

ストレス蛋白質 DnaK の役割

市 川 比 良 久

Cellular Role of a Stress Protein DnaK

Hiraku ITIKAWA

1. 緒言

私たち人間を取り巻く外部環境にはさまざまな要因があって、それらが私たち人間の生理機能や精神活動に種々の影響を与えている。これらの要因には、光、温度、水分、酸素、炭酸ガス、土壌、空気などの物理的要因および化学的要因があり、さらにウイルスや他の生物に由来する生物的要因が存在する。

最近、地球上では人的活動の急激な増加によって、オゾン層の破壊、大気中の炭酸ガス量の増加、あるいは森林の減少にともなう砂漠化の進行など広範囲の変化が増加している。その結果、人類および他の生物の生存に大きな影響を与える要因が蓄積しつつある。

これらの要因の中には、私たちに有害な作用をおよぼすものがある。たとえば、細菌の感染や疲労・飢えなどのような生物的なもの、寒冷や洪水などのような物理的なもの、薬品のような化学的なもの、抑圧や焦燥などのような精神的なもの、騒音や過密などのような社会的なものなどである。

私たちはこのような傷害をおこす作用因子のはたらきを受けたときに、生体防衛あるいは適応反応を起こして傷害を防ぎ、機能を正常に維持しようとする能力をもっている。1936年、セリエ博士は、種々の作用因子のはたらきを受けて生じた傷害と、このとき起った防衛的適応反応の両方を合わせて「ストレス」と呼んだ。これが現在、日常的に使われているストレスの語源である。ともすると、ストレスは刺激そのものを指すようにとられがちであるが、本来のセリエ博士のいうストレスとは、体外から加えられた各種の刺激に応じて体内に生じた、傷害と防衛の反応の総和を意味している。もう一言説明を加えるとすれば、刺激によって生ずる傷害が過度になり、防衛的適応反応による修復や機能保持が不可能となったときは、ストレス病が

発病するか、または死が起こるのである。

過去30億年に及ぶ生物の進化の過程で、有害な要因あるいは刺激に対する防衛的適応反応が遺伝的機能の重要なものとして、生物の遺伝情報の中に組み込まれ、受けつがれてきた。次に述べるように、バクテリアの細胞および高等動植物さらには私たち人間にまで見出されている熱ショック応答機構はその例といえよう。

1962年に Ritossa¹⁾ によって発見された熱ショック応答(Heat shock response)については、大腸菌細胞をはじめ種々の生物で、分子遺伝学的にまた生化学的に研究が詳しく進められている。いま、対数増殖期(活発に細胞分裂をくり返して増殖中)の大腸菌細胞集団の培養温度を30°Cから42°Cに上げて、熱ショック(熱の刺激)を与えたときに細胞が起こす変化を観察してみる。熱ショックのあと、5分から10分後に遺伝的な熱ショック応答が起こることによって、約20種類の熱ショックタンパク質が合成される²⁾。これらの熱ショックタンパク質は、熱の刺激によって生ずる障害を防ぐ一方で、生じた異常をもとの正常な状態にもどすはたらきをする。それ以上刺激の量が増加せず、修復が進行すれば、やがて細胞は定常状態に復帰し、熱ショックタンパク質の合成も止まる。

このように、熱の作用で生ずる傷害に対して、細胞内では遺伝的にそなわった熱ショック応答がはたらいて、熱ショックタンパク質という1種のストレスタンパク質を生成して、ストレス状態を組み立てるのである。約20種類の大腸菌の熱ショックタンパク質の中に、*dnaK* 遺伝子からつくられる分子量69,000ダルトン(69kDa)のDnaKタンパク質がある。高等生物にはこのDnaKによく似た熱ショックタンパク質(Hsp70)が人間に至るまで広く見出されており、生物にとって、本質的に重要なタンパク質ではないかと注目されている³⁾。私たちは、大腸菌の*dnaK* 遺伝子に突然変異 *dnaK7*(Ts)を実験的に起こさせる事に成功した⁴⁾。

本研究では、このDnaKタンパク質が細胞の増殖にどのような役割をもつかを *dnaK7*(Ts)変異株を用いてしらべた。まず濁度測定にもとづく細胞の増殖を30°Cおよび43°Cでしらべ、ついで光学顕微鏡によって、細胞を観察し、顕微鏡写真を検討することによって、*dnaK* 変異の影響をしらべた。その結果、*dnaK* 変異によって、細胞の増殖および細胞の形態が顕著に影響を受けることが明らかになった。

