

カイコシャペロンホモログの機能解析と そのタンパク質発現系への応用

山下 隼^{1),3)}・洪 善美²⁾・李 在萬²⁾・河口 豊²⁾・日下部宜宏^{2),*}

¹⁾九州大学大学院生物資源環境科学府, ²⁾九州大学大学院農学研究院, ³⁾日本学術振興会

はじめに

ポストゲノムと呼ばれる時代の中、近年、カイコのゲノム情報が発達し、カイコはショウジョウバエと並んで、アジアを中心に代表的なモデル昆虫として研究材料となっている。モデル昆虫としてのカイコは、蚕糸業の発展という歴史的な研究背景を有し、品種改良された系統や突然変異系統などが多く保存されているなどの利点がある。現在では、再びカイコを用いた産業として、カイコに感染するバキュロウイルスを用いた、カイコバキュロウイルス組換えタンパク質発現系(カイコ-BES)が注目を集めている。筆者らは、カイコ-BESに最も適したカイコ系統を見つけるため、約450種類の突然変異系統の中から、ウイルス高感受性系統を同定した(KAWAKAMI et al., 2008)。さらに、シャペロンという遺伝子の機能解析を行ってきており(MIYAGAWA et al., 2005; YAMASHITA et al., 2007)、それをカイコ-BESの改良に応用していく研究も進めている。今回は、カイコシャペロンホモログの現在までの研究概要を、カイコ-BESへの改良を目的とした背景と共に述べていきたい。

バキュロウイルスは核多角病ウイルス属に含まれ、感受性昆虫が感染すると、その細胞内の全タンパク質の30~40%が多角体タンパク質になる。そのような現象を起こす原因は、ウイルスゲノムに含まれ感染末期に発現する、多角体をコードする強力なプロモーターにある。カイコ-BESは、このプロモーターを用いることによって、目的の組換えタンパク質を大量に発現させることを可能にしている。しかしながら、目的のタンパク質を大量に発現させることができる反面、それらが凝集してしまうことも少なくない。筆者らはその原因として、翻訳途中の新生ポリペプチド鎖や、翻訳後の不完全な立体構造のタンパク質等が、同時期に大量に存在するために、それらが絡まり合っただけで凝集してしまうと考えている。この問題を解決するために筆者らが注目したのは、生体内でタンパク質が凝集しないようにタンパク質の品質管理を行っていることで知られる、シャペロンと呼ばれる遺伝子群である。

シャペロンとは「未熟な状態のタンパク質に一時的に結合し、成熟するのを介添えする世話役タンパク質」と定義づけられている遺伝子群で、タンパク質をフォールディングする機能をもつことで知られている。シャペロンは酵母からヒトま

で広く保存され、通常の状態でも生体に必須なタンパク質のフォールディングに寄与しており、生物によっては欠損すると死に至る。シャペロンのほとんどがHsp(Heat shock protein)で、Hspは生物が熱ストレスに瀕すると発現が誘導され、タンパク質の凝集を防ぐように機能する。筆者らは、このHspの中でもHsp90というシャペロンを中心に機能解析を行ってきた。「シャペロンのもつタンパク質のフォールディング機能」を利用しての、カイコ-BESを改良する研究については後述するが、まず、カイコHsp90(BmHsp90)の研究の経緯から詳細に論ずる。

1. BmAha1の機能解析

筆者らのシャペロンの研究は、BmAha1(Activator of Hsp90 ATPase)の機能解析から発していた(MIYAGAWA et al., 2005)。BmAHA1はディフアレンシャルディスプレイ法によって、カイコ5齢3日目の幼虫の精巢で強く発現する遺伝子として同定された。当時、BmAHA1はシャペロンとは知られておらず、精巢特異的な遺伝子として解析を進めていた。精巢における発現解析の結果、BmAHA1のmRNAの発現量は5齢3日目で高く、その後減少することが明らかとなった。しかし、タンパク質レベルで発現解析を行うと、タンパク質はmRNA発現パターンよりも数日遅れたパターンを示した。このことは翻訳が遅れて起こることを示しており、この特徴は精子形成に関連する遺伝子において多く見られていた。また、精子が形成される減数分裂の各ステージ間で発現量が異なり、精子形成初期に高く、後期にはほとんど見られなかった。さらに、鱗翅目昆虫に特徴的な有核精子と無核精子という2種類の精子において、異なる発現パターンを示していた(Fig. 1)。このように、BmAha1の発現量は詳細に制御されており、その中でも発現量の高い精子形成過程の初期においては、何か重要な役割を担っていると考えられた。

