## HSP105 ファミリータンパク質の構造と機能

## 畑 山 巧,山岸伸行,齊藤洋平

ほ乳動物の HSP105 タンパク質ファミリーには HSP105 $\alpha$  と HSP105 $\beta$  の二種類存在するが、HSP105 $\alpha$  は構成的かつストレス誘導性であり、HSP105 $\beta$  は 42°C 程度の熱ショックによって誘導される。 HSP105 $\alpha$  と HSP105 $\beta$  は hsp105 遺伝子のオルタナティブスプライシングによって産生され、それぞれほ乳動物細胞の細胞質および核に局在する。 HSP105 は変性タンパク質の凝集を抑制するが、最近 HSP70 シャペロン系のヌクレオチド交換因子として機能することが明らかとなってきた。一方、HSP105 はアポトーシスに対し細胞腫によって正反対の作用、即ち胎児細胞においては促進的に、神経細胞やがん細胞においては抑制的に作用する。また、HSP105 がタンパク質の凝集に起因する種々の疾患においてミスホールドタンパク質の有害な凝集と細胞死を抑制するので、HSP105 をはじめとする分子シャペロンの発現増強はこれらの疾患の効果的な治療法になると考えられる。さらに、HSP105 は種々のがんにおいて高発現していることからがん治療の新しいターゲットとしても期待されている。

## 1. はじめに

種々の生物細胞は熱ショックや環境からのストレスに暴露されると、熱ショックタンパク質 heat shock protein (HSP) と呼ばれる、高度に保存された一群のタンパク質を発現・産生する。これらの熱ショックタンパク質はストレスによって変性した細胞タンパク質の凝集を防ぎ、修復することによって細胞を種々のストレスから防御すると考えられている。熱ショックタンパク質のあるものはストレス誘導性でなく、構成的に発現しており、正常の環境下において機能していることも明らかとなってきた。

熱ショックタンパク質は分子量に従って数種類のファミリー、HSP105、HSP90、HSP70、シャペロニン、DNAJ、及び低分子 HSP に分類されている $^{1}$ . 表1 に、ほ乳動物の

機能を示すが、現在まで最もよく研究されている HSP70 ファミリーは種々のストレスによる細胞障害の防御や修復に働くのみならず、正常時の細胞機能としてタンパク質のフォールディング、集合体の形成や輸送に分子シャペロンとして関与することが明らかとなっている2~40. HSP70 ファミリータンパク質は細胞内の種々のコンパートメントに特有の HSP70 が発現している. 主なものに、細胞質で構成的に発現している HSC70 (HSP73)、ストレス誘導性の HSP70、ミトコンドリアの mtHSP70、小胞体内腔に発現する GRP78 などがあり、アンフォールドあるいはミスフォールドしたタンパク質の露出した疎水性領域に結合してタンパク質の凝集を抑制し、再びフォールドする働きをする. DNAJファミリーは、HSP70 の ATPase 活性を促進してタンパク質のフォールディングを促進する5.

熱ショックタンパク質ファミリーの主要なメンバーと主な

HSP90 ファミリーはステロイドホルモン受容体や種々のキナーゼなどの特異なタンパク質の成熟と活性の維持や,熱ショック因子や p53 などの種々の転写因子の活性制御に働いている. HSP90 は細胞質に, GRP94 は小胞体に発現している<sup>2,6</sup>.

シャペロニンファミリーには、HSP60/HSP10やTRiC が存在する<sup>7</sup>. HSP60/HSP10はミトコンドリアに、TRiC

京都薬科大学生命薬科学系生化学分野(〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5)

Structure and function of HSP105 family proteins

Takumi Hatayama, Nobuyuki Yamagishi and Yohei Saito (Department of Biochemistry, Kyoto Pharmaceutical University, 5, Nakauchicho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607–8414, Japan)

投稿受付:2011年11月4日

ファミリー	主要なメンバー	主な機能
HSP105	HSP105, HSP110, APG-1, APG-2, GRP170	タンパク質の凝集抑制,ヌクレオチド交換因子,アポトーシス制御
HSP90	HSP90, GRP94	ステロイドホルモン受容体やキナーゼなど特異なタンパク質の成熟 と活性維持
HSP70	HSP70, HSC70, mtHSP70, GRP78	タンパク質の疎水性領域への結合と凝集抑制,ATP 依存的タンパ ク質フォールディング
シャペロニン	HSP60, HSP10, TRiC	アンフォールドタンパク質の ATP 依存的フォールディング
DNAJ	HSP40, DJ-2	HSP70 の ATP 加水分解促進
低分子 HSP	HSP27, αA クリスタリン, αB クリスタリン	変性タンパク質の凝集抑制と安定化

表1 ほ乳動物の主な熱ショックタンパク質ファミリー

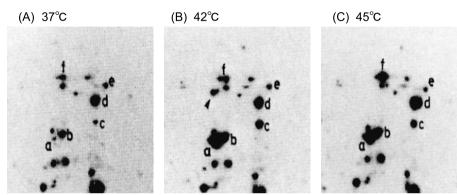


図1 ヒト HeLa 細胞における HSP105 と 42°C-hsp の誘導 HeLa 細胞を [<sup>35</sup>S]メチオニン存在下に、37°C 3 時間 (A)、42°C 3 時間 (B)、あるいは 45°C 10 分加温後 37°C 3 時間 (C) 培養した、標識タンパク質を二次元ゲル電気泳動法により分離し、フルオログラフィーにより検出した、HSP70 (a)、HSC70 (b)、GRP78 (c)、HSP90 (d)、GRP94 (e)、HSP105 (f)、42°C-hsp (矢頭).

は細胞質に発現し、これらはヘテロオリゴマーのシャペロニン複合体を形成してタンパク質の ATP 依存的フォールディングとタンパク質の凝集の防御に働いている.

低分子 HSP ファミリーは、非ストレス時にはオリゴマー複合体で細胞質に存在し、ストレスによってダイマーに変換されて変性タンパク質に結合して凝集を防いでいる®.

HSP105 ファミリーは、HSP70 と比較的高いホモロジーをもち、HSP70 よりも比較的長いループドメインをもつ一群のタンパク質である。HSP110 ファミリーとも呼ばれるが、ここでは HSP105 ファミリーを統一的に用いる。

我々は、ほ乳動物細胞において上述の一群の熱ショックタンパク質のほかに  $42^{\circ}$ C 加温でのみ発現する特異な熱ショックタンパク質( $42^{\circ}$ C-hsp と略す)を発見した<sup>9)</sup>. さらにこの  $42^{\circ}$ C-hsp に関する一連の研究から、 $42^{\circ}$ C-hsp は HSP105 のスプライスバリアントであり、HSP105 ファミリーの一員として興味ある生理的役割も果たしていることを明らかにしてきた.ここでは、 $42^{\circ}$ C-hsp を含む HSP105ファミリータンパク質の構造と機能について、我々の研究で明らかにしてきた知見を中心に概説する.