2. 実験方法

本実験に用いた大腸菌の系統を表1に示す。

表1. 実験に使用した大腸菌株⁴⁾

株名	遺伝子型	種類
H/r30RT	<i>thy argF</i>	<i>E. coli</i> B 野生型
MT112	<i>thy argF dnaK7</i>	H/r30RT 由来
MT114	<i>thy argF ilv dnaK7</i>	MT112 由来
MT116	<i>thy ilv leu dnaK7</i>	MT114 由来

大腸菌細胞をLB培地⁴⁾で培養した。30°Cで1夜培養したのちに、新鮮なLB培地に一部を移し、30°Cで通気培養を行いつつ、濁度(OD660)および生菌数を測定した。80分間後、すでに対数増殖期に入った細胞を43°Cに移し、さらに通気培養を行いながら、OD660および生菌数測定を行った。培養の一部を1%ホルマリンで固定し、細胞の観察に用いた。顕微鏡観察は400倍の倍率で位相差装置付光学顕微鏡(ニコン位相差装置付双眼顕微鏡)を用いて行った。観察を行いつつ、顕微鏡写真撮影を行った(フジネオパンFフィルムを使用)。

生菌数測定は、培養の一部を適した希釈ののちに、普通寒天培地⁴⁾上に塗布し1夜30°Cで培養した。培養後生じたコロニーを計数し、生菌数を求めた。培養液の濁度(OD660)は光電光度計(日立FPO-3)を用いて測定した。顕微鏡写真の作成は通常の方法に従った。マイクロメーターの顕微鏡写真を作成し、最終倍率を求めた。

3. 結果と考察

(1) 大腸菌 *dnaK7* 変異株 MT112 の培養を始めるのに先立って、野生株 H/r30RT の培養と同じ濁度(0.05)にそろえた。濁度によって増殖の推移をしらべた結果、図1A のようになった。30°C では、H/r30RT と MT112 の増殖曲線は、近似した曲線を示した。43°C では、野生型はそのまま増殖を続けるのに対して、変異株ではやがて増殖を停止する。生菌数の増加をしらべた結果を図1B に示す。30°C で野生株の培養の濁度に等しい濁度でありながら、変異株の生菌数は野生株のその約1/2という値が示された。増殖速度は両株とも同じ傾きを示している。この事から、30°C において、*dnaK* 変異は細胞の大きさに影響を与えるが、細胞の増殖速度

