

平成 29 年度

博 士 論 文

ストレス下におけるポリアミンの生理的役割

千葉科学大学

大学院薬学研究科

薬学専攻

吉田 健人

平成 30 年 3 月

目次

序論	1
第一章 酸化ストレス下におけるポリアミンの生理機能解析	
1-1 目的	8
1-2 材料と方法	10
1-3 結果	15
1-4 考察	26
第二章 スペルミジン構造類似体による高温適応機構の解明	
2-1 目的	28
2-2 材料と方法	31
2-3 結果	33
2-4 考察	43
参考文献	45
結論	51
謝辞	52
主論文目録	53
審査委員	54

序論

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 価のプトレッシン [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 種であり (Fig. 1)、一般的に原核生物は Put と Spd を多く含み、真核細胞は Spd と Spm を多く含んでいる【1】。しかし、原核生物の中には Spd ではなく、炭素鎖の一つ少ないノルスペルミジン [Nspd : $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$] や、逆に炭素鎖の一つ多いホモスペルミジン [Hspd : $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$] などのスペルミジン構造類似体を有するものに加え、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【2, 3】。ポリアミンは、その強い塩基性から生理的条件下においてプラスに荷電した状態で存在しており、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 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、その作用濃度は $\text{Spm} < \text{Spd} < \text{Put}$ 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【4】。

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【5, 6】。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。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、*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。これらの酵素のうち、ODC と SAMDC は少量しか存在しておらず、また、半減期も短いことからポリアミン生合成の律速酵素であると考えられている。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【7】。

これまでに大腸菌のポリアミン輸送系としては 7 つの輸送系が報告されている (Fig. 3)。Spd 優先取り込み系である PotABCD、Put 特異的取り込み系である PotFGHI、Put 排出蛋白質である PotE が存在する【8-11】。PotABCD 及び PotFGHI の複合体は、ATP Binding Cassette (ABC) 輸送系ファミリーに属する輸送体であり、ATP の加水分解をエネルギー源としている。Put 排出系は、

オルニチン/プトレシニンアンチポーター活性を持つ PotE 蛋白質により触媒され、Put を排出すると同時にオルニチンを取り込む。この他にもカダベリン排出蛋白質である CadB、Spd を排出する MdtJI 【12】 や、特殊な環境下で発現し、Put の取り込みをする PuvP 【13】 や PlaP 【14】 など同定され輸送機構について詳細な研究が行われている。

ポリアミンは細胞内において主に RNA と結合して存在しており、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 【15,16】。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。このことから、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ていることが示唆される。また、ポリアミンが核酸と結合する場合、2本鎖で GC 含量が高いほど優先的に結合する性質を有する 【17,18】。そのため、ポリアミンの核酸への相互作用に関して塩基特異性が存在すると考えられる。

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 【1,19】。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 (オリゴリ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 σ^{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 σ^{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 σ^{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 σ^{24} サブユニット)、StpA (heat-shock応答に関わる転写因子) の11種が、定常期においてはRMF (ribosome modulate factor)、SpoT (グアノシン4リン酸合成調節酵素、ppGpp)、RpoZ (RNAポリメラーゼ ω サブユニット)、UvrY (炭素源を感知するレスポンスレギュレーター)、CpxR (銅を感知するレスポンスレギュレーター)、RRF (ribosome recycling factor) の6種が同定されている 【20-29】。これらの遺伝子群は、いずれも細胞増殖若しくは細胞生存率の維持に重要な役割を果たす蛋白質であり、11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 及び0.02% glutamic acidを栄養源とする培地、RpoE、StpAは0.1% glucose及び0.02% glutamic acidの培地において42°Cで培養した場合、CpxRは銅存在下においてそれぞれポリアミンにより発現促進を受けた。

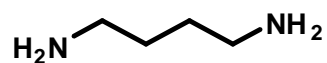
現在までに、ポリアミンモジュロンと同定された遺伝子群のmRNAにはそれぞれ共通する特徴があり、主に3つに大別される。1つ目は、開始コドンと原核細胞の蛋白質合成開始に重要なShine-Dalgarno (SD) 配列が離れている、もしくはSD配列が不明瞭なmRNAである。ポリアミンはこのmRNAに結合することでSD配列と開始コドン付近の構造を変化させ開始複合体形成を促進する。oppA、fecI、fis、rpoN、hns、rpoE、stpA、rmf、rpoZ、cpxR mRNAがこの特徴を有している 【24,26-30】。2つ目は、開始コドンがAUGではなくUUGやGUGのmRNAである。cya、cra、spoT、uvrY、frr mRNAがこの特徴を有している 【21,24】。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【22,23】。また、ポリアミンモジュロンの多くが転写因子であることから、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ところ、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【25】。これらのことは、対数期においてポリアミンが様々な条件下における細胞増殖に強く寄与していることを示唆している (Fig. 4A)。

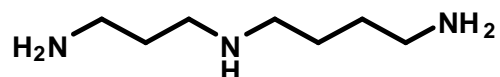
また、近年、当研究室では定常期におけるポリアミンモジュロンを6種同定した【27-29】。これら定常期におけるポリアミンモジュロンは、緊急応答時の転写に関与するセカンドメッセンジャーであるppGppを合成促進すると共に、細菌の集合体であるバイオフィルムの形成を促進することで、細胞生存率の維持及び様々なストレスに対する抵抗性を向上させることが明らかとなっている (Fig. 4B)。このことから、ポリアミンは細胞増殖だけでなく、外的なストレスからの防御にも大きく寄与していることが示唆されている (Fig. 4)。

本研究では、まず第一章において、酸化ストレス下におけるポリアミンの生理的機能を解析した。次に、第二章ではスペルミジン構造類似体の高温適応機構の解明を行った。

Putrescine (Put)



Spermidine (Spd)



Spermine (Spm)

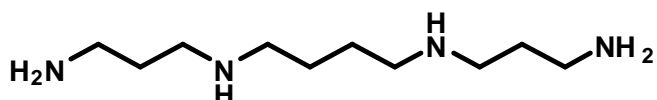


Fig. 1 ポリアミンの構造

基本的なポリアミンの構造式を示す。ポリアミンは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。生体内で見出されるポリアミンは、主に2価のプトレッシン (Putrescine, Put)、3価のスペルミジン (Spermidine, Spd)、4価のスペルミン (Spermine, Spm) の3種であり、一般的に原核生物はPutとSpdを多く含み、真核細胞はSpdとSpmを多く含んでいる【1】。

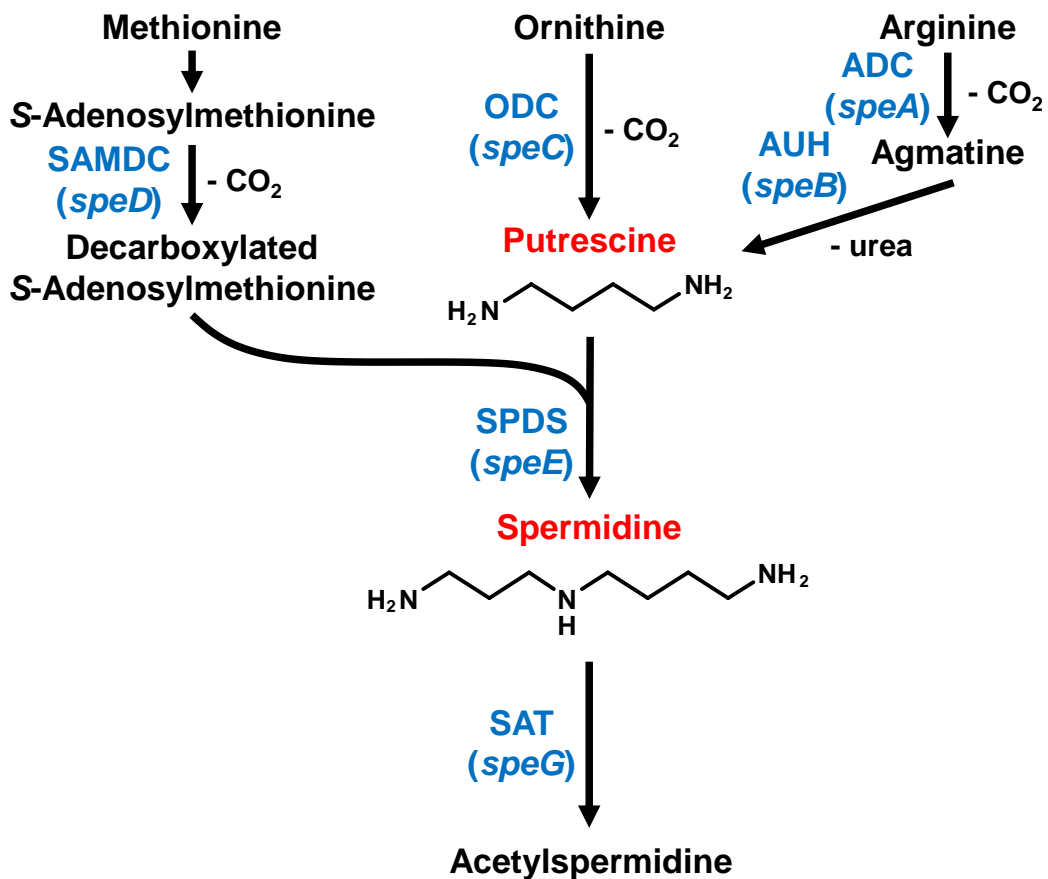


Fig. 2 大腸菌におけるポリアミンの生合成及び分解

ポリアミンは大腸菌において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。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、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。これらの酵素のうち、ODCとSAMDCは少量しか存在しておらず、また、半減期も短いことからポリアミン生合成の律速酵素であると考えられている。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【7】。

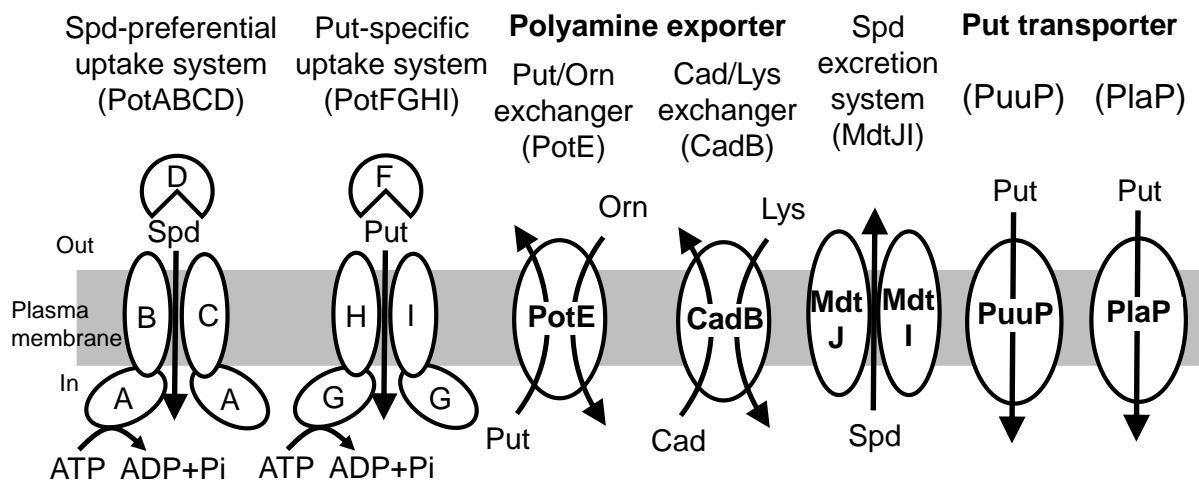


Fig. 3 大腸菌におけるポリアミンの輸送系

これまでに同定されている大腸菌のポリアミン輸送系を示す。Spd優先取り込み系であるPotABCD、Put特異的取り込み系であるPotFGHI、Put排出蛋白質であるPotEが存在する【8-11】。PotABCD及びPotFGHIの複合体は、ATP Binding Cassette (ABC) 輸送系ファミリーに属する輸送体であり、ATPの加水分解をエネルギー源としている。Put排出系は、オルニチン/プロレスシンアンチポーター活性を持つPotE蛋白質により触媒され、Putを排出すると同時にオルニチンを取り込む。この他にもカダベリン排出蛋白質であるCadB、Spdを排出するMdtJI【12】や、特殊な環境下で発現し、Putの取り込みをするPuuP【13】やPlaP【14】などが同定されている。

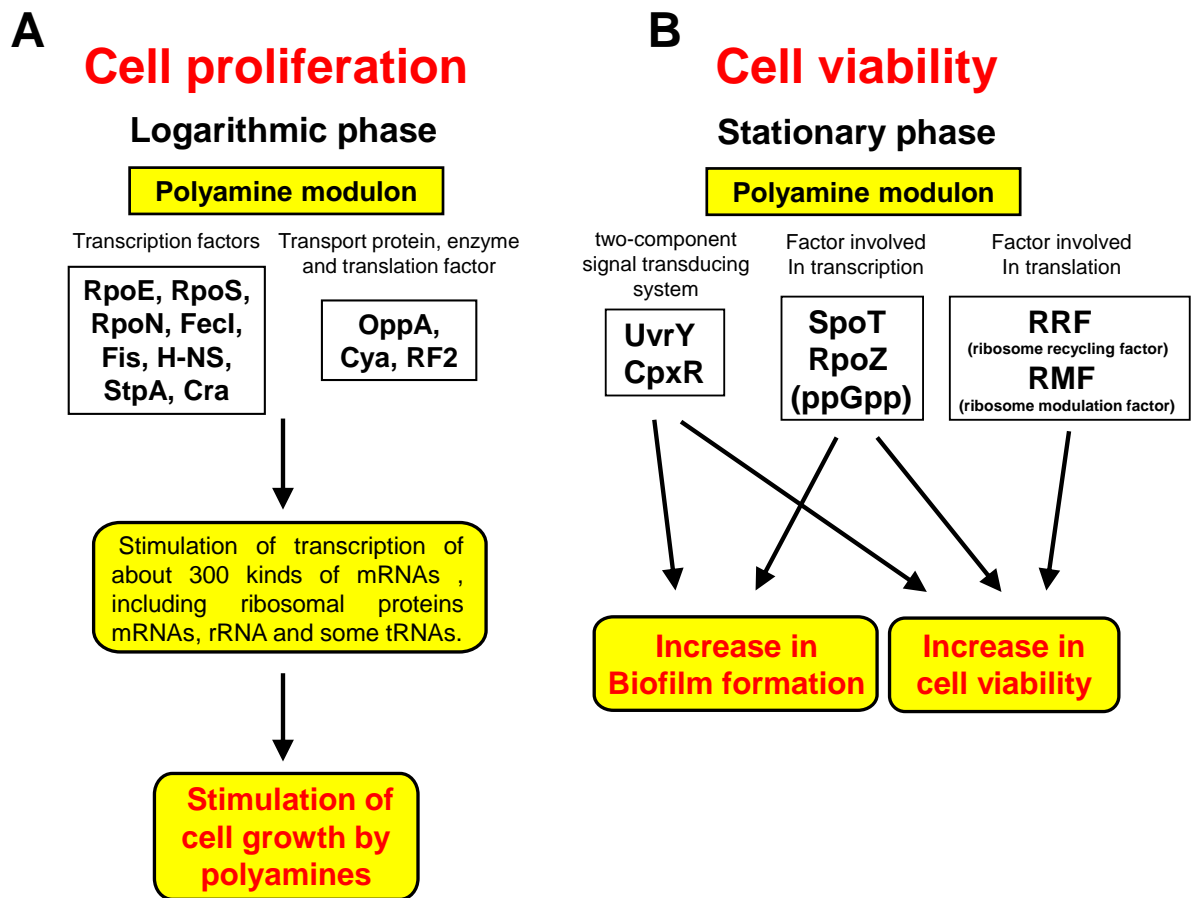


Fig. 4 対数増殖期及び定常期におけるポリアミンモジュールの役割

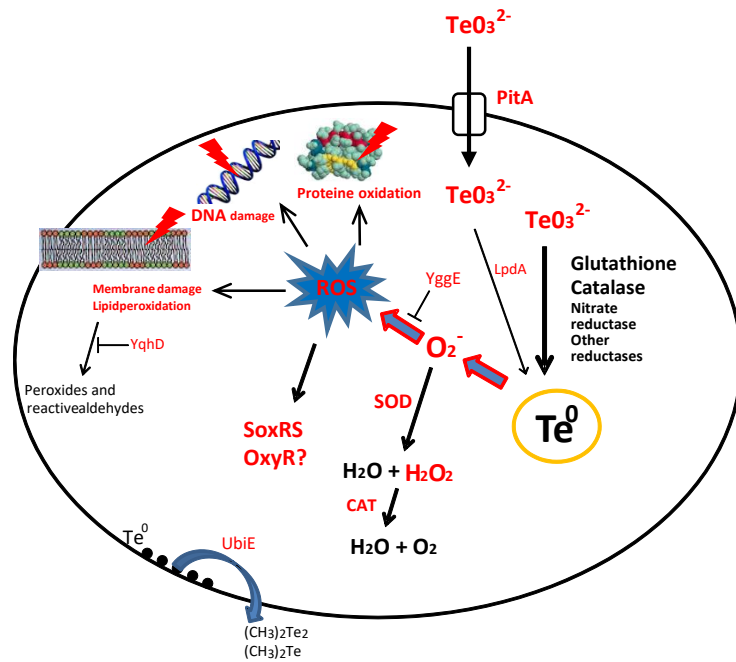
これまでに同定されているポリアミンモジュールの役割をまとめた。(A) 対数増殖期においてはポリアミンにより8種の転写因子及び3種の輸送蛋白質などが発現促進されることで下流の約300種のmRNAやrRNA及びいくつかのtRNAの合成がポリアミンにより促進をうけ、細胞増殖が促進される。(B) 定常期においてポリアミンは、6種の蛋白質の合成を促進することで、バイオフィルムの形成を上昇させると共に、緊急応答時の転写に関与するセカンドメッセンジャーであるグアノシン4リン酸を合成促進することで、細胞生存率及び外的ストレスからの抵抗性を向上させる。

第一章 酸化ストレス下におけるポリアミンの生理機能解析

1-1 目的

酸化ストレスとは内因性、あるいは外因性の要因により生じる活性酸素を、生体が十分に処理することが出来なくなるために生じるものであり、DNA、RNA、蛋白質及び脂質など生体構成成分に多くのダメージを与える。この活性酸素は、酸素分子 (O_2) が部分的に還元された化合物であり、これまでに酸素分子が1電子還元されたスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$)、もう1電子還元され、2つの H^+ が付いた過酸化水素 (H_2O_2) 及びもう1電子還元され、O原子同士が結合できなくなり、開裂したヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) の3種が知られている。これら活性酸素は電子状態が非常に不安定であることから、生体内において反応性が非常に高い。従って、細胞内において活性酸素が過剰に蓄積することで、強い酸化ストレスの伴う細胞障害が引き起こされ、細胞死を誘発する。そのため、ほぼすべての生物種において、これら活性酸素に対する防御機構は重要であり、過剰に蓄積することのないよう、必然的に高力価の除去酵素を有している【31-33】。

当研究室では、これまでにポリアミンが飢餓ストレス【27-29】、熱ストレス【26】及び銅ストレス【29】などの外的ストレスから抵抗性を向上させることで、細胞増殖及び細胞生存率の維持に寄与することを明らかにした。しかしながら、大腸菌の酸化ストレスとポリアミンの関係性についてはあまり研究されておらず、不明な点が多い。そこで、本研究では酸化ストレス誘発剤である亜テルル酸カリウム (K_2TeO_3) (Fig. 5)【34, 35】を用いて、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を行った。



引用文献: Chasteen TG. et al., *FEMS Microbiol Rev.* 2009.

