

博士論文

熱ショック蛋白質HSP90の機能

宮田 愛彦

①

博士論文

熱ショック蛋白質HSP90の機能：
複合体形成によるステロイド受容体
及びカゼインキナーゼIIの機能制御

宮田 愛彦

東京都臨床医学総合研究所
細胞生物学研究部門

目次

《略号》

《要旨》

- I. 熱ショック蛋白質HSP90 ----- 5
- II. グルココルチコイド受容体・HSP90複合体と ----- 5
アクチン繊維との結合
- III. カゼインキナーゼIIとHSP90との複合体形成と ----- 6
その生理的意義

《序章》熱ショック蛋白質HSP90と結合する蛋白質

- [0. 0: 熱ショック応答と熱ショック蛋白質] ----- 11
- [0. 1: 90-kDa 熱ショック蛋白質HSP90 ----- 12
- [0. 2: HSP90と細胞質受容体との複合体形成] ----- 13
- [0. 3: HSP90と癌遺伝子産物との複合体形成] ----- 14
- [0. 4: HSP90と細胞骨格との相互作用] ----- 15
- [0. 5: カゼインキナーゼII] ----- 16
- [0. 6: 細胞増殖・細胞周期とカゼインキナーゼII] ----- 17

《第1章》HSP90を介する

細胞質グルココルチコイド受容体とアクチン繊維との結合

- [1. 1: 方法] ----- 21
- [1. 1. 1: 材料]

- [1. 1. 2: バッファー及び細胞]
- [1. 1. 3: 蛋白質]
- [1. 1. 4: 抗体]
- [1. 1. 5: グルココルチコイド受容体のリガンド結合解析]
- [1. 1. 6: アクチンを含まないグルココルチコイド受容体の
粗精製]
- [1. 1. 7: 細胞粗抽出液の調製]
- [1. 1. 8: グルココルチコイド受容体のTAAによる標識]
- [1. 1. 9: ショ糖密度勾配遠心法]
- [1. 1. 10: グルココルチコイド受容体と
アクチン繊維との結合の解析]

[1. 2: 結果] ----- 25

- [1. 2. 1: 細胞粗抽出液中で、グルココルチコイド受容体は
内在性及び外来性のアクチン繊維と共沈する]
- [1. 2. 2: 8S-GCRはアクチン繊維と結合するが
4S-GCRは結合しない]
- [1. 2. 3: 粗精製GCRはアクチン繊維と結合する]
- [1. 2. 4: 8S-GCRとアクチン繊維との結合に対する、
精製HSP90、トロポミオシン、
及びCa²⁺-カルモジュリンの影響]

《第2章》HSP90とカゼイン

キナーゼIIの複合体形成と

その生理的意義

[2. 1: 方法] ----- 37

- [2. 1. 1: ペプチド]
- [2. 1. 2: バッファー及び細胞]

- [2. 1. 3 : ブタ精巢からのCK IIの精製]
- [2. 1. 4 : HSP 90の精製]
- [2. 1. 5 : L細胞粗抽出液の調製]
- [2. 1. 6 : 抗体]
- [2. 1. 7 : HSP 90及び結合蛋白質の免疫沈降]
- [2. 1. 8 : CK II活性の測定]
- [2. 1. 9 : ショ糖密度勾配遠心法]
- [2. 1. 10 : SDS-PAGE後にrenatureしたSDS-ポリアクリル
アミドゲル内でのCK II活性の測定
(活性ゲル内リン酸化法)]
- [2. 1. 11 : HSP 90のCK IIによるリン酸化]
- [2. 1. 12 : メンブレンオーバーレイによるHSP 90と
CK IIの結合の解析]

[2. 2 : 結果] ----- 43

- [2. 2. 1 : HSP 90をリン酸化するキナーゼが
HSP 90と共精製される]
- [2. 2. 2 : HSP 90と共精製されるキナーゼ
はカゼインキナーゼIIである]
- [2. 2. 3 : 細胞粗抽出液中でのCK IIと
HSP 90の複合体形成]
- [2. 2. 4 : HSP 90はin vitroでCK IIと
複合体を形成してCK IIの多量体を解離する]
- [2. 2. 5 : HSP 90は上記の複合体形成に伴って
CK IIを活性化する]
- [2. 2. 6 : HSP 90はCK IIの触媒サブユニットである
 α に特異的に結合する]
- [2. 2. 7 : CK II-HSP 90複合体形成に対する
塩濃度・温度の影響]

《第3章》 考察

[3. 1 : 細胞骨格とHSP90の相互作用とステロイドホルモンの生理作用] ----- 61

[3. 1. 1 : HSP90・ステロイドホルモン受容体複合体と細胞骨格の相互作用]

[3. 1. 2 : ステロイドホルモン受容体のアンカリングシステムとしてのHSP90]

[3. 1. 3 : ステロイドホルモン受容体の細胞内局在とHSP90]

[3. 2 : カゼインキナーゼIIとHSP90との相互作用] ----- 66

[3. 2. 1 : CKIIとHSP90の複合体形成]

[3. 2. 2 : CKII-HSP90複合体の*in vitro*での再構成]

[3. 2. 3 : CKII-HSP90複合体形成に必要なHSP90の濃度]

[3. 2. 4 : HSP90-CKII複合体形成に対する温度と塩濃度の影響]

[3. 2. 5 : CKIIのサブユニット構成とHSP90との複合体形成]

[3. 2. 6 : HSP90によるキナーゼの活性化]

[3. 2. 7 : CKIIのHSP90による活性化の生理的意義]

[3. 3 : HSP90と複合体を形成する他の蛋白質] ----- 70

《文献》 ----- 75

《謝辞》 ----- 82

《各号》

ATP : adenosine 5'-triphosphate
BSA : bovine serum albumin
CBB : Coomassie Brilliant Blue R-250
CKII : casein kinase II
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT : dithiothreitol
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
EGF : epidermal growth factor
EGTA : [ethylenebis(oxyethylenitrilo)]tetraacetic acid
eIF2 α : eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit
FCS : fetal calf serum
GCR(s) : glucocorticoid receptor(s)
GRP : glucose-regulated protein
GTP : guanosine 5'-triphosphate
Hepes : 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HRE : hormone-responsive element
HRP : horseradish peroxidase
HSP(s) : heat shock protein(s)
IGF-I : insulin like growth factor-I
KLH : keyhole limpet hemocyanin
MEM : minimum essential medium
Mops : 3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
PBS : phosphate-buffered saline
Pipes : piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF : polyvinylidene difluoride
SDS : sodium dodecyl sulfate
SHR : steroid hormone receptor
TAA : triamcinolone acetonide
TBS : Tris-buffered saline
TCA : trichloroacetic acid
TFA : trifluoroacetic acid
Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

《要旨》

Ⅰ 熱ショック蛋白質(HSP)90

生物は1個の細胞から臓器、個体、社会集団に至るまで、さまざまなレベルで環境の温度の影響を受ける。細胞を通常より数度高い温度に曝す熱ショックにより誘起される最も顕著な反応は、通常の蛋白質合成が阻害されるとともに熱ショック蛋白質(HSP)群の合成が上昇する、いわゆる熱ショック応答である。多くのHSPは通常でも細胞内に比較的高い濃度で構成的に存在しており、HSPは非ストレス時でも細胞の増殖・生存に必要な機能を担っていると考えられる。

分子量90Kの主要な熱ショック蛋白質であるHSP90は酵母からヒトに至る生物の細胞に普遍的にかつ比較的多量に存在している、酵母で必須の蛋白質であるが、その機能に関しては未解決の問題が多い。HSP90は様々な細胞内機能蛋白質と複合体を形成することが知られている。ターゲットとなる蛋白質の中にはグルココルチコイド受容体等のステロイドホルモン受容体やpp60^{v-src}等の癌遺伝子産物、またアクチンやカルモジュリン等が含まれ、HSP90がターゲット蛋白質の細胞内局在や機能の制御に関与する可能性が考えられてきた。

Ⅱ グルココルチコイド受容体-HSP90複合体とアクチン繊維との結合

HSP90は一方でステロイド受容体等と複合体を形成してその細胞内局在や輸送に関与しており、また、アクチン繊維を介して細胞骨格系と相互作用していることになる。もし、HSP90分子の上で、機能蛋白質と複合体形成をする部分とアクチン繊維と結合する部分が異なっていれば、HSP90を含む機能蛋白質複合体がHSP90を介してアクチン繊維、ひいては細胞骨格系と相互作用し得ることになる。この事が実証されれば、これらの機能蛋白質の細胞内局在や輸送と、HSP90との複合体形成の生理的な意味との関連の一端が明らかとなるであろう。このような観点にたつて、まず、グルココルチコイド受容体-HSP90複合体が、果たしてHSP90を介してアクチン繊維と結合し得るかどうかを詳細に検討し、その生理的意義について検討を加えた。

要旨

グルココルチコイド受容体は特異的な放射性リガンド [^3H]triamcinolone acetoneide で標識して定量した。アクチンはウサギ骨格筋から精製して *in vitro* で重合させて用いた。低いイオン強度で調製した細胞粗抽出液中ではグルココルチコイド受容体は沈降係数8Sの、HSP90との複合体として存在していた。この8S複合体を標識して重合アクチンと *in vitro* で混合した後に超速心によって重合アクチンとそれと結合した蛋白質を回収したところ、8S-グルココルチコイド受容体はアクチン繊維と結合することが明らかとなった。HSP90を解離した4Sの受容体はアクチンと結合しなかった。これらの事実から、8Sのグルココルチコイド受容体はそのHSP90成分を介してアクチン繊維と結合することが示唆された。そこで、ラット肝臓からグルココルチコイド受容体をHSP90と複合体を形成したままで粗精製してアクチン繊維との結合を調べた。この場合でも8Sグルココルチコイド受容体はアクチン繊維と結合した。この時、アクチン繊維と結合したHSP90の量とグルココルチコイド受容体の量は良く相関していた。また、この結合は精製HSP90、精製トロポミオンによって強く阻害された。また、カルモジュリンは Ca^{2+} の存在下のみこの結合を阻害した。これらのデータは*in vitro*でのHSP90とアクチン繊維との結合の性質と良く一致していた。これらの結果を総合して考えて、8Sのグルココルチコイド受容体はその複合体中のHSP90成分を介してアクチンに結合することが結論された。8Sグルココルチコイド受容体は核移行シグナルを持つにもかかわらず細胞質に留まり、リガンド依存性に細胞質から細胞核に移行して情報伝達を行なう。ここで観察された結果は、ステロイドホルモン受容体を介する生理的な情報伝達におけるHSP90の密接な関与を示唆している。

Ⅲ. カゼインキナーゼⅡとHSP90との複合体形成とその生理的意義

カゼインキナーゼⅡは比較的早くから知られていたセリン/スレオニン特異的な蛋白質リン酸化酵素である。最近になってカゼインキナーゼⅡが細胞周期と細胞増殖の制御における核内への遺伝子発現調節シグナル伝達に深く関与することを示唆する報告が相次ぎ、カゼインキナーゼⅡの生理的機能とその活性

要旨

調節機構に対して大きな興味が持たれるようになった。しかし、細胞内でどのようにしてその活性が維持・制御されているかに関してはほとんど不明であった。精製したカゼインキナーゼIIは自己会合して大きな凝集体を作ることが報告されている。この自己会合は低イオン強度下で顕著であるが、生理的条件下でも観察されることから、カゼインキナーゼIIの活性や局在の制御に係わる可能性が考えられてきたが、これまではそれ以上の研究が進んでいなかった。

我々はHSP90の研究の過程で、精製HSP90画分に Mg^{2+} の存在下にATPを加えるとHSP90が強クリン酸化されることを見だし、おそらくHSP90を基質とする何らかのキナーゼがHSP90と複合体を形成して共精製されてくるのであろうと考えて、このキナーゼの同定と、細胞内での複合体形成の有無及びその生理的意義について検討した。このキナーゼは、その基質特異性、ヌクレオチドや2価金属イオンの要求性、ヘパリン感受性、ポリリジンによる活性化、フォスフォセルロースやヘパリンセファロースに対する強い親和性、また、分子量等の様々な性質からカゼインキナーゼIIであると同定された。ショ糖密度勾配遠心での沈降係数に対する抗体の効果によって、細胞粗抽出液中でカゼインキナーゼIIはHSP90と結合して沈降係数8Sの複合体を形成して存在していることを明らかにした。HSP90に対する抗体による免疫沈降によってHSP90と共にカゼインキナーゼIIが共沈降されることも判った。即ち、カゼインキナーゼIIはHSP90と複合体を形成して存在し、HSP90精製の過程で挙動を共にし、最終的に得られたHSP90画分中でHSP90をリン酸化したことが明らかとなった。

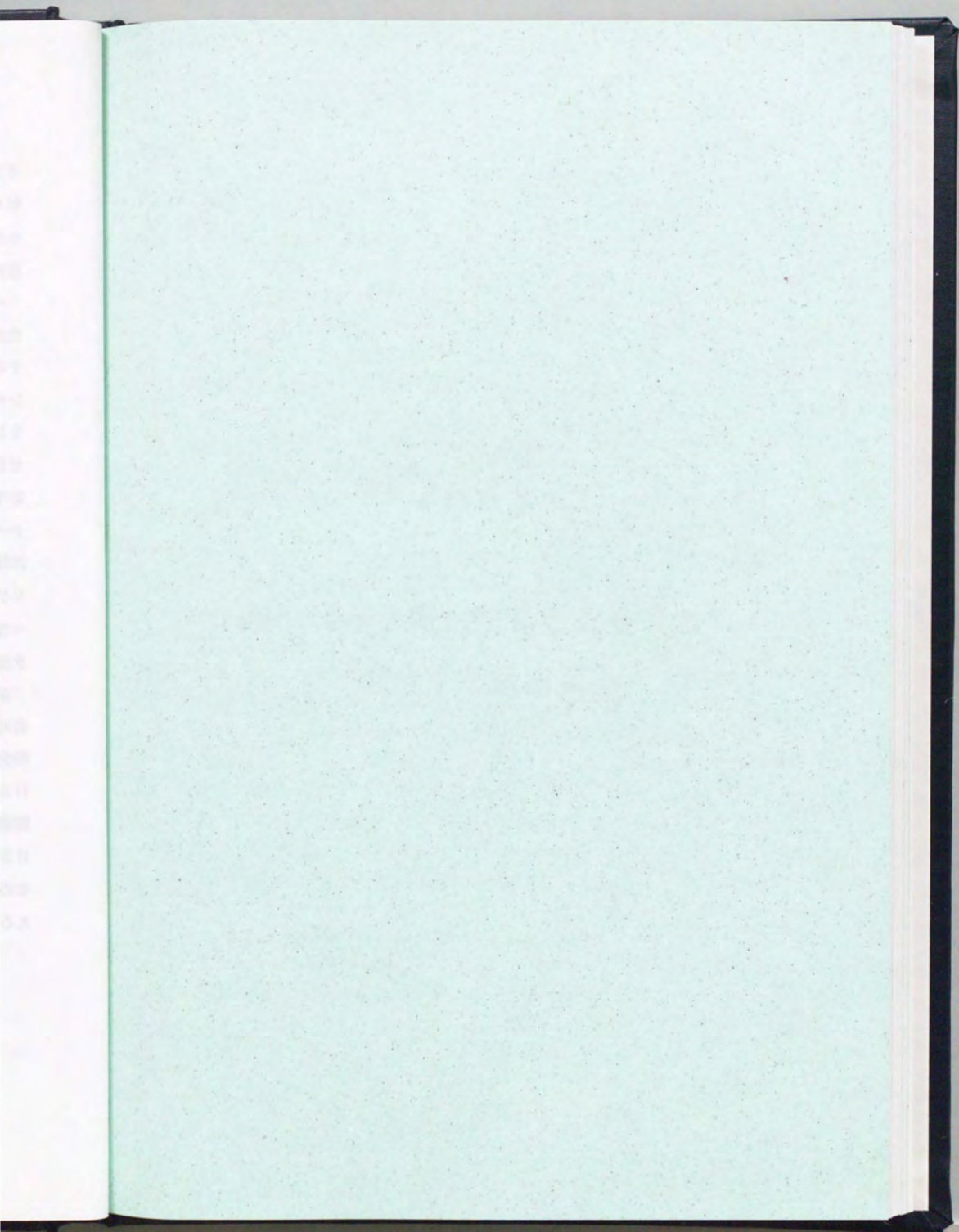
次いでHSP90と精製したカゼインキナーゼIIの両成分から*in vitro*でカゼインキナーゼII-HSP90複合体が再構成されるかを検討した。ブタ精巣からの精製カゼインキナーゼIIをHSP90の存在下・非存在下でインキュベートし、ショ糖密度勾配遠心法によって解析した。低イオン強度ではカゼインキナーゼIIは大きな多量体を形成した。このとき、HSP90を加えておくとカゼインキナーゼIIの多量体は解離して8SのHSP90・カゼインキナーゼII複合体が再構成された。また、HSP90とカゼインキナーゼIIとの結合はカゼ

要旨

インキナーゼIIの触媒サブユニットである α サブユニットを介していることも明らかにした。In vitroでの再構成実験の際、カゼインキナーゼII多量体よりも8SカゼインキナーゼIIの方が活性が高かった。そこでHSP90が複合体を形成することによってカゼインキナーゼIIを活性化するのではないかと考えた。

一定量のカゼインキナーゼIIに様々な濃度の精製HSP90を加えてリン酸化反応を行った。その結果、HSP90はカゼインキナーゼII特異的の基質に対するカゼインキナーゼII活性を濃度依存的に顕著に活性化した。同時にカゼインキナーゼII β サブユニットの自己リン酸化も顕著に増大した。また、このHSP90による活性化は生理的なイオン条件でも観察された。カゼインキナーゼIIの自己会合とそれに伴う不活性化は温度依存的であり、より高い温度で顕著であった。このとき、HSP90を共存させると、HSP90はカゼインキナーゼIIと複合体を形成して温度依存的なカゼインキナーゼIIの自己会合と不活性化を阻害した。細胞を熱ショックに曝した時に多くの蛋白質が同様にアグリゲートを形成する傾向に向かうと予想され、ここで観察されたカゼインキナーゼIIの不活性化とHSP90による阻害は、熱ショックストレスと熱ショック応答という生理的な状態を反映していることが示唆される。

以上の、グルココルチコイド、アクチン、及びカゼインキナーゼIIの場合を含めて、HSP90はターゲット蛋白質と複合体を形成して相手蛋白質の或る特定の機能を細胞内の特定の場所で保つように働いているようである。つまり、HSP90がHSP90と複合体を形成する様々な生物学的に重要な蛋白質の細胞内での、共通のキャリアー蛋白質として存在していることをうかがわせる。HSP90と複合体を形成している蛋白質はまだ他にも多数あると考えられ、その同定と機能制御、及びそのメカニズムの研究がこれからの大きな課題といえる。



《序章》

熱ショック蛋白質HSP90と 結合する蛋白質

【0.0 熱ショック応答と熱ショック蛋白質】

生物は1個の細胞から臓器、個体、社会集団に至るまで、さまざまなレベルで環境の温度の影響を受ける。細胞を通常より数度高い温度に曝す熱ショックにより誘起される最も顕著な反応は、通常の蛋白質合成が阻害されるとともに熱ショック蛋白質(HSP)群の合成が上昇する、いわゆる熱ショック応答である [Lindquist & Craig (1988), Welch (1989), 宮田・矢原 (1989), Schlesinger (1990), 宮田 (1991b)]. 熱ショック応答は熱による非特異的な損傷ではなく、生理的で可逆的な反応である。多くのHSPは重金属や酸素欠乏などの他のストレスによっても誘導され、HSPが細胞の生存にとって有害な環境から細胞を守るために、生物種の違いを超えて普遍的に重要な役割を果たしていることが示唆される。また多くのHSPは通常でも細胞内に比較的高い濃度で構成的に存在しており、HSPは非ストレス時でも細胞の増殖・維持に必要な機能を担っていると考えられる [Lindquist & Craig (1988), Welch (1989), 宮田・矢原 (1989), Schlesinger (1990), 宮田 (1991b)].

