

総説

Hsp40 相同体のシャペロンサイクルにおける役割と固有機能

竹内理香¹⁾, 川島大介¹⁾, 曾我実¹⁾, 大塚健三^{1), 2)}

¹⁾中部大学大学院応用生物学研究科, ^{1,2)}中部大学大応用生物学部

要 旨

熱ショックタンパク質(Heat shock proteins, HSPs)は, 分子シャペロンとして細胞内のタンパク質の品質管理を担っている. Hsp70 は代表的な分子シャペロンであり, その補助因子として機能する Hsp40 は HSPs の中で最も相同体が多く, 哺乳類では, 現在の時点で 50 個確認されている. ヒトゲノム計画が終了し, タンパク質の機能解析が進む中で数多くの Hsp40 相同体 1 つ 1 つの固有の機能が解析されつつある. その結果, タンパク質の恒常性維持や, 神経変性疾患, プリオン病に至るまで Hsp40 相同体は幅広く関与していることが示唆されている. しかし, 未だに機能未知の相同体も多く, その解析が待たれている. 本稿では Hsp40 相同体の構造およびシャペロンサイクルにおける役割と, これまでに報告されている個々の相同体の機能解析について概観する.

1. はじめに

生体内のタンパク質はセントラルドグマの流れに沿って DNA から mRNA に転写, さらに翻訳されて合成される. 合成されたタンパク質は自身が働く場所へと輸送され, 役割を終えたタンパク質はおもに UPS(ubiquitin proteasome system)によって分解, リサイクルされる. この過程でタンパク質の正しい折りたたみを助け, 機能を獲得させるタンパク質の一群が存在する. その一群は分子シャペロンと呼ばれ, その多くは熱ショックによって誘導されることから HSPs(heat shock proteins)とよばれる. この HSPs はタンパク質の品質管理を行うことが知られている. 一番重要な機能はタンパク質に凝集を起こさせない, もしくは凝集してしまったタンパク質をリフォールディングさせ, 再び正しい立体構造にしてやることである. つまり HSPs は異常なタンパク質の凝集から生体を防護しているのである. HSPs の最も重要な役割はこの機能であると言えよう(Hartl, 1996).

2. HSP family

HSPs 研究は 1960 年代に, Ritossa がショウジ

ヨウバエの幼虫を高温にさらすと唾液腺染色体の特定の部位に mRNA の合成が活発に行われる染色体の局所的な膨らみ, パフが出現することを発見したことから始まった. Ritossa はこの反応のことを HSR(heat shock response)と名付けた(Ritossa, 1962). その後 1974 年に Tissières によってこのパフの出現がある特定のタンパク質の発現を上昇させることが分かった. このタンパク質の一群は熱ショックで誘導されることからここで初めて熱ショックタンパク質という名称で呼ばれることとなった (Tissières et al., 1974). その後の研究でさらに HSPs は熱ショックのみならず, 私たちの生活を取り巻く様々なストレス, 例えば重金属, 紫外線や酸化ストレスなどによっても誘導され, それらから生体を防御することが分かってきた(Wirth et al., 2003; Trautinger, 2001; Samali and Orrenius, 1998). また, HSPs は分子量が 90kDa なら Hsp90, 70kDa なら Hsp70 と, その分子量によって大まかに分類される. その機能も一部が重なっている場合もあるが, 分子量によって特有の働きを有するものもある. たとえば Hsp90 はステロイド受容体や p53, HER2(human epidermal growth factor receptor

2)などの転写因子と複合体を形成してその機能維持に参与している(Wandinger et al., 2008; Neckers, 2006). また, Hsp90 はがんとの係わり合いも深く, Hsp90 の阻害剤は抗がん剤になる可能性が示唆されている(Solit and Chiosis, 2008). Hsp70 は最も解析の進められている HSP であり, 脳や消化器, 筋肉にいたるまで生体のほぼ全ての臓器で発現している. Hsp70 は非ストレス条件下では細胞質に局在し, ストレス条件下では核小体へと移行する(Hattori et al., 1993). 小胞体には BiP(Chevalier et al., 2000), ミトコンドリアには mtHsp70(Ran et al., 2000)と細胞の各コンパートメントに固有の Hsp70 のメンバーを持つ. Hsp70 はとりわけ, HSPs のなかでも代表的な存在と言える. 具体的には ATP 依存的に不安定なタンパク質の疎水性領域に結合してその部分をシールドして凝集を防ぐ. そして, 結合と解離を繰り返して本来あるべき立体構造へとターゲットタンパク質をリフォールディングする(Agashe and Hartl, 2000). また, タンパク質輸送やタンパク質の膜透過, タンパク質合成さらにはタンパク質の分解にも関与しており, タンパク質のあらゆる局面においてその機能が確認されている(Hendrick and Hartl, 1995) それ以外にはタンパク質をプロテオソームに輸送して分解するユビキチンも低分子量の HSPs である(Schlesinger, 1990). そして, 次項より詳しく記述していく Hsp40 とその相同体の主な役割は Hsp70 の補助であり, Hsp40 はコシャペロン, シャペロン補助因子と呼ばれている (Minami et al., 1996). いくつか存在する生体内の HSPs の中でとりわけ Hsp40(heat shock protein 40kDa)はグループに分かれ, さらにメンバーが多数存在するファミリーを形成している(Ohtsuka and Hartl, 2000). その相同体は HSPs の中でも最も多く, 加えてシャペロン補助因子としての働き以外に相同体固有の機能を有している. Hsp40 グループは最も種類や機能の多い HSPs と考えられる. よって多岐に渡る Hsp40 とその相同体の機能を

解析・検討することは分子シャペロンを理解する上で重要である. 本稿ではこれまでに解明されている Hsp40 とその相同体の機能とその役割について詳しく述べてい.

3. Hsp40 相同体の構成と構造

Hsp40 も細胞の各コンパートメントにメンバーが存在し, 各場所に局在する Hsp70 もしくはその相同体と相互作用を示している. ヒトゲノム計画によりヒトの全塩基配列が決定されたことによって, 2000 年の段階で哺乳類の相同体は 23 個(Ohtsuka and Hata, 2000), 2009 年の段階では 50 個確認(Kampinga et al., 2009)されている. この他にも Hsp40 相同体は大腸菌で 4 個, 酵母で 22 個, 線虫で 29 個, ショウジョウバエで 38 個確認されている(Rubin et al., 2000)が, いずれの種でもその数は Hsp70 相同体よりも多い. これは Hsp70 ではなく Hsp40 相同体の基質結合 domain がターゲットとなるタンパク質を決定しているからだと考えられている.

