

低温ショックドメインタンパク質の機能の保存性と多様性：植物からの視点

今井 亮三, 金 明姫

1. はじめに

細菌から高等動植物に至るまで、生物にはそれぞれ生育に最適な温度があり、環境温度の著しい上昇（熱／高温ストレス）や低下（低温ストレス）により生育が制限されたり、生存が脅かされる。そこで生物は、温度の変化に対して適応する機構を発達させている。中でも熱（高温）ショック応答は最もよく研究されており、高温で誘導される熱ショックタンパク質が、分子シャペロンとして変性したタンパク質をリフォールドさせる。このような熱ショックタンパク質による高温適応機構は細菌からヒトまで広範な生物群に共通に見いだされる。一方、低温に対しても生物はそれを認識して適応する仕組みを持っているが、これまで、進化的に保存された機構は見つかっていなかった。しかし、最近の研究で、低温ショックドメインと呼ばれるタンパク質ドメインに、進化的に保存された低温適応機構が隠されていることがわかってきた。

2. 大腸菌の低温適応と低温ショックタンパク質

大腸菌は、低温にさらされると低温応答性タンパク質群を誘導し、その環境に適応する。その中で最も顕著に蓄積するのが CspA と呼ばれるタンパク質である。ここでは、CspA とそのファミリーを単に低温ショックタンパク質（cold shock protein : CSP）と呼ぶことにする。大腸菌には 9 個の CSP 遺伝子（*cspA*~*cspI*）が存在するが、そのうち四つが低温に応答する。CSP は、RNA の二次（二本鎖）構造を一本鎖状に解きほぐす活性を持つことから、RNA シャペロンと呼ばれている。低温下では、RNA 分子上に熱力学的に安定な二次構造が形成されやすくなり、転写、

翻訳過程に問題を生ずる。大腸菌は、RNA シャペロンを合成することによりこの問題を解決する。また、CSP のうち低温に応答する三つ（*cspA*, *cspB*, *cspG*）と構成発現する一つ（*cspE*）を欠損した大腸菌は、低温では生育できないことから、CSP の機能は低温下の生育に不可欠であるといえる。CspA は 7.4 kD のタンパク質で五つの逆平行 β -シートから形成される β バレル構造を持ち、RNA 結合モチーフ RNP1 および RNP2 をそれぞれ $\beta 2$, $\beta 3$ 上に配置する。CSP は、ラン藻を除く細菌群に広く見いだされている。

3. 植物の低温適応と低温ショックドメインタンパク質

移動能を持たない植物にとって、低温は成長と生存に大きく影響を与える環境因子である。植物は、他の生物にはない高度な低温適応（馴化）メカニズムを進化させている。多くの熱帯、亜熱帯植物が低温で簡単にダメージを負ってしまうのに対して、温帯や亜寒帯の越冬性の植物は、穏やかな低温への遭遇により、厳しい低温（凍結）に対する耐性（耐凍性）を獲得する。この機構は低温馴化と呼ばれるが、自然界においては、晩秋の低温を感じることで、冬に備えて耐凍性を高める生態適応といえる。WCSP1 はコムギの低温馴化過程で誘導される遺伝子として見いだされたが、その構造はきわめて興味深いものであった。すなわち、WCSP1 タンパク質は N 末端側に細菌 CSP と相同な配列（低温ショックドメイン；CSD）を持ち、C 末端側は、Cys-Cys-His-Cys (CCHC) タイプのジンクフィンガー (ZF) とグリシンリッチ (GR) 配列の繰り返しからなるドメインで構成されていた (図 1)¹⁾。CSD を持つ真核細胞由来タンパク質としては動物の Y-box タンパク質がすでに知られていたが、低温適応との関わりは不明であった。WCSP1 は低温特異的に誘導され、その発現量は mRNA、タンパク質レベルともに低温により増加する¹⁾。また、高度な耐凍性が獲得されるクラウン組織（成長点を含む茎頂組織）において高蓄積する。WCSP1 においては CSD が低温適応と深く関わるのが推測されたが、実際に組換えタンパク質を用いた研究により、WCSP1 タンパク質は CSD を介して一本鎖および二本鎖核酸に結合し、二本鎖構造を解きほぐす活性を持つことが示された²⁾。また、WCSP1 は大腸菌

