、pMW $rpoZ$ [-31( $\Delta$ G)]-lacZ、pMW $rpoZ$ [+28(A $\rightarrow$ U)]-lacZ についても同様の方法で作製した。

### 3) 大腸菌からの全 RNA 抽出

大腸菌 MA261 を PUT 存在下及び非存在下で  $A_{540} = 0.2$  と 24 時間まで培養し、8000 回転、5 分、4 °C で集菌した。RNA Protect Bacteria Reagent (QIAGEN) で懸濁後、10000 回転、5 分、4 °C で遠心して洗浄した。全 RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) のプロトコールに従って抽出した。

### 4) Dot blotting 法による特定 mRNA の検出及び DNA マイクロアレイ分析

全 RNA を 50% ホルムアミド、7% ホルムアルデヒド、1 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM Sodium citrate) を含む溶液に溶かし 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  の濃度にした。さらに、RNA の量が 0.2  $\mu\text{g}$ 、0.6  $\mu\text{g}$ 、1  $\mu\text{g}$ 、3  $\mu\text{g}$  になるよう調整し、65  $^{\circ}\text{C}$ 、15 分間のインキュベートにより変性させた。これに 2 倍量の 20 x SSC を加え sample を作製した。sample を Multi Micro Filter (ADVANTEC FLE 396AA) を用いて吸引し、GeneScreen Plus<sup>TM</sup> Hybridization Transfer Membrane (Du Pont-NEN) へ吸着させた。吸着後の Membrane は UV Crosslinker (CL-1000) で処理し、RNA を固定した。5 mL の Hybridization Buffer (ECL<sup>TM</sup> Gold Hybridization Buffer (GE Healthcare) 0.5 mM NaCl, 5% Blocking reagent) で Membrane を 42  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間振とうした。プローブ (1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 5  $\mu\text{L}$  加え、42  $^{\circ}\text{C}$  で 16 ~ 20 時間インキュベートした。hybridization しなかった余計なプローブを除くため、Membrane を洗浄し (0.1 x SSC + 0.1% SDS で 42  $^{\circ}\text{C}$ 、20 分 x 2 回、2 x SSC で室温、5 分 x 2 回)、ECL<sup>TM</sup> Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (GE Healthcare) の試薬を用いて FUJIFILM LAS3000 で検出した。定量は FUJIFILM Image Gauge で行った。各 mRNA 検出に使用したプローブは、大腸菌 MA261 からの total chromosomal DNA を鋳型とし、プライマーは P3 と P7 (*spoT*)、P8 と P9 (*relA*)、P12 と P16 (*rpoZ*) を用いて PCR を行って作製した。PCR 産物は、low-melting gel で泳動して分離・精製し、ECL<sup>TM</sup> Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (GE Healthcare) を用いてラベルした。

DNA マイクロアレイはポリアミンの有無で培養した MA261 を 36 時間で集菌し、Terui らの方法に従って行った【28】。

## 5) Western blotting 法による特定蛋白質の検出

抗 RelA、SpoT、RpoZ、RpoE、RpoS、RpoN、H-NS、Cya 及び Cra 抗体は、千葉大学大学院薬学研究院の五十嵐先生並びに法政大学生命科学部の石浜先生のご厚意により分与していただいた。抗 $\beta$ -galactosidase 抗体は Sigma-Aldrich より購入した。

PUT 存在下及び非存在下で大腸菌 MA261 を  $A_{540} = 0.2$ 、0.6、24 時間、36 時間まで培養し、8000 回転、10 分、4  $^{\circ}\text{C}$  で集菌した。菌体を 20% Sucrose-10 mM Tris-HCl に懸濁し、さらに 20 mg/mL Lysozyme、3 mM EDTA、Protease inhibitors (0.5 mM FUT175、1 mM E64C) を加え、0  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分処理した。Sonicator (microson<sup>TM</sup> ultrasonic cell disruptor) により細胞壁を破碎し、15000 回転、10 分、4  $^{\circ}\text{C}$  の遠心分離後に得られた

上清を cell lysate として用いた。蛋白質濃度の定量は、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いて Bradford 法【41】により測定した。特定蛋白質の検出は Nielsen らの方法に従い、Amersham™ ECL Western Blotting Analysis System (GE Healthcare) を用いて FUJIFILM LAS 3000 により行った【42】。

#### 6) 免疫沈降法による SpoT-及び RpoZ-β-galactosidase 合成量の測定

MA261Δ*lacZ::Em* に pMW*spoT-lacZ*、pMW*spoT(ATG)-lacZ*、pMW*rpoZ-lacZ* 及び pMW*rpoZ(SD)-lacZ* を形質転換した菌を作製し、Medium A (methionine 3 μg/mL) で 24 時間まで培養した。この培養液を 5 mL ずつ分取し、片方に PUT (100 μg/mL) を加え、それぞれ 20 分培養した。1 MBq の [<sup>35</sup>S] methionine を各々の培養液に加え、5 分培養した。ラベルされていない methionine (20 mM) を加え、10000 回転、10 分、4 °C で集菌した。この菌に Buffer A (10 mM Sodium phosphate (pH 7.4)、100 mM NaCl、1% TritonX-100、0.1% SDS) 30 μL と Glass beads (0.1 mm) 30 mg を加えて懸濁した。これを Multi Beads Shocker (Yasui Kikai) で 2500 回転、30 秒 x 6 回、4 °C の条件で菌を破碎した。この菌液に Buffer A を加えて全量 1 mL とし、15000 回転、10 分、4 °C で遠心分離を行い上清を sample とした。sample 5 μL を 3 MM ろ紙 (Whatman) に滴下し、cold 5% TCA で 30 分振とうした。これを hot 5% TCA で 30 分振とうし、Ethanol : Ether (1 : 1) でさらに 10 分振とうした。さらに、Ether で 10 分間振とうし、乾燥後に Instagel-plus (Perkin Elmer) にいれ、Liquid Scintillation Counter Tri-Card 2800TR (Perkin Elmer) で蛋白質中に取り込まれた [<sup>35</sup>S] methionine 量を測定した。sample 500,000 cpm 分に Buffer A を加え 1 mL とした。ここに、β-galactosidase 抗体 (Rock Land) を 1/1000 vol. 加えて 1 時間振とうした。50% Protein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) を 7.5 μL 加え、さらに 1 時間振とうした。15000 回転、10 分、4 °C で遠心し、上清を捨て、沈殿を Buffer A で 1 回洗浄した後、2 x Sample Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、10% Glycerol、2% SDS、2% β-Mercaptoethanol、0.1% Bromophenol Blue) 20 μL に溶解し、100 °C で 4 分煮沸した。これを 15000 回転、10 分、4 °C で遠心し、上清を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。ゲル乾燥後、BAS1800 II imaging analyzer で目的蛋白質の放射能を測定した。

## 7) 細胞内ポリアミン量の測定

大腸菌 MA261 は、PUT 存在下及び非存在下で  $A_{540} = 0.2$ 、0.6 と 24、36、48、72 及び 96 時間培養し、8000 回転、10 分、4 °C で集菌した。菌体を 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl を含む Buffer で洗浄した。5% TCA で菌体を懸濁し、70 °C で 30 分インキュベーションした。氷中に 30 分間置き、12000 回転、10 分、4 °C で遠心した。上清をポリアミン定量に用いた。沈殿は 0.2 N NaOH に溶かし Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いて Bradford 法【41】により蛋白定量を行った。

ポリアミン定量は HPLC を用いて、TSK gel Polyaminepak (4.6 x 50 mm) カラムを Buffer II (93 mM Sodium citrate (pH 5.1)、2 M NaCl、0.08% Brij-35、53 mM HCl、0.68 mM Hexanoic acid、20% Methanol) で平衡化し、50 °C、0.42 mL/min の条件で分離を行った。分離されたポリアミンは OPA Buffer (0.4 M Boric acid-KOH (pH 10.18)、0.056% o-Phthalaldehyde、24 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol、0.1% Brij-35、0.6% methanol) を 0.4 mL/min の割合で溶離液と混和し、50 °C で反応させて、励起波長 340 nm、蛍光波長 455 nm の条件で検出した【43】。

## 8) 細胞内 ppGpp 含量の測定

大腸菌 MA261 は、Medium A に 3.7 MBq の  $H_3^{32}PO_4$  を加え、PUT (100  $\mu$ g/mL)の有無で  $A_{540} = 0.2$  と 24、36 及び 48 時間培養し、8000 回転、10 分、4 °C で集菌した。2 mL の Buffer A で洗浄後、1 mL の Buffer A で懸濁した。100  $\mu$ L の 25% formic acid を加え、12000 回転、10 分、4 °C で遠心後、上清を sample とした。sample 1  $\mu$ L を 3 MM ろ紙 (Whatman) に滴下し、乾燥後に Instagel-plus (Perkin Elmer) に入れ、Liquid Scintillation Counter Tri-Card 2800TR (Perkin Elmer) で核酸中に取り込まれた  $^{32}P$  量を測定した。sample 30,000 cpm 分を PEI-cellulose thin-layer chromatography plate (Merck) に滴下し、1 M potassium phosphate buffer (pH 3.4) により室温で、2 時間展開した【44】。展開後、BAS1800 II imaging analyzer で目的核酸の放射能を測定した。

## 9) RNA の 2 次構造予測

mRNA の 2 次構造予測は、Zuker の方法に従って作製した【45】。2 次構造の自由エネルギー ( $\Delta G$ ) は、Turner らの方法【46】に基づいて計算した。

**Table 2 Primers used in this study.**

No.	Primer used	Nucleotide sequence
P1	5'-SpoT (BamHI)	5'-GCCGCTGGATCCCAAGCCGTTACCGCTATT-3'
P2	3'-SpoT (EcoRI)	5'-GATCAGAATTCGCCTGGCGAGCATTTTCGC-3'
P3	5'-SpoT (ATG)	5'-CAAAGCGGGTCGCCCATGTATCTGTTTGAA-3'
P4	3'-SpoT (ATG)	5'-AGGCTTTCAAACAGATACATGGGCGACCCG-3'
P5	5'-SpoT (XmaI)	5'-TCCGCTGGTCCCGGGAGAAAACGATAAAAAC-3'
P6	3'-SpoT (XmaI)	5'-CTCGTGAGCATCCCGGGCAACGAGATACGC-3'
P7	3'-SpoT (dot)	5'-GGTTTTAATGTGGTGGATACCTAAACGGTG-3'
P8	5'-RelA (dot)	5'-AAAGGAGAGGACGATGGTTGCGGTAAGAAG-3'
P9	3'-RelA (dot)	5'-ATCTTTTACTTCGCGCAGATGAGCAATACG-3'
P10	5'-RpoZ (BamHI)	5'-TCAGTAGGATCCCCAGTCATTTCTTCACCT-3'
P11	3'-RpoZ (EcoRI)	5'-TTGAAGGAATTCATTCAGGCTTTCAAACAG-3'
P12	5'-RpoZ (SD)	5'-TCTTCACCTGTTTAGGAGTTTAAGTATGGC-3'
P13	3'-RpoZ (SD)	5'-GCCATACTTAAACTCCTAAACAGGTGAAGA-3'
P14	5'-RpoZ (XmaI)	5'-TGAAGACCATTATTCCCGGGGAACGTCTGC-3'
P15	3'-RpoZ (XmaI)	5'-GTTTTCTCCGGTACCCCGGGATCCTTTCC-3'
P16	3'-RpoZ (dot)	5'-CGACGACCTTCAGCAATAGCGGTAACCGCT-3'
P17	5'-RpoZ (-28+A)	5'-ATTCAGTATCATGCCAGTCAATTTCTTC-3'
P18	3'-RpoZ (-28+A)	5'-AAAGCTCCACAGGTGAAGAAATTGACTGGG-3'
P19	5'-RpoZ (-28+G)	5'-TTTCAGTATCATGCCAGTCAGTTTCTTCA-3'
P20	3'-RpoZ (-28+G)	5'-AAAAGCTCCACAGGTGAAGAAACTGACTGG-3'
P21	5'-RpoZ (-31ΔG)	5'-ACCTGATTTTCAGTATCATGCCATCATTTC-3'
P22	3'-RpoZ (-31ΔG)	5'-AAAGCTCCACAGGTGAAGAAATGATGGGCA-3'
P23	5'-RpoZ (+28A-U)	5'-TATGGCACGCGTAACTGTTTCAGGTCGCTGT-3'
P24	3'-RpoZ (+28A-U)	5'-GGTTACCAATTTTCTCTACAGCGACCTGAA-3'

## 【結果】

### 1. ポリアミンによる細胞内 ppGpp 含量の上昇

当研究室では、ポリアミンが RMF を翻訳レベルで合成促進することにより、細胞生存率維持に寄与していることを明らかにした【32】。大腸菌などの微生物には、環境変化に適応する際のセカンドメッセンジャーとして緊縮応答因子グアノシン 4 リン酸 (ppGpp) (Fig. 5A) が知られており、RMF の発現は ppGpp によって制御されていることが知られている【47】。そこで、この ppGpp に着目し、ポリアミンと細胞内 ppGpp 含量を検討した。

大腸菌ポリアミン要求株 MA261 は PUT を添加することで、細胞増殖速度が 3~5 倍増加する。添加された PUT は細胞内に取り込まれ、対数増殖期 ( $A_{540} = 0.2$ ) 及び培養 24 時間における細胞内濃度はそれぞれ PUT がおよそ 25 nmol/mg protein、35 nmol/mg protein であった。また、SPD はおよそ 7 nmol/mg protein と PUT の取り込みにより SPD 合成の増加が見られた【32】。MA261 をポリアミンの有無で、対数増殖期 ( $A_{540} = 0.2$ )、24、36 及び 48 時間まで培養し、細胞内 ppGpp 含量を比較したところ、 $A_{540} = 0.2$  ではポリアミンの有無にかかわらず、ppGpp 含量に差は見られなかった (Fig. 5B)。しかし、培養開始 24 時間後のポリアミン非存在下 (約  $A_{540} = 0.8$ )、存在下 (約  $A_{540} = 1.2$ ) ではポリアミンにより 2.3 倍の ppGpp 含量の上昇が認められた。さらに、36 時間、48 時間ではそれぞれ 3.0 倍、3.7 倍の細胞内 ppGpp 含量の上昇が見られた。これらの結果から、大腸菌の定常期において、細胞内の ppGpp 合成にポリアミンが関与することが示唆された。

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

大腸菌において、ppGpp 合成酵素は 2 種知られており (RelA 及び SpoT)、アミノ酸飢餓時には RelA が、その他の栄養飢餓状態では SpoT が ppGpp 合成に関与していることが知られている【48】。また、RNA ポリメラーゼと ppGpp との相互作用の際に RpoZ



(RNA ポリメラーゼのサブユニット) が必要であることが知られており、*rpoZ* 及び *spoT* は *spo* オペロンとして発現制御されている【49, 50】。そこで、MA261 を用いてポリアミンによる RelA、SpoT 及び RpoZ の発現量の変化を検討した。ポリアミンによる RelA の発現量の変化に関して、対数増殖期及び定常期で転写及び翻訳レベルにおいてポリアミンによりわずかに減少しており、対数増殖期より定常期において発現量が増加することが認められた (Fig. 6)。大腸菌の wild type である W3110 及びもう 1 つのポリアミン要求株である HT283 においても同様な結果が得られた (Fig. 6A)。

次に、ポリアミンによる SpoT の発現量の変化を Western blotting により比較したところ、 $A_{540} = 0.2$ 、0.6、24 時間、36 時間において、ポリアミンによりそれぞれ 2.2 倍、2.5 倍、3.4 倍、3.2 倍と対数増殖期及び定常期で強い促進が見られた (Fig. 7A)。HT283 においても同様に SpoT 発現量に対し、ポリアミンの促進効果が見られたが、W3110 ではポリアミンの促進効果は見られなかった (Fig. 7A)。そこで、MA261 において Dot blotting によりポリアミンによる *spoT* mRNA 量の変化を  $A_{540} = 0.2$  及び 24 時間で比較したところ、どちらも 0.8 倍と mRNA 量にポリアミンによる発現促進は認められなかった (Fig. 7B)。したがって、SpoT はポリアミンにより翻訳レベルで合成促進されることが示された。

