

ポリアミンによる細胞増殖促進に関与する遺伝子群の調節部位の同定

Identification of polyamine regulatory site on the genes involved in the polyamine stimulation of cell growth

代表研究者 千葉大学薬学部助手 柏木 敬子
Res. Assoc. Faculty of Pharmaceutical Sci., Chiba Univ.
Keiko KASHIWAGI

1. The nucleotides in the 70-170 region upstream from the initiator AUG of ornithine decarboxylase (ODC) mRNA have been shown to be important in the strong stimulation of ODC synthesis by low spermidine concentrations and in the inhibition of ODC synthesis at high spermidine concentrations. In this region, a GC-rich sequence as well as a small open reading frame existed. In order to clarify which of these was of greater importance for the spermidine regulation of ODC synthesis, the synthesis was performed with various ODC mRNAs, possessing different sizes and nucleotide sequences in the 5'-untranslated region (5'-UTR) in a rabbit reticulocyte cell-free system. The results show that a GC-rich sequence, but not a small potential leader peptide, plays an important role in the spermidine regulation of ODC synthesis.

2. The effect of spermidine on the synthesis of ODC, S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) and β -actin was studied using mRNAs for three proteins constructed by attaching the three kinds of 5'-UTR to the open reading frames. The 5'-UTR was either short nucleotides, about 190 nucleotides containing the continuous GC double-stranded region of ODC mRNA (ODC 5'-UTR), or about 250 nucleotides containing no continuous GC double-stranded region of SAMDC mRNA (SAMDC 5'-UTR). Three proteins were chosen since the GC content of the coding sequence was different to each other (ODC, 48%, SAMDC 43%, and β -actin, 54%). When the mRNA containing ODC 5'-UTR was used, the synthesis of ODC, SAMDC and β -actin was strongly stimulated by the low concentration of spermidine (0.2 mM), and was greatly inhibited by the high concentration of spermidine (1 mM). When the mRNA contained SAMDC 5'-UTR, the stimulation of protein synthesis by 0.2 mM spermidine slightly increased in comparison of the results with the short 5'-UTR. The degree of inhibition by 1 mM spermidine was also small. The results show that the continuous GC double-stranded region in the 5'-UTR, but not in the open reading frame, plays an important role in the spermidine regulation of protein synthesis.

研究目的

ポリアミン (プトレスシン, スベルミジン, スベルミン) は生物界に普遍的に存在する低分子塩基性の生理活性物質で, 細胞増殖に重要な役割を果たすばかりでなく, 最近ではある種の細胞分化 (軟骨細胞等) にも関与することが知られている。私達の研究室ではこのポリアミンによる細胞増殖促進作用を蛋白質合成の面から研究し, 以下のことを明らかにしている。1) ポリアミンはリボゾームのアセンブリー (rRNA とリボゾーム蛋白質の

自己集合) を促進し, 全体の蛋白質合成を上昇させる。2) ポリアミンは細胞増殖に重要な特定蛋白質の合成を翻訳開始レベルで促進する。3) 大腸菌ではオリゴペプチド結合蛋白質 (oppA 蛋白質) の合成¹⁾が, 真核細胞ではポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の合成が特に強い促進を受ける。また, ODC 合成は高濃度のポリアミンにより阻害を受け, ポリアミンによる自律調節が翻訳レベルで行われている。

これらポリアミンの効果は核酸との相互作用に

より発揮されるので、核酸上のポリアミン認識部位を明らかにすべく、以下の実験を行った。すなわち、マウス ODC の 5'-untranslated region (5'-UTR) を持つ種々の mRNA や 5'-UTR の塩基配列の異なる ODC mRNA を調製し、ポリアミンの効果を検討した。一方大腸菌では oppA 蛋白質の mRNA 及び遺伝子の構造を解析し、ポリアミン結合部位の同定を試みた。

研究経過

1. 5'-UTR の異なるマウス ODC mRNA 依存 ODC 合成に対するポリアミンの効果

ODC 合成は低濃度のスペルミジンで強く促進され、高濃度スペルミジンで阻害される。このスペルミジンによる合成調節には ODC mRNA の 5'-UTR の開始コドン AUG より上流 70~170 塩基に存在するヌクレオチド配列が関与していることを私達は既に報告した²⁾。この領域には GC rich な二重鎖領域と短いペプチドをコードでき