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター (〒062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘 1 番地)

Functional conservation and diversification of cold shock domain proteins: a view from plants

Ryozo Imai and Myung Hee Kim (Hokkaido Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization, Hitsujigaoka 1, Toyohira-ku, Sapporo, Hokkaido 062-8555, Japan)

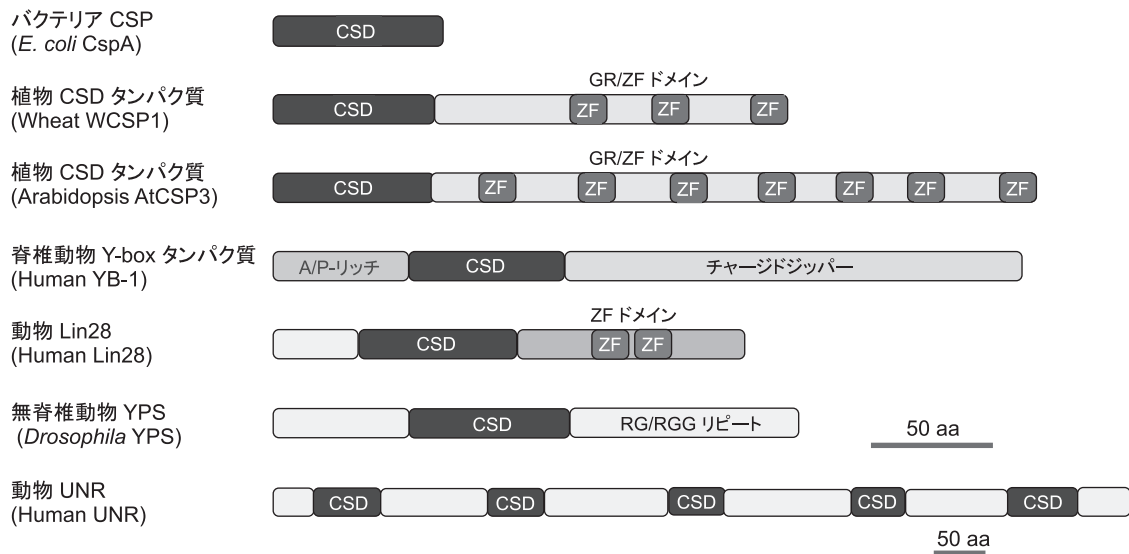


図1 CSDタンパク質の構造
各ドメインの説明は本文参照のこと。

csp 四重変異体が示す低温感受性を相補することから、大腸菌 CSP と同様な RNA シャペロン活性を持つことも明らかにされた²⁾。データベース検索を行うと、WCSP 様のタンパク質はほぼすべての植物種において見いだされるが、その遺伝子数は種によって大きく異なる^{3,4)}。一般的に ZF のリピート数が異なる二つのクラスに分けられる。イネゲノムには ZF が 2 個の Class I と 4 個の Class II それぞれ一つずつ合計 2 個の遺伝子が存在する。シロイヌナズナでは 4 コピーの ZF を持つ Class I, 7 コピーの ZF を持つ Class II それぞれ 2 個ずつ存在する⁴⁾。

4. 植物の CSD タンパク質の機能

植物 CSD タンパク質の機能はシロイヌナズナを用いて遺伝学的に調べられている。シロイヌナズナは AtCSP1~AtCSP4 の四つの CSD タンパク質を持つが、中でも AtCSP3 が最も詳細に解析されている。AtCSP3 は茎頂や根端など分裂組織で発現しており、低温により発現が高まる⁵⁾。AtCSP3 は、大腸菌の *csp* 四重変異体が示す低温感受性を相補し、*in vitro* においても、二本鎖核酸の解離活性を示したことから、RNA シャペロン活性を持つと考えられた⁵⁾。AtCSP3 のノックアウト変異体 (*atcsp3-2*) を単離し、その表現型を解析したところ、通常の栽培条件では、生育や形態に異常はみられなかったが、低温馴化前後、変異体において耐凍性の著しい低下が観察された (図 2)。また反対に、*AtCSP3* を過剰発現した植物では、野生株に比べて耐凍性が高まっていた。つまり、*AtCSP3* は耐凍性の正の調節因子であることが明らかになった⁵⁾。

