● 総 説

熱ショック応答の遺伝的制御と生理機能

山本 友子 緒方 幸雄

杏林大学 医学部 微生物学教室

三鷹市新川 6-20-2 〒181

[受付: 1月19日, 1990年]

- I. 熱ショック応答とは?
- II. 大腸菌の熱ショック応答
 1. 熱ショック蛋白質の誘発
 - a) 熱ショックの感知, 伝達
 - b) 熱ショック遺伝子発現の誘導機構
 - c) 熱ショック遺伝子発現の負の制御機構
 2. 熱ショック蛋白質とその遺伝子
 - a) GroEL 蛋白質と GroES 蛋白質
 - b) DnaK 蛋白質と DnaJ 蛋白質
 - c) GrpE 蛋白質
 - d) シグマ 70
 - e) リジン tRNA 合成酵素 II
 - f) プロテアーゼ La (Lon)
 - g) C62.5 蛋白質
 - h) *htrA* 遺伝子産物
 3. ラムダファージの増殖と熱ショック応答
 - a) ラムダファージによる熱ショック応答の制御
 - b) ラムダファージ増殖における熱ショック蛋白質の役割
- III. 細菌感染の免疫と熱ショック蛋白質
- IV. 細胞の耐熱性と熱ショック蛋白質
- V. 熱ショック応答の普遍性
- VI. おわりに

I. 熱ショック応答とは?

生物個体あるいは細胞を, 生理的温度より数度高い環境にさらすと, 温度の変化にすばやく対応して特定の蛋白質の合成が誘導される^{70,71,84,86,104}。このような応答

を熱ショック応答といい, 誘導産生される一群の蛋白質を熱ショック蛋白質 [以下 HSP (heat shock protein)] という。熱ショック応答は, 細菌からヒトに至るまで調べられたすべての生物に認められる現象であり, また, 誘導される HSP は生物種を通して非常に変異の少な

表1. 熱ショック蛋白質を誘導する条件

熱ショック	低酸素状態からの回復
エタノール	過酸化水素
アミノ酸アナログ	ウイルス感染
遷移金属イオン	SH 基酸化剤
酸化的リン酸化の阻害剤	グルコース飢餓
紫外線	DNA 合成阻害

い、すなわち進化の過程でよく保存されてきている蛋白質である。これらの事実から、熱ショック応答は生物共通の基本的かつ重要な機能を担っていると考えられている。HSP は、熱ショックに限らず細胞に影響を及ぼすさまざまなストレス、たとえば、エタノール、遷移金属イオン、紫外線など(表1)によつても誘導されるのでストレス蛋白質ともよばれている。

熱ショック応答の研究は、1962 年 Ritossa⁹⁷⁾ の「ショウジョウバエの唾液腺染色体の熱ショックパフ」の観察に端を発する。パフは染色体の特定の部位が非ヒストン蛋白質の作用で膨らんだもので発生の時期に固有の位置に出現するものであるが、Ritossa はショウジョウバエの幼虫の培養温度をわずかに上昇させることにより、従来のパフが消失し同時に新しいパフが出現することを見いだした。後に、この熱ショックパフからは HSP の mRNA が合成されていることが明らかにされた。次いで、Tissieres ら¹¹⁸⁾ は体外に取り出した唾液腺に熱ショックを与えた時に合成される蛋白質を電気泳動で解析し、初めていくつかの特異的蛋白質が誘導産生されることを明らかにした。細菌においては、増殖期にある大腸菌を低温から高温へ急激に移すとある種の蛋白質の産生量が一時的に増大することが、1978 年 Yamamori ら¹³²⁾ および Lemaux ら⁶⁷⁾ により独立に見いだされた。さらに、これらの発見に先立つて 1975 年 Cooper と Ruettinger¹⁹⁾ により分離されていた高温で増殖できない大腸菌の変異株が、HSP の誘発能欠損株であることが判明したことから^{83,135)}、大腸菌での熱ショック応答の研究は、主に熱ショック遺伝子の発現誘導機構を中心に進展してきた。

遺伝子発現の誘導に合目的性をもとめると、生体がその遺伝子にコードされる蛋白質の機能を必要とする時に発現するしくみ、またその機能がもはや不要になった時に発現が終わるしくみを考えることができる。この観点から熱ショックによつて誘導される蛋白質は、熱ショックに対する防御に必要とされているといえるであろう。

実際いくつかの主要 HSP 変異株は高温では増殖できず、それらの HSP が少なくとも大腸菌の高温での成育に必須であると考えられている。しかしながら、細胞の耐熱性に関する個々の HSP の生理機能は現在のところほとんどわかっていない。HSP に見られる共通の特徴は、予想される本来の機能以外に独自の機能を有することである。すなわち、現在知られている HSP のほとんどが熱ショック応答とは関連なく見いだされ解析されてきた事実が示すように、HSP は正常な細胞増殖過程においても重要かつ多様な機能を発揮している。

本稿では、大腸菌における HSP 誘発の遺伝的制御機構、および各種の HSP の正常な細胞増殖過程における機能、さらに最近関心をよんでいる細菌感染後の宿主の免疫応答と HSP との関連等を中心に、細菌の熱ショック応答について紹介する。

一方、真核細胞においては、HSP が動物の個体発生、分化、ウイルス増殖、細胞のトランスフォーメーション、癌遺伝子の発現誘導などで重要な役割を果たすらしいことが相次いで報告され、また、医療面で悪性腫瘍に対する温熱療法(ハイパーサーミア)における一過性の温熱耐性との関連が示されるなど、HSP の多様な生理機能が多くの分野で注目されてきている。これらについては総説^{70,71,104)} および引用文献を参照されたい。

II. 大腸菌の熱ショック応答

1. 熱ショック蛋白質の誘発

大腸菌は一般に 20 C から 37 C の間でバランスのとれた正常な増殖を行うが、約 10 C の低温あるいは約 49 C の高温のもとでも増殖速度や菌の生理状態に大きな影響が現われるものの増殖は可能である⁵⁵⁾。図1に示したように 30 C で対数増殖期にある大腸菌を 42 C へ移すと、温度変換後 1 分以内に特定の蛋白質(HSP)の合成量が増大し、5~10 分後に最大に達する。この誘発は一時的で、その後徐々に減少し、60~90 分後にはほぼ元のレベルに戻り定常状態となる。42 C への転換では蛋白質合成は全体として 30%~50% 増大し、増殖速度も速くなる。しかし致死的な温度(50 C)への転換では、大部分の蛋白質合成は停止し、ほとんど HSP のみが合成される。

HSP の誘発を次の 3 つの段階にわけて考え、各段階についてまとめた。

第一段階

熱ショックの感知、伝達：細胞が生育環境の温度変化

を感知し、その変化を誘発に関与する制御因子にすばやく伝達する段階

第二段階

熱ショック遺伝子の発現：制御因子が活性化され、HSP の合成が誘発される段階。大腸菌では、転写段階で正の制御因子により熱ショック遺伝子の発現が誘導される。

第三段階

ターンオフ：HSP の産生が停止し、定常状態にもどる段階

図1 大腸菌熱ショック蛋白質の誘発
30℃で増殖中の大腸菌を42℃に移し、各時間後に2分間³⁵S-メチオニンで標識した。10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後フルオログラフを作成した。

a) 熱ショックの感知、伝達

細胞が熱ショックを感知し、その異常事態を熱ショック遺伝子発現の制御因子にどのように伝えるかという具体的な機構については現在のところほとんどわかっていない。HSP の合成は、熱ショック以外の種々のストレスによつても誘導される(表1)。しかし熱ショックとエタノール以外のストレスについては誘発されるHSPの種類に限られる¹²²⁾ことから、ストレスの感知、伝達さらには熱ショック遺伝子発現の制御においても複数の機構が存在すると考えられる。現時点ではこれらのストレスに対して現われるある程度共通した細胞側の変化が、熱ショック応答の細胞内の引き金となつているという可能性が考えられている。

まず、熱ショックは熱に不安定な蛋白質の変性を引き起こし、生じた変性蛋白質自身あるいはそれらの分解産物の急激な蓄積が引き金となる可能性が考えられる。実際、細胞内に異常蛋白質が作られる状況下でHSPの産生が誘導されることや、不完全なペプチド鎖の合成を引き起こすビューロマイシン⁴¹⁾、翻訳のまちがいや蛋白質の変性を起こすエタノール¹¹⁹⁾、アミノ酸制限による緊縮調節⁴⁶⁾、外来の蛋白質の急激な蓄積をおこすファージの感染^{21, 61, 127)}によるHSPの誘発の例が示すとおりである。また、クローン化したヒトの遺伝子が大腸菌の中で発現させると正常な蛋白質のS-S結合が形成されず、不溶性の固まりとなつて蓄積する。このことによつてもHSPの誘発が起こる⁴¹⁾。異常な蛋白質の分解にかかわる主要なプロテアーゼであるプロテアーゼLa(後述)が異常蛋白質の蓄積によつて誘発されるHSPのひとつであることは興味深い事実である。次に熱ショック等のストレスが、DNAに損傷を与え、あるいはその合成を阻害することが引き金となる可能性を考えることができる。ストレスの一種である紫外線はDNAに損傷を与える⁶²⁾。またDNAジャイレースの阻害剤であるクーママイシンやナリジクス酸^{62, 79)}によつてもHSPの誘発が起こるが、クーママイシン耐性株ではこの誘発が起こらない⁷⁹⁾。これらの事実は、DNA合成の阻害が引き金となる可能性を強く示唆している。大腸菌の染色体は、蛋白質やRNAと結合し、幾重にも折りたたまれたヌクレオイド構造を形成している。この構造は通常1800s~1900sの沈降定数を示すが、細胞を50℃にさらすとヌクレオイド構造が壊れ、ついで大量の蛋白質が結合し4000s~5000sを示すようになる。しかしその後それは通常のヌクレオイドにもどる。このようなヌクレオイドの沈降定数の経時的変化にHSPが関与している可能

性が考えられていたが⁹³⁾、その後この HSP は GroEL 蛋白質であることが明らかにされた⁸⁶⁾。一方、大腸菌を酸化剤で処理すると、細胞内に急激に AppppA などのジヌクレオチドが蓄積する¹¹⁾。これは酸化状態のストレスに対する防御機構誘発のためのシグナル（アラーム）ではないかと考えられている^{17, 66)}。AppppA は異常なヌクレオチドであり、その細胞内濃度は通常きわめて低いが、その量は熱ショックあるいはエタノール処理によっても急激にかつ著しく増大する⁶⁶⁾。熱ショック応答のターンオフに関与する負の制御因子 DnaK 蛋白質（後述）は、5'-Nucleotidase 活性を有するが、その活性が AppppA により阻害されること¹²⁾ は両者の熱ショック応答における役割を考えるうえで興味深い事実である。これらの事実から AppppA が熱ショック誘発のシグナルとなる可能性も考えられている。

b) 熱ショック遺伝子発現の誘導機構

熱ショック遺伝子の発現は、主として転写段階で正の制御を受けている^{10, 44, 113, 134)}。この正の制御遺伝子の存在は、Cooper と Ruettinger¹⁹⁾ により分離された高温で増殖不能な変異株 K165 を用いて明らかにされた。K165 は、温度感受性サプレッサー tRNA を背景に持つ温度感受性ナンセンス変異株で、当初、細胞の主要蛋白質のひとつに関する変異と考えられていた。しかし