Hsp40 は 1990 年に Ohtsuka らによって二次元電気泳動法で同定され, 分子量が約 40kDa であったため, Hsp40 と命名された(Ohtsuka et al., 1990). その後, この Hsp40 が大腸菌の DnaJ と同源性が高かったため DnaJ 相同体をまとめて Hsp40 ファミリーと呼ぶことになった(Ohtsuka, 1993). DnaJ 相同体は 3 つのグループに分けられ, その構造によって DnaJA, DnaJB, DnaJC, もしくは type I, type II, type III に分類されることになった. DnaJA グループもしくは type I は N 末端から順に Hsp70 もしくはその相同体と相互作用を示す HPD(ヒスチジン・プロリン・アスパラギン酸)motif の存在する J domain, その相互作用を促進するグリシンとフェニルアラニンに富んだ領域(G/F rich domain), 基質との特異的な結合に必要な Zn finger domain が存在する. DnaJB グループもしくは type II は J domain と G/F rich domain が存在し, DnaJC グループもしくは type III は J domain のみが存在する(Kelly,

1998)(図 1). C 末端は互いに相同性が低く、基質の特異性に関与していると考えられている。

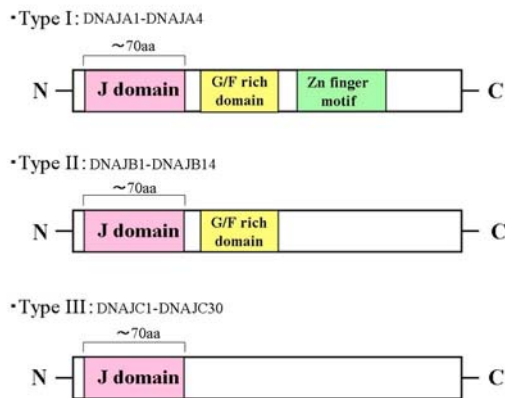


図 1. Hsp40 相同体のアミノ酸配列。

type I, DNAJA グループは N 末端から HPD motif の存在する約 70 アミノ酸残基からなる J domain, グリシンとフェニルアラニンに富んだ G/F rich domain, DNA 結合領域を持つ Zn finger motif が存在し, DNAJA1~DNAJA4 の 4 個のメンバーが存在する。type II, DNAJB グループは N 末端から J domain, G/F rich domain 存在し, DNAJB1~DNAJB14 の 14 個のメンバーが存在する。type III, DNAJC グループは J domain のみが存在し, DNAJC1~DNAJC30 の 32 個のメンバーが存在する。DNAJC グループのメンバー数と個数が違うのは DNAJC5 に 3 個のバリエーションが存在するからである。3 つの domain 以外は基質タンパク質と結合するのに必要と考えられている(Kelly, 1998 より改変)。

これらのグループに共通して存在する J domain は 70 ほどのアミノ酸残基で構成されるドメインで大腸菌からヒト間でも保存性が非常に高い(Pellecchia et al., 1996)。その立体構造は 4 つの α -ヘリックスで構成されている。2 つめのヘリックスのアミノ酸は塩基性に富んでおり、電荷を帯びた表面が分布している。2 つめと 3 つめのヘリックス間に HPD motif は存在し(Qian et al., 1996)(図 2), その間の疎水性アミノ酸はヘリックスに包まれた安定した位置に保存されている(Walsh et al., 2004)。

4. Hsp70-Hsp40 シャペロンサイクルと Hsp70 の補助因子としての Hsp40 相同体

Hsp70 や Hsp40 の発現は、熱ショック転写因子 (heat shock factor 1, HSF1) によってコントロールされる。細胞にストレスが加わると、細胞質に局在していた HSF1 が 3 量体を形成し、リン

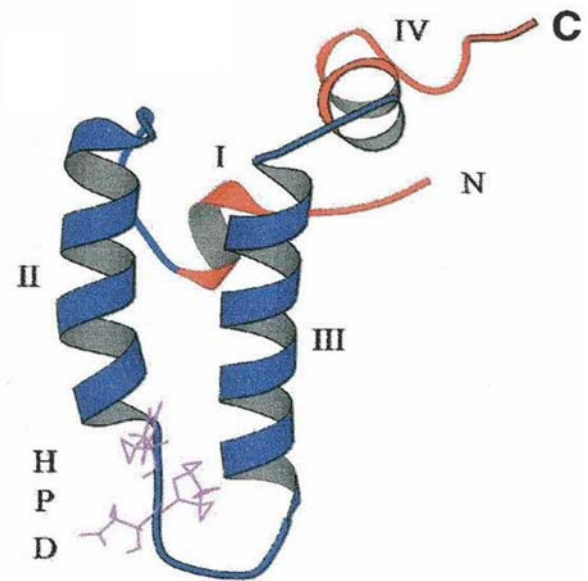


図 2. J domain の 3 次元構造

J domain は 4 つの α -ヘリックスから構成され、ヘリックス II とヘリックス III の間に HPD が存在する(Hennessy et al., 2005 より抜粋)。

酸化されて核内に移行し, Hsp40 や Hsp70 のプロモーター部位に存在する HSE (heat shock element) に結合し, Hsp40 や Hsp70 が発現する(Shi et al., 1998)。

シャペロンサイクルのスタートは 2 つのルートがあると考えられている。基質タンパク質が先に Hsp70-ATP に結合し(図 3. ①), その後で Hsp40 が結合して(図 3. ③), シャペロン複合体を形成する場合(図 3. ⑥)と、基質タンパク質がまず Hsp40 に結合し (図 3. ②→④), それから Hsp70-ATP に結合して(図 3. ⑤)シャペロン複合体を形成する(図 3. ⑥), という 2 つのルートである。基質タンパク質とは凝集したタンパクやまだ折りたたまれていないタンパク質のことを指す。次に Hsp40 が Hsp70 の ATP 加水分解活性を促進し, Hsp70 による ATP 加水分解反応が起こり, ATP からリン酸が解離する(図 3. ⑦). ATP 加水分解反応が終了すると Hsp40 は複合体から解離する(図 3. ⑧). Hsp70 と基質タンパク質の複合体において ATP-ADP 交換反応が起こり, 基質タンパク質が Hsp70 によって正常に折りたたまれる。ATP-ADP 交換の step はヌクレオチド交換因子

(大腸菌では GrpE, 哺乳類では Bag1)によって促進される(図 3. ⑨). 基質タンパク質が Hsp70 から解離する(図 3. ⑩). 基質タンパク質の折りたたみが不十分の場合はこのサイクルを繰り返す(図 3. ⑪).