HSPはその1次構造の類似性によって大きくHSP90ファミリー、HSP70ファミリー、低分子量HSPファミリー、およびその他のHSPと分類することができる。ここ数年の著しい研究の進展によって、HSP70ファミリーの一群の蛋白質は、ATP依存性に様々な分子の高次構造の形成と、オルガネラ蛋白質の細胞内局在に関与することが明らかにされつつある [Lindquist & Craig (1988), Welch (1989), 宮田・矢原 (1989), Schlesinger (1990), 宮田 (1991b)]. HSP90ファミリーは様々な動物種のほとんどあらゆる細胞に普遍的にかつ比較的多量に存在しており、これまでの研究の結果、HSP90が多面的な機能を持つ蛋白質であることが明らかにされつつあるが、HSP90ファミリーの担う本質的な機能に関しては未解決の問題が多い。本論文では、HSP90の性質および細胞内での機能の解明を目指して研究を行い、2つの重要な性質を見だし、実験結果を示すと共にそれに関する考察を行なった。

[0.1] 90-kDa 熱ショック蛋白質(HSP90)

HSP90ファミリーの主要な分子種はHSP90とHSP100 (GRP94と同一)である。HSP90は哺乳類細胞ではその大部分が細胞質にほぼ均一に存在し、熱ショックなどのストレスによって発現が増大し、その際著しく細胞内分布が変化することはない。最近ではHSP90は細胞核にも存在すると考えられている。上皮成長因子(EGF)やインスリン・インスリン様成長因子-I(IGF-I)などの増殖因子で或種の細胞を刺激すると、刺激後非常に速やかにかつ一過的に、アクチン繊維が強く染色される細胞形態変化であるラッフル膜が形成される[Kadowaki et al. (1986), Miyata et al. (1988), Miyata et al. (1989a), Miyata et al. (1989b), 宮田・西田 (1989)]. このラッフル膜部位にHSP90がアクチンと共に局在することが示され[Koyasu et al. (1986)], 増殖因子情報伝達系および細胞骨格系とのHSP90との関連が予想された。

HSP90の遺伝子は α と β の2種類が単離されており[Farrelly & Finkelstein (1984), Hickey et al. (1989)], 僅かに分子量の異なる2種類の蛋白質が存在する。HSP90は主に $\alpha\alpha$ 又は $\beta\beta$ のホモダイマーとして存在しており[Minami et al. (1991)], その沈降係数は6.2Sである。異なる生物種のHSP90の1次構造の比較から、HSP90が、極めて生物種間で良くアミノ酸配列の保存されている蛋白質であることが明らかにされた[Hickey et al. (1989)]. また、酵母の系で必須遺伝子であることが示されている[Borkovich et al. (1989)]. HSP90と同じファミリーのHSP100の1次構造はかなり良く似ているが、これまでの所、他の蛋白質との1次構造の類似性は見いだされていない。

HSP90は細胞内で様々な修飾を受けており、それらの修飾による機能の制御が予想されているが、ほとんど研究が進んでいない。蛋白質の機能制御において第1義的に重要であることが広く認識されているリン酸化に関しては、HSP90は哺乳類の培養細胞の系では細胞内の最も主要なリン酸化蛋白質のうちの1つであり、主にセリン残基でリン酸化されている。現在までにHSP90をリン酸化するキナーゼとして二重鎖DNA依存性キナーゼとカゼインキナーゼII (CKII)が知られており[Walker et al. (1984), Dougherty et al. (19

序章

内でもSHRと結合して8S複合体を形成しており[Howard & Distelhorst (1988)], リガンドの結合や高塩濃度などの条件によって8Sの受容体が4Sとなるに際して受容体複合体から解離する[次の総説を参照 Denis & Gustafsson (1989), Pratt et al. (1989)]. グルココルチコイド受容体 (GCR)の場合、8S複合体は細胞質に存在し、H S P 9 0の解離に伴って受容体が核内に移行する[Vedeckis (1983), Wikstrom et al. (1987)]. 即ち、GCRは通常はH S P 9 0と複合体を形成することでDNAと結合せずに細胞質に安定に存在しているが、リガンドの結合によってH S P 9 0が解離すると細胞核へ移行し、核内でDNAのホルモン依存性の特異的な活性化を引き起こすと考えられる[次の総説を参照 Denis & Gustafsson (1989), Pratt et al. (1989)]. この複合体の解離はmolybdateやtungstate等の遷移金属イオンを添加したり[Okret et al. (1985), Housley et al. (1985), Mendel et al. (1986), Redeuilh et al. (1987)], 或いはRU486等のリガンドアンタゴニスト[Baulieu (1989)]を加えることで抑制される。即ち、受容体-H S P 9 0複合体は安定化される。その他、ダイオキシン等の芳香族炭化水素系の毒物に対して細胞内にSHRスーパーファミリーに属する受容体があり、やはりH S P 9 0と複合体を形成している[Perdew (1988), Denis et al. (1989), Wilhelmsson et al. (1990)].

【0.3】 H S P 9 0と癌遺伝子産物との複合体形成

レトロウィルスがコードする癌遺伝子産物のうち、pp60^{v-src}, pp84^{v-yes}, pp140^{v-fms}などはいずれもチロシンキナーゼ活性を持っており、細胞膜近傍において機能していると考えられている。これらの癌遺伝子産物は細胞質では分子量50kのリン酸化蛋白質(pp50)及びH S P 9 0と複合体を形成している[Brugge et al. (1981), Opperman et al. (1981a), Opperman et al. (1981b), Lipsich et al. (1982)]. この、癌遺伝子産物とH S P 9 0との複合体形成は、癌遺伝子産物の合成後一過的に観察され、複合体を形成している時にはキナーゼ活性が低い[Courtneidge & Bishop (1982), Brugge et al. (1983)]. 一方、これらの癌遺伝子産物が細胞膜に移行して活性化された状態では複合体は解離して単独で存在している。つまり、H S P 9 0とpp50は細胞質で癌遺伝子産物

チロシンキナーゼと複合体を作ることでその活性を抑制し、また、細胞質から細胞膜への移行の過程に関わっていると考えられる。

【0.4.4】HSP90と細胞骨格との相互作用

上記のように、SHRの場合にも、また、癌遺伝子産物チロシンキナーゼの場合にも、HSP90は、ターゲットとする機能蛋白質の機能の制御と共に細胞内分布・輸送にも関与している可能性が強く示唆される。蛋白質の細胞内分布や輸送は細胞骨格系と密接に係わっており、HSP90が細胞骨格系と相互作用する可能性が考えられる。特に、前述のように増殖因子によって誘起されるラッフル膜に、アクチン繊維とほぼ一致してHSP90が局在することが観察されたことから、HSP90がアクチンと結合する活性があるのではないかと推定された[Koyasu et al. (1986)]. その結果、HSP90及びHSP100が、*in vitro*でアクチン繊維を架橋する活性を持つアクチン結合蛋白質であることが明らかとなった[Koyasu et al. (1986), Nishida et al. (1986), Koyasu et al. (1989)].

アクチン10分子あたり1分子のHSP90ダイマーが結合し、解離定数は約 $2\mu\text{M}$ の、比較的弱い結合である[Koyasu et al. (1986)]. しかし、アクチンおよびHSP90はいずれも細胞内含量が非常に高い蛋白質であるため、生理的な状態で十分に相互作用しうると考えられる。また、HSP90とアクチンとの結合は Ca^{2+} 存在下でカルモジュリンによって阻害される[Nishida et al. (1986)]. 平衡ゲル濾過法によって、HSP90がカルモジュリンと Ca^{2+} 依存性に結合することが示された。細胞内においてもHSP90とアクチンとの結合が Ca^{2+} -カルモジュリンによって制御されている可能性が指摘される。

CHO (Chinese hamster ovary)細胞の熱ショック抵抗性変異株HR-01は、HSP90を親株に比べて5-10倍多く発現している[Yahara et al. (1986)]. この変異株は親株よりも細胞の運動性が高く、細胞の伸展性がよい[Yahara et al. (1986)]. この変異株に見られるこれらの特徴はアクチン系細胞骨格あるいはその制御機構の変化に基づくと考えられ、アクチン系細胞骨格とHSP90との相互作用を反映していると考えられる。

序章

つまり、HSP90はSHRや癌遺伝子産物と複合体を形成してそれらの分子の細胞内局在や輸送に関与しており、また、アクチン繊維を介して細胞骨格系と相互作用していることになる。もし、HSP90分子の上で、機能蛋白質との複合体形成をする部分とアクチン繊維と結合する部分が異なっていれば、HSP90を含む機能蛋白質複合体がHSP90を介してアクチン繊維、ひいては細胞骨格系と相互作用し得ることになる。この事が実証されれば、これらの機能蛋白質の細胞内局在や輸送と、HSP90との複合体形成の生理的な意味との関連の一端が明らかとなるであろう。このような観点にたつて、本論文の第1部では、GCR-HSP90複合体が、果たしてHSP90を介してアクチン繊維と結合し得るかどうかを詳細に検討し、その生理的意義について検討を加えた[Miyata & Yahara (1991), 宮田・矢原 (1991)].

【0.5】カゼインキナーゼII

カゼインキナーゼII(CKII)は、現在までに数多く知られるようになったプロテインキナーゼのうちで最も早く同定されたものの一つである [Edelman & Blumenthal (1987), Pinna (1990)]. しかしながらその後、プロテインキナーゼ研究の主流はセカンドメッセンジャー依存性のキナーゼ及びチロシンキナーゼになり、CKIIの研究は比較的ゆっくりとしか進められていなかった。

CKIIは、 Ca^{2+} やcAMP、或いはカルモジュリンによって活性が変化しない。In vitroでは、ヘパリンが非常に低濃度で特異的にCKII活性を抑制し、ポリリジンやスペルミンがCKIIを活性化することは良く知られているが、細胞内でどのようにしてCKIIの活性が維持されまた、制御されているかに関してはほとんど不明であった。CKIIは、他の多くのキナーゼと異なり、GTPをATPとほぼ同程度にリン酸供与体として利用する他、酸性アミノ酸のクラスターの直前のセリン/スレオニンを特異的にリン酸化するという特徴がある [次の総説を参照 Pinna (1990), Tuazon & Traugh (1990)]. 精製されたCKIIは α (または α') β_2 のヘテロテトラマーとして存在し、この複合体の沈降係数は6Sである。触媒サブユニットは α であり、通常の条件で自己リン酸化されるのは β サブユニットである[Traugh et al. (1990)]. β サブユニットはCKIIの活性調

節に関与していることが予想されているが、これまでのところその機能は全く判っていない[次の総説を参照 Edelman & Blumenthal (1987), Pinna (1990), Tuazon & Traugh (1990)]. 精製したCK IIは低塩濃度では自己会合して大きな凝集体を作ることが報告されている[Glover (1986)]. この自己会合は低イオン強度下で顕著であるが、生理的条件でも観察されることから、CK IIの活性や局在の制御に係わる可能性が考えられてきたが、これまではそれ以上の研究が進んでいなかった。一方で幾種かの生物のCK IIのcDNAクローニングからその1次構造が決定され、そのアミノ酸配列が酵母からヒトまで種間で極めて良く保存されていることが明らかにされた[Lozeman et al. (1990), Padmanabha et al. (1990)]. 更に酵母の系を用いてCK IIが細胞の生育に必須の遺伝子であることが示され[Padmanabha et al. (1990)]、CK IIが細胞の増殖と機能に必須で重要な役割を担っていると考えられるようになった。

〔0.6 細胞増殖・細胞周期をカゼインキナーゼII〕

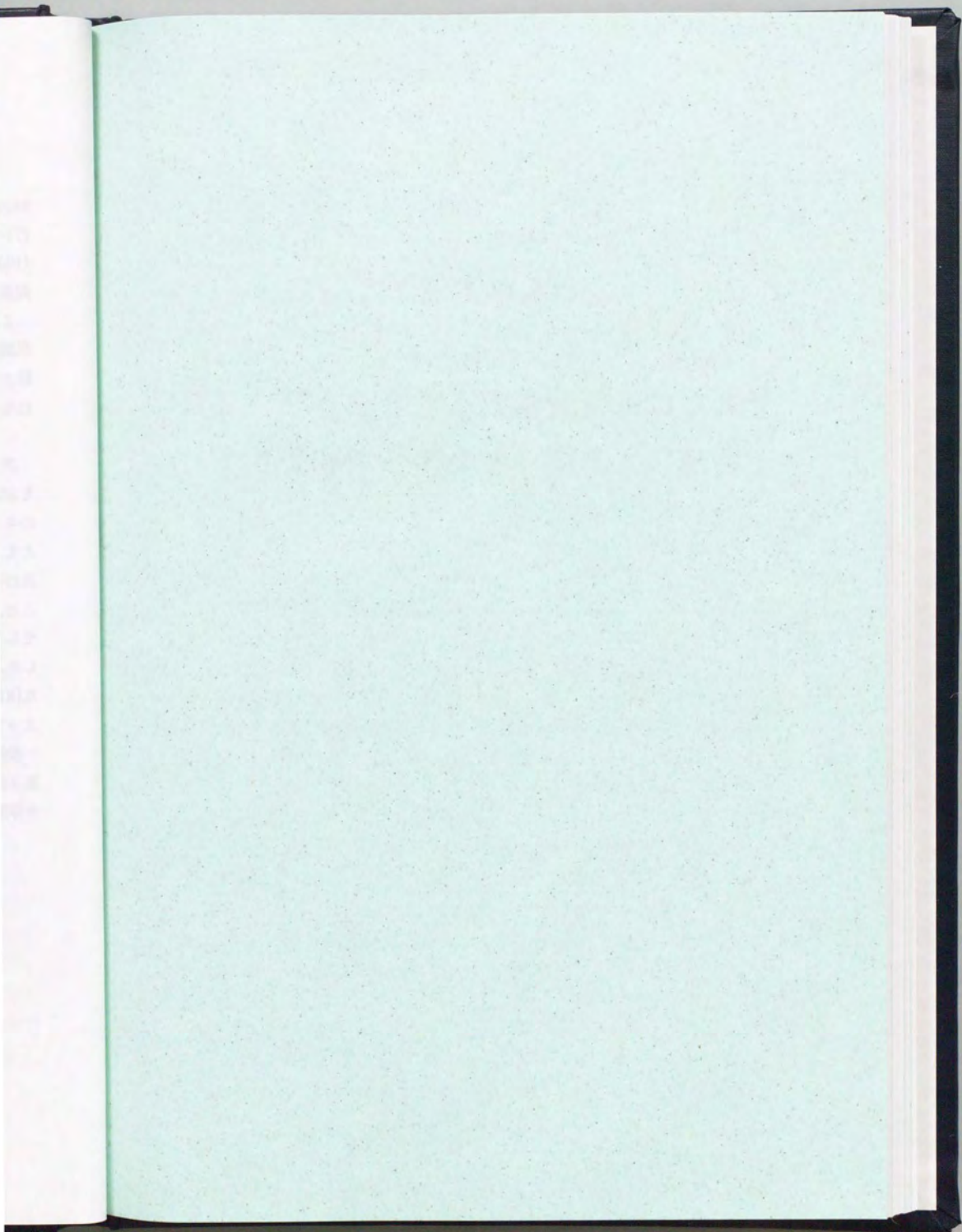
極く最近になって、次の様な事実が次々と知られるようになって、CK IIの生理的機能について、大きな興味が寄せられるようになりつつある。即ち、(1) 静止期の培養細胞に、インスリン、EGF、IGF-I、血清等によって増殖シグナルを与えると細胞内のCK IIが活性化される[Sommercorn et al. (1987), Klarlund & Czech (1988), Ackerman & Osheroff (1989), Ackerman et al. (1990)]. (2) 様々な蛋白質がCK IIの基質となることが明らかにされたが、それらの中には myc[Luscher et al. (1989)], myb[Luscher et al. (1990)], serum responsive factor[Manak et al. (1990)], p53[Meek et al. (1990)], 更にはRNA polymerase I/II, DNA topoisomerase I/II, glycogen synthase, acetyl-CoA carboxylase, erbA, SV40 Large T antigen, adenovirus E1A protein, papilloma virus E7 protein等の、細胞の代謝調節や遺伝子発現に極めて重要だと考えられる蛋白質が多く含まれる[次の総説を参照 Carroll et al. (1988), Tuazon & Traugh (1990)]. 実際、c-mycやc-myb, serum responsive factor等ではCK IIによるリン酸化で機能が制御されることが明らかにされた。(3) 精製CK IIを Xenopus卵にマイクロインジェクションすると

序章

maturationを引き起こす[Mulner-Lorillon et al. (1988)]. (4) 蛋白質の核移行シグナルの近傍に共通してCK IIのターゲット部位が存在する[Rihs et al. (1991)]. SV40 Large T antigenの場合、この部分のリン酸化によって核移行が促進される事が示されている[Rihs et al. (1991)].

これらの特徴は特に、細胞周期と細胞増殖の制御における核内への遺伝子発現調節シグナル伝達にCK IIが深くかかわっているkey enzymeであることを予想させることから、CK II活性の調節機構に対して大きな興味を持たれるようになった[次の総説を参照 Carroll et al. (1988), Krebs et al. (1988)].

我々はHSP 90の研究の過程で、精製HSP 90画分に Mg^{2+} の存在下にATPを加えるとHSP 90が強くリン酸化されることを見だし、おそらく何らかのキナーゼがHSP 90と複合体を形成して共精製されてくるのであろうと考えて、本論文の第2部でこのキナーゼの同定と、細胞内での複合体形成の有無及びその生理的意義について検討した。その結果このキナーゼはCK IIであること、HSP 90とCK IIは細胞粗抽出液中で複合体を形成して存在すること、そして精製HSP 90と精製CK IIとから複合体が再構成されることを見出した。更に、この複合体形成によってCK IIが活性化されることも明らかにした[Miyata & Yahara (1992)]. これらの現象は、HSP 90との複合体形成によってCK IIの高次構造が保たれるからであることが示唆され、HSP 90の一般的な機能に対して重要な手掛かりを与えるものと考えられる。第1部及び第2部を通じた以上の様な実験結果から、HSP 90とターゲット蛋白質の複合体形成のメカニズムと生理的意義について検討を加えた。



《第1章》

HSP90を介する細胞質グルコシルチ コイド受容体とアクチン繊維との結合

※[1.1.1] 方法

[1. 1. 1 : 材料]

[6, 7-³H]triamcinolone acetonide (TAA) (1570 GBq/mmol)はDu Pont-New England Nuclearより、phosphocellulose P11はWhatman Chemical Separationより、DEAE-Sephacrose Fast Flow 及びSuperdex-200 HiLoadはPharmacia Fine Chemicals ABより、hydroxylapatite high resolution はCalbiochemより、非放射性TAA及びその他の試薬はSigmaより、それぞれ購入した。

[1. 1. 2 : バッファー及び細胞]

HEDG+Mo buffer ; 25 mM Hepes, 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol, pH 7.6 + 10 mM sodium molybdate.

