

分子シャペロンに魅せられて

Fascinated by molecular chaperones

理工学研究科生命科学部門 仲本 準
Graduate School of Science and Engineering
Hitoshi Nakamoto

1. はじめに

平成元年に埼玉大学に赴任した。その平成が終わり令和になり、退職までいよいよ残すところ1年余りになって、このような執筆の機会が与えられて、CACS forum 編集部の方々に感謝している。今までに二回(2002年と2010年)、CACS forum に執筆させてもらったが、今回は、埼玉大学における研究・教育活動の中で、特に分子シャペロンに関するものを総括しながら書き進めたい。

2. 光合成から分子シャペロンへ

2. 1. 光合成暗反応から明反応へ

筆者は、平成元年(1989年)に埼玉大学の専任講師に採用され、理学部生化学科檜山哲夫教授が主宰されていた代謝学研究室で光化学系 I 色素タンパク質複合体(PSI)の研究に携わることになった。当時生化学科には、檜山先生と金井龍二先生が所属され、光合成「明」反応と「暗」反応の研究において、影響力のあるはたらきをされていた。赴任当時、檜山先生は、その構造がまだ十分に解明されていなかったPSIをホウレンソウから単離して、その構成タンパク質の分離・同定を行っておられた。理化学研究所の井上頼直博士とも共同研究をされていて、月1回程度井上先生の研究グループと合同でゼミをもっていた。井上先生も光合成(特にPSII)研究の第一人者で、大変恵まれた環境で研究を始めることができた。赴任後、檜山研の卒論や修士論文を片端から読んで、ホウレンソウを材料にして実験し、結果をまとめて学術雑誌に投稿したが不採択の通知をもらった。それまで不採択通知をもらったことがあまり無かったので大変落ち込んだ。

2. 2. 生化学から分子遺伝学的研究へ—ロシュ分子生物学研究所 Nelson 研で修業—

この論文はPSI構成タンパク質に関する生化学的解析結果をまとめたものであったが、PSIのような膜タンパク質複合体を精製し、各タンパク質の機能を生化学的に明らかにするのは難しいので、PSIを構成する各タンパク質をコードする遺伝子を破壊した変異株を作製して、その変異PSIの解析をした方がよいのではないかと考えた。遺伝子ターゲティングによって標的遺伝子を破壊するわけであるが、そのためには全く経験のなかった遺伝子組換え実験法を習得する必要がある。そのために、東京大学の宮地重遠先生の研究室で助手をされていた福澤秀哉博士(現京都大学教授)のところに頻繁に通っていたが、金井先生から研究室を留守にして駄目じゃないか、と厳しく叱責された。しかし、その金井先生が日米科学協力事業に申請したらどうかと勧めてくださった。当時、シアノバクテリアのPSI構成タンパク質の遺伝子破壊を行っていた数少ない研究者の一人である米国ロシュ分子生物学研究所(Roche Institute of Molecular Biology)のNathan Nelson博士(現テルアビブ大学教授)に打診したところ、分子遺伝学の門外漢で、わずか5か月間という滞在期間にもかかわらず、受け入れてもらえることになった。上記の科学

協力事業の研究者派遣に申請したところ、幸い採択され、1991年夏から5か月間の出張を許された。Nelson博士は、故Efraim Racker教授とも大変親しく(自宅でRacker教授の絵を拝見させてもらったことがある)、ATPase、神経伝達物質輸送体などの膜タンパク質研究の世界的権威である。もう15年前のことになるが、教授の論文の総引用数は、15,000回を超えていた。今年5月の国際会議でお会いしたが、まだ自分で結晶構造解析の実験をしていると聞いた。

しかし、研究室での毎日は(詳細は省くが)困難の連続であった。例えば、(おそらく筆者の実験技術を疑ったのだろうと思うが)研究室では、技官からピペットマンの使用法まで指導されるような状況で、「バカにしやがってクソッたレ」を心の中で繰り返しながら、死に物狂いで5か月間実験して、遺伝子ライブラリー(シアノバクテリアのゲノムDNAの断片が、網羅性高くプラスミドやファージに組み込まれたもの)からの目的遺伝子のスクリーニング(目的遺伝子を含むクローンを選び出すこと)と、サンガー法によるDNA塩基配列決定法を学んだ。当時(1990年代初期)は、遺伝子をクローニングしたというだけで、その論文が学術雑誌に採択された時代であったが、PSIの構成タンパク質であるPsaLをコードする遺伝子やフェレドキシンの遺伝子などをクローニングした。このようなストレスが高じるような状況下で、時折話し相手になってくださったのが、研究室は異なるが、高田慎治博士(現基礎生物学研究所教授)であった。実験の合間に、(今は高校生物の教科書に記載される)PCRの原理を懇切丁寧に教えてもらったことを憶えている。

帰国後の1年間は学生指導を免除してもらって、経済的な制限はあったが、可能な限りNelson研で用いた器具や装置等をそろえ、実験ノートを見ながら、出張中に学んだ方法を復習した。実験条件はもちろんのこと、方法(の詳細、例えば、凍結試料の溶解法、遠心機や遠心管等の種類など些細に思えることを含む)が少しでも異なると、その実験結果は前の結果と(大きく)異なったものになりうる。自分自身が経験したこのようなことを、研究室の学生に繰り返し言ってきたが、傾聴・理解する学生が少なくなってきた(そのために再現性の良い結果を得られず成果もでない)ように感じる。学んだことを復習しながら、PSI遺伝子の一つ(*psaI*)を破壊し、変異株の表現型を解析して論文を書いたところ、この単著の論文はPlant and Cell Physiology にすぐに採択された(1995年)。その後、PSI関係の遺伝子クローニング、遺伝子破壊株作製と表現型解析は、鈴木豊子さんと長谷川みきさん(1994年度卒業論文、1996年度修士論文)とともに続けた。二人は修了後、それぞれミカン箱「一杯」分の、実験ノートを研究室に残して行った。それらを見ながら、彼女らがひたむきに実験を行っていた日々を思い出す。

2. 3. 光合成から分子シャペロン研究へ—偶然の産物による研究の方向転換—

上記の出張から帰国後、檜山先生の指導を受けていた古木正人君が、PSI構成タンパク質の遺伝子をクローニングするつもりが、「*groEL* 様」遺伝子[正確には、オープンリーディングフレーム(ORF)あるいはタンパク質に翻訳される配列]を単離したことを知った。これが彼の修士論文(1992年度)になった。このORFは、代表的な分子シャペロンである大腸菌GroELタンパク質と類似のタンパク質をコードしていたのである。おそらく、遺伝子ライブラリーのスクリーニング(上記)に用いたプローブ(目的遺伝子と相補的な配列をもつDNA断片)の塩基配列が適切にデザインされていなかったために、意図しない遺伝子をクローニングしたものと想像される。檜山先生から、これを論文にできないかと勧められて、分子シャペロンの研究を始めることになった。この偶然の産物によって私の研究の方向が全く変わってしまった。この続きは、以下の4章で詳しく述べる。その前に、3章で、分子シャペロンの説明をしておこう。なお、ここでは紙面の関係で十分説明できないが、分子シャペロンに興味をもたれた方は、拙著「分子シャペロン」(コロナ社、2019年)を読んでいただければ幸いである。

3. 分子シャペロンとは

英米の辞書によると、分子シャペロンの「シャペロン(chaperone)」という単語は、「他の人あるいは自分

よりも若い人に付き添って(正しいふるまいを保証するために)世話をする人」のことを意味する。シャペロンは、正しいふるまいをしてふさわしい相手と結ばれるように世話をしていたのだろう。

「分子」シャペロンは、「(未成熟の)タンパク質が正しく折りたたみ、相応しいタンパク質と相互作用して機能的な 4 次構造や複合体を形成する(成熟する)まで付き添い世話をする」分子(通常、タンパク質分子)のことを意味する。「分子シャペロン」という用語を、(生物学分野の)学術論文で最初に使用したのは Ronald A. Laskey (1978 年)と言われているが、上記のような分子シャペロンの概念と重要性を提唱し、(molecular) chaperone というキーワードで検索すると~80,000 もの論文が現れる、分子シャペロン研究の発展の礎を築いたのはイギリスの R. John Ellis である(1987 年)。Ellis は最近、分子シャペロンの解釈の幅を広げて、「他のタンパク質あるいは RNA の、共有結合を介さない折りたたみ[フォールディング(folding)]とアンフォールディング、オリゴマーや複合体形成(アセンブリー)とそのディスアセンブリーを助けるが、これらが正常な生物学的機能を果たす時には、機能的構造の永続的構成成分にはならないタンパク質である」(2013 年)と再定義している。分子シャペロンは触媒的にはたらくと考えられていて、通常、基質タンパク質と一過的に相互作用する。

3.1. 試験管内(*in vitro*)と細胞内(*in vivo*)のタンパク質の折りたたみ

米国のアンフィンセン (Christian B. Anfinsen) は、リボヌクレアーゼ (RNase) という、アミノ酸 124 個からなる比較的小さく安定な酵素を精製し、これを変性剤によって失活させた後、その変性剤を(反応液から透析などで)除くと、変性前の酵素と物理化学的性質において区別のつかない、活性を有する RNase を再生できることを示した。この結果は、特定の立体構造をとらないタンパク質が、自発的に折りたたみ、そのアミノ酸配列(一次構造)に決定づけられた特有の立体構造と機能をもつようになることを示すものであった。なお、尿素やグアニジン塩酸などの変性剤は、タンパク質の一次構造には影響せずに、その高次構造のみを破壊する。

このように、RNase などのタンパク質は「他の助けを借りずに自発的に」折りたたみ、立体構造を形成する。この試験管の中 (*in vitro*) で起こる現象が、細胞の中 (*in vivo*) でも同様に起こるものと長らく考えられていた。ところが、アンフィンセンの実験から 20 年以上もたった 1980 年代後半になって、細胞の中の多くのタンパク質は分子シャペロンに介助されて折りたたむことがわかってきた。大腸菌の細胞内のタンパク質と RNA の総濃度は~340 mg/mL と報告されているが、このように濃度が高いと、タンパク質間に「正しくない」相互作用が起こり、タンパク質は凝集しやすくなる。即ち、細胞の中では、タンパク質がそれ自身で正しく折りたたむことは困難で、分子シャペロンの助けを必要とするのである。

3.2. 分子シャペロンの種類

さまざまな分子シャペロンが知られているが、我々を含めて多くの研究者の注目を集めてきたのが、進化的に保存された数種類の「代表的」分子シャペロンである。代表的分子シャペロンは一群の相同なタンパク質からなるファミリーを形成する(表 1)。これらは、ほとんどの生物に存在する、非常に起源の古いタンパク質である。細胞の中でも、サイトゾルに加えて、核、ミトコンドリア、葉緑体、小胞体、ペルオキシソームなどの細胞小器官に検出され、細胞の外にさえ存在する。

表 1. 進化的に保存された分子シャペロンファミリー, メンバーの名称, 特徴

分子シャペロンファミリー	原核生物のメンバーの名称	高次構造	ATPase 活性	凝集阻止活性
Hsp60 (シャペロニン)	GroEL	7量体あるいは8量体のリング2個	○	○
Hsp70	DnaK	単量体	○	○
Hsp90	HtpG	2量体	○	○
Hsp100	ClpB	6量体	○	×
低分子量 Hsp	HspA, IbpA, IbpB	2~32 (≧) 量体	×	○

3.3. タンパク質に「生涯寄り添い介助する」分子シャペロン

リボソームで合成されたタンパク質は、正しく折りたたみ（機能的な立体構造を形成し）、細胞内の適切な場所へ移動し、他の化合物あるいはタンパク質などと相互作用し、役割を果たし、分解される。このような「タンパク質の一生」のどの段階においても、分子シャペロンが他のタンパク質に「寄り添い、その一生を全う」できるように助けている。

分子シャペロンは、細胞が高温に曝されると、熱ショックタンパク質（Hsp）として大量に合成される。高温以外にも、例えばヒ素やカドミウム、アミノ酸アナログ（類似物質）、エタノール、低酸素などのストレスを引き起こす作用因子によっても、分子シャペロンは誘導される。これらの因子によって引き起こされる、タンパク質の変性や（変性タンパク質が集合して形成される）凝集を防ぎ、それが機能をもつ元の構造に戻るのを助けるのが分子シャペロンである。再生が不可能な場合には、その分解にも介在する。このように、分子シャペロンは細胞のタンパク質の恒常性の維持に深く関与する。

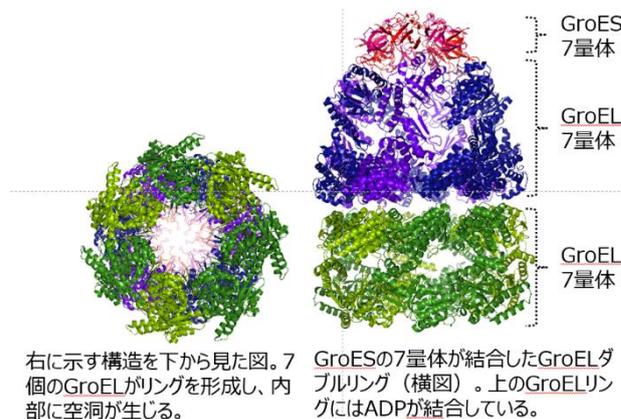


図1. GroEL-GroES-ADP複合体の構造。PDBID: 1pcq

3.4. 分子シャペロンの作用機作

分子シャペロンはどのようなしくみで、上に述べたようなはたらきをするのだろうか。ここでは、他のタンパク質の折りたたみを助けるしくみについて考えてみよう。

既に述べたように、細胞の中のタンパク質濃度が非常に高いために、他のタンパク質と「相応しくない」相互作用をして凝集すると、「ゆで卵（熱変性タンパク質凝集塊）が生卵にもどることはないように」正しく折りたたむのが困難になる。そこで、タンパク質の凝集を抑えれば、その折りたたみを助けることができる。

