

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～ 2008

課題番号：18608003

研究課題名 (和文) 好冷性微生物の熱ショック応答と高温適応の分子機構

研究課題名 (英文) Molecular Mechanism of heat-shock response and high-temperature adaptation in psychrophilic bacteria

研究代表者

林 秀 則 (HAYASHI HIDENORI)

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・教授

研究者番号：60124682

研究成果の概要：

好冷性生物は、通常の温度域で生育する生物が低温ストレスと感じる温度を高温ストレスと感じ、これに応答する。即ち高温ストレスにもっとも鋭敏に応答する生物であると考えことができ、その応答機構には他の生物とは異なる特徴があることが期待される。本研究ではゲノム情報を利用して、好冷性微生物における高温ストレス応答の普遍性と特異性、熱ショックタンパク質の構造的特徴と機能に関する知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総 計	3,500,000	510,000	4,010,000

研究分野：環境生物学

科研費の分科・細目：極限環境生物学

キーワード：好冷性細菌、遺伝子発現、蛋白質、熱ショック応答、高温適応

1. 研究開始当初の背景

好冷性生物の場合、例えば生育温度が 10℃あれば、20℃はかなりの高温ストレスであり、何らかの応答機構が作用すると思われる。したがって、好冷性生物は他の生物より低い温度で高温ストレス応答が発現する、即ち高温ストレスにもっとも鋭敏に応答する生物であり、その応答機構には他の生物とは異なる特徴があることが期待される。

研究開始当初、クローニングされた好冷性細菌の熱ショックタンパク質は 5 種類しかなく、そのうち 4 種類は本研究グループ

によって解析されたものであり、その情報をもとにして、RNA ポリメラーゼの σ^{32} 因子の遺伝子の mRNA の塩基配列から好冷性細菌の熱ショック遺伝子の発現温度が *rpoH* 遺伝子翻訳効率に関係していると推測した。しかし他の好冷性生物の熱ショックタンパク質遺伝子の発現調節や高温適応の機構を詳細に研究した例はなく、本研究は、好冷性生物の生理的特徴を理解する上で新規性の高い内容であった。また、好冷性微生物においてもゲノム解析が盛んに進められていたため、データベースを利用した好冷

性微生物の生理学的特徴に関する研究が開発されることが予想され、本研究はその先駆けとなるものであった。

2. 研究の目的

好冷性細菌 *Colwellia maris* strain ABE-1 は 10–15°C の低温環境で生育し、致死温度は 25°C である。このため、常温生物にとって低温域である 20°C 程度でも高温ストレスを感じて、HSP の合成誘導が起こると推測される。本研究では、好冷性微生物の高温ストレス応答機構の全容を明らかにするとともに、好冷性微生物が持つ遺伝子発現機構の温度依存性、即ちより低温域で遺伝子を発現する機構を明らかにすることを目的とした。

好冷性細菌 *Colwellia psychrerythraea* 34H は北極海の堆積物中から単離された至適温度 8°C のグラム陰性菌で、ゲノム情報が既知である。常温性細菌である大腸菌は *dnaK* を 1 種類のみ持つが、この菌は *dnaK* を 2 種類持っており、各 DnaK を使い分けている可能性がある。本研究では、比較的低温で働くと推測される好冷性細菌の DnaK システムの機能を解析し、好冷性細菌の高温ストレス応答機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

① *C. maris* の HSP 遺伝子のクローニングおよび発現機構の解析

好冷性細菌 *C. maris* から GroES, GroEL, DnaK, DnaJ の 4 種類の HSP 遺伝子をクローニングし、その塩基配列およびアミノ酸配列を常温細菌のものと比較検討した。ノーザンブロットにより各 HSP の転写が誘導される温度およびそのパターンを詳細に解析した。またプライマー伸長法により各 HSP 遺伝子の発現に関わるプロモーター領域を特定した。

② *C. maris* の HSP 遺伝子の発現誘導に関わる σ 因子 (σ^{32}) をコードする *rpoH* 遺伝子のクローニングおよびその発現機構の解析