BmAHA1は精子形成に関わる因子として推測されたが、実は、AHA1は酵母で最初に単離されており、名称の通りHsp90のATP加水分解のアクチベーターで、シャペロンの補助因子に位置するコシャペロンとして同定されていた(PANARETOU et al., 2002; LOTS et al., 2003)。つまり、BmHsp90の制御因子であるBmAha1という1つのコシャペロンの発現が、精子形成過程において詳細に制御される

*〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

Tel, Fax: 092-642-2842

E-mail: kusakabe@agr.kyushu-u.ac.jp

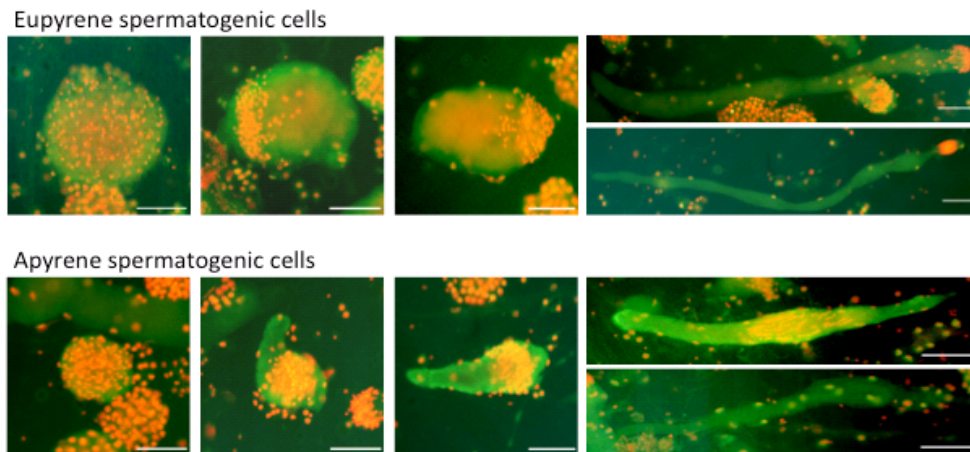


Fig. 1. Localization of BmAha1 in the eupyrene and apyrenespermatogenic cells at different developmental stages (Green: BmAha1, Red: Nucleus).

ということであった。これを受けて筆者らは、カイコ生体内においてコシャペロンが BmHsp90 を介してどのような役割をもつのかを、BmHsp90 の役割と共に明らかにするため、BmHsp90 の研究を進めていった。

2. 哺乳類 MAPK に対する BmHsp90 の機能解析

Hsp90 とは、ターゲットの非常に多いシャペロンとして知られており、また Hsp90 のコシャペロンも Aha1 の他に Cdc37 (Cell division cycle 37), Fkbp51 および 52 (FK506 binding protein 51, 52), Cyp40 (Cyclophilin 40), Hop (Hsc70/Hsp90 organizing protein), p23 (23kDa protein) と多く存在する (<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>)。これらの一部は Hsp90 の ATP 結合状態を制御し、Hsp90 がコンフォメーションを変化させることに貢献している (PEARL and PRODROMOU, 2006)。ターゲットの 1 つであるステロイドホルモン受容体の Glucocorticoid receptor (GR) については、Hsp90 を中心に Hop, Fkbp51 および 52, Cyp40, p23 が段階的に相互作用することによって Hsp90 の ATPase が進行し、これによって GR が転写活性因子としての機能を成熟させることが明らかとなっている (GRAD and PICARD, 2007)。また、Mitogen activated protein kinase (MAPK) の中には、Hsp90-Cdc37 と複合体を形成し、自らの安定性を Hsp90 に依存しているものがある (MIYATA and NISHIDA, 2001)。筆者らはまず、BmHsp90 のターゲットを安定化する機能を解析するために、マウス MAPK の 1 つで、Hsp90 に安定性を依存している MsMok を用いて研究を行った。

MsMok をカイコ培養細胞で発現させると、安定に発現し可溶化した。しかしながら、Hsp90 阻害剤である Geldanamycin (GA) 処理を行うと、発現量は数時間で減少した。このことから、MsMok の安