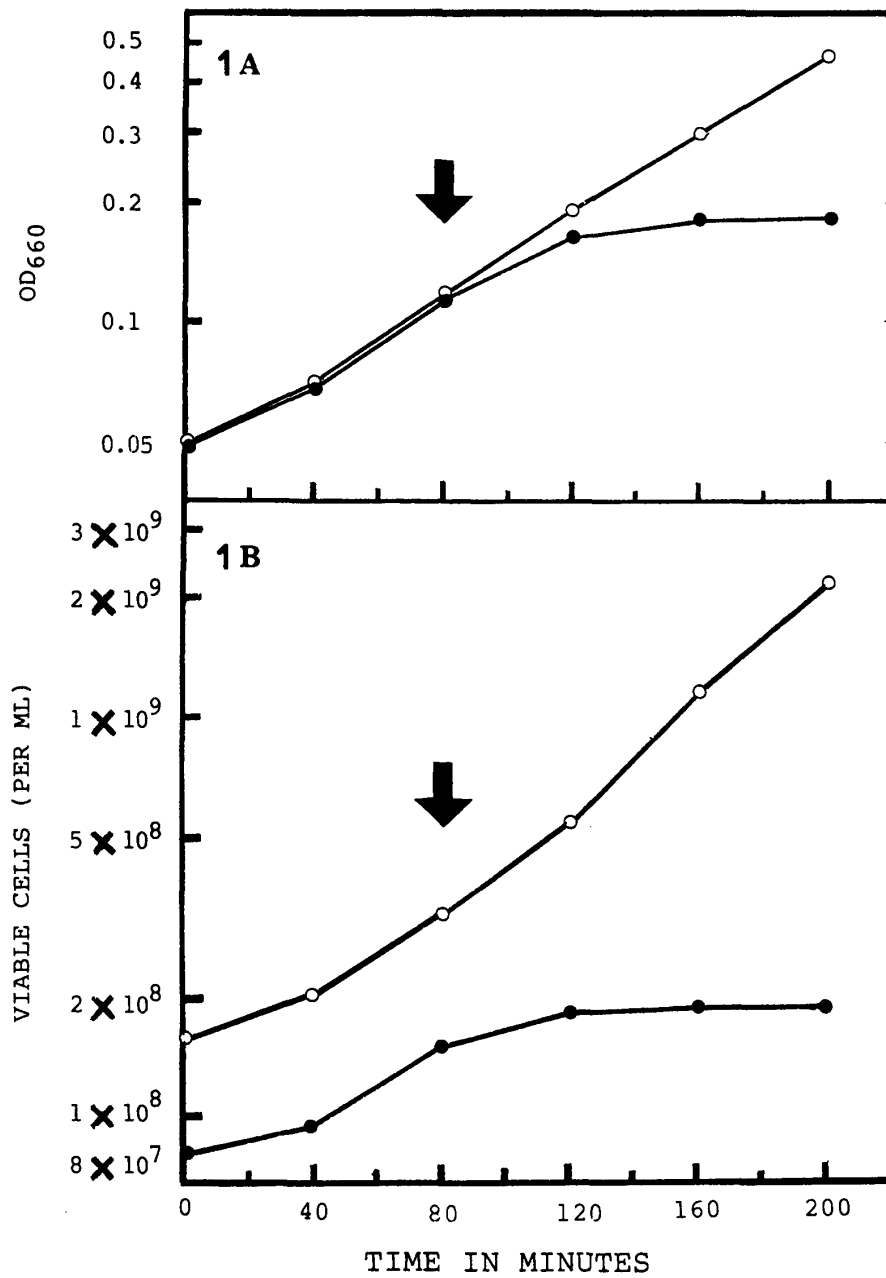


図1. 大腸菌野生株 H/r30RT および変異株 MT112の30°C および43°C における増殖曲線。
 両株の LB 前培養を希釈し、OD₆₆₀を0.05にそろえ(0分)、30°C で通気培養を行った。80分
 後(矢印)に温度を43°C に上げ、さらに120分間培養した。この間両培養の濁度(OD₆₆₀)を測定
 し図1A に結果を示す。縦軸は OD₆₆₀の $-\log T$ の値を、横軸は時間(分)を示す。
 ○—○— H/r30RT : ●—●— MT112
 上記の培養から経時的に試料を採取し、生菌数測定を行った。その結果を図1B に示す。縦
 軸は培養1 ml 当り生菌数を、横軸は培養経過時間(分)を示す。
 ○—○— H/r30RT : ●—●— MT112

には影響しないことがわかった。一方、43°Cでは、野生型の生菌数が対数的に増加するのに対して、変異株では、温度が43°Cに上げられた後の生菌数増加は、約30%に止まった。

(2) 大腸菌 *dnaK* 7(Ts)変異が細胞形態に及ぼす影響についてしらべた。野生型 H/r30RT および変異型 MT112をそれぞれ、30°Cで80分間培養したときの細胞形態およびその後30°Cから43°Cに移して、60分間培養した時の細胞の観察を行った。その結果を図2に示す。30°C 80分間の培養後、野生型の細胞は直径約1 μm、長さ2~3 μmの標準の大きさを示している(図2A)のに対して、変異型細胞では直径が正常型よりやや大きく、長さも4~5 μmのものが見られた(図2B)。この事は、*dnaK* 7(Ts)変異が30°Cにおいて、細胞の大きさに影響することを示しており、図1Bの結果を裏づけるものといえよう。

30°Cから43°Cに温度を上げて60分間経過した場合、野生型細胞の形態にはとくに変化が見られなかった(図2C)。一方、変異型細胞では熱ショックの影響があらわれ、細胞の形状は著しく変化しているのが認められた。図2Dに見られるように、8 μmの長さに達するものや細胞内に顆粒状構造が見られるものなどが出現した。

43°Cで120分間培養した場合の結果を図3に示す。野生型の H/r30RT 細胞は通常の形・大きさを保っており、やや小型の細胞が多く存在するのが見られた(図3A)。一方、変異型の MT112細胞は、図2Dに見られた変化がさらに顕著になり、弯曲化や細胞の密度低下により、形のみを保っている細胞が多く出現した(図3B)。

変異型細胞によって示されるこのような変化が遺伝的な *dnaK* 7(Ts)変異に基づくことを確認するために、この変異を有する他の2系統 MT114および MT116を用いて、同様の実験を行った。30°C、80分間に続いて43°C 120分間培養を行った MT114の細胞を図3Cで、また MT116のそれを図3Dに示す。両株とも MT112細胞と同様の変化を示すのが認められた。したがって、大腸菌が高温で細胞増殖を停止し、異常な形態を示す理由は *dnaK* 7(Ts)による事がわかった。この *dnaK* 変異はナンセンス突然変異であることがすでに明らかである⁵⁾。したがって、この変異細胞では、不完全な DnaK タンパク質が合成される^{5, 6)}。