C. maris から *rpoH* 遺伝子をクローニングし、その塩基配列およびアミノ酸配列を常温細菌のものと比較検討した。ノーザンブロットおよび転写阻害剤であるリファンピシンを用いて、*rpoH* 遺伝子の転写パターンおよび温度変化における mRNA の安定性の変化を解析した。またプライマー伸長法により *rpoH* 遺伝子のプロモーター領域を特定した。*rpoH* 遺伝子の発現には *rpoH* mRNA の 5' 側の二次構造が重要な役割をしていることから、*C. maris* の *rpoH* mRNA の 5' 側の二次構造をコンピュータにより解析し、大腸菌のものと比較した。

③ *C. psychrerythraea* の *dnaK1*、*dnaK2* の発現機構の解析

異なる温度における *dnaK1*、*dnaK2* の転写量を DNA-RNA ハイブリダイゼーションノーザンブロット分析によって解析した。これによって *dnaK1*、*dnaK2* の転写が誘導される温度とそのパターンを解析した。

また、プライマー伸長法によりそれぞれの発現に関わるプロモーター領域を特定した。5' 末端に 6-FAM (Fluorescein phosphoramidite) を標識したオリゴヌクレオチド (日本バイオサービス) (Fig. 2-2) を使用し、RNA サンプル 20 \cdot g を鋳型に SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて 50°C で 40 分間、逆転写反応を行った。塩基配列対応と転写開始点を対応させるため、*dnaK1*、*dnaK2* の 5' 非翻訳領域のクローニングを行い、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR 法) にてそれぞれの 5' 非翻訳領域を増幅し、pGEM-T Easy ベクターに挿入した。逆転写反応と同様のプライマーを使用して *dnaK1*、*dnaK2* の 5' 非翻訳領域をそれぞれ含むプラスミドを鋳型にシーケンス反応を行った。

④ *C. psychrerythraea* の DnaK1、DnaK2 の活性の温度依存性の解析

C. psychrerythraea の DnaK1、DnaK2 のアミノ酸配列をゲノムデータベースから推定し、大腸菌のものと比較した。次に、DnaK 発現系を作製し、大腸菌において *C.*

psychrerythraea の 2 種類の DnaK を各々ヒスチジンタグ融合タンパク質として発現させ、ニッケルアフィニティーカラムクロマトグラフィにより精製した。精製した各 DnaK タンパク質を用いてマラカイトグリーン法により ATPase 活性を測定し、大腸菌の DnaK のものと比較した。

⑤ 3-4. *C. psychrerythraea* 34H の DnaK1、DnaK2 による大腸菌 DnaK の相補

大腸菌における *C. psychrerythraea* 34H の DnaK1、DnaK2 の機能を調べるため、相補実験を行った。コントロールとして大腸菌野生株 (*E. coli* MG4100)、大腸菌 *dnaK* 欠損株、*dnaK* 欠損株に大腸菌 *dnaK* 遺伝子、*C. psychrerythraea* 34H の *dnaK1* あるいは *dnaK2* を導入した菌体を一晚 LB 液体培地で培養し、これを段階的に希釈して寒天培地にスポットし 20、30、40°C で、生育を観察した。

4. 研究成果

ノーザン分析の結果、*groEL*、*dnaK* 遺伝子とともに約 20°C で発現が誘導されることを確

認した。遺伝子から推定されるアミノ酸配列は、GroEL, DnaK とともに大腸菌のものと約 80% の相同性を持っていた。また双方とも上流には熱ショックプロモーターの配列が確認され、推定非翻訳領域の A, T 含量値が非常に高かった。このため *C. maris* には σ^{32} による HSPs 発現調節機構が存在していることが示唆され、 σ^{32} 発現調節の温度依存性および非翻訳領域の塩基配列が好冷性細菌における HSPs の特異的な発現に関与していることが明らかになった。

クローニングした *rpoH* 遺伝子から推測される σ^{32} アミノ酸配列は大腸菌のものと 64% の相同性を持ち、 σ^{32} に特有な RpoH box とよばれる 9 つのアミノ酸配列が確認された。ノーザン分析では、*rpoH* mRNA 量は 20°C 処理で蓄積すること、また 20°C におけるその分解速度は 10°C の場合より遅いことを確認した。高温時の σ^{32} 翻訳料増加に関わっていると推測される *rpoH* mRNA 5' 側の二次構造を推測したところ、その構造は大腸菌のものと大きく異なっており、より低温でほどこけやすくなっていることが推測された (図 1)。

