

ESRと遺伝子の構造と発現に関する研究

美 真 泰

報告番号 乙第 5846 号

Hsp40遺伝子の構造と発現に関する研究

秦 眞美

目 次

1. 要旨	2
2. 序説	
2-1. 熱ショックタンパク質	4
2-2. Hsp40	6
2-3. Hsp70分子シャペロン	6
2-4. DnaJ/Hsp40ファミリー	8
2-5. 熱ショック遺伝子の転写制御	11
2-6. 本研究の目的と概要	12
3. 材料と方法	13
4. 結果	
4-1. Hsp40遺伝子の単離と構造解析	16
4-2. Hsp40の発現解析	19
4-3. Hsp40の発現制御解析	22
5. 考察	
5-1. Hsp40遺伝子の構造	27
5-2. Hsp40遺伝子の発現	29
5-3. Hsp40の熱ショックによる発現調節	30
5-4. ヒト、マウスHsp40遺伝子の発現制御領域	32
6. 謝辞	34
7. 文献	35

1. 要旨

Hsp40は分子量40kDaの塩基性熱ショックタンパク質としてヒトHeLa細胞から発見された。その後、部分的アミノ酸配列およびcDNAクローニングの結果、Hsp40は大腸菌のDnaJ類似タンパク質であることがわかった。大腸菌のDnaJは大腸菌のHsp70であるDnaKのATPase活性を制御している。Hsp40も同様には哺乳動物細胞でHsp70のATPase活性を制御することにより、Hsp70のシャペロン補助因子として働いているものと考えられている。本研究ではHsp40の発現の制御機構を解明するために遺伝子をクローニングして解析した。

ヒトおよびマウスのHsp40遺伝子をクローニングし、その構造を明らかにした。Hsp40遺伝子はヒトおよびマウスとも3つのエクソンより構成されていた。第1エクソンはDnaJファミリータンパク質に共通して存在するJドメインをコードしていた。

遺伝子上流にはTATA配列があり、さらに上流には熱ショック遺伝子上流に必ず存在する熱ショックエレメント(HSE)の配列が見られた。プロモーター解析によりこのHSE配列が熱ショック時の発現の誘導に不可欠であることが証明された。また熱ショックの際はHSE配列にHSF1(heat shock factor 1)が結合していることをゲルシフト解析で明らかにした。In vivo footprintingによりin vivoでもプロモーター域のHSE配列にはタンパクが結合しており、その領域はHSE配列の全域にわたっていることが明らかとなった。なおHSE様配列はヒトおよびマウスとも第1イントロンにも存在したが、第1イントロンのHSE様配列にはin vivoではタンパクの結合は認められないことをin vivo footprinting解析により明らかにした。レポーター解析によりこのHSE様配列は熱ショック時の発現の誘導には必要でないことが示唆され、第1イントロンのHSE様配列はHSEとして機能していないと考えられた。またプロモーター域にあるHSE配列の上流にはGC配列、逆向きのCAAT配列が存在したが、これらの配列を含む領域が

basalレベルの発現に必要であることが示唆された。

Hsp40の発現は熱によって強く誘導された。各組織でのHsp40の発現はマウス、ヒトとも精巣で高かったが、その他の組織ではマウス、ヒトでは違いがみられた。ヒトでは肺などでも高い発現があり、全ての臓器に比較的強い発現が認められたのに対し、マウスでは精巣以外の臓器については発現量が極めて少ない。さらにマウスでは熱ショック時の転写物と通常時の転写物では転写開始点に違いがみられた。通常時（恒常的発現）は主にTATA上流から転写が開始され、TATAを介さない転写機構が働いていると考えられる。

なお、ヒトではプロセス型の偽遺伝子も同定したが、配列の中にTATAに相当する配列を含んでおり、偽遺伝子が発生した時点においてはマウスと同様な転写制御を受けていたと考えられる。その後、進化の過程で別の制御領域を獲得して、マウスとは異なった転写開始調節、組織での発現パターンを示すようになったと考えられる。開始コドンの上流約300 bpまでの塩基配列はマウス、ヒトでよく類似していたが、それより上流では類似性が低くなっており、上流の領域がヒト、マウスの転写制御の違いと関係している可能性がある。マウスHsp40遺伝子上流域に通常時にはTATA下流からの転写を抑制し、上流からの転写を制御する領域があったのが、ヒトの場合、進化の過程でその領域に変異が生じ、マウスとは異なった制御を受けるようになったと考えられる。

2. 序説

2-1. 熱ショックタンパク質 (表1)

細胞を正常発育温度より5-10°C高い温度にさらすと、熱ショックタンパク質(HSP)と呼ばれる一群のタンパク質が顕著に合成されてくる。この現象は熱ショック応答といい、ほとんどすべての生物に普遍的にみられる現象である。HSPの代表的なものはファミリーを形成しておりHsp90, Hsp70, 低分子量HSP(Hsp27等)などがある(表1)。HSPはあらゆる生物種に存在し、さらにそれぞれの相同の分子が細胞質、小胞体、ミトコンドリアなど細胞内の各コンパートメントに存在している。またHSPは熱のみならず、さまざまな環境ストレスで誘導される。たとえばエタノール、ヒ素、カドミウムなどの化学的ストレス、X線や紫外線、浸透圧などの物理的ストレス、過酸化水素などの酸化的ストレス、などによっても誘導される。このためストレスタンパク質とも呼ばれる[Linquist and Craig, 1988]。その後、HSPの多くはストレス時のみならず正常時においても発現しており細胞の生理機能に重要な役割を担っていることが明らかになってきている[Hartl, 1996]。

HSPの役割は細胞をさまざまな環境ストレスから防御し、細胞の正常機能を保つことにある。熱などのストレスにより変性したタンパク質は疎水性の部分の外に露出した状態になり、疎水性の部分どうして凝集しやすくなる。不可逆的に凝集したタンパク質は細胞内に集積して細胞を死へと至らしめる。HSPは変性したタンパク質に結合することにより、それらの凝集を妨げ細胞を防御するのである。このような変性タンパク質に結合して凝集を防ぎ、間違っただ折りたたみ(folding)を起こさせないように正しいfoldingを手助けする働きを分子シャペロン機能といい、正常時には新しく合成されたポリペプチドのfoldingや、タンパク質の細胞内輸送に関わっている働きである。最近では熱ショックタンパク質は分子シャペロンとも呼ばれている。

表 1. 主な熱ショックタンパク質

Family	Mammal	Drosophila	Yeast	Bacteria
HSP110	Hsp110 Hsp105		Sse1.2	
HSP100	Skd3		Hsp104	ClpA
HSP90	Hsp90 α Hsp90 β	Hsp83	Hsp83 Hsc83	HtpG
HSP70	Hsp70(p72) Hsc70(p73) Grp78 Grp75	Hsp70 Hsp68 Hsc72 Hsc70	Ssa1,2,3,4 Ssb1,2 Ssc1	DnaK
HSP60	Cpn60		Hsp60	GroEL
HSP27	Hsp27	Hsp26	Hsp26	IbpA

分子シャペロン(HSP)の基質となるのはふつう正常で変異のないタンパク質であるが、最近変異タンパク質でも分子シャペロンが過剰に存在すると正常に機能するようになる例が報告されている。例えばHsp70を高発現させると、変異したSV40のT抗原の機能が回復される[Jcoung et al., 1991]。またラット胎児繊維芽細胞のrasによる癌化を抑制できる[Yehiely and Oren, 1992]。さらにラットグルコルチコイド受容体の変異タンパク質をもつ細胞にHdj2(Hsp40相同体)を導入すると活性が回復する[Tang et al., 1997]等の例がある。トリプレットリピート病である脊髄小脳運動失調症(SCA1)はataxin-1タンパク質が変異して異常な凝集体が形成されることで発症する病気であるが、この変異ataxin-1タンパク質が発現している細胞にHdj2を導入すると凝集体形成が抑えられる[Cummings et al., 1998]。球脊髄性筋萎縮症(SBMA)もトリプレットリピート病であり、変異アンドロゲン受容体(AR)の凝集体が原因で発症する。この変異ARをもつ細胞にHsp70およびHsp40を導入すると凝集体の誘導が抑制された [Kobayashi et al., 2000]。これらのことはタンパク質の変異が原因で発症するような遺伝子病の予防や治療等に分子シャペロンが応用できる可能性を示唆している。

細胞にあらかじめ熱ショックを与えておくと、再度の熱ショックに対して、耐性を示す。これは温熱耐性と呼ばれる現象で、温熱耐性は癌細胞でも発現するので癌温熱療法の問題点となっている。この温熱耐性とHSPの発現はよく相関する [Kaneko et al., 1995]。温熱抵抗性の細胞はHSPの発現が亢進しており [Laszlo and Li, 1985]、またHSPを過剰に発現させると細胞が温熱耐性となったという報告[Li et al., 1991]もある。

HSPは他にも虚血/再灌流、栄養欠損、活性酸素曝露、ウィルス感染、発熱、組織損傷などの病的ストレスから細胞を防護する役割をもっている。プリオン病との関係 [Chernoff, 1995]、自己免疫疾患との関係なども指摘されている [Auger and Roudier, 1997]。ある種の癌の予後をHSPの発現で診断できるなどの報告もある [Kimura et al., 1993]。このように分子シャペロンの持つ有益な細

胞防御機能を利用した医療への応用などの研究が進むなか、HSPの機能を知る基礎的研究は重要な意義をもっている。

2-2. Hsp40

Hsp40はHeLa細胞タンパク質の二次元電気泳動から分子量40kDaの塩基性熱ショックタンパク質として1990年に発見された[Ohtsuka et al., 1990]。その後、部分的アミノ酸配列、およびcDNAクローニングの結果、Hsp40は大腸菌のDnaJの相同体であることがわかった[Hattori et al., 1992 ; Ohtsuka, 1993]。大腸菌のDnaJはDnaKとともに λ ファージのDNA複製に欠陥のある宿主側の遺伝子として同定されたものである。DnaKはほ乳動物細胞のHsp70と相同であり、DnaK/DnaJは大腸菌においてDNA複製やタンパク質の輸送などに分子シャペロンとして機能していることが明らかになっている。Hsp40についても、さまざまな実験でHsp70との相互作用が証明されている。抗体染色による細胞内の局在を調べると、Hsp40はHsp70とともに挙動を同じくしていた。すなわち両者は正常温度では細胞質に局在するが、熱ショックによって細胞質から核、核小体に移行し、正常温度に戻すと再び細胞質へ戻ってくる [Hattori et al., 1993]。また免疫沈降の実験でHsp40はHsp70と会合していることが示された[Sugito et al., 1995]。さらにタンパク質合成時の新生ポリペプチドのおりたたみにHsp70とHsp40が共同して働くことが明らかにされた [Frydman et al., 1994]。そのほか、Hsp40はHsp70のATPase活性を促進し共同して変性したタンパク質の凝集を防ぐことができることがin vitroの系[Minami et al., 1996]、in vivoの系[Michels et al., 1997]で明らかにされた。大腸菌でのDnaK/DnaJシャペロン系と同様にほ乳動物細胞でもHsp70/Hsp40のシャペロン系が構成されていると考えられる。

2-3. Hsp70分子シャペロン (図1, 2)

分子量70kDaのHsp70はストレスで最も強く誘導される代表的な熱ショックタンパク質である。ファミリーを形成しており、これらのHsp70は50%以上の相同性が認められる。多くのHsp70はストレス誘導型であるが、恒常的に発現し

ているものもある(Hsc70)。Hsp70はN末によく保存されたATPaseドメイン、そのC末側に基質結合ドメインがあり、C末端にEEVDモチーフをもつこともある(図1)。Hsp70ファミリータンパク質のアミノ酸配列は良く保存されており、大腸菌のDnaKとでも50%の一致が見られる。Hsp70はATPase活性を持っており、ATP結合型とADP結合型があり、両者のコンフォーメーションの違いが基質タンパク質の親和性の違いとなっている(図2)。ATP結合Hsp70は低親和性であるため基質との結合の回転率が高く、ADP結合Hsp70は高親和性であるため基質との結合がより安定している。変性したタンパク質などの基質はATP結合Hsp70に結合しサイクルに入る。基質タンパク質はATP/ADP交換反応ののち遊離する。このサイクルをくり返すことにより、基質タンパク質はfoldingすると考えられている(図2)。Hsp70は単独ではなくいくつかのco-chaperoneと協力して働いている。co-chaperoneの調節によりサイクルが制御され、基質の結合、遊離が適切になされるのである。大腸菌のHsp70であるDnaKのco-chaperoneはDnaJとGrpEである。DnaJはDnaKのATPase活性を促進し、GrpEはATP/ADP交換反応を触媒する役目をもっている。Hsp70シャペロンサイクルについてはDnaK/DnaJ/GrpEの系で説明が進んできたが[Hendrick and Hartl, 1993]、ほ乳動物細胞ではさらに多くの因子が関わっており、複雑になっている。

Hsp40はDnaJと同様、ATPの加水分解を促進することにより、基質タンパク質がより安定なADP-Hsp70に結合することを促すが、Hsp70のco-chaperoneとして、Hsp40の他、Hip, Hop, Bag-1などが同定されてきた。HipはHsp-ADP-基質複合体に結合して安定化する働きをしている[Hohfeld et al., 1995]。Bag-1については、大腸菌のGrpEのようにATP/ADP交換反応を促進する働きがあるとされる[Hohfeld and Jentsch, 1997]ほか、Hsp70のATPaseドメインに結合して、シャペロン活性を抑制するという報告[Takayama et al., 1997]もある。HopはHsp70とHsp90に結合して両シャペロン系の橋渡しの役目していると考えられている[Frydman and Hohfeld, 1997]。

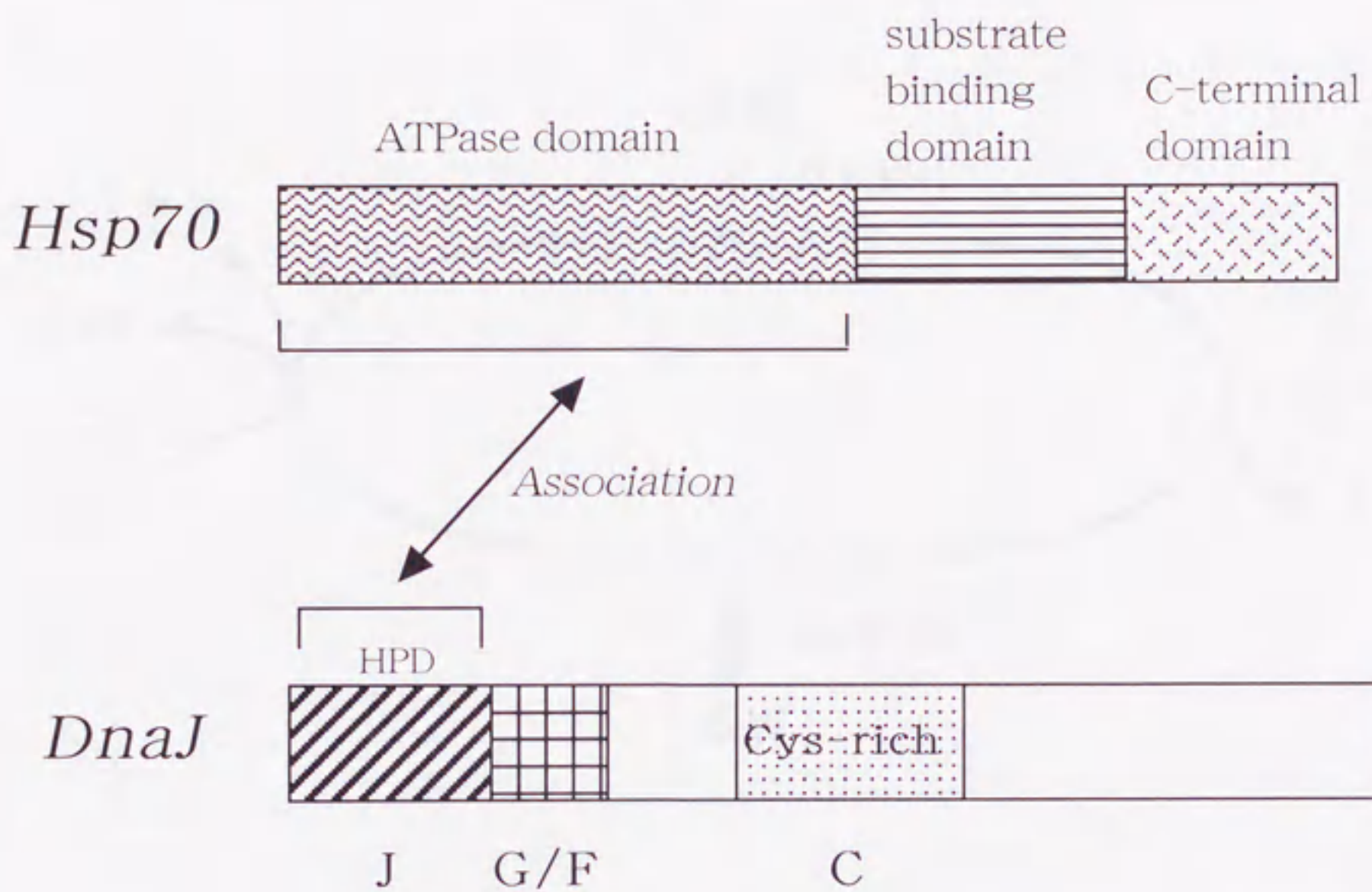


図 1. Hsp70とDnaJタンパク質の構造

Hsp70はN末にATPaseドメイン、C末側に基質結合ドメインがある。
 DnaJのJドメインはHsp70のATPaseドメインと相互作用し、Hsp70のATPase活性を促進する。

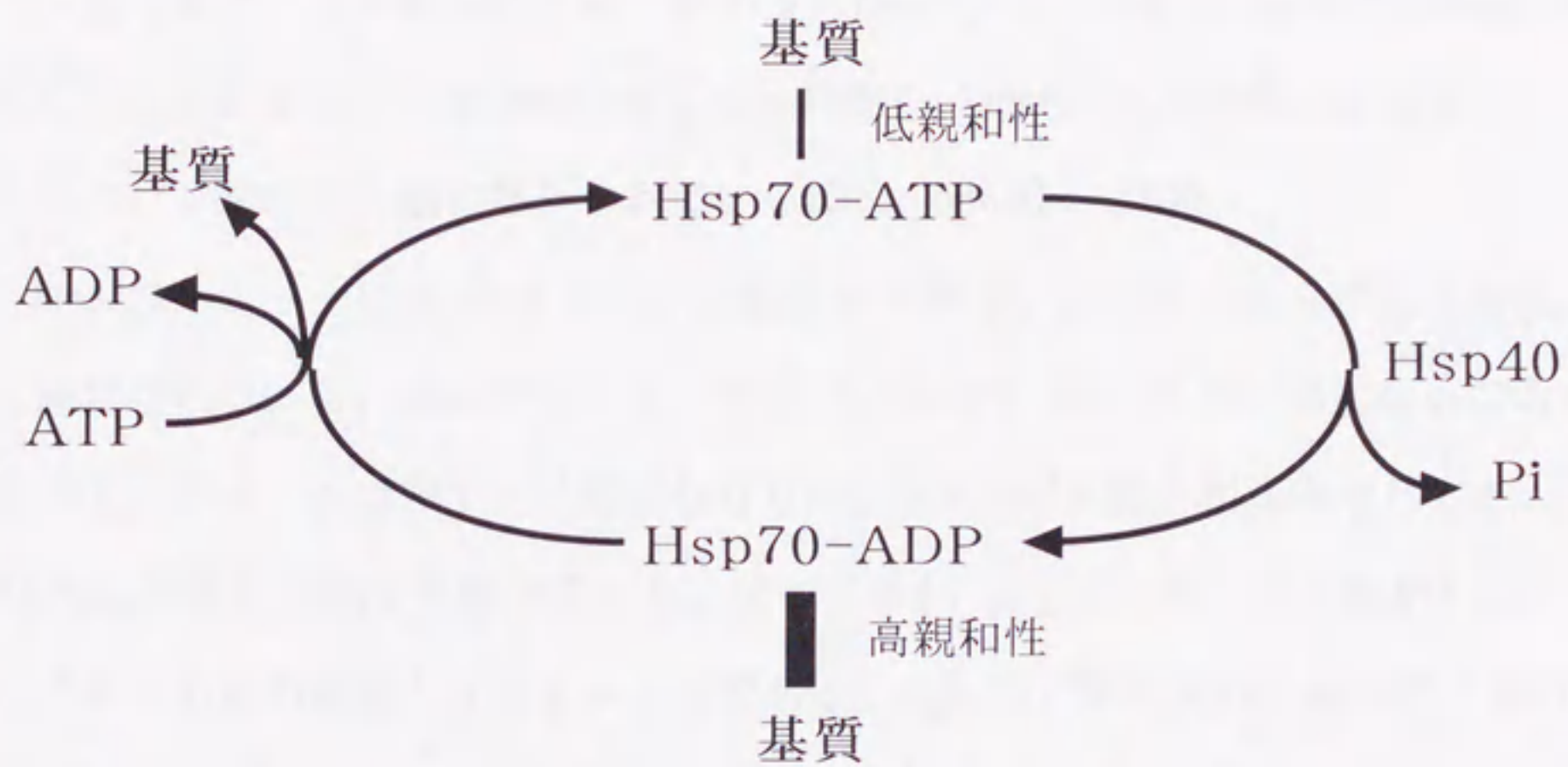


図 2. Hsp70のシャペロンサイクル


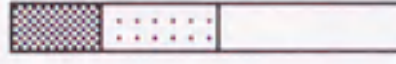


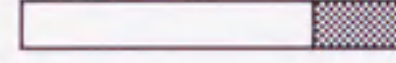
Hsp70は基質親和性の低いHsp70-ATP型と基質親和性の高いHsp70-ADP型がある。基質と結合したHsp70-ATPはHsp40によりHsp70-ADP型への転換を促される。基質はATP/ADP 交換反応により、遊離する。

2-4. DnaJ/Hsp40ファミリー (表2, 図1)




DnaJはDnaK, GrpEとともにラムダファージのDNA複製に関わる大腸菌側の因子として発見されたものである。その後これらの遺伝子産物は熱ショックタンパク質であることが確かめられ、そのうちDnaKタンパク質はHsp70の相同体であることがわかった [Bardwell and Craig, 1984]。DnaK/DnaJ/GrpEによる分子シャペロン機能は詳細に解析されている [Georgopoulos, 1992]。

DnaJファミリーは表2のように、大腸菌から酵母、ヒトまであらゆる生物種に保存されている。DnaJファミリータンパク質は3つのドメイン構造からなる (図1)。Jドメインは70アミノ酸よりなりHsp70タンパク質と相互作用してそのATPase活性を制御する働きをもち、すべてのJファミリータンパク質がもっていてその名前の由来となるドメインである。最も良く保存された領域で、異なるJタンパク質でのアミノ酸配列の一致は50%以上である。Jドメインのなかでもよく保存されているHis-Pro-Aspからなる配列(HPD配列)がHsp70との相互作用に重要であるとされる。三次元の構造が明らかにされると [Pellechia et al., 1996; Qian et al., 1996]、この3残基が2つのヘリックスに挟まれたループ部分に位置していることがわかった。JドメインにつづくG/Fドメインはグリシンとフェニルアラニンに富んだ領域である。G/FドメインのJタンパク質間の類似性はJドメインよりは低い。G/FドメインはJドメインを正しいコンフォメーションに位置させるためのリンカーの役割をしていると考えられている。最近、酵母のSIS1のG/FドメインはSIS1の機能の特異性を決定するのに必要であることが明らかにされた [Yan et al., 1999]。中央部分のCドメインはシステインに富んだ領域で、4つの(CxxCxGxG)モチーフからなるZinc-finger様構造を示し [Bork et al., 1992]、基質結合に必要であると考えられている。DnaJファミリータンパク質はこれらのドメイン構造から3種類に分類することができる。すなわち3つのドメインをすべてもつType I、JドメインとG/FドメインとをもつType II、JドメインのみをもつType IIIである [Cheetham and Caplan, 1998] (表2)。Type I, II ではJ

