原 著

ストレスタンパク質 HSP 90 ファミリータンパク質の構造と発現

呂 井 利 奈

岩手医科大学歯学部口腔生化学講座（主任：佐藤詔子教授）

〔受付：平成 10 年 5 月 25 日，受理：平成 10 年 8 月 3 日〕

Structures and expression of HSP 90 family proteins

Rina Roi

Department of Biochemistry, Iwate Medical University School of Dentistry

(Chief : Prof. Nobuko Sato)

1-3-27 Chuodori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

[Received on May 25, 1998 ; Accepted on August 3, 1998]

Key words : stress proteins/90-kDa heat shock protein (HSP 90)/94-kDa glucose-regulated protein (GRP 94)/MC 3 T 3-E 1/stress induction

Abstract : The 90-kDa heat shock protein (HSP 90) is one of the major stress proteins in eukaryotic cells. There are at least two HSP 90 genes ; and two HSP 90 isoform proteins, HSP 90 α and HSP 90 β , are expressed by them. The third member of HSP 90 family proteins, the 94-kDa glucose-regulated protein (GRP 94), is expressed in the endoplasmic reticulum. The purpose of the present study was to investigate the structures of HSP 90-family proteins and their expression in osteoblastic cells (MC 3 T 3-E 1) and in mammalian tissues. All three HSP 90-family proteins of human origin were expressed in a bacterial expression system and were purified to near homogeneity. Two kinds of polyclonal antibodies against human GRP 94 (hGRP 94) were obtained by immunization of recombinant protein and a synthetic peptide (residues 336-349) of hGRP 94 as antigens. The results of limited proteolysis of recombinant hGRP 94 with trypsin suggested three domain structures, similar to those of HSP 90 α . The expression level of HSP 90 isoforms in various rat tissues and in MC 3 T 3-E 1 cells under nonstress conditions revealed the predominance of HSP 90 β in most tissues (including oral tissues) except for the brain, testis, and reticulocytes. The expression of HSP 90 α in MC 3 T 3-E 1 cells was induced under stress conditions such as exposure to arsenate, whereas HSP 90 β and GRP 94 were not significantly increased.

These findings suggest that the three HSP 90 family proteins possess similar domain structures and that HSP 90 β is the major HSP 90 isoform expressed constitutively in the cell, whereas HSP 90 α is an inducible form.

抄録：真核細胞における主要なストレスタンパク質である HSP 90 ファミリータンパク質には、異なる遺伝子にコードされる 90-kDa heat shock protein α isoform (HSP 90 α)、 β isoform (HSP 90 β)、および小胞体に存在する 94-kDa glucose-regulated protein (GRP 94) がある。本研究では、マウス骨芽細胞 (MC 3 T 3-E 1)、ラット全身および口腔組織における HSP 90 の構造や発現について検討した。これら 3 種類のヒト HSP 90 ファミリータンパク質をまず大腸菌発現システムを用いて発現、精製した。ヒト GRP 94 についてはそのポリクローナ

ル抗体を作製した。限定トリプシン分解により GRP 94 のドメイン構造を解析した結果、HSP 90 α と同様 3 つのドメインからなることが示唆された。さらに、HSP 90 α ならびに HSP 90 β のそれぞれに特異的なモノクローナル抗体を用いて、非ストレス時のラット臓器における両 HSP 90 アイソフォームの発現量の変化を検索した。その結果、口腔組織を含め多くの臓器では HSP 90 α よりも HSP 90 β の発現が亢進しており、一方、精巣、脳、赤血球では HSP 90 α の発現が亢進していた。MC 3 T 3-E 1 細胞にヒ酸ナトリウムによるストレスを負荷した場合 HSP 90 α の発現量が増加したが、HSP 90 β および GRP 94 の発現量は変化しなかった。

以上の結果から HSP 90 ファミリータンパク質は 3 つのドメイン構造を有することが明らかになった。ラットのほとんどの組織では HSP 90 α よりも HSP 90 β の発現が優位であり、一方 HSP 90 α はストレス誘導型であった。

緒 言

生物は外部環境の変化に対応する応答反応を示す。すべての外部環境の変化は、生物にとってある種のストレスとも考えられる。熱ショックタンパク質 (heat shock proteins: HSPs) は生物が生育温度より高温にさらされた際に、特異的に発現量が増大する一群のタンパク質としてみいだされたが¹⁾、その後さまざまなストレス、例えばエタノール、ヒ素^{2,3)}などの化学的ストレス、X 線、紫外線などの物理的ストレス、また個体レベルでは虚血、拘束⁴⁾などのストレスによっても HSPs が誘導されることが明らかになり、現在ではストレスタンパク質とも呼ばれている⁵⁾。

HSPs はその遺伝子配列と分子サイズの類似性により、いくつかのファミリーに分類されている。代表的なものとして HSP 90 (90 kDa)、HSP 70 (70 kDa)、HSP 60 (60 kDa)、HSP 47 (47 kDa)、HSP 40 (40 kDa)、低分子量 HSP (20-30 kDa) などがある。さらに、多くのストレスタンパク質は非ストレス時でもその発現が認められ、しかも HSP 70 や HSP 90 などは非常に大量に存在することも明らかになってきた。現在ではストレスタンパク質は細胞をストレスから守るだけでなく、非ストレス時にも細胞の恒常性を維持するうえで基本的かつ重要な役割を果たしていると認識されている。その機能は分子シャペロン^{6,7)}という言葉で表される。分子シャペロンとは一般に、自らは構造体の最終的な構成要素とはならないがタンパク質の折りたたみや会合を助け、あるいは凝集を抑止する因子をいう。分子シャペロンは通常翻訳されつつあるタンパク質に結合し、その分子が目的の部位 (核、ミトコンドリア、細胞膜、細胞外) に到達するまで完全に折りたたまれない過渡的な状態を保つための必須因子である。一方ストレス時、例えば熱ショックやエタノール、重金属にさらされた場合には細胞内のタンパク質は変性や凝集をおこしそれらは強い細胞毒性を示す。しかしあらかじめ軽度の非致死性の熱ショック

などを与えて十分量の HSPs を誘導した場合には細胞死を免れることができる。このように現在、HSPs の役割はある程度理解されている。しかしながら多くのファミリーからなる HSPs の各ファミリー間の機能の違い、また各ファミリー内のアイソフォーム間の違いなどについては不明な点が多い。また HSP ファミリータンパク質と類似の遺伝子配列を有するがストレス時に全くあるいはごくわずかしき発現が亢進しない分子もみいだされ、このような分子は heat shock cognate proteins (例えば HSC 70)⁸⁾と呼ばれている。それに対しストレスタンパク質でも真にストレス誘導型のアイソフォームが狭義の HSP (例えば HSP 70) といわれる。

