

解説

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 4 -分子シャペロン登場-

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 3 章 分子シャペロン登場

はじめに

前回の第 2 章では、熱ショックタンパク質(heat shock proteins, HSPs と略、複数の HSP が存在するので複数形の s を付ける)について述べましたが[1], この言葉は、そのタンパク質が細胞を正常発育温度よりも少し高い温度で処理(heat shock)したときに発現してくる、ということで名付けられたもので、その働きを表しているわけではありません。それでは HSPs はどのような機能を持っているのでしょうか？そこで登場してきたのが「分子シャペロン(molecular chaperone)」という考え方です。分子シャペロンって何？と思われる読者も多いかもしれません。この言葉も最近になってようやく定番の生化学や細胞生物学の教科書で取り上げられるようになってきましたが、一般的にはまだなじみがうすく、一度聞いただけでその機能を連想するのは難しいかもしれません。それもそのはずです。そもそも「シャペロン」という言葉は西欧文化独自のもので、日本にはもともと「シャペロン」に対応する言葉がありませんでした。「シャペロン」とは、西欧の貴族社会で未婚の若い女性が社交界にデビューするときにその女性に付き添う既婚または年配の婦人のことをいいます。「シャペロン」は若い女性に礼儀作法を指南し、不都合な男性から彼女を守り、お目当ての男性とうまくカップルができるようにあれこれと世話をやきます。日本語では「付添人」とか「介添人」とでも訳せるかもしれませんが、それでは社交界の華やかな雰囲気や、若い男女の間をうまく取り持つ年配の婦人といった意味が伝わってきま

せん。欧米人であれば「分子シャペロン」と聞くと、ああなるほど！と想像がつくと思われます。

ともあれこの章でも、やはり原著論文にもとづいて分子シャペロン研究の歴史的な経緯をたどってみたいと思います。ただその前に、タンパク質の構造や折りたたみのことについて述べる必要があります。なお、以下に登場するさまざまなタンパク質の名前などがアルファベットで表記されており、紛らわしいかもしれませんがしばらくお付き合いください。またわかりやすい表現を重視するために、正確さの欠ける文章になった部分もありますがご容赦ください。

3-1 アミノ酸からタンパク質へ

タンパク質(protein)は生命活動を中心的に担っている高分子化合物であり、生体内の代謝や構造維持、運動や物質輸送、情報伝達などあらゆる細胞機能を支えています。タンパク質は、アミノ酸(amino acid)という分子質量 100 前後(遊離アミノ酸の分子質量の範囲はグリシンの 75 Da[ダルトン]からトリプトファンの 204 Da まで)の比較的小さな分子が「ひも」状に結合した高分子です。タンパク質に含まれるアミノ酸は 20 種類あります。そのアミノ酸の基本構造を図 1 に示してあります。中心の炭素原子(α -炭素)のまわりにアミノ基とカルボキシル基、水素原子、これら 3 つは全てのアミノ酸に共通です。そのほかに側鎖(R)と呼ばれる部分があります。タンパク質を構成するアミノ酸が 20 種類ということは、側鎖の部分が 20 種類あるからです。アミノ酸が「ひも」状に結合すると

きには一定の様式があります。つまり一つのアミノ酸のカルボキシル基と隣のアミノ酸のアミノ基が縮合してペプチド結合(-CO-NH-)を形成します(このとき水分子 H_2O がはずれてきます)。その次のアミノ酸もペプチド結合でつながるという形で、つぎつぎと結合していきます(図 2)。タンパク質はお祈りするときに使う「数珠(じゅず)」に似ています。数珠の「たま」一つ一つがアミノ酸に相当し、「たま」の間の「ひも」がペプチド結合ということになります。ちなみに、いくつものアミノ酸がペプチド結合によってつながった「ひも」状のタンパク質の両方の末端は、一方はアミノ基、もう一方の端はカルボキシル基がフリーのまま残ることになります。アミノ基のある末端をアミノ末端(アミノ基 NH_2 の N をとって N 末端ともいう)、もう一方をカル

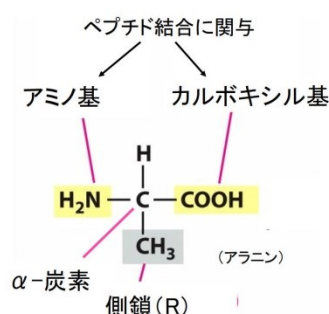


図 1

アミノ酸の基本構造。このアミノ酸はアラニンであり、側鎖がメチル基 ($-\text{CH}_3$) である。

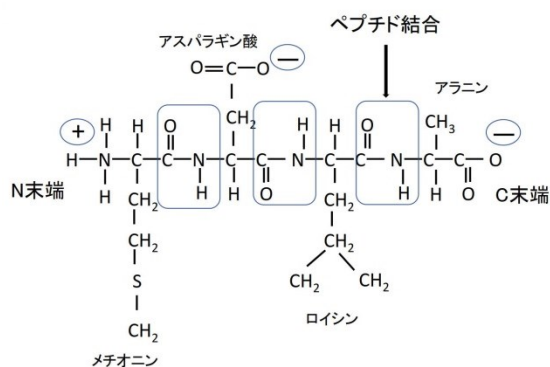


図 2

ペプチド結合。メチオニン、アスパラギン酸、ロイシン、アラニンの 4 つのアミノ酸がペプチド結合でつながっている。

ボキシ末端(C 末端)とよびます。アミノ酸配列を書くときには N 末端を左にして順番にアミノ酸を書いていき、C 末端が右端になるようにします。これは歴史的には、タンパク質のアミノ酸配列を決定するとき、最初は N 末端側から一つずつ決めていったことにちなんでいるといわれています。ただその後 C 末端側からの決定法も開発されています。なお後で述べるように、リボソームでタンパク質が合成されてくるときには、N 末端から順番に合成されてきます。横書きの文章は通常左から順に右に書いていくのと同じで、N 末端を最初に書くのが決まっています。なお、タンパク質はアミノ酸がペプチド結合でつながっているの、タンパク質のことをポリペプチドともいいます。ポリペプチドのなかに組み込まれた個々のアミノ酸のことをアミノ酸残基(amino acid residue)とよびます。ペプチド結合ができるときに水分子が遊離するので、その残りの基、ということです。したがってアミノ酸残基の分子質量は遊離アミノ酸から水分子の 18 Da を引いた値になります。

個々のタンパク質を構成するアミノ酸の数は十数個の小さなものから数千個のアミノ酸からなる巨大なタンパク質もあります。セントラルドグマによると、タンパク質は DNA に書き込まれた塩基配列をもとに作られることがわかっています。つまりある特定のタンパク質において、20 種類のうちどのアミノ酸がどのような配列でつながっているのかは、DNA の塩基配列で決まることになります。

セントラルドグマを簡単に説明すると、まず DNA に書き込まれた 4 つの塩基(A:アデニン、T:チミン、G:グアニン、C:シトシン)の配列が mRNA(メッセンジャーRNA)に写し取られます(この過程を転写といいます)。次にその mRNA が細胞質のリボソームというタンパク質製造装置に運ばれ、mRNA の配列にしたがってアミノ酸が一つ一つ結合(ペプチド結合)していくことによってタンパク質が合成されることとなります(この過程を翻訳といいます)(図 3)。

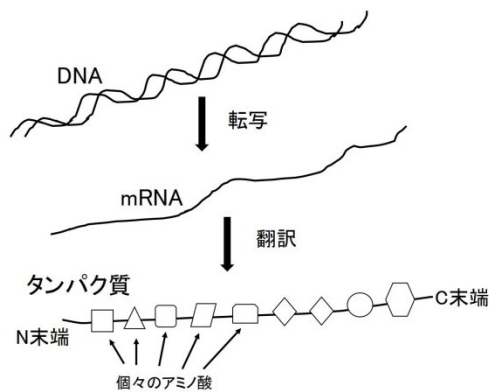


図 3

セントラルドグマ. DNA の塩基配列が mRNA (メッセンジャー-RNA) に写し取られ (転写), ついで mRNA の塩基配列にしたがってアミノ酸がペプチド結合によってつながっていく (翻訳).

さて, もう一つ大事なことは, ペプチド結合でつながったタンパク質の中で個々のアミノ酸の側鎖が「ひも」から少し顔を出すように飛び出ていることです。じつは 20 種類の側鎖のうち約半分は親水性(水に溶けやすい)で, 残りは疎水性(水に溶けにくい)の性質を持っています。この側鎖の化学的性質の違いが, タンパク質が折りたたまれて立体構造(三次元構造ともいう)を形成するとき重要になります。つまり, リボソームで合成されてきたタンパク質が折りたたまれて立体構造を形成するときには, 疎水性の側鎖をもつアミノ酸は立体構造の内側に, また親水性の側鎖をもつアミノ酸は外側にくる(水溶液に接する)ように配置されることになります。これは, 疎水性の化合物は「疎水性相互作用^{*1}」によって互いに凝集しやすい性質を持っているからです。

ヒトの遺伝子の数は約 22,000 個ですが, そこから作られてくるタンパク質は 5 万から 10 万個ほどといわれています。これは一つの遺伝子から数個のタンパク質が作られてくることがあるからです。一つ一つのタンパク質は固有のアミノ酸配列をもっているのです。折りたたまれて最終的に立体構造を形成したときには千差万別の構造をし

ています。一つとして同じ構造のタンパク質はありません。もちろんアミノ酸配列のよく似たタンパク質同士は似たような構造になりますが全く同じではありません。正常なアミノ酸配列をもった(野生型の)タンパク質の中の一つのアミノ酸だけ別のアミノ酸に置き換わった場合, 立体構造がわずかに変化して正常な機能ができなくなり, 病気を引き起こすこともあります。もっともよく知られた例は鎌状赤血球貧血症で, これは酸素を運ぶヘモグロビンというタンパク質の 6 番目のグルタミン酸がバリンに置き換わり, この変異ヘモグロビンが繊維状の凝集体を形成し, 赤血球が鎌状に変形して酸素をうまく運べなくなってしまう病気です。タンパク質の中のアミノ酸が 1 個変わっただけで微妙に立体構造が変化し, そのことが重大な病気を引き起こすというのは驚きです。じつは, アミノ酸が 1 個変わるということは, DNA の塩基配列ではそのアミノ酸を規定しているトリプレット(3 つの塩基)のうち 1 個の塩基が変異しただけなのです。鎌状赤血球貧血症では, グルタミン酸のトリプレットは GAG, バリンのトリプレットは GTG です。つまり A(アデニン)が T(チミン)に変わっているだけです。このような病気は数多く知られています。

このようにタンパク質は正しく折りたたまれて正常な立体構造を取ることではじめてうまく機能することができるのです。それでは, タンパク質の最終的な立体構造はどのようにして決まるのでしょうか? またその立体構造は, もしあるとしたらどのようなメカニズムで折りたたまれるのでしょうか?

^{*1} 疎水性相互作用: 「水と油の関係」とよくいいます。お互いに仲が悪く分かり合えない関係という意味です。水と油(疎水性)の分子を混ぜてよく攪拌しても, しばらくすると油の分子はお互いに凝集して水と分離してしまいます。疎水性の分子同士が凝集しやすい性質のことを疎水性相互作用といいます。疎水性の分子とは, 炭化水素(炭素と水素だけからなる分子)や動物の脂肪や植物油脂などのことです。それではなぜ疎水性分子同士は集まりやすいのでしょうか? それは次のように説明されています。水の中に疎水性分子が存在すると, 水分子は疎水性分子と水素結合を形成できないので, その分子の周りに水分子同士が水素結合を作って取り囲むように「かご」状構造を作ります。

この状態では水分子は高度に整列して(秩序だって)いて、エネルギー的に不安定でありエントロピー(無秩序さを表す値)は低いのです。そこで疎水性分子が互いに集まると「かご」状構造に関与する水分子が減って、その分多くの水分子はバラバラになります。したがって全体としてエネルギー的には安定し、エントロピーが増大することになります。自然界でひとりでに起こる反応は、エントロピーが増大する方向に進みます。つまり水の中での疎水性分子はお互いにひとりでに集まるようになるのです。言い換えれば、疎水性分子は水分子から疎外されて(弾き飛ばされて)自然に集まるということです。このことを疎水性相互作用といいます。したがって、疎水(性)結合という言い方は正しくありません。疎水性分子同士が結合する性質はないからです(分子細胞生物学, ローディッシュ他著, 東京化学同人)[2]。

3-2 タンパク質の折りたたみの問題—アンフィンゼンのドグマ

「ひも」状の構造したタンパク質が正常に機能するには、正しく折りたたまれた立体構造(天然型コンフォメーション, native conformation とともいう)をとることが必要であること、またゆで卵のように熱で処理するとタンパク質は変性して凝集し、機能を失うことは古くから知られていました。タンパク質の折りたたみの問題に最初に取り組んだのがアンフィンゼン(Christian B. Anfinsen, 1916-1995)です。それは1950年代に行われた実験です。彼が選んだ研究材料はウシすい臓のリボヌクレアーゼ A という消化酵素(食物中の RNA 分子を分解する)で、124 個のアミノ酸からなる比較的小さなタンパク質です。これは精肉業者から大量にウシすい臓の原材料が得られたからのようです。アンフィンゼンは最初リボヌクレアーゼ A のアミノ酸配列を決定しようと考えていたようですが、ムーア(S. Moore)とスタイン(W.H. Stein)によって先に決定されてしまったので、折りたたみの問題に取り組むことになったのです[3]。ちなみにこの3人は、1972年に一緒にノーベル化学賞を受賞することになります。受賞理由は「リボヌクレアーゼの研究, 特にアミノ酸配列と生物学的な活性構造の関係に関する研究」です。

リボヌクレアーゼ A の124個のアミノ酸のうち8個がシステインです。システインは側鎖が $[-CH_2-SH]$ となっており、硫黄原子を含むスルフヒドリル基 $[-SH]$ があります。

