

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2012～2015
課題番号：24580102
研究課題名(和文) 原核生物Hsp90シャペロンネットワークの解析

研究課題名(英文) The prokaryotic Hsp90 chaperone network

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアのHtpG (Hsp90) は、高温等のストレス下で必須の働きをする。我々は、HtpGがDnaK2 (Hsp70) と直接相互作用すること、HtpGは、ATP依存のあるいは非依存に、DnaK2と共同で変性タンパク質を再活性化することを明らかにした。DnaJ2 (Hsp40) やGroEL (Hsp60) もHtpGと相互作用した。我々は、Hsp90/HtpGのATPase活性を増大させる化合物を発見したが、ATPase活性の増大によりDnaK2との協調的シャペロン作用は阻害された。この協調的シャペロン作用が起こるには、HtpGのATPase活性が適切に調節される必要があるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：HtpG, a bacterial heat shock protein 90 (Hsp90), is essential for thermotolerance in some prokaryotes. HtpG functioned with DnaK2 (Hsp70)/DnaJ2/GrpE to assist unfolding/folding of denatured proteins in both ATP-dependent and -independent fashions. The cooperative action of HtpG and DnaK2 might play a key role under stress. DnaJ2 and GroEL also interacted with HtpG physically. We found that a naturally occurring styryl-lactone goniotalamin activates the ATPase activity of Hsp90. Unexpectedly, it inhibited the activity of HtpG that assists refolding of a non-native protein in cooperation with the DnaK2 chaperone system. It indicates that the ATPase activity of HtpG has to be controlled so that it can co-operate with DnaK2 effectively.

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 シアノバクテリア

1. 研究開始当初の背景

真核生物の Hsp90 は、単独で機能するのではなく、他のシャペロンやコシャペロンと複合体を形成して機能するが、原核生物においては (Hsp90 の原核生物ホモログである) HtpG を含む複合体が検出されてこなかったために、一体どのようにしてシャペロン作用するのか不明であった。

我々は、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 株の HtpG と DnaJ (Hsp40)、HtpG と DnaK2 (Hsp70)、DnaJ と DnaK2 が相互作用し複合体を形成することを酵母ツーハイブリッド法、プルダウン法等で初めて明らかにした。真核生物とは異なり、Hop などのコシャペロンを介せず、HtpG は DnaK2 と直接結合した。

DnaJ や DnaK2 は、シアノバクテリアに複数種存在する DnaJ や DnaK ホモログの一つで、HtpG と同様にストレス誘導される。高温ストレス下におけるシアノバクテリアの生育・生存にとって HtpG が必須の働きをすることを我々は明らかにした (i) が、HtpG は DnaK2/DnaJ2 と協同でシャペロン作用して熱耐性に貢献するのではないかと考えた。大腸菌等の DnaK はコシャペロン (シャペロン補助因子) である DnaJ 及び GrpE とシャペロン系を形成することが明らかにされているが、我々はシアノバクテリアの DnaK2/DnaJ2/GrpE シャペロン系を初めて確立した。DnaK2 は、コシャペロンである DnaJ2 と ATP に依存して、熱変性したリンゴ酸脱水素酵素や尿素変性した乳酸脱水素酵素の再折り畳み (refolding) を行い、GrpE (ヌクレオチド交換因子) がこのシャペロン活性を増大させた。

この DnaK2 シャペロン系と HtpG の協調的シャペロン作用を調べた。HtpG に結合した変性タンパク質は、DnaK2 シャペロン系に受け渡され、折り畳まれることを初めて明らかにした。このような HtpG-DnaK2 シャペロンネットワークと協調的シャペロン作用の発見は、原核生物 Hsp90 (HtpG) の作用機構解明に向けた第一歩となった。