マウスhepatoma Hepa-1 細胞は、東北大学の藤井-栗山博士より供与頂き、10%牛胎児血清を含むDMEMで培養した。

[1. 1. 3 : 蛋白質]

カルモジュリンはブタ脳から報告されている方法に従って精製した[Nishida et al. (1979)]. ウサギ骨格筋アクチンは報告されている方法に従って精製した[Spudich & Watt (1971)]、更に、予め0.1 mM CaCl₂, 0.2 mM ATP, 0.1 mM DT T, 0.01 % NaN₃, 2 mM Hepes, pH 7.8により平衡化したSuperdex-200 HiLoad カラムによるゲル濾過によって精製した。

マウスHSP90は、Koyasuらの方法に従い、マウスリンフォーマ細胞株L5 178Yより、DE-52, hydroxylapatite, Sephacryl S-300 ゲル濾過, MonoQ FPLC カラムに順次かけることによって精製した[Koyasu et al. (1986)]. HSP90の同定はSDS-PAGEによって行なった。ウサギ骨格筋のトロポミオシンは東京大学理学部生化学教室の西田栄介博士より頂いた。

[1. 1. 4 : 抗体]

マウス及び酵母のHSP90に対するウサギ抗血清はそれぞれ対応する精製蛋白質を抗原としてウサギに免疫することで別個に作成した。それぞれの抗血

第1章：方法

清からIgGフラクションをProtein-A-Sepharose (Pharmacia)を用いて精製した。L細胞の総蛋白質を用いたWesternブロッティングによって、それぞれの抗体はHSP90のみを特異的に認識することを確認した。

[1. 1. 5 : グルココルチコイド受容体 (GCR) のリガンド結合解析]

ハイドロキシルアパタイト吸着解析法を用いてGCRの量を定量した [Nemoto et al. (1990)]. 試料を20 nMの $[^3\text{H}]$ TAAと混合し、特異性を見るためには500倍の濃度の非放射性TAAを同時に加えた。氷上で3時間インキュベートした後、サンプルを等量のハイドロキシルアパタイトの懸濁液 (50 % v/v in HEDG + Moバッファー)と混合し、ゆっくり攪拌しながら20分インキュベートした。ハイドロキシルアパタイト及び結合蛋白質を遠心して回収し、HEDG + Moバッファーで3回洗った。吸着した $[^3\text{H}]$ TAA-GCR複合体は0.4 Mリン酸カリウム, pH7.4の溶液を加え15分間氷上で抽出し、遠心してハイドロキシルアパタイトと分離し、上清の放射活性をカウントして定量した。

[1. 1. 6 : アクチンを含まないグルココルチコイド受容体の粗精製]

アクチン及びリガンドを含まないGCRはほぼNemotoらの方法に従い、一部改変して精製した [Nemoto et al. (1990)]. 全ての精製操作は0-4°Cで行った。ラットの肝臓を取り出し、氷冷しながらPBSで還流し、HEDG+Moバッファーで良く洗浄し、約2倍量のHEDG+Moバッファー (1 mM PMSF, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antipain, 及び10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotininをプロテアーゼ阻害剤として加えた)中で破碎し、ホモジナイズした。ホモジネートを遠心し (75,000 $\times g$, 40分)、不溶性の成分を除き、更に脂肪層を注意深く取り除いた。上清にその半分の容量のphosphocellulose P11樹脂 (HEDG+Mo バッファーに平衡化)を加え1時間ゆっくりと混合した。同樹脂に結合しない画分を遠心によって集め (3,000 $\times g$, 10分)、DEAE-Sepharose Fast Flow カラム (16 mm \times 20 cm, 80 mM NaCl/HEDG + Mo バッファーで平衡化)にかけた。280 nmの吸収がバッファーと同じになるまで同バッファーでカラムを洗浄した。DEAE-Sepharoseカラムに結合した蛋白質は0.2 M NaCl/HEDG+Mo バッファーによって溶出し、溶出画分をNaClを含まないHEDG+Mo バッファーで平衡化したSuperdex-200 ゲル濾

第1章：方法

過カラムに直接ロードすることで速やかに塩濃度を低下させ、同時にゲル濾過を行なった。溶出されるタンパク量を280 nmの吸収で測定し、グルココルチコイド結合活性を[1. 1. 5]に従って定量した。

[1. 1. 7：細胞粗抽出液の調製]

Hepa-1細胞はディッシュからスクレイパーでかきとり、HEDG+Moバッファー(プロテアーゼ阻害剤として1 mM PMSF, 2 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin A, 2 μ g/ml antipain, 10 μ g/ml aprotininを加えた)中にホモジナイズした。ホモジネートは22,000 \times g, 2°Cで20分遠心し、上清を更に100,000 \times g 2°Cで60分遠心して上清を回収し、Hepa-1細胞の細胞質画分とした。4S型のGCRを含む細胞質を調製するには、HEDGバッファーにmolybdateを加えず、同時に0.4 M KClを加えて細胞質の調製を行なった。

[1. 1. 8：グルココルチコイド受容体のTAAによる標識]

GCRを含むサンプルは20 nMの 3 H]TAAと氷上で3時間インキュベートした。GCRに結合しなかったリガンドは1/5容量のデキストラン処理した活性炭charcoal (100 mg/ml charcoal, 10 mg/ml dextran in HEDG + Mo バッファー)と4°Cで20分インキュベートして吸着させ、4,000 \times gで10分遠心し上清をさらに0.22 μ mの遠心フィルターを通して除いた。必要に応じて標識されたサンプルを抗SP90抗体と氷上で3時間インキュベートした。

[1. 1. 9：シヨ糖密度勾配遠心法]

200 μ lの 3 H]TAAで標識されたサンプルを5.2 mlのシヨ糖密度直線勾配 (HEDG+Mo バッファー中)に静かに重層した。グラジエントチューブはベックマンSW50.1のスウィングローターで45,000 rpm, 2°Cで16時間遠心した。各チューブから180 μ lずつフラクションを作成し、各フラクションの放射活性を測定した。沈降係数はオバルブミン、BSA、アルドラーゼ、及びカタラーゼを標準タンパクとして決定した。

第1章：方法

[1. 1. 10：グルココルチコイド受容体とアクチン繊維との結合の解析]

Hepa-1細胞質画分又は粗精製GCRは [1. 1. 8] に従って $[^3\text{H}]\text{TAA}$ によって標識した。様々な濃度の精製アクチンを20 mM HEPES, 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.03 mM ATP, 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.02 mM DTT, 0.02 mM imidazole, pH 7.5のバッファー中で室温60分重合させ、更に氷上で20分インキュベートした。必要に応じて2 mM の Ca^{2+} 又はEGTAを加えた。生じたアクチン繊維を、標識したGCRを含むサンプルと氷上で90分混合した。必要に応じて様々な濃度の精製カルモジュリン、精製hSP90、精製トロポミオシンをGCRを加える前に混合した。混合時の標準的なバッファー組成は、60 mM HEPES-Pipes, 60 mM KCl, 10 mM sodium molybdate, 1 mM MgCl_2 , 0.3mM CaCa_2 , 0.6 mM ATP, 0.6 mM DTT, 0.3 mM EDTA, 0.3 mM EGTA, 2 % glycerol, pH 7.2とした。インキュベート後のサンプルは2°Cで100,000 $\times g$ 90分超遠心し、重合したアクチン繊維及びそれと結合した蛋白質を沈降させた。ペレットの蛋白質は1% SDSで可溶化し、含まれるGCRの量を放射活性を測定して定量化した。

[1.2] 結果

[1.2.1:細胞粗抽出液中で、グルコルチコイド受容体 (GCR)は内在性及び外来性のアクチン繊維と共沈する]

Hepa-1細胞の粗抽出液を調製し、GCRを $[^3\text{H}]$ TAAを用いて標識した。同細胞粗抽出液中ではGCRは沈降係数8S型の複合体として存在し、同複合体中にHSP90を含むことをショ糖密度勾配遠心及び抗HSP90抗体を用いた実験で確認した(図1.1)。

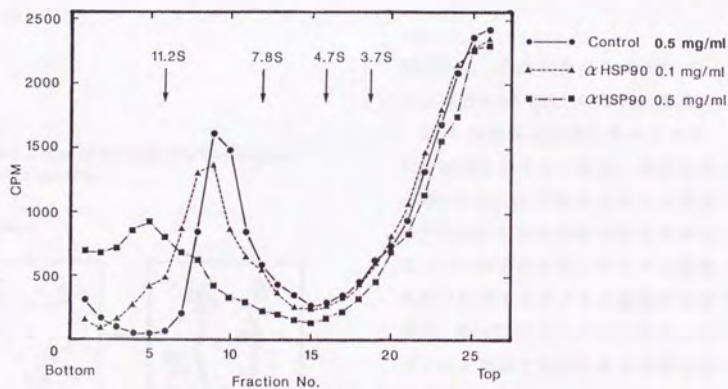


図1.1 グルコルチコイド受容体複合体の沈降係数に及ぼす抗HSP90抗体の効果。

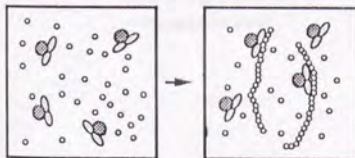
Hepa-1細胞粗抽出液を調製し、 $[^3\text{H}]$ TAAでGCRを標識後、コントロールIgG(●) 0.1 mg/ml (▲)及び0.5 mg/ml (■)の抗HSP90 IgGと氷上で120分間インキュベートし、5-20%のショ糖密度勾配遠心によって解析した。

第1章: 結果

ウサギ骨格筋のアクチンは予め *in vitro* でアクチン重合条件下 (100 mM KCl + 2.5 mM MgCl₂) に置くことで重合させた。標識した細胞粗抽出液を重合アクチン繊維と混合・インキュベートし、アクチン繊維およびそれと結合している蛋白質を、超速心をしてペレットとして回収した。細胞粗抽出液を様々な濃度に調整し、アクチン繊維の存在下または非存在下でこの結合実験を行ない、アクチン繊維と共沈したGCRをペレットの放射活性として定量した。用いた細胞粗抽出液には内在性のアクチンが含まれている。もし、GCRがアクチン繊維と共沈するならば、アクチン重合条件下では外からアクチンを加えないときには内在性のアクチン繊維とGCRが結合して共沈し、更に外からアクチン繊維を加えるとより多くのGCRがアクチン繊維と共沈すると考えられる (この様子を図1.2に模式的に示した)。

Binding of Steroid Receptor-HSP90 Complex to Actin Filaments

(A) Cell Lysates



(B) Cell Lysates + Exogenous Filamentous Actin

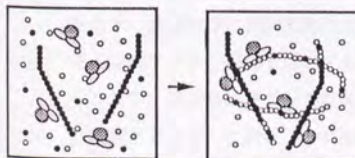


図1.2 内在性及び外来性のアクチン繊維と8S-GCRとの結合の模式図。

(A): 細胞粗抽出液に外からアクチン繊維を加えない場合、細胞粗抽出液中には8SのGCR-HSP90複合体が存在し、また内在性のアクチンモノマーが存在する。アクチン重合条件下に移すとアクチン繊維が形成され、8S-GCRはHSP90を介してアクチン繊維と結合すると予想される。

(B): 細胞粗抽出液に外から精製アクチンを加えた場合、アクチン重合条件下ではより多くのアクチン繊維が形成され、より多くの8S-GCRがアクチン繊維と共に超速心で沈殿に回収されることが期待される。即ち、外からアクチンを加えてアクチン繊維と共沈するGCR量が増えれば、GCRとアクチン繊維との結合が証明される。

第1章：結果

様々な条件での上記の結合実験の結果を1つに纏めて図1.3に示した。もし、外来性のアクチン繊維とGCRが全く結合しないならば、全ての点は対角線の線上に並ぶ筈である。図1.3では、それに反して、全ての点は対角線の上側に分布した。つまり、外からアクチン繊維を加えるとアクチン繊維と共沈するGCRの量が増大したことを示す。

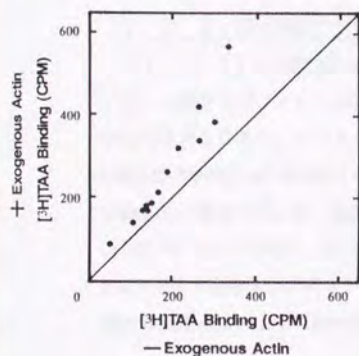


図1.3 細胞粗抽出液中でのグルコシルコリド受容体とアクチン繊維との結合。

図1.2に示した実験を、HEDG+Moバッファーで調製したHepa-1細胞粗抽出液を用いて行なった。様々な濃度の細胞粗抽出液中のGCRを $[^3\text{H}]$ TAAで標識し、様々な濃度の精製アクチン繊維を加えて(+Exogenous Actin)、或いは加えないで(-Exogenous Actin)インキュベートした後にアクチン繊維及び結合蛋白質を超速心の沈殿として回収した。1つの実験においてアクチン繊維と共沈したGCRの量を外からアクチンを加えないとき(横軸)と加えたとき(縦軸)に対応した1つの点でプロットした。

即ち、細胞粗抽出液中で細胞質のGCRはアクチン繊維と結合する性質を持つことを示す。前述の様に同細胞粗抽出液は8SのGCRを含むので、HSP90を含む8S-GCRはアクチン繊維と結合する、と結論できる。

ここで、外からアクチンを加えない時でも有意な量のGCRが超速心のペレットに回収されるが、これは1つには内在性のアクチンが重合しており、それに標識GCRが結合している為だと考えられる。一方では、HSP90はアクチン以外にも様々な蛋白質と複合体を形成することから、外からアクチンを加えない時

第1章：結果

にはHSP90がGCRと複合体を形成したまま細胞粗抽出液中の他の蛋白質と更に複合体を形成して超速心でペレットに回収されている可能性も否定できない。また、 Ca^{2+} -カルモジュリンはHSP90とアクチンとの結合を阻害する事が知られている[Nishida et al. (1986)]、この系に於いて Ca^{2+} -カルモジュリンはGCRのアクチン繊維への結合を阻害した (data not shown)ことから、ここで見られたGCRのアクチン繊維への結合は、8S-GCRのHSP90画分を介していることが示唆された (下記を参照)。

[1. 2. 2: 8S-GCRはアクチン繊維と結合するか4S-GCRは結合しない]

[1. 2. 1]で観察されたGCRとアクチン繊維との結合が、GCR複合体中のリガンド結合サブユニットが直接アクチンに結合しているのではなく、複合体中のHSP90を介しているということをより明確に示すために、8S-GCRを含む細胞粗抽出液と4S-GCRを含む細胞粗抽出液とを調製し、標識したGCRとアクチン繊維との結合を比べた。細胞粗抽出液を調製する際に、高塩濃度 (0.4 M NaCl)のバッファーを用い、複合体を安定化するmolybdateを除いておくと、8S型のGCR-HSP90複合体からHSP90が解離して4S-GCRとなる。このことはショ糖密度勾配遠心法によって確かめられた (図1.4)。

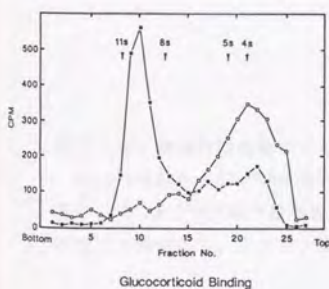


図1.4 細胞粗抽出液中での8S型及び4S型のGCRのショ糖密度勾配遠心。

細胞粗抽出液を、molybdate存在下に低イオン強度で(■)または、molybdate非存在下で0.4M KCl存在下で(□)調製し、含まれるGCRを $[^3H]$ TAAで標識した後に5-20%のショ糖密度勾配遠心によって解析した。

第1章：結果

次いで、8S-GCRを含む細胞質画分と4S-GCR粗画分を同じバッファー条件下で（[1. 1. 10] 参照）それぞれアクチン繊維と混合し、アクチンと結合したGCRの量を測定した（図1.5）。その結果、HSP90を含む8S-GCRは内在性及び外来性のアクチン繊維と結合するが、HSP90を含まない4S-GCRはアクチンと全く結合しないことが示された。この結果は、8S-GCRがHSP90を介してアクチン繊維と結合していることを示している。

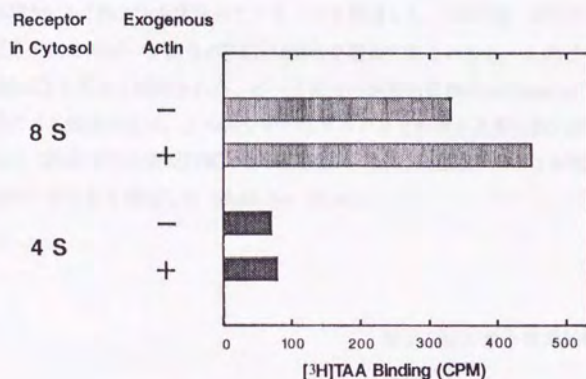


図1.5 細胞粗抽出液中での8S及び4SのGCRとアクチン繊維との結合。

Hepa-1細胞から8S-GCRを含む細胞粗抽出液と4S-GCRを含む細胞粗抽出液を調製し、20 nM [³H]TAAで標識後、精製アクチン繊維(0.4 mg/ml)の存在下又は非存在下で超遠心し、アクチン繊維と共沈したGCRを定量した。

[1. 2. 3：粗精製GCRはアクチン繊維と結合する]

上記の実験で用いた粗細胞質画分は内在性のアクチンの他、様々な蛋白質成分を含んでいることから、GCR複合体とアクチンとの結合を更に調べるため、GCRを部分精製して実験を行なった。GCRはラットの肝臓から粗抽出液を調製し、phosphocellulose, DEAE-Sephrose, 及びSuperdex-200によるゲル濾過を用いて、Nemotoらの方法[Nemoto et al. (1990)]を改変した方法で精製した。グルココルチコイド結合活性は最後のゲル濾過カラムから単一ピークとして溶出された(図1.6■)。塩化スズを用いたmolybdateの定量により、得られたGCR画分には確かにmolybdateが含まれていることを確認した。500倍量の非放射性TAAはほぼ完全にこのピーク画分の $[^3\text{H}]$ TAA結合を阻害することから、このピークは特異的なGCRであると結論された。ピーク画分の総蛋白質濃度は約2mg/mlで、SDS-PAGEによる解析により、この画分中ではHSP90が最も主要な蛋白質の一つであり(同画分中の全蛋白質のうち約30%)、また、内在性アクチンが完全に除かれていることを確認した(data not shown)。

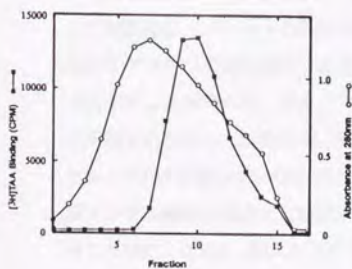


図1.6. 部分精製GCRのゲル濾過溶出パターン。

ラット肝臓粗細胞質画分からphosphocellulose及びDEAE-SephroseによってGCR画分を回収した後、Superdex-200のゲル濾過にかけた。同カラムから溶出されたフラクションの280 nmの紫外吸収によるタンパク量(○)とハイドロキシルアパタイト法によるGCRの量(■)を示した。GCRのピークは非放射性のTAAによって完全に抑制された。ピークフラクションNo. 10を以下の実験に用いた。

第1章：結果

この粗精製GCRを $[^3\text{H}]\text{TAA}$ で標識し、HEDG+M₀バッファー中で5-20%のショ糖密度勾配遠心法によって解析した(図1.7○)。粗精製GCRは沈降係数約8.8の8S型であった。また、この際に抗HSP90抗体と予めインキュベートすることによってこの沈降係数のピークは約9.6Sにまで上昇した(図1.7■)。これは、既に報告されているGCRの性質と一致し、得られた粗精製GCRがHSP90を含む8S-GCRであることを示している。

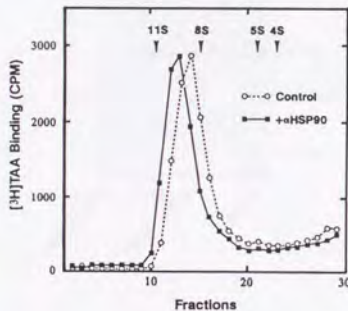


図1.7 部分精製8S-GCRの沈降係数に及ぼす抗HSP90抗体の効果。

部分精製GCR画分を $[^3\text{H}]\text{TAA}$ で標識し、0.4 mg/mlのコントロールIgG(○)又は抗HSP90 IgG(■)と氷上120分インキュベートした後、5-20%のショ糖密度勾配遠心によって解析した。

次いでこのGCR画分を用いてアクチン繊維との結合実験を行なった。まず、この画分中でHSP90がアクチン繊維と結合するかどうかをアクチン繊維を加えて超遠心し、ペレットのSDS-PAGEによって解析した。図1.8に示された様に、加えるアクチンの量を増やすに従って同画分中のHSP90がアクチン繊維と共沈することが判った。また、アクチンを加えない時には蛋白質はペレットには回収されなかった。次いで、同画分を20 nMの $[^3\text{H}]\text{TAA}$ で標識し、GCRに結合しなかったTAAをdextran/charcoalで吸着・除去した。この画分を様々な濃度の精製アクチン繊維と混合して超遠心し、共沈したGCR量を測定した。図1.9●に示された様に、GCRは、加えたアクチン量依存的にアクチン繊維と結合することが明らかとなった。GCRの部分精製によって内在性のアクチン等の他の成分が除去されたことによって、外来性のアクチンを加えないときにはペレットにはほとんど放射活性が検出されなかった。8S-GCRのアクチン繊維への結合は一定以上のアクチン量でほぼ飽和に達した。

第1章: 結果

HSP90 in the GCR fractions co-precipitated with actin filaments

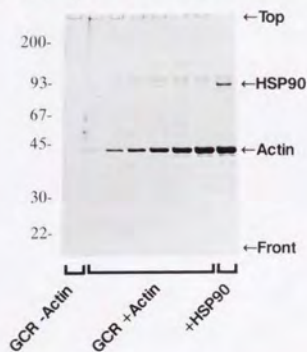


図1.8 部分精製8S-GCR画分中でのアクチン繊維とHSP90との共沈。

部分精製したアクチンを含まない8S-GCRを $[^3\text{H}]\text{TAA}$ で標識し、様々な濃度の精製アクチン繊維と氷上で90分インキュベートした。アクチン繊維と結合した蛋白質を超速心の沈殿として回収し、SDS-PAGEによって分離後CBB染色によって解析した。同画分中でアクチン無しでは蛋白質は沈殿しなかった(GCR-Actin)。また、HSP90の泳動位置は同画分にアクチン繊維と共に外から精製HSP90を加えた実験(+HSP90)及びWestern blotting(data not shown)から明らかにした。