同様に、ポリアミンによる RpoZ の発現量を比較した結果、 $A_{540} = 0.2$ 、0.6、24 時間、36 時間において、ポリアミンによりそれぞれ 0.8 倍、2.3 倍、3.3 倍、2.7 倍と後期対数増殖期から定常期において強い促進が見られた (Fig. 8A)。HT283 においても同様に RpoZ 発現量に対し、ポリアミンの促進効果が見られたが、W3110 ではポリアミンの促進効果は見られなかった (Fig. 8A)。そこで、MA261 において Dot blotting によりポリアミンによる *rpoZ* mRNA 量の変化を  $A_{540} = 0.2$  及び 24 時間で比較したところ、それぞれ 0.7 倍、0.8 倍と mRNA 量に変化は見られなかった (Fig. 8B)。したがって、RpoZ はポリアミンにより翻訳レベルで合成促進されることが示された。

### **3. ポリアミンによる SpoT 及び RpoZ の合成促進機構の解明**

SpoT 及び RpoZ がポリアミンにより翻訳レベルで合成促進されることが示されたことから、ポリアミンによる合成促進機構の解明を行った。SpoT の開始コドンは、AUG

ではなく、UUG であり、非効率的であると考えられる。そこで、この特徴がポリアミンによる SpoT の合成促進に寄与しているか検討するため、*spoT* のプロモーター領域を含み、wild type 及び開始コドン UUG を AUG に変えた変異遺伝子を、 $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) と融合させたプラスミドを作製し、MA261 $\Delta$ lacZ::*Em* に形質転換しポリアミンによる $\beta$ -Gal 合成促進効果の変化を検討した (Fig. 7C)。SpoT- $\beta$ -Gal 融合蛋白質の合成を [<sup>35</sup>S] methionine を用い検討したところ、wild type では SpoT- $\beta$ -Gal の合成がポリアミンにより、2.8 倍増加した (Fig. 7D)。しかし、開始コドンを AUG に変えたものはポリアミンの促進効果が 1.4 倍に減少し、ポリアミン非存在下の蛋白質合成能が著しく上昇した。また Western blotting により、SpoT- $\beta$ -Gal の発現量を比較したところ、同様の結果が得られた (Fig. 7E)。これらの結果から、ポリアミンによる SpoT の合成促進は開始コドンに依存して引き起こされ、*spoT* を新たなポリアミンモジュロンとして同定した。

ポリアミンにより RpoZ の発現が定常期において上昇することから、ppGpp の機能に重要な役割を果たしていることが示唆される。そこで、ポリアミンによる RpoZ の合成促進機構を解明するため、SpoT と同様に *rpoZ-lacZ* 融合遺伝子を作製しポリアミンによる RpoZ- $\beta$ -Gal の発現量の変化を検討した。*rpoZ* mRNA の Shine-Dalgarno (SD) 配列は、開始コドンより 11 塩基上流に位置しており、6 ~ 7 塩基上流に存在する通常の SD 配列より離れている。そこで、この特徴がポリアミンによる RpoZ の合成促進に寄与しているか検討するため、wild type と SD 配列を通常的位置に変え、ポリアミンの促進効果の変化を検討した (Fig. 8C)。RpoZ- $\beta$ -Gal 融合蛋白質の合成を [<sup>35</sup>S] methionine を用い検討したところ、wild type では RpoZ- $\beta$ -Gal の合成がポリアミンにより、2.7 倍増加した (Fig. 8D)。しかし、SD 配列を変えたものはポリアミンの促進効果が 1.4 倍に減少し、ポリアミン非存在下の蛋白質合成能が著しく上昇した。また、Western blotting により、RpoZ- $\beta$ -Gal の発現量を比較したところ、同様の結果が得られた (Fig. 8E)。これらの結果から、ポリアミンによる RpoZ の合成促進は SD 配列と開始コドンとの距離に依存して引き起こされることが明らかとなった。

これまでの研究で、ポリアミンは mRNA の bulged-out 構造に作用し、構造変化を引き起こし安定化することで特定蛋白質を合成促進していることが明らかとなっている【51, 52】。*rpoZ* mRNA におけるポリアミンの作用部位を同定するため、*rpoZ* mRNA の

翻訳開始領域を含めた構造を Zuker の方法を用いて構築したところ、開始コドンと SD 配列の間に loop 構造を見出した (Fig. 9A)。そこで、この loop 構造の変異体を作製し *lacZ* 遺伝子と融合させ、ポリアミンの促進効果を RpoZ-β-Gal の発現量変化により検討した。loop 構造を欠損させた変異体-28 (+A)、-28 (+G) 及び-31 (ΔG) では、ポリアミン非存在下において RpoZ-β-Gal の合成能がおよそ 2 倍に増加したが、ポリアミンによる促進効果が wild type (3.2 倍) に比べ、0.9 ~ 1.3 倍に減少した (Fig. 9B)。また、開始コドン付近の loop 構造に影響しない変異体+28 (A→U) においては、wild type 同様に 3.0 倍とポリアミンによる促進効果が見られた。これらの結果より、ポリアミンは *rpoZ* mRNA の翻訳開始領域の loop 構造に作用し構造変化させることで、RpoZ を翻訳レベルで合成促進することが明らかとなり、*rpoZ* を新たに定常期におけるポリアミンモジュロンとして同定した。

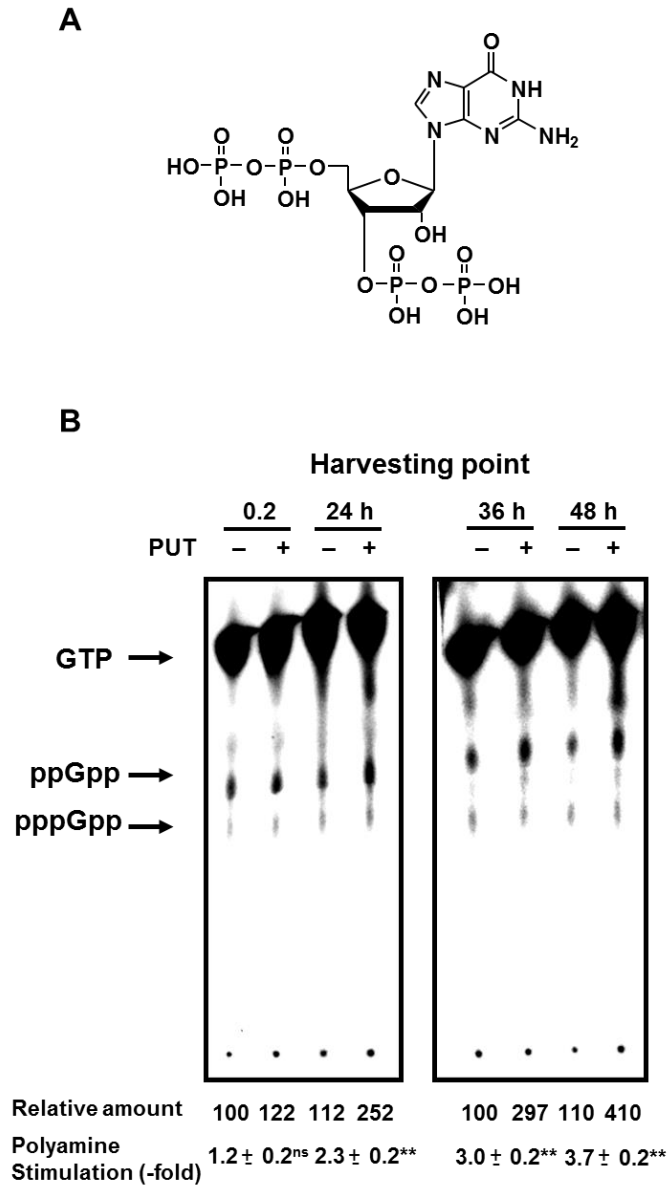
#### 4. ポリアミン非存在下における SpoT 及び RpoZ による生存率の上昇

MA261 における細胞生存率はポリアミンが欠乏すると著しく低下する【32】。ポリアミンが欠乏すると RMF や RpoS の合成が抑制され、生存率が低下することが明らかとなっている【44, 53】。微生物は栄養飢餓やストレスのように生存が脅かされたとき、生き残るために緊縮応答という機構が知られており、ppGpp の関与が報告されている【48, 54】。ポリアミンが SpoT 及び RpoZ の合成を翻訳レベルで促進し、ppGpp 形成や機能に関与することが示唆されることから、SpoT 及び RpoZ が細胞生存率に関与するか検討した。そこで、*spoT* 及び *rpoZ* 遺伝子を組み込んだプラスミド (pMW-lacSpoT, pMW-lacRpoZ, pMW-lacRpoZ-SpoT)、*spoT* の開始コドンや *rpoZ* の SD 配列を変化させたプラスミド (pMW-lacSpoT(ATG), pMW-lacRpoZ(SD), pMW-lacRpoZ(SD)-SpoT(ATG)) を作製し、ポリアミンの有無にかかわらず SpoT 及び RpoZ が過剰発現する株で細胞生存率を比較した。これらを過剰発現させた株においてポリアミン非存在下で細胞生存率を比較したところ、pMW-lacRpoZ(SD)-SpoT(ATG) > pMW-lacRpoZ(SD) > pMW-lacSpoT(ATG) の順に生存率の上昇が認められた。また、開始コドンや SD 配列を変化させていない pMW-lacRpoZ-SpoT、pMW-lacRpoZ 及び pMW-lacSpoT もわずかに生存率が上昇した (Fig. 10A)。これらの結果より、SpoT 及び RpoZ は細胞生存率に重

要な蛋白質であることが示された。これらの過剰発現株において、細胞内 ppGpp 含量を測定したところ、ポリアミン非存在下において、SpoT を過剰発現させた株で ppGpp 含量の上昇が認められ、蛋白質の発現も増加していた (Fig. 10B, C)。したがって、SpoT により ppGpp 合成が増加し、RpoZ による ppGpp の機能促進により細胞生存率が上昇したと考えられる。

## 5. 定常期においてポリアミンにより発現制御される遺伝子の解析

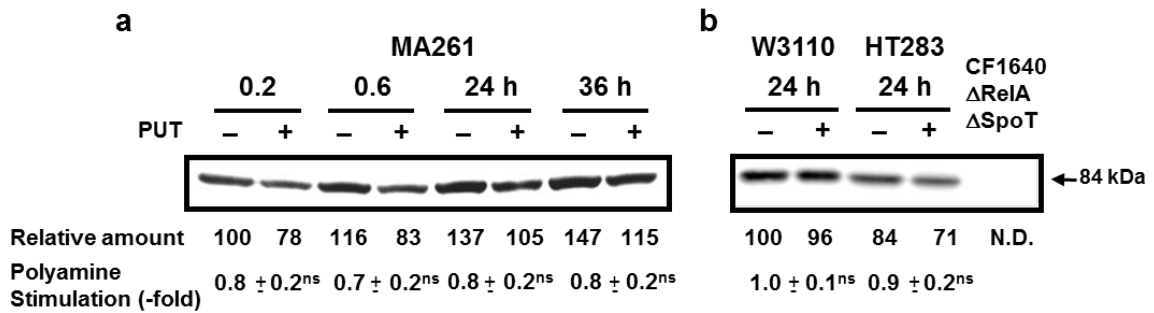
DNA マイクロアレイにより、MA261 における定常期でポリアミンにより発現制御される遺伝子を解析した。培養開始 36 時間後に発現している 694 遺伝子中、142 遺伝子がポリアミンによって正に制御 (2 倍以上の発現促進) されており、137 遺伝子が負に制御 (2 倍以上の発現抑制) されていた。この結果は、対数増殖期に発現される遺伝子数と比べて、わずか 26%にしかすぎなかった【28】。*in vivo* の系において、RpoE、RpoS や RpoN のような RpoD ( $\sigma^{70}$ ) 以外の  $\sigma$  因子の転写活性には ppGpp が必要であることが報告されている【55】。また、cAMP-CRP と ppGpp レギュロンは相互作用して遺伝子の発現を制御していることが報告されている【56】。ポリアミンによって発現促進される 142 遺伝子の中で、Table 3 に示すように 65 の遺伝子が ppGpp、RpoE、RpoS、RpoN、Cya、Cra 及び H-NS/StpA によって制御されていた【57-63】。また、定常期においてポリアミンモジュロン蛋白質である RpoE、RpoS、RpoN、Cya、Cra 及び H-NS の発現にポリアミンによる促進が見られた (Fig. 11)。したがって、ppGpp によって発現制御される遺伝子の大部分が、 $\sigma^{70}$  以外の  $\sigma$  因子やアデニル酸シクラーゼ (Cya) の生成物である cAMP によって制御される遺伝子と重なっていることから、定常期におけるポリアミンによる遺伝子発現促進は、RpoZ による ppGpp の機能促進を介した  $\sigma^{70}$  以外の  $\sigma$  因子や cAMP によって制御されていることが示唆された。また、定常期においてポリアミンによって正の制御が見られた遺伝子は、対数増殖期に見られた遺伝子とは異なっていた【28】。



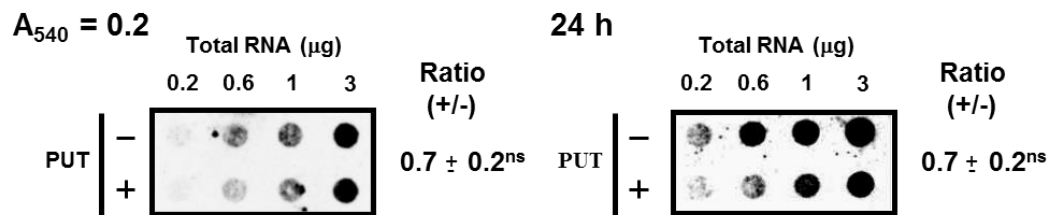
**Fig. 5** グアノシン 4 リン酸 (ppGpp) の構造及び細胞内 ppGpp 含量の上昇

A. グアノシン 4 リン酸 (ppGpp) の構造を示した。B. 大腸菌ポリアミン要求株 MA261 におけるポリアミン添加の有無による細胞内 ppGpp 含量を比較した。値は mean  $\pm$  S.E. (n = 3) で表す。ns は  $p \geq 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$  を表す。