細胞とは異なり、通常の生化学実験で使用されるタンパク質溶液の濃度は非常に低く、他のタンパク質との相互作用が起こりにくく、自発的に折りたたむことがより容易である。そうであるならば、非天然構造（変性）タンパク質を1個ずつ隔離して相互作用しないようにすればよいのではないかと考える読者がおられるかもしれない。実際、細胞ではそのようなことが起こっている。分子シャペロンの一つである GroEL（Hsp60/シャペロニン）は、7個のサブユニットから成る筒状の構造（2個の筒で機能する）を形成する（図1）。この中に、変性（非天然構造）タンパク質が1個入り、同じく7個のサブユニットから成る GroES が、この筒の蓋をする。隔離されたタンパク質は、他のタンパク質と相互作用せずに、（凝集のおそれなく）折りたたむことができる。

隔離以外の方法としては、非天然構造タンパク質が他のタンパク質と相互作用して凝集する前に、分子シャペロン自身はそのタンパク質と相互作用して、凝集を防ぐという方法がある。後述するように、変性タンパク質と分子シャペロンの複合体は可溶性である。ほとんどの分子シャペロンがこのような凝集を阻止する活性をもっている（表 1）。

凝集に加えて、タンパク質が折りたたみを間違える（ミスフォールディング）こともある。この間違った折りたたみ状態がかなり安定なために、折りたたみの速度や収率が落ちたり、凝集が生じる。このような場合には、DnaK/Hsp70 などの分子シャペロンが、アンフォールド（フォールドの反対のはたらき）し、そのタンパク質がもう一度正しく折りたたむチャンスを与える。さらに、凝集しても、凝集塊を溶かす ClpB/Hsp100 のような分子シャペロンも存在する。

4. GroEL に導かれて分子シャペロン研究へ—シアノバクテリアの進化と非典型的 GroEL (Hsp60)—

2. 3節で述べたように、古木君が好熱性シアノバクテリア *Synechococcus vulcanus* の *groEL* 様遺伝子を、偶然クローニングした(遺伝子バンク DDBJ に登録。Accession 番号は D17354)。後に *groEL2* と命名することになるので、ここでは最初から *groEL2* と呼ぶことにする。なお、(少なくとも我々の研究分野では) 遺伝子名は最初を小文字にしてイタリックで表すのに対して、その遺伝子にコードされるタンパク質の名称は、遺伝子名を通常の手書体にし、頭文字を大文字にして記す。また、研究材料に用いた *S. vulcanus* や後にでてくる *Thermosynechococcus elongatus* は、日本の温泉で単離されたシアノバクテリアである。

groEL2 の上流には、「お手本(モデル生物)」である大腸菌の *groEL* 遺伝子のように、*groES* は見つからなかった(図 2)。「典型的な」*groEL* は *groES* とオペロン(operon)を形成するのである。なお、オペロンとは、関連する機能を有する複数の遺伝子のかたまりで、一つのプロモーター(転写開始に関与する配列)によって転写が一緒に調節されるものをいう。*groEL2* の塩基配列から推定されるアミノ酸配列(GroEL2 の全長)を、大腸菌 GroEL のそれと比較するとかなり類似していた(57%同一)ので、大腸菌 GroEL と同様の機能をもつのではないかと考えられた。

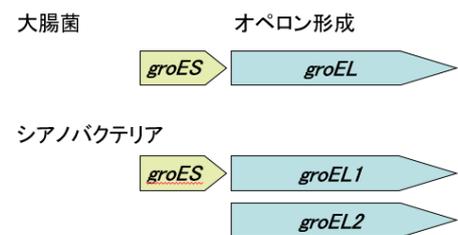


図2. 大腸菌とシアノバクテリアの *groEL* 遺伝子

我々が単離した *groEL2* 遺伝子が大腸菌のそれと同じ機能をもつかどうかを調べるために、京都大学の伊藤維昭教授から譲り受けた大腸菌 *groEL* 変異株に、*groEL2* 遺伝子を導入して表現型(遺伝子のはたらきの結果つくられる生物の形質)を調べることにした。大腸菌 *groEL* は必須遺伝子であり、この遺伝子を欠損すると大腸菌は死ぬが、突然変異により、あるアミノ酸が変異した GroEL タンパク質を発現する変異株の中には、(変異型 GroEL が高温で機能不全になるために)ある温度以上では増殖できなくなる「高温感受性」を示すものが存在する。我々に分与された *groEL* 変異株は、37°C では増殖するが 42°C では不可能であった。1993 年度に他大学から進学してきた田中直樹君が、*groEL2* を組み込んだプラスミド(遺伝子の運び屋で、大腸菌の中で増殖する)を変異株に導入し大量発現させたが、変異株は依然として高温感受性であった。これは、この遺伝子が大腸菌 GroEL の代わりにはたらくことができないことを示唆するものであった。進化の過程で機能を失ってしまった偽遺伝子ではないかと心配したが、*S. vulcanus* を通常の培養温度である 55°C から 63°C の恒温槽に移す(熱ショック処理をする)と、*groEL2* の発現は誘導された(その mRNA 量が著しく増加した)。即ち、GroEL2 は熱ショックタンパク質(Hsp)の一つであることがわかった。

遺伝子塩基配列から推定された GroEL2 の分子質量は 57,103 Da (Da は質量の単位)であった。檜山先生は、当時概算要求で本学科に導入されたアミノ酸シーケンサーを用いて、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離された細胞破碎液タンパク質の中で、分子質量約 60kDa の Hsp の N 末端アミノ酸配

列が GroEL2 のアミノ酸配列と一致することを明らかにされた。ただし、シーケンサーで得られたその配列は GroEL2 だけのものではなくて、もう一つ別のタンパク質のアミノ酸配列を含み、その配列も大腸菌 GroEL のそれに類似していた。即ち、*S. vulcanus* には二種類の GroEL が存在することが示唆されたのである。*groEL2* の転写産物に加えて、その翻訳産物も検出できたので、*groEL2* に関する論文を書いて *Biochimica et Biophysica Acta* という雑誌に投稿したところ、すぐに採択された(1996年)。その時の editor が George H. Lorimer 教授であった。教授は光合成のルビスコと呼ばれる酵素の研究における第一人者であったが、分子シャペロン(GroEL/Hsp60/シャペロニン)の研究でも歴史に残る仕事をしていた。自分の研究の方向を変える契機となる論文を Lorimer 教授に審査してもらえたのは嬉しかった。

4. 1. シアノバクテリアの二種類の GroEL

論文の採択に勇気づけられて、分子シャペロンの研究を継続した。上に述べたように、GroEL2 とは異なる、もう一つの GroEL の存在が示唆された。田中直樹君は、修士論文(1994 年度)の一部として、この *groEL* 遺伝子をクローニングし *groEL1* と命名した(accession 番号は D78139)。この遺伝子上流には *groES* 遺伝子が存在し、二つの遺伝子はオペロンを形成していた(図 2)。熱ショックにより、その転写量と翻訳産物は顕著に増えた。重要なことは、この遺伝子を(上に述べた)大腸菌 *groEL* 変異株に導入し発現させると、この変異株が 42°C で増殖するようになったことである。これらの結果から、シアノバクテリアには、大腸菌と同様のはたらきをする *groES/groEL1* オペロンに加えて、異なるはたらきをする *groEL2* 遺伝子が存在することが示された。これらの結果を再び *Biochimica et Biophysica Acta* に報告した(1997年)。

なお、シアノバクテリアに複数の *groEL* 遺伝子が存在することを最初に報告した(1993 年)のは、ハンガリーの László Vígh 教授らで、我々は 2 番目であった。Vígh 教授らも常温性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803(以下 PCC6803 と略す)の *groEL1* は大腸菌 *groEL* のはたらきを代替するが、*groEL2* はしないという、我々と同様の結果を報告している(2001 年)。

これら二つの *groEL* 遺伝子は遺伝子重複の結果生じたものと考えられる。重複した遺伝子は、(まれに)新規機能を獲得する、あるいは二つの遺伝子が元の遺伝子の機能を分かち合うことにより、進化の過程で「生き」残ることがあるという。現在では、100 以上のシアノバクテリアのゲノム塩基配列が明らかにされているが、ほとんどすべてが複数(多くは二種類)の *groEL* 遺伝子をもつ。このうちの一つは *groES* とオペロンを形成する *groEL1* 遺伝子で、もう一つはオペロンを形成しない *groEL2* である。シアノバクテリアのゲノムに *groEL2* 遺伝子は進化の過程で保存されてきたのである。

4. 2. *groEL* の発現調節—CIRCE/HrcA 系を介した負の調節—

シアノバクテリアの *groEL* 遺伝子の発現調節や機能に関する研究は皆無に近かった。そこで、遺伝子発現調節に関する研究をまず始めた。PCC6803 株の二つの *groEL* 遺伝子のプロモーター領域には共に CIRCE オペレーター配列(後述)があった。*S. vulcanus* の *groEL2* には無かったが、*groEL1* には CIRCE が見つかった。これは、CIRCE を介して *groEL1* の転写調節が行われることを示唆するものであった。

ここで CIRCE の説明をしておこう。プロモーター周辺に存在するこの塩基配列(TTAGCACTC-N9-GAGTGCTAA)は、オペレーターとしてはたらき、これにリプレッサーである HrcA タンパク質が結合することで、RNA ポリメラーゼが転写できないようにする。従って、CIRCE/HrcA 系は、Hsp 遺伝子の転写を負に調節する。熱ショックにより、HrcA は不活性化して CIRCE から解離するので、転写が起こるようになる。この負の調節は、ドイツバイロイト(Bayreuth)大学の Wolfgang Schumann 教授らによって、枯草菌で明らかにされた(1994 年, 1996 年)。それまでは大腸菌で明らかにされたシグマ 32 因子(ストレス特異的シグマ因子)を介した正の転写調節が、さまざまなバクテリアの熱ショック応答の主たるメカニズムと思われていた。熱ショックにより、シグマ 32 因子の細胞内濃度と活性が一過的に増えるために、(これが特異的に認識する)熱ショックプロモーターをもつ Hsp 遺伝子の転写が起こる。大腸菌の多くの Hsp 遺伝子の熱ショックによる転写誘導は、シグマ 32 因子によって一括して調節されている。Schumann 教授らの論文を、

片っ端から詳細に読んだことを記憶しているが、教授が国際会議出席のために来日された際(1998年7月)に、埼玉大学に招待し講演をしてもらった。同じ年に、Schumann 教授を訪問し学科セミナーを行った。それから今に至るまで、非常に親しく交流している。教授の紹介で、Andreas Horn 君が来日し我々のところで実験・研究を行った(2015年バイオイト大学修士論文)が、欧米の大学の学生指導をしたのは、これが初めてであった。

S. vulcanus のゲノム全塩基配列はまだ解析されず、CIRCEに結合するHrcAの遺伝子もクローニングされていなかったが、PCC6803株のゲノムの全塩基配列は、当時既に決定されていて、枯草菌HrcAと類似の配列をコードするORF(2.3節)も見つかった。CIRCE/HrcA系により、シアノバクテリアの*groEL*の転写が負に調節されることを明らかにするために、PCC6803株の*hrcA*遺伝子を破壊して、負の調節が解除(脱抑制)されるかどうかを調べることにした。これは、鈴木倫累君の修士論文(2001年度)のテーマであった。彼は、たった一つではあるが、*hrcA*変異株のクローンを取得し、その遺伝子が正しく破壊されていることも明らかにした。ただし、頑張り始めたのが就職先決定後なので、変異株の解析は同じ学年で博士課程に進学した小島幸治君が引き継いで行うことになった。

この*hrcA*遺伝子破壊株($\Delta hrcA$ 株)における*groEL*のmRNA量をノーザンブロット法で解析すると、予想通り、平常時でも、それは顕著に増加していた(図3)。しかしながら、この脱抑制は最大限に起こったわけではなく、「明所下」熱ショック処理をすると、その発現量は、さらに上昇した。最初は若干量の上昇であるように見えたので、「無視」という選択肢もあったが、再現性を確認し、プライマー伸長法による転写活性の定量等を行っても、確かに熱ショックでさらに増加することがわかった(実験技術が高く、実験を繰り返すことを厭わない学生さんに恵まれて幸いだった)。我々の結果は、CIRCE/HrcA系以外の転写調節機構があることを示唆するものであった。