Neidhardt ら⁸³⁾ は、この変異株では高温下で一群の蛋白質の誘発が起こらないことを見だし、高温下において一群の蛋白質の誘導を制御する遺伝子が存在する可能性を示した。この遺伝子は *htpR* (high temperature production) と名付けられ、大腸菌染色体上の 76 分に位置づけられた^{83, 85)}。一方 Yamamori ら¹³⁵⁾ により同様の結果が独立して見いだされ、*hin* (heat shock induction) 遺伝子と命名された。*htpR* 遺伝子の塩基配列が決定され、284 個のアミノ酸に相当する遺伝子産物は転写の開始の段階で働く RNA ポリメラーゼのシグマ因子との間に高い相同性を有することが示された^{64, 141)}。この結果は、制御因子が第二のシグマ因子として働く可能性を強く示唆するものであつたが、この可能性は相次いで行われた *in vivo*, *in vitro* 双方の実験により見事に証明された。まず熱ショックにより転写が活性化されるプロモーター (P_{HS}) が *in vitro* の転写系を用いてシグマオペロン内に同定された¹¹⁰⁾。シグマ因子の遺伝子 (*rpoD*) は *rpsU*, *dnaG* 両遺伝子とともにひとつのオペロンを形成し、その最下流に位置している (図 2) が、通常の増殖至適条件下では P_1 , P_2 より転写が開始され、これらの転写活性は高温にしても変化しない。 P_{HS} は *dnaG* 遺伝子の中に存在し、熱ショックによつてシグマ因子の合成量は著しく増大した^{42, 110)}。つぎに *htpR* 遺伝子をブラ

図 2 シグマオペロンの構造¹¹⁰⁾

Promoter	-35 region	-10 region	+1
<i>groE</i>	CCCCC TTGAAG GGGCGAAGCCATCCCCA	TTTCTC TGGTC	ACCA
<i>dnaK</i> P1	TCCCCC TTGATG ACGTGGTTTACGACCCCCA	TTTAGT AGTC	AACC
<i>dnaK</i> P2	GGGCAG TTGAAA CCAGACGTTTCGCCCC	TATTAC AGACTC	ACAA
<i>rpoD</i>	CCACCC TTGAAA AACTGTCGATGTGGGACGA	TATAGC AGAT	AAGA
<i>lon</i>	TCCGGCG TTGAAT GTGGGGGAAACATCCCCA	TATACT GACTG	AC
<i>htpG</i> P1	TCTCGC TTGAAA TTATTCTCCCTTGTCGCCCA	TCTCTC CCACA	TCCT
σ^{32} consensus	C CcC TTGAA	CCCCA TaT	
σ^{70} consensus	ttc TTGACA	tttgg TAtAaT	

図 3 大腸菌熱ショックプロモーターの構造²⁰⁾

スミド上にクローニングし増幅させた菌から P_{HS} 特異的な転写因子が精製され、それが *htpR* 遺伝子産物そのものであることが証明された⁴⁴⁾。さらに *in vitro* の実験で HtpR 蛋白質は RNA ポリメラーゼコアと複合体を形成し、 P_{HS} からの転写を行う活性を有することが証明された。このことから分子量 32-kDa の HtpR 蛋白質はシグマ 32 と呼ばれ、従来のシグマ因子はそれと区別するためにシグマ 70 と呼ばれるようになった。最近では、*htpR* 遺伝子は熱ショック応答を制御するシグマ因子の構造遺伝子という意味から *rpoH* と呼ばれるようになって⁴⁷⁾。さらに、*in vivo*, *in vitro* 両方で形成された RNA ポリメラーゼ・シグマ 32 ホロ酵素 ($E\cdot\sigma^{32}$) が、他の熱ショック遺伝子の上流にあるプロモーターからの転写を特異的に行うこと、また $E\cdot\sigma^{70}$ はこのプロモーターからの転写活性をもたないことが明らかにされた¹⁰⁾。これらの研究と平行して、熱ショック遺伝子のプロモーターが相次いで決定され、従来の大腸菌のプロモーターについてみられた consensus sequence (−35 領域; TTGACA, −10 領域; TATAAT) とはかなり異なる特徴的な共通配列をもつことが明らかになった (図 3)。実際これらのプロモーターから熱ショックによる転写の増加が確認された。以上のことより、熱ショック遺伝子の発現はその特異的なプロモーターをシグマ 32 が認識することにより行われることが明らかとなった。

それではどのような機構で通常の転写から熱ショック転写に切り替わるのであろうか。現在のところ、熱シ

ックによりシグマ 32 の細胞内濃度が急激に増加し、RNA ポリメラーゼのコア酵素との結合段階でシグマ 70 と競合した結果、 $E\cdot\sigma^{32}$ が大量に形成され熱ショック遺伝子の発現を導くというシグマ因子交換による制御機構がもつとも有力である。このモデルの最初のヒントはシグマ 70 とシグマ 32 の細胞内濃度の相対的変動が熱ショック応答の変化をもたらすという事実にあつた。すなわち、不安定なシグマ 70 をコードする *rpoD800* 変異をもつ株においては野生株に比べ HSP の産生量が増加し⁴²⁾、またシグマ 70 の濃度が 7 分の 1 に低下した変異株では HSP の産生が顕著に促進される¹³⁵⁾ のに対し、シグマ 70 が大量に産生される変異株では HSP の産生量は低下する¹³³⁾ という事実であつた。最近、熱ショックによりシグマ 32 の細胞内濃度が急激に増加すること^{68,107)}、また、*rpoH* 遺伝子を強力なプロモーターに連結して発現させシグマ 32 を大量に作らせると、熱ショック処理なしに HSP の産生が誘導されること^{45,116)} から、シグマ 32 の細胞内濃度が熱ショック遺伝子の発現を直接調節している可能性が考えられ、上述の制御モデルが強く支持されている。

つぎに問題になるのはシグマ 32 の細胞内量を制御する機構である。シグマ 32 の構造遺伝子である *rpoH* 遺伝子は大腸菌染色体上で、*livJ* 遺伝子と *ftsYEX* オペロンの間に位置する。図 4 に *rpoH* 遺伝子のプロモーター領域の構造を示した。この領域には 4 つのプロモーター (*rpoH1p*, *rpoH2p*, *rpoH3p*, *rpoH4p*) が確認されている

図 4 *rpoH* プロモーター領域の構造^{128, 129)}
制限酵素切断地図: Rv, *EcoRV*; Hp, *HpaII*; H, *HindIII*; C, *ClaI*.
(□→); プロモーター領域と転写方向。

図5 大腸菌の第二の熱ショックプロモーターの構造⁷⁴⁾

が、この中で *rpoH1p* と *rpoH4p* からの転写はシグマ 70 により開始され^{10, 24, 28)}、産生される mRNA は低温 (30 C) および高温 (42 C) における全 *rpoH* mRNA の 90 % を占める²⁴⁾。 *rpoH2p* は宿主特異的プロモーターのようである^{128, 129)}。同時に、 *rpoH3p* がシグマ 32、シグマ 70 のいずれによつても認識されないという興味深い結果が報告された²⁴⁾。これは新たなシグマ因子の存在を予告するものであつたが、最近、 *rpoH3p* を認識し転写を引き起こす新しいシグマ因子 (シグマ 24) が同定され¹²⁸⁾、第 2 の熱ショック制御因子が明らかとなつた。また 50 C では、シグマ 70 による *rpoH1p*、*rpoH4p* からの転写は完全に停止するにもかかわらず *rpoH3p* からの mRNA 合成は少なくとも 85 分間続くことが明らかにされた²⁴⁾。この事実は、致死温度 (たとえば 50 C) で培養された大腸菌では、ほとんどの蛋白質合成が停止しているにもかかわらず、ある種の HSP の合成が続けられている現象を説明するものであり、温度が生育許容内に低下するまでのしばらくの間生育を可能にし、生存の機会を増やすことにつながるものであろう。以上のように、 *rpoH* 遺伝子の転写には、その遺伝子産物であるシグマ 32 自身は関与せず熱ショック条件下においてもシグマ 70 により転写が開始されることが明らかとなつた。30 C から 43.5 C への温度転換直後、細胞内 *rpoH* mRNA 量は 5~8 倍に増加する¹¹³⁾ が、最近、その mRNA の合成率の増加は 2 倍以下であることが明らかにされ、熱ショック後の *rpoH* mRNA 量の増加は主として高温での *rpoH* mRNA の安定化などによる post-transcriptional control に起因すると推定された²⁴⁾。したがつて、熱ショック直後のシグマ 32 の細胞内濃度の増加について次のような機構が考えられる。通常の培養条件下で、 $E \cdot \sigma^{70}$ により転写され細胞内に存在していた低濃度の *rpoH* mRNA が熱ショックにより安定化される。さらにある程度の mRNA 合成の活性化とあいまつて、急激に細胞内濃度が高まることにより、大量のシグマ 32 の産生を導くという機構である。

すでに述べたように増殖中の大腸菌を高温に移すと直ちに HSP の合成が起こる。その mRNA 合成は温度変換後 15 秒以内に増加し始め、3.5 分後には最高レベル

に達する¹³⁴⁾。熱ショック遺伝子の発現が主にシグマ 32 の合成量の増加により制御されているとしても、それだけでこのように早い反応を説明することは不充分である。シグマ 32 は非常に不安定な蛋白質であり 42 C でその半減期は約 4 分である⁴⁵⁾。 *rpoH* 遺伝子を P-tac プロモーターに連結して発現させると、細胞内に多量に産生されたシグマ 32 は 42 C でその半減期が 1 分以下と著しく短くなる^{43, 116)}。この事実から、シグマ 32 の細胞内濃度の調節にはその合成効率とともに蛋白質自身の安定化も寄与している可能性が考えられている。

現時点で考えられる熱ショック遺伝子発現誘導の制御機構を以下にまとめる。

- (i) 制御因子は *rpoH* 遺伝子の産物であるシグマ 32 である。(第二の制御因子シグマ 24 も発見された。)
- (ii) 通常の培養条件下で $E \cdot \sigma^{70}$ により転写されていた *rpoH* mRNA は、熱ショックにより安定化され (post-transcriptional control) 細胞内に *rpoH* mRNA が大量に蓄積される。このとき同時に、ある程度の *rpoH* mRNA の合成効率の増加も見られる。
- (iii) 大量に蓄積した *rpoH* mRNA がシグマ 32 に翻訳され、さらに蛋白質自身の安定化も加わつてシグマ 32 が細胞内に蓄積する。
- (iv) シグマ 32 が RNA ポリメラーゼとの結合段階でシグマ 70 と拮抗し、 $E \cdot \sigma^{32}$ が形成され heat shock consensus sequence をもつ種々の熱ショック遺伝子のプロモーターからの転写を引き起こす。

複数の転写単位にまたがる多数の遺伝子群が統一的な制御を受けるものをレギュロンと言うが、熱ショック遺伝子群はシグマ 32 の制御を受ける熱ショックレギュロンを形成していると言える。

