

9527 塩ストレスによって誘導される新しいストレスタンパク質(HSP66)の生理的役割と発現調節機構

助成研究者：室伏きみ子（お茶の水女子大学 理学部）

耐塩性を獲得している植物では、種々の生理的な変化が起こることが知られているが、生体内にその生理的变化を誘導するメカニズムについては、まだほとんど分かっていないのが現状である。我々は、塩ストレスに対する細胞の応答を研究することによって、単純化した系で、耐塩性獲得のメカニズムに迫ることができると考え、下等な植物である真性粘菌 *Physarum polycephalum* の単相体ミクソアメーバをモデル系として、それが塩ストレスに対してどのような防御反応を示すか、そして、その反応がどのような分子的機序によるものであるかについての検討を行った。

Physarum のミクソアメーバは、塩ストレスに曝されると、擬足を失って円盤状の細胞へと変化した後、細胞壁の合成を行って休眠型の細胞であるマイクロシストへと分化する。この細胞分化に伴って、ミクソアメーバ中の主要な骨格タンパク質であるアクチン繊維の再構成が引き起こされた。ミクソアメーバ中で、アクチン繊維は、細胞全体に分布し、特に擬足付近にマイクロスパイクが観察されたが、細胞が円盤状に変化すると、太く短い束構造に変化した。そして、それと並行して、数種類のタンパク質の合成誘導が観察されたが、特に 66k の分子量を持つタンパク質、p66 の合成誘導が著しく、円盤状細胞の出現と共に一過的に合成が起こることが示された。p66 の合成誘導は、単相体のミクソアメーバ期のみ認められ、複相の変形体では起こらなかった。このことは、核相の異なる各ステージにおいて、p66 の発現が調節されていることを示している。

二重染色の結果から、p66 は細胞内でアクチン繊維と結合して存在することが確かめられ、また、*in vitro* で、p66 がアクチンと共沈澱することも示された。p66 はアクチン調節タンパク質の一員であると考えられよう。また、p66 は ATP と結合活性をもち、他の既知のストレスタンパク質、HSP70 や HSP90 と免疫学的な相同性は見られなかった。

p66 の構造とその発現調節機構を知るために、p66-cDNA のクローニングを行い、その塩基配列を決定したところ、これがこれまでに知られていない新しいタンパク質であることが明らかになった。p66 の遺伝子構造と発現調節機構を解明するために、現在、上流領域を含んだ遺伝子 DNA の分離とその塩基配列決定を進めている。

さらに、p66 の精製過程で、常に p66 と挙動を共にしているタンパク質、p42 を見出し、免疫沈降実験によって、それらが *in vivo* で相互作用している可能性を示唆した。

今後、p66 と p42 の遺伝子構造とその発現機構を明らかにし、アクチン繊維の調節の詳細を解明することによって、細胞のストレス応答と分化誘導を結ぶ知見が得られるであろう。そして、植物細胞の耐塩性獲得の機構を明らかにすることができると考えられる。

9527 塩ストレスによって誘導される新しいストレスタンパク質(HSP66)の生理的役割と発現調節機構

助成研究者：室伏きみ子（お茶の水女子大学 理学部）

1. 研究目的

耐塩性を獲得している植物において、種々の生理的な変化—糖類、アミノ酸、グリシンベタインなどの細胞内蓄積など—が起こることが知られているが、生体内にその生理的变化を誘導するメカニズムについては、まだほとんど分かっていないのが現状である。

我々は、塩ストレスに対する細胞の応答を研究することによって、単純化した系で、耐塩性獲得のメカニズムに迫ることができると考えた。そして、下等な植物である真性粘菌 *Physarum polycephalum* の単相体ミクソアメーバをモデル系として、それが塩ストレスに対してどのような防御反応を示すか、そして、その反応がどのような分子的機序によるものであるかについての検討を行った。

2. 研究方法

2.1. 生物材料

用いた細胞は、真性粘菌 *Physarum polycephalum* の単相体であるミクソアメーバの J 株で、餌となる *Aerobacter aerogenes* と共に暗所、24°C で二員培養した(1)。培養したミクソアメーバを収穫し、PBS で洗った後、それぞれの実験に用いた。熱ストレスを与える場合は、細胞を 40°C で処理した。