4.3. *groEL*の光・光合成電子伝達を介した新規な正の発現調節—K-boxを介した調節—

CIRCE/HrcA系以外の転写調節機構を解明するために、*hrcA*変異株の熱ショック応答(*groEL1*の転写調節)を解析することにした。この研究は小島君の博士論文の一部となった。*hrcA*変異株の熱ショック応答は、熱ショック前に*groEL1*のmRNAが相当量蓄積しているために、熱ショックによる増加量はそれほどでもない(図3)。そのために、*groEL1*のmRNA量の増減を感度良く解析できない。熱ショック前の*groEL1*量を減少させることができるのではないかと期待して、変異株を(通常温度で)暗処理した。Asadulghani君(2004年度博士論文)や鈴木由起子さん(2000年度卒業論文)が、*groEL1*などのHsp遺伝子の転写が暗所よりも明所で促進されること、光は光合成電子伝達を介して転写を活性化することなどを明らかにしていた(Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003年)ので、暗処理をすると*groEL1*のmRNA量が減少すると考えたわけである。暗処理して(図3に示す、野生株の熱ショック前のレベルまで)減少した*groEL1*のmRNA量は、野生株と同様に、熱ショックで増加した。*groEL1*の発現量は、光強度に依存して大きくなり、光合成電子伝達を阻害するDCMUの存在下では、そのmRNAはほとんど増加しなかった。*groEL1*の発現は、高温に限らず常温でも光強度に依存して調節された。即ち、温度と光のそれぞれが、この新規な転写調節に関与するのである。

一般的に、転写調節に関与する領域(塩基配列)は、遺伝子の転写開始点(あるいは翻訳開始点)上流にあるので、*groEL1*の上流に特徴的な配列が無いかを調べたところ、異なるシアノバクテリア種由来の*groEL1*間でよく保存された配列が見つかった。この配列(5'-GTTCGG-NNAN-CCNNAC-3')をK-boxと命名した(Kはおそらく小島のK)。この配列を含むDNA断片に結合するタンパク質を、ゲルシ

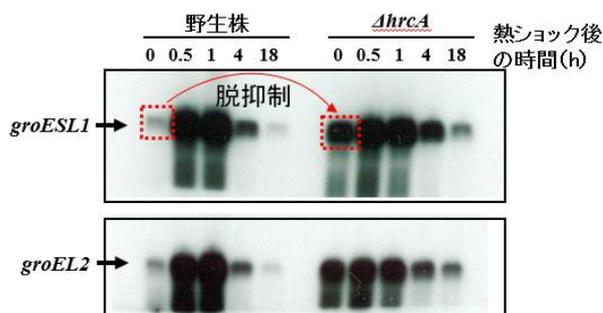


図3. 熱ショック後の2種類の*groEL*のmRNA蓄積

フト法 (Electrophoresis Mobility Shift Assay あるいは略して EMSA と呼ばれる) により検出しようとしたところ、K-box ではなく、さらにその上流にある GATCTA 配列に未知のタンパク質が特異的に結合することを発見し、それを N-box と命名した。なお、ゲルシフト法とは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を利用して、DNA 結合タンパク質とその結合配列をもつ DNA 断片の相互作用を解析する方法で、タンパク質と結合した DNA 断片の (ゲル上の) 移動度が小さくなる (シフトする) ので、このように呼ばれる。

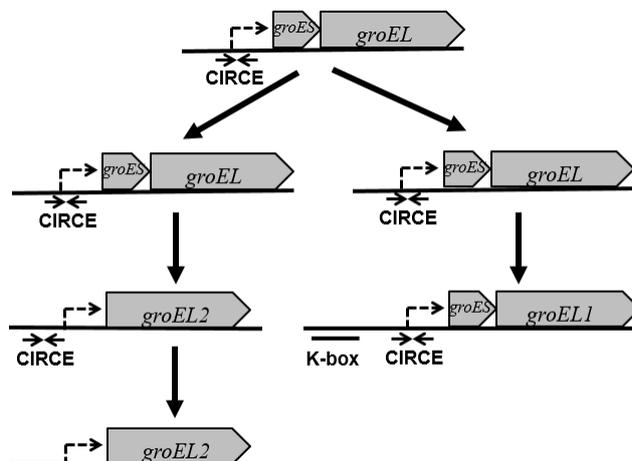


図4. シアノバクテリア *groEL* 遺伝子の進化

4. 4. *groEL* 遺伝子の進化仮説

CIRCE と K-box の保存性を調べたところ、これらはさまざまなシアノバクテリアの *groEL1* において高度に保存されていたが、*groEL2* における保存性は低かった。多くの研究者が研究材料として用いる PCC6803 株においては、(例外的に) 両方の *groEL* に保存されていた。興味深いことに、*Gloeobacter violaceus* は、二種類の *groEL* 遺伝子をもつが、どちらにも CIRCE が存在するにもかかわらず、K-box は存在しなかった。系統樹によれば、最も古く分岐したのは *G.violaceus* といわれている。このシアノバクテリアは光化学系のタンパク質をすべて細胞膜上にもち、細胞内にチラコイド膜は存在しない。さらにその光合成活性は低く、弱光でのみ生育するという。このようなことに基づき、以下の仮説を立てた。シアノバクテリアの祖先は、CIRCE オペレーター配列をもつ 1 種類の *groEL* 遺伝子をもっていたが、遺伝子重複によって二種類の *groEL* をもつものが出現し、(*G.violaceus* のように) それらの発現は CIRCE/HrcA 系によって調節されていた。CIRCE/HrcA 制御系は、さまざまなバクテリアに普遍的に存在することから、古くから存在したものと思われる。進化の過程でシアノバクテリアがチラコイド膜を獲得すると、光・光合成電子伝達を介した制御系が必要になり、K-box が現れたのではないかとこの仮説である (図 4)。増殖速度が速い方が、生存競争を勝ち抜く上で有利であるが、そのためにはより高い光合成活性が必要になる。光合成活性が高くなると、(集光と光合成電子伝達に伴う) 活性酸素の産生量も大きくなり、ストレス耐性を付与する分子シャペロンがより多く必要になる。このようにして、光量に応じた新しい制御機構が必要になったのではないかと考える。

4. 5. 新規なシャペロニン GroEL2 のはたらき—*in vivo* の解析—

大腸菌 GroEL のはたらきを代替できないシアノバクテリア GroEL2 のはたらきは何であろうか。二つの GroEL が全く同じ機能をもつならば、二種類も遺伝子をもつ必要はないと考えられる。実際、さまざまなバクテリアのゲノム解析から、大腸菌や枯草菌を含む多くのバクテリアはただ 1 種類の GroEL を有する。

GoEL2 のはたらきを明らかにするために、*groEL2* 遺伝子破壊株を作製しようとした。大腸菌 *groEL* と同様に *groEL2* が必須遺伝子ならば、この遺伝子破壊株を作製することは不可能であるが、(愚かな教員の指導に従って) *groEL2* の遺伝子破壊に挑戦してくれたのが佐藤慎一郎君である (2006 年度修士論文)。その実験にもちいたのが、(*S.vulcanus* と類似しているが) 形質転換が可能であると報告されていた *T. elongatus* である。このシアノバクテリアは、PCC6803 株のように外来 DNA が自然に取り込まれるわけではなく、エレクトロポレーション法 (高電圧を短時間かけることにより細胞膜に微小な穴をあけ、細胞内に DNA を直接導入する方法) で導入するが、細胞の形質転換 (外来遺伝子あるいは DNA により菌の性質が変わること) の効率が非常に悪い。なぜ形質転換がはるかに容易な PCC6803 株を用いなかったのか、よく覚えていない。これも教員の愚かさによるものかもしれない。形質転換は、東京大学の池内昌彦教授の研究室で実験法を学んできた小島君がやってもうまいかなかったが、慎一郎君は、何度もトライをし

て、ついに1個のコロニー(形質転換株)を取得することができた。

シアノバクテリアには複数のゲノムコピーが存在するが、そのすべての *groEL2* は(抗生物質耐性遺伝子で)破壊されていた。つまり、大腸菌などの *groEL* とは異なり、必須遺伝子ではなかった。しかし、*groEL2* 変異株は高温感受性を示し、通常の培養温度 50°C では野生株と変わらないが、62°C では全く増殖しなかった。一方、この変異株は低温(40°C)感受性も示した。野生株は、50°C と比べると著しく遅い速度ではあるが、40°C で増殖したが、変異株は増殖できなかった。*groEL2* は、*groEL1* とは異なり、低温ショック遺伝子でもあり、その発現が低温で誘導された。このような高温や低温感受性が、GroEL2 の欠損により、GroEL1 蓄積量が低下したために起こったことも考えられるので、GroEL1 タンパク質の発現量を調べた。*T. elongatus* の GroEL1 と GroEL2(これらのアミノ酸配列は、*S. vulcanus* のそれらと同一)のサイズは、わずかにアミノ酸2個分の違いであり、これらを SDS-PAGE で分離するのは難しいが、慎一郎君は、この二つを分離できた。その結果、*groEL2* 遺伝子破壊株において、GroEL1 は(50°C でも 40°C でも)若干高発現(細胞における蓄積量が増加)していることがわかった。それにもかかわらず、温度感受性を示すのである。これは、GroEL1 が GroEL2 の機能を代替できないことを示唆するものであった(FEBS Letters, 2008年)。

バングラデシュからの留学生である Saaimatul Huq さん(2010年度博士論文)が常温性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942(以下、*S. elongatus*)株の *groEL2* 遺伝子を破壊したが、この変異株も高温感受性を示した。さらに、強光や高塩感受性も示すことが明らかになった。このようなことから、*groEL2* は、ストレス下で、*groEL1* では代替できない重要なはたらきをするようになり、進化の過程で保存されてきたのではないかと考えている。なお、この *S. elongatus* の変異株では、低温感受性を観察することができなかった。なぜわざわざ形質転換が困難な *T. elongatus* を用いたのか理由が思い出せないと書いたが、このシアノバクテリアを用いなければ、GroEL2 が低温耐性に重要なはたらきをすることは発見できなかった。

4. 6. 分子シャペロンの分子遺伝学的解析から、再び、生化学的解析へ—在外研究—

GroEL1 と GroEL2 のアミノ酸配列は、~60%同一であるが、細胞がストレス下に置かれると、GroEL2 は GroEL1 では代替できない重要なはたらきをすることが示唆された。GroEL1 と GroEL2 の異なる細胞機能は、それらの構造とシャペロン機能が異なることに起因するものと考えられる。この仮説を証明するには、これらを生化学に解析する必要がある。幸い、在外研究制度を利用して、分子シャペロン研究で世界を先導している二つの研究室に行き、必要なことを学ぶことができた(2003年~2004年の9か月間)。最初の約10日間は、スイスのローザンヌ大学の Pierre Goloubinoff 教授の研究室に行って、シャペロン機能(*in vitro* のタンパク質折りたたみ反応)の解析法を学んだ。彼は、Lorimer 教授の研究室で、変性したルビスコが分子シャペロン(GroEL と GroES)と ATP に完全に依存して天然の機能的構造に再び戻ることを世界で初めて明らかにした(1989年)。ちなみに、(熱)変性したタンパク質がもとに戻りうることや分子シャペロンが高校の生物教科書に記載され始めたのは、ここ数年のことである。Goloubinoff 教授の研究室でまず驚いたのは、この *in vitro* のタンパク質折りたたみ反応を解析するには、10μM 以上の高純度のタンパク質が必要とされることであった。午後5時過ぎには建物と各フロアの入り口のドアがロックされ、たった一つあるキャンパスの食堂も5時頃には閉まるので、夜遅くまで一人で実験するのは苦労した。

次に、ミシガン大学の James C. A. Bardwell 教授の研究室で、ポリヒスチジン(~6個のヒスチジンから成るペプチド)のタグ(His タグ)が融合されたタンパク質の精製法を学んだ。この方法を学ぶことは、高純度かつ高濃度のタンパク質を(学部学生でも)容易に調製できるようにするために重要であった。Bardwell 教授は、細胞(大腸菌)の中では、タンパク質のシステイン側鎖間のジスルフィド結合(disulfide bond)が、自然に(酸化反応で)生じるのではなく、分子シャペロンのようなはたらきをする Dsb タンパク質の仲介によってつくられることを明らかにし(1991年)、この分野の研究を先導してきた。この長期出張の

主目的は、(埼玉大学では実験をする時間を見つけることに苦労していたので)ベンチワークに集中することであった。ところが、Bardwell 教授は電話帳何冊分かの文献ファイルをもってきて、まず総説を書いて Dsb の勉強をしたらどうかと言ってきた。ジスルフィド結合形成に関しては門外漢であったが、何とか仕上げた総説は、2004 年の *Biochimica et Biophysica Acta (Molecular Cell Research)* に掲載されて、よく引用されている。彼は共著者ではあるが、彼の「執筆」は私の書いた総説中の単語を、ただ一つ変えただけであった。総説執筆後は、His タグ融合タンパク質(さまざまな Dsb タンパク質とそれらの変異体)を大腸菌で大量発現させ、ニッケルをキレートしたビーズ(樹脂)を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。Bardwell 研では、Jean-Francois Collet 博士(現 Université Catholique de Louvain 教授)に公私共にお世話になった。