我々は *S. elongatus* の *htpG* 変異株が高温に加え低温にも感受性であることを見出し、HtpG が低温下においても重要な働きをすることを明らかにした。野生株は低温下で GroEL と DnaK が含まれる複合体を蓄積するのに対して、*htpG* 変異株はこの複合体を蓄積しなかった ()。この複合体のサイズは 450kDa であり、約 60kDa の GroEL が大腸菌のようなホモ 14 量体を形成しないで、DnaK や HtpG と複合体を形成するのではないかと推察された。さらに、好冷細菌の *Shewanella frigidimarina* などの HtpG が GroEL や DnaK と相互作用することが免疫沈降法によって明らかにされた ()。これらの結果は、低温ストレス下では、GroEL-HtpG-DnaK2 複合体が存在し、HtpG が DnaK に加えて GroEL とネットワークを構築していることを示唆す

るものである。

2. 研究の目的

(1) 我々が発見した新規 HtpG-DnaK2 シャペロン系における HtpG と DnaK2 の協調的作用機構を解明する。

(2) HtpG と DnaK2 の協調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機能するのではないかと仮定し、それを実証する。

(3) HtpG のシャペロン機能を調節する小分子化合物を探索し、HtpG の ATPase 活性が、そのシャペロン機能に及ぼす影響を明らかにする。

(4) 低温ストレスで形成されることが示唆された新規 HtpG-GroEL シャペロン系を (生化学的に) 検証する。

3. 研究の方法

(1) *S. elongatus* の HtpG、DnaK2、DnaJ2、GrpE、GroEL1、GroEL2 及び種々の Jドメインタンパク質 (JDP) 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。

(2) ATPase 活性は、ピルビン酸キナーゼ反応と乳酸脱水素酵素反応を共役させることで、NADH の減少速度として分光光度計により経時的に測定した。

(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。

4. 研究成果

(1) HtpG と DnaK2 間の基質 (変性タンパク質) の移動は両方向で起こり、方向により HtpG のシャペロン作用における ATP 依存性が異なる ()。

3 種類のタンパク質基質の折り畳み反応を解析した。熱変性させたリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) に HtpG や DnaK2 シャペロン系を其々単独で加えても折り畳まれる (再活性化される) ことはなかったが、MDH を HtpG 共存下で熱処理し MDH-HtpG 複合体を形成させると、変性 MDH は DnaK2 シャペロン系に依存して活性化した。ATPase 活性を失った HtpG 変異体 (D79N や E34A) や Hsp90/HtpG の阻害剤ラディシコールを用いた実験の結果から、HtpG から DnaK2 への変性 MDH の転移反応には ATP が必要ではないことが明らかになった。

次に、熱変性させたグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) や尿素変性させた乳酸

脱水素酵素 (LDH) を用いて折り畳み反応を解析した。熱変性 MDH とは異なり、これらの酵素は DnaK2 シャペロン系に依存して活性化した。HtpG 単独では、これらの基質の折り畳みを助けなかったが、HtpG は DnaK2 シャペロン系を介した折り畳み反応を促進した。この促進はラディシコールによって完全に阻害されたので、HtpG の ATP 加水分解反応に依存して起こることが明らかになった。