## A Western blotting of RelA

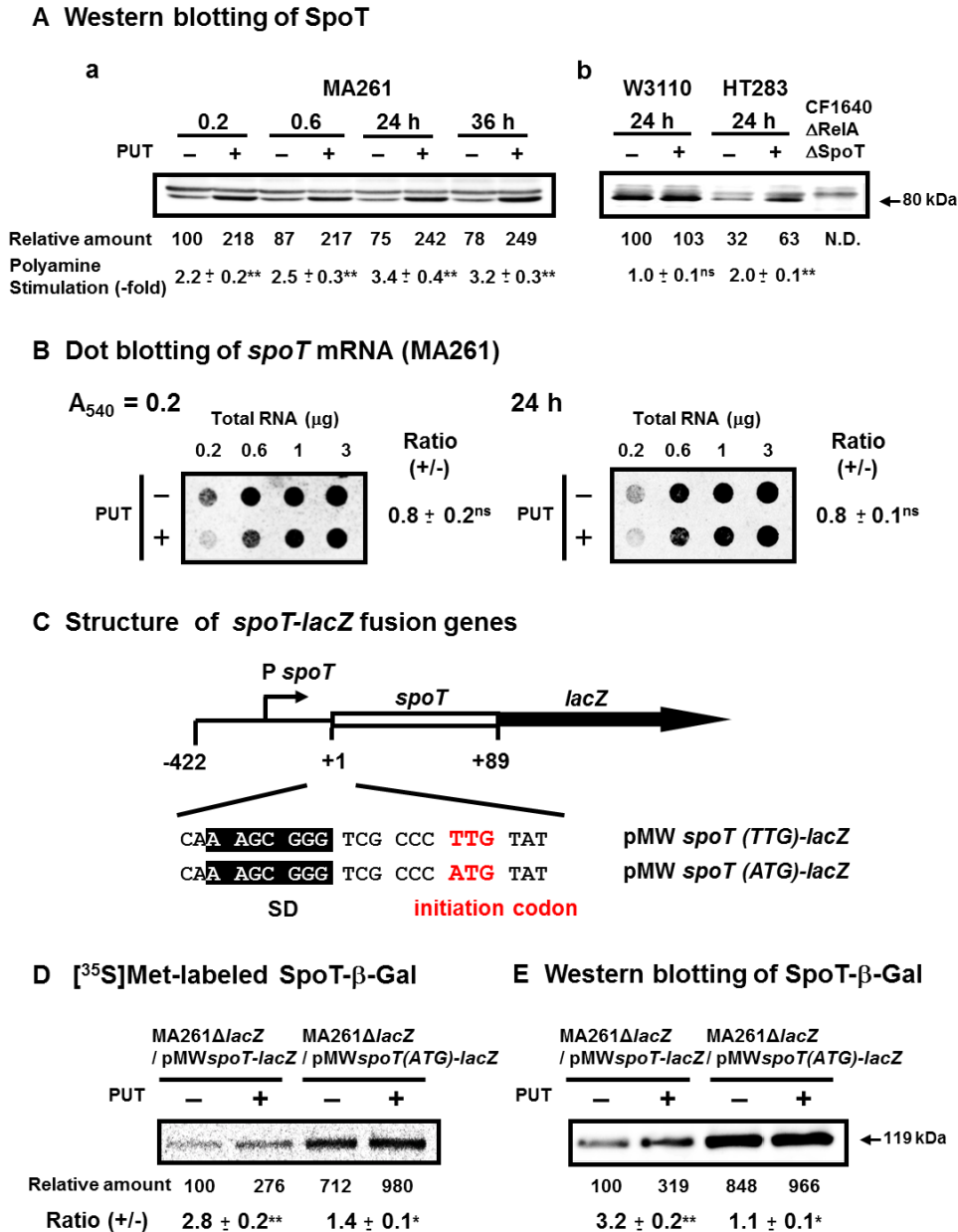


## B Dot blotting of *relA* mRNA (MA261)



**Fig. 6 MA261 における RelA 蛋白質及び mRNA 量の比較**

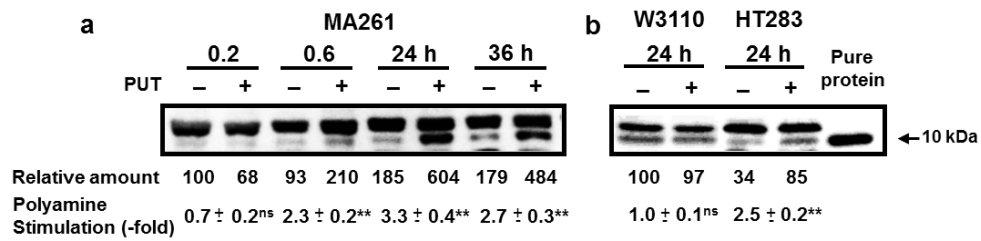
MA261、W3110 及び HT283 を用いてポリアミン添加の有無による RelA 蛋白質 (A) 及び MA261 における *relA* mRNA (B) 発現量を比較した。値は mean  $\pm$  S.E. (n = 3) で表す。ns は  $p \geq 0.05$  を表す。



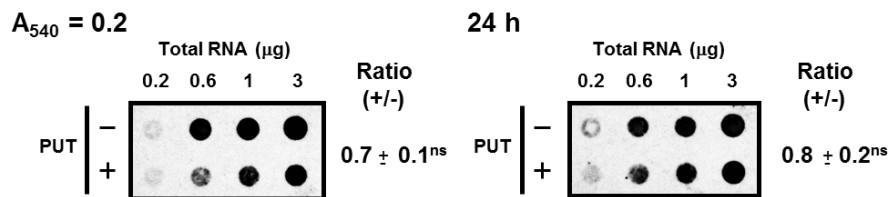
**Fig. 7** ポリアミンによる SpoT 蛋白質の翻訳レベルにおける合成促進

MA261、W3110 及び HT283 を用いてポリアミン添加の有無による SpoT 蛋白質 (A) 及び MA261 における *spoT* mRNA (B) 発現量を比較した。C. wild type 及び変異 *spoT-lacZ* 遺伝子の構造を示した。wild type 及び変異させたプラスミドを MA261Δ*lacZ*::*Em* に形質転換し、免疫沈降法により [<sup>35</sup>S]ラベルした SpoT-β-Gal 蛋白質合成量及び Western blotting 法により SpoT-β-Gal 発現量の変化を比較した (D, E)。値は mean ± S.E. (n = 3) で表す。ns は  $p \geq 0.05$ 、\*は  $p < 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$  を表す。

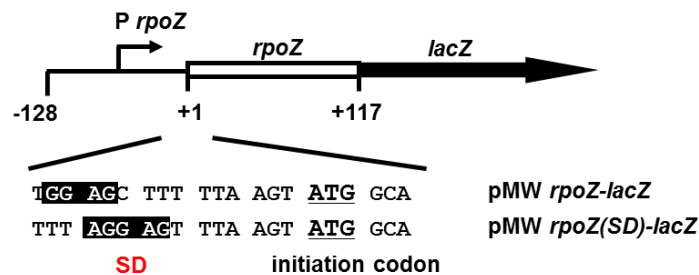
### A Western blotting of RpoZ



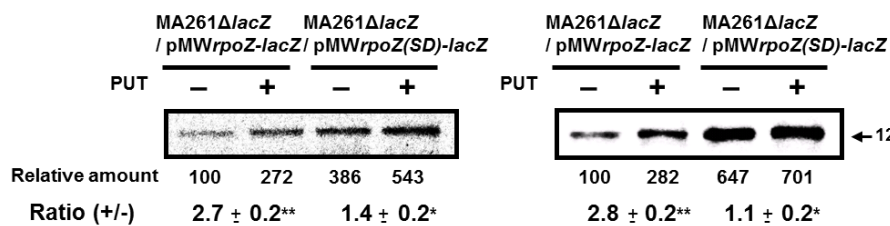
### B Dot blotting of *rpoZ* mRNA (MA261)



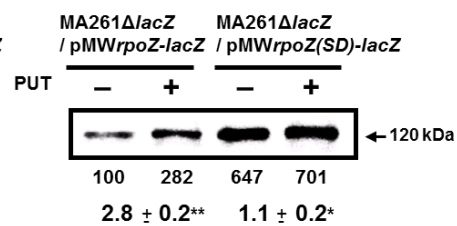
### C Structure of *rpoZ-lacZ* fusion genes



### D [<sup>35</sup>S]Met-labeled RpoZ-β-Gal



### E Western blotting of RpoZ-β-Gal

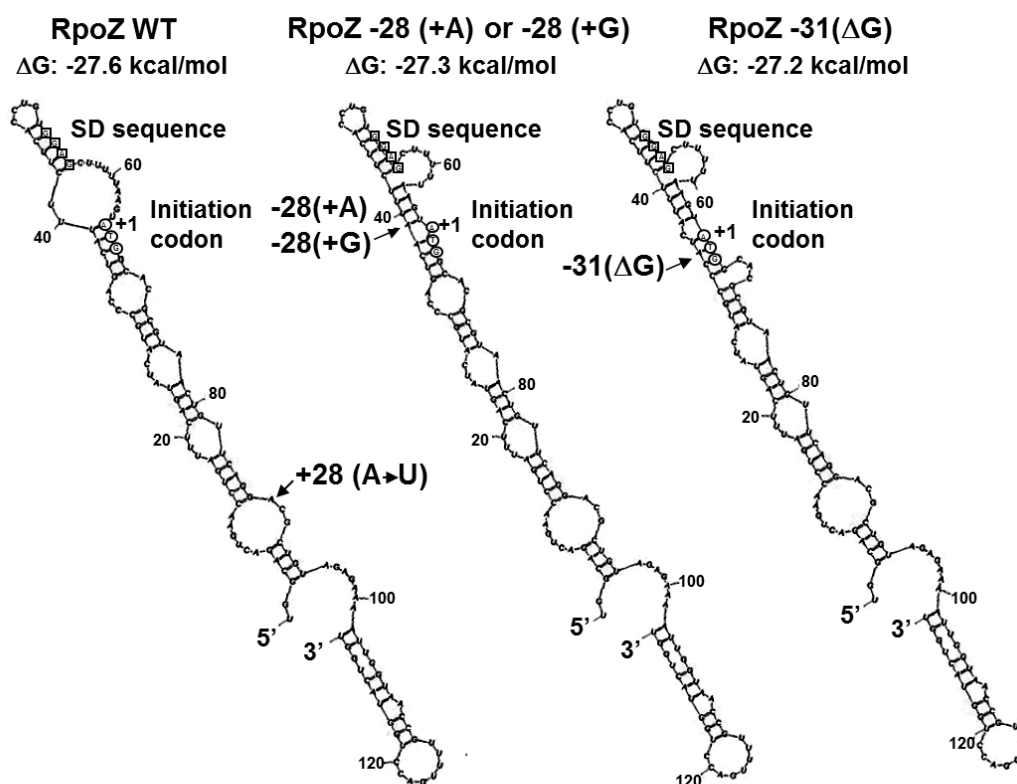


**Fig. 8** ポリアミンによる RpoZ 蛋白質の翻訳レベルにおける合成促進

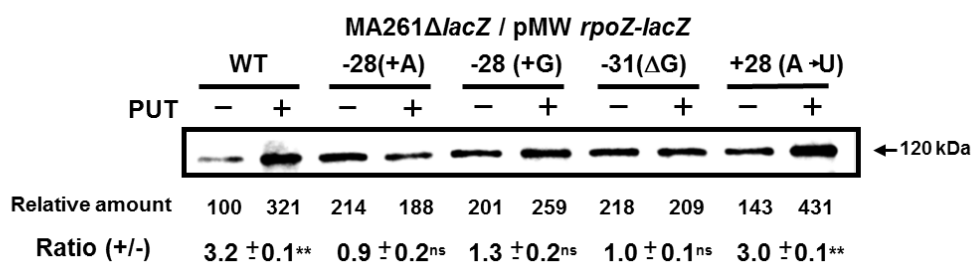
MA261、W3110 及び HT283 を用いてポリアミン添加の有無による RpoZ 蛋白質 (A) 及び MA261 における *rpoZ* mRNA (B) 発現量を比較した。C. wild type 及び変異 *rpoZ-lacZ* 遺伝子の構造を示した。wild type 及び変異させたプラスミドを MA261Δ*lacZ*::*Em* に形質転換し、免疫沈降法により [<sup>35</sup>S]ラベルした RpoZ-β-Gal 蛋白質合成量及び Western blotting 法により RpoZ-β-Gal 発現量の変化を比較した (D, E)。値は mean ± S.E. (n = 3) で表す。ns は  $p \geq 0.05$ 、\*は  $p < 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$  を表す。



**A Possible secondary structure of the initiation region of *rpoZ* mRNA**  
*rpoZ* mRNA from -65 to +65



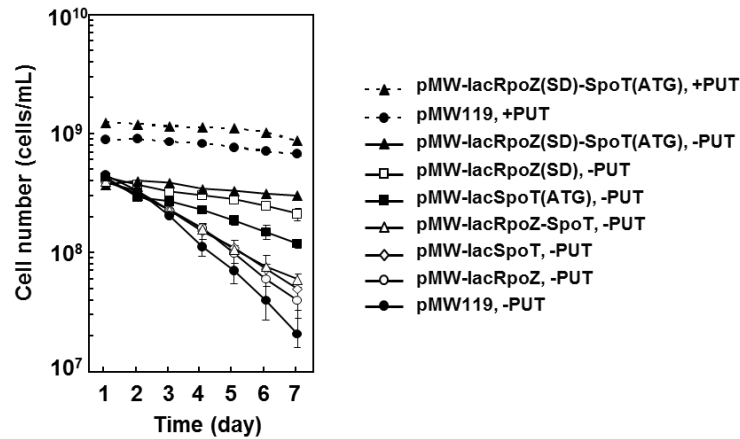
**B Western blotting of RpoZ-β-Gal**



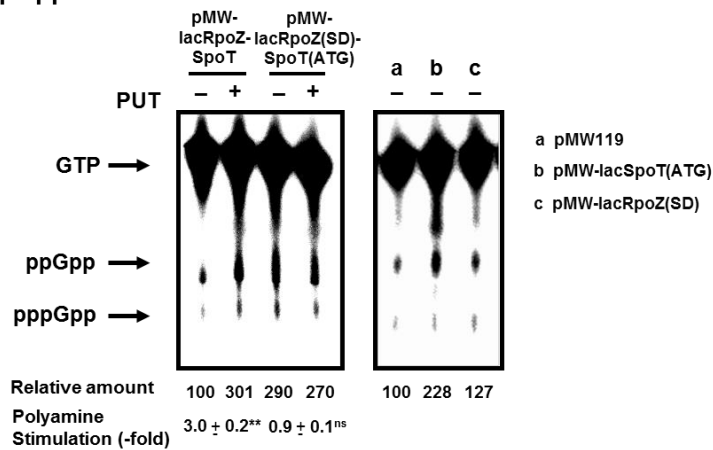
**Fig. 9** ポリアミンによる *rpoZ* mRNA 翻訳開始領域の構造変化を介した RpoZ-β-Gal の合成促進

A. *rpoZ* mRNA の翻訳領域を含む2次構造を示した。翻訳開始領域の構造を変異させ、*lacZ* と融合させたプラスミドを作製した。B. RpoZ-β-Gal の発現量を Western blotting 法により比較した。値は mean ± S.E. (n = 3) で表す。ns は  $p \geq 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$  を表す。

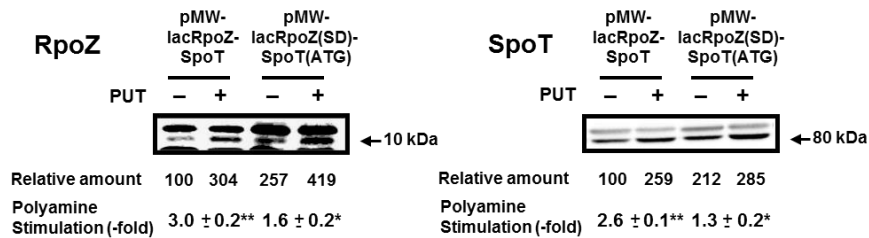
### A Cell viability



### B ppGpp content



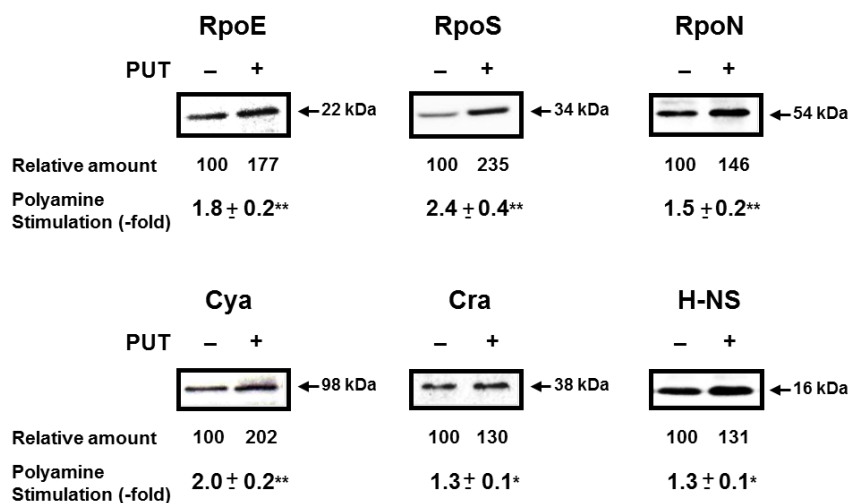
### C Western blotting of RpoZ and SpoT



**Fig. 10** ポリアミン非存在下における RpoZ 及び SpoT による生存率の上昇

A. SpoT 及び RpoZ の過剰発現株を作製し、ポリアミン非存在下で細胞生存率への寄与を調べた。B. 過剰発現株の ppGpp 含量を比較した。C. 過剰発現株の培養 24 時間後の RpoZ 及び SpoT 蛋白質発現量を比較した。値は mean ± S.E. (n = 3) で表す。ns は  $p \geq 0.05$ 、\*は  $p < 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$  を表す。

## Western blotting



**Fig. 11** 定常期におけるポリアミンモジュロン蛋白質発現量

MA261 における培養 24 時間後の RpoE、RpoS、RpoN、Cya、Cra 及び H-NS 蛋白質の発現量の変化をポリアミンの有無で比較した。値は mean ± S.E. (n = 3) で表す。\*は  $p < 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$  を表す。

**Table 3**

Typical genes up-regulated by ppGpp, RpoE ( $\sigma^{24}$ ), RpoS ( $\sigma^{38}$ ), RpoN ( $\sigma^{54}$ ), Cya, Cra and H-NS/StpA in the presence of putrescine at the stationary phase (36 h).