定化は BmHsp90 が担っていたと考えられ、免疫沈降によっても MsMok と内在性 BmHsp90 が相互作用していることが確かめられた。Mok は Hsp90 と複合体を形成し、コシャペロン Cdc37 もその中に含まれる (MIYATA and NISHIDA, 2001)。そこで、BmCdc37 について機能解析を行った。BmCdc37 は内在性 BmHsp90 と相互作用し、これは BmAha1 についても同様であった (Fig. 2) (YAMASHITA et al., 2007)。しかしながら、BmCdc37 と MsMok の相互作用は確認できなかった。MsMok の Hsp90 コシャペロンとの結合は特異的で、Fkbp52, Hop とも相互作用しないことが確かめられている (MIYATA and NISHIDA, 2001)。BmCdc37 とヒト Cdc37 のアミノ酸配列の相同性については、MAPK と結合に必須なリン酸化部位である 13 番目のセリンは保存されているものの、Identity は全体で 47%、N 末端のキナーゼ結合ドメインのみで比べても 53% と高くない。哺乳類 MAPK-Cdc37 の結合が種特異的であるなら、BmCdc37 とは相互作用しない可能性も推測された。

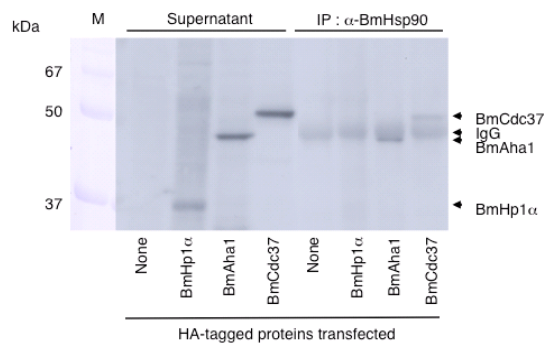


Fig. 2. Interactions of BmHsp90 with BmCdc37 in BmN4 cells (IP: α -BmHsp90, W. B.: α -HA).

MsMok を用いた実験結果より、BmHsp90 が哺乳類 MAPK を安定化することが明らかとなった。また、BmHsp90 とコシャペロンが相互作用することも明らかとなった。しかし、コシャペロンが BmHsp90 のターゲットに及ぼす影響は不明なままであった。そこで、内在性の遺伝子を用いて、BmHsp90 のコシャペロンの機能解析を行った。

3. 内在性ホルモンレセプターに対する BmHsp90 の機能解析

内在性の遺伝子として、昆虫で広く保存されている EcR (Ecdysone receptor) を用いた。EcR は USP (Ultraspiracle) と EcR/USP ヘテロダイマーを形成し、変態ホルモンであるエクダイソンと結合して核に移行、転写を活性化するホルモンレセプターである (KOELLE et al., 1991; KOELLE, 1992; YAO et al., 1992; YAO et al., 1993; THOMAS et al., 1993; ARBEITMAN, 1998)。内在性遺伝子として BmEcR を選んだ理由は、ショウジョウバエ EcR の DNA 結合能は Hsp90 とそのコシャペロン Fkbp51 および 52, Cyp40, Hop, p23 を必要とするという報告があるからであった (ARBEITMAN and HOGNESS, 2000)。そこで筆者らは、BmEcR の転写活性をモニターすることによって、BmHsp90 とそのコシャペロンの機能を検証した。

まず、カイコにおける Hsp90 のコシャペロンの保存性については、前述した 5 つのコシャペロンと相同性の高いものとして BmFkbp59, BmHop, Bmp23 が存在しており、筆者らはこれらを単離した。BmFkbp59 は Fkbp52 と最も相同性が高いもので、BmFkbp51 および BmCyp40 は保存されていないと推測された。免疫沈降の実験より、これらは BmHsp90 と相互作用することが明らかとなった。次に、BmEcR との相互作用について、免疫沈降によって BmHsp90 と BmEcR との相互作用が示され、さらにコシャペロンについては BmFkbp59 のみが相互作用した。BmFkbp59 は N 末端にホルモンレセプターと直接結合できる FK ドメインをもっており、これは哺乳類 Fkbp52 にも見られる特徴的なドメインであった。哺乳類においても、直接ホルモンレセプターと結合できるのは Hsp90 と Fkbp52 だけである。このことから、カイコにおいて、BmHsp90-Fkbp59-EcR というコンプレックスが形成されることが推測された。

最後に、EcR の転写活性をルシフェラーゼ活性によってモニターすることが可能なレポーターアッセイを用いて、シャペロンの EcR の転写活性に与える影響を調べた。実験には、エクダイソンのアゴニストとして知られる MurA とカイコ培養細胞を用いた。まず、Hsp90 阻害剤 GA 処理を行うと、EcR の転写活性の増加が抑えられた。次に、MurA 濃度を一定にして、BmHsp90, BmFkbp59, BmHop および Bmp23 をそれぞれ単独で過剰発現させたが、EcR の転写活性の増加は 2 倍弱程度で

