

令和元年6月18日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07349

研究課題名(和文) 原核生物Hsp90 (HtpG) と新規ClpBのシャペロン作用機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism of chaperone function of cyanobacterial Hsp90 and ClpB paralogs

研究代表者

仲本 準 (NAKAMOTO, Hitoshi)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：30192678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアのHtpG (Hsp90) は、DnaK2と共に、変性タンパク質の折りたたみを助ける。本研究では、DnaJ2がHtpGのシャペロン作用を調節する(最初の)タンパク質因子であることを示す結果を得た。さらに、Hsp90のシャペロン作用を調節する新規の天然化合物をみつけた。また、シアノバクテリアの二種類のClpBの内の一つが、独自の進化をして必須の機能を獲得したことを支持する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物のHsp90のシャペロン作用にとって必須のはたらきをするシャペロン補助因子は、バクテリアではまだ発見されていない。本研究は、DnaJ2がバクテリアHsp90 (HtpG) の補助因子としてはたらきうることを初めて示した。また、がん細胞の生存・増殖等に必須とされるHsp90を標的として、Hsp90のATPase活性の阻害剤の探索が行われてきたが、ATPaseの活性化剤によってもシャペロン機能を阻害できることを明らかにした。これは「阻害剤」選択の範囲を広げるものとして重要である。さまざまな生化学的解析を行い、ClpBがシアノバクテリアにおいて独自の進化をしたという新規な仮説を提唱した。

研究成果の概要(英文)：We discovered that HtpG (Hsp90) and DnaK2 (Hsp70) act together to refold denatured proteins in cyanobacteria. In the present study, we found that DnaJ2 physically interacts with HtpG to control its chaperone activity that suppresses aggregation of denatured proteins. DnaJ2 is considered to be the first co-chaperone for HtpG in prokaryotes. We also found a naturally occurring small molecule that inhibits the chaperone function of Hsp90 by enhancing its ATPase activity. Our findings are unexpected because it is assumed that the Hsp90 function is inhibited only when its ATPase is inhibited. As a new project, we worked on cyanobacterial paralogs of ClpB. One of the two paralogs in *Synechococcus elongatus*, ClpB1, showed biochemical properties similar to *E. coli* ClpB, whereas ClpB2 was totally different from ClpB1 and *E. coli* ClpB. I postulate that the clpB2 gene has acquired novel, beneficial functions and becomes preserved by natural selection, with clpB1 retaining the original function.

研究分野：分子生物学・生化学

キーワード：分子シャペロン 熱ショックタンパク質 Hsp90 Hsp70 ClpB パラログ シアノバクテリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般的に分子シャペロンは、単独ではたらくのではなく、他の異なる分子シャペロンやコシャペロン (シャペロン補助因子) とともに他のタンパク質 (基質) の折りたたみを介助する。バクテリアの Hsp90 ホモログである分子シャペロン HtpG に関しては、HtpG 単独で変性タンパク質と相互作用して、その凝集を抑制することを我々は明らかにした (Sato *et al.*, 2010) が、果たして折りたたみを介助するかどうかは不明であった。しかしながら、2012 年度 ~ 2015 年度の科研費による研究成果として、HtpG が DnaK2 (分子シャペロン Hsp70 のホモログ) と HtpG-DnaK2/DnaJ2/GrpE シャペロン系を形成して、変性タンパク質の (再) 折りたたみを助けることを明らかにした (Nakamoto *et al.*, 2014)。

Hsp90 は、がん化に関わる、多くのタンパク質の折りたたみと機能を保証している。このため、がん細胞の Hsp90 を分子標的とするさまざまな薬剤が開発されている。それらの化合物のほとんどは、Hsp90 の N 末端ドメインに存在する ATP 結合ポケットに結合し、Hsp90 の (シャペロン作用に必須である) ATPase 活性を阻害するものである。我々は、東南アジアに自生する薬用植物由来の化合物で、抗癌活性を示すゴニオタラミンが、Hsp90 の ATPase 活性を増大させるにもかかわらず、そのシャペロン作用を阻害することを、試験管レベルで明らかにした (Yokoyama *et al.*, 2015)。これは、Hsp90 の ATPase 活性を阻害するだけでなく、活性化することによっても、Hsp90 のシャペロン機能を抑制できることを示唆するものである。