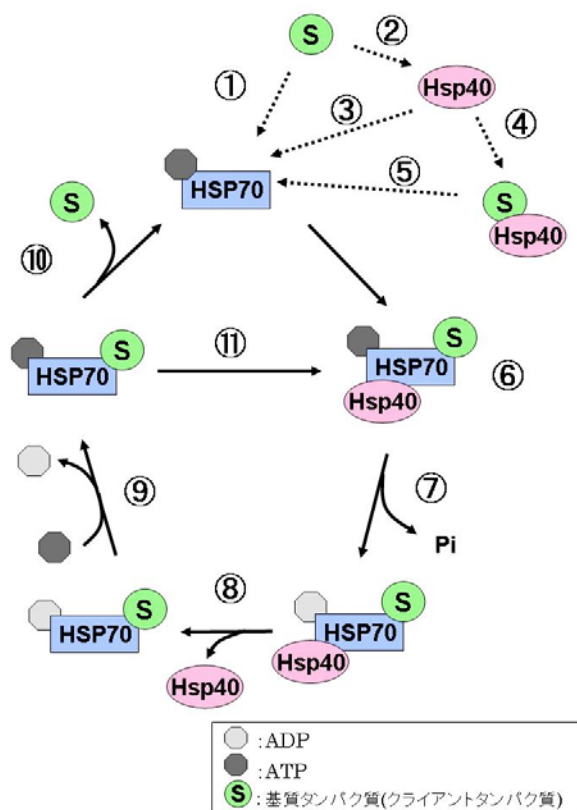


図 3. Hsp40, Hsp70 シャペロンサイクル.

①: 基質タンパク質 (aggregated protein, unfolded protein など) が ATP-Hsp70 複合体に結合する. ②: 基質が Hsp40 に結合する. ③: Hsp40 が ATP-Hsp70 複合体に結合する. ④: 基質-Hsp40 複合体が形成される. ⑤: 基質-Hsp40 複合体が ATP-Hsp70 複合体に結合する. 基質と Hsp40 は①, ③もしくは②, ④, ⑤の経路をたどる. ⑥: Hsp70, Hsp40, 基質, ATP が複合体を形成する. ⑦: ATP 加水分解反応が起こってリン酸が解離する. ⑧: Hsp40 が解離する. ⑨: ATP-ADP 交換反応が起こり, 基質が折りたたまれる. ⑩: 基質が解離する. ⑪: 基質の折りたたみが不十分の場合はサイクルを繰り返す. (Hennessy et al., 2005 より改変)

基質の折りたたみが終了し, 細胞質で余剰となった Hsp40, Hsp70 は核内に移動し, HSF1 の C 末端の転写活性化ドメインに結合する. すると, HSF1 を不活性化する負のフィードバックが起こり, Hsp40 と Hsp70 の発現が止まる(Shi et al., 1998). Hsp70-Hsp40 シャペロンサイクルによるタンパク質の品質管理は常に生体内で行われて

いるが, 先述した先述したストレスに生体がさらされるとサイクルはよりいっそう活発になる. また, これらの Hsp40-Hsp70 サイクルは, 全ての Hsp40 ファミリーに当てはまるわけではない. Hsp40 ファミリーはあくまで Hsp70 のコシャペロンとして補助的な役割をするだけであり, Hsp70 単独でも弱いながらの ATP の加水分解を行う. また, Hsp40 相同体の中にはその遺伝子上流のプロモーター部位の中に HSE 配列を持たない相同体も存在し, それらは熱ショックでは発現が誘導されない.

5. 解析が進んでいる Hsp40 相同体

今現在, 解析が進められている Hsp40 相同体をいくつか取り挙げたい.

5-1. ケラチン 18/8 中間径フィラメントと相互作用する DnaJB6(Mrj)

ケラチンは上皮細胞において細胞骨格のおもな構成要素である中間径フィラメントを形成しているタンパク質であり, 少なくとも 20 以上のメンバーで構成され, タイプ I ケラチン(ケラチン 9~20)とタイプ II ケラチン(ケラチン 1~8)間で非共有結合のヘテロポリマーを形成する. ケラチン 18 はケラチン 8 とヘテロポリマーを形成し, ケラチン 18/8 中間径フィラメントとして細胞骨格を形成している(Moll et al., 1982). このケラチン 18 は Hsp40 相同体の DnaJB6(別名 Mrj)と相互作用を示すことが yeast two-hybrid 法で確認された(Izawa et al., 2000). 培養細胞を用いた実験では核周辺でケラチン 18 と DnaJB6 は共局在を示した. ケラチン 18 の coil II region は DnaJB6 の C 末端の基質結合ドメインと相互作用を示し, さらに DnaJB6 は N 末端の J domain で Hsp70 と相互作用を示すため, シャペロン複合体が出来上がる. このケラチン 18 と DnaJB6 間, または DnaJB6 と Hsp70 間の相互作用の消失は明らかなケラチン 18/8 フィラメントネットワー

クの崩壊を示した。また、培養細胞内にマイクロインジェクション法を用いて抗 DnaJB6 抗体を注入し、細胞内の DnaJB6 を抗体と結合させると上記同様にケラチン 18/8 フィラメントネットワークが崩壊した(図 4)。しかし、その他の細胞骨格を構成するタンパク質であるアクチンやチューブリンには影響が見られなかった。このことから DnaJB6 が基質特異的にケラチン 18, Hsp70 と結合してシャペロン複合体を形成して、ケラチン 18/8 フィラメントの構築に寄与していることが示唆された(Izawa et al., 2000)。

