

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580121

研究課題名(和文) 超好熱菌低温ショックシャペロンの作用機序

研究課題名(英文) Roles of cold-inducible chaperones in hyperthermophiles

研究代表者

藤原 伸介 (Fujiwara, Shinsuke)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：90263219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の低温ストレス環境下での適応現象を探るとともに、低温で発現する遺伝子の誘導機構について検討した。分子シャペロンである DEAD 型 RNA ヘリカーゼ (TK0306)、分子シャペロニン CpkA (TK0678) は低温ストレス環境下での生育に必須であった。また TK0306 遺伝子の低温誘導を支配する領域の探索を行った結果、SD 領域と開始コドンの間に存在する A の連続する配列 (AAAAA) が重要な役割を果たしていることが明らかになった。この領域で、高温特異的な転写終結が起こり、結果として低温特異的な遺伝子の発現がなされていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that hyperthermophiles are highly primitive microorganisms and that their descendants evolved by adapting to cooler environments. Hence, study of the adaptive mechanisms of hyperthermophiles to cold environments may provide insight into evolutionary processes. In the project, the physiological roles of cold inducible chaperones, cpkA (TK0678) and DEAD box RNA helicase (TK0306) from *Thermococcus kodakarensis* were investigated, showing that both genes are essential for cell growth at cold stressed environment. In addition, the region required for cold induction of TK0306 was identified. The regulatory element, a five-adenosine sequence has been located in the region between the SD region and the initiation codon (ATG). It seems likely that A5-dependent cold-induced expression is related to premature termination depending on temperature. This sequence-specific mechanism is unique, and one that has not been identified in other known cold-inducible genes.

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：アーキア 低温ショック シャペロン RNAヘリカーゼ

1. 研究開始当初の背景

熱ショック応答はすべての生物に普遍的にみられ、分子シャペロニンを含む一群のシャペロンはタンパク質構造の再生に中心的役割を果たしている。一方、低温ショック応答については普遍性のある適応機構はあまり研究されていない。一部の細菌、植物では、低温下で低温ショックタンパク質 (Csp) が誘導され、RNA 上に形成される 2 次構造を解消し、翻訳停止の解除あるいは抗転写終結を行う RNA シャペロンとして機能する。これまで超好熱菌の低温ショック応答については詳細に研究されていなかった。現在の学説では原始生命体は好熱性の微生物であり、進化の過程でより低い温度に適応順化することで多様性を獲得していったと考えられている。代表者は平成 17-18 年度基盤研究 C「超好熱菌の低温適応機構」において超好熱菌ゲノムの遺伝子数と生育温度範囲について検討した。その結果、生育温度が低くなるにつれて遺伝子のパラログが増え、ゲノムのサイズも大きくなるという相関を見出した。特に類縁菌どうして比較すると低い温度で生育が可能な種ほど遺伝子数が多い。例えば *Pyrococcus* 属と *Thermococcus* 属は共通の生理的特徴を有すが、*Thermococcus* 属は *Pyrococcus* 属に比べ 10 以上も低い温度で生育する。*Thermococcus* 属のゲノムサイズは *Pyrococcus* 属に比べ約 200kbp ほど大きく、689 個の遺伝子は *Thermococcus* 属にのみし

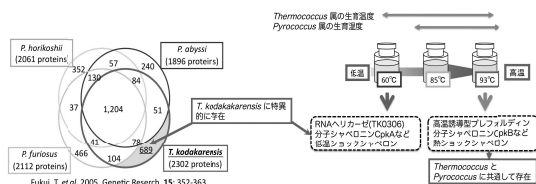


図 1. 超好熱菌ゲノムの遺伝子数比較と温度変化で特異的誘導されてくる遺伝子群

が存在しない。平成 20-22 年度基盤研究 C「超好熱菌の恒常性維持に関する研究」において、*Thermococcus kodakarensis* をモデル生物として 60°C~93 で培養し細胞の膜脂質分析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析を行った。本菌の膜脂質は炭化水素鎖の飽和度で流動性を確保するのではなく、鎖長を変化させることで対応していた (Matsuno et al., 2009)。培養温度の下降に伴い細胞内のポリアミン価数も小さくなり (Morimoto et al., 2010)、RNA ヘリカーゼ TK0306 (Shimada et al., 2009) やクラス 分子シャペロニン CpkA も特異的に誘導されてくる (Fujiwara et al., 2008)。また熱ショックとは独立に誘導されるプレフォルディンも存在した (Danno et al., 2008)。興味深いことにこれら低温で誘導される遺伝子はすべて *Pyrococcus* 属には存在しない。このことも超好熱菌の低温適応とこれら遺伝子の機能には重要な関係があることを示唆する。また、シャペロニンの高発現により酵素の基質特異性変化がも