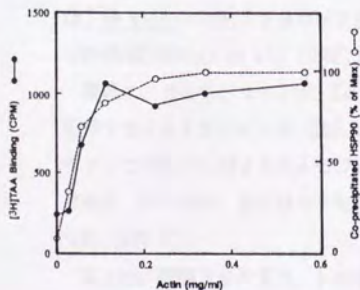


図1.9 部分精製8S-GCRとアクチン繊維とのアクチン濃度依存性の結合。

部分精製GCR画分中で様々な濃度のアクチン繊維と結合したHSP90の量を、図1.8のゲル上でHSP90のバンドをdensitometerで定量して示した(○)。この時、予め部分精製GCRを $[^3\text{H}]\text{TAA}$ で標識し、各濃度のアクチン繊維と共沈したGCRの量を放射活性として示した(●)。

第1章：結果

この時、アクチン繊維と共沈したHSP90の量を、図1.8のHSP90のバンドをdensitometerで定量化し、図1.9〇に示した。図の通り、アクチン繊維と共沈したHSP90の量とGCRの量は非常によく相関していることが判った。充分量のアクチンを加えた条件では用いた画分中の総GCR量の約70%がアクチン繊維と結合した。ここで用いられた条件下で、残りのGCRが何故アクチン繊維と結合しないのかは不明である。

[1. 2. 4 : 8S-GCRとアクチン繊維との結合に対する、精製HSP90、トロポミオシン、及びCa²⁺-カルモジュリンの影響]

粗精製した8S-GCRのアクチン繊維に対する結合の性質が、精製HSP90のアクチン繊維に対する結合の性質と同様であるかどうかを検討した。まず、マウス細胞から精製したHSP90の、8S-GCRとアクチン繊維との結合に対する効果を調べた。精製HSP90はこの結合を濃度依存的に阻害することが明らかとなった(図1.10a)。これは、精製HSP90がアクチン繊維との結合において8S-GCRと競合するからであると考えられる。

次に精製トロポミオシンの8S-GCRとアクチン繊維との結合に対する影響を調べた。トロポミオシンは精製HSP90とアクチン繊維とのin vitroでの結合を阻害することが知られている[Nishida et al. (1986)]。図1.10bの結果はトロポミオシンがアクチン繊維と8S-GCRの結合を阻害することを示した。50%の結合阻害は、約0.25 mg/mlのトロポミオシンで引き起こされた。この50%阻害濃度は、in vitroでのHSP90とアクチン繊維との結合を阻害するトロポミオシンの濃度[Nishida et al. (1986)]とほぼ同程度である。

最後に、カルモジュリンが、Ca²⁺依存的にアクチン繊維と8S-GCRとの結合を阻害することを見いだした(図1.11)。この結果はin vitroでのHSP90とアクチンとの結合に対するカルモジュリンの効果[Nishida et al. (1986)]と同様である。Ca²⁺のみ、またはカルモジュリンのみでは阻害効果は全く見られなかった(図1.11)。

以上の、精製HSP90、トロポミオシン、Ca²⁺-カルモジュリンによる8S-GCRとアクチンとの結合の阻害は全て、8S-GCRがその複合体中のHSP90画分を介してアクチン繊維と結合していることを更に強く示している。

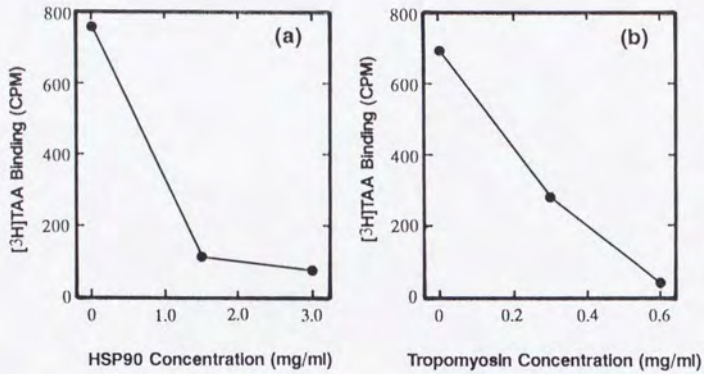


図1-10 8S-GCRとアクチン繊維との結合に及ぼす精製HSP90及び精製トロポミオシンの効果。

$[^3\text{H}]\text{TAA}$ で標識した部分精製8S-GCRとアクチン繊維(0.2 mg/ml)との結合実験の際に、(a): 精製HSP90, 或いは(b): 精製トロポミオシンを加えて、アクチン繊維と結合したGCRの量を超遠心の沈殿に回収される放射活性として示した。

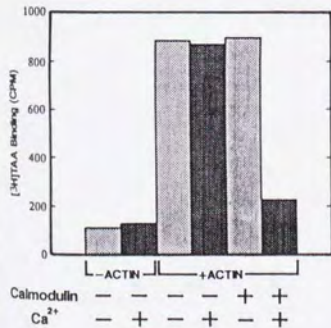
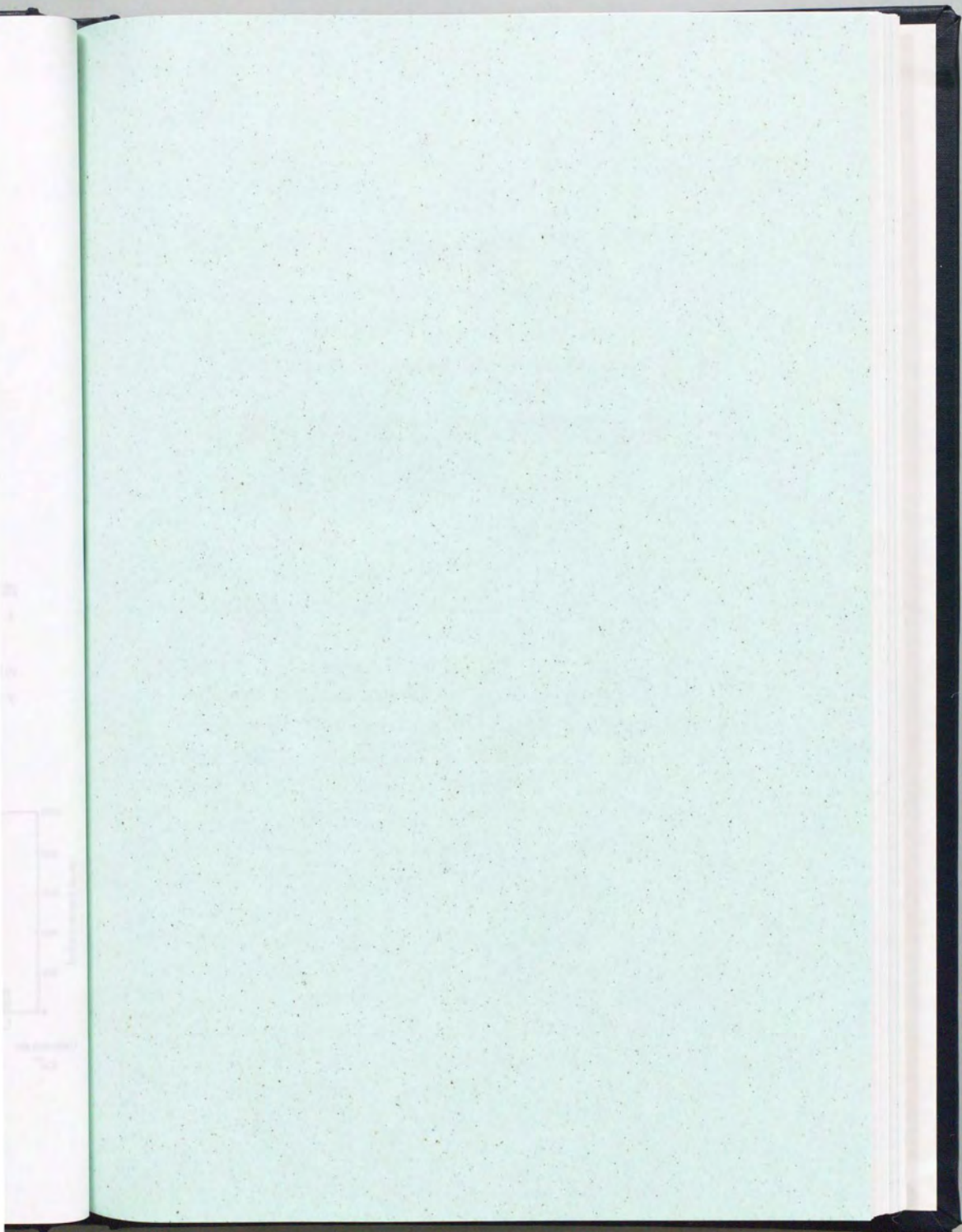


図1-11 8S-GCRとアクチン繊維との結合に及ぼす Ca^{2+} -カルモジュリンの効果。

$[^3\text{H}]\text{TAA}$ で標識した部分精製8S-GCRを精製アクチン繊維(0.2 mg/ml)及び1.5 mg/mlのカルモジュリン、2 mM Ca^{2+} 又はEGTAと共にインキュベートし、アクチン繊維と結合したGCRの量を超遠心で沈殿に回収される放射活性として定量した。



《第2章》

HSP90とカゼインキナーゼIIの 複合体形成とその生理的意義

[2.1. 方法]

[2. 1. 1 : ペプチド]

ペプチドArg-Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Glu (RRREETEEEE)はCK II 特異的にリン酸化される基質であることが報告されている[Kuenzel & Krebs (1985)]. ヒトCK II β のアミノ酸140-158に相当するペプチド (CMDVYTPKSSRH HHTDGAY)は、KLHと結合させて抗ペプチド抗体作成に用いた。両ペプチドはApplied Biosystemの固相ペプチド合成機を用いて合成した。ペプチドはレジンから切り出し、0.1% TFAの存在下で0-100%のアセトニトリルの直線グラジエントにより、PepRPC逆相カラム (Pharmacia)を用いて精製した。

[2. 1. 2 : バッファー及び細胞]

HEDG バッファー; 25 mM Hepes, 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycerol, pH 7.6. KCM バッファー; 130 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 20 mM Hepes, 10 mM NaCl, pH 7.2. Assay バッファー; 20 mM Tris-Cl, 20 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 60 mM NaCl, 10 mM sodium metabisulfite, 20 mM β -glycerophosphate, 6 mM EGTA, 6 mM *p*-nitrophenylphosphate, 1 mM DTT, 30 μM [γ - ^{32}P]ATP, pH7.8. マウスL細胞は5%の牛胎児血清を含むMEMを用いて培養した。

[2. 1. 3 : ブタ精巢からのCK IIの精製]

CK IIはLitchfieldらによって報告されている方法を改変してブタ精巢から精製し[Litchfield et al. (1990)], さらにMonoQ FPLCによって完全に精製した。

2kgのブタ精巢をホモジナイズし、遠心して粗抽出液を得、DE-52陰イオン交換カラム、phosphocellulose P11カラム、ハイドロキシルアパタイトカラムを順次用いてCK II活性画分を回収した。同画分中の蛋白質を硫酸アンモニウムによって沈殿させ、遠心によって回収し、可溶化してHiLoad Superdex-200ゲル濾過カラム、heparin-SepharoseカラムによってCK IIを精製した。溶出されたCK II画分はさらにMonoQ FPLCカラムにかけ、15 mM Mops, 1.5 mM EDTA, 0.75

第2章：方法

mM DTT, 25 % (v/v) glycerol, pH7.0のバッファー中で200-1,000 mMのNaClの直線グラジエントをかけて溶出した。CKII活性は同カラムより単一ピークとして溶出し、また、280 nmで検出した蛋白質の吸収の単一ピークと完全に一致していた。また、精製されたCKIIは α (42 kDa)、 α' (40 kDa)、 β (27 kDa)の3本のポリペプチドより成ることがSDS-PAGEによる解析によって確認された。

[2. 1. 4 : HSP90の精製]

マウスHSP90の精製は[1. 1. 3]を参照。

クローン化された*S. cerevisiae*のHSP90のcDNAをT7システムの発現プラスミド (in PET11d)に組み込み、大腸菌 (DE21 Lys E)に導入した。導入したHSP90遺伝子はisopropyl- β -D-thiogalactopyranosideを加え、37°Cで2時間誘導をかけて発現させた。大腸菌粗抽出液中に可溶化されたHSP90はマウスHSP90の精製と同様に4段階のカラムクロマトグラフィーを用いて単一バンドにまで精製した。

[2. 1. 5 : L細胞粗抽出液の調製]

コンフルエントに培養したマウスL細胞は氷冷したPBSで洗浄し、プロテアーゼ阻害剤 (1 mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin)を含むHEDGバッファーを加えて液体窒素上で凍結した。凍結-融解された細胞はディッシュからかきとり、氷上で可溶化した。得られた粗抽出液を22,000 \times gで20分間遠心して不溶性画分を除き、さらに100,000 \times g 2°Cで60分間超遠心し、上清を細胞質画分として回収した。

[2. 1. 6 : 抗体]

抗HSP90抗体は[1. 1. 4]参照。CKII β に対するウサギ抗血清は[2. 1. 1]で作成したCKII β ペプチドをグルタルアルデヒドを用いてKLHに結合したものを抗原としてウサギに免疫して作成した。同抗体は細胞総蛋白質中でCKII β のみを特異的に認識することをWesternブロッティングで確認した。

第2章：方法

[2. 1. 7 : HSP90及び結合蛋白質の免疫沈降]

L 細胞粗抽出液を抗HSP90 IgGと氷上で120分間インキュベートし、更に Protein A-Sepharoseの懸濁液を加えて4°Cで60分間混合した。Protein A-SepharoseをHEDGバッファーで5回洗浄し、吸着したHSP90およびHSP90と複合体を形成して共沈降された蛋白質はSDSバッファーと5分間煮沸して溶出した。溶出された免疫沈降物中のCKII活性は[2. 1. 10]に従い活性ゲル内リン酸化法によって検出した。

[2. 1. 8 : CKII活性の測定]

CKII活性は30°Cで10分間、Assayバッファー中でCKII特異的な基質合成ペプチド (RRREETEEE) 0.7 mg/mlの存在下で解析した。反応液をphosphocellulose P81の紙片にスポットし、80 mM リン酸で充分洗浄し、同紙片に特異的に吸着された基質ペプチドへの放射性リン酸の取り込みをシンチレーションカウンターで測定した[Kuenzel & Krebs (1985)]。

[2. 1. 9 : ショ糖密度勾配离心法]

L 細胞粗抽出液又は精製CKII (HEDG バッファーに対し10 μ g/mlとなるように希釈した)を[1. 1. 9]と同様にHEDGバッファー中の5-20%ショ糖密度勾配を用いて解析した。必要に応じて予め抗HSP90 IgG (0.5 mg/ml)と氷上で120分間インキュベートした。再構成実験の際には精製CKIIを予め氷上でHEDGバッファー中で精製HSP90 (1.0 mg/ml)と共に60分間インキュベートした。各フラクションのCKII活性を[2. 1. 8]に従い特異的合成基質ペプチドを用いて解析した。

[2. 1. 10 : SDS-PAGE後にrenatureしたSDS-ポリアクリルアミドゲル内でのCKII活性の測定 (活性ゲル内リン酸化法)]

Ca²⁺-カルモジュリン依存性キナーゼIIに対して報告されたゲル内リン酸化法 [Kameshita & Fujisawa (1989)]を改変してCKII活性を測定することを試みた (図2.1参照)。

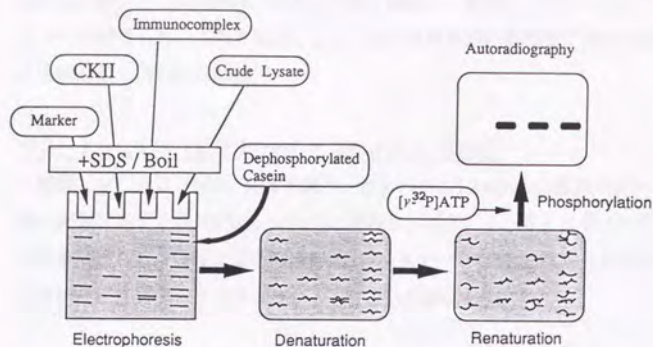


図2-1-1 活性ゲル内リン酸化法の原理と手順。

脱リン酸化したカゼイン(2 mg/ml)を基質としてアクリルアミドと共にセパレーションゲルに固め込む。サンプルを電気泳動し、タンパクのdenaturation/renaturation後に反応溶液中で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 中でリン酸化反応を行なわせ、オートラジオグラフィーによって触媒サブユニットの位置でのカゼインのリン酸化を検出する(詳細は本文[2. 1. 10]参照)。

2 mg/mlの脱リン酸化精製カゼインを溶かしこんだSDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて、サンプルを通常のLaemmliの系で電気泳動した。泳動後、ゲルを2-propanolで洗浄してSDSを除去し、6M Guanidinium塩酸溶液(50 mM Tris-Cl, 5 mM 2-メルカプトエタノール、pH 8.0のバッファーに溶かした)中で室温1時間インキュベートしてゲル内の蛋白質を完全に変性させた。その後、ゲルを0.04% Tween 40溶液(同バッファー中)で4°Cで16時間充分に平衡化してゲル内の蛋白質をrenatureさせた。ついでバッファー(40 mM Tris-Cl, 50 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 2 mM DTT, pH 8.0)で平衡化し、その後、50 μM非放射性ATP+3 MBq $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を加えて(同バッファー中)室温で60分間イ

第2章：方法

インキュベートしてゲル内でリン酸化反応を行なった。ゲルは10% (w/v)TCA+1%ピロリン酸ナトリウム溶液で十分に洗浄/固定し、乾燥してオートラジオグラフィを行なった。この方法によってCK IIを特異的に高感度で検出できることを確立した[宮田 (1991b)]。

[2. 1. 11 : HSP90のCK IIによるリン酸化]

精製したCK II (HEDG 又は KCMバッファー中に4 $\mu\text{g/ml}$ に希釈)を様々な濃度の精製HSP90 (0-0.4 mg/ml)と混合し、[2. 1. 8]に従ってCK II活性を測定した。同時に反応溶液をSDSバッファー中で5分間煮沸した後SDS-PAGEを行ない、オートラジオグラフィによって解析した。

[2. 1. 12 : メンブレンオーバーレイによるHSP90とCK IIの結合の解析 (図2.2参照)]

精製したCK II (2 μg)をSDS-PAGE後、PVDFメンブレンに転写した。転写後、メンブレンをrenaturationバッファー (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, $\times 1$ Denhardt's solution, pH 7.4)中で室温で90分インキュベートした。ついで20% FCS/TBSで室温1時間ブロックした後、0.2% Tween-20/TBSで3回洗浄した[Filhol et al. (1990b)]。

HSP90は2通りの方法でラベルした。放射性ラベルの場合、精製HSP90 (360 μg)を精製CK II (0.2 μg)と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を含むAssayバッファー中で30 $^{\circ}\text{C}$ 30分インキュベートしてHSP90をリン酸ラベルした。PD10カラム (Pharmacia)でゲル濾過を行なってHSP90を未反応のATP等から分離・精製した。また、biotinラベルの場合には、同量のHSP90を1 mMのSulfo-NHS-biotinと0.2 M NaHCO_3 , pH 8.5のバッファー中で2 $^{\circ}\text{C}$ 2時間インキュベートしてHSP90をbiotin化し、PD10ゲル濾過カラムで標識HSP90を精製した。いずれの場合にも得られた精製HSP90画分にはHSP90以外に標識化合物が無いことを確認した。

標識HSP90をCK IIを転写したPVDFメンブレン上にオーバーレイし、37 $^{\circ}\text{C}$ で2時間インキュベートした。次いでメンブレンをHEDG+0.1M NaCl及びHEDG+0.1 M NaCl+0.1% Tween 20でそれぞれ2回ずつ洗浄し、 ^{32}P HSP90を用い

【2.2.2】結果

[2.2.1: HSP90をリン酸化するキナーゼがHSP90と共精製される]

HSP90をこれまでに報告されている方法[Koyasu et al. (1986)]に準じてL5178Y細胞から、DE52, hydroxylapatite, Sephacryl S-300、およびMonoQの4種のカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製HSP90は、SDS-PAGE後CBBで染色すると、単一バンドとして観察された(図2.3A)。しかし、この最終精製HSP90に、他の蛋白質を加えずに $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を加えてインキュベーションすると、HSP90がリン酸化されることがわかった(図2.3B, Lane 1)。

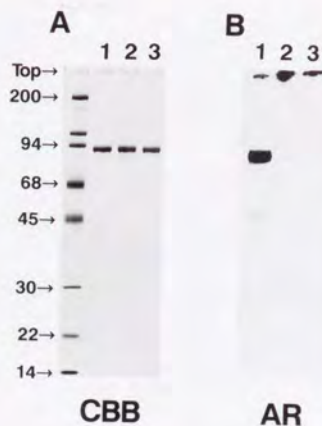


図2.3 高度に精製されたHSP90画分にはHSP90をリン酸化するキナーゼが含まれる。

高度に精製したHSP90画分を、コントロールのSephacryl 4B (Lane 1), phosphocellulose (Lane 2) 又は heparin-Sephacryl (Lane 3) と混合し、樹脂に吸着した蛋白質を遠心によって除去した。上清に残った蛋白質(5 μg)を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とAssayバッファー中で30°C 10分間インキュベートし、SDS-PAGEによって解析した。ゲルのCBB染色(A)及びオートラジオグラム(B)を、分子量マーカーの位置と共に示した。