我々は、モデル生物の大腸菌とは異なり、独立栄養生物のシアノバクテリアには、複数種の GroEL パラログが存在する (Furuki *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1997) ことを報告し、これらの生化学的性質や細胞機能が異なることを明らかにしてきた (Sato *et al.*, 2008; Huq *et al.*, 2010)。GroEL と同様に、シアノバクテリアには (大腸菌には一種類しか存在しないのに) 複数種の ClpB が存在する。Adrian K. Clarke らは、*Synechococcus elongatus* PCC7942 株の ClpB1 は、大腸菌 ClpB と同様に、必須ではないが熱耐性の獲得に必要とされる (Eriksson & Clarke, 1996) のに対して、ClpB2 は必須であり、熱耐性には関与しない (Eriksson *et al.*, 2001) と報告している。なお、それらの生化学的解析は全く行われてこなかった。

2. 研究の目的

本研究は、以下の三つの目的をもつ。

- (1) HtpG-DnaK2/DnaJ2/GrpE シャペロン系における HtpG 機能の調節機構を解明する。
- (2) ゴニオタラミン以外の、Hsp90 の ATPase 活性化剤を見つけ、ATPase 活性を増大させるにもかかわらず、そのシャペロン作用を阻害できるのかを明らかにする。
- (3) 従来の大腸菌 ClpB や酵母 Hsp104 とは異なることが (細胞レベルの実験で) 示唆されたシアノバクテリア *S. elongatus* の ClpB2 パラログの生化学的性質とシャペロン機能などを解析し、ClpB1 や大腸菌 ClpB との違いを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *S. elongatus* の HtpG、DnaK2、DnaJ2、GrpE、ClpB1、ClpB2 を大量発現する大腸菌株を構築し、各タンパク質を高度に精製した。大腸菌 HtpG、分裂酵母とヒトの Hsp90 を大量発現する大腸菌株は、それぞれ、David A. Agard 教授、養王田正文教授、宮田愛彦博士から譲り受けた発現プラスミドを用いて構築した。

(2) ATPase 活性は、ピルビン酸キナーゼ反応と乳酸デヒドロゲナーゼ反応を共役させて、NADH の減少を分光光度計を用いて経時的に測定することにより、求めた。

(3) 変性タンパク質の凝集反応の解析は、360 nm の見かけの吸光度の増加 (溶液濁度の増加) を分光光度計を用いて経時的に測定することによって行った。

(4) タンパク質間の相互作用は、免疫沈降法、プルダウン法、Native-PAGE 等によって解析した。

(5) 変性タンパク質の再折りたたみ反応は次のようにして解析した。即ち、熱変性失活したリンゴ酸デヒドロゲナーゼあるいはグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、あるいは尿素で変性させた乳酸デヒドロゲナーゼに、HtpG、DnaK2、DnaJ2、GrpE、ClpB1 あるいは ClpB2 を加えて、ATP に依存した再活性化 (再折りたたみ) を測定した。

4. 研究成果

(1) HtpG-DnaK2/DnaJ2/GrpE シャペロン系における HtpG 機能の調節機構に関する成果。

DnaK2 に加えて HtpG と物理的に相互作用する (Nakamoto *et al.*, 2014) DnaJ2 が「コシャペロン」として HtpG の機能を調節するのではないかと仮定し、それを実証すべく研究を行った。DnaJ2 の J ドメイン (JD) と、JD を含まない C 末側領域 (JD) を調製して、これらと HtpG の相互作用を解析した。JD のみが HtpG と相互作用し、そのシャペロン (変性タンパ