Fig. 5 細胞内における亜テルル酸カリウム (K_2TeO_3) の酸化ストレス発生機構

大腸菌の細胞内における K_2TeO_3 の酸化ストレス発生機序を示す。添加された K_2TeO_3 はまず、リン酸トランスポーターであるPitAにより細胞内へ取り込まれる。取り込まれた K_2TeO_3 はグルタチオンやカタラーゼなどにより還元されることでスーパーオキシドアニオンを産生する【34, 35】。

1-2 材料と方法

1) 大腸菌株及び培養条件

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【36】。MA261 Δ *lacZ::Em*は、千葉大学大学院薬学研究院の五十嵐一衛先生のご厚意により分与していただいた【37】。

MA261、MA261 Δ *lacZ::Em*は、L-Broth (LB) (1 % Trypton、0.5% Yeast Extract、0.5% NaCl) に必要に応じて10 μ g/mL エリスロマイシンを添加し、一晚通気培養した。その菌液をMedium A [22.4 mM glucose (0.4%)、40.2 mM K₂HPO₄、22.1 mM KH₂PO₄、1.7 mM sodium citrate、7.6 mM (NH₄)₂SO₄、0.41 mM MgSO₄、6 μ M thiamine、40 μ 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 μ g/mL) putrescine dihydrochloride及び0.6 μ M (0.15 μ g/mL) 亜テルル酸カリウム (K₂TeO₃) を必要に応じて加え、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。また、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【38】。作製したプラスミドは、Maniatisらの方法【39】に従ってMA261若しくはMA261 Δ *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 1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-*lacSoxR*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*Bam*HI及び*Eco*RIで処理し、pMW119 (Nippon Gene) の同制限酵素サイトに挿入し、pMW-*lacSoxR*を作製した。SD配列と開始コドンの距離を短くしたpMW-*lacSoxR* (SD) は、overlap extension PCR法【40】を用いて作製した。1st PCRは、鋳型としてpMW-*lacSoxR*を用い、プライマーとしてpMW-*lacSoxR* (SD) では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-*lacSoxR*と同様の方法を用いて*Bam*HI、*Eco*RIで処理した断片をpMW119に挿入し、pMW-*lacSoxR* (SD) を作製した。

pMW $soxR-lacZ$ 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【41】の同制限酵素サイトに挿入し、pMC $soxR-lacZ$ を作製した。このプラスミドをSalIで処理後、 $soxR-lacZ$ を含む断片をpMW119の同制限酵素サイトに挿入し、pMW $soxR-lacZ$ を作製した。pMW $soxR(SD) - lacZ$ は、上記と同様にoverlap extention PCR法を用いて作製した。

その他のプラスミドpMW- $lacEmrR$ 、pMW- $lacEmrR(SD)$ 、pMW $emrR-lacZ$ 、pMW $emrR(SD)-lacZ$ 、pMW- $lacGshA$ 、pMW- $lacGshA(SD)$ 、pMW $gshA-lacZ$ 、pMW $gshA(ATG)-lacZ$ に関しても同様の方法を用いて作製した。

3) 大腸菌からの全RNA抽出及びDot blotting法による特定mRNAの検出

大腸菌MA261をPut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。

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の量がそれぞれ0.4、1.2、2、6 μg になるよう調整し、65°C、15分間のインキュベーションにより変性させた。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™ 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™ Gold Hybridization Buffer (GE Healthcare) 0.5 mM NaCl, 5% Blocking reagent) でmembraneを42°Cで1時間振とうした。プローブ (1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) を5 μL 加え、42°Cで16~20時間インキュベーションした。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°C、20分x 2回、2 x SSCで室温、5分x 2回)、ECL™ 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 ImageGauge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P19とP20 ($soxR$)、P21とP22 ($emrR$)、P23とP24 ($gshA$)、P25とP26 ($soxS$)、P27とP28 ($sodA$)、P29とP30 ($katE$)、P31とP32 ($katG$) 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™ Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (GE Healthcare) を用いてラベルした。

4) Western blotting法による特定蛋白質の検出

抗SoxR、EmrR、GshA、RpoS及びRpoD抗体は、千葉大学大学院薬学研究院の五十嵐一衛先生、法政大学生命科学部の石浜明先生及び京都工芸繊維大学の鈴木秀之先生のご厚意により

分与していただいた。抗 β -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 $A_{540}=0.3$ 、24時間、36時間まで培養し、8000回転、10分、4°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°Cで30分処理した。Sonicator (microson™ ultrasonic cell disruptore) により細胞壁を破碎し、15000回転、10分、4°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【42】により測定した。特定蛋白質の検出は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) 後、25Vの定電圧でImmobilon Transfer Membrane (Merck Millipore) に転写した。その後、Nielsenらの方法に従い、Amersham™ ECL Western Blotting Analysis System (GE Healthcare) を用いてFUJIFILM LAS 3000により検出を行った【43】。

5) DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazine) 法【44】によるカルボニル化蛋白質の検出

Immobilon Transfer Membrane (Merck Millipore) を100% MeOHで1分間浸漬し、精製水で5分振とう後乾燥させ、上記3) で得られたcell lysateを希釈したサンプル5 μ Lをそれぞれ0.25、0.5、1、2 μ gになるよう調整し、等間隔に滴下、乾燥させた。乾燥させたmembraneは100% MeOHに1分間浸漬後、20% MeOH-80% TBS (10mM Tris-HCl, pH7.4, 0.15 M NaCl)、2 M HClでそれぞれ5分振とうした。10 mMの1 x DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazine) 溶液を調整し、正確に5分振とうしてDNPH誘導体化をした。その後順に2 M HClで5分 x 3回、100% MeOHで5分 x 7回、TBSで5分洗浄し、5% スキムミルクを含むTBS-T [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.15 M NaCl、0.05% Tween 20] 中で60分振とうしてブロッキングした。ウサギ抗DNP (2,4-Dinitrophenol) 抗体を5%スキムミルクを含むTBS-Tで2000倍希釈し、一次抗体として60分間振とうした。TBS-Tで5分 x 3回洗浄し、二次抗体はHRP (Horseradish peroxidase) 標識の抗ウサギ抗体 (GE Healthcare) を10000倍希釈し、60分間振とうした。検出は、Amersham™ ECL Western Blotting Analysis System (GE Healthcare) を用いてFUJIFILM LAS 3000により行った。定量はFUJIFILM Image Gaugeで行った。

6) 細胞内ポリアミン定量

大腸菌MA261は、Put存在下及び非存在下で24時間培養し、8000回転、10分、4°Cで集菌した。菌体は10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaClを含む緩衝液で3回洗浄した。5% TCAで菌体を懸濁し、70°Cで15分インキュベーション後、氷中に30分間置き、12000回転、10分、4°Cで遠心した。得られ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【42】により蛋白質濃度の定量を行った。

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 β -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 で反応後、励起波長 340 nm、蛍光波長 455 nm の条件で検出した【45】。溶出時間はそれぞれ Put で 6.7 分、Spd で 12.5 分及び Spm で 24.6 分であった。

7) 細胞内グルタチオン量の測定

細胞内のグルタチオン量の測定には Total glutathione assay kit (Northwest Life Science Specialties LLC, USA) を用いた。上記 6) で得られた上清を添付の assay buffer で希釈した。希釈したサンプルはマニュアルに従って 5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)、グルタチオン還元酵素及び NADPH を添加し、405 nm で測定した。沈殿は 0.2 N NaOH に溶かし、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いて Bradford 法【42】により蛋白質濃度の定量を行った。

Table 1 List of primers.

No.	Primer used	Nucleotide sequence
<u>Various plasmids</u>		
P1	5'-soxR(BamHI)	5'- CGACTGGATCCATGTTAAGCGGCTGGTCAA -3'
P2	3'-soxR(EcoRI)	5'- ACCACGAATTCGAATGAGGTGTGTTGACGT -3'
P3	5'-soxR(SD)	5'- TAATTCCTCAAGTAACTTCTCCGAGGTCG -3'
P4	3'-soxR(SD)	5'- CGACCTCGGAGAAGTTAACTTGAGGAATTA -3'
P5	5'-soxR(XmaI)	5'- GGCATAACCCGGGTCCATTGCGATATCAA -3'
P6	3'-soxR(XmaI)	5'- CTCCCGGGGATACTGGTAATCAACCCTTTA -3'
P7	5'-emrR(BamHI)	5'- TGATGCAGGATCCACGCCGTTTCGTGCCCA -3'
P8	3'-emrR(EcoRI)	5'- TCTCGTGAATTCCTGAGCCTTCAGCATTT -3'
P9	5'-emrR(SD)	5'- GGCTGAAATTAATGAGGAGGTACCCAAATG -3'
P10	3'-emrR(SD)	5'- CGAACTATCCATTTGGGTACCTCCTCATT -3'
P11	5'-emrR(XmaI)	5'- TCTACCCGGGCAGAAGTGATGCACGATACA -3'
P12	3'-emrR(XmaI)	5'- TTAATCCCCGGGGCCTTCAGCATTTTATTG -3'
P13	5'-gshA(BamHI)	5'- TAGGCCTGGATCCATGGTCACCATTACAGT -3'
P14	3'-gshA(KpnI)	5'- CTAACAACGGCATTAGGTACCTCCGGTAA -3'
P15	5'-gshA(ATG)	5'- GATTTTGACAGGCGGGAGGTCAATATGATC -3'
P16	3'-gshA(ATG)	5'- TGTGATACGTCCGGGATCATATTGACCTCC -3'
P17	5'-gshA(XmaI)	5'- GATCAGTCATCCCCGGGTTTTAGTTTTAAC -3'
P18	3'-gshA(XmaI)	5'- ATTGTTGCCCGGGTGCCATCAGCATTAACA -3'
<u>Probes for PCR</u>		
P19	5'-soxR(probe)	5'- CGACTGGATCCATGTTAAGCGGCTGGTCAA -3
P20	3'-soxR(probe)	5'- CTGCGCCAAAGGCAGCCACAACCAATACAT -3'
P21	5'-emrR(probe)	5'- TGATGCAGGATCCACGCCGTTTCGTGCCCA -3'
P22	3'-emrR(probe)	5'- ATCGCTTCGAGAACCACACCGTCTTGTTCC -3'
P23	5'-gshA(probe)	5'- TAGGCCTGGATCCATGGTCACCATTACAGT -3'
P24	3'-gshA(probe)	5'- AGATATCACCGCACTTCGCTTGCCAGAATG -3'
P25	5'-soxS(probe)	5'-CCCCAACAGATGAATTAACGAACTGAACAC-3'
P26	3'-soxS(probe)	5'-TAAAAACGATCGCTGAAGGCGTCGAAACTG-3'
P27	5'-sodA(probe)	5'- CTGGAGATGAATATGAGCTATACCCTGCCA -3'
P28	3'-sodA(probe)	5'- CCTCATTGCAGCAGGCGGCAAATGATTATT -3'
P29	5'-katE(probe)	5'- ATCAGCCGCTCACGGTTATTTCCAGCCATA -3'
P30	3'-katE(probe)	5'- AATCGCCTGCTTCAATGGCTTCCCACAAC -3'
P31	5'-katG(probe)	5'- TCGTTCTAACCCACTGGGTGAGGACTTTGA -3'
P32	3'-katG(probe)	5'- GTGCTCGCCCAACCTAACCTTGTTCCTTCA -3'

1-3 結果

ポリアミンによる酸化ストレス下での細胞増殖、生存率、細胞内ポリアミン量及びグルタチオン量の上昇

酸化ストレスは、活性酸素による強い酸化力により、DNAや蛋白質などの生体構成成分にダメージを与え、大腸菌において細胞増殖及び生存率に影響を与える【31-33】。これまでの研究でポリアミンは、種々のストレスの除去に寄与することが知られているが、大腸菌における酸化ストレスとの関係性についてはあまり研究されていない。そこで、本研究では酸化ストレスに着目し、酸化ストレス下におけるポリアミンの影響を調べた。

初めに、大腸菌ポリアミン要求株MA261を用いて、酸化ストレス誘発剤である0.6 μM 亜テール酸カリウム (K_2TeO_3) の有無における細胞増殖及び細胞生存率に対するポリアミンの効果を検討した。その結果、 K_2TeO_3 の有無に関わらずPut添加により細胞増殖及び細胞生存率が大きく促進され、Put非存在下、 K_2TeO_3 添加により、細胞増殖速度及び細胞生存率は著しく減少した。しかし、Putを添加することで減少した細胞増殖速度及び細胞生存率は著しく回復し、細胞生存率においては K_2TeO_3 無添加時とほぼ同程度まで回復した (Fig. 6 A-B)。また、培養24時間における細胞内ポリアミン量を測定したところ、Put無添加時において、Put及びSpdが顕著に減少していたが、Put添加により、Putが取り込まれ、Spdが細胞内で合成されていた (Fig. 6C)。さらに、 K_2TeO_3 添加により細胞内ポリアミン量はわずかに減少していた。次に、酸化ストレス除去に大きな役割を果たすことが知られているグルタチオンの細胞内含量をPutの有無で調べたところ、培養24時間、 K_2TeO_3 の有無に関わらず、Put添加により細胞内グルタチオン量が約2~3倍増加しており、 K_2TeO_3 添加により、グルタチオン量の減少が見られた (Fig. 6C)。さらに、酸化ストレス損傷のマーカであるカルボニル化蛋白質の変化を培養24時間で調べたところ、 K_2TeO_3 添加によりカルボニル化蛋白質量は約1.5倍増加したが、Putを添加することで K_2TeO_3 無添加時と同程度までカルボニル化蛋白質が減少した (Fig. 6 D)。

以上の結果から、 K_2TeO_3 は酸化損傷を引き起こし、細胞増殖速度及び細胞生存率を大きく減少させること、また、ポリアミンは細胞内グルタチオン量を上昇させ、酸化ストレス除去に寄与している可能性が示唆された。

酸化ストレス下における新規ポリアミンモジュロンの同定

本研究で用いた酸化ストレス誘発剤である K_2TeO_3 は、PitA (inorganic phosphate transport system) により細胞内に取り込まれ、細胞内で還元されることでスーパーオキシドアニオンを産生することが知られている【34, 35】。そこで、スーパーオキシドアニオンを感知し、転写因子として働くSoxR【46, 47】に着目し、 K_2TeO_3 存在下における蛋白質発現量の変化を比較した。その結果、対数増殖期 ($A_{540}=0.3$) では発現量に大きな差は見られなかったが、培養開始

後24時間及び36時間では3.2~3.5倍とポリアミンによる発現促進が見られた (Fig. 7 A)。またこの時、コントロールであるRpoD (RNAポリメラーゼ σ^{70} サブユニット) 蛋白質の発現量に大きな差は見られなかった。次に、*soxR* mRNAの発現量の変化を比較したところ、ポリアミンの有無による有意な差は見られなかった (Fig. 7 B)。このことから、SoxR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明らかとなった。