#### 2. HSP105 ファミリータンパク質

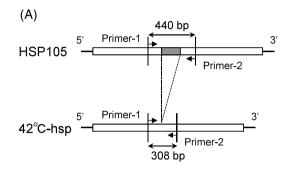
ほ乳動物細胞に  $42\sim45^{\circ}$ C の熱ショックを加えると、HSP70、HSC70、GRP78、HSP90、GRP94、HSP105 など一群の熱ショックタンパク質が誘導合成されるが、これらの熱ショックタンパク質に加えて  $42^{\circ}$ C 加温でのみ誘導される特異な熱ショックタンパク質( $42^{\circ}$ C-hsp と略す)がある.この  $42^{\circ}$ C-hsp は分子量約 90、000 で、正常時には産生されておらず  $42^{\circ}$ C 加温によって転写誘導されるが、熱ショックタンパク質を誘導する亜ヒ酸、重金属、アミノ酸類似体などによっては誘導されない $^{\circ}$ (図 1).予期せぬことに、この  $42^{\circ}$ C-hsp は我々がマウス HSP105 タンパク質に対して作製したラビット抗 HSP105 血清に反応した $^{10}$ .

#### 2-1 HSP105 の精製と cDNA クローニング

HSP105 と  $42^{\circ}$ C-hsp の構造を明らかにするために、 $42^{\circ}$ C で 8 時間熱ショックを与えたマウス FM3A 細胞を数百枚のディッシュから回収し、その細胞質抽出液から HSP105 および  $42^{\circ}$ C-hsp を精製した。これらの精製タンパク質を lysyl endopeptidase で消化すると 17,000-Da のポリペプチ

ド断片が共通して産生され、そのN末端アミノ酸配列は HSP70 ファミリータンパク質やアクチンのアデノシン結合ドメインのそれと類似であった $^{11}$ .

さらに、 $42^{\circ}$ Cで加温したマウス FM3A 細胞から作製した cDNA ライブラリーを抗 HSP105 抗体を用いてスクリーニングした結果、前述の 17,000-Da 断片のアミノ酸配列をもつ二つの全長 cDNA クローンを得た $12^{\circ}$ . 一つは 858 アミノ酸のタンパク質をコードし、もう一つは 814 アミノ酸のタンパク質をコードしていたが、前者のタンパク質から44 アミノ酸を欠失していた。RT-PCR 解析によって、前者のクローンの PCR 産物は 42 や  $45^{\circ}$ C のいずれの加温やそ



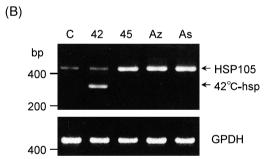


図2 HSP105 および 42°C-hsp mRNA の RT-PCR 分析

- (A) RT-PCR 解析に用いたプライマーとその予想される産物。
   (B) 37°C 3 時間, 42°C 3 時間, あるいは 45°C 15 分加温後 37°C
- (B) 37°C 3 時間, 42°C 3 時間, あるいは 45°C 15 分加温後 37°C 3 時間培養したマウス FM3A 細胞, 亜砒素酸(Ar)あるいはアゼチジン(Az)処理した FM3A 細胞から polyA<sup>+</sup>RNA を分離し,一対のプライマーを用いて RT-PCR 解析をおこなった.

の他のストレスによって誘導されたが、後者のクローンの PCR 産物は  $42^{\circ}$ C 加温によってのみ増加したので、これら 二つのクローンはそれぞれ HSP105 と  $42^{\circ}$ C-hsp をコードし ていると考えられた(図 2). このように、 $42^{\circ}$ C-hsp は HSP 105 から 44 アミノ酸残基を欠失したタンパク質であることが明らかとなったため、我々は HSP105 と  $42^{\circ}$ C-hsp を新たにそれぞれ HSP105 $\alpha$  および HSP105 $\beta$  と命名した.

HSP105αと HSP105βの予想される二次構造は HSP70ファミリータンパク質と高い類似性をもち、N-末端 ATP結合,βシート,ループおよび C-末端 α へリックスドメインをもつが,HSP70よりも長いループ(リンカー)領域をもっている(図 3).

さらに、ヒト HSP105 $\alpha$  と HSP105 $\beta$  cDNAs をクローニングすると、マウス HSP105 と同様にそれぞれ 858 アミノ酸および 814 アミノ酸のタンパク質であり、ヒト HSP105 $\alpha$  はマウス HSP105 $\alpha$  (96%) やハムスター HSP110 (92%) と高い相同性を示した<sup>14</sup>.

ほ乳動物細胞の HSP105 ファミリーには HSP105 と相同性を示す APG-1, APG-2, GRP170 などが存在する. マウス APG-1 は 838 アミノ酸残基のタンパク質であり, 精巣特異的に発現し熱誘導性を欠いている  $^{15}$ . APG-1 は精巣を防御する重要なタンパク質と考えられている. マウス APG-2 は 841 アミノ酸残基のタンパク質であり, HSP105 と同様に種々の臓器に見出されるが熱誘導性を欠いている  $^{16}$ . GRP170 は 999 アミノ酸残基のタンパク質であり小胞体内腔に存在する  $^{17}$ . HSP105, APG-1 と APG-2 は細胞質に存在するが, GRP170 は小胞体内腔に存在することから, これらのタンパク質はそれぞれの臓器においてそれぞれの細胞内コンパートメントにおいて機能していると考えられる.

#### 2-2 hsp105 遺伝子クローニング

我々のおこなった遺伝子クローニングにより、マウス hsp105 遺伝子は約22kbの広範囲にわたり、17のイント

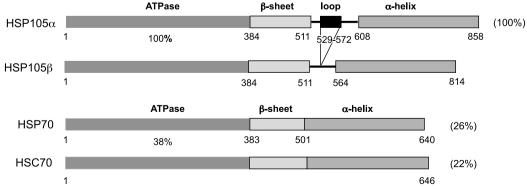
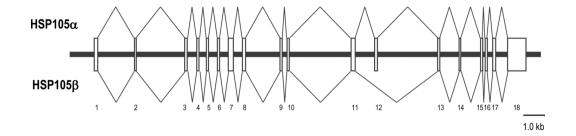


図3 HSP105 ファミリータンパク質と HSP70 ファミリータンパク質の高い相同性 HSP105 は N-末端側より ATPase,  $\beta$ -シート, ループ(リンカー), および  $\alpha$ -ヘリックスドメインをもつ.