HSP 90 は多くの機能タンパク質と複合体を形成し、その高次構造形成と機能保持に働いている分子シャペロンである。そのパートナーとしてはステロイドレセプター、ダイオキシシンレセプター、セリン/スレオニンキナーゼ、チロシンキナーゼ等が知られているが⁹⁻¹¹⁾、これらは結合パートナーのごく一部と考えられている。HSP 90 には遺伝子配列の異なる 2 つのアイソフォーム HSP 90 α 、ならびに HSP 90 β が存在し、ヒトの場合アミノ酸配列は 85% 相同である^{12,13)}。また種間でも非常によく保存されており、ヒトと大腸菌 (HtpG) でも 37% 相同である。出芽酵母では 2 つの HSP 90 遺伝子を破壊すると高温では増殖できないが、どちらか一方のヒト HSP 90 アイソフォームを発現させると生存可能である。しかし大腸菌では酵母の場合と異なり必須の遺伝子ではない¹⁴⁾。またヒト小胞体には、HSP 90 α や HSP 90 β と 44% の相同性を有する HSP 90 ファミリータンパク質が存在する。このタンパク質はグルコース飢餓状態でその発現が誘導されることから 94-kDa glucose-regulated protein (GRP 94) とよばれている。

細胞にとってのストレス刺激には、環境ストレス (高温、放射線、薬物など)、病変的变化 (発熱、外傷、炎症など)、生理的变化 (細胞周期、発生、分化など) などがある¹⁵⁾。環境ストレスの 1 つであるメカニカルストレスは i) 物理的力、ii) 圧力、iii) 熱、光、iv) 電界、磁

界の4つに分類されている。物理的力には張力や圧縮があり、これは咀嚼により歯根膜や顎骨に負荷される機械的外力に最も近い¹⁶⁾。ヒト歯根膜細胞にメカニカルストレスを負荷すると弱いながら HSP 47, HSP 60, HSP 70 が発現誘導されるという報告がある¹⁷⁾。

歯原性上皮性腫瘍のエナメル上皮腫で退行変性を伴う嚢胞型では、HSP 70 の発現が顕著で増殖活性の著しい濾胞型・叢状型では HSP 70 の発現が低い¹⁸⁾。また若年性歯周炎の原因菌の *Actinobacillus actinomycetemcomitans* が産生する surface-associated material は、骨溶解活性をもち急速な歯槽骨破壊に関係しているタンパク質で、真核細胞 HSP 60 ホモログである大腸菌 GroEL と相同の分子であった¹⁹⁾。この報告は、細菌の HSPs が積極的に病変の進行や病因そのものにかかわっている可能性を示唆している。このようにヒト口腔組織の HSPs は一種のストレスといえる種々の病変や生理的刺激によってその発現が変化する。また細菌の HSPs は歯周病を亢進させる可能性があることが明らかになってきた。歯科領域ではさまざまな金属が臨床で用いられているが、HSPs との関係についての報告は極めて少ない。

本研究では、哺乳類の組織や細胞におけるストレス応答の機構を明らかにすることを目的とし、HSP 70 とともに哺乳類の代表的な HSP である HSP 90 ファミリータンパク質のメンバーである HSP 90 α , HSP 90 β , および GRP 94 の構造や発現について検討した。

材料と方法

1. 実験動物

Wistar 系雄ラット（体重 280~300 g, 日本クレア）に固形飼料を与え、自由に飲水させ飼育し実験に供した。抗体作製実験には BALB/c 系雌マウスと雌ウサギ（体重 3 kg）を用いた。

2. 試薬

Minimum essential medium alpha medium (α -MEM), antibiotic-antimycotic, trypsin (0.25% 溶液), nitroblue tetrazolium chloride (NBT) および 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) は Gibco BRL (Rockville, MD, U.S.A.) より、phosphate-buffered saline は日水製薬より購入した。Fetal bovine serum は Biocell (Rancho Dominguez, U.S.A.) より購入した。アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体は Bio-Rad (Richmond, CA, U.S.A.) より、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgM 抗体およびアルカリ

ホスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体は、EY Laboratories Inc. (San Mateo, CA, U.S.A.) より購入した。アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ラット IgG+M (H+L) は、American Qualex (San Clemente, CA, U.S.A.) より購入した。Blue Phos microwell phosphatase solution A, B は Kirkegaard Perry Laboratories (Maryland, U.S.A.) より購入した。制限酵素 *Bam*HI, *Sna*BI, *Sal*I は New England Biolabs (Beverly, MA, U.S.A.) より、*Taq* polymerase は Sawady (Tokyo, Japan) より購入した。低分子量マーカーは Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) より、Rainbow marker は Amersham (Buckinghamshire, England) より購入した。Trypsin (5200 USP units/mg protein) は Sigma より購入した。その他の試薬はすべて特級を用いた。

3. 緩衝液

実験に使用した緩衝液組成を以下に示す。Buffer A, 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 50 mM NaCl; Buffer B, 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8; Buffer C, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20; Buffer D, 25 mM Tris-192 mM glycine pH 8.3, 10% methanol; Buffer E, 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂; Buffer F, 300 mM Tris-HCl pH 6.8, 3% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol; Buffer G, 20 mM Tris-HCl pH 7.3, 1 mM EDTA, 130 mM NaCl, 0.05% NaN₃.

4. 細胞培養

1) 細胞と培養方法

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 (MC 3 T 3-E 1) を培養し実験に供した。この細胞は新生児 C 57 BL/6 マウス頭蓋冠から樹立された細胞株であり²⁰⁾、石灰化の機構を研究するうえで非常に有用な細胞である。MC 3 T 3-E 1 細胞は 9 cm dish (Nunc) に 1.6×10^6 個の細胞を播種した。細胞維持のために α -MEM に 10% fetal bovine serum, antibiotic-antimycotic (100 units/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin, 0.25 μ g/ml amphotericin B), NaHCO₃ を添加した培養液を用いた。細胞は 37°C, 5% CO₂ 環境下で培養した。

2) MC 3 T 3-E 1 細胞のストレス処理

上記方法で培養した MC 3 T 3-E 1 細胞は、播種後 2 日目にヒ酸ナトリウムストレス、低酸素ストレス、あるいはメカニカルストレスを負荷された。ヒ酸ナトリウム

は 225 μ M と 450 μ M の濃度で添加し、4 時間培養した。低酸素ストレス条件の実験では 37°C、5% CO₂、2% O₂ 環境下で 72 時間培養した。メカニカルストレスの実験では、細胞は type I collagen 処理 6-well plate (FLEX I, Flexcell Corp., McKESPORT, PA, U.S.A.) に 0.5 × 10⁵ 個の細胞を播種し、Flexercell strain unit を用いて培養 2 日目より 15% の機械的伸展力を 24 時間負荷した。