Regulator	Gene
Genes regulated by ppGpp	<i>dnaK</i> , <i>dnaJ</i> , <i>fliK</i> , <i>lldD</i> , <i>manX</i> , <i>manY</i> , <i>mglB</i> , <i>narJ</i> , <i>wrbA</i> , <i>ybeL</i> , <i>ychH</i>
Genes regulated by RpoE	<i>clpB</i> , <i>dnaK</i> , <i>dnaJ</i> , <i>ftsH</i> , <i>fxsA</i> , <i>fusA</i> , <i>grpE<sup>a</sup></i> , <i>hslR</i> , <i>hslV</i> , <i>miaA</i> , <i>mlC</i> , <i>mopA/groEL</i> , <i>mopB/groES</i> , <i>rpoD</i> , <i>ybeD</i> , <i>ybeY</i> , <i>yccV</i> , <i>ycjX</i> , <i>yhdN</i> , <i>yhiQ</i> , <i>ynfK(bioD)</i> , <i>yrfI</i> , <i>zntR</i>
Genes regulated by RpoS	<i>bolA<sup>d</sup></i> , <i>csiD</i> , <i>glgS</i> , <i>glpD</i> , <i>pspC<sup>b</sup></i> , <i>wrbA</i> , <i>ycfH</i> , <i>ycgB</i> , <i>yeaG</i> , <i>ynhG</i> , <i>ytfQ<sup>c</sup></i>
Genes regulated by RpoN	<i>hisJ</i> , <i>mglB<sup>e</sup></i> , <i>pspC<sup>b</sup></i> , <i>rbsD<sup>e</sup></i> , <i>yahE</i> , <i>ybiM</i> , <i>yebV</i>
Genes regulated by Cya	<i>dctA</i> , <i>fliK</i> , <i>gatY</i> , <i>gatZ</i> , <i>glpT</i> , <i>grpE<sup>a</sup></i> , <i>manX<sup>f</sup></i> , <i>manY<sup>f</sup></i> , <i>mglB<sup>e</sup></i> , <i>rbsA</i> , <i>rbsD<sup>e</sup></i> , <i>ybeL</i> , <i>ycdZ</i> , <i>ychH</i> , <i>ydeZ</i> , <i>yihX</i> , <i>yjeN</i> , <i>yneB</i> , <i>ytfQ<sup>c</sup></i> , <i>ytfR</i>
Genes regulated by Cra	<i>citE</i> , <i>manX<sup>f</sup></i> , <i>manY<sup>f</sup></i> , <i>mhpR</i>
Genes regulated by H-NS/StpA	<i>adi</i> , <i>bolA<sup>d</sup></i> , <i>leuO</i> , <i>rfaK</i> , <i>yabD</i> , <i>ygaP</i>

The 65 up-regulated genes (more than 2-fold) in response to polyamines are shown in the table. Bold letters represent genes regulated by ppGpp and polyamine modulons.

a Regulated by RpoE ( $\sigma^{24}$ ) and Cya (cAMP-CRP).

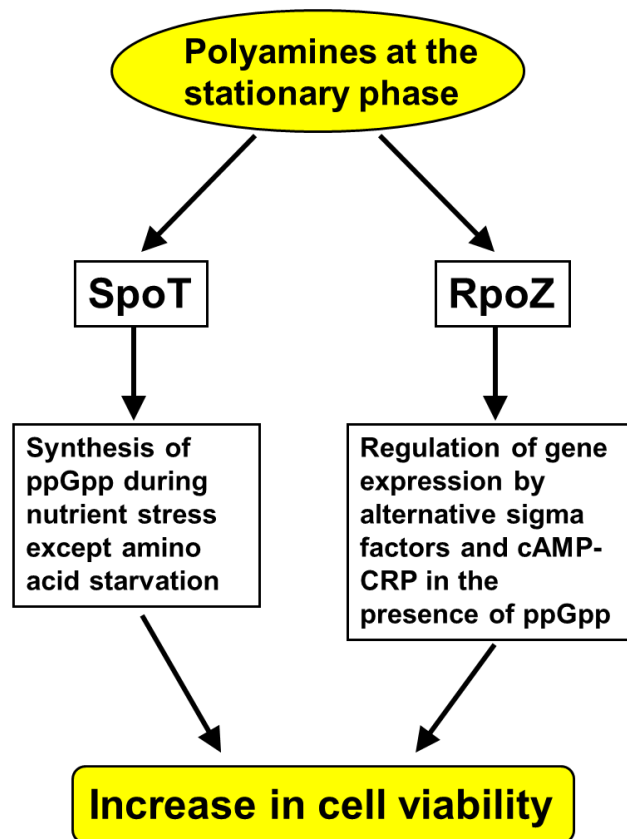
b Regulated by RpoS ( $\sigma^{38}$ ) and RpoN ( $\sigma^{54}$ ).

c Regulated by RpoS ( $\sigma^{38}$ ) and Cya (cAMP-CRP).

d Regulated by RpoS ( $\sigma^{38}$ ) and H-NS/StpA.

e Regulated by RpoN ( $\sigma^{54}$ ) and Cya (cAMP-CRP).

f Regulated by Cya (cAMP-CRP) and Cra.



**Fig. 12** 定常期におけるポリアミンの ppGpp 機能亢進による生存率の上昇

定常期におけるポリアミンの役割を図示した。ポリアミンは SpoT を合成促進し、ppGpp 合成を促進する。また、ポリアミンによって合成促進された RpoZ を介した ppGpp の機能亢進により、細胞生存率が上昇する。

## 【考察】

大腸菌においてポリアミンは、いくつかの特定蛋白質を合成促進することにより、細胞増殖及び細胞生存率を上昇させる。当研究室では、これまでにポリアミンによって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を“ポリアミンモジュロン”と提唱してきた【22, 23】。最近、当研究室ではポリアミンモジュロンの中で、定常期において合成される RMF や主に後期対数増殖期に合成される RpoS が細胞生存率に関与していることを報告した【32】。また、RMF は強く細胞生存率に関与していること、RpoS は RMF の機能を補助していることも報告されている【44】。本研究では、ポリアミンの細胞生存率に対する役割をさらに解明するため、細胞生存率に関わるポリアミンモジュロンの探索とその生理的意義の解明を行った。

緊縮応答因子である ppGpp は、長期の生存率に必要であることが知られている【48, 54】。ppGpp は RpoE、RpoS や RpoN のような $\sigma^{70}$ 以外の $\sigma$ 因子による転写や cAMP-CRP による遺伝子の発現を正に制御している (Table 3)【48, 49, 56, 64】。さらに、*rmf* mRNA の発現においても関与していることが知られている【47】。本研究では、大腸菌ポリアミン要求株である MA261 を用いて細胞内 ppGpp 含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 ppGpp の合成が強く促進されることを明らかにした。そして、ppGpp の合成及び機能に関与する *spoT* 及び *rpoZ* を定常期におけるポリアミンモジュロンとして同定した。SpoT 蛋白質は、ppGpp の合成と分解の両方に機能する蛋白質であるが【36】、SpoT 過剰発現株において ppGpp の形成が上昇したことから、本実験系では ppGpp 合成に寄与していると考えられる。一方、RpoZ 蛋白質は細胞生存率に関与しており、ppGpp による $\sigma^{70}$ 以外の $\sigma$ 因子の RNA 合成調節に必要であることが報告されている【48, 49, 64】。また、ppGpp の合成酵素である RelA の発現量は、ポリアミンによって促進されなかったが、無細胞系において RelA による ppGpp の合成がポリアミンによって促進されることが報告されている【65】。したがって、ポリアミンによる RelA 蛋白質の発現促進は見られなかったが、このような報告もあるので ppGpp の合成が促進された可能性も考えられる。

ポリアミンによる ppGpp の合成と ppGpp の機能上昇を介した細胞生存率維持に対す

る関与について Fig. 12 に図示した。ポリアミンによって翻訳レベルで合成促進された SpoT により ppGpp 合成促進が認められた (Fig. 10B)。これまでに、SpoT における ppGpp の合成と分解の酵素活性の切り換えは、脂肪酸飢餓時において acyl carrier protein (ACP) の相互作用を介して変わることが報告されている【66】。このことから、本実験系においても同様なことが起こる可能性が考えられる。さらに、ポリアミンは RpoZ 合成促進を介して、 $\sigma^{70}$  以外の  $\sigma$  因子や cAMP-CRP 複合体依存の転写を制御する ppGpp の機能を増強することが明らかとなった。一方で、細胞内の過剰な ppGpp は細胞生存率を減少させるという報告があるため【64】、SpoT は細胞内の ppGpp 含量を至適に保つことで生存率維持に寄与していると考えられる。

大腸菌 MA261 をポリアミン非存在下で 7 日間培養し、細胞数を測定したところ、pMW-lacSpoT(ATG)、pMW-lacRpoZ(SD)、pMW-lacRpoZ(SD)-SpoT(ATG) を形質転換することで、それぞれおよそ  $1 \times 10^8$  cells/mL、 $2 \times 10^8$  cells/mL、 $2.8 \times 10^8$  cells/mL と上昇した (Fig. 10A)。さらに、ポリアミン非存在下における 7 日目の細胞数は pMW-lacRMF(SD\*)【32】と pMW-lacRpoZ(SD)-SpoT(ATG)-RMF(SD\*) を形質転換すると、およそ  $2.3 \times 10^8$  cells/mL と  $5.2 \times 10^8$  cells/mL と増加が見られた (data not shown)。これらの結果より、細胞数における RpoZ、SpoT 及び RMF の効果は相加的であることが示され、細胞生存率に対する RpoZ、SpoT 及び RMF は独立的に機能していることが示唆された。また、ストレス条件下において、ppGpp 存在下で  $\sigma^{70}$  以外の  $\sigma$  因子による普遍的な転写や RMF による蛋白質合成の制御が細胞生存率維持に寄与していることが示唆された。しかし、RMF による蛋白質合成の制御が細胞生存率維持にどのように関与しているか不明であるため、今後詳細な研究が必要である。

## 第2章

# ポリアミンによるバイオフィルム形成能及び 細胞生存率上昇機序の解明

## 【目的】

これまでの研究で、定常期において ribosome modulation factor (RMF)、また前章で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 ポリメラーゼと ppGpp との相互作用に必要な 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【32, 第1章】。

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 (バイオフィルム) 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ル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、バイオフィル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、二成分情報伝達系レスポンスレギュレーター (UvrY 及び CpxR) や ribosome recycling factor (RRF) に着目し、これらとポリアミンとの関係及び生理的意義の解明を行った。



## 【材料と方法】

### 1) 大腸菌及び培養条件

PUT 生合成酵素欠損株 MA261 (*speB speC gly leu thr thi*) は、ニューヨーク大学 W. K. Maas 先生のご厚意により分与していただいた【33】。MA261 $\Delta$ lacZ::*Em* は、千葉大学大学院薬学研究院の五十嵐先生のご厚意により分与していただいた【34】。

MA261 及び MA261 $\Delta$ lacZ::*Em* の培養は、第 1 章と同様の方法で行った。必要に応じて、0.6 mM (100  $\mu$ g/mL) putrescine dihydrochloride や 0.5 mM CuSO<sub>4</sub> を加え、37 °C で培養した。細胞増殖は、吸光度 540 nm の波長で測定した。Cell viability の測定は、上記の培養を行い、培養から 24 時間毎に希釈したものを 1.5% Agar-LB プレートに撒き 37 °C で一晩培養した。プレートに出現したコロニーを数え、6 日間この操作を続け生存率を算出した。

### 2) プラスミドの作製

本研究で用いたプラスミド (pMW-lacUvrY, pMW-lacUvrY(ATG), pMW*uvrY-lacZ*, pMW*uvrY(ATG)-lacZ*, pMW-lacCpxR, pMW-lacCpxR(SD), pMW*cpxR-lacZ*, pMW*cpxR(SD)-lacZ*, pMW-lacRRF, pMW-lacRRF(ATG), pMW*frr-lacZ*, pMW*frr(ATG)-lacZ*) は、第 1 章と同様の方法で作製した。作製したプラスミドは、Maniatis らの方法【38】に従って MA261 もしくは MA261 $\Delta$ lacZ::*Em* に形質転換した。プライマーの合成は、北海道システムサイエンス社に依頼した。本実験で使用したプライマーの配列を Table 4 に示す。作製したプラスミドは、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を確認した。

### 3) 大腸菌からの全 RNA 抽出

大腸菌 MA261 を PUT 存在下及び非存在下、CuSO<sub>4</sub> 存在下及び非存在下で 24 時間まで培養し、8000 回転、5 分、4 °C で集菌した。RNA Protect Bacteria Reagent (QIAGEN) で懸濁後、10000 回転、5 分、4 °C で遠心して洗浄した。全 RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) のプロトコールに従って抽出した。

#### 4) Dot blotting 法による特定 mRNA の検出

全 RNA を 50% ホルムアミド、7% ホルムアルデヒド、1 x SSC (150 mM NaCl、15 mM Sodium citrate) を含む溶液に溶かし 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  の濃度にした。さらに、RNA の量が 0.4  $\mu\text{g}$ 、1.2  $\mu\text{g}$ 、2  $\mu\text{g}$ 、6  $\mu\text{g}$  になるよう調整し、以下は第 1 章と同様にして行った。各 mRNA 検出に使用したプローブは、大腸菌 MA261 からの total chromosomal DNA を鋳型とし、プライマーは P3 と P7 (*uvrY*)、P11 と P13 (*cpxR*)、P16 と P20 (*frr*) を用いて PCR を行って作製した。

#### 5) Western blotting 法による特定蛋白質の検出

抗 UvrY、CpxR 及び RRF 抗体は、千葉大学大学院薬学研究院の五十嵐先生並びに法政大学生命科学部の石浜先生のご厚意により分与していただいた。抗  $\beta$ -galactosidase 抗体は Sigma-Aldrich より購入した。

PUT 存在下及び非存在下、 $\text{CuSO}_4$  存在下非存在下で大腸菌 MA261 を  $A_{540} = 0.2$ 、48 時間まで培養し、8000 回転、10 分、4  $^{\circ}\text{C}$  で集菌した。cell lysate の作製及び Western blotting は第 1 章に従った。

#### 6) 細胞内ポリアミン、 $\text{Cu}^{2+}$ 及び $\text{Mg}^{2+}$ 量の測定

大腸菌 MA261 は、PUT 存在下及び非存在下、 $\text{CuSO}_4$  存在下及び非存在下で  $A_{540} = 0.2$ 、0.6 と 24、36、48、72 及び 96 時間培養し、8000 回転、10 分、4  $^{\circ}\text{C}$  で集菌した。菌体を 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl を含む Buffer で洗浄した。5% TCA で菌体を懸濁し、70  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分インキュベーションした。氷中に 30 分間置き、12000 回転、10 分、4  $^{\circ}\text{C}$  で遠心した。上清をポリアミン定量に用いた。沈殿は 0.2 N NaOH に溶かし Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いて Bradford 法【41】により蛋白定量を行った。ポリアミン定量は第 1 章と同様に HPLC を用いて測定した。

$\text{Cu}^{2+}$  及び  $\text{Mg}^{2+}$  量の測定は、大腸菌 MA261 を PUT 及び  $\text{CuSO}_4$  存在下及び非存在下で 48 時間培養し、8000 回転、10 分、4  $^{\circ}\text{C}$  で集菌した。菌体を 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl を含む Buffer で洗浄した。0.1 M HCl で菌体を懸濁し、70  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分インキュベーションした。氷中に 30 分間置き、12000 回転、10 分、4  $^{\circ}\text{C}$  で遠心した。上清