第2章：結果

この実験結果は、何らかのキナーゼがHSP90と共精製されており、そのキナーゼがHSP90をリン酸化したことを示唆している。そこでこのキナーゼの同定を試みた。

このキナーゼ活性がHSP90と分離できるかどうかを調べるため様々なアフィニティー樹脂を加えてインキュベートした所、このキナーゼは phosphocellulose及びheparin-Sepharoseに、比較的高塩濃度（それぞれ0.4 M及び0.2 MのNaCl）下でも、強固に結合することが判った（図2.3, Lane 2, 3）、この条件ではHSP90はいずれの樹脂にも結合しなかった（図2.3A）。このことから、用いた条件ではHSP90が自己リン酸化しているのでは無いことが示された。

[2.2.2 : HSP90と共精製されるキナーゼはカゼインキナーゼIIである]

更に、このキナーゼの性質を検討した（図2.4）。このキナーゼ活性は熱によって失活し、2価金属（ Mg^{2+} 又は Mn^{2+} ）を必要とした。

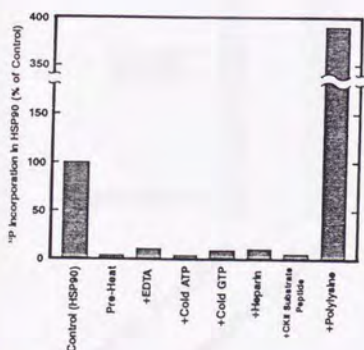


図2.4 HSP90と共精製されるキナーゼの様々な性質。

高度に精製したHSP90（5 μ g）を様々な条件で30°Cで10分間 [γ -³²P]ATPとインキュベートし、HSP90に取り込まれた放射活性を定量化し、Control（HSP90のみ）に対するパーセンテージで示した。Control, HSP90のみ；Pre-Heat, 70°C5分前処理；EDTA, 5 mM；+Cold ATP/GTP, [γ -³²P]ATPに対して×200の非放射性ATP/GTPを加えた；heparin, 1 μ g/ml；+CK II Substrate Peptide, 0.7 mg/mlのCK II 特異的基質合成ペプチド（RRREEETEEE）を加えた；Polylysine, 0.1 mg/ml。

第2章：結果

このキナーゼ活性は低濃度のヘパリンで顕著に阻害され、ポリリジンによって活性化された。また、非放射性のGTP及びATPによってほぼ同程度に放射活性のHSP90への取り込みが阻害されたことから、このキナーゼがGTPをATPと同程度にリン酸供与体として利用できることが判った。これらの性質は【0.5】で述べたCKIIの性質と非常に良く一致した。そこで、CKIIの特異的な基質である合成ペプチド[Kuenzel & Krebs (1985)]をリン酸化反応の際に加えた。すると、このペプチドはHSP90のリン酸化を競合的に阻害した(図2.4)。

HSP90と共精製されたキナーゼはCKII様の活性を持つことが示されたので、カゼインを基質としたゲル内リン酸化法を用いて同キナーゼの触媒サブユニットの分子量を決定した。図2.5の様に、同キナーゼの触媒サブユニットはヘパリン感受性を持つ分子量40/43kDaの2本のバンドとして検出された。これは報告されているCKII α の分子量と一致する[Tuazon & Traugh (1990)]。以上の性質を総合して考えて、HSP90と共精製されているキナーゼはCKIIであると同定した。



図2.5 HSP90と共精製されるキナーゼの触媒サブユニットの分子量。

高度に精製したHSP90画分を、2 mg/mlの脱リン酸化したカゼインを含むセパレーションゲルを用いてSDS-PAGEを行なった。ゲル内リン酸化反応を1 μ g/mlのheparinの存在下又は非存在下で行ない、ゲルのオートラジオグラフィーを行なった。

第2章：結果

HSP90とCKIIの共精製が、単に4種のクロマトグラフィー上でHSP90のピークとCKIIのピークの一部が偶然重なっている為なのか、それともほぼ完全に挙動を共にしているかを調べる為に、一連のカラムクロマトグラフィーにおける両蛋白質の挙動を追跡した。HSP90量はカラムフラクションをSDS-PAGE後densitometerで定量化した。また、CKII量は特異的な基質合成ペプチドを用いたキナーゼアッセイによって定量化した。図2.6 A-Dに示すように、CKII活性はDE52, hydroxylapatite, 及びMonoQの3種のカラムに於いて完全にHSP90と同じ位置に溶出された。ゲル濾過カラムからはCKII活性はHSP90の主要ピークよりは僅かに早く溶出した。これはHSP90-CKII複合体がHSP90のダイマーより分子サイズが大きいことを示している。

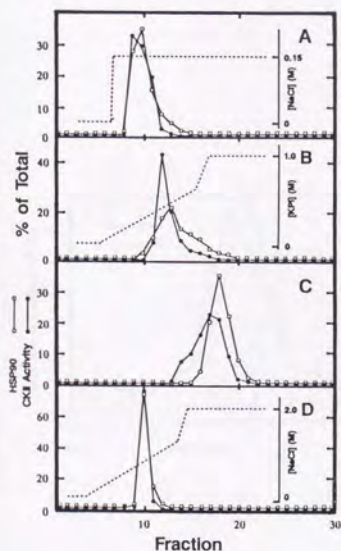


図2.6 HSP90とカゼインキナーゼIIとの共精製。

HSP90をマウスリンフォーマL5178Y細胞から精製する4種のカラムクロマトグラフィーの各過程で、それぞれのフラクションに含まれるHSP90の量をSDS-PAGE後にCBB染色してdensitometerで定量化した(□-□)。同時にCKII活性を特異的基質合成ペプチドを用いて定量化した(●-●)。それぞれの値をトータルの量に対する%で示した。A, DE52; B, hydroxylapatite; C, Sephacryl S-300 gel filtration; D, MonoQ。また、NaCl濃度(A及びD)あるいはリン酸カリウム(B)のグラジエントを点線で示した。

第2章：結果

これらの結果は、CK IIが単にクロマトグラフィー上でHSP 90と偶然近い位置に溶出したというよりは、CK IIが細胞抽出液からMonoQカラムの段階まで、HSP 90と複合体を形成して存在していることを示唆している。そこで、更に直接この複合体形成の有無を細胞粗抽出液を用いて検討した。

[2. 2. 3：細胞粗抽出液中でのCK IIとHSP 90の複合体形成]

L細胞の粗抽出液を、低イオン強度のHEDGバッファーを用いて調製した。同抽出液中のCK IIの沈降係数をショ糖密度勾配遠心で調べた。同抽出液中ではCK II活性は沈降係数約8Sの単一ピークとして存在していた(図2.7■)。精製CK IIの高塩濃度下(約300mM以上)でのテトラマーは沈降係数約6Sであることが報告されている[Glover (1986)]。即ち、同抽出液中ではCK IIは $\alpha_2\beta_2$ のテトラマーよりも大きな複合体として存在していた。そこで、この8S複合体中にHSP 90が構成成分として含まれているか、CK IIの沈降係数に対する抗HSP 90抗体の効果を調べた。

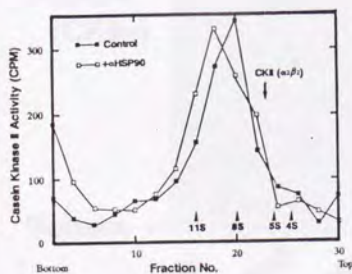


図2.7 ■ 細胞粗抽出液中におけるCK IIの沈降係数と抗HSP 90抗体の効果。

L細胞の粗抽出液をHEDGバッファーで調製し、抗HSP 90 IgG(0.5 mg/ml)の存在下(□-□)または非存在下(■-■)でインキュベートした。反応液をHEDGバッファー中の5-20%のショ糖密度勾配遠心によって解析した。各フラクションのCK II活性を特異的基質合成ペプチドを用いて解析した。高イオン強度で同様の実験を行なった時に観察されるCK IIの $\alpha_2\beta_2$ テトラマーのピークの位置を↓で示した。

第2章：結果

図2.7□に明らかな様に、抗HSP90抗体によって8SのCKIIピークは約10Sと重い方へシフトした。即ち、同細胞粗抽出液中でCKIIはHSP90と約8Sの複合体を形成して存在していることが示された。高塩濃度下で同様の実験をした場合、精製CKIIは約6Sの沈降係数を示し(図2.7↓)、抗HSP90抗体はこの場合には沈降係数に影響を及ぼさなかった (data not shown)。この事は、GCRの場合と同様に、CKII-HSP90複合体が高塩濃度に比較的不安定であることを示している。

次いで、抗HSP90抗体を用いてHSP90とCKIIが共沈降されるかどうかを調べた。L細胞粗抽出液を、コントロール(non-immune)のIgG、抗*S. cerevisiae* HSP90 IgG、及び抗マウスHSP90 IgGを用いてそれぞれ免疫沈降をおこなった。

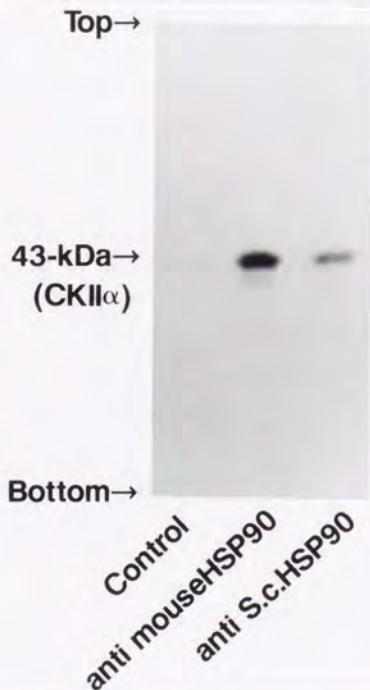


図2.7□ CKIIはHSP90と共に免疫沈降される。

L細胞の粗抽出液をHEDGバッファー中で調製し、non-immuneのIgG、抗マウスHSP90 IgG、或いは抗*S. cerevisiae* HSP90 IgG (L細胞のHSP90と弱く反応する)とそれぞれインキュベートした。生じた免疫複合体はプロテインA-Sepharoseに吸着し、充分洗浄した後に含まれるCKII活性をゲル内リン酸化法によって解析し、オートラジオグラフィを行なった。

第2章：結果

得られた免疫沈降物複合体をカゼインを基質とした活性ゲル内リン酸化法によって解析した(図2.8)。その結果、分子量40及び43kDaのカゼインリン酸化活性がHSP90と共沈降することが検出された。この値は図2.5と同様に、報告されているCKIIの分子量と良く一致している。この結果からも、HSP90が細胞粗抽出液中でCKIIと複合体を形成していることが示された。

[2.2.4: HSP90はin vitroでCKIIと複合体を形成してCKIIの多量体を解離する]

次いで、*in vitro*で、精製したHSP90と精製したCKIIの両成分からCKII-HSP90複合体が再構成されるかを検討した。HSP90を含まないCKIIはブタの精巣から精製した。また、CKIIを含まないHSP90は、[2.2.1]で述べられているように通常の方法で精製したHSP90からCKIIをheparin-Sepharoseで吸着除去して用いた。

精製CKIIをHSP90の存在下・非存在下でインキュベートし、混合物をショ糖密度勾配速心法によって解析した。既に報告されているように[Glover (1986)]、低イオン強度下ではCKIIは大きな多量体を形成した(図2.9●)。この時、HSP90を加えておくと、CKIIの多量体は解離して8Sの複合体となった(図2.9■)。加えたHSP90ホモダイマーは約6Sのピークとして存在し(図2.9↓)、また、CKII活性を測定する際にCKII特異的な基質ペプチドを加えないと、放射性リン酸の取り込みは観察されなかった(図2.9□○)。従って、図2.9でHSP90を加えた時に見られる8Sのピークは、加えたHSP90にリン酸が取り込まれた為ではなく、CKIIのピークがシフトしたことを示している。また、この8Sのピークは抗HSP90抗体によって有意に重い方へとシフトしたことから(data not shown)、ここで再構成された8S-CKIIは、粗細胞質画分の8S-CKII、更には8S-GCRと同様に、HSP90をその構成成分として含むことが確認された。以上の結果を総合して考え、HSP90は、CKIIの大きな多量体を解離して、細胞粗抽出液で観察されるのと同様の8SのCKII-HSP90複合体を再構成したと結論した。

第2章：結果

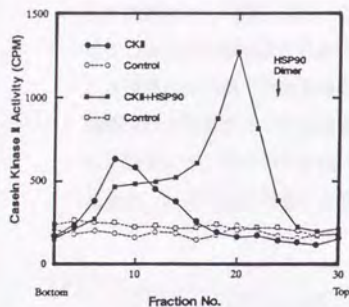


図2.9 CK IIの低イオン強度での沈降係数とHSP90-CK II複合体の再構成。

精製したCK II (10 μ g/ml)をHSP90 (1 mg/ml)の存在下(■、□)又は非存在下(●、○)にHEDGバッファー中でインキュベートし、ショ糖密度勾配遠心によって解析した。それぞれのフラクションのCK II活性を特異的基質ペプチド(0.7 mg/ml)の存在下(●、■)でアッセイした。コントロールとして、アッセイの際に基質ペプチドを除いた場合(○、□)ほとんど放射活性が見られなかった。CK IIと複合体を形成していないHSP90のダイマーの存在位置を↓で示した。

[2.2.5: HSP90は上記の複合体形成に伴ってCK IIを活性化する]

図2.9では、HSP90を加えた時と加えない時で、同量のCK IIを用いた。しかし、超遠心・分画後に回収される総CK II活性は、常にHSP90の存在下(S8複合体)の方がHSP90無し(CK IIの多量体)よりも高かった。この事は、HSP90がCK IIと複合体を形成することでCK IIを活性化したことを示唆する。それゆえ、CK II活性に対するHSP90の効果を直接に調べることを試みた。等量のCK II (HEDGバッファー中に4 μ g/ml)を取り、様々な濃度の*S. cerevisiae*のリコンビナントHSP90を含むAssay buffer中に加えた。そして、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を加えてCK II活性を測定した。

ここで用いた条件では、HSP90無しではCK IIは α 及び β のいずれのサブユニットにも非常に僅かの自己リン酸化しか引き起こさなかった(図2.10A)。ところがHSP90を加えると、CK II β のリン酸化が劇的に促進された(図

第2章：結果

2.10A). 同時に、HSP90もCKIIによってリン酸化された。HSP90の存在下ではまた、CKII α も僅かに自己リン酸化された(図2.10A)。こうしたリン酸化活性の促進は加えたHSP90の量に依存していた。このとき、外来性の基質ペプチドに対するリン酸化活性も同様にHSP90を加えることで著しく促進された(図2.10B)。この、外来性の基質に対するキナーゼ活性とCKII β の自己リン酸化量とは非常に良く一致していた(図2.10Aと図2.10Bを比較)。この促進は大腸菌で発現させたリコンビナントの*S. cerevisiae* HSP90のみでなく、精製マウスHSP90でもほとんど同様に観察された(data not shown)。これらを総合して、HSP90は、外来性の基質、HSP90、およびCKIIそれぞれ自身の、いずれもCKIIによるリン酸化を同様に促進することが結論された。

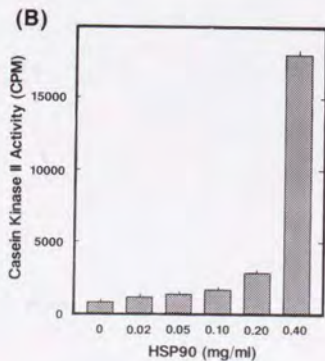
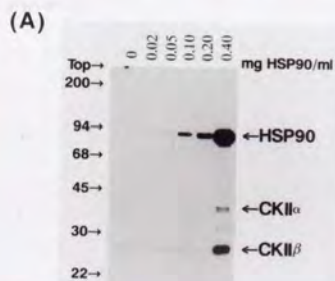


図2.10 HSP90によるCKIIの活性化。

(A)、精製したCKII (HEDGバッファー中に4 μ g/mlに希釈)を、0-0.4 mg/mlのキナーゼフリーの精製リコンビナントHSP90の存在下に[γ - 32 P]ATPと共にAssayバッファー中で30 $^{\circ}$ C10分間インキュベートした。リン酸化反応後のサンプルをSDS-PAGEによって分離し、オートラジオグラフィーを行なった。

(B)、CKIIによるリン酸化反応を(A)と同様に様々な濃度のHSP90の存在下で行なった。その時に、特異的基質ペプチドに対するCKII活性を測定して示した。

第2章：結果

上記の実験で用いられている条件は、比較的塩濃度が低い条件である。そこで、より生理的な条件でこの活性化が起こるかどうかを調べた。精製したCK IIをKCMバッファー（生理的な塩条件）またはHEDGバッファーに希釈し、KCMバッファー中でCK II特異的合成ペプチドに対するキナーゼ活性を測定した。図2.11に示す様に、精製したマウスHSP90 (●)及びリコンビナントの*S. cerevisiae* HSP90 (■)のいずれも、ほぼ同様に生理的条件で濃度依存的にCK IIを活性化することが明らかとなった。更に、図2.11○では、HSP90が一度も低いイオン強度に曝していないCK II（直接高塩濃度のストックからKCMバッファー中に希釈する）をも活性化することが明らかとなった。即ち、これらのデータは、HSP90との複合体形成によるCK IIの活性化は生理的な条件でも引き起こされることを示している。

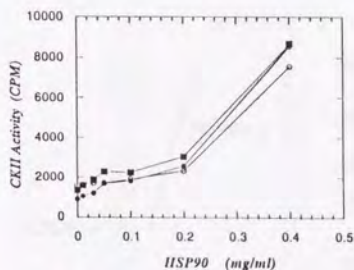


図2.11 生理的イオン条件におけるHSP90によるCK IIの活性化。

精製したCK II（予めHEDG バッファー(●、■)またはKCMバッファー(○)に希釈した)を、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とKCMバッファー中で37℃で10分間インキュベートした。その時に0-0.4 mg/mlの、マウス精製HSP90(●、○)又は大腸菌で発現させて精製したリコンビナント酵母HSP90(■)を加えて、CK II活性に対する効果を特異的基質ペプチドを用いて調べた。

[2. 2. 6 : HSP90はCK IIの触媒サブユニットである α に特異的に結合する]

CK IIはこれまで調べられたほとんどの生物種で、分子量40-45kDaの $\alpha\alpha'$

第2章：結果

サブユニットと分子量23-27kDaの β サブユニットから成り立っている[for review, see Tuazon & Traugh (1990)]. 実際、ここで精製されたブタ精巢のCK IIも分子量42kDaの α (及び40kDaの α')のサブユニットと分子量27kDaの β サブユニットから成っていることがSDS-PAGEによって確かめられた。そこで、HSP90がCK IIのどちらのサブユニットに結合するかをメンブレンオーバーレイ法によって調べた。図2.12Aに、 32 PラベルしたHSP90とCK IIの結合のオートラジオグラフィーを示した。図から明らかなように、HSP90はSDS-PAGEで分離されたCK IIの2つのサブユニットの内、分子量約43kDaの α サブユニットのみに結合し、 β サブユニットには全く結合しなかった。

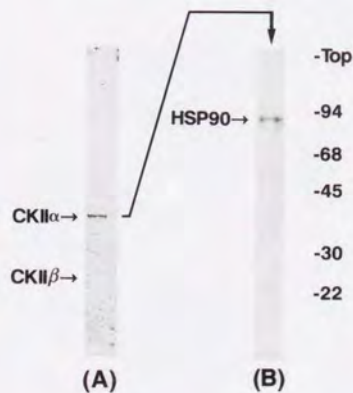


図2.12 メンブレンオーバーレイ法によるHSP90結合サブユニットの決定。

精製したCK II (2 μ g/ml)をSDS-PAGE後PVDFメンブレンに転写し、renaturing及びブロッキングを行なった。HSP90 (360 μ g)は精製CK II及び[γ - 32 P]ATPとインキュベートしてリン酸ラベル後、ゲル濾過で再精製した。メンブレン上のCK IIを標識HSP90とインキュベートした後に洗浄し、結合したHSP90をオートラジオグラフィーによって解析した(A)。CBB染色によるCK II α 及びCK II β の位置を矢印で示した。また、(A)のバンドを切り出し、メンブレンに結合している蛋白質を溶出後再びSDS-PAGEによって分離し、オートラジオグラフィーによって解析した(B)。

第2章：結果

HSP 90 をbiotinで標識したときも同様の結果が得られた(data not shown). 標識されたCK II α 部分のメンブレンを切り出して再びSDS-PAGEによって解析し、CK II α に結合しているのが確かに標識されたHSP 90であることも確認した(図2.12B). この結果から、HSP 90はCK IIの α サブユニットに特異的に結合することが示された.