最近、シグマ 32 をまったく産生しなくなつた *rpoH* の挿入あるいは欠失変異株が分離された¹⁴²⁾。この変異株は非常に温度に感受性が高く、20 C 以下の低温でのみ増殖可能である。熱ショック (この場合 30 C) をかけると、*dnaK*、*groEL* などの主要な熱ショック遺伝子の転写は起こらないが、*groELES* オペロン内の他のプロモーターからの転写は起きていることが示された。こ

れは熱ショック遺伝子の発現にシグマ 32 に依存しない他の制御機構が存在することを示唆している。最近シグマ 32 に依存しない新しい熱ショック遺伝子 (*htrA*; 後述) が単離された⁷³⁾。そのプロモーターは、*rpoH3p* と共通の特徴的な配列をもっており (図 5) 前述のシグマ 24 により制御される可能性をもつ新たな熱ショックレギュロンのひとつと見えよう。

c) 熱ショック遺伝子発現の負の制御機構

すでに述べたように HSP の合成誘導は一時的で、やがて減衰し定常状態に戻って行くが、この熱ショック遺伝子発現の負の調節に、HSP 自身が関与する一種の自己調節機構が考えられている。*dnaK* 遺伝子は主要な熱ショック遺伝子のひとつであるが (後述)、*dnaK756* 変異株では HSP の誘発は正常に起こるが、その後のターンオフが起こらず HSP 産生は高いレベルのまま続くことが明らかにされた¹¹⁴⁾。また、*dnaK* 遺伝子がプラスミド上に存在するため DnaK 蛋白質が過剰に生産される菌では HSP の誘導の程度が低下していた¹¹⁴⁾。一方、シグマ 32 蛋白質は半減期の短い蛋白質であるが、

DnaK 過剰生産株ではさらに短くなるのに対し、*dnaK756* 変異株では 3~5 倍に長くなることが明らかにされた^{45,116)}。これらの事実は、熱ショック応答の負の制御が、DnaK 蛋白質によるシグマ 32 の post-translational control により行われる可能性を示唆している。

最近 *rpoH* 遺伝子の発現に影響を与える新たな因子が報告されている。すなわち大腸菌染色体複製の開始を調節する DnaA 蛋白質が *rpoH* 遺伝子の二つのプロモーター *rpoH3p* と *rpoH4p* に結合し、*in vitro* で両プロモーターからの転写を抑制することが見いだされ¹²⁹⁾、DnaA 蛋白質が *rpoH* 遺伝子発現の負の制御に関与している可能性が提出された。

2. 熱ショック蛋白質とその遺伝子

大腸菌では、二次元ゲル電気泳動法による蛋白質の合成量の変化の解析から、約 20 種類の蛋白質が熱ショックにより誘発されることが確認されている (図 6)。この中で遺伝子が同定され、あるいは HSP の機能が解析されているものは 10 種あるが (表 2)、ほとんどのものが熱ショック応答とは独立に、大腸菌の様々な生理機

図 6 大腸菌の合成する蛋白質の二次元ゲル電気泳動パターン
30°C で培養した大腸菌を 42°C に移し、5 分後に 2 分間 ³⁵S メチオニンで標識した。二次元ゲル電気泳動後フルオログラフを作成した。
(→) Neidhardt^{82, 85, 121)} らにより同定されている HSP. 1, B25.3 (GrpE); 2, B56.5 (GroEL); 3, B66.0 (DnaK); 4, C14.7; 5, C15.4 (GroES); 6, C62.5; 7, D33.4; 8, D48.5; 9, D60.5; 10, F84.1; 11, G13.5; 12, G21.0.
(⇒) Yamamoto and Georgopoulos 未発表成績。

表2. 大腸菌の熱ショック蛋白質

蛋白質名 ^a	遺伝子(分)	分子量(ダルトン) ^b	細胞内含有量($\alpha' \cdot 10^3$) ^c
GroEL (B56.5)	<i>groEL</i> (94.2)	57259 ⁴⁸⁾	16.47
GroES (C15.4)	<i>groES</i> (94.2)	10368 ⁴⁸⁾	2.61
DnaK (B66.0)	<i>dnaK</i> (0.5)	61121 ⁶⁾	14.09
DnaJ (H26.5)	<i>dnaJ</i> (0.5)	40973 ^{9, 90)}	<0.2
GrpE (B25.3)	<i>grpE</i> (57)	21668 ⁷²⁾	1.44
シグマ70 (B83.0)	<i>rpoD</i> (67)	70263 ¹⁴⁾	2-3
リジンtRNA(D60.5)	<i>lysU</i> (93.5)	60500	0.18
合成酵素			
La, Lon (H94.0)	<i>lon</i> (10)	94000	1.61
C62.5 (C62.5)	<i>htpG</i> (11.1)	71429 ⁷⁾	2.61
HtrA	<i>htrA</i> (3.7)	51000 ⁷⁴⁾	?

a: ()はNeidhardtらによる命名^{84, 86)}

b: ()は塩基配列が決定された文献を示す。

c: 細胞内含有量(α')は、細胞内全蛋白質量に対する重量比^{84, 86)}

能に関する研究を通して見いだされてきたものである。したがって、HSPは細胞の正常な増殖過程でも重要な役割を担っているといえる。以下に個々のHSPについて主な性状を述べる。遺伝子とその産物については、「遺伝子 *groEL* のコードする蛋白質 GroEL」に準じて表記する。

a) GroEL 蛋白質と GroES 蛋白質

groEL および *groES* 遺伝子は最初、ラムダファージをはじめとするいくつかのファージの形態形成に必須な大腸菌側の遺伝子として発見された^{36, 37)}。当初はひとつの遺伝子 *groE* として考えられていたが、後にこれは2つの遺伝子 *groEL*, *groES* からなるオペロンを形成していることが明らかにされ¹¹⁵⁾、また GroEL は高温で産生される全蛋白質量の15%を占める主要HSPのひとつB56.5^{50, 82)}に、GroESはC16.5¹¹⁷⁾に相当することが明らかにされた。GroELは分子量約90万の巨大なポリマーで、7個のサブユニットがリング状に集合したものが、さらに2個重なった形(14mer)をしている^{49, 53)}。GroESも分子量約8万のホモポリマーであり、数個のポリペプチドがリング状の対象的な構造をとっている¹⁵⁾。両蛋白は、機能的にも相互作用をもっていることが示されている^{15, 113)}。*groE* 遺伝子に変異をもつほとんどの大腸菌は、高温で培養するとDNA、RNA合成が停止し温度感受性の増殖を示すようになり^{33, 125)}、またある種の変異株では高温で透過性が変化し¹⁰⁹⁾、細胞分裂も阻害される³³⁾。これらのことから *groE* 遺伝子は少なくとも高温では大腸菌の生育に必須と考えられていた

が、最近、大腸菌の生育にはすべての温度(17°C~42°C)で両遺伝子が必須であることが遺伝学的に明らかにされた²⁶⁾。実際 *groE* オペロンの上流には熱ショックプロモーター以外にもシグマ70が認識するプロモーターがあり、シグマ32がない状態でも合成されている¹⁴²⁾。大腸菌 *dnaA* 遺伝子の変異 *dnaA46* はDNA複製に関する温度感受性変異であるが、この表現形質は *groEL*・*groES* の遺伝子を増幅して両蛋白質の細胞内量を増加させることによりサプレスされる^{25, 57)}。また、すでに述べたように制御遺伝子 *rpoH* の欠失変異株は20°C以下でのみかろうじて増殖できるが、この欠失変異株より分離された高温で増殖可能になった復帰変異株はGroEL, GroESを大量に産生するようになっており、しかもその合成量が多いほど高温での増殖が可能であった¹⁴²⁾。以上のことからGroE蛋白質は細胞の増殖に重要な役割を果たし、しかもある一定の量が必要なことから、いろいろな蛋白質の集合や高次構造体の形成に必要な場を作る機能をもっていると考えられる。他の蛋白質の高次構造の形成、維持を助ける機能をもつ蛋白質は介添え蛋白質(Chaperone)⁴⁸⁾といわれているが、GroELもその一種と考えられている。

b) DnaK 蛋白質と DnaJ 蛋白質

dnaK, *dnaJ* 遺伝子はいずれもラムダファージDNAの複製に関与する宿主側の遺伝子として発見された^{32, 34, 99, 108)}。プロモーター *dnaK-dnaJ* のオペロンを形成している^{100, 138)}。DnaKはHSP B66.0³⁹⁾に、DnaJはH26.5⁸⁶⁾に相当する。精製されたDnaKはDNA-

independent ATPase 活性, 弱い autophosphorylation^{145, 146)}, および 5'-nucleotidase 活性¹²⁾ を有する。一方, DnaJ は分子量 76-kDa の 2 量体で, 疎水性の高い膜結合蛋白質であり, 精製された DnaJ は, 2 本鎖および 1 本鎖 DNA への結合能を有している¹⁴⁷⁾。

すでに述べたように, DnaK はシグマ 32 の量的調節を通して HSP 誘発の負の制御に関与している。dnaK 変異株を 43 C で増殖させると, コロニー形成能, RNA 合成, DNA 合成の開始が阻害されることから^{56, 99, 100)}, 大腸菌の増殖にも機能を有していると考えられていたが, 事実, 最近, 42 C において大腸菌染色体の *oriC* からの複製開始に働くことが明らかにされた¹⁰¹⁾。また, 大腸菌野生株に dnaK 遺伝子の欠失変異を導入すると高温 (42 C) および低温 (11 C, 16 C) で増殖不能になり, 30 C では菌の増殖や分裂に著しい障害が現われ, さらにこの変異を安定に維持するにはサプレッサー変異が必要であることから¹³⁾, dnaK 遺伝子は広い温度域で菌の正常な生育に要求されているといえる。DnaK は真核細胞におけるもつとも主要な HSP である hsp70 蛋白質とアミノ酸配列においても非常に相溶性が高い⁶⁾。hsp70 のファミリーには, 免疫グロブリンの H 鎖に結合してそれらが異常な集合体を作るのを防ぐ役割や, 熱変性したリボゾーム前駆体の代謝回転に関与する機能をもつものがあり⁹⁴⁾, これらは, 蛋白質の集合, 解離の反応において共通の機能を持つのではないかと考えられている。DnaK では現在のところそのような機能はわかっていないが, 相溶性から考えると, 同様の機能, とりわけ高温で必須蛋白質の構造が異常になるのを防御する機能をもっているかもしれない。

一方, DnaJ も大腸菌の染色体 DNA 複製に関与している可能性が報告されている¹⁴⁴⁾。また DnaJ は, 細胞周期依存の蛋白質すなわち細胞周期の特定の時期でしか合成されない一群の蛋白質 (たとえば β -ガラクトシダーゼ) の合成を調節する機能をもっている⁹¹⁾。

c) GrpE 蛋白質

grpE 遺伝子もラムダファージ DNA 複製に必須な大腸菌の遺伝子として発見された⁹⁸⁾ が, 後に酸性の HSP B25.3 に相当し, ラムダファージのみならず高温 (42 C) においては大腸菌の DNA 複製にも関与することが明らかにされた¹⁾。最近, *grpE* 遺伝子がすべての生育可能温度において菌の増殖に必須であることが遺伝学的手法により明らかにされた²⁾。しかし同時に, dnaK103 をもつ変異株では, 野生型 *grpE* 遺伝子が欠失変異と容易におきかわる興味ある事実が示された²⁾。このことは,