スルフヒドリル基は非常に反応性に富んでいて、一つのタンパク質の中に複数のシステインが存在すると、折りたたまれたときにスルフヒドリル基同士が結合してジスルフィド結合(S-S 結合ともいう)を形成し、タンパク質の立体構造を安定化する働きがあります。リボヌクレアーゼ A は折りたたまれたときに4個のジスルフィド結合が形成されることがわかっています。

アミノ酸配列が最初に決定されたタンパク質は、すい臓で合成されるインスリンというホルモンです(サンガー[Frederick Sanger]によって決定された)。インスリンはA鎖(21アミノ酸残基)とB鎖(30アミノ酸残基)の2本のポリペプチドからできています。そしてA鎖には4個、B鎖には2個のシステイン残基があります。これらのシステイン残基は、A鎖とB鎖のあいだで2個のジスルフィド結合、A鎖のなかで1個のジスルフィド結合にかかわっています。こうすることでインスリンタンパク質の立体構造が安定化して壊されにくい構造になっています(図4)。

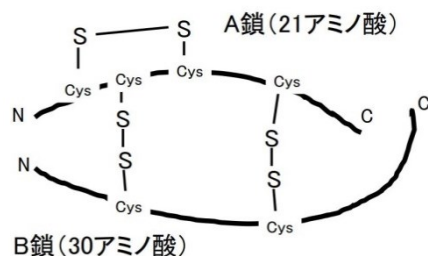


図 4

インスリンの構造。インスリンには6個のシステイン残基があり、A鎖とB鎖の間に2つ、A鎖内に1つのジスルフィド結合が形成されている。

余談になりますが、リボヌクレアーゼ A やインスリンのように、細胞外に分泌されて消化管や血液中などの過酷な環境で働くタンパク質は一般的にジスルフィド結合によって安定化されたり、糖鎖が結合したりして分解されにくい構造となっていることが多いようです。これは細胞から分泌されて旅立つ子供(タンパク質)が安全に働くことができるように「よろい兜」を着せてあげるようなものかも

しません。

さて、前置きが長くなりましたが、アンフィンゼンの行った実験は以下のようなものです。天然型のリボヌクレアーゼ A は 8 つのシステイン残基をもっていて、決まった部位のシステイン残基同士が結合して 4 つのジスルフィド結合をもっています(図 5 の a)。このジスルフィド結合を切るために還元剤の 2-メルカプトエタノールを加えます。同時にタンパク質全体の構造を変性させるために高濃度の尿素も加えると完全にほどけた状態のポリペプチドになり、もちろん活性もなくなります(図 5 の b)。この状態から透析によって 2-メルカプトエタノールと尿素を徐々に除いていくと、なんと元の天然型のリボヌクレアーゼ A が再生し、活性も回復することを、彼は示したのです。もちろんジスルフィド結合も元の同じシステイン残基同士で正しく形成されます(図 5 の b から a へ)。

しかしこのとき、尿素を残して 2-メルカプトエタノールだけを先に除くとスルフヒドリル基が水溶液中の酸素で酸化されて、ジスルフィド結合がランダムに形成されてし

まい不活性なタンパク質ができてしまうのです(図 5 の c)。これに微量(触媒量)の 2-メルカプトエタノールを加えて尿素を徐々に除いていくと、ランダムに形成されたジスルフィド結合が解離・再結合を経過してもとの天然型のリボヌクレアーゼ A が再生することも示されました(図 5 の c から a へ)。

このような簡単な実験結果からわかったことは、ひとつには、ジスルフィド結合はタンパク質が折りたたまれて立体構造が形成された後、結合すべきシステイン残基が近くに来てから形成されることです。もう一つは、完全に変性したタンパク質が、生理的条件に戻すと、ひとりでに(自然に、他の因子の手助けなしに)もとの立体構造に戻るということです。つまり、タンパク質の立体構造(3 次構造)は、そのアミノ酸配列(1 次構造)で決まるということです。言い換えると、タンパク質がどのような 3 次構造になるかは 1 次構造のなかに書き込まれている、ということになります。これがアンフィンゼンのドグマといわれている原理です。彼はタンパク質の天然型の構造というのは、熱力学的にもっとも安定した(ギブスの自由エネルギーがもっとも低い)状態だろうと述べています。「熱力学的にもっとも安定した状態」とはどういうことでしょうか？わかりやすい例は、母親の胎内にいる胎児の姿勢かもしれません。胎児は子宮の中で背中を少し丸めて、手や足は軽く曲げて羊水に浮かんだ状態です。これがエネルギー的に一番安定した姿勢なのだと思います。

なお、アンフィンゼンは 1972 年のノーベル化学賞の受賞講演で次のように述べています。

「This hypothesis (thermodynamic hypothesis) states that the three-dimensional structure of a native protein in its normal physiological milieu (solvent, pH, ionic strength, presence of other components such as metal ions or prosthetic groups, temperature, and others) is the one in which the Gibbs free energy of the whole system is lowest; that is, the native conformation is determined by the totally

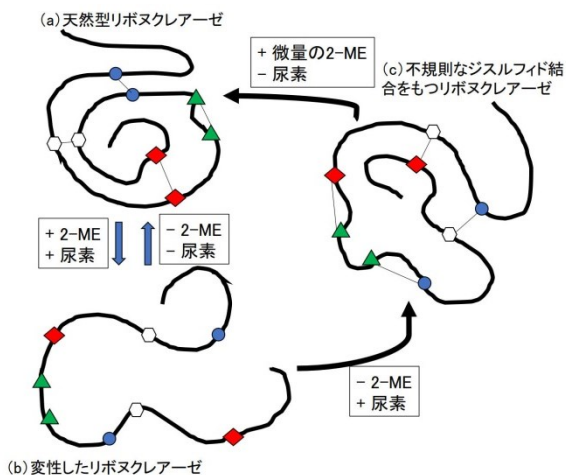


図 5

タンパク質の活性のある天然型立体構造は、アミノ酸配列(一次構造)で決まることを示したアンフィンゼンの実験。詳しくは本文参照。2-ME:2-メルカプトエタノール(還元剤)。●, ◆, ▲, などはシステイン残基を表し、それらの残基間の線はジスルフィド結合を意味する。(引用文献 4 より改変)

of interatomic interaction and hence by the amino acid sequence, in a given environment.」[5] (下線は筆者)。

アンフィンゼンの実験は非常に単純な実験系で、しかも結果も明快でわかりやすい結論になっています。彼は最も少ない研究費用の実験でノーベル賞を受賞した人だと思われます。ただ、それは後から考えると単純な実験ということができません。「コロンブスの卵」と同じで、アンフィンゼンはこのような独創的な実験系を考案し、単純明快な結論を導きだしたことが、彼の非凡な才能によるのかもしれません。

なお、アンフィンゼンはジスルフィド結合の切り離し(還元)と再結合(酸化)を触媒する酵素、ジスルフィドイソメラーゼ(PDI, protein disulfide isomerase)を発見しています。タンパク質はリボソームで合成されて N 末端から徐々に伸びてきますが、先に伸びてきたポリペプチドにあるシステイン残基同士が不適切なジスルフィド結合を形成して、非天然型の立体構造をとることがあります。このようなポリペプチドはエネルギー的に不安定なので、PDI が作用して正しくないジスルフィド結合を切り離して正しい結合を形成する反応を触媒します。最終的にエネルギーレベルの低い安定した天然型の立体構造に折りたたまれることになります。ちなみにこの PDI という酵素は細胞内の小胞体に多く存在しています。これは小胞体内では細胞外に分泌されるタンパク質が合成されており、それらの多くはジスルフィド結合を持っているからです。生体はうまくできています。

3-3 細胞内でのタンパク質の折りたたみの問題

アンフィンゼンは、比較的小さなリボヌクレアーゼ A というタンパク質が、試験管内で変性した状態から他の因子の助けを必要とすることなく、ひとりでに正しく折りたたまれて活性も回復することを示しました。それでは全てのタンパク質が自然に折りたたまれるのでしょうか？生理的な条件の細胞の中は、さまざまな小分子やタンパク

質、細胞小器官が所せましと混み合っています。細胞内のタンパク質濃度は、おおよそ 300~400 mg/ml と見積もられています。これはまさにどろどろの状態といってもいい濃度です。そのような細胞内でもタンパク質はひとりでに折りたたまれるのでしょうか？

タンパク質の中の疎水性のアミノ酸は内部に配置されるようになっていることは先に述べました。しかし、ある条件下では少しほぐれて部分的に変性した状態になり、疎水性領域が外に露出するようになり、近くのタンパク質の疎水性領域同士が相互作用して(疎水性相互作用といいます)、タンパク質の凝集体を形成するようになります。もっとも分かりやすい例が「ゆで卵」で、卵を熱湯に入れると溶液状態だったタンパク質が完全に変性して凝集し、固形状態になってしまいます。

実際に、生理的条件の細胞の中でも、タンパク質の疎水性領域が露出するような状況が多くあるのです。具体的には次の 4 つの状況が考えられます。最初は、リボソームでタンパク質が合成されつつあるとき、N 末端から順番にアミノ酸が 1 個ずつ結合してポリペプチドがリボソームから伸びてきます。そのときある程度の長さのタンパク質では C 末端までまだ合成されていないのに、先に伸びてきた N 末端が細胞質で折りたたまれていないとすると、疎水性のアミノ酸同士が凝集しやすい状況にあります。2 番目は、タンパク質がミトコンドリアや小胞体などのオルガネラに輸送されるときに、解きほぐされて伸びた状態になってオルガネラの膜にある輸送装置を通り抜けることがわかっています。つまりそのタンパク質は細胞質側でも、またオルガネラに入ってきたときにも疎水性領域が露出することになります。3 番目には、タンパク質がいくつか集まって複合体を作って機能する場合があります。複合体の一つ一つのタンパク質をサブユニットといい、数個のサブユニットの場合もあるし、リボソーム(タンパク質合成装置)やプロテアソーム(タンパク質の分解装置)などのように数十個のサブユニットからなる巨大なタ

ンパク質複合体もあります。これらのサブユニット同士は、たいてい疎水性相互作用で会合しています。それぞれのサブユニットが別々に合成されて、正しく会合するまで疎水性部分が露出した状態にあります。またこれらの複合体は必要に応じて絶えず会合・解離が起こっているため、そのようなときにもやはり疎水性部分が一時的にはあっても表面に出てくることになります。4 番目には、細胞が熱などのストレスを受けたときに、タンパク質が部分的に変性してやはり疎水性領域が露出することになります。そのようなタンパク質の凝集を防いだり再び折りたたんだりする必要があります[6]。

このように、タンパク質の疎水性領域が表面に露出することが多い状況下で、疎水性相互作用によって凝集体ができるようになると細胞にとっては一大事です。なんとしてもまちがった折りたたみを防いで、本来あるべき立体構造に正しく折りたたんだり、正確な複合体を形成することが細胞にとっては死活問題となってきました。そこで、細胞の中でのタンパク質の折りたたみや複合体形成には何らかの手助けをする補助因子が必要なのではないかと考えられるようになってきたのです。それが「分子シャペロン」という概念です。後ほど述べるように、細胞内でタンパク質の疎水性領域が露出するような状況では、多くの場合熱ショックタンパク質(HSPs)を中心とする「分子シャペロン」が関与することがわかってきたのです。

もちろんアンフィンゼンの「タンパク質の天然型立体構造はアミノ酸配列で決定される」という原理は現在でも正しいとされています。ただ、生きた細胞の中でタンパク質が他の因子の手助けなしにひとりでの折りたたまれるというのは、起こりにくい出来事であるということです。

3-4 分子シャペロン登場

分子シャペロンという言葉は、熱ショック応答とは全く別の研究から提唱されてきました。この言葉を最初に使ったのはラスキー(R.A. Laskey)らです。彼らの実験を述

べる前に DNA の構造について解説する必要があります。

遺伝情報をもつ DNA 二重らせんは、細胞の中では染色体という構造体に詰め込まれています。染色体を解きほぐしていくと、最終的には DNA が多数のヒストン(8 個のタンパク質からなる)というタンパク質複合体に巻きついた繰り返し構造をしています(図 6)。

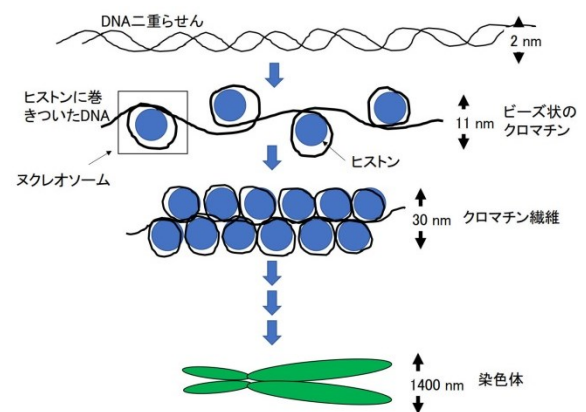


図 6

DNA 鎖から染色体へ。DNA 二重らせんはヒストン（タンパク質複合体）に巻きついて（実際には 2 巻して）ビーズ状の繰り返し構造をしている。それがさらに何重にもパッキングされて染色体となる。（引用文献 2 より）

DNA はヒストンに 2 巻きしておりその長さは 147 塩基対です。隣のヒストンまでは約 50 塩基対の DNA でつながっています。このヒストンと約 200 塩基対の DNA が繰り返しの単位であり、この単位をヌクレオソームと呼んでいます。これはたくさんの小さなビーズ(ヒストン)が長い糸(DNA)でつながっている状態です。ちなみに、ヒトの細胞 1 個の核の中には 23 対 46 本の染色体が存在していますが、その中の DNA を引き伸ばしてみると 2 メートルほどにもなる見積もられています。その細い DNA の「ひも」がヒストンに巻きついてヌクレオソームになり、さらに何重にもパッキングされて染色体となり、顕微鏡でようやく観察できるようになります。よく考えてみると、2 メートルもの細長い「ひも」が小さな細胞の核(直径が 5~10 マイクロメートル)に中に収納されていて生命を支えているこ