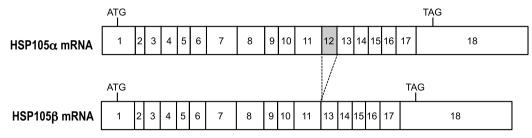


図 4 マウス hsp105 遺伝子構造

hsp105 遺伝子のエクソン-イントロン構造の模式図. エキソンは番号をつけた白抜きのボックスで示す. オルタナティブスプライシングにより  $HSP105\alpha$  と  $HSP105\beta$  の転写産物が生成する.

ロンにより分断された 18 のエクソンより構成されていることが明らかになった (204). また、サザンブロット解析の結果、nsp105 遺伝子は単一コピーであり、エクソン 12 のオルタナティブスプライシングにより nsp105 と nsp105 遺伝子の nsp105 は nsp105 は

5′-上流のプロモーター領域には一つの TATA ボックス, 一つの CAAT ボックス, 一つの逆向きの CAAT ボックス および二つの GC ボックスをもつ. 四つの nGAAn リピートをもつ二つの熱ショックエレメント (HSE) が nt -64と nt -128に存在した. 欠損変異体を用いたプロモーター解析により, 最小限二つのコンセンサス HSE 配列が hsp105 遺伝子の熱ショックによる誘導性と構成的な発現に必要であった<sup>18)</sup>.

#### 3. HSP105 のシャペロン機能

我々は、ほ乳動物細胞において HSP105 が HSP70(HSC 70)と相互作用し、HSP105・HSP70 複合体として存在することを抗 HSP105 抗体を用いた免疫沈降法、ゲルろ過クロマトグラフィー法、密度勾配遠心法などによって、他のグループに先駆けて見出した<sup>19</sup>・HSP105・HSP70 複合体はヘテロ二量体およびヘテロ四量体であり、これらの複合体は培養細胞だけではなく、ラットの種々の臓器においても見出された<sup>20</sup>・これらの結果は、HSP105 が HSP70 と協調して機能するのか、あるいは HSP105 が HSP70 の機能

を調節することを示唆した.

# 3-1 **HSP1**05 による変性タンパク質の凝集抑制と **HSP7**0 シャペロン活性の制御

HSP105 の生理的機能を解明するために、HSP105 のシャペロン活性等を検討したところ、HSP105  $\alpha$  と HSP 105 $\beta$  はルシフェラーゼの熱変性による凝集を HSC70/HSP 40 と同様に抑制した $^{21,22}$  (図 5A). 興味あることに、HSP 105 は熱変性タンパク質の凝集を ATP よりも ADP 存在下で強く抑制し、対照的に HSC70 は熱変性タンパク質の凝集を ADP よりも ATP 存在下で抑制した(図 6). 培養細胞においても HSP105 $\alpha$  は ATP 欠乏によるルシフェラーゼの不活性化を抑制したが、HSC70 はこの不活性化を抑制できなかった.このように、HSP105 ファミリータンパク質は細胞内の ATP レベルが極端に低下するような厳しいストレス下において変性タンパク質の凝集を防いでいると考えられる $^{22}$ 0.

一方、HSC70/HSP40 は熱変性ルシフェラーゼを再活性 化したが、 $HSP105\alpha$  と  $HSP105\beta$  では再活性化できなかった $^{21)}$  (図 5B). HSP105 の ATP 加水分解能を検討すると、 $HSP105\alpha$  と  $HSP105\beta$  はそれ自身では ATP の加水分解活性 を示さないが、HSC70/HSP40 に  $HSP105\alpha$  あるいは  $HSP105\beta$  を加えると HSC70/HSP40 よりも ATP の加水分解が さらに増加した(図 5C). また、 $HSP105\alpha$  に結合した ATP の加水分解を HSC70 は促進したが、 $HSP105\alpha$  は HSC70 に結合した ATP の加水分解を逆に抑制した $^{23)}$ . このように、 $HSP105\alpha$  と HSC70 は相互作用することによりお互い

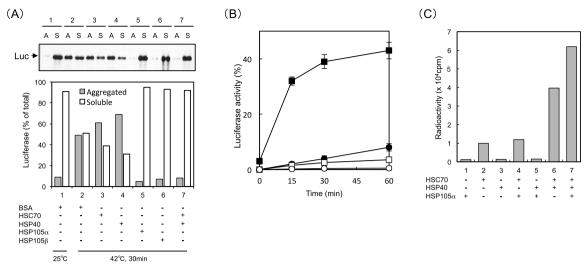


図5 HSP105 による熱変性ルシフェラーゼの凝集抑制

(A) 精製ルシフェラーゼを種々の HSP 存在下に  $42^{\circ}$ C、30 分処理した後、上清 (S) と沈殿 (P) に分離し、それぞれに含まれるルシフェラーゼを SDS-PAGE にて検出した。 (B) 熱変性ルシフェラーゼの網状赤血球ライセイト存在下での再活性化に及ぼす HSP $105\alpha$ ( $\square$ )、HSP $105\beta$ ( $\square$ )、HSP $105\alpha$ (HSP $105\alpha$ )、HSP $105\alpha$ (HSP $105\alpha$ )、HSP $105\alpha$ ( $\square$ ) HSP $105\alpha$ ( $\square$ 

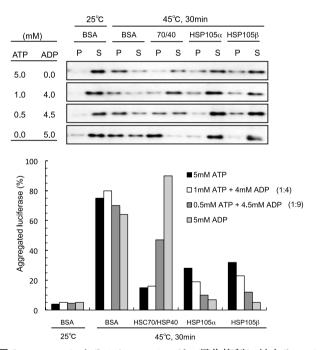


図 6 HSP105 によるルシフェラーゼの凝集抑制に対するアデニンヌクレオチドの影響

精製ルシフェラーゼを  $HSP105\alpha$ ,  $HSP105\beta$ , HSP70/HSP40 あるいは BSA 存在下に,種々の ATP: ADP 比の条件下にインキュベートし,上清(S)と沈殿(P)に分離し,それぞれに含まれるルシフェラーゼを SDS-PAGE にて検出した.

の機能を制御していると考えられた.