帰国後、出張中に学んだことを鳴海尚一君に教えたが、よく理解して精力的に実験してくれた(2005 年度修士論文)。鳴海君は、*S. elongatus* の *groEL1*, *groEL2*, *groES*, *dnaK2*, *dnaK3*, *dnaJ2*, *grpE* の各遺伝子を大量発現する大腸菌株を構築し、His タグを融合したこれらの分子シャペロン(コシャペロン)の精製法も確立してくれた。アフィニティークロマトグラフィーに用いる樹脂としてさまざまな会社のものを試したが、Bio-Rad 社の Profinity IMAC を用いて行った DnaK2 の精製結果は、この会社の宣伝パンフレットに掲載された。彼の構築したシャペロン大量発現株を、学生が今も用いている。鳴海君が研究室にいなかったら、研究の発展は著しく遅れていたかもしれない。なお、筆者の在学研究による長期出張については、大学(文科省)への申請の段階から(少なくとも)研究室の檜山先生に承認してもらっていたが、採択後、学科会議で反対された。一度採択されると辞退するのは(事務的に)難しいと聞いたので、引込みがつかない状況であった。このような中で出張したわけであるが、この出張が無ければ、以下に述べるような生化学的研究を発展させることは不可能だったと思う。

4. 7. GroEL2 の構造とシャペロン機能—*in vitro* の比較生化学的解析—

大腸菌 GroEL は 7 量体の筒状構造が二つ、その底と底でくっついた 14 量体構造を形成する。筒の一つに非天然構造のタンパク質(基質)が 1 分子入ると、GroES (7 量体)が結合して蓋をし、ATP 依存的に折りたたみを助ける(3. 4 節)。ATP 依存的というのは、ATP が結合すると GroES (蓋)が筒に結合し、ATP が分解されて ADP になると蓋が開くのである。高度に精製した分子シャペロンを大量に用意することができるようになったので、Huq さん(4. 4 節)が、大腸菌の GroEL を対照として、*S. elongatus* の GroEL1 と GroEL2 の比較生化学的解析を行った。まずオリゴマー構造を、ゲル濾過クロマトグラフィーや分析型超遠心分離法などで調べた。大腸菌 GroEL は、予想通り安定な 14 量体を形成した。ところが、同じ条件で、GroEL1 は 14 量体を形成したが、GroEL2 はしない(7 量体と 2 量体)ことがわかった。GroEL1 と GroEL2 には、変性タンパク質の凝集を阻止する活性は観察されたが、大腸菌 GroEL のような、GroES と ATP に依存した折りたたみ活性はほとんど検出されなかった(*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2010 年)。

最近、インドの Shree K. Apte 教授らが我々と同様の結果を報告した(2016 年)。Apte 教授は、Bhabha Atomic Research Centre に所属する、インドでは著名な研究者である(筆者は一度訪問してセミナーをしたことがある)。彼らは、窒素固定シアノバクテリア(アナベナ)の二種類の GroEL について生化学的解析を行い、GroEL1 は 14 量体を形成するが、GroEL2 は単量体であると結論付けた(2016 年)。さらに、GroEL1 は大腸菌 GroEL とは異なり、GroES と ATP に非依存的に折りたたみを助けると断定した。GroEL2 も同様の挙動を示した。さらに、ドイツの Tal Dagan 博士らは、ヘテロシストをつくる *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 の「二種類の」GroEL1 及び GroEL2 間の相互作用をバクテリアツーハイブリッド法で解析した(2017 年)。その結果、GroEL2 は、他の GroEL2 や GroEL1 及び GroES のいずれとも相互作用しないことが分かった。これらの結果は、シアノバクテリア GroEL2 が大腸菌 GroEL のような 14 量体構造(図 1)を形成しないことを支持するものである。14 量体構造を形成できないことから、大

腸菌 GroEL とは異なる(シャペロン)機能を有するのではないかと考えているが、その解明はまだ道半ばである。

5. 分子シャペロン Hsp90

5. 1. Hsp90(HtpG)の研究の開始—再び偶然の産物に導かれて—

シアノバクテリアの Hsp90(バクテリアのホモログを HtpG と呼ぶ)の遺伝子も偶然の産物である。ただし、遺伝子ライブラリーのスクリーニングで「間違っ」たクローンを拾ったわけではなく、今度は「普通ではない」PCR によってこの遺伝子が増幅されてきた。その次第は次のとおりである。田中君は、*S. elongatus* の低分子量 Hsp(後述)をクローニングしようとして、*S. vulcanus* と従属栄養バクテリアの低分子量 Hsp のアミノ酸配列に基づいて、プライマー(degenerate primers)を設計し、ゲノム DNA を鋳型にして PCR を行った。PCR の増幅回数は通常~30 回であるが、30 回やっても DNA 断片が得られないので、実に 90 回繰り返したところ、サイズの異なる DNA 断片が複数(4 種類の DNA 断片)増幅された。もちろん、PCR を 90 回繰り返すというのは普通ではない(産物が毎回 2 倍に増えるとする、 2^{90} 即ち 10^{30} 倍を超えることになる!)。このような「普通ではない」PCR で得られた DNA 断片が目的のものであるはずがないのに、それぞれの PCR 産物をプラスミドにクローニングして、塩基配列を決定したところ、その一つが Hsp90 と類似するアミノ酸配列をコードしていることがわかった。他のものは枯草菌などに存在する機能未知のものやデータベースに類似の配列が見いだされないものであった。田中君はすぐに、放射性同位元素 P^{32} でこれらの DNA 断片を標識し(プローブを調製し)、熱ショック前後のシアノバクテリアから調製した(全)mRNA をアガロースゲル電気泳動で分離した後、プローブと反応させた(ノーザンブロット解析)。その結果、上記の DNA 断片から作製した二種類のプローブが、熱ショックで誘導される mRNA とハイブリダイゼーションすることがわかった。そこで、これらのプローブを用いて、遺伝子ライブラリーをスクリーニングしたところ ORF が見つかり、一つは予想通り HtpG(遺伝子バンクに登録した塩基配列の accession 番号は AB010001)を、他方は全く新規な Hsp(AB002694)をコードしていた。なお、紙面が足りず詳細を省略するが、田中君や石川南都子さん(2000 年度修士論文)が、アミノ酸 63 個からなるポリペプチドをコードするこの新規な ORF を破壊すると、*S. elongatus* は顕著な高温感受性を示すようになり、小さいながらも熱耐性に重要なはたらきをする遺伝子(*orf7.5* と命名)であることが示された。これを、*Journal of Biological Chemistry* に発表した(2001 年)。

5. 2. 原核生物 Hsp90 のはたらきの発見

当時、シアノバクテリアの HtpG に関する報告は全くなかったが、大腸菌の *htpG* 遺伝子は約 10 年前に既にクローニングされていた(Bardwell ら, 1987 年)。遺伝子も破壊されたが、熱ショックで発現するにもかかわらず、注目すべき高温感受性を示さなかった。枯草菌の *htpG* 遺伝子破壊株も高温感受性を全く示さない(Versteeg ら, 1999 年)。一方、真核生物では、ステロイドホルモン受容体やシグナル伝達系に関与するプロテインキナーゼの安定性・機能維持等に必須で、がんにも関与することがあきらかになっていた。バクテリアでは Hsp90 は重要なはたらきをしないと断言するシャペロン研究の第一人者もいた。

このようなことには無頓着に、田中君は *htpG* 遺伝子破壊株を構築した(1999 年)。驚くべきことに、*S. elongatus* の変異株は顕著な高温感受性を示した。HtpG は細胞の高温耐性にとって必須であるというタイトルの論文を *FEBS Letters* に発表した(1999 年)。この結果を、第一回の Hsp90 国際会議(スイス, 2002 年)でも発表したが、真核生物の分子シャペロン研究を先導するドイツの Johannes Buchner 教授や Christine Queitsch 博士(当時 Susan Lindquist 教授の研究室の研究員)らがやってきて、Hsp90 が高温耐性に必須のはたらきをすることを初めて報告したものだとして評価してくれた。なお、PCC6803 株では、高温で誘導される数種類の遺伝子の破壊株の中で、*htpG* 遺伝子破壊株が最も顕著な高温感受性を示し、高温(38°C)で全く生育しないことが観察されている(Rowland ら, 2010 年)。

なお、最近になって、従属栄養細菌の *Shewanella oneidensis* においても、その高温耐性にとって Hsp90 が必須のはたらきをすることが明らかにされた(Honoré ら, 2017 年). なお, Md. Motarab Hossain 君(2001 年度博士論文)は、高温のみならず、低温や酸化ストレス耐性においても、*S.elongatus* の HtpG が重要なはたらきをすることを明らかにし、*Current Microbiology* に報告した(2002 及び 2003 年). その後、好冷性従属栄養細菌の生育(García-Descalzo ら, 2011 年)や病原菌 *Vibrio vulnificus* の低温ショックからの回復(Choi ら, 2012 年)において、HtpG が重要なはたらきをすることが明らかにされた. 病原菌 *Edwardsiella tarda* の *htpG* 変異株も、*S.elongatus* の変異株と同様に活性酸素に対する高感受性を示した(Dang ら, 2011 年). 最近になって、病原菌の感染性に HtpG が関与することがあきらかにされてきた. 例えば、*E. tarda* による魚の致死性は、この病原性細菌の *htpG* に変異を導入することで顕著に減少する(Dang ら, 2011 年).

5. 3. 原核生物 Hsp90 の基質の探索

ストレス下で HtpG が重要なはたらきをすることが明らかになったが、どのようにしてストレス耐性に寄与するのかを理解するうえで、HtpG が相互作用するタンパク質(基質)を明らかにすることは重要である.

東京農業大学の吉川博文教授らは、酵母ツーハイブリッドシステムを用いてタンパク質間相互作用解析をするための *S.elongatus* 株のゲノムライブラリーの構築をされた. HtpG と相互作用するタンパク質を(全遺伝子の翻訳産物を対象にして)網羅的に探索できるというのは大変魅力的なので、すぐに共同研究をお願いした. 吉川先生のもとで博士論文の研究指導を受けていた渡辺智さん(現東京農業大学准教授)らに斎藤勝和君(2008 年度博士論文)が加わり、HtpG がウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素(uroporphyrinogen decarboxylase)と相互作用することを明らかにし、*Biochemical and Biophysical Research Communications* に発表した(2007 年). これはテトラピロール合成経路の酵素で、細菌のみならず真核生物にも存在する. HtpG/Hsp90 がクロロフィルやヘム合成に関係するわけで、光合成のみならず、もっと普遍的な細胞機能に関与することが示唆された. これは、最初に報告された細菌 Hsp90 の基質である.

変異株の観察からもう一つの基質を見つけることができた. *htpG* 変異株(の培養液)の色は、通常の藍色ではなく、若干緑色が強かったので、細胞の吸収スペクトルを測定したところ、フィコシアニン量が減少していることが明らかになった. これは、フィコビリソーム(その構成タンパク質)が HtpG の基質であることを示すものではないかと考えた.

ここで、フィコビリソームの説明を簡単におこよう. フィコビリソームは、シアノバクテリアなどのチラコイド膜上に規則的に配列しているタンパク質複合体(会合体)で、(代表的なものは)扇を広げたような形をしていて、その中心部分がチラコイド膜に結合している. その扇の直径は 50 nm にも及び、分子量は 5,000 kDa を越える. 青色～紅(ピンク)色をしていて、光を吸収し、そのエネルギーを光合成の光化学反応中心へ効率よく伝達する. このような巨大な構造物が、吸収された光エネルギーをほとんど無駄なく伝達できるように構築されているのである. 我々は *S. elongatus* を主たる実験材料にしているが、PCC6803 株に比べて、フィコビリソームを構成するタンパク質の種類は驚くほど少なく(約 10 種類)、その構成成分である青色のフィコシアニンは、細胞全タンパク質の実に～50% (重量当たり)を占める. *S. elongatus* のフィコビリソームの精製法は、Alexander N. Glazer らによって既に確立されていた. 巨大なフィコビリソームは、サイズの違いで分離する方法(ショ糖密度勾配超遠心分離法)を用いれば容易に精製できる. 有色のフィコビリソームは卒研や修論の学生でも扱いやすい材料であると思った. 本間大奨君(2004 年度修士論文)が、初めてフィコビリソームを精製したが、その青色は宝石のようだと感じた.