と自体が驚異的なことです。

さてラスキーらは、試験管の中で精製した DNA とヒストンタンパク質を混ぜてヌクレオソーム構造がうまくできるかどうか試みていました。しかしこの両者を混ぜただけではきれいなヌクレオソームは形成されず不規則な凝集塊ができるだけです。しかし、ヒストンにまずアフリカツメガエル(実験材料としてよく用いられる)の卵をすりつぶした溶液を加えて、あとから DNA を添加するとききれいなヌクレオソームが形成されとことを見出しました(図 7)。そのヌクレオソーム形成の有効成分を精製したところ、分子質量約 29,000Da のタンパク質であることがわかり、ヌクレオプラスミンと名付けられました。ヌクレオプラスミンは負電荷をもつ酸性タンパク質です。ラスキーらはこの結果を次のように解釈しました。ヒストンは塩基性(正の電荷をもつ)タンパク質であり、DNA はリン酸基が多くあるので負の電荷をもっています。したがってこれら両者を直接混ぜると静電的作用で不規則な凝集塊ができ、うまくヌクレオソーム構造をとることができません。ここで塩基性タンパク質であるヒストンに酸性タンパク質のヌクレオプラスミンを加えると静電的に相互作用するので、

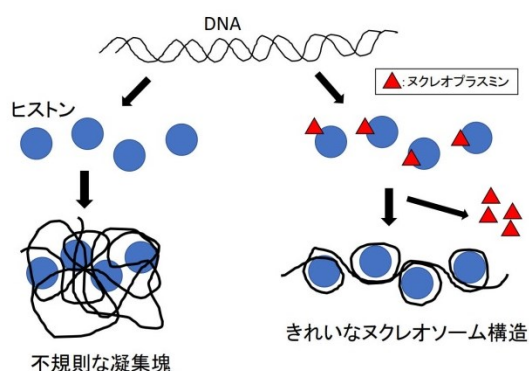


図 7

ラスキーらの実験。DNA とヒストンを混ぜただけでは不規則な凝集塊が形成されるが、ヒストンをあらかじめヌクレオプラスミンと結合させておいてから DNA と混ぜるときれいなヌクレオソーム構造が形成される。(引用文献 7 より作図)

ヒストンはすぐには DNA と結合できないようになります。そこにあとから DNA を添加すると、ヌクレオプラスミンはヒストンから徐々に外れ、フリーになったヒストンが DNA と結合してきれいなヌクレオソームが形成されると、ラスキーらは考えたのです。なお、ヌクレオプラスミンの働きでうまくヌクレオソームは形成されましたが、ヌクレオプラスミン自身はヌクレオソーム構造の中には含まれていませんでした。つまり、ヌクレオプラスミンは一時的にヒストンに結合してそのプラスの電荷をシールドすることで、ヌクレオソーム形成を手助けしただけなのです。彼らはヌクレオプラスミンのような働きを持つタンパク質のことを「molecular chaperone (分子シャペロン)」と呼ぶことを提案しました。その論文のなかで彼らは次のように述べています。

「We suggest that the role of the protein (nucleoplasm) we have purified is that of a ‘molecular chaperone’ which prevents incorrect ionic interactions between histones and DNA」[7] (かっこは筆者)。

ここでは、ヌクレオプラスミンのような分子シャペロンは、正しくない(不適切な)相互作用を阻害する役割をもつ、と述べられています[7]。人の世界のシャペロン(年配の婦人)は若い女性を不適切な男性から保護し(シャペロンが目を光らせて用心していても不適切な関係はしばしば起こり得ますが)、お目当ての男性とうまくカップルができるように働きます。そして最終的にシャペロンはそのカップルから離れていきます。まさにヌクレオプラスミンは分子レベルのシャペロンとして働いているというわけです。まさに言い得て妙なる表現であると言えます。ただ、ラスキーらの論文では「molecular chaperone」と述べているだけで、人の世界のシャペロンについてはひとことも述べていません。多分欧米人はこれで、「なるほど」と理解できたのかもしれませんが、日本人には何らかの解説が必要だと思われます。

3-5 分子シャペロンの次なる展開-ルビスコ結合タンパク質

ラスキーらが提唱した「分子シャペロン」という概念はしばらく顧みられることはありませんでしたが、1980年代に入ってヌクレオプラスミンのように不適切な相互作用を阻害する働きをもつタンパク質が次々と見つかってきました。その多くがじつは熱ショックタンパク質であることがわかってきたのです。

分子シャペロンの次の展開は、エリス(R.J. Ellis)らによる植物の葉緑体における光合成過程で二酸化炭素(CO₂)の固定に関わる酵素に関する研究です。

光合成について少し簡単に説明します。この過程は大きく二つに分けられます。一つは明反応または光依存反応とよばれる過程で、葉緑体にあるクロロフィルという色素に吸収された光のエネルギーがその色素の電子を弾き飛ばし、その電子が電子伝達系を通じて流れていくときに NADPH という還元物質と ATP (エネルギー通貨) を作り出します。電子がなくなった色素は非常に不安定で反応性に富んでいるので水分子から電子を引き抜き、そのさいに酸素(O₂)が発生します。この酸素が空気中に放出されてヒトも含めた地球上の生物の好気呼吸に利用されていますが、元を正せば水分子の酸素原子由来ということになります。

もう一つの過程は光に依存しない暗反応または光非依存反応と呼ばれています。ここでは明反応で生成された還元力(NADPH)とATPを使ってCO₂の固定と有機化合物の合成を行なっています。

分子シャペロンと関係するのは、暗反応の最初のCO₂の固定に働くルビスコ(Rubisco: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxxygenase)という酵素です。ルビスコはCO₂固定の最初の反応、

リブロース 1,5-ビスリン酸 + CO₂ → 2 x 3-ホスホグリセリン酸

を触媒する酵素です。この反応では、炭素原子 5 個のリブロース 1,5-ビスリン酸に 1 分子の CO₂ が取り込まれて、炭素原子 3 個の 3-ホスホグリセリン酸が 2 分子形成されます。その後炭素原子の組換えを行う複雑な代謝経路はサイクル(回路)を形成しており、この回路発見の中心研究者の名前をとってカルビンサイクルと呼ばれています。

ちなみにこのルビスコという酵素タンパク質は、植物の葉の全タンパク質の 50%ほどを占めており、単一のタンパク質としてはおそらく地球上の生物界で最も多いタンパク質であるとも言われています[8]。地球上の生物界を含めたすべての有機物質に含まれる炭素原子のほとんどはルビスコの CO₂ 固定に由来すると言っても過言ではありません。全ての動物の生存は植物の作ってくれた有機物質に依存していることになります。このことが、植物は独立栄養生物、動物は従属栄養生物と呼ばれる所以です。

さてエリスらは、ルビスコのタンパク質について研究していましたが、ルビスコを精製してみると、8 個の大サブユニット(large subunit, 分子質量約 50 kDa)と 8 個の小サブユニット(small subunit, 分子質量約 15kDa)からなる 16 量体(L₈S₈)の非常に大きなタンパク質複合体であることがわかりました(図 8)。エリスらはこのタンパク質複合体がどのように形成されるのかを調べていました。じつは、大サブユニットは葉緑体の DNA から合成されますが、

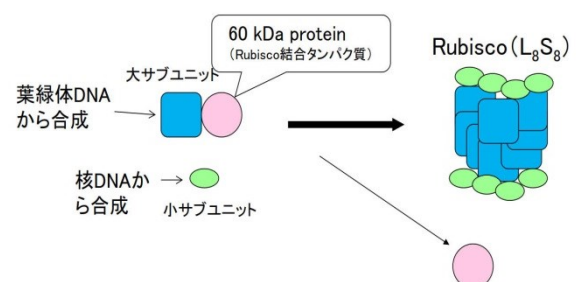


図 8

ルビスコタンパク質複合体の形成。詳細は本文参照。
(引用文献 18 より作図)

小サブユニットは核にある DNA から細胞質で合成されます。その後小サブユニットは細胞質から葉緑体に移行して大サブユニットと複合体を形成します。しかし大サブユニットと小サブユニットを別々に精製して試験管の中でそれらを混ぜただけでは機能のある 16 量体のルビスコは形成されません。よく調べてみると、葉緑体の中では新しく合成された大サブユニットはいつも 60 kDa のタンパク質と結合していることがわかりました(ルビスコ結合タンパク質とも呼ばれ、核の DNA にコードされています)。そこで、試験管の中で、先に大サブユニットとほぼ同量の 60 kDa タンパク質を混ぜておいて、その後で小サブユニットを加えようまく機能を持った 16 量体のルビスコが形成されてきたのです(図 8) [9]。しかも 60 kDa タンパク質は 16 量体のルビスコには含まれていませんでした。したがってこの 60 kDa タンパク質は、前項で述べたヌクレオソーム形成におけるヌクレオプラスミンとまったく同じように分子シャペロンとして働いていることになります。

エリスは後に、この 60 kDa タンパク質のことを、シャペロニン 60(chaperonin 60, Cpn60)と呼ぶようになりました。その後の研究で、シャペロニン 60 は分子質量約 10 kDa のタンパク質と一緒に働くことがわかり、これはシャペロニン 10(chaperonin 10, Cpn10)と名付けられています。

3-6 シャペロニン 60 は Hsp60 の仲間である

タンパク質が同定されると、当然のことながらそのタンパク質をコードしている DNA の塩基配列を決定し、そこからアミノ酸配列を推定することになります。その結果驚くべきことに、植物の Cpn60 のアミノ酸配列が大腸菌の GroEL という 60 kDa のタンパク質のそれと非常に相溶性が高いことがわかったのです [10]。Cpn60 と GroEL の推定される分子質量や等電点はほぼ同じで、アミノ酸配列を並べてみると 43% が同一で異なるアミノ酸も性質の似たものが多かったのです。またこの両者のタンパク質は

弱いながらも ATPase 活性があることも報告されました。さらに、どちらのタンパク質も 10 kDa のタンパク質(植物では Cpn10, 大腸菌では GroES)と一緒に 14 量体の複合体を形成することも判明しました。このように種が違ってもよく似たアミノ酸配列を持ち、機能も似ているタンパク質のことをお互いに相同体といいます。

ラスキーらのヌクレオプラスミンやエリスらの Cpn60 とは全く独立に、ジョージオポラス(C.P. Georgopoulos)らを中心として大腸菌での GroEL という 60 kDa タンパク質の機能に関する研究が進んでいました。大腸菌の GroEL というのはもともとこの遺伝子に変異があると、大腸菌に感染するウィルス(バクテリオファージ λ)の頭部タンパク質集合体がうまく形成されないということから見つかったものです [11]。つまりこのウィルスは自身の体(頭部)の形成に宿主(大腸菌)のタンパク質である GroEL をうまく利用していることになります。また、GroEL はウィルスの頭部の形成を手助けするだけで、最終的にはウィルスの本体に GroEL が含まれてはいません。したがって、GroEL もヌクレオプラスミンや Cpn60 と同じように「分子シャペロン」としての機能を持っていることになります。ちなみに、Cpn60 が Cpn10 と一緒にシャペロンとして働くのと同様に、GroEL も GroES という 10 kDa のタンパク質と一緒に 14 量体の複合体を形成して働くことも後にわかりました。なお、GroEL と GroES はいずれも大腸菌の熱ショックタンパク質です。

さらに興味あることとして、動物のミトコンドリアに局在する 60 kDa の熱ショックタンパク質 Hsp60 が Cpn60 や GroEL の相同体であることがわかったのです。このようにして大腸菌、植物の葉緑体、動物のミトコンドリアに局在するそれぞれの 60 kDa のタンパク質がお互いに相同体であり、分子シャペロンとして機能することが判明したのです。しかも 60 kDa のタンパク質と一緒に働く 10 kDa のタンパク質もお互いに相同体であることがわかりました。図示すると、

植物葉緑体	大腸菌	動物ミトコンドリア
Cpn60	=	GroEL = Hsp60
Cpn10	=	GroES = Hsp10

ということになります。これはまさに、大腸菌、植物、動物を含むすべての生物で同じようなタンパク質が共通の機能を営んでいることを意味しています。

3-7 大腸菌熱ショックタンパク質(DnaKとDnaJ)の分子シャペロン機能

前項で述べたジョージオポラスらは大腸菌で、GroELとは別の熱ショックタンパク質である DnaK や DnaJ の機能を調べていました。大腸菌の DnaK は 1980 年代半ばには、哺乳類の Hsp70 の相同体であることが知られていました。DnaJ の哺乳類の相同体は少し遅れて 1993 年に筆者らの発見した Hsp40 であることが判明しました。

DnaK や DnaJ は、名前に「DNA」と付いていることからわかるように、もともとこれらの遺伝子に変異があると大腸菌の DNA 複製に異常が見られることから同定されたものです。ジョージオポラスらのグループは、大腸菌に寄生する λ ファージというウィルスの DNA 複製を調べているときに、DnaK と DnaJ、そしてもう一つの GrpE という遺伝子に変異があると、 λ ファージの DNA 複製が阻害されることを見出しました。彼らは必要なタンパク質を精製し、完全な *in vitro* 系(試験管の中)で λ ファージの DNA 複製を再現しています。少し細かい内容ですが簡潔に説明します(図 9) [12]。

最初に λ ファージ DNA の複製開始点(ori λ という部位)にファージ遺伝子産物である λ O と λ P という 2 つのタンパク質が結合します。ついでそこに宿主大腸菌の DnaB タンパク質(DNA ヘリカーゼ活性を持つ)が結合します。これで複製開始の準備ができたのですが、 λ P が DnaB に強く結合しているのでこのままでは開始ができません。複製開始のためには DnaB から λ P が外れなければなら