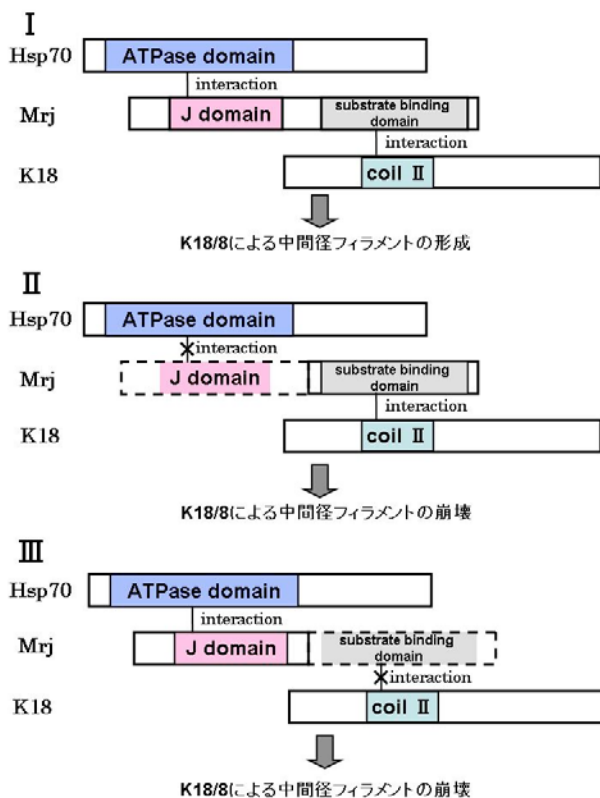


図 4. Hsp70, Mrj, K18 の相互作用。

I. Mrj は J domain 内の HPD motif を介して Hsp70 と相互作用を示し、基質結合ドメインを介して K18 の coil II region と相互作用を示す。II. J domain を介する Hsp70 との相互作用が消失すると K18/8 による中間径フィラメントの崩壊を引き起こす。III. substrate binding domain を介する K18 の coil II region との相互作用が消失すると K18/8 による中間径フィラメントの崩壊を引き起こす(Izawa et al., 2000 より改変)。

また、DnaJB6 は脳内のドーパミン不足とアセチルコリンの増加を病態とする神経変性疾患のパーキンソン病において、その病変部位である脳

内のレビー小体や中脳の一部を占める神経核に高発現が確認されている。このことから DnaJB6 は神経変性疾患に関連したタンパク質である可能性も示唆されている(Durrenberger et al., 2009)。

5-2 増殖因子受容体の動態と細胞内シグナリングに 関 与 す る DnaJC13(RME8) お よ び DnaJA3(Tid1)

エンドサイトーシスは細胞外の物質を細胞内へと輸送小胞によって取り込む現象のことである。このエンドサイトーシスに関連するシグナル伝達を行う受容体のいくつかはシャペロンサイクルの基質タンパク質となっている。DnaJC13(別名 RME8)は線虫のエンドサイトーシス異常に関連するタンパク質としてスクリーニングされた Hsp40 相同体である(Zhang et al., 2001)。DnaJC13 は基質特異的に EGFR (epidermal growth factor receptor: 上皮増殖因子受容体)と相互作用を示し、EGFR のリソソーム経路への輸送に関与している(Girard et al., 2005)。EGFR は細胞の成長や増殖に関与している EGF(epidermal growth factor: 上皮増殖因子)の受容体であり、EGF を認識してシグナル伝達を行う膜貫通タンパク質である(Gschwind et al., 2004)。この遺伝子のノックアウトマウスは胎児期における死亡、もしくは肺や消化管などの内臓上皮において重度の障害を引き起こすことが知られている(Sibilia et al., 1995; Miettinen et al., 1995)。また、このタンパク質は肺がん、乳がん、胃がん、大腸がんなどのさまざまな悪性腫瘍で過剰発現が検出されている(Normanno et al., 2003)。細胞内へエンドサイトーシスされるレセプターはエンドソームへと輸送された後に再び細胞膜へと戻るリサイクル経路とリソソームで分解されるリソソーム経路に分けられる。DnaJC13 は ATP 依存的に Hsc70(heat shock cognate 70 : 恒常的に発現している Hsp70)と相互作用を示し、

EGFR をリソソーム分解経路へと導くが, Tfr (transferrin receptor)や InsR (insulin receptor), LDLR (low density lipoprotein cholesterol receptor)などのリサイクリング経路をたどる受容体には関与しない. DnaJC13 はエンドソームマーカーの EEA1 と共局在し, エンドソームからリソソーム分解経路間で EGFR は相互作用を示

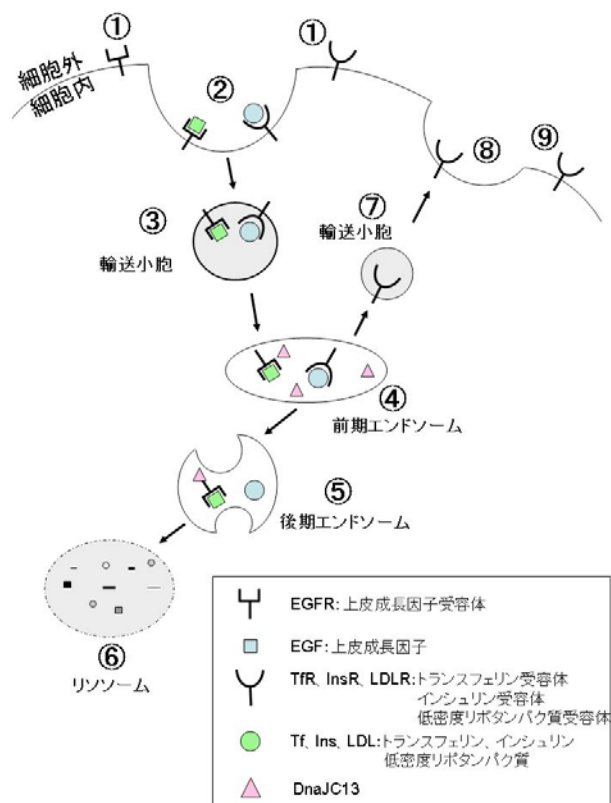


図4. 細胞内にエンドサイトーシスされた受容体がたどるリソソーム経路とリサイクリング経路.

①: 細胞表面に受容体が存在する. ②: リガンドと結合した受容体は細胞内に陥入する. ③: クラスリン被覆小胞によって細胞内へと取り込まれた輸送小胞は前期エンドソームと融合する. ④: 早期エンドソームに局在する DnaJC13 は特異的に前期エンドソームへと取り込まれてきた EGFR に結合する. Tfr, InsR, LDLR などの受容体はリガンドと解離する. ⑤: リガンドと受容体は内側に括れを持つ成熟した後期エンドソームへと取り込まれる. ⑥: 後期エンドソームがリソソームに取り込まれることによってリガンドと受容体がリソソーム内のプロテアーゼによって分解される. ④~⑥の経路がリソソーム経路である. ⑦: リガンドと解離した受容体は再び輸送小胞によって細胞膜へと輸送される. ⑧: 受容体は細胞膜へとリサイクルされる. ⑨: ①の状態に戻る. ④, ⑦~⑨の経路がリサイクリング経路である. (Girard et al., 2008)より予想図を作成.

