

## シアノバクテリアの二種類のシャペロニン (GroEL) における機能分化

### Functional specialization of GroEL homologues in cyanobacteria

大学院理工学研究科生命科学部門 仲本 準

Department of Biochemistry and Molecular Biology

Hitoshi NAKAMOTO

#### Abstract

The photosynthetic prokaryotic cyanobacteria generally have two copies of the *groEL* or chaperonin gene. The *groEL1* gene forms an operon with *groES*, whereas *groEL2* is not accompanied by *groES*. There is evidence for some specificity of *in vivo* function in these two GroELs. We have shown that GroEL1 can replace GroEL functionally in *Escherichia coli*, while GroEL2 cannot. GroEL1 appears to be essential in cyanobacteria, while the *groEL2* gene is dispensable under normal growth conditions. However, we showed that a *groEL2* mutant of *Thermosynechococcus elongatus* is high- and low-temperature sensitive. Our comparative biochemical characterization of the two GroELs showed that the cyanobacterial GroELs are mutually distinct and different from *Escherichia coli* GroEL. On the basis of our results, I propose the following hypothesis. GroEL1 plays an essential housekeeping role, like *Escherichia coli* GroEL. On the other hand, GroEL2 plays a role under stress that cannot be substituted by GroEL1. Cyanobacteria have acquired this unique chaperonin in order to sustain photoautotrophic life under changing environmental conditions.

シャペロンという言葉をご存知だろうか。社交界にデビューする若い女性に付き添う、介添え役の女性をさす言葉である。タンパク質の中にも、分子シャペロン (molecular chaperone) あるいは単にシャペロンと呼ばれるものが存在する(1)。細胞の中でタンパク質の合成をおこなうのは、リボソームというRNAとタンパク質からなる巨大な塊であるが、分子シャペロンは、リボソームで合成途中やできたばかりの若いポリペプチド(ひも状あるいは完全に折り畳まれていないポリペプチド)に付き添い、成熟(機能的立体構造に折り畳む)を助け、必要な場合には社交場(例えば細胞小器官)にまで連れて行き、一人前になったら離れるという、「立派な」働きをする。多数のアミノ酸がひも状に繋がったタンパク質が機能をもつためには、折り畳まれて、三次元の構造をつくる必要があることを考えると、「控目に見える」分子シャペロンはどんな細胞にとっても重要な働きをしているのではないかと想像されるが、分子シャペロンは、古細菌、真正細菌、真核生物に見出される普遍的なタンパク質である。

分子シャペロンの多くは、細胞が高温などのストレス(熱ショック)を受けると合成が促進(誘導)される熱ショックタンパク質(Hsp)である。熱ショック以外の、カドミウムや水銀などの重金属を含む有毒物質、酸化ストレス、グルコース飢餓、乾燥、塩ストレス等でも誘導される。ストレス下において、分子シャペロンはタンパク質の変性を防ぎ、変性したタンパク質を再生し、再生不可能な場合には分解を介添えする。換言すると、分子シャペロンは細胞プロテオームの恒常性維持(proteostasis)のために重要な役割を果たしているといえる。ストレス下ではタンパク質が変性するので、細胞はより多くの分子シャペロンを必要とし、Hspを誘導するのであろう。分子シャペロンの重要性は、ますます認識されつつあり、その機能不全によって引き起こされる病気(chaperonopathy)も続々と報告されている。

代表的な分子シャペロンとしては低分子量 Hsp (sHsp), Hsp60(シャペロニンとも呼ばれる), Hsp70, Hsp90, Hsp100 などのタンパク質ファミリーがあげられる。以前本誌にシアノバクテリアの Hsp に関する総説(2)を寄稿さ

せてもらったが、ここでは前回ふれなかった Hsp60 に関する我々の研究を紹介したい。筆者らは、分子シャペロン遺伝子のクローニングから始めて、遺伝子発現調節、遺伝子翻訳産物(分子シャペロンタンパク質)の細胞及び試験管レベルにおける機能解析へと一步一步研究を進めてきたが、科学分析支援センターにおけるアイソトープ実験は必須のものであった。