#### 3-2 HSP70 シャペロン系とヌクレオチド交換因子

ほ乳動物細胞において、フォールドされていないタンパク質は HSP70 シャペロン系に直接あるいはコシャペロン

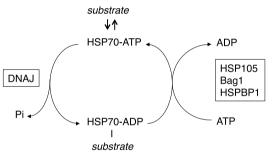


図7 HSP70 シャペロン装置

フォールドされていないタンパク質は ATP 結合型の HSP70 に 結合する。ATP が加水分解されて ADP 結合の HSP70 に変換されると、HSP70 と基質タンパク質の結合が安定化される。続いて、ヌクレオチドの交換反応が促進されて、ATP 結合型の HSP 70 に変換されると基質タンパク質との親和性が低下しタンパク質が放出される。フォールドされていないタンパク質は HSP 70 への結合と遊離のサイクルがホールドされるまで繰り返される。

の助けをかりて結合する<sup>2,5)</sup>(図7). これらの基質タンパク質は ATP 結合型の HSP70 に相互作用するが、基質タンパク質の結合によって ATP が ADP に加水分解されて ADP 結合型の HSP70 に変換されると、HSP70 と基質タンパク質の結合が安定化される. この反応は DNAJ などのコファクターによって促進される. 続いて、ヌクレオチドの交換反応がヌクレオチド交換因子によって促進されて、ATP 結合型の HSP70 に変換されると基質タンパク質との親和性が低下しタンパク質が放出される. このようなHSP70へのフォールドされていないタンパク質の結合と放出のサイクルを経て、タンパク質がフォールディングされていく. 種々のコファクターが HSP70 の異なったドメインに結合し、 HSP70 シャペロンの機能を制御している.

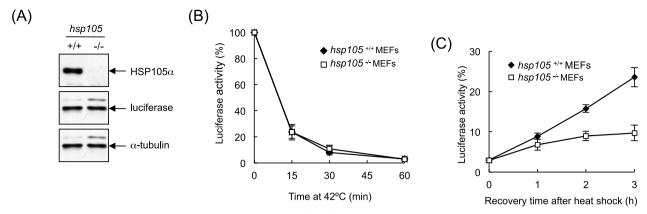


図 8 hsp105 ノックアウトマウス由来の胎児線維芽細胞(MEFs)における熱変性ルシフェラーゼの再活性化 (A) 一過性にルシフェラーゼを発現させた  $hsp105^{+/+}$  MEFs および  $hsp105^{-/-}$  MEFs の HSP105 $\alpha$ , ルシフェラーゼ,  $\alpha$ -チュブリンをウエスタンブロットにより検出した. (B)  $hsp105^{+/+}$  MEFs と  $hsp105^{-/-}$  MEFs を  $42^{\circ}$ C 加温し,ルシフェラーゼ活性を測定,あるいは(C) $42^{\circ}$ C で 60 分加温後  $37^{\circ}$ C でインキュベートし,ルシフェラーゼの再活性化を測定した.

近年、酵母やほ乳動物細胞において HSP105 ファミリーが HSP70 のヌクレオチド交換因子の一つとして機能することが明らかとなってきた<sup>240</sup>. 酵母の Sse1 やほ乳動物の HSP105 は ADP 結合型の HSP70 と相互作用し、ADP の解離と ATP の再結合を促進するとともに、HSP105 と HSP 70 の解離を引き起こす。このようにして ATP と ADP の ヌクレオチド交換の促進によって HSP105 は HSP70 によるタンパク質のフォールディングを加速する.

BAG-1 や HSPBP1 などのヌクレオチド交換因子と異なり、HSP105 はフォールドされていないタンパク質と結合しフォールディング可能な状態に保持するので、HSP105 は基質タンパク質のフォールディングとヌクレオチド交換のカップリング因子として機能していると考えられる。また、HSP70 と HSP105 はともに熱誘導性であり、HSP105 は熱ストレス下で機能するヌクレオチド交換因子かもしれない<sup>25)</sup>.

実際, hsp105 KO マウス由来の HSP105 欠損線維芽細胞をもちいて HSP105 の欠損はルシフェラーゼの熱変性には影響がないが、熱変性ルシフェラーゼのリフォールディングを抑制することを明らかにした(図 8). さらに、HSP105 の欠損は種々のストレスに対する感受性を増加させることから、HSP105 は変性タンパク質のリフォールディングとストレスにより誘導される細胞死の抑制に直接あるいは間接に関与していると考えられる250.

#### 4. HSP105 の臓器分布とリン酸化

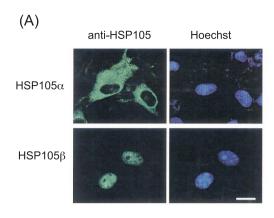
HSP105の臓器分布を HSP105 cDNA を用いてノーザンブロット解析すると、HSP105 mRNA はマウスの大部分の臓器に存在し、特に脳において高い発現が認められた $^{12}$ . さらに、HSP105 タンパク質の発現を抗 HSP105 抗体を用いてウエスタンブロット解析すると、HSP105 $\alpha$  は副腎、脾臓、肝臓、心臓に中等度に発現しており、ラットの全身

加温により増加した. しかし, 脳組織では  $HSP105\alpha$  が特徴的に高発現していたが, ラットの全身加温によっても増加しなかった $^{20}$ .

さらに、注意深いウエスタンブロット解析により、HSP  $105\alpha$  と HSP $105\beta$  はともに SDS-PAGE で移動度の若干異なる 2本のバンドとして分離されることが明らかとなった $2^{7,280}$ . マウス FM3A 細胞を $2^{2}$ P-正リン酸で標識した実験から、移動度の遅い HSP $105\alpha$  と HSP $105\beta$  はセリン残基がリン酸化されたリン酸化型であり、移動度の速い HSP $105\alpha$  と HSP $105\beta$  は脱リン酸化型であった. ゲル内リン酸化法によってこれらのリン酸化酵素は casein kinase 2 (CK2)であり $2^{29}$ , HSP $105\alpha$  や HSP $105\beta$  の  $\beta$ -シートドメインにある Ser $3^{509}$  が CK2 によってリン酸化されること、また HSP 105 のリン酸化は HSP105 と HSP105 の相互の機能制御に関与することを示した $2^{30}$ .