ク質の凝集阻止)活性を低下させた。これは、DnaJ2 が HtpG-基質(変性タンパク質)複合体の安定性を調節して、基質の HtpG からの解離を容易にすることを示唆するものである。

(2) Hsp90 の ATPase 活性化剤に関する成果。

ハナショウガ (*Zingiber zerumbet*) に含まれる小分子化合物ゼルンボン (zerumbone) が、シアノバクテリア HtpG のシステイン側鎖を修飾して、その ATPase 活性を増大させることを明らかにした。HtpG のみならず、ゼルンボン添加により分裂酵母やヒトの Hsp90 の ATPase 活性も増大した。シアノバクテリアや真核(がん)細胞をゼルンボンで処理すると、Hsp90 の基質タンパク質の細胞蓄積量が減少した。ゴニオタラミンを用いて得られた試験管レベルの結果と同様に、本研究結果は、Hsp90 (HtpG) が Hsp70 (DnaK) などと協調的にはたらいでシャペロン作用するためには、それらの ATPase 活性が適切に調節されなければならないことを示すものである。

Hsp90 は、シャペロン作用に必要とされる ATPase 活性を有する。そのために、抗がん剤開発を目的として、がん細胞の生存・増殖等に必須とされる Hsp90 を標的として、その ATPase 阻害剤の探索・化学合成が行われてきたが、本研究は、ATPase 活性を「活性化」してもシャペロン機能を阻害できることを示したものとして重要である。

(3) ClpB1 及び ClpB2 パラログの生化学的性質に関する成果。

以下のように、ClpB2 は、ClpB1 や(これまでに多くの研究がなされてきた)大腸菌 ClpB とは生化学的に顕著に異なることが明らかになった。

- A. ClpB1 に比べると ClpB2 の ATPase 活性は著しく低かった。
- B. ClpB1 は、DnaK2 シャペロン系と協調的に変性タンパク質の凝集塊を可溶化し再生するのに対して、ClpB2 はしなかった。
- C. ClpB1 は6量体(あるいは7量体)を形成するのに対して、ClpB2 は~2量体であった。
- D. (低濃度の)塩酸グアニジンは、ClpB1 と DnaK との協調的シャペロン作用(脱凝集活性)を完全に消失させた。この化合物は、大腸菌 ClpB の脱凝集活性を同様に阻害することが報告されている。

本研究における二つの ClpB パラログの比較生化学的解析により、ClpB1 は大腸菌 ClpB と類似しているが、ClpB2 は顕著に異なることが明らかになった。これらの結果に基づき、遺伝子重複により増えた遺伝子の片方(*clpB1*)が、もともと担っていた(大腸菌 ClpB と類似する、ストレス下で必須な)機能を維持する一方で、もう片方の遺伝子(*clpB2*)がシアノバクテリア特有の新規機能を獲得し、細胞の維持や増殖に不可欠なハウスキーピング遺伝子になったという新規な仮説を立てるに至った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Nakamoto, H., Y. Amaya, T. Komatsu, T. Suzuki, N. Dohmae, Y. Nakamura, I. Jantan, and Y. Miyata.

Stimulation of the ATPase activity of Hsp90 by zerumbone modification of its cysteine residues destabilizes its clients and causes cytotoxicity.

Biochemical Journal, 査読有, 475 巻, pp.2559-2576, 2018 年. DOI: 10.1042/BCJ20180230

Nakamoto, H., and K. Kojima

Non-housekeeping, non-essential GroEL (chaperonin) has acquired novel structure and function beneficial under stress in cyanobacteria.

Physiologia Plantarum, 査読有, 161 巻, pp.296-310, 2017 年. DOI: 10.1111/pp1.12595.