佐藤壮志君が、フィコビリソームと HtpG の生化学的相互作用解析を始めた(2006 年度修士論文). HtpG に限らず、分子シャペロンとフィコビリソームの相互作用に関する報告は皆無であった. まず、フィコビリソームを精製した. ショ糖密度勾配超遠心分離法で分離された変異株のフィコビリソームは、野生株

のものに比べて、若干サイズが小さく、さらに構成ポリペプチドを比較すると、30kDa リンカーポリペプチドが減少していることがわかった。真核細胞 Hsp90 の機能を阻害すると、その基質は不安定になり、(例えばプロテアソームで分解されて)減少することが明らかにされている。従って、このタンパク質が基質ではないかと考えた。30kDa リンカーポリペプチドに加えて、数種類のリンカーポリペプチドがフィコビリソームの骨格をなすと考えられている。GroEL/GroES はファージ(巨大な複合体)の構築に関与し、GroEL がいないとその尾部が構築されないという報告がある。HtpG もフィコビリソームの構築に関係するために、変異株のフィコビリソームは、より小さな(不完全な)ものになったのではないかと考えた。

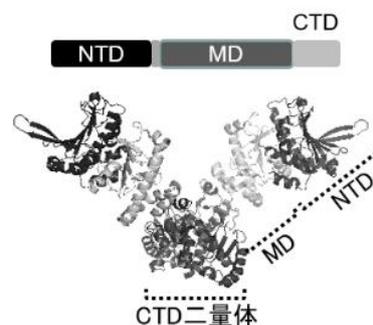


図5. Hsp90の一次構造とその2量体構造(アボ型)。PDBID: 2ior, 2ioq

5. 4. 原核生物 Hsp90 のシャペロン作用の解析—基質との相互作用と凝集阻止活性の検出—

既に述べたように(3章)、分子シャペロンは、オリゴマーや複合体形成(アセンブリー)とそのディスアセンブリーを助けるが、これらが正常な生物学的機能を果たす時には、その構造の構成成分にはならないタンパク質である。HtpG がフィコビリソームにシャペロン作用するならば、「壊れた」フィコビリソームと相互作用するものと予想される。フィコビリソーム複合体はかなり穏やかな処理で「壊す」ことができる。緩衝液に用いるリン酸の濃度を下げる(750mM から 20mM)だけで解離するのである。解離したフィコビリソームと精製した(His タグを融合した)Hsp90 を混合して、このタグに結合するニッケルをキレートしたビーズを加えて HtpG を沈殿(プルダウン)させると上記の 30kDa リンカーポリペプチドと 27kDa リンカーポリペプチドが共沈殿することがわかった。これは、HtpG が 30kDa 及び 27kDa リンカーポリペプチドと物理的に相互作用することを示すものであった。解離していない(機能的な)フィコビリソームと HtpG を混合しても、このような相互作用はみられない。相互作用によって、HtpG がフィコビリソーム構成タンパク質の変性・凝集を防ぐのかどうかを調べた。そこで、フィコビリソーム複合体を解離させたのちに、45°C で処理をした。約 10 種類のフィコビリソーム構成タンパク質のうちリンカーポリペプチド(3 種類)のみが凝集し沈殿した。リンカーポリペプチドの 1 分子当たり 1 分子の HtpG(二量体)を加えることで、このリンカーポリペプチドの凝集は完全に阻害された。驚くべきことに、大腸菌 HtpG がこの凝集を阻止することはなかった。これは、リンカーポリペプチドが、集光機能を有するフィコシアニンなどと比べて、はるかに不安定であること、それゆえに、分子シャペロン HtpG の保護を必要とすることを示すものであった。

5. 5. 原核生物 Hsp90 の基質相互作用部位の解析

Hsp90/HtpG は二量体を形成するが、そのサブユニットは、三つのドメインから構成される(図5)。即ち、N末端ドメイン(NTD)、中間ドメイン(MD)、C末端ドメイン(CTD)である。当時、真核、原核生物を問わず、Hsp90 の基質結合ドメインについてはよくわかっていなかった。そこで、HtpG のどのドメインがリンカーポリペプチドと相互作用するのかを、各ドメインを単離・調製して調べたところ、MD が主たる相互作用領域を含み、NTD も相互作用することがわかった。また、二量体構造をとらないと基質との相互作用が弱まるためか、(二量体化に必須である)CTD を欠損した NTD-MD の凝集阻止活性は顕著に低下していた。

さらに、フィコビリソームではなく、30kDa リンカーポリペプチドを大腸菌に大量発現し、高度に精製したものを基質にして凝集阻止実験を行うことにした。このリンカーポリペプチドは、SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>)を用いて予測すると可溶性であるが、大腸菌で発現させると不溶化する不安定なタンパク質であった。そこで、不溶化した(精製)リンカーポリペプチドを尿素で可溶化しておき、凝集阻止活性(6.2節で測定法を詳述)を調べるときには、尿素濃度を下げて実験を行った。HtpG はこのリンカーポリペプチドと相互作用して(プルダウン法で確認)、その凝集を阻止した。これらの

結果に基づき、リンカーポリペプチドが、フィコシアニンと相互作用して複合体の一部となるまでは、変性・凝集しないように、HtpG が守っているのではないかと考えた。佐藤君には、良い学術雑誌に報告するからがんばってくれと言って励ましたが、*Molecular Microbiology* に採択された。この雑誌は、微生物学分野における最も影響力のある雑誌の一つであるが、そのコメントリー (MicroCommentary) にとりあげられて、Buchner 教授により詳しく解説・紹介された。

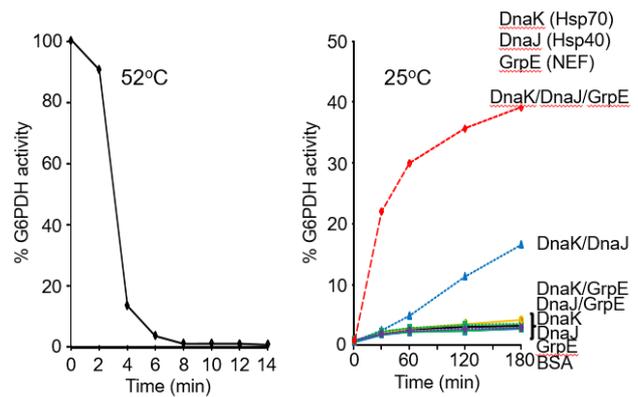


図6. シアノバクテリアDnaK(Hsp70)シャペロン系

5. 6. 原核生物 Hsp90 のシャペロン作用の解析—折りたたみ活性—

5. 6. 1. 原核生物 Hsp90 と Hsp70 の相互作用

シアノバクテリアの HtpG は、特定の基質と相互作用し、その凝集を阻止する活性を有することがわかった。凝集を免れた基質は、分子シャペロンから解離して、もとの機能的構造に折りたたむ、あるいは機能的複合体の一部にならねばならない。分子シャペロンは、折りたたみを助けるタンパク質 (3章) なので、このステップにも関与するはずである。真核細胞では、Hsp90とHsp70/Hsp40系 (5.6.2項) が協調的に作用して折りたたみを助けることが明らかにされていたが、この協調作用にはコシャペロンである Hop (酵母では Sti1 と呼ばれる) が必要である。シアノバクテリアを含む多くのバクテリアのゲノム配列が調べられているが、Hop などのコシャペロンは無いと考えられている。従って、バクテリアにおける、HtpG (Hsp90) と DnaK (Hsp70) の協調的なシャペロン作用は研究されてこなかった。

吉川教授らが、上記 (5. 3節) の酵母ツーハイブリッドシステムを用いたタンパク質間相互作用解析によって、*S. elongatus* の HtpG が DnaK (DnaK2) と相互作用すること見つけて学会で発表された (2004 年)。この結果はバクテリアにおける Hsp90 と Hsp70 の (新規な) 協調的シャペロン作用を示唆するものだと考え、吉川教授らとの共同研究を開始した。我々はまず、これらのタンパク質を高度に精製し、プルダウン法や免疫沈降法等で、HtpG と DnaK がコシャペロンを介さずに直接相互作用することを確認した。その後、特定領域研究で知り合いになった産業技術総合研究所 (つくば) の Penmetcha K. R. Kumar 博士に、Biacore (表面プラズモン共鳴を検出原理とする解析装置) を用いて相互作用を定量的に解析してもらった。HtpG-DnaK、HtpG-DnaJ (DnaJ2) 複合体の K_D 値は、2.58 μM と 102 nM であった。

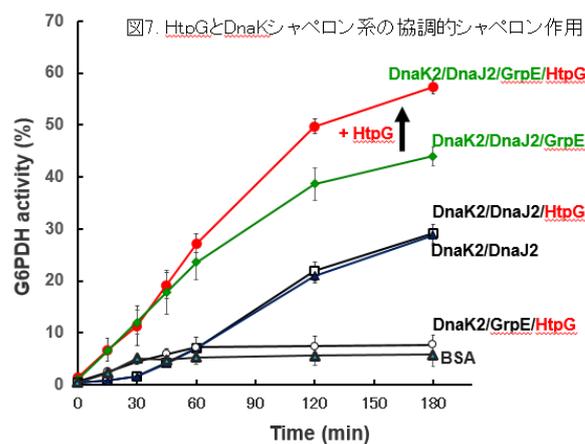
次に、相互作用によってどのような機能変化が生じるかを明らかにしようとした。DnaK も HtpG も非常に弱い ATPase 活性 (k_{cat} は 0.1~1.0/分) を示す。高校の教科書にも出てくるカタラーゼの k_{cat} ($\sim 10^8$ /分) と比べると、実に約 1 億分の 1 程度の活性である。もちろん ATPase 活性がこの程度低くないと適切な分子シャペロン作用は生じないものと思われる。両者混在下で ATPase 活性を測定すると、HtpG は DnaK の ATPase 活性を 2 倍に増大させることが分かった。

5. 6. 2. シアノバクテリア Hsp70 シャペロン系の確立

HtpG と DnaK が直接相互作用し、HtpG が DnaK の ATPase 活性を「活性化」することがわかった。HtpG は DnaK の ATPase 活性を高めて、非天然構造タンパク質の折りたたみ反応における協調作用をオンにするのではないかと考えた。これを証明するには DnaK/DnaJ/GrpE シャペロン系を確立する必要があった。というのは、DnaK 単独では、折りたたみ反応を促進することができず、補助因子 (コシャペロン) である DnaJ と GrpE が無いとその活性が検出されない。即ち、これらは DnaK シャペロン系として機能するのである。当時、大腸菌の DnaK シャペロン系は既に確立されていた。そこで、(既述の在学研究として) ロー

ザンヌ大学の Goloubinoff 教授のもとで大腸菌の DnaK シャペロン系を学んできて、帰国後、鳴海尚一君に教えた。彼は、DnaK, DnaJ, GrpE などの大量発現系やそれらの精製法を確立し(4.6節)、熱変性したリンゴ酸脱水素酵素(MDH)にこれらを加えると(加えないものに比べて)数%余分に活性が回復することを観察した(2005 年度修士論文)。渡邊達郎君がこの実験を引継いだ。MDH の熱変性条件等を検討した結果、変性 MDH の活性は、変性前の活性の 30~40%程度まで戻るようになった。しかしながら、シャペロン作用とは無関係な「自発的」折りたたみがその半分近くを占め、コシャペロン(GrpE)や ATP への依存性ははっきりと見られなかった(2007 年度修士論文)。藤田健作君は、異なる(シャペロン)基質や変性条件等を検討し、例えば、52°C で 8 分間処理をして、活性が検出可能なレベルまで減少したグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)に、25°C で DnaK と DnaJ を加えるとはじめて再活性化し(折りたたみ)、GrpE を加えることでさらに折りたたみの速度や収率が増加することを明らかにした(図 6)。これらの折りたたみ反応は ATP 非存在下では全く起こらなかった。また、DnaK, DnaJ, GrpE 単独、あるいは DnaK/GrpE や DnaJ/GrpE の組み合わせに ATP を加えても再活性化は全く検出されなかった(2009 年度修士論文)。

変性剤(5M 尿素)により失活した乳酸脱水素酵素の再活性化反応(反応液の尿素濃度を希釈することで再活性化を促す)においても同様の結果が得られた。即ち、分子シャペロン(DnaK)とコシャペロン(DnaJ, GrpE)と ATP に依存して、失活した酵素が再活性化したのである。このようにして、シアノバクテリアの DnaK シャペロン系を確立するまで~5 年かかった。その間、卒論や修士論文の発表会で、(学生が異なっても)毎回同じような研究内容を繰り返し発表するのは如何なものかという、研究意欲を失わせるようなコメントをもらった。また、彼の論文(発表)は、そのプレゼンにも問題があったのかもしれないが、相応の評価を得られなかったように感じた。しかし、自ら文献を漁り(彼の机の上には論文コピーが山積みになっていた)、文字通り毎日実験に励んだ藤田君を誇りに思う。



5. 6. 3. バクテリア Hsp90 と Hsp70(DnaK)の協調的シャペロン作用—HtpG の折りたたみ活性の検出—

さて、シアノバクテリアの DnaK シャペロン系を確立することができたので、これを用いて HtpG に結合した変性基質がもとに戻るかどうかを調べた。変性基質と(モル比で)等量の HtpG(二量体)を加えて、45°C で処理をすると、HtpG が変性 MDH と複合体をつくり凝集はしない。25°C に戻すと同時に DnaK シャペロン系と ATP を加えると、MDH は活性を回復した(折りたたんだ)。一方、DnaK シャペロン系を加えない、あるいは HtpG を加えずに熱処理した MDH に DnaK シャペロン系と ATP を加えても、活性は全く回復しなかった。真核細胞の Hsp90 のはたらきは ATP の結合、およびその加水分解に依存するということが細胞レベルで明らかにされていたので、ATP を結合できない、あるいは結合するが加水分解できない HtpG の変異体を作製し、これらを用いて同様の実験をしたが、野生型となんら変わりなく活性は回復した。さらに Hsp90 特異的阻害剤(radicicol)の影響も見られなかった。このように、ATP に依存しないで HtpG が DnaK と協調的にはたらくことを発見した。

真核細胞における Hsp90 と Hsp70 の協調的シャペロン作用は次のようなものであると報告されていた。タンパク質基質は、Hsp70 に捕捉され(あるいは、Hsp40 にまず捉えられた後に、Hsp70 に受け渡され)、ある程度折りたたんだのちに、(Hsp70 と Hsp90 の両者に結合する)コシャペロン(Hop)を介して、Hsp90 に移動し、機能的天然構造へ折りたたむ。このときに、Hsp90 は、ATP の結合と加水分解に依存して折り