たらされると報告されたが (Tokuriki et al., 2009)、この結果はシャペロニンの高発現が多様性獲得に関係していることを示すものである。

Danno, A. et al., J.Mol.Biol., 382, 298-311 (2008)
 Fujiwara, S. et al., Appl. Environ. Microbiol., 74, 7306-7312 (2008)
 Morimoto, M. et al., J.Bacteriol., 192, 4991-5001 (2010)
 Matsuno, Y. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 104-108 (2009)
 Sato, T. et al., Appl. Environ. Microbiol., 71, 3889-3899 (2005)
 Shimada, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 389, 622-627 (2009)
 Tokuriki and Tawfic, Nature, 459, 668-673 (2009)

2. 研究の目的

本研究では低温ショックで誘導される遺伝子の誘導メカニズムの解明と低温ショックシャペロン (分子シャペロニン CpkA、RNA ヘリカーゼ TK0306) の機能解析に焦点をあてた。特に以下の 5 つを具体的な達成目標とした。

- (1) 低温での遺伝子誘導機構の解明
- (2) 標的分子の探索と作用機序
- (3) 生理的機能の解析
- (4) 変性分子のトラッピング
- (5) 低温誘導型ヘリカーゼの機能解析

3. 研究の方法

超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* をモデル生物とし、次の 5 つの内容を試みた。

(1) 低温での遺伝子誘導機構の解明:

超好熱菌の発現レポーターシステムを構築し、*cpkA* 遺伝子と TK0306 について制御に必要なシスエレメントを特定し、制御領域に作用する調節因子を明らかにする。さらに温度依存的に発現している転写因子のうち、TFB に注目し、2 個存在するオルソログを破壊し、それぞれの関与を調べる。

(2) 標的分子との作用機序:

免疫沈降法を用いて分子シャペロニン CpkA が認識している標的タンパク質を特定する。また RNA ヘリカーゼ TK0306 が作用する RNA についても特定し、作用機序を明らかにする。

(3) 低温適応における生理学的意義:

低温ショックシャペロンを破壊し、生育に及ぼす影響を調べると共に他の生物種のオルソログと置換し低温適応における役割を調べる。また低温適応に細胞内ポリアミンの組成変化が関与するかについても検討するため、高温で特異的に機能する分枝型ポリアミンの合成酵素を特定、破壊し低温での生育、高温での生育を調べる。

(4) 変性分子のトラッピング:

超好熱菌の低温ショックシャペロニン CpkA が作用する標的タンパク質と熱ショックシャペロニン CpkB が作用する標的タンパク質の違いを明らかにする。

(5) 低温誘導型ヘリカーゼの機能解析 (逆転写酵素活性への影響)

低温誘導型 RNA ヘリカーゼはステム様構造をとった RNA 分子をほぐす活性 (unwind 活性) を有する。この性質が逆転写酵素の活性にどのような影響を与えるか検証する。

4. 研究成果

(1) 低温での遺伝子誘導機構の解明:

耐熱性カタラーゼをレポーターとするモニタリングシステムを構築し、低温誘導に必要な制御領域の特定を試みた。まず超好熱菌 *T. kodakarensis* の低温誘導型 RNA ヘリカーゼ (TK0306) に注目した。TK0306 遺伝子の上流域を挿入し、低温誘導に必要な領域を絞り込んだところ、TATA 配列までの領域は低温誘導に関与しないことが明らかになった。さらに恒常的に発現しているグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) 遺伝子のプロモーター領域とキメラ DNA を構築し、制御領域を調べたところ、リボソーム結合部位から開始コドンまでに存在する AAAAA 配列が重要であることを見出した。60 ではこの領域が低温に依存して転写終結を引き起こしていると考えられる。超好熱性アーキアの転写は TTTTTTTT 配列のところで終結する。TK0306 遺伝子の制御領域では A の連続配列が、SD 配列に近接する場合は、温度に依存して転写終結の効率が変ると考えられた。この領域では、温度が高くなるにつれて mRNA は鋳型 DNA から遊離しやすくなると予想される。TK0306 遺伝子の発現調節は、mRNA の外れる効率、つまり転写終結効率の違いでなされていると考えられる。また、低温誘導が認められている遺伝子のいくつかは SD 配列から開始コドンまでに A または T に富む配列が存在している。低温誘導型分子シャペロニンである *cpkA* 遺伝子上流にもこの配列が存在していた。その一方でこの配列を持たない低温誘導遺伝子も存在した。