[2. 2. 7 : CK II-HSP 90複合体形成に対する塩濃度・温度の影響]

HSPは、細胞の温度を上昇させると合成が上昇する、従って、より高い温度で顕著に起こる反応に対してより高い濃度のHSP 90が必要とされるのであれば、それはHSPの生理的作用を反映している可能性が考えられる。そこでCK IIのHSP 90による活性化に対する温度の影響を調べた。

精製したCK IIをとり、生理的な塩濃度のもとで、0-45°Cの様々な温度で0-4時間インキュベートし、1時間ごとにその一部を取ってAssayバッファー中でのCK II活性を測定した。その結果、CK IIは時間と共に徐々に不活性化し、しかもCK IIの不活性化は、温度がより高い方(特に生理的な温度以上)で顕著であった(図2.13)。

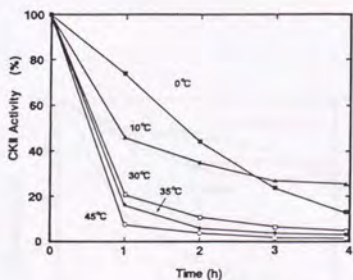


図2.13: CK IIの不活性化の温度依存性.

一定量のCK II (1 μ g)をHEDGバッファー+10 mM MgCl₂溶液に希釈し、0-45°Cの様々な温度でインキュベートして1時間ごとにその一部をとってCK II活性を30°Cで特異的の基質を用いて測定した。測定値は時間0での値を100%として示した。

より高い温度におけるCK IIの不活性化が、プロテアーゼの作用や熱による非特異的な分解によるのでは無いことは、CK II β に対する抗体を用いたWestern blottingによって確認した(図2.14)。おそらく、こうしたCK IIの不活性化は、

第2章：結果

CK IIの多量体形成によっていると考えられる。即ち、CK IIは温度依存的に多量体形成を引き起こし、これがCK IIの活性の消失をもたらすと考えられる。

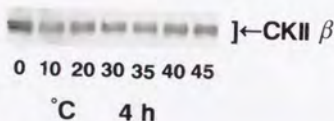


図2.14 CK IIの温度依存性の不活性化と β サブユニット。

一定量のCK II ($1 \mu\text{g}$)をHEDGバッファー+10 mM MgCl_2 溶液中で0-45°Cの様々な温度で4時間インキュベート後にSDS-PAGEで分離し、抗CK II β 抗体を用いてWesternプロットを行なった。

上記の温度依存性のCK IIの不活性化に対するHSP 90の影響を次に調べた。生理的な塩濃度下で様々な濃度のHSP 90と共にCK IIを37°CでインキュベートしてCK II活性の変化を測定した。その結果、HSP 90は50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で、ほぼ濃度依存的にCK IIの不活性化を阻害した (図2.15)。

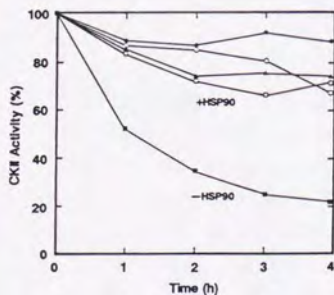


図2.15 HSP 90によるCK IIの不活性化の阻害。

0.4 μg のCK IIを、0 (■)、0.05 (□)、0.1 (▲)、0.2 (○)、及び0.45 mg/ml (●)のキナーゼを含まない精製HSP 90の存在下で、37°CでHEDG+10 mM MgCl_2 +100 mM NaCl 溶液中でインキュベートし、1時間ごとにその一部を取って特異的基質に対するCK II活性を30°Cで測定した。測定値は時間0の値を100%として示した。

第2章：結果

この阻害効果が、CKIIの多量体形成を阻害しているからであることを、超速心実験によって調べた。図2.16では、様々な濃度のHSP90とCKIIを37°Cで4時間インキュベートした後に、サンプルを超速心し、多量体を形成しているCKIIのみをペレットとして回収した。そして、ペレットと上清に残った蛋白質をSDS-PAGEによって分離し、(A) HSP90の量 (CBB染色) : (B) CKII α の量 (活性ゲル内リン酸化法) : (C) CKII β の量 (特異的ペプチド抗体によるWesternブロッティング) をそれぞれ示した。CKIIは、用いた条件で、HSP90を加えないとほとんどペレットに多量体として回収された。それに対して、HSP90を加えると、加えたHSP90の量に依存して上清に回収されるCKII α 及び β 双方の量が增大した (図2.16)。以上の結果から、HSP90は、CKIIと複合体を形成して、温度依存的に引き起こされるCKIIの多量体形成とそれに伴う不活性化を阻害することが示された。

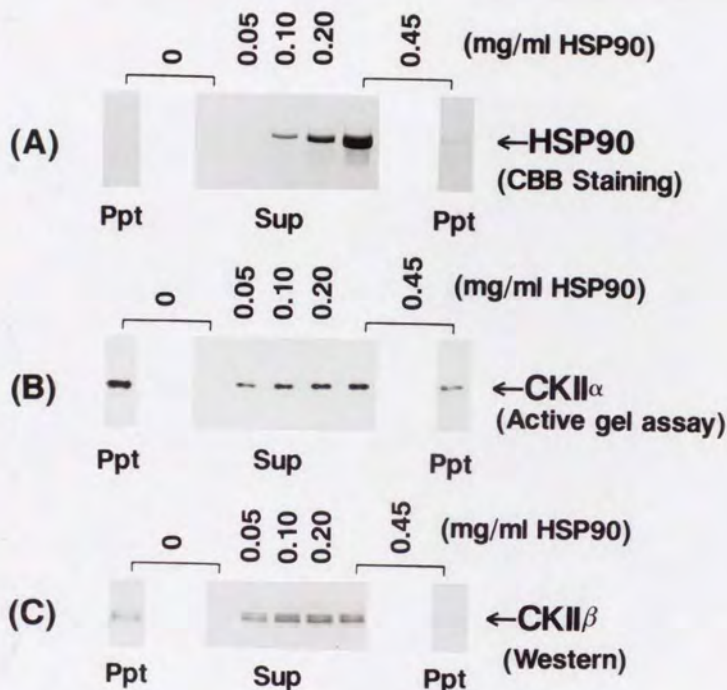
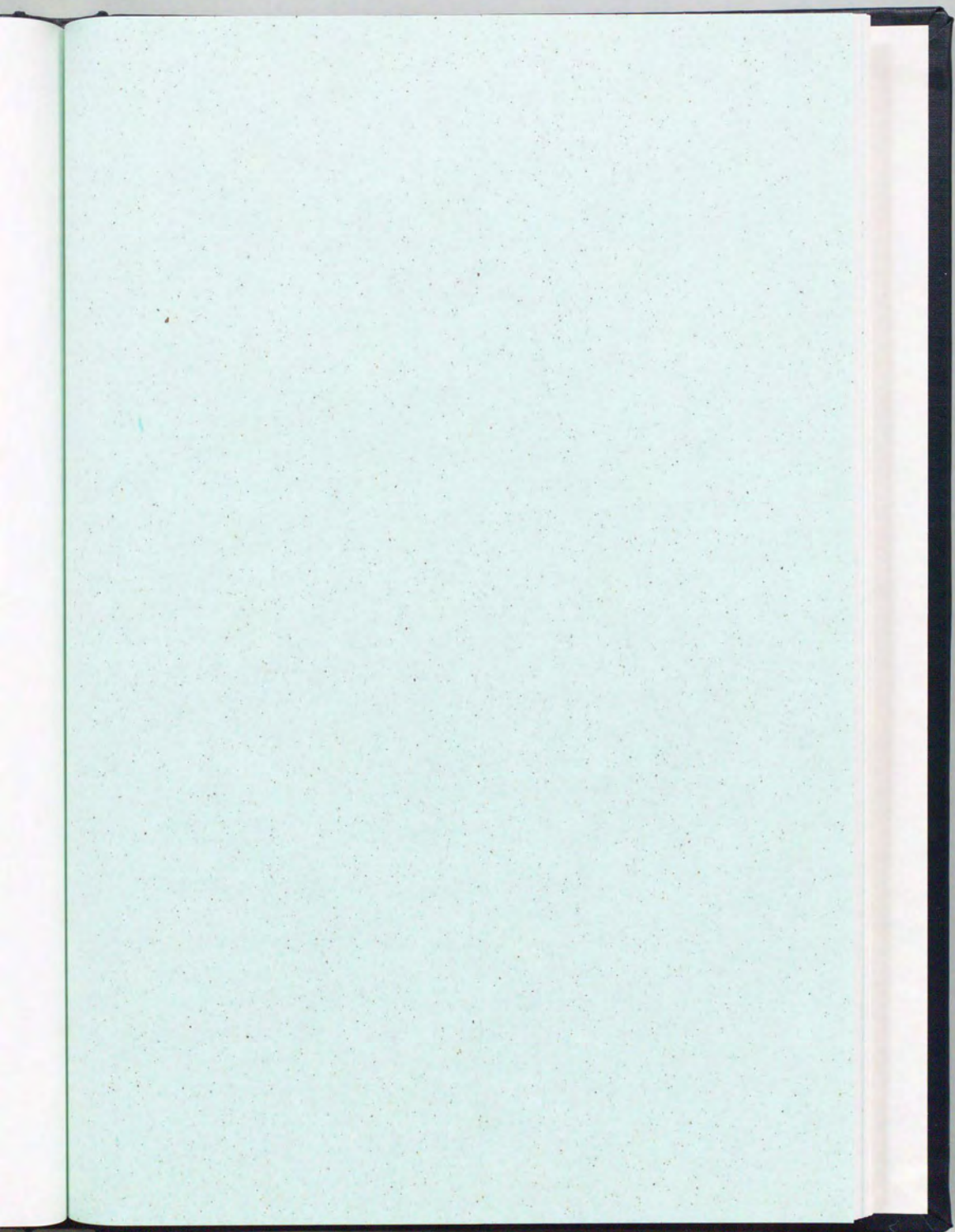


図2-16 HSP90によるCKIIの自己会合の阻害。

0.4 μ gのCKIIを0-0.45 mg/mlのキナーゼを含まない精製HSP90の存在下で37°CでHEDG+10 mM MgCl₂+100 mM NaCl溶液中で4時間インキュベートした後、100,000 \times gで60分超遠心して上清と沈殿に分けた。沈殿は0.1%SDSで可溶化したのち、上清と沈殿に含まれる蛋白質をSDS-PAGEによって分離した。HSP90、CKII α 、CKII β に対応する分子量の位置を切り出し、(A)、CBB染色でHSP90の量；(B)、活性ゲル内リン酸化法でCKII α の量；(C)、Western blottingでCKII β の量を、それぞれ示した。各々について、上清の蛋白質(Sup)及び、0又は0.45 mg/mlのHSP90を加えた時の沈殿の蛋白質(Ppt)について示した。





《第3章》

考察

〔3.1.1〕細胞骨格とHSP90の相互作用とステロイドホルモンの生理作用

〔3.1.1〕HSP90・ステロイドホルモン受容体 (SHR)複合体と細胞骨格の相互作用

第1部では、8S-GCRはアクチン繊維と結合するが4S-GCRは結合しないという結果を得た。精製HSP90やトロポミオシンはほぼ完全に8S-GCRとアクチンとの結合を阻害し、また、カルモジュリンはその結合を Ca^{2+} の存在下にのみ阻害した。これらの結果を、*in vitro*でのアクチンと精製HSP90との結合の性質[Koyasu et al. (1986), Nishida et al. (1986)]と考えあわせ、8S-GCR複合体とアクチン繊維との結合は、複合体中のHSP90成分を介して特異的に起こっていることを結論した(図3.1)[Miyata & Yahara (1991)]。

細胞骨格系には大きく分けてアクチン繊維からなるマイクロフィラメント系と、チューブリンからなる微小管系、また、中間径繊維系が知られている。これらの細胞骨格系はそれぞれ独立に存在するのではなく、お互いが構成蛋白質の相互作用を介して全体として大きな細胞骨格ネットワークとして成り立っている[酒井(1989)]。即ち、HSP90はアクチン繊維を介して細胞骨格系全体と相互作用し得ると考えられる。これらを総合すると、8S-GCRはHSP90を介して細胞質の細胞骨格系に結合していると考えられる[Miyata & Yahara (1991)]。

〔3.1.2〕ステロイドホルモン受容体のアンカリングシステムとしてのHSP90

8S-GCRは細胞質にDNA非結合型として存在し、リガンドであるグルココルチコイドの結合によってGCR・HSP90複合体は解離し、受容体がDNA結合能を獲得する。この活性化のプロセスに伴って、受容体は細胞質から核へと移行する[次の総説を参照 Denis & Gustafsson (1989), Pratt et al. (1989)]。GCRは、分子内に核移行シグナル配列が同定されており[Picard & Yamamoto (1987)]、それ故、本来ならば核移行シグナルに従って核に局在する筈である。それにも

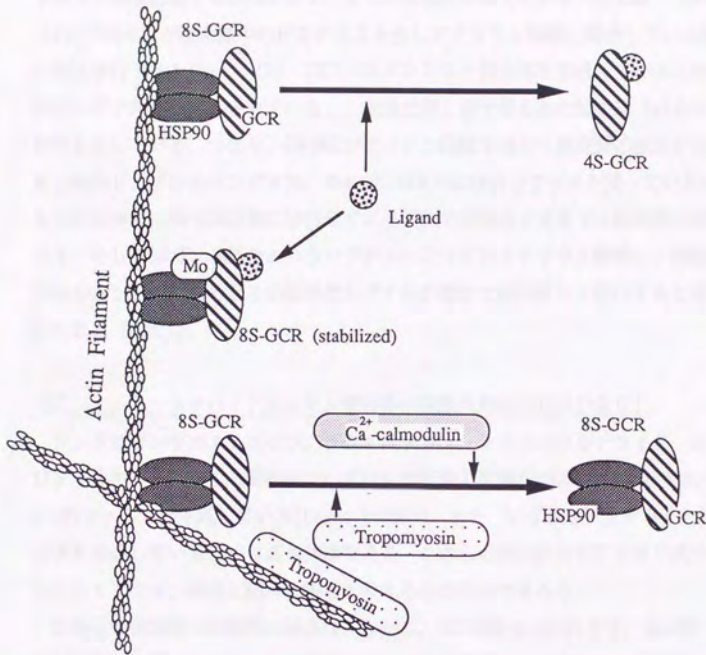


図3-1 HSP90を介したGCRとアクチン繊維との相互作用。

8SのGCR-HSP90複合体はHSP90を介してアクチン繊維と結合する。リガンドによって複合体が解離するとGCRは4S型となり、HSP90及びアクチン繊維から離れる。Molybdateはこの過程を阻害し、また、Ca²⁺-カルモジュリンやトロポミオシンはリガンド無しでアクチン繊維からのHSP90の解離を引き起こす(本文 [3, 1, 1] 参照)。

第3章：考察

かかわらず、8S-GCRは細胞質に存在する[Wikstrom et al. (1987)]. この一見矛盾する事実に対する説明として、2つの可能性が考えられる(図3.2). 即ち、

(a) 「8S-GCRが複合体中のHSP90を介してアクチン繊維と結合している為に核に移行できない」、(b) 「GCRがHSP90と複合体を形成していると核移行シグナルがマスクされている」。本論文第1部で得られた結果は(a)の可能性を示している。つまり、8S-GCRがアクチン繊維を通じて細胞質の細胞骨格系と結合してアンカリングされ、それ故、GCRが核移行シグナルを持っているにもかかわらず、8S-GCRは核に移行せずにリガンドが結合するまでは細胞質に留まる。そしてリガンド結合というシグナルによってHSP90と解離し、細胞骨格からフリーになるとその核移行シグナルの働きで細胞核へと移行すると考えられる(図3.2)。

[3. 1. 3 : ステロイドホルモン受容体の細胞内局在とHSP90]

アンドロゲンやエストロゲン、プロゲステロン、ミネラルコルチコイド、及びダイオキシンに対する受容体はいずれも性質や1次構造がGCRと類似しており1つのファミリーを成している[Evans (1988)]. また、いずれもHSP90と複合体を形成しているという点も共通である。これらの受容体もHSP90成分を介してアクチン繊維と結合し得ると考えるのが妥当であろう。

これらの受容体の細胞内の局在は、しかし、GCRの場合とは異なり、未だ統一的な見解には至っていない。受容体によっては細胞核に存在することが主張されている[Redeuilh et al. (1987), Renoir et al. (1990), Wilhelmsson et al. (1990)]. 特に、最近プロゲステロンの受容体の大部分はHSP90と複合体を形成したまま細胞核に存在していることが報告された[Renoir et al. (1990)]. いずれもHSP90と複合体を形成する同じファミリーの受容体でありながら、一方が細胞質に一方が細胞核に存在するメカニズムは明らかではない。ここでもまた、2つの可能性が考えられる。1つは両者がHSP90と複合体を形成した際に受容体の核移行シグナルのマスクの程度が異なるというものである。そして、もう1つの可能性は、両受容体・HSP90複合体で、アクチンとの結合の程度が異なるというものである。アクチンとHSP90との結合は比較的弱い($KD=2\mu M$)[Koyasu et al. (1986)].

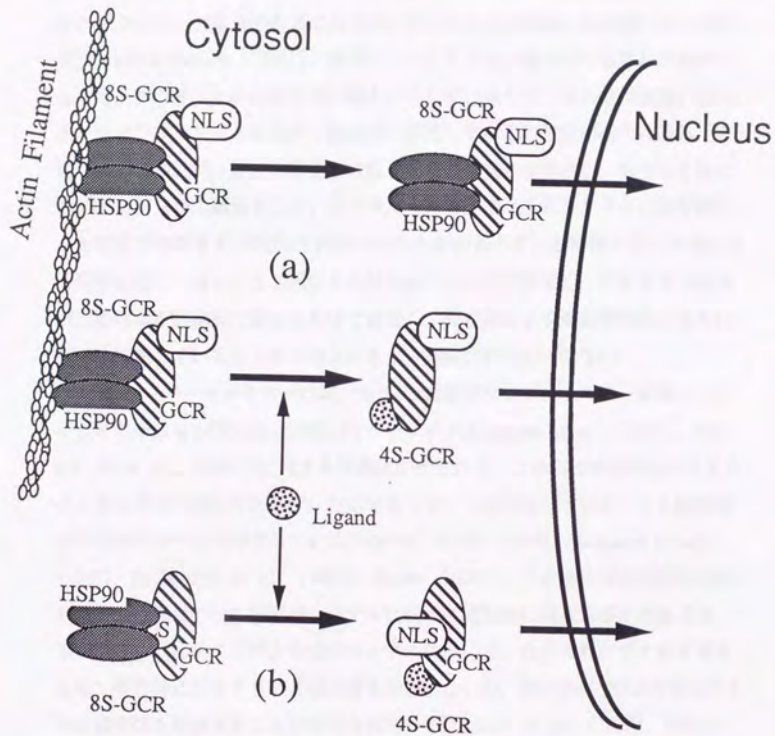


図3-2 GCRの細胞内局在におけるHSP90の役割。

8S-GCRは核移行シグナルを持つにもかかわらず、HSP90と複合体を形成して細胞質に存在する。そのメカニズムとして、(a): 細胞骨格との相互作用の関与; (b): 核移行シグナルのマスキング、の2つが考えられる(本文[3. 1. 2]参照)。

第3章：考察

それに加えてこの結合は Ca^{2+} ・カルモジュリン等の他のシステムによって制御されている[Nishida et al. (1986)]. しかも、これらの*in vitro*でのHSP90とアクチンとの結合の性質は8S-GCRとアクチンとの結合にも同様に当てはまる[Miyata & Yahara (1991)]. 従って、HSP90が複合体を形成した相手によって、アクチンとの相互作用の強さが少しずつ異なり、それ故に或種のSHRはアンカリングシステムを逃れて細胞核に移行している可能性が考えられる[宮田・矢原 (1991)]. 最近の研究ではHSP90は核にも存在し、おそらく核においても何らかの機能をしていると考えられる。また、HSP90の量を減らした細胞では4SタイプのSHRが増大するにもかかわらず、受容体を介した遺伝子の発現が起こらないことも報告され[Picard et al. (1990)], HSP90は単純に受容体を細胞質に留めるだけではなく、受容体による遺伝子発現にさらに別の機能をしていることが予想されるが、詳細は明らかではない。

SHRのスーパーファミリーには、もう1つの重要なサブファミリーがあり、サイロイドホルモン[Evans (1988)]やレチノイド[Giguere et al. (1987), Petkovich et al. (1987)]に対する受容体が含まれる。これらの受容体はHSP90と複合体を形成しておらず、対応するリガンドが存在していなくても細胞核内に4Sのフォームで存在している[Pascual et al. (1982), Giguere et al. (1987), Petkovich et al. (1987), Evans (1988)]. このタイプの受容体はおそらく合成後速やかに核移行シグナルに従って細胞核に局在するのであろう。事実、*in vitro*のタンパク合成のシステムに於いて、合成されたサイロイドホルモン受容体はHSP90と複合体を形成しないが、同じ条件でGCRはHSP90と複合体を形成することが報告されている[Dalman et al. (1989), Dalman et al. (1990)]. これらの事を総合して考えて、SHRスーパーファミリーの細胞内局在は、HSP90と複合体を形成するかどうか、また複合体を形成したときには複合体が細胞骨格や核移行システムとどの程度の強さで結合するかによって決まってくると考えられる[宮田・矢原 (1991)]. このように、HSP90がステロイドホルモン作用の情報伝達に対して、重要な役割を果たしていることが明らかとなったが、より詳細なメカニズムの研究が今後必要になると思われる。

【3. 2. : カゼインキナーゼIIとHSP90との相互作用】

【3. 2. 1 : CKIIとHSP90の複合体形成】

精製CKIIは高塩濃度下では沈降係数6Sの $\alpha_2\beta_2$ テトラマーとして存在している[Glover (1986)]. 第2部では細胞粗抽出液中のCKIIが、HSP90と結合した8S複合体として存在することを示した。この複合体形成は始め、8S-GCRと同様にHEDGバッファー中で検出されたが、CKIIのHSP90による活性化が生理的な条件のバッファーでも観察された(図2.11を見よ)ことから、HSP90はCKIIと生細胞内でも複合体を形成していると考えられる[Miyata & Yahara (1992)]. HSP90とCKIIとが共精製されたのは、この複合体形成を反映していると思われる。これらの事実、CKIIがラット肝臓から得られた可溶性画分に於いて、HSP90とゲル濾過のカラムで挙動を共にするという報告と良く一致している[Meggio et al. (1985), Dougherty et al. (1987)].