GrpE が DnaK と細胞内で相互作用して働くことを示唆しているが, この可能性は精製された GrpE が *in vitro* で DnaK と結合し ATP 存在下では解離すること¹⁴³⁾, また, *in vivo* で *grpE280* 変異をサプレッサー変異が dnaK 遺伝子上に分離された (*dnaK9* 変異) ことにより確認された⁵⁸⁾。

d) シグマ 70

図 2 に示したように *rpoD* の上流にはシグマ 32 により認識されるプロモーター P_{HS} が存在するから^{14, 20, 110)}, その遺伝子産物シグマ 70 の産生量は熱ショックにより顕著に増大する。シグマ 70 は HSP B83.0 に相当する⁸⁶⁾。大腸菌のほとんどのプロモーターがシグマ 70 によつてのみ認識され転写が開始されるが, すでに述べたように熱ショック応答はシグマ 70 の細胞内量と拮抗するから^{42, 133, 135)}, 熱ショックによるシグマ 70 の誘発は, HSP の過剰産生により予想される細胞内生理の不均衡や障害に対する防御機構として理解できるであろう。

e) リジン tRNA 合成酵素 II

通常の増殖条件での蛋白合成にはリジン tRNA 合成酵素 I が働いているが, ある種の栄養条件下では *lysU* の遺伝子産物リジン tRNA 合成酵素 II が大量に産生される^{49, 52)}。この酵素は熱ショックによつても誘発される¹²³⁾。この酵素の独自の機能はよくわかっていないが, 副反応として熱ショック誘発のシグナルの候補のひとつにあげられている AppppA などのジヌクレオチドを合成する活性が高いことが知られている⁶⁶⁾。

f) プロテアーゼ La (Lon)

ATP をエネルギー源とする蛋白質分解酵素で分子量約 94-kDa のサブユニット 4 個が集合した多量体で存在する^{16, 18)}。遺伝子 *lon* は熱ショックプロモーターをもち³¹⁾, 遺伝子産物は HSP H94.0 に相当する^{40, 95)}。lon 変異株では異常蛋白質の分解能が 50~80 % 低下することから, La は変異や損傷により生じた異常蛋白質の分解に主要な役割を担っていると考えられる。またこれらの変異株では, DNA 修復のときに働く制御蛋白質 (SOS 応答の SulA 蛋白質) の分解が起こらず UV 感受性が高まる⁸⁰⁾ ことや, ムコポリサッカライドが過剰に生産されることなどから, La は通常の増殖条件下での正常な蛋白質の分解にも関与することが考えられる。しかしその機能を失活させた挿入変異株が分離され, その株では菌体内の ATP に依存した蛋白質分解性も減少するだけでなくはしないことが明らかにされている⁷⁶⁾。熱ショックにより異常蛋白質が蓄積すること, La がその

ような状況で誘発されることを考えあわせるとこの遺伝子は菌の生育には必ずしも必要ではないが、熱ショックのようなストレスをうけた時に異常蛋白質の分解に必要とされていると考えられる。

g) C62.5 蛋白質

C62.5 蛋白質は、分子量約 65-kDa のサブユニットから構成される 2 量体で細胞内でリン酸化されて存在している¹⁰⁵⁾。その遺伝子 *htpG* は真核細胞に広く存在する *hsp83* と相同性が高い DNA としてクローニングされた⁷⁾。この遺伝子は進化の過程で非常によく保存されてきているため、細胞内で重要な役割を果たしていると予想されたが、大腸菌では欠失変異株が分離され、その変異株はわずかに温度感受性が高まる程度であることから、必須の遺伝子ではないと考えられている⁸⁾。その機能は現在のところ不明である。

h) *htrA* 遺伝子産物

Georgopoulos らは、3 kb の mini-Tn10 トランスポゾンあるいは λ plac-Mu hybrid phage を大腸菌染色体に無作為に挿入させ、30°C で増殖し、42°C では増殖できない大腸菌のライブラリーを作製している (Georgopoulos 私信)。このライブラリーには、少なくとも既知の熱ショック遺伝子とは異なる 8 種の遺伝子が含まれていたが、その中のひとつ *htrA* 遺伝子⁷³⁾ は、大腸菌染色体上の 3.7 分に位置し、分子量 50-kDa の蛋白質をコードしていた。これは翻訳後 N 末が取り除かれて分子量 48-kDa の蛋白質になる HSP であった。この遺伝子の発現はシグマ 32 の制御を受けず、プロモ-

ーター領域の塩基配列はシグマ 24 によつて認識される *rpoH3p* に類似していた (図 5)⁷⁴⁾。したがつてシグマ 24 支配下の第 2 熱ショックレギュロンに含まれる遺伝子であると考えられる。最近、*htrA* はペリプラズムに蓄積した異常な蛋白質の分解に関与する遺伝子 *degP*¹⁰⁶⁾ と同一の遺伝子であることが明らかにされている (Lipinska and Georgopoulos 私信)。

3. ラムダファージの増殖と熱ショック応答

熱ショック応答と大腸菌のバクテリオファージラムダの増殖には少なくともつぎの三つの面からの関連が見られる。

① 現在知られている熱ショック遺伝子の中で 5 種 (*dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groEL* および *groES*) が最初、ラムダファージの増殖に必須な大腸菌宿主側の遺伝子として同定された。

② ラムダファージ感染が、HSP の誘発を引き起こす^{21, 61)}。

③ *rpoH* 遺伝子に関するある種の変異株ではラムダファージが増殖できない^{126, 127)}。

ここではラムダファージによる熱ショック応答の制御とファージの増殖における各 HSP の役割についてまとめ、ラムダファージの増殖が熱ショック制御サーキットに巧妙に組み込まれている様子を示す。

a) ラムダファージによる熱ショック応答の制御

大腸菌がラムダファージの感染をうけると、細胞の代謝に様々な変化が現われるが、それらの変化の一つに HSP の一時的な誘発がある。この誘発に必要なファ-

図7 ラムダファージのゲノム構造と複製開始領域の構造⁷⁵⁾

ジの機能は *pL* プロモーター (図7) からの初期遺伝子の転写であることが明らかにされていたが^{21, 61)}, 最近, 初期蛋白質のひとつ *cIII* 蛋白が, シグマ 32 を安定化することにより熱ショック応答を引き起こす可能性が示された³⁾. すなわち *cIII* 遺伝子をプラスミド上にクローニングし, *cIII* 蛋白を大量に産生させた菌では, シグマ 32 の半減期が4倍に長くなり, また活性シグマ 32 の量が増加した。*cIII* 蛋白は溶原性の確立に必要なファージ蛋白である *cII* 蛋白をプロテアーゼによる分解から保護する働きをもっている⁴⁾ ことから, 同様の機能によるシグマ 32 の安定化を通して HSP の誘発が起これと考えられている³⁾.

一方, *rpoH* 遺伝子に変異 (TC28-2) をもつ大腸菌変異株では, すべてのファージ蛋白は正常レベルで産生されているにもかかわらずファージ粒子が完成されない。すなわち, プロファージの切り出しや尾部形成の阻害, 異常な頭部形成, ラムダ近縁のファージ 434 増殖の初期段階での阻害などが起こる^{126, 127)}. これらの現象は次に述べるように, ラムダファージの増殖の種々の段階に複数の HSP の機能が必須であることで主に説明されるであろう。

b) ラムダファージ増殖における熱ショック蛋白質の役割

ラムダファージ DNA の複製は特定の複製開始点 (*oriλ*) より始まり両方向に向かつて進行するが, 複製を開始するためには次の経過をたどることが必要とされている²⁹⁾.

- ① *pRoR* プロモーターからの右向きの転写 (図7) が複製開始領域に達し, *O* 遺伝子, *P* 遺伝子を転写してイニシエーター蛋白である λO , λP が産生される。
- ② 同じ転写が *oriλ* あるいはその周辺の構造を通過することにより, 複製開始のための活性化された状態に導く (transcriptional activation)。
- ③ λO が *oriλ* の特定の部位に結合し, 安定な [*oriλ*]- λO 複合体が形成される。
- ④ [λO]- λP および [λP]-[DnaB] の相互作用を介して [*oriλ*]- λO - λP -[DnaB] の複製開始複合体が形成される。
- ⑤ [*oriλ*]- λO - λP -[大腸菌の蛋白質群] という因子間の一連の相互作用が成立した結果, 安定な複製開始複合体から, *dnaG*-Primase に依存したプライマー RNA が合成される。

最近, transcriptional activation の実態は, RNA ポリメラーゼが *oriλ* 領域を通過することにより, DNA に結合したヒストン様蛋白である HU を取り除き, 複製

開始複合体の形成を促すものであることが示された⁷⁷⁾.

ラムダファージが増殖できなくなる大腸菌の変異に *groP*^{32, 108)} あるいは *grp*⁹⁹⁾ と呼ばれる一群の変異がある。この変異をもつ大腸菌でも増殖可能になったファージ側の変異がすべて *P* 遺伝子の変異であることから, λP と *groP* 遺伝子産物が機能的に相互作用をもつと考えられた。これらの *groP* に含まれるものが後に熱ショック遺伝子であることが明らかにされた *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* 遺伝子である。これらの遺伝子産物がラムダ DNA の複製に必須であることは多くの遺伝学的研究^{32, 34, 98, 99)} により明らかにされていたが, 最近, *in vitro* における *oriλ* を含む λdv プラスミド DNA 複製の再構成系を用いて, DnaK, DnaJ, GrpE 蛋白質のラムダ DNA 複製開始における役割が詳細に検討された^{136, 144)}. その結果, DnaK, DnaJ および GrpE 蛋白質は, プライマー RNA 合成の前の段階, すなわちプレプライミングの段階に働くことが明らかになった。さらに, これらの蛋白質は, ATP に依存した反応により開始複合体 [*oriλ*]- λO - λP -[DnaB] から λP を取り除くことが明らかにされた^{69, 144)}. λP は, λO , DnaB のそれぞれとの相互作用により複製開始複合体形成に必須であるが, ひとたび複合体が形成されると λP は DnaB のもつ helicase 活性を阻害するから, 複合体から λP を引き離すことにより DNA 複製開始反応を進行させることになる。DnaJ 蛋白質は DnaK 蛋白質と物理的な相互作用をもち (Sell and Georgopoulos 私信), また GrpE 蛋白質は DnaK 蛋白に結合し¹⁴³⁾, *in vitro* 複製系の DnaK 蛋白質の要求度を低下させること¹⁴⁴⁾, さらに *grpE* 遺伝子の変異が *dnaK* の変異によりサプレスされること⁵⁸⁾ などから, DnaJ, GrpE 両者とも DnaK 蛋白質との相互作用を介して働いていると考えられる。以上の HSP が関与するラムダ DNA 複製開始機構のモデルを図8に示した。