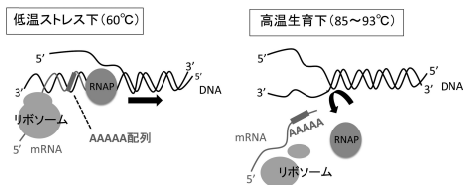


図 2. 超好熱菌における温度依存的転写終結

そこで次に温度特異的に発現している因子の関与を検討した。*T. kodakarensis* には 2 種類の TFB が存在し、そのうちのひとつは温度特異的に発現量が変動する。これらが低温誘導に関与しているかを遺伝子破壊を行うことで検討したところ、いずれの遺伝子も低温誘導には関与していなかった。また一連の研究を行う中で、転写因子 TFB1 は 85 以上の高温環境下で鞭毛形成を支

配していることが明らかになった。

(2) 標的分子との作用機序:

免疫沈降法を用いて分子シャペロニン CpkA が認識している標的タンパク質を特定したところ、複数の特異的タンパク質を同定した。一方、RNA ヘリカーゼ TK0306 が作用する RNA については特定することができなかった。

(3) 低温適応における生理学的意義:

TK0306 遺伝子の破壊株を構築し、93、85、60 で培養して生育特性を調べたところ、破壊株では 60 での生育が衰え、溶菌が認められた。この溶菌現象が硫黄を含まない培地、つまり水素発生型呼吸を行っているときにみられたことから、呼吸系酵素の遺伝子発現に関与していると考えられた。

また、*cpkA* 遺伝子を破壊すると 60 での生育が著しく低下した。CpkA が低温で変性するタンパク質分子を再生・機能させていることを強く示唆する。熱ショックシャペロニンである CpkB とのキメラ遺伝子を構築し、温度適応への影響を調べたところ、CpkA のカルボキシ末端に存在する 50 アミノ酸が低温適応に関与していることが示された。

また本菌は温度依存的に細胞内のポリアミン組成を変動させ、生育温度が高くなるに連れて分岐鎖ポリアミンの細胞内含量が高くなる。分岐鎖ポリアミンを合成する遺伝子 (TK1691) を特定し、その破壊株の生育温度を調べたところ、高温での生育が消失した。この結果は生物が低温への適応を獲得する段階で分岐鎖ポリアミンの生合成経路を欠落していったことを予想させる。原始的な超好熱菌には TK1691 を中心とする分岐鎖ポリアミン合成の経路が存在したと思われる。

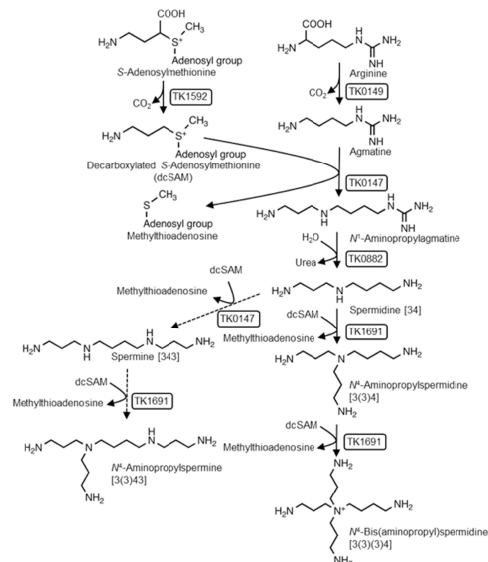


図 3. 超好熱菌の分岐鎖ポリアミンの合成経路

(4) 変性分子のトラッピング：

CpkA 及び CpkB が捕捉するタンパク質バンドを免疫沈降法によりカタログ化した。特に CpkA が特異的に捕捉している TrpC 分子を用いて in vitro での再生実験を行ったところ、本分子が CpkA により再生されることが示された。

(5) 低温誘導型ヘリカーゼの機能解析（逆転写酵素活性への影響）：

今回、逆転写酵素としてレトロウイルス（MMLV）由来の酵素、細菌由来の酵素をタンパク質工学的に改変した DNA 合成酵素を用いて実験を計画した。まず両酵素の性質を調べたところ細菌由来の逆転写酵素（DNA 合成酵素）には鋳型量に依存した阻害が起こることが示された。そこで MMLV 由来の逆転写酵素に対し TK0306 の添加効果を検証したところ、TK0306 の添加量に依存して逆転写活性の変化がみられた。さらなる精密な解析が必要である。