3) 細胞抽出液の調製

回収した細胞ペレットを leupeptin, soybean trypsin inhibitor (各 25 μ g/ml) および 1% Triton X 100 を添加した Buffer A (0.5 ml/9 cm dish) に懸濁し、超音波破碎後、16,000 × g で 30 分遠心した。得られた上清を細胞質画分とした。本条件では細胞質タンパクだけでなく、小胞体等細胞内小器官のタンパク質も可溶化されている。

5. モノクローナル抗体 (mAbs)

抗 HSP 90 α 特異的 mAb として、K 41007 と K 41009 を、抗 HSP 90 β 特異的 mAb として、K 3725 B を用いた。これらの mAbs は特殊免疫研究所の岩成宏子氏、山下尚彦氏との共同研究によって作製し、その基本的性質についてはすでに報告している^{21,22)}。抗 HSP 70 mAb (SPA-815) および抗 HSC 70 mAb (SPA-815) は Stressgen Biotechnologies Corp. (Victoria, B.C., Canada) より購入した。

6. ヒト GRP 94 (hGRP 94) および HSP 90 発現ベクターの作製

HeLa S 3 cell の 5'-stretch cDNA フェージライブラリー (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) からプラークハイブリダイゼーション法により、hGRP 94 の全長 (GenBank accession no. M 24747)²³⁾ をコードする cDNA (永井と根本、未発表) をクローニングした。この cDNA を polymerase chain reaction のテンプレートとして hGRP 94 cDNA 断片を増幅した。hGRP 94 遺伝子増幅には 5' プライマー-5'-GTCGATCCGACGATGAAGTTGATG-3' (ベース Nos. 174-189 に BamHI 部位を付加)、および 3' プライマー-5'-CACATTCCCTCTCCACAC-3' (2560-2543) を使用した。5' プライマーには制限酵素 BamHI 部位 (下線部) を導入した。反応液 (50 μ l) は、テンプレート DNA、各 200 nM の 5'-および 3'-プライマー、200 μ M dNTP、2.5 units Taq polymerase、50 μ g bovine albumin、10 mM dithiothreitol、10 mM Tris-HCl (pH 8.8)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂ を含んでいる。最初に 95°C で 2 分の変性、以後 95°C で 30

秒の変性、44°C で 1 分のアニーリング、72°C で 1 分 30 秒の伸長というステップを 35 サイクルくり返した。最後に 72°C 7 分追加伸長反応を行った。増幅した hGRP 94 断片は QIAEX II (Qiagen, Hilden, Germany) にて精製した。5' プライマーと hGRP 94 の 3' 側に内在する BamHI 部位で消化した後、pQE-9 ベクター (Qiagen) の BamHI 部位に挿入した。作製したプラスミドは pQh-GRP 94 と名づけた。大腸菌 Y 1090 [pREP 4] を上記のプラスミドにてトランスフォームし、挿入したフラグメントを含むプラスミドを有するクローンを得た。

ヒト HSP 90 β (hHSP 90 β) cDNA は Dr. Hickman (Washington University) より供与を受けた。この cDNA を SnaBI と SalI で二重切断し、得られた断片をプラスミド pQE 9 (Qiagen, Hilden, Germany) の、DNA ポリメラーゼのクレノウ断片でフィルインして平滑化した BamHI 部位と、SalI 部位の間に挿入した。続いて大腸菌 Y 1090 [pREP 4] を作成したプラスミド pQh-HSP 90 β でトランスフォームした。この発現プラスミドは 5' 側を SnaBI で切断したため、hHSP 90 β の全長 724 残基に加えて、hHSP 90 β cDNA の配列に由来した 7 残基のアミノ酸残基を N 末側に含有する。ヒト HSP 90 α (hHSP 90 α) 発現ベクターの作製については以前に報告した²⁴⁾。

7. hHSP 90 α , hHSP 90 β および hGRP 94 タンパクの発現と精製

hGRP 94 に関しては pQhGRP 94/Y 1090 [pREP 4] を 50 μ g/ml アンピシリン、25 μ g/ml カナマイシンを含む 300 ml の LB 培養液で 37°C にて一晚培養した。翌日さらに 0.2 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactoside を含む 600 ml の同培養液を加え、さらに 30°C で 4~5 時間培養して、リコンビナントタンパク質の発現を誘導した。この培養液を 5,000 × g で 10 分間遠心して集菌した。この菌ペレットを leupeptin, antipain, soybean trypsin inhibitor, pepstatin (各 20 μ g/ml) を含む Buffer B 30 ml に懸濁した。さらに 0.5 mg/ml lysozyme を加え、0°C で 20 分インキュベートした。この懸濁液を超音波破碎した後 23,000 × g で 20 分間遠心しリコンビナントタンパク質を含むライゼートを得た。リコンビナントタンパク質を Talon metal affinity resin (Clontech) を用いて精製した。hHSP 90 α および hHSP 90 β についても同様に発現精製した²⁴⁾。

8. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

精製タンパク質 (0.5 μ g) を 96 ウェルマイクロプレート (Maxisorp, Nunc) の各ウェルに吸着させた。5% (w/v) skim milk (Difco Lab) を含む Buffer C でブロッキング後、各ウェルを Buffer C にて洗浄した。ついで 1 次抗体である mAb または希釈抗血清を添加し、室温にて 6 時間インキュベーションした。さらに Buffer C にて洗浄後、2 次抗体としてアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG、抗マウス IgM あるいは抗ウサギ抗体をそれぞれ 0.1 ml (0.2 μ g/ml) 添加して室温で 2 時間インキュベーションした。過剰の抗体を洗浄により除去した後、microwell phosphatase solution A と B を添加し、30°C でインキュベーションした。発色後に、600 nm の吸光度を測定した。

9. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) およびイムノブロット

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) は Laemmli の方法²⁵⁾に従って行った。ポリアクリルアミドゲルの濃度は主に 10% とし、一部の実験については 7.5, 12.5, 15% (w/v) を使用した。低分子量マーカーあるいは rainbow marker を標準として用いた。泳動後の PAGE ゲル中のタンパク質は Coomassie Brilliant Blue で染色した。イムノブロットの際は Buffer D 中で 10 V, 175 mA, 2 時間の電気泳動転写を行い、ゲル中のタンパク質を polyvinylidene difluoride 膜 (Millipore, U.S.A.) に転写した。膜は ELISA の項で記述したように 1 次、2 次抗体で処理した後に発色基質 NBT/BCIP を添加した Buffer E 中にて発色させた。

10. タンパク質濃度の定量

ウシ血清アルブミンを標準とし、Bradford の方法²⁶⁾によりタンパク質濃度を測定した。測定には microplate reader MPR-A 4 i II (TOSOH, Japan) を用いた。

結 果

1. HSP 90 ファミリータンパク質の精製

hHSP 90 α , hHSP 90 β および hGRP 94 をリコンビナントタンパク質として大腸菌で発現した²⁴⁾。それぞれのタンパク質は、N 末端側に 6 残基のヒスチジン残基を有するため、Talon affinity resin を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。精製タンパク質を SDS-PAGE で分析した結果、hHSP 90 α と

Fig. 1 SDS-PAGE of purified hHSP 90 α , hHSP 90 β , and hGRP 94.