あり、大幅な活性の上昇は見られなかった。また、それらを組み合わせた実験区においても同様の結果であった。しかし、MurA を低濃度から活性に必要な濃度まで、細かい濃度勾配にて転写活性を計ると、BmFkbp59 および Bmp23 を 2 つ同時に過剰発現した区では、コントロール区と比べて低濃度では活性が抑えられ、ある一定の濃度を超えると加率的に上昇する結果が得られた。これについて、生体内のエクダイソン濃度はカイコ生育ステージ間で厳密に制御されており、エクダイソンの濃度依存的に 2 つのコシャペロンが EcR の活性を制御しているとなると、これらがカイコの変態過程に何か影響を及ぼしている可能性が示唆された。なぜなら、EcR は変態に必要な遺伝子を多く発現しており、これらコシャペロンが EcR の発現制御を介して表現型に影響をもたらす可能性があるからであった。このレポーターアッセイ系は現在も解析中であり、今後カイコ生体に与える影響も検証していく予定である。

カイコ内在性ホルモンレセプターは BmEcR の他にも存在し、その中でよく研究が進んでいるもので BmFtz-F1 (Fushi-tarazu factor1) が知られている (UEDA and HIROSE, 1990)。Ftz-F1 の発現は、エクダイソンによって制御されており、変態の時期に特異的である (WOODARD et al., 1994)。筆者らが BmFtz-F1 を培養細胞内で発現させると、細胞質局在の EcR/USP とは異なって通常状態で核局在を示し、当初はシャペロンと相互作用しないと考えていた。しかしながら免疫沈降の実験において、BmHsp90 および BmFkbp59 と相互作用することが明らかとなり、細胞内の核か細胞質のどちらで細胞質シャペロンと複合体を形成するのか興味もたれた。これを示すために、蛍光 Insect-two-hybrid 法を用いて相互作用している場所を蛍光タンパク質 Venus で可視化すると、細胞全体が蛍光を示した。そこで BmFtz-F1 とシャペロンを共発現させ、シャペロンを免疫染色すると、シャペロンが核に移行していることが明らかとなった。このことは、細胞を核と細胞質のフラクションに分け、それらを用いてウエスタンブロット法を行っても確認された。哺乳類 SHR は、Hsp90 や Fkbp52 と結合した状態では転写を活性化することができないと考えられており (GRAD and PICARD, 2007)、カイコシャペロンが BmFtz-F1 と共に核移行することは、BmFtz-F1 の転写活性に対して負の制御を行っていると考えられた。現在は、カイコ生体内でも BmFtz-F1 が特異的に発現する変態時期において BmHsp90 が核移行を示すのか、解析する準備を進めている。

おわりに

これまで BmHsp90 とそのコシャペロンの研究を行い、哺乳類の知見と比較しながらカイコシャペ

ロン BmHsp90 の機能を議論してきた。BmHsp90 は、他生物と同様に、ターゲットの多いシャペロンであると推測され、ターゲットの安定化に貢献できる機能をもっていた。BmHsp90 を制御する補助因子コシャペロンも保存されており、その中でも BmFkbp59 はホルモンレセプター BmFtz-F1 と複合体を形成し、共に核移行することが明らかとなった。また BmFkbp59 は、カイコの変態に必要な遺伝子を発現する BmEcR の転写活性を制御する機能をもっており、おそらくこの機能は BmHsp90 を介したものであると推測された。このように、コシャペロンが BmHsp90 を制御することによって、生体に影響を及ぼす可能性が示唆され、BmAha1 の精子形成初期に重要な役割をもつ可能性も推測された。

カイコ-BES に利用するという観点からすれば、シャペロンにはまず、タンパク質の凝集を防ぐという機能が求められる。そういう機能面においては、熱ストレス誘導性の高い Hsp70 のカイコホモログが有効であると考えた。実際に筆者らは、BmHsp90 を含め BmHsp70 系 (BmHsp70, BmHsp40, BmHsc70-4, BmHop) の精製タンパク質を用いて、熱凝集したルシフェラーゼに対するリフォールディング活性を調べ、BmHsp70 系に高い活性を見出した。これらをゲノムに再導入したトランスジェニックカイコを用いた BES では、標準系統を用いたときと比べ、数倍の収量が期待できた (投稿準備中)。この結果から、カイコシャペロンによって、カイコ-BES の収量を改良できるということが明らかとなった。現在、この系統を用いて様々な組換えタンパク質を生産している。