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 11 件）

藤原 伸介. 超好熱性アーキアの低温誘導性遺伝子に見出された新しい調節配列. 化学と生物 (2014)印刷中 査読有

秀瀬 涼太, 今岡 進, 藤原 伸介. 耐熱性タンパク質を利用したビスフェノール A の吸着. ケミカルエンジニアリング 59/4, 17-21 (2014) 査読無

Okada, K., Hidese, R., Fukuda, W., Niitsu, M., Takao, K., Horai, Y., Umezawa, N., Higuchi, T., Oshima, T., Yoshikawa, Y., Imanaka, T., Fujiwara, S. Identification of a novel aminopropyltransferase involved in the synthesis of branched-chain polyamines in hyperthermophiles. J.Bacteriol., (American Society for Microbiology, Washington DC, USA), 196/10, 1866-1876, (2014) (DOI: 10.1128/JB.01515-14.) 査読有

Hidese, R., Nishikawa, R., Gao, L., Katano, M., Imai, T., Kato, S., Kanai, T., Atomi, H., Imanaka, T., Fujiwara, S. Different roles of two transcription factor B proteins in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. Extremophiles (Springer Co.Ltd., New York) 18, 573-588, (2014) (DOI: 10.1007/s00792-014-0638-9.) 査読有

Nagaoka, E., Hidese, R., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Importance and determinants of induction of cold-induced DEAD RNA helicase in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. J.Bacteriol., (American Society for Microbiology, Washington DC, USA) 195/15, 3442-3450, (2013) (DOI:10.1128/JB.00332-13.) 査読有

Yokooji, Y., Sato, T., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Atomi, H. A genetic examination of initial amino acid oxidation and glutamate catabolism in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. J.Bacteriol., (American Society for Microbiology, Washington DC, USA), 195, 1940-1948, (2013) (DOI: 10.1128/JB.01979-12.) 査読有

藤原 伸介, 高 楽. 好熱菌研究のいま：高温適応から低温適応へ 日本生物工学会誌 90/11, 701-705, (2012) 査読有

秀瀬 涼太, 藤原 伸介. 高温において翻訳活性化作用を持つポリアミン. バイオサイエンスとインダストリー, 70/3, 211-212, (2012) 査読有

Yasukawa, K., Konishi, A., Shinomura, M., Nagaoka, E., and Fujiwara, S. Kinetic analysis of reverse transcriptase activity of bacterial family A DNA polymerases. Biochem. Biophys. Res. Commun. (Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands), 427, 654-658, (2012) (DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.09.116.) 査読有

Gao, L., Danno, A., Fujii, S., Fukuda, W., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Indole-3-glycerol-phosphate synthase is recognized by a cold-inducible group II chaperonin in *Thermococcus kodakarensis*. Appl. Environ. Microbiol. (American Society for Microbiology, Washington DC, USA), 78, 3806-3815, (2012) (DOI:10.1128/AEM.07996-11.) 査読有

Sano, S., Yamada, Y., Shinkawa, T., Kato, S., Okada, T., Higashibata, H., and Fujiwara, S. Mutations to create thermostable reverse transcriptase with bacterial family A DNA polymerase from *Thermotoga petrophila* K4. J. Biosci. Bioeng. (Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands), 113/3,

315-321, (2012) (DOI:
10.1016/j.jbiosc.2011.11.001.) 査読
有

[学会発表](計16件)

三浦 歌織, 藤原 綾子, 秀瀬 涼太, 今中 忠行, 藤原 伸介. 安定性の異なる trpC 遺伝子の置換が超好熱菌の生育に及ぼす影響 (2014年3月29日) 日本農芸化学会 2014年度大会 明治大学

岡田 和真, 秀瀬 涼太, 今中 忠行, 藤原 伸介. 超好熱菌の分岐鎖ポリアミン合成酵素の役割 (2014年3月29日) 日本農芸化学会 2014年度大会 明治大学

井上 貴央, 岡田 和真, 秀瀬 涼太, 今中 忠行, 藤原 伸介. 超好熱菌の長鎖・分岐型ポリアミンの翻訳促進効果 (2014年3月28日) 日本農芸化学会 2014年度大会 明治大学

井上 貴央, 秀瀬 涼太, 岡田 和真, 福田 青郎, 今中 忠行, 藤原 伸介. 長鎖・分岐型ポリアミン添加による高温下での無細胞翻訳系の高効率化 (2013年9月18日) 第65回日本生物工学会大会 広島国際会議場