これらの結果から、HtpG と DnaK2 の協同的シャペロン作用は、二つの異なる機構で起こることが示された (図 1)。

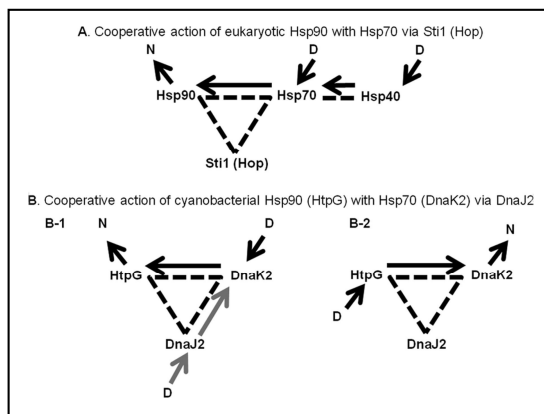


図 1. 真核生物及び原核生物 Hsp90/HtpG と Hsp70/DnaK2 との協調的シャペロン作用 ()。

A. 真核生物の Hsp90 と Hsp70 は、コシャペロン Hop を介して物理的に相互作用する。非天然タンパク質 (D) は Hsp70 のシャペロン作用を受けた後に、Hsp90 の (ATP 依存的) 介助を受けて天然構造に折り畳む。B. 我々が確立した原核生物の HtpG と DnaK2 の協調的シャペロン作用 ()。真核生物と異なり二つのシャペロンは直接相互作用する (DnaJ2 は HtpG と DnaK2 の両方に結合するので、3 者複合体が形成される場合には DnaJ2 が相互作用を仲介することも考えられる)。D は、図 A と同様に DnaK2 のシャペロン作用を受け、最終的に、(ATP 依存的に) HtpG の介助を受けて天然構造に折り畳む (B-1)。あるいは、D はまず HtpG にリクルートされて、(ATP 非依存的に) DnaK2 に転移し、その介助を受けて天然構造に折り畳む (B-2)。

(2) DnaJ2 による HtpG のシャペロン機能の調節

真核細胞 Hsp90 と Hsp70 は、Hop と呼ばれるコシャペロンに仲介されて相互作用するが、Hop はこれらシャペロンの ATPase 活性を制御し、協奏的シャペロン作用を可能にしている。Hop のホモログは原核細胞では見つからない。

上記の HtpG-DnaK2 シャペロン系において、DnaJ2 はコシャペロンとして、DnaK2 のシャペロン機能にとって必須の働きをするだけでなく、HtpG のコシャペロンとしても重要な働きをするのではないかと新規な仮

説を立てて、その実証を試みてきた。プルダウン法等により、HtpG は J ドメイン (DnaK との相互作用ドメイン) 以外の領域と相互作用することを明らかにし、さらに DnaJ2 は HtpG と基質との相互作用を弱めることを示唆する結果を得た。これらの結果は、DnaJ2 が HtpG のコシャペロンとして、HtpG の基質解離を促してそのシャペロン作用を調節することを示唆するものである。

DnaJ2 は、J ドメインタンパク質 (JDP) ファミリーのメンバーで、メンバーは三つのタイプ (I 型 ~ III 型) に分類される。DnaJ2 は II 型 JDP であるが、*S. elongatus* ゲノムには 10 種類の JDP をコードする ORF が存在するので、これらを単離・精製して、果たしてある種の J タンパク質 (例えば DnaJ2) のみが HtpG と DnaK2 の協同作用に関与するかどうかを調べた。

大腸菌で発現し、精製が可能であった JDP の中で、DnaJ1 (I 型 JDP) と DnaJ2 (II 型 JDP) のみが DnaK2 の (変性タンパク質の再折り畳み反応における) コシャペロンとして機能した。これは、HtpG と DnaK2 の協調的シャペロン作用に関与しうる JDP の種類は限定的であることを示唆するものである。今後、DnaK2/DnaJ1/GrpE と HtpG が協調的にシャペロン作用するかどうかを調べる予定である。

(3) HtpG のシャペロン作用を調節する小分子化合物の探索とその調節機構 ()

HtpG の ATPase 活性を増大させる新規天然小分子化合物 goniothalamin を発見した。多数の報告がされている阻害剤に比べると、活性化剤はほとんど知られていなかった。Goniothalamin を HtpG-DnaK2 シャペロン系に加えて、HtpG の ATPase 活性 (だけ) を増大させると、(予想に反して) 変性タンパク質の再折り畳み反応は阻害された。この結果は、HtpG と DnaK2 の協調的シャペロン作用が高效率で起こるには、これら二つの分子シャペロンの ATPase 活性のバランスが重要であることを示すものである。

(4) HtpG-GroEL シャペロンネットワーク

Native-PAGE 法によって、*S. elongatus* の二種類の GroEL の一つと HtpG の間に新規な物理的相互作用を検出した。この相互作用によって、GroEL と HtpG の両方の ATPase 活性が 10~20% 増大し、GroEL あるいは HtpG のシャペロン機能 (変性タンパク質の凝集抑制活性) が活性化した。

以上から、ストレス誘導性の HtpG、GroEL、DnaK2、DnaJ2 はネットワークを形成し、共同で、変性タンパク質の凝集を阻止し、元の機能的構造に折り畳むのを助けるものと考えられた。

< 引用文献 >

i. Tanaka N, Nakamoto H. FEBS Lett.