2.2. 塩ストレスによる形態変化の観察

ストレスによる細胞の形態変化を観察するために、ミクソアメーバを種々の塩濃度の緩衝液中で、種々の時間インキュベートし、位相差顕微鏡下で観察した。細胞壁を持つマイクロスチスは、コンゴレッドで染色することによって他の細胞と区別した。また、マイクロスチスは切片作成後、透過型電子顕微鏡による観察を行った(2)。

2.3. 新しく合成されるタンパク質の標識

種々のストレス条件下で、ミクソアメーバを、 $[^3\text{S}]$ メチオニンを含む緩衝液中でインキュベートした。一定時間後、非標識メチオニン含有緩衝液で洗って、SDS sample buffer

(3) に溶解し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）による分析を行った。

2.4. 電気泳動とフルオログラフィー

1次元 SDS-PAGE は、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて、Laemli の方法（3）により行った。タンパク質のバンドは、Coomassie Brilliant Blue（CBB）で染色することによって可視化した。フルオログラムは、Kodak X-Omat film を用いて作成した（2）。2次元 SDS-PAGE は、O'Farrell の方法（4）に従って行い、銀染色によってタンパク質のスポットを発色させた。

2.5. 抗 p66 抗体の作成

ストレスを与えたミクソアメーバをホモジェナイズし、45,000 x g 上清を CM-セファデックスカラムクロマトグラフィー、ATP-アガロースカラムクロマトグラフィーにかけた。p66 を含む画分を SDS-PAGE で分離して、p66 のバンドを切り出し、それを用いてウサギを免疫し、抗血清を得た。抗血清を常法に従ってアフィニティー精製したものを、抗 p66 抗体とした（2）。

2.6. イムノブロッティング

Towbin らの方法（5）により、イムノブロッティングを行った。用いた抗体は、抗 p66 抗体、抗 HSP70 抗体、抗 HSP90 抗体である。

2.7. 蛍光抗体染色

ミクソアメーバをポリ-L-リジンでコートしたカバーグラス上に載せてストレスを与え、Triton で膜を透過性にした後、アクチン繊維はローダミンファロイジンと、p66 は抗p66 抗体と結合させた後、FITC-抗ウサギ IgG 抗体と結合させ、蛍光顕微鏡で観察した（2）。

2.8. アクチンとの共沈澱

ミクソアメーバのホモジェネートを 100,000 x g で遠心した上清を用いて、アクチンとの共沈実験を行った。共沈澱後の上清と沈澱は、SDS-PAGE で分析した（2）。

2.9. アミノ酸配列の部分決定

ストレスに曝した細胞を、2.5.と同様にカラムクロマトグラフィーの組合せによって部分精製した後 SDS-PAGE で分離した p66 画分を、再電気泳動して単一のタンパク試料を得た。この試料を Kawasaki の方法（6）によってペプチド分解処理し、分離したペプチドの配列を決定した（7）。

2.10. p66 の cDNA のクローニング (8)

得られた部分アミノ酸配列から、考えられるコドンの多様性が少ない部分を選んで、常法に従って DNA オリゴマーを作成した。それとストレスを与えた細胞から分離した mRNA から逆転写によって合成した DNA を組み合わせて増幅させ、プラスミド pUC118 に組み込んだ。それを *E. coli* JM109 コンピテント細胞に導入してクローニングし、その塩基配列をジデオキシ法 (9, 10) によって決定した。

3. 結果および考察

3.1. 塩ストレスによるマイクロシストの誘導

真性粘菌 *Physarum polycephalum* は Fig.1 に示すようなライフサイクルをもっている。単相体であるミクソアメーバは、通常の条件下では擬足を持って活発に運動しているが、ストレスに曝すと擬足を失って細胞壁を形成し、休眠型細胞であるマイクロシストへと形態変化する。そして、環境が好転するまで長期にわたってその状態で生存することが可能