## 5. HSP105 の細胞内局在性

マウス 3T3 細胞やマウス C3H 細胞の内因性 HSP105 の 細胞内局在性を抗 HSP105 抗体を用いた間接免疫蛍光法により検討すると、HSP105 $\alpha$  は正常時やストレス時ともに 細胞質に存在した $^{31}$ . さらに、HSP105 $\alpha$  および HSP105 $\alpha$  たまび HSP105 $\alpha$  および HSP105 $\alpha$  および HSP105 $\alpha$  および HSP105 $\alpha$  および HSP105 $\alpha$  はそれぞれ細胞質および細胞核に局在した $^{32}$  (図 9). HSP105 $\alpha$  と HSP105 $\beta$  には、ともに機能的な核移行シグナル(NLS)がループドメインに、また核外輸送シグナル(NES)が $\alpha$  ヘリックスドメインに存在する. HSP105 $\alpha$  は NES 依存的な核輸送の特異的な阻害剤であるleptomycin B より細胞核に集積し、HSP105 $\beta$  は NLS 依存的な核輸送に必須の importin $\beta$  に対する siRNA により細胞質にとどまったことから、HSP105 $\alpha$  と HSP105 $\beta$  の異なった細胞内局在性は、HSP105 $\alpha$  においては NLS 活性が抑制されているため、また HSP105 $\beta$  においては NES 活性が抑



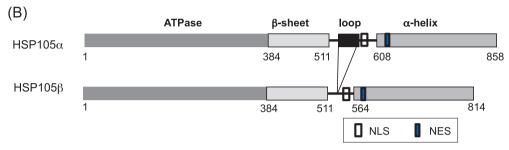


図9 COS-7 細胞における HSP105α と HSP105β の細胞内局在性
(A) HSP105α および HSP105β の発現プラスミドを COS-7 細胞に導入後, Hoechst33342 染色で細胞核を, HSP105 の局在を抗 HSP105 抗体で免疫染色して検出した. (B) HSP105α と HSP105β は機能的な核移行シグナル (NLS) と核外輸送シグナル (NES) をもつ.

制されているために、それぞれ細胞質と核に局在すると考えられた。酵母の HSP105 ホモローグである Sse1 の三次構造予測から、 $HSP105\alpha$  と  $HSP105\beta$  の  $\beta$  シートドメインと  $\alpha$  ヘリックスドメインがループを挟んで相互作用することから<sup>33</sup>、 $HSP105\beta$  におけるループの 44 アミノ酸残基の欠失により、ループドメインに存在する NLS と  $\alpha$  ヘリックスドメインに存在する NES の露出度が変化して、これらのタンパク質の局在性が変化すると予想される。

現在までに、細胞質に局在する HSP70 や HSC70 は熱ショックに応答して細胞核に移動すること、またこれらのタンパク質は熱ショックに脆弱な核小体に集積し核小体を熱変性から防御することが明らかになっている $^{34}$ . ここで明らかにしたように、HSP70 以外に HSP105 $\beta$  が熱ショックにより細胞核に移行することは核タンパク質の変性による凝集を防ぐのに重要であり、HSP105 $\beta$  も細胞核に存在する多くの転写装置などの保護に働いていると考えられる.

#### 6. HSP105βによる HSP70 の誘導

さらに、我々は細胞核に局在する HSP105 $\beta$  がほ乳動物 細胞において HSP70 の誘導を特異的に引き起こすことを 見出した $^{35)}$  (図 10A). この HSP105 $\beta$  による HSP70 の誘導は、hsp70 遺伝子の 5'-上流の-207 から-183 nt に存在する signal transducer and activator of transcription (STAT)-3

結合エレメントを欠損あるいは変異させると消失することから STAT-3 が関与することを明らかにした<sup>36)</sup>(図 10B, 10C). HSP105β の発現を減少させると熱ショックによる HSP70 の発現が大きく減少するので、比較的弱い熱ショックで誘導される HSP105β は弱い熱ショックによる HSP70 の発現を STAT3 経路によって増加させていると考えられる. これらの結果は、ストレスに対する細胞防御に熱ショックタンパク質ファミリーと STAT ファミリーが協調して機能していることを初めて示したものである.

ほ乳動物細胞では  $45^{\circ}$ C のような強い熱ショックに反応して大量の HSP70 をはじめとする熱ショックタンパク質が誘導・産生されるが、 $42^{\circ}$ C 程度の比較的弱い熱ショックにより誘導される HSP105 $\beta$  が HSP70 を誘導するということは比較的弱い熱ショックにおいても HSP70 を効率よく誘導するのに役立っているのかもしれない.

#### 7. HSP105-結合タンパク質

さらに、我々は HSP105 $\alpha$  の機能を明らかにする目的で、HSP105 $\alpha$  と相互作用するタンパク質の検索をおこなった。マウス FM3A 細胞 cDNA ライブラリーを酵母 two-hybrid 系を用いてスクリーニングした結果、HSP105 $\alpha$  結合タンパク質として  $\alpha$ -tubulin,cofilin,dynein light chain 2A, $\alpha$ -adducin,ubiquitin activating enzyme E1,phosphoglycerate kinase 1 および platelet-activating factor acethylhydrolase  $\alpha$ 1-

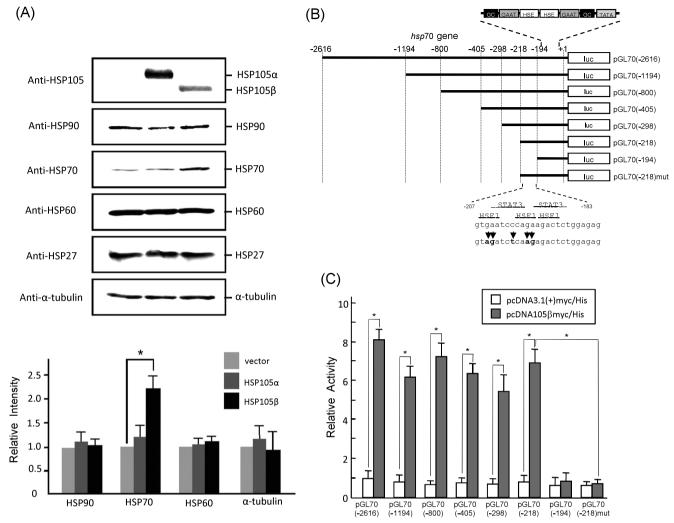


図 10 HSP105β による HSP70 の特異的誘導

(A) COS-7 細胞に  ${\rm HSP105}\alpha$  あるいは  ${\rm HSP105}\beta$  を発現させて種々の  ${\rm HSP}$  をウエスタンブロット法で検出した. (B)  ${\it hsp70}$  プロモーターにルシフェラーゼを結合したレポータープラスミドの種々の  ${\rm 5'-Y}$  大損変異体の模式図. (C) サル COS-7 細胞にこれらの  ${\it hsp70}$  プロモーターのリポータープラスミドと  ${\rm HSP105}\beta$  を共発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定した.

subunit など数種類のタンパク質を同定した $^{37}$ . これらのなかで、 $HSP105\alpha$ が $\alpha$ -tubulin や微小管と相互作用し、ストレス条件下で微小管構造の保持に働いていることを明らかにした $^{38}$ .