DnaK タンパク質の分子的機能に関しては、現在多くの研究室で実験が進められている。DnaK タンパク質によく似ている Hsp70の研究成果から類推すると DnaK にも分子シャペロンとしての役割が考えられる^{7, 8)}。すなわち、細胞内では、複雑で重要な機能を発揮する高次構造体が多種類のタンパク質の会合によって形成される。分子シャペロンは、このような高次構造体が正確につくられるように介添役をするタンパク質である。熱ショックが細胞に与えられた時に、細胞内では代謝などの機能的な高まりが生じ、高次構造体の需要が増加するであろうし、既成の高次構造体が熱の作用で変性したり、失活するであろう。細胞は正常な状態を維

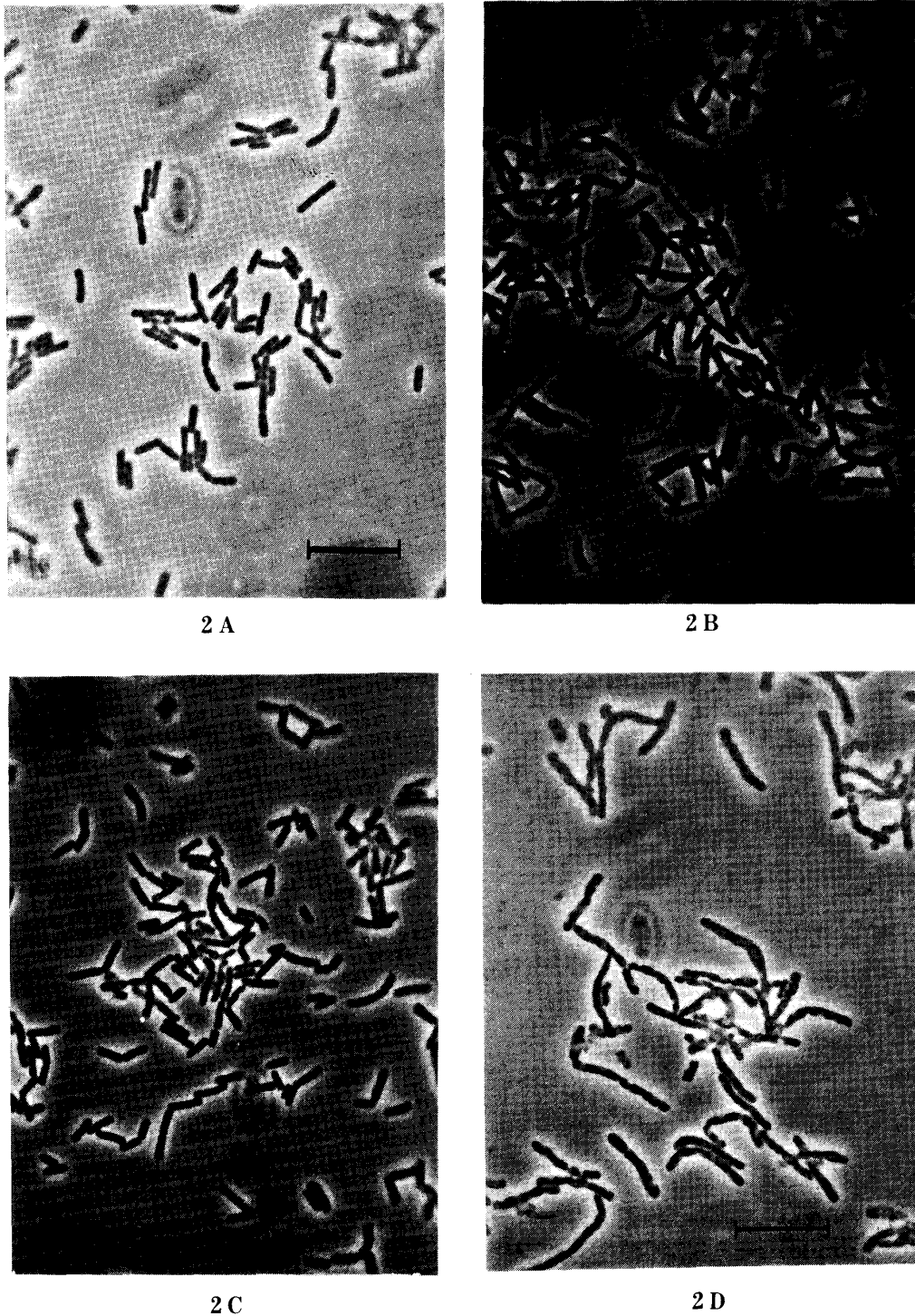
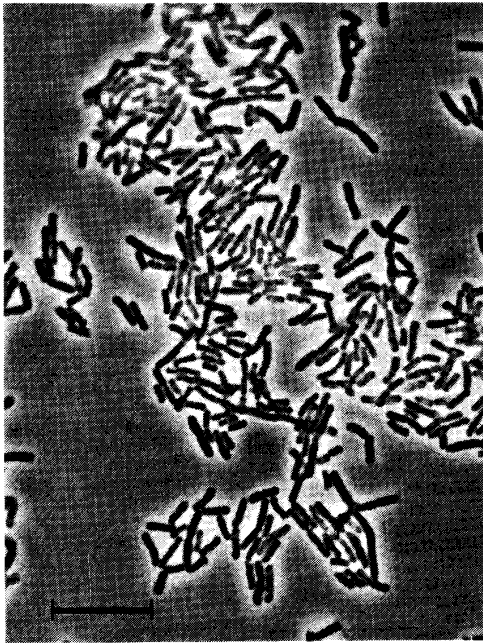