していることが示唆された(図 5). 加えて, DnaJC13 は EGFR の分解系のみに関与しているとされている. 培養細胞において RME8 を siRNA 処理すると細胞における EGFR の総量, とりわけ, 細胞表面における EGFR は減少したが, ^{35}S -label されたシステインとメチオニンを培養液に加え, 抗 EGFR 抗体で免疫沈降を行ったところ, mock と siRNA 処理とのサンプル間で検出された EGFR の量は同等であった. このことから, DnaJC13 は EGFR の新規合成には関与せず, 分解量を制御していることが示唆された(Girard et al., 2008).

また, EGFR と同じ ErbB ファミリーの HER-2/ERbB2 と DnaJA3(別名: Tid1)の相互作用も確認されている(Kim et al., 2004). HER-2 は活性化した他の ErbB ファミリーと結合して二量体を形成し, シグナル伝達を行うと考えられている(Graus-Porta et al., 1997). また, HER-2 も EGFR と同様に細胞の増殖や分化に関わっており, 多くのがん細胞で過剰発現が確認されている(Normanno et al., 2003). HER-2 ノックアウトマウスでは心臓や神経系の発達障害で胎生期の死亡が確認されている(Lee et al., 1995). HER-2 は膜貫通型の糖化タンパク質であり, その細胞質ドメインと DnaJA3 は相互作用を示す. DnaJA3 を過剰発現させたがん細胞において HER-2 とプログラム細胞死へと導く発がん性 HER-2 依存性 MAP キナーゼの発現の低下が確認された. このことは DnaJA3 の発現増加によって HER-2 依存的な腫瘍増殖が阻害された可能性が示唆された(Kim et al., 2004). これらのことから細胞増殖のための細胞内シグナリングと Hsp40 相同体の密接な関係性が示唆されている.

5-3 シナプスのエンドサイトーシスに関与する DnaJC5(CSP)

エキソサイトーシスは上記で述べたエンドサイトーシスとは逆の経路のことであり, 細胞内で

合成された物質を開口分泌によって細胞外へ放出する過程のことである。この過程においてもシャペロンサイクルの基質となるタンパク質が存在する。DnaJC5(別名 CSP:Cysteine-string protein)はショウジョウバエとシビレエイで同定された主要なシナプス小胞と分泌顆粒タンパク質である。CSPは神経伝達物質の放出に関与しており、哺乳類の神経内分泌系のエキソサイトーシスを制御している。CSPは高度にパルミトイル化された cysteine string domain を有し、Hsc70 と相互作用を示す Hsp40 相同体である。その基質として開口分泌に関連するタンパク質のシナプトブレビン、開口放出 SNARE 複合体タンパク質のシンタキシンなど、エキソサイトーシスに関連したタンパク質や、SGT (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein) との相互作用が確認されている (Chamberlain et al., 2000; Tobaben et al., 2001)。CSP, Hsc70, SGT 複合体はシナプス小胞表面に局在し、SGT の過剰発現は神経伝達物質の細胞外への放出を阻害することから、CSP, Hsc70, SGT のシャペロン複合体はシナプスの機能において重要な役割を担っていると示唆された (Tobaben et al., 2001)。これらのことから DnaJC5 はエキソサイトーシスやシナプスの恒常性の維持に関与するシャペロンだと考えられる。

5-4 精子形成に関与する Hsp40 相同体

Hsp40 相同体の中で精子形成に関与する相同体はいくつか存在する。DnaJB1 は yeast two-hybrid 法によって精子細胞で特異的に発現する Iba1 との相互作用が検出されており、精子においてはその頭部と尾部で発現が確認されている (Doiguchi et al., 2007)。DnaJA1 は精子形成におけるステージ 8 および、9 の段階で精巣に器官特異的に存在する。DnaJA1 のノックアウトマウスはアンドロゲンシグナリングに関与する精子形成において重篤な欠損症が発見されている。

具体的には、精子完成の維持に必要であるセルトリ細胞の欠損や、Pem や testin などのアンドロゲン反応性遺伝子の転写の増加とアンドロゲン受容体の蓄積を引き起こす。また、ノックアウトマウスではセルトリ細胞の細胞間接着結合の崩壊も確認できたことから、DnaJA1 は精子形成において決定的な役割を担っていると考えられている (Terada et al., 2005)。

5-5 小胞体内で機能する Hsp40 相同体

小胞体内で機能している Hsp40 相同体では DnaJB9, DnaJB11 などが挙げられる。この 2 つにはそれぞれ ERdj4, ERdj3 と呼ばれる別名がある。つまり ER(endoplasmic reticulum) の DnaJ (Hsp40) 相同体という意味である。小胞体は真核生物の細胞内小器官の一つであり、小胞体内タンパク質の正しい折りたたみや切断、脂質の合成や糖鎖付加などのタンパク質翻訳後修飾、また、カルシウムの貯蔵も行っている。ERdj4, ERdj3 はともに小胞体ストレスによって誘導され、小胞体内に局在する Hsp70 相同体の BiP と相互作用を示し、小胞体内でのタンパク質の正しい折りたたみや、凝集してしまったタンパク質の再折りたたみを補助している。BiP の小胞体での役割は、ER トランスロコンの permeability barrier の維持、タンパク質の移行 (Hamman et al., 1998)、ER ストレスセンサーとしての機能である (Bertolotti et al., 2000)。それぞれの特徴として DnaJB9 はヒト組織において肝臓や腎臓などの多くの分泌タンパク質を産生する臓器において高発現が見られ、ツニカマイシン (糖鎖合成阻害剤) やサブシガルジン (小胞体カルシウムポンプ阻害剤) などの小胞体ストレス誘導剤によって誘導される。また、膜アンカータンパク質でもある (Shen et al., 2002; Kurisu et al., 2003)。

DnaJB11 は膵臓と精巣で高発現が確認され (Yu et al., 2000)、培養細胞においてはツニカマイシン誘導性 ER ストレスには反応せず、サブシ

ガルジン処理で発現が誘導されたことから細胞内でのカルシウムの恒常性の乱れから細胞を保護していることが示唆された(Nakanishi et al., 2004). また, 基質特異的に γ HC (immunoglobulin heavy chain:免疫グロブリン重鎖)との相互作用が確認されている(Jin et al., 2008). DnaJB11 と γ HC, BiP と γ HC, さらに DnaJB11 と BiP はそれぞれ相互作用を示し, シャペロン複合体を形成する. そのシャペロンサイクルにおいて DnaJB11 は BiP と相互作用することによって基質である γ HC のシャペロンサイクルからの解離を制御する. 培養細胞における実験で, DnaJB11 の HPD motif に変異を導入するとコントロールと比較して, γ HC のシャペロンサイクルからの解離量が減少する(Shen et al., 2005).