#### 8. HSP105 の生理機能

#### 8-1 マウス胎児発生における HSP105 の役割

マウス胎児発生過程における  $HSP105\alpha$  の発現のレベルは妊娠 8 日の胎児においてはほとんど認められないが、9 日から 11 日の胎児において顕著に増加しその後 14 日まで徐々に減少した(図 11).一方、HSC70 は妊娠 8 日から 17 日(誕生前)の胎児においてほぼ一定であった. $HSP105\alpha$  の胎生期における一過性の増加はマウスのほとんどの臓器において認められ、さらに  $HSP105\alpha$  が手の指間間充織の典型的なアポトーシス細胞に局在したことから、 $HSP105\alpha$ 

がマウス胎児発生過程において器官形成に重要な役割を演じていることが示唆された<sup>39</sup>.

次に、胎児細胞における HSP105 $\alpha$  の役割を明らかにするため、我々はマウス胎児由来 F9 細胞における HSP105 $\alpha$  の影響を検討した $^{40,41)}$ . F9 細胞では過酸化水素、エトポシド、熱ショック処理によりアポトーシスによる細胞死が誘導され、シクロヘキシミド処理ではネクローシスによる細胞死が誘導されたが、Hsp105 $\alpha$  の高発現によりアポトーシスは増強されたが、ネクローシスには影響しなかった。このように、HSP105 $\alpha$  の胎児細胞におけるアポトーシス促進作用が胎児発生に重要な役割をしていると考えられた.

#### 8-2 **HSP1**05 の抗アポトーシス作用

HSP105 はほ乳動物の脳組織に高度に発現しているので、神経細胞における  $HSP105\alpha$  の役割を検討した $^{42}$ .

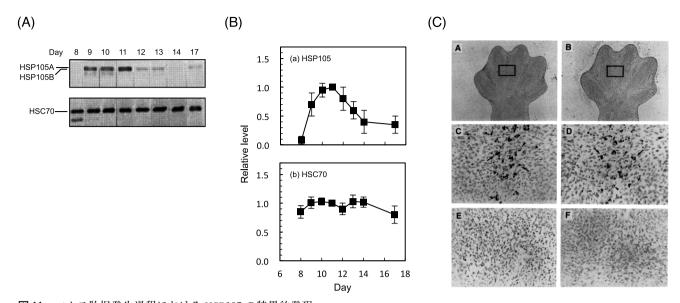


図 11 マウス胎児発生過程における HSP105 の特異的発現 (A, B) 妊娠 8 日から出生前(17 日)胎児における HSP105 および HSC70 の発現レベル. (C) 手の指間間充織における HSP105 と HSC70 の局在:TUNEL 染色 (A, C), および anti-HSP105 (B, D), 抗-HSP70 (E), あるいは免疫前血清 (F) を用いて免疫染色した. (C, D, E, F) は (A, B) の□部分の拡大図.

ラット神経系 PC12 細胞に血清除去,熱ショック,過酸化水素などの処理を与えるとアポトーシスが誘導されるが,HSP105 $\alpha$  を構成的に高発現した PC12 細胞はこれらのストレスによるアポトーシスに対して強い抵抗性を示した.このように HSP105 $\alpha$  は神経系細胞においては細胞防御に働いていると考えられた.さらに,培地中のドキシサイクリン除去により HSP105 $\alpha$  あるいは HSP105 $\beta$  を高発現するヒト子宮頚部がん由来 HeLa 細胞を用いて,HSP105 $\alpha$  あるいは HSP105 $\beta$  の高発現はスタウロスポリンによるアポトーシスの初期段階の Bax のミトコンドリアへの移行を抑制すること,また過酸化水素により誘導されるアポトーシスをシトクロム $\alpha$  のミトコンドリアからの遊離と p38MAPKシグナル系を抑制して抑制することを示した<sup>43,44</sup>.

以上の結果は、HSP105がストレス誘導性アポトーシスに対して細胞種によって正反対の作用、即ち胎児細胞においては促進的に、神経細胞やがん細胞においては抑制的に作用していることを示している.

## 9. HSP105 と疾患の治療

#### 9-1 ポリグルタミン病

球脊髄性筋委縮症(SBMA)はポリグルタミン病の一種でアンドロゲン受容体(AR)に長いポリグルタミン鎖が存在すると発症する神経変性疾患である。我々は SBMA の細胞モデルを用いて伸長ポリグルタミン鎖によっておこる凝集体形成と細胞毒性について検討した<sup>45)</sup>. 97 個,65 個あるいは 27 個のポリグルタミンを含む短縮型アンドロゲン受容体(それぞれ tAR97, tAR65, tAR27 と略す)をサル腎臓由来 COS-7 細胞やヒト神経芽細胞由来 SK-N-SH

細胞に発現させると、tAR27では凝集体の形成は見られないが、tAR97ではその凝集体の形成と核内凝集体形成に伴うアポトーシスが引きおこされた。tAR97を同時にこれらの細胞に発現させると、tAR97の凝集体形成と細胞毒性を抑制した。tAR97の凝集体形成と細胞毒性を抑制した。tAR97の凝集体と細胞毒性は tAR97の凝集体と細胞された(図 12)。さらに、tAR97の患者や tAR97の必要体を対すると、tAR97の必要体と細胞された(図 12)。さらに、tAR97のと tAR97の必要体と細胞された(図 12)。さらに、tAR97の必要体を対した。tAR97の必要体を対した。tAR97の必要体を対した。tAR97の必要体を対した。tAR97の必要体を対した。tAR97の必要ながは、tAR97の必要ながは、tAR97の必要ながは、tAR97の必要ながは、tAR97の必要ながは、tAR97の必要ながは、tAR97の必要なが、tAR97のののでは、tAR97の必要なが、tAR97の必要なが、tAR97の必要なが、tAR97のので、tAR97のので、tAR97のので、tAR97のでは、tAR97のので、tAR97のので、tAR97ののでは、tAR97ののでは、tAR97ののでは、tAR97のので、tAR97ののでは、tAR97ののでは、tAR97ののでは、tAR97ののでは、tAR97のでは、tAR97のでは、tAR97ののでは、tAR97ののでは、tAR97ののでは、tAR97ののでは、tAR97のでは、tAR9

我々は、 $HSP105\alpha$ ではなく  $HSP105\beta$  がほ乳動物細胞の細胞核に集積し HSP70 の発現を誘導することを明らかにしたが、 $HSP105\alpha$  を伸長ポリグルタミンタンパク質と共発現させると  $HSP105\alpha$  は細胞核にも一部局在するとともに、HSP70 の誘導が認められた。また、HSP70 発現をノックダウンすると伸長ポリグルタミンタンパク質の核内凝集体とアポトーシスに対する  $HSP105\alpha$  および  $HSP105\beta$  の抑制効果が減少するので、 $HSP105\alpha$  と  $HSP105\beta$  によるポリグルタミンタンパク質の凝集とアポトーシスの抑制の一部は HSP70 の誘導を介していると考えられた $^{46}$ .