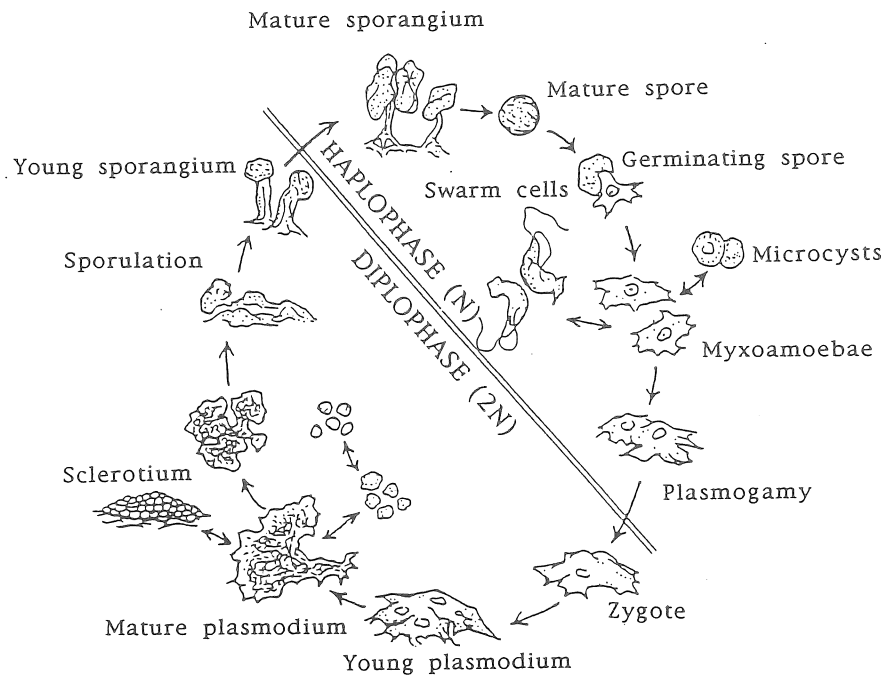


Figure 1. The life cycle of *Physarum polycephalum*.

である。自然界においてミクソアメーバが受けるストレスには、塩ストレスの他に、熱ショック、飢餓、乾燥などがあるが、マイクロシストの形成は、熱ショック > 塩ストレス >

飢餓＝乾燥の順で速やかに誘導された。Fig. 2 に、塩ストレスによって誘導されるシスト形成のタイムコースを、Fig. 3 に塩ストレスによって誘導されたマイクロシストの電子顕微鏡写真を示す。0.25 M NaCl の塩ストレスに曝されたミクソアメーバは、24 時間後にはほぼ 80% がマイクロシストへと変化した。形態変化の程度は塩濃度に依存しており、マイクロシストは周囲に細胞壁 (Fig. 3 矢印) を形成して、周囲の悪環境から自己を守っていることが示された。

3.2. ミクロシスト形成に伴う細胞内アクチン繊維の変化

種々のストレスによってマイクロシストの形成が誘導されることが示されたが、その過程でミクソアメーバは擬足を失った円盤状の状態を経て、細胞壁を形成し、マイクロシストへと変化するようになった (Fig. 4)。この様な形態変化を示すことは、ストレスに対応して細胞骨格の変化が引き起こされることが示唆される。そこで、ローダミンファロイジンで細胞を染めてアクチン繊維の変化を調べたところ (Fig. 4 写真下段)、ミクソアメーバ中ではアクチン繊維は細胞質全体にわたって分布し、特に擬足のマイクロスパイク部に濃縮されて存在していた。ところが、円盤状細胞とマイクロシスト中では、アクチンは太くて短い束状構造となり、細胞質周辺部に局在していた。このアクチン繊維の再構成は、ストレスに伴って細胞が形態変化することと密接に関わっていると考えられ、細胞のストレス応答における細胞骨格の重要な役割が示唆された。

3.3. ストレスタンパク質の誘導

マイクロシストへの形態変化と並行して、数種類のタンパク質の合成誘導が観察された。Table 1 に、ストレスによる誘導が明らかな 5 種類のタンパク質について、塩ストレスと熱ショックによる合成誘導の比較を示した。いずれも、ストレス負荷後 1 時間で合成量の大幅な増加が観察されたが、ことに、66k と 70k の分子量を持つもので顕著であった。熱ショックによるタンパク合成誘導は短時間での解析が可能で、その結果からは 66kD タンパク質合成の急激な上昇 (熱ショック 5 分間で、66k タンパク質はほぼ 16 倍に増加) が認められている。66k タンパク質は、円盤状細胞の出現と共に一過的に合成された。単相体のミクソアメーバは、接合して複相体の変形体へと分化するが (Fig. 1, 4)、この変形体にストレスを与えても、66k タンパク質の誘導は見られなかった。このことは、核相の異なる細胞分化の各ステージにおいて、p66 の発現が調節されていることを示している。すなわち、p66 はミクソアメーバがマイクロシストへと分化する過程でのみ特異的に発現し、細胞の分化に関連する新しいタイプのストレスタンパク質である可能性が考えられる。二次元電気泳動とそのイムノブロットングの結果から、p66 が単一タンパク質であることも示されている。