5-6 神経変性疾患と Hsp40 相同体

近年, 遺伝子解析が進む中で神経変性疾患の遺伝子が次々に同定された. 中でもハンチントン舞蹈病の原因遺伝子が同定された意義はとて大きい. ハンチントン舞蹈病は huntingtin 遺伝子の N 末端側の CAG リピートが健常人よりもリピート数が多いことが原因となっており, 細胞内, 特に脳内の神経細胞に凝集体が形成されることにより引き起こされる. ハンチントン舞蹈病に代表されるような CAG(グルタミンをコードする)リピートの過剰な繰り返しによるグルタミンの異常伸長による神経変性疾患を総じてポリグルタミン病という(Ross et al., 1999). これらの神経変性疾患の原因タンパク質も Hsp40 相同体, Hsp70 相同体のシャペロンサイクルの基質タンパク質となっているものがいくつか存在する.

Hsp40 相同体の DnaJB6(Mrj)は脳, 特に海馬と視床で高発現が確認されたタンパク質である(Chuang et al., 2002). 培養細胞における実験で, 連続した 150 グルタミンを含む huntingtin 遺伝子と共に DnaJB6 を共発現させたとき, シャーレ

内で凝集体を形成した細胞の割合が 150 グルタミンを含む huntingtin 遺伝子単独で 61.8%, DnaJB6 を共発現させた場合は 11.2%と有意な減少が見られた. また, この場合の細胞の生存率においてもコントロールを 100%として 20%以上の差が確認された. 加えて, アポトーシスシグナル伝達系タンパク質のカスパーゼ活性を測定したところ, 今度は逆に 150 グルタミンを含む huntingtin 遺伝子のみを発現させた細胞のほうが DnaJB6 を共発現させた細胞よりも高かった. 以上のことから DnaJB6 は huntingtin 遺伝子由来のポリグルタミン凝集体の形成を抑制し, アポトーシスから細胞を防御していることが示唆された(Chuang et al., 2002).

この他にもポリグルタミンの凝集体から細胞を防御している Hsp40 相同体が存在するのでいくつか例を挙げていきたい.

DnaJC29 は別名 saccin と呼ばれ, この遺伝子の変異が常染色体劣性遺伝の神経変性疾患 ARSACS (autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay:シャルルボワ・ザグネ型痙性失調症)を引き起こすとして同定された失調関連タンパク質である(Engert et al., 2000). また, type III の特徴である J domain の他に UbL (ubiquitin-like) domain が存在し, プロテアソームとの相互作用が確認されている. さらに DnaJC29 は DnaJB6 同様に脳において発現が確認されている. DnaJC29 は自身も神経失調症の原因遺伝子であるが, 脊髄小脳変性症 1 型原因タンパク質の ataxin-1 由来のポリグルタミン凝集体から細胞を防御する(Parfitt et al., 2009). 培養細胞に連続した 82 グルタミンを含む ataxin-1 を発現させると通常は細胞質に局在する ataxin-1 が核内に封入体を形成する. DnaJC29 は通常は核内に punctate に局在するが, 82 グルタミンを含む ataxin-1 を共発現させた場合には DnaJC29 の局在は変化し, 核内の ataxin-1 の封入体と共に局在することが分かった. DnaJC29 を siRNA 処理した培養細胞において, 82 グルタミンを含む

ataxin-1 を発現させた細胞では核内封入体を形成した細胞はコントロールの細胞よりも半分以下であり、逆に punctate に局在した細胞はコントロールの細胞よりも有意に多かった。この結果は DnaJC29 が 82 グルタミンを含む ataxin-1 由来のポリグルタミン凝集体が存在するにも関わらず、共局在して細胞の生存を維持していることが示唆された。逆に DnaJC29 が siRNA 処理された細胞では封入体を形成する時点でアポトーシスによって細胞が死滅している可能性が示された(Parfitt et al., 2009)。この他にもポリグルタミン病に関与している相同体は多く、DnaJB2(Hsj1)はアンドロゲンレセプターの CAG リピートが原因となって引き起こされる SBMA(spinal and bulbar muscular atrophy : 球脊髄性筋萎縮症)において核内に形成される封入体から細胞を防護しているという報告がある(Howarth et al., 2007)。

また、Hsp40 相同体は近年、プリオン病との関連も指摘されている。プリオン病は BSA (bovine spongiform encephalopathy : 牛海面状脳症)や CJB(Creutzfeldt-Jakob disease : クロイツフェルト・ヤコブ病)などに代表される、現代では治療法のない致死的な疾患である (Prusiner, 1998)。現在確認されているプリオンは通常、健康な哺乳類で確認できるが、この正常型プリオンが何らかの原因で異常プリオンへと変化し、それが正常型プリオンを異常型プリオンへと構造を変換させる能力をもつことで伝播・感染する。異常型に変換されたプリオンはアミロイドと呼ばれる凝集した β -シート構造を形成し、神経細胞のアポトーシスなどを引き起こすとされている(Dobson, 2001)。プリオンと Hsp40 の関係については特に酵母での解析が進められている。酵母 Hsp40 相同体のひとつの Sis1 は酵母プリオンの代表的な RNQ+, PSI+, URE3 の 3 つの増殖と伝播に必要であることが示唆され、この系には Hsp70, Hsp104 が関与してプリオンの断片化を行っている (Higurashi et al., 2008)。哺乳類では

Hsp40 相同体の DnaJA2 は細胞内プリオンで GPI アンカー糖化タンパク質の PrPC との相互作用が確認されているが、それがシャペロンサイクルのターゲットタンパク質になるのかどうかはまだ分かっていない(Beck et al., 2006)。