図 2. 大腸菌野生株 H/r30RT および変異株 MT112 の細胞の光学顕微鏡写真。
LB 培地中で、30°C、80 分間培養後の H/r30RT 株の細胞 (2A)、および MT112 株の細胞 (2B) を示す。引き続き温度を 43°C に上げ、60 分間培養を行ったときの H/r30RT の細胞 (2C)、および MT112 の細胞 (2D) を示す。写真中の横の線は 10 μ m の長さに相当する。

ストレス蛋白質 DnaK の役割



3 A



3 B



3 C



3 D

図 3. 大腸菌野生株 H/r30RT および *dnaK* 変異株 3 株の細胞の光学顕微鏡写真。
LB 培地中で、30°C、80分間培養後、引き続き43°Cで120分間培養を行ったときの H/r30RT
の細胞(3A)、MT112の細胞(3B)、MT114の細胞(3C)、および MT116の細胞(3D)を示す。写
真中の横の線は10 μ m に相当する。

持するために、多量のシヤペロンを確保せねばならず、熱ショック応答を起こして DnaK を含む熱ショックタンパクを合成するのである。熱ショックタンパク質が細胞内でストレスタンパク質として果たす役割が正確に把握されるためには、国の内外の今後の研究成果が期待されるのである。

4. 要約

大腸菌細胞が熱ショックを受けた時に合成するストレスタンパク質の1種、DnaK タンパク質に注目し、その役割をしらべた。すでに高温感受性の *dnaK* 7(Ts) 突然変異株が分離されているので、この変異株を用いて実験を行った。野生型および変異型細胞を30°Cで培養後、43°Cで培養を続けながら増殖曲線を測定した。同時に細胞の形状を光学顕微鏡で観察し、顕微鏡写真を作製した。細胞の大きさ、形態の変化を詳細に検討した結果、DnaK タンパク質の欠損によって、細胞増殖が43°Cで阻害され、細胞が伸長するのみでなく弯曲するなどの異常が明らかに観察された。また細胞内密度の変化も顕著に見られた。変異型細胞が熱ショックを受けた時に、細胞内部にさまざまな代謝障害が生じ、これらを消去するのに必要な DnaK を欠除しているためにこのような異常が生じたのではないかと思われた。

DnaK タンパク質の分子的機能に関しては、類似の Hsp70 の研究成果から、分子シヤペロンとしての役割が推定されている。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、御協力頂いた東京都立大学理学部生物学教室の西岡泰三教授に深く感謝申し上げます。

6. 引用文献

1. Ritossa, F. *Experientia* 18, 571–573 (1962)
2. Neidhardt, F.C., VanBogelen, R.A. and Vaughn, V. *Annu. Rev. Genet.* 18, 295–329 (1984)
3. Bardwell, J.C.A. and Craig, E.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 848–852 (1984)
4. Itikawa, H. and Ryu, J.-I. *J. Bacteriol.* 138, 339–344 (1979)
5. Miyazaki, T., Tanaka, S., Fujita, H. and Itikawa, H. *J. Bacteriol.* 174, 3715–3722 (1992)

ストレス蛋白質 DnaK の役割

6. Itikawa, H., Mishina, Y., Wada, M. and Fujita, H. *Japan. J. Genet.* 67, 17-27 (1992)
7. Ellis, J. *Nature* 328, 378-379 (1987)
8. 市川 比良久, 本紀要 4 (2), 221-229 (1993)