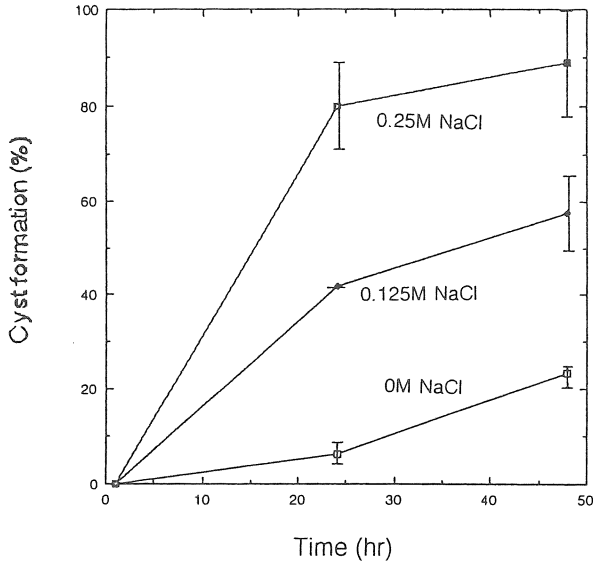


Fig. 2. Time Course of Microcyst Formation induced by Salt Stress.

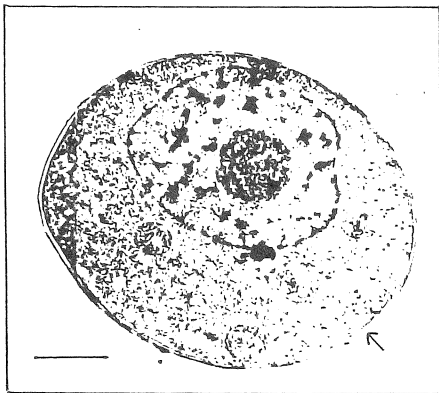


Fig. 3. Electron Microscopic Observation of Microcyst. Arrow, cell wall; bar, 1 μ m.

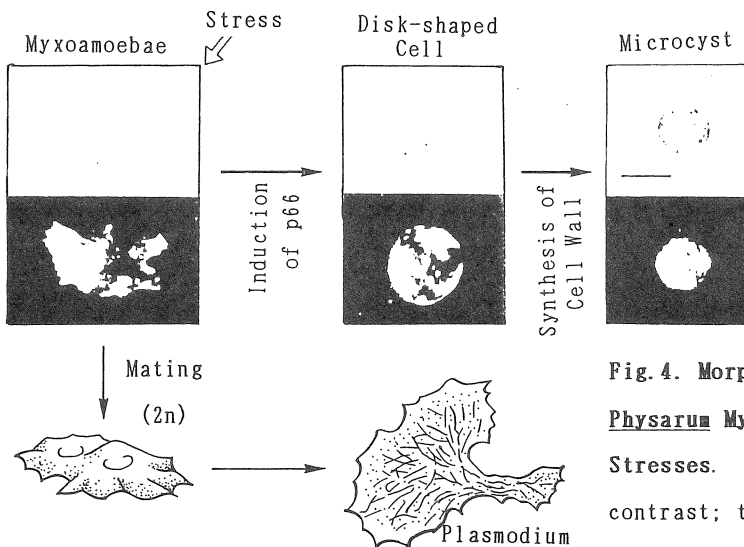


Fig. 4. Morphological Change of Physarum Myxoamoebae under Some Stresses. The upper row, phase contrast; the lower row, fluorescence, bar, 5 μ m.

7 6 k

[³⁵S]Met incorporation (dpm/cell)

	1 hr	6 hrs	24 hrs
control	0.020 (1)	0.077 (1)	0.029 (1)
heat shock	0.073 (3.65)	0.137 (1.77)	0.070 (2.41)
salt stress	0.073 (3.65)	/	

9 8 k

[³⁵S]Met incorporation (dpm/cell)

	1 hr	6 hrs	24 hrs
control	0.027 (1)	0.125 (1)	0.060 (1)
heat shock	0.098 (3.62)	0.190 (1.52)	0.096 (1.6)
salt stress	0.111 (4.11)	/	

3 5 k

[³⁵S]Met incorporation (dpm/cell)

	1 hr	6 hrs	24 hrs
control	0.015 (1)	0.136 (1)	0.027 (1)
heat shock	0.054 (3.61)	0.191 (1.41)	0.065 (2.40)
salt stress	0.043 (2.84)	/	