ポリアミンによるSoxRの発現促進メカニズムを明らかにするため、*soxR-lacZ*融合遺伝子のプラスミドを作製し、 β -galactosidase (β -Gal) の活性を持たないMA261 Δ *lacZ::Em*に形質転換することで、ポリアミンによるSoxR- β -Gal合成促進効果を検討した。*soxR* mRNAの開始コドン付近の構造を調べたところ、*soxR* mRNAのShine-Dalgarno (SD) 配列は開始コドンより10塩基上流に位置しており、通常のSD配列よりも離れていた。この構造は、これまでに同定されているポリアミンモジュロンと同様であることから、この特徴がポリアミンによる翻訳レベルでの合成促進に寄与しているか検討するため、SD配列と開始コドンの位置を通常的位置まで近付けた変異体を作製し、ポリアミンによる促進効果を調べた (Fig. 7 C)。その結果、wild typeにおけるSoxR- β -Gal蛋白質の発現量はポリアミンにより2.9倍増加したが、SD配列を変えた変異体においてはポリアミンによる合成促進効果が1.4倍と大きく減少した (Fig. 7 D)。また、SD配列を近付けたことにより、ポリアミン非存在下におけるSoxR- β -Galの発現量が3.9倍に増加した。これらの結果から、ポリアミンによるSoxRの合成促進は、SD配列と開始コドン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。

これまでの研究において、酸化ストレスの除去にはグルタチオンが重要であり【48】、ポリアミンはこのグルタチオン量を調節することが示唆されている (Fig. 6 C)。そこで、グルタチオンの構成因子であるシステインの排出に参与する排出蛋白質EmrA及びEmrBの負の転写因子であるEmrR【49, 53】に着目し、 K_2TeO_3 存在下における蛋白質発現量の変化を比較した。その結果、対数増殖期 ($A_{540} = 0.3$) 及び24時間においてそれぞれ4.6、3.0倍と大きくポリアミンにより発現促進されていた (Fig. 8 A)。また、*emrR* mRNA量に大きな差は見られなかった (Fig. 8 B)。以上のことから、EmrRは対数増殖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ることを見出した。

先程と同様に、EmrRのポリアミンによる発現促進機構を検討したところ、*emrR* mRNAは*soxR* mRNA同様にSD配列と開始コドンとの距離が10塩基と通常より離れていることを見出した。そのため、この特徴がポリアミンによる発現促進機構に参与しているか検討するため、SD配列と開始コドンの位置を通常的位置まで近付けた変異体を作製し、ポリアミンによる促進効果を調べた (Fig. 8 C)。その結果、wild type におけるEmrR- β -Gal融合遺伝子の発現量はポリアミンにより3.5倍増加したが、SD配列を変えた変異体においてはポリアミンによる合成促進効果が1.4倍と大きく減少した (Fig. 8 D)。また、SD配列を近付けたことにより、ポリアミン非存在下におけるEmrR- β -Galの発現量が6.1倍に増加した。これらの結果から、ポリアミンによるEmrRの合成促進は、SD配列と開始コドン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。

次に、グルタチオン合成酵素であるGshA【50】に着目して、 K_2TeO_3 存在下における蛋白質

発現量の変化を比較した。その結果、対数増殖期 ($A_{540}=0.3$) では発現量に大きな差は見られなかったが、培養開始後24時間及び36時間ではそれぞれ3.0、2.5倍とポリアミンによる発現促進が見られた(Fig. 9 A)。また、*gshA* mRNA量に大きな差は見られなかった (Fig. 9 B)。以上のことから、GshAは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ることを見出した。

これまでと同様にGshAのポリアミンによる発現促進機構を検討したところ、GshAの開始コドンは通常のアUGではなく、UUGであり、翻訳効率の悪い非効率的な構造であることを見出した (Fig. 9 C)。そのため、この特徴がポリアミンによる発現促進機構に関与しているか検討するため、GshAの開始コドンを通常のアTGに変えた変異体を作製し、GshA- β -Galの発現量をポリアミンの有無で比較した。その結果、wild type におけるGshA- β -Gal融合遺伝子の発現量はポリアミンにより2.4倍増加したが、開始コドンを変えた変異体においてはポリアミンによる合成促進効果が1.1倍と大きく減少した (Fig. 9 D)。また、開始コドンをATGに変えたことにより、ポリアミン非存在下におけるGshA- β -Galの発現量が3.0倍に増加した。これらの結果から、ポリアミンによるGshAの合成促進は、開始コドンに依存して引き起こされることが明らかとなった。

以上の結果から、SoxR、EmrR及びGshAを新規のポリアミンモジュロンとして新たに同定した。

酸化ストレス下における細胞増殖及び生存率に対するSoxR、EmrR及びGshAの効果

新規ポリアミンモジュロン蛋白質である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、これら遺伝子のSD配列若しくは開始コドンを変え、ポリアミンの有無に関係なく蛋白質が発現するプラスミドを作製し、MA261に形質転換することで、SoxR、EmrR及びGshAの過剰発現株を作製した。これら過剰発現株を用いて、 K_2TeO_3 存在下、Put無添加時における細胞増殖速度及び細胞生存率の変化を比較した。その結果、どの過剰発現株においてもベクターと比較し、細胞増殖速度及び細胞生存率の上昇が見られた (Fig. 10 A, B)。その中でも、*gshA* (ATG) 及び*soxR* (SD) は特に大きく増加しており、*emrR* (SD) は他の2つと比較し、増加率が少なかった。また、*gshA* (ATG) 過剰発現株において、Put存在下で同様の実験を行ったところ、細胞増殖速度及び細胞生存率はベクターと比較し、上昇していたが、Put無添加時と比べ、その上昇率は少なかった (Fig. 10 A, B)。また、*soxR* (SD) 及び*emrR* (SD) においても同様の結果が得られた (data not shown)。これらのことから、SoxR、EmrR及びGshAは K_2TeO_3 存在下において酸化ストレスの軽減に寄与していることが明らかとなった。

次に、これら新規ポリアミンモジュロンの詳細な酸化ストレス除去機構を調べた。SoxRは酸化ストレスの中でも、スーパーオキシドアニオンを特異的に感知することで、蛋白質の高次構造が変化し、転写因子として*soxS* mRNAの発現を促進する。このSoxSは転写因子であり、酸化ストレスの除去に重要なスーパーオキシドジスムターゼ (SODs) であるSodAを含む約

15種の遺伝子発現を制御することが知られている【51, 52】。そこで、MA261において K_2TeO_3 存在下、Putの有無で $soxS$ 及び $sodA$ mRNA量の変化を比較した。その結果、Put添加により $soxS$ 及び $sodA$ mRNA量がそれぞれ2.3、3.1倍と大きく発現促進された (Fig. 11 A)。また、EmrRは大腸菌において抗生物質への抵抗性を向上させる多剤耐性因子の1つであり、薬剤の排出を行うEmrABの負の転写因子である【49】。これまでの研究でEmrABの過剰発現株において、細胞内システイン量の減少が認められている【53】ため、EmrRはこのEmrABの発現を負に制御することで、システイン量を上昇させ、間接的に細胞内グルタチオン量の変化に寄与していることが考えられた。また、GshAはグルタチオン合成酵素であり、直接グルタチオンを合成する。このことから、EmrR及びGshAは細胞内グルタチオン量の変化に寄与する可能性が考えられたため、ポリアミン非存在下、SoxR、EmrR及びGshAの過剰発現株における細胞内グルタチオン量の変化を比較した。その結果、 $emrR$ (SD)、 $gshA$ 及び $gshA$ (ATG) において有意な細胞内グルタチオン量の上昇が認められた (Fig. 11 B)。一方で、SoxR過剰発現株においてはグルタチオン量に大きな差は見られなかった。以上のことから、EmrR及びGshAはそれぞれ間接的及び直接的にグルタチオン合成を促進することで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。

酸化ストレス下においてポリアミンにより合成促進されるRpoSの効果

これまでの研究で、種々のストレス除去に寄与するRNAポリメラーゼの σ 因子であるRpoSが、ポリアミンモジュロンとして同定されており【22】、このRpoSは定常期において過酸化水素の除去に寄与するカタラーゼであるHP1 (KatG) 及びHP2 (KatE) の発現を制御し、酸化ストレスの除去に寄与することが明らかとなっている【54】。そこで、 K_2TeO_3 存在下におけるRpoS蛋白質の発現量及び $katG$ 、 $katE$ mRNA量の変化を検討した。まず、MA261において K_2TeO_3 存在下、Putの有無でRpoS蛋白質の発現量の変化を比較したところ、Put添加によりRpoS蛋白質の約2~3倍の発現上昇が見られ、 K_2TeO_3 非存在下と比較すると、ポリアミンにより強く発現促進されていた (Fig. 12 A)。そこで、 K_2TeO_3 存在下においてポリアミンの有無で $katG$ 及び $katE$ mRNAの発現量の変化を調べた。その結果、Put添加によりそれぞれ2倍及び3倍と大きく発現促進されることを見出した (Fig. 12 B)。このことから、ポリアミンはRpoSの発現量を翻訳レベルで促進することで、 $katG$ 及び $katE$ mRNAの発現を制御し、酸化ストレスの除去に寄与していることが示された。

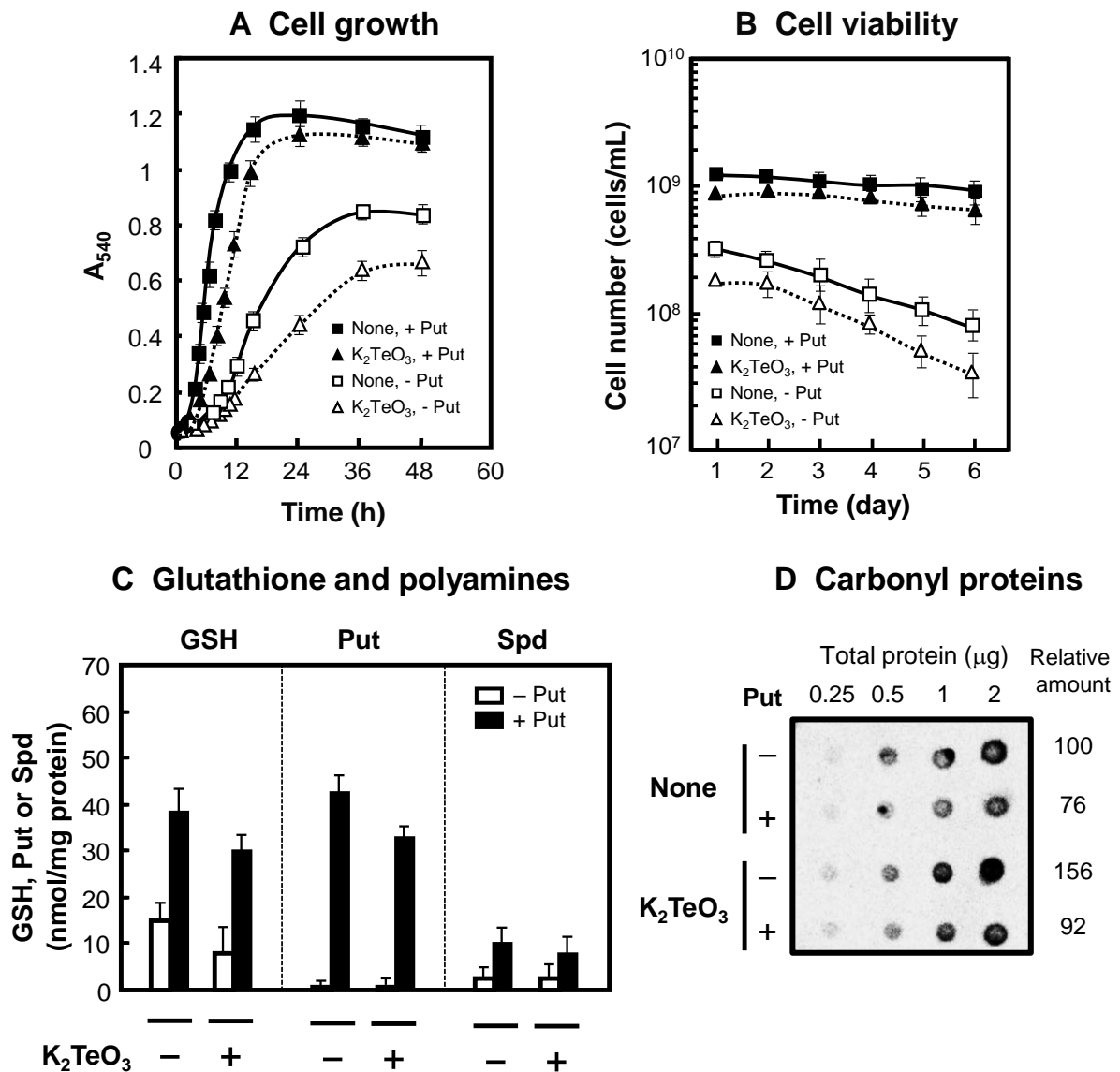
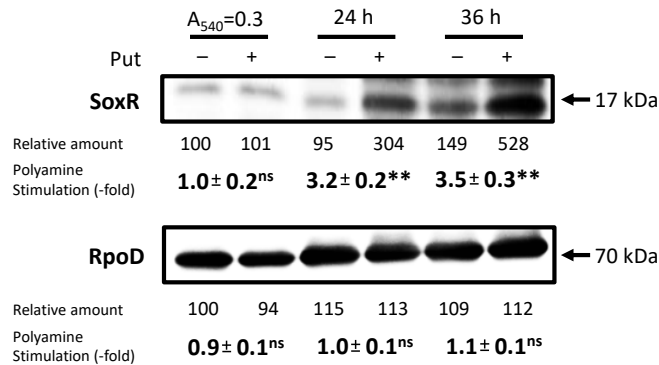


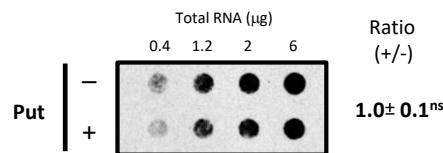
Fig. 6 酸化ストレス下における細胞増殖速度、細胞生存率、細胞内グルタチオン量及びカルボニル化蛋白質に対するポリアミンの効果

大腸菌ポリアミン要求株MA261を用いて、細胞増殖 (A)、細胞生存率 (B)、細胞内グルタチオン量 (C) 及びカルボニル化蛋白質量 (D) を0.6 mM Put及び0.6 μM亜テルル酸カリウム (K₂TeO₃) の有無で測定した。その結果、K₂TeO₃により大きく低下した細胞増殖及び細胞生存率はポリアミンの添加で回復した。また、ポリアミンにより細胞内グルタチオン量は顕著に増加した。さらに、酸化損傷のバイオマーカーであるカルボニル化蛋白質量もポリアミンの添加により低下した。値はmean±S.E. (n=3) で示す。

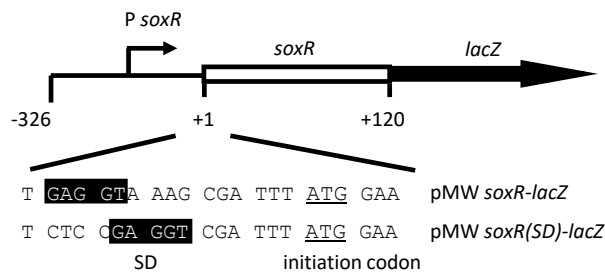
A Western blotting of SoxR and RpoD



B Dot blotting of *soxR* mRNA at 24 h



C Structure of *soxR-lacZ* fusion genes



D Western blotting of SoxR- β -Gal at 24 h

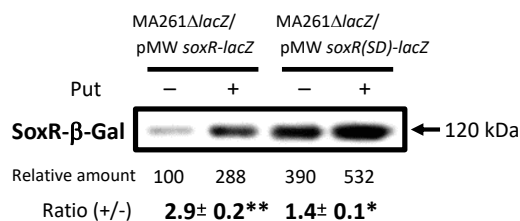


Fig. 7 ポリアミンによるSoxR蛋白質の発現促進機構

MA261を用いて K_2TeO_3 存在下、ポリアミンの有無でSoxR蛋白質 (A) 及び*soxR* mRNA (B) 発現量の変化を比較した。wild type及び変異*soxR-lacZ*遺伝子の構造を示す (C)。wild type及び変異*soxR-lacZ*を含むプラスミドをMA261 Δ *lacZ*::*Em*に形質転換し、SoxR- β -Gal発現量の変化を比較した (D)。値はmean \pm S.E. (n=3) で示す。nsは $p \geq 0.05$ 、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す。