ないのですが、この λ P を解離させるのに DnaK, DnaJ, GrpE が関与しているのです。DnaK は ATPase 活性を持っており、ATP のエネルギーを使ってこの過程を進めています。 λ P が解離すると DnaB ヘリカーゼが二重らせんを解きほぐし(unwind), DNA ポリメラーゼによるファージ DNA の複製がスタートします。ここでの DnaK, DnaJ および GrpE の役割は、複製開始点のタンパク質複合体から λ P タンパク質を解離させるだけで、DNA 複製が始まる時には DnaK, DnaJ および GrpE は必要なくなるのでそこから離れていきます。これはまさに「分子シャペロン」の働きですが、ジョージオポラスらはまだこの言葉を使っていません。

ちなみに、 λ ファージ DNA の複製に関与するタンパク質の多くは、 λ O と λ P を除いてすべて宿主のもので、ウィルスというのは必要最小限の遺伝子しか持っておらず、増殖するときに必要なタンパク質はすべて宿主のものを拝借しています。したがってウィルス単独では増殖できません。増殖するには必ず宿主細胞に寄生する必要があります。ウィルスのしたたかな戦略です。このようなことから、ウィルスは生物と無生物との中間に位置する存在であるといわれています。

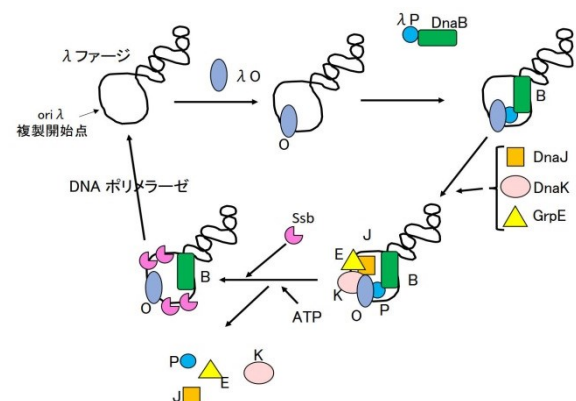


図 9

λ ファージ DNA 複製における DnaK, DnaJ, GrpE の役割 (概略)。詳細は本文参照。Ssb: single strand DNA 結合タンパク質。(引用文献 12 を改変)

なお、大腸菌のなかで増殖するP1プラスミドの複製にも DnaK および DnaJ が「分子シャペロン」のような働きをしていることが報告されています[13]。このようなことから、DnaK (真核生物では Hsp70, ATPase 活性を持っている) は DnaJ (DnaK の ATPase 活性を促進する) や GrpE (DnaK のヌクレオチド交換反応を促進する) とともに、一般的にタンパク質複合体形成を調節する「分子シャペロン」ではないか、と考えられるようになってきたのです。

この後もときどき登場しますが、Hsp70 (DnaK) がシャペロンとして働くときにはいつも、DnaJ 相同体(Hsp40)と GrpE のようなヌクレオチド交換反応を促進するタンパク質がコシャペロン (cochaperone, シャペロン補助因子) として一緒に働いています。

3-8 ペラムの大胆な提案-Hsp70 は変性タンパク質を修復する

イギリスのペラム (H. Pelham) は、2 章で述べたように (2-1-8) [1], 熱ショック遺伝子のプロモーター領域に共通して存在する塩基配列 (heat shock element, HSE) を発見しています。1986 年ペラムは、簡単な実験結果から Hsp70 の機能について大胆な提案をしました[14]。それはこうです。

哺乳類の培養細胞では Hsp70 は通常細胞質に局在しています。しかし細胞に 42~45°C の軽い熱ショックを与えると、Hsp70 は速やかに核および核小体へ移行します (図 10) [15]。その細胞を 37°C に戻すと数時間で Hsp70 はまた細胞質に戻ってきます。それは見事な細胞内局在の変化です。ペラムらは哺乳類細胞にショウジョウバエの Hsp70 遺伝子を導入し Hsp70 を高発現させると対照の細胞と比較して、熱ショックによって核小体に移行した Hsp70 がより速やかに細胞質に戻ってくることを観察しました[16]。また、熱ショックで核小体に移行した Hsp70 は、細部膜を透過性にして ATP を添加すると核小体から遊離することも示しました[17]。核小体はタンパク質合成装

置であるリボソームを組み立てている核内の領域です。組み立て途上のリボソーム (preribosomes) は熱に弱く、軽い熱ショックで不溶性になり核小体の形態も変化することがわかっています。このような結果から、ペラムは、Hsp70 は熱で変性した (と思われる) 核小体のタンパク質

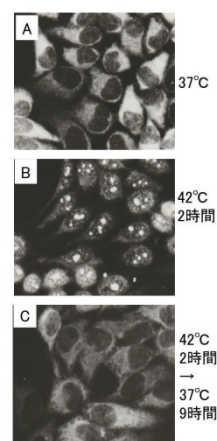


図 10

熱ショックによる Hsp70 の細胞内移行 (HeLa 細胞). A: 37°C. B: 42°C 2 時間加温. C: 42°C 2 時間加温後ふたたび 37°C で 9 時間. 抗 Hsp70 抗体による免疫蛍光染色. Hsp70 は 37°C ではおもに細胞質に局在しているが、熱ショックにより核および核小体に移行する。細胞をふたたび 37°C にもどすと Hsp70 は細胞質に戻ってくる。(引用文献 15 より)

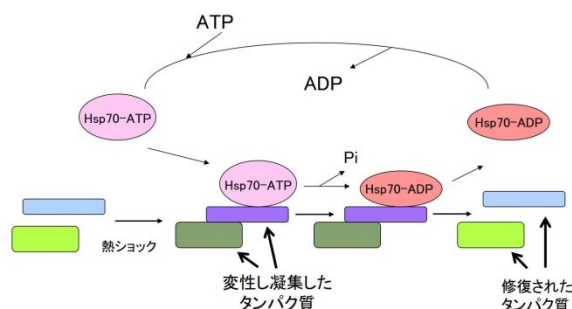


図 11

Hsp70 による変性タンパク質の修復モデル (ペラムの仮説). ATP 結合型の Hsp70 が変性タンパク質に結合し、ATP のエネルギーを使って、その変性タンパク質を修復するのではないかと (引用文献 14 より作図)

複合体に結合し、ATP のエネルギーを使って修復(再折りたたみ)し、ストレス条件下でも細胞機能(リボソームによるタンパク質合成など)がうまくいくように働いているのではないかと提唱しました(図 11)[14]. この総説でもペラムは「分子シャペロン」という言葉を使っていません.

3-9 分子シャペロンという概念の一般化

このような背景のもと、エリス(J. Ellis)は、1987 年コペンハーゲンで開催された植物関係の会議で、他のタンパク質の疎水性相互作用による不適切な凝集を防ぎ、その正しい折りたたみや適切なタンパク質複合体の形成の手助けをするタンパク質のことを、まとめて「分子シャペロン」と呼ぶことを提案しました[18]. これには前述した、ヌクレオプラスミン、シャペロニン 60, GroEL, Hsp70 などが含まれます. 「分子シャペロン」の重要な特徴は、相手のタンパク質とは一時的に結合(弱い静電的および疎水性相互作用)するだけで、最終的には相手から離れていくことです. もう一点大事なことは、相手のタンパク質の最終的な立体構造や複合体の構造はあくまでもその一次構造(アミノ酸配列)で決定されるのであって、分子シャペロン自身がそれに影響を与えることない、ということです.

エリスによる分子シャペロンという概念の一般化によって、それまでは関係のないと思われていた多くの反応系が分子シャペロンという考え方で説明ができるようになったのです. 1990 年ころには分子シャペロンに関する総説がいくつか発表されています. 1991 年のエリスの総説では、分子シャペロンとして機能しているタンパク質の例として、ヌクレオプラスミン、シャペロニン 60 (Hsp60), Hsp70 や Hsp90 などが示されています. さらに HSP 以外のタンパク質もいくつか例示されています[6]. その後の研究で、HSPs の多くは分子シャペロンおよびその補助因子として働いていることがわかってきました. したがって、最近では分子シャペロンと HSPs はほぼ同じ意味で

使われるようになってきていますが、正確には分子シャペロンという大きなくりの中に HSPs が含まれている、というのが正しい見方です.

3-10 HSPs の細胞内でのさまざまな分子シャペロン機能

1980 年代後半から 1990 年代にかけて、HSPs が細胞内で分子シャペロンとして機能していることが矢継ぎ早に報告されるようになりました. 当時 HSPs の研究を始めたばかりの頃の筆者には驚きの連続でした. ここからは、そのいくつかの例を見ていきたいと思います.

3-10-1 免疫グロブリンとの関わり

免疫系で働くリンパ系細胞では、抗体である免疫グロブリンというタンパク質を盛んに合成しています. 免疫グロブリンは重鎖(heavy chain)と軽鎖(light chain)がそれぞれ 2 本のサブユニットが会合したタンパク質複合体です(図 12). これらのサブユニットが別々に小胞体で合成されてから会合して成熟した免疫グロブリンが出来上がり、細胞外に分泌されることになります. 詳しく調べてみると、免疫グロブリンが形成されるときに重鎖には必ず 78 kDa のタンパク質(BiP, immunoglobulin heavy chain binding protein)が結合していて、その後このタンパク質が外れてうまく重鎖と軽鎖が会合し、成熟した免疫グ

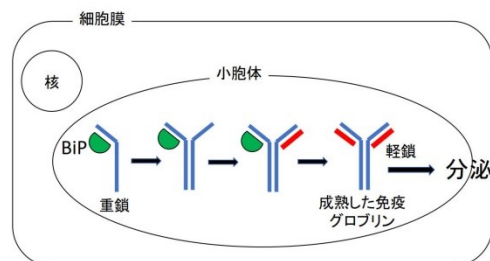


図 12

小胞体における免疫グロブリン成熟過程での BiP (免疫グロブリン重鎖結合タンパク質, 78 kD のタンパク質). BiP は別名 Grp78 と呼ばれ、Hsp70 の仲間である. (引用文献 2 を参考にした)

ロブリンが形成されることが示されました。まさに BiP は分子シャペロンとして働いていることになります。この BiP がじつは小胞体に局在する Grp78 (78 kDa の glucose-regulated protein, グルコース飢餓状態になると合成されてくるタンパク質)と同一であり, Hsp70 の相同体であることがわかったのです[19]。

3-10-2 クラスリンアンコーティング (Clathrin uncoating) ATPase

細胞の外に分泌されるタンパク質はまず小胞体で合成され, その後小さな袋(被覆小胞, coated vesicle)に詰め込まれて, ゴルジ体を経由して細胞膜まで運ばれていって細胞外に分泌されます。この被覆小胞の一つがクラスリン被覆小胞です。また細胞外からタンパク質などを取り込むときにもエンドサイトーシスという過程でクラスリン被覆小胞が形成されます(図 13)。クラスリンというのは特徴ある構造をしたタンパク質で, それらが集合するとサッカーボールのような形をした被覆小胞 (coated vesicle) ができあがります。細胞内では被覆小胞の中にタンパク

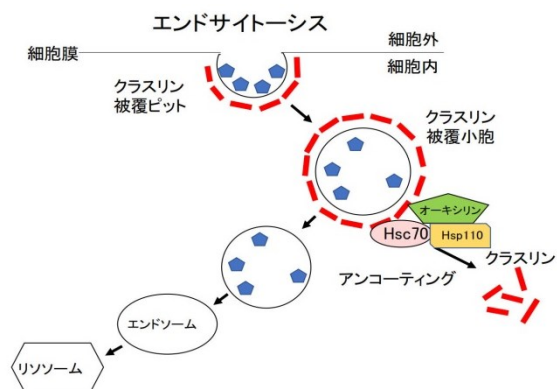


図 13

クラスリン被覆小胞からクラスリンを解離する Hsc70。エンドサイトーシスの過程でクラスリン被覆小胞が形成される。そのクラスリンを解離するのに Hsc70, オーキシリン (Hsp40 の仲間), Hsp110 (ヌクレオチド交換因子) が関与している。なお被覆が解離した小胞はエンドソームを経由してリソソームに運ばれる。(引用文献 2 および 22 を参考に作図)

質を入れて輸送していますが, この小胞の中のタンパク質を取り出すときにはクラスリンを解離(覆いを取り除く, uncoating)しなければなりません。このときに働くのが 70 kDa の ATPase 活性を持ったタンパク質で, これが Hsc70 (構成的に発現している Hsp70 の仲間, heat shock cognate 70)と同一であることが判明したのです[20, 21]。

クラスリンアンコーティング (Clathrin uncoating) ATPase
= Hsc70

ということです。

なお最近の研究では, クラスリンの解離には Hsc70 とともに, Hsp40 の仲間であるオーキシリン (auxilin) と, ヌクレオチド交換反応を促進する Hsp110 も一緒に働いていることが報告されています[22]。また, Hsc70 はクラスリンの解離だけでなく, クラスリンが集合して被覆小胞を作るときにもクラスリンタンパク質に会合して不規則なクラスリン複合体ができないようにしていることもわかっています。このようなことから, Hsc70 はまさに分子シャペロンとして働いていることになります。

3-10-3 Hsp70 がミトコンドリアや小胞体へのタンパク質輸送にも関与

ミトコンドリアや小胞体などの細胞小器官で働くタンパク質の多くは核の DNA にコードされていて, 細胞質で合成されてからそれぞれの小器官に運ばれていきます。このとき, たとえばミトコンドリアへ運ばれるタンパク質は, 他の小胞体や核に運ばれるタンパク質とどのようにして識別されているのでしょうか? じつはそれぞれのタンパク質は行き先を指定するアミノ酸配列をあらかじめ持っていることがわかりました。それを「シグナル配列」といい, それぞれの小器官への輸送に必要な十数個から数十個のアミノ酸配列です(ちなみに, シグナル配列が細胞小器官へのタンパク質輸送に必要最小限の配列であることを証明したブローベル[G. Blobel, 1936-2018]は, 1999

年にノーベル医学生理学賞を受賞しています). たとえばミトコンドリアへ輸送されるタンパク質のシグナル配列は塩基性アミノ酸が飛び飛びに存在する十数個の配列です. このシグナル配列がミトコンドリア外膜にあるタンパク質転送装置(トランスロコン)と結合することで中に輸送されることになります. ミトコンドリア内に輸送された後はそのシグナル配列は切除されます. したがって, タンパク質がミトコンドリアに輸送されたかどうかはその分子質量を電気泳動で調べればわかります. つまり, 輸送される前は分子質量が大きく(前駆体タンパク質といいます), 輸送された後はシグナル配列に相当する分だけ少し小さくなります(成熟タンパク質といいます). このことを指標にして, ミトコンドリアへのタンパク質輸送に関わる他の因子を探索することができます.