#### 9-2 筋委縮性側索硬化症

Superoxide dismutase 1 (SOD1) 遺伝子の優性変異は最も多い筋委縮性側索硬化症の原因の一つである。我々は変異 SOD1 と相互作用するタンパク質として HSP105 をア

〔生化学 第84巻 第4号

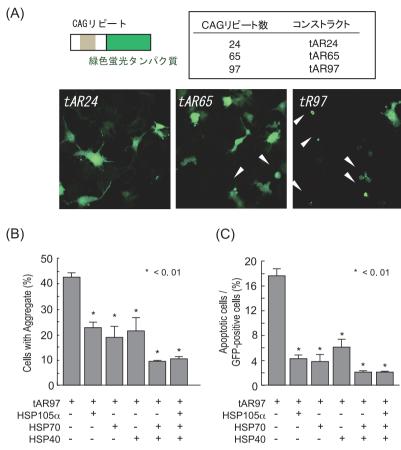


図12 球脊髄性筋委縮症モデル細胞における伸長ポリグルタミン含有タンパク質の凝集に及ぼす HSP105αの影響

(A) ポリグルタミン鎖と緑色蛍光タンパク質(GFP)を含む短縮型アンドロゲン受容体(tAR24, tAR65, tAR97)の発現プラスミドを COS-7 細胞に導入後,72 時間培養し GFP の蛍光を観察した。(B, C) COS-7 細胞に tAR97 と tAR97 と tAR97 と tAR97 の多現プラスミドを共導入後 72 時間培養し、GFP の蛍光を観察した。tAR97 の凝集体と GFP 陽性細胞の割合(B),凝集したクロマチンをもつアポトーシス細胞と GFP 陽性細胞の割合(C)。

フィニティ精製とマススペクトロ分析によって同定した.この相互作用は変異 SOD1トランスジェニックマウスの脊髄抽出液と培養神経芽細胞においても認められた.また,脊髄素における HSP105 は, SOD1 で3A 変異マウスの発症前にも減少し,さらに病気の進展に伴って減少した.さらに,ラクトスタチン誘導のカスパーゼ3の活性化を HSP105 は抑制することから,神経細胞において HSP105 を増加させることは変異 SOD1 の毒性を減少させる効果的治療法の一つになることを示した470.

#### 9-3 がん細胞における HSP105 の高発現とがん免疫

HSP105 はヒトの種々のがん、大腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、食道がん、乳がんにおいて高発現が見られる<sup>48)</sup>. HSP105 の高発現はがん細胞をアポトーシスから防ぐと考えられることから、HSP105 はがん治療のための新しい標的分子であると考えられた.

そこで、がん免疫療法として HSP105 タンパク質を産生する DNA ワクチンの効果を検討した<sup>49</sup>. BALB/c や C57 BL/6 マウスに HSP105 を高発現する大腸がん細胞 Colon 26 やメラノーマ細胞 B16. F10 を皮下に接種したところ、hsp105 DNA ワクチンで免疫した 50% のマウスにおいて皮下に接種したこれらのがん細胞の増殖が CD4 $^+$  T 細胞や CD8 $^+$  T 細胞の腫瘍への浸潤を伴って完全に抑制された.自己免疫反応は見られなかったことから、HSP105 は HSP 105 を高発現する腫瘍の免疫療法における理想的な腫瘍抗原であると考えられた.

#### 9-4 脳虚血

我々は遺伝子ターゲティングによって hsp105 遺伝子のエキソン1をネオマイシン抵抗カセットで置き換えて hsp 105 ノックアウト (hsp105 KO) マウスを作製した<sup>500</sup>. ヘテロとホモマウスは生存および生殖可能であり、発育上の

異常は認められなかった。また、組織学的および形態学的解析によっても hsp105 KO マウスの神経系の発育は野生型に比べて差は認められなかった。種々の熱ショックタンパク質の発現を hsp105 KO マウスの脳組織において検討したところ、野生型と hsp105 KO マウスにおいて構成的なHSP90と HSC70の発現に有意差はなく、また誘導型 HSP70の発現も見られず、代償的な熱ショックタンパク質の増加は認められなかった。

しかし、予期せぬことに hsp105 KO マウスに中脳動脈の 閉塞による一過性の脳虚血を与えると、hsp105 KO マウス では脳虚血障害が野生型のものよりも少なく、また行動観察においても hsp105 KO マウスの神経学的欠陥は野生型マウスに比べて有意に低いものであった。このように、HSP 105 はマウスの分化・発育に必須ではないが、hsp105 KO マウスが脳虚血障害に対して抵抗性示す現象は HSP105 の未知の機能を示すものとして興味深いものであり、この解明に今後の研究が期待される。

#### 10. おわりに

本稿では、HSP105 ファミリータンパク質の構造と機能について概説した。HSP105 は ATP 枯渇時にも変性タンパク質の凝集を抑制するとともに、HSP70 シャペロン系のヌクレオチド交換因子の一つとしてタンパク質のフォールディングに関与する。HSP105 $\alpha$  は細胞質で機能するが、弱い熱ショックによって誘導される HSP105 $\beta$  は HSP70 の発現を増強するとともに細胞核内で機能する。HSP105 の生理的機能として、胎児細胞におけるアポトーシスの促進作用と神経細胞やがん細胞におけるアポトーシスの抑制作用があり、さらに HSP105 がポリグルタミン病、筋委縮性側索硬化症、がんとがん免疫、脳虚血など種々の疾患の発症や治療に関わっていることから、今後 HSP105 の詳細な作用機作の解明とともに応用研究が期待される。

#### 謝辞

本稿で紹介した著者の研究成果は,著者が大阪市立大学 医学部に在籍していたころから京都薬科大学生化学分野の 現在に至るまでの間,多くの方々との共同研究によって得 られたものであり,これらの皆様に心より感謝の意を表し ます.