一方, *groE* 遺伝子もラムダファージが増殖できない大腸菌の変異により発見され^{27, 35)}, 後に *groEL*, *groES* の2つの遺伝子からなるオペロン¹¹³⁾ であることが明らかにされた。両遺伝子産物は共にラムダファージの頭部形成の初期段階で働く³⁸⁾. 頭部を形成する一連の反応はまず DNA を含まない Prohead と呼ばれる前駆体の形成から始まる。これにはファージの遺伝子 *B*, *C*, *E*, *Nu3* と, 大腸菌 *groEL*, *groES* が関与する。遺伝子 *E* の産物はカプシドあたり420個含まれる主要コード蛋白である。*Nu3* 蛋白は, Scaffolding としての機能を持ち成熟した Prohead の構成単位にはならない。*B* 遺伝子産物は12分子からなるドーナツ形を形成するが, これは

図8 λ dv DNA複製開始機構のモデル¹⁴⁴⁾

λ dv DNAを複製開始に導く一連の反応は次のように要約される。 λ Oがoriに結合し、一本鎖DNA領域が形成される(第一段階)。 λ P-DnaB複合体が、 λ O- λ P相互作用を介して結合し、ori- λ O- λ P-DnaB開始複合体が形成される。DnaBは二本鎖DNA領域との連結部に位置する一本鎖DNAと結合している(第二段階)。DnaJが λ Pを認識して、DnaB、 λ P両方に結合する(第三段階)。DnaKが λ P、DnaJに結合する(第四段階)。DnaKのもつATPase活性によりATPが加水分解され、DnaK、DnaJの機能により λ Pが取り除かれる。Ssbが結合することにより一本鎖領域の再結合を阻止する(第五段階)。DnaBのhelicase活性が発現、さらにDnaG primaseがDnaB-single stranded DNA領域を認識してRNAプライマーを合成する(第六段階)。

Preconnector と呼ばれ、後期で head-tail connector になる前駆体である。GroEL, GroES 蛋白質は、この B 遺伝子産物の集合に関与する⁶⁰⁾。

以上述べたように、ラムダファージは感染後自ら熱ショックレギュロンを活性化することにより増殖に必要な宿主の一群の蛋白質の細胞内濃度を、一挙に増加させ、利用している。

Ⅲ. 細菌感染の免疫と熱ショック蛋白質

最近、HSP が細菌感染症において宿主の免疫応答の主要なターゲットになっている可能性が報告され、細菌感染症や自己免疫における HSP の免疫生物学的役割が注目されてきている。まず、Mycobacteria 感染において強い免疫原性を示す主要な抗原^{23,81,88)} をコードする

表3. Mycobacteria の蛋白抗原¹³⁹⁾

Protein (kDa)	Recognized by human T cells	Homology with known proteins
<i>M. tuberculosis</i>		
71	+	DnaK
65	+	GroEL
38	+	—
19	+	None
14	+	—
12	ND	—
<i>M. leprae</i>		
70	ND	DnaK
65	+	GroEL
36	+	—
28	+	—
18	+	Plant HSP
12	ND	—

Mycobacterial protein antigens, their recognition by human T cells, and homology of the deduced mycobacterial protein sequences to known proteins are summarized. ND, not determined. +, Yes; —, No.

遺伝子が単離され、DNA の塩基配列が決定されたことにより、これらの抗原のいくつかが大腸菌の GroEL^{102, 103)} や DnaK³⁰⁾ あるいは植物の HSP⁸⁷⁾ と高い相同性を持つことが明らかにされた (表3)。この中で GroEL と相同性を有する 65-kDa 抗原は、Mycobacteria 感染動物において強い遅延型過敏反応を引き起こすことや、*in vitro* での T 細胞活性化をはじめとした細胞性免疫応答を誘導する^{59, 63)} などの強い免疫原性が示されてきたが、最近熱ショック応答により合成される *M. tuberculosis* の主要な HSP であることが明らかになった¹⁰³⁾。しかし大腸菌とは異なり、その遺伝子は *groES* 遺伝子とオペロンを形成していない¹⁰²⁾。

一方、*Yersinia enterocolitica* の感染宿主において、感染の初期に多量に抗体産生を誘導する分子量 60-kDa の蛋白抗原が見いだされ⁸⁹⁾、さらにこの抗原がグラム陰性、陽性を問わず広範囲な細菌種属に存在することが明らかにされている (表4)¹³¹⁾。最近、この細菌共通抗原が *Yersinia enterocolitica* において熱ショックにより産生量が著しく増大し、GroEL と交差反応性を有することが明らかにされた^{131a)}。GroEL family は、真正細菌以外の微生物では *Mycoplasma*¹³⁷⁾、*Coxiella*^{5, 124)}、*Treponema*⁵¹⁾、*Borrelia*¹⁴⁰⁾ などにおいて見いだされているが、さらに最近、ヒトをはじめ多くの生物のミトコンドリア

にも存在するなど²²⁾、この蛋白質の一次構造や抗原性が細菌からヒトに至るまできわめてよく保存されていることがあいついで明らかにされてきている。

一般に自己の抗原に対する免疫応答は、トレランスなどにより誘導されないが、HSP は宿主内に元来相同性を示す抗原でありながら強い抗体産生を誘導する。このような同一の抗原性をもつ蛋白質を異物として認識するトレランスの解除は自己免疫応答をもたらすと考えられるが、最近、*M. tuberculosis* の 65-kDa 抗原上のエピトープを認識する T 細胞がラットに関節炎を引き起こす事実¹³⁰⁾ が報告され、細菌感染をうけた宿主の外来性 HSP に対する免疫応答が、感染を契機として引き起こされる関節炎や SLE (Systemic Lupus Erythematosus) などの自己免疫疾患発症の原因となる可能性が注目されはじめた¹⁴⁰⁾。以上のような HSP と自己免疫応答の関連は、自己免疫疾患が外来性抗原と自己抗原との交差反応にあるという Molecular Mimicry 説⁹²⁾ に対しても興味深い問題を提起しているといえるであろう。

IV. 細胞の耐熱性と熱ショック蛋白質

一般に、HSP の誘発は環境の急激な変化に対する細胞の防御、適応機構に関係があると考えられており、真核細胞では、細胞を致死的温度にさらす前に中間的温度で前処理してやると致死的温度での生存率が高まることや、熱と同様に HSP の誘発を起こすエタノールで前処理を行つても耐熱性が獲得されるなどのいくつかの実験事実がこれを支持している^{70, 71)}。一方、大腸菌でも、42°C で前処理した細胞を 55°C にさらすと耐熱性の獲得がみられ、熱ショック応答を示さない *rpoH* 変異株ではこの耐熱性の獲得がみられないこと¹⁰²⁾ から熱ショック応答と耐熱性の獲得の関連が強く示唆されてきた。しかし最近、*rpoH* 遺伝子を P-tac プロモーターに連結し、IPTG で 17 種の主要 HSP を誘導産生しても、菌は耐熱性を示さない結果が報告された¹²¹⁾。したがって菌の耐熱性の獲得には、HSP 以外に熱ショックにより誘発されるいくつかの因子が関与しているものと考えられる。

V. 熱ショック応答の普遍性

既に述べてきたように HSP の一次構造は、種を越えてきわめてよく保存されている。HSP のアミノ酸レベルでの相同性をここに整理する。

DnaK ; ショウジョウバエの HSP70 と 48% の相同性をもつ⁶⁾。HSP70 は真核細胞では酵母からヒトまで広く分布するもつとも主要な HSP であ

表 4. 細菌共通抗原 (CRPA ; cross-reacting protein antigen) の菌種間分布

Bacterial extract	Reactivity with monoclonal antibody				
	1A4	5C1	5C3	3C8	Poly
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	+	+	+	+
<i>Vibrio cholerae</i>	—	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	—	—	+	+	+
<i>Shigella sonnei</i>	—	—	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	—	—	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	—	—	+	+	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	—	—	+	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	—	—	+	+	+
<i>Vibrio alginolyticus</i>	—	—	+	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	—	—	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	+	+	+
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	—	—	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	—	—	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	—	—	—	+	+
<i>Escherichia coli</i>	—	—	—	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	—	—	—	+	+
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	—	—	—	+	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	—	—	—	+	+
<i>Flavobacterium</i> sp.	—	—	—	+	+
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	—	—	—	+	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	—	—	—	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND	ND	±
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ND	ND	ND	ND	±
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ND	ND	ND	ND	±

Y. enterocolitica の CRPA に対する各種モノクローナル抗体 (1A4, 5C1, 5C3, 3C8) およびポリクローナル抗体と、各菌種の粗抽出物の反応性をウェスタンブロッティング法により検討した。+, 分子量 60-kDa (Mycobacteria では 65-kDa) の蛋白質が検出されたもの。—, 検出されなかつたもの。±, 10 倍量の抗原を用いて検出されたもの。ND, Not determined.

るがお互いに 72 % 以上の相同性を示している⁵⁴⁾。いずれも ATPase 活性をもち、蛋白質間の集合・解離の反応において共通した機能を持つのではないかと考えられている。

GroEL ; 高等植物のクロロプラストに存在し、光合成の CO₂ 固定に関与する酵素 Rubisco (ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase) subunit binding protein と高い相同性を持つ⁴⁸⁾。両者とも弱い ATPase 活性を有し、他の蛋白質の高次構造形成に関与する介添蛋白質 (Chaperone) である。ヒトのミトコンドリアの蛋白質 P1 と約 70 % の相同性を持ち²²⁾、またテトラヒメナ、酵母、アフリカツメガエル、トウモロコ

シ、エンドウマメなどのミトコンドリアにも分子量 58-kDa~64-kDa の相同性の高い蛋白質が存在する^{78, 96)}。

C62.5 蛋白質 ; ショウジョウバエおよびヒトの HSP83 と約 40 % の相同性を持つ⁷⁾。HSP83 は、真核細胞に広く存在する主要 HSP のひとつであるが、その機能は現在のところまったく分かっていない。

熱ショック応答の生物界における普遍性は、以上述べたような HSP 自身の高い相同性のみならず、誘発が遺伝子の転写段階で正の制御因子により調節されていること (真核細胞での誘発機構に関する総説^{70, 71)}) さらにそ

の誘発が一時的でやがて減衰していくことなどの制御機構の基本においても認められる。これらのことから熱ショック応答の生物学的意義や個々の HSP の生理機能においても共通性が高いことが考えられる。

V. おわりに

温度は、生物が生育するうえできわめて重要な環境因子である。わずかな温度変化さえ生物あるいは細胞に与える影響ははかりしれない。生物はその急激な変化にあたり影響を最小限にいとめ、引き続いて起こる類似のストレスに対する防御機構を進化の過程で獲得したにちがいない。その防御機構のひとつが熱ショック応答であるといつてもまちがいないであろう。

細菌における熱ショック応答の制御機構は、その現象の発見以来およそ 10 年間で“シグマ因子変換による転写制御”という大筋が解明された。しかし、最近では従来のシグマ 32 制御下のレギュロンに加えて新たな熱ショックレギュロンの存在が明らかにされたり、翻訳レベルでの調節を示唆する成績も出始めてきている。また、本稿ではふれなかつたが、熱ショックにより一時的に合成速度が低下する一群の蛋白質の存在や、熱ショック遺伝子の変異により高温で増殖不能になつた大腸菌変異株の復帰変異が同時に低温感受性の表現形質をもたらしという現象もみつかつており、これらの制御機構を含めた熱ショック応答の発現誘発に関する統一的な分子機構は今後の研究を待たなければならない。