Purified recombinant proteins were electrophoresed by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. A polyacrylamide concentration of 12.5% was used. Lane 1, hHSP 90 α ; lane 2, hHSP 90 β ; lane 3, hGRP 94.

hHSP 90 β は 90 kDa の単一バンドとして得られた (Fig. 1, lanes 1, 2)。一方 hGRP 94 については 100 kDa の主要バンドと、53 kDa のマイナーバンドが検出された (Fig. 1, lane 3)。cDNA の配列²³⁾から予想した分子量 (93.8 kDa) や、後述するように細胞で発現している GRP 94 との比較からみて 100 kDa のバンドが全長分子と考えられた。53 kDa の分子については膜に転写後バンド部分を切り出し N 末端のアミノ酸配列決定を行った。その結果メチオニン 336 の N 末端側を欠く hGRP 94 分子であることが判明した (Table 1)。すでに Nemoto ら²⁴⁾が報告しているように小麦 GRP 94 を含め HSP 90 ファミリータンパク質は C 末端側にダイマー形成領域が存在する。そのため、この 53 kDa 分子も C 末端側の領域で 100 kDa の hGRP 94 全長分子とダイマーを形成するため、それ自体は N 末端部分の 6 残基のヒスチジン残基を欠いているにもかかわらず、アフィニティークロマトグラフィーによって精製されたものと思われた。したがってこの 53 kDa ペプチドは、合成後に大腸菌の内在性のプロテアーゼによる切断を受けたか、あるいはメチオニン 336 から翻訳された分子と考えられた。しかしメチオニン 336 は本発現ベクターの本来のスタートの位置からかなり離れていることを考えると、プロテオリシスの可能性が高いと思われる。同様の C 末領域の切断は hHSP 90 α でもみられている²⁷⁾。すなわち Fig. 1, lane 1

Table 1 N-terminal sequences of the 53-kDa peptide and tryptic peptides

Peptide (kDa)	Detected amino acids	Corresponding sequence
53	MNDIKPIWQ	L ↓ M ₃₃₆ MNDIKPIWQ
tryptic peptide		
85	MRGSHH	m ₋₁₂ rgshh ₋₇
35	TVWDWELMNDIKPIWQR	K ↓ T ₃₂₉ TVWDWELMNDIKPIWQR
	MNDIKPIWQRPSKEVEE	L ↓ M ₃₃₆ MNDIKPIWQRPSKEVEE

Amino acid residues (m₋₁₂rgshh₋₇) written in small letters in the last column are derived from the sequence of the expression vector. Arrows indicate proteolytic cleavage sites.

Fig. 2 Concentration-dependent binding of anti-hGRP 94 antibodies to HSP 90-family proteins.

One μ g of purified hHSP 90 α , hHSP 90 β , or hGRP 94 was loaded into each well of a 96-well titer plate, and ELISA was carried out with anti-recombinant hGRP 94 antibodies (a) or anti-hGRP 94 peptide antibodies (b) at various dilutions. Binding to hHSP 90 α (○), hHSP 90 β (●), and hGRP 94 (□) is shown.

の精製 HSP 90 α をさらに大量に SDS-PAGE に添加すると 20 kDa のペプチドが検出されるが、この N 末端は hHSP 90 α のイソロイシン-574 であった²⁷⁾。したがって hGRP 94 の精製標品は 53 kDa のバンドを含んではいるが、hGRP 94 分子の一部であり他のタンパクの混在はほとんどないと考えられた。

2. 抗 hGRP 94 ポリクローナル抗体の作製

抗 hGRP 94 抗体を作製するために 2 種類の抗原を用いた。第一に上記の精製リコンビナント hGRP 94 を抗原としたウサギポリクローナル抗体を作製した。この精製

標品には 100 kDa の全長分子以外に 53 kDa の断片が含まれるが、これも hGRP 94 分子の一部であるため特に抗原としては問題ないと考えられた。作製した抗 hGRP 94 抗体の性質を検討するために、精製 hHSP 90 α 、hHSP 90 β 、および hGRP 94 を用いて ELISA を行った (Fig. 2 a)。本抗体は抗原である hGRP 94 と最も強く反応したが、抗体が高濃度になると hHSP 90 α や hHSP 90 β とも結合した。このとき吸光度 0.5 となる抗血清濃度の比較から、本 hGRP 94 抗体の hHSP 90 との交差性は 6% と見積もられた。本抗血清を用いてイムノプロットを行ったところ、精製 hGRP 94 の 100 kDa お

Fig. 3 Immunoblotting analysis of hGRP 94.

Purified recombinant proteins were electrophoresed by SDS-PAGE. Separated proteins were immunoblotted with (a) anti-recombinant hGRP 94 (1/500 dilution) or (b) anti-peptide polyclonal antibodies (1/500 dilution). Lane 1, hHSP 90 α ; lane 2, hHSP 90 β ; lane 3, hGRP 94; lane 4, MC 3 T 3-E 1 cytosol.

よび 53 kDa 分子と強く反応した (Fig. 3 a, lane 3) が, hHSP 90 α や hHSP 90 β とは結合しなかった (Fig. 3 a, lanes 1, 2). さらに MC 3 T 3-E 1 細胞抽出液でイムノブロットを行うと 100 kDa のバンドが得られた (Fig. 3 a, lane 4).

第二に hGRP 94 の配列の一部 MNDIKPIWQRPS-KE (336-349 残基) をペプチド合成してこれを抗原とした抗体を作製した。特にこの領域を選択したのは, HSP 90 α の免疫原性テストで最も強い抗原性を有する部位であることが明らかにされているからである²⁷⁾。この配列部分は hHSP 90 α と 43% の相同性を示す部位であり (上記配列の下線部分), 特にアスパラギン 337-アルギニン 345 の 9 残基についてはそのうちの 6 残基が同一である。作製した抗ペプチド抗体を用いて ELISA を行った結果, 合成ペプチドとは 182,500 倍希釈した状態でも結合を示した (吸光度 0.2)。また本ペプチド抗体は精製 hGRP 94 とも反応し (Fig. 2 b), しかも抗リコンビナント hGRP 94 抗体よりも hGRP 94 への強い結合性を示した。さらに本抗体は hGRP 94 だけでなく hHSP 90 α や hHSP 90 β とも結合した。すなわち, 低濃度 (1/2,700 以上の希釈度) では hHSP 90 への結合は hGRP 94 への結合のほぼ 1/3 程度であり, 高濃度 (1/900 以下の希釈度) では hGRP 94 と同等あるいはそれ以上の結合性を示