さて酵母を用いた遺伝学的研究(遺伝子を破壊したりして表現形を観察してその遺伝子の機能を解析する研究)で, Hsp70 の遺伝子を破壊(ノックアウト)すると, ミトコンドリアだけでなく小胞体へ輸送されるべき前駆体タンパク質が輸送されずに細胞質に蓄積してきたのです[23]. 同様の結果がミトコンドリアを単離した細胞フリー系の実験でも示されました[24].

細胞小器官へのタンパク質輸送における Hsp70 の役割について, ミトコンドリアへの輸送に関しては現在以下のように理解されています(図 14)[2]. ミトコンドリアの外膜と内膜にはタンパク質輸送に関わる転送装置(トランスロコン)があり, 輸送されるときにはタンパク質はほどけて引き伸ばされた状態でなければ転送装置を通り抜けることができません. 細胞質で合成されたタンパク質が輸送されやすいように引き伸ばされた状態に保つのに Hsp70 が必要, というわけです. Hsp70 は引き伸ばされたタンパク質の疎水性領域に結合してお互いに凝集しないようにシールドしていると考えられています. また, 転送装置を通してタンパク質がミトコンドリア内に入ってくるとき, そのタンパク質を中に引きずり込む力が必要ですが, それ

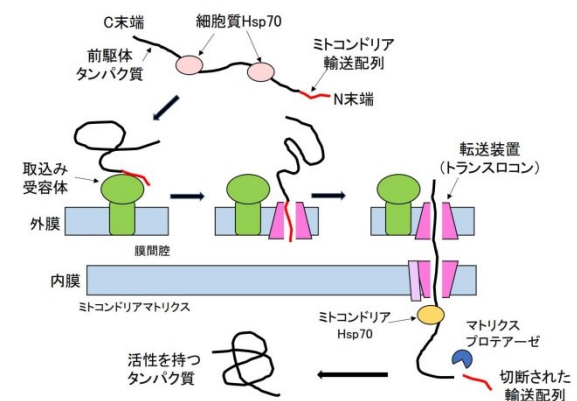


図 14

ミトコンドリアへのタンパク質輸送. 細胞質 Hsp70 は前駆体タンパク質をほどけた状態に保つ. ミトコンドリア輸送配列が取込み受容体に結合したあと, 前駆体タンパク質は転送装置 (トランスロコン) を通ってマトリクス内に入っていく. マトリクスではミトコンドリア Hsp70 が前駆体タンパク質を中に引き込む. マトリクスプロテアーゼが輸送配列を切断する. そのあと成熟した活性を持つタンパク質に折りたたまれる. (引用文献 2 を参考に作図)

はミトコンドリアの中に局在する Hsp70 の仲間(ミトコンドリア Hsp70, mtHsp70)が ATP のエネルギーを使って行なっています. mtHsp70 は中に入ってきたタンパク質の折りたたみにも関与しています.

なお, 小胞体へのタンパク質輸送には, 2 つの方式があります. 一つは小胞体に結合したリボソームがタンパク質を合成しながらそのまま小胞体の中に送り込む方式です. もう一つは細胞質で合成された後に輸送される場合で, これはミトコンドリアへの輸送と同じで, 細胞質側では Hsp70 による解きほぐしと, 小胞体の中では Hsp70 の仲間(3-10-1 の項で述べた Grp78, または BiP)が働いていることがわかっています[2].

3-10-4 Hsp70 は合成途上のポリペプチドに結合している

1990 年, ウェルチ (W.J. Welch) らのグループは重要な

研究を報告しました[25]。それは、リボソームで新たに合成されてくるポリペプチドすべてに細胞質の Hsp70 が結合している、というものです。リボソームから伸びてくるポリペプチドがまだ折りたたまれていないときに、その疎水性領域に結合して凝集するのを防いでいるのではないかと、いうのです。そしてポリペプチドと Hsp70 との結合は ATP の添加で解離することも示されました。

これらの結果をふまえてウェルチらは図 15 に示すようなモデルを提案しています。まず、リボソームから伸びてきてまだ折りたたまれていないポリペプチドに Hsp70 が結合します。ポリペプチドが完全に合成された後に、ATP のエネルギーを使って、1 つは折りたたみや、2 つめは複合体形成を手助けし、3 つめはポリペプチドを解きほぐした状態に維持してミトコンドリアなどへの輸送を補助している、というものです。もちろん結合しているポリペプチドが折りたたまれたり複合体を形成した後に Hsp70 は解離するので、やはり分子シャペロンとして働いていることになります。

Hsp70 はその前から細胞内のさまざまなタンパク質と会合することが知られており、相手をあまり選ばないこと

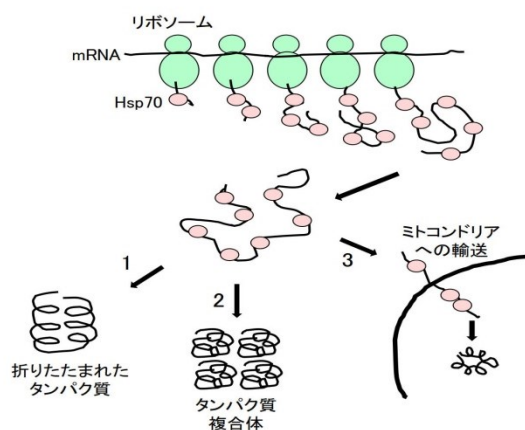


図 15

新生ポリペプチド鎖と Hsp70 との結合。Hsp70 は新生ポリペプチド鎖と結合し、そのあと、1 折りたたみを補助する、2 複合体形成を手助けする、3 ミトコンドリアなどへの輸送を介添えする、などの機能を持つ。(引用文献 25 を改変)

から「無節操(promiscuous)」なタンパク質とも言われていましたが、これはウェルチらの実験結果をみると納得することができます。

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のラツロー (Andrei Laszlo) 博士の研究室に留学していましたが、あるとき論文の抄読会で私が「Hsp70 は promiscuous なタンパク質である」ことを紹介したところ、そこにいた女性から嫌な顔をされたことがあります。「真面目な論文紹介の場でそのような言葉は使うべきでない」と言わんばかりでした。後からわかったことですが、この promiscuous という言葉は、「ふしだらな女性」という意味があること知りました。言葉の違いというか、文化の違いを考えさせられたエピソードの一つです。

3-10-5 Hsp70 が結合するのはどのような領域か？

Hsp70 は疎水性の領域に結合すると述べましたが、それでは具体的に相手のタンパク質のどのようなアミノ酸配列を認識して結合するのでしょうか？

まず Hsp70 は約 640 個のアミノ酸からなるタンパク質ですが、そのドメイン構造は、N 末端部分には ATP 結合

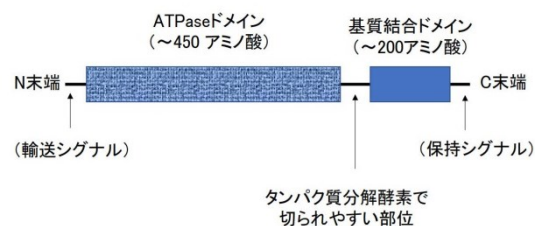


図 16

Hsp70 のドメイン構造。N 末端から約 450 アミノ酸は ATPase 活性を持つドメインで、進化的に Hsp70 の仲間同士でよく保存されている。C 末端側には基質結合ドメインがあり、その立体構造には 8~10 個のペプチドが結合できるくぼみがある。N 末端および C 末端には、それぞれ輸送シグナルおよび保持シグナルを持つメンバーもある。

部位(ATPase 活性部位)があり, C 末端側にペプチド結合部位があります(図 16). そのペプチド結合部位の立体構造も解析されており, 8 から 10 個のペプチドが結合できるような「くぼみ」があります.

ロスマン(J.E. Rothman)らのグループは, 8~9 個のアミノ酸からなるさまざまな配列を持った多数のペプチドを合成し, どのような配列のペプチドが Grp78(小胞体に局在する Hsp70 の仲間)とよく結合するかを調べました. その結果, 一つおきに疎水性の芳香族アミノ酸(フェニルアラニンとトリプトファン)があり, 全体として疎水性のアミノ酸に富むペプチドが Grp78 に結合しやすいことがわかったのです[26].

3-10-6 新規合成タンパク質折りたたみの原理

ウェルチらの研究で, リボソームから伸びてきた新規合成タンパク質に Hsp70 が結合していることがわかりました. それではその後そのタンパク質はどのように折りたたまれて成熟したタンパク質になるのでしょうか. この問題に取り組んだのが, ハートル(F.U. Hartl)を中心としたグループです. 1990 年代の彼らの研究によって, 新規に合成されてきたタンパク質は, 大腸菌などの原核生物でもヒトを含む真核生物でも同じような原理で折りたたま

れることがわかったのです[27, 28].

ここでは, 最近の研究成果のまとめを紹介したいと思います[29]. 原核生物(図 17A)および真核生物(図 17B)での新生ポリペプチド鎖の折りたたみを簡潔に説明します.

リボソームから伸びてきたポリペプチドは最初に, 原核生物ではトリガーファクター(trigger factor, TF), 真核生物では NAC/RAC 複合体と結合します. いずれも約 70%のタンパク質はこれらのシャペロンの働きで折りたたまれます. そこで折りたたまれなかった残り 30%ほどのタンパク質は DnaK(Hsp70)と DnaJ(Hsp40)のシャペロン系に移されます. これらのシャペロンはまだ折りたたまれていないポリペプチドの疎水性領域をシールドする役目をしています. ポリペプチド-DnaK-DnaJ の三者複合体が形成されます. このとき ATP は DnaK に結合していますが, DnaJ が DnaK による ATP 分解を促進し, ADP 結合型の DnaK になって三者複合体が安定化します. この段階ではまだポリペプチドは完全には折りたたまれていません. 次に GrpE(ヌクレオチド交換反応を促進する, 真核生物では Hsp110 や Bag1 など)が作用して

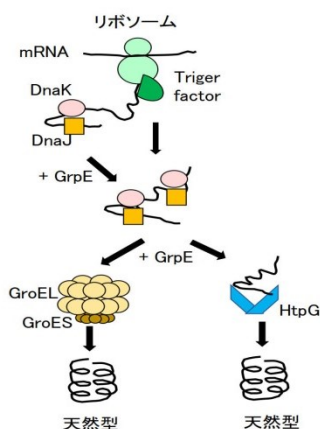


図 17A

原核生物での新生ポリペプチド鎖の折りたたみ経路.
詳しくは本文参照. (引用文献 29 を改変)

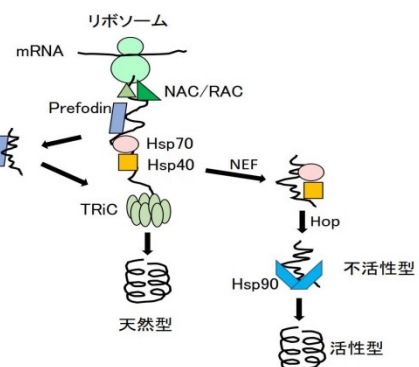


図 17B

真核生物での新生ポリペプチド鎖の折りたたみ経路.
詳しくは本文参照.