一方、熱ショック応答の制御機構に比べ、HSP 自体の生理機能に関する研究は比較的新しい。本稿では、大腸菌の HSP のなかで機能や構造が少しでもわかっているものについて述べたが、これらは 20 種以上の HSP のうち一部にすぎない。また、明らかにされた機能も大腸菌の通常の生育状態におけるものであり、これらがストレスの加わつた異常状態でも同様に発揮される可能性については現在のところ推測の域をでていない。異常状態での細胞の生存にかかわる HSP の機能解析を通して熱ショック応答の生物学的意義がしだいに明らかになっていくであろう。さらに HSP の持つ多彩な生理機能の解析は、さまざまな分野に大きな影響を与えるものと期待される。また、細胞のストレスの感知方法とシグナルの伝達機構の解明も今後に残された重要な課題である。

熱ショック応答の研究は原核細胞と真核細胞双方で活発に展開されており、今後両分野で得られる相互補完的な知見によりその全体像が明らかにされていくであろう。

本稿執筆にあたり、多大な御協力を得ました当教室、田口晴彦助手、桂卓也助手、山口博之助手、熊田淳子助手、並びに千葉大学医学部微生物学第一講座白澤浩助手の皆様へ深く感謝いたします。また、未発表成績を含む最新の知見を紹介していただきました Utah 大学医学部 Costa Georgopoulos 教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Ang, D., Chandrasekhar, G. N., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1986): *Escherichia coli* *grpE* gene codes for heat shock protein B25.3, essential for both λ DNA replication at all temperatures and host growth at high temperature. *J. Bacteriol.* **167**, 25-29.
- 2) Ang, D. and Georgopoulos, C. (1989): The heat-shock-regulated *grpE* gene of *Escherichia coli* is required for bacterial growth at all temperatures but is dispensable in certain mutant backgrounds. *J. Bacteriol.* **171**, 2748-2755.
- 3) Bahl, H., Echols, H., Straus, D. B., Court, D., Crowl, R., and Georgopoulos, C. P. (1987): Induction of the heat shock response of *E. coli* through stabilization of σ^{32} by the phage λ cIII protein. *Genes and Development* **1**, 56-64.
- 4) Banuett, F., Hoyt, M. A., McFarlane, L., Echols, H., and Herskowitz, I. (1986): *hflB*, a new *E. coli* locus regulating lysogeny and the level of bacteriophage λ cII protein. *J. Mol. Biol.* **187**, 213-224.
- 5) Bard, P. N., Hall, L. M. C., and Coates, A. R. M. (1988): A Major antigen from *Mycobacterium tuberculosis* which is homologous to the heat shock proteins *groES* from *E. coli* and the *htrA* gene product of *Coxiella burnetii*.
- 6) Bardwell, J. C. A. and Craig, E. A. (1984): Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 848-852.
- 7) Bardwell, J. C. A. and Craig, E. A. (1987): Eukaryotic Mr83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **84**, 5177-5181.
- 8) Bardwell, J. C. A. and Craig, E. A. (1988): Ancient heat shock gene is dispensable. *J. Bacteriol.* **170**, 2977-2983.
- 9) Bardwell, J. C. A., Tilly, K., Craig, E. A., King, J., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1986): The nucleotide sequence of *Escherichia coli* K-12 *dnaJ* gene, a gene that encodes a heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 1782-1785.

- 10) Bloom, M., Skelly, S., VanBogelen, R. A., Neidhardt, F. C., Brot, N., and Weissbach, H. (1986) : In vitro effect of the *Escherichia coli* heat shock regulatory protein on expression of heat shock genes. *J. Bacteriol.* **166**, 380-384.
- 11) Bochner, B. R., Lee, P. C., Wilson, S. W., Cutler, C. W., and Ames, B. N. (1984) : AppppA and related adenylylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidation stress. *Cell.* **37**, 225-232.
- 12) Bochner, B. R., Zylitz, M., and Georgopoulos, C. (1986) : *Escherichia coli* DnaK protein possesses a 5'-nucleotidase activity that is inhibited AppppA. *J. Bacteriol.* **168**, 931-935.
- 13) Bukau, B. and Walker, G. (1989) : Cellular defects caused by deletion of the *Escherichia coli* *dnaK* gene indicate roles for heat shock protein in normal metabolism. *J. Bacteriol.* **171**, 2337-2346.
- 14) Burton, Z., Burgess, R. R., Lin, J., Moore, D., Holder, S., and Gross, C. A. (1981) : The nucleotide sequence of the cloned *rpoD* gene for the RNA polymerase sigma subunit from *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2899-2903.
- 15) Chandrasekhar, G. N., Tilly, K., Woolford, C., Hendrix, R., and Georgopoulos, C. (1986) : Purification and properties of the *groES* morphogenetic protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **261**, 12414-12419.
- 16) Charette, M. F., Henderson, G. W., and Markovitz, A. (1981) : ATP hydrolysis-dependent protease activity of the *lon* (*capR*) protein of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **78**, 4728-4732.
- 17) Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S., and Ames, B. N. (1985) : Positive control of regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell.* **41**, 753-762.
- 18) Chung, C. H. and Goldberg, A. L. (1981) : The product of the *lon* (*capR*) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **78**, 4391-4395.
- 19) Cooper, S. and Ruettinger, R. (1975) : A temperature sensitive nonsense mutation affecting the synthesis of a major protein of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **139**, 167-176.
- 20) Cowing, D. W., Bardwell, J. C. A., Craig, E. A., Woolford, C., Hendrix, R. W., and Gross, C. A. (1985) : Consensus sequence for *Escherichia coli* heat-shock promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 2679-2683.
- 21) Drahos, D. J. and Hendrix, R. W. (1982) : Effect of bacteriophage lambda infection on the synthesis of *groE* protein and other *Escherichia coli* proteins. *J. Bacteriol.* **149**, 1050-1063.
- 22) Dudani, A. K. and Gupta, R. S. (1989) : Immunological characterization of a human homolog of the 65-kilodalton Mycobacterial antigen. *Infect. Immun.* **57**, 2786-2793.
- 23) Engers, H. D., Houba, V., Bennedsen, J., Buchanan, T. M., Chaparas, S. D., Kadival, G., Closs, O., David, J. R., van Embden, J. D. A., Godal, T., Mustafa, S. A., Ivaniyi, J., Young, D. B., Kaufmann, S. H., Khomenko, A. G., Kolk, A. H. J., Kubin, M., Louis, J. A., Minden, P., Schnnick, T. M., Trnka, L., and Young, R. A. (1986) : Results of a World Health Organization-sponsored workshop to characterize antigens recognized by monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **51**, 718-720.
- 24) Erickson, J. W., Vaughn, V., Neidhardt, F. C., and Gross, C. A. (1987) : Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes and Development.* **1**, 419-432.
- 25) Fayet, O., Louarn, J. M., and Georgopoulos, C. (1986) : Suppression of the *Escherichia coli* *dnaA* 46 mutation by amplification of the *groES* and *groEL* genes. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 435-445.
- 26) Fayet, O., Ziegelhoffer, T., and Georgopoulos, C. (1989) : The *groES* and *groEL* heat shock gene products for *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J. Bacteriol.* **171**, 1379-1385.
- 27) Friedman, D. I., Olson, E. R., Tilly, K., Georgopoulos, C., Herskowitz, I., and Banuett, F. (1984) : Interaction of bacteriophage and host macromolecules in the growth of bacteriophage lambda. *Microbiol. Review.* **48**, 299-325.
- 28) Fujita, N. and Ishihama, A. (1987) : Heat shock induction of RNA polymerase sigma-32 synthesis in *Escherichia coli* : Transcriptional control and a multiple promoter system. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 10-15.
- 29) Furth, M. E. and Wickner, S. H. (1983) : Lambda DNA replication in Lambda II (Hendrix, R. W., Roberts, J. W., Stahl, F. W. and Weisberg, R. A., eds.) pp 145-173 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 30) Garsia, R., Hellqvist, L., Booth, R. J., Radford, A. J., Britton, W. J., Astbury, L., Trent, R. J., and Basten, A. (1989) : Homology of the 70-kilodalton antigens from *Mycobacterium leprae* and *Myco-*

- bacterium bovis* with the *Mycobacterium tuberculosis* 71-kilodalton antigen and with the conserved heat shock protein 70 of eucaryotes. *Infect. Immun.* **57**, 204-212.
- 31) Gayda, R. C., Stephens, P. E., Hewick, R., Schoemaker, J. M., Dreyer, W. J., and Markovitz, A. (1985): Regulatory region of the heat shock-inducible *capR* (*lon*) gene: DNA and protein sequences. *J. Bacteriol.* **162**, 271-275.
 - 32) Georgopoulos, C. P. (1977): A bacterial gene (*groPC*) which affects lambda DNA replication. *Mol. Gen. Genet.* **151**, 35-39.
 - 33) Georgopoulos, C. P. and Eisen, H. (1974): Bacterial mutants which block phage assembly. *J. Supramol. Struct.* **2**, 349-359.
 - 34) Georgopoulos, C. P. and Herskowitz, I. (1971): *Escherichia coli* mutants blocked in lambda DNA synthesis, p 553-564. In A. D. Hershey (ed.), *The bacteriophage lambda* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 - 35) Georgopoulos, C. P. and Hohn, B. (1978): Identification of a host protein necessary for bacteriophage morphogenesis (the *groE* product). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 131-135.
 - 36) Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Casjens, S. R., and Kaiser, A. D. (1973): Host participation in the bacteriophage lambda head assembly. *J. Mol. Biol.* **76**, 45-60.
 - 37) Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Kaiser, A. D., and Wood, W. B. (1972): Role of the host cell in morphogenesis: effect of a bacterial mutation on T4 head assembly. *Nature (London) New Biol.* **239**, 38-41.
 - 38) Georgopoulos, C., Tilly, K., and Casjens, S. (1983): Lambdoid phage head assembly in Lambda II (Hendrix, R. W., Roberts, J. W., Stahl, F. W. and Weisberg, R. A., eds.) pp 279-304. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 - 39) Georgopoulos, C., Tilly, K., Drahos, D., and Hendrix, R. (1982): The B66.0 protein of *Escherichia coli* is the product of the *dnaK*⁺ gene. *J. Bacteriol.* **149**, 1175-1177.
 - 40) Goff, S. A., Casson, L. P., and Goldberg, A. L. (1984): Heat shock regulatory gene *htpR* influences rates of protein degradation and expression of the *lon* gene in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **81**, 6647-6651.
 - 41) Goll, S. A. and Goldberg, A. L. (1985): Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell.* **41**, 587-595.
 - 42) Gross, C. A., Grossman, A. D., Liebke, H., Walten, W., and Burgess, R. R. (1984): Effects of the mutant sigma *rpoD800* on the synthesis of specific macromolecular components of the *Escherichia coli* K-12 cell. *J. Mol. Biol.* **172**, 283-300.
 - 43) Grossman, A. D., Cowing, D., Erickson, J., Baker, T., Zhou, Y. N., and Gross, C. (1985): Analysis of *Escherichia coli* heat shock response, p. 327-331. In L. Leive (ed.), *Micobiology-1985*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 - 44) Grossman, A. D., Erickson, J. W., and Gross, C. A. (1984): The *htpR* gene product of *Escherichia coli* is a sigma factor heat shock promoters. *Cell* : 383-390.
 - 45) Grossman, A. D., Straus, D. B., Walter, W. A., and Gross, C. A. (1987): σ^{32} synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes and Development.* **1**, 179-184.
 - 46) Grossman, A. D., Tayler, W. E., Burton, Z. F., Burgess, R. R., and Gross, C. A. (1985): Stringent response in *Escherichia coli* induces expression of heat shock protein. *J. Mol. Biol.* **186**, 357-365.
 - 47) Grossman, A. D., Zhou, Y. N., Gross, C., Heilig, J. Christie, G. E., and Calendar, R. (1985): Mutation in the *rpoH*(*htpR*) gene of *Escherichia coli* K-12 phenotypically suppress a temperature-sensitive mutant defective in the σ^{70} subunit of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **161**, 939-943.
 - 48) Hemmingsen, S. M., Woolfold, C., van der Vies, S. M., Tilly, K., Dennis, D. T., Georgopoulos, C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Hendrix, R. W., and Ellis, R. J. (1988): Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* **333**, 330-334.
 - 49) Hendrix, R. W. (1979): Purification and properties of *groE*, a host protein involved in bacteriophage assembly. *J. Mol. Biol.* **129**, 375-392.
 - 50) Herendeen, S. L., VanBogelen, R. A., and Neidhardt, F. C. (1979): Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperature. *J. Bacteriol.* **139**, 185-194.
 - 51) Hindersson, P., Knudson, J. D., and Axelsen, N. H. (1987): Cloning and expression of *Treponema pallidum* common antigen (Tp-4) in *E. coli* K-12. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 587-596.
 - 52) Hirshfield, I. N., Tenreiro, R. A., Vanbogelen, R. A., and Neidhardt, F. C. (1984): A lysyl-transfer RNA synthetase mutant of *Escherichia coli* K-12 with a novel reversion pattern. *J. Bacteriol.* **158**, 615-620.
 - 53) Horn, T., Horn, B., Engel, A., Wurz, M., and