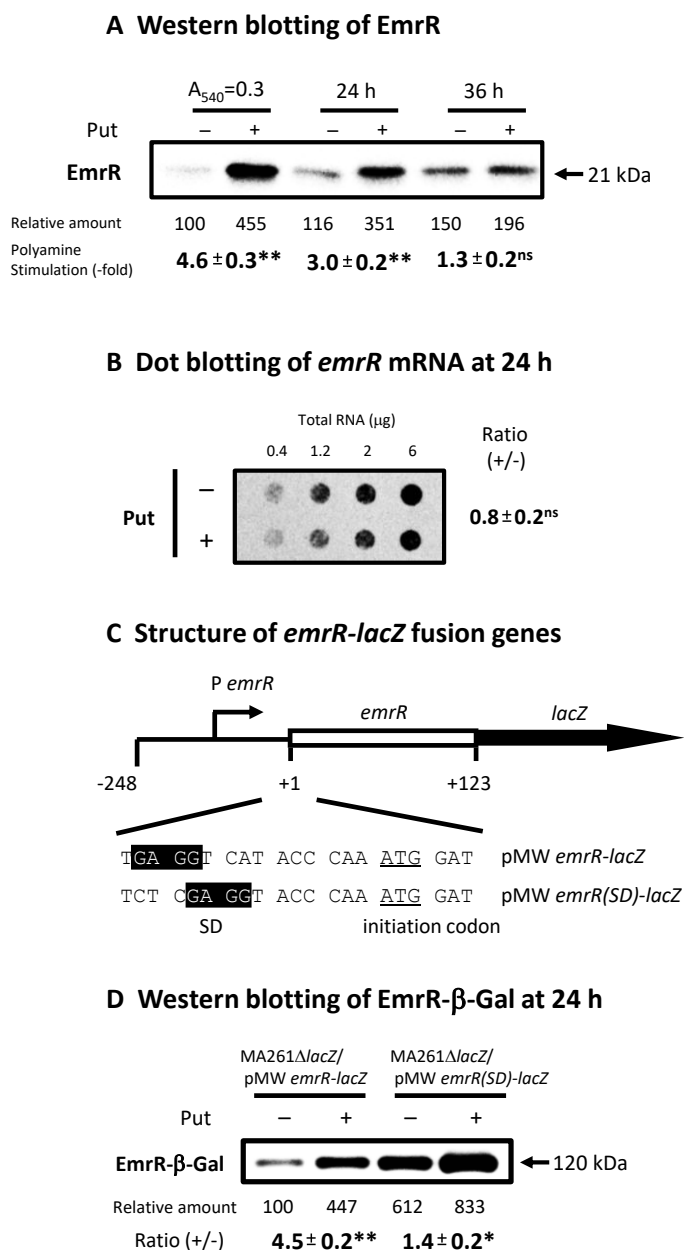
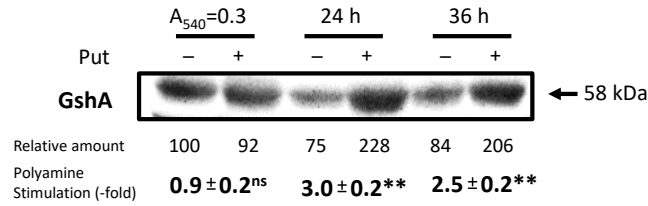


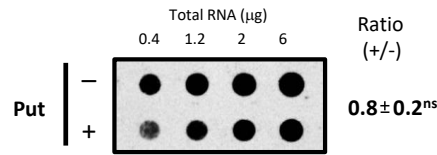
Fig. 8 ポリアミンによるEmrR蛋白質の発現促進

MA261を用いて K_2TeO_3 存在下、ポリアミンの有無でEmrR蛋白質 (A) 及び*emrR* mRNA (B) 発現量の変化を比較した。wild type及び変異*emrR-lacZ*遺伝子の構造を示す (C)。wild type及び変異*emrR-lacZ*を含むプラスミドをMA261Δ*lacZ*::Emに形質転換し、EmrR-β-Gal発現量の変化を比較した (D)。値はmean ± S.E. (n=3) で示す。nsは $p \geq 0.05$ 、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す。

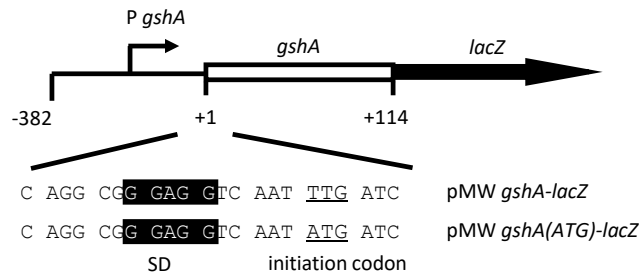
A Western blotting of GshA



B Dot blotting of *gshA* mRNA at 24 h



C Structure of *gshA-lacZ* fusion genes



D Western blotting of GshA- β -Gal at 24 h

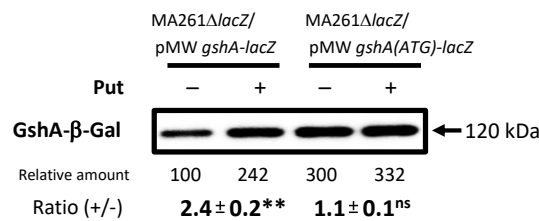


Fig. 9 ポリアミンによるGshA蛋白質の発現促進

MA261を用いて K_2TeO_3 存在下、ポリアミンの有無でGshA蛋白質 (A) 及び*gshA* mRNA (B) 発現量の変化を比較した。wild type及び変異*gshA-lacZ*遺伝子の構造を示す (C)。wild type及び変異*gshA-lacZ*を含むプラスミドをMA261 Δ *lacZ*::*EmI*に形質転換し、GshA- β -Gal発現量の変化を比較した (D)。値はmean \pm S.E. (n=3) で示す。nsは $p \geq 0.05$ 、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す。

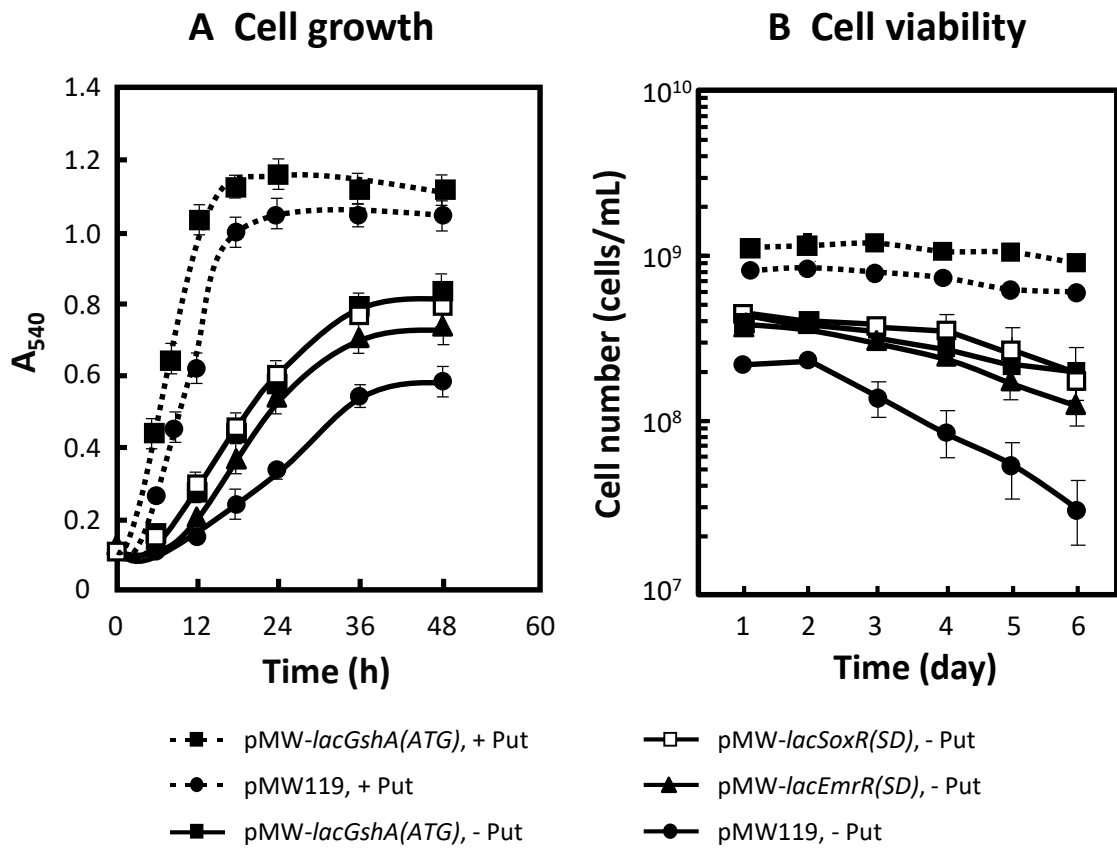
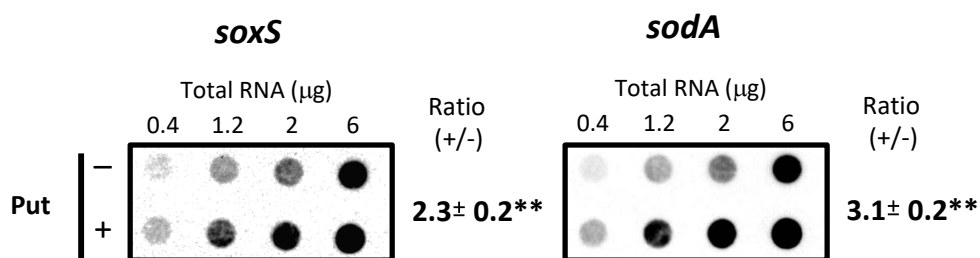


Fig. 10 ポリアミン非存在下におけるSoxR、EmrR及びGshA過剰発現株の細胞増殖速度及び細胞生存率の回復

soxR、*emrR*及び*gshA*遺伝子のSD配列及び開始コドンを変異させたプラスミドを作製し、MA261に形質転換することで、ポリアミン非存在下でも発現できるSoxR、EmrR及びGshA蛋白質過剰発現株を作製した。この過剰発現株を K_2TeO_3 存在下で培養し、細胞増殖速度 (A) 及び細胞生存率 (B) の変化を比較した。値はmean±S.E. (n=3) で示す。

A Dot blotting of *soxS* and *sodA* mRNAs at 24 h



B Glutathione at 24 h

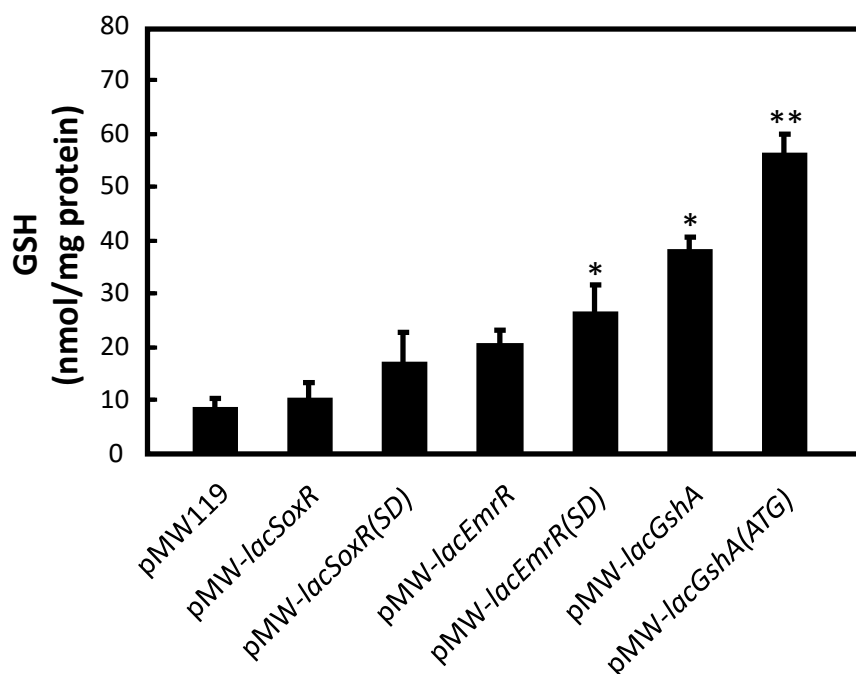
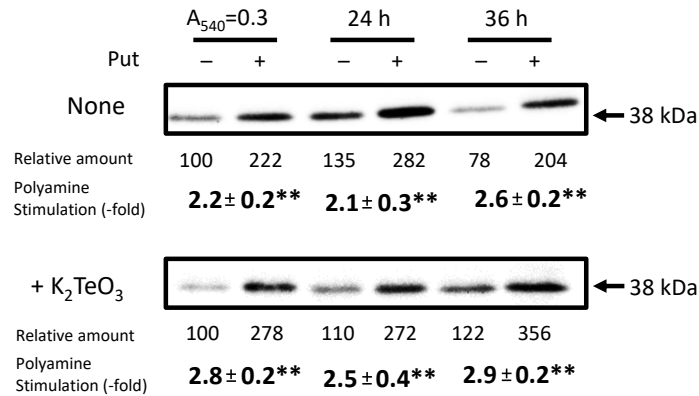


Fig. 11 ポリアミンによる*soxS*、*sodA* mRNA量の上昇及び、*SoxR*、*EmrR*及び*GshA*過剰発現株における細胞内グルタチオン量の変化

MA261を用いて K_2TeO_3 存在下、ポリアミンの有無で*SoxR*により転写調節を受ける*soxS*及びスーパーオキシドアニオンの除去に重要であり、*SoxS*により転写調節を受ける*sodA* mRNA量の変化を比較した (A)。 K_2TeO_3 存在下、ポリアミン非存在下における*SoxR*、*EmrR*及び*GshA*過剰発現株の細胞内グルタチオン量の変化を比較した (B)。値はmean ± S.E. (n=3) で示す。nsは $p \geq 0.05$ 、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す。

A Western blotting of RpoS



B Dot blotting of *katG* and *katE* mRNAs at 24 h

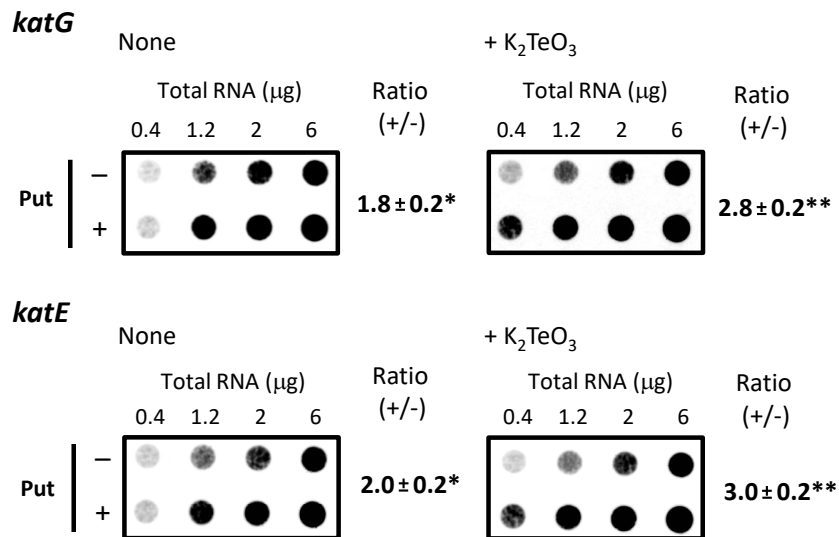


Fig. 12 RpoS蛋白質及び*katG*、*katE* mRNAの発現量の変化

これまでにポリアミンモジュロンとして同定されており、種々のストレス応答に関与するRpoS蛋白質の発現を K_2TeO_3 及びPutの有無で比較した (A)。過酸化水素の除去に重要なカタラーゼの遺伝子である*katG*及び*katE* mRNAの発現量の変化を K_2TeO_3 及びPutの有無で比較した (B)。値はmean \pm S.E. (n=3) で示す。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す。

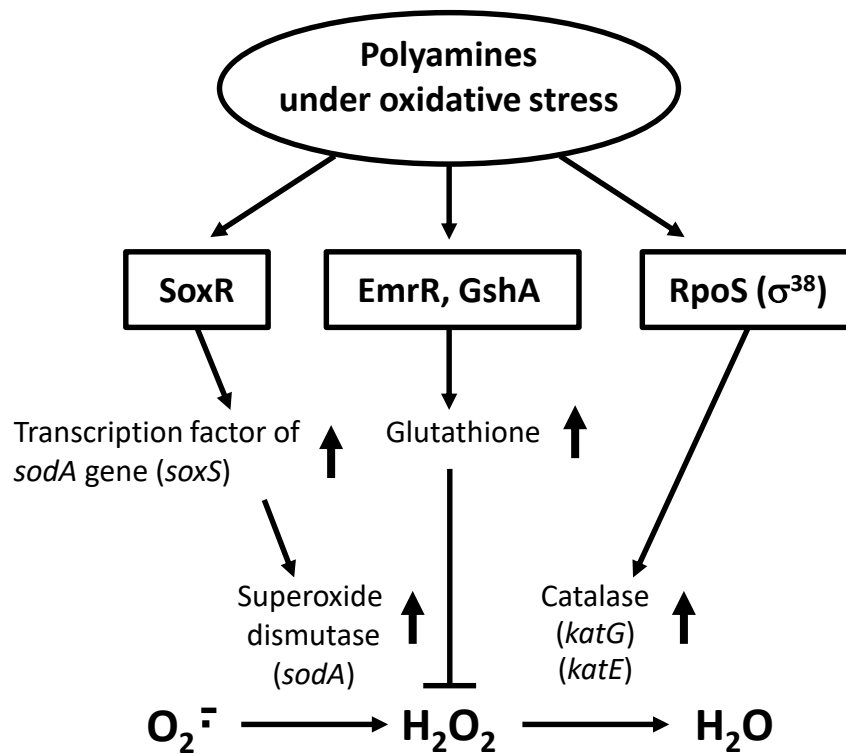


Fig. 13 酸化ストレス下におけるポリアミンモジュロンの役割

ポリアミンによる酸化ストレス除去機構を図示した。ポリアミンは酸化ストレス下において翻訳レベルでSoxRを合成促進し、*soxS* mRNAの転写促進を介して、スーパーオキシドジスムターゼである*sodA* mRNA量を上昇させ、スーパーオキシドアニオンを除去する。また、EmrR及びGshAはポリアミンにより発現促進されることで、それぞれ間接的及び直接的に細胞内グルタチオン量を上昇させ、過酸化水素を除去する。さらにポリアミンは、RpoSの合成促進を介し、過酸化水素の除去に重要なカタラーゼの遺伝子である*katG*及び*katE* mRNA量を制御することで酸化ストレスへの抵抗性の向上に寄与している。