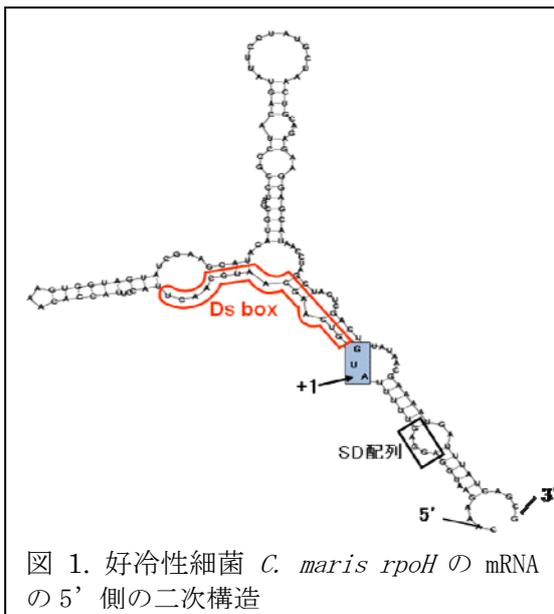


図 1. 好冷性細菌 *C. maris* *rpoH* の mRNA の 5' 側の二次構造

C. psychrerythraea 34H の *dnaK1*, *dnaK2* プロモーター領域の塩基配列から、いずれも大腸菌や *C. maris* の *dnaK* と同じく、 σ^{32} 因子による制御を受けていると考えられる。また、保存されたプロモーター領域を持ちながら、大腸菌と *dnaK* の mRNA の合成が誘導される温度が異なるため、*C. maris* と同様に、大腸菌の *dnaK* とは σ^{32} 因子の誘導される温度が異なると推測した。

dnaK1 について見ると 16°C 以上の処理では mRNA が検出され、4~12°C ではほとんど検出さ

れなかった。また、温度上昇につれて mRNA の検出量が増加しており、高温による誘導が見られた (Fig. 3-2)。一方、*dnaK2* の場合、16°C 以上の処理では mRNA が検出され、4~12°C でも最大発現量の 1/5 程度の mRNA が検出された。また、16°C 以上の処理では温度上昇につれて mRNA の検出量が増加しており、*dnaK1* と同様に高温による誘導が見られた (Fig. 3-2)。このように、生育温度付近でも発現が見られ、生育温度付近における両者の発現が異なることが示された。

DnaK の機能において構造変化の制御を担う ATP の加水分解活性を、温度を変えて測定することにより、DnaK の温度依存性の指標とした。その結果、8°C、20°C では DnaK1、DnaK2 の活性に大きな違いは見られなかった。しかし、DnaK1 は 40°C で最大の ATP 加水分解活性を示したが、DnaK2 は 50°C で最大の活性を示し、両者の温度依存性は異なっていた。

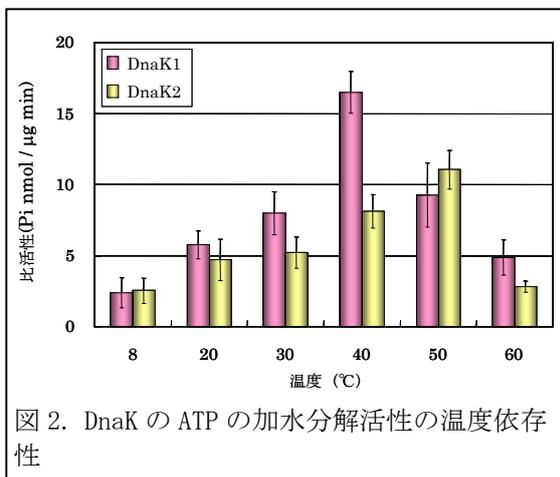


図 2. DnaK の ATP の加水分解活性の温度依存性

C. psychrerythraea 34H の *dnaK1* を *dnaK* 欠損株に導入すると、40°C では大腸菌の *dnaK* を導入したものの 1/10 程度生育が改善された。しかし、低温の 20°C、生育温度の 30°C では *dnaK* 欠損株よりも生育が悪く、生育阻害が見られた。一方、*C. psychrerythraea* 34H の *dnaK2* を導入したものは 20°C では生育が改善されていたが、40°C では生育しなかった。

C. psychrerythraea 34H の生育温度付近において *dnaK1* は抑制されていた。また、*C. psychrerythraea* 34H の DnaK1 は大腸菌における高温域で相補し、生育温度付近、低温域では生育の阻害したことから DnaK1 は高温ストレス時のみ必要とされると推測される。また、大腸菌 *dnaK* 欠損株の相補で見られたような生育阻害が *C. psychrerythraea* 34H においても起こるとすれば、生育温度付近における *dnaK1* の発現抑制には大きな意味があると結論できた。