BmHsp90 については、精製タンパク質を用いた実験より、ルシフェラーゼが熱によって凝集するのを防ぎ、その後リフォールディングされやすい状態にすることを示す結果を得た。そこで、BmHsp90 が BmHsp70 系と協調するのであれば、さらなるカイコ-BES の改良が期待できると考えられた。BmHsp90 をゲノムに再導入するトランスジェニックカイコを作製するかどうかの焦点は、BmHsp90 が BmHsp70 系と協調して機能するかということと、通常状態で細胞内タンパク質の約 1% を占める BmHsp90 が、カイコ-BES において既に十分な量であるかということである。これらを解明するためには、シャペロンと組換えタンパク質のモル比を、実際のカイコ-BES により近いモデルにて行う必要があり、今後も精製タンパク質を用いて詳細な研究を進めていかなければならない。

最後に、BmHsp90 の基礎研究において、共同研究として哺乳類 MAPK および EcR のレポーターアッセイ用のベクターを提供して下さった京都大学生命科学研究科 宮田愛彦助教、並びに東京大学分子生物学研究所 加藤茂明教授には、この場を借りて厚く御礼申し上げる。

文 献

- ARBEITMAN, M. N. (1998) Functional analysis of the *Drosophila melanogaster* ecdysone receptor. Ph. D. thesis, Stanford University, Stanford, CA.
- ARBEITMAN, M. N. and HOGNESS, D. S. (2000) Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell*, **101**, 67-77.
- CHEN, S., PRAPAPANICH, V., RIMERMAN, R. A., HONORE, B. and SMITH, D. F. (1996) Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins hsp90. *Mol. Endocrinol.*, **10**, 682-693.
- CHEN, S., SULLIVAN, W. P., TOFT, D. O. and SMITH, D. F. (1998) Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants. *Cell Stress & Chaperones*, **3**, 118-129.
- DITTMER, K. D., DEMADY, D. R., STANCATO, L. F., KRISHNA, P. and PRATT, W. B. (1997) Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21213-21220.
- GRAD, I. and PICARD, D. (2007) The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **275**, 2-12.
- KOELLE, M. R., TALBOT, W. S., SEGRAVES, W. A., BENDER, M. T., CHERBAS, P. and HOGNESS, D. S. (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*, **67**, 59-77.
- KOELLE, M. R. (1992) Molecular analysis of the *Drosophila* ecdysone receptor complex. Ph. D. thesis, Stanford University, Stanford, CA.
- LOTZ, G. P., LIN, H., HARST, A. and OBERMANN, W. M. (2003) Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. *J. Biol. Chem.*, **278**, 17228-17235.
- MIYAGAWA, Y., LEE, J.-M., MAEDA, T., KOGA, K., Kawaguchi, Y. and Kusakabe, T. (2005) Differential expression of a *Bombyx mori* AHA1 homologue during spermatogenesis. *Insect Mol. Biol.*, **14**, 245-253.
- MIYATA, Y., IKAWA, Y., SHIBUYA, M. and NISHIDA, E. (2001) Specific association of a set of molecular chaperones including HSP90 and Cdc37 with MOK, a member of the mitogen-activated protein kinase superfamily. *J. Biol. Chem.*, **276**, 21841-21848.
- PANARETOU, B., SILIGARDI, G., MEYER, P., MALONEY, A., SULLIVAN, J. K., SINGH, S., MILLSON, S. H., CLARKE, P. A., NAABY-HANSEN, S., STEIN, R., CRAMER, R., MOLLA-POUR, M., WORKMAN, P., PIPER, P. W., PEARL, L. H. and PRODROMOU, C. (2002) Activation of the ATPase activity of Hsp90 by the stress-regulated cochaperone

- Ahal. *Mol. Cell*, **10**, 1307-1318.
- PEARL, L. H. and PRODROMOU, C. (2006) Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 271-294.
- THOMAS, H. E., STUNNENBERG, H. G. and STEWART, A. F. (1993) Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature*, **362**, 471-475.
- YAMASHITA, J., MIYAGAWA, Y., SUGAHARA, R., MON, H., MITSUNOBU, H., Lee, J.-M., KAWAGUCHI, Y., KOGA, K., KUSAKABE, T., (2007) Molecular cloning of silkworm Cdc37 and its interaction with Hsp90 chaperone. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **75**, 141-145.
- YAO, T. P., SEGRAVES, W. A., ORO, A. E., MCKEOWN, M. and EVANS, R. M. (1992) *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, **71**, 63-72.
- YAO, T. P., FORMAN, B. M., JIANG, Z., CHERBAS, L., CHEN, J. D., MCKEOWN, M., CHERBAS, P. and EVANS, R. M. (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and ultraspiracle genes. *Nature*, **366**, 476-479.
- WOODARD, C. T., BAEHRECKE, E. H. and THUMMEL, C. S. (1994) A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell*, **79**, 607-615.