

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580083

研究課題名（和文）シアノバクテリアの環境適応に果たす HtpG（Hsp90）の役割

研究課題名（英文）Role of HtpG（Hsp90） in cyanobacterial adaptation to environmental stresses

研究代表者

仲本 準（NAKAMOTO HITOSHI）

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：30192678

研究成果の概要（和文）：

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株の HtpG（Hsp90）と DnaK2（Hsp70）/DnaJ2（Hsp40）/GrpE（NEF）シャペロン系の物理的相互作用と協同的シャペロン作用を初めて明らかにした。この協同的シャペロン作用において、DnaJ2 は、DnaK2 のみならず HtpG のコシャペロンとしても働く。シアノバクテリアの HtpG は、高温、低温、強光等の環境ストレス下で重要な働きをするが、他のシャペロンやコシャペロンと機能的複合体を形成してシャペロン機能を果たすことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We established the cyanobacterial HtpG-DnaK2-DnaJ2-GrpE chaperone machine. In this machine, HtpG, DnaK2 and DnaJ2 physically interacted each other. The heat-denatured protein substrates trapped by HtpG could be transferred to DnaK2 to be refolded. The present study indicated that HtpG forms a functional complex with DnaK2 and DnaJ2 to chaperone other proteins under environmental stresses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物生態学、分子シャペロン

1. 研究開始当初の背景

代表的分子シャペロンの一つである Hsp90 は、種々のプロテインキナーゼやステロイドホルモン受容体などの細胞増殖や分化に重要な役割を果たす多くのシグナル伝達分子等と相互作用し、これらの構造・機能及び安定性を保証している。Hsp90 は、Hsp70 等の

シャペロンや Hop や Cdc37 などのコシャペロン（シャペロン補助因子）と機能的複合体を形成している。コシャペロンは、Hsp90 の基質タンパク質を特異的に認識・結合・リクルートするのみならず、Hsp90 の ATPase 活性を阻害あるいは活性化することでシャペロン作用を調節する。

Hsp90 の祖先タンパク質は HtpG であるが、大腸菌や枯草菌等の従属栄養真正細菌における HtpG の機能は不明であった。これに対して我々は、独立栄養真正細菌であるシアノバクテリア（藍藻）の HtpG が環境応答において重要な働きをすることを初めて見出したが、そのシャペロン機構は全く解明されていない。真核生物以外の生物では、コシャペロンが存在するという報告はなく、HtpG を含むタンパク質複合体形成や HtpG と他のシャペロンとの協同作業に関する研究もほとんど行われていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下に述べた仮説を検証し、環境応答における HtpG の働きを分子レベルで明らかにすることである。

(1) シアノバクテリアの HtpG は、DnaK や DnaJ などのシャペロンやコシャペロンと物理的に相互作用する。

(2) HtpG は DnaK/DnaJ/GrpE シャペロン系と協同で変性基質の再折りたたみを助ける。

(3) シアノバクテリアの HtpG は、コシャペロンを介して多様な基質タンパク質と特異的に相互作用し、それらの機能や安定性を維持あるいは調節することで環境応答における重要な働きをする

3. 研究の方法

(1) 酵母ツーハイブリッド法、免疫沈降法やプルダウン法等によって、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株の HtpG と相互作用するコシャペロン、シャペロン及び基質等を探索・同定する。

(2) HtpG と相互作用するコシャペロン、シャペロン及び基質等を大量発現する大腸菌株を構築し、それぞれを精製する。

(3) 単離・精製された HtpG とコシャペロンやシャペロン等の相互作用を、免疫沈降法、プルダウン法あるいは表面プラズモン共鳴法等で、定性的あるいは定量的に解析する。

(4) HtpG、コシャペロン及びシャペロン間の、シャペロン協同作業を解析する。

4. 研究成果

(1) HtpG は DnaK2 及び DnaJ2 と、DnaJ2 は DnaK2 と物理的に相互作用することが、酵母ツーハイブリッド法、免疫沈降法やプルダウン法によって明らかになった（図 1）。DnaK や DnaJ には複数のホモログが存在するが、DnaK2 と DnaJ2 は高温や強光等のストレスで誘導されるストレスタンパク質である。