NAC: nascent chain-associated complex; RAC: ribosome-associated complex; NEF: nucleotide exchange factor (真核生物では Hsp110 や Bag1). (引用文献 29 を改変)

DnaK に結合している ADP を外します。そうするとポリペプチドは DnaK と DnaJ から外れ、そのさいにポリペプチドは折りたたまれます(全体の約 20%のタンパク質)。それでもまだ完全に折りたたまれないポリペプチド(全体の約 10%のタンパク質)は、GroEL と GroES の複合体に移されます(真核生物では TRiC とよばれるタンパク質複合体)。この複合体は中が空洞になっていてその中にポリペプチドが入り、そこでまた ATP のエネルギーを使って完全に折りたたまれます。また、一部のポリペプチドは、DnaK/DnaJ シャペロン系から Hsp90 シャペロン系(原核生物では HspG)に移されて正しく折りたたまれることになります。Hsp90 にお世話になるタンパク質の多くは細胞の生存や増殖に必要なシグナル伝達因子や転写因子で、真核生物では 200~300 個ほど知られています(後述)。

なお、真核生物ではごく一部のポリペプチドはリボソームから伸びてきてすぐにプリフォルディン(prefoldin, Pfd)とよばれるシャペロンと結合し、Hsp70/Hsp40 シャペロン系を迂回してポリペプチドを TRiC に受け渡す経路もあります(図 17B)。

ここで述べたように、タンパク質の折りたたみにはいくつかのシャペロンがチームを組んで働いていますが、これをシャペロン系(chaperone system)とよんでいます。

Cold Spring Harbor Laboratory でのエピソード

真核生物でのタンパク質折りたたみの研究では、じつは私の発見した Hsp40 が活躍することになります。正確には Hsp40 に対する抗体です。1992 年当時、Hsp40 の抗体は私の研究室で作製しましたが、Hsp40 はまだ cDNA が単離されていないこともあって精製されたタンパク質を得ることは困難でした。そこで、ハートルらは私の抗 Hsp40 抗体を用いて、無細胞系タンパク質合成システムから Hsp40 タンパク質を除去するとモデルタンパク質(このときにはホタルのルシフェラーゼ)がうまく折りた

たまれないことを示したのです。この研究成果は 1994 年 5 月、アメリカニューヨーク州にある Cold Spring Harbor Laboratory で開催された国際会議で発表されました(論文としては 94 年 7 月の Nature に掲載されました[28])。私もこの会議にはポスター発表でしたが参加していました。

この会議で、私の Hsp40 の抗体に関する一つのエピソードを紹介します。ハートルと私はそれまでに国際会議などで何度かお会いする機会があり、93 年にアメリカで開催されたある学会で会ったときに共同研究の申し込みがあり、Hsp40 の抗体の分与を依頼されたので彼に送ることにしたのです。それが上で述べた結果につながりました。ハートルに抗体を送ってからしばらくして、ウェルチ(W.J. Welch)からもこの抗体の分与の依頼がありました。ウェルチとは私もそれまで面識はありました。しかしハートルとの共同研究が進行中でもあり、分与を渋っていたのです。そういう中で Cold Spring Harbor Laboratory の国際会議でウェルチに会ったのです。私がポスター発表しているところに彼がきて、「なぜ抗体を分けてくれないのか」と言うので、私が「いまこの抗体を使ってハートルと共同研究しているのでもう少し待ってほしいか」と言ったら、突然「You are stopping science, You are stopping science」と大きな声で食ってかかってきました。これには私もびっくりしました。たしかに医学生物学の研究分野では、公表されたまたは論文に発表された研究材料(抗体や cDNA、細胞など)は依頼があれば分与することが暗黙のしきたりになっています。それで研究が発展するからです。それにしても「You are stopping science」と言われたときには一瞬たじろいでしまいました。もちろんハートルとの共同研究が Nature に掲載された後にウェルチには Hsp40 抗体を送り、非常にいい抗体だと言ってくれました。科学の世界はなかなかきびしいものだなあと思い知らされたエピソードです。なおウェルチは 1980 年代から 90 年代にかけて HSPs の分野

で活躍していましたが、90 年代後半からは残念ながら彼の消息が聞かれなくなりました。

3-10-7 HSPs はタンパク質の変性を防護し、変性したタンパク質を修復できる

これまで述べてきたように、細胞内での HSPs のもつ分子シャペロン機能が徐々に明らかになってきました。熱ショックなどのストレスを受けるとタンパク質が変性します。そのさいに HSPs がその変性を防護したり、いったん変性して (unfold, 解きほぐれた) しまったタンパク質を元どおりに修復して (refold, 再折りたたみ) 活性を回復させることができるのではないかと考えられるようになってきました。これは、3-8 の項で述べたペラム (H. Pelham) の仮説 [14] に刺激されたこともあります。

以下に、さまざまな実験系で示された、HSPs によるタンパク質変性防護と、変性したタンパク質の修復について紹介します。また、変異したタンパク質の機能回復についても述べます。

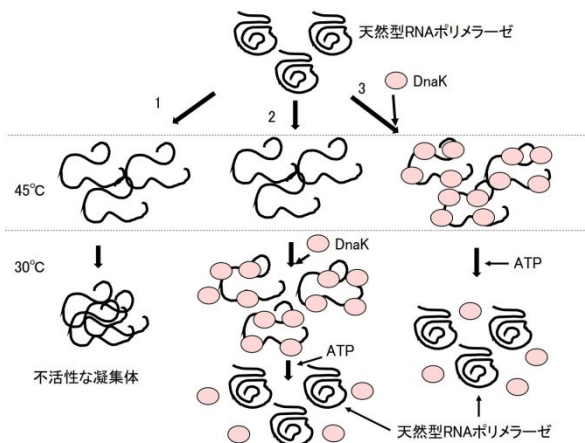


図 18

ジョージオポラスらの実験. RNA ポリメラーゼを 45°C で加温すると不活性な凝集体が形成される (1). 熱ショックで変性したあとから DnaK (+ATP) を加えると天然型 RNA ポリメラーゼが再生する (2). また、45°C 加温中に DnaK を加えておくと変性が防護される (3). (引用文献 30 を改変)

(1) ジョージオポラスらの研究

彼らは RNA ポリメラーゼを 45°C で 5 分間加温するとそのあと 30°C に戻して活性を測定しても活性は見られませんが (図 18 の 1), このとき反応液に大腸菌の DnaK (Hsp70) を加えておくと 45°C で 20 分以上加温しても活性がほとんど失活しないことを示しました (図 18 の 3). また、リボヌクレアーゼ A をあらかじめ 45°C 10 分処理して完全に失活させた後から、DnaK と ATP を加えても活性が回復するという結果が得られました (図 18 の 2) [30]. この実験では DnaK 単独でも ATP のエネルギーを使って熱によるタンパク質変性を防護し、変性してしまったタンパク質の修復ができることが示されたのです。

(2) リンドクイスト (S. Lindquist) らの研究

彼女らは酵母の HSPs があらかじめ変性して凝集してしまったタンパク質 (ここではホタルルシフェラーゼをモデルタンパク質として用いた) でも元どおりに活性回復することを報告しました [31]. 彼女らはまずフシフェラーゼを高濃度の尿素 (タンパク質変性剤) で変性させ、それを低温 (4°C) の溶液で尿素を希釈して 30 分ほど置いておきます。すると分子質量が 2000 kD ほどの大きな凝集体が形成されます。ルシフェラーゼの分子質量が約 60 kD とすると、30 数個ほどのルシフェラーゼの凝集体ということになります。ここに酵母の Ssa1 (Hsp70), Ydj1 (Hsp40), および Hsp104 (ATPase 活性あり) を添加すると、なんとルシフェラーゼの活性が回復することを示したのです。この論文が発表されたときには、まさにゆで卵が生卵にできるのではないかともしましたが、さすがそれは無理のようです。

(3) Disaggregase について (大腸菌と哺乳類)

上で述べたジョージオポラスとリンドクイストの実験に触発されて、その後さまざまな実験系で詳しく調べられ、最近大腸菌の系を用いてタンパク質凝集体を解離する

Disaggregase(タンパク質凝集体解離酵素とでも訳すべきか)の分子メカニズムが解明されています。酵母の Hsp104 は大腸菌では ClpB(クリッピーと発音)に対応します。ClpBはATPase活性を持ち、分子質量約580 kDの6量体となってリング状の複合体を形成します。タンパク質の凝集体にまずDnaKとDnaJが結合します。DnaKに結合したATPがADPに分解されるとDnaKは凝集体の中の一つのポリペプチドと強く結合します。ついでGrpEによってDnaKに結合しているADPがATPと交換します。そのときそのポリペプチドが引っ張り出されてClpBのリング状複合体に引き渡されて、リングの中を通過する間にATP加水分解のエネルギーでポリペプチドが正しく折りたたまれる、ということです(図19) [32]。

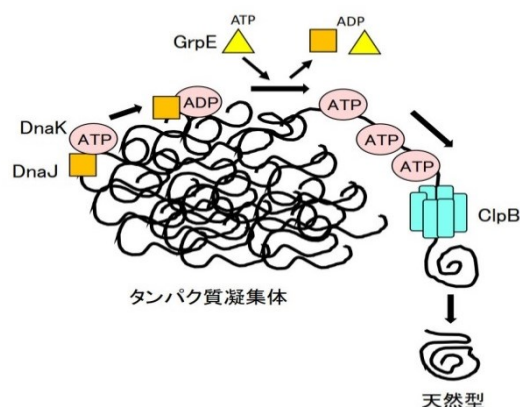


図 19

原核細胞でのDisaggregase. DnaK, DnaJおよびGrpEの働きでタンパク質凝集体からポリペプチドを引き剥がし、そのポリペプチドはClpBに引き渡されて天然型立体構造に折りたたまれる。(引用文献32から作図)

ごく最近哺乳類の系でも Disaggregase の存在が示されました。あらかじめ熱ショックで凝集したタンパク質(モデルタンパク質としてルシフェラーゼを使用)を用いて、いくつかの分子シャペロンを組み合わせることで、凝集タンパク質を解離して活性も回復できるのです。少し詳しく述べると、用いた分子シャペロンは、Hsp70, Jタンパク質(クラスAとクラスBの2種類, ドメイン構造の違うJタンパク質)*2, それからヌクレオチド交換を促進する

Hsp110(大腸菌ではGrpEに対応)です。まずルシフェラーゼタンパク質を熱ショック(45℃15分)処理することで凝集体を作製しゲルろ過で精製します。膨大な組み合わせの実験から分子シャペロンによる凝集タンパク質の解離および活性回復のメカニズムは以下のように提案されています。まずタンパク質凝集体にクラスAとBの2種類のJタンパク質が結合します。そこにHsp70がリクルートされてきます。Hsp70のATP加水分解により、Hsp70は凝集体の中のタンパク質(ルシフェラーゼ)と結合します。ついで、Hsp110によるヌクレオチド交換反応によりHsp70-タンパク質複合体が凝集体から引きずり出されます。そこにふたたびHsp70および2種類のJタンパク質とHsp110が働いて基質タンパク質が折りたたまれて活性も回復します(図20) [33]。

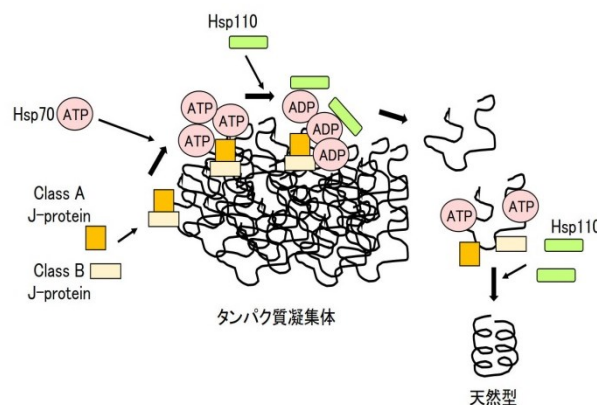


図 20

真核細胞でのDisaggregase. Hsp70と2つのクラスのJタンパク質(Hsp40), およびHsp110(ヌクレオチド交換反応を促進)が共同で働いて、凝集体からポリペプチドを引き出して天然型の立体構造に折りたたむ。(引用文献34を改変)

このように、大腸菌と哺乳類では若干違いはあるものの、分子シャペロン系が基本的には同じメカニズムで凝集体タンパク質の解離・活性回復を行なっていると考えられています。このような活性をもつ酵素を称して、Disaggregase(タンパク質凝集体解離酵素)と呼んでいます[34]。Disaggregaseは1組のシャペロンチーム(原核

生物ではDnaK、DnaJ、GrpE,およびClpB;真核生物ではHsp70、A と B クラスの J タンパク質、Hsp110)として働いており、凝集体からポリペプチドを1本ずつ引き出しては天然型立体構造に折りたたんでいるのです。しかし、Disaggregase の基質として用いているのはモデルタンパク質(たとえばルシフェラーゼ)を 43~45°Cで 20~30 分程度加温して得られるタンパク質凝集体で、変性したルシフェラーゼがせいぜい数十個集まったものです。ゆで卵のようにガチガチに固まってしまったタンパク質凝集体はいくら Disaggregase といえども、もとの生卵状態に戻すのは不可能かもしれません。

なお最近、線虫個体に熱ショックを与えて体内に生じたタンパク質凝集体が、分子シャペロン系(Hsp70、クラス A と B の 2 種類の J タンパク質、および Hsp110)によって解離することが示されています[35]。したがって Disaggregase は生体内でも異常なタンパク質凝集体が細胞内に蓄積しないように機能していることが示唆されます。

*² クラス A とクラス B の J タンパク質:哺乳類では約 50 個の Hsp40 (DnaJ) ファミリーのメンバー(相同体)が確認されていますが、そのドメイン構造から 3 つのクラス(タイプ)に分けられます。大腸菌の DnaJ タンパク質は N 末端から約 70 アミノ酸はすべての Hsp40 相同体と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ています。それに続く領域にはグリシン(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。他の Hsp40 相同体を見てみると、J ドメインはすべてのメンバーが持っていますが、C ドメインのないものや、G/F ドメインと C ドメインの両方のない相同体も存在します。これらの相同体をクラス分けすると、以下の通りです。

クラス A:J、G/F、C の 3 つのドメインを持つもの、
 クラス B:J と G/F の 2 つのドメインを持つもの(私の発見した Hsp40 はクラス B の一つ)、
 クラス C:J ドメインのみを持つもの。
 なお、タイプ A、B、C というときもあります。

(4)ハートル(U. Hartl)らの研究

次は哺乳類の Hsp70 と Hsp40 についての研究(筆者が Hsp40 の cDNA を提供)です。実際には南康文氏(現

在前橋工科大学)が行った実験です。Hsp70 と Hsp40 は一緒に働いて変性タンパク質の凝集を防ぐことはできませんが、熱で変性したタンパク質の回復はできません。ただ、モデルタンパク質のルシフェラーゼを熱で変性させるときに Hsp70 と Hsp40 を一緒に入れておき、その後でウサギ網状赤血球の溶解液(さまざまな必要な因子が含まれている)を添加するとルシフェラーゼの酵素活性が回復してくることが示されました[36]。つまり哺乳類でのシャペロン系は少し複雑で、あらかじめ変性したタンパク質の回復にはHsp70とHsp40以外の因子が必要だということです。

これまで述べた(1)から(4)までの実験は、おもにインビトロ(in vitro, 試験官の中)で精製したタンパク質を用いていますが、以下に紹介するのはインビボ(in vivo, 生きた細胞または生体の中)での実験です。いわば細胞を試験官に見立てた実験ですが、主要なシャペロン分子は遺伝子導入で高発現させます。