を Metallo Assay Copper LS-MPR kit 及び Metallo Assay Magnesium LS-MPR kit (Wako) を用いて測定した。沈殿は 0.2 N NaOH に溶かし Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いて Bradford 法【41】により蛋白定量を行った。

#### 7) バイオフィーム形成能の測定

バイオフィーム形成は、Lee らの方法に従って測定した【67】。Pre-culture 液 : Medium A = 1:100 (100 倍希釈) をマイクロプレートに 200  $\mu$ L/well で分注し、30  $^{\circ}$ C で 24 ~ 72 時間静置培養した。時間毎に吸光度 595 nm で濁度を測定後、培地を取り除き、200  $\mu$ L の 0.1% Crystal violet 溶液を加え、室温で 30 分間染色した。その後、Crystal violet を除き、DDW で 5 回洗浄後、20% 酢酸で溶解し、吸光度 570 nm で吸光度を測定し、 $A_{595}$  で規準化した。

#### 8) 円偏光二色性 (CD) による RNA の構造変化の測定

測定に使用した RNA は北海道システムサイエンス社で合成したものを使用した (CpxR wild-type RNA ; 5'-CGGAGGUAUUUAAACAAUGAAUAAAAUCCU-3' と SD 配列を開始コドンより上流 8 番目にした CpxR SD RNA ; 5'-UUAGGAGGUUAAACAAUGAAUAAAAUCCUG-3')。CD の測定は、Jasco J-820 spectropolarimeter (Jasco International Co.) を使用した。0.1 cm のキュベットに RNA solution (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 50  $\mu$ M RNA,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  及び SPD (0 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM, 0.8 mM, 1.6 mM) を加え、37  $^{\circ}$ C で測定した。測定条件は Scan speed 100 nm/min、開始波長 320 nm、終了波長 200 nm で行った。

**Table 4 Primers used in this study.**

No.	Primer used	Nucleotide sequence
P1	5'-UvrY (SalI)	5'-TTAACGTTTCAAAGTCGACATAAAAACCGC-3'
P2	3'-UvrY (SalI)	5'-CGCTTTGTGCGACATAGATAACCGTACCACC-3'
P3	5'-UvrY (ATG)	5'-CTGGAGATATTCTATGATCAACGTTCTAC-3'
P4	3'-UvrY (ATG)	5'-CGTTGATCATAGGAATATCTCCAGAAATAG-3'
P5	5'-UvrY (XmaI)	5'-GCCCGTATTGCCCGGGTTAATTAATGTTAC-3'
P6	3'-UvrY (XmaI)	5'-TCAACGGCATTGCCCCGGGACCACTTAACG-3'
P7	3'-UvrY (dot)	5'-CTGACTTGATAATGTCTCCG-3'
P8	5'-CpxR (XmaI)	5'-TCCCCCGGGTTCGAACATATGGCTCTGCGTA-3'
P9	3'-CpxR (XmaI)	5'-GAGCCCCGGGTAACATCAAAACCAACATCAA-3'
P10	3'-CpxR (XmaI)2	5'-CAATGCTGTCCCCGGGAAGATCAAGCGCCT-3'
P11	5'-CpxR (SD)	5'-AATTTCTGCCTCTAAGGAGGTAAACAATG-3'
P12	3'-CpxR (SD)	5'-CATTGTTTAACTCCTAAGAGGCAGAAATT-3'
P13	3'-CpxR (dot)	5'-ATGTTACGGGAAACCACCTGACCCAGATG-3'
P14	5'-RRF (BamHI)	5'-ATGTTGGATCCGGGCTATACTTAGCACACT-3'
P15	3'-RRF (EcoRI)	5'-CATCCAGAATTCAGACAGAATAAAAAGCAA-3'
P16	5'-RRF (ATG)	5'-AAGTTTTCAAGGATTCGTAACATGATTAGC-3'
P17	3'-RRF (ATG)	5'-GATATCGCTAATCATGTTACGAATCCTTGA-3'
P18	5'-RRF (XmaI)	5'-TATTGTTCCCGGGAGTTTGGTCACGGCCAG-3'
P19	3'-RRF (XmaI)	5'-GTAATATCCCCGGGAATGCCATCCAGCAG-3'
P20	3'-RRF (dot)	5'-ACGAACGATTTTGGTCAGATCTTTACGACG-3'

## 【結果】

### 1. Cu<sup>2+</sup>存在下及び非存在下におけるポリアミンによるバイオフィーム形成及び細胞生存率上昇

細菌の細胞生存率上昇戦略として、バイオフィーム形成が知られており、医療面・食品業界で大きな問題となっている。また、銅 (Cu<sup>2+</sup>) 存在下ではバイオフィーム形成は抑制されることが知られているため【68, 69】、本研究においても Cu<sup>2+</sup>存在下、非存在下でポリアミンの効果を検討した。さらに、バイオフィーム形成には ppGpp が重要な役割を果たしている。そこで、大腸菌ポリアミン要求株 MA261 を用いて、0.5 mM Cu<sup>2+</sup> 添加の有無における細胞増殖、バイオフィーム形成能及び細胞生存率に対するポリアミンの効果を比較した。その結果、Cu<sup>2+</sup>の有無にかかわらず、細胞増殖、バイオフィーム形成及び細胞生存率がポリアミンにより著しく促進された (Fig. 13)。バイオフィーム形成は、対数増殖期においては検出されず、時間経過とともに培地中のグルコースの減少が見られ (data not shown)、バイオフィーム形成量の増加が見られた。培養開始 48 時間以降の細胞生存率は、ポリアミン非存在下において顕著な減少が見られた。また、Cu<sup>2+</sup>存在下では、細胞増殖、バイオフィーム形成及び細胞生存率はポリアミン非存在下において Cu<sup>2+</sup>非存在下に比べ減少した (Fig. 13)。Cu<sup>2+</sup>存在下における培養開始 48 時間後の細胞内 Cu<sup>2+</sup>を測定したところ、およそ 10 nmol/mg protein であり、これは細胞内濃度として 3 mM に相当した【70】。Cu<sup>2+</sup>非存在下では、検出されなかったことから、Cu<sup>2+</sup>添加により、細胞内に Cu<sup>2+</sup>の蓄積が認められた。一方、細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度は Cu<sup>2+</sup>の有無にかかわらず、およそ 100 nmol/mg protein (30 mM) と細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度に変化は見られなかった (Fig. 13B)。細胞内ポリアミン含量は、Cu<sup>2+</sup>の有無にかかわらず変化は見られなかった (data not shown)【32】。これらの結果より、Cu<sup>2+</sup>存在下において細胞増殖、バイオフィーム形成及び細胞生存率は抑制させるが、ポリアミンを添加することで著しい促進が見られることから、Cu<sup>2+</sup>存在下においていくつかのポリアミンモジュロンが機能する可能性が示唆された。

## 2. 定常期における新規ポリアミンモジュロンの同定

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【71, 72】。二成分情報伝達系は、センサーヒスチジンキナーゼとその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成る。バイオフィーム形成はこの二成分情報伝達系が関与していることが知られているため【73】、本研究では二成分情報伝達系に着目しポリアミンの効果を検討した。

炭素源を感知する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 の発現量の変化をポリアミンの有無で比較したところ、対数増殖期 ( $A_{540} = 0.2$ ) では2倍、定常期 (培養 48 時間) では3倍とポリアミンによる発現促進が見られた (Fig. 14A)。この時、mRNA 量を比較するとポリアミンによる発現量に差は見られなかった (Fig. 14B)。これらの結果より、UvrY はポリアミンにより翻訳レベルで合成促進されることが示唆された。また、 $Cu^{2+}$ の有無による発現量に差は見られなかった。

ポリアミンによる UvrY 合成促進機構を解明するため、*uvrY-lacZ* 融合遺伝子のプラスミドを作製し、 $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) の活性を持たない MA261 $\Delta$ *lacZ::Em* に形質転換し、ポリアミンによる UvrY- $\beta$ -Gal 合成促進効果を検討した。UvrY の開始コドンは、AUG ではなく、UUG であり、非効率的であると考えられる。そこで、この特徴がポリアミンによる UvrY の合成促進に寄与しているか検討するため、*uvrY* のプロモーター領域を含み、wild type 及び開始コドン UUG を AUG に変えた変異体を用い、UvrY- $\beta$ -Gal の発現量をポリアミンの有無で検討した (Fig. 14C)。Western blotting により、UvrY- $\beta$ -Gal の発現量を比較したところ、wild type ではポリアミンにより3.3倍と強く促進されたが、開始コドンを AUG に変えたものはポリアミンによる促進効果が1.2倍に減少した (Fig. 14D)。また、ポリアミン非存在下における UvrY- $\beta$ -Gal の発現量が著しく増加した (Fig. 14D)。 $Cu^{2+}$ 存在下においても同様な結果が得られた。これらの結果から、*uvrY* を定常期における新規ポリアミンモジュロンとして同定した。

大腸菌では銅イオンを感知する二成分情報伝達系として CpxA/CpxR が知られており、バイオフィーム形成に関わることが知られている【72, 73】。そこで、レスポンスレギュレーターである CpxR のポリアミンによる発現量の変化を比較した。その結果、

定常期において  $\text{Cu}^{2+}$  非存在下ではポリアミンによる発現量に差は見られなかったが、 $\text{Cu}^{2+}$  存在下において 2.5 倍の発現促進が見られた (Fig. 15A)。また、ポリアミンによる *cpxR* mRNA 量に差は見られなかった (Fig. 15B)。ポリアミンによる CpxR の合成促進機構を解明するため、*cpxR-lacZ* 融合遺伝子を作製しポリアミンによる CpxR- $\beta$ -Gal の発現量の変化を検討した。*cpxR* mRNA の SD 配列は、開始コドンより 10 塩基上流に位置しており、通常より SD 配列より離れている。そこで、この特徴がポリアミンによる CpxR の合成促進に寄与しているか検討するため、wild type 及び SD 配列を通常的位置に変えた変異体を用い、ポリアミンの促進効果の変化を検討した (Fig. 15C)。CpxR- $\beta$ -Gal 融合蛋白質の合成を Western blotting により比較したところ、wild type の CpxR- $\beta$ -Gal の発現は  $\text{Cu}^{2+}$  存在下のみポリアミンにより 2.5 倍促進されたが、 $\text{Cu}^{2+}$  非存在下では 1.3 倍であった (Fig. 15D)。一方、SD 配列を通常的位置に変えた場合、 $\text{Cu}^{2+}$  存在下、ポリアミン非存在下で 4.1 倍と CpxR- $\beta$ -Gal の蛋白質合成が増加した。しかし、ポリアミンによる蛋白質合成促進効果は、2.5 倍から 1.1 倍に減少した (Fig. 15D)。これらの結果から、*cpxR* は  $\text{Cu}^{2+}$  存在下における新規ポリアミンモジュロンであることが示された。

翻訳に関与する RMF がポリアミンモジュロン蛋白質であったことから【32】、翻訳の終了段階でリボソームを mRNA から解離させ、リボソームを次の翻訳ヘリサイクルさせる ribosome recycling factor (RRF) のポリアミンによる発現量の変化を検討した。RRF の発現量の変化をポリアミンの有無で比較したところ、 $\text{Cu}^{2+}$  の存在にかかわらず、定常期において 3 倍とポリアミンによる発現促進が見られた (Fig. 16A)。この時、mRNA 量を比較するとポリアミンによる発現量に差は見られなかった (Fig. 16B)。これらの結果より、RRF はポリアミンにより翻訳レベルで合成促進されることが示された。

ポリアミンによる RRF 合成促進機構を解明するため、*frr-lacZ* 融合遺伝子のプラスミドを作製し、MA261 $\Delta$ *lacZ::Em* に形質転換し、ポリアミンによる RRF- $\beta$ -Gal 合成促進効果を検討した。RRF の開始コドンは、AUG ではなく、GUG であり、非効率的であると考えられる。そこで、この特徴がポリアミンによる RRF の合成促進に寄与しているか検討するため、*frr* のプロモーター領域を含み、wild type 及び開始コドン GUG を AUG に変えた変異体を用い、RRF- $\beta$ -Gal の発現量をポリアミンの有無で検討した

(Fig. 16C)。Western blotting により、RRF- $\beta$ -Gal の発現量を比較したところ、wild type ではポリアミンにより 3.3 倍と強く促進されたが、開始コドンを変えたものはポリアミンによる促進効果が 1.1 倍に減少した (Fig. 16D)。また、ポリアミン非存在下における RRF- $\beta$ -Gal の発現量が著しく増加した (Fig. 16D)。Cu<sup>2+</sup>存在下においても同様な結果であった。これらの結果から、*frr* を定常期における新たにポリアミンモジュロンとして同定した。

### 3. UvrY、CpxR、RRF、SpoT、RpoZ 及び RMF 過剰発現によるバイオフィルム及び細胞生存率に対する効果

UvrY、CpxR 及び RRF がバイオフィルム形成に関与しているか検討するため、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た (Figs. 14-16)。それらを MA261 に形質転換し蛋白質を過剰発現させ、ポリアミン非存在下における 48 時間後のバイオフィルム形成能を測定した。その結果、Cu<sup>2+</sup>の存在の有無にかかわらず、RRF 過剰発現株ではバイオフィルム形成に変化が見られなかったが、UvrY 及び CpxR 過剰発現株ではバイオフィルム形成能が上昇した (Fig. 17A)。

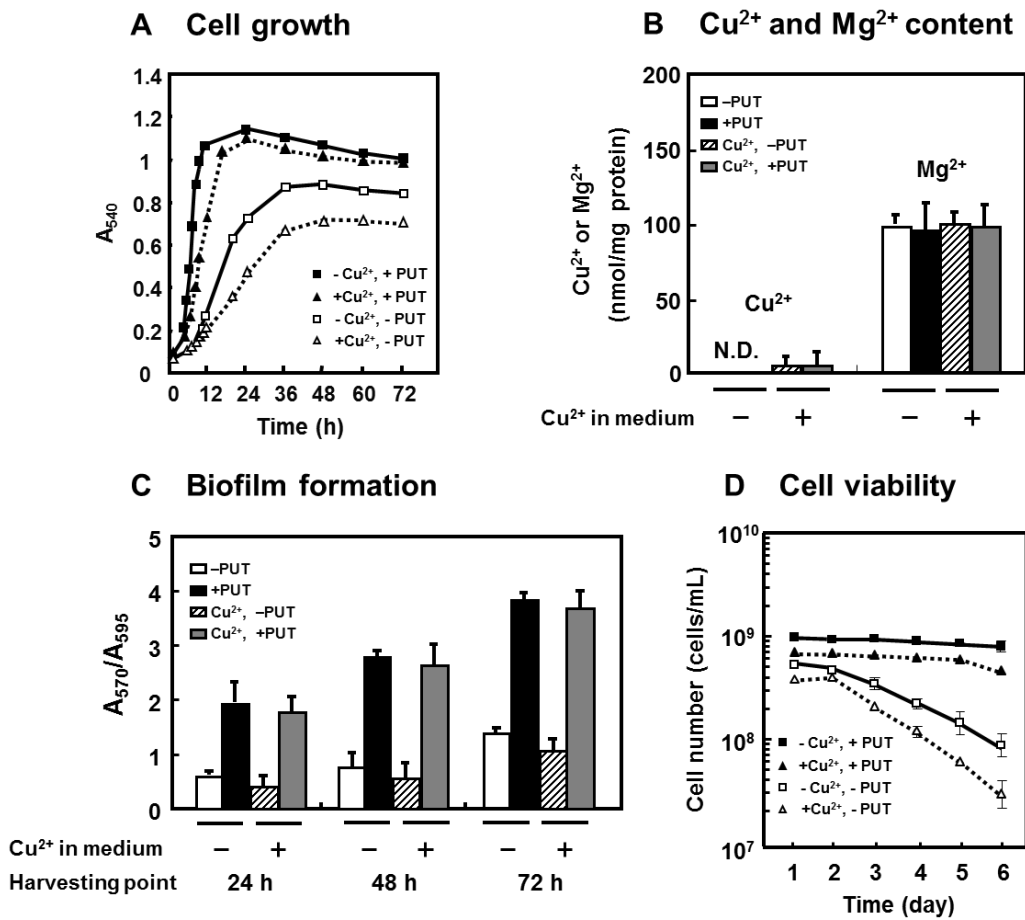
SpoT、RpoZ 及び RMF は細胞生存率に寄与することを報告したが、バイオフィルム形成においては検討していない【32, 第 1 章】。そこで、上述と同様にポリアミンに依存せず、これらを過剰発現させた株でバイオフィルム形成能を検討した。その結果、RRF と同様に RMF 過剰発現株ではバイオフィルム形成に変化は見られなかったが、SpoT と RpoZ を共発現させた株ではバイオフィルム形成能が著しく上昇した (Fig. 17A)。

