

ストレス下におけるポリアミンの生理的役割 Physiological role of polyamine under stress conditions

薬学専攻 吉田 健人
Taketo Yoshida

【目的】

ポリアミンは生物に普遍的に存在する塩基性生理活性物質であり、多くの生物で種々のポリアミンが存在し、これまでに 20 種以上のポリアミンが同定されている。一般的に大腸菌などの原核生物ではプトレッシン及びスペルミジンが、真核生物にはスペルミジン及びスペルミンが多く含まれているが、原核生物の中にはスペルミジンではなく、ノルスペルミジンやホモスペルミジンなどのスペルミジン構造類似体を有するものも存在する (Fig. 1)。さらに、好熱菌など特殊な環境に生育する微生物には、長鎖型や分岐鎖型といった特殊ポリアミンが含まれている。

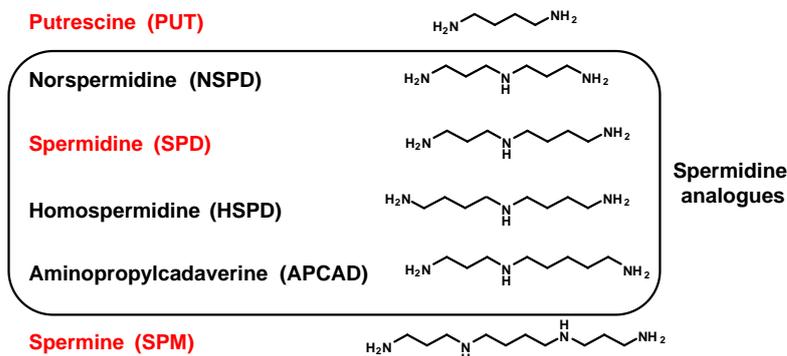


Fig. 1 ポリアミンの構造式

ポリアミンは細胞内において mM オーダーで存在し、主に核酸、特に RNA に結合し、その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する。このように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、大腸菌において 17 種同定されている。これらポリアミンモジュロンの mRNA は翻訳効率の悪い構造を有しており、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、ポリアミンが RNA の特定構造 (二本鎖を形成しない bulged-out 構造) に結合して構造変化を引き起こすことにより、翻訳レベルでの発現上昇をおこすことが明らかになっている。

ポリアミンモジュロンの多くは転写因子をコードしているため、約 300 種の mRNA などの合成が促進され、細胞増殖及び生存率の維持に寄与している (Fig. 2)。このことから、ポリアミンは、蛋白質合成を翻訳レベルで促進することで飢餓ストレス、熱ストレス及び銅ストレスなどの種々の外的ストレスからの抵抗性を向上させ、対数増殖期及び定常期において大きな役割を果たすことが示唆されている。従って、本研究ではストレス下におけるポリアミンの生理的役割を明らかにするため、1) 酸化ストレス下での大腸菌におけるポリアミンの生理機能の解析、及び 2) スペルミジン構造類似体による高温適応機構の解明を行った。

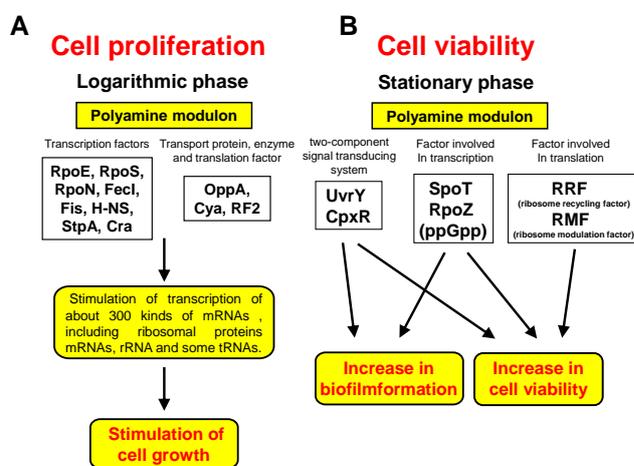


Fig. 2 大腸菌におけるポリアミンモジュロンの役割

【方法及び結果】

1. 酸化ストレス下での大腸菌におけるポリアミンの生理機能解析

酸化ストレスは、好気呼吸における副産物である活性酸素種により生じ、DNA や蛋白質、リン脂質などの細胞構成成分に損傷を与え、細胞や個体の老化に大きく影響を与える主要な要因であると考えられている。本研究では酸化ストレス下におけるポリアミンの役割を明らかにするため、酸化ストレス誘発剤である亜テール酸カリウム (K_2TeO_3) を用いて、大腸菌ポリアミン要求株 MA261 をポリアミンの有無で培養した。