(2) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー（BIACORE）を用いて複合体の解離定数等を求めることにより、HtpG と DnaJ2 の親和性の

方が、HtpG と DnaK2 のそれよりも大きいことを明らかにした。DnaJ2 は、DnaK2 のみならず、HtpG のコシャペロンとしても機能するのではないかと考えた。

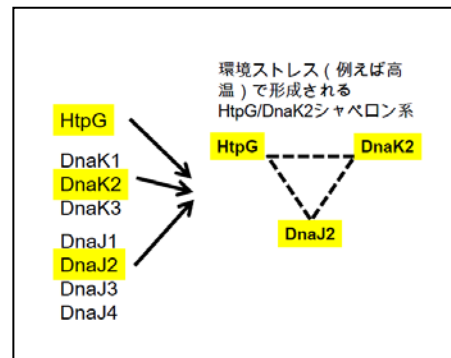


図 1. 環境ストレス下では、HtpG、DnaK2 及び DnaJ2 が誘導されて、複合体を形成する。

(3) HtpG が変性基質タンパク質と安定な複合体を形成し、基質の凝集を抑制するのに対して、(予期に反して) DnaJ2 の (熱) 変性基質凝集抑制活性が著しく低いことを明らかにした。

(4) シアノバクテリアの DnaK2/DnaJ2/GrpE シャペロン系を確立した。DnaK2 は DnaJ2 と ATP に依存して、熱変性して失活したモデル基質を再活性化した。GrpE はこの再折りたたみをさらに促進した。

(5) HtpG に結合した基質タンパク質が DnaK2/DnaJ2/GrpE シャペロン系によって折りたたまれて再活性化することを明らかにした（図 2）。

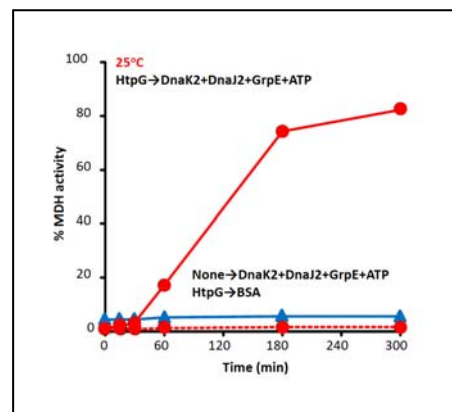


図 2. シアノバクテリアの HtpG と DnaK2/DnaJ2/GrpE シャペロン系の協同的シャペロン作用。HtpG 存在下で熱変性したリンゴ酸脱水素酵素（MDH）の活性は、DnaK2/DnaJ2/GrpE シャペロン系の添加によって、変性前の活性の 80%以上まで回復した（HtpG->DnaK2+DnaJ2+GrpE+ATP）。このシャペロン系を加えない場合には活性化はみられなかった（HtpG → BSA）。また、HtpG 非存

在下で変性した MDH に DnaK2/DnaJ2/GrpE シャペロン系を加えても再活性化は起こらなかった (None→DnaK2+DnaJ2+GrpE+ATP)。

(6) HtpG の特異的阻害剤であるラディシコール存在下でも、HtpG から DnaK2 への基質の転移は起こった。これは、基質の転移において、HtpG への ATP の結合・加水分解が必要とされないことを示唆するものである。従って、真核細胞 Hsp90 とは全く異なる機構で HtpG は基質を DnaK2 に転移するのではないかと推察された。今後、その詳細を解析する必要がある。

(7) HtpG と DnaJ2 の両方が、DnaK2 の ATPase 活性を増大させた。HtpG は基質を DnaK2 に転移させるとともに DnaK2 のシャペロン活性を増大させるものと推察された (図 3)。