した。本抗ペプチド抗体を用いてイムノブロットを行うと, ELISA の結果と一致して 100 kDa の hGRP 94, 90 kDa の hHSP 90 α , hHSP 90 β が共に検出された (Fig. 3 b, lanes 1-3)。hGRP 94 の精製標品に含まれる 53 kDa の分子が強く染色されたが, 53 kDa の分子が抗原ペプチド部分のメチオニン 336 よりはじまるのでこの結果は予想されたところである。本抗体で MC 3 T 3-E 1 細胞抽出液のイムノブロットを行ったところ, 100 kDa と 90 kDa の位置にバンドが検出され (Fig. 3 b, lane 4), それぞれ内在性の GRP 94 と HSP 90 と考えられた。また弱くではあるが 53 kDa の位置にもバンドが検出された。これらの結果を上述の抗リコンビナント hGRP 94 抗体の結果と考え合わせてみると, 抗ペプチド抗体は hHSP 90 α や hHSP 90 β とも反応してしまうものの HSP 90 ファミリータンパク質以外のタンパク質とは全く反応しないことが判明した。

3. hGRP 94 のドメイン構造の解析

hGRP 94 のドメイン構造解析のため, トリプシンの限定分解を行ったところ新たに 22, 35, 85 kDa のペプチド断片が得られた (Fig. 4 a)。これらのペプチドの由来を明らかにするために N 末端アミノ酸配列の決定を行った (Table 1)。低濃度のトリプシンで一過性に現れる 85

Fig. 4 Limited proteolysis of hGRP 94.

(a) Purified hGRP 94 (30 μ g) was incubated at 30°C without trypsin (lane 1) or with 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, or 80 ng of trypsin (lanes 2-8). After 6 h, the samples were denatured, and one-sixth of the sample (5 μ g) was analyzed by SDS-PAGE. A polyacrylamide concentration of 15% was used. Separated proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue. (b) The proteolytic cleavage sites of hGRP 94 were compared with the domain structures (A-C) of human HSP 90 α proposed by Nemoto *et al.*²⁷⁾ Amino acid numbers written under the columns represent real ones and those written above the columns are ones increased to make maximum homology between hGRP 94 and hHSP 90 α . A hatched area shows the amino acids 329-336 used as the antigen for production of anti-peptide antibodies. Dotted areas represent immunogenic sites of hHSP 90 α . An underline indicates a region susceptible to trypsin²⁷⁾.

kDa ペプチドの N 末端アミノ酸配列は全長分子と同一であった。すなわち 85 kDa ペプチドは全長分子の C 末端から約 15 kDa のペプチドを遊離した分子であった。一方 35 kDa 分子はスレオニン 329 とメチオニン 336 から始まる 2 種類のペプチドの混合物であった。このうちメチオニン 336 で始まるペプチドの N 末端は精製標品中に含まれる 53 kDa ペプチドと同一である。ロイシン 335-メチオニン 336 間はトリプシンでは分解されないペプチド結合なので、このペプチドは精製標品中の 53 kDa ペプチドの C 末端側が切断されて生じたものであろう。興味深いことにこれら 2 つの 35 kDa ペプチドの N 末端の位置は 6 残基しか離れていない。このことは、一方は大腸菌内で分解され、もう一方はトリプシンで分解されるという違いはあるものの、この付近がプロテアーゼ感受性部位であることを示唆している。また 53 kDa から 35 kDa への分子量の低下からみて、明らかに C 末端側でも 18 kDa 程度の切断を生じていると考えられた。22 kDa のバンドについては N 末端アミノ酸配列の分析を試みたものの、その量が少ないため明確な結果は得られなかった。

以上の結果からその断片部位を HSP 90 α の切断位置と比較して Fig. 4 b に示した。C 末端側から 15 kDa-20 kDa N 末端側よりの領域と、N 末端側のロイシン 328-

メチオニン 336 残基間が hGRP 94 のトリプシン感受性部位であることから、本タンパク質が 3 つのドメイン構造よりなることが示唆された。このことはイヌ GRP 94 が 3 つのドメイン構造からなるという電子顕微鏡観察の結果²⁸⁾とも一致する。

4. HSP 90 ファミリータンパク質の分子形態の検討

MC 3 T 3-E 1 細胞で発現している 3 種の HSP 90 ファミリータンパク質の分子形態について検討した。分子量を推定するために細胞抽出物の HPLC によるゲルクロマトグラフィーを行い、得られたフラクションについて ELISA ならびにイムノプロットを組み合わせ、各タンパクの溶出位置を決定した (Fig. 5)。各フラクションを抗ペプチド抗体によるイムノプロットにより検討したところ、90 kDa と 100 kDa の位置にバンドが検出された (Fig. 5 b)。本抗体は GRP 94 のみならず HSP 90 とも反応するため、90 kDa と 100 kDa のバンドはそれぞれ HSP 90 と GRP 94 であると考えられた。また 100 kDa のバンドとして、フラクション 41 が最も強く染色されていることから GRP 94 の溶出ピークであると考えられた。当教室ではすでに HSP 90 α と HSP 90 β それぞれに特異的な mAb を作製している^{21,22)}。そこでこれらの HSP 90 アイソフォーム α と β それぞれに特

Fig. 5 Size-exclusion HPLC analysis of HSP 90-family member proteins of MC 3 T 3-E 1 cells.

(a) MC 3 T 3-E 1 cytosol was subjected to size-exclusion HPLC with a TSK G 4000 SWXL column equilibrated with Buffer F. Vo, void volume; Thy, thyroglobulin (669 kDa); Fer, ferritin (440 kDa); Cat, catalase (232 kDa); BSA, bovine serum albumin (66 kDa). The migration positions of HSP 90 α (○) and HSP 90 β (●) were determined by ELISA with the isoform-specific mAbs (K 41009 and K 3725 B respectively i.e., K 41009 for α and K 3725 B for β). (b) Separated proteins (fraction numbers 33-53) were immunoblotted with anti-hGRP 94 peptide polyclonal antibodies (1/500 dilution). A polyacrylamide concentration of 7.5% was used. Lane C, the cytosol of MC 3 T 3-E 1 cells. M, marker proteins.