さて、筆者の分子シャペロン研究は、研究室の学生が(光合成遺伝子をクローニングするつもりが)誤って *groEL* 遺伝子を単離した(遺伝子データベース登録番号 D86384)ことに端を発する。GroEL(遺伝子名の場合は *groEL* で、その翻訳産物であるタンパク質の場合には GroEL と記す)は、Hsp60 の一つである。大腸菌の相同遺伝子とは異なり、好熱性シアノバクテリア(らん藻)由来の、この遺伝子の近傍には *groES* 遺伝子が存在しなかった(3)ので、我々は何かの間違いかもしれないと心配した。シアノバクテリアの細胞抽出液中に、この遺伝子の翻訳産物が本当に存在するかどうかを調べるために、檜山哲夫先生(前代謝学研究室教授)が、SDS-PAGE で分離された Hsp の N 末端アミノ酸配列を解析されたところ、驚くべきことに、クローニングされた遺伝子由来の GroEL に加えて、これと相同なもう一つ別の GroEL が存在することが明らかになった。これは、大腸菌とは異なりシアノバクテリアには二種類の *groEL* 遺伝子が存在することを示唆するもので、私と、他大学から博士前期課程に入学(1993年)してきた田中直樹君とが、この GroEL をコードする遺伝子をクローニングすることになった。当時はまだ、シアノバクテリアのゲノム全塩基配列が決定されていなかった。遺伝子のクローニングは時間・労力を要する幾つもの過程からなる。簡単に述べると、全ゲノムの DNA 配列が網羅されている DNA 断片(ゲノム DNA ライブラリー)の中から[放射性同位元素で標識した、目的遺伝子と相補的な配列をもつ DNA 断片(プローブ)を用いて]目的の遺伝子を含む断片を選び出し(スクリーニングし)、その後、サザンブロット解析、サブクローニング、塩基配列決定等を繰返して、(完全長)遺伝子をクローニングし、その塩基配列を明らかにする。アミノ酸シーケンサーで決定された 10 数個のアミノ酸からなる配列を手掛かりにしてプローブを作製するわけであるが、一種類のアミノ酸に対して複数のコドンが対応しているために、アミノ酸配列から遺伝子塩基配列を推定して「良いプローブ」を作製するのは難しい。良くないプローブを用いると、一万個以上のゲノム DNA 断片から目的の遺伝子断片を探し出すのは困難であり、目的のものではない遺伝子をクローニングしてしまう可能性が大きくなる。田中君には、かなりリスクの大きいプロジェクトになりそうだったと言ったが、全く恐れることなく研究に取り組み、こちらが期待する以上の成果を出した。サザンブロット解析、塩基配列決定、ノザンブロット解析、そして転写開始点決定のためのプライマー伸長実験等を行うために何度もアイソトープ実験施設を利用した。台風が来て多量の雨に見舞われたとき、私たちの研究室のあった理学部 1 号館からアイソトープ実験施設棟までの間は水はけが悪く(大げさかもしれないが)川ようになった。靴下をぬぎズボンを持ち上げて、アイソトープ実験施設棟まで行き、いつもどおりに実験を続けていた田中君のことが忘れられない。田中君は博士後期課程にも進学し、最後まで粘り強く実験をして、研究に没頭し、さらに二つの Hsp 遺伝子のクローニング(登録番号 AB010001 及び AB002694)に成功し、四つの論文の著者となったが、それらの論文が発表された学術雑誌のインパクトファクターの合計は約 15 であった。

このようにして田中君がクローニングした *groEL* 遺伝子(登録番号 D78139)の上流(近傍)には、大腸菌のそれと同様に *groES* 遺伝子が存在した(4)。従って、大腸菌とは異なり、シアノバクテリアには二種類の *groEL* 遺伝子が存在し、一方は *groES* とオペロンを形成するが、他方はしないことが明らかになった。前者を *groEL1*、後者を *groEL2* と命名した。

なぜ、二種類の GroEL が存在するのだろうか。おそらく、それらの発現調節や機能が異なるのではないかと考えた。紙面の関係上、ここでは発現調節に関する研究(5, 6:この研究では、田中君と負けず劣らず研究に専念し続けた小島幸治君がプライマー伸長実験等を行うためにアイソトープ実験施設を利用させてもらった)にはふれず、GroEL の機能分化について述べたい。GroEL1 と GroEL2 の機能が異なるのかどうかを調べるために、シアノバクテリアの *groEL1* 及び *groEL2* 遺伝子を、大腸菌の *groEL* 遺伝子変異株に導入することにした。この変異株は通常温度では生育できるが高温では生育できない。もし、大腸菌の GroEL と同等の機能を有する場合には大腸菌は高温でも生育するようになるはずである。*groEL1* を導入すると大腸菌は高温で生育可能になった(4)が、