このように Hsp40 は凝集したタンパク質を認識し、Hsp70 を介してダメージを受けたタンパク質のリフォールディングに寄与している。しかし、酵母の Ydj1 のような type I Hsp40 によるネイティブなポリペプチドの折りたたみのための分子メカニズム、つまりは Ydj1 によって選択的に認識される基質タンパク質のコンセンサス配列は最近まで明らかにされていなかった。しかし、2009 年に Kota らは、Ydj1 の C 末側のペプチド結合ドメインの構造をもとに、そこに結合しうるアミノ酸配列をコンピューター上で予測した。予測されたコンセンサス配列は GX[LMQ]{P}X{P}{CIMPVW} の 7 つのアミノ酸のモチーフ(ただし []内は []内のアミノ酸のうちのどれか, { }内は { }内のアミノ酸以外のアミノ酸)であった。さらに Kota らは yeast proteome のスクリーニングによって多くのタンパク質にこのモチーフを含んだ複数のアミノ残基が存在することを明らかにしている(Kota et al., 2009)。上記のことから、Hsp40 相同体がどのようにして基質タンパク質を選別し、結合するのかは、徐々に解析されつつある。上記に挙げた Hsp40 相同体は Hsp70, もしくは Hsp70 相同体と相互作用を示したタンパク質の品質管理を行うが、Hsp40 相同体によってそのシャペロンサイクルの基質となるタンパク質は異なる。上記で取り挙げきれなかった未解析の相同体もおそらく基質特異性を持つものが多いことが予測される。Hsp40 相同体の J domain は Hsp70 または Hsp70 相同体との相互作用において機能するため、その他の domain, つまりは基質結合 domain が固有機能を持つということになる。基質結合 domain は Hsp40 相同体の種類の多さと機能の多様性を語る上で重要であるといえる。

6. おわりに

ヒトゲノム計画が終了し, 遺伝子の解析が進むなかで Hsp40 の相同体は数多く同定された. 今までに Hsp40 相同体の機能やその役割も解析されてきたが, 未だに機能未知の相同体も多数存在する. Hsp40 相同体は細胞の基本的な機能維持から, 癌や神経変性疾患まで幅広く生命活動に関与している. これら機能未知の相同体の生体内での機能を解析, 検討することで分子シャペロンの生体内での新たな役割が発見される可能性がある.

引用文献

- Agashe, V. R. and Hartl, F. U. 2000. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11:15-25.
- Beck, K. E., Kay, J. G. and Braun, J. E. 2006. Rdj2, a J protein family member, interacts with cellular prion PrP(C). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346:866-871.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. and Ron, D. 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2:326-332.
- Chamberlain, L. H. and Burgoyne, R. D. 2000. Cysteine-string protein: the chaperone at the synapse. *J. Neurochem.* 74:1781-1789.
- Chevalier, M., Rhee, H., Elguindi, E. C. and Blond, S. Y. 2000. Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1. *J. Biol. Chem.* 275:19620-19627.
- Chuang, J. Z., Zhou, H., Zhu, M., Li, S. H., Li, X. J. and Sung, C. H. 2002. Characterization of a brain-enriched chaperone, MRJ, that inhibits Huntingtin aggregation and toxicity independently. *J. Biol. Chem.* 277:19831-19838.
- Dobson, C. M. 2001. The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 356:133-145.
- Doiguchi, M., Kaneko, T., Urasoko, A., Nishitani, H. and Iida, H. 2007. Identification of a heat-shock protein Hsp40, DjB1, as an acrosome- and a tail-associated component in rodent spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 74:223-232.
- Durrenberger, P. F., Filiou, M. D., Moran, L. B., Michael, G. J., Novoselov, S., Cheetham, M. E., Clark, P., Pearce, R. K. and Graeber, M. B. 2009. DnaJB6 is present in the core of Lewy bodies and is highly up-regulated in parkinsonian astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 87:238-245.
- Engert, J. C., Bérubé, P., Mercier, J., Doré, C., Lepage, P., Ge, B., Bouchard, J. P., Mathieu, J., Melançon, S. B., Schalling, M., Lander, E. S., Morgan, K., Hudson, T. J. and Richter, A. 2000. ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Québec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat. Genet.* 24:120-125.
- Girard, M. and McPherson, P. S. 2008. RME-8 regulates trafficking of the epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.* 582:961-966.
- Girard, M., Poupon, V., Blondeau, F. and McPherson, P. S. 2005. The DnaJ-domain protein RME-8 functions in endosomal trafficking. *J. Biol. Chem.* 280:40135-40143.
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M. and Hynes, N. E. 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 16:1647-1655.
- Gschwind, A., Fischer, O. M. and Ullrich, A. 2004. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4:361-370.
- Hamman, B. D., Hendershot, L. M. and Johnson, A. E. 1998. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92:747-758.
- Hartl, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-579.
- Hattori, H., Kaneda, T., Lokeshwar, B., Laszlo, A. and Ohtsuka, K. 1993. 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.
- Hendrick, J. P. and Hartl, F. U. 1995. The role of molecular chaperones in protein folding. *FASEB J.* 9:1559-1569.
- Hennessy, F., Nicoll, W. S., Zimmermann, R., Cheetham, M. E. and Blatch, G. L. 2005. Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci.* 14:1697-1709.
- Higurashi, T., Hines, J. K., Sahi, C., Aron, R. and Craig, E. A. 2008. Specificity of the J-protein Sis1 in the propagation of 3 yeast prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:16596-16601.
- Howarth, J. L., Kelly, S., Keasey, M. P., Glover, C. P., Lee, Y. B., Mitrophanous, K., Chapple, J. P., Gallo, J. M., Cheetham, M. E. and Uney, J. B. 2007. Hsp40 molecules that target to the ubiquitin-proteasome system decrease inclusion formation in models of polyglutamine disease. *Mol. Ther.* 15:1100-1105.
- Izawa, I., Nishizawa, M., Ohtakara, K., Ohtsuka, K., Inada, H. and Inagaki, M. 2000. Identification of Mrj, a DnaJ/Hsp40 family protein, as a keratin 8/18 filament regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 275:34521-345217.
- Jin, Y., Awad, W., Petrova, K. and Hendershot, L. M. 2008. Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins by BiP. *EMBO J.* 27:2873-2882.
- Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. A., Cheetham, M. E., Chen, B. and Hightower, L. E. 2009. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14:105-111.
- Kim, S. W., Chao, T. H., Xiang, R., Lo, J. F., Campbell, M. J., Fearn, C. and Lee, J. D. 2004. Tid1, the human homologue of a Drosophila tumor suppressor, reduces the malignant activity of ErbB-2 in carcinoma cells. *Cancer Res.* 64:7732-7739.
- Kelly, W. L. 1998. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem. Sci.* 23:222-227.
- Kota, P., Summers, D. W., Ren, H. Y., Cyr, D. M. and Dokholyan, N. V. 2009. Identification of a consensus motif in substrates bound by a Type I Hsp40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:11073-11078.
- Kurusu, J., Honma, A., Miyajima, H., Kondo, S., Okumura, M. and Imaizumi, K. 2003. MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ family member, suppresses cell death induced by ER stress. *Genes Cells.* 8:189-202.
- Lee, K. F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M. C. and Hauser, C. 1995. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378:394-398.
- Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z. and Derynck, R. 1995. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376:337-341.
- Minami, Y., Höhfeld, J., Ohtsuka, K. and Hartl, F. U. 1996. Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J. Biol. Chem.* 271:19617-19624.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. and Krepler, R. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24.
- Nakanishi, K., Kamiguchi, K., Torigoe, T., Nabeta, C., Hirohashi, Y., Asanuma, H., Tobioka, H., Koge, N., Harada, O., Tamura, Y., Nagano, H., Yano, S., Chiba, S., Matsumoto, H. and Sato, N. 2004. Localization and function in endoplasmic reticulum stress tolerance of ERdj3, a new member of Hsp40 family protein. *Cell Stress Chaperones* 9:253-264.
- Neckers, L. 2006. Using natural product inhibitors to validate Hsp90 as a molecular target in cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* 6:1163-1171.
- Normanno, N., Maiello, M. R. and De Luca, A. 2003. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action? *J. Cell Physiol.* 194:13-19.