異的な mAb, K 41009 と K 3725 B を用いて ELISA 分析を行いその溶出位置を調べた。その結果, HSP 90 α はフラクション 41 に HSP 90 β はフラクション 42 に溶出された (Fig. 5 a)。マーカータンパク質の溶出位置との比較から HSP 90 α , HSP 90 β , GRP 94 の分子量はそれぞれ 450 kDa, 390 kDa, 450 kDa と見積もられた。このことは MC 3 T 3-E 1 細胞で発現している 3 種の HSP 90 ファミリータンパク質はすべてオリゴマー構造をとって

いることを示唆している。

5. ラットの臓器および MC 3 T 3-E 1 細胞における HSP 90 アイソフォームの発現

哺乳類の組織細胞の細胞質には 2 種類の HSP 90 アイソフォーム, HSP 90 α と HSP 90 β が発現しているが, 両者の発現量に差異があるのかどうかは不明である。そこでアイソフォーム特異的 mAb を用いて, 組織における各 HSP 90 アイソフォームの発現量について検討した。ラット各臓器の細胞質タンパク質を電気泳動シムノプロットを行ったところ, HSP 90 α の発現レベルは組織によって異なっていた (Fig. 6 a)。特に脳, 精巣, 赤血球で多く (Fig. 6 a, lanes 7, 10, 13), 他の組織では少ないかあるいはほとんど検出されなかった。しかしながら, 発現の低い臓器, 例えば顎下腺でも非常に大量のタンパク量を電気泳動してシムノプロットを行うと 90 kDa のバンドが検出された (データには示さない)。一方, HSP 90 β はどの臓器でも 90 kDa の明瞭なバンドとして検出された (Fig. 6 b)。しかし顎下腺で少なく (Fig. 6 b, lane 9), 脳や心臓でより多く (Fig. 6 b, lanes 7, 8) 発現していた。さらにこの差異を定量化するために精製したりコンビナント HSP 90 α および HSP 90 β を標準として用い, 染色程度を画像解析装置 NIH image 1.57 で分析した。肝臓では HSP 90 β の発現量が HSP 90 α に比較し 30 倍であった (Table 2)。口腔組織においても同様の測定を行ったところ, 耳下腺では HSP 90 β の発現量が HSP 90 α の少なくとも 41 倍以上, 舌下腺では 9.5 倍以上, 咬筋では 30 倍であった。顎下腺でも HSP 90 β の方がより多く発現していたが (Fig. 6 b, lane 9), HSP 90 α の発現が非常に微量 (Fig. 6 a, lane 9) のため両者の比は決定できなかった。

6. ストレス条件での HSP 90 および HSP 70 ファミリータンパク質の発現

MC 3 T 3-E 1 細胞にヒ酸ナトリウムによるストレス, 低酸素によるストレス, メカニカルストレスを加えた場合に, すべてのストレス条件下で HSP 90 α の発現が誘導された。このうち 450 μ M ヒ酸ナトリウム処理で 2.6 倍と最も HSP 90 α の発現量が増大した (Fig. 7)。対照群と比較して低酸素条件では 1.5 倍, メカニカルストレスでは 1.7 倍の増加であった (データには示さない)。ヒ酸ナトリウム処理では, HSP 90 β および GRP 94 の発現量には変化がなかった (データには示さない)。比較のために細胞質に発現する 2 種類の HSP 70 ファミリータンパク質である HSP 70 と HSC 70 についてヒ酸ナトリ

Fig. 6 Immunoblotting analysis of HSP 90 isoforms of rat tissues.

The cytosolic proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting with K 41007 (a) and K 3725 B (b). In a and b, 90 and 45 μ g of cytosol proteins, respectively, were loaded in the lanes. Lane 1, liver; lane 2, stomach; lane 3, intestine; lane 4, kidney; lane 5, masticatory muscle; lane 6, lung; lane 7, brain; lane 8, heart; lane 9, submandibular gland; lane 10, testis; lane 11, epididymis; lane 12, prostate; lane 13, reticulocyte (30-60% ammonium sulfate-precipitation fraction); lane 14, MC 3 T 3-E 1 cytosol.

Table 2 Analysis of HSP 90 isoforms of rat liver, oral tissues, and MC 3 T 3-E 1 cells

	HSP 90 α /cytosol proteins (%)	HSP 90 β /cytosol proteins (%)	HSP 90 β /HSP 90 α
Liver	0.01	0.31	31
Submandibular gland	n.d.	0.24	—
Parotid gland	≤ 0.02	0.83	≥ 41.5
Sublingual gland	≤ 0.02	0.19	≥ 9.5
Masticatory muscle	≤ 0.04	1.2	30
MC 3 T 3-E 1	≤ 0.01	0.6	≥ 60

Electrophoretically separated HSP 90 proteins were immunoblotted with an anti-HSP 90 α mAb (K 41007) or an anti-HSP 90 β mAb (K 3725 B). The 90-kDa band intensities were quantified for use of NIH image 1.57. n.d., not detected.

ウムストレス条件での誘導性を検討したところ、両者とも濃度依存性の誘導がみられた。450 μ M ヒ酸ナトリウムの条件での HSP 70 と HSC 70 はそれぞれコントロールの 6.5 倍と 1.7 倍であり、特に HSP 70 の誘導は HSP 90 α や HSC 70 に比較して顕著であった。HSP 70 ファミリータンパク質では、HSC 70 よりも HSP 70 の方が強く誘導されることが知られているが、本条件でも

同様の結果が得られた。

考 察

本研究では、HSP 90 ファミリータンパク質、hHSP 90 α 、hHSP 90 β 、hGRP 94 を発現、精製した。このうち hHSP 90 α と hHSP 90 β は PAGE 分析で単一バンド

Fig. 7 Immunoblotting analysis of HSP 90 and HSP 70 isoforms in MC 3 T 3-E 1 cells.

MC 3 T 3-E 1 cells were incubated for 4 h without sodium arsenate (lane 1) or exposed to 225 μ M (lane 2) or 450 μ M sodium arsenate (lane 3). The cell cytosol was subjected to immunoblotting with an anti-HSP 90 α mAb (K 41007), anti-HSP 90 β mAb (K 3725 B), anti-HSP 70 mAb, and anti-HSC 70 mAb.

として検出されたが、hGRP 94 では 100 kDa のメインバンドの他に 53 kDa のマイナーバンドが検出された。この分子はアミノ酸配列分析により全長分子の一部が切れたものであることがわかった。すなわちこの分子は、全長が合成された後にロイシン 335-メチオニン 336 結合が切断されて生じたものと考えられた。現在まで HSP 90 に対するポリクローナル抗体^{29,30)}および mAb^{9,31,32)}がいくつか作製され市販もされている。しかしながらこれらの抗体はどちらの HSP 90 アイソフォームとも結合してしまう。当教室では HSP 90 α と HSP 90 β を識別できる mAb を世界にさがけて作製した^{21,22)}。今回筆者はさらに hGRP 94 を発現精製して、これに対するポリクローナル抗体および抗ペプチド抗体を作製した。これら抗体や HSP 90 アイソフォーム mAb を用いて HSP 90 ファミリータンパク質の構造の検索を行った。HSP 90 は 3 つ (A-C) のドメイン構造から成っていることが明らかにされている²⁷⁾。hHSP 90 と hGRP 94 はアミノ酸配列が 44% 相同であり、その機能ドメインも類似していることが予想された。本研究において hGRP 94 のペプチド断片のアミノ酸配列の決定を行いドメイン構造の解析を行ったところ、N 末端側 329-336 と、C 末端側から 15 kDa の部分に切断されやすい領域があることを認めた (Fig. 4 b)。このうち N 末端側の切断部分は HSP 90 α のドメイン A とドメイン B 間の切断部分とは若干ずれていた。しかし HSP 90 α の場合、アミノ酸残基 230-400 の領域が非常に切断されやすいという以前の報告²⁷⁾