表 2. Jファミリータンパク質の分類

	Bacteria	Yeast	Drosophila	Plant	Mammal	
Type I	 J G/F C	DnaJ	Ydj1 Mdj1 Scj1 Xdj1	Tid56	Anj1 Atj1	Hdj2
Type II		Sis1 Hlj1	Droj1		Hsp40 Hsj1 Msj1 Hlj1	
Type III	  	CbpA	Sec63 Caj1	Csp29	Mtj1 p58	

Jファミリータンパク質はドメイン構造により3つのタイプに分類される。
 Type Iは約70アミノ酸よりなるJドメインとそれに続くグリシン、フェニルアラニンに富んだG/Fドメイン(30-40アミノ酸)、システインに富んだZinc finger様構造をもつCドメインがある。
 Type IIはCドメインをもたない。G/FドメインはType IのG/Fドメインより長く70-100アミノ酸ある。
 Type IIIはJドメインのみをもつもので、Jドメインの位置は決まっていない。

 : J  : G/F  : C

ドメインはN末側にあるが、Type IIIについてはJドメインの位置は決まっていない。

ほ乳動物のDnaJファミリーについては20種余り報告されている。著者らはこのうち11の cDNAを同定している [Ohtsuka and Hata, 2000]。

Type I のDnaJ/Hsp40相同体はそのアミノ酸配列の相同性から4種類に分けられる。1つはヒトHdj2/Hsdj [Chellaiah et al., 1993; Oh et al., 1993]で、マウスではHsj2 [Royaux et al., 1998]、ラットではRdj1 [Leng et al., 1998]が報告されている。Hdj2/Hsdjは酵母Ydj1の相同体で、ミトコンドリアへのタンパク質の輸送に働いている [Terada et al., 1997]。2つめはラットの Rdj2 [Andres et al., 1997]、マウスはmDj3 [Ohtsuka and Hata, 2000]、ヒトではDnj3/Cpr3/Hirip4として登録されている。これらはC末にCaaXのプレニル化のモチーフをもっている。3つめはヒトhTid1 [Schilling et al., 1998]で、ショウジョウバエのTid56 [Kurzik-Dumke et al., 1998]、酵母のMdj1 [Rowley et al., 1994]と相同であり、ミトコンドリアタンパク質と考えられる。4つめが最近筆者らが同定したmmDjA4である [Hata and Ohtsuka, 2000b]。これもまたC末にCaaXモチーフをもっている。これらの4グループ間の相同性は20-70%であるが、それぞれのヒト、マウス、ラットの種間の相同性は90-100%と高い [Hata and Ohtsuka, 2000b]。

Type IIに含まれるのはHsp40のほか、ニューロン細胞特異的なHsj1 [Cheetham et al., 1992]、肝臓から単離されたHldj [Hoe et al., 1998]、精巣特異的なMsj1 [Berruti et al., 1998]およびHsj2 [Pei, 1999]などである。最近では、Mrj [Hunter et al., 1999]やこのヒト相同体も報告されている [Seki et al., 1999]。Hdj1 [Raabe and Manley, 1991]はpoly (A)ポリメラーゼに対する抗体でスクリーニングして得られたクローンであるが、Hsp40と塩基配列で98%一致したのに、アミノ酸レベルでは77%であった。これはシークエンスのエラーによるもので、Hsp40とHdj1は同一のものと判断される。Type II J タンパク質のなかでもいくつかのグループに分けられる。これらのグループ内での相同性は50-64%であるが、他のグル

ープとの間では30%以下であり、Jドメインについては相同性が高いが(50%以上)、それ以外の部分は同じType II グループでも相同性が低い。

Type IIIでは、p58 [Melville et al., 1997], Csp [Braun et al., 1996], auxilin [Jiang et al., 1997] などが報告されている。mDj11 [Ohtsuka and hata, 2000] はヒトTpr2 [Murthy et al., 1996] と相同であり、Zrf1/Mida1 [Hughes et al., 1995; Shoji et al., 1995] とp58 [Lee et al., 1994] と同様にTPR(tetratricopeptide repeat)タンパク質である。Type IIIのグループはJドメイン以外は全く相同性がない。

これらのDnaJ相同体もDnaJ同様にHsp70と協力して働いていると考えられる [Kelley, 1998; Cheetham and Caplan, 1998]。進化的によく保存されたJドメインのアミノ酸配列でマウスESTデータベースを検索して分類すると、全部で少なくとも40種はあると推測された [Ohtsuka and Hata, 2000]。これらのタンパク質のJドメイン以外の領域については極めて多様である。それに対してHsp40のパートナーであるHsp70はよく保存されており、Hsp70ファミリータンパク質は50%以上のアミノ酸が一致している。Jタンパク質ではJドメインの相同性がその程度である。またHsp70についてはJタンパク質より少なく約20種とされる。このことから1つのHsp70タンパク質が複数のDnaJ/Hsp40タンパク質とシャペロン複合体を形成していると考えられる。実際に、細胞質のHsp70は機能的にいくつかのHsp40/DnaJと相互作用することが知られている。たとえば、Hsp70-Hsp40は新生タンパク質や変性タンパク質の折り畳み [Frydman et al., 1994; Freeman and Morimoto, 1996; Minami et al., 1996]、Hsp70-Hdj2はミトコンドリアへのタンパク質輸送 [Terada et al., 1997]、Hsp70-Hsj1は神経細胞でのシャペロン機能 [Cheetham, 1994]、Hsp70-auxilinは被覆小胞からのクラスリンの解離 [Jiang et al., 1997]、Hsp70-Cspはシナプス小胞からの神経伝達物質の遊離 [Braun et al., 1996]などである。このようなことからそれぞれのDnaJ/Hsp40がまず基質となるタンパク質と特異的に会合してそこにHsp70をリクルートしてきて、それぞれに特異的なシャペロン機能を発揮していると考えられる [Rassow et al., 1995]。

現在、Hsp40についてその基質となるタンパク質を同定する目的で酵母のtwo-hybrid法によりスクリーニングを始めている。

2-5. 熱ショックタンパク質遺伝子の転写制御 (図3)

Hsp遺伝子の熱による発現の誘導はHSF (Heat shock factor)によって制御されている[Morimoto, 1998]。HSFはHsp70遺伝子のプロモーター領域に結合する因子として同定された[Wu, 1984]。HSFは熱ショックのほかさまざまなストレスにより活性化し、一連のHspの転写を活性化する。これまで、酵母、ショウジョウバエ、植物、トリ、マウス、ヒトより遺伝子が単離された。HSFの構造はN末にDNA結合ドメインがあり、転写活性化ドメインはC末にある。その間にHSFの三量体形成を司るロイシンジッパー領域、HSFの不活性化制御ドメインがある。正常温度ではHSFは不活性な単量体として細胞質に存在し、分子内相互作用でC末の活性化ドメインがマスクされている構造をとっていると考えられている(図3)[Rabindran et al., 1993]。熱ショックなどのストレスが加わるとHSFは三量体となって活性化し、核内に移行してHSFの認識DNA配列、HSE (heat shock element)に結合する [Perisic et al., 1989]。ただし、酵母では常温でも三量体を形成しプロモーター上に結合しているが、転写活性化能はなく熱ショック後修飾を受けてのち転写活性化能をもつようになる。酵母ではHSFは1つであるが[Wu, 1995]、高等生物では複数存在する。ヒトではHSF1 [Rabindran et al., 1991]、HSF2 [Schuets et al., 1991]、HSF4 [Nakai et al., 1997] などが単離されているが、そのうちHSF1が酵母のHSFと機能的に相同であり熱ショックによる転写の活性化因子である [Morimoto et al., 1992; Sarge et al., 1993]。HSF2はストレスには反応せず、ヒト血液癌細胞のK562細胞をヘミンにより分化誘導した際に活性化する。そのほか、マウスの初期発生や精子形成時に発現しており、細胞の分化に関与していると考えられている[Sarge et al., 1994]。HSF4は恒常的にDNAに結合しているが転写活性は認められていない。HSF3はニワトリでのみ見い出されている[Nakai et al., 1995]。

HSF monomer



HSF trimer

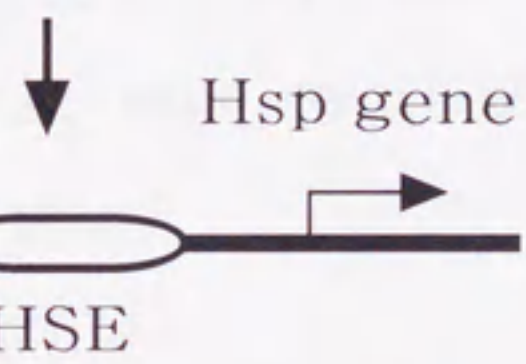
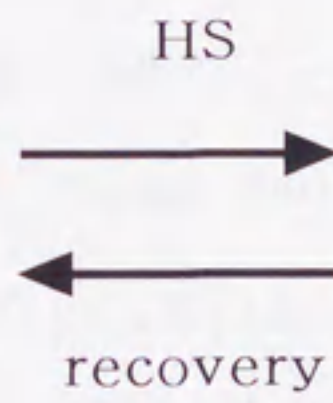
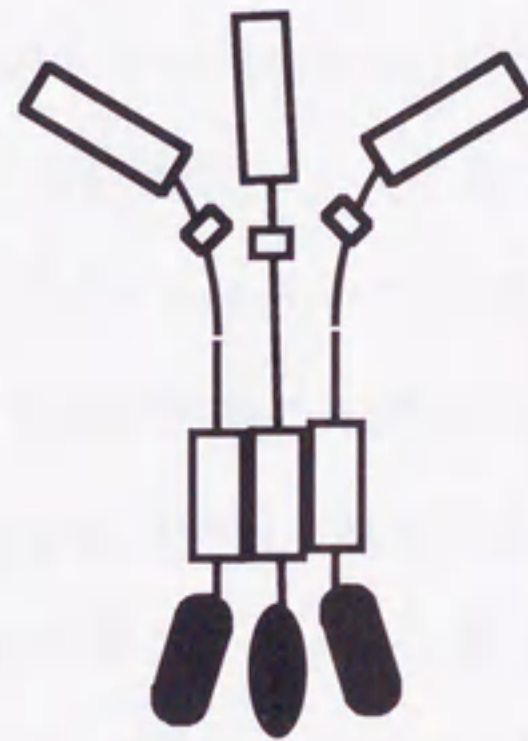


図 3. HSFによるHsp遺伝子の活性化

HSFは通常時はモノマーの状態に存在するが、熱ショックにより活性型のトリマーとなり、核内に移動して、Hsp遺伝子プロモーター上にあるHSEに結合し、Hsp遺伝子の転写を活性化する。

HSEは5'-NGAAN-3'の基本単位が互いに逆向きに連続してつながった配列として定義されている [Amin et al., 1988; Xiao et al., 1988]。その後、最初のヌクレオチドについてはAまたはGである場合が多いことがわかり、5'-G/AGAAN-3'と表記される場合もある [Cunniff and Morgan, 1993; Fernandes et al., 1994a]。この5 bpモチーフはHSFの認識の基本単位であり、HSFトリマーの1つのサブユニットが1つの5 bpモチーフと相互作用していると考えられる(図3)。人工的に合成したHSEを使った *in vitro* の実験では少なくとも2つの5 bpモチーフが連続していないと安定な結合が得られなく [Sorger, 1991]、さらに複数のHSEが存在すると協調的に働いて相乗効果をもたらしている [Wang et al., 1994]。遺伝子上にあるHSEは通常3個以上で構成され、それが複数存在することが多い。例えば、*Drosophila* ではHsp70はそれぞれ3個から4個の5 bpモチーフからなるHSEが4個、Hsp83のHSEは8個の5 bpモチーフである [Fernandes et al., 1994b]。ラットのHsp70は5個のモチーフよりなるHSEが2個である [Mestril, 1994]。

2-6. 本研究の目的と概要

Hsp70分子シャペロンについては多くの研究がおこなわれているが、重要なco-chaperoneであるHsp40についての研究はそれほど進んでいない。細胞レベルではHsp40がHsp70と共に細胞質内に局在し、熱ショック時には共に核へ移動することが明らかになっているのをはじめ、タンパク質レベルではHsp70と共に変性タンパク質のfoldingに関わっていることが示唆される解析結果が得られているが、さらに詳細な解析を進めるために遺伝子レベルの研究が必要となってきた。本研究の目的はHsp40の機能を遺伝子レベルから解明していくために、遺伝子を単離し、その発現制御についての知見を得ることである。高等生物のDnaJ相同体遺伝子についてはこれまで報告がなかったが、著者らが初めてヒトおよびマウスの遺伝子を単離し、その構造を明らかにした。またHsp40の発現の解析から、熱ショック時および正常時の発現の制御機構についての知見を得た [Hata et al., 1996; Hata and Ohtsuka, 1998; Hata and Ohtsuka, 2000a]。

3. 材料と方法

3-1. ライブラリーのスクリーニング

ヒト胎盤由来ゲノムライブラリー(Lambda DASH II), マウス精巣由来cDNA ライブラリー(λ gt11)およびマウスBALB/c 肝臓由来ゲノムライブラリー(EMBL3) (Clontech)を使用した。ライブラリーは40万~400万個プレーティングし、プラークハイブリダイゼーションをおこなった。得られたポジティブクローンはさらにpBluescript, M13ベクターにサブクローニングしてシーケンシングをした。

3-2. ハイブリダイゼーション

プローブのDNAは、Takaraのランダムプライマーラベリングキットを用いて $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTPで標識した。ハイブリダイゼーションはAmersham社の Hybridization buffer中で65°Cにておこなった。Washingは0.1% SDS/0.1 \times SSC 65°Cの条件で2回おこなった。

3-3. シーケンシング

Applied Biosystems社のオートシーケンサー, Model 373 を用いた。GC含量が高く解析不能の場合はSequence Pro(TOYOBO)を用いてマニュアルでシーケンスした。塩基配列はGenetyx Softwareで解析した。

3-4. 細胞培養および核酸の調製

ヒトHeLa細胞、マウスNIH3T3細胞、マウスFM3A細胞は37°C, 5% CO₂下にて、10%牛胎児血清加ダルベッコ変法イーグル培地中で培養した。ヒトゲノムDNAは正常人の血液から、マウスゲノムDNAはBALB/cマウスの肝臓より、Blood and Cell DNA Kit (QIAGEN)にて抽出した。細胞またはマウスの組織からの全RNA抽出にはRNeasy total RNA Kit (QIAGEN)を用いた。ポリ(A)⁺RNAは全RNAからオリゴdTセルロース(Pharmacia)にて調製した。

3-5. サザンブロッティング

ゲノムDNAは数種類の制限酵素にて切断し、0.7%アガロース(1 \times TAE)電気

泳動で分離しニトロセルロースメンブランにキャピラリー法にて20時間ブロッキングした。

3-6. ノザンブロッティング

20 μ gのRNA試料を1%アガロース/フォルムアルデヒドゲルにて電気泳動し、Amersham社のHybond N⁺メンブランにブロッキングした。同じメンブランを β -actinをプローブにしてハイブリダイズしRNA量を確認した。ヒト組織での発現を調べるのにはMTN(Multiple Tissue Northern)TM blot (Clontech)を用いた。

3-7. 5' RACE および3' RACE

Clontech社の5' AmpliFinderRACE kit またはMarathonTM cDNA Amplification Kitを用いた。PCRはTakaraのTaq polymeraseまたはClontechのAdvantage[®]-cDNA Polymerase Mix, Advantage[®]-GC cDNA Polymerase Mix を使用しPerkin-Elmer Model 2400 サーマルサイクラーにておこなった。RACE産物はpBluescriptにサブクローニングし、シークエンスした。

3-8. プライマーエクステンション解析

TOYOBOのKination Kitにより $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で標識した1pmoleのプライマーを20 μ gのトータルRNAまたは3 μ gのポリ(A)⁺ RNAと混合し、16時間ハイブリダイズした[Sambrook et al., 1989]。伸長反応は200UのSuperscriptII (GibcoBRL)で42 $^{\circ}\text{C}$ 1h 反応させておこなった。できたcDNAは7M尿素/6%ポリアクリドアミドゲルにて電気泳動しオートラジオグラフィーで可視化した。

3-9. トランスフェクションとレポーターアッセイ

細胞のトランスフェクションはGibcoBRL社のLipofectinを用いた。レポーター遺伝子にはルシフェラーゼまたは β -ガラクトシダーゼを用いた。5 $\times 10^4$ の細胞にレポーターコンストラクト1.5 μ gと内部標準のコントロールプラスミド0.5 μ gをトランスフェクトした。44時間後に42 $^{\circ}\text{C}$ 1時間熱処理したのち、5時間後に細胞を溶解してルシフェラーゼまたは β -ガラクトシダーゼの活性それぞれ、

Picagene assay kit (TOYO INK), Luminescent β -galactosidase detection Kit

(Clontech)を用いて、ルミノメーター(Lumat Berthold)にて測定した。

3-10. ゲルシフト解析

細胞抽出液の調製はMosserら[Mosser et al., 1988]の方法によった。抗体によるスーパーシフトの実験は中井ら[Nakai et al., 1995]の方法に従った。10 μ gの細胞抽出液を1:10に希釈した2 μ lの抗血清と氷中にて20分置いたのち、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で末端ラベルした10⁴cpmのプロープとさらに20分反応させた。反応物は4%ポリアクリドアミドゲル(1 \times TAE)にて電気泳動した。

3-11. In vivo フットプリンティング

細胞は37 $^{\circ}\text{C}$ 2分、DMS(dimethyl sulfate)で処理したのち、ゲノムDNAを抽出し、EcoRIで消化してから、piperidine処理をおこなった。(DMSはグアニン残基をメチル化し、メチル化されたグアニン残基はpiperidineにより切断される。タンパクが結合している領域はDMSによるメチル化を受けないため切断されない。)様々に切断されたゲノムDNAはligation-mediated PCR [Mueller et al., 1992]により目的の遺伝子部位を増幅して可視化した。

3-12. In vitro トランスクリプション/トランスレーション

TNT[®]T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega)を用いた。 $[\text{S}^{35}]$ メチオニンでラベルした翻訳産物はSDS-PAGEで電気泳動し、オートラジオグラフィで可視化した。翻訳産物の量はFujix BAS2000イメージアナライザーで定量した。

3-13. 変異導入

Site-directed mutagenesis にはTakara LAPCR in vitro Mutagenesis Kitを使用した。

4. 結果

4-1. Hsp40遺伝子の単離と構造解析

4-1-1. ヒトHsp40遺伝子と偽遺伝子の単離 (図4, 5, 6, 7)

ヒトHsp40遺伝子をクローニングするために、先ずヒトHsp40cDNA[Ohtsuka, 1993]をプローブとしてヒトゲノムDNAのサザン解析をおこなった。その結果、3つの制限酵素でいずれも2本ずつのバンドが検出された(図4A)。このことは2つのヒトHsp40遺伝子の存在を示唆している。

そこで、ヒトゲノミックライブラリーをスクリーニングすると、5種のファージクローンを得た。それらはその制限酵素地図から2種類に分類された(図4B)。サザン解析でのEcoRIのゲノム断片は9.4kbと13kbであり、XbaIのゲノム断片は9kbと9.5 kbであるが、それぞれの長さはファージの制限酵素地図のEcoRI断片であるr1(9.4kb)、r2(13kb)、およびXbaI断片であるx1(9kb)、x2(9.5kb)に対応していた。つまり、2種類に分類されたファージクローンは2つのHsp40遺伝子部位由来であることを示すものである。

図4B上段のグループのファージクローンをサブクローニングしてシーケンスした結果、ヒトHsp40cDNAの塩基配列と完全に一致した配列を含むことがわかった。ファージクローン#4のXbaI 9kbのうち、cDNA塩基配列に一致する領域を含む7 kbあまりの塩基配列を決定して、ヒトHsp40遺伝子のエクソン-イントロン構造を解析した。その結果、ヒトHsp40遺伝子は2つのイントロンに分断されていることがわかった。図5にヒトHsp40遺伝子のエクソン-イントロン構造と対応するcDNAおよびタンパク質の構造を示した。ヒトHsp40遺伝子は3つのエクソンより構成されており、2つのイントロンは約1kbと300bpで、比較的小さな遺伝子であった。図6にヒトHsp40遺伝子の5'上流域から第1イントロンにかけての塩基配列を示した。第1エクソンは70のアミノ酸をコードしているが、その70アミノ酸は正確にJドメインに対応している。遺伝子上流域

から第1イントロンにかけてはGC含量が高く70%以上を示した。この領域の配列には多くの転写因子結合コンセンサス配列が存在した。TATA box, GC boxなどが遺伝子上流に、そしてICE (inverted CAAT element), HSE (heat shock element)は遺伝子上流および第1イントロンに見い出された。

一方、図4B下段グループのファージクローンをサブクローニングしてシーケンシングした結果、cDNAの配列と類似していたが、イントロンの配列がなく、さらに短いポリ(A)配列もみられたことから、これらの配列はプロセス型の偽遺伝子と考えられた。いずれの翻訳フレームでも多くの終止コドンを含んでいたが、さらにRT-PCRによってこれらの配列が転写されていないことを確認し、偽遺伝子と判断した。

図7に上述のHsp40遺伝子の配列との比較を示した。上段の配列がHsp40遺伝子であるが、比較のためイントロンの配列は除いてある。2箇所のイントロンの位置、2箇所のポリ(A)付加位置(上流の部位は、3' RACEクローニングによりマッピングされたものである)、開始コドン、終止コドンを示した。下段の配列が偽遺伝子である。Hsp40遺伝子と比較すると、偽遺伝子の対応する塩基配列には多数の箇所に変異、挿入などがみられ、Hsp40遺伝子の開始コドン、終止コドンに対応する偽遺伝子の塩基にも変異がみられた。Hsp40遺伝子の3'末端側のポリ(A)付加位置に対応する偽遺伝子の箇所には短いポリ(A)配列が存在した。その外側にある配列GCCACTTCTは5'末端側にある配列GGCACTTCTとほぼ一致していた。つまり偽遺伝子はこの9bpのdirect repeatによって挟まれていた。9bpのdirect repeatの外側の配列はHsp40遺伝子の配列とは全く異なっていた。以上の結果をまとめると、1. イントロンを含まない、2. 多数の箇所での点変異、挿入などがみられる、3. 短いポリ(A)配列がある、4. 5'と3'末端にdirect repeatがある、5. direct repeatの外側の塩基配列はHsp40遺伝子の配列と全く異なっているというprocessed pseudogeneの特徴 [Vanin, 1985]をすべてもっていた。