る小さい open reading frame が存在する。このいずれかがポリアミンによる ODC 合成調節に関与しているかを明らかにするために以下の実験を行った。

5'-UTR の異なるマウス ODC mRNA を合成するために、ODC cDNA を site-directed mutagenesis の手法と種々の制限酵素を用い、5'-UTR 領域の長さや塩基配列の異なる cDNA を調製した。その cDNA より SP6 RNA ポリメラーゼを用い種々の ODC mRNA を合成した。合成した mRNA は、mODC188 (5'-UTR のヌクレオチド数が 188)。mODC188^{AU→CG}, mODC188^{AU→UA} (いずれも 5'-UTR 中の小さい open reading frame の開始コドンをなくしたもの)、mODC161, mODC124 (5'-UTR のヌクレオチド数が 161 または 124)、mODC161AU (5'-UTR 中の GC 二重鎖を AU 二重鎖に変えたもの)であった。

Table 1. Degree of spermidine stimulation of ODC synthesis directed by ODC mRNA templates with different sizes and unclotide sequences of 5'-UTR.

mRNA	ΔG (kcal/mol)	Mg ²⁺ (mM)	SPD (mM)	[³⁵ S]Met incorporated (fmol)	Degree of SPD stimulation (-fold)
mODC188	-92.0	1.5	-	11.6 ± 2.74	18.8
		1.5	0.2	218 ± 24	
mODC188 ^{AU→CG}	-92.0	1.5	-	14.5 ± 3.15	18.1
		1.5	0.2	263 ± 34	
mODC188 ^{AU→UA}	-92.0	1.5	-	13.4 ± 3.39	18.5
		1.5	0.2	248 ± 25	
mODC161	-65.0	1.5	-	33.5 ± 6.31	15.0
		1.5	0.2	501 ± 33	
mODC124	-39.4	1.5	-	152 ± 18	10.7
		1.5	0.2	1630 ± 123	
mODC161AU	-46.0	1.5	-	149 ± 17	10.5
		1.5	0.2	1567 ± 135	

The values are expressed as mean ± S.D. The degree of spermidine stimulation is the ratio of the amount of ODC synthesized in the presence of 1.5 mM Mg²⁺ and 0.2 mM spermidine to that in the presence of 1.5 mM Mg²⁺ only. Free energy (ΔG) for the formation of the secondary structure of the 5'-UTR was calculated on the basis of the data of Salser.