(8) 本研究により、(シアノバクテリアのみならず) 原核生物における HtpG (Hsp90) と DnaK2 (Hsp70) /DnaJ2 (Hsp40) /GrpE (NEF) シャペロン系の物理的相互作用と協同的シャペロン作用が初めて明らかにされた。さらに、本研究の成果は、原核生物のみならず真核生物の、ストレス条件下における Hsp90 の働きの解明につながるものであると期待される。

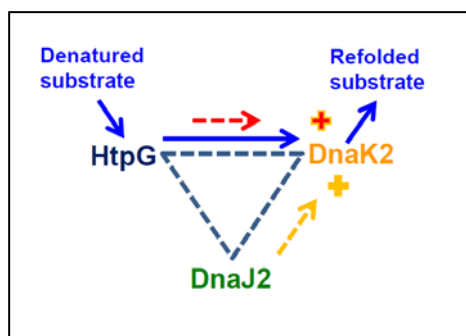


図 3. 本研究で確立された HtpG/DnaK2 シャペロン系。HtpG にリクルートされた変性基質 (denatured substrate) は DnaK2 に転移して、DnaK2 と DnaJ2 の介在によって、再び元の天然型構造に折りたたむ (refold)。HtpG と DnaJ2 は DnaK2 のシャペロン機能を増大させる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Horváth I, Glatz A, Nakamoto H, Mishkind ML, Munnik T, Saidi Y, Goloubinoff P, Harwood JL, Vigh L, Heat shock response in photosynthetic organisms: Membrane and lipid

connections, *Progress in Lipid Research*, 査読有, 51, 2012, pp.208-220

- ② Minagawa S, Kondoh Y, Sueoka K, Osada H, Nakamoto H, Cyclic lipopeptide antibiotics bind to the N-terminal domain of the prokaryotic Hsp90 to inhibit the chaperone activity, *Biochemical Journal*, 査読有, 435, 2011, pp.237-246
- ③ Huq S, Sueoka K, Narumi S, Arisaka F, Nakamoto H, Comparative biochemical characterization of two GroEL homologs from the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 74, 2010, pp.2273-2280
- ④ Sato T, Minagawa S, Kojima E, Okamoto N, Nakamoto H, HtpG, the prokaryotic homologue of Hsp90, stabilizes a phycobilisome protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Molecular Microbiology*, 査読有, 76, 2010, pp.576-589
- ⑤ 仲本 準, 高等植物における熱ショック応答の分子機構と応用, *農林水産技術研究ジャーナル* 7月号, 査読無, 32 巻, 2009, pp.5-9

[学会発表] (計 21 件)

- ① 仲本 準, DnaK (Hsp70) への基質タンパク質の受け渡しにおける HtpG (Hsp90) の ATP 結合と加水分解の重要性, 第 53 回日本植物生理学会年会, 平成 24 年 3 月 16 日, 京都産業大学 (京都府)
- ② 仲本 準, Hsp90 (HtpG) から Hsp70 (DnaK) への高温変性タンパク質の転移機構, 第 34 回日本分子生物学会年会, 平成 23 年 12 月 15 日、16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③ 仲本 準, ストレス下におけるシアノバクテリア・シャペロンチームの働き, 第 10 回微生物研究会, 平成 23 年 11 月 12 日, 千葉大学 (千葉県)
- ④ 仲本 準, 高温ストレス下における原核生物 Hsp90 のシャペロン作用, 第 49 回日本生物物理学会年会, 平成 24 年 9 月 18 日, 兵庫県立大学 (兵庫県)
- ⑤ 仲本 準, シアノバクテリアにおける Hsp90 と Hsp70 の協働的シャペロン作用, 日本ゲノム微生物学会ワークショップ 2011, 平成 24 年 8 月 20 日, 東北大学 (宮城県)
- ⑥ 仲本 準, Prokaryotic Hsp90 collaborates with the Hsp70 system, The EMBO Conference Series on: The Biology of Molecular Chaperones, 2011 年 5 月 21