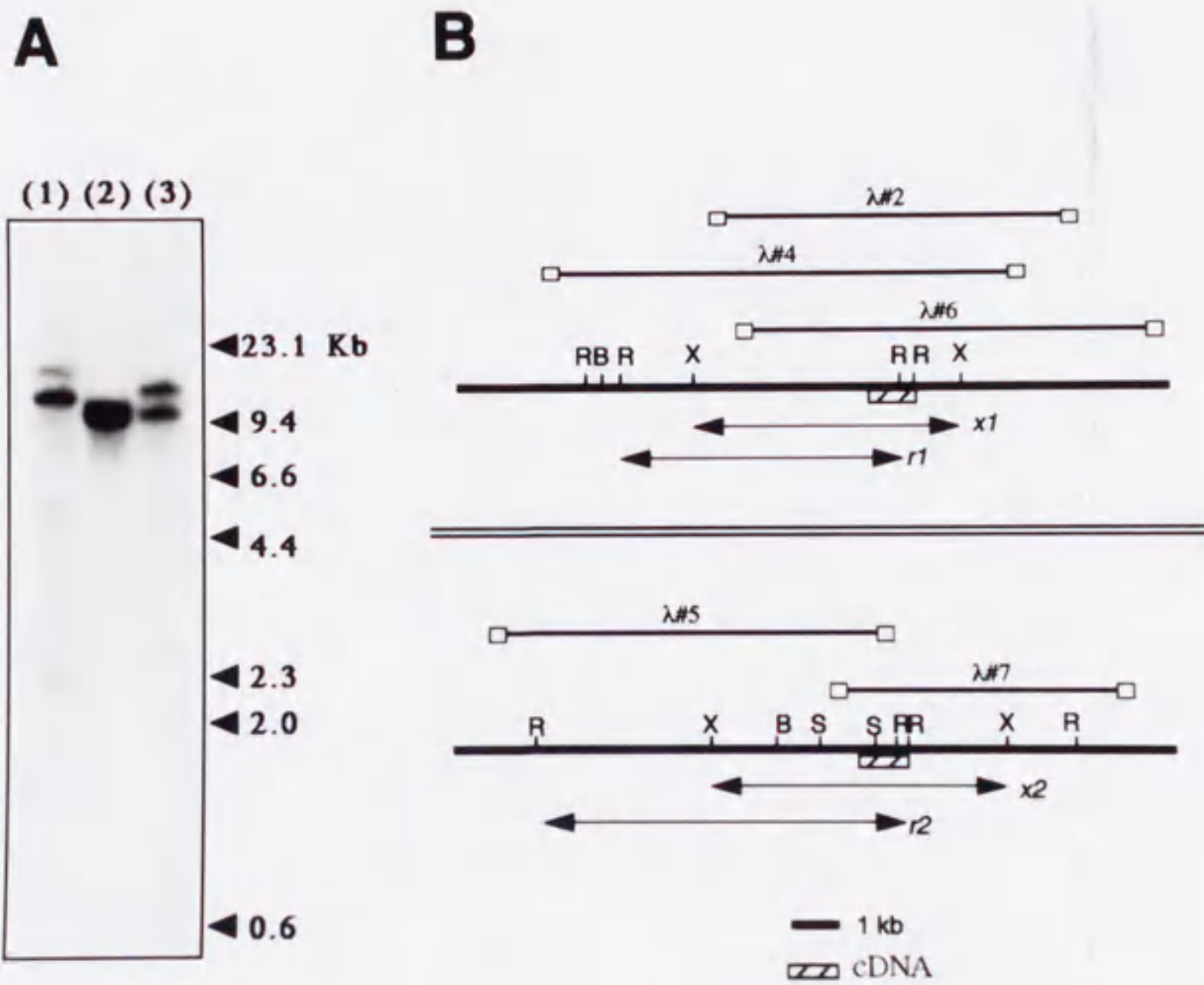


図4. ヒトHsp40遺伝子と偽遺伝子

(A) サザンブロット解析 正常人血液から抽出したDNA10 μ gを(1) HindIII, (2) XbaI, (3) EcoRI で切断し、ニトロセルロースフィルターにブロットしてヒトHsp40cDNAの1.5 kb EcoRI 断片をプローブとしてハイブリダイズした。2本のバンドがそれぞれのレーンで検出された。

(B) 2箇所の遺伝子部位の制限酵素地図 R: EcoRI, X: XbaI, B: BamHI, S: Sall. 上段がHsp40遺伝子部位であり、下段が偽遺伝子部位である。ファージクローンλ#2, λ#4, λ#6, λ#5, λ#7の位置をそれぞれの制限酵素地図上に示した。x1, x2, r1, r2 はそれぞれ(A)に示した(2)XbaI, (3) EcoRIの2つのバンドの長さに対応する。

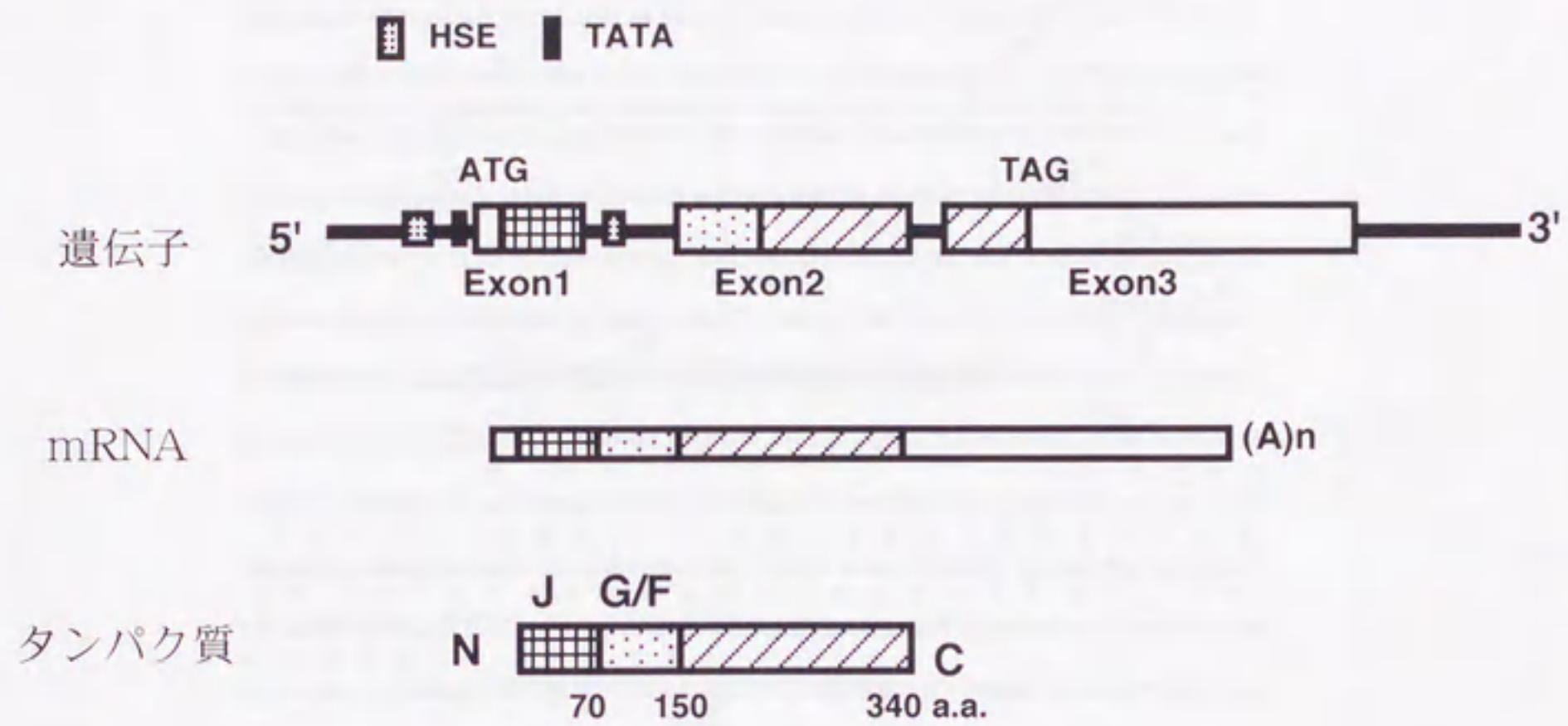


図5. ヒトHsp40遺伝子、mRNA、タンパク質の構造

Hsp40の遺伝子、mRNA、タンパク質の構造の模式図を示した。タンパク質の各ドメインと対応するコーディング域を同じ図柄で表した。遺伝子は3つのエクソンよりなり、Jドメインは正確に exon 1にコードされている。塩基配列から推定されたTATA様配列、HSE様配列も示した。

-1437
CGATCGTGTGCTACAATTGAGGAAACAGAGGCCTTGAAGGTGTGTGACACACTATGTCCTCCCAAATTATAAAGG
TAGTTGGGAAGAAAAGAAGCACGTGTGAAGAACGGGAATATTTATGAGGTTCCTACTGCGTTCAGGCACTGGGG
ACCCAGTGCAGACAGGACTGGCCCTGCCAGGTGGCGATGTGAGTGGGGAGGACAGATTGAAAGCCAGAGA
CAAGATAAATTTCAAATTTAGCGCAAGTGATCTTGAGAGGGCAGTAAAGGGAAGAGGCGGGACTGGGAGGACCTTG
GAGATGCGCTTCCGTCAGATCCTACCTTGTCTTAGGAGGTGAGAACAGAGGAGTCTTCCGTCCTCCAAATCCTTC
CCCACGGTGGGAGAATAGCGCTGGTGGTTTTTTTGTTCATTTACTTTATTTACTTTATTTATTTATTTATGAGACG
-967
GAGTCTCGCTCTGTTGCCGAGGCTGGAGTGAACGGCCGGATCTCGGCTCACTGCAACCTCCGCTCCCGATTCAAGC
TATTCTCAGGCCTCAATCTCTGAGTAGCTGGGATTACAGGTTCTGTCACCAACGCCGGTAATTTTTATATTTT
GCAGAGATGGGTTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTGAACCTCGACTCAAGTATCCGCCGCTCGGCTCC
AAAATGCTGGGATTACAGGCTGAGCCACCAGCGCCCGGCTGTTTGTAACTTAAATAGAAACGGAGTCTCCTTATGT
TGCTAGGCTGGTCTCAACTCTAGGATCAAGAGATCCTCTGCTTGGCTCAGGAAGTATGGGATTACAGGCATG
-513
AGGCTCCGCGCCCGGCTGATAGTCTCTTATTGCCATGTTGTAGATAGAAGGGGGCCCTGGGTTAGGACAGACAG
GTTAGGATGTTCTCGCCGCTCAGCGGGGAGCCACCAGGCCCCAGGAGCAAGGGGAGCAGGTTTATCGCT
CCCGGGAAAGGACTGGGTAGTCCAGGCECCACCCTTCTGGAACAGCAAGTTCGCTGTGGTCCCGACTACTGAC
-256 -277 -275
CCAGCGGAGGGGCGGACGAGGTTAGTGGGGCCCGTATAGAGAGGAAAGAAGGTCCTCGTCCCGAAAGG
-189
GCCTCCTCGACTGTGCGCGCCGCCGCGGGAGGTGTGCCGAGGGCGGAGCGGGAGGCGGGCTGCTCC
-110 -103
CGCGCGGCGGGCGTGTGACGGCGAGGCCCCGCCCGGATGTCGGCTGTGCTGAAAGGGCGGGCGCGCCGCGC
-88 -78 -41 -30
CGCGGGGCGGGCGGGCGAAAGGTTCTGGAGGGGGCTGGCGGGCTTGGAAAGCTTCGCGCGGAGGTTATATAGAGTC
+1 +47
CGGGACTGGTCCGCGGCGGAGCGGGGACGGCGACAGCGGGTCGGCGGGCCGAGGAGGGGTCATGGGTAAGACTA
M G K D Y
CTACCAGACGTTGGGCTGGCCCGCGGGCGTCCGACGAGGAGATCAAGCGGGCTACCGCCGCGAGGCGCTGCGCTAC
Y Q T L G L A R G A S D E E I K R A Y R R Q A L R Y
CACCCGACAAGAACAAGGAGCCCGCGCCAGGAGAAGTTCAAGGAGATCGCTGAGGCTACGACGTGCTCAGCGACC
H P D K N K E P G A E E K F K E I A E A Y D V L S D
CGCGCAAGCGGAGATCTGACCGCTACGGGAGGAAAGTgtgtgtcgcgagccaggggagcggacccgctttgac
P R K R E I F D R Y G E E
agacagggaaactgaggcaagctggccctctcgccggcccccgggaaggacgccccgggctgggagccgagctgccc
+410
ccgcccctcggtctcggggctccgcccctcgccagcggccgcgaggagggagccttgaccagccgctcgcg
+458
gccccgggactctagcagctggtggtgcccctccccggggcctcctcccgcccccagcagccccgggagtgccg
tgcctgggggtgggggagccgggggtagcagcggggagcggcgccggagcccgctgaggaccgggctcacctgggct
cggccgcccgggctcgggggaggcctccggctcagctcgggggcagggggtgtaagtcaggagagcagcccgtt
cgtgggctgggggctgggtgggataatccgggaagtgatgocctggccccggcagggccagcagggagcagcggc
cgcccaggtccggagagcggggcggcctcggagggttagggagagcagggccttttggctcgtgcccgttgatgattca
ggctggcttcgggcttgatctggagctgactttttgtgcaaggatggcgagtgatgctaatgtgtgaggatttaa
aaactcccctatttttttttttttaattctctctctacgcaccattagccctaaaacgttgaggatpaaact
taccgaaagccagccctggaccatgtgtctttagccatctcttggatgttgccaggagggatgggtcagtcaggaggt
ggcagggcctaggtagccctggaggtgaaacactaaccgatgagtcctttccactgtcaggctacgaggaaatact
gttggtggggggcgtctctgctgttgccagtgagggtagaaactggggcttctcctgtctccccctgacagacaa
aaaagtctcccccatggcttcaagctgtttccccctgtaagggagctcgagagagaggtcgtgtttcagccatct
gactgcttcaatctgcttttcagccTAAAGGGAGTGGCCCCAGTGGCGGTAGCGGCGGTGGTCCCAATGGTACC
G L K G S G P S G G S G G G A N G T

図 6. ヒトHsp40遺伝子の5'上流域から第1イントロンにかけての塩基配列。イントロンの塩基配列は小文字で表した。矢じりは主な転写開始点であり、これを+1として他の塩基の相対位置を数字で示した。+47にATG開始コードン、TATA boxは-30、逆向きCAAT boxは-275, -110, 第1イントロンの+410の3箇所に、GC boxは-256, -189の2箇所、HSEは-80と第1イントロンの+458に存在した。ドットで示したのは図23のレポーターアッセイで用いたコンストラクトのdeletion部位である。制限酵素部位はアンダーラインで示した。

```

2049 : GTTCTGGAGG GGGCTGGGG GCTCTGGAAG CTTCCGCCGG ACCGGTATA AGAGTCGGGG
361 : AAGAATGTGA TCTCTTTGTB TAACAGCAL TCTAGCCGG ATGGGTATAC AGAGTCGGGG
719 : ACTGGTCGGC GGGGAGCGG GGGAGCGCG ACAGCGGGTC GCGGGGGCG AGGAGGGGT
421 : ACCGGGGCGT GCGGAACCG GGGAGTGGG ACAGEAGGTC AGTGGGCTGC AGCGGGGGC
2179 : CTGGTAAA GACTACTAC AGAGCTTGG GCTGGCCCG GCGCGCTCG AGGAGGAGAT
481 : GCTGGGCAA GACTACTAC AGAGCTTGG CTTGGCCCG GCGCGCTCG AGGAGGAGAT
2239 : CAAGCGGGCC TACCGCCGC AGGCGTGGG CTACCACCG GACAAGAACA AGGAGCGGG
341 : CAAGCGGGCC TACCGCCGC AGGCGTGGG CTACCACCG GACAAGAACA AGGAGCGGG
2299 : CGCGGAGGAG AAGTCAAGG AGATCGCTG GCGCTACGAC CTGCTCAGCG ACCCGCGCAA
601 : CGCGGAGGAG AAGTCAAGG AGATCGCTG GCGCTACGAC CTGCTCAGCG ACCCGCGCAA
2359 : GCGGAGATC TTCGACCGCT ACCGGGAGGA AG-CCTAAA GGGGAGGGC CCGAGTGGC
860 : GCGGAGATC TTCGACCGCT ACCGGGAGGA AG-CCTAAA GGGGAGGGC CCGAGTGGC
3510 : GTAGCGGGCG TGGTCCAAT GGTACTCTT TCAGCTACAC ATTCCATGA GAGCTCATG
729 : GTAGCGGGCG TGGTCCAAT GGTACTCTT TCAGCTACAC ATTCCATGA GAGCTCATG
3570 : CCATGTTTC TGGTCTTTC GGTGGCAGAA ATCCCTTTG CACTTTTTT GGGCAGCGA
779 : CCATGTTTC TGGTCTTTC GGTGGCAGAA ATCCCTTTG CACTTTTTT GGGCAGCGA
3630 : ACGGGGAGGA AGGCATGAC ATTGATGAC CATCTCTGG CTTCCTATG GGCATGGTG
829 : ACGGGGAGGA AGGCATGAC ATTGATGAC CATCTCTGG CTTCCTATG GGCATGGTG
3690 : GCTTCACCAA CGTGAATTT GCGCGTCCC GCTCTGCCA AGAGCCCGC CGAAGAAGC
899 : GCTTCACCAA CGTGAATTT GCGCGTCCC GCTCTGCCA AGAGCCCGC CGAAGAAGC
3750 : AAGATCCCC AGTCAACCAC GACCTTCGAG TCTCCCTGA AGAGATCTAC AGCG-----
959 : AAGATCCCC AGTCAACCAC GACCTTCGAG TCTCCCTGA AGAGATCTAC AGCGCTTGA
3804 : -----GCT GTACCAAGAA GATGAAAAT TCCACAAGC GGTAAACCC CGACGGAAAG
1019 : CCAAGAGAT GTACCAAGAA GATGAAAAT TCCACAAGC GGTAAACCC CGACGGAAAG
3857 : AGCATTGAA ACGAAGCAA AATATTGAC ATCGAAGTGA AGAAGGGTG GAAAGAGGA
1079 : AGCATTGAA ACGAAGCAA AATATTGAC ATCGAAGTGA AGAAGGGTG GAAAGAGGG
3917 : ACGAATACTA CTTTCCCAA GGAAGGAGC CAGACCTCA ACAACATTCC AGCTGATAC
1139 : ACGAATGTA CTTTCCCAA GGAAGGAGC CAGACCTCA ACAACATTCC AGCTGATAC
3977 : GTCTTTGTT TAAAGGCAA GCGCCACAAT ATCTTTAAG GAGATGGTC TGATGATTT
1199 : GTCTTTGTT TAAAGGCAA GCGCCACAAT ATCTTTAAG GAGATGGTC TGATGATTT
4037 : TATCTGCCA GATCAGCCT CCGGGAGTG TCTGTGGGC TGCACAGTA AGCTCCAC
1259 : TATCTGCCA GATCAGCCT CCGGGAG-GC TCTGTGGGC -ACACAGTA AGCTCCAC
4391 : TCTGGAGGC AGGACGATC CTGTGATTT CAAAGATGT ATCAGGCTG GCATGGGG
1317 : TCTGGAGGC AGGACGATC CTGTGATTT CAAAGATGT ATCAGGCTG GCATGGGG
4451 : AAAAGTTCTT GGGAAGGCE TCCCCCTCC CAAAACCCC GAGAAACGTG GGGACCTAT
1377 : AAAAGTTCTT GGGAAGGCC TCCCCCTCC CAAAACCCA GAGAAACGTG GGGACCTAT
4511 : TATTGAGTT GAAGTATCT TCCCGAAG GATTCGCCG ACATCAAGAA CCGTACTGA
1437 : TATTGAGTT GAAGTATCT TCCCGAAG GATTCGCCG ACATCAAGAA CCGTACTGA
4571 : GCAGGTTCTT CCA--TA--TACTATCT GAGCTCCCA AGGACTGAC AGGACCTTT
1497 : GCAGGTTCTT CCAAGTACG TGAGTACCT GAGCTCCCG AGGGCTGGC AGGACCTAT
4626 : ECAGAGCTCA AGGATTTCTG GACCTTTCTA CCAATCTGG ACCATGAGG GGTGGAGGG
1552 : ECAGAGCTCA AGGATTTCTG GATCTTCTG CCGTCTGGG TCCATGAGG GGTGGAGGG
4686 : CCGAGGGAGG GCTTCTGAC TCTGAAATG TTTCCAGAG ATATATTACA ATCTTTCAA
1617 : CCGAGGGAGG GCTTCTGAC TCTGAAATG TTTCCAGAG ATATATTACA ATCTTTCAA
4746 : GTCACACT AGACTTCAGT GGTJTTCGA GCTATAGGG ATCAGGTGT GGGACAGCA
1677 : GTCACACT AGACTTCAGT GGTJTTCGA GCTATAGGG ATCAGGTGT GGGACAGCA
4806 : GG-AAAAGC ATTCCAGCT GCCCACTGG GTTGGCAGC CTTCCCGGA TGGGCCA
1736 : GGAAAAAGC ATTCCAGCT GCCCACTGG GTTGGCAGC CTTCCCGGA TGGGCCA
4865 : TCCACTC- GAGTCCCG GCCAGGGTG AGAGCAGAG CAGCAGATG ACTTGTCC
1795 : TCCACTCCT GAGTCCCG TCCAGGGTA AGAGCAGAG CAGCAGATG ACTTGTCC
4922 : TCTGTGTTT TGGGCTCTG GCTGTAGAT AATGTAACC TGCAGTCTG ATCTCCAGC
1855 : TCTGTGTTT TGGGCTCTG GCTGTAGAT AATGTAACC TGCAGTCTG ATCTCCAGC
4982 : GCTGTACAT GCTCCCTTC TGTGTGTA TCAATGAGC TTTAATTC TATTGCTC
1915 : GCTGTAGCT CTTCCCTTC TGTGTGTA TCAATGAGC TTTAATTC TATTGCTC
5042 : CCATGCTTG CTTCTCCTT GGAGATTC GCTTCTCTT TGGCCATCT AAATTGAGAA
1975 : CCATGCTTG CTTCTCCTT GAAGATTC GCTTCTCTT TGGCCATCT AAATTGAGAA
5102 : CCTAAACTAT TCTGCAGAA CTGCCGTGT GCGTCCACA AGCAATACC CTGTCTCAG
2035 : CCTAAACTAT TCTGCAGAA CTGCCGTGT GCGTCCACA AGCAATACC CTGTCTCAG
5162 : CAGGACCAAG GGAGCCAGC TCCAGTGT GACTCCAGC AGTCCAGCA CCTCTCCTT
2095 : CAGGACCAAG GGAGCCAGC TCCAGTGT GACTCCAGC AGTCCAGCA CCTCTCCTT
5222 : GATGCTCTG GAGCTGGGC TCAAGAGGG GCTTCTGA CTTCTGCTC CAGTGAAGC
2155 : GAGAGTCTG GAGCTGGGC CCAAGAGGG GCGTCTGA CTTCTGCTC CAGTGAAGC
5282 : GAATGCTCT ACTTTGTTG TCACTCTT TCAATTTCT TAAGGCAAT TCGCACAC
2215 : GAATGCTCT ACTTTGTTG TCACTCTT TCAATTTCT TAAGGCAAT TCGCACAC
5342 : TGGGCTTAC CAGTGGCCA GGTAAATTT TGTTCATGG ACTATGACT CTTCAAGG
2275 : TGGGCTTAC CAGTGGCCA GGTAAATTT TGTTCATGG ACTATGACT CTTCAAGG
5402 : GATGTATG TTTTGAATT TGCAGAGCC TAGATAAAT CCTTTTGA AAAAGGCTT
2335 : GATGTATG TTTTGAATT TGCAGAGCC TAGATAAAT CCTTTTGA AAAAGGCTT
5462 : TTGCTCTGA TTACAGGAG ACTGTGGAAC GCTGTAAAT ATGTTTTAT AATCCATG
2395 : TTGCTCTGA TTACAGGAG ACTGTGGAAC ATCTATAAT ATGTTTTAT AATCCATG
5522 : ATAGTTGTT TACTCTC- -AAAACCTGT CCGCGCAGC CAGTCTCT TGTATAGGC
2455 : ATAGTTGAT TACTCTCAA TAAACCTGT CCGCGCAGC CAGTCTCT TGTATAGGC
5578 : CATAATGAA TTCTGAAGAA ATCTTGGGA GGGAGGGGA GTTGAACAA ATGTCTGTT
2515 : CATAATGAA TTCTGAAGAA ATCTTGGGA GGGAGGGGA GTTGAACAA ATGTCTGTT
5638 : CTTGGAGGC AGTCCAGTG TCAACCTTT AGATCATTG TAAGTGGCA CTGCCACAT
2575 : CTTGGAGGC AGTCTGTTG TCAACCTTT AGATCATTG TAAGTGGCA CTGCCACAT
5798 : GAGACCAAG TGTGACTA GTCATGAG TGGCAGCA TTAAGACTG ATCTAAAC
2635 : GAGACCAAG TGTGACTA GTCATGACT CATGACAGG TTAAGACTG ATCTAAAC
5858 : TCA--GGG AGCGTCTG TCACTCTGT TGAAGTTCT GCTGTTTT GGGGAGG
2695 : TTAATTAATA AAAAAAAAAA AAAGCACTTCT TTTCTCT TTTCTGTA ATTTCCATA