- Ohtsuka, K. 1993. Cloning of a cDNA for heat-shock protein hsp40, a human homologue of bacterial DnaJ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197:235-240.
- Ohtsuka, K., Masuda, A., Nakai, A. and Nagata, K. 1990. A novel 40-kDa protein induced by heat shock and other stresses in mammalian and avian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166:642-647.
- Ohtsuka, K. and Hata, M. 2000. Mammalian HSP40/DNAJ homologs: cloning of novel cDNAs and a proposal for their classification and nomenclature. *Cell Stress Chaperones* 5:98-112.
- Parfitt, D. A., Michael, G. J., Vermeulen, E. G., Prodromou, N. V., Webb, T. R., Gallo, J. M., Cheetham, M. E., Nicoll, W. S., Blatch, G. L. and Chapple, J. P. 2009. The ataxia protein sarsin is a functional co-chaperone that protects against polyglutamine-expanded ataxin-1. *Hum. Mol. Genet.* 18:1556-1565.
- Pellecchia, M., Szyperki, T., Wall, D., Georgopoulos, C. and Wüthrich, K. 1996. NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the Escherichia coli DnaJ chaperone. *J. Mol. Biol.* 260:236-250.
- Prusiner, S. B. 1998. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95:13363-13383.
- Qian, Y. Q., Patel, D., Hartl, F. U., McColl, D. J. 1996. Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain. *J. Mol. Biol.* 260:224-235.
- Ran, Q., Wadhwa, R., Kawai, R., Kaul, S. C., Sifers, R. N., Bick, R.J., Smith, J. R. and Pereira-Smith, O. M. 2000. Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275:174-179.
- Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. *Experientia* 18:571-573.
- Ross, C. A., Wood, J. D., Schilling, G., Peter, S. M. F., Nucifora, F. C. Jr., Cooper, J. K., Sharp, A. H., Margolis, R. L. and Borchelt, D. R. 1999. Polyglutamine pathogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354:1005-1011.
- Rubin, G. M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J. M., Henikoff, S., Skupski, M. P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M. S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S. E., Chervitz, S. A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R. F., Gelbart, W. M., George, R. A., Goldstein, L. S., Gong, F., Guan, P., Harris, N. L., Hay, B. A., Hoskins, R. A., Li, J., Li, Z., Hynes, R. O., Jones, S. J., Kuehl, P. M., Lemaitre, B., Littleton, J. T., Morrison, D. K., Mungall, C., O'Farrell, P. H., Pickeral, O. K., Shue, C., Vossall, L. B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X. H. and Lewis, S. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287:2204-2215.
- Samali, A. and Orrenius, S. 1998. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 3:228-236.
- Schlesinger, M. J. 1990. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 265:12111-12114.
- Shen, Y., Meunier, L. and Hendershot, L. M. 2002. Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J. Biol. Chem.* 277:15947-15956.
- Shen, Y., and Hendershot, L. M. 2005. ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol. Biol. Cell* 16:40-50.
- Shi, Y., Mosser, D. D. and Morimoto, R. I. 1998. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 12:654-666.
- Sibilia, M., and Wagner, E. F. 1995. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269:234-238.
- Solit, D. B. and Chiosis, G. 2008. Development and

application of Hsp90 inhibitors. *Drug Discov. Today* 13:38-43.

Terada, K., Yomogida, K., Imai, T., Kiyonari, H., Takeda, N., Kadomatsu, T., Yano, M., Aizawa, S. and Mori M. 2005. A type I DnaJ homolog, DjA1, regulates androgen receptor signaling and spermatogenesis. *EMBO J.* 24:611-622.

Tissi res, A., Mitchell, H. K. and Tracy, U. M.. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84:389-398.

Tobaben, S., Thakur, P., Fern ndez-Chac n, R., S dhof, T. C., Rettig, J. and Stahl, B. 2001. A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron* 31:987-999.

Trautinger, F. 2001. Heat shock proteins in the photobiology of human skin. *J. Photochem. Photobiol. B.* 63:70-77.

Walsh, P., Burs c, D., Law, Y. C., Cyr, D. and Lithgow, T. 2004. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep.* 5:567-571.

Wandinger, S. K., Richter, K. and Buchner, J. 2008. The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 283:18473-18477.

Wirth, D., Christians, E., Li, X., Benjamin, I. J. and Gustin, P. 2003. Use of Hsf1(-/-) mice reveals an essential role for HSF1 to protect lung against cadmium-induced injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192:12-20.

Yu, M., Haslam, R. H. and Haslam, D. B. 2000. HEDJ, an Hsp40 co-chaperone localized to the endoplasmic reticulum of human cells. *J. Biol. Chem.* 275:24984-24992.

Zhang, Y., Grant, B. and Hirsh, D. 2001. RME-8, a conserved J-domain protein, is required for endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* 12:2011-2021.

Author(s) : Rika Takeuchi, Daisuke Kawashima, Minoru Soga, Kenzo Ohtsuka

Address(es) :Department of Environmental Biology, Chubu University College of Bioscience and Biotechnology.

Keywords : molecular chaperone, HSP40, Hsp40 homologue, chaperone cycle, protein quality control, neurodegenerative disease

Title : The role of Hsp40 homologues in chaperone cycle and their specific functions.