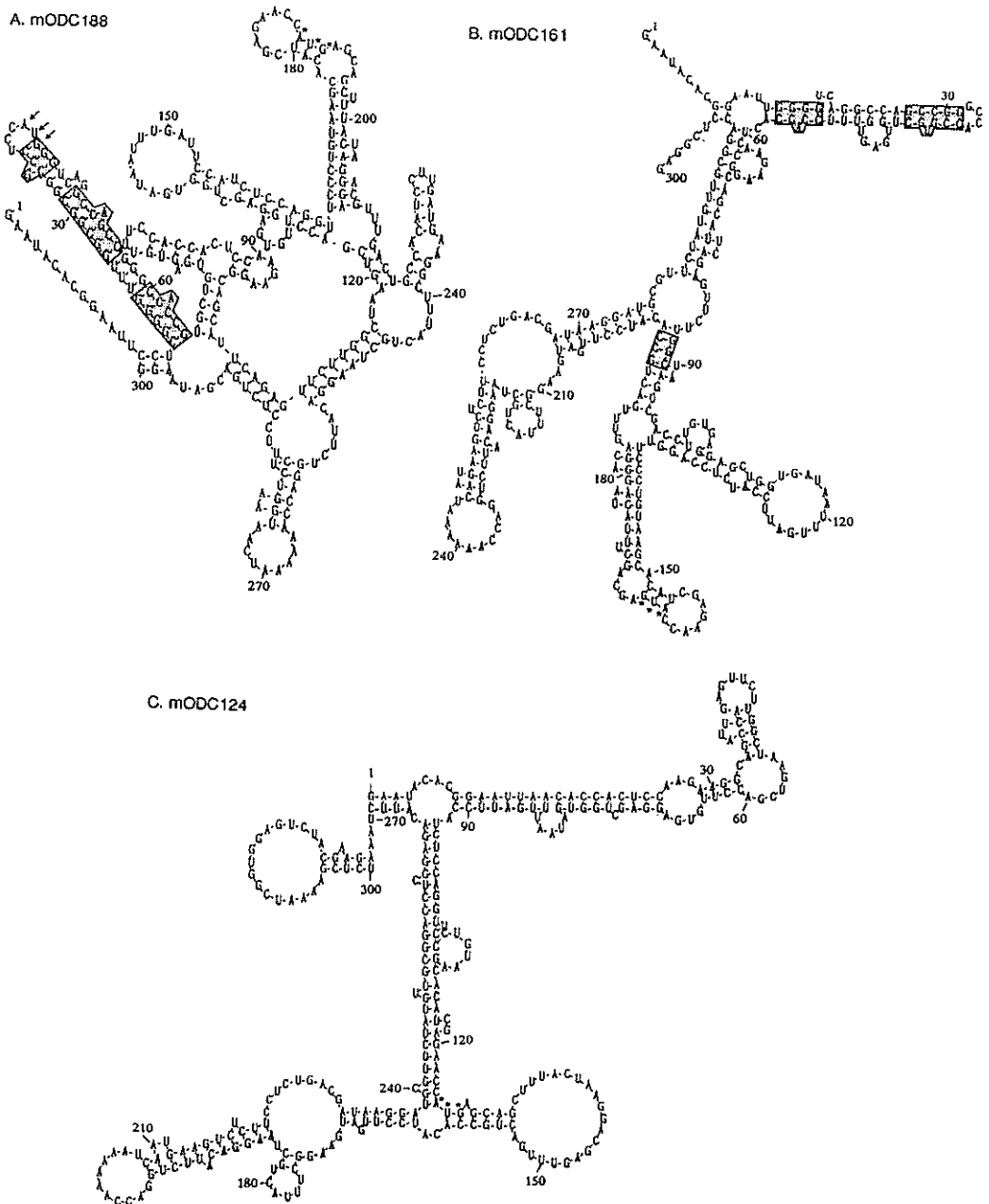


Fig. 1. Possible secondary structure of ODC mRNAs. Continuous GC stems were shadowed. The initiator AUGs of a potential leader peptide and ODC were indicated by arrows and stars, respectively.

ウサギ網状赤血球の無細胞蛋白質合成系にこれら ODC mRNA を添加し、ODC 合成を行いスペルミジンの効果を調べた。ウサギ網状赤血球の lysate は Sephadex G-25 カラムを 2 回通すこと

によりポリアミンを除いた。低濃度スペルミジン (0.2 mM) による ODC 合成の促進効果を Table 1 に示す。mODC188, mODC188^{AU→CG}, mODC188^{AU→UA} 依存の ODC 合成のスペルミジンによ

ODC 5'-UTR		ORF	ΔG (kcal/mol)					
Cap- <u>GAAUACACGG</u>	<u>AUUCCUCGG</u>	GGUUUGGCGG	CGGCGCCUCC	AUGGGUCAGG	50			
CCAGCCGGGC	CACCGUCUG	UGAGUUUUC	CACCACUCCA	AGAAGGCAGC	100			
AUUCAGAGUU	CUUGGCUAAG	UCGACCUUGU	GAGGAGCUGG	UGAUAAUUUG	150			
AUCCAUCUC	CAGGUUCCU	GUAAGCACAU	CGAGA <u>CCAU</u>	G	188	ODC	-91.2	
			CU	CGAGGUA <u>UG</u>	187	SAMDC	-90.6	
			CU	CGAGCC <u>AUG</u>	187	Actin	-90.6	
			CU	CGAGGCA <u>AUG</u>	187	TK	-91.3	
SAMDC 5'-UTR								
Cap- <u>GAAUACAAGC</u>	<u>UUGGGCUGCA</u>	GCUAUUCCA	AAAGACUCAC	GUUCAACUUU	50			
CGCUCACACA	AAGCCGGGAA	AAUUUUUUA	GUCCUUUUUU	UAAAAAAGU	100			
UAAUUAUAAA	UUAVAGCAA	AAAAAAAAGG	AACCUGAACU	UUAGUAAACAC	150			
AGCUGGAACA	AUCGCAGCGG	CGGCGGCAGC	GGCGGAGAA	GAGGUUUAAU	200			
UUAGUUGAUU	UUCUGUGGUU	GUUGGUUGUU	CGCUAGUCUC	GAGA <u>CCAU</u>	247	ODC	-68.6	
				CUC	ACGGU <u>GAUG</u>	246	SAMDC	-64.7
				CUC	GAGCC <u>CAUG</u>	246	Actin	-72.8
				CUC	GAGGCA <u>AUG</u>	246	TK	-67.9
No 5'-UTR								
Cap- <u>GAAUACAAGC</u>	<u>UUGGGCUGCA</u>	GUUCGAGAAC	CA <u>UG</u>		31	ODC	-2.9	
		GUCGAGGUG	A <u>UG</u>		30	SAMDC	-2.0	
		GUCGAGCCC	A <u>UG</u>		30	Actin	-11.3	
		GUCGAGGCA	A <u>UG</u>		30	TK	-3.7	