(5)カンピング(H.H. Kampinga)らの研究(筆者が Hsp40 の cDNA と抗体を提供)

ルシフェラーゼの cDNA を哺乳類細胞に導入し、その細胞を加温するとルシフェラーゼの活性は失活します。このとき、一緒に Hsp70 と Hsp40 を遺伝子導入して高発現させておくと加温(42°Cまたは 44°C)によるルシフェラーゼの失活が防護されます(図 21A)。また、ルシフェラーゼと一緒に Hsp70/Hsp40 を高発現した細胞を少し強い加温(43°C30 分)で処理するとルシフェラーゼは完全に失活しますが、その後細胞を 37°Cに置いておくと、失活したルシフェラーゼの活性が回復してきます。この場合、Hsp40 単独では効果がなく、Hsp70 単独でも少し効果がありますが、Hsp70 と Hsp40 の両方で最も高い回復効果が見られたのです(図 21B)[37]。この実験では Hsp70とHsp40がたしかにタンパク質変性を防護し、また

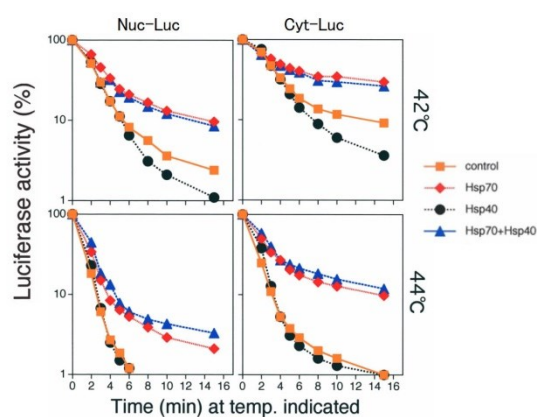


図 21A

細胞内ルシフェラーゼの熱ショックによる失活に対する Hsp70/Hsp40 の効果。ルシフェラーゼを細胞の核（左）および細胞質（右）に発現させる。Hsp70 と Hsp40 も同時にそれぞれの組み合わせで発現させる。それらの細胞を 42°C（上）または 44°C（下）で加温し一定時間後にルシフェラーゼの活性を測定した。（引用文献 37 を改変）

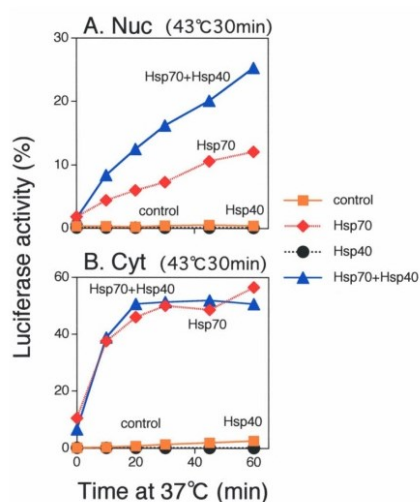


図 21B

熱ショックにより失活したルシフェラーゼの回復に対する Hsp70/Hsp40 の効果。A と同じ細胞を 43°C 30 分加温すると細胞の核（A）および細胞質（B）のルシフェラーゼはほぼ完全に失活する。その後細胞を 37°C においてルシフェラーゼ活性の回復を測定した。コントロール細胞では 37°C で 60 分経過してもほとんど活性は回復しないが、Hsp70 や Hsp40 が存在するとルシフェラーゼ活性が回復してくる。（引用文献 37 を改変）

変性したタンパク質の回復の促進に効果があることはわかりますが、細胞の中のその他の因子が関わっているかどうかは不明です。

(6) 分子シャペロンは変異タンパク質でも活性回復できる

これまで述べてきたように、HSPs は分子シャペロンとして、タンパク質の折りたたみ、タンパク質変性の防護や変性タンパク質の再折りたたみなどに働いていることがわかりましたが、HSPs が作用する相手のタンパク質（クライアントと呼ぶこともある）は、あくまでも正常なアミノ酸配列を持ったタンパク質です。ところが、変異したタンパク質であっても HSPs の分子シャペロン機能によって正常な立体構造や活性を回復することがわかってきたのです。

最初に報告されたのは、SV40 というウィルスの持つラージ T (SV40 large T) 抗原というタンパク質です[38]。このウィルスが動物細胞に感染すると、SV40 large T 抗原はその動物細胞の分裂増殖を促進し不死化します（がん細胞のようになること、形質転換という）。SV40 large T 抗原はその配列の中に核移行シグナル（塩基性アミノ酸が 4～5 個連続した配列）を持っており、核内に移行することで細胞を形質転換させます。しかし、この核移行シグナルのアミノ酸の 1 つがリジンからアスパラギンに変異すると、核内に移行することができなくなり活性を失ってしまいます。ところが、その変異した SV40 large T 抗原を持った細胞に Hsp70 を高発現させると核内に移行できるようになり、しかも形質転換活性も回復することが示されたのです。

この報告に刺激されて、田淵圭章氏（富山大学）は温度感受性変異細胞を利用して HSPs の分子シャペロン機能を検討しました。温度感受性変異細胞というのは、アミノ酸が 1 個だけ変異しており、それが 33°C では野生型の活性を持っているのですが、39°C にするとその変異によ

って構造が少し変化して活性がなくなる, というタンパク質を持った細胞のことです. 細胞を 33°C に戻すとそのタンパク質はまた野生型の活性が回復します. つまり 33°C での正常型と 39°C での変異型の間の変換は可逆的であり, いわば非常に弱い変異体と考えることができます. 田渕氏は, 温度感受性の SV40 large T 抗原を発現したマウス細胞を 39°C に移すと, 変異 SV40 large T 抗原は分解されて p53-p21 細胞周期停止シグナルが活性化し, 細胞の増殖は止まってしまいます. ところがこの細胞に Hsp70 と Hsp40 を高発現すると, 変異 SV40 large T 抗原の分解が抑制されて p53-p21 細胞周期停止シグナルは活性化しないので, 細胞の増殖が回復するのです [39]. つまり, Hsp70 と Hsp40 の分子シャペロンのおかげで温度感受性の変異 SV40 large T 抗原は 39°C でも正常な機能を維持できるということです (図 22).

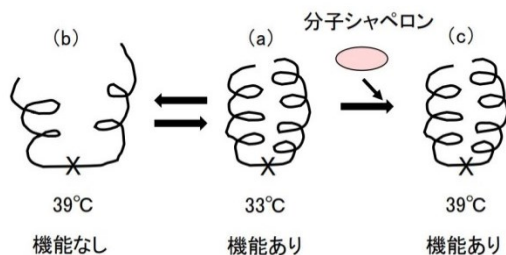


図 22

温度感受性変異タンパク質に対する分子シャペロンの効果. 温度感受性変異タンパク質は 33°C では天然型立体構造をとっていて機能がある (a). しかし 39°C では変性して機能を失う (b). (a) と (b) の変換は可逆的である. 分子シャペロンが存在すると 39°C でも機能を維持することができる (c). (引用文献 39 から作図)

分子シャペロンの定義によると, 相手の基質タンパク質の折りたたみなどを手助けするだけで, 最終的な立体構造には影響を与えないことになっています. しかし, 上で述べた結果は, 明らかに分子シャペロンが過剰に存在すると, 変異したタンパク質であっても正しく折りたたまれて正常に機能するようになることを示しています. このことは後で述べる Hsp90 の分子シャペロン機能によ

る「遺伝的変異の緩衝作用」の箇所でも詳しく触れたいと思います. ただ, タンパク質の変異でも大きく構造変化を引き起こしたり, リン酸化部位や活性部位のアミノ酸変異などの場合には, いくら分子シャペロンといえども機能回復は難しいと思われます.

(7) 分子シャペロンによる変異タンパク質凝集体形成の抑制

アルツハイマー病やハンチントン病などの神経変性疾患は, 多くの場合神経細胞の中にある特定のタンパク質の凝集体が形成されるためにその神経細胞が死滅し, 運動機能などが障害される病気です. これらの凝集体はタンパク質の折りたたみが異常になって形成されて病気が発症することから, タンパク質折りたたみ病 (protein folding disease) と呼ばれることもあります. 分子シャペロンが変性タンパク質の凝集を防護できるのであれば, 神経変性疾患における異常なタンパク質凝集体も阻止できるのではないかと考えられるようになってきました.

それを示唆する報告が 1998 年に発表されました [40]. 神経変性疾患の一つ, 脊髄小脳運動失調症 (spinocerebellar ataxia type 1, SCA1) は Ataxin-1 というタンパク質が変異してプルキンエ細胞の核内に異常な凝集体が形成されることで発症する病気です. この患者の脳の組織では, Ataxin-1 タンパク質の凝集体にプロテアソーム (タンパク質分解装置) とともに Hdj2 (Hsp40 の仲間) も一緒に局在していることが示されました. Hsp70 はかすかにその凝集体と共局在していました. このことは, 細胞は異常なタンパク質凝集体を何とかして分解するか解離するかしようとしていることを示唆しています. さらにこの報告では, 培養細胞に変異 Ataxin-1 タンパク質を発現させると凝集体が形成されますが, Hdj2 (Hsp40 の仲間) も一緒に高発現させると, その凝集体形成が抑制されるという結果も得られています.

この論文に鼓舞されて筆者はさっそく, 1998 年当時名

古屋大学医学部神経内科教室で神経変性疾患の研究をしていた祖父江元氏に会い共同研究を申し込みました。研究対象は、球脊髄性筋萎縮症(spinal and bulbar muscular atrophy, SBMA)の原因タンパク質であるアンドロゲン受容体(androgen receptor, AR)です。このタンパク質のN末端付近にはグルタミン(アミノ酸1文字表記ではQ)が連続して10~30個ほど繋がった領域があります。それが変異タンパク質はグルタミンが40個以上に伸びています。そのためにタンパク質の構造が不安定になり神経細胞の中で凝集体が形成されて病気が発症します。グルタミン(Q)が異常に伸長することで発症する病気という意味で、ポリグルタミン病(polyQ disease)とも呼ばれています。そこで、培養した神経細胞に97個のグルタミンが連続してつながった変異遺伝子(97Q-AR)を導入したところ、細胞質や核内に多くの凝集体が形成され、樹状突起の発達も悪くアポトーシスによる細胞死も増加しました。そこに97Q-ARと同時にHsp70またはHsp70+Hsp40を導入すると凝集体の形成も抑制され、細胞形態も回復しアポトーシスも減少したのです[41]。同様の結果は、もう一つの神経変性疾患である家族性筋萎縮性側索硬化症(familial amyotrophic lateral sclerosis, FALS)の原因遺伝子の1つであるスーパーオキシドジスムターゼの変異体においても示されました[42]。

これらの祖父江氏と筆者との共同研究が先駆けとなり、その後世界の多くの研究者によって培養細胞や実験動物を用いたさまざまな実験系で分子シャペロンによる神経変性疾患の発症遅延や症状軽減の効果が報告されるようになりました。これらの研究が、先に述べたDisaggregaseの研究に引き継がれていくことになります。

(8)Hsp90の分子シャペロン機能

Hsp90は細胞内にもともと多く存在するタンパク質で、細胞内全タンパク質の1~2%と見積もられています。最近では、Hsp90は数多くのタンパク質と相互作用し、分子

シャペロンとしてそれらの安定化や活性化に関与していることがわかっています。

Hsp90と会合するタンパク質として最初に同定されたのはラウス肉腫ウィルスの持つp60というタンパク質です。このp60はSrc(サーク)とも呼ばれチロシンキナーゼ活性があります。このウィルスが細胞に感染するとp60^{Src}が働いて細胞の分裂増殖を促進するように形質転換(がん化)させます。免疫沈降実験によりp60^{Src}が宿主(細胞)側のHsp90と相互作用していることが判明しました[43]。また、p60^{Src}による細胞の形質転換にはそのキナーゼ活性が必要ですが、Hsp90の機能を特異的な阻害剤によって阻害するとp60^{Src}のキナーゼ活性が失われるとともに、形質転換活性もなくなりました。このことからp60^{Src}の機能維持のためにHsp90の分子シャペロン活性が必須であることが示されたのです[44]。

もう一つ、Hsp90と会合するタンパク質として代表的なのが、ステロイドホルモン受容体です。この受容体は遺伝子の転写因子なのですが、ホルモンのシグナルがないときには細胞質にあってHsp90と結合していて不活性な状態にあります。ステロイドホルモンが細胞内に入ってくると受容体と結合しますが、Hsp90は受容体から解離します。ついでステロイドホルモンと受容体の複合体は核内に移行し、受容体は転写因子としてそのホルモンに特異的な遺伝子の転写を活性化するのです[45]。つまり、Hsp90はステロイドホルモン受容体と結合して不活性な状態に保っていて、ホルモンが結合できるようにスタンバイしているのです。しかし、Hsp90の機能が阻害されるとその受容体は不安定になり、プロテアソーム系によって分解されてしまいます。したがって、Hsp90はその受容体にホルモンが結合するまで分解から保護しているとも言えます。

最近までにHsp90と会合するタンパク質として同定されたのは200個以上(300個以上とする論文もある)にも関わらず、これらはHsp90クライアントタンパク質と呼ばれ

ています(Hsp90 が分子シャペロンとして世話する相手のタンパク質のこと)。これらのクライアントタンパク質には、シグナル伝達系のさまざまなキナーゼ、ステロイドホルモン受容体、多くの転写因子、アポトーシス関連因子などが含まれています。これらの多くは細胞の生存や増殖に必要なタンパク質です。したがって、Hsp90 はクライアントタンパク質の構造や機能を制御することによって細胞の生存や増殖に寄与していることになります。