```

図 7. ヒト Hsp40 遺伝子と偽遺伝子の塩基配列

上段 : Hsp40 gene 下段 : pseudogene

▽ : イントロンの位置 ▼ : ポリA付加位置 — : TATA配列 ▶ : 転写開始点

□ : 開始コドン、終止コドン : direct repeat — : ポリA配列

4-1-2. マウスHsp40cDNAと遺伝子の単離 (図8, 9, 10, 表3, 4)

ヒトHsp40の塩基配列をもとにマウスのESTデータベースを調べるとマウスHsp40cDNA断片と推測されるいくつかのクローンがあった。全長のHsp40cDNAを得るために、それらのESTクローンの塩基配列からプライマーをつくり、RT-PCRからプローブを作製してライブラリーをスクリーニングした。cDNAライブラリーは発現が高いと予測された[Mori et al., 1999]マウスの精巢のライブラリーを用いた。約4百万個のライブラリーをスクリーニングして数種の互いに重なりあうcDNAクローンが得られた(図8)。このうちクローン#23cは全翻訳領域を含んでいた。これらの重なりあうcDNAクローンから全長のcDNA塩基配列を決定した。マウスcDNAのコーディングの塩基配列をヒトと比較すると90%が一致した。コードするアミノ酸はヒトと同じく340で、その配列は95%が一致した(図9)。

ゲノミッククローンはcDNAクローン#23cをプローブとしてマウス肝臓ゲノミックライブラリーをスクリーニングして得た。クローン#9gと#16gである。クローン#9gは全マウスHsp40遺伝子を含んでいた。クローン#16gはさらにHsp40遺伝子の上流側を含むクローンであった(図8)。全長cDNAの塩基配列および予測されるアミノ酸配列、2箇所のイントロンの挿入位置を図10に示した。エクソン-イントロン構造はヒトと同様でイントロンの挿入位置も一致、エクソンのコードするアミノ酸数も一致していたが、非翻訳領域およびイントロンについては若干の差異がみられた。表3にヒトおよびマウスHsp40遺伝子の比較を示した。翻訳域の配列は90%の一致がみられたが、非翻訳域やイントロンでは構成する塩基の数も異なり、類似性も低い。イントロンの塩基配列の類似性は53-59%であった。表4にヒトおよびマウスHsp40遺伝子のエクソン-イントロン境界部分の配列をまとめた。イントロン境界部分の配列はスプライシングのGT-AG則にあてはまり、周辺配列もコンセンサスによく一致した。

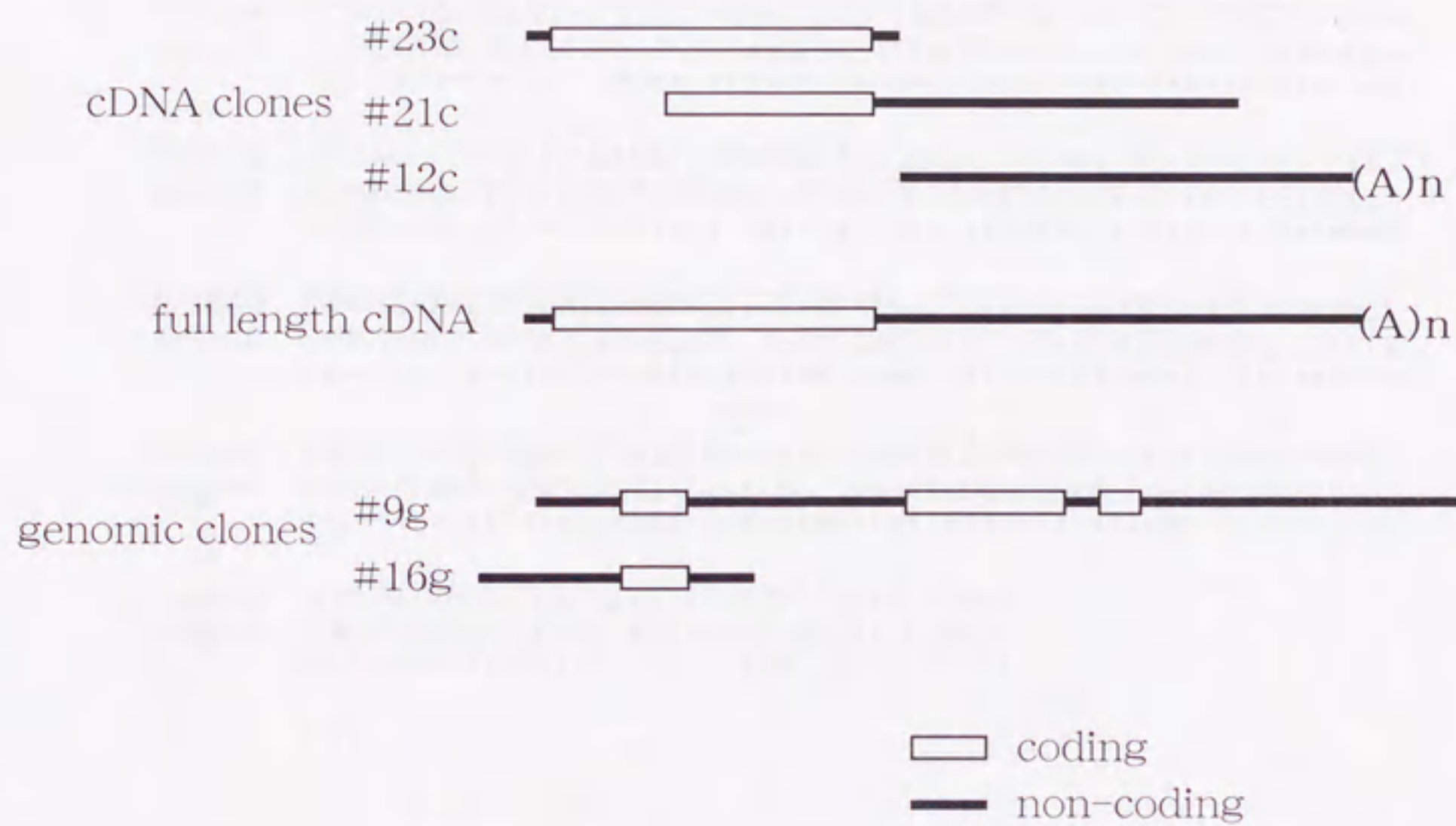


図8 マウスHsp40のcDNA クローンおよびgenomicクローン
 cDNA クローン、genomicクローンの位置関係を示した。

#23cはコーディングの全域を含むが3'側の配列が欠けていたので
 全長cDNAは他のクローンの配列と合わせて決定した。

#9gは遺伝子と上流域約300bpを含む。#16gはさらに上流域を含
 む。

hHsp40	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRK
mHsp40	MGKDYYQTLGLARGASDDEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRK
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
	▽
hHsp40	REIFDRYGEEGLKGGSPSGGGGGANGTSFSYTFHGDPHAMFAEFFGGRNPFDTFFGQRN
mHsp40	REIFDRYGEEGLKGGSPSGSSGGANGTSFSYTFHGDPHAMFAEFFGGRNPFDTFFGQRN
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
hHsp40	GEEGMDIDDPFSGFPMGMGGFTNVNFGRSRQAQEPARKKQDPPVTHDLRVSLIEEISGCT
mHsp40	GEEGMDIDDTFSSFPMMGGFTNMNFGRSRPSQEPTTRKKQDPPVTHDLRVSLIEEISGCT
	*****.****.*****.*****.*****.*****.*****
hHsp40	KKMKISHKRLNPDGKSIRNEDKILTIEVKKGWKEGTKITFPKEGDQTSNNIPADIVFVLK
mHsp40	KKMKISHKRLNPDGKSIRNEDKILTIEVKGWKEGTKITFPKEGDQTSNNIPADIVFVLK
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
	▽
hHsp40	DKPHNIFKRDSVVIYPARISLREALCGCTVNVPTLDGRTIPVVFKDVIKIRPGMRRKVPGE
mHsp40	DKPHNIFKRDSVVIYPARISLREALCGCTVNVPTLDGRTIPVVFKDVIKIRPGMRRKVPGE
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
hHsp40	GLPLPKTPEKRGDLIIIEFEVIFPERIPQTSRTVLEQVLPI
mHsp40	GLPLPKTPEKRGDLVIEFEVIFPERIPVSSRTILEQVLPI
	*****.*****.*****.*****.*****.*****

図9 ヒトおよびマウスHsp40のアミノ酸配列の比較

上段にヒト、下段にマウスのHsp40のアミノ酸配列を示した。

340アミノ酸のうち異なるのは14のみで95%のアミノ酸が一致した。

▽でイントロンの位置を示した。ヒトとマウスでイントロンの位置は完全に一致した。

```

...GGTGTCTGCGGGGCATCGGGAGGGGGGAGAGGCTTGGAGGGGCTGGCGGATTTGGAGGCTTCCGCCGGACG 73
GGTATATAGAGTCCGGGACGGGGCAGCAGCGGAGCCGGAGGGCGGCGACAGCTGGCGGGCGGTGGCCATGGGCAAG 148
GACTACTATCAGACGCTGGGCTGGCCCGGGCGGCTCCGACGACGAGATCAAGCGAGCCTACCGCCGCCAGGGC 223
D Y Y Q T L G L A R G A S D D E I K R A Y R R Q A
CTGGCTACCAACCGGACAAGAACAAGGAGCCCGGCGCTGAGGAGAAGTTCAAGGAGATCGCCGAGGCCTACGAC 298
L R Y H P D K N K E P G A E E K F K E I A E A Y D
exon 1 | exon 2
GTGCTCAGCGACCCCGCAAGCGCGAGATTTTCGACCGCTATGGAGAGGAAGGCTGAAGGGTGGTAGCCCAAGT 373
V L S D P R K R E I F D R Y G E E G L K G G S P S
GGAGGAAGCAGTGGTGGTCTAATGGTACCTCTTTCAGCTACACATTCCACGGAGACCCCATGCCATGTTTGGT 448
G G S S G G A N G T S F S Y T F H G D P H A M F A
GAGTTCTCGGTGGCAGAAACCCCTTGGATACCTTTTGGGCGAGCAACGGGGAAGGCGATGGACATTGAT 523
E F F G G R N P F D T F F G Q R N G E E G M D I D
GACACATTCTAGCTTTCCAATGGGTATGGTGGCTTCCCAACATGAACCTTTGGAGCTTCCCGCCCTTCTCAA 598
D T F S S F P M G G G F T N M N F G R S R P S Q
GAGCCACCCGGAAGAAGCAAGATCTCCAGTCACCCATGACCTTCGGGCTCCCTTGAAGAGATCTACAGCGGC 673
E P T R K K Q D P P V T H D L R V S L E E I Y S G
TGTACCAAGAAGATGAAATCTCCACAAGCGGCTGAACCTGTGAAAGAGCATTGAAATGAAGATAAGATC 748
C T K K M K I S H K R L N P D G K S I R N E D K I
CTGACCATCGAAGTGAAGAGGGGCTGAAAGAAAGGACCAAAATCACCTTTCCAAGGAAGGGGACAGACCTCG 823
L T I E V K R G W K E G T K I T F P K E G D Q T S
AACAACTTCCAGCAGACATCGTCTTTGTTTAAAGGACAAGCCACACAATATCTTCAAGAGAGATGGTTCTGAT 898
N N I P A D I V F V L K D K P H N I F K R D G S D
exon 2 | exon 3
GTCATCTATCCAGCCAGGATTAGCCCTTCGGGAGGCTCTCTGTGTTGCACTGTGAATGTCCCTACTCTGGACGGC 973
V I Y P A R I S L R E A L C G C T V N V P T L D G
AGGACCATCCCTGTTGATTCAAAGATGTCATCAGGCCCTGGTATGCGGGGAAAGTCCCTGGAGAAGGCCCTCCCT 1048
R T I P V V F K D V I R P G M R R K V P G E G L P
CTCCCCAAACACCTGAGAAACGTGGAGACCTTGTATCGAGTTTGAAGTGATCTCCCGGAAAGGATTCCCGTC 1123
L P K T P E K R G D L V I E F E V I F P E R I P V
TCATCCAGAACCCTCGGAGCAGGTTCTTCCATATAGCCACCTGCACTCTCAAGGACTGAGCCAGGGGCTTT 1198
S S R T I L E Q V L P I *
CAGCGCTGCAGATCTCCAGACCGTTCCTGTTGCATATCGGGAGGGCCAGGGAGGGCTTTTGGCTCTGCCGA 1273
ATGTTTTCCACAGAAATATAATTACAATCTTTCAAAGTCGCGCACTAGACTACAGTGGTTTTTTCGAGCGATAGGCAG 1348
GCGGTGGGAACAGCAGCCCTCTGGAATGGACCCACCTCTGACCCAGCTCTGCCAAGGGTGTGAGGCAGG 1423
CCTGCAACTGGACTCTTGCCCTCTGTGTCTTAGTCTGGCTGTCATGTGACAGTGGTECGCCATCTCAGTTGCC 1498
AGACCTGTGCACTAGTCAGTCTCCACTGTGTGGGAGGTTCTTGTTTTATCTGTATTTGTCATGCTTGTTC 1573
TCCTCCCAGAAGAGTCTGTCTTGTCTTGGCCATCTCAAATTGAGACCAATTCCTAGGACTGCCAGGCCAGCA 1648
TCACAAGCAATACCTGGTGGCAGGACACAGGGCCAGCCCTCTCCAGGTTCTGGGGCTGGCCAGCCAGGAGAT 1723
CCCCGACCTCTGGCTCCATFGACATCAGATGGCTGGCTTACAGTACAGTACTTGTGGTCCAGAGGTAGACC 1798
TTGGCCACACTGGCACTTCTCAGAGGCACAGGTGATTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 1873
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGAAGTAATGGACTCTGAACCTAGAAGGATACAATCCTTTTGGATTTTGA 1948
CAGTCTAGATCTAATCCCTTTGATAAAAGGCTTTTGTCTGTGATGAAAGGAGCACTGTGGAACGTATGATAA 2023
TATGTTTTATAATTCCATTGGAAGCTGGTGTGCACTCAGACGAAAGCAGTCCCTGTCAACTACTGTCCAGGGCT 2098
GTGATGGGATCAGACCTGGGCGTGAAGTATCTGTTCTTTGGAGTAGCCTGGTGTCTGACCATCAACTCATT 2173
GTAAGTTGCCACTACCAACAAGACCAAGTGTGTGACTTGTGATTATGCAAGTGTGACAGCATTAAAGACTGAT 2248
GCTAAACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2279

```

図 10. マウスHsp40cDNAの塩基配列

矢印 (▲) はcDNAクローン #23cの3' 末端を示している。これより3' 側の配列は#23cと重なり合うcDNAクローン#21c, #12cのデータである。終止コドンの約150bp 下流に3' RACEクローニングによってマップされたポリ(A) 付加部位 (▲) がある。2つのポリ(A) 付加部位の数bp上流には、ポリ(A) 付加配列 (■) が認められた。上流域にはHSE, TATAの配列 (□) が見られた。ドット (●) で示したのは熱ショック処理をしたNIH3T3細胞のmRNA でのprimer extensionの結果、検出された転写開始点である。

表 3. ヒトおよびマウスのHsp40遺伝子の比較

Exon No.	size(bp)	Matching %	amino acid
1	h:257	88%	70 a.a. (J domain)
	m: 245		
2	h: 581	90%	193 a.a.
	m: 581		
3	h: 1402	72%	77 a.a.
	m: 1317		

Intron No.	size(bp)	Matching %
1	h:1092	53%
	m:1269	
2	h:295	59%
	m:219	

ヒト(h)とマウス(m)遺伝子のエクソンとイントロンの比較をし、エクソン1とエクソン3のコードするアミノ酸数は一致するが、5' および 3' 非翻訳領域の長さは異なる。

表 4. ヒトおよびマウスHsp40遺伝子のエクソン-イントロン境界部位

	Exon	Donor	Intron	Acceptor	Exon	
human	1	GGAGGAAG	gtgtgtgc	1092 bp	cttttcag GCCTAAAG	2
mouse	1	AGAGGAAG	gtacgtgt	1269 bp	gtttccag GCCTGAAG	2
human	2	TCCGGGAG	gtaaggtg	295 bp	ttttcaag GCTCTGTG	3
mouse	2	TCCGGGAG	gtaaggtg	219 bp	ttccctag GCTCTCTG	3
consensus		AG	gt(Pu)agt		(Py)n ncag G	

ヒトおよびマウスHsp40遺伝子のエクソン-イントロン境界部分の塩基配列を示した。エクソンは大文字で、イントロンは小文字で表した。

4-2. Hsp40の発現解析

4-2-1. ヒトHsp40の発現 (図11、図12)

ヒト組織での発現をノザン解析で調べた結果を図11に示した。3.8 kb, 2.4 kb, 1.4 kbの3種の転写物が検出された。このうち2.4 kbの転写物が主な転写物で、ほとんどすべての臓器で発現していたが、発現量には臓器特異性があり、特に精巣、気管支、肺での発現が高かった。1.4 kbの転写物は発現の高い肺、気管支、精巣では同様に高い発現が検出されたが、その他の臓器では低かった。3.8 kbの転写物も発現の高い肺、気管支に比較的強い発現がみられたが、精巣には検出されなかった。

HeLa細胞でのヒトHsp40の発現をノザン解析で調べたところ、2.4 kbと1.4 kbの2つの転写産物が検出された。いずれの転写産物も42°C、1時間の熱ショックにより発現量の増加が認められた(図12A)。熱ショックを加えたHeLa細胞から精製したmRNAでRACE解析をおこなうと、5' RACE解析では1本のバンドが、3' RACEでは2本のバンド(1.2 kbと0.22 kb)が検出された(図11B)。RACE産物をクローニングしてシーケンスした。3' RACEの1.2 kbのバンド由来のクローンの末端の配列はcDNAクローンの3'末端と一致した。0.22 kbのバンド由来のクローンの末端はcDNAの終止コドンから159 bp下流のアデニンにマップされた(図7上段、ヒトHsp40遺伝子 nt 4752)。この位置にポリ(A)が付加された転写物の長さを計算すると1228 bpであり、ポリ(A)配列も考慮に入れるとノザン解析で検出された1.4 kbの転写物の長さによく対応する。そのため2.4 kbと1.4 kbの転写物はポリ(A)付加位置の違い、つまり3'非翻訳領域の長さの違いであると考えられた。一部のヒト組織で検出された3.8 kbの転写物はHeLa細胞では検出されなかった。この3.8 kbの転写物についてはいまのところ5'末および3'末の位置が不明である。

4-2-2. マウスHsp40の発現 (図13)

マウスの組織での発現を調べると、転写物は2.4kbと1.4kbで、ヒトで検出さ

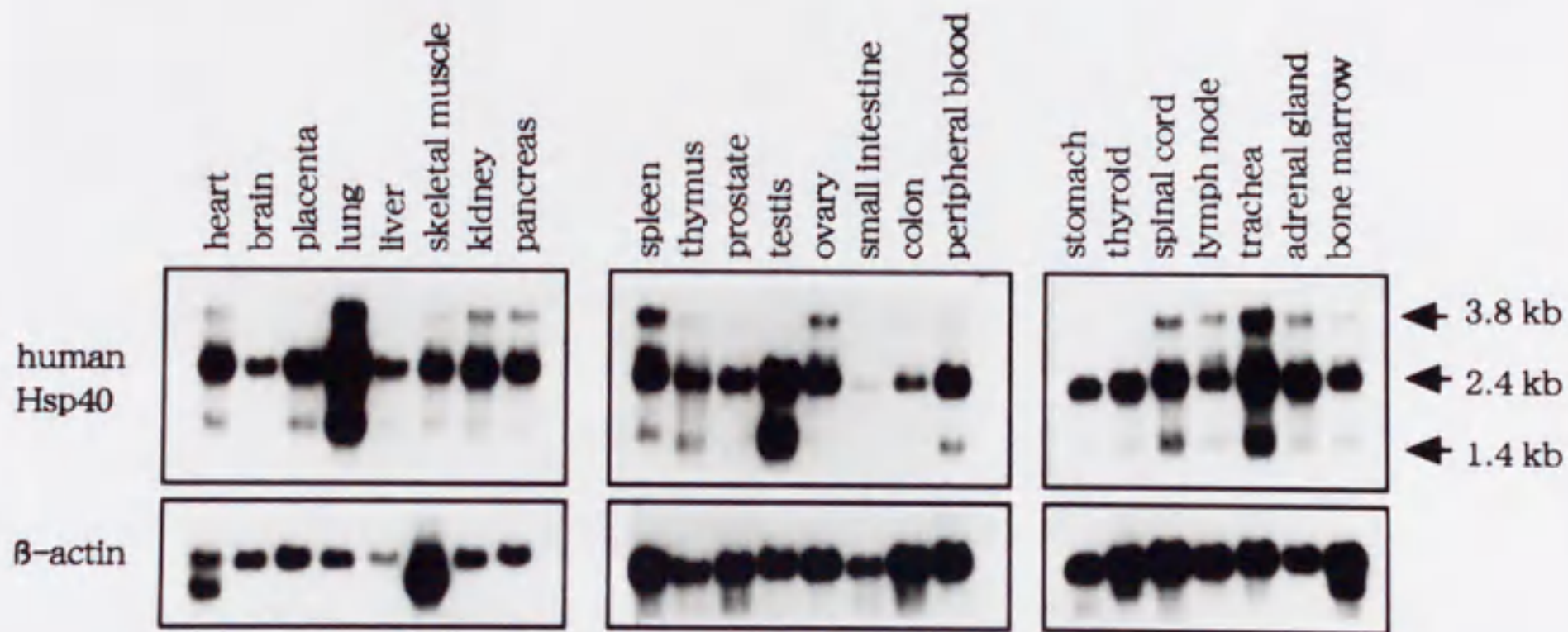


図 11. ヒト組織でのHsp40の発現

MTN (Multiple Tissue Northern) プロット (Clontech) でヒトHsp40の発現を調べた。ヒトHsp40cDNA、 β -actinをプローブとしてノザンハイブリダイゼーションをおこなった。heart とskeletal muscleは2.0 kbと1.8 kbの2つの β -actin form を含む。