初めに、 K_2TeO_3 存在下、MA261 における細胞増殖速度、細胞生存率及び酸化ストレスの除去に重要なグルタチオン量の変化をポリアミンの有無で比較した。その結果、ポリアミンを添加したことで、酸化ストレスにより減少した細胞増殖速度 (Fig. 3A) 及び細胞生存率 (Fig. 3B) が著しく回復し、細胞内グルタチオン量はポリアミンにより約 2 倍の上昇することが明らかとなった (Fig. 3C)。さらに、酸化損傷のバイオマーカーであるカルボニル化蛋白質についても調べたところ、 K_2TeO_3 添加により上昇したカルボニル化蛋白質がポリアミンにより有意に減少した (Fig. 3D)。これらのことから、ポリアミンは大腸菌において酸化ストレスを軽減させること、また、抵抗性の向上にはグルタチオン量の変化が関与していることが示唆された。

次に、酸化ストレスの除去に関与している蛋白質の発現量の変化をポリアミンの有無で調べた。その結果、スーパーオキシドアニオンを特異的に感知する転写因子である SoxR、グルタチオンの構成因子であるシステインの排出に関与する輸送系の負の転写因子である EmrR 及びグルタチオン合成酵素である GshA が、ポリアミンにより合成促進を受けることを見出した。また、mRNA 量に差は見られなかったことから、SoxR、EmrR 及び GshA 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。また、これら蛋白質のポリアミンによる発現促進機構を明らかにするため、それぞれの mRNA の構造を調べた。soxR 及び emrR mRNA は SD 配列と開始コドンが通常より離れており、gshA mRNA は開始コドンが UUG と、いずれの mRNA においても、これまでに同定されているポリアミンモジュロン mRNA と同様の特徴を有しており、この構造がポリアミンによる翻訳レベルでの発現促進に寄与していることが明らかとなった。これらのことから、SoxR、EmrR 及び GshA がポリアミンにより翻訳レベルで発現促進されることを明らかにし、これらを新規ポリアミンモジュロンとして同定した。

次に、SoxR、EmrR 及び GshA と酸化ストレスの関係性を明らかにするため、SoxR、EmrR 及び GshA 過剰発現株を作製し、 K_2TeO_3 存在下、ポリアミン非存在下において、細胞増殖速度及び生存率を調べた。その結果、いずれの過剰発現株においても酸化ストレスによって低下した細胞増殖速度及び細胞生存率が回復することを見出した。そこで、これら新規ポリアミンモジュロン蛋白質の酸化ストレス除去機構を調べたところ、SoxR は産生されたスーパーオキシドアニオンを感知し、下流の転写因子である soxS mRNA の発現を促進することで、多種の酸化ストレス防御に関与する遺伝子、特にスーパーオキシドジスムターゼ (SodA) の発現を制御し、酸化ストレスを除去することを明らかにした。さらに、EmrR は過剰発現株において細胞内グルタチオン量が増加していたことから、グルタチオンの構成因子であるシステインの排出系の発現を抑制することで間接的にグルタチオン合成を促進しており、GshA は

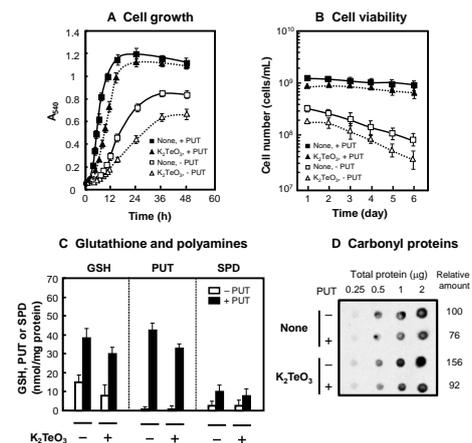


Fig. 3 大腸菌ポリアミン要求株MA261における細胞増殖、生存率及びグルタチオン量の変化

グルタチオン合成を直接行うことで、細胞内グルタチオン量を上昇させ、主に過酸化水素の除去に大きな役割を果たしていることが示唆された。また、これまでに同定されているポリアミンモジュロンの中でも RpoS は多くの遺伝子の転写を制御しており、多種のストレス除去に関与している。このことから、RpoS の下流に存在するカタラーゼの遺伝子である *katE* 及び *katG* mRNA の発現量を調べたところ、どちらの mRNA においてもポリアミンにより大きく発現促進されることが明らかとなった。