6 6 k

[³⁵S]Met incorporation (dpm/cell)

	1 hr	6 hrs	24 hrs
control	0.030 (1)	0.194 (1)	0.067 (1)
heat shock	0.175 (5.83)	0.479 (2.46)	0.131 (1.95)
salt stress	0.132 (4.4)	/	

7 0 k

[³⁵S]Met incorporation (dpm/cell)

	1 hr	6 hrs	24 hrs
control	0.009 (1)	0.056 (1)	0.015 (1)
heat shock	0.037 (4.11)	0.095 (1.69)	0.031 (2.06)
salt stress	0.062 (6.88)	/	

Table I. Induction of Stress Proteins by Salt Stress and Heat Shock.

3.4. p66 とアクチンとの結合

三種類のタイプの細胞（ミクソアメーバ、円盤状細胞、マイクロシスト）をローダミンファロイジンと抗 p66 抗体とで二重染色すると、円盤状細胞でそれらによる染色像が一致し（Fig. 5）、細胞内で p66 がアクチン繊維と結合して存在することが示された。また *in vitro* でストレスに曝した細胞抽出液とアクチンとの共沈実験を行うと、p66 はアクチン重合体と共に沈澱に回収された（Fig. 6）。これらの結果は、p66 がアクチン調節タンパク質のひとつであることを示唆する。p66 は、アクチンと相互作用して、ストレスに対応した細胞の形態変化に直接関与しているのであろう。また、p66 は ATP と結合することも示された。そこで、アクチン結合活性や ATP 結合活性を持つ他のストレスタンパク質、HSP70 や HSP90 との相同性を調べるため、それぞれの抗体によるイムノブロッティングを試みたが、p66 はそのいずれとも交叉反応を示さなかった。

3.5. p66 の cDNA クローニング

p66 の構造とその発現調節のメカニズムを知るために、p66 の cDNA クローニングを行い、その塩基配列を決定した。得られた cDNA は 642 bp の配列から成っていた。これは期待されたプライマー配列を持っており、p66 遺伝子が組み込まれたものに間違いないと考えられる。この部分アミノ酸配列を Genbank に登録されている配列と比較したところ、p66 がこれまでに知られていない新しいタンパク質であることが示された（論文準備中）。この cDNA は分子量から考えて、p66 遺伝子のほぼ半分の長さである。現在、ミクソアメーバからの cDNA ライブラリーの作成を行っている。さらに、p66 の完全な遺伝子構造と、その発現調節機構を知るために、上流域を含んだ遺伝子 DNA の分離とその塩基配列の決定を試みている。遺伝子上流の発現調節配列が明らかになれば、p66 のストレスによる誘導のメカニズムが解明されるであろう。また、複相変形体でその発現を抑制している制御配列が明らかになれば、細胞のストレス応答と分化誘導を結び付ける重要な知見を得ることができると考えている。

3.6. 新しいアクチン調節タンパク質、p42

p66 の精製過程で、42k の分子量を持つタンパク質（p42）が、常に p66 と挙動を共にしており、これらが *in vivo* で相互作用していることが示唆された。そこで、抗 p66 抗体を用いて、細胞抽出液の免疫沈降実験を行った。すると、p66 と p42 はいずれも沈澱へと回収され、これらが *in vivo* で強く相互作用している可能性が考えられた。この混合物を粘菌アクチンと共に共沈実験を行うと、いずれのタンパク質も沈澱へと回収された。p42 は p66 とアクチンとの結合を仲介している可能性も考えられ、これらの関係について、現在研究を進めている。

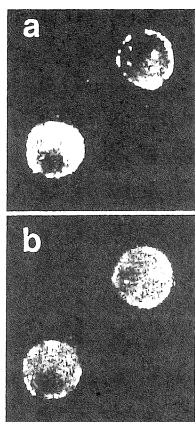


Fig. 5. Co-localization of Actin and p66 revealed by Double-labeled Immunofluorescence. The disk-shaped cells were visualized with rhodamin-phalloidin (a) and the anti-p66 antibody (b).

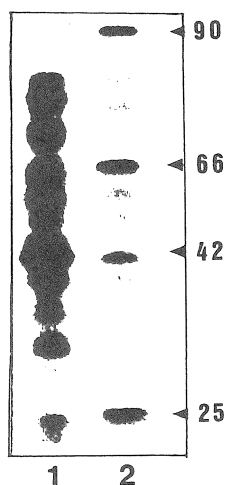


Fig. 6. Co-precipitation Study of Cell Extract with Polymerized Actin. The [^{35}S]methionine-labeled cell extract was incubated with actin and centrifuged (2). The supernatant (lane 1) and the pellet (lane 2) were analyzed by SDS-PAGE, and fluorogram was made.