(Fig. 4 b, 下線部) を考慮すると、GRP 94 の 329-336 の領域と HSP 90 α の切断されやすい領域とはかなり重複していることが推測される。これらの点から、GRP 94 は HSP 90 と同様のドメイン構造をとっていると考えられた。

native PAGE を用いた分析により HSP 90 α はホモダイマーを形成しており、一方、HSP 90 β は主にモノマーで存在していると報告されている³³⁾。しかし非ストレス下でラット肝臓の細胞質中の HSP 90 アイソフォームはオリゴマーとして存在しているが、native PAGE 条件では HSP 90 α は主にダイマーに、HSP 90 β は主にモノマーに解離することが明らかになった³⁴⁾。本研究の生理的塩濃度条件でのゲルクロマトグラフィーの結果からも、培養細胞 MC 3 T 3-E 1 でも HSP 90 ファミリータンパク質はすべてオリゴマーを形成していることが判明した。

HSP 90 は非ストレス時にも細胞内に発現していることが知られている。しかしこれまで HSP 90 両アイソフォームがどのような割合で存在しているかを定量化した報告はない。それはこれまで HSP 90 α と HSP 90 β を完全に識別できる抗体がなかったためである。そこで本研究では当教室で作製した HSP 90 アイソフォーム特異的 mAb^{21,22)}を用いて非ストレス条件下でのラットの各臓器の HSP 90 アイソフォームの発現量を定量した。本 mAb はヒト HSP 90 α 、HSP 90 β を抗原として作製したものであるが、HSP 90 のアミノ酸配列は相同性が高いために (例えばヒトとマウスの HSP 90 α は 98.9%、HSP 90 β は 97.8% 相同である^{35,36)}) ヒトだけでなくラット、マウス、ウサギ HSP 90 α 、HSP 90 β アイソフォームと反応する。その結果、非ストレス時にはほとんどのラット組織で HSP 90 α よりも HSP 90 β の発現が優勢であることが明らかになった。興味深いことに脳、精巣では HSP 90 α の発現が他臓器に比較して多かった。また赤血球ライゼートでは、大量に存在するヘモグロビンをのぞくために 30-60% の硫酸精製画分を用いたため、単純に他組織と比較することは不可能ではあるが、HSP 90 α と HSP 90 β の発現量を比較すると HSP 90 α の発現が優位であった (呂井ら、未発表)。赤血球は核を失った非常に特殊な細胞であり、また脳や精巣は非常に熱感受性の高い組織なので他の組織に比べて異なる HSP 90 発現調節機構があるのかもしれない。

本研究では、さらに骨芽細胞 MC 3 T 3-E 1 を用いて非ストレス条件下およびストレス条件下で、HSP 90 ファミリータンパク質および HSP 70 ファミリータンパク質の発現を検索した。ラット組織同様非ストレス条件では、

HSP 90 α よりも HSP 90 β の発現が優勢であった。また HSP 90 α は種々の刺激による誘導がみられ、その程度は最も差の大きかったヒ酸ナトリウムの場合で 2.6 倍程度であった。これまでヒト顎下腺腺癌由来細胞において熱ショックを与えた場合²²⁾およびヒ酸ナトリウムストレスを負荷した場合²¹⁾には、HSP 90 β よりも HSP 90 α がより強く誘導されることを報告しているが、本研究の MC 3 T 3-E 1 細胞での結果もそれと一致した。

以上本研究の結果から HSP 90 β が非ストレス時にも恒常的に発現しており、HSP 90 α はストレス時にその発現が誘導されるアイソフォームであることが判明した。HSP 70 ファミリータンパク質の場合 HSP 70 がストレス誘導型であり、HSC 70 がストレス非誘導型といわれている³⁷⁾。本研究においても MC 3 T 3-E 1 細胞の場合、ヒ酸ナトリウム添加により HSP 70 の発現は顕著に増加した。HSC 70 の発現もまた増加したが HSP 70 と比較するとその程度は低かった。

2 種類の HSP 70 や HSP 90 アイソフォームが細胞質に存在する理由として、過去の報告や今回の結果を考えると、興味深い仮説を立てることができる。すなわち、HSP 70 や HSP 90 は細胞に必須の因子であるため非ストレス時にも存在する必然性があり、一方ストレス負荷時にはストレスに対応するために多量に必要となる。このような要求を満たす最も合理的な発現調節系として 2 種のアイソフォームが存在し、一方は恒常的発現型でもう一方はストレス誘導型である、というものである。ただしこの仮説は HSP 90 α と HSP 90 β が同一の機能をもつ場合にはじめて成立する。この仮説を検証するには今後さらに小胞体型 HSP 90 である GRP 94 を含め、HSP 90 ファミリータンパク質に機能的な差異があるかどうかを調べる必要がある。また今回はタンパク質レベルの定量を行ったが、これらの変化が mRNA の発現レベルや安定性によるかさらにタンパク質の安定性についても変化があるのかも検討しなくてはならない。HSP 90 ファミリータンパク質は、細胞に必須の因子ではあるが細胞内の多くの因子と結合するために逆に HSP 90 の最も重要な機能がいまだによくわかっていない。その際 HSP 90 α 、HSP 90 β 、GRP 94 に何らかの機能的な違いがあるかどうか今後の重要な課題である。

結 論

本研究では HSP 90 ファミリータンパク質の構造と発現について検討した。リコンビナント GRP 94 は HSP 90 と同様の 3 つのドメイン構造をとっていた。培

養骨芽細胞 MC 3 T 3-E 1 で発現している HSP 90 ファミリータンパク質も、すべてオリゴマーを形成していることが判明した。ラットの脳、精巣、赤血球では HSP 90 α の発現が高いが、その他のほとんどの組織では HSP 90 β が優勢に発現していた。また、MC 3 T 3-E 1 細胞ではストレス条件で HSP 90 β 、GRP 94、HSC 70 に比べ HSP 90 α と HSP 70 の選択的誘導が認められた。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔生化学講座佐藤詔子教授ならびに太田稔名誉教授に感謝いたします。本研究の遂行に終始ご教示とご指導をいただいた同講座根本孝幸助教授に深謝いたします。あわせて適切な助言をいただいた同講座客本斉子講師、永井雅純博士に、また、ご校閲を賜りました同歯科補綴学第 2 講座石橋寛二教授に感謝いたします。アミノ酸配列を決定していただいた東北大学理学部高木尚助教授に深く感謝いたします。