たたみを助ける。そこで、バクテリアの HtpG も ATP 依存的にシャペロン作用するのかどうかを調べた。この実験は、大瀧拳君が行った(2014 年度修士論文)。本人から、居酒屋のアルバイトで、注文後決められた時間内(例えば 5 分以内)に「必ず」調理を完了できる凄腕の持ち主であると聞いたが、同様に、私の注文に応じて難しい実験をやってくれた。彼は、変性基質に DnaK シャペロン系を加えて折りたたみ反応を起こさせる際に、HtpG を共存させると、折りたたみ反応がさらに促進される(実はここまでは藤田君が行っていた)ことを明らかにした(図 7)。この促進(折りたたみ増加分)は HtpG の折りたたみ活性を示すもので、阻害剤(radical)を加えると完全に阻害され、Hsp90 の変異体(上記)でも観察されなかった。即ち、この折りたたみは ATP の結合と加水分解に依存していたのである。これらの結果が出てから論文にしようと思っていたが、その途中経過の発表を Hsp90 国際会議で発表したところ、Sue Wickner 博士(米国 NIH)の研究室のポストドクである Olivier Genest 博士(現フランス国立科学研究センター CNRS 研究員)があまりにしつこく質問するので、彼らのポスター発表を聞きに行くと、その発表は、なんと大腸菌の HtpG と DnaK の協調的シャペロン作用の解析に関するもので、内容は我々のものと酷似していた。彼に、論文投稿を少し待って欲しくないかと頼んだが、次の年の Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) で発表されてしまった(2011 年)。なお、Wickner 博士は米国科学アカデミーのメンバーである。我々は、この PNAS の内容にさらに新規な結果を盛り込んで論文を作成し、Journal of Biological Chemistry に発表した(2014 年)。Hsp90 の国際会議では、バクテリアや植物の Hsp90 に関する発表はほとんど無く、競争相手がいないと思って油断して、未発表のデータを発表していた。時間をかけて良いものをつくろうとしてきたが、Wickner 博士らがこの分野に乗り込んできたので、もうそんな考えは吹っ飛んだ。

5. 7. Hsp90 の機能を制御する化合物の探索—最初のバクテリア Hsp90(HtpG)阻害剤の発見—

病気に関係するという報告が少ないためか、バクテリアの分子シャペロンの阻害剤は、あまり研究されてこなかった。特に HtpG の阻害剤の報告は皆無であった。筆者の阻害剤研究の始まりは、「蛋白質核酸酵素」に掲載された理研の長田裕之博士(埼玉大学大学院連携教授兼任)らによる化合物マイクロアレイに関する論文(叶ら, 2005 年)を、学科図書室で偶然閲覧したことにある。光親和型固定化法という新規な方法でさまざまな小分子化合物を固定化したマイクロアレイを長田先生らが作製したというものであった。先生らは、化合物バンクをもち、ハイスループットスクリーニング法を開発・確立されていた。そこで、HtpG と相互作用する化合物の探索に関する共同研究を願ったところ引き受けてくださった。共同研究では、近藤恭光博士がスクリーニングをしてくださり、皆川俊君がヒットした化合物の解析を行った(2008 年度修士論文)。「長田研は超一流のラボだけれど、君が共同研究に加わってくれるかな」と聞いたところ、皆川君は自分の右腕を軽くたたきながら「大丈夫です」と言ってくれた。~7000 の化合物をスクリーニングして、~30 個の化合物が HtpG に結合した。そのうちの数個は、コリスチン(colistin)やポリミキシン B(polymyxin B)などの環状リポペプチド(抗生物質)であった。

我々は、環状リポペプチドに焦点を合わせて研究を進めた。これらの化合物はどれも、HtpG の N 末ドメインに「特異的」に結合した。コリスチンは、N 末ドメインの相互作用・凝集を誘導し、基質との相互作用を阻害した。ちなみに、N 末ドメインには ATP 結合部位があるが、ATPase 活性には何ら影響しなかった。それまでに報告されていた阻害剤は、ATP 結合部位に結合し ATPase 活性を阻害(拮抗阻害)するものだったので、新規な阻害剤であった。これらの結果を Biochemical Journal(2011 年)に発表した。最近、他の研究グループが、真核生物 Hsp90 に及ぼすコリスチンの影響を調べたが、彼らの結果は我々のものと同様であった(Togashi ら, 2017 年)。

なお、長田先生とは、Current Pharmaceutical Design という薬学系学術雑誌の特集号(Hot topic 'Molecular chaperones as drug targets')の企画・編集を行った。この雑誌のことはよく知らなかったが、当時インパクトファクターが4を超えていたので、executive guest editor を引き受けた。この分野の国内外の第

一人者に執筆を依頼し、さらに一流の研究者に論文審査を依頼して、12の論文を揃えることができた。どの論文も引用回数が非常に多く、出版社は驚いたようで、特集号の editor を再び依頼されたが断った。編集部との協力はあまり得られず、執筆及び審査依頼、編集にいたるまで、本当に消耗した。この特集号に自らも執筆した。京都大学の宮田愛彦先生と米国 National Cancer Institute の Leonard M. Neckers 博士(Hsp90 の最初の阻害剤ゲルダナマイシンを発見した世界的研究者)に共同執筆をお願いして、書いた分量で著者順を決めた。私の論文の中では、よく引用されている論文の一つである。

5. 8. Hsp90 の機能を制御する化合物の探索—偶然の出会いと天然小分子化合物に導かれて—

コリスチンの論文を書いた後、インドで国際会議をするので来ないかという招待メールがきた。送信者と面識があったわけではないので、いわゆる「ハゲタカ」国際会議かもしれないと思ったが、行くことにした。その理由の一つは、筆者が指導した Kollimalai Sakhivel 君(2009 年度博士論文)が博士号をとった Annamalai University で開催されたからであった。真夜中にチェンナイ(マドラス)に着き、カオスな空港駐車場でなんとか車を見つけ、南下してアナマライに到着したのは早朝であった。実はそれほど期待していなかったが、会議には東南アジア有数の大学の研究者・教員が参加し、同じゲストハウスに泊まり、エクスカージョンにも行って、親交を深めた。その一人が、マレーシア国民大学(Universiti Kebangsaan Malaysia)の Ibrahim Jantan 教授であった。後ほど知ったが、彼はマレーシア国内ではもちろんのこと東南アジアでも著名な研究者であった。この会議の後しばらくして、教授を訪問した際に、数種類の抗がん活性を有する化合物を譲り受けた。

5. 9. Hsp90 の ATPase 活性を活性化するがシャペロン機能を阻害する化合物の発見

Jantan 教授から分与された化合物を解析してくれたのが、横山雄平君(2013 年度修士論文)である。彼は、実験に用いた酵母(タグを付けない)Hsp90 の精製方法を東京農工大学養王田正文教授の研究室で学び(数日程度)、約半年間かけて、筆者の研究室でも精製ができるようにしてくれた。年に一度の研究室合宿で、彼が自慢げに、酵母 Hsp90 の精製ができるようになったと言うのを聞いて、指導者として冥利に尽きると感じた。研究成果を出す学生の特徴は、教員の話聞いて理解し、自分でよく考え工夫しながら(すぐに、忍耐強く)実験することができるということではないかと思う。彼はまさにそのような学生の一人であった。彼は、譲り受けた天然小分子化合物の一つ

である、ゴニオタラミン(図 8)が、シアノバクテリアの HtpG や酵母の Hsp90 の ATPase 活性を活性化することをみつけた。ゴニオタラミンは、抗がん活性を有するために HtpG/Hsp90 の ATPase 活性を阻害すると予想したので驚いた。なぜならば、ゲルダナマイシンの発見(1994 年)から現在にいたるまで、抗がん活性を有する化合物のほとんどは、Hsp90 の ATPase 活性を ATP と競合して阻害するからである。これらの化合物、例えば

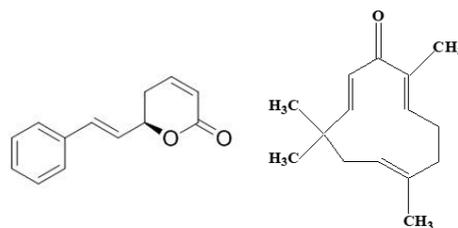


図8. ゴニオタラミン(左)とゼルンボン(右)

ゲルダナマイシンで Hsp90 を阻害すると、多くのがんの原因となるタンパク質(Hsp90 の基質)が分解されて消失し、培養がん細胞の増殖抑制や動物の腫瘍縮小効果が観察される。Hsp90 はがん細胞の生存にとって必須のはたらきをしているのである。さらに、ゴニオタラミンは *in vitro* の折りたたみ活性(5. 6. 3 項)を阻害した。ATPase 活性が活性化すると、シャペロン活性も増大すると予測していたので、意外な結果であった。ところが、過去の文献を調べることで、酵母の変異株(Hsp90 を構成するアミノ酸の一つが変異したもの)の中で、通常よりも高い ATPase 活性をもつ Hsp90 を発現する変異株は低活性の株と同様に、高温感受性を示すということが分かった。高温では変性タンパク質が増えるために、Hsp90 のより大きなシャペロン活性が必要とされるが、細胞が高温感受性を示すということは、活性「過多」の ATPase によりシャペロン機能が減じていることを示唆するものである。これらのことから、Hsp90 の ATPase 活性が最適値からずれると、Hsp90 のシャペロン機能が低下するのではないかと考えている。これらの結果を、Journal

of Biochemistry に報告した(2015年).

マレーシア国民大学の客員教授として招待されて、Jantan 教授を再び訪問した。このときは、薬学部教員向けの分子シャペロンに関する講義を複数回行った。講義のあと、一人の教員がゼルンボン(図 8)という化合物を調べたらどうかと言って、その化合物まで与えてくれた。ゼルンボンは熱帯から亜熱帯地方で広く見られるハナショウガ由来の天然小分子化合物である。天谷洋介君(2014年度修士論文)と小松太和君(2015年度卒業論文)が、ゼルンボンの Hsp90/HtpG に及ぼす影響を調べたところ、この化合物も ATPase を活性化することがわかった。ゼルンボンは、システイン残基に共有結合する。ゴニオタラミンにおいては、化合物が結合するドメインは明らかにできたが、相互作用するアミノ酸は分からずじまいであった(北里大学薬学部の梅山秀明先生らに結合シミュレーションをしてもらったことはあるが)。質量分析(理研の堂前直博士らとの共同研究)や、すべてのシステイン残基の各々をアラニンに変異させた HtpG 変異体の解析をして、活性化に関与するシステインを特定することができた。ゼルンボンは、シアノバクテリア HtpG のみならず、酵母やヒトの Hsp90 を活性化したが、システインをもたない大腸菌 HtpG の活性には影響しなかった。この化合物でシアノバクテリアを処理すると、シアノバクテリアは *hspG* 変異株のように高温感受性になった。また、HtpG の基質であるリンカーポリペプチドが減少した。宮田博士との共同研究で、動物細胞に対する影響も調べた。ゼルンボンで処理されたがん細胞由来の培養細胞では、Hsp90 とその基質(タンパク質キナーゼ)との相互作用が阻害され、基質の消失が観察された。これらの結果を *Biochemical Journal* (2018年)に発表した。

6. 低分子量 Hsp

6. 1. 熱ショックで大量発現する HspA の遺伝子クローニングと精製

最後になったが、GroEL の研究(4章)を始めてすぐに、低分子量 Hsp にも興味をもった。その理由は、この 16kDa タンパク質が、60kDa (GroEL) 及び 10kDa (GroES) タンパク質とともに、*S. vulcanus* を熱ショック処理することにより顕著に蓄積する Hsp であったからである。既に述べた GroEL や HtpG の研究時期とは前後するところもあるが、低分子量 Hsp の研究の歩みについて以下に記す。

留学生のロイ(Sanjit Kumer Roy)さんとともに、16kDa の Hsp の研究を始めた(1998年度博士論文)。ロイさんは、理工学研究科博士後期課程設置(1989年)後、分子生物学コースに受け入れられた(最も初期の国費留学生だった。檜山先生が決定された 16kDa Hsp の N 末端アミノ酸配列と内部配列に基づきプライマー(degenerate primers)を設計し PCR を行ったところ、幸い単一の DNA 断片が増幅されてきたので、これをプローブにして遺伝子ライブラリーをスクリーニングし、クローニングした遺伝子を *hspA* と命名した(accession 番号は AB002666)。塩基配列から推定されたアミノ酸配列の類似性(ホモロジー)検索によって、HspA が低分子量 Hsp の一つであることが明らかになった。シアノバクテリアにおける低分子量 Hsp 遺伝子を初めてクローニングしたもので、論文を *Journal of Bacteriology* に発表した(1998年)。