また、UvrY、CpxR 及び RRF が細胞生存率に関わるかどうか同様の株を用いて検討した。UvrY 及び CpxR は Cu<sup>2+</sup>の有無にかかわらず、バイオフィルムの増加と同等の (2 ~ 4 倍) 生存率の上昇が認められた (Fig. 17B)。一方、RRF では 6 ~ 8 倍生存率が上昇した (Fig. 17B)。これらの結果から、UvrY、CpxR、SpoT 及び RpoZ はバイオフィルム形成に寄与すること、RRF 及び RMF はバイオフィルム形成ではなく、細胞生存率に寄与していることが明らかとなった。



#### 4. Cu<sup>2+</sup>存在下における *cpxR* mRNA 翻訳開始領域の構造変化

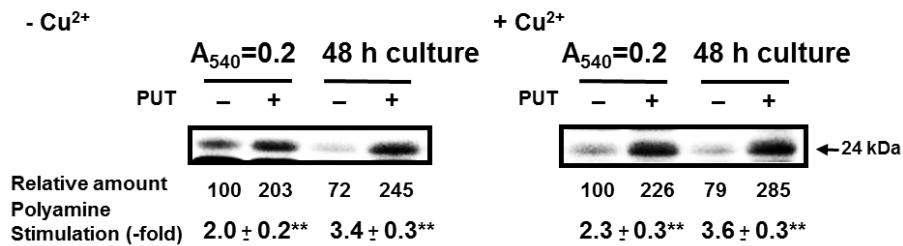
SPD は、PUT の約 1/12 の濃度で RNA の機能に影響を与えることができ、RNA 構造変化において重要であると考えられている【2】。ポリアミンによる CpxR の合成促進は、Cu<sup>2+</sup>存在下のみにおいて見られたため、円偏光二色性 (CD) を用いて、*cpxR* mRNA の bulged-out 構造に及ぼすポリアミン、Mg<sup>2+</sup>及び Cu<sup>2+</sup>の影響を調べた。CpxR WT RNA は *cpxR* mRNA の上流-16 ~ +14 塩基 CpxR SD RNA は RMF WT mRNA の SD 配列を上流-8 塩基にしたものである (Fig. 18A, C)。CD における波長 208 nm の negative band の変化は、二本鎖 RNA における A form の安定化を示している【32, 74】。そこで、SPD、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>の濃度変化における mRNA の構造変化を 208 nm の negative band の相対強度を測定することで、比較した。*cpxR* mRNA は、これらのカチオンによって *cpxR*(SD) mRNA より明らかな構造変化を示した (Fig. 18B, D)。0.1 mM Cu<sup>2+</sup>及び 1 mM Mg<sup>2+</sup>存在下における SPD による構造変化が最も顕著で、Mg<sup>2+</sup>が存在しない時においても同様な構造変化が確認された。この時の *K<sub>d</sub>* 値は、0.5 mM であった。この結果より、CpxR WT RNA の 5 塩基からなる bulged-out 構造の安定化に Mg<sup>2+</sup>ではなく、SPD と Cu<sup>2+</sup>の両方が必要であることを示唆された。また、この結果は SPD が RNA の bulged-out 構造の構造変化を引き起こすことを支持している【32, 51】。



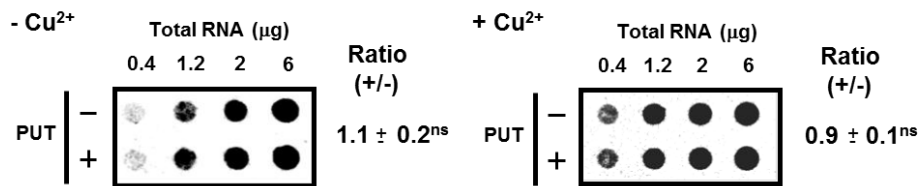
**Fig. 13** 細胞増殖、バイオフィーム形成能及び細胞生存率に対するポリアミンの効果

大腸菌ポリアミン要求株 MA261 を用いて、Cu<sup>2+</sup>の有無における細胞増殖 (A)、細胞内 Cu<sup>2+</sup>及び Mg<sup>2+</sup>量 (B)、バイオフィーム形成能 (C)、細胞生存率 (D) に対するポリアミンの効果と比較した。値は mean ± S.E. (n = 3) で表す。N.D.は not detected を表す。

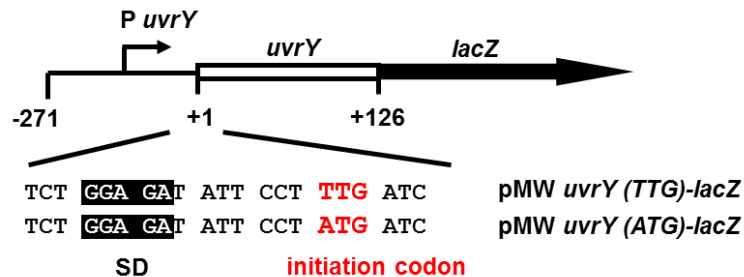
### A Western blotting of UvrY



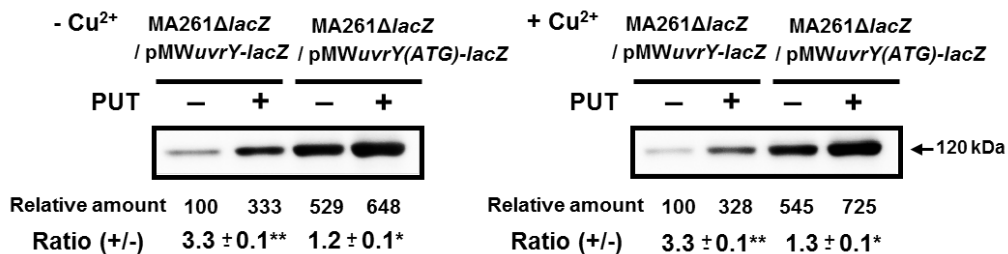
### B Dot blotting of *uvrY* mRNA



### C Structure of *uvrY-lacZ* fusion gene



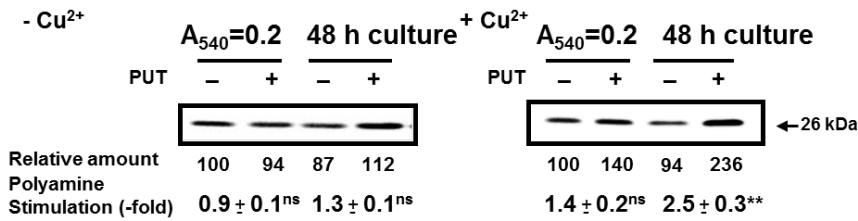
### D Western blotting of UvrY-β-Gal



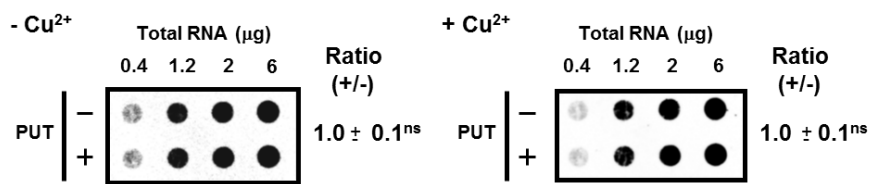
**Fig. 14** ポリアミンによる UvrY 蛋白質の翻訳レベルにおける合成促進

MA261 を用いてポリアミン添加の有無、Cu<sup>2+</sup>添加の有無による UvrY 蛋白質 (A) 及び mRNA (B) 発現量を比較した。C. wild type 及び変異 *uvrY-lacZ* 遺伝子の構造を示した。wild type 及び変異させたプラスミドを MA261Δ*lacZ*::*Em* に形質転換し、Western blotting 法により UvrY-β-Gal 発現量の変化を比較した (D)。値は mean ± S.E. (n = 3) で表す。ns は  $p \geq 0.05$ 、\*は  $p < 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$  を表す。

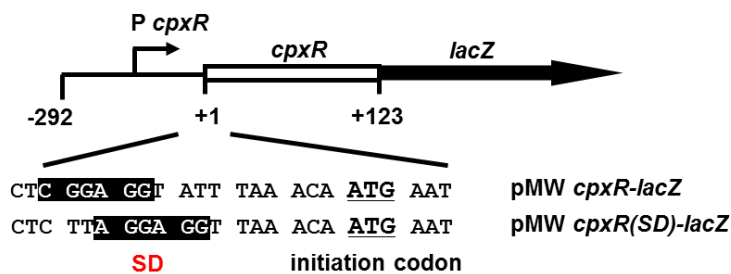
### A Western blotting of CpxR



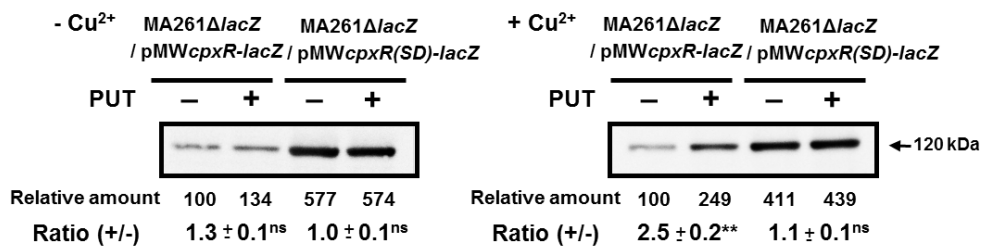
### B Dot blotting of *cpxR* mRNA



### C Structure of *cpxR-lacZ* fusion genes



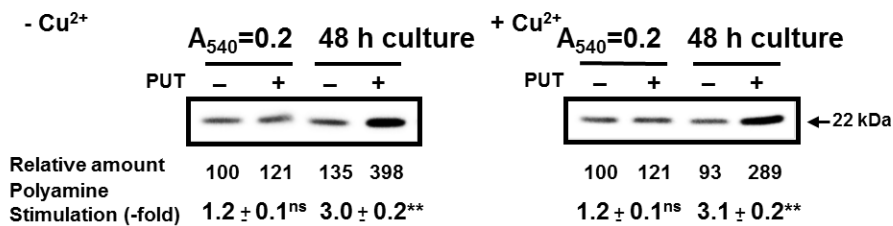
### D Western blotting of CpxR-β-Gal



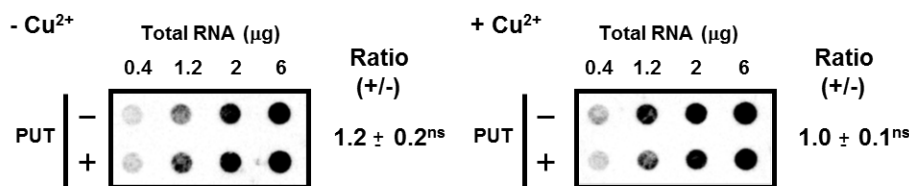
**Fig. 15** ポリアミンによる CpxR 蛋白質の翻訳レベルにおける合成促進

MA261 を用いてポリアミン添加の有無、Cu<sup>2+</sup>添加の有無による CpxR 蛋白質 (A) 及び mRNA (B) 発現量を比較した。C. wild type 及び変異 *cpxR-lacZ* 遺伝子の構造を示した。wild type 及び変異させたプラスミドを MA261Δ*lacZ*::*Em* に形質転換し、Western blotting 法により CpxR-β-Gal 発現量の変化を比較した (D)。値は mean ± S.E. (n = 3) で表す。ns は  $p \geq 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$  を表す。

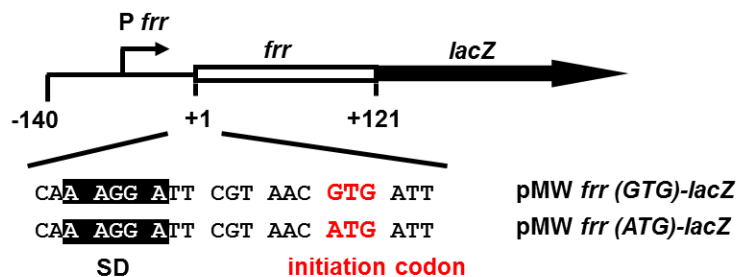
### A Western blotting of RRF



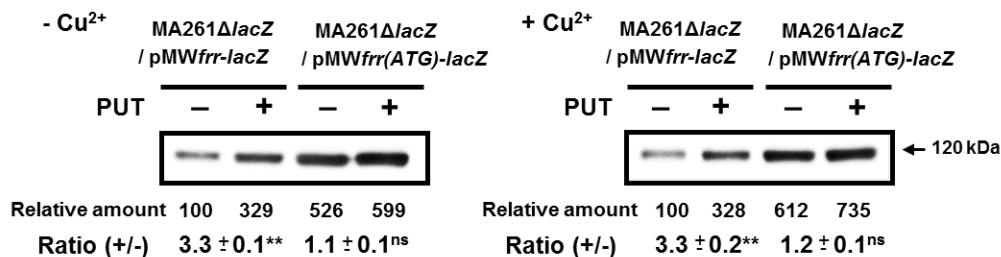
### B Dot blotting of *frr* mRNA



### C Structure of *frr-lacZ* fusion genes



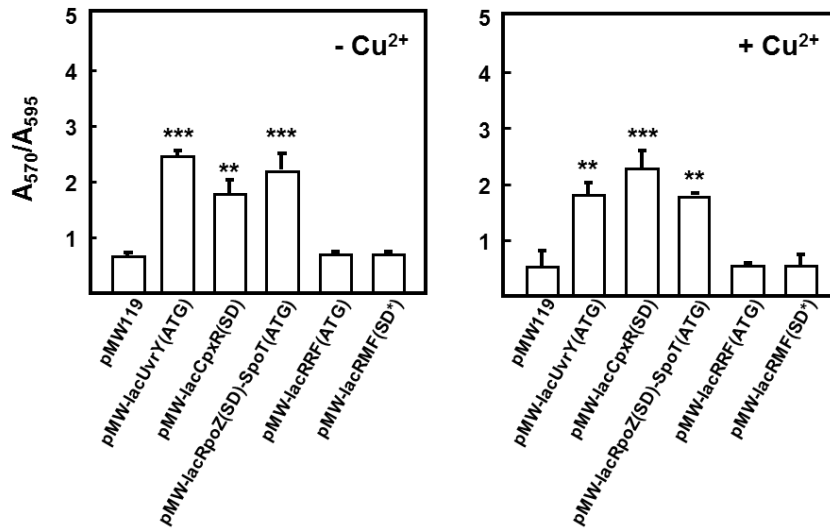
### D Western blotting of RRF-β-Gal



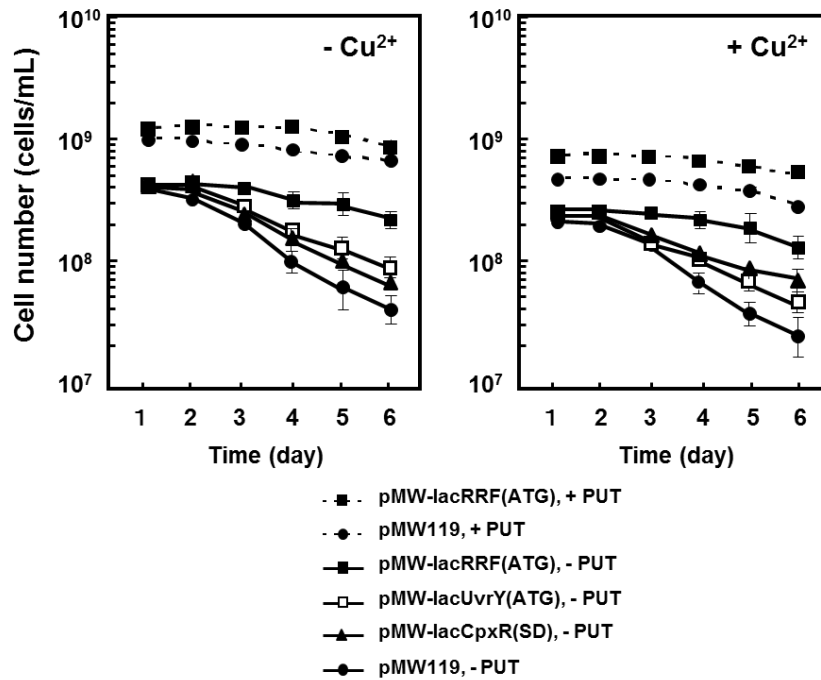
**Fig. 16** ポリアミンによる RRF 蛋白質の翻訳レベルにおける合成促進

