

集光性超分子フィコビリソームの構築に関わる分子シャペロンの

作用機構の解明

Functions of molecular chaperones in the assembly of the light-harvesting phycobilisomes

プロジェクト代表者：仲本 準（大学院理工学研究科・准教授）

Hitoshi Nakamoto (Graduate school of science and engineering, Associate Professor)

1 研究背景・目的

集光性色素タンパク複合体フィコビリソームは、シアノバクテリア（ラン藻）や紅藻のチラコイド膜表面に付着している巨大な半円盤状の、フィコシアニンのようなフィコビリタンパク質が集合した超分子会合体である。フィコビリソームは形態学的には二つの構造、即ち、中心部分のコア、そこから広げた手の指のように放射状に伸びた棒状のロッドから形成されている。フィコビリタンパク質の会合状態を保ち高効率のエネルギー伝達を実現するために、フィコビリソームリンカーポリペプチドが重要な役割を果たしていると考えられている。

分子シャペロンは、リボソームで合成された直後の新生ポリペプチドの折れたたみ（folding）や集合（assembly）、変性タンパク質の再生などを介助する。高温などのストレス下では熱ショックタンパク質（Hsp）として著しく誘導されて、変性タンパク質の不可逆的凝集阻止や天然の構造への再生、あるいは変性タンパク質の分解に関与すると考えられている。

本研究では、モデル生体超分子としてシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 株のフィコビリソームと低分子量 Hsp や HtpG などの分子シャペロンを用いて、フィコシアニン $\alpha\beta$ アポタンパク質からフィコシアニン $\alpha\beta$ ヘテロダイマー形成、ディスク形成、ロッド構築に至る、フィコビリソーム超分子会合体構築に果たす分子シャペロンの役割を分子レベルで解明することを最終目的とする。本年度の研究目的は、1) 低分子量 Hsp とフィコビリソーム構成ポリペプチドとの相互作用を解析すること、2) 原核生物の Hsp90 ホモログである HtpG とフィコビリソームリンカーポリペプチドとの相互作用を解析しフィコビリソームロッド構築に果たす分子シャペロンの役割を解明することである。

2 成果

1) 低分子量 Hsp とフィコビリソーム構成ポリペプチドとの相互作用

ヒスチジントグを融合した低分子量Hspを調製し、プルダウン法などを用いて、低分子量Hspとフィコビリソーム構成ポリペプチドとの *in vitro* における相互作用を解析した。その結果、低分子量Hspがフィコビリソームの主要構成ポリペプチドであるフィコシアニンに加え、フィコビリソームリンカーポリペプチドとも相互作用することを明らかにした。前者が、過酸化水素存在下で熱（50°C）処理をしたときに観察されたのに対して、後者の相互作用は、過酸化水素非存在下、30°Cでも観察された。

低分子量Hsp遺伝子破壊株や低分子量Hsp遺伝子構成的発現株などの変異株を用いて、低分子量

Hspが細胞の酸化ストレス耐性獲得に重要な役割を果たすこと、さらに酸化ストレス下におけるフィコシアニンなどの光合成色素（タンパク質）の安定化に低分子量Hspが関与することを明らかにした。これらの結果は、細胞における低分子量Hspとフィコシアニンの相互作用を示唆するものである。

2) HtpG とフィコビリソームリンカーポリペプチドとの相互作用

フィコシアニン単量体 $\alpha\beta$ から構成されるロッドの構成単位は、ディスクと呼ばれる六量体 $(\alpha\beta)_6$ である。各ディスクに存在するリンカーポリペプチド間の特異的相互作用を介して複数のディスクが集合し、ロッドが形成されると考えられている。我々は HtpG がリンカーポリペプチドと特異的に相互作用することを既に明らかにしたが、本研究ではリンカーポリペプチドと相互作用する HtpG の領域（ドメイン）を特定した。HtpG は、Hsp90 と同様に、N 末ドメイン、中間ドメイン、C 末ドメインの三つのドメインからなるが、PCC7942 株 HtpG の各ドメインのみを有する、あるいはN 末あるいはC 末ドメインのみを欠損した、各ポリペプチドを大腸菌に大量発現させニッケルカラムで精製した。各ポリペプチドによるリンカーポリペプチドの熱変性凝集抑制の測定や免疫沈降法等で *in vitro* におけるこれらポリペプチド間の相互作用を解析した。その結果、HtpG の N 末ドメイン及び中間ドメインの両方がリンカーポリペプチドと相互作用するが、特に中間ドメインが高い親和性をもって相互作用することが明らかになった。

また、野生株に比べると *htpG* 変異株における、窒素栄養欠乏下のフィコビリソームの分解や窒素栄養源添加後のフィコビリソーム再構築が遅延することを明らかにした。これは、フィコビリソームの分解や再構築において分子シャペロン HtpG が重要な役割を果たすことを示唆するものである。

3 関連発表論文

- 1) Watanabe, S., Kobayashi, T., Saito, M., Sato, M., Nimura-Matsune, K., Chibazakura, T., Taketani, S., Nakamoto, H. and H. Yoshikawa

Studies on the role of HtpG in the tetrapyrrole biosynthesis pathway of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Biochem. Biophys. Res. Commun., 352:36-41, 2007.

- 2) Nakamoto, H. and L. Vigh

The small heat shock proteins and their clients (Invited review).

Cell. Mol. Life Sci., 64(3):294-306, 2007.

- 3) Kojima K. and H. Nakamoto

A novel light- and heat-responsive regulation of the *groE* transcription in the absence of HrcA or CIRCE in cyanobacteria.

FEBS Lett., 581: 1871-1880, 2007.

4 期間中に獲得した外部資金など

平成 19 年度、ヤマハ発動機株式会社との共同研究、代表

平成 19/20 年度、二国間交流事業共同研究・セミナー（日本学術振興会）、インドとの共同研究、代表