藤原 伸介. 超好熱菌由来の長鎖分岐型ポリアミンの生合成経路と機能 (2013年10月26日) 第14回極限環境生物学会年会 明治大学

R. Hidese, T. Inoue, S. Fujiwara. An important role of cysteine desulfurase on the environmental adaptation of *Thermococcus kodakarensis*. (2013年9月12日) Thermophiles 2013 12th International Meeting at the University of Regensburg, Regensburg, Germany

Alshehri Amira, 安部 芳, 秀瀬 涼太, 今岡 進, 藤原 伸介. 耐熱性 Protein Disulfide Isomerase を利用した効率的な BPA の回収 (2013年3月26日) 日本農芸化学会 2013年度大会 東北大学

岡田 和真, 秀瀬 涼太, 福田 青郎, 大島 泰郎, 今中 忠行, 藤原 伸介. 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の新規アミノプロピル基転移酵素の同定 (2013年3月26日) 日本農芸化学会 2013年度大会 東北大学

川妻 孝平, 秀瀬 涼太, 今中 忠行, 藤原 伸介. 超好熱菌 *Thermococcus*

kodakarensis の水素・硫化水素発生に関わる転写因子 Tk-SurR の転写制御機構 (2013年3月25日) 日本農芸化学会 2013年度大会 東北大学

西川 諒, 秀瀬 涼太, 今井 友裕, 加藤 知, 跡見 晴幸, 金井 保, 片野 正展, 藤原 伸介. 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* の二つの Transcription factor B の異なる役割 (2013年3月25日) 日本農芸化学会 2013年度大会 東北大学

Sahara Tatit Novi, 長岡 英里子, 秀瀬 涼太, 今中 忠行, 藤原 伸介. 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* の低温誘導型 RNA ヘリカーゼの機能解析 (2013年3月25日) 日本農芸化学会 2013年度大会 東北大学

井上 貴央, 青木 俊, 秀瀬 涼太, 細川 桂一, 跡見 晴幸, 今中 忠行, 藤原 伸介. 超好熱性アーキアのリボソーム画分に存在する熱ショックタンパク質の機能解析 (2013年3月25日) 日本農芸化学会 2013年度大会 東北大学

藤原 伸介. 好熱菌分岐鎖ポリアミンの生合成、および高温下での翻訳の効率化 (2013年3月27日) 日本農芸化学会 2013年度大会 東北大学

長岡 英里子, 秀瀬 涼太, 今中 忠行, 藤原 伸介. 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の低温誘導型 RNA ヘリカーゼの誘導機構 (2012年12月16日) 第85回日本生化学会大会 マリンメッセ福岡

藤原 綾子, 高 楽, 秀瀬 涼太, 今中 忠行, 藤原 伸介. 耐熱性の異なる TrpC が超好熱菌の生育に及ぼす影響 (2012年12月16日) 第85回日本生化学会大会 マリンメッセ福岡

井上 貴央, 青木 俊, 秀瀬 涼太, 細川 桂一, 跡見 晴幸, 今中 忠行, 藤原 伸介. 超好熱性アーキアのリボソーム画分に存在する熱ショックタンパク質の機能解析 (2012年12月15日) 第85回日本生化学会大会 マリンメッセ福岡

[図書](計3件)

Fujiwara, S., Hidese, R., and Fukuda, W. Protein synthesis and polyamines in thermophiles: Effect of polyamines on nucleic acid maintenance and gene

expression. *In* T. Kusano and H.Suzuki (ed.), Polyamines, a universal molecular nexus for growth, survival and specialised metabolism (Springer Co.Ltd., New York)(2014) in press

Fukuda, W., Hidese, R., and Fujiwara, S. Long-chain and branched polyamines in thermophilic microbes. *In* T. Kusano and H.Suzuki (ed.), Polyamines, a universal molecular nexus for growth, survival and specialised metabolism (Springer Co.Ltd., New York)(2014) in press

松田 祐介、田中 克典、東端 啓貴、福田 青郎、関 由行、藤原 伸介 . 遺伝子工学の原理 三共出版 (2012), 201(1-81)

〔その他〕

ホームページ等

<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~fujiwara/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤原 伸介 (FUJIWARA SHINSUKE)
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号：90263219

(3)連携研究者

今中 忠行 (IMANAKA TADAYUKI)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号：30029219

跡見 晴幸 (ATOMI HARUYUKI)
京都大学・工学研究科・教授
研究者番号：90243047