[学会発表](計 3 2件)

仲本準, Natural small molecules which target the molecular chaperone Hsp90, The 2nd International Conference on Applied Microbiology (ICAM 2018), 2018 年, Chiayi (台湾)

仲本準, シアノバクテリアの ClpB1 と ClpB2 の比較生化学的解析; 高濃度の変性タンパク質存在下では ClpB1 による凝集塊可溶化が顕在化する, 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年, パシフィコ横浜(横浜市)

仲本準, Hsp90 is involved in degradation of the supramolecular assembly phycobilisome in cyanobacteria, The 9th International Conference of the Hsp90 Chaperone Machine, 2018 年, Leysin (スイス)

仲本準, Interaction of DnaJ2 with HtpG in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*, The 9th International Conference of the Hsp90 Chaperone Machine, 2018 年, Leysin (スイス)

仲本準, シアノバクテリアの分子シャペロンパラログの生化学的解析, 第 70 回日本生物工学会大会, 2018 年, 関西大学(吹田市)

森田 勇人, 仲本準, Solution structural analysis of novel small heat shock protein

- Orf7.5 from *Synechococcus elongatus* PCC 7942, The XXVIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2018年, Dublin (アイルランド)
- 仲本準, Neofunctionalization of chaperone paralogs in photoautotrophic cyanobacteria, FASEB Science Research Conference: Protein Folding in the Cell, 2018年, Olean (アメリカ)
- 仲本準, Paralogs in different families of molecular chaperones in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*: neofunctionalization of chaperone paralogs in photoautotrophic cyanobacteria, Microbial Stress: from Systems to Molecules and Back, 2018年, Kinsale (アイルランド)
- 仲本準, シアノバクテリアの DnaJ (Hsp40) / J タンパク質の多彩な機能 DnaK (Hsp70) と HtpG (Hsp90) との相互作用について, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018年, 名城大学 (名古屋市)
- 仲本準, Molecular chaperones and stress tolerance in non-model microorganisms, SQUARE-ACI International Conference on Biotechnology in Health and Agriculture 2017, 2017年, Dhaka (バングラデシュ)
- 仲本準, シアノバクテリア分子シャペロンの新規機能獲得 (neofunctionalization) による多様化, かずさ DNA 研究所研究会「藍藻の分子生物学 2017」, 2017年, かずさ DNA 研究所 (木更津市)
- 仲本準, Molecular chaperones and stress tolerance in cyanobacteria: Role of chaperone paralogs/cognates in the evolution of cyanobacteria, 8th International Conference "Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2017, 2017年, University of Hyderabad (インド)
- 仲本準, 分子シャペロン Hsp90 と Hsp70 の機能に及ぼす天然小分子化合物レスベラトロールの影響, 第 16 回 微生物研究会, 2017年, 東京工業大学 (横浜市)
- 仲本準, シアノバクテリアの HtpG (Hsp90)/DnaK (Hsp70) シャペロン系, 第 16 回 微生物研究会, 2017年, 東京工業大学 (横浜市)
- 仲本準, *Synechococcus elongatus* PCC7942 における HtpG と DnaJ2 の相互作用の生化学的解析, 第 16 回 微生物研究会, 2017年, 東京工業大学 (横浜市)
- 仲本準, シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 の多様な J タンパク質の機能の解析, 第 16 回 微生物研究会, 2017年, 東京工業大学 (横浜市)
- 仲本準, 分子シャペロン Hsp90 と Hsp70 の機能に及ぼす天然小分子化合物レスベラトロールの影響, 第 69 回日本生物工学会大会, 2017年, 早稲田大学 (東京)
- 仲本準, Multiple ClpBs and GroELs/chaperonins in cyanobacteria: novel chaperones for basic and applied research, The 1st International Conference on Applied Microbiology (ICAM-VN 2016), 2016年, Ho Chi Minh (ベトナム)
- 仲本準, ClpB の新規機能の探索を目的としたシアノバクテリア ClpB1 と ClpB2 の比較生化学的解析, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016年, パシフィコ横浜 (横浜市)
- 仲本準, シアノバクテリア J タンパク質ファミリーの多様性と 3 種類の DnaK (Hsp70) とのパートナーシップ, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016年, パシフィコ横浜 (横浜市)
- 21 Apiradee Hongsthong, 仲本準, Comparative analysis of protein-protein interaction network of *Synechococcus elongatus* PCC7942 wild type and GroEL2-negative mutant in response to high temperature stress, The 9th Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology (APCAB), 2016年, Bangkok (タイ)
- 22 仲本準, シアノバクテリアの主要 Hsp である低分子量 Hsp (small Hsp) の生化学的解析, 第 15 回微生物研究会, 2016年, 日本大学 (藤沢市)
- 23 仲本準, シアノバクテリアのハウスキーピング ClpB2 (分子シャペロン) の生化学的解析, 第 15 回微生物研究会, 2016年, 日本大学 (藤沢市)
- 24 仲本準, 分子シャペロン Hsp90 の機能に影響を与える天然小分子化合物の解析, 第 15 回微生物研究会, 2016年, 日本大学 (藤沢市)
- 25 仲本準, Modification of cysteine residues of Hsp90 by a natural dietary small compound zerumbone enhances its ATPase activity and inhibits physiological Hsp90 functions in prokaryotic and eukaryotic cells, The 8th International Conference of the Hsp90 Chaperone Machine, 2016年, Seon Abbey (ドイツ)
- 26 仲本準, 原核生物における J タンパク質による Hsp90 と Hsp70 の協同的シャペロン作用の仲介と機能調節, 第 68 回日本生物工学会大会, 2016年, 富山国際会議場 (富山市)
- 27 仲本準, シアノバクテリアの分子シャペロン ClpB2 は、そのパラログである ClpB1 や大腸菌 ClpB とは顕著に異なる生化学的性質を示す, 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016年, 岩手大学 (盛岡市)
- 28 仲本準, シアノバクテリア ClpBII (Hsp104 ホモログ) は脱凝集活性に加えてタンパク質凝集阻止活性も示す, 第 38 回日本分子生物学会年会 (BMB2015), 2015年, 神戸国際展示場 (神戸市)
- 29 仲本準, The yin and yang of the molecular chaperone Hsp90: activation and inhibition of Hsp90, Microbial Stress: From Molecules to Systems, 2015年, Sitges (スペイン)