1-4 考察

大腸菌においてポリアミンは、種々のストレス下において、特定の蛋白質の合成を促進することで抵抗性を向上させ、細胞増殖及び生存率を向上させる。当研究室では、これまで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をポリアミンモジュロンと命名し、現在までに17種同定した【20-29】。これらポリアミンモジュロンの多くが転写因子であることから、ポリアミンにより多種の遺伝子発現が制御されることで、熱ストレスや飢餓ストレスなど様々なストレス除去に寄与することを見出している【26-29】。そこで、本研究では更なるストレス下でのポリアミンの生理的意義を明らかにするため、新たに酸化ストレス下でのポリアミンの生理的役割を解析した。

これまでの研究で、大腸菌における主な酸化ストレスはスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\bullet-}$) 及び過酸化水素 (H_2O_2) により引き起こされることが知られている【31-33】。その除去機構として、スーパーオキシドアニオンは主にスーパーオキシドジスムターゼ (SODs) により、過酸化水素はグルタチオンペルオキシダーゼ【55】やカタラーゼ、ヒドロゲンパーオキシドレダクターゼ (Ahp)【33】など種々の蛋白質により除去される。そこで、スーパーオキシドアニオン及び過酸化水素の除去に関与する新規ポリアミンモジュロンを探索した。その結果、SODsの発現に寄与するSoxR、グルタチオン合成を間接的若しくは直接的に行うEmrR及びGshAの3種の蛋白質が、酸化ストレス下においてポリアミンにより翻訳レベルで発現促進されることを見出し、*soxR*、*emrR*及び*gshA*遺伝子を新規ポリアミンモジュロンとして同定した (Fig. 7-9)。これらSoxR、EmrR及びGshAに加え、RpoSを含めた蛋白質の酸化ストレス下における生理的意義をFig. 13にまとめた。SoxRは、スーパーオキシドアニオンを感知することで、その蛋白質構造を変化させ、下流の*soxS* mRNAの転写を促進し、転写因子であるSoxSが下流の*sodA* mRNAを含む約15種の遺伝子の転写発現を制御することで、スーパーオキシドアニオンの除去に寄与することが明らかとなった (Fig. 11A)。EmrRは抗生物質への抵抗性を向上させる多剤耐性因子として同定され、薬剤の排出を行うトランスポーターであるEmrABの負の転写因子であったが【49】、このEmrABは薬剤以外にも小分子化合物も排出しており、中でもグルタチオンの構成アミノ酸であるシステインがEmrABにより排出されていた【53】。システインはチオール基を有しており、グルタチオンの構成アミノ酸として非常に重要であると共に、システイン単独でもチオール基の還元力により過酸化水素の除去に寄与することが知られている【56】。従って、ポリアミンはEmrRを発現促進させることで、EmrABの発現量を減少させ、システインの細胞外への流出を抑制することで、間接的にグルタチオン合成を促進していることが示唆された。また、GshAはグルタチオン合成酵素であるため、直接的にグルタチオンを合成し、細胞内含量を上昇させていた (Fig. 11B)。従って、EmrR及びGshAは細胞内グルタチオン量を上昇させることで、グルタチオンペルオキシダーゼによる過酸化水素の除去が効果的に働くことが明らかとなった。さらに、これまでの研究でポリアミンモジュロンと同定されているRpoSは、カタラーゼの発現を制御していることが知られている【22, 54】。そのため、酸化ストレス下、ポリアミンの効果を検討したところ、酸化ストレス下にお

いてもRpoSはポリアミンにより発現促進され、カタラーゼの遺伝子である*katG*、*katE* mRNAもポリアミンにより大きく転写促進されていた (Fig. 12)。以上のことから、ポリアミンはいくつかの蛋白質の発現を翻訳レベルで制御することにより、酸化ストレスの除去に寄与することが示された (Fig. 13)。

また、酸化ストレスの中でも過酸化水素の除去に関与する転写因子であるOxyR【57】はAhpC及びAhpFを発現促進させることで酸化ストレスの除去に寄与していることが知られている【33】。そこで、OxyRの発現量の変化を比較したところ、ポリアミンによる発現量に大きな差は見られなかった (data not shown)。従って、OxyRによる酸化ストレス除去機序はポリアミンによる酸化ストレス下での細胞増殖及び生存率の促進に寄与していないことが考えられる。

今回同定されたポリアミンモジュロンの中でもSoxR及びGshAは定常期に最も蛋白質合成が促進され、EmrRは対数増殖期に合成促進されていた。これは大腸菌の生存戦略であり、対数増殖期において大腸菌は、細胞増殖を非常に盛んに行うために、多くのエネルギーを使用して細胞増殖に必須な蛋白質合成を優先的に行う。そのため、対数増殖期においてはEmrRの発現を促進することで、システインなどの最低限のストレス除去に重要な化合物を保持する一方、細胞増殖に必須でないSoxR及びGshAなどのスーパーオキシドアニオンや過酸化水素などに対する防御機構を担う蛋白質は定常期において合成促進されていることが考えられる。実際にSoxRは、定常期に発現量が増加することが報告されており【58】、グルタチオンの細胞内含量は定常期初期に最大値を示す【59】。従って、ポリアミンは大腸菌の生存戦略に非常に重要であり、その時々に必要な蛋白質の発現を促進することで、酸化ストレス下において細胞の生存に寄与することが示唆された。

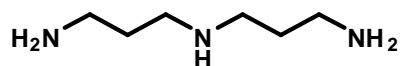
これまでの研究により、ポリアミンが17種のポリアミンモジュロン蛋白質を翻訳レベルで発現促進することを明らかにしており【20-29】、これらの蛋白質の多くは K_2TeO_3 存在下においても発現促進されていた (data not shown)。従って、これらポリアミンモジュロン蛋白質は酸化ストレス下においても細胞増殖及び生存率の上昇に寄与している。加えて、大腸菌において、酸化ストレス下、Put、Spd及びカダベリンが酸化ストレスからの防御に寄与することが報告されていることから、大腸菌において酸化ストレス下でポリアミンが非常に重要な役割を担っていることが明らかである【60】。

第二章 スペルミジン構造類似体による高温適応機構の解明

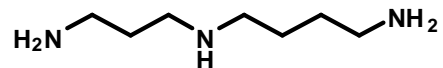
2-1 目的

スペルミジン構造類似体はこれまでに、Spdを母体とし、炭素鎖の1つ少ないノルスペルミジン (Nspd)、炭素鎖の1つ多いホムスペルミジン (Hspd) 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与したアミノプロピルカダベリン (Apcad) の4種が同定されている (Fig. 14)。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し、何種かの原核生物において生合成されており、様々な生理的意義を持つ。Nspdは*Vibrio alginolyticus*において、バイオフィーム形成に寄与することが知られており【61】、Hspdは*Acinetobacter tartarogenes*の細胞内において細胞増殖に寄与していることが明らかとなっている【62】。さらに、大腸菌ポリアミン要求株であるDR112は通常のポリアミンの代わりにカダベリンからApcadが合成されており、Apcadを合成することができない別のポリアミン要求株であるMA261と比べ、生育速度が速い【45, 63】。また、高度好熱菌*Thermus thermophilus*においてはNspd、Spd及びHspdとApcad以外のスペルミジン構造類似体を有しており、これらスペルミジン構造類似体が高温環境下での生育に寄与している可能性が示唆されている【2, 3】。従って、本研究ではこれら4つのスペルミジン構造類似体をMA261に添加した際の細胞増殖速度の変化を32°C、37°C及び42°Cで比較し、スペルミジン構造類似体間での生理的役割の差異を調べた。

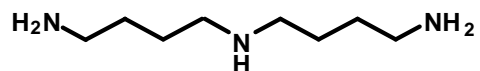
Norspermidine (Nspd)



Spermidine (Spd)



Homospermidine (Hspd)



Aminopropylcadaverine (Apcad)

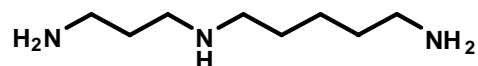


Fig. 14 スペルミジン構造類似体の構造

スペルミジン構造類似体の構造式を示す。Spdを母体とし、炭素鎖の1つ少ないノルスペルミジン (Nspd)、炭素鎖の1つ多いホモスペルミジン (Hspd) 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与したアミノプロピルカダベリン (Apcad) の4種がこれまでに同定されている。

2-2 材料と方法

1) 大腸菌株と培養条件

Spd取り込み能欠損株MA261 *potD::Km*及びPut、Spd取り込み能欠損株KK3131は以前当研究室で作成したものをを用いた【64, 65】。

MA261及びMA261 *potD::Km*の培養は、第一章と同様の方法を用いた。必要に応じて、50 µg/mL カナマイシン及び0.1 mM Nspd、Spd、Hspd及びApcadを添加し、32°C、37°C及び42°Cで培養した。

2) スペルミジン構造類似体

本研究で用いたノルスペルミジン (Norspermidine、Nspd、33) 及びスペルミジン (Spermidine、Spd、34) は和光純薬株式会社より購入した。ホモスペルミジン (Homospermidine、Hspd、44) 及びアミノプロピルカダベリン (Aminopropylcadaverine、Apcad、35) は城西大学薬学部の高尾浩一先生及び杉田義明先生のご厚意により分与していただいた【66, 67】。

3) Western blotting法による特定蛋白質の検出

抗OppA、RpoE (σ^{24})、StpA、EmrR及びRpoD (σ^{70}) 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。

スペルミジン構造類似体存在下及び非存在下、32°C、37°C及び42°Cで培養したMA261をA₅₄₀ = 0.3で集菌した。cell lysateの作製及びWestern blotting法は第一章に従った。

4) Dot blotting法による*potABCD* mRNAの検出

大腸菌MA261をスペルミジン構造類似体存在下及び非存在下でA₅₄₀ = 0.3まで培養し、8000回転、5分、4°Cで集菌した。全RNAの抽出並びにDot blotting法は第一章に従った。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P1 (5'-CGA CTT ACG AGT CGA ACG AAA CCA TGT ACG-3') 及びP2 (5'-AGA ACG GTT CCA GAT GCC GAG GTT AAC-3') 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™ Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (GE Healthcare) を用いてラベルした。

5) 細胞内ポリアミンの測定

大腸菌MA261、MA261 *potD::Km*及びKK3131は、スペルミジン構造類似体存在下及び非存在下で $A_{540}=0.3$ まで培養し、8000回転、10分、4°Cで集菌した。菌体は10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaClを含む緩衝液で3回洗浄した。菌体を5% TCA (Trichloroacetic acid) で懸濁し、70°Cで15分インキュベーション後、氷中に30分間置き、12000回転、10分、4°Cで遠心した。得られ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【42】により蛋白定量を行った。

ポリアミン定量にはHPLCを用いた。測定は、TSK gel Polyaminepak (4.6 x 50 mm) カラムを2本繋げ、BufferII [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、カラム温度50°C、流速0.20 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 β -Mercaptoethanol、0.1% Brij-35、0.6% methanol] を0.2 mL/min の割合で溶離液と混和し、50°Cで反応後、励起波長340 nm、蛍光波長455 nmの条件で検出した。溶出時間はそれぞれNspdで42.5分、Spdで47.2分、Hspdで50.6分及びApcadで67.7分であった。

6) 円偏光二色性 (CD) によるRNAの構造変化

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 μ M RNA、 Mg^{2+} 及びスペルミジン構造類似体 (0 mM、0.1 mM、0.2 mM、0.4 mM、0.8 mM、1.6 mM、2.0 mM)] を加え、37°C及び42°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。

7) PotD蛋白質に対するスペルミジン構造類似体の解離定数 (K_d) の測定

PotD蛋白質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【10】。

解離定数の測定にはCDを用いた。0.1 cmのキュベットにprotein solution [10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM KCl、5 μ M PotD protein、スペルミジン構造類似体 (0、2、4、6、8、10、20、40 μ M)] を加え、37°C及び42°Cで測定した。測定条件はScan speed 50 nm/min、開始波長250 nm、終了波長200 nmで行った。 K_d 値は、208 nmの吸光波長を用いて、double reciprocal plotより算出した。

2-3 結果

32°C、37°C及び42°Cにおけるスペルミジン構造類似体によるMA261の細胞増殖速度変化

これまでの研究で、原核生物はそれぞれ多種のポリアミンを有しており、特にSpdにおいては4種のスペルミジン構造類似体が同定されている。これらスペルミジン構造類似体はそれぞれバイオフィーム形成や生育などとの関わりが指摘されており、原核生物の生存に非常に重要である。しかしながら、これらスペルミジン構造類似体の生理的意義並びに機能差異についてはあまり研究されていない。そこで、本研究ではスペルミジン構造類似体 (Nspd、Spd、Hspd、Apcad) をMA261に添加した際の細胞増殖速度の変化を32°C、37°C及び42°Cで比較し、スペルミジン構造類似体間での生理的役割の差異を調べた。

初めに、スペルミジン構造類似体であるノルスペルミジン (Nspd)、スペルミジン (Spd)、ホモスペルミジン (Hspd) 及びアミノプロピルカダベリン (Apcad) を大腸菌ポリアミン要求株MA261に添加し、32°C、37°C及び42°Cで培養した際の細胞増殖速度の変化を比較した。その結果、どの温度においてもスペルミジン構造類似体非存在下と比較し、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著しく上昇した (Fig. 15A)。また、32°C及び37°CにおいてApcadは、他のスペルミジン構造類似体と比較し、わずかに細胞増殖速度が遅かったが、Nspd、Spd及びHspd間で大きな差は見られなかった。しかし、42°CではHspd添加により細胞増殖速度が著しく上昇した。また、wild typeである大腸菌W3110においては、どのスペルミジン構造類似体添加時にも生育速度に大きな差は見られなかった (data not shown)。

次に、HPLCを用いて細胞内ポリアミン量を対数増殖期 ($A_{540}=0.3$) で調べた。その結果、スペルミジン構造類似体無添加時には僅かなSpdのみが確認されたが、スペルミジン構造類似体を添加することで、細胞内にスペルミジン構造類似体を取り込まれることが明らかとなった (Fig. 15B)。また、これらスペルミジン構造類似体の中でもHspdは、どの温度においても細胞内に多く取り込まれており、特に42°Cにおいては、32°C及び37°Cと比較し、Nspd、Spd及びApcadは細胞内ポリアミン量が低く、HspdはSpdの約2.5倍と顕著に多量のHspdが細胞内に取り込まれていた。この結果から、Hspdによる42°CでのMA261の細胞増殖促進には、Hspdが多量に取り込まれることが寄与している可能性が示唆された。

MA261におけるスペルミジン構造類似体の細胞内への取り込み機構の解明

これまでの研究で、大腸菌においてSpdはATP binding cassette transporterの一種であるPotABCDにより細胞内に取り込まれることが知られている【68】。そこで、これらスペルミジン構造類似体の細胞内への取り込みにPotABCDが関与しているか検討するため、ペリプラズムに存在し、Spdと結合する基質結合蛋白質であるPotDを欠損させたSpd取り込み能欠損株であるMA261 *potD::Km*を用いて細胞増殖及び細胞内ポリアミン量の変化を比較した【64, 69,

70】。その結果、スペルミジン構造類似体による細胞増殖促進効果はいずれの温度においても著しく減少した (Fig. 16A)。しかしながら、32°CにおいてNspd添加時には、他のスペルミジン構造類似体と比較し、細胞増殖が促進された。また、MA261 *potD::Km*の細胞内ポリアミン量を対数増殖期 ($A_{540}=0.3$) で測定したところ、MA261と比較し、顕著に細胞内ポリアミン量が低く、スペルミジン構造類似体を取り込まれていなかった (Fig. 16B)。このことから、スペルミジン構造類似体は主にPotABCDを介し、細胞内に取り込まれることが明らかとなった。

次に、Hspdだけが細胞内に多く取り込まれ原因を明らかにするため、PotABCDによるHspdの取り込み機構を詳細に調べた。これまでの研究で、Spd-PotD蛋白質の複合体が*potABCD*オペロンの転写を抑制することが知られている【71】。そこで、スペルミジン構造類似体とPotD蛋白質との親和性を測定した。その結果、37°C及び42°CにおいてPotD蛋白質との親和性はNspd > Spd > Apcad > Hspdとなり、特にHspdの親和性は著しく低かった (Table. 2)。そこで、スペルミジン構造類似体による*potABCD* mRNAの発現量の変化を比較したところ、Nspd、Spd及びApcad添加時には*potABCD* mRNAが有意に減少したが、Hspd添加時には有意な減少は見られなかった (Fig. 17)。また、PotD蛋白質の発現量においても、*potABCD* mRNAと同様に、Hspd添加時にのみ有意な発現量の減少が見られなかった。以上の結果から、42°CにおいてHspdは、*potABCD*オペロンの転写抑制が起きにくく、PotABCD蛋白質が持続的に発現することで、Hspdが多く細胞内に取り込まれることが明らかとなった。