4. 今後の課題

本研究では、塩ストレスに対応して、真性粘菌 *Physarum polycephalum* のミクソアメーバがそのストレスから身を守るための形態変化に、アクチン繊維の構造変化が密接に関与していること、その際に、細胞のステージ特異的に新しいストレスタンパク質、p66 が誘導されることを明らかにし、そのタンパク質がアクチン繊維の構造変化を調節していることを示した。今後、さらに、p66 と p42 の遺伝子構造とその発現機構を明らかにし、細胞分化におけるアクチン調節の詳細を解明することによって、細胞のストレス応答と、細胞の分化誘導を結ぶ重要な知見が得られるものと考えている。そして、植物細胞の耐塩性獲得のメカニズムを明らかにすることも夢ではないと考えられる。

5. 参考文献

1. Murakami-Murofushi, K., Hiratsuka, A., Ohta, J. (1984) A Novel Acid Protease from Haploid Amoebae of Physarum polycephalum, and Its Changes during Mating and Subsequent Differentiation into Diploid Plasmodia. *Cell Struct. Funct.* **9**, 311-315.
2. Shimada, Y., Kasakura, T., Yokota, M., Miyata, Y., Murofushi, H., Sakai, H., Yahara, I., and Murakami-Murofushi, K. (1992) Expression of a 66-kD Heat Shock Protein Associated with The Process of Cyst Formation of A True Slime Mold, Physarum polycephalum. *Cell Struct. Funct.* **17**, 301-309.
3. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of A Structural Proteins during The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
4. O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M., and O'Farrell, P. H. (1975) High Resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
5. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
6. Kawasaki, H., Emori, Y., Suzuki, K. (1990) Production and Separation of Peptides from Proteins Stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 after Separation by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **191**, 332-336.
7. Hewick, R. M., Hunkapiller, M. K., Hood, L. E., and Dreyer, W. J. (1981) A Gas-Liquid Solid Phase Peptide and Protein Sequenator. *J. Biol. Chem.* **256**, 7990-7997.
8. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning* (2nd edition). Vol. 1 - Vol. 3, Cold Spring Harbor Lab. Press.
9. Ish-Horowicz, D., and Burke, J. F. (1981) Rapid and Efficient Cosmid Vector Cloning. *Nucl. Ac. Res.*, **9**, 2989.
10. Sanger, F. (1977) DNA Cloning with Chain Terminating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.

EXPRESSION OF A NOVEL STRESS PROTEIN, P66, ASSOCIATED WITH
THE PROCESS OF MICROCYST FORMATION INDUCED BY SALT STRESS.

KIMIKO MURAKAMI-MUROFUSHI

Department of Biology, Faculty of Science, Ochanomizu University
2-1-1, Ohtsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112, Japan

SUMMARY

Under high salt conditions, haploid myxoamoebae of a true slime mold, Physarum polycephalum retracted their pseudopodia and changed their shape into disk-shaped form, then they constructed the cell wall to form microcysts. These morphological changes of haploid myxoamoebae were associated with changes of the distribution of actin filaments in the cells. Staining with phalloidin showed that actin filaments were uniformly distributed throughout the cytoplasm of the myxoamoebae. The actin structures changed into short rods under the stress conditions associated with the appearance of disk-shaped cells.

Several proteins were induced under the stress conditions, among which a 66k-protein, p66, was most prominently induced. However, p66 was not induced, when diploid plasmodia of the same species were exposed to stress conditions.

This stress protein was co-precipitated with polymerized actin and bound to ATP. A double staining of the disk-shaped cells with phalloidin and anti-p66 antibody revealed superimposable localization of the p66 and actin filaments in the short rods. p66 was immunologically unrelated to the common stress proteins, HSP70 and HSP90, those are highly conserved during evolution.

In order to know the structure and the regulation of its expression, cDNA for p66 was cloned and its nucleotide sequence was determined. From its deduced amino acid sequence, p66 is considered to be a novel stress protein.

A 42k-protein, p42, was found to form a complex in vivo with actin and p66, and it is considered to act as a regulatory factor in the binding of p66 and actin.

To get further information, full length of p66-cDNA and p42-cDNA have been prepared and their nucleotide sequencing are now under way.