- 日, Grundlsee (オーストリア)
- ⑦ 仲本準, シアノバクテリアの Hsp90/Hsp70 シャペロンシステム, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 27 日, 京都女子大学 (京都府)
- ⑧ 仲本準, シアノバクテリアの Hsp90 と Hsp70 シャペロン系との協同的シャペロン作用, 日本植物生理学会 2011 年度 (第 52 回) 年会, 2011 年 3 月 22 日, 東北大学 (宮城県)
- ⑨ 仲本準, Prokaryotic Hsp90: its substrates, chaperone sites, chaperone function, and collaboration with the Hsp70 system, The 5th International Conference on the Hsp90 Chaperone Machine, 2010 年 10 月 1 日, Les Diablerets (スイス)
- ⑩ 仲本準, 原核生物 Hsp90 の機能, 第 48 回 日本生物物理学会年会, 2010 年 9 月 22 日, 東北大学 (宮城県)
- ⑪ 仲本準, ラン藻 Hsp90 の機能 (招待講演), ラン藻ゲノム研究交流会, 2010 年 7 月 24 日, 東京大学 (東京都)
- ⑫ 星野秀知, シアノバクテリア Hsp90 のシャペロン部位と機能, 第 9 回 微生物研究会, 2010 年 6 月 26 日, 法政大学 (東京都)
- ⑬ 末岡啓吾, シアノバクテリア GroEL の生化学的解析, 第 9 回 微生物研究会, 2010 年 6 月 26 日, 法政大学 (東京都)
- ⑭ 仲本準, Function of prokaryotic Hsp90, a forgotten chaperone (招待講演), The 8th International Workshop on the Molecular Biology of Stress Responses, 2010 年 6 月 2 日, Daemyung Resort (韓国)
- ⑮ 仲本準, シアノバクテリアの二種類の GroEL (シャペロン): タンパク質の構造、活性、細胞機能, 日本植物生理学会 2010 年度 (第 51 回) 年会, 2010 年 3 月 21 日, 熊本大学黒髪北キャンパス (熊本)
- ⑯ 仲本準, Cyanobacterial diversity and molecular chaperones (招待講演), International Symposium on Phycological Research, 2010 年 2 月 26 日, Varanasi (India)
- ⑰ 藤田健作, Cyanobacterial DnaK/DnaJ/GrpE chaperone system and its control by HtpG (Hsp90), 第 32 回 日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 11 日, パシフィコ横浜 (横浜)
- ⑱ 仲本準, シアノバクテリアの環境適応と分子シャペロン (招待講演), かずさ DNA 研究所研究会「ラン藻の分子生物学 2009」, 2009 年 12 月 4 日, かずさアカデミアホール (木更津)
- ⑲ 仲本準, シアノバクテリア

DnaK/DnaJ/GrpE 系の確立と HtpG によるリフォールディング活性の調節, 第 47 回 日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 30 日, アスティとくしま (徳島)

- ⑳ 仲本準, Functional specialization of two different GroEL homologues in cyanobacteria (招待講演), The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine & the 4th Annual Meeting of the Biomedical Society for Stress Response, 2009 年 10 月 8 日, ガトーキングダム サッポロ ホテル&スパリゾート (北海道)
- ㉑ 仲本準, Stress response and chaperone function in cyanobacteria, The EMBO Conference Series on: The Biology of Molecular Chaperones, 2009 年 5 月 25 日, Dubrovnik, Croatia

[図書] (計 1 件)

- ① Huq S, Nakamoto H, Taylor & Francis/CRC Press, Handbook of Plant and Crop Stress. 3rd Ed., 2011 年, pp. 519-534

[その他]

ホームページ等

<http://www.molbiol.saitama-u.ac.jp/~nakamoto/top.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲本 準 (Nakamoto Hitoshi)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 30192678

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

ペンメチャ クマール (Penmetcha Kumar)
産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・主任研究員
研究者番号: 80357938