

分子シャペロン DnaK の役割

市川比良久

Role of a Molecular Chaperone DnaK

Hiraku ITIKAWA

1. 緒言

高等生物は機能的に分化した細胞群が互いに連携を取り合って生命活動を営んでいる。多様な環境の変化に対応しながら、細胞はその諸活性を保つために種々の防御機能を作動させている。周囲の温度の上昇には熱ショックタンパク質をつくることにより、熱の障害を防ぎ、また修復に役立てる。この応答は熱ショック応答とよばれ、生物の進化の過程でつくられ保存されてきた反応である。この応答は熱以外の刺激によっても誘導されることがあり、熱ショックタンパク質を誘導する多種多様な刺激、環境を総称して「ストレス」とよぶようになった。ストレスによって誘導されるタンパク質をストレスタンパク質、そしてその反応をストレス応答と称する。最近ストレスタンパク質の機能についてめざましい研究成果が得られ、分子シャペロンという新しい概念で理解できるようになった。分子シャペロンは、「タンパク質の正しい折りたたみや会合を介助するが、その最終機能産物には組み込まれない一群のタンパク質」と定義される^{1,2)}。最近ではストレスタンパク質は、その機能的側面から分子シャペロンとしてまとめられている。

すでに本誌上で報告したように、大腸菌の DnaK タンパク質は熱ショック応答で誘導されるストレスタンパク質であるが機能的には分子シャペロンの一つである。この DnaK タンパク質をつくる遺伝子 (*dnaK*) に突然変異をもつ *dnaK7*(Ts) 変異株では、DnaK タンパク質をつくり得ないために 30°C で生育できるが 42°C では生育できない³⁾。また高温では細胞の形態が異常になり、細胞分裂が不能になる⁴⁾。この変異株に見られる生物活性の喪失および形態の異常化からも、DnaK タンパク質の機能がストレス下の細胞に必須であることが理解される。

高等生物の細胞にも DnaK によく似た Hsp70 が見出されており、分子シャペロンとしての

機能が明らかになった。DnaK や Hsp70 は他の分子シャペロン (DnaJ, GrpE, GroEL, GroES) と共に、新生ペプチドの高次構造形成に関して次のように段階的にはたらく^{5,6)}。

(1) リボソームから翻訳されて伸張してくるペプチドに DnaK が結合し、このペプチドが不溶性の凝集塊になるのを防ぐ。

(2) ペプチドがさらに伸張してくると、2 個の DnaK が結合しペプチドが折り曲げられる。この時、ATP を消費して DnaK の一部が遊離する。

(3) こうして形成された DnaK/DnaJ/ペプチドの複合体が GrpE の結合によって、小容量に畳み込まれる。

(4) DnaK/DnaJ が GrpE の働きでこの複合体から放出され、代わりに GroEL/GroES が結合する。GrpE もリボソームと共に新生タンパク質から離れる。

(5) 新生タンパク質の高次構造が完成し活性のあるタンパク質分子なる。このタンパク質から GroEL/GroES が離れシャペロンの作用が終了する。(第 1 図参照)

このほか分子シャペロンはストレスによって変性したタンパク質がその疎水部を露出して、不溶性の凝集塊になるのを防いだり、タンパク質の会合 (assembly) や膜構造へのタンパク質の取り込み (protein transport) などをも介助する。

ここで生物と酸素の関係に注目すると、原始地球上で最初の生命が誕生した頃、地球を取りまく大気の組成は還元的であり酸素は殆ど存在しなかった。やがてラン藻などの光合成細菌の出現と普遍化によって酸素量が増加し、酸素呼吸が可能になった。この呼吸法によって生命活動を支えるエネルギーが効率よく獲得できるようになった。ピルビン酸やアセチル-CoA の酸化で基質を離れた電子は、電子伝達系に入り、NADH などのキャリアーを経て酸素に受け渡されて水を生ずる。この電子伝達にともなう酸化的リン酸化によって、高エネルギー化合物のアデノシン三リン酸 (ATP) が生成する。

このエネルギー生成系は、高等生物の細胞のミトコンドリアにあり、細菌細胞ではその細胞膜にある。酸素はこのようなエネルギー獲得に重要な役割を果たすが一方では、酸化活性の高い活性酸素 (O_2^- , H_2O_2 , $HO\cdot$, 1O_2) を生ずる危険性をもっている。酸素分子 (O_2) が電子 1 個を受取ると、スーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) になり、これにもう 1 個の電子が加わって過酸化水素 (H_2O_2) になる。このほかヒドロキシラジカル ($HO\cdot$)、一重項酸素分子 (1O_2) がある。上にのべた呼吸鎖から電子が逸脱してこれが酸素と結合すると、活性酸素を生ずる。活性酸素は生体物質を励起し、障害を与えたり、脂質に作用して有機ラジカルを生成したりする。その結果 DNA が攻撃されて、一本鎖切断を起こし生存や変異原性に大きな影響を受ける。最近酸化傾向に導くものに対して、酸化ストレスという言葉が使われるようになった。