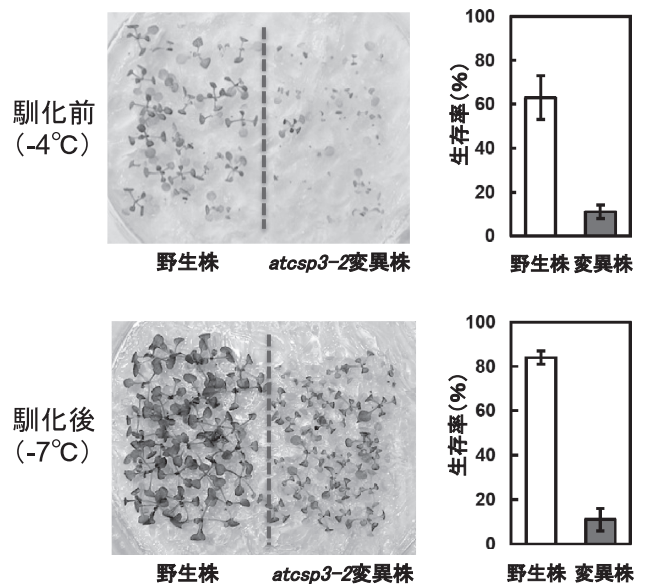


図2 *atcsp3-2* 変異体は耐凍性が低下する
野生株および *atcsp3-2* 変異株について、低温馴化前および低温馴化後の植物体をそれぞれ -4°C および -7°C で凍結処理後の回復のようす (左) ならびにそのときの生存率 (右)。

5. 耐凍性獲得のメカニズム

AtCSP3 はどのようなメカニズムで耐凍性を調節しているのだろうか。大腸菌 CSP の機能から類推すると、まず、低温下における翻訳障害を回避する機能が考えられる。野生株と *atcsp3-2* 変異株間で二次元電気泳動によるタンパク質プロファイルの比較を行ったところ、低温馴化前後のどちらの組織を用いても、両株間に明確な差異を与

えるスポットは検出されなかった。次に、mRNA レベルの発現調節機能について検討した。シロイヌナズナの耐凍性獲得において、鍵となるシグナル経路は CBF (C-repeat binding factor) 経路である⁶⁾。転写因子 CBF (CBF1~CBF3) により、その下流において発現制御を受ける多くの遺伝子が発現誘導される。AtCSP3 が耐凍性を調節する機構が CBF 経路を介するののかについて検討した。CBF 遺伝子およびその下流遺伝子について野生株と *atcsp3-2* 変異株間で低温に应答した発現変化を調べたところ、両株間で違いは見いだされなかった⁵⁾。したがって AtCSP3 による耐凍性調節には CBF 経路が関わっていないと結論された。そこで、野生株と *atcsp3-2* 変異株間でマイクロアレイ解析を行い、*atcsp3-2* 変異株で発現抑制されている遺伝子を探索したところ、21 個の遺伝子が同定された⁵⁾。この中に既知の耐凍性付与遺伝子は見いだされなかったが、ほとんどの遺伝子が低温、乾燥、塩などのストレスにより誘導される遺伝子であった。これらの遺伝子産物が AtCSP3 による耐凍性の向上に機能していると推測される。