- 30 仲本準, Heat-shock proteins, molecular chaperones, and stress tolerance, *Microbes in Extreme Environment: Diversity and Translational Applications* (MEEDTA-2015), 2015年, Srinagar Garhwal (インド)
- 31 仲本準, Biochemical analysis of two kinds of ClpB in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942, EMBO conference. *Molecular Chaperones: From Molecules to Cells and Misfolding Diseases*, 2015年, Crete (ギリシャ)
- 32 仲本準, Naturally occurring small-molecule inhibitors and activators of the molecular chaperone Hsp90, EMBO conference. *Molecular Chaperones: From Molecules to Cells and Misfolding Diseases*, 2015年, Crete (ギリシャ)

〔図書〕(計 2件)

Nakamoto, H. and T. Akter

Molecular chaperones and acquisition of thermotolerance in plants.

In: M. Pessarakli, ed., *Handbook of Plant and Crop Stress*. 4th ed. Chapter 18 (最初と最後のページと総ページ数は未定). CRC Press. 2019年.印刷中

Hongsthong, A., J. Senachak and H. Nakamoto

Genome- and proteome-wide analyses for targeted manipulation and enhancement of bio-products in cyanobacteria.

In: Rastogi, R.P., D. Madamwar and A. Pandey, eds., *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology*. pp.39-64 (総ページ 336). Elsevier. 2016年.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.saitama-u.ac.jp/~nakamoto/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。