【3. 2. 2 : CKII-HSP90複合体のin vitroでの再構成】

SHRやpp60^{v-src}の場合、細胞内で合成後非常に速やかにHSP90と複合体を形成し、単離した成分からのin vitroでの複合体の再構成は、成分蛋白質を一度変性させないと困難である[Inano et al. (1990), Scherrer et al. (1990)]. これに対して、精製HSP90を精製CKIIに加えるとCKIIのアグリゲートが解離されると共に、可溶性のCKII-HSP90複合体がin vitroで再構成されたことは、CKII-HSP90複合体の1つの際立った特徴である。CKIIのアグリゲートのHSP90による解離に伴ってCKIIの活性の上昇が観察された。それ故、HSP90はCKIIを可溶性にし、同時に活性を保持する役割を果たしていると考えられる(図3.3)[Miyata & Yahara (1992)].

【3. 2. 3 : CKII-HSP90複合体形成に必要なHSP90の濃度】

HEDGバッファー中でCKII (4 $\mu\text{g/ml}$)の最大限の活性化には比較的高濃度のHSP90 (0.4 mg/ml)が必要とされた。しかしながら、10 mM MgCl_2 及び100 mM のNaClを加えたバッファー中で37°Cでは50 $\mu\text{g/ml}$ のHSP90で充分であっ

第3章：考察

た(図2.15, 2.16)。この時、同濃度のnon-immune IgGを加えてもCKIIのアグリゲートの解離や活性化が引き起こされなかったため、HSP90によるCKIIの活性化は、高い濃度の蛋白質が非特異的に他の蛋白質の分解や変性を防いでいる為では無い。一方では、細胞内のHSP90の濃度が比較的高いという事実にも着目したい。非ストレス時のHSP90の細胞質濃度は、ラットの3Y1細胞では約0.3 mg/ml、また、マウスのL5178Y細胞では約1mg/mlにも達する(未発表)。増殖因子を細胞に加えたときに見られるラッフル膜のようなHSP90の局在する部分[Koyasu et al. (1986)]ではさらに高い濃度のHSP90が存在するであろう。従って、細胞内での生理的なHSP90の濃度は、CKIIを活性化するのに十分な濃度であると言える。

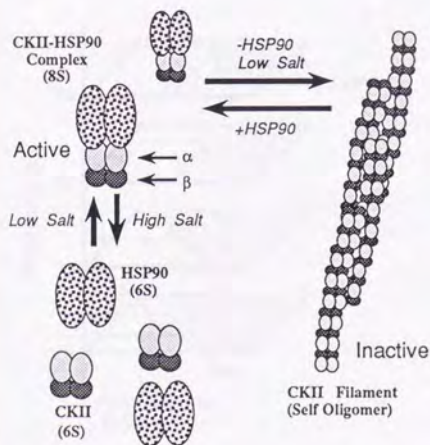


図3.3 CKIIの存在様式とHSP90の関与。

CKIIは低イオン強度では不活性な多量体を形成する。ここでHSP90が存在すると多量体は解離してCKII-HSP90複合体が形成され、CKIIは活性化される。細胞内でもこの複合体が存在すると思われる。また、非常に高い塩濃度ではさらに複合体が解離して $\alpha_2\beta_2$ のテトラマーとしてCKIIは存在する(本文[3.2.2]参照)。

[3. 2. 4 : HSP90-CKII複合体形成に対する温度と塩濃度の影響]

CKIIのアグリゲートの形成は温度依存性であり、より高い温度でアグリゲートの形成が顕著であった。同時に、より低いイオン強度の方がアグリゲートの形成が顕著であった(模式的に図3.4に示した)。そして、HSP90は生理的な濃度でこのアグリゲートの形成とそれに伴う不活性化を阻害した。細胞を熱ショックに曝した時に、おそらく細胞内でCKIIがアグリゲートを形成する傾向に向かうと予想され、より高い温度ではCKIIが本来の機能を果たす為にはより高濃度のHSP90が必要なのではないかと考えられる(図3.4参照)。この傾向はおそらく、ほかの多くの蛋白質に対しても成り立つであろう。こう考えると、細胞を熱ショックに曝したときにHSP90を含む様々なHSPの発現が増大することが合目的的に考えられる。

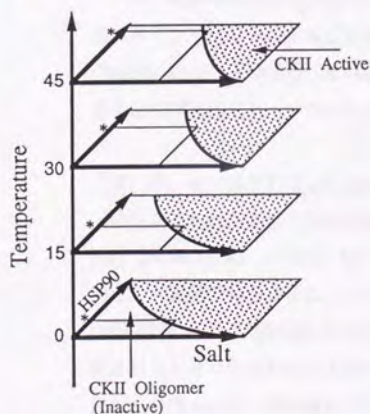


図3.4 カゼインキナーゼIIの存在様式と温度・塩濃度の影響。

CKIIの存在様式は温度、塩濃度、及びHSP90濃度によって決まってくると考えられる。温度が高いほど、塩濃度が低いほど、HSP90濃度が低い程、CKIIは多量体を形成する方向に向かい、不活性となる。従って、一定の塩濃度では、温度が高い程、CKIIの活性を保つために高い濃度のHSP90(*)が必要となる(本文[3. 2. 4]参照)。

[3. 2. 5 : CK IIのサブユニット構成とHSP 90との複合体形成]

CK IIは α (α') と β の2種のサブユニットから成っている。CK IIのキナーゼ活性は α サブユニットに由来する。また、CK IIはDNAやRNAに結合するが、いずれも α サブユニットに結合する[Filhol et al. (1990b), Tuazon & Traugh (1990)]。ヘパリンによるCK II活性の阻害も α サブユニットに直接にヘパリンが働いている[Traugh et al. (1990)]。図2.12の様にHSP 90もCK II α に結合した。ヘパリンはDNAと似た立体構造を取っており、また、HSP 90の高次構造の1部がDNAと似ているという仮説がある[Binart et al. (1989)]。これらの事から、CK II α 上の同一の部位がDNA、ヘパリン、HSP 90との結合に関与している可能性がある。GCRの場合HSP 90との複合体形成によってDNA結合活性が抑制されるが、CK IIのDNAに対する結合活性がHSP 90との複合体形成によってどう影響されるかが興味深い。また、ヘパリンはCK IIを阻害し、HSP 90やDNAがCK IIを活性化するという逆の作用を持つメカニズムも重要な問題である。

一方、細胞内でも*in vitro*でも主に自己リン酸化されるのはCK II β であり、スperlミンやポリリジンなどによるCK IIの活性化はCK II β を介している[Traugh et al. (1990)]。それゆえ、CK II β は活性に必須ではないが、他の分子との相互作用や、シグナルに対する活性の調節をしていると考えられる。

[3. 2. 6 : HSP 90によるキナーゼの活性化]

HSP 90によるCK IIの活性化は、HSP 90によるeIF2 α キナーゼの活性化[Rose et al. (1987), Matts & Hurst (1989)]と類似している。しかしながら、大腸菌で発現させたりコンビナントのHSP 90も精製HSP 90もほぼ同様にCK IIを活性化したのに対して、eIF2 α キナーゼの場合にはリン酸化されたHSP 90のみがeIF2 α キナーゼを活性化する[Szyszk et al. (1989)]。また、eIF2 α キナーゼの場合には、HSP 90との複合体形成とキナーゼ活性の関連が詳しくは判っていない。それゆえ、現在ではまだ、HSP 90がCK IIとeIF2 α キナーゼに対して、同一のメカニズム・結合部位で作用を果たしているかどうかは明らかではない。2つのキナーゼはいずれも蛋白質の開始因子複合体の成分をリン酸化することから、この2つのキナーゼを介してHSP 90が

蛋白合成の調節に関与している可能性が考えられて興味深い[Rose et al. (1989)].

[3. 2. 7: CKIIのHSP90による活性化の生理的意義]

最後に、HSP90によるCKIIの活性化の生理的意義について考察したい。この活性化に必要とされるHSP90の濃度が生理的なHSP90の濃度と近いことから、ストレス時に細胞内HSP90濃度が通常よりも更に高くなった場合に、CKIIの一層の活性化の引き金が引かれるという可能性が考えられる。或いは、非ストレス下のHSP90の濃度が既にCKIIの活性の維持に充分であるのならば、HSP90はCKIIの(おそらくeIF2 α キナーゼ等の他の様々な蛋白質に対して)スキヤフォールドとして働いているという可能性が強く示唆される。また、[3. 2. 4]で述べたような熱ショック下での蛋白質の高次構造変化に伴う不活性化を防いだり、修復するように働くという機能も充分考えられる。更に、GCRについて示されたのと同様にCKII-HSP90複合体がアクチン繊維を介して細胞骨格・核骨格系と相互作用するのであれば、HSP90がCKIIの細胞内局在にも関与する可能性が考えられる。実際、CKIIはGCRと同様に、細胞質及び核にも存在し、その局在が細胞周期によって制御されていると考えられている[Filhol et al. (1990a)]。HSP90もCKIIも進化の過程で酵母からヒトに致るまで、極めて良く保存されていると共にubiquitousな蛋白質であることも考えあわせると、おそらく、CKIIとHSP90の相互作用は、細胞が増殖し、機能していく上で、極めて重要で必須の役割を担っていると考えられる。

[3. 3: HSP90と複合体を形成する他の蛋白質]

HSP90はここで詳しく解析したGCRやアクチン、CKIIの他にも、様々な細胞の生理的機能にとって非常に重要な蛋白質と相互作用をする(図3.5) [次の総説を参照 Lindquist & Craig (1988), Welch (1989), 宮田・矢原 (1989), Schlesinger (1990), 宮田 (1991b)]。その場合、複合体形成による相手蛋白質の機能の制御には2通りがある。例えば、GCRに対してHSP90との複合体形

第3章：考察

成はある場合には正に働く。HSP90と複合体を形成していると、GCRのリガンドに対する親和性は高まる[Bresnick et al. (1989), Scherrer et al. (1990), Wilhelmsson et al. (1990)]. それに加えて、HSP90はGCRによる遺伝子の発現に他にも何らかの必須の役割を果たしている[Picard et al. (1990)]. 一方で、HSP90が相手蛋白質の機能を負に制御している例も知られている。SHRの場合には、HSP90と複合体を形成しているとDNAに対する結合活性は低い[次の総説を参照 Denis & Gustafsson (1989), Pratt et al. (1989)]. また、HSP90は細胞骨格にSHRをアンカーすることによって間接的に核への移行をネガティブに制御している[Miyata & Yahara (1991)]. また、pp60^{v-src}のチロシンキナーゼ活性はHSP90及びpp50と細胞質で複合体を形成している場合には低い[Courtneidge & Bishop (1982)]. これらの全てのケースに於いて、HSP90は相手蛋白質と複合体を形成して、相手蛋白質の或る特定の機能を細胞内の特定の場所で保つように働いているようである。つまり、HSP90がHSP90と複合体を形成する様々な生物学的に重要な蛋白質の細胞内での、共通のキャリアー蛋白質として存在していることをうかがわせる。HSP90と複合体を形成している蛋白質はまだ他にも多数あると考えられ、その同定と機能制御、及びそのメカニズムの研究がこれからの大きな課題と言えよう。

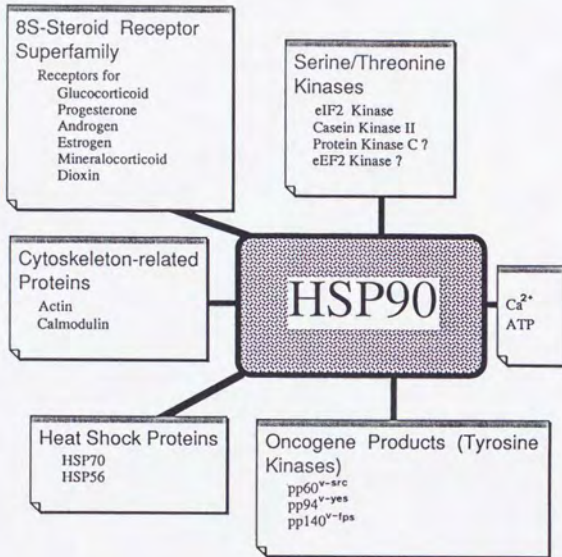


図3-5 HSP90と複合体を形成するターゲット蛋白質。

HSP90は様々な細胞内機能蛋白質と複合体を形成する。この複合体形成によるターゲット蛋白質の機能と細胞内局在の制御が、HSP90の本質的な機能であると考えられる(本文[3.3]参照)。



REFERENCES

Adams, T. A. (1968). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1970). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1972). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1974). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1976). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1978). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1980). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1982). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1984). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1986). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1988). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1990). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1992). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1994). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1996). The geology of the ...
 Adams, T. A. (1998). The geology of the ...
 Adams, T. A. (2000). The geology of the ...
 Adams, T. A. (2002). The geology of the ...
 Adams, T. A. (2004). The geology of the ...
 Adams, T. A. (2006). The geology of the ...
 Adams, T. A. (2008). The geology of the ...
 Adams, T. A. (2010). The geology of the ...
 Adams, T. A. (2012). The geology of the ...
 Adams, T. A. (2014). The geology of the ...
 Adams, T. A. (2016). The geology of the ...
 Adams, T. A. (2018). The geology of the ...
 Adams, T. A. (2020). The geology of the ...

《文献》

REFERENCES

- Ackerman, P., & Osheroff, N. (1989) Regulation of casein kinase II activity by epidermal growth factor in human A-431 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 264:11958-11965.
- Ackerman, P., Glover, C.V.C., & Osheroff, N. (1990) Stimulation of casein kinase II by epidermal growth factor: Relationship between the physiological activity of the kinase and the phosphorylation state of its β subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:821-825.
- Baulieu, E.E. (1989) Contraception and other clinical applications of RU486, an antiprogesterone at the receptor. *Science* 245:1351-1357.
- Binart, N., Chambrud, B., Dumas, B., Rowlands, D.A., Bigogne, C., Levin, J.M., Garnier, J., Baulieu, E.-E., & Catelli, M.-G. (1989) The cDNA-derived amino acid sequence of chick heat shock protein Mr. 90,000 (HSP90) reveals a "DNA like" structure: Potential site of interaction with steroid receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159:140-147.
- Borkovich, K.A., Farrelly, F.W., Finkelstein, D.B., Taulien, J., & Lindquist, S. (1989) Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell. Biol.* 9:3919-3930.
- Bresnick, E.H., Dalman, F.C., Sanchez, E.R., & Pratt, W.B. (1989) Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 264:4992-4997.
- Brugge, J.S., Erickson, E., & Erickson, R.L. (1981) The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60^{src}, with two cellular proteins. *Cell* 25:363-372.
- Brugge, J., Yonemoto, W., & Darrow, D. (1983) Interaction between the rous sarcoma virus transforming protein and two cellular phosphoproteins: Analysis of the turnover and distribution of this complex. *Mol. Cell. Biol.* 3:9-19.
- Carroll, D., Santoro, N., & Marshak, D.R. (1988) Regulating cell growth: Casein kinase II-dependent phosphorylation of nuclear oncoproteins. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 53:91-95.
- Catelli, M.G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J.M., Baulieu, E.E., Feramisco, J.R., & Welch, W.J. (1985) The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J.* 4:3131-3135.
- Courtneidge, S.A., & Bishop, J.M. (1982) Transit of pp60^{src} to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:7117-7121.
- Dalman, F.C., Bresnick, E.H., Patel, P.D., Perdew, G.H., Watson, S.J., and Pratt, W.B. (1989) Direct evidence that the glucocorticoid receptor binds to hsp90 at or near the termination of receptor translation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 264:19815-19821.
- Dalman, F.C., Koenig, R.J., Perdew, G.H., Massa, E., & Pratt, W.B. (1990) In contrast to the glucocorticoid receptor, the thyroid hormone receptor is translated in the DNA binding state and is not associated with hsp90. *J. Biol. Chem.* 265:3615-3618.
- Denis, M., Wikström, A.C., & Gustafsson, J.-Å. (1987) The molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid receptor contains a dimer of Mr 90,000 nonhormone-binding protein. *J. Biol. Chem.* 262:11803-11806.
- Denis, M., Cuthill, S., Wikström, A.-C., Poellinger, L., & Gustafsson, J.-Å. (1988) Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock

- protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155:801-807.
- Denis, M., & Gustafsson, J.-Å. (1989) The Mr ~90,000 heat shock protein: An important modulator of ligand and DNA-binding properties of the glucocorticoid receptor. *Cancer Res. Suppl.* 49:2275s-2281s.
- Dougherty, J.J., Rabideau, D.A., Iannotti, A.M., Sullivan, W.P., & Toft, D.O. (1987) Identification of the 90 kDa substrate of rat liver type II casein kinase with the heat shock protein which binds steroid receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 927:74-80.
- Edelman, A.M., & Blumenthal, D.K. (1987) Protein serine/threonine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 56:567-613.
- Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
- Farrelly, F.W., & Finkelstein, D.B. (1984) Complete sequence of the heat shock-inducible HSP90 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 259:5745-5751.
- Filhol, O., Cochet, C., & Chambaz, E.M. (1990a) Cytoplasmic and nuclear distribution of casein kinase II: Characterization of the enzyme uptake by bovine adrenocortical nuclear preparation. *Biochemistry* 29:9928-9936.
- Filhol, O., Cochet, C., & Chambaz, E.M. (1990b) DNA Binding activity of casein kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:862-871.
- Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P., & Evans, R.M. (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624-629.
- Glover, C.V.C. (1986) A Filamentous Form of *Drosophila* Casein Kinase II. *J. Biol. Chem.* 261:14349-14354.
- Hickey, E., Brandon, S.E., Smale, G., Lloyd, D., & Weber, L.A. (1989) Sequence and Regulation of a gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein. *Mol. Cell. Biol.* 9:2615-2626.
- Holbrook, N.J., Bodwell, J.E., Jeffries, M., & Munck, A. (1983) Characterization of nonactivated and activated glucocorticoid-receptor complexes from intact rat thymocytes. *J. Biol. Chem.* 258:6477-6485.
- Housley, P.R., Sanchez, E.R., Westphal, H.M., Beato, M., & Pratt, W.B. (1985) The molybdate-stabilized L cell glucocorticoid receptor isolated by affinity chromatography or with a monoclonal antibody is associated with a 90~92 kDa non-steroid-binding phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* 260:13810-13817.
- Howard, K.J., & Distelhorst, C.W. (1988) Evidence for intracellular association of the glucocorticoid receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 263:3474-3481.
- Inano, K., Haino, M., Iwasaki, M., Ono, N., Horigome, T., & Sugano, H. (1990) Reconstitution of the 9 S estrogen receptor with heat shock protein 90. *FEBS Lett.* 267:157-159.
- Joab, I., Radanyi, C., Renou, M., Buchou, T., Catelli, M.-G., Binart, N., Mester, J., & Baulieu, E.-E. (1984) Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones. *Nature* 308:850-853.
- Kadowaki, T., Koyasu, S., Nishida, E., Sakai, H., Takaku, F., Yahara, I., and Kasuga, M. (1986) Insulin-like growth factors, insulin, and epidermal growth factor cause rapid cytoskeletal reorganization in KB cells. *J. Biol. Chem.* 261:16141-16147.
- Kameshita, I., & Fujisawa, H. (1989) A sensitive method for detection of calmodulin-dependent protein kinase II activity in sodium dodecyl

