

# ランソウの熱ショックタンパク質(Hsp)遺伝子の 発現調節機構の解明

(課題番号:11640641)

平成 11 年度~平成 12 年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成 13 年 11 月

埼玉大学附属図書館

研究代表者 仲本 準



(埼玉大学理学部助教授)

998005221

464

N

埼大コーナー

998005221

平成 11 年度~平成 12 年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))

## 研究成果報告書

課題番号: 11640641

研究課題:ランソウの熱ショックタンパク質(Hsp)遺伝子の発現調節機構の解明

埼玉大学附属図書館



998005221

埼大コーナ-

### はしがき

#### (目的)

原核生物の熱ショックタンパク質(HSP)遺伝子の発現調節機構は、大腸菌のシグマ 32 因子に代表されるシグマ因子による「正」の調節により説明されてきたが、特別な熱ショックプロモーターが関与しない新しい調節機構が枯草菌等で最近明らかにされた。これは、オペレーターへのリプレッサーの結合により転写が抑制されるという「負」の調節機構である。CIRCE エlementへのHrcAリプレッサーの結合による調節機構が特に詳しく解析されている。本研究では、常温性と好熱性ランソウの、5'上流調節領域に特別な熱ショックプロモーターも CIRCE 配列も存在しない *orf7.5*、*htpG*、*hspA* (small HSP ホモログ)の各遺伝子の発現調節機構の解明を目的とした。これらすべての HSP 遺伝子は、我々が初めてランソウからクローニングした遺伝子で、特に *orf7.5* は、遺伝子塩基配列あるいはタンパク質一次構造のデータベースに相同な配列が無い、新規な HSP 遺伝子である。

ランソウ(シアノバクテリアあるいは藍色細菌ともよばれる)は、高等植物と同様に二種の光化学系からなる光合成電子伝達系をもち、酸素発生型光合成を行う原核生物である。地球に古くから生存し、多様な環境(ストレス)に適応してきたランソウと HSP の間には「親密」で高度に多様化した「ユニーク」な関係が構築されてきたと想像するが、ランソウの HSP 遺伝子発現調節機構は全く研究されていない。ランソウ特有の遺伝子発現調節機構の解明は、生物全体における HSP 遺伝子発現調節機構の多様性や、新規な遺伝子発現調節に関する重要な知見をもたらすものと期待される。

#### (研究成果)

##### (1) 新規な HSP 遺伝子 *orf7.5* の発見と Orf7.5 による *groESL* オペロンの発現調節

常温性ランソウ *Synechococcus* sp. PCC 7942 から、熱ショックで誘導される *orf7.5* 遺伝子をクローニングした。*orf7.5* の塩基配列や(推定)翻訳産物の一次構造と相同な配列は、現時点でもデータベースに見出されない。*orf7.5* 遺伝子破壊株を作製し、この遺伝子が高温における生存に必須のものであることを明らかにした。野生型の *orf7.5* 遺伝子を *orf7.5* 遺伝子破壊

株のゲノム中性領域に戻すと表現型が野生型に回復するのに対して、*orf7.5* のコード領域にフレームシフトや点変異を起こしたものは相補しないことから、Orf7.5 はタンパク質として高温耐性に関与していることが示唆された。*orf7.5* 遺伝子の破壊により *groESL* の mRNA の蓄積量が顕著に減少すること、クロラムフェニコール添加によりタンパク合成を阻害すると *groESL* の mRNA の蓄積量は著しく減少するが、*orf7.5* 転写産物の蓄積量は増加することなどの結果から、Orf7.5 はそれ自身の発現を自己調節し、*groESL* 遺伝子については「正」の調節因子として働くという作業仮説をたてた。Orf7.5 タンパク質の大腸菌における大量発現系と簡便な精製法を確立した。Orf7.5 にはタンパク質の熱変性による凝集を抑制する活性があった。これは、Orf7.5 (推定分子質量は 7.5 kDa) が世界最小の分子シャペロンであることを示唆するものである。Orf7.5 の高次構造を、愛媛大学の森田勇人助教授と共同で解析中である。発表論文: J. Biol. Chem. (2001) 276: 25088-25095

#### (2) 好熱性ランソウの small HSP 遺伝子の転写調節: 新規な転写抑制機構

我々は、好熱性ランソウ *Synechococcus vulcanus* から small HSP 遺伝子 (*hspA*) を初めてクローニングした。この遺伝子の転写開始点上流には大腸菌主要シグマ因子に認識されるプロモーター配列が存在することから、この遺伝子の発現は、非ストレス下でリプレッサーによる抑制を受けていることを仮定した (J. Bacteriol. (1998) 180: 3997-4001)。実際、転写と翻訳開始点の間の 5'-UTR には、好熱性ランソウ細胞抽出液中の未知のタンパク質が結合する、新規な逆位繰り返し配列が存在した。この配列が、未知のリプレッサータンパク質が結合するオペレーターであるという作業仮説をたてた。現在、この配列に結合するタンパク質の精製とその遺伝子のクローニングを行っている。第 24 回日本分子生物学会年会発表・論文投稿準備中