じつは、Hsp90 はじめ Hsp70 など多くの分子シャペロン、またそれらの転写因子である HSF1(熱ショック転写因子 1)は、正常細胞の生存や増殖の促進に貢献していますが、がん細胞はこの分子シャペロン系をうまく利用して、宿主からの攻撃(がん細胞にとってはストレスになる)をかわして自身の生存に有利になるようにしています。この点については、第 4 章において、分子シャペロンとがんなどの病気との関連についても詳しく見ていくことにしています。

(9)Hsp90 と生物進化-分子シャペロンによる遺伝的緩衝作用

リンドクイスト(S. Lindquist)らのグループによる Hsp90 に関する興味ある報告があります。ショウジョウバエでは Hsp90 変異体のホモ接合体(相同染色体の両方の Hsp90 遺伝子に変異している)では致死になるので、ヘテロ接合体(相同染色体の一方の Hsp90 遺伝子に変異型だがもう一方は正常)として継代維持しています。そのヘテロ接合体では必ず 1~3%の個体に眼、脚、翅などに大きな形態異常(いわゆる奇形)がみられます。これと同じような形態異常は、正常個体を Hsp90 の特異的阻害剤(ゲルダナマイシンなど)で処理したり、熱ショックを与えた場合にも出現します。これらの形態異常は 1 つの遺伝子の変異によるものではなく複数の遺伝子の変異(polygenic mutations)によることがわかっています。分子シャペロンである Hsp90 は、前項で述べたように、多くの

シグナル伝達分子や転写因子をクライアントとしています。形態形成に関わる遺伝子はやはりシグナル伝達分子や転写因子です。このようなことから、Hsp90 が十分に存在するときには(正常個体)、いくつかの遺伝子に変異があっても表現型にならずに潜在化しており、Hsp90 の量が減少したり(ヘテロ接合体)、機能が低下(阻害剤や熱ショック処理)したりすると、それら複数の変異が顕在化して形態異常が現れるのではないかと示唆されました。このことは、もともと形態異常のない正常と思われる個体でも隠され遺伝的変異(cryptic genetic variation)がかなりあるのだが、Hsp90 などの分子シャペロン機能による遺伝的緩衝作用(genetic buffering)によってそれらの変異が潜在化しているのではないかと、リンドクイストらは提案しています[46]。言い換えると、分子シャペロンはいくつかの遺伝子の変異を蓄えておくことができるキャパシター(蓄電池のようなもの)としての機能を持っていると考えられます。

化石による生物の進化の過程は、小さな変異の連続的な変化ではなく、しばしば段階的であることが知られています。つまり、分子シャペロンが存在することで、生物はいくつかの遺伝子に変異があってもそれらを顕在化することなく蓄えておくことができ、いったん環境に大きな変化が起きた(分子シャペロンの機能が阻害された)とき、変異した形態を持つ個体を多く出現させ、それら形態異常を持った多くの個体は自然淘汰されて死滅したかもしれませんが、たまたま新しい環境に適応するような変異個体も出現して生き延びて進化してきたのかもしれない。

リンドクイストらの報告と同じような結果が、その後いくつかの実験系で示されています。

(10)HSPs と温熱耐性

温熱耐性については第 1 章 1-7 の項で詳しく述べました[47]。一度軽い熱ショックを与えておくと細胞はその

後の強い熱ショックに対して抵抗性になる, という現象です. 1970年代から80年代にかけて多くに研究者が温熱耐性に関する研究を進めていましたが, 温熱耐性とHSPsの関係について精力的に研究してきたのがリー (Gloria Li) らのグループです. 彼女らは, 細胞に熱ショックを与えてからの時間経過を追って, 温熱耐性の発現とHSPs (Hsp100, Hsp90, Hsp70) 合成を調べたところ, 両者の時間経過がよく相関していること, また細胞をヒ素 (As) やエタノールで処理してもHSPsが合成されるとともに温熱耐性も誘導されることを示しました[48]. さらに, ヒト Hsp70 遺伝子をラット細胞に過剰発現させるとその細胞が温熱耐性になることも報告しました[49]. 私がアメリカに留学したときのボス, ラツロー (Andrei Laszlo) は, 哺乳類細胞に軽い熱ショックを数回与えて, それらの細胞の中から熱に抵抗性の変異細胞 (heat resistant variants) を単離しました. その細胞を調べると, Hsc70 (構成的に発現している Hsp70 の仲間, heat shock cognate 70) が多く発現していることが判明しました[50].

これらの結果は, HSPs が温熱耐性に直接関与していることを示したものではありません. しかし, HSPs の持つ分子シャペロン機能 (ストレスによるタンパク質の変性を防護する, またすでに変性してしまったタンパク質を元どおりに回復させるなど) を考慮に入れると, 温熱耐性の実体は HSPs であると考えても矛盾はないと, 筆者は考えています.

(11) HSPs の分子シャペロン機能のまとめ—細胞内防御因子

これまで述べてきたように, HSPs は分子シャペロンとして細胞のさまざまな機能に関わっていることがわかってきました. それらをまとめたのが図23です. ここには本論文では取り上げなかった内容も含まれています. HSPs の分子シャペロン機能を箇条書きにまとめると以下の通りです.

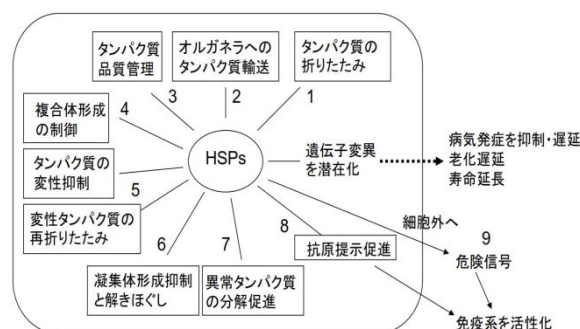


図 23

熱ショックタンパク質 (HSPs) のさまざまな分子シャペロン機能. 詳しくは本文参照.

- 1 新生ポリペプチド鎖に結合してその正しい折りたたみを手助けする.
- 2 ミトコンドリアなどの細胞小器官へのタンパク質輸送に関与する.
- 3 小胞体でのタンパク質品質管理 (protein quality control).
- 4 未熟なサブユニットタンパク質に結合してその正しい複合体形成を介添する.
- 5 ストレスによるタンパク質の変性を抑制し, 再折りたたみを促進する.
- 6 変性タンパク質の凝集体形成を抑制し, ときには凝集体を解きほぐすことができる.
- 7 修復不能なタンパク質の分解を手助けする.
- 8 細胞内で分解されたペプチドをシャペロンして抗原提示を促進する.
- 9 細胞外に分泌されて危険信号 (danger signal) として免疫系を活性化する.

などです.

このように, 分子シャペロンはタンパク質の一生 (生成から分解まで) のさまざまな過程に「黒子」のように関わっており, 多くの細胞機能を制御しています. また, スレ

スを受けたときには細胞を防護するように働いているので、HSPs(分子シャペロン)は細胞内防御因子であるといえます。最近では分子シャペロンの働きで細胞内に異常なタンパク質が蓄積しないようにコントロールされていることから、分子シャペロンによってタンパク質の恒常性が維持されている (protein homeostasis, proteostasis), とも言われています[51]。

今回は HSPs のもつ分子シャペロン機能が細胞や生体にとって有益な(beneficial)な効果を示すことを述べてきました。次回は分子シャペロンとさまざまな病気(がんや神経変性疾患など)や老化・寿命との関連などを取り上げていきます。

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 3, 中部大学生物機能開発研究所紀要, 18: 37-61, 2017.
2. ローディッシュ他著. 分子細胞生物学第 7 版, 東京化学同人.
3. Schechter AN. Obituary, Christian B. Anfinsen. *Structural Biol* 2: 621-623, 1995.
4. ホートン他著. ホートン生化学第 5 版, 東京化学同人.
5. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230, 1973.
6. Ellis RJ, van der Vies SM. Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 60: 321-347, 1991.
7. Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275: 416-420, 1979.
8. Ellis RJ. The most abundant protein in the world. *Trends in Biochem Sci* 4: 241-244. 1979.
9. Barraclough R, Ellis RJ. Protein synthesis in chloroplasts. IX. Assembly of newly-synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*. 608: 19-31, 1980.
10. Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333: 330-334, 1988.
11. Georgopoulos CP, Hendrix RW, Casjens SR, Kaiser AD. Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J Mol Biol*. 76: 45-60, 1973.
12. Georgopoulos CP, Ang D, Liberek K, Zylicz M. Properties of the *Escherichia coli* heat shock proteins and their role in bacteriophage ϕ growth. In Morimoto RI, et al. Edts. 'Stress Proteins in Biology and Medicine', pp.191-221, Cold Spring Harbor Laboratory, 1990.
13. Wickner S, Hoskins J, McKenney K. Monomerization of RepA dimers by heat shock proteins activates binding to DNA replication origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7903-7907, 1991.
14. Pelham HR. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 46: 959-961, 1986.
15. Ohtsuka K, Nakamura H, Sato C. Intracellular distribution of 73000 and 72000 dalton heat shock proteins in HeLa cells. *Int J Hyperthermia* 2: 267-275, 1986.
16. Pelham, HR. Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J* 3: 3095-3100, 1984.
17. Lewis MJ, Pelham HR. Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kd heat shock protein. *EMBO J* 4: 3137-3143, 1985.
18. Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328: 378-379, 1987.
19. Munro S, Pelham HR. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46: 291-300, 1986.
20. Ungewickell E. The 70-kd mammalian heat shock

- proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelia from coated vesicles. *EMBO J* 4: 3385-3391, 1985.
21. Chappell TG, Welch WJ, Schlossman DM., et al. Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell* 45: 3-13, 1986.
 22. Sousa R, Lafer EM. The role of molecular chaperones in clathrin mediated vesicular trafficking. *Frontiers Mol Biosci* 2: 1-6, 2015.
 23. Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M., et al. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332: 800-805, 1988.
 24. Chirico WJ, Waters MG, Blobel G. 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332: 805-810, 1988.
 25. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248: 850-854, 1990.
 26. Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353: 726-730, 1991.
 27. Langer T, Lu C, Echols H., et al. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356: 683-689, 1992.
 28. Frydman J, Nimmesgern E, Ohtsuka K, Hartl FU. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370: 111-117, 1994.
 29. Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol* 217: 51-63, 2018.
 30. Skowyra D, Georgopoulos C, Zylicz M. The *E. coli* dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* 62: 939-944, 1990.
 31. GloverJR, Susan Lindquist S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A Novel Chaperone System that Rescues Previously Aggregated Proteins. *Cell* 94: 73-82, 1998.
 32. Seyffert, F., Kummer, E., Oguchi, Y., et al. Hsp70 proteins bind Hsp100 regulatory M domains to activate AAA+ disaggregase at aggregate surfaces. *Nat Struct Mol Biol* 19: 1347-1355, 2012.
 33. Nillegoda, N. B., Kirstein, J., Szlachcic, A., et al. Crucial HSP70 co-chaperone complex unlocks metazoan protein disaggregation. *Nature* 524: 247-251, 2015.
 34. Nillegoda NB, Bernd Bukau B. Metazoan Hsp70-based protein disaggregases: emergence and mechanisms. *Frontiers Mol Biosci* 2:1-12, 2015.
 35. Kirstein J, Arnsburg K, Scior A., et al. In vivo properties of the disaggregase function of J-proteins and Hsc70 in *Caenorhabditis elegans* stress and aging. *Aging Cell* 16: 1414-1424, 2017.
 36. Minami Y, Hohfeld J, Ohtsuka K, Hartl FU. Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J Biol Chem* 271: 19617-19624, 1996.
 37. Michels AA, Kanon B, Konings AWT, Ohtsuka K, Bensaude O, Kampinga HH. Hsp70 and Hsp40 chaperone activities in the cytoplasm and the nucleus of mammalian cells. *J Biol Chem* 272: 33283-33289, 1997.
 38. Jeoung D-I, Chen S, Windsor, J, Pollack RE. Human major HSP70 protein complements the localization and functional defects of cytoplasmic mutant SV40 T antigen in Swiss 3T3 mouse fibroblast cells. *Genes Dev*, 5: 2235-2244, 1991.
 39. Tabuchi Y, Kuribayashi R, Takasaki I., et al. Overexpression of Hsp70 restores the structural stability and functional defects of temperature-sensitive mutant of large T-antigen at nonpermissive temperature. *Cell Stress & Chaperones* 11: 259-267, 2006.
 40. Cummings CJ, Mancini MA, Antalffy B., et al.

- Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nature Genet* 19: 148-154, 1998.
41. Kobayashi Y, Kume A, Li M., et al. Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem* 275: 8772-8778, 2000.
 42. Takeuchi H, Kobayashi Y, Yoshihara T., et al. Hsp70 and Hsp40 improve neurite outgrowth and suppress intracytoplasmic aggregate formation in cultured neuronal cells expressing mutant SOD1. *Brain Res* 949: 11-22, 2002.
 43. Oppermann H, Levinson W, Bishop JM. A cellular protein that associate with the transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat-shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 1067-1071, 1981.
 44. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B., et al. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: Essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8324-8328, 1994.
 45. Picard D. Steroid-binding domains for regulating the functions of heterologous proteins in cis. *Trends Cell Biol* 3: 278-780, 1993.
 46. Rutherford SL, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396: 336-342, 1998.
 47. 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.
 48. Li GC, Werb Z. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 3218-3222, 1982.
 49. Li GC, Li LG, Liu YK., et al. Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1681-1685, 1991.
 50. Laszlo A, Li GC. Heat-resistant variants of Chinese hamster fibroblasts altered in expression of heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8029-8033, 1985.
 51. Labbadia J, Morimoto RI. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 84:435-464, 2015.

Title : There is no world without stress. Introduction to Cell Stress Biology No. 4
Molecular chaperones

Author : Kenzo Ohtsuka

Address: Laboratory of Cell and Stress biology,
College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University