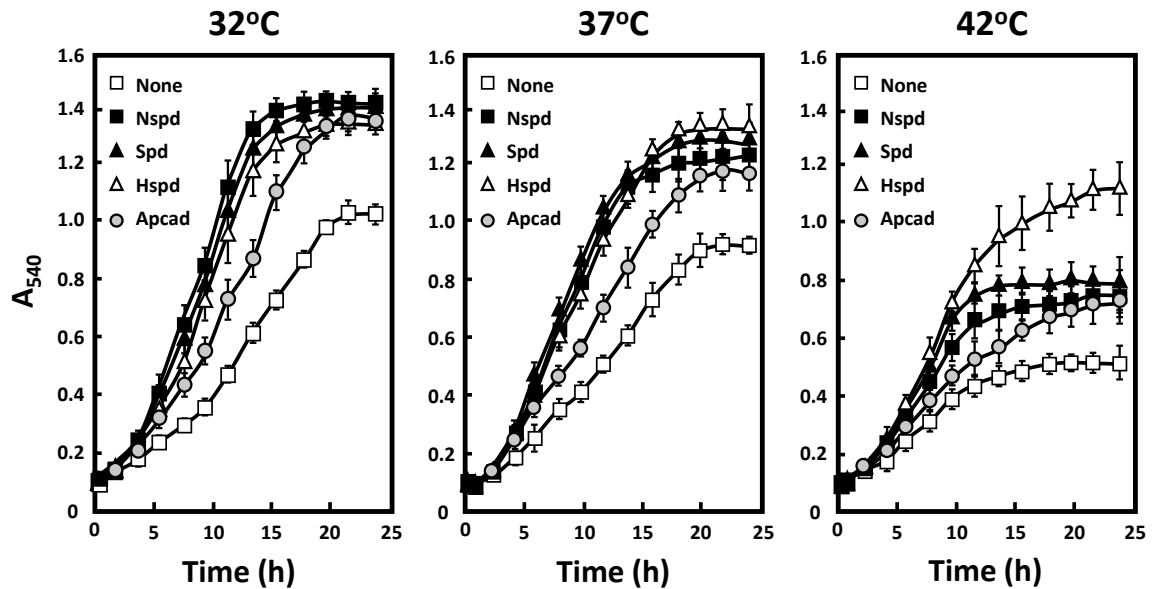
スペルミジン構造類似体による蛋白質合成の促進及びmRNAの構造変化

これまでの研究で、ポリアミンはmRNAに結合し、その構造を変化させることで種々の蛋白質合成を翻訳レベルで促進し、細胞増殖及び生存率の維持に重要な役割を果たすことが明らかとなっている【1】。そこで、スペルミジン構造類似体による細胞増殖促進機構を明らかにするため、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熱ストレスに関与する4種の蛋白質OppA (oligopeptide binding protein)、RpoE (σ^{24} transcription factor for heat shock response genes)、StpA (transcription factor for the genes of flagellin and ribosomal proteins) 及びEmrR (negative transcription factor for the genes of drug excretion proteins) における発現量の変化を37°C及び42°Cにおいて比較した。その結果、37°Cにおいてスペルミジン構造類似体により、OppA、StpA及びEmrR蛋白質の発現量が上昇したが、RpoEの発現量に有意な差は見られなかった (Fig. 18)。また、コントロールであるRpoD (σ^{70} transcription factor, a major σ factor) においてはスペルミジン構造類似体の有無に関係なく、発現量に差は見られなかった。

一方、42°Cにおいては、Hspdを添加することでOppA、RpoE、StpA及びEmrRすべての蛋白質において他のスペルミジン構造類似体と比較し、蛋白質発現量が著しく増加した (Fig. 18)。その際のRpoD蛋白質の発現量に差は見られなかった。これらの結果から、これらのRNAの構造は42°Cにおいて、より変化しやすくなっている可能性があり、また、Hspdは他のスペルミジン構造類似体と比較し、RNAの構造を効果的に変化させる可能性が示唆された。

次に、*oppA*及び*rpoE* mRNA (Fig. 19A, E) におけるスペルミジン構造類似体を添加した際の構造変化を円偏光二色性 (circular dichroism, CD) を用いて比較した。さらに、これまでの研究で、スペルミジンは2本鎖RNAのbulged-out構造周辺の領域に結合し、構造変化させることで、蛋白質合成の促進に寄与することが明らかになっているため、コントロールとしてbulged-out構造を欠き、より安定的なRNAの構造を有する*oppA* + U及び*rpoE* -20 (Δ U) RNA (Fig. 19C, G) においても、同様にCDの測定を行った。これら4種のCDスペクトルをFig. 19に示す。CDにおける波長208 nmのnegative bandの変化は、2本鎖RNAにおけるA formの安定性を示しているため【72】、208 nmにおけるnegative bandの相対強度を測定することで、スペルミジン構造類似体を添加した際のRNAの構造変化を比較した。また、スペルミジン構造類似体添加時における*oppA*及び*rpoE* mRNAの解離定数 (K_d 値) の測定には、RNAの構造安定化作用を有する Mg^{2+} においても同様に測定し、スペルミジン構造類似体添加時においては1 mM Mg^{2+} 存在下において検討を行った。その結果、37°C及び42°Cどちらの温度においても、Hspdによる*oppA* 及び*rpoE* mRNAの構造変化が他のスペルミジン構造類似体と比較し、より効果的に起きており (Fig. 20A, C)、どちらのmRNAにおいてもスペルミジン構造類似体により安定化されていた。また、37°C及び42°Cにおける K_d 値からスペルミジン構造類似体は37°Cと比べ、42°Cにおいて、より効率的にRNAの構造を変化させることが明らかとなった。一方、*oppA* + U及び*rpoE* -20 (Δ U) RNAにおける37°C及び42°Cでのスペルミジン構造類似体による構造変化は、wild typeと比較し、著しく弱かった。これらの結果から、Hspdは42°Cにおいて他のスペルミジン構造類似体と比較し、より効果的にRNAの構造を変化させることが明らかとなった。

A Cell growth of *E. coli* MA261



B Polyamine content

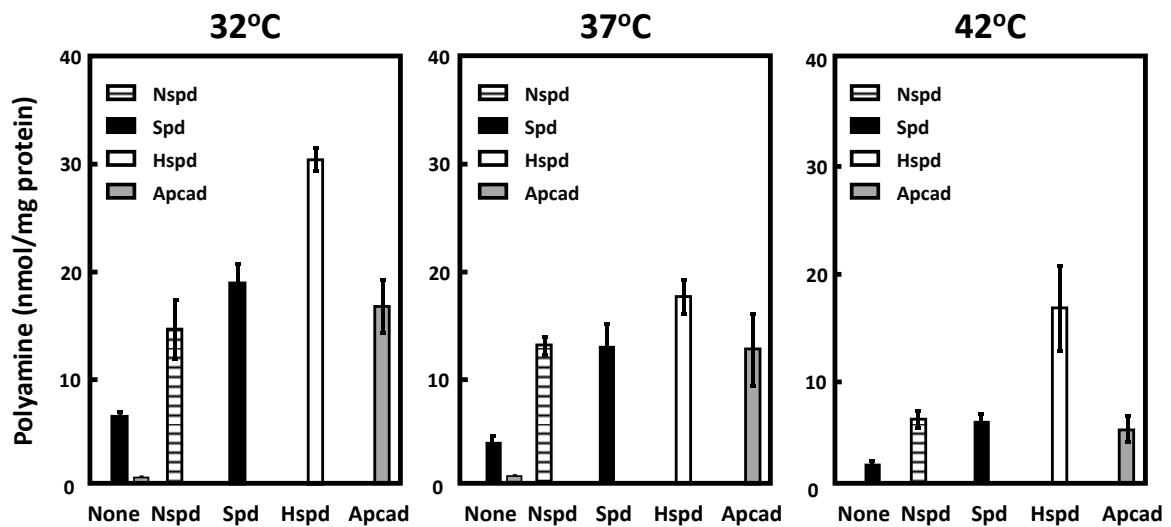
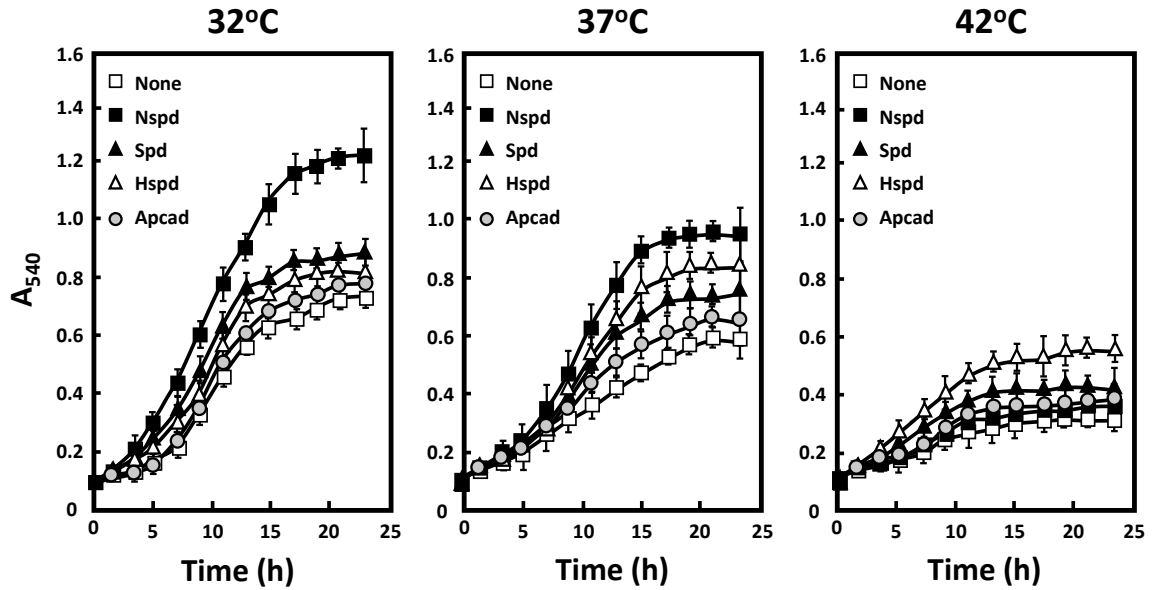


Fig. 15 大腸菌ポリアミン要求株MA261にスペルミジン構造類似体を添加した際の細胞増殖及び細胞内ポリアミン量の変化

大腸菌ポリアミン要求株MA261を用いて、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32°C、37°C及び42°Cと培養温度を変化させ検討した (A)。同様の条件下でMA261を培養後、 $A_{540}=0.3$ で集菌し、細胞内ポリアミン含量を測定した (B)。値はmean \pm SE (n=5) で表す。

A Cell growth of *E. coli* MA261 *potD::Km*



B Polyamine content

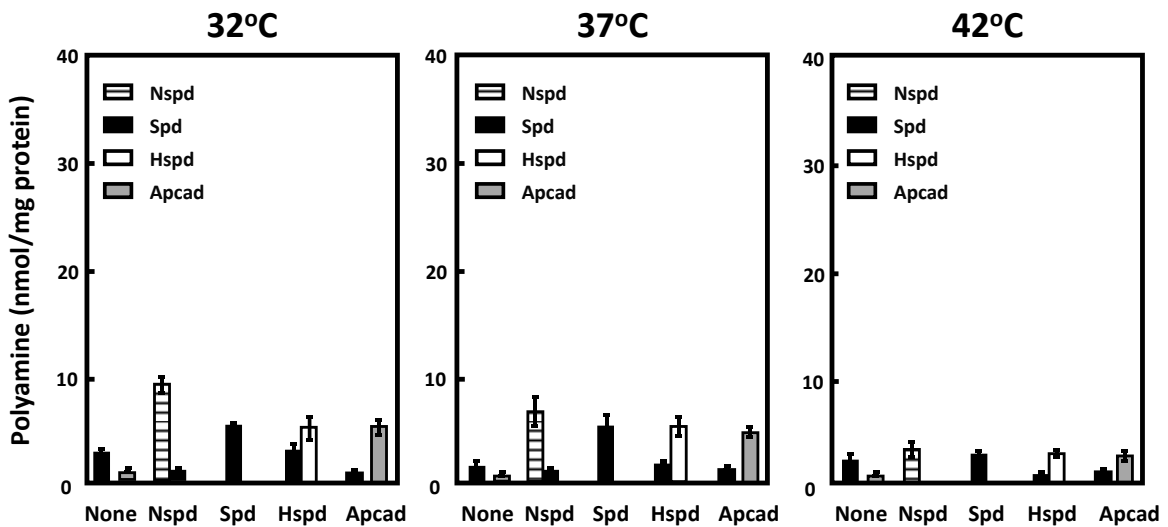


Fig. 16 大腸菌 Spd 優先取り込み系 PotABCD の基質結合蛋白質である PotD を欠損させた際の細胞増殖及び細胞内ポリアミン量の変化

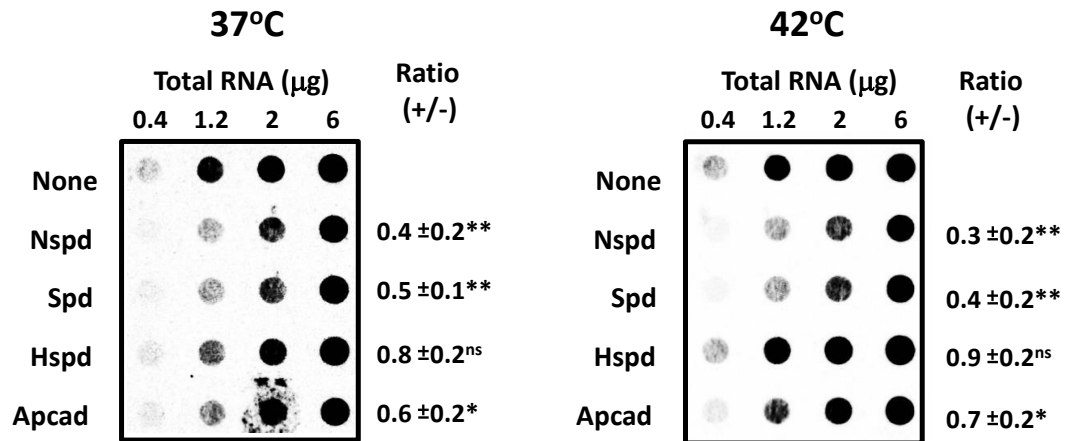
大腸菌 Spd 優先取り込み系 PotABCD の中でも、基質である Spd と結合し、Spd の取り込みに重要である *potD* 遺伝子を欠損させた菌株 MA261 *potD::km* を用いてスペルミジン構造類似体添加による細胞増殖 (A) 及び細胞内ポリアミン量 (B) の変化を比較した。値は mean \pm SE (n=5) で表す。

Table 2

Polyamine	K_d (μM)	
	37°C	42°C
Nspd	2.4 \pm 0.1	3.7 \pm 0.2
Spd	3.2 \pm 0.1	5.4 \pm 0.1
Hspd	8.8 \pm 0.4	13.0 \pm 0.2
Apcad	5.8 \pm 0.2	8.0 \pm 0.4

値は mean \pm SE (n=5) で表す。

A Dot blotting of *potABCD* mRNA



B Western blotting of PotD protein

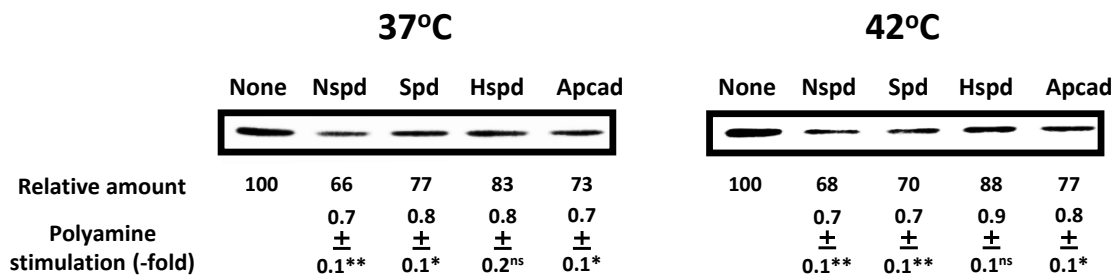


Fig. 17 スペルミジン構造類似体による*potABCD* mRNA及びPotD蛋白質の発現量の変化

potABCD mRNA (A) 及びPotD蛋白質 (B) の発現量の変化を37°C及び42°Cにおいて、スペルミジン構造類似体の有無で比較した。値はmean ± SE (n=3) で表す。nsは $p \geq 0.05$ 、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す。