Fig. 2. Nucleotide sequence of the 5'-UTR of various mRNAs and the calculated free energy for secondary structure formation of the 5'-UTR.

る促進はほぼ等しく、5'-UTR中の小さい open reading frame はポリアミンによる ODC 合成調節に関与していないことが明らかとなった。

ついで、5'-UTR中のGC二重鎖の効果を検討した。これは5'-UTR中の長さを減少させ、RNA中のGC二重鎖をなくすか、またはGC二重鎖をAU二重鎖に変えた ODC mRNA を用いて行った。Fig. 1に3種の ODC mRNA の5'-UTR中のGC二重鎖構造を示した。mODC124になると全くGC二重鎖が5'-UTR中に存在しなくなる。Table 1に示すように、GC二重鎖が少なくなるにつれて、ポリアミンによる合成促進率が減少した。

高濃度スベルミジン(1 mM)は逆に ODC 合成を強く阻害する。この阻害に関与する塩基配列も、5'-UTR中のGC二重鎖領域であり、mODC124やmODC161AUでは、あまり阻害が認められなかった。

これらの結果より、ODC mRNAの5'-UTR中のGC二重鎖構造がポリアミンにより構造変化を受け、ODC合成のポリアミンによる調節(低濃度での合成促進、高濃度での合成阻害)に関与していることが明らかになった。

2. キメラ mRNA (種類の異なる5'-UTRと open reading frame を組み合わせた mRNA) 依存蛋白質合成に対するスベルミジンの効果

ODC mRNAの5'-UTR中のGC二重鎖領域がポリアミンによる合成調節に重要であることを明確にするために、ODC mRNAの5'-UTR(ODC 5'-UTR)、5'-UTR中に連続したGC二重鎖が存在しないS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素(SAMDC)の5'-UTR(SAMDC 5'-UTR)、非常に短い5'-UTR(No 5'-UTR)の3種を、GC含量の異なる open reading frame (ORF) につなぎ、計12種のキメラ mRNA を合成した (Fig. 2)。

ORF 中の GC 含量はチミジンキナーゼ (TK) (60%) > アクチン (Actin) (53%) > ODC (48%) > SAMDC (43%) であった。これらキメラ mRNA を用いて蛋白質合成を行い、ポリアミンの効果を検討した。

低濃度スベルミジン (0.2 mM) による合成促進効果は、5'-UTR が ODC のものが、ORF が TK のもの (ODC 5'-UTR-TK) 以外は最も強く、これまでの実験結果を支持した。ODC 5'-UTR-TK の場合、mRNA 中の GC 含量が非常に高く、最大合成促進に必要なスベルミジンの濃度が 0.2 mM から 0.06 mM に低下しており、このキメラ mRNA にはスベルミジンが強く結合しすぎ、mRNA の二次構造を強固なものにしたと考えられる。その結果、スベルミジンによる蛋白質合成促進率が低下したものと推測している。私達はスベルミジンが AU rich な RNA よりも GU rich な RNA に強く結合することを既に報告している。

SAMDC 5'-UTR と No 5'-UTR を比較してみると、SAMDC 5'-UTR の方がスベルミジンによる合成促進率が高かった。5'-UTR 中に連続した GC 二重鎖がなくとも、5'-UTR のポリアミンによる構造変化は蛋白質合成効率に影響するようである。