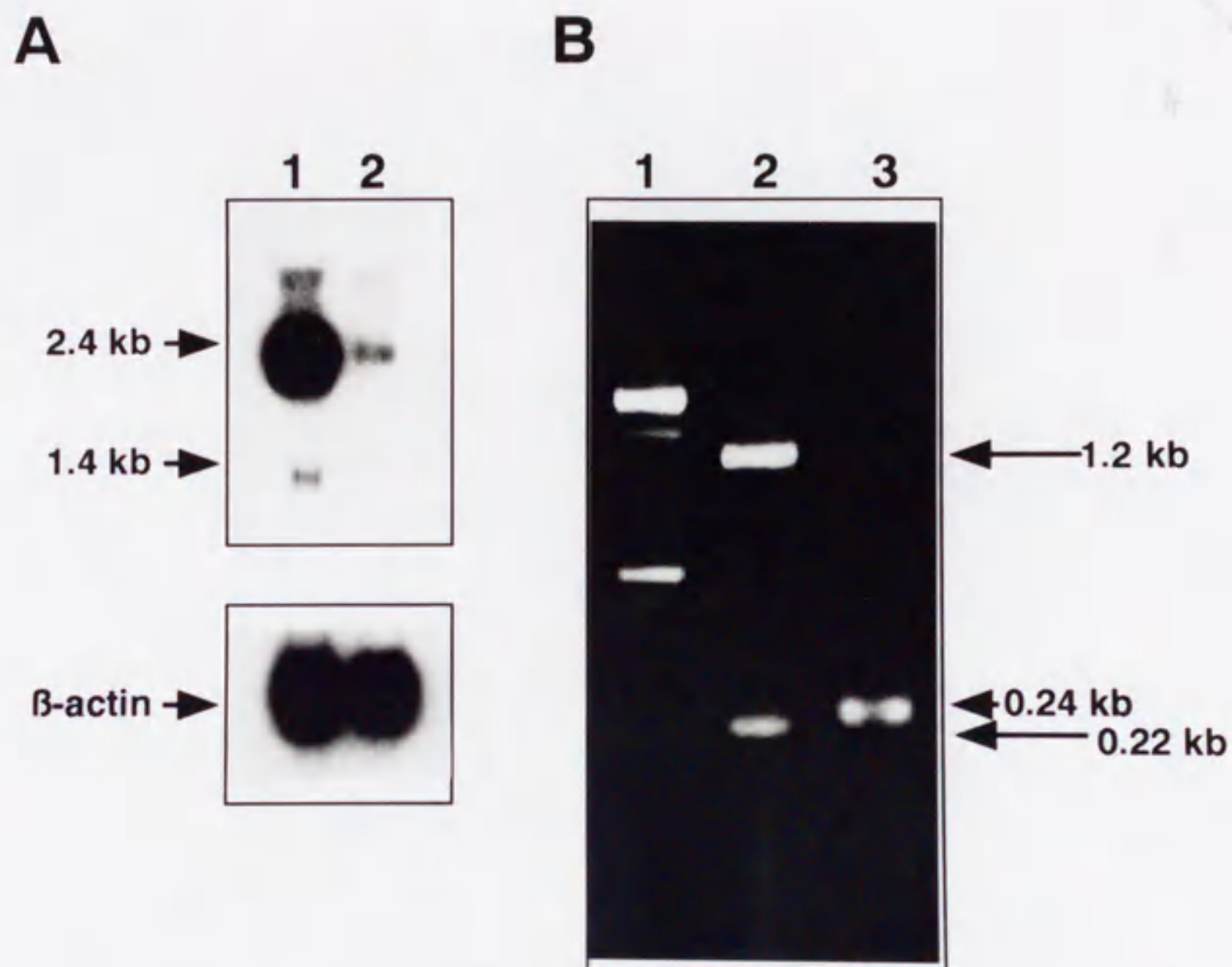


図 12. ヒトHsp40のHeLa細胞での発現

(A) ノザンプロット解析 1: 42°C, 1 h の熱ショック処理をした HeLa 細胞、
 2: コントロールのHeLa 細胞 それぞれRNA 20 μgをプロットし、ヒト
 Hsp40の発現を調べたところ、2.4 kbと 1.4 kbの2つの転写物が検出され、両
 者とも熱によりその発現が誘導された。コントロールでは1.4 kbの転写物のシ
 グナルが薄く写真ではみえていないが、より長い露出時間で検出できている。
 (B) RACE 解析 1: 分子量マーカー(100 bp ladder)、2: 3' RACE、 3: 5'
 RACE RACE 産物はクローニングして、シーケンスした。

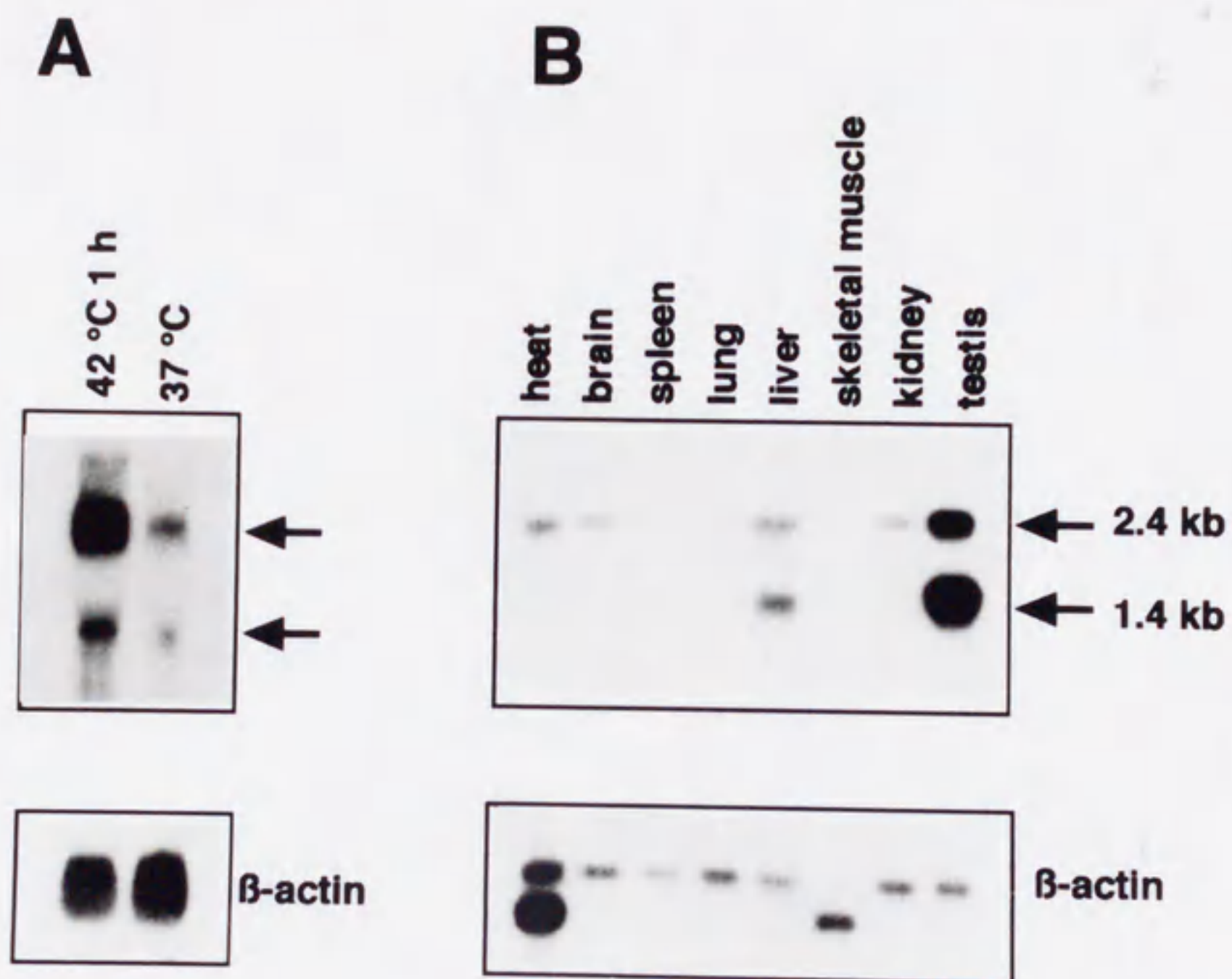


図 13. マウスHsp40のノザンブロット解析

(A) マウスNIH3T3細胞での発現 熱ショックにより誘導される2.4 kbと1.4 kbの転写物が検出された。

(B) マウス組織での発現 testisで最も高い発現がみられた。2.4 kbと1.4 kbの転写物が検出された。

れたものと同じ長さであった。しかし、組織ごとの発現パターンは大きな違いが見られた。特に精巣で高い発現がみられたが、他の組織では全般に発現は低く(図13B)、ヒトとはかなり異なっていた。マウスのNIH3T3細胞での発現を調べると2種の転写物とも熱ショックによって発現が誘導された(図13A)。NIH3T3細胞mRNAのRACE解析では、ヒトと同様に、5' RACEで1本、3' RACEで2本のバンドが検出された。3' RACE クローンのシーケンスによってマップされたポリ(A)付加位置を図10に示した。終止コドンTAGの約150 bp下流にマップされたが、その20 bp上流にはポリ(A)付加シグナルに相当する配列AATATAが存在した。ライブラリーからクローニングしたcDNAクローン(#12c)の3'のポリ(A)配列から20 bp付近にもATTAAAのポリ(A)付加シグナルがみられる。2種の転写物はヒトと同様、3'非翻訳領域の長さの違いであることがわかった。

4-2-3. ヒトHsp40遺伝子の転写開始点の同定 (図14)

熱ショック処理をしたヒトHeLa細胞のmRNAをテンプレートとしてプライマー伸長法により転写開始点を調べた結果、ATGの上流51 bpから44 bpまでの8 bpの連続したバンドとして検出された。そのうちATGの上流47 bpのアデニンが最も強いバンドとして検出された。5' RACE産物をシーケンスした結果、得られた5'末端も多くはこのアデニンであった。そのためこのアデニンを(+1)とした(図14)。さらに、熱ショック処理および非処理HeLa細胞のmRNA、ヒト肺のmRNA、について5' RACEをおこなったが、この3つのmRNAの材料で得られた5' RACE クローンの5'末端は同様の位置にマップされ、差異はなかった。つまり次項で述べるようなマウスでみられた熱ショックで誘導された転写物と通常時の転写物の5'末端の違いはヒトの場合は、少なくとも調べたmRNAの材料では、認められなかった。

4-2-4. マウスHsp40転写物の5'末端の多様性 (図15、16)

マウスcDNAクローン#23cはその5'非翻訳領域にTATA配列やHSE配列がみられた(図10)。転写産物にこのような転写制御因子の結合配列が存在するのは予

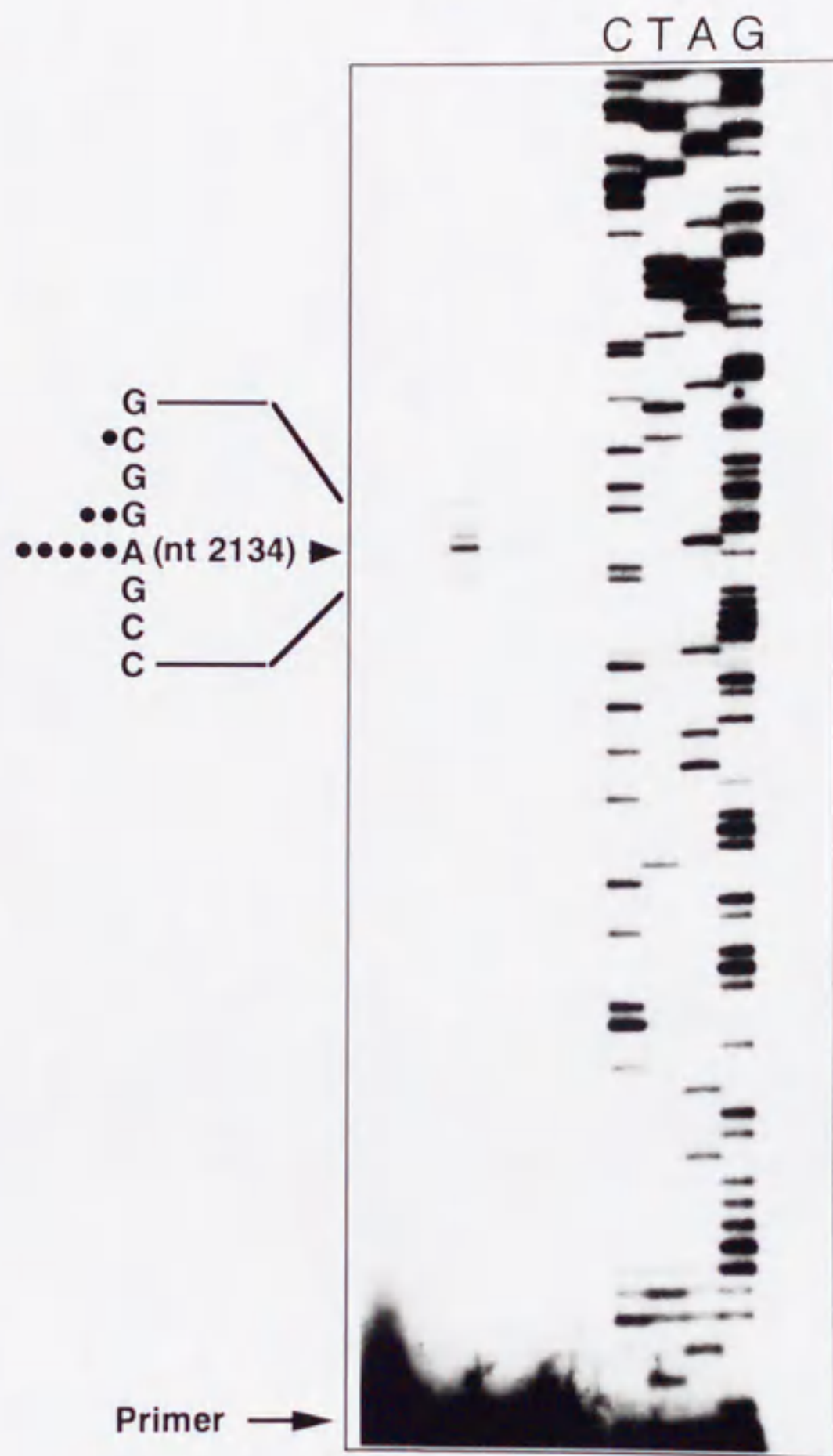


図 14. ヒトHsp40遺伝子の転写開始点

HeLa細胞のmRNAによるprimer extensionの結果、8つの連続したバンドが検出された。矢印は主な転写開始点のアデニンを示す。ドットは5' RACE産物のシーケンスでマップされた5'末端を示す。

想外であったので、さらに詳しくマウスHsp40転写産物の5'末端を調べることにした。ほかに5'非翻訳領域を含むcDNAクローンが得られなかったので5' RACEで5'末端を含む複数のcDNAをクローニングすることにした。その結果、RNAの由来により5' RACE産物の長さに違いがみられることがわかった。

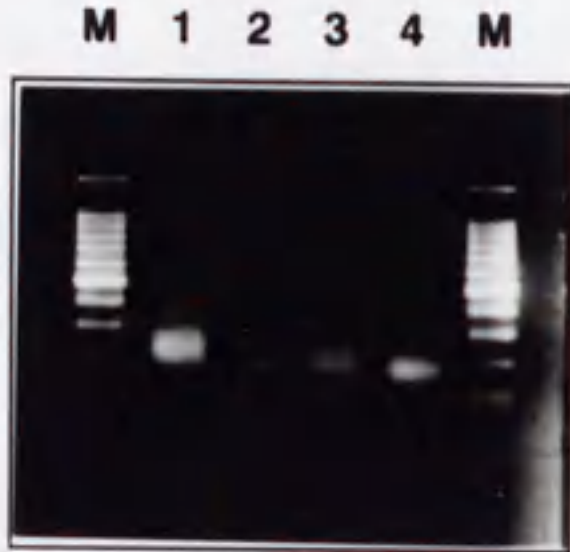
精巣由来では最も長く、熱ショック処理をしたNIH3T3細胞では短かく、肝臓やコントロールのNIH3T3細胞ではその中間であった(図15A)。これらの5' RACE産物をクローニングしてシーケンスし、5'末端をマッピングした。精巣では最も5'側にマッピングされ、多くのクローンがTATA配列を含み、広い範囲にわたって5'末端が散らばっていた。肝臓や熱ショック処理をしないNIH3T3細胞でも多くがTATA上流にマッピングされた。一方、熱ショック処理をしたNIH3T3細胞では調べたすべてのクローンでTATA下流の狭い領域にマッピングされた(図15C)。

さらに正確に転写開始点を同定するためにプライマー伸長法をおこなった。熱ショック処理をしたNIH3T3細胞ではヒトと同様な結果が得られ、TATA配列の22 bp下流の7bpが主な開始点としてが検出された。マウスの精巣では複数のバンドが検出されたが、その多くはTATA上流にあり、5' RACEとほぼ同様な結果が得られた(図15B)。

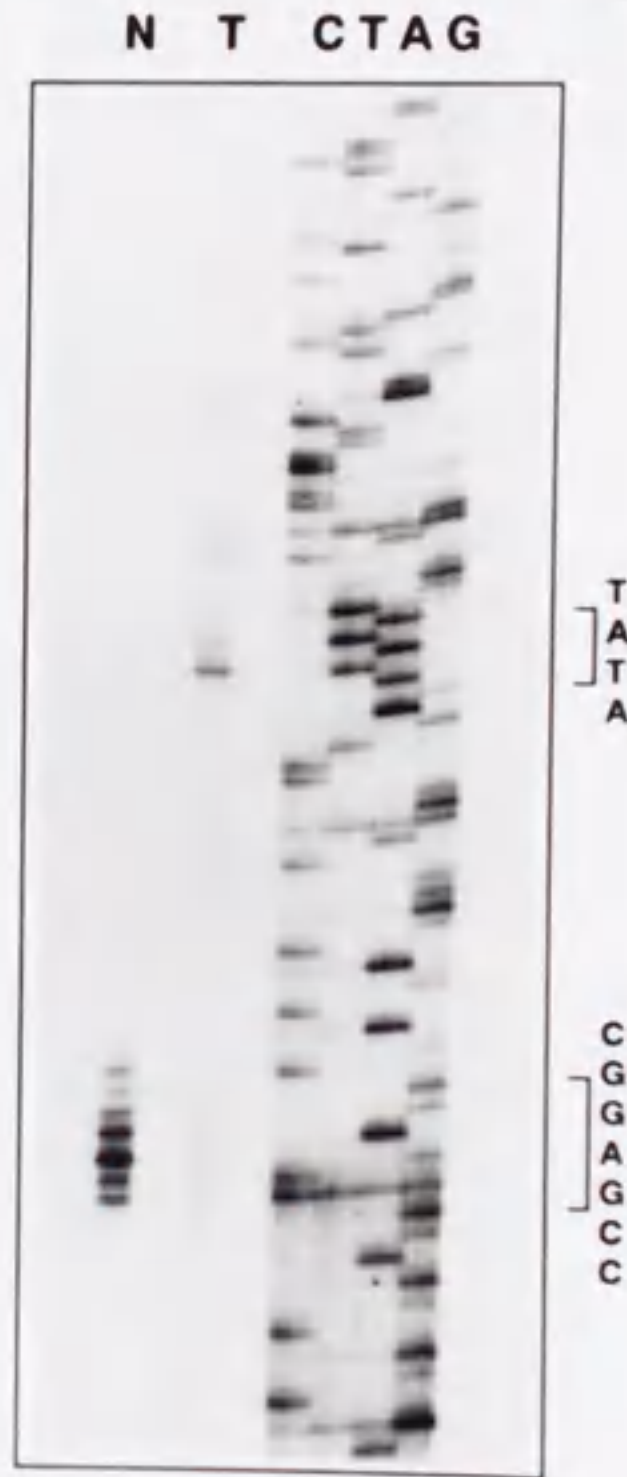
以上の結果から、マウスHsp40の転写の開始点はRNAの材料によりそれぞれ異なっていることがわかった。熱ショックにより誘導された転写物はTATA下流より転写が開始され、TATAを介した転写開始機構によるものと考えられる。それに対して、通常時(恒常的発現)では多くがTATA上流より転写が開始され、TATAを介さない制御機構が働いていると考えられる。

マウスHsp40の転写物はすくなくとも4種類の構造が存在することがわかった。3'末端についてはヒトと同様、3'非翻訳領域の長さ違う2種類がある。5'末端についてはマウスの場合多数存在するが、TATA下流に開始点のあるものとTATA上流に開始点のあるものとで少なくとも2種類は考えられるので、

A



B



C

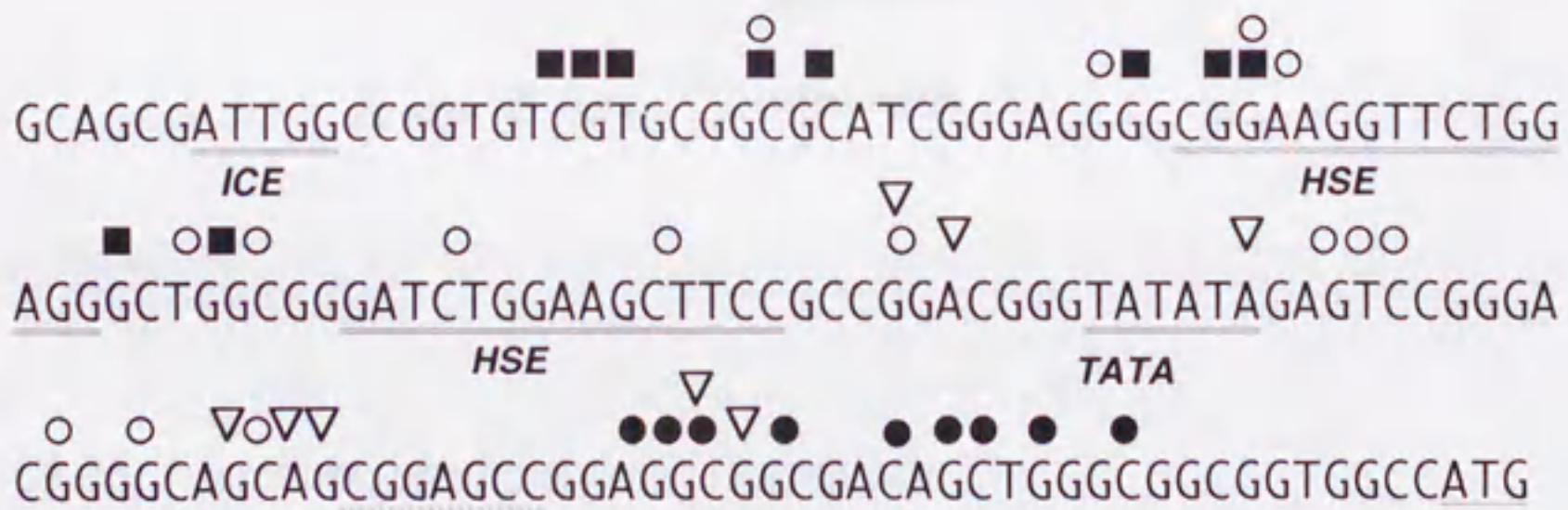


図 15. マウスHsp40遺伝子の転写開始点

(A) RACE 解析 M. 100 bp ladder, 1. testis, 2. liver, 3. コントロールのNIH3T3細胞 4. 熱ショック処理をしたNIH3T3細胞、RACE産物はクローニングしてシーケンスした。(B) Primer extension 解析 N: 熱ショック処理をしたNIH3T3細胞, T: testis (C) RACE産物の5'末端 ■: testis ▽: liver ○: NIH3T3 ●: NIH3T3 (hs) (B), NのPrimer extension産物