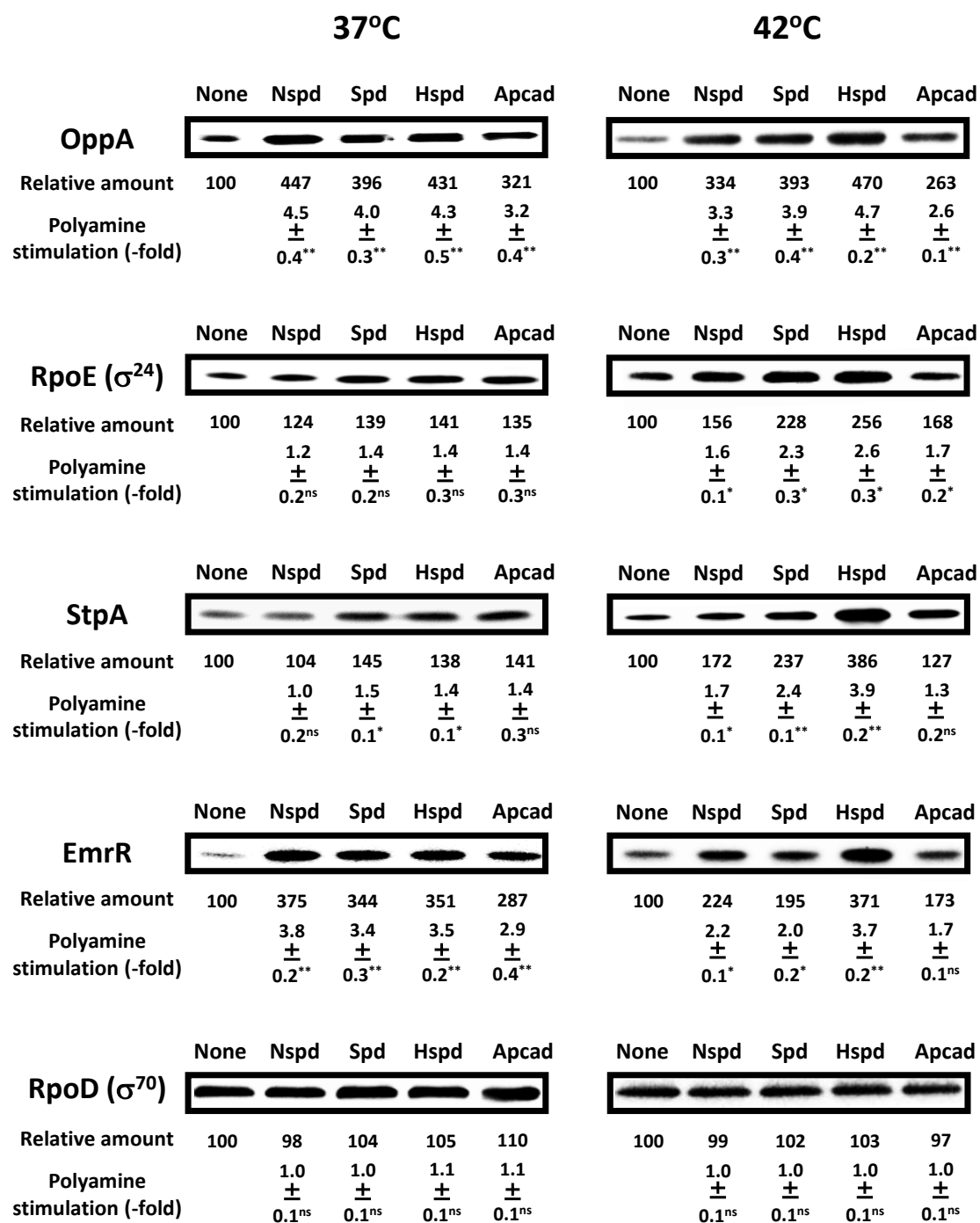


Fig. 18 スペルミジン構造類似体によるポリアミンモジュロン蛋白質の発現量の変化

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OppA、RpoE (σ²⁴)、StpA及びEmrRの発現量の変化を37°C及び42°Cにおいて、スペルミジン構造類似体の有無で比較した。コントロールとしてRpoD (σ⁷⁰) 蛋白質を用いた。値はmean ± SE (n=3) で表す。nsはp ≥ 0.05、*はp < 0.05、**はp < 0.01を表す。

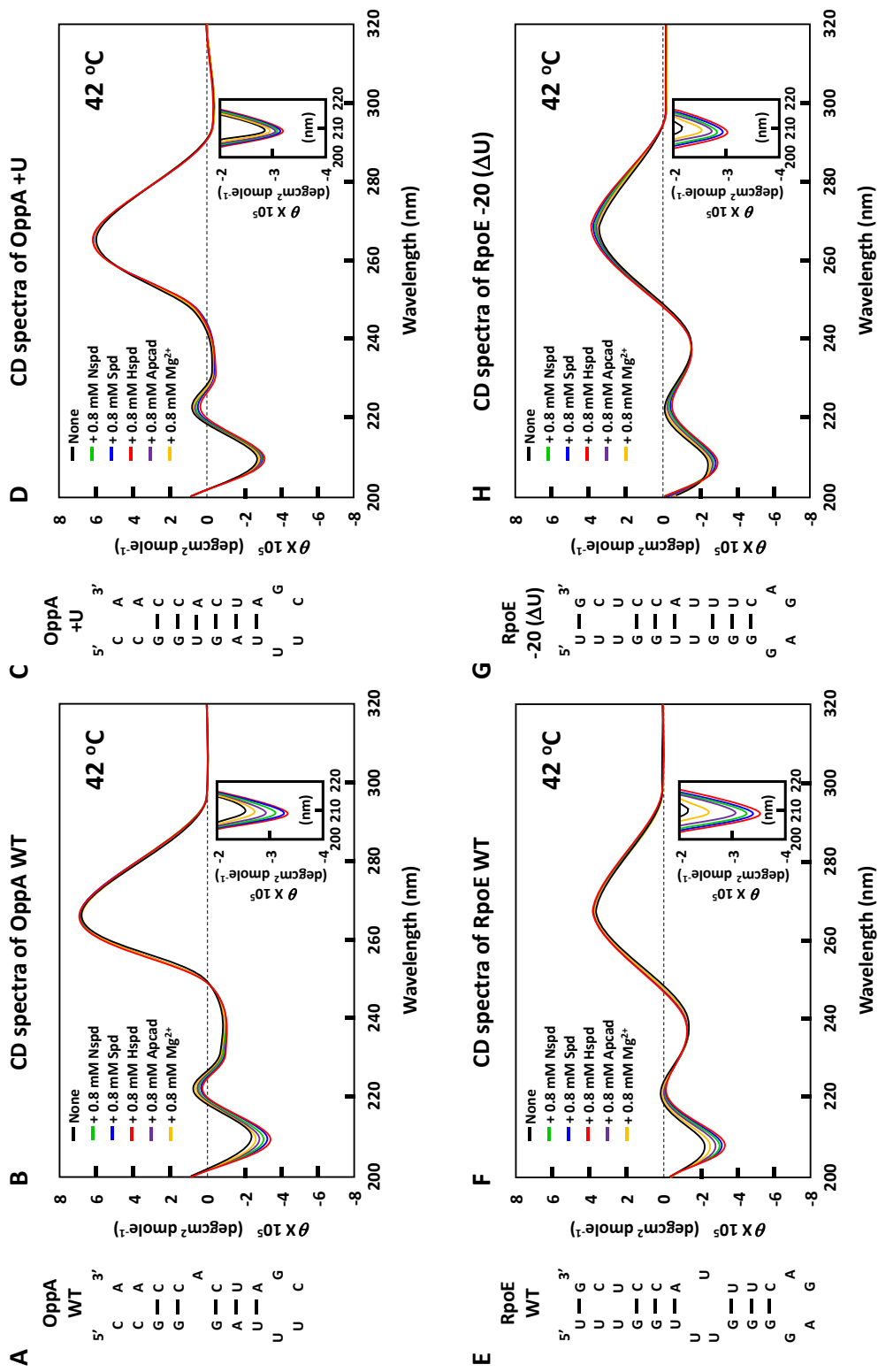
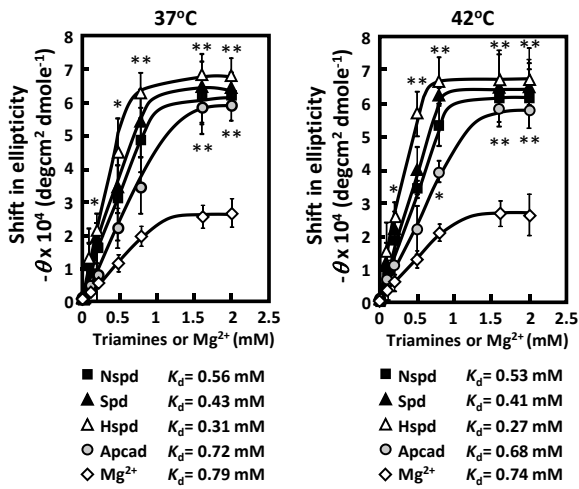


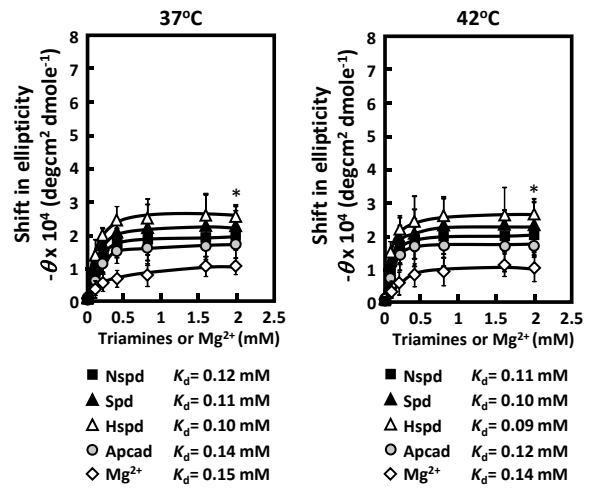
Fig. 19 円偏光二色性 (CD) によるOppA WT、OppA +U、RpoE WT及びRpoE -20 (ΔU) RNAの測定スペクトル

OppA WT、OppA +U、RpoE WT及びRpoE -20 (ΔU) RNAの2次構造 (A, C, E, G) 及びCDスペクトル (B, D, F, H) を示す。

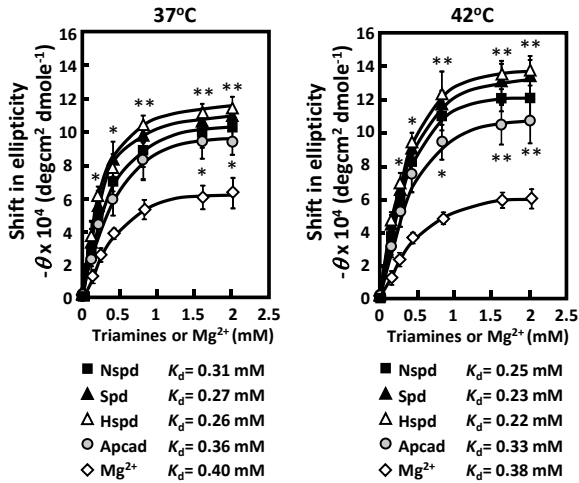
A OppA WT



B OppA +U



C RpoE WT



D RpoE -20 (ΔU)

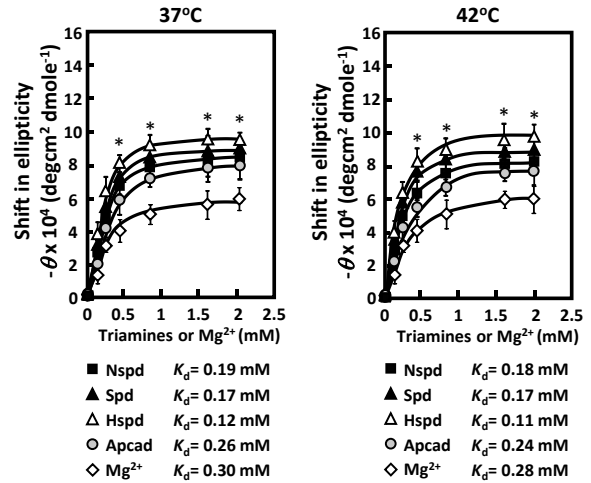


Fig. 20 円偏光二色性 (CD) によるOppA WT、OppA +U、RpoE WT及びRpoE -20 (ΔU) RNAの構造変化解析

OppA WT、OppA +U、RpoE WT及びRpoE -20 (ΔU) RNAの208nmにおける構造変化をスペルミジン構造類似体ごとに解析した。値はmean±SE (n=5) で表す。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す。

2-4 考察

一般的に原核生物においてポリアミンとしてはPut及びSpdが多く含まれているが、一部の原核生物ではSpdではなく、Nspd、HspdやApcad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【61-63】。そこで、本研究ではスペルミジン構造類似体を添加した際の変化を比較し、スペルミジン構造類似体間での生理的役割の差異を調べた。

初めに、大腸菌ポリアミン要求株MA261におけるスペルミジン構造類似体を添加した際の細胞増殖の変化を32°C、37°C及び42°Cで比較したところ、温度変化及びスペルミジン構造類似体間においても細胞増殖に違いが見られた。この結果は、スペルミジン構造類似体のRNAへの効果が異なることや、温度変化によるスペルミジン構造類似体の細胞内への取り込み活性の差異に依存することが考えられる。特に42°CにおいてHspdは、より効果的に細胞内に取り込まれていた (Fig. 15B)。通常Spdが細胞内に取り込まれると、細胞内においてPotD-Spd複合体が形成され、*potABCD*オペロンの転写抑制が起きるが、HspdはPotDとの親和性が弱いため、PotD-Hspd複合体を形成し辛い。その結果、PotD-Hspd複合体による*potABCD*オペロンの抑制効果は弱く、持続的にPotABCD蛋白質が発現することで、細胞内にHspdが多く取り込まれていた (Fig. 17)。さらに、*potD*遺伝子を欠損させた菌株MA261 *potD::km*において、32°CでNspdが細胞内に取り込まれ、細胞増殖が促進していた (Fig. 16)。他のスペルミジン構造類似体は取り込まれておらず、他のポリアミン輸送系を欠損させたKK3131においても、同様にNspdが細胞内に取り込まれていた (data not shown) ことから、大腸菌においてNspdのみを取り込む新規輸送系の存在が示唆された。Nspdは*Vibrio alginolyticus*において、バイオフィーム形成に寄与する【61】一方、最近の研究で*Pseudomonas aeruginosa*のバイオフィーム形成を逆に抑制し、形成されたバイオフィームを破壊することが見出されている【73】。従って、大腸菌においてNspdは低温下において、未知のトランスポーターにより取り込まれることで、細胞増殖やバイオフィーム形成に影響を与える可能性が示唆される。

また、4種のスペルミジン構造類似体 (Nspd、Spd、Hspd、Apcad) をそれぞれ添加時及び測定温度の変化時 (32°C、37°C、42°C) における細胞増殖及び蛋白質合成を調べた。その結果、32°Cにおいて最も短いスペルミジン構造類似体であるNspdが、42°Cにおいては長いスペルミジン構造類似体であるHspdが効果的に細胞増殖を促進した (Fig. 15A)。一方、Apcadはどの温度においても他のスペルミジン構造類似体と比較し、効果が弱く、細胞増殖速度が遅かった。これは、Apcadが他のスペルミジン構造類似体と比較し、RNAとの相互作用が弱いことに起因する (Fig. 20)。RNAのリン酸基間の距離は、平均的にmajor grooveにおいて6.35Å、minor grooveでは5.20Åであることが知られており【protein Data Bank code 1570】、Spdを構成するジアミノブタン基及びジアミノプロパン基においては、アミノ基間の長さはそれぞれ6.2Å及び5.0Åとリン酸基間の距離と類似している【74】。一方、Apcadが有するジアミノペンタン基においては約7.4Åと、リン酸基と効果的に相互作用するには長すぎる可能性が考えられる。そのため、Apcadにおけるアミノ基間の炭素鎖数が5つであることで、RNAにおけるリン酸基との相互作用が他のスペルミジン構造類似体の持つ炭素数3つ又は4つの場合と比較し、減弱する可能性

が示唆された。このことから、ポリアミンが効果的にRNAの構造を変化させるには、アミノ基間の距離も非常に重要であることが明らかになった。また、どのRNAにおいても、37°Cと比較し、42°Cにおいてスペルミジン構造類似体が効果的にRNAの構造を変化させていた (Fig. 20)。これは高温下において、RNAの高次構造を形成している水素結合が不安定となり、構造変化を引き起こしやすくなったためであると考えられる。従って、Hspdは42°Cにおいて、細胞内に多く取り込まれることに加え、RNAの構造を他のスペルミジン構造類似体と比較し、効果的に変化、安定化させることで蛋白質合成を翻訳レベルで促進し、高温下での細胞増殖に寄与していることが明らかとなった。

また、スペルミジン構造類似体によるRNAの相互作用を検討すると同時に、細胞内でRNAの安定化に寄与すること知られているMg²⁺においても検討を行ったが、Mg²⁺はRNAを十分に構造変化させるには至らなかった。これまでの研究の中でも、大腸菌及びラット肝臓でのセルフリー蛋白質合成システムにおいて、ポリアミンの細胞内至適濃度はPut > Spd > Spmとなっており、また、ポリアミンが至適なMg²⁺濃度を低下させることを明らかになっている【75】。このことから、Mg²⁺単独ではRNAの構造を十分に変化させ、安定化するには至らないが、生体内においてポリアミンとMg²⁺が協調的に働くことで、Mg²⁺が安定化することが出来ない2本鎖RNAのbulged-out構造の近傍を安定化し、RNAの安定化に寄与している可能性が考えられた。また、以前同様にMA261を用いて37°Cにおける OppA及びRpoE蛋白質の発現量の変化を調べた際には、ポリアミン無添加時と比較し、それぞれ5.1倍、2.3倍であり、本研究と差異が見られた【26, 76】。これは前回の研究時にはSpdではなくPutを添加していたため、Spdに加えPutも多量に細胞内に存在していたこと、さらに集菌のタイミングをA₅₄₀=0.5からA₅₄₀=0.3に変えたことが原因であると考えられる。

ポリアミンはほぼすべての生物が有しており、その欠損は致命的な影響を及ぼす。そのため、多くの原核生物においてRNAと相互作用し、RNAの安定化に寄与するのに適したポリアミンを合成することによって環境温度に適応することが考えられる。例えば、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* は、Spmよりも長鎖のポリアミンや分岐したポリアミン等の特殊ポリアミンを合成することで78°Cという高温下でも生育することが出来る【2, 3】。このように、生育温度でのRNAの構造及び可動性と特殊ポリアミンとの分子相互作用を研究することは、ポリアミンの生理的意義を研究する上で非常に重要である。

本研究によりスペルミジン構造類似体の中でもHspdが大腸菌における高温条件下での細胞増殖を促進することを見出した。このような生育限界温度の上昇は、発酵生産などの産業面において非常に有用である。特に酢酸菌などの有用発酵微生物では、一般的な生育環境温度が15-25°Cと低温であることから、発酵生産には厳密な温度管理が必要となる。従って、Hspdのような生育温度を向上させることのできる化合物は、発酵生産をより簡易的な設備で簡便に行える新規発酵生産技術の開発に繋がると期待される。