458:117-123, 1999.
 . Hossain MM, Nakamoto H, Curr Microbiol. 44:291-296, 2002
 . Garcia-Descalzo *et al.*, Cell Stress Chaperones. 16:203-218, 2011
 . Nakamoto *et al.*, J Biol Chem. 289:6110-6119, 2014.
 . Yokoyama *et al.*, J Biochem. 157:161-168, 2015.

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)

Yokoyama, Y., A. Ohtaki, I. Jantan, M. Yohda and H. Nakamoto, Goniothalamine enhances the ATPase activity of the molecular chaperone Hsp90 but inhibits its chaperone activity, **The Journal of Biochemistry**, 査読有, Vol. 157, No.3, 2015, pp.161-168, DOI: 10.1093/jb/mvu061

Nakamoto, H., K. Fujita, A. Ohtaki, S. Watanabe, S. Narumi, T. Maruyama, E. Suenaga, T.S. Misono, P.K. Kumar, P. Goloubinoff and H. Yoshikawa, Physical interaction between bacterial heat shock protein (Hsp) 90 and Hsp70 chaperones mediates their cooperative action to refold denatured proteins, **The Journal of Biological Chemistry**, 査読有, Vol. 289, No.9, 2014, pp.6110-6119, DOI: 10.1074/jbc.M113.524801.

Nakamoto, H. and H. Osada, Molecular chaperones as drug targets, **Current Pharmaceutical Design**, 査読無, Vol. 19, No. 3, 2013, pp.307-308, DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138161213804143671>

Miyata, Y., H. Nakamoto and L. Neckers, The Therapeutic Target Hsp90 and Cancer Hallmarks, **Current Pharmaceutical Design**, 査読有, Vol. 19, No.3, 2013, pp.347-365, DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138161213804143725>

[学会発表](計 32 件)

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 11 月 12 日-15 日, Sitges (スペイン)

仲本準, 分子シャペロン Hsp90 の ATPase

活性の増大により、シャペロン機能が抑制され細胞毒性が生じる, 第 10 回臨床ストレス応答学会, 2015 年 11 月 6 日, 東京農工大学 (東京都・小金井市)

仲本準, Naturally occurring small-molecule inhibitors and activators of the molecular chaperone Hsp90, The Biology of Molecular Chaperones, 2015 年 5 月 8 日-13 日, Crete (ギリシャ)

仲本準, シアノバクテリア Hsp90 と Hsp60 の相互作用, 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月 16 日-18 日, 東京農業大学 (東京都・世田谷区)

仲本準, 分子シャペロン HtpG (Hsp90) と DnaJ (Hsp40) の相互作用の解析, 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月 16 日-18 日, 東京農業大学 (東京都・世田谷区)

仲本準, シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 における 2 種類の ClpB (Hsp100) の生化学的解析, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日-27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

仲本準, 異なる環状リポペプチド化合物が原核及び真核生物の分子シャペロン Hsp90 に及ぼす影響, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日-27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

仲本準, シアノバクテリア Hsp70 (DnaK2) と Hsp90 (HtpG) 及びリン脂質との特異的相互作用, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日-27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

仲本準, シアノバクテリアのストレス耐性とシャペロニン GroEL2, 2014 年度日本農芸化学会関東支部大会, 2014 年 10 月 18 日, 埼玉大学 (埼玉県・さいたま市)

仲本準, Prokaryotic Hsp90/Hsp70 chaperone machinery, 7th International Conference on the Hsp90 Chaperone Machine, 2014 年 10 月 15 日-19 日, Seon-Seebruck (ドイツ)

仲本準, Naturally occurring small-molecule activators of Hsp90, 7th International Conference on the Hsp90 Chaperone Machine, 2014 年 10 月 15 日-19 日, Seon-Seebruck (ドイツ)

仲本準, Amphitropic DnaK2: Its

association with Hsp90 and lipid membrane in cyanobacteria, FASEB Science Research Conference 'Protein Folding in the Cell', 2014年7月20日-25日, Saxtons River/ Vermont (アメリカ)

仲本準, シアノバクテリアの分子シャペロンと光合成, 第5回光合成学会年会, 2014年5月30日-31日, 近畿大学農学部 (奈良県・奈良市)