また、mRNA の ORF 中の GC 含量が高い場合は蛋白質合成量は低下するが、ポリアミンによる合成促進にはあまり影響を与えなかった。この結果はポリアミンによる RNA の二次構造の変化は、40S リボゾーム亜粒子の mRNA 上のスキャンニングに強く影響するが、蛋白質合成中の 80S リボゾームの mRNA 上の移動にはあまり影響を与えないことを意味している。

3. 大腸菌 oppA 蛋白質の mRNA および遺伝子の構造解析

大腸菌遺伝地図上 27 分に存在する oppA 遺伝子¹⁾を、PI 形質導入によりカナマイシン耐性遺伝子を挿入して不活化した。この不活化はウェスタンブロットにより確認した。この大腸菌にマルチコピーベクターである pACYC184 に接続した oppA 遺伝子を導入し、ポリアミンの効果を調べたところ、oppA 蛋白質のポリアミンによる合成

促進は認められなかった。ついで、コピー数の少ない pMW119 に接続した oppA 遺伝子を導入したところ、ポリアミンによる合成促進が認められた。

S1 マッピングとプライマー伸長法により転写の開始点を決定した。その場所は開始コドン、AUG の上流 465 ヌクレオチド (nt) の点であり、5'-UTR が異常に長かった。この 5'-UTR の長さを 200 nt に短縮したところ、oppA 蛋白質のポリアミンによる合成促進が消滅した。したがって、5'-UTR の 200 から 465 nt の間の 265 nt 中にポリアミン認識部位が存在すると結論された。この部分には調節蛋白質によって認識される leucine responsive element (TTTATTGGTAAT) も含まれており、ロイシンによる oppA 蛋白質の合成促進が確認された。また、oppA 遺伝子のプロモーター部位に IS2 (insertion sequence 2) が存在しており、翻訳レベルだけでなく転写レベルでのポリアミンによる調節も興味深い。大腸菌でも核酸上のポリアミン認識部位の解明は間近であると考えている。

研究成果

ポリアミンによる蛋白質合成促進は、リボゾームの活性化による全体の蛋白質合成促進と、細胞増殖に重要な特定蛋白質の合成促進がある。今回の研究により、mRNA 中の 5'-UTR 領域中の GC 二重鎖構造がポリアミンによる特定蛋白質合成促進に重要であることが明らかとなった。大腸菌でも核酸上のポリアミン認識部位が明らかになりつつある。

今後の課題と発展

ポリアミンによる特定蛋白質合成促進に関与する核酸上のポリアミン認識部位が mRNA の 5'-UTR 中の GC rich な二重鎖 RNA 領域であるということ以外、未だ詳しく解析されていない。したがって、GC rich でかつ塩基配列の異なる 5'-UTR を持つ数種の mRNA を調製し、詳細なポリアミン認識部位の解析を行う。大腸菌でも核酸上の認識部位の同定を oppA 蛋白質の遺伝子および mRNA を用いて行う。

核酸上のポリアミン認識部位が同定されると、

ポリアミンにより合成促進をうける蛋白質の予測がその遺伝子の塩基配列から可能となり、ポリアミンにより合成促進をうける蛋白質の同定が一段と加速される。これら蛋白質の同定により、ポリアミンの細胞増殖・分化に果たす役割の解析が分子レベルで進むと思われる。

最後に、本研究に対しご援助下さいました日産科学振興財団に心より感謝申し上げます。

発表論文リスト

- 1) 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.*, **265**, 8387-8391 (1990).
- 2) 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.*, **265**, 13036-13041 (1990).
- 3) Kashiwagi, K., Ito, K., and Igarashi, K.: Spermidine regulation of ornithine decarboxylase synthesis by a GC-rich sequence of the 5'-untranslated region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 815-822 (1991).
- 4) 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.*, **266**, 20922-20927 (1991).
- 5) Kashiwagi, K., Miyaji, A., Ikeda, S., Tobe, T., Sasakawa, C., and Igarashi, K.: Increase of the sensitivity to aminoglycoside antibiotics by polyamine-induced protein (oligopeptide-binding protein) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **174**, 4331-4337 (1992).