MA261 を用いてポリアミン添加の有無、Cu<sup>2+</sup>添加の有無による RRF 蛋白質 (A) 及び mRNA (B) 発現量を比較した。C. wild type 及び変異 *frr-lacZ* 遺伝子の構造を示した。wild type 及び変異させたプラスミドを MA261Δ*lacZ*::*Em* に形質転換し、Western blotting 法により RRF-β-Gal 発現量の変化を比較した (D)。値は mean ± S.E. (n = 3) で表す。ns は  $p \geq 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$  を表す。

### A Biofilm formation

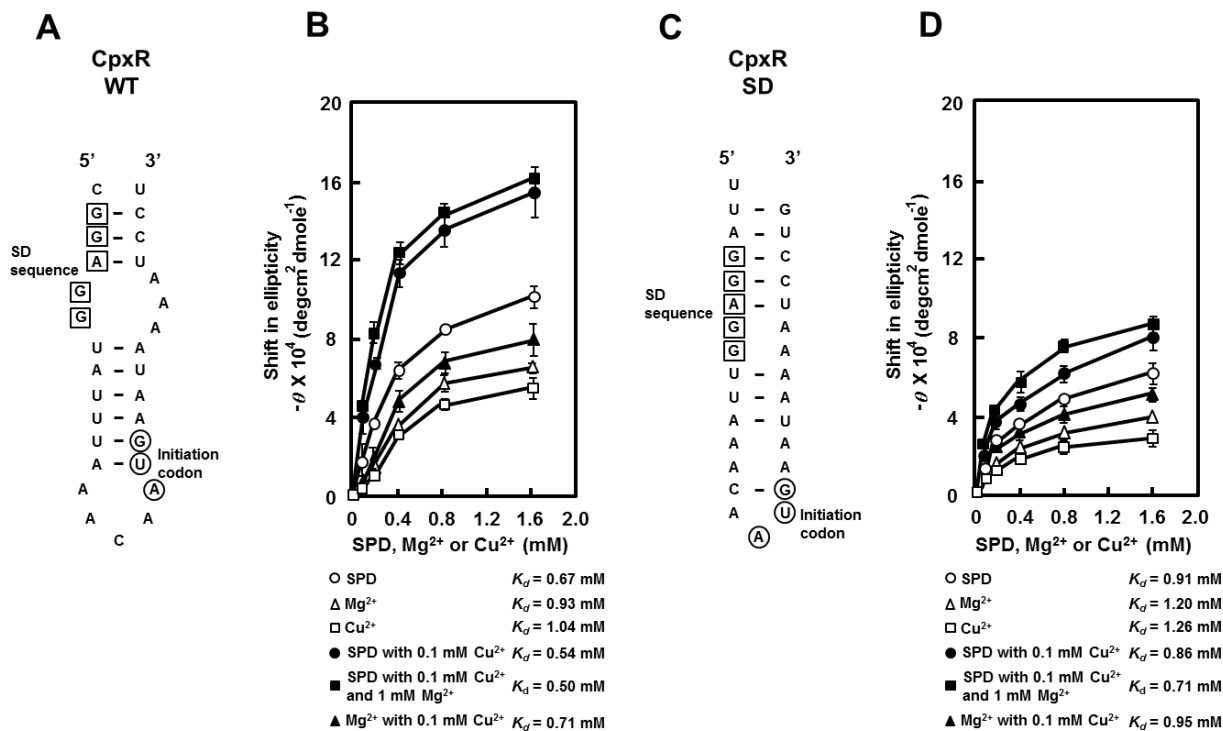


### B Cell viability



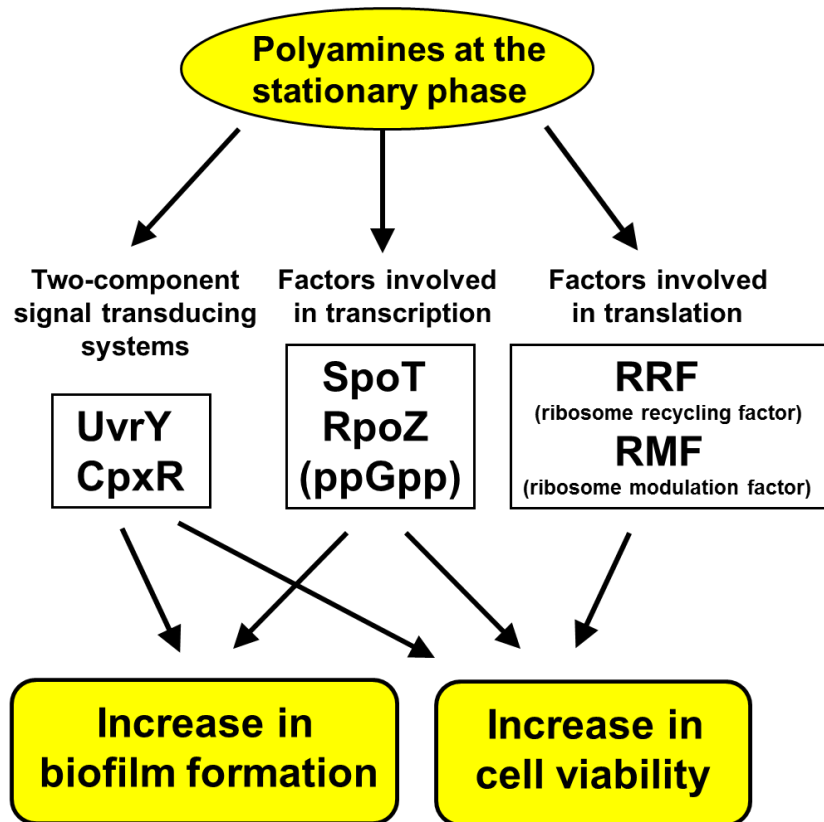
**Fig. 17** ポリアミンモジュロン蛋白質によるバイオフィーム形成能及び細胞生存率の上昇

定常期において見出したポリアミンモジュロン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及び細胞生存率への寄与を調べた。値は mean ± S.E. (n = 3) で表す。\*\*は  $p < 0.01$ 、\*\*\*は  $p < 0.001$  を表す。



**Fig. 18** 円偏光二色性 (CD) を用いた銅存在下における *cpxR* mRNA の構造変化の解析

CpxR WT RNA 及び CpxR SD RNA の予測 2 次構造を示した (A, C)。Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>及び SPD による 208 nm における RNA の構造変化を比較した (B, D)。値は mean ± S.E. (n = 3) で表す。



**Fig. 19** 定常期におけるポリアミンの役割

ポリアミンは転写 (RpoZ、SpoT) や翻訳 (RMF、RRF) に関与する因子、二成分情報伝達系レスポンスレギュレーター (UvrY、CpxR) を翻訳レベルで合成促進することで、細胞生存率やバイオフィーム形成に寄与している。



## 【考察】

ポリアミンは細胞増殖や生存率に関わる蛋白質を翻訳レベルで合成促進することで、細胞増殖を促進し、生存率を上昇させる【22, 23, 32, 第1章】。微生物は環境変化に応じて、バイオフィルムを形成し、生存率を著しく上昇させている。本研究では、ポリアミンの細胞生存率に対する役割をさらに解明するため、バイオフィルム形成に関わるポリアミンモジュロンの同定とその生理的意義の解明を行った。

バイオフィルム形成には、二成分情報伝達系というセンサーシステムの関与が知られている【73】。また、銅イオンがバイオフィルム形成を抑制するという報告があるため、本研究でも銅イオン存在下においても検討した。バイオフィルム形成に関与することが知られている二成分情報伝達系構成蛋白質である UvrY 及び CpxR がポリアミンにより、翻訳レベルで合成促進することが明らかとなった。UvrY は炭素源の変化を感知するセンサーキナーゼにより、リン酸化され下流の遺伝子を制御するレスポンスレギュレーターである【71】。また、CpxR は銅イオンを感知するセンサーキナーゼによりリン酸化されるレスポンスレギュレーターである【72】。さらに、リボソーム再生因子である RRF もポリアミンにより翻訳レベルで促進されることが明らかとなり、*uvrY*、*cpxR* 及び *frr* を新たに定常期におけるポリアミンモジュロンと同定した。

定常期において同定した 6 種のポリアミンモジュロンは細胞生存率やバイオフィルム形成に関与する。この 6 種を 3 つのグループに分類した (Fig. 19)。1 つ目のグループの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 は、バイオフィルム形成に関与することが報告されている【75, 76】。また、これらはポリアミンモジュロンの 1 つである RpoS ( $\sigma^{38}$ ) の発現及び機能に関与している【26, 78】。2 つ目は、ppGpp 合成調節酵素 SpoT と ppGpp の機能に関与する RNA ポリメラーゼ  $\omega$  サブユニットである RpoZ のグループに分けられる【54】。これらは、バイオフィルム形成及び細胞生存率維持に関与する【第1章】。3 つ目は、RRF【78, 79】及び RMF【32, 80】のグループである。これらは、蛋白質合成に関与し、細胞生存率維持に非常に重要であるが、バイオフィルム形成には関与しないことが示唆された。したがって、ポリアミンは、様々な面で機能するいくつかの蛋白質の合成を促進し、細胞生存率を上昇させて

いると考えられる。

大腸菌以外の微生物のバイオフィーム形成にポリアミンが必須であることは、*Bacillus subtilis* 【81, 82】、*Vibrio cholerae* 【67】や *Yersinia pestis* 【83】で報告されており、*Pseudomonas aeruginosa* 【84】や *Vibrio cholerae* 【85】でポリアミンによりバイオフィーム形成が促進されることが報告されている。*Vibrio cholerae* におけるバイオフィーム形成において、ノルスペルミジンや大腸菌のスペルミジン結合蛋白質 PotD のホモログである NspS が膜蛋白質 c-di-GMP phosphodiesterase (MbaA) の活性を介して、バイオフィーム形成に寄与している 【85, 86】。このように、多くの微生物のバイオフィーム形成に関与していることが明らかとなっているため、大腸菌においてもバイオフィーム形成にポリアミンの関与が支持される。

細胞生存率を上昇させる際には、普遍的に発現している RNA や蛋白質の合成は抑制される。ppGpp により RNA 合成が抑制され、RMF によって蛋白質の合成が抑制される 【48, 54, 80】。一方で、生存率を維持するために必要ないくつかの重要な蛋白質は合成し続けなければならない。RpoZ は、 $\sigma^{70}$  以外の  $\sigma$  因子の転写に寄与する ppGpp の機能に関わり 【49, 第 1 章】、RRF は mRNA からのリボソームの解離に関与している 【78, 79】ことから、細胞内で行われている RNA 合成や蛋白質合成制御のような多重の機能は、RpoZ や RRF が部分的に制御している可能性が考えられる。

本研究では、重金属の毒性として  $\text{Cu}^{2+}$  を培地中に加え、ポリアミンの効果を検討したが、 $\text{Cu}^{2+}$  存在下においてもポリアミンにより細胞増殖、バイオフィーム形成及び細胞生存率の上昇が見られた。このことは、 $\text{Cu}^{2+}$  存在下におけるポリアミンの CpxR 合成促進がこれらの促進効果の一部分を担うことを示している。*cpxR* mRNA の開始コドン付近の bulged-out 構造は、ポリアミンだけでなく、ポリアミンと  $\text{Cu}^{2+}$  が存在するときに大きく構造変化を起こし、安定化することが認められたことから、CpxR 合成に関わっていると考えられる (Fig. 18)。

## 【参考文献】

1. Tabor CW., and Tabor H. 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine. *Annu. Rev. Biochem.* 1976;**45**:285-306.
2. Ogasawara T., Ito K., and Igarashi K. Effect of polyamines on globin synthesis in a rabbit reticulocyte polyamine-free protein synthetic system. *J. Biochem.* 1989;**105**:164-167.
3. Tabor CW., and Tabor H. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 1984;**53**:749-790.
4. Tabor CW., and Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 1985;**49**:81-99.
5. Fukuchi J., Kashiwagi K., Takio K., and Igarashi K. Properties and structure of spermidine acetyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1994;**269**:22581-22585.
6. Watanabe S., Kusama-Eguchi K., Kobayashi H., and Igarashi K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J. Biol. Chem.* 1991;**266**:20803-20809.
7. Miyamoto S., Kashiwagi K., Ito K., Watanabe S., and Igarashi K. Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993;**300**:63-68.
8. Feuerstein BG., Pattabiraman N., and Marton LJ. Spermine-DNA interactions: a theoretical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1986;**83**:5948-5952.
9. Yuki M., Grukhin V., Lee CS., and Haworth IS. Spermidine binding to GC-rich DNA: experimental and theoretical studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996;**25**:39-46.
10. Cohen SS. A Guide to the Polyamines (Oxford University Press, Oxford, 1998).
11. Herbst EJ., and Snell EE. Putrescine and related compounds as growth factors for *Hemophilus parainfluenzae* 7991. *J. Biol. Chem.* 1949;**181**:47-54.
12. Russell DH., Levy CC., Schimpff SC., and Hawk IA. Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Res.* 1971;**31**:1555-1558.
13. Maas WK. Mapping of genes involved in the synthesis of spermidine in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 1972;**119**:1-9.
14. Cohn MS., Tabor CW., and Tabor H. Regulatory mutations affecting ornithine

- decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 1980;**142**:791-799.
15. Steglich C., and Scheffler IE. An ornithine decarboxylase-deficient mutant of Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 1982;**257**:4603-4609.
  16. Nishimura K., Nakatsu F., Kashiwagi K., Ohno H., Saito T., and Igarashi K. Essential role of *S*-adenosylmethionine decarboxylase in mouse embryonic development. *Genes Cells.* 2002;**7**:41-47.
  17. Igarashi K., Kashiwagi K., Kishida K., Watanabe Y., Kogo A. and Hirose S. Defect in the split proteins of 30-S ribosomal subunits and under-methylation of 16-S ribosomal RNA in a polyamine-requiring mutant of *Escherichia coli* grown in the absence of polyamines. *Eur. J. Biochem.* 1979;**93**:345-353.
  18. Atkins JF., Lewis JB., Anderson CW., and Gesteland RF. Enhanced differential synthesis of proteins in a mammalian cell-free system by addition of polyamines. *J. Biol. Chem.* 1975;**250**:5688-5695.
  19. Ito K., Kashiwagi K., Watanabe S., Kameji T., Hayashi S., and Igarashi K. Influence of the 5'-untranslated region of ornithine decarboxylase mRNA and spermidine on ornithine decarboxylase synthesis. *J. Biol. Chem.* 1990;**265**:13036-13041.
  20. Kashiwagi K., Yamaguchi Y., Sakai Y., Kobayashi H., and Igarashi K. Identification of the polyamine-induced protein as a periplasmic oligopeptide binding protein. *J. Biol. Chem.* 1990;**265**:8387-8391.
  21. Echandi G., and Algranati ID. Defective 30S ribosomal particles in a polyamine auxotroph of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975;**67**:1185-1191.
  22. Igarashi K., and Kashiwagi K. Polyamine modulon in *Escherichia coli* : genes involved in the stimulation of cell growth by polyamine. *J. Biochem.* 2006;**139**:11-16.
  23. Igarashi, K., and Kashiwagi, K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010;**42**:39-51.
  24. Igarashi K., Saisho T., Yuguchi M., and Kashiwagi K. Molecular mechanism of polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein. *J. Biol. Chem.* 1997;**272**:4058-4064.
  25. Yoshida M., Kashiwagi K., Kawai G., Ishihama A., and Igarashi K. Polyamine