次に HspA の生化学的解析を行うために、まずその精製を行った。今では、目的のタンパク質にタグを融合したものを大腸菌で大量発現させて容易に精製できるが、当時、タンパク質はその生物から直接、単離精製するのが一般的であった。ロイさんは、硫安分画、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーの各精製段階を経て、HspA を単一標品にまで精製したが、その精製方法は独特であった。増殖速度の遅いシアノバクテリアの細胞を大量に集めるのは(大腸菌に比べると)かなり困難である。~10L の培養液が必要であった。そのために、精製の各段階で、少しでも多くのタンパク質を回収しながら、精製を進めていくわけであるが、ロイさんは、カラムからの溶出画分のうち、HspA を最も多く含む(ピークの)画分のみを回収して、他の画分は惜しげもなく捨てた。必要ならば、もう一度最初から始めて、ピーク画分がある程度溜まると、次の精製ステップに進むのである。タンパク質の精製では、純度、回収率、比活性が問われるが、ロイさんは回収率には目もくれなかった。

6. 2. HspA のシャペロン活性—タンパク質凝集阻止活性の測定法の確立—

マウスやヒト、高等植物などの低分子量 Hsp は、変性タンパク質の凝集を阻止する活性(シャペロン活性)を示すという報告が既にあった。シアノバクテリアの低分子量 Hsp は全く解析されていなかったため、HspA を用いてこの活性を検出しようとした。低分子量 Hsp 研究の第一人者である Elizabeth Vierling 教授(1999 年に筆者の研究室を訪問、セミナーをしてもらった)らは、タンパク質基質を高温処理して、見かけの吸光度の増大を一定の時間間隔で経時的に調べていた。吸光度の増大は、タンパク質の凝集塊生成に伴う光の散乱強度(濁度)の増大を示す。そこで、高温に設定した水槽に、基質を含む溶液をインキュベートし、一定時間ごとにサンプリングして吸光度を測定した。分子シャペロンの添加の有無で濁度に違いがみられることを期待したが、吸光度変化(0.02~0.04)が小さすぎるためか、あるいは、セルの出し入れに伴って生じる機械的な測定誤差が原因なのか、我々が具有していた分光光度計では再現性良く測定することはできなかった。

幸いなことに、試料の温度を一定に保つセル(キュベット)ホルダー(ペルチェ素子を用いた電子冷熱式のものを)を装備した、我々の研究室のものよりも高感度な分光光度計が、金井龍二先生の研究室にあったので、それを借りて解析を行うことにした。セルホルダーの温度を高温(例えば 45°C)にしておき、反応液を入れたセルをホルダーにセットし、数分間放置後、基質(例えば MDH)を加え、吸光度変化を経時的に連続解析した。微小な濁度上昇を再現性良く解析できるようになった。HspA を反応液に加えておくと、この濁度の上昇が完全に抑えられた。このようにして、HspA のシャペロン活性を初めて検出することができた。比較のために用いた、低分子量 Hsp の一つであることが分かっていた水晶体の α クリスタリンを加えると、HspA の半分以下の濃度で凝集を完全に阻止できたので驚いた。眼の水晶体のタンパク質はクリスタリンと呼ばれ、 α 、 β 、 γ の 3 種類のファミリーに分けられるが、 α クリスタリンは低分子量 Hsp の一種で、目の透過性の維持に寄与していると考えられている。

6. 3. HspA は変性タンパク質と可溶性の複合体を形成する

上記のように、基質(変性 MDH)の凝集が HspA によって完全に阻止されたので、酵素は失活していないだろうと考えて、高温処理をした基質と HspA を含む反応液から、一部をサンプリングし活性測定したところ、活性は全く検出されなかった。さらに、反応液の温度を(45°C から)25°C にして、反応液を数時間放置しても、活性は全く回復しなかった。Buchner 教授らは、マウスやヒトの低分子量 Hsp は変性タンパク質の凝集を阻止し、さらに、基質(酵素)の不活性化も抑制すると報告していた(1993 年)ので、この結果に大変驚いた。筆者は自分の実験結果から、①変性タンパク質が HspA に結合して可溶性の複合体を形成している、②25°C に温度シフトしても基質は HspA に結合したままで解離しないと考えた。今では、低分子量 Hsp のシャペロン作用をこのように理解するのが一般的になっている。

6. 4. HspA に結合した変性タンパク質は元の構造に折りたたむ

HspA に結合した変性状態の基質は、HspA から解離して元に戻らねばならない。この再折りたたみ反応をどのようにして調べることができるのか。上記の HspA の生化学的解析結果を European Journal of Biochemistry に報告した(1999 年)ころ、Vierling 教授や Buchner 教授らは、高等植物や酵母由来の低分子量 Hsp に結合した変性基質が、Hsp70(DnaK)シャペロン系を共存させることで元に戻ることを報告した。このような実験をすべきだと思ったが、当時はまだ、DnaK シャペロン系を確立していなかった。もちろん、共同研究すればよかったが、分子シャペロン研究開始から 10 年間程度は、安易な共同研究を避けて、可能な限り自分たちの手ですべて行いたかった。「埼玉産」にプライドをもって、研究したいのだと

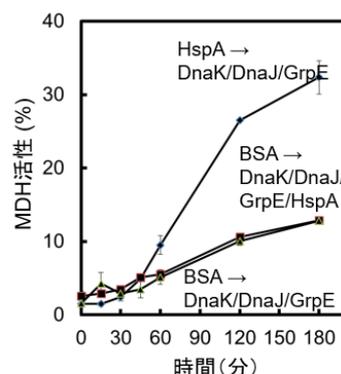


図9. HspAあるいはウシ血清アルブミン(BSA、対照タンパク質)存在下で熱変性・失活したMDHの、DnaKシャペロン系によるMDHの再活性化。図の→は、45°Cから25°Cへの温度シフトを示す。

学生たちに語っていたことを思い出す。DnaK シャペロン系を確立(5.6.2参照)した今では実験可能で、HspA と基質を 45°C で処理した後に、25°C にして DnaK シャペロン系を加えると MDH は再活性化することを小林優介君(通称アラブ)が示してくれた(2016 年度修士論文, 図 9)。ストレス条件下では、変性したタンパク質はそれ以上の損傷(凝集)を受けないように HspA の庇護を受け、非ストレス条件にもどると、DnaK シャペロン系などに助けられながら元の機能的構造を回復すると説明できる。

6. 5. HspA 遺伝子の発現調節

6. 5. 1. HspA 遺伝子の転写調節

HspA の転写調節機構を調べるために、まず転写開始点を決めた。当時、シアノバクテリアにおける Hsp 遺伝子の発現は大腸菌と同様に、シグマ 32 因子によって調節されていると考えられていたが、転写開始点の上流約 10 塩基と 35 塩基の位置にあるプロモーター配列を見る限り、通常的主要シグマ因子で認識されるものであった。これは、抑制因子(リプレッサー)によって通常条件における転写が抑えられていることを示唆するものである。リプレッサーは転写開始点周辺に結合する。そこで、*hspA* の転写開始点周辺に結合するタンパク質があるかどうかを、EMSA(4. 3節)で解析することにした。埼玉大学ではこの方法を用いている研究者はいなかったので、基礎生物学研究所(岡崎)のトレーニングコース(数日間)に参加して方法を学んだ。講習会には、生体制御学科の弥益恭先生も参加されていた。

ロイさんが 1998 年度に博士後期課程を修了し、1999 年度に小島幸治君が卒研を始めたが、その内容は、低分子量 Hsp をコードする遺伝子の発現制御に関するタンパク質の同定であった。そこで、EMSA を用いて、DNA 結合タンパク質の検出を試みた。上記の講習会では、EMSA に用いる DNA プローブを放射性同位元素で標識したが、ジゴキシゲニン(digoxigenin)で標識した(非放射性標識の)DNA プローブでもアッセイできるようにした。実験には、好熱性 *T. elongatus* (種は異なるが、*hspA* の塩基配列は *S. vulcanus* のものと同一)を用いた。通常培養温度 50°C で生育した細胞の抽出液中に、*hspA* 遺伝子の 5'非翻訳領域(mRNA の 5'側にある翻訳されない領域)に結合するタンパク質が見つかった。この DNA 断片には、A と T が多く含まれる逆方向反復配列(ACAAGcAAA-TTTagTTGT)が存在し、この配列に変異を導入するとタンパク質の結合は見られなくなった。タンパク質がこの配列に特異的に結合して RNA ポリメラーゼによる転写反応を阻害すると仮定すれば、*hspA* の発現が誘導されるために、熱ショックによってこのタンパク質が解離して、転写阻害が解除されねばならない。このような仮説に基づき、この DNA 結合タンパク質は高温不安定ではないかと考えた。実際、50°C で培養した細胞の抽出液を 63°C で処理したところ、5'非翻訳領域へのタンパク質の結合は見られなくなった。これは *in vitro* における解析結果であるが、細胞を 50°C から 63°C にシフトし、経時的にサンプリングして、それらの細胞破碎液を用いて EMSA で解析すると、シフト後 45 分間まで処理した細胞抽出液には DNA 結合活性は検出されなかったが、驚きべきことに 45 分後には見られるようになったのである。なお、*in vitro* では、細胞抽出液を 1 時間熱処理しても、結合活性は回復しなかった。もし、細胞の熱処理を 30 分間しか行わなかったとすれば得られなかった、この予期せぬ実験結果は何を意味するのか。このなぞときのヒントを得ようと、タンパク質合成阻害剤であるクロラムフェニコール添加後に熱処理を行い、45 分後に細胞を破碎して EMSA で解析した。その結果、DNA 結合活性は見られなくなった。これらの結果に基づき、この DNA 結合タンパク質を再活性化するタンパク質が熱ショックで合成される、あるいは高温安定な DNA 結合タンパク質が熱ショックで合成されて転写のシャットオフに関与するなどといった仮説を立てた。結合する DNA の塩基配列を明らかにしたので、このタンパク質の単離は容易にできそうであるが、小島君修了後、残念ながら全く進展していない。

6. 5. 2. HspA 遺伝子の転写後調節

1998 年に Schumann 教授を訪問し学科セミナーをした際(4. 2節)に、研究室の学生さんの一人が、プログラム(おそらく mfold)を用いて、我々がクローニングした *hspA* 遺伝子の mRNA の二次構造予測を

してくれた。*hspA* の mRNA は顕著な二次構造をとり、それが温度で変化することを教えてくれた。帰国後、小島君がこのプログラムを用いて、二次構造予測を再現してくれた。これは、*hspA* の mRNA の 5'非翻訳領域に、通常温度(50°C)と熱ショック温度(63°C)で変化する二次構造が形成されることを示し、熱ショックにより翻訳阻害が解除されることを示唆するものであった。即ち、mRNA 構造を介した温度検知システム(RNA thermometer)の存在が強く示唆された。分子生物学科の松崎博先生から転写融合と翻訳融合プラスミドを分与してもらい、転写及び転写後レベルにおける解析結果をまとめて、*Biochemical and Biophysical Research Communications* に報告した(2005年)。

6. 6. HspA の高発現による細胞及びフィコビリソームの熱耐性の増大

6. 6. 1. HspA の高発現による細胞の熱耐性の増大

HspA の細胞機能を明らかにするために、大量発現株を作製しようとした。その方法に関する文献検索によって、大腸菌とシアノバクテリアのいずれでも複製可能なプラスミド(シャトルベクター)が存在すること、そのプラスミドをトロント大学の Neil A. Straus 教授が構築したことを知った。そこで、教授から使用許可を得、教授の研究室にいたことがある鈴木英治博士(現秋田県立大学教授)からこのベクターを譲り受けた。このプラスミドに高発現用(強力に転写を促す) *tac* プロモーターとその下流に *hspA* をクローニングしようとしたが、なぜか非常に困難で、最初は田中直樹君がトライしたが、うまくいかなかったので、ロイさんが引き継いだ。田中君は実験することを一切厭わない学生であったが、ロイさんも同じで、何度も、本当に何度もトライして大量発現プラスミドの構築に成功した。分子シャペロン研究を始めたときにこのような学生さんたちに恵まれて、本当に幸運であった。ロイさんは、このプラスミドを(*S. vulcanus* が形質転換できなかった)常温性シアノバクテリア *S. elongatus* に導入して形質転換に成功した後、海外にポスドクに行ってしまった。大量発現株の表現型解析は、神奈川大学から進学した鈴木伸章君が行った(2001年度修士論文)。高発現により細胞の熱耐性が増すと期待したので、細胞を致死的高温にさらし、高発現株と対照株(*hspA* をクローニングしていないプラスミドで形質転換したもの)の生存率を比較した。その測定法であるが、培養液を連続的に希釈して、寒天培地(固形培地)に一定量滴下して、1~2週間培養すると、(培養液が適度に希釈されている場合には)培養液中の1個の細胞が増殖して生じたコロニーが観察されるようになる。彼と一緒に、その個数を計測し、生存率を求めた。実験誤差が大きいので、何度も実験を行うことになり、寒天培地のプレート(シャーレ)がうず高く積まれていったことを憶えている。高発現株は、対照株に比べて、致死温度(50°Cで15分間)における生存率が約10倍増えた。HspA の大量発現だけで顕著な生存率の増加が観察されたのである。

この生存率が10倍増えたというのは、致死温度処理を光(30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 弱光である)照射下で行った場合の結果である。明所で致死温度処理を行うと、(対照株の)生存率が2.3%、同様の処理を暗所で行うと32%になり、明所では生存率が格段に低下するために、HspA の高発現の効果が顕著になる。一方、暗所では、この効果が顕著にみられない(1.3倍程度の生存率の増加)。*hspA*、*groEL* や *hspG* などの分子シャペロン遺伝子の発現は、光照射により著しく増えるが、明所高温下では、タンパク質の変性・損傷が激しいために、より多くの分子シャペロンが必要とされるのではないかと考えている。