#### (3) 好熱性ランソウ small HSP 遺伝子の転写後発現調節: downstream box による翻訳促進

*Synechococcus vulcanus* の *hspA* 遺伝子が大腸菌に導入すると、30°C から 42°C への温度シフトにより HspA タンパクが大量に蓄積した。これに対して、*hspA* の転写は 30°C でも 42°C でも同様に構成的に起こった。転写開始点はランソウにおけるものと同一であったが、熱ショックによる一過的な転写誘導は起こらなかった。これらの結果は、転写後調節を示唆するものである。*hspA* のコード領域の異なる部位に *lacZ* 遺伝子をフレームを合わせて融合したものをプラスミドベクターに構築し大腸菌に導入した。*hspA* の第 2 コドンで融合したものの活性は顕著に低かったが、第 14 コドンで融合すると活性が回復し、30°C よりも 42°C で活性が約 3 倍増加した。第 37 コドンで融合すると各々の活性がさらに約 2 倍増加した。第 14 コドンと 37 コドンの間には、大腸菌の 16S rRNA の 1467-1481 番の塩基配列と相補的な配列 (downstream box) が存在した。同様の anti-downstream box は、*Synechococcus vulcanus* の 16S rRNA にも存在した。*hspA* 遺伝子発現調節に downstream box が翻訳エンハンサーとして働いていることが示唆された。第 23 回日本分子生物学会年会発表・論文投稿準備中

#### (4) 光合成電子伝達系による HSP 遺伝子発現調節

常温性ランソウ *Synechocystis* sp. PCC 6803 の *groEL* や *hspG* の転写産物の、熱ショックに

よる蓄積は、光照射により促進される。暗所では、熱ショックを与えても顕著には蓄積しない。この光依存の転写誘導は、光合成電子伝達阻害剤 DCMU により阻害され、一方 DBMIB により活性化される。これら二つの阻害剤が電子伝達体の一つであるプラストキノンの前後の電子伝達を阻害することから、プラストキノンの酸化還元状態により HSP 遺伝子の発現レベルが調節されていることが示唆された。プラストキノンの酸化還元状態により未知のプロテインキナーゼの活性が調節され、これが転写因子の活性を調節し、HSP 遺伝子の発現調節が起こるという作業仮説をたてた。

(5) *htpG* 遺伝子破壊株の構築: HtpG はランソウの高温耐性に必須である。

*htpG* 遺伝子をランソウ (*Synechococcus* sp. PCC 7942) から初めてクローニングした。この遺伝子破壊株を作製し、原核生物では初めて、*htpG* が高温における生存に必須のものであることを明らかにした。HtpG は光合成生物において特に重要な働きをしているのではないかと考えた。 発表論文: FEBS Lett. (1999) 458: 117-123

(6) 低温順化における HtpG の役割と、低温で誘導されるマルチシャペロン複合体の発見

HtpG タンパクは低温処理で蓄積し、*htpG* 遺伝子破壊株の生育や光合成活性が低温 (16°C) で阻害されたことから、*htpG* 遺伝子が低温順化に重要であることが示唆された。GroEL、DnaK と 48 kDa の未知のタンパク質を含む 450 kDa の新規な複合体が低温で誘導されることを見出した。この複合体の誘導は *htpG* 遺伝子破壊株では阻害されたので、HtpG がその形成に関与していることが示唆された。 発表論文: Curr. Microbiol. (2001) 印刷中

(7) small HSP 大量発現株の構築: small HSP は光合成に高温耐性を与える。

small HSP を構成的に大量発現する *Synechococcus* sp. PCC 7942 株を構築した。このランソウの高温 (50 °C) における生存率、光化学系 II やフィコシアニンの熱安定性が顕著に増加した。高温ストレス下で、small HSP が光合成の集光機能や光合成電子伝達系の防御に働くことが明らかになった。 発表論文: FEBS Lett. (2000) 483: 169-174

## 研究組織

研究代表者: 仲本 準 (埼玉大学理学部助教授)

## 研究経費

平成 11 年度	2,100 千円
平成 12 年度	1,400 千円
計	3,500 千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等(論文発表)

- 1: Tanaka, N. and H. Nakamoto  
HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria.  
FEBS Lett. 458: 117-123, 1999.
- 2: Roy, S. K., T. Hiyama and H. Nakamoto  
Purification and characterization of the 16-kDa heat-shock-responsive protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which is an alpha-crystallin-related, small heat shock protein.  
Eur. J. Biochem. 262:406-416, 1999.
- 3: Nakamoto, H., N. Suzuki and S. K. Roy  
Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria.  
FEBS Lett. 483: 169-174, 2000.
- 4: Nakamoto, H., N. Tanaka and N. Ishikawa  
A novel heat shock protein plays an important role for the thermal stress management in cyanobacteria.  
J. Biol. Chem. 276: 25088-25095, 2001.
- 5: Hossain, M. M. and H. Nakamoto  
HtpG plays a role in cold acclimation in cyanobacteria.  
Curr. Microbiol. vol. 43, 2001, in press.