以上のことからポリアミンは SoxR、EmrR、GshA 及び RpoS の発現を翻訳レベルで促進することで、酸化ストレスの除去に大きく寄与していることを明らかにし、ポリアミンによる酸化ストレス除去機構の一端が示された (Fig. 4)。

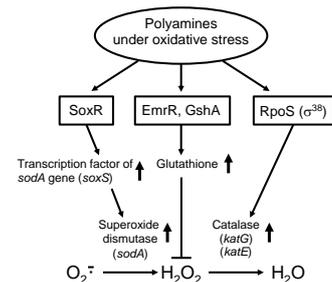


Fig. 4 酸化ストレス下における SoxR、EmrR、GshA 及び RpoS の役割

2. スペルミジン構造類似体による高温適応機構の解明

スペルミジン構造類似体はこれまでに、スペルミジンを母体とし、炭素鎖が 1 つ短いノルスペルミジン、1 つ長いホモスペルミジン及び腐敗アミンであるカダベリンにアミノプロピル基が付いたアミノプロピルカダベリンの 4 種が同定されている (Fig. 1)。これらスペルミジン構造類似体はそれぞれ自然界に存在すると共に、*Vibrio alginolyticus* や *Acinetobacter tartarogenes* など原核生物の細胞内に存在しており、その中でも高温下で生育する高度好熱菌はアミノプロピルカダベリン以外の 3 種のスペルミジン構造類似体を細胞内に有することが知られている。しかし、これらスペルミジン構造類似体の生理的意義並びにその機能差異についてはあまり研究されていない。そこで、MA261 を用いて、32°C、37°C 及び 42°C においてスペルミジン構造類似体を添加した際の細胞増殖速度の変化を比較した。その結果、32°C 及び 37°C においてはスペルミジン構造類似体を添加したことで細胞増殖速度は大きく上昇したが、スペルミジン構造類似体間において大きな差は見られなかった。しかし、42°C においてホモスペルミジン添加により細胞増殖速度が大きく増加することを見出した (Fig. 5A)。このことから、本研究では熱ストレス下においてスペルミジン構造類似体が果たす生理的意義の解明及びその機能差異の解析を行った。

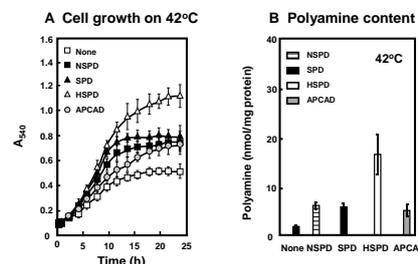


Fig. 5 42°C におけるスペルミジン構造類似体添加時の細胞増殖速度及び細胞内ポリアミン量の変化

初めにスペルミジン構造類似体を添加した際の細胞内ポリアミン量の変化を比較した。上記すべての温度において、細胞内のホモスペルミジン含量は他のスペルミジン構造類似体より多く、特に 42°C においてはスペルミジンの約 2.5 倍と多量に取り込まれることが明らかとなった (Fig. 5B)。この結果から、スペルミジン構造類似体の中でもホモスペルミジンは細胞内に多く取り込まれることで、熱ストレス下において細胞増殖に寄与していることが示唆された。

次に、ホモスペルミジンの取り込み促進機構を明らかにするため、スペルミジン構造類似体の細胞内への輸送機構を調べた。これまでに大腸菌におけるポリアミン輸送系として、スペルミジン優先取り込み系である PotABCD が同定されている。そのため、基質結合蛋白質である PotD を欠損させ、スペルミジン取り込み能を大きく減少させた菌株 MA261 *potD::km* を用いて、スペルミジン構造類似体を添加した際の変化を検討した。その結果、PotD を欠損させたことで、どのスペルミジン構造類似体においても細胞内への取り込みが著しく減少した。このことから、スペルミジン構造類似体は PotD と結合し、PotABCD を介して細胞内に取り込まれることが明らかとなった。次に、PotD とスペルミジン構造類似体との基質特異性について検討し