- Smith, P. R. (1979) : Isolation and characterization of the host protein *groE* involved in bacteriophage lambda assembly. *J. Mol. Biol.* **129**, 359-373.
- 54) Hunt, C. and Morimoto, R. (1985) : Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 6455-6459.
- 55) Ingraham, J. (1987) : Effect of temperature, pH, water activity, and pressure on growth. p. 1543-1554. *In* Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schechter, M., and Umberger, H. E. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 56) Itikawa, H. and Ryu, J. I. (1979) : Isolation and characterization of a temperate-sensitive *dnaK* mutant of *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.* **138**, 339-344.
- 57) Jenkins, A. J., March, J. B., Oliver, I. R., and Masters, M. (1986) : A DNA fragment containing the *groEL* genes can suppress mutations in the *Escherichia coli dnaA* gene. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 446-454.
- 58) Johnson, C., Chandrasekhar, G. N., and Georgopoulos, C. (1989) : *Escherichia coli* DnaK and GrpE heat shock proteins interact both *in vivo* and *in vitro*. *J. Bacteriol.* **171**, 1590-1596.
- 59) Kaufman, S. H., Vath, U., Thole, J. E. R., van Embden, J. D. A., and Emmrich, F. (1987) : Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. *Eu. J. Immunol.* **17**, 351-357.
- 60) Kochan, J., Carrascosa, L., and Murialdo, H. (1984) : Bacteriophage lambda preconnectors. Purification and structure. *J. Mol. Biol.* **174**, 433-447.
- 61) Kochcan, J. and Murialdo, H. (1982) : Stimulation of *groE* synthesis in *Escherichia coli* by bacteriophage lambda infection. *J. Bacteriol.* **149**, 1166-1170.
- 62) Krueger, J. H. and Walker, G. (1984) : *groEL* and *dnaK* genes of *Escherichia coli* are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an *htpR*⁺-dependent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 1499-1503.
- 63) Lamb, F. I., Kingston, A. E., Estrada, G. I., and Colston, M. J. (1988) : Heterologous expression of the 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium leprae* and murine T-cell responses to the gene product. *Infec. Immun.* **56**, 1237-1241.
- 64) Landick, R. V., Vaughn, V., Lau, E. T., Van-Bogelen, J. W., Erickson, J. W., and Neidhardt, F. C. (1984) : Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *E. coli* suggests its protein product may be a transcription factor. *Cell.* **38**, 175-182.
- 65) Lebowitz, J., Zylicz, M., Georgopoulos, C., and McMacken, R. (1985) : Initiation of DNA replication on single-stranded DNA templates catalyzed by purified replication proteins of bacteriophage λ and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 3988-3992.
- 66) Lee, P. C., Bochner, B. R., and Ames, B. N. (1983) : AppppA, heat-shock stress and cell division. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **80**, 7496-7500.
- 67) Lemaux, P. G., Herendeen, S. L., Bloch, P. L., and Neidhardt, F. C. (1978) : Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell.* **13**, 427-434.
- 68) Lesley, S. A., Thompson, N. E., and Burgess, R. R. (1987) : Studies of the *Escherichia coli* heat shock regulatory protein σ^{32} by the use of monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **262**, 5404-5407.
- 69) Liberek, K., Georgopoulos, C., and Zylicz, M. (1988) : Role of the *Escherichia coli* DnaK and DnaJ heat shock proteins in the initiation of bacteriophage λ DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 6632-6636.
- 70) Lindquist, S. (1986) : The heat shock response. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 1151-1191.
- 71) Lindquist, S. and Craig, E. A. (1988) : THE HEAT-SHOCK PROTEINS. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631-677.
- 72) Lipinska, B., King, J., Ang, D., and Georgopoulos, C. (1988) : Sequence analysis and transcriptional regulation of the *Escherichia coli grpE* gene, encoding a heat shock protein. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7545-7562.
- 73) Lipinska, B., Fayet, O., Baird, L. and Georgopoulos, C. (1989) : Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli htrA* gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperature. *J. Bacteriol.* **171**, 1574-1584.
- 74) Lipinska, B., Sharma, S., and Georgopoulos, C. (1988) : Sequence analysis and regulation of *Escherichia coli* : a σ^{32} -independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10053-10067.
- 75) Matsubara, K. (1981) : Replication control system

- in lambda dv. Plasmid **5**, 32-52.
- 76) Maurizi, M. R., Trisler, P., and Gottesman, S. (1985) : Insertional mutagenesis of the *lon* gene in *Escherichia coli* : *lon* is dispensable. J. Bacteriol. **164**, 1124-1135.
 - 77) McMacken, R., Alfano, C., Gomes, B., LeBorwitz, J. H., Mensa-Wilmot, K., Robert, J. D., and Wold, M. (1987) : In McMacken, R. and Kelly, T. (eds.), Mechanism of DNA replication and recombination. UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. Ser., Alan R. Liss, New York Vol. 47. pp 227-246.
 - 78) McMullin, T. W. and Hallberg, R. L. (1988) : A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia coli* *groEL* gene. Mol. Cell. Biol. **8**, 371-380.
 - 79) Mirkin, S. M., Bagdanova, E. S., Gorlenko, Z. M., Gragenov, A. I., and Larionovo, O. A. (1979) : DNA supercoiling and transcription *Escherichia coli* : influence of RNA polymerase mutations. Mol. Gen. Genet. **177**, 169-175.
 - 80) Mizusawa, S. and Gottesman, S. (1983) : Protein degradation in *Escherichia coli* : the *lon* gene controls the stability of *sulA* protein. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **80**, 358-362.
 - 81) Mustafa, A. S., Gill, H. K., Nerland, A., Britton, W. J., Mehra, V., Bloom, B. R., Young, R. A., and Godal, T. (1986) : Human T-cell clones recognize a major *M. leprae* protein antigen expressed in *E. coli*. Nature. **319**, 63-66.
 - 82) Neidhardt, F. C., Phillips, T. A., VanBogelen, R. A., Smith, M. W., Geogalis, Y., and Subramanian, A. R. (1981) : Identity of the B56.5 protein, the A-protein, and the *groE* gene product of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **145**, 513-520.
 - 83) Neidhardt, F. C. and VanBogelen, R. A. (1981) : Positive regulatory gene for temperature-controlled proteins in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **100**, 894-900.
 - 84) Neidhardt, F. C. and VanBogelen, R. A. (1987) : Heat shock response. p 1334-1345. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 - 85) Neidhardt, F. C., VanBogelen, R. A., and Lau, E. T. (1983) : Molecular cloning and expression of a gene that controls the high-temperature regulon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **153**, 597-603.
 - 86) Neidhardt, F. C., VanBogelen, R. A., and Vaughn, V. (1984) : The genetics and regulation of heat-shock proteins. Ann. Rev. Genet. **18**, 295-329.
 - 87) Nerland, A. H., Mustafa, A. S., Sweetser, D., Godal, T., and Young, R. A. (1988) : A protein antigen of *Mycobacterium leprae* is related to a family of small heat shock proteins. J. Bacteriol. **170**, 5919-5921.
 - 88) Oftung, F., Mustafa, A. S., Hussien, R., Young, R. A., and Godal, T. (1987) : Human T cell clones recognize two abundant *Mycobacterium tuberculosis* protein antigens expressed in *Escherichia coli*. J. Immunol. **138**, 927-931.
 - 89) Ogata, S., Kanamori, M., Yamaguchi, H., and Taguchi, H. (1987) : Properties of a protein antigen common to *Yersinia enterocolitica* and other gram-negative bacteria. Contrib. Microbiol. Immunol. **9**, 201-212.
 - 90) Ohki, M., Tamura, F., Nishimura, S., and Uchida, H. (1986) : Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *dnaJ* gene and purification of the gene product. J. Biol. Chem. **261**, 1778-1781.
 - 91) Ohki, M., Uchida, H., Tamura, F., Ohki, R., and Nishimura, S. (1987) : The *E. coli* *dnaJ* mutations affecting biosynthesis of certain proteins including the *lac* operon proteins. J. Bacteriol. **169**, 1917-1922.
 - 92) Oldstone, M. B. A. (1987) : Molecular mimicry and autoimmune disease. Cell **50**, 819-820.
 - 93) Pellon, J. R. (1983) : Heat damage and repair in *Escherichia coli* nucleoid : kinetics based on sedimentation analysis. Rev. Esp. Fisiol. **39**, 321-326.
 - 94) Pelham, H. R. B. (1986) : Speculations on the functions of the heat shock and glucose-regulated proteins. Cell **46**, 959-961.
 - 95) Phillips, T. A., VanBogelen, R. A., and Neidhardt, F. C. (1984) : The *lon* (*capR*) gene product of *Escherichia coli* is a heat shock protein. J. Bacteriol. **159**, 237-287.
 - 96) Pushkin, A. V., Tsuprum, V. L., Solovjeva, N. A., Shubin, V. V., Evstigneeva, Z. G., and Kretovich, W. L. (1982) : High molecular weight pea leaf protein similar to *groE* protein of *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. **704**, 379-384.
 - 97) Ritossa, F. (1962) : A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experimentia **18**, 571-573.
 - 98) Saito, H., Nakamura, Y., and Uchida, H. (1978) : A transducing λ phage carrying *grpE*, a bacterial gene necessary for λ DNA replication, and two ribosomal protein genes, *rpsP* (S16) and *rplS* (L19). Mol. Gen. Genet. **165**, 247-256.
 - 99) Saito, H. and Uchida, H. (1977) : Initiation of the