6. AtCSP3 はさまざまなタンパク質と複合体を形成する

AtCSP3 がどのような機構で耐凍性付与遺伝子の発現量を制御するのかについて検討した。緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合タンパク質の解析から、AtCSP3 は核と細胞質に局在すると考えられている。AtCSP3 の酵母ツーハイブリッド法を用いた相互作用タンパク質のスクリーニングから、38 個の相互作用タンパク質が同定された⁷⁾。興味深いことに、多くの相互作用タンパク質が RNA の代謝や機能発現に関わるものである。たとえば、rRNA プロセッシングタンパク質 (AtNUC-L1)、核内ポリ A 結合タンパク質 (PABN)、脱キャップ化タンパク質 (DCP5) 等である。BiFC (bimolecular fluorescence complementation) 解析*により植物細胞内での相互作用を解析したところ、NUC-L1 とは核小体と核質において、PABN とは核スペックルで、DCP5 とは細胞質の P-body において特異的な相互作用が検出された⁷⁾。PABN は 3 種類存在するが、そのすべてが AtCSP3 相互作用タンパク質として検出された点は興味深い。図 3 に示すように AtCSP3 は核内外のさまざまな部位

*BiFC (bimolecular fluorescence complementation) 解析: 二つのタンパク質間相互作用を *in vivo* で検出する方法。相互作用を調べたい二つのタンパク質に黄色蛍光タンパク質 (YFP) の N 末端側、C 末端側をそれぞれ融合させ、それらを同一細胞内で発現させる。タンパク質間に相互作用があれば、分断された YFP の再構成が起これ、YFP の蛍光が観察される。実際に相互作用が起きている細胞内部位を特定できる点が優れている。

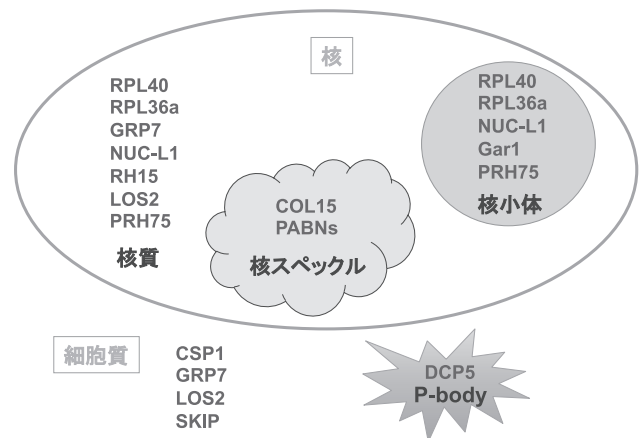


図 3 AtCSP3 と相互作用するタンパク質

酵母ツーハイブリッドおよび BiFC 解析により相互作用が確認されたタンパク質と相互作用が検出された細胞内部位。RPL40: ribosomal protein L40A, RPL36a: ribosomal protein L36aB, GRP7: glycine-rich RNA-binding protein 7, NUC-L1: nucleolin L1, RH15: RNA helicase 15, LOS2: low expression of osmotic stress-responsive genes 2, PRH75: plant RNA helicase 75, Gar1: H/ACA ribonucleoprotein complex subunit, COL15: constans-like 15, PABNs: nuclear poly (A)-binding proteins, CSP1: cold shock domain protein 1 (AtCSP1), SKIP: chromatin protein family/Ski-interacting protein, DCP5: decapping protein 5.

において多様なタンパク質と相互作用し、RNP (ribonucleoprotein) 複合体を形成していると考えられる。このことは、AtCSP3 が RNA シャペロン機能を通して、多面的な遺伝子発現制御に関わっていることを示唆している。

7. 機能モジュールとしての CSD

動物の CSD タンパク質は、ドメイン構造の違いにより複数種類に分類されている (図 1)。中でも Y-box タンパク質が最も詳細に研究されている。Y-box タンパク質の構造は、N 末端の Ala/Pro リッチ領域とそれに続く CSD、C 末端側に正負の電荷が繰り返されるチャージドジッパードメインからなる。ヒトの Y-box タンパク質 YB-1 は MHC クラス II 遺伝子プロモーター中の Y-box に結合する転写抑制因子として同定されたが⁸⁾、実際に YB-1 は多様な遺伝子の転写抑制あるいは活性化因子として働くことが明らかにされている⁹⁾。また、Y-box タンパク質は、細胞質において mRNA に結合し mRNA 複合体を形成するが、mRNA と YB-1 の存在量比により、翻訳活性を持つポリソーム型と翻訳活性を持たない遊離型の 2 種類の mRNA を形成し翻訳を調節する⁹⁾。また、アフリカツメガエル卵母細胞において Y-box タンパク質 (FRGY2) は特定の母性 mRNA に結合し翻訳を不活化 (RNA マスキング) し、卵成熟、胚発生過程における特異的翻訳を可能している¹⁰⁾。YB-1 における CSD の機能については詳細に検討さ

れていないが、ウサギの YB-1/p50 は RNA シャペロン活性を示すことから¹¹⁾、YB-1 中において CSD は RNA シャペロンモジュールとして働いている可能性が考えられる。ニワトリ培養細胞において、YB-1 の発現は低温では誘導されないが、その破壊株では低温下の増殖が抑えられることが示されており、低温下で重要な機能を持つことも示唆されている¹²⁾。

別のグループの CSD タンパク質 Lin28 は 25 kD の細胞質タンパク質で、CSD と Cys-Cys-His-Cys (CCHC) ジンクフィンガーから構成される (図 1)。Lin28 は脱分化状態の維持に働き、分化により抑制される。また、胚性幹 (ES) 細胞の維持や人工多能性幹 (iPS) 細胞の誘導に使われる。核に局在する Lin28 は pri-let-7 miRNA に結合し、それを核内にとどめる働きを持つ。一方で細胞質に局在する Lin28 は、pre-let-7 miRNA に結合し、そのプロセッシングを防ぐ。低温と関連する機能や RNA シャペロン活性については報告されていない。

UNR (upstream of N-Ras) は五つの CSD からなるユニークな構造を持つ (図 1)。UNR は、mRNA 上の内部リボソームエンター部位に結合し、その二次構造を変化させ、その場所からの翻訳を活性化する¹³⁾。したがって UNR は RNA シャペロンと考えられている¹⁴⁾。

無脊椎動物のみに見いだされる Ypsilon Schachtel (YPS) 型 CSD タンパク質は、CSD と C 末端側の RGG リピートからなる (図 1)。ショウジョウバエの YPS は、発生パターンの制御に関わる特異的 mRNA の細胞内局在性に関与している¹⁵⁾。アメフラシの ApYI¹⁶⁾ やプラナリア DjYI¹⁷⁾ は RNA 結合タンパク質として報告されているが、それ以上の機能は未知である。最近、ホタテ貝から低温誘導性の YPS 型 CSD タンパク質である CfCSP が発見された。CfCSP は大腸菌の *csp* 四重変異株を相補することから RNA シャペロン活性を持つとされている¹⁸⁾。

8. おわりに

植物の CSD タンパク質の解析から、低温適応における CSD 機能の進化的保存性が明らかになってきた。このことは、多様な生物種において、低温下では RNA の構造変化に対する適応が重要であることを示唆しており、高温下におけるタンパク質構造変化に対する適応と対比される。

また、CSD は RNA 結合ドメインとして多様な調節タンパク質に見いだされており、低温適応以外の機能を持つものも多い。つまり、常温下における RNA の二次構造制御による発現調節においても CSD タンパク質が重要な機能を担っていると考えられる。今後、個々の RNP 複合体における CSD タンパク質の機能の解析から、CSD タンパク質の分子レベルにおける機能の理解が深まることが期待される。