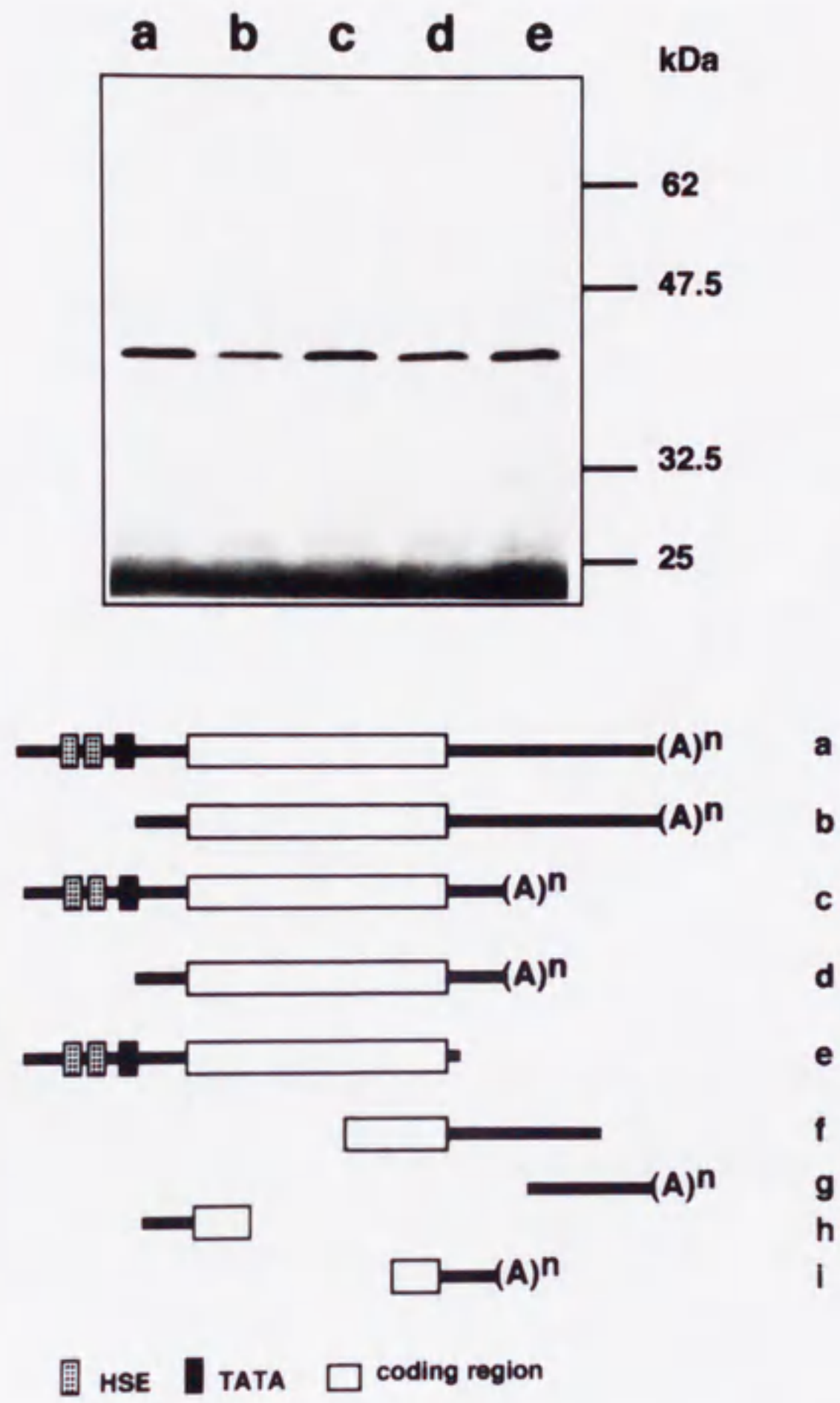


図 16. In vitro transcription/translation templateのコンストラクトの構造を下に表した。eがcDNAクローン #23cである。a, b, c, dは f: cDNAクローン#21c, g: cDNAクローン#12c, h: 5' RACEクローン i: 3' RACEクローンを組み合わせて構築した。いずれも分子量約40 kDaのタンパク質を合成した。

予想される計4種類のcDNAコンストラクト(図16、下段a-d)をライブラリーから得られたcDNAクローン(c-g)およびRACEクローン(h, i)などを組み合わせて構築した。これらの構築したcDNAをtemplateとして、in vitro トランスクリプション/トランスレーションをおこなった結果、cDNAクローン#23c(c)と同様、すべて同一のサイズのタンパクをコードすることを確認した(図16、上段a-d)。

これらの翻訳産物の量をそれぞれのバンドのradioactivityを定量して比較してみると、図16のa, c, eなど5'非翻訳配列の長いものの方が短いb, dよりも約2倍翻訳の効率が良いことがわかった。一方、3'非翻訳領域の長さの違い(a, bとc, d)は約1 kbもあるにもかかわらず翻訳産物の量は同程度であったため、3'非翻訳領域の長さは翻訳の効率には影響しないものと考えられた。

熱ショックの際、最も多く発現している転写物はノザン解析と5' RACE解析の結果から、5'非翻訳配列の短いbの型であることが明らかである。熱ショック時には通常時の数十倍にも転写が誘導されることから、翻訳の効率が多少低いにせよ充分補っているものと思われる。

翻訳の開始にはeIF-4E, eIF-4Gを必要とするcap 依存的翻訳開始機構とeIF-4E, eIF-4Gの相互作用を必要としないIRES (internal ribosome entry sites)を介したcap 非依存的翻訳開始機構がある[Sachs, 2000]。ほとんどのmRNAの翻訳はcap 依存的であるが、HSPのmRNAはcap 非依存的にも翻訳開始できるとの報告がある[Joshi-Barve, 1992]。HSPの発現は転写のみならず、翻訳時にもストレス時に有利なように調節を受けていると考えられ、ストレス時には翻訳の効率も高くなっているかもしれない。

4-3. Hsp40の発現制御解析

4-3-1. ヒトおよびマウスHsp40遺伝子上流域の配列 (図17, 18, 19, 20)

ヒトHsp40遺伝子上流域の塩基配列を図17に示した。熱ショック遺伝子上流に必ず見いだされる熱ショックエレメント、HSEは5'-NGAAN-3'の基本単位が交互に逆向きに少なくとも3回連続してつながった配列として定義されて

いる [Perisic, et al., 1989]。さらにこの5bpモチーフの1番めの塩基はAまたはGである場合が多いとされる [Fernandes, et al., 1994; Cunniff, et al., 1993]。AGAANまたはGGAANのコンセンサスに従って塩基配列を調べると、ヒトHsp40遺伝子上流にはコンセンサスに11/12で一致する3個の5bpモチーフの単位が2組、10 bpを隔てて並んで見いだされた。(間の10 bpはコンセンサスに4/8と半分一致し、5bpモチーフが8個連なっているとも考えられる。)この上流域のHSE様配列を第1イントロンに見いだされたHSE配列と区別するため、p-HSEと表わした。p-HSEの下流約10 bpにTATA配列、p-HSEの上流には2つのGCボックス、逆向きのCAATボックス(ICE), AP-2, CREBなどの結合配列が存在する(図17)。ATGの上流の約300 bpはGC含量が高く78%を占める。GCの多い領域にはSp1のコンセンサス配列も多く存在した。ヒトHsp40のHSE配列は遺伝子上流域のほか、第1イントロン内にも見いだされた。第1イントロン内のHSE配列をi-HSEと表わす。i-HSEはコンセンサスに11/12で一致する3個の5 bpモチーフよりなっていた。

マウスHsp40遺伝子については上流の約700 bpの塩基配列を決定した(図18)。ATGの上流300 bp以内はヒトHsp40遺伝子の配列とよく類似しており70%の一致を示した。GC含量も高く70%を占める。TATA配列、HSE、GCボックス、CAATボックスなどのエレメントの配置もヒトとよく類似していた。また第1イントロンのHSE様配列も存在した。ヒトとマウスHsp40遺伝子のHSE配列を図19にまとめた。マウスプロモーター域のHSE様配列はそれぞれ3個の5 bpモチーフよりなる2組のHSEが8 bp隔てて連続して存在すると考えられる。図20にヒトおよびマウスHsp40遺伝子のプロモーター領域の構造を模式的に示した。また、マウスの主な熱ショック遺伝子のプロモーター領域の構造をも合わせて示した。TATA配列、HSE、Sp1部位は共通して存在し、CAATボックスや逆向きCAAT (ICE, inverted CAAT element) 配列もしばしばみうけられる。これらのエレメントの位置はそれぞれ異なっているが、翻訳領域よりほぼ300 bp以内に集まっており、多くの場合、HSEはTATA配列に隣接している。

```

-700  GCGCCCGGCCTGTTTGTAAATCTTAAATAGAAACGGAGTCTCCTTATGTT
      GCCTAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAGGATCAAGAGATCCTCCTGTCTTGGC
-600  CTCAGGAAGTGATGGGATTACAGGCATGAGGCTCCGCGCCCGGCCTGATA
      GATTCTCTTATTGCCATGTTGTAGATAGAAGGGGGCCCTGGGTTAGGCA
      c-Myc          GATA-1          AP-2
-500  GACACAGGTTAGGTAGTTCGTCCGGCGTCACCGGGCGGGAGCCCACCGCA
      GGCCCCACGAGACAAGGGCGAGCAGGTTTCATCGCCTCCCGGGGAAAGGAC
      CRE.1    Sp1          AP-2
-400  TGGGTAGTCCCAGGCCCCACCCCTTCCTGGAACAGCAAGTTCGCTGTGGG
      TCCCGACCTACTGACCCAGGCGGAGGGCGGGACGCAGGGTAGCTGGGGCC
      AP-2
-300  GCGTAGAGAGGGAAAGAAGGTTCGCGATTGGCTCGTCCCGAAAGGTGGGCG
      GGGCCTCCTCCGACCTGTGCGCGCGCGCCGCGGGGAGGTGTTGCCGAGGG
      ICE          GC
-200  CGGAGCGGGAGGGGGCGTGGCCCCGCGCGGGCGGCCGTTGACGGCGAGGC
      CCCGCCCCGGATGTCGCGTGTGCTGAAAGGGCGGCGGCGATTGGCCGGC
      GC          c-Myb
-100  GCCGCGGGGGCGGGCGGGGCGGAAGGTTCTGGAGGGGGCTGGCGGGCTCT
      GGAAGCTTCCGCCGGACGGGTATATAGAGTCCGGGACTGGTCGGCGGGCGG
      Sp1          HSE
      HSE          TATA
+1    AGCCGGGGGACGGCGACAGCGGGTTCGGCGGGCCGCAGGAGGGGGTTCATG
      ↓

```

図 17. ヒトHsp40遺伝子上流域の塩基配列

転写開始点 (ATGの上流47 bpにある主な転写開始点を矢印で表した) の上流700bpの塩基配列と主な転写調節因子結合配列を示した。

-720 AAAAAAATCACGCAGCCCTGGTGGTAAACTCAGACGGCAAAGGAAGTGACAAGTATCAGA
 ACGCCAAGAGGGCGAGCTAAACCCAGTAGGAATTAGTAGGAAGTAAGATAAACCGGAGAGG
 GATA-1

-600 CAGCCCGACTGCAGCAAGCCCAAGGCAGACCAGTCTCACCTCGCTTTACAGTAACGGCCT
 AP-2
 TACGGGAAAAACCAAGGGCTACGGGCAGAAGAGGGCGGGGTGCCTATTTTTATCCCTGGG
 Sp1

-480 TTAGAGCAGGAAAGCTTAGAGGTAAGTGTGTCAGGTAGCTACCACAAGTCACGCAGCAGAAC
 CTCCCAGCCGGCGATAACCTGGGGAAAGGGTGCGGCCTTTCGGAGAGGCCCGTCTCTGTA
 AP-2

-360 GCCCCGCCCTCTTCGCGCCTCCACCTGTCCGCAGAGAGAGAGGGTTGCGATTGGTTG
 AP-2 ICE
 GATCCGCTACGGAGGCGGAACCCAGCAGCCGGCGCGCGCGCCCGAGGAAGGCGTTGACC
 GC

-240 AGAGTAGAGAGGGAAGGGGCGTGGCCCCGCGCGGAAAGCCGTTGGCAGCCGGGTCCCACC
 GC c-Myb
 CCGGATGTGCTGCGTCACGGAGCGGGCCGCAGCGATTGGCCGGTGTGCGTGCGGCGCATCG
 CRE.1 ICE

-120 GGAGGGGCGGAAGGTTCTGGAGGGCTGGCGGGATCTGGAAGCTTCCGCCGGACGGGTATA
 HSE HSE TATA
 TAGAGTCCGGGACGGGGCAGCAGCGGAGCCGGAGGCGGCGACAGCTGGGCGGCGGTGGCC

+1 ATG

図 18 マウスHsp40遺伝子上流域

マウスHsp40遺伝子上流域約700bpの塩基配列、および主な転写因子モチーフの位置を示した。

A プロモーター域のHSE(p-HSE)配列

human GGGGC GGAAG GTTCT GGAGG GGGCT GGCGG GCTCT GGAAG CTTCC GCCGG
└──┘

mouse GGGGC GGAAG GTTCT GGAGG GCT GGCGG GATCT GGAAG CTTCC GCCGG
└──┘

B 第1イントロン内のHSE(i-HSE)配列

human CGGCC AGAAG CTTCT AGCAT GTCTG
└──┘

mouse GGCAC AGAAG CTTCT AGCAC GTCTG
└──┘

図 19. ヒトおよびマウスHsp40遺伝子のHSE配列

5 bp ユニットA/G GAAN のコンセンサスに一致する塩基を二重線で表した。

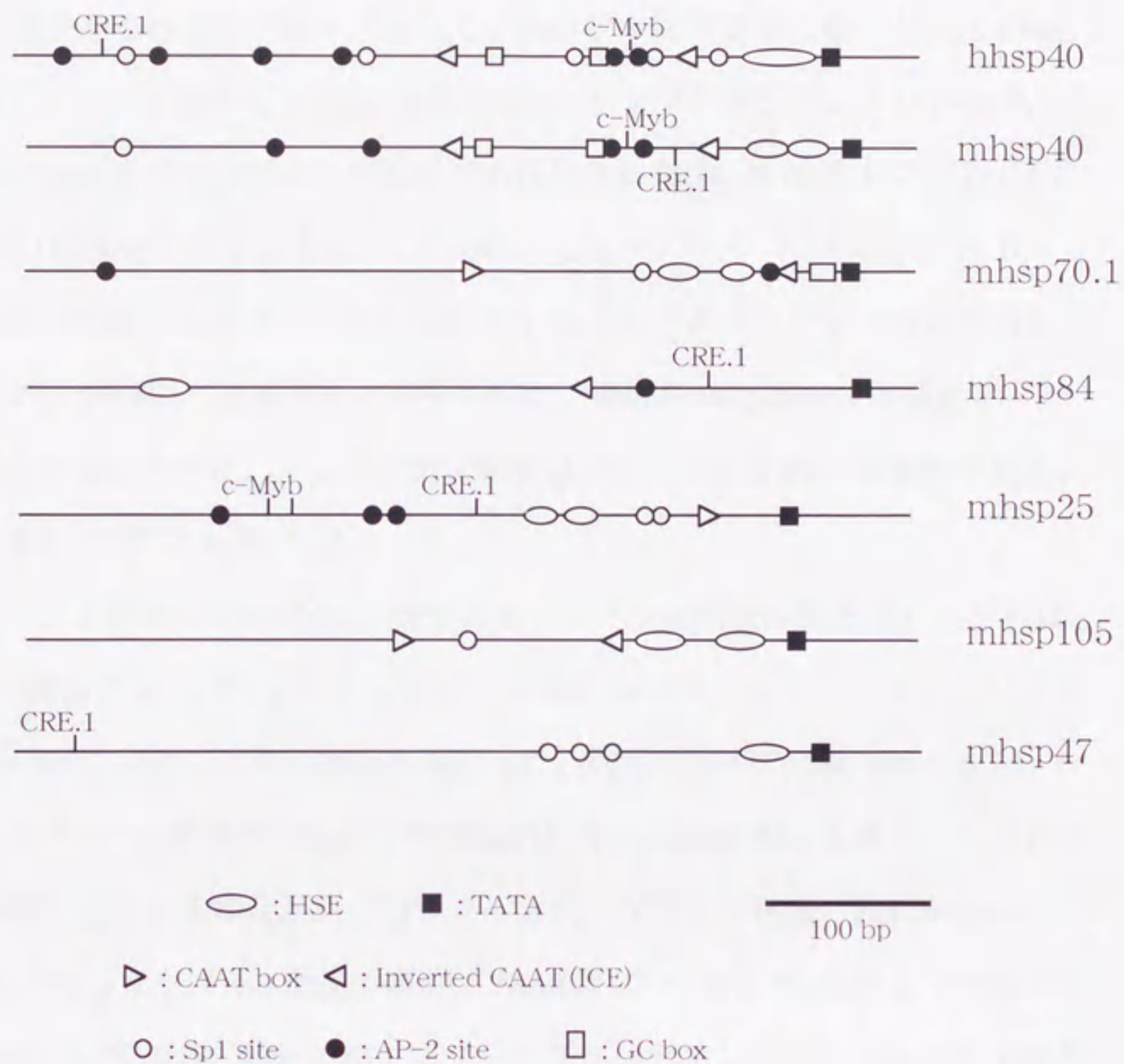


図 20. 熱ショック遺伝子のプロモーター域
 ヒトおよびマウスHsp40遺伝子と主なマウス熱ショック遺伝子のプロモーター域を比較した。
 TATA, HSE, Sp1, CAAT box, AP-2などが共通に存在する。

4-3-2. ヒト Hsp40 の HSE 配列の解析 (図21, 図22, 図23)

さらにヒト Hsp40 の HSE 様配列について詳しい解析をおこなった。まず、p-HSE, i-HSE をそれぞれプローブとしてゲルシフト解析をおこなった。その結果、熱ショック処理をした HeLa 細胞の extract でシフトするバンドが p-HSE, i-HSE のいずれをプローブとした場合でも検出された(図 21 A, B, 1, 2)。あらかじめ抗 HSF1 抗体を加えておくと、このバンドはスーパーシフトし(図 21 A, B, 3)、抗 HSF2 抗体ではシフトしない(図 21 A, B, 4)ことから、プローブに結合したタンパク質が HSF1 であることが示唆された。過剰の competitor で特異的にバンドが消失することから、タンパク質の結合はプローブの配列に特異的であることも示された(図 21 A, B, 5, 6)。

ゲルシフト解析では p-HSE, i-HSE ともタンパクの結合が検出され、それは抗 HSF-1 抗体でスーパーシフトしたが、さらに *in vivo* フットプリンティングにより *in vivo* でのタンパクの結合を確認した。図 22 に p-HSE 領域の *in vivo* フットプリンティングの結果を示した。Coding(A), Non-coding(B)とも熱ショックにより、DMS によるメチル化からプロテクトされたグアニン残基、逆に hyper-sensitive となったグアニン残基が検出された(図 22 A, B, hs30', hs60')。1 時間の熱処理の後、回復 30 分、60 分で徐々にフットプリンティングパターンに変化があり、回復 90 分では熱ショック前の状態にほぼ戻っていた(図 22 A, B, re30', re60', re90')。これらのプロテクトされたグアニン残基の領域は p-HSE の配列全域にわたっていた(図 22, C)。このことは HSF1 タンパク質が *in vivo* でも p-HSE 領域に結合し、その範囲は p-HSE 配列全域におよんでいることを示している。つまり、p-HSE 配列全域が HSF1 タンパク質の結合領域であり、1 つの HSE として機能していることを示唆している。

図 23 にはヒト i-HSE 領域の *in vivo* フットプリンティングの結果を示した。熱ショック前、加熱中、熱ショック後とフットプリンティングパターンに変化はなく、熱ショック時にはタンパクが結合していないことが示唆された(図 23, A,

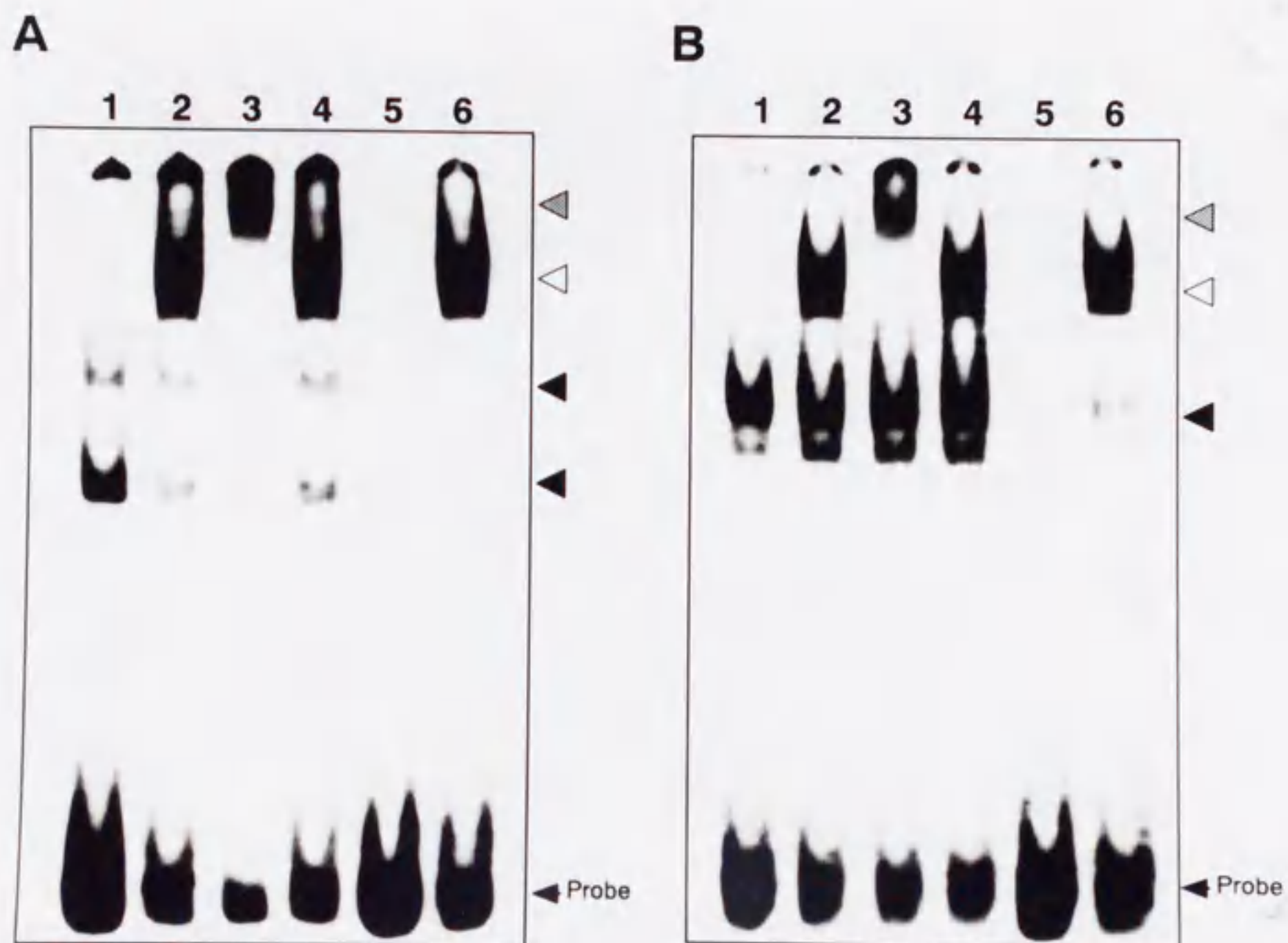


図 21. ゲルシフト解析

(A) ヒトp-HSE (-90 to -35); 5'-CGGGCGGGGGCGGAAGGTTCTGGAGGGGGCTGGGC
GGGCTCTGGAAGCTTCCGCCGGA-3' (B) ヒトi-HSEの配列 (+448 to +480); 5'-CCGCT
CGGCCAGAAGCTTCTAGCATGTCTGGGG-3'をプローブとした。

1. コントロールのHeLa細胞のextract、 2. 42°C 1 h の熱ショック処理
をした HeLa 細胞のextract、 3. 2. に抗HSF1抗体を加えたもの、 4. 2.
に抗HSF2抗体を加えたもの、 5. competitor としてcold のプローブを100
倍量過剰に加えたもの、 6. competitor として無関係のオリゴヌクレオチド
(GATA sequence)を加えたもの、タンパク質の結合によりシフトしたバンド
(◀)、さらに抗体の結合によりスーパーシフトしたバンド(◀)、non-
specific なバンド(◀)をそれぞれ示した。