#### 文 献

- Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., & Hightower, L.E. (2009) Cell Stress & Chaperones, 14, 105–111.
- Vos, M.J., Hageman, J., Carra, S., & Kampinga, H.H. (2008) *Biochemistry*, 47, 7001–7011.
- 3) Hendrick, J.P. & Hartl, F. (1993) Annual Review of Biochem-

- istry, 62, 349-384.
- Craig, E.A., Weissman, J.S., & Horwich, A.L. (1994) Cell, 78, 365–372.
- Kelley, W.L. (1998) Trends in Biochemical Sciences, 23, 222– 227.
- Buchner, J. (1999) Trends in Biochemical Sciences, 24, 136– 141.
- Netzer, W.J. & Hartl, F.U. (1998) Trends in Biochemical Sciences, 23, 68–73.
- Bryantsev, A.L., Kurchashova, S.U., Golyshev, S.A., Polyakov, V.Y., Wunderink, H.F., Kanon, B., Budagova, K.R., Kabakov, A., & Kampinga, H.H. (2007) *Biochem. J.*, 407, 407–417.
- Hatayama, T., Honda, K., & Yukioka, M. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun., 137, 957–963.
- Honda, K., Hatayama, T., & Yukioka, M. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun., 160, 60–66.
- Hatayama, T., Yasuda, K., & Nishiyama, E. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204, 357–365.
- Yasuda, K., Nakai, A., Hatayama, T., & Nagata, K. (1995) J. Biol. Chem., 270, 29718–29723.
- 13) Lee-Yoon, D., Easton, D., Murawski, M., Burd, R., & Subjeck, J.R. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 15725–15733.
- 14) Ishihara, K., Yasuda, K., & Hatayama, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1444, 138–142.
- 15) Kaneko, Y., Nishiyama, H., Nonoguchi, K., Higashitsuji, H., Kishishita, M., & Fujita, J. (1997) J. Biol. Chem., 272, 2640-
- 16) Kaneko, Y., Kimura, T., Kishishita, M., Noda, Y., & Fujita, J. (1997) Gene, 189, 19–24.
- 17) Chen, X., Easton, D., Oh, H., Lee-Yoon, D., Liu, X., & Subjeck, J. (1996) *FEBS Lett.*, 380, 68–72.
- 18) Yasuda, K., Ishihara, K., Nakashima, K., & Hatayama, T. (1999) Biochem, Biophys. Res. Commun., 256, 75–80.
- Hatayama, T., Yasuda, K., & Yasuda, K. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., 248, 395–401.
- Wakatsuki, T. & Hatayama, T. (1998) Biol. Pharm. Bull., 21, 905–910.
- 21) Yamagishi, N., Nishihori, H., Ishihara, K., Ohtsuka, K., & Hatayama, T. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun., 272, 850–855.
- 22) Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y., & Hatayama, T. (2003) FEBS Lett., 555, 390–396.
- Yamagishi, N., Ishihara, K., & Hatayama, T. (2004) J. Biol. Chem., 279, 41727–41733.
- 24) Cry, D.M. (2008) Cell, 133, 945-947.
- Polier, S., Dragovic, Z., Hartl, U., & Bracher, A. (2008) Cell, 133, 1068–1079.
- 26) Yamagishi, N., Yokota, M., Yasuda, K., Saito, Y., Nagata, K., & Hatayama, T. (2011) Biochem. Biophys. Res. Commun., 491, 90–95.
- 27) Honda, K., Hatayama, T., & Yukioka, M. (1988) J. Biochem., 103, 81–85.
- Hatayama, T., Yasuda, K., & Nishiyama, E. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun., 204, 357–365.
- Ishihara, K., Yasuda, K., & Hatayama, T. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun., 270, 927–931.
- Ishihara, K., Yamagishi, N., & Hatayama, T. (2003) Biochem. J., 371, 917–925.
- Hatayama, T., Nishiyama, E., & Yasuda, K. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun., 200, 1367–1373.
- 32) Saito, Y., Yamagishi, N., & Hatayama, T. (2007) Exp. Cell Res., 313, 3707–3717.

260 [生化学 第84巻 第4号

- 33) Liu, Q. & Hendrickson, W.A. (2007) Cell, 131, 106-120.
- 34) Pelham, H.R.B. (1984) EMBO J., 3, 3095–3100.
- Saito, Y., Yamagishi, N., & Hatayama, T. (2009) J. Biochem., 145, 185–191.
- Yamagishi, N., Fujii, H., Saito, Y., & Hatayama, T. (2009) FEBS J., 276, 5870–5880.
- Saito, Y., Doi, K., Yamagishi, N., Ishihara, K., & Hatayama, T.
   Biochem. Biophys. Res. Commun., 314, 396–402.
- 38) Saito, Y., Yamagishi, N., Ishihara, K., & Hatayama, T. (2003) Exp. Cell Res., 286, 233–240.
- Hatayama, T., Takigawa, T., Takeuchi, S., & Shiota, K. (1997) Cell Struct. Funct., 22, 517–525.
- Yamagishi, N., Saito, Y., Ishihara, K., & Hatayama, T. (2002)
   Eur. J. Biochem., 269, 4143–4151.
- Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y., & Hatayama, T. (2002)
   J. Biochem., 132, 271–278.
- Hatayama, T., Yamagishi, N., Minobe, E., & Sakai, K. (2001)
   Biochem. Biophys. Res. Commun., 288, 528–534.
- 43) Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y., & Hatayama, T. (2006) *Exp. Cell Res.*, 312, 3215–3223.

- 44) Yamagishi, N., Saito, Y., & Hatayama, T. (2008) FEBS J., 275, 4558–4570.
- Ishihara, K., Yamagishi, N., Saito, Y., Adachi, H., Kobayashi, Y., Sobue, G., & Hatayama, T. (2003) J. Biol. Chem., 278, 25143–25150.
- 46) Yamagishi, N., Goto, K., Nakagawa, S., Saito, Y., & Hata-yama, T. (2010) Exp. Cell Res., 316; 2424–2433.
- 47) Yamashita, H., Kawamata, J., Okawa, K., Kanki, R., Nakamizo, T., Hatayama, T., Yamanaka, K., Takahashi, R., & Shimohama, S. (2007) J. Neurochem., 102, 1497–1505.
- 48) Miyazaki, M., Nakatsura, T., Yokomine, K., Senju, S., Monji, M., Hosaka, S., Komori, H., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Minohara, M., Kubo, T., Ishihara, K., Hatayama, T., Ogawa, M., & Nishimura, Y. (2005) Cancer Sci., 96, 695–705.
- Hosaka, S., Nakatsura, T., Tsukamoto, H., Hatayama, T., Baba,
   H., & Nishimura, Y. (2006) Cancer Sci., 97, 623–632.
- 50) Nakamura, J., Fujimoto, M., Yasuda, K., Takeda, K., Akira, S., Hatayama, T., Takagi, Y., Nozaki, K., Hosokawa, N., & Nagata, K. (2008) Stroke, 39, 2853–2859.