仲本準, Hsp90 を活性化する天然小分子化合物, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014年3月27日-30日, 明治大学 (神奈川県・川崎市)

仲本準, シアノバクテリア Hsp90 のコシャペロンと、Hsp90 と Hsp70 のシャペロン協同作用, 第55回日本植物生理学会年会, 2014年3月18日-20日, 富山大学 (富山県・富山市)

仲本準, Physical interaction between bacterial Hsp90 and Hsp70 chaperones mediates their collaboration to refold denatured proteins, 第231回発生研セミナー兼ミニシンポジウム, 2014年2月20日-21日, 熊本大学発生医学研究所 (熊本県・熊本市)

仲本準, シアノバクテリア (ラン藻) のストレス耐性と分子シャペロン (HSP), PROS セミナー & 大学院特別講義, 2014年2月7日, 愛媛大学 (愛媛県・松山市)

仲本準, 種々の基質に対する原核生物 Hsp90 と Hsp70 の協同的シャペロン作用, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3日-6日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

仲本準, Hsp90 の機能を調節する小分子化合物の探索と作用機構の解明, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3日-6日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

仲本準, シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の Hsp90 (HtpG) と Hsp70 (DnaK) の協同的シャペロン作用, ラン藻の分子生物学 2013, 2013年11月22日-23日, かずさアカデミアホール (千葉県・木更津市)

- ②① 仲本準, 種々の環状リポペプチド抗生物質が分子シャペロン Hsp90 の機能に及ぼす影響, 第12回微生物研究会, 2013年10月5日, 東京電機大学 (東京都・足立区)

- ②② 仲本準, Hsp90 を調節する新規天然小分子化合物の同定と作用機構の解明, ラン藻ゲノム交流会, 2013年7月13日, 東京大学 (東京都・目黒区)

- ②③ 仲本準, Cyclic lipopeptide antibiotic inhibitors and natural product activators of Hsp90, The Biology of Molecular Chaperones, 2013年5月17日-22日, Sardinia (イタリア)

- ②④ 仲本準, ストレス下における分子シャペロン DnaK2 (Hsp70) の機能と脂質・生体膜との相互作用, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013年3月24日-27日, 東北大学 (宮城県・仙台市)

- ②⑤ 仲本準, シアノバクテリア DnaJ コシャペロンの生化学的解析, 第54回日本植物生理学会年会, 2013年3月21日-23日, 岡山大学 (岡山県・岡山市)

- ②⑥ 仲本準, 分子シャペロン DnaK2 (Hsp70) は、HtpG (Hsp90) と膜脂質の両方と相互作用する, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日-14日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市)

- ②⑦ 仲本準, Hsp90 を活性化する新規天然小分子化合物の同定と作用機構の解明, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日-14日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市)

- ②⑧ 仲本準, シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の DnaK システムと GroEL との協調的シャペロン機構の解析, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日-14日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市)

- ②⑨ 仲本準, シアノバクテリアのストレス耐性とシャペロニン GroEL2, 第11回微生物研究会, 2012年9月22日, 東京大学 (東京都・文京区)

- ③⑩ 仲本準, Cyclic lipopeptide antibiotics as Hsp90 inhibitors, The 6th International Conference on the Hsp90 Chaperone Machine, 2012年9月19日-23日, Les Diablerets (スイス)

- ③⑪ 仲本準, タンパク質の世話役・分子シャペロン, 埼玉県高等学校生物研究会, 2012年5月25日, 埼玉県立浦和高等学校 (埼玉県・さいたま市)

- ③⑫ 仲本準, Cyanobacterial DnaK2: Its connection with Hsp90 (HtpG) and lipid

membrane , Microbial Stress: from Molecules to Systems , 2012 年 5 月 10 日 -13 日 , Belgirate (VB), Maggiore Lake (イタリア)

〔図書〕(計 1 件)

仲本準 , CRC Press, **Stress Biology of Cyanobacteria: Molecular Mechanisms to Cellular Responses**, 2013, 375 (113-144).

〔その他〕

ホームページ等

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

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 : 3 0 1 9 2 6 7 8

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :