

解 説

細胞ストレス生物学入門-その 3

大塚健三

中部大学応用生物学部細胞ストレス生物学教室

第 2 章 熱ショックタンパク質物語

第 1 章では、がん温熱療法の基礎に関して、マウスの個体レベルや培養細胞を用いての熱による殺細胞効果や、温熱耐性(ストレス耐性)などについて述べてきました[1, 2]。ここからは、生体や細胞に熱ショックなどのストレスを与えると新たに合成されてくる熱ショックタンパク質について述べていきます。これは英語の *heat shock protein* をそのまま日本語に訳した言葉です。最近カタカナで表記されたヒートショックプロテインとして、インターネットのウェブ上では「自己回復プロテイン」といわれたり、生体を強くする効果などがマスコミなどでしばしば取り上げられていたりしています。ここでは、そもそも熱ショックタンパク質がどのような経緯でわかってきたのか、原著論文などを忠実にたどりながら研究の歴史を詳しく見ていきたいと思います。生体の巧妙なしくみの一端を垣間見ることができるはずですが、熱ショックといっても、その生物の正常な生育温度から 5~10℃だけ高い温度に一時的にさらされたときに起こる細胞内の変化です。哺乳類の細胞ではおおそ 40~45℃の範囲です。これはがん温熱療法で用いる温度範囲とほぼ同じです。

2-1 熱ショックタンパク質の発見の経緯

2-1-1 リトッサによる熱ショック応答の発見

熱ショックタンパク質の発見の原点となったのは、ショウジョウバエでの熱ショック応答 (*heat shock response*) の研究です。それは 1962 年のリトッサ (Ferruccio Ritossa) による報告が最初とされています[3]。彼は 1960 年代のはじめころ、イタリアの北部の町パヴィアにある遺伝学研究所およびナポリ

国際遺伝学生物物理学研究所で、ショウジョウバエの唾腺染色体のパフ (*puff*) に関する研究を行っていました。ショウジョウバエは、1910 年代からモーガン (Thomas Morgan) による唾腺染色体の染色体地図の作成や、マラー (Hermann Muller) による X 線照射による突然変異体の作出など、モデル生物として遺伝学的研究によく用いられていました。1950 年代には、DNA (*deoxyribonucleic acid*) が遺伝物質であることの証明や、ワトソン (James Watson) とクリック (Francis Crick) による DNA の二重らせん構造の解明など、生物学における重要な発見が相次いでいた時代です。その主な研究材料は大腸菌やそれに感染するウィルスであるファージなどでした。1958~59 年ころになって DNA から合成される RNA (*ribonucleic acid*) の存在がわかってきました。1958 年にはクリックが、遺伝情報は「DNA→(転写)→mRNA→(翻訳)→タンパク質」の順に伝達されるという「セントラルドグマ」を提唱しました。そのことが実験的に証明されたのは 1961 年になってからです。つまり遺伝子である DNA からその情報を伝える mRNA (*messenger ribonucleic acid*) が転写され、それがリボソームに運ばれてタンパク質が合成される、という過程がはっきりわかってきました[4]。リトッサが研究を始めるにあたってショウジョウバエを選んだのは、それが大腸菌とヒトの間のような生物であることと、もうひとつは研究設備が限られていて簡単に飼育できることがその理由のようです[5]。ショウジョウバエの唾腺染色体は光学顕微鏡でもよく観察できるほど大きな構造体で、特定の色素で染色すると特徴ある縞模様に染色されます。そして発生の段階にしたがって特定の部位が大きく膨らん

のような状態になります。これが女性のお化粧に用いるパフに似ていることからその膨らんだ構造をパフと呼ぶようになりました。では、そのパフでは何が起きているのでしょうか？リッッサはそのパフでどのような物質(核酸)が合成されているのかという研究を始めました。

ショウジョウバエは通常 25℃の恒温槽で飼育していますが、たまたま研究仲間の一人が誤ってリッッサの使っていた恒温槽の温度を 30℃以上に上げてしまいました。彼はその実験が失敗したと思いましたが、念のために唾腺染色体を調べてみると、通常の膨らんでいるはずのパフが縮小し、別の部位に新たなパフが形成されていることを見出したのです[3](図 1)。

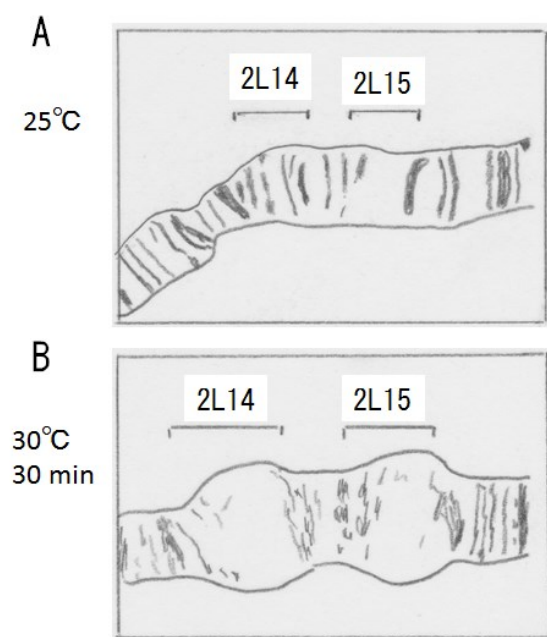


図 1 ショウジョウバエの熱ショックパフ。

A. 25℃. B. 30℃30 min 処理. B では、熱ショックにより唾腺染色体のうち 2L14 と 2L15 の部位がはっきりとふくらんでいるのがわかる。このふくらんだ部位をパフという。(文献 3 から模写)

これが「熱ショックパフ」の発見です。この論文では数本ある染色体のうち 1 本(2L)についてのみ観察しており、25℃で膨らんでいたパフ(2L8)が 30℃30 分処理すると消失し、新たに 3 箇所(2L14, 2L15, 2L20)にパフが形成されることを報告しています。このとき熱ショックのあと放射性の ^3H (トリチウム)シ

チジンを添加しておく、その膨らんだ熱ショックパフに取り込まれること、その ^3H シチジンは RNA を分解する RNase という酵素で処理すると取り除かれることから、まさにパフは DNA から RNA が合成されている部位、つまり遺伝子発現の現場を顕微鏡で観察できることを示したのです。面白いことに、30℃30 分の熱ショックのあともう一度 25℃に戻して 1 時間もすると、もとのパフ(2L8)が膨らみ、熱ショックパフ(2L14, 2L15, 2L20)は消失します。さらにもう一度熱ショックを与えると同じようにパフが変化することも観察しています。つまり繰り返しパフは膨らんだり消失したりするのです。このように遺伝子発現(DNA から mRNA の合成)が、生物個体や細胞を数℃だけ上昇させるという簡単な方法で制御できることがわかったのです。この発見はまさにセレンディピティ(serendipity)による発見の代表的な例の一つです。セレンディピティとは、もともと意図していなかった出来事や失敗の実験、また偶然などによって全く別の新しい発見につながることをいいます。セレンディピティという言葉には、「思わぬことを発見する能力」という意味もあります。リッッサも失敗したと思った実験の奥に、何か新しい真実が隠されているかもしれない、と考えたのかもしれません。科学の世界ではこのようなセレンディピティによる新しい発見が満ちあふれています。

リッッサは熱ショックによるパフの構造変化がエネルギー代謝の障害(ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の脱共役*)によるのではないかと考えました。これは、1957 年に出版されたセント・ジョルジ(Albert Szent-Gyorgyi, ビタミン C の発見などにより 1937 年にノーベル医学生理学賞を受賞)の「Bioenergetics」という本に、「熱はミトコンドリアの電子伝達系に関わるタンパク質の周りの水分子の構造を破壊し、その結果酸化的リン酸化を脱共役する」との記載があることにヒントを得たものです。そこで、唾腺染色体をミトコンドリアの脱共役剤である 2-ジニトロフェノールまたはサリチル酸で 30 分ほど処理すると、熱ショックと同じパフが膨らむことが観察されました。

リトッサはこれらの研究成果をまとめてある有名な雑誌に投稿したのですが、拒否されてしまいました。後に彼の書いた回想録エッセイでは、非常に評判のよい雑誌(a highly reputable journal)に投稿したのだが、編集者からは、「これらの研究成果は科学の分野では不適切である(irrelevant to the scientific community)」ということで掲載を拒否された、と述べています[5]。彼は拒否された雑誌の名前は具体的に記載していませんが、その雑誌は Nature であることがわかっています[6]。そこで彼はしかたなく *Experientia* というスイスの雑誌に論文を投稿することにしました。リトッサの熱ショック応答の発見は、わずか 2 ページ足らずの論文ですが、その後花開いて一つの大きな研究分野の発展につながったことを考慮すると、掲載を拒否した編集者の判断は、後から考えると見る目がなかったものと言えるかもしれません。

リトッサはその後、2-ジニトロフェノールやサリチル酸だけでなく、やはりエネルギー代謝阻害剤であるロテノンやアジド、また低酸素といった処理によっても熱ショックと同様のパフが膨らむことも報告しています[7]。リトッサがこれらの研究で示したのは、ショウジョウバエを熱ショックやエネルギー代謝阻害剤などの薬剤で処理することで、唾腺染色体の特定のパフが膨らみ、そこで RNA が合成されている、ということです。言いかえると、遺伝子発現のオンオフが、温度を 5~10℃だけあげるという簡単な実験操作でコントロールできることが示されたのです。このことが遺伝子発現のメカニズム研究の最良のモデル実験系であることは、しばらく後でわかってきました。ただ、この時点ではまだ熱ショックタンパク質は検出されていません。その検出や解析にはタンパク質解析に不可欠の研究手法である電気泳動法の開発を待たなければならませんでした。

なお、熱ショック応答に関する研究はその後大きく発展して、この分野の専門の雑誌として1996年に *Cell Stress & Chaperones* が創刊され、また1999年には *Cell Stress Society International* (CSSI) という国際学会も創設されました。しかしリトッサは熱シ

ックパフの発見以降、この分野の研究を継続することではなく、ショウジョウバエの DNA において、リボソーム(タンパク質を合成する装置)を構成する RNA (リボソーム RNA) をコードする DNA (リボソーム DNA) の研究をおこない、優れた業績を多くあげています。リトッサは1936年生まれですが、1992年、56歳の時に突然引退を決意し、イタリアの片田舎に引っ越して彫刻家として生きる道を選びました。彼の彫刻の作品にはちょっと風変わりな宇宙人のような姿をしたものがあります。2010年にCSSIの国際会議がイタリアで開催されたときに、熱ショックパフの発見から50年近くということで、リトッサにCSSIメダル(いわゆる学会賞)が授与されています[8]。リトッサはその後、2014年9月に77歳で亡くなりました[6]。リトッサがなぜ科学者から彫刻家に転身したのか、彼の回想録[5]や追悼文[6]にも書かれていないので不明のままです。

*ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の脱共役:ミトコンドリアは細胞の発電所にたとえられていて、生体のエネルギー通貨であるATP (adenosine triphosphate)を合成している。燃料分子(グルコースなど)からの電子がミトコンドリア内膜の電子伝達系を流れるときに、プロトン(H⁺)が内膜を介して内側(マトリクス)から外側(膜間部)に汲み出され、プロトン濃度勾配が形成される。このプロトン濃度勾配のエネルギーを使ってATP合成酵素がADPとPiからATPが合成される。これが酸化的リン酸化であり、燃料分子を酸化することによって得られた電子のエネルギーを、プロトン濃度勾配を介してADPをリン酸化してATPを合成するのでこの名がある。このとき電子の流れとATP合成の反応が連動しているので「共役(couple)」しているという。ここに、ミトコンドリア内膜に作用して(穴をあけて)プロトン濃度勾配を解消する試薬を加えると、電子は流れる(燃料分子は消費される)けれどもATPは合成されなくなる。このことを「脱共役(uncouple)」といい、そのように作用する試薬を脱共役剤という。

2-1-2 熱ショックタンパク質の検出

リトッサの報告からしばらくは熱ショック応答に関する研究は顧みられることはありませんでしたが、1970年に、画期的なタンパク質の解析方法であるSDS-PAGE(エスディーエス-ページ、と読む)(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)という電気泳動法がラエムリ(Ulrich Laemmli)によって開発されました[9]。この方法は

発表から 50 年近くなりますが、現在でも医学生物学分野のタンパク質を扱う研究では必須の手段です。これほど多用されている実験方法は他にないかもしれません。簡単に説明すると、解析するサンプル(細胞や生体組織)を SDS (sodium dodecyl sulfate) という界面活性剤の入った溶解液で溶解し、タンパク質をすべて変性させます。次にアクリルアミドを重合させた網目状のゲルの中でその溶解したサンプルを、一定の電圧をかけて泳動させます。すると、タンパク質は分子量によって分離し、分子量が小さなタンパク質は早く移動し、大きなものは遅く動きます。そのゲルを、タンパク質を染色する色素で染めると、さまざまなタンパク質がバンドとして検出できるのです(図 2)。この方法では、タンパク質

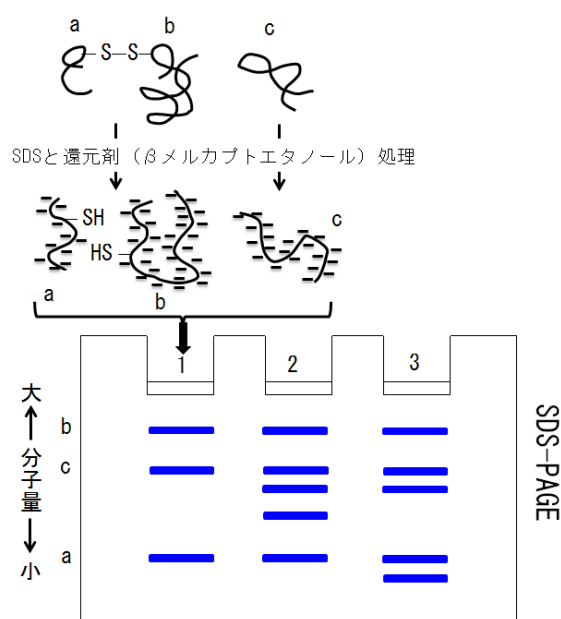


図 2

SDS-PAGE の原理. タンパク質のサンプルを SDS と還元剤(β-メルカプトエタノール)で処理すると、すべてのタンパク質は 1 本鎖のポリペプチドとなり、SDS の負電荷でおおわれる。ジスルフィド結合で結合した 2 つのサブユニット(a と b)からなるタンパク質も単一のポリペプチドになる。そのサンプルを 1 のくぼみ(well)に入れて電気泳動すると分子量の大きさにしたがって移動し、バンドとして検出される。2 と 3 のくぼみには別のサンプルを入れて泳動して現れるバンドを互いに比較する。

の分子量によってゲル中の移動度が異なるので、既知の分子量のタンパク質の移動度との比較から、未知のタンパク質のおおよその分子量を推定することができます。ここで「おおよその分子量」と述べましたが、正確な分子量はアミノ酸配列が決定されて初めてわかるので、SDS-PAGE でわかるのはあくまでも「おおよその分子量」ということになります。

さて、リトッサの熱ショックパフの発見から 10 年以上も過ぎた 1974 年、ショウジョウバエに熱ショックを与えて唾腺染色体で合成されてくるタンパク質を初めて解析したのはティジエレス(Alfred Tissieres)らです[10]。彼らは新しく合成されてくるタンパク質を放射性の $[^{35}\text{S}]$ メチオニンでラベルして解析したところ、熱ショックによって分子量のちがう 6 個のタンパク質が新しく合成されてくることを示しました。しかしまだ heat shock protein という言葉はまだ使っていません。また彼らは熱ショック後に唾腺染色体をやはり放射性の $[^3\text{H}]$ ウリジン(新たに合成される mRNA に取り込まれる)でラベルすると、熱ショックによって形成された数個のパフ(染色体の特定の部位)がラベルされることも示しました。しかし、どのパフからどのタンパク質が合成されるのかの対応はまだわかりませんでした。ただ、6 個のタンパク質のうち分子量約 70 kDa(キロダルトン, Da は質量を表す単位)のタンパク質が他のものより強くラベルされること、また染色体の 87B という部位が非常に強く $[^3\text{H}]$ ウリジンでラベルされることから、87B が 70 kDa のタンパク質をコードしている遺伝子部位ではないかと示唆しています[10]。

特定の染色体部位(87B)とそこから合成されてくるタンパク質(70 kDa タンパク質)との対応関係をはっきり証明したのがリンドクイスト(Susan Lindquist)らの報告です[11]。彼女らはショウジョウバエの個体ではなくショウジョウバエに由来する培養細胞を用いました。細胞に 37°C 1 分間の熱ショックを与えると 4~5 本の新しいタンパク質が合成されてきます(図 3)(先に述べた SDS-PAGE で解析するとタンパク質はバンドとして検出されるので、タンパク質のことを

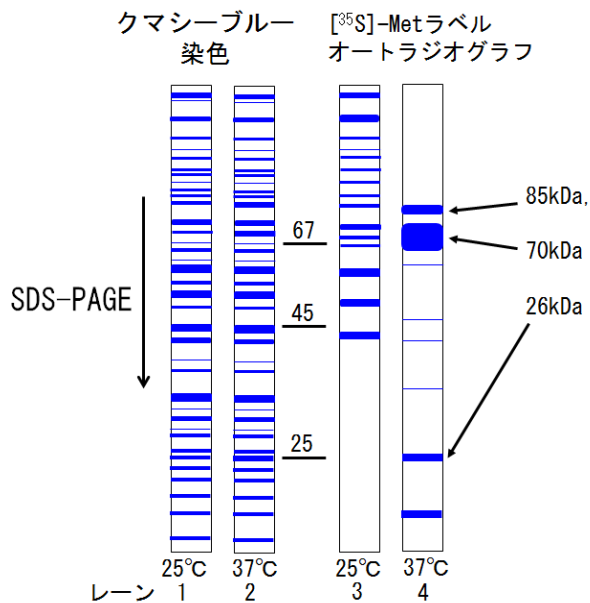


図 3

SDS-PAGE によるショウジョウバエの熱ショックタンパク質の検出。レーン 1 と 2 はタンパク質をクマシーブルーで染色したもので、1 と 2 を比較しても熱ショックタンパク質の検出は困難である。レーン 3 と 4 は ^{35}S メチオニンで新しく合成されたタンパク質をラベルして検出している。レーン 4 では熱ショックによって顕著に合成されてくる 3 つのタンパク質 (Hsp85, Hsp70, Hsp26) が検出される。分子量既知のマーカーが中央に示されている (kDa)。(文献 11 から改変)

1 本, 2 本などと呼ぶことがあります)。そのうち 70 kDa のタンパク質がもっとも顕著に合成されます。次に熱ショックを与えた細胞から mRNA (放射性的 ^3H ウリジンでラベルしておく) を精製してきて、それを元の染色体 DNA とハイブリダイズさせたところ、87B という熱ショックパフに強く結合しました (DNA から合成されてきた mRNA は元の DNA とは相補的になっているので、混ぜ合わせると強く結合します。これは *in situ* hybridization という実験方法です)。つまり 87B という部位には 70 kDa のタンパク質をコードする遺伝子が存在することを意味しています。

リンドクイストらはその後、熱ショックで合成されてきた mRNA を用いた *in vitro* translation 法 (試験管

のなかで mRNA からタンパク質を合成する方法) により、その mRNA から直接 70 kDa タンパク質が合成されることを証明しました [12]。この論文で初めて熱ショックで新たに合成されてくるタンパク質のことが「heat-shock proteins」と表記されています。しかしまだ、「hsp」という略号は使われていません。

1979 年に発表されたアシュバーナー (Michael Ashburner) とボナー (Jose Bonner) によるショウジョウバエの熱ショック応答に関する総説 [13] では、熱ショックで誘導されてくるタンパク質のことを「heat shock polypeptides」とよび、略して「hsps」(最後の s は複数形を意味する) と表記しています。この時点でショウジョウバエにおいて熱ショックで新たに合成されてくるタンパク質は電気泳動で検出できるものとして 8 個わかっていましたが、それぞれを電気泳動上のおおよその分子量で表し、hsp82 (分子質量が約 82 kDa の hsp ということ)、hsp68 などと表記しました。また、それぞれの hsp 遺伝子の染色体上の部位も特定されました。たとえば hsp82 は 63BC, hsp68 は 95D などです。このときには、「hsp」の略号はすべて小文字で表記していました。

このように、ショウジョウバエでの熱ショック応答に関する研究は進みましたが、1978 年ころからは、ようやくそのほかのさまざまな生物でも熱ショックタンパク質の検出が相次ぐようになりました。大腸菌、酵母、ニワトリ、哺乳類、はたまた植物でも検出されるようになったのです。しかしこのころはまだ混乱期にありました。たとえば各生物種で検出される熱ショックタンパク質の分子量は、先に述べたように SDS-PAGE の移動度から推定しますが、その値が研究者によってまちまちでした。また遺伝子の同定も進んでいなかったもので、異なる生物種で分子量がほぼ同じ熱ショックタンパク質の場合、互いに相同性があるのかどうか不明でした。さらに、熱ショックだけでなくさまざまな薬剤や環境要因によって同じ熱ショックパフが活性化されて熱ショックタンパク質が誘導されてきますが、そこに共通する誘導メカニズムが存在するのかどうかまだよくわかりませんでした。

2-1-3 「HEAT SHOCK from Bacteria to Man」

そのような状況のなか、さまざまな生物種の熱ショック応答の研究にたずさわる世界中の研究者が一堂に会して、1982年5月にアメリカニューヨーク州のロングアイランドにある Cold Spring Harbor Laboratory (分子遺伝学研究のメッカといわれている) で会議が開催されました。これはリッッサの熱ショック応答の発見から20周年を記念する会議でした。そしてこの会議での発表内容をまとめた本が出版され、そのタイトルが「HEAT SHOCK From Bacteria to Man」[14]です。まさにバクテリアからヒトまで、熱ショック応答はそれまで調べられた全ての生物で普遍的に起こる現象であることがわかってきたのです。この本でようやく、heat shock protein = hsp と表記されるようになりました。筆者も1983年ころからヒトやマウスの細胞で熱ショックタンパク質の研究を始めていたので、さっそくこの本を取り寄せて、この分野の最先端の研究は今どうなっているのか貪るように読んだ記憶があります。そこには、まだ論文として発表されていない萌芽的な研究成果が多く記載されています。たとえば、大腸菌や酵母、ショウジョウバエの Hsp70 が互いによく似ていること(相同性があること)、ショウジョウバエのいくつかの熱ショック遺伝子上流には共通の塩基配列があること(のちに heat shock element, HSE の発見につながる)、熱ショックタンパク質と温熱耐性との相関性、細胞内の異常なタンパク質が熱ショック応答を引き起こすのではないか(のちにタンパク質毒性 proteotoxic stress による熱ショック応答の誘導という考え方につながる)、などです。この本は、当時の熱ショックタンパク質の研究者にとって一種のバイブルのような存在でした。

この本の参加者リストを見ると、その後のこの分野の大御所となっていく研究者(たとえばモリモト [Richard Morimoto] , リンドクイスト [Susan Lindquist], ハイタワー [Lawrence Hightower] など)に加えて、日本からは由良隆(当時京大ウィルス研究所)や矢原一郎(当時東京都臨床医学総合研究所)の研究グループも参加しています。ちなみに熱

ショック応答に関する Cold Spring Harbor Laboratory における国際会議は、当時研究所長をしていたワトソン (James Watson) のサポートもあったようで、2回目の会議が1991年に開催され、その後2年か3年ごとにほぼ定期的に行われるようになります。私も1994年 (Biology of heat shock proteins & molecular chaperones) と2000年 (Molecular chaperones & the heat shock response) の会議に参加し、いずれも、後述する Hsp40 についてポスター発表を行いました。

Cold Spring Harbor Laboratory の正面玄関に入ったロビーには、高さ3~4メートルほどのDNA二重らせんのモニュメントが飾られており、会議の参加者はこの前で記念写真などを撮影したりしています。ここではさまざまな分野の国際会議が3-4日の日程で開催されますが、最終日前日の夜には室内楽のコンサートがよく行われています。そのコンサートにしばしば所長(後に会長)のワトソンも参加することがあり、運が良ければ会うことができ、写真も一緒にとってくれることがあったようです[15]。残念ながら、筆者にはそのような機会はありませんでした。

2-1-4 大腸菌での熱ショックタンパク質および発現調節機構

大腸菌での熱ショックタンパク質を報告したのは、1978年、日本の由良隆らのグループ[16]およびアメリカのナイドハート (Frederick Neidhardt) らのグループ[17]です。その後二次元電気泳動を用いた解析などにより、約20個の熱ショックタンパク質が同定されました。その中の DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL, GroES, HtpG などとはあとで詳しく述べますが、分子シャペロンとしてタンパク質の折りたたみやタンパク質複合体の形成などに機能しています。また真核生物にはそれぞれに対応する熱ショックタンパク質があることもわかってきました。さらに大腸菌の熱ショックタンパク質には、ATP依存性の(ATP加水分解によるエネルギーを用いて、という意味)タンパク質分解酵素(Lon や ClpA/ClpB)もあります。こ

これらのことから、熱ショックによって誘導されてくる熱ショックタンパク質は、熱によって変性した異常なタンパク質を再び折りたたんだりまたは分解して、異常なタンパク質が細胞内に蓄積しないようにして、細胞を熱などのストレスから防御する機能を持っているのではないかと考えられるようになってきました。ただし、Lon や ClpA/ClpB に対応するタンパク質は真核生物には見つかっておりません。しかし後で述べるように、真核生物ではタンパク質分解に関わるユビキチンが熱ショックによって誘導されることがわかりました。

大腸菌での熱ショックタンパク質の発現制御機構については、1980 年代にはおおよそ解明されています[18, 19]。DNA から mRNA が合成される転写の過程では RNA 合成酵素 (RNA ポリメラーゼ, RNA polymerase) が働きますが、これはタンパク質複合体でそのサブユニットに σ (シグマ) 因子があります。この σ 因子にはいくつかの種類があつて、通常の温度での転写には $\sigma 70$ (分子質量 70 kDa の σ 因子) が転写に関与しています。しかし、大腸菌が熱ショックを受けると別の $\sigma 32$ (分子質量 32 kDa の σ 因子) が合成されて $\sigma 70$ と置きかわり、その $\sigma 32$ が熱ショック遺伝子のプロモーター領域にある共通の塩基配列に結合し、RNA ポリメラーゼは熱ショック遺伝子のみを転写するようになります。つまり転写のスイッチが通常の遺伝子から熱ショック遺伝子に切り替わるのです。非常にうまくできたスイッチ切り替え方法です。

熱ショックのあと大腸菌を通常の温度に戻すと、 $\sigma 32$ 因子は分解されて熱ショックタンパク質の合成は止まります。このとき熱ショックで合成されてきた DnaK や DnaJ, GrpE が $\sigma 32$ 因子に結合して RNA ポリメラーゼから解離させます。解離した $\sigma 32$ 因子は非常に不安定で、速やかに分解されてしまいます。そして、RNA ポリメラーゼにはふたたび $\sigma 70$ が結合して通常の転写を再開します。つまり、熱ショックタンパク質の発現は、自らの合成を担う $\sigma 32$ 因子の分解を促進することで合成が低下する、という負のフィードバックによって制御されていることになり

ます。のちに述べるように、真核細胞での熱ショックタンパク質の発現制御も似たような負のフィードバック機構によって制御されています。

生体内のさまざまな代謝過程や恒常性維持の多くの過程では負のフィードバック機構が働いていますが、この熱ショック応答もその一つ、ということができます。

ここで、大腸菌の熱ショックタンパク質の名前の読み方をまとめておきます。生物学の分野では、一つ一つの遺伝子やタンパク質に名前が付けられていて、アルファベットの略号で表されます。そのことが専門分野以外の人にはわかりにくくなっていることの一つの理由のようです。しかし、ある程度の名前を覚えないと生物学を深く理解することが困難なことも事実です。ここでは今まで出てきた大腸菌の熱ショックタンパク質の読み方をまとめておきます。これらの略号を一つの単語のように発音する場合がありますが、そうでないときにはアルファベットをそのまま発音します。

DnaK (ディーエヌエイケイ)

DnaJ (ディーエヌエイジェイ)

GrpE: ジーアールピーイー

GroEL: グロイーエル

GroES: グロイーエス

HtpG: エイチティーピージー

Lon: ロン

ClpA/ClpB: クリップエイ/クリップビー

2-1-5 各生物種間での熱ショックタンパク質の相同性

1982 年の Cold Spring Harbor Laboratory での国際会議[14]で、まだ論文になっていないデータとして、生物種が違っても分子量がほぼ同じ熱ショックタンパク質は互いによく似ていることが示唆されていました。それぞれの遺伝子が単離されて塩基配列が決定され、それから推定されるアミノ酸配列も含めて論文として発表されたのは 1984 年以降です。

その代表例として、大腸菌の DnaK はショウジョウ

バエやヒトの Hsp70 (分子質量約 70 kDa の熱ショックタンパク質, 以下同じ) はよく似ていることが報告されました[20, 21]. アミノ酸配列で比較すると, ヒトとショウジョウバエの Hsp70 は 73% の相同性 (homology) があり, ヒトの Hsp70 と大腸菌の DnaK でも 47% の相同性であることが分かりました.

ここで, 47% の相同性というのは, たとえば, 大腸菌 DnaK とヒト Hsp70 は約 640 個のアミノ酸からなるタンパク質ですが, その配列を比較してみて 47% のアミノ酸の配列が同じ (同じ位置に同じアミノ酸が配置されている), ということです.

大腸菌の GroEL がさまざまな真核生物のミトコンドリアで発現する分子質量約 60 kDa の熱ショックタンパク質 (Hsp60) との相同性が最初に報告されたのは, テトラヒメナ (繊毛虫の一種で単細胞生物, モデル生物としてよく用いられている) の Hsp60 に対する抗体を用いた実験です[22]. その抗体は大腸菌の GroEL だけでなく, 酵母, ショウジョウバエ, さらに植物のトウモロコシ, ヒトのミトコンドリアに局在する Hsp60 とも反応することがわかりました. 抗体が反応するというのは, 構造的によく似ているということです. もちろん遺伝子レベルでも大腸菌 GroEL と酵母 Hsp60 の相同性が示されています[23].

さらに興味あることには, GroEL が植物の葉緑体に多く認められる 60 kDa のタンパク質と遺伝子レベルで相同性の高いことが示されました[24]. じつは, 植物の葉緑体における光合成反応で, CO₂ を最初に固定する反応を触媒するのはルビスコ (Rubisco: Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase) と呼ばれる酵素で, 植物の葉には大量に存在しています. 植物の葉の全タンパク質の約 50% がこのルビスコと見積もられており, しばしば地球上で最も多いタンパク質ともいわれています. このルビスコに結合する 60 kDa のタンパク質が大腸菌の GroEL と相同性があるということです. このタンパク質はシャペロニン 60 (chaperonin 60, Cpn60) と名付けられ, のちに述べる分子シャペロン (molecular chaperone) という考え方の確立に貢献しています. このように原核生物 (大腸菌) の GroEL が, 真核生物のミトコン

ドリアに存在する Hsp60 や葉緑体に局在する Cpn60 と相同性があるということは, 真核生物のミトコンドリアや葉緑体が原核生物との共生によって生じてきたことを示唆する証拠の一つと考えられています.

ショウジョウバエの Hsp83 (のちに HSP90 ファミリーの一つに分類された) と大腸菌の HtpG との相同性も示されています[25].

1990 年当時, 大腸菌 DnaJ の相同体として酵母で Sec63 (セック 63) や SIS1 (シス 1) も同定されましたが, 哺乳類での相同体はまだ見つかっていませんでした. あとで述べるように, 哺乳類の DnaJ 相同体としては, 筆者の発見した Hsp40 が最初の報告になります.

以下に, 1990 年当時の原核生物 (大腸菌) と真核生物 (酵母, ショウジョウバエ, ヒトなど) のおもな熱ショックタンパク質の相同性についてまとめてみました. 生物種が違っても熱ショックタンパク質のアミノ酸配列がよく似ているということは機能も似ていることを示唆していますが, そのことについては後述することにします.

原核生物: 真核生物

DnaK : Hsp70

GroEL : Hsp60, ルビスコ結合タンパク質 (Cpn60)

GroES : Hsp10

HtpG : Hsp90

DnaJ : 酵母の SIS1, Sec63

このようなことから, 熱ショック応答はまさにバクテリアからヒトまで普遍的な現象であり, 合成されてくる熱ショックタンパク質もよく似たアミノ酸配列を持っています. つまり, 進化的によく保存されていることを意味しています. 「進化的によく保存されている」というフレーズはよく使われますが, これは, バクテリアもヒトも共通の祖先から進化してきており, その共通の祖先が獲得した熱ショック応答などの生物機能が現在の地球上のすべての生物に受け継がれているということです. 生物はストレスの充満する地球上でそのストレスにうまく対処するための防御機

構を保ち続けているのです。

生物における熱ショック応答のもう一つの観点は、熱ショックタンパク質は通常はほとんど合成されていなくて、DNA の中に情報として蓄えられていることです。料理にたとえると、料理を作り置きしているのではなくレシピとして保存しておき、必要なときにはそのレシピを元にして必要なだけ料理を作る、ということです。当たり前といえば当たり前ですが、非常に理にかなっていて資源の節約にもなっています。

2-1-6 イントロンのない Hsp70 遺伝子-ストレスにすみやかに対応できる-

大腸菌などの原核細胞の遺伝子は、一つのタンパク質を規定している遺伝子(DNA)はひとつながりの塩基配列でできていて、途切れてはいません。ところが、ほとんどの真核生物では遺伝子のタンパク質を指定する塩基配列が、タンパク質には翻訳されない介在配列(イントロン)によって分断されています。タンパク質に翻訳される部分はエキソン

と呼ばれています(図4)。イントロンの塩基の長さは数個から1万個以上の場合もあります。またエキソンの数が数個から数十個のものまで、遺伝子によってさまざまです。DNA から mRNA が合成されるときにはイントロンも含めて一緒に転写されて mRNA 前駆体ができてきます。しかしこのままではタンパク質に翻訳されないイントロンの配列が邪魔になります。そこで、スプライシング(splicing, つなぎ換え)という過程でイントロンを切り取ってエキソンだけの mRNA にする必要があります。いわば、余分な部分を削除して必要な部分だけをつなぎ編集作業のようなもので、非常に手間のかかる過程です。こうしてできた成熟 mRNA がリボソーム(タンパク質合成装置)に運ばれてタンパク質が合成されることとなります。

このスプライシングの過程は非常に熱に弱く、シヨウジョウバエの培養細胞で調べたところ、強い熱ショックのあとスプライシングが阻害されて、正常温度にもどしてから2~3時間するとようやく回復してきます。ところがあらかじめ弱い熱ショックを与えてお

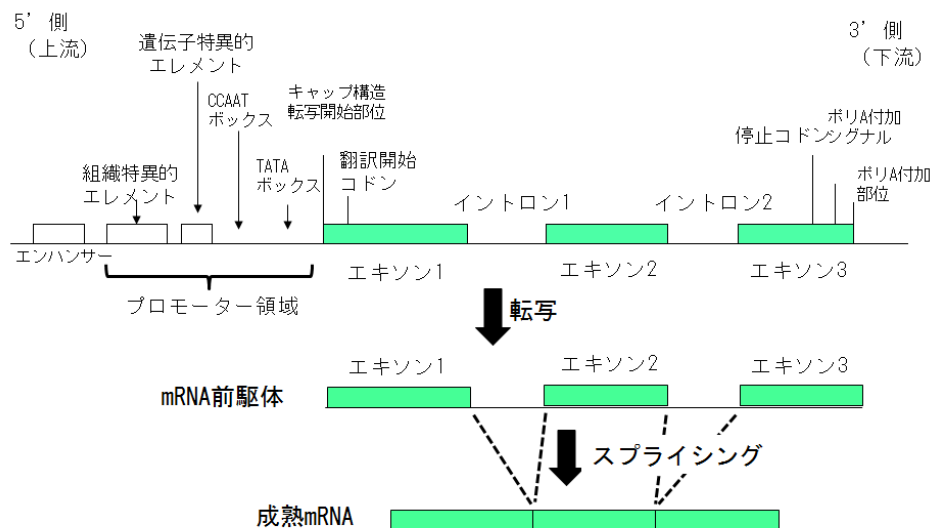


図4

哺乳類の遺伝子の一般的な構造。遺伝子のうちタンパク質をコードする配列(ここではエキソン1~3)は2つのイントロン(1と2)に分断されている。その5'上流側には転写を制御するプロモーター領域やエンハンサーがある。プロモーター領域には転写の開始に関与する塩基配列がある。TATAボックスやCCAATボックスはほとんどの遺伝子に共通して存在する配列である。遺伝子特異的エレメントとは熱ショックエレメント(HSE)などのことである。組織特異的エレメントとは特定の組織で発現するのに関わる配列である。また、転写されるときには、まずイントロンも一緒に転写されて mRNA 前駆体が合成される。そのあとスプライシングという過程でイントロン部分が切り取られてエキソンだけの成熟した mRNA となる。

くと、強い熱ショックによるスプライシングの阻害が軽減することが示されました[26]。スプライシングの過程も温熱耐性になるということです。温熱耐性とは、細胞が強いストレスを受けるとさまざまな細胞機能が損傷を受けますが、あらかじめ軽いストレスを受けていると強いストレスによる損傷が軽減する現象のことをいいます(詳しくは 1-7 の項に詳述)[2]。

さて、熱ショックタンパク質の遺伝子のうち真核生物の Hsp70 遺伝子は、じつはイントロンがないことが分かってきたのです[27, 28]。ほかの Hsp90 や Hsp28 などの遺伝子はイントロンが存在します。あとで述べるヒト Hsp40 遺伝子も 3 つのエキソンからなっています。Hsp70 遺伝子にイントロンがないということは、熱ショックによるスプライシング抑制を回避し、ストレスに対応してすみやかに Hsp70 タンパク質を合成して細胞を防御できることになります。実際、熱ショックのあと Hsp70 の合成はすみやかに起こり量も多く合成されますが、Hsp90 や Hsp28, また他の一般的なタンパク質の合成は少し遅れて合成されてきます[26]。

このように、生物は遺伝子のレベルでも熱などのストレスの緊急事態に対してすみやかに対応できるような巧妙なしくみを備えていることになります。

2-1-7 引き金はこわれたタンパク質—タンパク質毒性 (Proteotoxicity)という考え方

リトッサによるショウジョウバエでの熱ショック応答研究の初期から、熱だけではなくさまざまな化学物質などの要因でもこの反応が引き起こされることがわかっていました[13]。しかしそれらの要因には共通するような性質はありません。それではどのようなメカニズムで熱ショック応答は引き起こされるのでしょうか。この問いに対するヒントになる研究がありました。それは、ハイタワー (Lawrence Hightower) の実験です[29]。彼はニワトリの培養細胞にアミノ酸の一つ、アルギニンのアナログであるカナバニン(構造が少しだけ違う化合物で性質はアルギニンに似ている)、またはタンパク質合成阻害剤であるピュロマイシンを添加すると熱ショックタンパク質が誘導さ

れてくることを見出しました。タンパク質が合成されるときにアルギニンの代わりに構造的に少し違うカナバニンが取り込まれると、タンパク質の立体構造が少し異常に (abnormal) なります。一方ピュロマイシン処理では、タンパク質合成が途中で阻害されて未成熟なポリペプチドがリボソームから遊離してきます。それも正しく折りたたまれないので構造的には異常なタンパク質です。このようなことから彼は、異常な構造をしたタンパク質 (abnormal protein) の存在が熱ショック応答の引き金になるのではないかと考えました。ハイタワーらは、さらにこのことを確かめるために、熱ショックを与えるときに細胞を重水 ($^2\text{H}_2\text{O}$) やグリセリンで処理しておく、熱ショック応答が抑制されることを示しました[30]。重水 ($^2\text{H}_2\text{O}$) やグリセリンはタンパク質の構造を安定化する作用があります。つまり重水やグリセリンによって細胞内のタンパク質が安定化し、熱ショックによるタンパク質の変性の程度が減少したので熱ショック応答も低下した、と彼は解釈しました。

その後大腸菌でも、カナバニンやピュロマイシン処理[31]、またあるタンパク質の未成熟な変異体[32]を合成させると、やはり熱ショックタンパク質が誘導されてくることが確かめられました。さらにきわめつけは、カエルの卵に注射針で直接変性したタンパク質(ウシ血清アルブミン)を注入しても熱ショック応答が起こる、という実験です[33]。しかし、同じタンパク質でも変性していない場合は熱ショック応答が起こりません。

このような経緯から、ハイタワーは、1991 年に Cold Spring Harbor Laboratory で開催された「Stress Proteins and The Heat Shock Response」の会議報告で、タンパク質毒性 (proteotoxicity) をもつストレスが熱ショック応答の引き金になるという考え方を提案しています[34]。つまり、熱ショック応答はさまざまな要因によって誘導されますが、それらの要因そのものにはほとんどといっていいほど共通の性質はありません。しかしそれらの要因はタンパク質の構造を変化させる(変性させる)ということでは共通しているのではないかと、ということです。このタンパク質毒性

という言葉は、遺伝子毒性 (genotoxicity) になぞらえたものです。放射線や紫外線、また DNA に損傷を引き起こす化学物質 (たとえば発がん物質) などは、遺伝子に傷をつけるので遺伝子毒性をもつといわれています。これに対して、熱ショック応答を引き起こす要因はタンパク質に傷をつける (構造を変化させる、変性させる) ので、タンパク質毒性をもつ、というわけです。

またハイタワーは、熱ショックタンパク質はさまざまなストレスで誘導されるので、ストレスタンパク質 (stress protein) と呼ぶことを提案しています。熱ショックタンパク質やストレスタンパク質という言葉は、熱などのストレスで誘導されてくるタンパク質のことを言っているだけで、機能を表した言葉ではありません。ちょうど 1990 年頃、熱ショックタンパク質が分子シャペロンとしての機能を持っていることがわかり始めた時期でもあり、彼は熱ショックタンパク質のことを分子シャペロンと呼ぶことも提案しています。その後この両者はほぼ同じ意味で用いられるようになりました。分子シャペロンとは、他のタンパク質の折りたたみや複合体形成を手助けする介添タンパク質のことをいいます。このことについては項を改めて述べることにします。

それでは、異常な構造をしたタンパク質がどのようにして熱ショック応答を引き起こすのでしょうか？ この問いに答えるためには、2 つのことを話さなければなりません。1 つめは DNA 上の共通の塩基配列 (熱ショックエレメント)、2 つめは、その塩基配列に結合して転写を促進する転写因子の話です。

2-1-8 熱ショック遺伝子のプロモーターに存在する共通の塩基配列-熱ショックエレメント (heat shock element, HSE)

1970 年代の末頃にはショウジョウバエの分子量の違ういくつかの熱ショックタンパク質の遺伝子が同定され、それぞれの遺伝子も単離されてきました。しかしそれらの遺伝子の塩基配列もまたタンパク質のアミノ酸配列もおたがいに全く相同性はありませんでした。それではなぜ同じ熱ショックによっ

てこれらの遺伝子が同じように発現するのでしょうか。DNA の塩基配列にはタンパク質をコードする (アミノ酸配列を規定する) 部分の他に、5' 上流側にはその遺伝子の発現を調節する部分 (プロモーター領域と呼ぶ) もあります (図 4)。イギリスのパラム (Hugh Pelham) は、ショウジョウバエで各熱ショック遺伝子のプロモーター領域に共通する塩基配列があるのではないかと考えて配列を決定したところ、よく似た共通配列 (consensus sequence) を発見しました [35]。それは、

CTnGAAnnTTCnAG

という配列です (n は任意の塩基、つまり 4 つの塩基のどれでもよい)。調べた 7 つの熱ショック遺伝子すべてのプロモーター領域にこの配列がありました。彼はこの配列を heat shock element (HSE, 熱ショックエレメント) と名付けました。また彼は、この HSE 配列を人工的に合成して、熱ショック遺伝子ではないチミジンキナーゼ (thymidine kinase) という遺伝子につなげて細胞に導入し、その細胞に熱ショックを与えるとチミジンキナーゼが誘導されてくることを示しました [36]。まさに、HSE が熱ショックによって遺伝子が発現するのに必須な塩基配列ということになります。

ちなみに、この、特定の遺伝子のプロモーター部分を切り取って全く関係のない別の遺伝子につなげて、遺伝子発現におけるそのプロモーターの役割を調べるというペラムの方法は、その後レポーターアッセイとして、分子生物学分野で多用されるようになります。

話題を元にもどして、HSE の塩基配列をよく見ると、その DNA 二本鎖の相補的な塩基配列はパリンδροーム (回文構造) になっていることが分かります。つまり、

HSE: CTnGAAnnTTCnAG

相補的な DNA: GAnCTTnnAAGnTC

となり、上と下の塩基配列は逆から読むと全く同じ配列になっています。

ペラムはショウジョウバエだけの HSE を解析しましたが、その後さまざまな真核生物(酵母からヒトまで)の HSE が調べられており、驚くべきことに植物も含めてすべての真核生物で全く同じ塩基配列の HSE が存在することが分かりました。

リス(John T. Lis)らは、HSE をさらに詳しく解析し、基本的には以下の 5 つの塩基が 1 つの単位となり、この単位が 2 個から 4 個並んだ配列が最小の HSE として機能することを明らかにしました[37]。

5 つの塩基(1 つの単位配列)を 5 塩基単位とします。

nGAAn

nCTT n(相補鎖)

5 塩基単位が 2 個、または 3 個並んだ配列は以下のようになります(これらが最小の HSE として機能する)。

nGAAnnTTCn

nCTTnnAAGn(相補鎖)

nGAAnnTTCnnGAAn

nCTTnnAAGnnCTTn(相補鎖)

さらにリスらは、

nGAAnnTTCn ①

という 5 つの塩基の並びが、順番が逆、つまり

nTTCnnGAAn ②

という配列でも HSE として機能することを示しました[38]。

①の配列は二本鎖では

nGAAnnTTCn

nCTTnnAAGn(相補鎖), となり、これを③とします。

②の配列は二本鎖では

nTTCnnGAAn

nAAGnnCTTn(相補鎖), となり、これを④とします。

この 5 塩基の配列で方向性を考えて、nGAAn を → (右向き矢印)で表すと、

③の配列は

→ ← となり、これを head-to-head 配列、

④の配列は

← → となり、これを tail-to-tail 配列、と便宜的に表します。

5 塩基単位(nGAAn)を右向き矢印(→)で表すとして、HSE をよく調べてみると、

2 個の 5 塩基単位(→ ←, または← →)

3 個の 5 塩基単位(← → ←)

さらには 4 個の 5 塩基単位(← → ← →)

という配列が確認されます。

さらに、2 個から 4 個の 5 塩基単位がひとまとまりになって一つの HSE を構成し(これを HSE I とする)、少し離れたプロモーター部位に合わせて数個の HSE (HSE II, HSE III, HSE IV, など)が存在している熱ショック遺伝子もあります。5 塩基単位(nGAAn)の数が多いほど、熱ショックによってより強く誘導される傾向にあります。ちなみにショウジョウバエの Hsp70 遺伝子には 4 つの HSE (HSE I ~ HSE IV)が存在しているので非常に強く誘導されます[37](図 3 参照)。

次の項で述べるように、この HSE に熱ショック転写因子である HSF1 (heat shock factor 1) が結合するのですが、HSF1 は熱ショックによって活性化すると単量体から 3 量体になります。この 3 量体のうちの一つのサブユニットが、上述の HSE の一つの 5 塩基単位(nGAAn)に結合することがわかっています。

HSE として機能するためには 1 つの 5 塩基単位(nGAAn)では不十分で、最低 2 個の 5 塩基単位(nGAAn)が必要です。つまり、HSF1 の 3 量体のうち 2 個のサブユニットが 2 個の 5 塩基単位

(nGAAn)に結合することで、HSF1 が DNA にしっかりと結合して安定化し、転写が活性化されることになります[37].

以上のように、HSE 配列について少し詳しく述べましたが、非常に詳細に解明されています。

2-1-9 熱ショック転写因子(heat shock factor, HSF)の同定

前項で述べた、熱ショックタンパク質遺伝子のプロモーター部位の HSE (heat shock element) がわかってきたことで、今度はその HSE に結合して熱ショック遺伝子の転写を促進するタンパク質(熱ショック転写因子, heat shock factor, HSF)の同定、および遺伝子単離の競争が始まりました。方法は、HSE 配列を含む 20~30 塩基のヌクレオチドを人工的に合成して放射性の [^{32}P] (DNA にはリン酸 P が含まれている) でラベルします(これを *HSE と表します)。この *HSE と細胞溶解液と混ぜて、*HSE と結合するタンパク質を検出します。熱ショックを与えた細胞の溶解液では *HSE と結合するタンパク質が検出されますが、対照の細胞では検出できません。このことを指標にして目的のタンパク質を精製していきます。

1980 年代後半から 90 年代にかけてさまざまな生物種の HSF1 の遺伝子の単離がつぎつぎと報告されました。酵母[39]、ショウジョウバエ[40]、植物(トマト)[41]、マウス[42]、ヒト[43]などです。このような場合、それぞれの研究者は同じ生物種だと競争に負けたときにその成果は二番煎じになるので、それを避けるためにもおたがいに別の生物種を使って研究を進めるようです。

その後、HSF の遺伝子解析が進み、酵母、線虫、ショウジョウバエでは 1 個の HSF しかありませんが、ニワトリ、マウス、ヒトでは 4 個の HSF が確認されました(4 個はそれぞれ番号が付けられていて、HSF1、HSF2、HSF3、HSF4 と名付けられています)。これらのうち HSF1 が熱ショックなどのストレスを受けたときに活性化して熱ショックタンパク質を誘導します。

これまで述べてきた熱ショック応答に関して、遺

伝子のプロモーター領域にある HSE や、そこに結合して転写を活性化する転写因子 HSF の研究は、ある刺激で活性化するほかの遺伝子のモデル研究となりました。たとえばステロイドホルモンで活性化する遺伝子では、不活性な転写因子にそのホルモンが結合すると活性型となって DNA の特定の塩基配列を認識して結合し、その遺伝子が転写されることとなりますが、これらの塩基配列や転写因子の同定にも、熱ショック応答に関する研究が参考になっています。

2-1-10 熱ショック転写因子(HSF)の活性化機構

生物種は違っても HSF はお互いによく似た構造と機能を持っています。ここでは HSF1 がどのような機構で活性化されるかを解説します。

まず、ヒト HSF1 は 529 個のアミノ酸からなるタンパク質です。そのドメイン構造が図 5A に示されています。タンパク質はアミノ酸が数珠状につながったヒモ状の構造ですが、一定の数のアミノ酸がまとまってある機能を持つ領域(ドメイン)を形成しています(もちろん、機能するためには立体的に折りたたまれて 3 次元構造になる必要があります)。図 5A に示すように、HSF1 のアミノ末端(N 末端)あたりには DNA 結合ドメイン(DBD)、中央付近には制御ドメイン(RD)やヘプタッドリピート(HR-A, B, C)、カルボキシ末端(C 末端)にはトランス活性化ドメイン(TAD)などが存在しています[44]。

ストレスのない通常時には HSF1 は単量体として細胞質に存在し、不活性な(転写活性のない)状態にあります。細胞がストレスを受けると HSF1 は 3 量体となり、活性化して核内に移行し、熱ショック遺伝子のプロモーター領域にある HSE に結合し、転写を開始させます(図 5B)。この過程で HSF1 はリン酸化などの翻訳後修飾を受けることが知られています。

じつは、不活性な状態にある HSF1 には熱ショックタンパク質(Hsp90, Hsp70, Hsp40)が結合していて機能が抑制されているのです。ストレス(タンパク質の構造を変化させる)を受けると、細胞内に部分

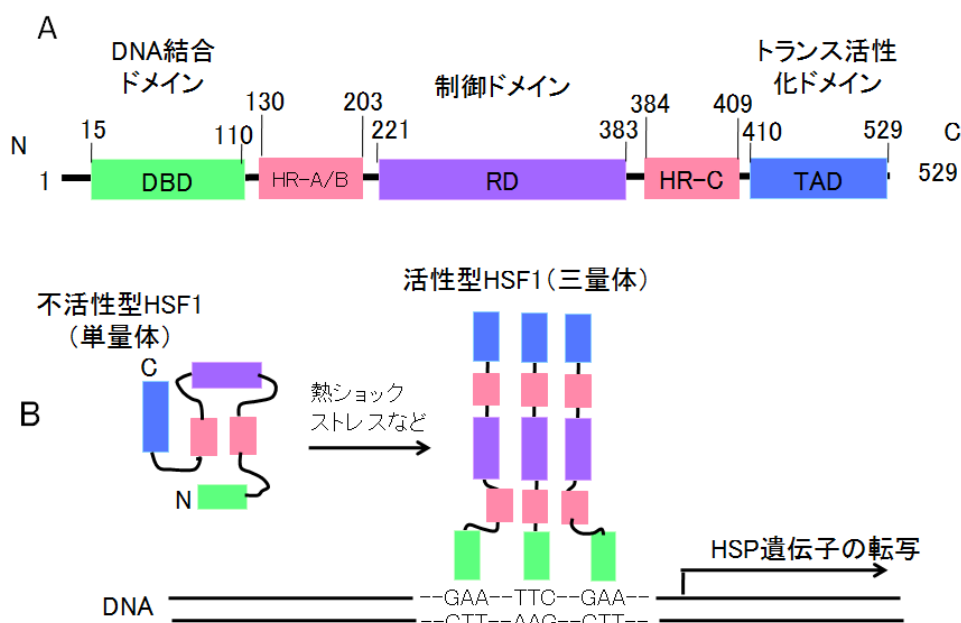


図 5

A. ヒト HSF1 のドメイン構造. B. HSF1 の活性化による三量体形成と HSE への結合. (詳しくは本文参照)

的に変性したタンパク質が生じてきますが, Hsp90 や Hsp70 はそれらの変性したタンパク質に結合するように, HSF1 からは解離します. フリーになった HSF1 は 3 量体となって活性型となり, 転写を促進することになるのです(図 6).

このことが, 先に 2-1-7 の項で述べた, 「壊れた(変性した, 異常な)タンパク質が熱ショック応答の引き金になる」ということの意味です. 細胞は, 「転んでもただでは起きない」ということなのかもしれません. 細胞はストレスを受けてなすがままにされているわけではなく, ストレスで生じた壊れたタンパク質をうまく活用して熱ショック応答を引き起こして細胞の防御機能を活性化しているとも考えられます.

その後合成されてきた Hsp90 や Hsp70 が細胞内に増えてくるとまた HSF1 に結合して不活性型になってしまいます. つまり負のフィードバックによって制御されているのです. モリモト (Richard Morimoto) は, この一連の過程のことを HSF1 サイクルと呼んでいます[45]. これは, 2-1-4 の項で述べたように, 大腸菌での熱ショックタンパク質合成の制御機構とよく似ています.

余談になりますが, モリモト (Richard Morimoto)

は, 熱ショックタンパク質, 分子シャペロン研究分野の大御所の一人です. Cold Spring Harbor Laboratory や Gordon Research Conference での国際会議のオーガナイザーとしても活躍しています. 著者も何度が国際会議などでお会いしたことがあります.

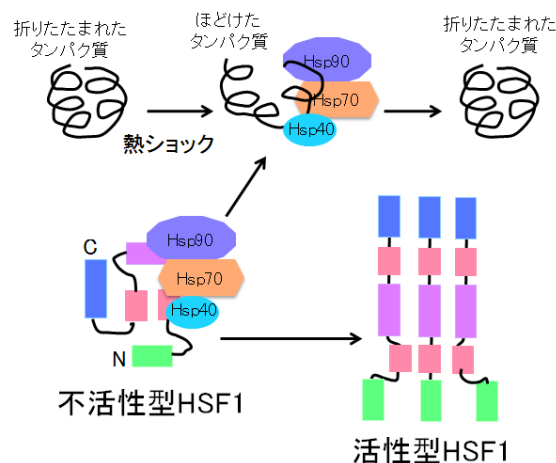


図 6

熱ショック転写因子 1 (heat shock factor 1, HSF1) の活性化機構. 通常 HSF1 には熱ショックタンパク質 (Hsp90, Hsp70, Hsp40 など) が結合していて不活性な状態にある. 熱ショックなどのストレスを受けて生じてきた, ほどけた(変性した)タンパク質にこれらの熱ショックタンパク質が結合するので HSF1 がフリーになる. フリーになった HSF1 は三量体となって活性化する.

ます。最初に会ったのは 1986 年の 12 月、アメリカミズーリ州セントルイスにあるワシントン大学に彼が招待されて講演に来ていたときです。私はこのときワシントン大学に留学して間もないころでした。私も彼の講演を聞いていましたが、彼の話す英語がうまいので感心していました。一緒に聞いていた日本人の友人も、「なんと流暢な英語を話す日本人なんだろう」と、驚いていました。モリモトは講演の後に私のボス (Andrei Laszlo) の研究室に立ち寄りました。そこで話していたら、彼は「I am sansei (三世)」と言ったので、私は彼の英語のうまさを納得した次第です。彼の正式な名前は、Richard I. Morimoto ですが、ミドルネームの I は、Isamu (イサム) という日本名ということも話してくれました。なお、モリモトと永田和宏との対談記事が、特定領域研究「タンパク質の一生」(領域代表: 吉田賢右) の情報誌 No.12 に紹介されています。モリモトがどのような経緯で熱ショックタンパク質を研究するようになったか、などの経歴が詳しく述べられています[46]。

2-2 新たな熱ショックタンパク質の発見

1980 年代半ばまで熱ショックタンパク質はおもに一次元の SDS-PAGE という電気泳動法 (2-1-2 参照) で検出されていました。この方法で、分子質量が約 100 kDa, 90 kDa, 70 kDa, 60kDa, そして 20-30kDa の 5 種類ほどの熱ショックタンパク質が同定されていました。この方法では泳動距離が長くてもせいぜい 10 cm ほどであり、検出できる全体のタンパク質も多くて 20~30 本 (バンドとして検出される) 程度です。哺乳類では数万から 10 万個ほどのタンパク質があると見積もられているので、一次元の SDS-PAGE では検出の限界もあり、まだ見つからない熱ショックタンパク質もあるのではないかと予想されていました。以下に、別の検出方法で見つかった新たな熱ショックタンパク質をいくつか紹介します。

2-2-1 ユビキチンも熱ショックタンパク質

ユビキチン (ubiquitin) というのは、ほとんどすべ

ての生物にあまねく (ubiquitous に) 存在するタンパク質ということで名付けられた分子量約 8,000 Da の分子 (アミノ酸 76 残基) です[47]。この論文は 1975 年に発表されていますが、当時はこれほどの広い範囲の生物に存在するタンパク質はあまり見つかっていなかったもので、ユビキチン (ubiquitin) という名前でもよかったのかもしれませんが。その後、熱ショックタンパク質も含めてバクテリアからヒトまであまねく存在しているタンパク質が多く確認されています。

さて、このユビキチンはその後、細胞内のタンパク質分解において、分解の目印になるタンパク質であることがわかってきました。かいつまんで説明すると、分解すべき標的のタンパク質 (変性したタンパク質や、正常な生理機能の過程で分解されるタンパク質、など) にユビキチンが 10 個ほどつながった状態で (ポリユビキチンと呼ぶ) 結合します。このポリユビキチン化を触媒するのに 3 種類の酵素 (E1, E2, E3) が必要です。そしてポリユビキチン化されたタンパク質は、そのポリユビキチンが目印になってプロテアソーム (proteasome) というタンパク質分解装置によってアミノ酸まで分解されます。このユビキチン-プロテアソーム系はタンパク質を 1 個 1 個分解するシステムです。

ちなみに細胞内でのタンパク質分解にはもう一つのリソソーム (lysosome) 系がありますが、こちらは分解すべき多くのタンパク質を袋に詰め込んで一斉に分解するシステムです。ユビキチン-プロテアソーム系とリソソーム系は、一種のゴミ (壊れたり不要になったタンパク質) 処理装置といえます。この両方が正常に機能して、細胞内の不要なタンパク質や異常なタンパク質を分解して、細胞内におかしなタンパク質が蓄積しないようにしているのです。

このユビキチンが、なんと熱ショックによって誘導されてくることがわかったのです[48]。シュレジンガー (Milton J Schlesinger) らはニワトリ細胞で、熱ショックを与えた細胞から分取した mRNA を解析し、その中の一つにユビキチンを合成するものがあることを示しました。さらにその mRNA を用いてニワトリのユビキチン遺伝子を調べたところ、プロモーター部

位に熱ショックエレメント(HSE)配列があることも確認しました[49].

また、酵母では4つのユビキチン遺伝子(*UBI1*~*UBI4*)が知られていますが、そのうちの *UBI4* が熱ショックで誘導されてきます。この *UBI4* 遺伝子を破壊してしまうと、熱やアミノ酸誘導体の処理に弱くなってしまいます[50]。さらに分解すべき標的タンパク質のユビキチン化に関わる酵素(E2:ユビキチン付加酵素)も熱ショックで誘導されてきます[51]。

真核生物では、原核生物とはちがったやり方で異常なタンパク質を処理しています。つまり、熱ショックなどのストレスを受けた細胞内で、変性した異常なタンパク質が生成してきたとしても、それらの分解に関わるユビキチン-プロテアソーム系の一部のタンパク質も誘導することで、おかしいタンパク質をすみやかに廃棄処分してしまうのです。これも細胞の巧妙な仕掛けの1つです。

なお、ユビキチンが先に述べた SDS-PAGE という電気泳動法で検出できなかったのは、分子質量が約 8 kDa と比較的小さかったからかもしれません。通常の SDS-PAGE では、分子質量 10 kDa 以下のタンパク質は検出できないからです。

2-2-2 Hsp47 -コラーゲン専用分子シャペロン-

Hsp47 は日本人の永田和宏によって意図しない実験によって偶然発見された熱ショックタンパク質です。永田はアメリカメリーランド州にある NIH (National Institute of Health) の、細胞外マトリックスなどを研究していたヤマダ (Kenneth M Yamada) の研究室で、ニワトリ細胞を用いてコラーゲンに結合するタンパク質を調べていたところ、47 kDa のタンパク質を同定しました[52]。しかし、コラーゲンは細胞外にあって細胞集団である組織の構築を維持しているマトリックスタンパク質です。しかし 47 kDa タンパク質は細胞内の小胞体に存在します。コラーゲンは細胞内で合成され、小胞体からゴルジ体を經由して細胞外に分泌されますが、47 kDa タンパク質は小胞体内でコラーゲン分子が成熟する過程で結合していることがわかってきました。

また永田は、ニワトリ細胞を形質転換(がん化)させるウィルス(Rous sarcoma virus)を導入すると 47 kDa タンパク質の発現量が低下することも見出しました[52]。そこで、このウィルスによる細胞形質転換と 47 kDa タンパク質の発現量との関係を詳しく調べるために、温度感受性のウィルスを細胞に導入し、温度を変化させて 47 kDa タンパク質の発現量を調べました。ところが、対照としてウィルスを導入しない細胞を 42°C や 45°C で加温ただけでこのタンパク質の発現が増加することが判明したのです[53]。そこで彼はこの 47 kDa タンパク質を Hsp47 と名付けました。二次元電気泳動法の解析により、Hsp47 はかなり塩基性(等電点 pI が 9.0)であることもわかりました。これが Hsp47 発見の経緯です[54]。

その後、永田らは精力的に Hsp47 の機能を解析しました。コラーゲンは小胞体に結合したリボソームで合成されて小胞体内にポリペプチドが伸びてきます。最初は1本鎖のプロコラーゲンとして存在し、それらが次第に集まってきて3本鎖のコラーゲンが形成されていきますが、Hsp47 は3本鎖のコラーゲンに結合してその成熟を手助けしています。3本鎖のコラーゲンは Hsp47 と結合したままゴルジ体に移行していきます。そこで Hsp47 は解離してコラーゲンは細胞外に分泌され、Hsp47 はふたたび小胞体に戻ってきて再利用されます。Hsp47 の遺伝子を破壊すると、コラーゲンがうまく形成されず、マウス個体では生後 11 日ほどで致死となることも示されています。

このように Hsp47 はコラーゲンのみに結合するという性質を持っています。他の熱ショックタンパク質(Hsp90 や Hsp70 など)は分子シャペロンとして他のさまざまなタンパク質と相互作用しますが、Hsp47 はどうもコラーゲン専用の分子シャペロンではないかといわれています[55, 56]。もう一点、Hsp47 について不思議なことは、その遺伝子が哺乳類、ニワトリ、魚類では確認されますが、ショウジョウバエや線虫、ウニなどでは Hsp47 の相同体が見つからないことです[54]。したがって、Hsp47 は進化的には遅れて出現してきた遺伝子ということになりますが、熱シ

ョックタンパク質の多くはバクテリアからヒトまで共通して存在しているのとは、対照的です。

なお、永田は日本を代表する分子シャペロン研究者ですが、1997年から2001年まで、文部科学省の重点領域研究「分子シャペロンによる細胞機能制御」の領域代表を務めています。そのときこの分野のさまざまな情報を発信する情報誌として「Chaperone Newsletter」を創刊し、5年間でNo.9まで発行しています。この情報誌は、引き続き特定領域研究「タンパク質の一生」(領域代表:吉田賢右, 2002年~2007年), さらに2008年~2012年には特定領域研究「タンパク質の社会」(領域代表:遠藤斗志也)と引き継がれ、総計でNo.24まで発行されました。これらは全てウェブサイトで閲覧できます。そのときどきの国際会議の meeting report や、最先端の研究内容、研究の裏話、さらにこの分野の世界の第一人者へのインタビュー記事など、興味ある記事が満載です。私もNo.1に記事を書かせていただきました[57]。

ちなみに永田和宏は歌人としても著名な方で、毎年正月、皇居で開催される歌会始の選者を長年務めています。一般世間では歌人としてよく知られています。科学者としても一流、歌人としても一流、なかなか凡人にはない才能の持ち主として筆者も尊敬しています。

2-2-3 Hsp40 の発見

Hsp40 は筆者が哺乳類で初めて見出した熱ショックタンパク質です。筆者は、1986年から2年間アメリカミズーリ州・セントルイスにあるワシントン大学で、ラツロー(Andrei Laszlo)とHsp70の抗体を用いてHsp70の細胞内局在などを調べていました[58]。1988年に帰国後、愛知県がんセンター研究所でこれから何を研究していくのか考えていましたが、すでにわかっている熱ショックタンパク質を研究対象とするには世界的にも競争が激しくなることが予想されました。そこで1人前の研究者としてやっていくには新しい熱ショックタンパク質を見つけなければならないと強く思っていました。当時、熱ショックタンパ

ク質の検出は、一次元の SDS-PAGE よりも多くのタンパク質を解析できる二次元電気泳動法が主流になっていました。以下に、二次元電気泳動法について解説します。

二次元電気泳動法というのは、1975年にオフアーレル(P.H. O'Farrell)によって報告された方法です[59]。これはタンパク質のもつ等電点(isoelectric point, pI)と分子量という2つの互いに異なる性質を利用して分離する方法です。つまり、一次元目では等電点の差によって分離し(等電点電気泳動)、二次元目では SDS-PAGE を用いて分子量によってタンパク質を分けます。その結果、個々のタンパク質はスポットとして平面(二次元)に分布します(図7)。もう少し詳しく述べると、一次元目は細いガラス管を用いて、電圧をかけると pH 勾配が形成される試薬

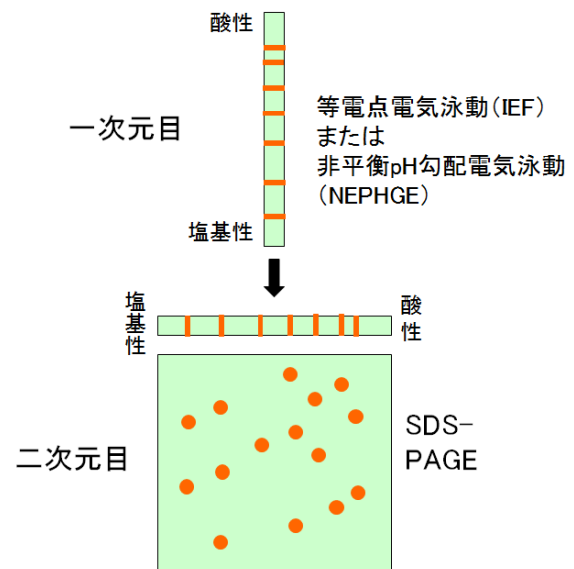


図7

二次元電気泳動法の原理。一次元目はガラス管のなかで等電点の違いによりタンパク質を分ける。等電点電気泳動(isoelectric focusing, IEF)と、非平衡 pH 勾配電気泳動法(non-equilibrium pH gradient electrophoresis, NEPHGE)の2種類の方法がある。一次元目のゲルを横たえて二次元目の平板のゲルの上に乗せて二次元目の SDS-PAGE を行う。個々のタンパク質はスポットとして検出される。オレンジ色のバンド(一次元目)およびスポット(二次元目)はタンパク質を表す。

と一緒にアクリルアミドゲルを作成し、そこに細胞溶解液を入れて電圧をかけます。すると、タンパク質はそれぞれの等電点(pI, タンパク質の電荷がゼロになる pH のこと)のところで移動が停止します。つぎにガラス管からゲルを抜き取り、二次元目の平板状のアクリルアミドゲルの上に横にして乗せて SDS-PAGE を行い、分子量で分離します。その結果数百個から多ければ数千個のタンパク質がスポットとして検出されることになります。この方法を IEF (isoelectric focusing)/SDS-PAGE といいます。

ただ、この方法では一次元目で形成される pH の範囲がせいぜい pH4 から pH7 くらいなので、pI8 以上の等電点をもつ塩基性タンパクの検出は困難でした。その当時にわかっていた熱ショックタンパク質の多く(Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp27 など)は等電点が pI7 以下の酸性タンパク質だったので、IEF/SDS-PAGE の二次元電気泳動法で検出できていました。

オフアーレルはさらに 1977 年に塩基性タンパク質も検出できる二次元電気泳動法を発表していました[60]。この方法の一次元目は電圧をかけると pH 勾配は形成されますが平衡状態にならず、電圧をかけ続けるとタンパク質はどんどん移動していくので、適当なところで電気泳動を止めることになります。二次元目はやはり SDS-PAGE です。この方法では酸性タンパク質とともに pI が 8~10 程度の塩基性タンパク質もよく検出できます。一次元目の電気泳動は非平衡 pH 勾配ということで、non-equilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE)と呼んでいます。

さて、二次元電気泳動法の説明が長くなりましたが、筆者が 1988 年にアメリカから帰国してから、愛知県がんセンター研究所の同僚(中村普武, ナカムラヒロム)と話しているとき、彼がひよっとしたら塩基性の領域にも熱ショックタンパク質があるのではないかと示唆しました。そこでさっそく、オフアーレル 1977 年の方法、つまり、NEPHGE/SDS-PAGE を試してみたところ、なんと熱ショックを与えたマウスの細胞において、塩基性で分子質量が約 40 kDa

のタンパク質が現れたのです(図 8)。そのときには小躍りして喜んだものです。再現性があるかどうか何回も何回も実験を行いました。マウスだけでなくヒトやラット、またニワトリの細胞でも同じ 40 kDa のタンパク質が検出されました。熱ショックだけでなく、ヒ素やアミノ酸アナログ(アゼチジンカルボン酸)でも誘導されます。さらに転写阻害剤のアクチノマイシン D で処理するとその発現が抑制されます。このことは 40 kDa のタンパク質が熱ショックによって新しく合成された mRNA から翻訳されてくることを意味します。まさに、熱ショックタンパク質の条件によく合

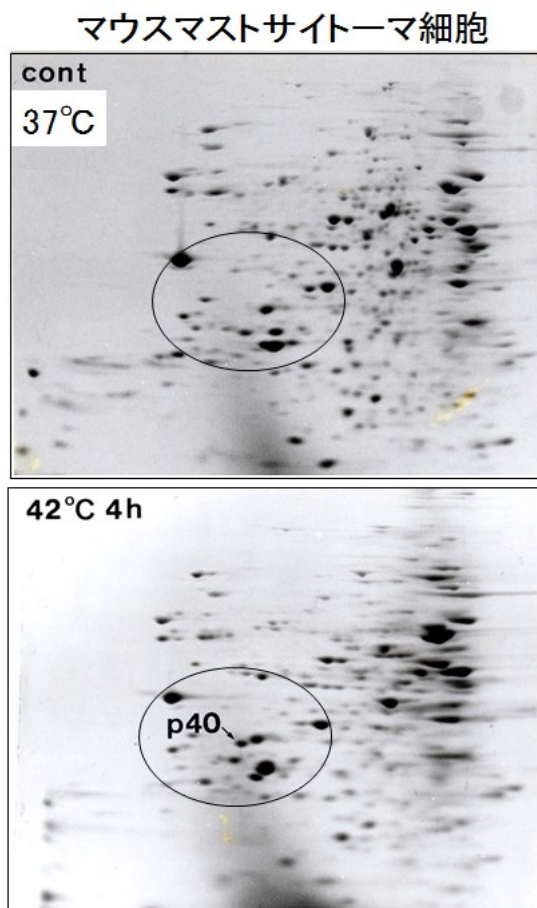


図 8

Hsp40 の発見。マウスのマストサイトーマ細胞の二次元電気泳動。上段はコントロール(37°C)細胞。下段が細胞を 42°C 4 時間加温したもの。夜空の星のようなスポットを比較すると、下段で新たなスポットがはっきり見える(○の中の矢印で p40 と示したもの)。ゲルの中のタンパク質はクマシーブルーという色素で染色した(未発表データ)。

致します。そこでこの 40 kDa タンパク質を Hsp40 と名付けました。この Hsp40 は塩基性タンパク質で pI が約 9.2 と推定されました。ところが、このときすでに永田は Hsp47 (pI が約 9.0 で分子量が 47 kDa) を報告していたので、ひょっとしたら同じものを見ているのではないかと懸念がありました。そこで、お互いに情報を交換して検討したところ、別のタンパク質であることが判明しました。まさにニアミスの状態でした。同じタンパク質を別の方法で後から見つけても新規性はありません。2 番手では評価されないのが科学の世界です。ということで Hsp40 について永田との共著論文として、無事に 1990 年に発表することができたのです[61]。

あとで永田から聞いた話では、Hsp47 を調べた二次元電気泳動のデータをよく見たところ、確かに Hsp40 のスポットも認められたと述べていました。彼は Hsp47 を調べていたので他のタンパク質には気がつかなかったのかもしれません。

2-2-4 Hsp40 の精製一点から線へ

さて、このあとも一苦勞でした。二次元電気泳動法で新しい Hsp40 は見つかったのですが、タンパク質を詳しく研究するためにはまず大量に精製して部分的にでもアミノ酸配列を決めたり、抗体を作製したりしなければなりません。しかし、Hsp40 は何かの酵素活性があるのかもわかりませんでしたので、酵素活性を手掛かりに精製することもできません。数種類のカラムクロマトグラフィーを用いて部分的に精製しては二次元電気泳動で Hsp40 が濃縮されているかどうかを調べる、という手間のかかるやり方も試みましたがうまくいきません。しまいには、100 枚以上の二次元電気泳動のゲルから Hsp40 のスポットを切り出し、ゲルから Hsp40 を溶出してアミノ酸配列を決めましたが、せいぜい 10 個ほどしか決めることができませんでした。これではすでに知られているタンパク質との相同性を比較するには不十分です。

そのころ名古屋大学医学部口腔外科から派遣された大学院生の服部浩朋君と一緒に仕事をしてく

れていました。彼と苦勞を共にしながら、二次元電気泳動法を使って Hsp40 を大量に精製する方法をようやく思いついたのです。まさに発想の転換が必要でした。どういうことかといいますと、二次元電気泳動法ではタンパク質は「点(スポット)」として検出されますが、この「点」を「線」にすれば大量にタンパク質が得られるはずだ、と考えたのです。通常の二次元電気泳動では一次元目はガラス管を使いますが、そのガラス管を何本も並べた状態、つまり一次元目を平板の状態で泳動し、Hsp40 の部分を切り取って二次元目の泳動(SDS-PAGE)をすれば各タンパク質は「線」として検出されることに思いついたのです(図 9)。実際にやってみると、確かに Hsp40 は 1 本の長い「線」として検出されました(図 10)。この「線(バンド)」を切り出してゲルから Hsp40 を溶出することで、大量に精製することができたのです。ここから Hsp40 の研究が大きく前進しました。まさに「ブレークスルー」できた瞬間です。「コロブスの卵」のようなものかもしれません。Hsp40 の発見から 2 年近く経っていました。

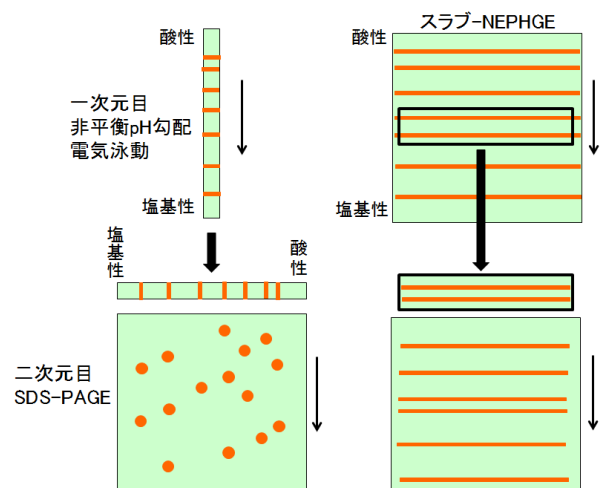


図 9

調製用二次元電気泳動法(右側)。左側は通常の二次元電気泳動法で、タンパク質はスポットとして検出される。右側は一次元目を平板で非平衡 pH 勾配 (NEPHGE) にて行う。目的のタンパク質(ここでは Hsp40)を含む部分を切り取って二次元目の SDS-PAGE を行う。その結果、タンパク質は長いバンドとして検出される(右下、文献 63 参照)。

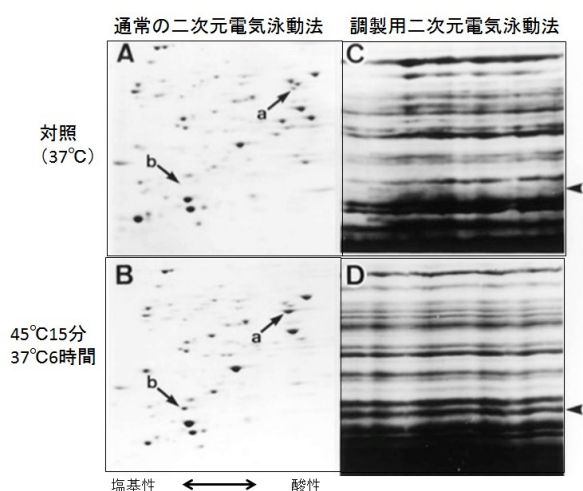


図 10

調製用二次元電気泳動法の実験。AとBは通常の二次元電気泳動法。B(熱ショックを受けた細胞)では、A(対照の細胞)にはないHsp40(矢印b)が検出される。矢印aはHsp70のスポット。CとDは調製用二次元電気泳動法。矢印がHsp40のバンド。C(対照の細胞)には見られず、D(熱ショックを受けた細胞)でははっきりと確認できる。タンパク質はすべてクマシーブルーという色素で染色した。Dで見られたHsp40のバンドを切り出し、ゲルからHsp40を溶出して精製した。(文献62, 63 参照)

この方法は、一次元目を非平衡 pH 勾配 (NEPHGE) で、しかも平板 (スラブ, slab) で行うので、Slab-NEPHGE/SDS-PAGE 法と名付けて、その実験方法を調製用二次元電気泳動法として報告しました[62, 63]。

この「線(バンド)」から Hsp40 を溶出して精製し、ウサギに免疫して抗体の作製もできました。また溶出した Hsp40 のアミノ酸配列を決めたところ、アミノ末端から 48 残基の配列が決定できました。その配列をこれまで知られていた熱ショックタンパク質と比較したところ、なんと大腸菌の DnaJ とよく似ていました。さらに酵母の DnaJ 相同体ともよく似ていたのです[64]。その後、Hsp40 の抗体を用いて、ヒト cDNA の発現ライブラリーから Hsp40 の cDNA も単離できました。その塩基配列から、ヒトの Hsp40 は大腸菌の DnaJ の相同体であることが明確になったの

です[65]。その当時、大腸菌の DnaJ の相同体として酵母では SIS1 と Sec63 が同定されていましたが、哺乳類での相同体はまだ報告されておらず、いわばミッシングリンクでしたので、筆者たちの Hsp40 がまさに哺乳類での DnaJ 相同体の最初の報告となりました。

じつは、すでにヒトの DnaJ 相同体として、HDJ1 (human DnaJ 1) が報告されていました[66]。この論文はたまたま見つかった cDNA の塩基配列を決めたところ大腸菌の DnaJ に似ているということで、塩基配列だけの報告でタンパク質の解析はありません。そこで、Hsp40 の塩基配列と比較したところ、98% の一致が見られました。しかし、HDJ1 の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、Hsp40 のそれと 77% の相同性しか見られませんでした。よく見てみると、HDJ1 の塩基配列がどうも間違っているらしいことが判明したのです。Hsp40 はアミノ末端のアミノ酸配列がわかっていたので、それは Hsp40cDNA の塩基配列から推定されるアミノ酸配列と完全に一致していました。しかし、HDJ1 のアミノ末端のアミノ酸配列は違っていたのです。違っている箇所の塩基配列を見てみると、HDJ1 は塩基が一つ抜け落ちていたり、余分に付け加わったりして、いわゆる「フレームシフト」を起こしていたのです。そのほかにも数カ所で「フレームシフト」が見つかりました。「フレームシフト」とは、3 つの塩基で 1 つのアミノ酸を規定しているので、塩基が 1 つや 2 つが抜け落ちたり付け加わったりすると、「読み枠」がずれて違うアミノ酸配列になってしまうことです。HDJ1 はタンパク質の情報がなかったの、その塩基配列が正しいかどうか確かめるすべがなかったのだと思われます。そのようなことから、Hsp40 と HDJ1 は同一の遺伝子産物であると結論しました[65]。後日談ですが、筆者が作製した Hsp40 に対する抗体が HDJ1 を認識することが、モリモト (Richard Morimoto) らによって確かめられました[67]。これはこの両者が同一のタンパク質であることの証拠です。

なお、筆者のグループ (秦眞美との共同研究) は、ヒト Hsp40 の遺伝子も単離して、3 つのエキソンから

なること、またそのプロモーター領域には熱ショックエレメント(HSE)の存在も確認しました[68].

筆者たちがウサギに免疫して作製したヒト Hsp40 に対する抗体(ポリクローナル抗体)は非常に特異性が高く、二次元電気泳動で展開したタンパク質に対してウェスタンブロット(抗体を用いてそれと反応するタンパク質を検出する方法)を行っても、たった一つのタンパク質(Hsp40)とのみ反応し、それ以外の DnaJ 相同体とはまったく反応しません[62]. また抗体価も高く、得られたウサギ抗血清を数千倍に希釈しても Hsp40 を検出できます. このようなことから、この抗体を当時のストレスタンパク質関連の抗体などを専門に扱う「StressGen」という企業に販売を委託したこともあります.

余談になりますが、緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein, GFP)の発見により 2008 年にノーベル化学賞を受賞した下村脩氏の著書に、名古屋大学の平田義正教授のもとで研究していた頃の苦労話がつづられています[69].

「当時は、もし『ウミホタルルシフェリンの精製と結晶化』に成功しても、それで私がどうなるという話はまったくなかった. しかし、不成功なら、私は多分、万年助手で生涯を終わることになると思った. それは、考えるだけでもいやな人生である. 私は全身全霊で努力した. そして実験をはじめて 10 ヶ月たった 1956 年 2 月のある寒い夜に、意外なことから突然結晶化に成功したのである。」とあります. 私も似たような心境で Hsp40 の精製に日夜奮闘していた 1991～92 年ころのことが懐かしく思い出されます.

2-2-5 Hsp40(DnaJ)ファミリータンパク質の命名法の提案

Hsp40 の発見以降、1990 年代には哺乳類において DnaJ 相同体が相次いで見出されるようになりました. それらの DnaJ 相同体タンパク質のアミノ酸配列を比較してみると、3 つのグループに分けられることが報告されていました[70]. 大腸菌の DnaJ は、アミノ末端から 70 アミノ酸は、他のすべての DnaJ 相同体と非常によく似た配列を持っているので J ド

メイン、と名付けられました. その後ろにはグリシン(G)とフェニルアラニン(F)の多い G/F ドメインが、また中央部分にはシステイン(C)の多い C ドメインが存在します. ところが他の DnaJ 相同体を見てみると、J ドメインはすべての相同体を持っていますが、C ドメインがないものや、G/F ドメインと C ドメインの両方がない相同体もあります. ちなみに Hsp40 は J ドメインと G/F ドメインはありますが C ドメインはありませんでした.

3 つのグループは以下の通りです.

Type I: J, G/F, C の 3 つのドメインを持つもの.

Type II: J と G/F の 2 つのドメインを持つもの.

Type III: J ドメインのみを持つもの.

多くの DnaJ 相同体が見つかったのはいいのですが、その名前が研究者によってまちまちで、同じ遺伝子を別名で呼んだり、別の遺伝子に同じ名前が使われるなど、混乱していました.

1990 年代の終わりのころには哺乳類で十数個の DnaJ 相同体が報告されていましたが、筆者はそれらの統一した名前が必要であると考えました. そこで哺乳類で新たに 10 個の DnaJ 相同体の cDNA の塩基配列を決定するとともに、統一的な命名法を提案しました[71]. 遺伝子とかタンパク質の名前にはローマ数字(I や II, III など)は使えないので、先に分類された type I には A, type II には B, type III には C のアルファベットを使うことにしました. それぞれのグループでは報告された順番に算用数字をつけるのです. ちなみに、私の見つけた Hsp40 の遺伝子は *DNAJB1*, タンパク質は DjB1 です. なおこの命名法はのちに改定され、筆者の提案がおおむね引き継がれて、遺伝子もタンパク質も同じアルファベットで表し、遺伝子はイタリックで表記することになりました[72]. 筆者の見出した Hsp40 の遺伝子は *DNAJB1*, タンパク質は DNAJB1 です. ただ、論文ではこれまで使われてきた名称(Hsp70 や Hsp40 など)が通称として今も使われています.

この Hsp40 の発見によってオリジナルな研究ができ、熱ショックタンパク質の研究分野でささやかなが

ら貢献できたのではないかと筆者は思っています。

2-2-6 Hsp40 が正式に登録される

1997 年に Oxford University Press から、その時点までにわかっていた熱ショックタンパク質や分子シャペロン、およびタンパク質折りたたみに関与するすべてのタンパク質を網羅するカタログのような本が出版されました[73]。このなかに、永田の Hsp47 や筆者も Hsp40 についても記載されています。この本に記載されたことで Hsp40 が HDJ1 と同一であることとともに、正式に熱ショックタンパク質の仲間入りしたことになります。

なおこの本では、各熱ショックタンパク質のアルファベットでの表記について提案されています。たとえば、Hsp70 については、相同体が多くありますがそれらをまとめてファミリーとして総称するときには、HSP70 family (3 文字とも大文字)と表記します(ほかには HSP90 family や、HSP40 family など)。その family の中の個々のメンバーは、Hsp70, Hsc70, Hsp86, Hsp40, などと表します(最初だけ大文字)。筆者もなるべくこの表記の仕方に従うようにしています。

さて、一通り、熱ショックタンパク質の発見の経過や熱ショック応答の分子機構などを述べてきましたが、次回以降は熱ショックタンパク質の分子シャペロンとしての機能について解説します。

引用文献

1. 大塚健三. ストレスのない世界はない-細胞ストレス生物学入門-その 1, 中部大学生物機能開発研究所紀要, 16:34-44, 2015.
2. 大塚健三. ストレスのない世界はない-細胞ストレス生物学入門-その 2, 中部大学生物機能開発研究所紀要, 17:42-60, 2016.
3. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573, 1962.
4. Brenner S, Jacob F, Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190: 576-577, 1961.
5. Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress & Chaperones* 1: 97-98, 1996.
6. Capocci M, Santoro G, Hightower LF. The life and time of Ferruccio Ritossa. *Cell Stress & Chaperones* 19: 599-604, 2014.
7. Ritossa F. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Exp Cell Res.* 35: 601-607, 1964.
8. De Maio, A, Santoro, MG, Tanguay RM, Hightower LE. Ferruccio Ritossa's legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress & Chaperones* 17: 139-143, 2012.
9. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
10. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84: 389-398, 1974.
11. Lindquist Mckenzie S, Henikoff S, Meselson M. Localization of RNA from heat-induced polysomes at puff sites in *Drosophila melanogaster*. *Proc Nat Acad Sci USA* 72: 1117-1121, 1975.
12. Lindquist Mckenzie S, Meselson M. Translation in vitro of *Drosophila* heat shock messages. *J Mol Biol* 117: 279-283, 1977.
13. Ashburner M, Bonner J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell* 17: 241-254, 1979.
14. Schlesinger MJ, Ashburner M, Tissieres A. Edts. 'HEAT SHOCK From Bacteria to Man' Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
15. 石川統. Chaperone Newsletter 3: 13-14, 1998; 森戸大介. Protein Community 2: 20-23, 2008;

- 田中元雅. Protein Community 2: 23-24, 2008.
(in Japanese)
16. Yamamori T, Ito K, Nakamura Y, Yura T. Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. *J Bacteriol* 134: 1133-1140, 1978.
 17. Lemaux PG, Herendeen SL, Bloch PL, Neidhardt FC. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell* 13: 427-434, 1978.
 18. Gross CA, Straus DB, Erickson JW, Yura T. The function and regulation of heat shock proteins in *Escherichia coli*. In Schlesinger MJ, Ashburner M, Tissieres A. Edts. 'HEAT SHOCK From Bacteria to Man', pp.167-189, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
 19. Yura T, Nagai H, Mori H. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 47: 321-350, 1993.
 20. Bardwell JCA, Craig EA. Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 848-852, 1984.
 21. Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic *hsp70* genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human *hsp70*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6455-6459, 1985.
 22. McMullin TW, Hallberg RL. A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia coli* *groEL* gene. *Mol Cell Biol.* 8: 371-380, 1988.
 23. Reading DS, Hallberg RL, Myers AM. Characterization of the yeast HSP60 gene coding for a mitochondrial assembly factor. *Nature* 337: 655-659, 1989.
 24. Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333: 330-334, 1988.
 25. Bardwell JC, Craig EA. Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 5177-5181, 1987.
 26. Yost HJ, Lindquist S. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell* 45: 185-193, 1986.
 27. Craig E, Ingolia T, Slater M, Manseau L, Bardwell J. *Drosophila*, Yeast, and *E. coli* genes related to the *Drosophila* heat-shock genes. In 'HEAT SHOCK From Bacteria to Man' (Edts. Schlesinger et al.), pp.11-18, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
 28. Wu B, Hunt C, Morimoto R. Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. *Mol Cell Biol.* 5: 330-341, 1985.
 29. Hightower LE. Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *J Cell Physiol.* 102: 407-427, 1980.
 30. Edington BV, Whelan SA, Hightower LE. Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. *J Cell Physiol.* 139: 219-228, 1989.
 31. Goff SA, Goldberg AL. Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* 41: 587-595, 1985.
 32. Parsell DA, Sauer RT. Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation. *Genes Dev* 3: 1226-1232, 1989.
 33. Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes.

- Science 232: 522-524, 1986.
- 34.Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. Cell 66: 191-197, 1991.
- 35.Pelham HRB. A regulatory upstream promoter element in the Drosophila Hsp70 heat-shock gene. Cell 30: 517-528, 1982.
- 36.Pelham HRB, Bienz M. A synthetic heat-shock promoter element confers heat-inducibility on the herpes simplex virus thymidine kinase gene. EMBO J. 1: 1473-1477, 1982.
- 37.Fernandes M, O'Brien T, Lis JT. Structure and regulation of heat shock gene promoters. In The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones (Edts. Morimoto et al.), pp. 375-393. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- 38.Perisic O, Xiao H, Lis JT. Stable binding of Drosophila heat shock factor to head-to-head and tail-to-tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit. Cell 59: 797-806, 1989.
- 39.Wiederrecht G, Seto D, Parker CS. Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. Cell 54: 841-853, 1988.
- 40.Clos J, Westwood JT, Becker PB, Wilson S, Lambert K, Wu C. Molecular cloning and expression of a hexameric Drosophila heat shock factor subject to negative regulation. Cell 63: 1085-1097, 1990.
- 41.Scharf KD, Rose S, Zott W, Schöffl F, Nover L. Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a region of remarkable homology to the DNA-binding domain of the yeast HSF. EMBO J. 9: 4495-4501, 1990.
- 42.Sarge KD, Zimarino V, Holm K, Wu C, Morimoto RI. Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. Genes Dev. 5: 1902-1911, 1991.
- 43.Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C. Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. Proc Natl Acad Sci USA. 88: 6906-6910, 1991.
- 44.Anckar J, Sistonen L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. Annu Rev Biochem. 80: 1089-1115, 2011.
- 45.Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Dev. 12: 3788-3796, 1998.
- 46.Life of Proteins No. 12, pp. 6-11, 2003. (in Japanese)
- 47.Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. Proc Natl Acad Sci USA. 72: 11-15, 1975.
- 48.Bond U, Schlesinger MJ. Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. Mol Cell Biol. 5: 949-956, 1985.
- 49.Bond U, Schlesinger MJ. The chicken ubiquitin gene contains a heat shock promoter and expresses an unstable mRNA in heat-shocked cells. Mol Cell Biol. 6: 4602-4610, 1986.
- 50.Finley D, Ozkaynak E, Varshavsky A. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. Cell 48: 1035-1046, 1987.
- 51.Seufert W, Jentsch S. Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. EMBO J. 9: 543-550, 1990.
- 52.Nagata K, Yamada KM. Phosphorylation and transformation sensitivity of a major collagen-binding protein of fibroblasts. J Biol Chem 261: 7531-7536, 1986.

53. Nagata K, Saga S, Yamada KM. A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. *J Cell Biol* 103: 223-229, 1986.
54. 永田和宏. HSP47: Maze and Enigma. *Chaperone Newsletter* 6: 21-24, 2000. (in Japanese)
55. Nagata K. Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone. *Trends Biochem Sci.* 21: 22-26, 1996.
56. Ito S, Nagata K. Biology of Hsp47 (Serpin H1), a collagen-specific molecular chaperone. *Semin Cell Dev Biol.* 62: 142-151, 2017.
57. 大塚健三. ブダペスト印象記. *Chaperone Newsletter* 1: 4-6, 1997. (in Japanese)
58. Ohtsuka K, Laszlo A. The relationship between hsp 70 localization and heat resistance. *Exp Cell Res.* 202: 507-518, 1992.
59. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 250: 4007-4021, 1975.
60. O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1141, 1977.
61. Ohtsuka K, Masuda A, Nakai A, Nagata K. A novel 40-kDa protein induced by heat shock and other stresses in mammalian and avian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 166: 642-647, 1990.
62. Hattori H, Kaneda T, Lokeshwar B, Laszlo A, Ohtsuka K. A stress-inducible 40-kDa protein (hsp40): Purification by modified two-dimensional gel electrophoresis and co-localization with hsc70(p73) in heat-shocked HeLa cells. *J Cell Sci.* 104: 629-638, 1993.
63. 服部浩朋, 金田敏郎, 大塚健三: 調製用二次元電気泳動法-スラブ NEPHGE/SDS-PAGE-, 生化学, 64: 416-420, 1992. (in Japanese)
64. Hattori H, Liu Y-C, Tohnai I, Ueda M, Kaneda T, Kobayashi T, Tanabe K. Ohtsuka K. Intracellular localization and partial amino acid sequence of a stress-inducible 40-kDa protein in HeLa cells. *Cell Struct Funct.* 17: 77-86, 1992.
65. Ohtsuka K. Cloning of a cDNA for heat-shock protein hsp40, a human homologue of bacterial DnaJ. *Biochem Biophys Res Commun.* 197: 235-240, 1993.
66. Raabe T, Manley JL. A human homologue of the Escherichia coli DnaJ heat-shock protein. *Nucleic Acids Res.* 19: 6645, 1991.
67. Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 12: 654-666, 1998.
68. Hata M, Ohtsuka K. Characterization of HSE sequences in human hsp40 gene: Structural and promoter analysis. *Biochim Biophys Acta* 1397: 43-55, 1998.
69. 下村脩. 光る生物の話. p.55, 朝日新聞出版社, 2014.
70. Cyr DM, Langer T, Douglas MG. DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci.* 19: 176-181, 1994.
71. Ohtsuka K, Hata M. Mammalian HSP40/DNAJ homologs: Cloning of novel cDNAs and a proposal for their classification and nomenclature. *Cell Stress & Chaperones* 5: 98-112, 2000.
72. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress & Chaperones* 14: 105-111, 2009.
73. Gething M-J. Edt. Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts. Oxford University Press, 1997