- sulfate-polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 183:139-143.
- Klarlund, J.K., & Czech, M.P. (1988) Insulin-like growth factor-I and insulin rapidly increase casein kinase II activity in BALB/c 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 263:15872-15875.
- Kost, S.L., Smith, D.F., Sullivan, W.P., Welch, W.J., & Toft, D.O. (1989) Binding of heat shock proteins to the avian progesterone receptor. *Mol. Cell. Biol.* 9:3829-3838.
- Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., Harada, F., Kasuga, M., Sakai, H., & Yahara, I. (1986) Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100, are actin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:8054-8058.
- Koyasu, S., Nishida, E., Miyata, Y., Sakai, H., & Yahara, I. (1989) HSP100, a 100 kDa heat shock protein, is a Ca^{2+} -calmodulin-regulated actin binding protein. *J. Biol. Chem.* 264:15083-15087.
- Krebs, E.G., Eisenman, R.N., Kuenzel, E.A., Litchfield, D.W., Lozeman, F.J., Lüscher, B., & Sommercorn, J. (1988) Casein kinase II as a potentially important enzyme concerned with signal transduction. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 53:77-84.
- Kuenzel, E.A., & Krebs, E.G. (1985) A synthetic peptide substrate specific for casein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:737-741.
- Lees-Miller, S.P., & Anderson, C.W. (1989a) Two human 90-kDa heat shock proteins are phosphorylated *in vivo* at conserved serines that are phosphorylated *in vitro* by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 264:2431-2437.
- Lees-Miller, S.P., & Anderson, C.W. (1989b) The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat-shock protein, hsp90 α at two NH₂-terminal threonine residues. *J. Biol. Chem.* 264:17275-17280.
- Lindquist, S., & Craig, E.A. (1988) The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22:631-677.
- Lipsich, L.A., Cutt, J.R., & Brugge, J.S. (1982) Association of the transforming proteins of Rous, Fujinami, and Y73 avian sarcoma viruses with the same two cellular proteins. *Mol. Cell. Biol.* 2:875-880.
- Litchfield, D.W., Lozeman, F.J., Piening, C., Sommercorn, J., Takio, K., Walsh, K.A., & Krebs, E.G. (1990) Subunit structure of casein kinase II from bovine testis: Demonstration that the α and α' subunits are distinct polypeptides. *J. Biol. Chem.* 265:7638-7644.
- Lozeman, F.J., Litchfield, D.W., Piening, C., Takio, K., Walsh, K.A., & Krebs, E.G. (1990) Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the α and the α' subunits of casein kinase II. *Biochemistry* 29:8436-8447.
- Lüscher, B., Kuenzel, E.A., Krebs, E.G., & Eisenman, R.N. (1989) Myc oncoproteins are phosphorylated by casein kinase II. *EMBO J.* 8:1111-1119.
- Lüscher, B., Cristenson, E., Litchfield, D.W., Krebs, E.G., & Eisenman, R.N. (1990) Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature* 344:517-522.
- Manak, J.R., de Bisschop, N., Kris, R.M., & Prywes, R. (1990) Casein kinase II enhances the DNA binding activity of serum response factor. *Genes. Devel.* 4:955-967.
- Matts, R.L., & Hurst, R. (1989) Evidence for the association of the heme-regulated eIF2 α kinase with the 90-kDa heat shock protein in rabbit reticulocyte lysate *in situ*. *J. Biol. Chem.* 264:15542-15547.

- Meek, D.W., Simon, S., Kikkawa, Y., & Eckhart, W. (1990) The p53 tumor suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II. *EMBO J.* 10:3253-3260.
- Meggio, F., Agostinis, P., & Pinna, L.A. (1985) Casein kinases and their protein substrates in rat liver cytosol: Evidence for their participation in multimolecular systems. *Biochim. Biophys. Acta* 846:248-256.
- Mendel, D.B., Bodwell, J.E., Gametchu, B., Harrison, R.W., & Munck, A. (1986) Molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid-receptor complexes contain a 90-kDa non-steroid-binding phosphoprotein that is lost on activation. *J. Biol. Chem.* 261:3758-3763.
- Minami, Y., Kawasaki, H., Miyata, Y., Suzuki, K., & Yahara, I. (1991) Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP90. *J. Biol. Chem.* 266:10099-10103.
- Miyata, Y., Nishida, E., & Sakai, H. (1988) Growth factor- and phorbol ester-induced changes in cell morphology analyzed by digital image processing. *Exp. Cell Res.* 175:286-297.
- Miyata, Y., Nishida, E., Koyasu, S., Yahara, I., & Sakai, H. (1989a) Regulation by intracellular Ca^{2+} and cyclic AMP of the growth factor-induced ruffling membrane formation and stimulation of fluid-phase endocytosis and exocytosis. *Exp. Cell Res.* 181:454-462.
- Miyata, Y., Nishida, E., Koyasu, S., Yahara, I., & Sakai, H. (1989b) Protein kinase C-dependent and -independent pathways in the growth factor-induced cytoskeletal reorganization. *J. Biol. Chem.* 264:15565-15568.
- Miyata, Y., & Yahara, I. (1991) Cytoplasmic 8S glucocorticoid receptor binds to actin filaments through the 90-kDa heat shock protein moiety. *J. Biol. Chem.* 266:8779-8783.
- Miyata, Y., & Yahara, I. (1992) The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J. Biol. Chem.* 267:in press.
- Mulner-Lorillon, O., Marot, J., Cayla, X., Poughle, R., & Belle, R. (1988) Purification and characterization of casein kinase II-type enzyme from *Xenopus laevis* ovary: Biological effects on the meiotic cell division of full-growth oocytes. *Eur. J. Biochem.* 171:107-117.
- Nemoto, T., Mason, G.G.F., Wilhelmsson, A., Cuthill, S., Hapgood, J., Gustafsson, J.-Å., & Poellinger, L. (1990) Activation of the dioxin and glucocorticoid receptors to a DNA binding state under cell-free conditions. *J. Biol. Chem.* 265:2269-2277.
- Nishida, E., Kumagai, H., Ohtsuki, I., & Sakai, H. (1979) The interactions between calcium-dependent regulator protein of cyclic nucleotide phosphodiesterase and microtubule proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* 85:1257-1266.
- Nishida, E., Koyasu, S., Sakai, H., & Yahara, I. (1986) Calmodulin-regulated binding of the 90-kDa heat shock protein to actin filaments. *J. Biol. Chem.* 261:16033-16036.
- Okret, S., Wikström, A.C., & Gustafsson, J.-Å. (1985) Molybdate-stabilized glucocorticoid receptor: Evidence for a receptor heteromer. *Biochemistry* 24:6581-6586.
- Opperman, H., Levinson, A.D., Levintow, L., Varmus, H.E., Bishop, J.M., and Kawai, S. (1981a) Two cellular proteins that immunoprecipitate with the transforming protein of Rous sarcoma virus. *Virology* 113:736-751.
- Opperman, H., Levinson, W., & Bishop, J.M. (1981b) A cellular protein that

- associated with the transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:1067-1071.
- Padmanabha, R., Chen-Wu, J.L.-P., Hanna, D.E., & Glover, C.V.C. (1990) Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: Casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:4089-4099.
- Pascual, A., Casanova, J., & Samuels, H.H. (1982) Photoaffinity labeling of thyroid hormone nuclear receptors in intact cells. *J. Biol. Chem.* 257:9640-9647.
- Perdew, G.H. (1988) Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 263:13802-13805.
- Petkovich, M., Brand, N.J., Krust, A., & Chambon, P. (1987) A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330:444-450.
- Picard, D., & Yamamoto, K.R. (1987) Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6:3333-3340.
- Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S., and Yamamoto, K.R. (1990) Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action *in vivo*. *Nature* 348:166-168.
- Pinna, L.A. (1990) Casein kinase 2: An 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim. Biophys. Acta* 1054:267-284.
- Pratt, W.B. (1987) Transformation of glucocorticoid and progesterone receptors to the DNA binding state. *J. Cell Biochem.* 35:51-68.
- Pratt, W.B., Sanchez, E.R., Bresnick, E.H., Meshinchi, S., Scherrer, L.C., Dalman, F.C., & Welsh, M.J. (1989) Interaction of the glucocorticoid receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: An evolving model of ligand-mediated receptor transformation and translocation. *Cancer Res. Suppl.* 49:2222s-2229s.
- Rafestin-Oblin, M.-E., Couette, B., Radanyi, C., Lombes, M., & Baulieu, E.-E. (1989) Mineralocorticosteroid receptor of the chick intestine: Oligomeric structure and transformation. *J. Biol. Chem.* 264:9304-9309.
- Redeuilh, G., Montcharmont, B., Secco, C., & Baulieu, E.E. (1987) Subunit composition of the molybdate-stabilized "8-9S" nontransformed estradiol receptor purified from calf uterus. *J. Biol. Chem.* 262:6969-6975.
- Renoir, J.-M., Radanyi, C., Jung-Testas, I., Faber, L.E., & Baulieu, E.-E. (1990) The nonactivated progesterone receptor is a nuclear heterooligomer. *J. Biol. Chem.* 265:14402-14406.
- Rihs, H.-P., Jans, D.A., Fan, H., & Peters, R. (1991) The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J.* 10:633-639.
- Rose, D.W., Wettengall, R.E.H., Kudlicki, W., Kramer, G., & Hardesty, B. (1987) The 90-kilodalton peptide of the heme-regulated eIF2 α kinase has sequence similarity with the 90-kilodalton heat shock protein. *Biochemistry* 26:6583-6587.
- Rose, D.W., Welch, W.J., Kramer, G., & Hardesty, B. (1989) Possible involvement of the 90-kDa heat shock protein in the regulation of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 264:6239-6244.
- Sanchez, E.R., Toft, D.O., Schlesinger, M.J., & Pratt, W.B. (1985) Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid

- receptor is a murine heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 260:12398-12401.
- Sanchez, E.R., Meshinchi, S., Tienrungroj, W., Schlesinger, M.J., Toft, D.O., & Pratt, W.B. (1987) Relationship of the 90-kDa murine heat shock protein to the untransformed and transformed states of the L cell glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 262:6986-6991.
- Scherrer, L.C., Dalman, F.C., Massa, E., Meshinchi, S., & Pratt, W.B. (1990) Structural and functional reconstitution of the glucocorticoid receptor-HSP90 complex. *J. Biol. Chem.* 265:21397-21400.
- Schlesinger, M.J. (1990) Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 265:12111-12114.
- Schuh, S., Yonemoto, W., Brugge, J., Bauer, V.J., Riehl, R.M., Sullivan, W.P., & Toft, D.O. (1985) A 90,000-dalton binding protein common to both steroid receptors and the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60^{src}. *J. Biol. Chem.* 260:14292-14296.
- Sommercorn, J., Mulligan, J.A., Lozeman, F.J., & Krebs, E.G. (1987) Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:8834-8838.
- Spudich, J.A., & Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 246:4866-4871.
- Szyska, R., Kramer, G., & Hardesty, B. (1989) The phosphorylation state of the reticulocyte 90-kD heat shock protein affects its ability to increase phosphorylation of peptide initiation factor 2 α subunit by the heme-sensitive kinase. *Biochemistry* 28:1435-1438.
- Traugh, J.A., Lin, W.-J., Takada-Axelrod, F., & Tuazon, P.T. (1990) Importance of subunit interactions in regulation of casein kinase II. *in Advances in second messenger and phosphoprotein research* 24:224-229.
- Tuazon, P.T., & Traugh, J.A. (1990) Casein kinase I and II — Multipotential serine protein kinases: Structure, function and regulation. *in Advances in second messenger and phosphoprotein research* 23:123-164.
- Ullrich, S.J., Moore, S.K., & Appella, E. (1989) Transcriptional and translational analysis of the murine 84- and 86-kDa heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 264:6810-6816.
- Vedeckis, W.V. (1983) Subunit dissociation as a possible mechanism of glucocorticoid receptor activation. *Biochemistry* 22:1983-1989.
- Walker, A.L., Hunt, T., Jackson, R.J., & Anderson, C.W. (1985) Double-stranded DNA induces the phosphorylation of several proteins including the 90,000 mol. wt. heat-shock protein in animal cell extracts. *EMBO J.* 4:139-145.
- Wikström, A.C., Baake, O., Okret, S., Bronnegard, M., & Gustafsson, J.-Å. (1987) Intracellular localization of the glucocorticoid receptor: Evidence for cytoplasmic and nuclear localization. *Endocrinology* 120:1232-1242.
- Wilhelmsson, A., Cuthill, S., Denis, M., Wikström, A.C., Gustafsson, J.-Å., & Poellinger, L. (1990) The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein. *EMBO J.* 9:69-76.
- Yahara, I., Iida, H., & Koyasu, S. (1986) A heat shock-resistant variant of Chinese hamster cell line constitutively expressing heat shock protein of Mr 90,000 at high level. *Cell Struct. Funct.* 11:65-73.

酒井彦一 (1989): 細胞骨格の機能. 蛋白質核酸酵素 34:1421-1428.

宮田愛彦, 西田栄介 (1989): 増殖因子によるアクチン細胞骨格構造の変化.
蛋白質核酸酵素 34:1575-1583.

宮田愛彦, 矢原一郎 (1989): HSP90ファミリーの構造と機能.
実験医学 7:2001-2008.

宮田愛彦 (1991a): 活性ゲル内リン酸化法-カゼインキナーゼIIの
同定・解析への適用. 実験医学 9:664-668.

宮田愛彦 (1991b): HSP70とHSP90の機能.
Medical Immunology 21:561-567.

宮田愛彦, 矢原一郎 (1991): ステロイドホルモンレセプターの
細胞内存在様式と熱ショック蛋白質. 最新医学 11:2179-2188.

William J. Welch (1989): 高等動物ストレス (熱ショック) 蛋白質の
構造と機能. 実験医学 7:1989-2000.

《謝辞》

終始御指導・御助言下さり、有益な討論をして下さった東京都臨床医学総合研究所細胞生物学研究部門の矢原一郎部長に心から深く感謝いたします。また、常に研究を励ましてくださった東京大学理学部生物化学教室の酒井彦一教授及び西田栄介博士に深く感謝いたします。また、共に議論し批評を述べて下さった東京都臨床医学総合研究所細胞生物学研究部門の南康文・米原伸・松本清治・小安重夫博士に心より感謝します。また、*S. cerevisiae* HSP90のcDNAを供与して頂き、同リコンビナンド蛋白質の発現を始めとする分子生物学の様々な手法に関して時間をかけて教えてくださり、真摯な討論を続けて下さった同じ研究室の木村洋子氏に深く感謝致します。また、以上の方々にはお忙しい中、本論文に目を通していただきました。改めてお礼を申し上げます。カゼインキナーゼIIに関しては、昭和大学薬学部の中村泰治・中谷一泰・中条茂男博士に多くを御教示いただき、また、カリフォルニア大学生物化学教室のJolinda A. Traugh博士並びにパドヴァ大学生物化学教室のLorenzo A. Pinna博士には発表前の論文のコピーを送っていただきました。この場を借りてお礼を申し上げます。また、東京都臨床医学総合研究所の、フォトセンター・コンピューターセンター・事務の方々には研究をすすめて行く上で大変お世話になりました。また、藪島史子・泉仁美両氏には実験の上で色々とお手伝っていただいた事を感謝します。最後に、研究に費やした膨大な時間故に仲々充分に一緒に過ごす時間の取れなかったにもかかわらず常に近くにいて励まし支えて下さった私の家族と多くの友人達に、この場を借りて深くお礼を申し上げます。

博士論文

熱ショック蛋白質HSP90の機能:

複合体形成によるステロイド受容体

及びカゼインキナーゼIIの機能制御

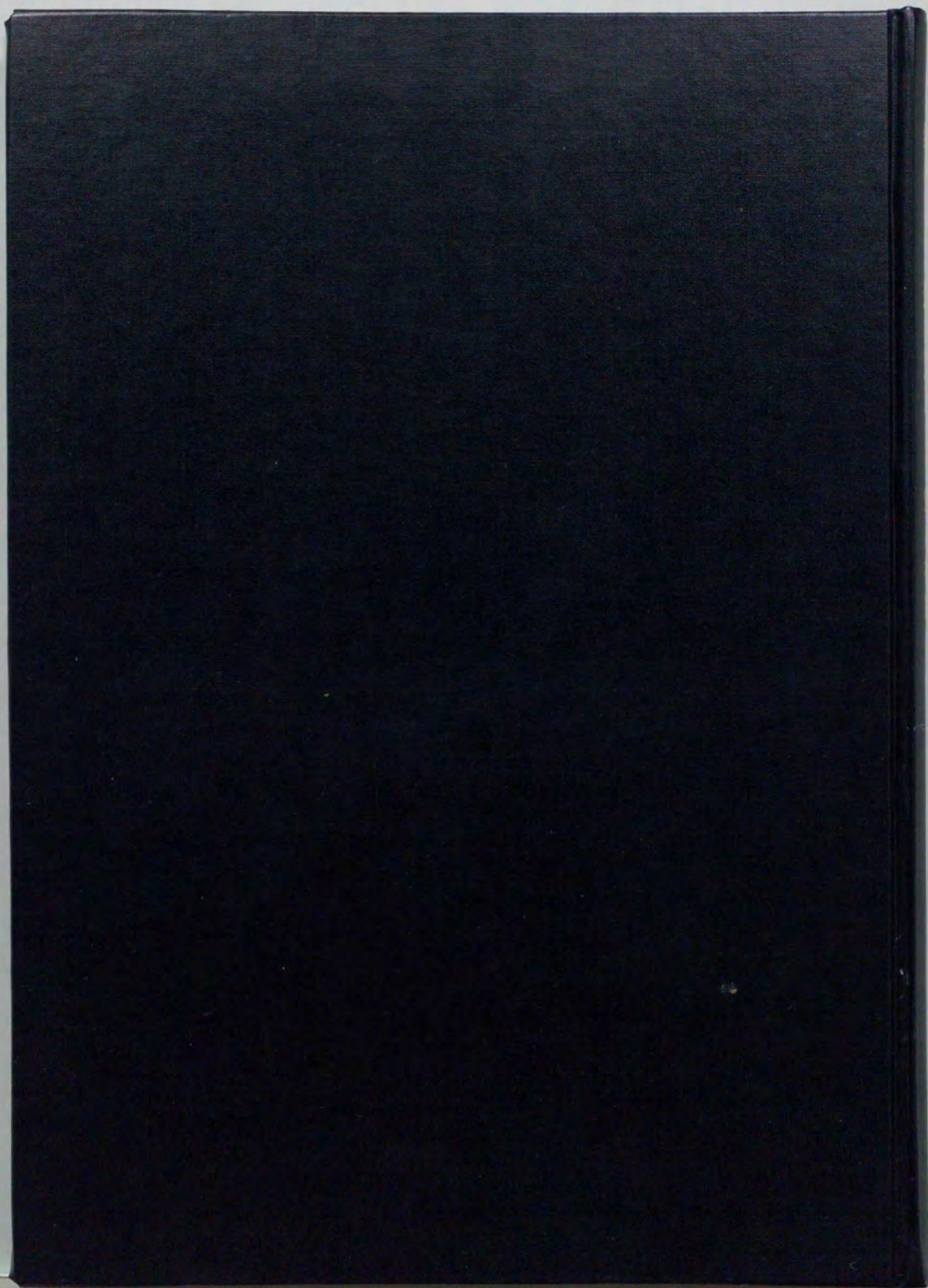
著者・発行者: 宮田 愛彦
東京都臨床医学総合研究所
細胞生物学研究部門

〒113 東京都文京区本駒込3-18-22
Tel: 03-3823-2101 ext. 5203

発行日: 1991年12月
1992年 1月改訂

●禁無断転載

A. Miyata





Inches
Centimetres

KODAK Color Control Patches

© The Titen Company, 2000

Kodak
LICENSED PRODUCT

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19