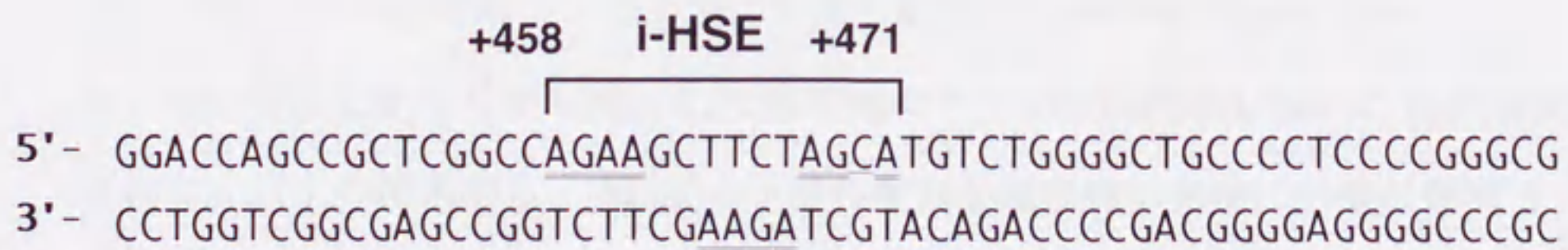
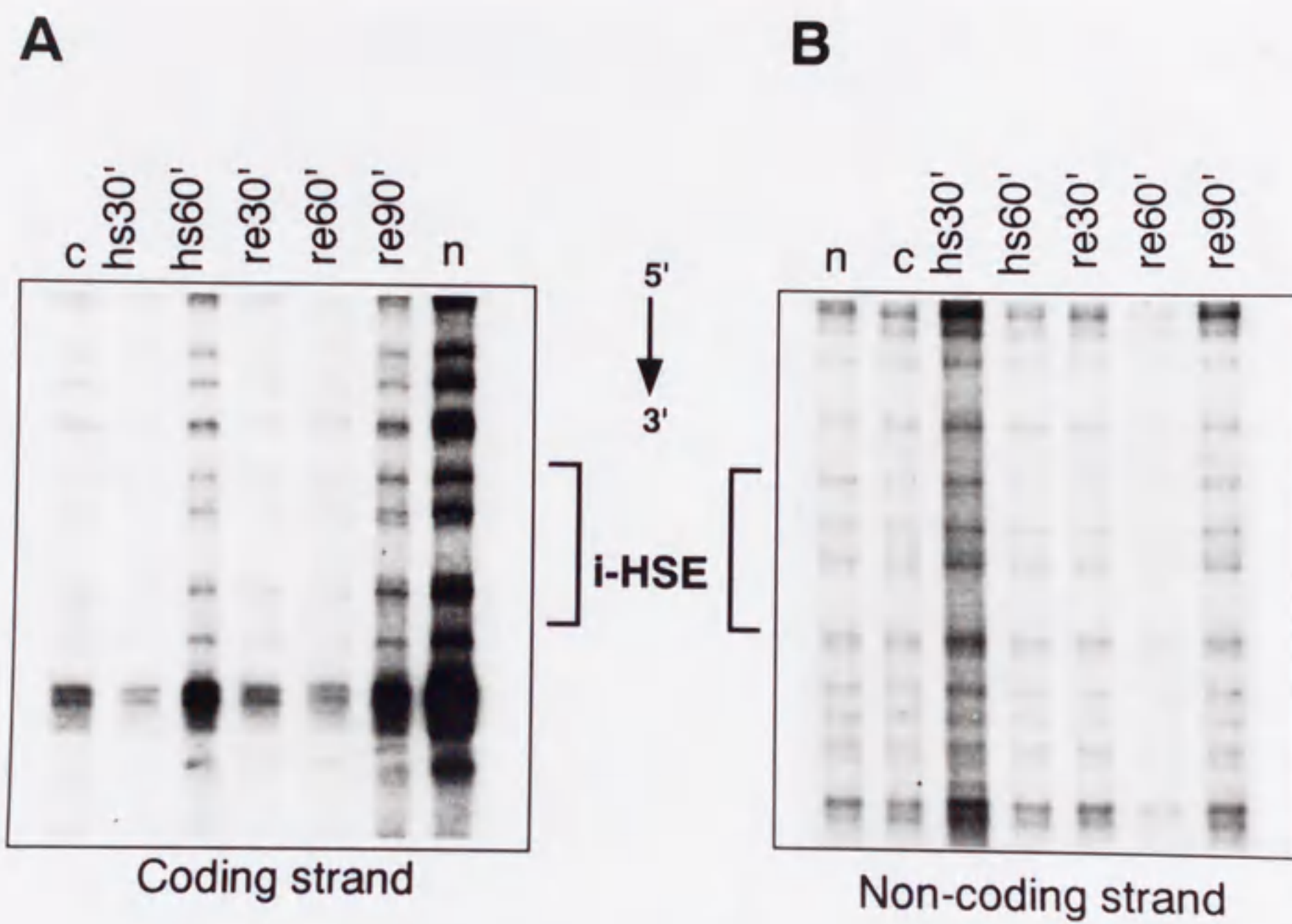


図 23. ヒトi-HSE領域のフットプリンティング解析

図 22の説明と同様である。加熱前と加熱中、加熱後と変化は認められなかった。

B)。すなわち、ゲルシフト実験で示されたようにi-HSEにはin vitroでのHSF1タンパク質の結合は認められたが、in vivoでは結合していないことが明らかとなった。

4-3-3. ヒトHsp40遺伝子のプロモーター活性 (図24)

ヒトHsp40遺伝子上流域のプロモーター活性をルシフェラーゼをレポーター遺伝子として検討した。図24Aに示したさまざまな5'領域をつないだレポーターコンストラクトをHeLa細胞に導入し、42°C, 1時間の熱ショック処理をしたものと比較して熱ショックによる誘導能についても調べた。図24A最上段のコンストラクトによるコントロールの活性を1とした相対活性で比較した。その結果、上流域の配列を-513まで除いてもコントロール、および熱ショック時の活性にはほとんど変化はなく、熱ショックによる活性の誘導はコントロールに比べて17倍以上の上昇が認められた。-277まで除くとコントロール、熱ショック時の活性がいくらか減少した。さらに-103まで除いてGCボックス、逆向きのCAATボックスを含む配列を除くと通常時の活性が大幅に低下したが(30%)、熱ショックによる誘導能は依然として残っており、約10倍上昇した。さらにp-HSE配列の一部を除くと熱ショックによる誘導能は消滅した。このp-HSE配列の一部を除いた-70のコンストラクトはそれでもなお5つの5 bpモチーフをもっている。しかしながら残った5つの5 bpモチーフでは機能しないことが示唆された。以上の結果から、-513から下流の配列が通常時の発現に必要な領域であり、さらにこれらの配列が欠けてもp-HSEの配列が無傷であれば依然として熱ショックによる誘導能はあったが、p-HSEの配列が一部でも欠けると熱による誘導能は消滅することがわかった。少なくとも-103より下流の配列、すなわちp-HSEを含む配列が熱ショックによる誘導に必須であることが示唆された。

次にi-HSEがHSEとして機能しているかどうか調べた。第1イントロンを含むヒトHsp40遺伝子部分をβ-ガラクトシダーゼにつないで融合遺伝子を構築し、β-ガラクトシダーゼの活性をi-HSEにin vitro mutagenesisで変異を導入したもの

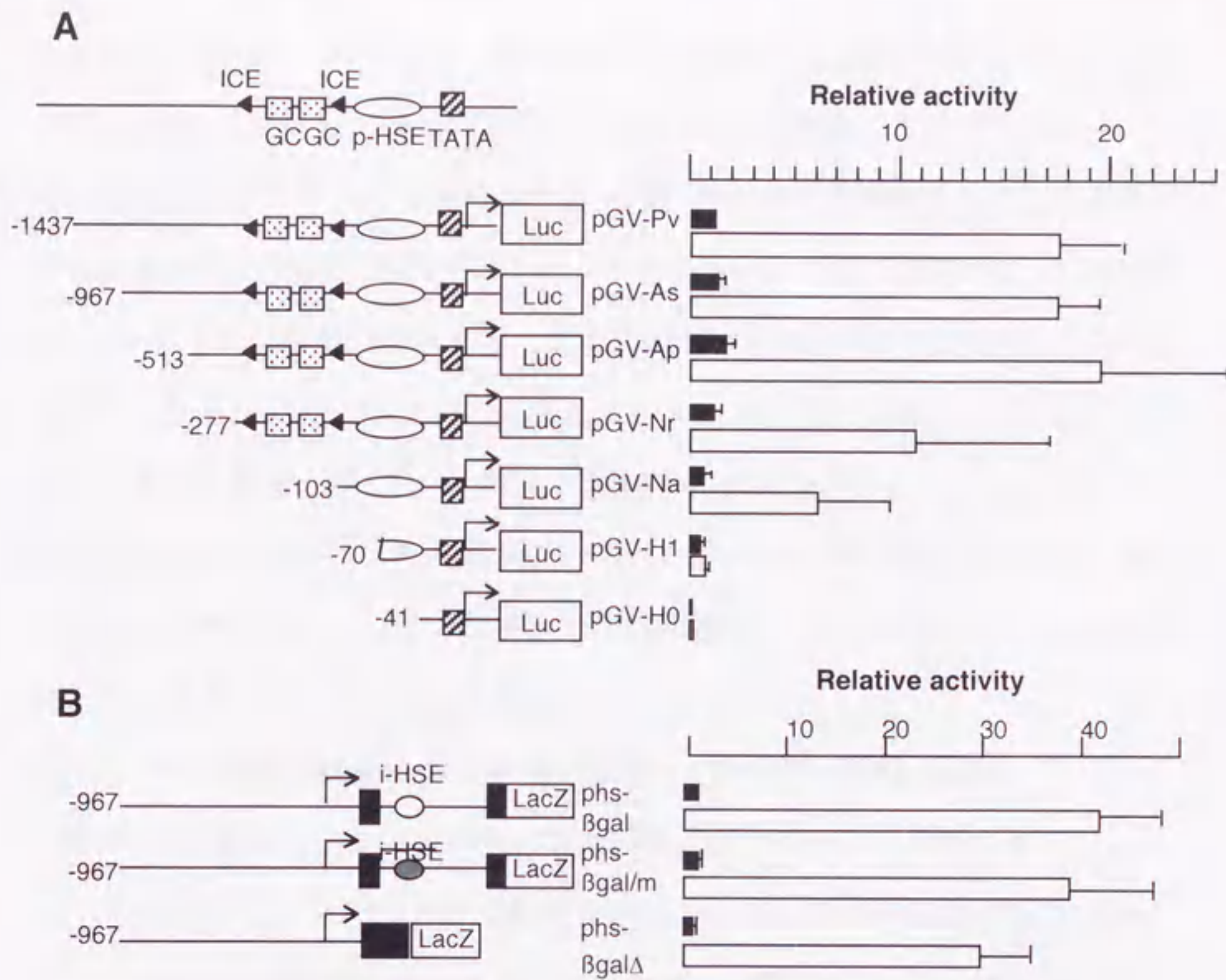


図 24. ヒトHsp40遺伝子のプロモーター解析

(A) 上流域のプロモーター活性をルシフェラーゼをレポーターとして調べた。それぞれ左に表したコンストラクトをHeLa細胞に導入し、42°C 1 hの熱ショック処理をした HeLa 細胞 (□) とコントロールの HeLa 細胞 (■) のルシフェラーゼ活性を調べた。活性は最上段のコンストラクトのコントロールの値を1とした相対活性で表した。

(○: HSE, ▨: TATA, ▣: GC box, ◀: ICE(inverted CAAT element))

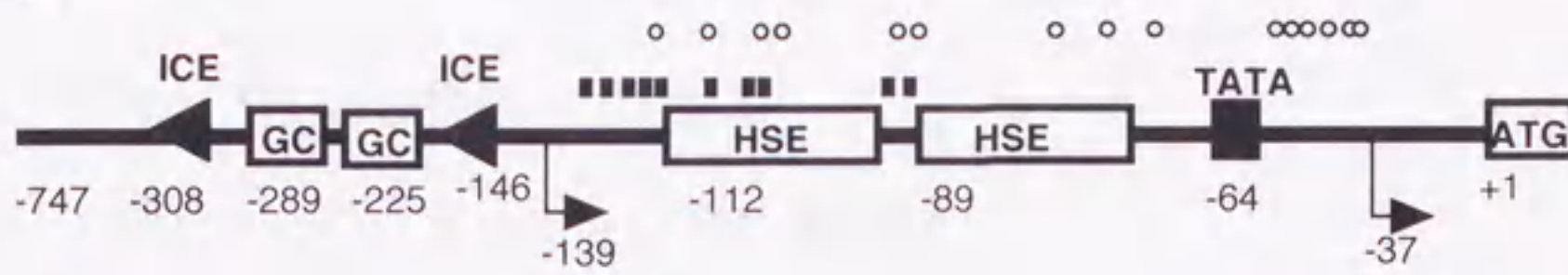
(B) i-HSEを含む第1イントロンをβ-ガラクトシダーゼレポーター遺伝子につなぎ、Hsp40との融合遺伝子を作製した。mutagenesisによりi-HSEの配列の一部を変えた (AGAAGCTTCTAGCA ⇌ AGACTAGTCTAGCA)もの (●)、第1イントロンを除いたもので、i-HSEおよび第1イントロンの影響を調べた。

と比較して調べた。その結果、活性にほとんど変わりはなく熱ショックの活性誘導にi-HSEは関与していないことが示唆された(図24B)。また第1イントロンを除いたコンストラクトではコントロール、熱ショック処理のものとも若干の活性の減少が認められたが(イントロンのあるものに対して約70%)、これは約1kbのイントロンの配列を除くことで生じた遺伝子構造の変化が影響している可能性もあるが、イントロン内にあるエレメントが発現制御に関与している可能性も考えられる。第1イントロンの前半部分はGC含量が高く、Sp1, AP-2などの転写制御コンセンサス配列も見受けられた。ICEもi-HSEの近傍に存在した。これらの配列が熱ショックの活性誘導には影響なくともbasalレベルの十分な活性化には関係しているかもしれない。

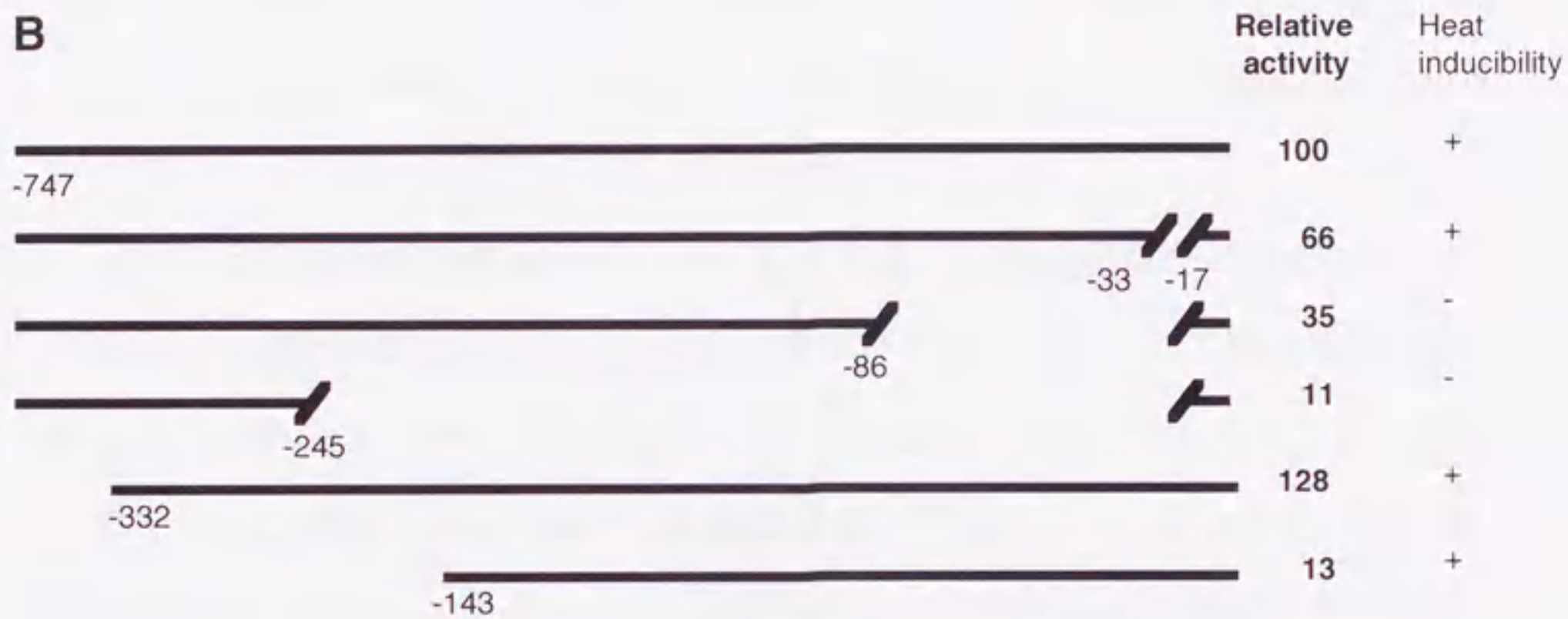
4-3-4. マウスHsp40遺伝子上流域のプロモーター活性 (図25)

マウスHsp40遺伝子上流域についても同様にプロモーター解析をおこなった。マウスではTATA上流から転写が開始される転写物が存在することから、下流域を欠失したコンストラクトを作成し、調べたところ、TATA下流、ATGの上流33 bpから17 bpを除くと相対活性が66%に減少した。さらにTATA配列を含む下流の配列を除いたコンストラクトで調べてみると、活性が35%に減少した。一方、上流域のGC、ICEなどのエレメントを含む領域を除くと相対活性が約10分の1にまで下がった(図25、最下段)。下流域だけを除いたものでは上流域を除いたものにくらべるとなお3倍近くの活性が残存していることになる。このことは上流域の配列がbasalのレベルの発現に最も重要であることを示唆している。また、-747から-332までの配列を除いたものでは逆に若干の活性の増加がみとめられた。ヒトの場合でも-513から上流域を除いたものでわずかに活性が増加していた(図24A)。この上流域はGC含量の高い下流域に対しては比較的ATに富んでいる。この領域に負に活性を制御する配列が存在する可能性も考えられる。なおHSE配列を除くとヒトの場合と同様、熱ショックによる活性の誘導が消失することも確認した。

A



B



- : testisのmRNAでマップされた5'末端
- : controlのNIH3T3細胞のmRNAでマップされた5'末端
- 37 : 熱ショック処理 NIH3T3細胞mRNA の主な転写開始点
- 139 : cDNAクローン#23cの5'末端

図 25. マウスHsp40遺伝子のプロモーター解析

(A) マウスHsp40遺伝子上流域の模式図を示した。数字は開始コドン (+1) とした相対位置を表す。(-139) はcDNAクローン#23cの5'末端である。(-37) は熱ショック処理したNIH3T3細胞のおもな転写開始点である。testisのmRNAでマップされた5'末端、コントロールのNIH3T3細胞でマップされた5'末端をそれぞれ記号で示した。

(B) 遺伝子上流域をルシフェラーゼのレポーター遺伝子につないでプロモーター活性を調べた。最上段のコンストラクトの活性を100とした相対活性で表した。熱による誘導が認められたものは (+) とした。

5. 考察

5-1. Hsp40遺伝子の構造

5-1-1. ヒト、マウスHsp40の類似性

マウスcDNAをクローニングし、塩基配列からマウスHsp40の一次構造を決定し、ヒトHsp40と比較した。その結果、塩基配列は90%、アミノ酸配列では95%が一致し、よく保存されていることがわかった。

高等生物のDnaJ相同体遺伝子については今までに報告がなかったが、著者らが初めてHsp40の遺伝子をヒトおよびマウスでクローニングして構造を明らかにした。ヒトおよびマウスに共通してHsp40の遺伝子は3つのエクソンより構成されていた。イントロン-エクソン構造は同一であり、イントロンで分断されている位置も共通していた。また、翻訳開始点から300 bpの上流域の配列もよく保存されている。このことから、Hsp40遺伝子はそのコードするタンパク質と共に、発現制御機構も進化の過程で強く保存されてきたと考えられる。

5-1-2. Jドメイン

ヒトおよびマウスのHsp40遺伝子では共通して第1エクソンがJドメインをコードしているという特徴をもっていた。このことは進化の過程でJドメインがエキソンシャッフリングによってさまざまな遺伝子にとりこまれてきたことを示唆している[de Souza et al., 1996]。実際、Jドメインを持つタンパク質は多岐にわたり、SV40ウイルスのlarge Tおよびsmall T抗原にもJドメインがある[Srinivasan et al., 1997]。

高等生物のDnaJ相同因子は著者らが同定したHsp40が初めてであったが、最近、新たにHsp40-3が同定された[Chen et al., 1999]。Hsp40-3は恒常的にも高いレベルで発現しており、熱ショックによっていくらかの増加がみられ、その発現パターンがHsc70と似ている。このことから、Hsc70に対応するHsc40であると考えられる。Hsp40-3のアミノ酸配列はHsp40によく類似しており、62%と高

い相同性が認められる。Hsp40-3の遺伝子は全長約10 kbにおよびHsp40に比べるとかなり大きく、イントロンの数も多い。ところが、その一部の構造はHsp40遺伝子と類似していた。Hsp40の第2と第3エクソンがHsp40-3の第4と第5エクソンの対応する位置と一致していた。このことから、Hsp40とHsp40-3は遺伝子重複により生じたもので、変異により、新たな遺伝子制御域を獲得して、別の遺伝子として進化していったものと考えられる。Hsp40-3のJドメインは第3エクソンにコードされており(第1, 2エクソンは翻訳領域を含まない)、Jドメインはイントロンによって他のドメインと分断されているのはHsp40と同様である。

5-1-3. Hsp40遺伝子のイントロン

Hsp70はイントロンがないことで知られている [Hunt and Morimoto, 1985]が、熱ショックによりスプライシングが阻害されることから、イントロンがないことは好都合であると考えられている [Yost and Lindquist, 1986]。しかし、Hsp90など他のHsp遺伝子はいずれも一般の遺伝子同様多くのイントロンで分断されている。熱ショックによって阻害されるスプライシングはHsp70とHSP104の共働的作用によって修復されうることが示されている [Vogel et al., 1995]。したがってイントロンを含むHsp遺伝子の発現はこのようなスプライシングを介助する分子シャペロンに依存しているのかもしれない。

熱ショックや他のさまざまなストレスによって誘導されるHsp70とHsp40の発現をノザン解析で経時的に調べてみると、Hsp70とHsp40の発現経過はほぼ同様であった [Sugito and Hata, unpublished data; Mori et al., 1999]。このことから熱ショックのスプライシングへの影響は実際にはさほど受けていないように思われる。Hsp40遺伝子はイントロンを持つにせよ、数も少なく単純な構造である。Hsp40もHsp70と同様に熱ショック時にすばやく転写、翻訳を開始するためにイントロンの少ない単純な構造が必要とされているのかも知れない。

5-1-4. 偽遺伝子

ヒトではHsp40の偽遺伝子を同定した。イントロンがなく、ポリ(A)配列をも

ち、多くの変異を含み、さらに5' および3' 末端のdirect repeatを含むことからプロセス型偽遺伝子である。プロセス型偽遺伝子はmRNAの逆転写とcDNAのゲノムへの挿入によって発生すると考えられている[Hollis, 1982]。一方、マウスはサザン解析で単一のシグナルを検出した(data not shown)ことから、単一の遺伝子であって、偽遺伝子は存在しない。偽遺伝子が発生したのはマウス、ヒトの種分化の後であると判断される。

5-2. Hsp40遺伝子の発現

5-2-1. ヒト、マウスHsp40mRNAの種類

マウス、ヒトとも2.4 kbと1.4 kbの転写物が見い出されたが、これらは 3' RACE 解析によりポリ(A)付加部位の違いによるものであることがわかった。ポリ(A)付加部位はマウス、ヒトとも同様な位置にあり、終止コドンの約150 bpと1 kb下流に見い出された。

一方、転写物の5' 末端についてはヒトとマウスでは違いがあり、ヒトでは1種の転写開始点であったのに対し、マウスでは少なくとも2種の転写開始点が発見された。マウスでは恒常的に発現している転写物と熱ショック時に発現している転写物で転写開始点の違いが見られ、恒常的に発現している転写物ではTATA配列の上流から転写が開始されているものが大部分であった。熱ショック時にはTATA配列の下流に開始点がある。ヒトではHeLa細胞と発現の高かった肺のmRNAで調べてみたが、このような違いは認められなかった。しかしながら、processed pseudogeneの塩基配列には転写開始点やTATA配列を含む上流の配列と相同な配列(図7)があり、processed pseudogeneが発生した時点では、TATA上流から転写が開始される転写物が存在していたことを示唆している。その後、進化の過程で変異により異なる転写制御域をもつようになっていったと考えられる。