分子シャペロン DnaK の役割

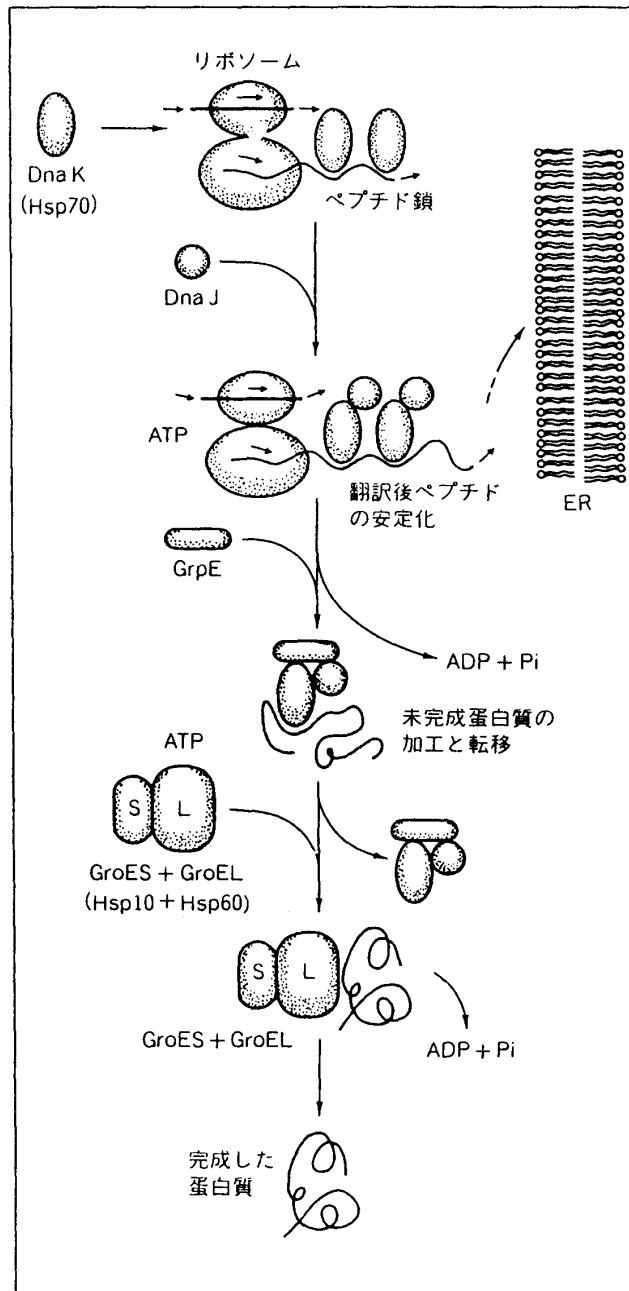


図1. 熱ショック蛋白質の一群の連続作用による高次構造の形成と膜透過⁵⁾

生物は酸化ストレスに対していくつもの防御機構をそなえている。すなわち種々の抗酸化酵素を始め分子シャペロンの誘導を行う。最近スーパーオキシドアニオンラジカルが生成すると、このラジカルを過酸化水素に変える反応の酵素スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)の誘

導を起すことが明らかになった⁷⁾。

本実験では、分子シャペロン DnaK タンパク質が膜の構造形成に果たす役割をしらべるために、大腸菌野生型および *dnaK* 変異型細胞を用いてスーパーオキシドディスムターゼ活性を測定し、 O_2^- の生成レベルを比較検討した。

2. 実験方法

用いた菌株は大腸菌 K-12 株の野生型 WK41 および *dnaK7*(Ts) 変異をもつ高温感受性の WK45 である⁸⁾。

培地は TPY 培地および NBA 培地⁹⁾を使用した。

スーパーオキシドディスムターゼの全活性はピロガロール自動酸化法¹⁰⁾により、MnSOD (含マンガンスーパーオキシドディスムターゼ)活性は、試料中の FeSOD (含鉄スーパーオキシドディスムターゼ)活性を過酸化水素処理で不活化したのちに同法で測定した。この測定のための試料は、細胞を 30°C で培養後 50ml を 46°, 48°, 49°, あるいは 52°C で 20 分間処理した後、超音波処理により菌を破碎し、遠心操作で得た上清を用いた。FeSOD 活性は全 SOD 活性から MnSOD 活性を差し引いて求めた。

3. 結果と考察

大腸菌 WK41 株および WK45 株を 30°C で培養後 46°, 48°, 49°, 52°C で 20 分間加熱し、それぞれ処理細胞から試料を調製した。各試料の全 SOD 活性および MnSOD 活性を測定した結果を表 1 に示す。この結果を図に示すと図 2 のようになる。

野生型の WK41 および *dnaK* 変異株はいずれも高温 (46°C 以上) では、30°C における MnSOD 活性を上廻っており、熱ショックによって誘導が起こっている。両株の間で MnSOD 活性を比較すると、すべての温度で変異株の MnSOD 活性が高く、とくに 46°C では 2 倍の活性値が得られた。

以上の結果を考察すると、*dnaK* 変異株の WK45 の MnSOD 活性が野生株より高い値を示す理由としては、膜からの電子の漏出がより多いため、スーパーオキシドアニオンラジカルがより多く生じて MnSOD が多く誘導されるのではないかと考えられる。