一方、*C. psychrerythraea* 34H の *dnaK2* は通常時でも最大の 1/5 程度の発現しているため、*DnaK2* は高温ストレス時のみならず、通常時にも必要であると推測される。*DnaK2* は 20°C では大腸菌の *DnaK* を相補するが、40°C では相補しないため、40°C では機能しないと推測される。しかし、*DnaK2* が最大の ATP 加水分解活性を示す温度が 50°C であることから、40°C で機能していない部位は、立体構造上 ATP の加水分解に関わっていない可能性がある。*DnaK1* と *DnaK2* は反応温度に伴う ATP の加水分解活性の変化に違いが見られた。

このような *DnaK1* と *DnaK2* の性質の違いより、好冷性細菌 *C. psychrerythraea* 34H の高温ストレス応答において 2 種類の *DnaK* が異なる役割を持つことが示唆された。

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 4 件)

① Yoshitake Oríkasa, Mika Tanaka, Shinji Sugihara, Ryuji Hori, Takanori Nishida, Akio Ueno Naoki Morita, Yutaka Yano, Kouhei Yamamoto, Akira Shibahara, Hidenori Hayashi, Yohko Yamada, Akiko Yamada, Reiko Yu, Kazuo Watanabe⁹, & Hidetoshi Okuyama
pfaB products determine the molecular species produced in bacterial polyunsaturated fatty acid biosynthesis
FEMS Microbiol. Lett. in press (2009) 査読有

② Kanesaki Y, Yamamoto H, Paithoonrangsarid K, Shoumskaya M, Suzuki I, Hayashi H, Murata N.
Histidine kinases play important roles in the perception and signal transduction of hydrogen peroxide in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803.
Plant J. 49(2): 313-24. (2007) 査読有

③ K. Kojima, M. Oshita, Y. Nanjo, K. Kasai, Y. Tozawa, H. Hayashi and Y. Nishiyama
“Oxidation of elongation factor G inhibits the synthesis of the D1 protein of photosystem II”
Molecular Microbiology, 65, 936-947
(2007) 査読有

④ Yamauchi S, Okuyama H, Nishiyama Y,

Hayashi H

The *rpoH* gene encoding heat shock sigma factor sigma³² of psychrophilic bacterium *Colwellia maris*.
Extremophiles. 10, 149-58. 2006 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 深田伸介、納山かおり、山内清司、杉浦美和、林秀則
好冷性細菌 *Colwellia psychrerythraea* 34H が持つ 2 種類の熱ショックタンパク質 *DnaK* の機能解析
極限環境微生物学会
2008年11月4-5日、東京

② 山内清司、杉浦美羽、林秀則
好冷性細菌 *Colwellia psychrerythraea* strain 34H のシャペロニン GroEL の機能解析。
極限環境微生物学会
2008年11月4-5日、東京

③ 南條洋平、西山佳孝、林秀則
ラン藻の光化学系 II の高温適応に関与する脂肪酸合成酵素
第 49 回日本植物生理学会年会
2008年3月20-22日、札幌

④ 山内清司、奥山英登志、西山佳孝、林秀則
好冷性細菌の熱ショックタンパク質発現機構の解析
極限環境微生物学会 2006年11月28-29日、東京

⑤ Hidenori Hayashi, Yoshitaka Nishiyama, Seiji Yamauchi and Hidetoshi Okuyama
Characteristics of *rpoH* Gene Encoding Heat Shock Sigma Factor σ^{32} of Psychrophilic Bacterium *Colwellia maris* that Expresses Heat Shock Proteins at Relatively Low Temperature
International Conference on Extremophiles, 17-21 Sept. 2006. Brest, France

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 秀則 (HAYASHI HIDENORI)

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・教授

研究者番号：60124682

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

奥山 英登志 (OKUYAMA HIDETOSHI)

北海道大学・地球環境科学研究科・准教授
(平成 18 年度、平成 19 年度は研究分担者)

研究者番号：90125295

西山 佳孝 (NISHIYAMA YOSHITAKA)

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・准教授

研究者番号：30281588

(平成 18 年度、平成 19 年度は研究分担者)