### (2) 口頭発表(ポスター発表含む)

- 1 : Hitoshi Nakamoto  
Structure and function of the cyanobacterial Hsp90 homologue, HtpG.  
The 1999 Annual meeting of the American Society of Plant Physiologists; Plant biology ' 99 (Baltimore Convention Center, Baltimore, MD, 米国)  
1999.7.24 - 7.28
- 2 : Hitoshi Nakamoto and Sanjit Kumer Roy  
Constitutive expression of a small heat shock protein confers thermotolerance to cyanobacteria.  
Information exchange seminar on photoconversion and photosynthesis under US-Japan cooperative project: Past, present and future prospects. (Okazaki conference center, 岡崎)

1999. 11. 15 - 11. 17

**3 : Toshihiko Kikuchi and Hitoshi Nakamoto**

Iron-stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 7942.  
Information exchange seminar on photoconversion and photosynthesis under  
US-Japan cooperative project: Past, present and future prospects. (Okazaki  
conference center, 岡崎)

1999. 11. 15 - 11. 17

**4 : 仲本 準**

ランソウの熱ショックタンパク質  
ランソウ研究会 (基礎生物学研究所、岡崎)

1999. 12. 13 - 14

**5 : 仲本 準、鈴木伸章、ロイ・サンジェット**

ランソウ低分子量熱ショックタンパク質の構成的発現  
日本植物生理学会2000年度年会 (椋山女学園大学、名古屋)

2000. 3. 27 - 3. 29

**6 : 石川南都子、仲本 準**

新規な熱ショック遺伝子によるランソウ熱ショック応答の調節  
日本植物生理学会2000年度年会 (椋山女学園大学、名古屋)

2000. 3. 27 - 3. 29

**7 : Hitoshi Nakamoto, Natsuko Ishikawa, MD. Motarab Hossain, Sanjit K. Roy, Naoki Tanaka**

Function of heat-shock proteins in cyanobacteria under heat and cold stresses.

6th International Congress of Plant Molecular Biology (Quebec, カナダ)

2000. 6. 18 - 6. 24

**8 : 仲本 準、小島幸治**

ランソウ低分子量熱ショックタンパク質の転写後発現調節  
第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸国際展示場、神戸)

2000. 12. 13 - 12. 16

**9 : ホサイン・モタロブ、仲本 準**

ランソウの低温馴化に果たす HtpG の役割  
日本植物生理学会2001年度年会 (九州産業大学、福岡)

2001. 3. 23 - 3. 26

**10 : 石川南都子、仲本 準**

ランソウの熱ストレス応答に関与する新規な熱ショック遺伝子 *orf7.5* の解析  
日本植物生理学会2001年度年会 (九州産業大学、福岡)

2001. 3. 23 - 3. 26

11: 小島幸治、仲本 準

ランソウ低分子量熱ショックタンパク質の転写調節

第 24 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜、横浜)

2001. 12. 9 - 12. 12

12: 鈴木倫累、仲本 準

ランソウ *groEL* 遺伝子の HrcA リプレッサーによる発現調節

第 24 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜、横浜)

2001. 12. 9 - 12. 12

### (3) 出版物

1: Nakamoto, H. and T. Hiyama

Heat Shock Proteins and Temperature Stress

In: Pessarakli, M. ed., Handbook of Plant and Crop Stress. 2nd Ed. Marcel Dekker., pp. 399-416, 1999.

以下の論文及び出版物のコピーを付した。

- 1: Tanaka, N. and H. Nakamoto  
HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria.  
FEBS Lett. 458: 117-123, 1999.
- 2: Roy, S. K., T. Hiyama and H. Nakamoto  
Purification and characterization of the 16-kDa heat-shock-responsive protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which is an alpha-crystallin-related, small heat shock protein.  
Eur. J. Biochem. 262:406-416, 1999.
- 3: Nakamoto, H., N. Suzuki and S. K. Roy  
Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria.  
FEBS Lett. 483: 169-174, 2000.
- 4: Nakamoto, H., N. Tanaka and N. Ishikawa  
A novel heat shock protein plays an important role for the thermal stress management in cyanobacteria.  
J. Biol. Chem. 276: 25088-25095, 2001.
- 5: Hossain, M. M. and H. Nakamoto  
HtpG plays a role in cold acclimation in cyanobacteria.  
Curr. Microbiol. vol. 43, 2001, in press.
- 6: Nakamoto, H. and T. Hiyama  
Heat Shock Proteins and Temperature Stress  
In: Pessarakli, M. ed., Handbook of Plant and Crop Stress. 2nd Ed. Marcel Dekker., pp. 399-416, 1999.