6. 6. 2. HspA の高発現によるフィコビリソームの熱耐性の増大

光合成が熱に弱いということは昔から知られていたもので、光合成活性を測定したところ、HspA の高発現により光合成(電子伝達系)が熱耐性を獲得することが明らかになった。従って、高温下で光合成が守られたために生存率が上がったという議論もできたかもしれないが、対照株の光合成活性は、明暗にかかわらず、検出不可能なレベルまで低下していた。しかし、上に述べたように、暗所で対照株を高温処理すると、光照射下に比べて10倍以上生存率が上昇したのである。

筆者は、光合成活性の熱失活と生存率とは関係しないと思っている。むしろ、集光機能を司るフィコビリソームの熱失活と生存率の方が相関していた。細胞の吸収スペクトルをとると、非破壊的にフィコビリソーム(吸光度)の定量ができる。フィコビリソームを構成する主要タンパク質であるフィコシアニンは、～620nm に吸収極大を示す。対照株を照射下で熱処理すると、フィコビリソームの吸光度が顕著に減少したが、暗所では著しい減少は観察されなかった。さらに、HspA を高発現することにより、照射下で熱処理をしても、フィコビリソームの減少は抑制された(図 10)。これらの結果から、ストレス下でフィコビリソームを守ること(あるいはフィコビリソームが変性しない細胞環境を維持すること)が生存上重要で、そのために分子シャペロンが重要なはたらきをしているのではないかと考えた。フィコビリソームは細胞全タンパク質の 50%を占める。従って、細胞のタンパク質の品質管理上、フィコビリソームを守ることは非常に重要である。

6. 7. HspA とフィコビリソームの相互作用

6. 7. 1. フィコビリソームのブリーチング

HspA がフィコビリソームと直接相互作用するのではないかと考えて、試験管レベルでそれを証明しようとした。上述のように、細胞(対照株)を照射下で高温処理すると、フィコビリソームの色が顕著に消失(ブリーチング)した(図 10)。本間君(5. 3節)は、単離したフィコビリソームがブリーチングする条件を見つけようとした。単に、高温(50°C)にしてもそれは起こらなかったが、過酸化水素を 0.03%～0.3%加えて高温処理すると起こった。細胞レベルでも、暗所では 50°C 処理してもブリーチングしないが、照射するとそれが起こった。このような観察に基づき、高温下で、タンパク質が変性して細胞のエネルギー消費が減少するにもかかわらず、過剰の光エネルギーが吸収され光合成電子伝達系に供給された場合には、電子伝達系は過還元状態となるために活性酸素が生じ、ブリーチングが起こるのではないかと考えている。

6. 7. 2. HspA によるフィコビリソームのブリーチングの抑制・阻害

フィコビリソームのブリーチングに伴い、どのような構造変化が起こるのか。超遠心分離を行って高温・過酸化水素処理後の単離フィコビリソームのサイズ変化を調べたところ、それが解離することが明らかになった。この解離は、高温(50°C)処理だけでは観察されず、過酸化水素を 0.15～0.3%加えて、高温処理(3 分間)すると起こった。解離のみならず、フィコビリソームの青い凝集物も検出された。また、照射下で 50°C 処理をした細胞を破碎し、超遠心分離をしてフィコビリソームを解析すると、その解離が観察された。これらの結果に基づき、フィコビリソームが解離し凝集する過程で、ブリーチングが起こるのではないかと考えた。高温・過酸化水素処理をする前に、HspA を加えると、単離フィコビリソームのブリーチングが抑えられ、その解離は阻止できないが、凝集は阻害されることが分かった。

フィコビリソームの主要構成タンパク質であるフィコシアニンと HspA の直接的な相互作用を解析するために、精製したフィコビリソームを解離させ、イオン交換クロマトグラフィーとヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーでフィコシアニン(α と β のヘテロ 2 量体)を高度に精製した。これを、0.3%過酸化水素存在下 50°C で 15 分間処理をすると、フィコビリソームを処理した時と同様にブリーチングしたが、HspA によってそれが阻止された。これらの結果は、HspA がフィコシアニンと直接相互作用して、そのブリーチングを抑制・阻害することを示すものである(FEBS Letters, 2006 年)。

6. 8. HspA とチラコイド膜の相互作用

HspA はフィコシアニンのような可溶性タンパク質のみならず、チラコイド膜の安定化にも関与することが、金子康子先生(現教育学部)との共同研究(電子顕微鏡による微細構造の解析)で示された。金子先

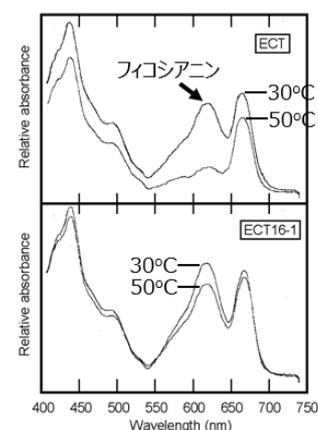


図10. HspA高発現株 (ECT16-1) と対照株 (ECT) の細胞の吸収スペクトル

生が指導された新田浩二君と、筆者が指導した鈴木伸章君(5. 6節)がこの研究を進めてくれた。

高温(光照射下)で処理後の HspA 高発現株とその対照株の微細構造を比較すると、株間の違いは顕著で、対照株のチラコイド膜は激しく損傷(断片化や膨潤など)していた。それに対して、HspA 高発現株のチラコイド膜は、処理前と同様の同心円状に何層か重なった構造を維持していた。強光下における構造的損傷も HspA によって緩和された。次に、HspA との直接的な相互作用によりチラコイド膜が安定化するのではないかと考えて、HspA の局在性を調べた。当時、高等植物の低分子量 Hsp が、それ自身は可溶性であるにもかかわらず、遠心分離すると(少なくとも一部が)チラコイド膜とともに沈殿画分に検出されることが報告されていた。我々も同様の結果を得ていたが、HspA がチラコイド膜に結合すると断定するためには遠心分離するだけでは不十分で、免疫電子顕微鏡法等で直接検出すべきだと考えた。この方法では、細胞の凍結超薄切片を作製し、その切片上で(HspA の抗体を用いて)免疫反応を行うが、かなり難しい実験で、金子先生の指導の下、鈴木君と新田君が協力して成し遂げた。金コロイド免疫電顕法により、HspA は、30°C と 45°C(非致死的高温)のどちらでも、サイトゾルとチラコイド膜の両方に存在するが、金粒子(即ち、HspA)の数を数えると、30°C ではチラコイド膜の方に約 2 倍多く局在していたが、45°C の熱ショックでサイトゾルに「移動し」、ほぼ等しく分布するようになり、熱ショック後 60 分が経過すると、熱ショック前の状態に分布することが明らかになった。HspA はサイトゾルの可溶性タンパク質とチラコイド膜の双方と相互作用して、それらの安定化に寄与すると考えている。

6. 9. HspA の高温以外のストレス耐性への関与

世界の全陸地面積の~7%(の土壌表層)に塩が蓄積し(1994 年)、さらに年々増加しつつあるという。高塩は、植物の生育を阻害し、枯死させることもあるので、食糧生産上大きな問題を引き起こしている。植物に塩耐性を付与できれば、このような問題の解決につながるだろう。転写産物の網羅的解析によると、PCC6803 の全遺伝子の中で、*hspA* は高塩濃度下で二番目に顕著に(転写)誘導される遺伝子である。Asadulghani 君(4. 3節)の博士論文のテーマの一つは、HspA が(細胞の)耐塩性に寄与するかどうかを解明することであった。

野生株を高塩(2.0M)で 12 時間処理すると生存率は 20%以下に減少したが、事前に(生存率には影響しない穏やかな)塩処理(0.5M で 2 時間)をしておく、致死的高塩下の生存率が 60%程度まで向上した(塩耐性を獲得した)。高塩処理によって、クロロフィルやフィコシアニン等が減少するが、事前に穏やかな塩処理をすると、それらの減少も抑制された。一方、HspA の遺伝子が欠損した株では、穏やかな塩処理をしても塩耐性獲得現象は観察されなかった。即ち、HspA は塩耐性獲得に重要なはたらきをするのである(Archives of Microbiology, 2004 年)。なお、高等植物の低分子量 Hsp も耐塩性に関与する。イネの低分子量 Hsp (OsHSP40)の変異株は塩ストレス感受性であることが報告されている(Wang ら, 2019 年)。また、低分子量 Hsp (RcHSP17.8)を構成的に発現するシロイヌナズナが塩耐性を獲得したという報告もある(Jiang ら, 2009 年)。

渡邊達郎君(2007 年度修士論文)とインドからの留学生である Kollimalai Sakthivel 君(2009 年度博士論文)は、HspA が、酸化ストレス耐性にも関係するかどうかを調べた。1mM の過酸化水素存在下で、HspA 大量発現株は増殖するが、対照株は全くしなかった。種が異なるが、PCC6803 株の HspA 遺伝子破壊株は、活性酸素の発生を促進するメチルビオローゲン(パラコート)に顕著な感受性を示した。過酸化水素やメチルビオローゲン存在下では、対照株あるいは野生株のクロロフィルやフィコシアニンの減少がみられたが、HspA の高発現によりその減少が抑制され、HspA 遺伝子破壊株では、野生株が(順化して)すぐに減少を止めるのに対して、減少が継続して起こった。低分子量 Hsp が酸化ストレス耐性において重要なはたらきを示すことを示すこれらの結果を Archives of Microbiology に発表した(2009 年)。

シアノバクテリアに関する低分子量 Hsp の研究が目にとまったのか、Cellular and Molecular Life Sciences から依頼されて低分子量 Hsp に関する総説を書いた(2007 年)。真核生物の低分子量 Hsp を

含む一般的な総説を書かねばならないと思い、Biological Research Centre の László Vigh 教授(ハンガリー科学アカデミーのメンバー)に共同執筆をお願いした。この総説は、自分の論文の中で最も引用回数が多いものである。この共同執筆を契機に、Vigh 教授との交流が発展した。日本学術振興会の二国間交流事業共同研究に二回採択され Vigh 教授の研究室を訪問するとともに、教授の研究員を筆者らの研究室に何度も受け入れ、さらに二つの総説を共同執筆し、今も公私ともども親しくさせてもらっている。

7. 謝辞

筆者は、卒業論文と修士論文の指導を杉山達夫先生(静岡大学助教授、後に名古屋大学教授、理研植物科学研究センター長などを歴任、1999年に紫綬褒章受章)に、博士論文を Gerald E. Edwards 先生(米国ウィスコンシン大学教授、ワシントン州立大学教授を歴任、Regents Professor)に指導していただいた。研究は、C₄ 光合成の生化学・生理学に関するもので、杉山先生からは、ユニークで重要な発想をし、仮説立案後は、全身全霊で証明すべきであると学んだ。Edwards 先生からは実験結果をそのまま受容し、博識に基づき、さまざまな立場から考察することを学んだ。その後、英国の David Walker 教授(シェフィールド大学教授、光合成研究所所長)のもとでポスドク(博士研究員)を経験したが、教授の完璧なまでの放任指導には驚いた。大学院生はほとんど指導を受けていなかったので自ら研究を進めていたと思うが、英国はこのような指導でノーベル賞を輩出してきたのではないかと想像した。この場を借りて、これらの Mentor の方々に感謝を述べたい。

また、好奇心をかきたてる偶然の発見を共に経験し、研究の旅をともに歩んでくれた学生の皆さんに、もう一度謝意を表す。このマイレビューでは、論文業績を主観的に評価しながら書いたかもしれないが、H-index に基づく評価法(Publons)では、27 の値

(<http://www.jbsoc.or.jp/letter-archive-nakanishi/2014-01.html>)になる。論文等に関係する方々の話が中心になったが、名前を挙げなかった代謝学研究室の一人ひとりにも心からお礼を申し述べたい。代謝学研究室を選んでくれた彼ら・彼女らが無事卒業あるいは修了できるようにと教育指導・世話する中で、孤独な、闇の中を歩く力をもらったこともある。杉山先生のように厳しく指導すれば、もう少し質の高い研究ができて学生の皆さんにとっても良かったかもしれないと思うことがあるが、私はせいぜい小言をいうのが精いっぱいであった。また、最後の 15 年間は、講義関係や委員会関係の仕事、書類・論文作成等に追われて、実験室で自分自身がピペットマンを握ることがほとんどなく、(もちろん個別のディスカッション、ゼミ・研究室合宿等での指導はしたが)学生さんに十分な技術指導ができなかったことを残念に思う。しかし、このような心配とは裏腹に、学生さんたちは教員の目を気にせず、自由に楽しい研究室生活を謳歌していたのかもしれない。

本研究は、埼玉大学のさまざまな研究費・国際交流支援費(Lab-to-Lab 含む)、在外研究費、科学研究費補助金(基盤研究(C) 18K05407 を含むこれまでの基盤研究、特定領域研究)、二国間交流事業(日本学術振興会)やヤマハ発動機などからの研究費の助成を受けて行われたものである。