本研究は日本私立学校振興・共済事業団特別補助大学院重点特別経費の補助を受けた。

文 献

- 1) Milton, J.S. : Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **265** : 12111—12114, 1990.
- 2) Levinson, W., Oppermann, H. and Jackson, J. : Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **606** : 170—180, 1980.
- 3) Li, G.C. : Induction of thermotolerance and enhanced heat shock protein synthesis in Chinese hamster fibroblasts by sodium arsenite and by ethanol. *J. Cell. Physiol.* **115** : 116—122, 1983.
- 4) Holbrook, N.J. and Udelsman, R. : Restraint stress, aging and the heat shock response. *最新医学* **49** : 100—109, 1994.
- 5) 永田和宏 : ストレスタンパク質—細胞内の名脇役たち. *科学* **61** : 50—59, 1991.
- 6) Ellis, R.J. : Molecular chaperones : proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *T. Biochem. Sci.* **14** : 339—342, 1989.
- 7) Ellis, J. : Proteins as molecular chaperones. *Nature* **328** : 378—379, 1987.
- 8) Jurnak, F. : Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins. *Science* **230** : 32—36, 1985.
- 9) Perdew, G.H. : Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **263** : 13802—13805, 1988.

- 10) Courtneidge, S.A. and Bishop, J.M. : Transit of pp 60^{v-src} to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79** : 7117-7121, 1982.
- 11) 根本孝幸 : HSP 90 ファミリータンパク質の構造と機能. *組織培養工学* **23** : 112-116, 1997.
- 12) Rebbe, N.F., Ware, J., Bertina, R.M., Modrich, P. and Stafford, D.W. : Nucleotide sequence of a cDNA for a member of the human 90-kDa heat-shock protein family. *Gene* **53** : 235-245, 1987.
- 13) Hickey, E., Randon, S.E., Smale, G., Lloyd, D. and Weber, L.A. : Sequence and regulation of a gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein. *Mol. Cell. Biol.* **9** : 2615-2626, 1989.
- 14) Bardwell, J.C. and Craig, E.A. : Ancient heat shock gene is dispensable. *J. Bacteriol.* **170** : 2977-2983, 1988.
- 15) 矢原一郎 : ストレスとストレス応答. *Mol. Med.* **30** : 428-434, 1993.
- 16) 斉藤 滋 : 咀嚼とメカノサイトロロジー : 咀嚼システム入門. (文部省特定研究-咀嚼システムの基礎的研究総括班編), pp. 115-129, 風人社, 東京, 1987.
- 17) Shimizu, Y., Okazaki, M., Suzuki, H. and Mitani, H. : Induction of heat shock proteins with in vitro application of mechanical stress in human periodontal ligament fibroblasts. in *International conference on dynamics and regulation of the stress response*. : 81, 1998.
- 18) 高橋 弘 : 腫瘍細胞内の HSP 70. *組織培養工学* **23** : 123-126, 1997.
- 19) Kirby, A.C., Meghji, S., Nair, S.P., White, P., Reddi, K., Nishihara, T., Nakashima, K., Willis, A.C., Sim, R., Wilson, M. and Henderson, B. : The potent bone-resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecular chaperone GroEL. *J. Clin. Invest.* **96** : 1185-1194, 1995.
- 20) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S. : Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *J. Oral Biol.* **23** : 899-901, 1981.
- 21) Nemoto, T., Roi, R., Matsusaka, T., Iwanari, H., Yamashita, H., Kyakumoto, S. and Sato, N. : Isoform-specific monoclonal antibodies against HSP 90. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42** : 881-889, 1997.
- 22) 松坂朋典 : ヒト HSP 90 アイソフォーム. *歯基礎誌* **38** : 633-646, 1996.
- 23) Maki, R.G., Old, L.J. and Srivastava, P.K. : Human homologue of murine tumor rejection antigen gp 96 : 5'-regulatory and coding regions and relationship to stress-induced proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87** : 5658-5662, 1990.
- 24) Nemoto, T., Matsusaka, T., Ota, M., Takagi, T., Collinge, D. B. and Walther-Larsen, H. : Dimerization characteristics of the 94-kDa glucose-regulated protein. *J. Biochem.* **120** : 249-256, 1996.
- 25) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227** : 680-685, 1970.
- 26) Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254, 1976.
- 27) Nemoto, T., Sato, N., Iwanari, H., Yamashita, H. and Takagi, T. : Domain structures and immunogenic regions of the 90-kDa heat-shock protein (HSP 90). *J. Biol. Chem.* **272** : 26179-26187, 1997.
- 28) Wearsch, P.A. and Nicchitta, C.V. : Endoplasmic reticulum chaperone GRP 94 subunit assembly is regulated through a defined oligomerization domain. *Biochemistry* **35** : 16760-16769, 1996.
- 29) Itoh, H., Toyoshima, I., Mizunuma, H., Kobayashi, R. and Tashima, Y. : Three-step purification method and characterization of the bovine brain 90-kDa heat shock protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **282** : 290-296, 1990.
- 30) Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., Harada, F., Kasuga, M., Sakai, H. and Yahara, I. : Two mammalian heat shock proteins, HSP 90 and HSP 100, are actin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83** : 8054-8058, 1986.
- 31) Lai, B.T., Chin, N.W., Stanek, A.E., Keh, W. and Lanks, K.W. : Quantitation and intracellular localization of the 85 K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Mol. Cell. Biol.* **4** : 2802-2810, 1984.
- 32) Riehl, R.M., Sullivan, W.P., Vroman, B.T., Bauer, V. J., Pearson, G.R. and Toft, D.O. : Immunological evidence that the nonhormone binding component of avian steroid receptors exists in a wide range of tissues and species. *Biochemistry* **24** : 6586-6591, 1985.
- 33) Minami, Y., Kawasaki, H., Miyata, Y., Suzuki, K. and Yahara, I. : Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP 90. *J. Biol. Chem.* **266** : 10099-10103, 1991.
- 34) Nemoto, T. and Sato, N. : Oligomeric forms of the

- 90-kDa heat shock protein. *Biochem. J.* **330** : 989—995, 1998.
- 35) Yamazaki, M., Tashiro, H., Yokoyama, K. and Soeda, E. : Molecular cloning of cDNA encoding a human heat-shock protein whose expression is induced by adenovirus type 12 E1A in HeLa cells. *Agric. Biol. Chem.* **54** : 3163—3170, 1990.
- 36) Moore, S.K., Kozak, C., Robinson, E.A., Ullrich, S.J. and Appella, E. : Murine 86- and 84-kDa heat shock proteins, cDNA sequences, chromosome assignments, and evolutionary origins. *J. Biol. Chem.* **264** : 5343—5351, 1989.
- 37) 伊藤維昭：分子シャペロンの機能. *Mol. Med.* **30** : 480—487, 1993.