- DNA replication of bacteriophage lambda in *Escherichia coli* K-12. J. Mol. Biol. **113**, 1-25.
- 100) Saito, H. and Uchida, H. (1978) : Organization and expression of the *dnaJ* and *dnaK* genes of *Escherichia coli* K-12. Mol. Gen. Genet. **164**, 1-8.
 - 101) Sakakibara, Y. (1988) : The *dnaK* gene of *Escherichia coli* functions in initiation of chromosome replication. J. Bacteriol. **170**, 972-979.
 - 102) Schinnick, T. M. (1987) : The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. **169**, 1080-1088.
 - 103) Shinnick, T. M., Vodkin, M. H., and William, J. C. (1988) : The *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the *Escherichia coli* GroEL protein. Infect. Immun. **56**, 446-451.
 - 104) Schlesinger, M. T., Ashburner, M., and Tissieres, A. (eds.) (1982) : HEAT SHOCK from Bacteria to Man. Cold Spring Harbor Lab.
 - 105) Spence, J. and Georgopoulos, C. (1989) : Purification and properties of the *Escherichia coli* heat shock protein, HtpG. J. Biol. Chem. **264**, 4398-4403.
 - 106) Strauch, K. L. and Beckwith, J. (1988) : An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85**, 1576-1580.
 - 107) Straus, D. B., Walter, W. A., and Gross, C. A. (1987) : The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . Nature **329**, 348-351.
 - 108) Sunshine, M., Feiss, M., Stuart, J., and Yochem, J. (1977) : A new host gene (*groPC*) necessary for lambda DNA replication. Mol. Gen. Genet. **151**, 27-34.
 - 109) Takano, T. and Kakefuda, T. (1972) : Involvement of a bacterial factor in morphogenesis of bacteriophage capsid. Nature (London) New Biol. **239**, 34-37.
 - 110) Taylor, W. E., Straus, D. E., Grossman, A. D., Burton, Z. F., Gross, C. A., and Burgess, R. (1984) : Transcription from a heat-inducible promoter causes heat shock regulation of the sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. Cell. **38**, 371-381.
 - 111) Tilly, K., Chandrasekhar, G. N., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1985) : Relationship between the bacterial heat shock response and bacteriophage lambda growth, p 322-326. In L. Leive (ed.) Microbiology-1985. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 - 112) Tilly, K., Erickson, J., Sharma, S., and Georgopoulos, C. (1986) : Heat shock regulatory gene *rpoH* mRNA level increase after heat shock in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **168**, 1155-1158.
 - 113) Tilly, K. and Georgopoulos, C. (1982) : Evidence that the two *Escherichia coli* *groE* morphogenetic gene products interact *in vivo*. J. Bacteriol. **149**, 1082-1088.
 - 114) Tilly, K., McKittrick, N., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1983) : The *dnaK* protein modulates the heat-shock response of *Escherichia coli*. Cell. **34**, 641-646.
 - 115) Tilly, K., Muliardo, H., and Georgopoulos, C. (1981) : Identification of a second *Escherichia coli* *groE* gene whose product is necessary for bacteriophage morphogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **78**, 1629-1633.
 - 116) Tilly, K., Spence, J., and Georgopoulos, C. (1989) : Modulation of stability of the *Escherichia coli* heat shock regulatory factor σ^{32} . J. Bacteriol. **171**, 1585-1589.
 - 117) Tilly, K., VanBogelen, R. A., Georgopoulos, C., and Neidhardt, F. C. (1983) : Identification of the heat-inducible protein C15.4 as the *groES* gene product in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **154**, 1505-1507.
 - 118) Tissieres, A., Mitchell, H. K., and Tracy, U. (1974) : Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosomal puffs. J. Mol. Biol. **84**, 389-398.
 - 119) Travers, A. A. and Mase, H. A. F. (1982) : The heat shock phenomenon in bacteria-a protection against DNA relaxation, p. 127-130. In M. Schlesinger, Ashburner, M. and Tissieres, A. (ed.) Heat shock from bacteria to man. Cold Spring Harbor, N. Y.
 - 120) Tsuchido, T., VanBogelen, R. A., and Neidhardt, F. C. (1986) : Heat shock response in *Escherichia coli* influences cell division. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**, 6959-6963.
 - 121) VanBogelen, R. A., Acton, M. A., and Neidhardt, F. C. (1987) : Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli*. Genes and Development **1**, 525-531.
 - 122) VanBogelen, R. A., Kelley, P. M., and Neidhardt, F. C. (1987) : Differential induction of heat-shock, SOS, and oxidation-stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **169**, 26-32.
 - 123) VanBogelen, R. A., Vaughn, A. V., and Neidhardt, F. C. (1983) : Gene for heat-inducible lysyl-tRNA synthetase (*lysU*) maps near *cadA* in *Escherichia*

- coli*. J. Bacteriol. **153**, 1066–1068.
- 124) Vodkin, M. H. and Williams, J. C. (1988) : A heat shock operon in *Coxiella burnetii* produces a major antigen homologous to a protein in both *Mycobacteria* and *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **170**, 1227–1234.
 - 125) Wada, M. and Itikawa, H. (1984) : Participation of *Escherichia coli* K-12 *groE* gene products in the synthesis of cellular DNA and RNA. J. Bacteriol. **157**, 694–696.
 - 126) Waghorne, C. and Fuerst, C. R. (1985) : Identification of a temperature-sensitive mutation in the *htpR* (*rpoH*) gene of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **164**, 960–963.
 - 127) Waghorne, C. and Fuerst, C. R. (1985) : Involvement of the *htpR* gene product of *Escherichia coli* in phage lambda development. Virology. **141**, 51–64.
 - 128) Wang, Q. and Kaguni, J. M. (1989) : A novel sigma factor is involved in expression of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **171**, 4248–4253.
 - 129) Wang, Q. and Kaguni, J. M. (1989) : *dnaA* protein regulates transcription of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **264**, 7338–7344.
 - 130) Willem, E., Joseph, H., Zvi, N., Ayalla, F., Avraham, K., and Irun, C. R. (1985) : Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and to cartilage proteoglycans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**, 5117–5120.
 - 131) Yamaguchi, H., Taguchi, H., Katsuya, T., Kumada, J., Uekusa, T., and Ogata, S. (1989) : Purification of cross-reacting protein antigen shared by *Yersinia enterocolitica* and other gram-negative bacteria with monoclonal antibody. Microb. Immunol. **33**, 683–689.
 - 131a) Yamaguchi, H., Yamamoto, T., Taguchi, H., and Ogata, S. (1990) : *Yersinia enterocolitica* immunodominant 60-kilodalton antigen, common to a broad range of bacteria, is a heat shock protein. J. Gen. Microbiol. **136**, in press.
 - 132) Yamamori, T., Ito, K., Nakamura, Y., and Yura, T. (1978) : Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. J. Bacteriol. **134**, 1133–1140.
 - 133) Yamamori, T., Osawa, T., Tobe, T., Ito, K., and Yura, T. (1982) : *Escherichia coli* gene (*hin*) controls transcription of heat-shock operons and cell growth at high temperatures. p. 131–137. In Schlessinger, M., Ashburner, M., and Tissieres (ed.), Heat shock from bacteria to man. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
 - 134) Yamamori, T. and Yura, T. (1980) : Temperature-induced synthesis of specific proteins in *Escherichia coli* : evidence for transcriptional control. J. Bacteriol. **142**, 843–851.
 - 135) Yamamori, T. and Yura, T. (1982) : Genetic control of heat-shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **79**, 860–864.
 - 136) Yamamoto, T., McIntyre, J., Sell, S. M., Georgopoulos, C., Skowrya, D., and Zylicz, M. (1987) : Enzymology of the pre-priming steps in λ dv DNA replication *in vitro*. J. Biol. Chem. **262**, 7996–7999.
 - 137) 山本友子, 山口博之, 田口晴彦, 桂 卓也, 緒方幸雄 (1990) : *Mycoplasma pneumoniae* の熱ショック応答と細菌共通抗原について. 日細菌誌 **45**, 286.
 - 138) Yochem, J., Uchida, H., Sunshine, M., Saito, H., and Georgopoulos, C. P. (1978) : Genetic analysis of two genes, *dnaJ* and *dnaK*, necessary for *Escherichia coli* and bacteriophage lambda DNA replication. Mol. Gen. Genet. **164**, 9–14.
 - 139) Young, D., Lathigra, R., Hendrix, R., Sweetser, D., and Young, R. A. (1988) : Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85**, 4267–4270.
 - 140) Young, D., Lathigra, R., and Mehler, A. (1989) : Stress-induced proteins as antigens in infectious diseases. p. 275–285. In UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology New Series, vol. 96. Stress-induced proteins (Pardue, M. L., Feramisco, J. R. and Lindquist, S. eds.) Alan R. Liss, Inc., New York.
 - 141) Yura, T., Tobe, T., Ito, K., and Osawa, T. (1984) : Heat shock regulatory gene (*htpR*) of *Escherichia coli* is required for growth at high temperature but is dispensable at low temperature. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **81**, 6803–6807.
 - 142) Zhou, Y.-N., Kusukawa, N., Erickson, J., Gross, C. A., and Yura, T. (1988) : Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor σ^{32} . J. Bacteriol. **170**, 3640–3649.
 - 143) Zylicz, M., Ang, D., and Georgopoulos, C. (1987) : The *grpE* protein of *Escherichia coli*. Purification and properties. J. Biol. Chem. **262**, 17437–17442.
 - 144) Zylicz, M., Ang, D., Liberek, K., Yamamoto, T., and Georgopoulos, C. (1988) : Initiation of lambda DNA replication reconstituted with purified lambda and *Escherichia coli* replication proteins. Biochem. Biophys. Acta **951**, 344–350.
 - 145) Zylicz, M. and Georgopoulos, C. (1984) : Purifica-

- tion and properties of the *Escherichia coli* *dnaK* replication protein. J. Biol. Chem. **259**, 8820-8825.
- 146) Zylicz, M., LeBowitz, J., McMacken, M., and Georgopoulos, C. (1983): The *dnaK* protein of *Escherichia coli* possesses an ATPase and autophosphorylation activity and is essential in an in vitro DNA replication system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **80**, 6431-6435.
- 147) Zylicz, M., Yamamoto, T., McKittrick, N., Sell, S., and Georgopoulos, C. (1985): Purification and properties of the *dnaJ* replication protein of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **260**, 7591-7598.