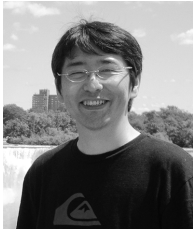
謝辞

本稿についてご助言をいただきました北海道農業研究センター 佐々木健太郎博士に感謝致します。

- 1) Karlson, D., Nakaminami, K., Toyomasu, T., & Imai, R. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 35248–35256.
- 2) Nakaminami, K., Karlson, D.T., & Imai, R. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10122–10127.
- 3) Karlson, D. & Imai, R. (2003) *Plant Physiol.*, **131**, 12–15.
- 4) Sasaki, K. & Imai, R. (2012) *Front. Plant Sci.*, **2**, 116.
- 5) Kim, M.H., Sasaki, K., & Imai, R. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 23454–23460.
- 6) Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) *Plant J.*, **38**, 982–993.
- 7) Kim, M.-H., Sonoda, Y., Sasaki, K., Kaminaka, H., & Imai, R. (2013) *Cell Stress Chaperones*, **18**, 517–525.
- 8) Didier, D.K., Schifflbauer, J., Woulfe, S.L., Zacheis, M., & Schwartz, B.D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7322–7326.
- 9) Eliseeva, I.A., Kim, E.R., Guryanov, S.G., Ovchinnikov, L.P., & Lyabin, D.N. (2012) *Biochemistry Mosc.*, **76**, 1402–1433.
- 10) Matsumoto, K. & Wolffe, A.P. (1998) *Trends Cell Biol.*, **8**, 318–323.
- 11) Evdokimova, V.M., Kovrigina, E.A., Nashchekin, D.V., Davydova, E.K., Hershey, J.W., & Ovchinnikov, L.P. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 3574–3581.
- 12) Matsumoto, K., Tanaka, K.J., & Tsujimoto, M. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 1779–1792.
- 13) Mihailovich, M., Militti, C., Gabaldón, T., & Gebauer, F. (2010) *BioEssays*, **32**, 109–118.
- 14) Mitchell, S.A., Spriggs, K.A., Coldwell, M.J., Jackson, R.J., & Willis, A.E. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 757–771.
- 15) Mansfield, J.H., Wilhelm, J.E., & Hazelrigg, T. (2002) *Development*, **129**, 197–209.
- 16) Skehel, P.A. & Bartsch, D. (1994) *Gene*, **145**, 231–235.
- 17) Salvetti, A., Batistoni, R., Deri, P., Rossi, L., & Sommerville, J. (1998) *Dev. Biol.*, **201**, 217–229.
- 18) Yang, C., Wang, L., Siva, V.S., Shi, X., Jiang, Q., Wang, J., Zhang, H., & Song, L. (2012) *PLoS ONE*, **7**, e32012.

 著者寸描

●今井 亮三 (いまい りょうぞう)



(独)農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター首席研究員・プロジェクトリーダー。農学博士。

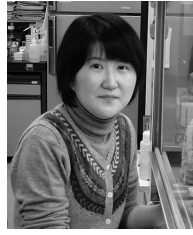
■略歴 1962年山梨県に生る。85年早稲田大学工学部応用化学科卒業。90年東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻博士課程修了。同年カリフォルニア大学リバーサイド校植物科学科博士研究員。95年理化学研究所フロンティア研究員。97年農水省北海道農業試験場主任研究官。2011年より現職。08年より北海道大学大学院農学院客員教授(併任)。

■研究テーマと抱負 植物とそれを取り巻く環境(温度, 水分, 病原菌)との相互作用に興味を持っている。植物が持つ未知の機能を明らかにして, 地球や人類のために利用したい。

■ウェブサイト <http://cse.naro.affrc.go.jp/rzi/index.html>

■趣味 釣り。

●金 明姫 (きむ みよんひ)



Daegu Gyeongbuk Institute of Science & Technology (DGIST), Center for Plant Aging Research, 研究員。農学博士。

■略歴 1974年韓国大邱市に生る。97年大邱カトリック大学園芸学科卒業。2002年同大学院農学系研究科博士課程修了。同年(独)農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター博士研究員。14年より現職。

■研究テーマと抱負 環境変化に因る生物の老化メカニズムを解明する事に興味を持っている。植物の環境条件による遺伝子の発現や本質的な遺伝子の機能に関して明らかにして行きたい。

■ウェブサイト <http://www.dgist.ac.kr/korean/index.html>

■趣味 ショッピング。