分子シャペロン DnaK の役割

表 1. 大腸菌 WK41 および WK45 の SOD 活性⁹⁾

温度(°C)	WK41		WK45	
	全 SOD	MnSOD	全 SOD	MnSOD
30	15.0	10.4	23.4	19.0
46	15.5	10.0	26.2	22.4
48	17.5	12.6	26.4	23.6
49	19.0	14.3	26.5	22.9
52	15.4	10.3	22.0	18.1

SOD 活性はピロガロール自動酸化法を用いて測定した。
活性値は 1 ミリグラムタンパク質当りの SOD 活性を示す。

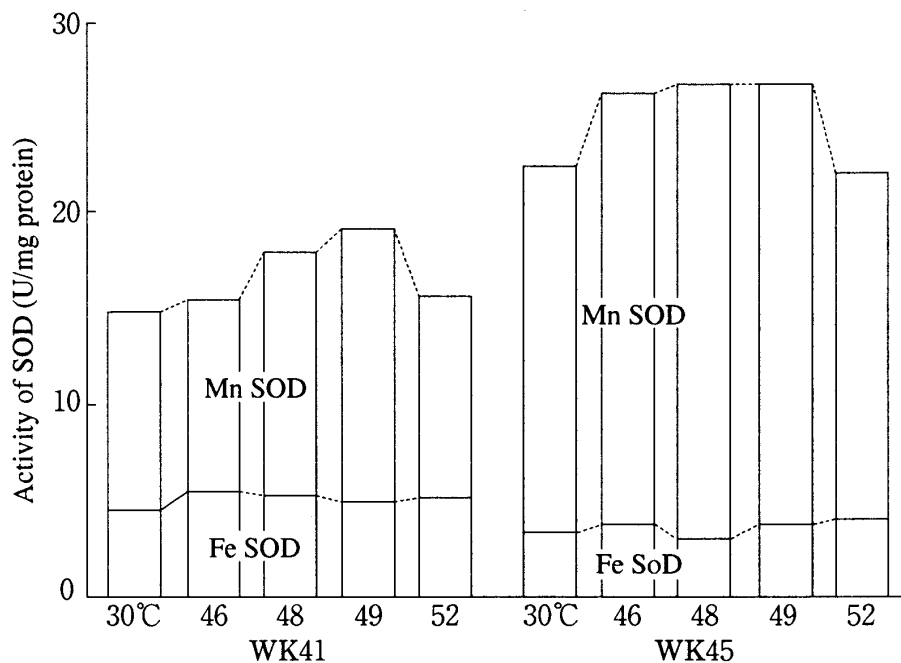


図 2. 大腸菌 WK41 株(野生型)および WK45 株(*dnaK* 変異型)の細胞内の SOD 活性。
FeSOD 活性は全 SOD 活性値から MnSOD 活性値を差し引いて求めた。縦軸はタンパク質 1 mg あたりの SOD 活性単位を示す。

4. 要約

熱ショックによって誘導される大腸菌のストレスタンパク質の DnaK は、分子シャペロンとして機能する。分子シャペロン機能には、細胞膜へのタンパク質輸送を介助して、膜構造を完成させる働きが含まれている。では、*dnaK* 変異株の細胞膜は野生型のそれとは異なる性状

を示すのであろうか。膜内にある電子伝達系からの電子の漏出が野生型より多ければ生ずる O_2^- も多くなり、誘導される SOD 活性が野生型の SOD 活性を上廻るはずである。本実験で得られた結果は MnSOD 活性に関して、この予想が裏づけられた。

すなわち、DnaK タンパク質を欠除した細胞が高温で高い MnSOD 活性を示すのは、膜から電子が漏出しやすいためであり、この漏出の原因は DnaK 欠除の影響が膜の構造形成および構造維持能力に及んでいるためと考えられる。

5. 謝辞

本論文を作成するにあたり、御協力頂いた東京都立大学理学部生物学教室の駒野照弥教授に深く感謝申し上げます。

6. 引用文献

1. 中井彰, 永田和宏『蛋白質 核酸 酵素』39, 793-807(1994)
2. Hendrick, J.P., Hartl, F.U. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 349-384(1993)
3. 市川比良久, 川村学園女子大学研究紀要 第4巻第2号, 221-229(1993)
4. 市川比良久, 川村学園女子大学研究紀要 第5巻第2号, 195-203(1994)
5. 香川靖雄, 太田敏子『蛋白質 核酸 酵素』39, 808-817(1994)
6. 香川靖雄, 『細胞工学』13, 169-175(1994)
7. 坂内四郎, 『蛋白質 核酸 酵素』39, 860-865(1994)
8. Itikawa, H., Fujita, H., Wada, M. *J. Biochem.* 99, 1719-1724(1986)
9. Taniguchi, H., Tokida, T., Fujita, H., Itikawa, H. *Mol. Gen. Genet.* 217, 317-323(1989)
10. Markland, S., Markland, G. *Eur. J. Biochem.* 47, 469-474 (1974)