- enhancement of the synthesis of adenylate cyclase at the translational level and the consequential stimulation of the synthesis of the RNA polymerase  $\sigma^{28}$  subunit. *J. Biol. Chem.* 2001;**276**:16289-16295.
26. Yoshida M., Kashiwagi K., Kawai G., Ishihama A., and Igarashi K. Polyamines enhance synthesis of the RNA polymerase  $\sigma^{38}$  subunit by suppression of an amber termination codon in the open reading frame. *J. Biol. Chem.* 2002;**277**:37139-37146.
  27. Higashi K., Kashiwagi K., Taniguchi S., Terui Y., Yamamoto K., Ishihama A., and Igarashi K. Enhancement of +1 frameshift by polyamines during translation of polypeptide release factor 2 in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2006;**281**:9527-9537.
  28. Terui Y., Higashi K., Taniguchi S., Shigemasa A., Nishimura K., Yamamoto K., Kashiwagi K., Ishihama A., and Igarashi K. Enhancement of the synthesis of RpoN, Cra, and H-NS by polyamines at the level of translation in *Escherichia coli* cultured with glucose and glutamate. *J. Bacteriol.* 2007;**189**:2359-2368.
  29. 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.* 2004;**279**:46008-46013
  30. Terui Y., Higashi K., Tabei Y., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K., and Kashiwagi K. Enhancement of the synthesis of RpoE and StpA by polyamines at the level of translation in *Escherichia coli* under heat shock conditions. *J. Bacteriol.* 2009;**191**:5348-5357.
  31. Yoshida M., Meksuriyen D., Kashiwagi K., Kawai G., and Igarashi K. Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein. Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon AUG in OppA mRNA. *J. Biol. Chem.* 1999;**274**:22723-22728
  32. Terui Y., Tabei Y., Akiyama M., Higashi K., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K., and Kashiwagi K. Ribosome modulation factor, an important protein for cell viability encoded by the polyamine modulon. *J. Biol. Chem.* 2010;**285**:28698-28707.
  33. Cunningham-Rundles S., and Maas WK. Isolation, characterization, and mapping of *Escherichia coli* mutants blocked in the synthesis of ornithine decarboxylase. *J. Bacteriol.*

- 1975;**124**:791–799.
34. Kashiwagi K., Watanabe R., and Igarashi K. Involvement of ribonuclease III in the enhancement of expression of the *speF-potE* operon encoding inducible ornithine decarboxylase and polyamine transport protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994;**200**:591-597.
  35. Hafner EW., Tabor CW., and Tabor H. Mutants of *Escherichia coli* that do not contain 1,4-diaminobutane (putrescine) or spermidine. *J. Biol. Chem.* 1979;**254**:12419-12426.
  36. Xiao H., Kalman M., Ikehara K., Zemel S., Glaser G., and Cashel M. Residual guanosine 3', 5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem.* 1991;**266**:5980-5990.
  37. Wilson K., Ausubel FM., Brent R., and Kingston RE. Current Protocols in Molecular Biology, 1987;pp. 2.4.1-2.4.2, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY
  38. Maniatis T., Fritsch EF., and Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory manual, 1982;pp. 440-442, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  39. Ho SN., Hunt HD., Horton RM., Pullen JK., and Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* 1989;**77**:51-59.
  40. Shapira SK., Chou J., Richaud FV., and Casadaban MJ. New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of beta-galactosidase. *Gene.* 1983;**25**:71-82.
  41. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;**72**:248-254.
  42. Nielsen PJ., Manchester KL., Towbin H., Gordon J., and Thomas G. The phosphorylation of ribosomal protein S6 in rat tissues following cycloheximide injection, in diabetes, and after denervation of diaphragm. A simple immunological determination of the extent of S6 phosphorylation on protein blots. *J. Biol. Chem.* 1982;**257**:12316-12321.
  43. Igarashi K., Kashiwagi K., Hamasaki H., Miura A., Kakegawa T., Hirose S., and Matsuzaki S. Formation of a compensatory polyamine by *Escherichia coli* polyamine-requiring mutants during growth in the absence of polyamines. *J. Bacteriol.* 1986;**166**:128-134.

44. Apirakaramwong A., Kashiwagi K., Raj VS., Sakata K., Kakinuma Y., Ishihama A., and Igarashi K. Involvement of ppGpp, ribosome modulation factor, and stationary phase-specific sigma factor  $\sigma^S$  in the decrease in cell viability caused by spermidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;**264**:643-647.
45. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003;**31**:3406-3415.
46. Turner DH., Sugimoto N., and Freier SM. RNA structure prediction. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 1988;**17**:167-192.
47. Izutsu K., Wada A., and Wada C. Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. *Genes Cells.* 2001;**6**:665-676
48. Potrykus K., and Cashel M. (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Microbiol.* 2008;**62**:35-51.
49. Vrentas CE., Gaal T., Ross W., Ebright RH., and Gourse RL. Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the  $\omega$  subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev.* 2005;**19**:2378-2387.
50. Sarubbi E., Rudd KE., Xiao H., Ikehara K., Kalman M., and Cashel M. Characterization of the *spoT* gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1989;**264**:15074-15082.
51. Higashi K., Terui Y., Inomata E., Katagiri D., Nomura Y., Someya T., Nishimura K., Kashiwagi K., Kawai G. and Igarashi K. Selective structural change of bulged-out region of double-stranded RNA containing bulged nucleotides by spermidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;**370**:572-577.
52. Higashi K., Terui Y., Suganami A., Tamura Y., Nishimura K., Kashiwagi K., and Igarashi K. Selective structural change by spermidine in the bulged-out region of double-stranded RNA and its effect on RNA function. *J. Biol. Chem.* 2008;**283**:32989-32994.
53. Yamagishi M., Matsushima H., Wada A., Sakagami M., Fujita N., and Ishihama A. Regulation of the *Escherichia coli* *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control. *EMBO J.* 1993;**12**:625-630.
54. Wu J., and Xie J. Magic spot: (p) ppGpp. *J. Cell. Physiol.* 2009;**220**:297-302.
55. Costanzo A., Nicoloff H., Barchinger SE., Banta AB., Gourse RL., and Ades SE. ppGpp and DksA likely regulate the activity of the extracytoplasmic stress factor  $\sigma^E$  in *Escherichia*

- coli* by both direct and indirect mechanisms. *Mol. Microbiol.* 2008;**67**:619-632.
56. Johansson J., Balsalobre C., Wang SY., Urbonaviciene J., Jin DJ., Sonden B., and Uhlin BE. Nucleoid proteins stimulate stringently controlled bacterial promoters: a link between the cAMP-CRP and the (p)ppGpp regulons in *Escherichia coli*. *Cell.* 2000;**102**:475-485.
57. Aberg A., Fernandez-Vazquez J., Cabrer-Panes JD., Sanchez A., and Balsalobre C. Similar and divergent effects of ppGpp and DksA deficiencies on transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2009;**191**:3226-3236.
58. Hommais F., Krin E., Laurent-Winter C., Soutourina O., Malpertuy A., Le Caer JP., Danchin A., and Bertin P. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol. Microbiol.* 2001;**40**:20-36.
59. Ishihama A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000;**54**:499-518.
60. Nonaka G., Blankschien M., Herman C., Gross CA., and Rhodius VA. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor,  $\sigma^{32}$ , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev.* 2006;**20**:1776-1789.
61. Shimada T., Yamamoto K., and Ishihama A. Novel members of the Cra regulon involved in carbon metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2011;**193**:649-659.
62. Zhao K., Liu M., and Burgess RR. Promoter and regulon analysis of nitrogen assimilation factor,  $\sigma^{54}$ , reveal alternative strategy for *E. coli* MG1655 flagellar biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* 2010;**38**:1273-1283.
63. Zheng D., Constantinidou C., Hobman JL., and Minchin SD. Identification of the CRP regulon using *in vitro* and *in vivo* transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res.* 2004;**32**:5874-5893.
64. Gentry DR., Hernandez VJ., Nguyen LH., Jensen DB., and Cashel M. Synthesis of the stationary-phase sigma factor  $\sigma^S$  is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* 1993;**175**:7982-7989.
65. Igarashi K., Mitsui K., Kubota M., Shirakuma M., Ohnishi R., and Hirose S. Effect of polyamines on synthesis and degradation of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate.



- Biochim. Biophys. Acta.* 1983;**755**:326-331.
66. Battesti A., and Bouveret E. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.* 2006;**62**:1048-1063.
  67. Lee J., Sperandio V., Frantz DE., Longgood J., Camilli A., Phillips MA., and Michael AJ. An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* 2009;**284**:9899-9907.
  68. Harrison JJ., Turner RJ., Joo DA., Stan MA., Chan CS., Allan ND., Vrionis HA., Olson ME., and Ceri H. Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;**52**:2870-2881.
  69. Baker J., Sitthisak S., Sengupta M., Johnson M., Jayaswal RK., and Morrissey JA. Copper stress induces a global stress response in *Staphylococcus aureus* and represses *sae* and *agr* expression and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010;**76**:150-160.
  70. Bakker EP., and Mangerich WE. Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J. Bacteriol.* 1981;**147**:820-826.
  71. Suzuki K., Wang X., Weilbacher T., Pernestig AK., Melefors O., Georgellis D., Babitzke P., and Romeo T. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2002;**184**:5130-5140.
  72. Yamamoto K., and Ishihama A. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol. Microbiol.* 2005;**56**:215-227.
  73. Beloin C., Roux A., and Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2008;**322**:249-289.
  74. Nakano S., Kanzaki T., and Sugimoto N. Influences of ribonucleotide on a duplex conformation and its thermal stability: study with the chimeric RNA-DNA strands. *J. Am. Chem. Soc.* 2004;**126**:1088-1095.
  75. Mondragon V., Franco B., Jonas K., Suzuki K., Romeo T., Melefors O., and Georgellis D. pH-dependent activation of the BarA-UvrY two-component system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2006;**188**:8303-8306.

76. Ogasawara H., Yamada K., Kori A., Yamamoto K., and Ishihama A. Regulation of the *Escherichia coli* *csgD* promoter: interplay between five transcription factors. *Microbiology*. 2010;**156**:2470-2483.
77. Hengge R. The two-component network and the general stress sigma factor RpoS ( $\sigma^S$ ) in *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008;**631**:40-53.
78. Hirokawa G., Nijman RM., Raj VS., Kaji H., Igarashi K., and Kaji A. The role of ribosome recycling factor in dissociation of 70S ribosomes into subunits. *RNA*. 2005;**11**:1317-1328.
79. Hirokawa G., Iwakura N., Kaji A., and Kaji H. The role of GTP in transient splitting of 70S ribosomes by RRF (ribosome recycling factor) and EF-G (elongation factor G). *Nucleic Acids Res.* 2008;**36**:6676-6687.
80. Wada A., Igarashi K., Yoshimura S., Aimoto S., and Ishihama A. Ribosome modulation factor: stationary growth phase-specific inhibitor of ribosome functions from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995;**214**:410-417.
81. Burrell M., Hanfrey CC., Murray EJ., Stanley-Wall NR., and Michael AJ. Evolution and multiplicity of arginine decarboxylases in polyamine biosynthesis and essential role in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *J. Biol. Chem.* 2010;**285**:39224-39238.
82. Kolodkin-Gal I., Cao S., Chai L., Böttcher T., Kolter R., Clardy J., and Losick R. A self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide. *Cell*. 2012;**149**:684-692.
83. Patel CN., Wortham BW., Lines JL., Fetherston JD., Perry RD., and Oliveira MA. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *J. Bacteriol.* 2006;**188**:2355-2363.
84. Williams BJ., Du RH., Calcutt MW., Abdolrasulnia R., Christman BW., and Blackwell TS. Discovery of an operon that participates in agmatine metabolism and regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 2010;**76**:104-119.
85. Karatan E., Duncan TR., and Watnick PI. NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine. *J. Bacteriol.* 2005;**187**:7434-7443.
86. Sugiyama S., Vassilyev DG., Matsushima M., Kashiwagi K., Igarashi K., and Morikawa K.

Crystal structure of PotD, the primary receptor of the polyamine transport system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1996;**271**:9519-9525.

## 【総括】

本研究では、定常期におけるポリアミンの役割を解明するため、細胞生存やバイオフィーム形成に関わるポリアミンモジュロンの同定とその生理機能の解明を行った。

第1章では、大腸菌などの微生物が様々な環境変化に適応して生存率を上昇させる際に、シグナル伝達を行うセカンドメッセンジャーである ppGpp に着目し、定常期における新規ポリアミンモジュロンとして *spoT* 及び *rpoZ* を同定した。ポリアミン非存在下において、これらを過剰発現させた株では著しい生存率の上昇が見られた。これらの過剰発現株において、細胞内 ppGpp 含量を測定したところ、ポリアミン非存在下で、*SpoT* を過剰発現させた株の ppGpp 含量の上昇が認められた。したがって、ポリアミンは *SpoT* 及び *RpoZ* を合成促進し、ppGpp の形成や機能促進により細胞生存率を上昇させることが明らかとなった。

第2章では、ポリアミンとバイオフィーム形成との関係を調べた。ポリアミンは二成分情報伝達系レスポンスレギュレーターである *UvrY* 及び *CpxR* を翻訳レベルで合成促進し、バイオフィーム形成を促進していることが明らかとなった。また、リボソーム再生因子 *RRF* もポリアミンモジュロン蛋白質であり、ポリアミンは *RRF* を合成促進することで、細胞生存率を上昇させることが明らかとなった。

これまでの研究に加え、本研究により大腸菌においてポリアミンモジュロンが 17 種同定された。そのうち、11 種類は対数増殖期において見出され、多くが転写因子をコードしていた。特に、プロモーター領域を認識する  $\sigma$  因子  $\sigma^{70}$  以外の  $\sigma$  因子がポリアミンモジュロンもしくはポリアミンモジュロンによって転写が促進される  $\sigma$  因子であり、遺伝子の発現に非常に深く関わっている。そのため、約 300 種類の mRNA や rRNA 及びいくつかの tRNA の合成がポリアミンにより促進をうけ、細胞増殖が促進されることが明らかとなった。残りの 6 種は、定常期において見出したポリアミンモジュロンであり、ポリアミンは転写や翻訳に関する因子、二成分情報伝達系構成蛋白質を合成促進することで、細胞生存率維持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。したがって本研究により、定常期におけるポリアミンの役割が明らかとなり、細胞生存率維持というポリアミンの新たな生理機能が明らかとなった。

## 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました柏木敬子教授に心より感謝致します。博士課程より、直接の御指導を戴きました照井祐介講師に深く感謝致します。そして、修士課程で御指導戴き、数々の御助言を戴きました富取秀行准教授に深謝致します。

数々の御指導を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 五十嵐一衛名誉教授に深く感謝致します。本研究の遂行に御協力下さいました法政大学石浜明教授、山本兼由准教授に感謝致します。

日々の実験でお世話になりました病態生化学研究室の皆様に感謝致します。研究室配属当初より、多くの実験を教えて戴きました中村瑞穂博士に深く感謝致します。また、笠原拓馬氏と山本拓氏にも心より感謝致します。

最後に、私を支えてくれた両親や家族、大切な友人に深く感謝致します。誠に有難うございました。

## 【主論文目録】

本学位論文は下記の発表論文による。

1. Terui Y., Akiyama M., Sakamoto A., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K., and Kashiwagi K. Increase in cell viability by polyamines through stimulation of the synthesis of ppGpp regulatory protein and  $\omega$  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 AJ., Igarashi K., and 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.

## 【審査委員】

本学位論文の審査は千葉科学大学で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉科学大学教授	柏木 敬子
副査	千葉科学大学教授	増澤 俊幸
副査	千葉科学大学教授	榊淵 泰宏
副査	千葉科学大学講師	福井 貴史