参考文献

1. Igarashi K., Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;**42**:39-51
2. Oshima T. Unique polyamines produced by an extreme thermophiles, *Thermus thermophilus*. *Amino Acids.* 2007;**33**:367–372
3. Oshima T., Moriya T., Terui Y. Identification, chemical synthesis, and biological functions of unusual polyamines produced by extreme thermophiles. *Methods Mol Biol.* 2011;**720**:81–111
4. Ogasawara T., Ito K., Igarashi K. Effect of polyamines on globin synthesis in a rabbit reticulocyte polyamine-free protein synthetic system. *J Biochem.* 1989;**105**:164-7.
5. Tabor CW., Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem.* 1984;**53**:749-90.
6. Tabor CW., Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev.* 1985;**49**:81-99.
7. Fukuchi J., Kashiwagi K., Takio K., Igarashi K. Properties and structure of spermidine acetyltransferase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1994;**269**:22581-5.
8. Kashiwagi K., Hosokawa N., Furuchi T., Kobayashi H., Sasakawa C., Yoshikawa M., Igarashi K. Isolation of polyamine transport-deficient mutants of *Escherichia coli* and cloning of the genes for polyamine transport proteins. *J Biol Chem.* 1990;**265**:20893-7.
9. Kashiwagi K., Suzuki T., Suzuki F., Furuchi T., Kobayashi H., and Igarashi K. Coexistence of the genes for putrescine transport protein and ornithine decarboxylase at 16 min on *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem.* 1991;**266**:20922-7.
10. Furuchi T., Kashiwagi K., Kobayashi H., Igarashi K. Characteristics of the gene for a spermidine and putrescine transport system that maps at 15 min on the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem.* 1991;**266**:20928-33.
11. Kashiwagi K., Miyamoto S., Suzuki F., Kobayashi H., Igarashi K. Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the *potE* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;**89**:4529-4533.
12. Higashi K., Ishigure H., Demizu R., Uemura T., Nishino K., Yamaguchi A., Kashiwagi K., Igarashi K. Identification of a spermidine excretion protein complex (MdtJI) in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2008;**190**:872-8.
13. Kurihara S., Oda S., Kato K., Kim H.G., Koyanagi T., Kumagai H., Suzuki H. A novel putrescine utilization pathway involves gamma-glutamylated intermediates of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem.* 2005;**280**:4602-8.
14. Kurihara S., Sakai Y., Suzuki H., Muth A., Phanstiel O. IV., Rather PN. Putrescine importer PlaP contributes to swarming motility and urothelial cell invasion in *Proteus mirabilis*. *J Biol Chem.* 2013;**288**:15668-76.
15. Watanabe S., Kusama-Eguchi K., Kobayashi H., Igarashi K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem.* 1991;**266**:20803-9.

16. Miyamoto S., Kashiwagi K., Ito K., Watanabe S., Igarashi K. Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*. 1993;**300**:63-8.
17. Feuerstein BG., Pattabiraman N., Marton LJ. Spermine-DNA interactions: a theoretical study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;**83**:5948-52.
18. Yuki M., Grukhin V., Lee CS., Haworth IS. Spermine binding to GC-rich DNA: experimental and theoretical studies. *Arch Biochem Biophys*. 1996;**325**:39-46.
19. Igarashi K., Kashiwagi K. Polyamine Modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines. *J Biochem*. 2006;**139**:11-6.
20. Igarashi K., Saisho T., Yuguchi M., Kashiwagi K. Molecular mechanism of polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein. *J Biol Chem*. 1997;**272**:4058-64.
21. Yoshida M., Kashiwagi K., Kawai G., Ishihama A., 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 σ^{28} subunit. *J Biol Chem*. 2001;**276**:16289-95.
22. Yoshida M., Kashiwagi K., Kawai G., Ishihama A., Igarashi K. Polyamines enhance synthesis of the RNA polymerase σ^{38} subunit by suppression of an amber termination codon in the open reading frame. *J Biol Chem*. 2002;**277**:37139-46.
23. Higashi K., Kashiwagi K., Taniguchi S., Terui Y., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K. Enhancement of +1 frameshift by polyamines during translation of polypeptide release factor 2 in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2006;**281**:9527-37.
24. Terui Y., Higashi K., Taniguchi S., Shigemasa A., Nishimura K., Yamamoto K., Kashiwagi K., Ishihama A., 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**:2359-68.
25. Yoshida M., Kashiwagi K., Shigemasa A., Taniguchi S., Yamamoto K., Makinoshima H., Ishihama A., Igarashi K. A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon. *J Biol Chem*. 2004;**279**:46008-13.
26. Terui Y., Higashi K., Tabei Y., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K., 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**:5348-57.
27. 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**:412-22.
28. Terui Y., Tabei Y., Akiyama M., Higashi K., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K., Kashiwagi K. Ribosome modulation factor, an important protein for cell viability encoded by the polyamine modulon. *J Biol Chem*. 2010;**285**:28698-707.

29. Sakamoto A., Terui Y., Yamamoto T., Kasahara T., Nakamura M., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Michael AJ., 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**:1877-86.
30. Yoshida M., Meksuriyen D., Kashiwagi K., Kawai G., Igarashi K. Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA). Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon AUG in *oppA* mRNA. *J Biol Chem.* 1999;**274**:22723-8.
31. Chiang SM., Schellhorn HE. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch Biochem Biophys.* 2012;**525**:161-9
32. Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* 2008;**77**:755-76.
33. Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol.* 2013;**11**:443-54.
34. Chasteen TG., Fuentes DE., Tantaleán JC., Vásquez CC. Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;**33**:820-32.
35. Elías AO., Abarca MJ., Montes RA., Chasteen TG., Pérez-Donoso JM., Vásquez CC. Tellurite enters *Escherichia coli* mainly through the PitA phosphate transporter. *Microbiologyopen.* 2012;**1**:259-67.
36. Cunningham-Rundles S, Maas WK. Isolation, characterization, and mapping of *Escherichia coli* mutants blocked in the synthesis of ornithine decarboxylase. *J Bacteriol.* 1975;**124**:791-9.
37. Kashiwagi K., Watanabe R., 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**:591-7.
38. Wilson K., Ausubel FM., Brent R., Kingston RE. Current Protocols in Molecular Biology. 1987;pp. 2.4.1-2.4.2, John Willey & Sons, Inc., New York, NY
39. Maniatis T., Fritsch EF., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory manual 1982;pp. 440-442, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
40. Ho SN., Hunt HD., Horton RM., Pullen JK., Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* 1989;**77**:51-9.
41. Shapira SK., Chou J., Richaud FV., 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.
42. 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**:248-54.
43. Nielsen PJ., Manchester KL., Towbin H., Gordon J., 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**:12316-21.
44. Nakamura A, Goto S. Analysis of protein carbonyls with 2, 4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis. *J Biochem.* 1996;**119**:768-74.
 45. Igarashi K., Kashiwagi K., Hamasaki H., Miura A., Kakegawa T., Hirose S., Matsuzaki S. Formation of a compensatory polyamine by *Escherichia coli* polyamine-requiring mutants during growth in the absence of polyamines. *J Bacteriol.* 1986;**166**:128-34.
 46. Wu J., Weiss B. Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1991;**173**:2864-71.
 47. Amábile-Cuevas CF., Demple B. Molecular characterization of the *soxRS* genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res.* 1991;**19**:4479-84.
 48. Kanai T., Takahashi K., Inoue H. Three distinct-type glutathione S-transferases from *Escherichia coli* important for defense against oxidative stress. *J Biochem.* 2006;**140**:703-11.
 49. Lomovskaya O., Lewis K., Matin A. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J Bacteriol.* 1995;**177**:2328-34.
 50. Watanabe K., Yamano Y., Murata K., Kimura A. The nucleotide sequence of the gene for gamma-glutamylcysteine synthetase of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 1986;**14**:4393-400.
 51. Wu J., Weiss B. Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1992;**174**:3915-20.
 52. Nunoshiba T., Hidalgo E., Amábile Cuevas CF., Demple B. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. *J Bacteriol.* 1992;**174**:6054-60.
 53. Yamada S., Awano N., Inubushi K., Maeda E., Nakamori S., Nishino K., Yamaguchi A., Takagi H. Effect of drug transporter genes on cysteine export and overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;**72**:4735-42.
 54. Schellhorn HE., Hassan HM. Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 1988;**170**:4286-92.
 55. Arenas FA., Díaz WA., Leal CA., Pérez-Donoso JM., Imlay JA., Vásquez CC. The *Escherichia coli* *btuE* gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;**398**:690-4.
 56. Ohtsu I., Wiriyathanawudhiwong N., Morigasaki S., Nakatani T., Kadokura H., Takagi H. The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2010;**285**:17479-87.
 57. Christman MF., Storz G., Ames BN. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;**86**:3484-8.

58. Ishihama A., Kori A., Koshio E., Yamada K., Maeda H., Shimada T., Makinoshima H., Iwata A., Fujita N. Intracellular concentrations of 65 species of transcription factors with known regulatory functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2014;**196**:2718-27.
59. Suzuki H., Kumagai H., Tochikura T. Isolation, genetic mapping, and characterization of *Escherichia coli* K-12 mutants lacking gamma-glutamyltranspeptidase. *J Bacteriol.* 1987;**169**:3926-31.
60. Chattopadhyay MK., Tabor CW., Tabor H. Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;**100**:2261-5.
61. Yamamoto S., Hamanaka K., Suemoto Y., Ono B., Shinoda S. Evidence for the presence of a novel biosynthetic pathway for norspermidine in *Vibrio*. *Can J Microbiol.* 1986;**32**:99-103.
62. Yamamoto S., Nagata S., Kusaba K. Purification and characterization of homospermidine synthase in *Acinetobacter tartarogenes* ATCC 31105. *J Biochem.* 1993;**114**:45-9.
63. Linderoth N., Morris DR. Structural specificity of the triamines sym-homospermidine and aminopropylcadaverine in stimulating growth of spermidine auxotrophs of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;**117**:616-22.
64. Kashiwagi K., Miyamoto S., Nukui E., Kobayashi H., Igarashi K. Functions of potA and potD proteins in spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1993;**268**:19358-63.
65. Terui Y., Saroj SD., Sakamoto A., Yoshida T., Higashi K., Kurihara S., Suzuki H., Toida T., Kashiwagi K., Igarashi K. Properties of putrescine uptake by PotFGHI and PuuP and their physiological significance in *Escherichia coli*. *Amino Acids.* 2014;**46**:661-70.
66. Niitsu M, Samejima K. Synthesis of a series of linear pentaamines with three and four methylene chain intervals. *Chem Pharm Bull.* 1986;**34**:1032-8.
67. Niitsu M, Samejima K, Matsuzaki S, Hamana K. Systematic analysis of naturally occurring linear and branched polyamines by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.* 1993;**641**:115-23.
68. Igarashi K., Kashiwagi K. Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol Biochem.* 2010;**48**:506-12.
69. Sugiyama S., Vassilyev DG., Matsushima M., Kashiwagi K., Igarashi K., Morikawa K. Crystal structure of PotD, the primary receptor of the polyamine transport system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1996;**271**:9519-25.
70. Kashiwagi K., Pistocchi R., Shibuya S., Sugiyama S., Morikawa K., Igarashi K. Spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. Identification of amino acids involved in polyamine binding in PotD protein. *J Biol Chem.* 1996;**271**:12205-8.
71. Antognoni F., Del Duca S., Kuraishi A., Kawabe E., Fukuchi-Shimogori T., Kashiwagi K., Igarashi K. Transcriptional inhibition of the operon for the spermidine uptake system by the substrate-binding protein PotD. *J Biol Chem.* 1999;**274**:1942-8.

72. Nakano S., Kanzaki T., 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**:1088-95.
73. Qu L., She P., Wang Y., Liu F., Zhang D., Chen L., Luo Z., Xu H., Qi Y., Wu Y. Effects of norspermidine on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and eradication. *Microbiologyopen.* 2016;**5**:402-12.
74. Ouameur AA., Tajmir-Riahi HA. Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis. *J Biol Chem.* 2004;**279**:42041-54.
75. Igarashi K., Sugawara K., Izumi I., Nagayama C., Hirose S. Effect of polyamines of polyphenylalanine synthesis by *Escherichia coli* and rat-liver ribosomes. *Eur J Biochem.* 1974;**48**:495-502.
76. Higashi K., Terui Y., Suganami A., Tamura Y., Nishimura K., Kashiwagi K., 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**:32989-94.

結論

本研究では、原核生物におけるポリアミンのストレス下での生理的役割を明らかにするため、酸化ストレス及び高温下におけるポリアミンの適応化機構の解明を行った。

第一章では、大腸菌における酸化ストレス下でのポリアミン役割を調べた。ポリアミン非存在下において、酸化ストレス添加により、細胞増殖及び生存率は大きく減少したが、ポリアミンの添加により、細胞増殖及び生存率は回復し、酸化ストレス除去に重要なグルタチオンの細胞内含量は2~3倍と著しく増加した。そこで、酸化ストレスの除去に関与する新規ポリアミンモジュロンを探索したところ、*soxR*、*emrR*及び*gshA*の3種の遺伝子を新規ポリアミンモジュロンとして同定した。これら新規ポリアミンモジュロン蛋白質の過剰発現株では、ポリアミン非存在下において酸化ストレスへの抵抗性が向上することを見出し、SoxR、EmrR及びGshAが酸化ストレスの除去に重要であることを明らかにした。また、EmrR及びGshAはグルタチオン合成の促進に寄与する一方、SoxRは定常期におけるストレス除去に大きな役割を果たすポリアミンモジュロンであるRpoSと共に、下流の様々な遺伝子 (*katE*、*katG*、*soxS*、*sodA* など) の転写を制御することで酸化ストレスの除去に寄与していた。従って、ポリアミンはSoxR、EmrR、GshA及びRpoSの合成を促進し、グルタチオン合成及び酸化ストレス除去に重要な遺伝子の発現を制御することで、酸化ストレスへの抵抗性を向上させることが明らかとなった。

第二章では生育温度を変化させ、スペルミジン構造類似体 (Nspd、Spd、Hspd、Apcad) を添加した際の細胞増殖、蛋白質発現量及びRNAの構造変化を調べた。スペルミジン構造類似体添加時における細胞増殖の変化を比較したところ、高温条件下である42°Cにおいて、Hspdが細胞増殖を促進することを見出した。この時、Hspdは細胞内へと多量に取り込まれていた。これは、Hspdが大腸菌のSpd優先取り込み系であるPotABCDの負のフィードバック機構による取り込み抑制を起こしづらく、持続的に取り込まれることが要因であった。また、42°CにおいてHspdは、RNAの構造をより効果的に変化させることで、いくつかのポリアミンモジュロン蛋白質合成を促進していた。従って、Hspdは高温環境下において、他のスペルミジン構造類似体と比較し、細胞内に多く取り込まれること、及びRNAの構造を効果的に変化させ、蛋白質合成を促進することで、高温環境下に適応していることが明らかとなった。

これまでの研究を含め、本研究により大腸菌におけるポリアミンモジュロンが20種同定された。これらポリアミンモジュロンの多くが直接、若しくは間接的にストレス除去に寄与する遺伝子であると共に、その多くが転写因子であるため、ポリアミンは多種の遺伝子発現を制御することで、ストレスの除去に関与している。また、ポリアミンはその構造の違いにより、生理機能が異なることを明らかにし、高温適応化にHspdが重要であることを見出した。従って、本研究により原核生物はそれぞれの有するポリアミンによりRNAの構造変化を通して、種々の蛋白質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。

謝辞

終わりに臨み、配属時より7年間という長期間にわたり、御指導、御鞭撻のほど賜りました柏木敬子教授に心より感謝致します。本研究を遂行するにあたり、研究室配属当初より研究内容への御助言や御指導くださり、また、社会的な常識などの一般的な部分におきましても御教授戴きました照井祐介教授に深く感謝致します。学部時代は先輩として、院生からは先生として、実験の手技、手法など多くのことを直接御指導戴きました坂本明彦助教に心より感謝致します。

本研究に数々の御助言、御協力戴き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、山本兼由教授並びに城西大学 杉田義明教授、高尾浩一准教授、京都工芸繊維大学 鈴木秀之教授に感謝致します。

平成26年度より3年間、博士後期課程奨学生として多額の経済的援助を賜りました公益財団法人 双葉電子記念財団に深く感謝いたします。また、平成29年度より、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金を賜りました公益社団法人 日本薬学会に心より感謝致します。賜りました経済的援助により、研究に没頭することができ、結果を残すことが叶いました。心より御礼を申し上げます。

日々の実験でお世話になりました病態生化学教室の皆様に心から感謝致します。共に笑い、苦悩し、過ごした研究室での日々は私の大切な人生の財産です。

最後に、私をここまで支えてくれました両親や家族、大切な友人に心より御礼を申し上げます。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) 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.

審査委員

本学位論文の審査は千葉科学大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査員により行われた。

主査	千葉科学大学大学院 (薬学研究科)	薬学博士	柏木	敬子
副査	千葉科学大学大学院 (薬学研究科)	薬学博士	増澤	俊幸
副査	千葉科学大学大学院 (薬学研究科)	薬学博士	細川	正清
副査	千葉科学大学大学院 (薬学研究科)	薬学博士	榊	泰宏