*groEL2* 遺伝子を導入しても (GroEL2 は大量に発現・蓄積したにもかかわらず) 生育できなかった(3). 次に, シアノバクテリアの *groEL2* 遺伝子を破壊してその機能を解析することにした. 常温性のものに比べると好熱性シアノバクテリアの遺伝子組換えは困難で時間を要したが, ようやく *groEL2* 遺伝子破壊株の構築に成功した(7). この遺伝子の破壊が可能であることから推測されるように, GroEL2 を持たないにもかかわらず, この株と野生株の通常培養条件下における生育に違いは見られなかった. しかしながら, この変異株は, 野生株が生育しうる高温下や低温下で, (野生株と同様に GroEL1 を蓄積したにもかかわらず) 全く生育できなかった. 常温性シアノバクテリアの *groEL2* 遺伝子破壊株も高温等のストレスに対して感受性であった. 一方, *groEL1* 遺伝子の破壊に成功したという報告はない. このような実験結果から, 筆者は, GroEL1 は大腸菌 GroEL と同様に, 平常時(やストレス下)の生育に必須の働きをするのに対して, GroEL2 は, ストレス下で GroEL1 では代替不可能な働きをするのではないかと考えている.

このように, GroEL1 と GroEL2 は異なる機能をもつと考えられるが, これらの GroEL の構造も異なるのだろうか. 我々は高度に精製された GroEL1 と GroEL2 を大量に調製し, これらの機能と構造を大腸菌 GroEL と比較した(8). ATP アーゼ活性やシャペロン活性に顕著な違いが見られたが, その原因はオリゴマー構造の不安定性にあることが示唆された. 大腸菌 GroEL は, 14 個の GroEL (サブユニット) が集まって (14 量体を形成して), 二段重ねのドーナツのような構造をしている. ドーナツの穴をふさぐように GroES が結合する. その結果できあがったドーナツの空洞部分の閉鎖空間の中に, 完全に折り畳まれていないポリペプチドや変性ポリペプチドが一つ入って, 細胞内の他のタンパク質から隔離され, 他の (例えば変性) タンパク質とあるまじき相互作用をすることなく, 折り畳む. 未熟あるいは変性ポリペプチド同士が相互作用しタンパク質が凝集すると細胞は死の危険に曝される. 従って, シャペロン機能を果たす上で, この構造形成は非常に重要であり, (当然のことだと思うが) 大腸菌等の GroEL は安定な 14 量体を形成する. これに対して, シアノバクテリアの GroEL のオリゴマー構造は不安定で, 種々の実験条件を試してようやく GroEL1 の 14 量体を検出することはできた. しかしながら, GroEL2 のそれを検出することは不可能であった. GroEL2 がストレス下で重要な機能を果たすには, 14 量体ではない, 大腸菌や他の生物とは異なるユニークな構造をとることが必要ではないかと考えて, 研究を進めている.

## 参考文献

1. Ellis J.  
Proteins as molecular chaperones. *Nature*. 328:378-379, 1987.
2. 仲本準  
シアノバクテリアの熱ショック応答. *CACS FORUM*. 22: 20-26, 2002.
3. Furuki, M., N. Tanaka, T. Hiyama and H. Nakamoto.  
Cloning, characterization, and functional analysis of *groEL*-like gene from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which does not form an operon with *groES*. *Biochim. Biophys. Acta (Protein Structure and Molecular Enzymology)*, 1294: 106-110, 1996.
4. Tanaka, N., T. Hiyama and H. Nakamoto.  
Cloning, characterization, and functional analysis of *groESL* operon from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*.  
*Biochim. Biophys. Acta (Protein Structure and Molecular Enzymology)*, 1343: 335-348, 1997.
5. Nakamoto, H., M. Suzuki and K. Kojima.  
Targeted inactivation of the *hrcA* repressor gene in cyanobacteria.  
*FEBS Lett.*, 549: 57-62, 2003.

6. 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.
7. Sato, S., M. Ikeuchi, and H. Nakamoto.  
Expression and function of a groEL paralog in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* under heat and cold stress. FEBS Lett., 582:3389-3395, 2008.
8. Huq, S., K. Sueoka, S. Narumi, F. Arisaka, and H. Nakamoto  
Comparative Biochemical Characterization of Two GroEL Homologs from the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942  
Biosci. Biotechnol. Biochem., in press, 2010