たところ、42°Cにおいてノルスペルミジンとの K_d 値が 3.7 μM 、スペルミジンが 5.4 μM 、ホモスペルミジンが 13.0 μM 及びアミノプロピルカダベリンが 8.0 μM と予想に反し、PotD との親和性はホモスペルミジンが最も弱く、PotD と結合しにくいことが明らかとなった。これまでに PotABCD はスペルミジンが細胞内に多量に存在する場合、PotD-スペルミジン複合体による負のフィードバック機構により発現が転写レベルで抑制されることが知られている。そこで、スペルミジン構造類似体を添加した際の PotABCD の発現量の変化を比較した。その結果、ホモスペルミジン以外のスペルミジン構造類似体を添加した際には無添加時と比較し、*potABCD* mRNA の発現量が著しく減少したが、ホモスペルミジン添加時には mRNA 量に有意な差が見られなかった。また、PotD 蛋白質の発現量の変化も比較したところ、mRNA と同様の結果が得られた。このことから、ホモスペルミジンは負のフィードバックによる取り込み抑制が起こりにくく、これにより他のスペルミジン構造類似体と比べ、持続的に細胞内に取り込まれることが明らかとなった。

最後に、ホモスペルミジンによる熱ストレスへの耐性獲得機構の解明を行った。これまでの研究でポリアミンは、熱ストレス除去に関与するポリアミンモジュロン蛋白質の発現量を促進することで熱ストレスへの抵抗性を向上させることが知られている。そのため、熱ストレス下に重要な RpoE 及び StpA 蛋白質の発現量の変化を Western blotting により、並びにこれら mRNA の構造変化を円二色性 (CD) により比較した。その結果、42°C においてホモスペルミジンは他のスペルミジン構造類似体と比較し、mRNA の構造をより効果的に変化させることで、RpoE 及び StpA などのいくつかの蛋白質発現量を翻訳レベルで促進することが明らかとなった。

以上の結果から、スペルミジン構造類似体の中でもホモスペルミジンは細胞内に持続的に取り込まれることで細胞内に多量に存在すると同時に、より効果的に mRNA の構造を変化させ、ポリアミンモジュロン蛋白質の発現を翻訳レベルで促進することで、高温適応機構を向上させることが明らかとなった。

【結論】

本研究では、新たに酸化ストレスの除去に寄与するポリアミンモジュロンを 3 種同定し、ポリアミンが酸化ストレス除去に重要な様々な蛋白質の発現を翻訳レベル (SoxR、EmrR、GshA 及び RpoS) で上昇させることで、下流の様々な遺伝子 (*katE*、*katG*、*soxS*、*sodA* など) の発現を転写レベルで制御し、酸化ストレスへの抵抗性を向上させることを明らかにした。また、熱ストレス下においてはスペルミジン構造類似体の中でもホモスペルミジンが細胞内に多く取り込まれ、ポリアミンモジュロン mRNA の構造をより効果的に変化させることで、熱ストレス下での細胞増殖を促進させることを見出した。これらの結果から、原核生物はそれぞれの有するポリアミンにより種々の蛋白質の発現を促進することで、環境中のストレス除去に寄与していることが示された。

【文献】

- 1) Sakamoto, A., Terui, Y., Yoshida, T., Yamamoto, T., Suzuki, H., Yamamoto, K., Ishihama, A., Igarashi, K., Kashiwagi, K., “Three members of polyamine modulon under oxidative stress conditions: two transcription factors (SoxR and EmrR) and a glutathione synthetic enzyme (GshA).” *PLoS One*, 2015;10(4):e0124883.
- 2) Yoshida, T., Sakamoto, A., Terui, Y., Takao, K., Sugita, Y., Yamamoto, K., Ishihama, A., Igarashi, K., Kashiwagi, K., “Effect of Spermidine Analogues on Cell Growth of *Escherichia coli* Polyamine Requiring Mutant MA261.” *PLoS One*. 2016;11(7):e0159494.