5-2-2. ヒト、マウスHsp40の組織での発現

組織での発現パターンについてもヒト、マウスで違いが見られた。ヒト、マ

ウスとも精巣での発現が高いが、マウスでは他の組織での発現はそれほど高くないのに対し、ヒトでは全般に高い発現がみられ特に肺の発現が顕著であった。

Hsp40の発現はマウス、ヒトとも精巣で高かった。精巣での発現が高いHsp40/DnaJ 相同体にはMsj1 [Berruti et al., 1998]、Hsj2 [Pei, 1999]が報告されている。Hsp40とのアミノ酸配列の一致性ではそれぞれ31% (Msj1)と 32% (Hsj2)であった。HSF2は血液細胞の分化の際に発現しているが、マウスの精巣でも発現していることが報告されている[Sarge et al., 1994]。そこでHsp40のマウスの精巣の高発現にHSF2が関与している可能性を調べるため、Hsp40のHSEをプローブにゲルシフト解析をしたが、HSEに結合するタンパク質はマウスの精巣中には検出できなかった。マウスの精巣で発現しているHsp40 mRNAは多くがTATA, HSE上流から転写が開始されていたため、HSEを介さない転写制御機構が働いていると考えられる。つまりマウスの精巣での発現はHSF2ではなく別の制御因子により、制御されているものと思われる。

5-2-3. Hsp40のストレスによる発現

ヒト、マウスともHsp40の発現は熱によって顕著に誘導された。ヒトHsp40ではそのほか、ヒ素、エタノール、アゼチジンカルボン酸などによっても発現が誘導されるのを確認している。これらの誘導パターンはHsp70とよく似ていた[Mori et al., 1999]。細胞内ではHsp40はHsp70と共に局在し、熱ショック時にも同時に細胞質から核へと移動していることが免疫染色で明らかにされているが[Hattori et al., 1993]、環境ストレスに対してHsp40はHsp70と同様に対応していることが示唆される。

5-3. Hsp40の熱ショックによる発現調節

5-3-1. 調節領域の塩基配列とHSE

調節領域の塩基配列はヒト、マウスで類似していた。調節領域にはHSE, GCbox, ICE など他のHsp遺伝子にも共通の元素が存在したが、それらの

並び方はHsp40に特異的である(図20)。HSEはTATAのすぐ上流にあり、GCbox, ICEがさらにその上流に存在する。Hsp40遺伝子上流は他のHsp遺伝子に比べてもGC含量が高く(特にヒト), Sp1, AP-2 sites が多く見られる。

真核細胞の熱ショック遺伝子のプロモーター領域には熱ショックエレメント(HSE)と呼ばれる共通の塩基配列が存在するが、Hsp40にもプロモーター領域にHSEの配列(p-HSE)がみられた。プロモーター領域についてレポーターアッセイをおこない、p-HSE配列全域が熱ショック時の転写誘導に必須であることを証明した。またゲルシフト解析により熱ショック時にはHSF-1が結合していることがわかった。p-HSEはその配列から3つの5 bpモチーフ(5'-G/AGAAN-3')よりなる単位2組が10 bpを挟んで存在すると考えられるが、in vivo フットプリンティングの結果から、間の10 bpを含めた全域にわたって、タンパクの結合が示唆された。また、この領域の部分欠失により熱ショック誘導能が消失することから、全体として1つのHSEとして機能していると考えられる。以上のように、p-HSEは熱ショック時の転写誘導に必須であり、熱ショックの際にはHSF1が結合していることから、HSEとして機能していることが証明された。

5-3-2. イントロン内のHSE様配列

Hsp40遺伝子の第1イントロンにはHSE様配列が存在したが、Hsp27, Hsp90遺伝子の第1イントロンにもHSE配列が存在している[Uoshima et al. 1993; Rebbe et al., 1989]。Hsp27のイントロンHSEについて最近報告があった[Cooper et al., 2000]。それによればイントロンHSEをCATレポーター遺伝子の下流につないでプロモーター活性への影響を調べたところ、活性の減少がみられたという。プロモーターHSEとHSFを競合している可能性もあるのではないかと考えられる。Hsp27のイントロンHSEは1つであるが、Hsp90 β では3つもあり、プロモーター域にあるHSEよりもHSFに対する親和性が高く、熱ショックおよびbasalの活性に必須の役割を果たしていることが明らかにされている[Shen et al., 1997]。Hsp90遺伝子の第1エクソンは非翻訳域であり、第2エクソンの始まりか

らATGをコードしているという特異な構造となっており、熱ショックで誘導された転写物は第1イントロンに転写開始点をもつ転写物が主であることが示唆されている。

ヒトHsp40遺伝子第1イントロン内のHSE様配列 (i-HSE) について、詳しい解析を試みた。i-HSEのゲルシフト解析ではHSF-1が結合した。しかしレポーターアッセイではi-HSEは熱ショック時の発現には必要でないという結果が得られ、in vivo フットプリンティングでも熱ショック時のi-HSEへのタンパクの結合は認められなかった。Hsp40のi-HSEはHSEとして機能していないことが判明した。

5-3-3. basal レベルの発現

遺伝子上流域には、TATA, ICE(inverted CAAT element), GCなどの配列が、ATGから300 bp以内の領域に存在した。レポーターアッセイにより、basalの活性にはICE, GCを含む領域が必要であることが示唆された。ICEはHsp70などのHsp遺伝子上流に見い出されているほか、topoll α 遺伝子にも存在する。topoll α 遺伝子のICEには熱ショックによる転写誘導を負に制御する因子が結合することが示唆されている[Furukawa et al, 1998]。しかしHsp40遺伝子上のICE配列部分のin vivo footprintingのパターンは熱ショック前と熱ショック時とに変化はみられない。プロモーター解析でもこの配列域が除かれても熱ショック誘導は生じた。しかしながら、basalの発現が低下しており、basalレベルの発現維持に必要であると考えられる。

一方、i-HSEの活性を調べる目的でおこなったレポーターアッセイの結果、第1イントロンを除いたものではbasalの発現が低下している。イントロン内の配列がbasalレベルの発現維持に関与していると考えられる。

5-4. ヒト、マウスHsp40遺伝子の発現制御の進化

マウスでは熱ショック時にはTATA 依存的に転写を開始するのに対し、恒常的な発現時には主にTATA上流に転写開始点がある。ヒトではこのような差異

は認められず、TATA 依存的のみと考えられるが、かつてはマウスと同様、TATA上流に転写開始点がある転写物が存在していたことを示す証拠が、偽遺伝子の塩基配列上に残っていた。偽遺伝子が発生した時点においてはヒトにおいても同様であったが、その後の進化の過程で転写制御域に変化が生じたと考えられる。

さらに組織での発現パターンでもヒト、マウスでは違いが見られた。ヒト、マウスともHsp40のアミノ酸レベルでは95%と酷似したタンパク質であり、しかも遺伝子構造は同一であるのに発現レベルで違いがみられるのはひとつには発現制御領域の違いと考えられる。ヒトおよびマウスの遺伝子上流300 bp以内の塩基配列は約70%が一致するほど保存されていたが300 bp以上の領域はヒト、マウスでの保存されておらず、この領域がヒトとマウスの発現制御の違いに関わると考えられる。

このような発現制御の違いを説明するひとつの仮説として、マウス遺伝子上流域にTATA 依存的転写開始を抑制するとともに上流の転写開始点を制御している領域が存在すると考える。ヒトでもかつては同じように制御されていたが、上流域が他に置き換えられ、上流からの転写開始点がなくなると共に組織ごとの発現のパターンが変化したと考えられる。TATA上流域からの転写産物の方がTATA下流域からの転写産物に比べてより高い翻訳活性を示すが、ヒトでこの領域が失われたことを補償するために各組織での発現レベルを高める必要があったのかもしれない。しかし、Hsp40-3など主に定常時に発現される相同遺伝子も存在する。今後は、このような遺伝子の発現制御を含めてヒトとマウスで比較することにより、定常時におけるHsp40遺伝子の両種における違いの意義を説明することができるであろう。また一方で熱ショックに応答する領域は両方で保存され続けてきたことも明らかになった。

6. 謝辞

本研究の御支援、御指導を頂きました大塚健三先生（愛知県がんセンター研究所）に深く感謝いたします。分子生物学の御指導ならびに本稿の作製にあたり御助言頂きました西田育巧先生（名古屋大学理学部）に深く感謝いたします。ヒトゲノムライブラリーを御供与頂きました瀬戸加大先生（愛知県がんセンター研究所）に感謝いたします。研究の過程でさまざまに御協力いただきました石崎寛司部長をはじめ愛知県がんセンター研究所の皆様感謝いたします。

7. 文献

- Amin, J., Ananthan, J. and Voellmy, R. (1988) Key feature of heat shock regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3761-3769.
- Andres, D.A., Shao, H., Crick, D.C., Finlin, B.S. (1997) Expression cloning of a novel farnesylated protein, RDJ2, encoding a DnaJ protein homologue. *Arch Biochem Biophys.* 364: 113-124.
- Auger, I., and Roudier, J. (1997) A function for the QKRAA amino acid motif: mediating binding of DnaJ to DnaK. Implications for the association of rheumatoid arthritis with HLA-DR4. *J. Clin. Invest.* 99: 1818-1822.
- Bardwell, J.C. and Craig, E.A. (1984) Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 848-852.
- Berruti, G., Perego, L., Borgonovo, B., and Martegani, E. (1998) MSJ-1, a new member of the *dnaJ* family of proteins, is a male germ cell-specific gene product. *Exp. Cell Res.* 239: 430-441.
- Bork P., Sander C., Valencia A., and Bukau B. (1992) A module of the DnaJ heat shock proteins found in malaria parasites. *Trends Biochem. Sci* 17: 129.
- Braun, J.E.A., Wilbanks, S.M., Scheller, R.M. (1996) The cysteine string secretory vesicle protein activates Hsc70 ATPase. *J. Biol.Chem.* 271: 25989-25993.
- Cheetham, M.E., Brion, J.P., and Anderton, B.H. (1992) Human homologues of the bacterial heat-shock protein *dnaJ* are preferentially expressed in neurons. *Biochem. J.* 284: 469-476.
- Cheetham, M.E., Jackson, A.P., and Anderton, B.H. (1994) Regulation of 70-kDa heat-shock-protein ATPase activity and substrate binding by human DnaJ-like proteins, HSI1a and HSI1b. *Eur. J. Biochem.* 226: 99-107.
- Cheetham, M.E. and Caplan, A.J. (1998) Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress & Chaperones* 3: 28-36.
- Chellaiah, A., Davis, A., and Mohanakumar, T. (1993) Cloning of a unique human homologue of the *Escherichia coli* DNAJ heat shock protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1174: 111-113.
- Chen, M-S., Roti, J. R., and Laszlo, A. (1999) Hsc40, a new member of the hsp40 family, exhibits similar expression profile to that of hsc70 in mammalian cells. *Gene* 238: 333-341.
- Chernoff, Y.O., Linqvist, S.L., Ono, B., Inge-Vechtomov S.G., and Liebman S.W.

- (1995) Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+]. *Science* 12: 880-884.
- Cooper, L.E., Uoshima, K., and Guo, Z. (2000) Transcriptional regulation involving the intronic heat shock element of the rat hsp27 gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1490: 348-354.
- Cummings, C.J., Mancini, M.A., Antalffy, B., DeFranco, D.B., Orr, H.T., Zoghbi, H.Y. (1998) Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat. Genet.* 19: 1048-154.
- Cunniff, N.F.A. and Morgan, W.D. (1993) Analysis of heat shock element recognition by saturation mutagenesis of the human hsp70.1 gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 268: 8317-8324.
- de Souza, S.J., Long, M., and Gilbert, W. (1996) Introns and gene evolution. *Genes Cells* 1: 493-505.
- Fernandes, M., Xiao, H. and Lis, J.T. (1994a) Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor-heat shock element interactions. *Nucleic. Acids. Res.* 22: 167-173.
- Fernandes, M., O'Brien, T.O., and Lis, J.T. (1994b) Structure and regulation of heat shock gene promoters. in *The Biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 375-393.
- Freeman, B.C. and Morimoto, R.I. (1996) The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO. J.* 15: 2969-2979.
- Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K., and Hartl, F. U. (1994) Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 117:111-117.
- Frydman, J., and Hohfeld, J. (1997) Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends in Biochem. Sci.* 22: 87-92.
- Furukawa, M., Uchiumi, T., Nomoto, M., Takano, H., Morimoto, R.I., Naito, S., Kuwano, M., and Kohno, K. (1998) The role of an inverted CCAAT element in transcriptional activation of the human DNA topoisomeraseII α gene by heat shock. *J. Biol.Chem.* 273: 10550-10555.
- Georgopoulos, C. (1992) The emergence of the chaperone machine. *Trends Biochem. Sci.* 17: 295-299.
- Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-580.

Hata, M., Okumura, K., Seto, M., and Ohtsuka, K. (1996) Genomic cloning of a human heat shock protein 40 (Hsp40) gene (HSPF1) and its chromosomal localization to 19p13.2. *Genomics* 38: 446-449.

Hata, M. and Ohtsuka, K. (1998) Characterization of HSE sequences in human Hsp40 gene: structural and promoter analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1397: 43-55.

Hata, M., and Ohtsuka, K. (2000a) Cloning and expression of murine Hsp40 gene: Differences in initiation sites between heat-induced and constitutive transcripts. DNA sequence. in press.

Hata, M., and Ohtsuka, K. (2000b) Murine cDNA encoding a novel type I HSP40/DNAJ homolog, mmDjA4. *Biochim. Biophys. Acta* 1493: 208-210.

Hattori, H., Kaneda, T., Lokeshwar, B., Laszlo, A., and Ohtsuka, K. (1993) A stress inducible 40-kDa protein (hsp40): purification by modified two-dimensional gel electrophoresis and co-localization with hsc70 (p73) in heat-shocked HeLa cells. *J. Cell. Sci.* 104: 629-638.

Hattori, H., Liu, Y.C., Tohnai, I., Ueda, M., Kaneda, T., Kobayashi, K., and Ohtsuka, K. (1992) Intracellular localization and partial amino acid sequence of a stress-inducible 40 kDa protein in HeLa cells. *Cell Struct. Funct.* 17: 77-86.

Hendrick, J.P. and Hartl, F.U. (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 349-384.

Hoe, K.L., Won, M., Chung, K.S., Jang, Y.J., Lee, S.B., Kim, D.U., Lee, J.W., Yun, J.H., and Yoo, H.S. (1998) Isolation of a new member of dnaJ-like heat shock protein 40 (hsp40) from human liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1383: 4-8.

Hohfeld, J., Minami, Y., and Hartl, F.U. (1995) Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 83: 589-598

Hohfeld, J., and Jentsch, S. (1997) GrpE-like regulation of the Hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J.* 16: 6209-6216.

Hollis, G.F., Hieter, P.A., McBride, O.W., Swan, D., and Leder, P. (1982) Processed genes: a dispersed human immunoglobulin gene bearing evidence of RNA-type processing. *Nature* 296: 321-325.

Hughs, R., Chan, Y. E., White, R. A., and Zon, L. I. (1995) Cloning and chromosomal localization of mouse cDNA with homology to the *Saccharomyces cerevisiae* gene Zuotin. *Genomics* 29:546-550.

Hunt, C., and Morimoto, R. I. (1985) Conserved features of eukaryotic *hsp70* genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6455-6459.

Hunter, P.J., Swanson, B.J., Haendel, M.A., Lyons, G.E., and Cross, J.C. (1999) Mrj encodes a DnaJ-related co-chaperone that is essential for murine placental development. *Development* 126: 1247-1258.

Jiang, R.F., Greener, T., Barouch, W., Greene, L., Eisenberg, E. (1997) Interaction of auxilin with the molecular chaperone, Hsc70. *J. Biol. Chem.* 272: 6141-6145.

Jeoung, D.I., Chen, S., Windsor, J., and Pollack R.E. (1991) Human major HSP70 protein complements the localization and functional defects of cytoplasmic mutant SV40T antigen in Swiss 3T3 mouse fibroblast cells. *Genes. Dev.* 5: 2235-2244.

Joshi-Barve, S., De Benedetti, A., and Rhoads, R.E. (1992) Preferential translation of heat shock mRNAs in HeLa cells deficient in protein synthesis initiation factors eIF-4E and eIF-4 gamma. *J. Biol. Chem.* 267: 21038-21043.

Kaneko, R., Hattori, H., Hayashi, Y., Tohnai, I., Udeda, M., Ohtsuka K. (1995) Heat-shock protein 40, a novel predictor of thermotolerance in murine cells. *Rad. Res.* 142: 91-97.

Kelley, W.L. (1998) The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem. Sci.* 23: 222-227.

Kimura, E., Enns, R.E., Alcaraz, J.E., Arboleda, J., Slamon, D.J., and Howell, S.B. (1993) Correlation of the survival of ovarian cancer patients with mRNA expression of the 60-kDa heat shock protein HSP60. *J. Clin. Oncol.* 11: 891-898.

Kobayashi Y, Kume A, Li M, Doyu M, Hata M, Ohtsuka K, Sobue G. (2000) Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem.* 275:8772-8778.

Kurzik-Dumke, U., Debes, A., Kaymer, M., Dienes, P. (1998) Mitochondrial localization and temporal expression of the *Drosophila melanogaster* DnaJ homologous tumor suppressor Tid56. *Cell Stress Chap.* 3: 12-27.

Laszlo, A., and Li, G.C. (1985) Heat resistant variants of chinese hamster fibroblasts altered in expression of heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. USA.* 82: 8029-8033.

Lee, T.G., Tang, N., Thompson, S., Miller, J., and Katze, M.G. (1994) The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins. *Mol. Cell Biol.* 14: 2331-2342.

Leng, C.H., Brodsky, J.L., Wang, C. (1998) Isolation and characterization of a DnaJ-like protein in rats: the C-terminal 10-kDa domain of hsc70 is not essential for stimulating the ATP-hydrolytic activity of hsc70 by a DnaJ-like protein. *Protein Sci.* 7: 1186-1194.

Li, G.C., Li, L., Liu, Y.-K., Mak, J.Y., Chen, L., and Lee, W.M.F. (1991) Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70 kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc. Natl. Acad. USA.* 88: 1681-1685.

Lindquist, S. and Craig, E.A. (1988) The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-677.

Melville, M.W., Hansen, W.J., Freeman, B.C., Welch, W.J. and Katze, M.G. (1997) The molecular chaperone hsp40 regulates the activity of p58IPK, the cellular inhibitor of PKR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 97-102.

Mestril, R., Chi, S.H., Sayen, M.R., and Dillmann, W.H. (1994) Isolation of a novel inducible rat heat-shock protein (HSP70) gene and its expression during ischaemia/hypoxia and heat shock. *Biochem.J.* 298:561-569.

Michels, A.A., Kanon, B., Konings, A.W.T., Ohtsuka, K., Bensaude, O., and Kampinga, H.H. (1997) Hsp70 and Hsp40 chaperone activities in the cytoplasm and the nucleus of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272: 33283-33289.

Minami, Y., Hohfeld, J., Ohtsuka, K., and Hartl, F.U. (1996) Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J. Biol. Chem.* 271: 19617-19624.

Mori, T., Sugito, K., Hata, M., Tohnai, I., Hayashi, Y., Ueda, M., and Ohtsuka, K. (1999) Mammalian Hsp70 and Hsp40: characteristic induction by environmental stresses and tissue specific expression. *Jpn. J. Hyperthermic. Oncol.* 15: 21-29.

Morimoto, R.I., Sarge, K.D. and Abravaya, K. (1992) Transcriptional regulation of heat shock genes. *J. Bio. Chem.* 267: 21987-21990.

Morimoto, R.I. (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Dev.* 12: 3788-3796.

Mosser, D.D., Theorakis, N.G. and Morimoto, R.I. (1988) Coordinate changes in heat shock element-binding activity and HSP70 gene transcription rates in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 8: 4736-4744.

Mueller, P.R., Garrity, P.A. and Wold, B. (1992) *Current Protocols in Molecular Biology*, Suppl. 20, 15.5.1-26. Greene Publishing Associate and Wiley-Interscience, NY.

Murthy A.E., Bernards, A., Church, D., Wasmuth, J., Gusella, J.F. (1996) Identification and characterization of two novel tetratricopeptide repeat-containing genes. *DNA Cell Biol.* 15: 727-735.

Nakai, A., Kawazoe, Y., Tanabe, M., Nagata, K. and Morimoto, R.I. The DNA-Binding properties of two heat shock factors, HSF1 and HSF3, are induced in the avian

erthroblast cell line HD6. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15: 5268-5278.

Nakai, A., Tanabe, M., Kawazoe, Y., Inazawa, J., Morimoto, R.I. and Nagata, K. (1997) HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* 17: 469-481.

Oh, S., Iwahori, A., and Kato, S. (1993) Human cDNA encoding dnaJ protein homologue. *Biochim. Biophys. Acta* 1174: 114-116.

Ohtsuka, K., Masuda, A., Nakai, A., and Nagata, K. (1990) A novel 40 kDa protein induced by heat shock and other stresses in mammalian and avian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 642-647.

Ohtsuka, K. (1993) Cloning of a cDNA for heat-shock protein hsp40, a human homologue of bacterial DnaJ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 235-240.

Ohtsuka, K. and Hata, M. (2000) Mammalian HSP40/DNAJ homologs: cloning of novel cDNAs and a proposal for their classification and nomenclature. *Cell Stress & Chaperones* 5: 98-112.

Pei, L. (1999) Pituitary tumor-transforming gene protein associates with ribosomal protein S10 and a novel human homologue of DnaJ in testicular cells. *J. Biol. Chem.* 274: 3151-3158.

Pellecchia, M., Szyperski, T., Wall, D., Georgopoulos, C., and Wuthrich, K. (1996) NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the Escherichia coli DnaJ chaperone. *J. Mol. Biol.* 260: 236-250.

Perisic, O., Xiao, H., and Lis, J.T. (1989) Stable binding of Drosophila heat shock factor to head-to-head and tail- to tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit. *Cell* 59: 797-806

Qian, Y.Q., Patel, D., Hartl, F. -U., and McColl, D.J. (1996) Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ1) J-domain. *J. Mol. Biol.* 260: 224-235.

Rabindran, S.K., Giorgi, G., Clos, J., and Wu, C. (1991) Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 6906-6910.

Rabindran, S.K., Haroun, R.I., Clos, J., Wisniewski, J., and Wu, C. (1993) Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* 259: 230-234.

Rabbe, T., and Manley, J.L. (1991) A human homologue of the Escherichia coli DnaJ heat-shock protein. *Nucl. Acids. Res.* 19: 6645.

Rassow, J., Voos, W., Pfanner, N. (1995) Partner proteins determine multiple functions of Hsp70. *Trends Cell Biol.* 5: 207-212.

- Rowley, N., Prip-Buus, C., Westermann, B., Schwarz, E., Barrell, B., Neupert, W. (1994) Mdj 1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell* 77: 249-259.
- Royaux, I., Minner, F., Goffinet, A.M., Lambert, R.C. (1998) A DnaJ-like gene, Hsj2, maps to mouse chromosome 5, at approximately 24cM from the centromere. *Genomics* 53: 415.
- Sachs, A.B. (2000) Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail. *Cell* 101: 243-245.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sarge, K.D., Murphy, S.P. and Morimoto, R.I. (1993) Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1392-1407.
- Sarge, K.D., Park-Sarge, O.K., Kirby, J.D., Mayo, K.E., and Morimoto, R.I. (1994) Expression of heat shock factor 2 in mouse testis: Potential role as a regulator of heat-shock protein gene expression during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 50: 1334-1343.
- Seki, N., Hattori, A., Hayashi, A., Kozuma, S., Miyajima, N., and Saito, T. (1999) Cloning, tissue expression, and chromosomal assignment of human MRJ gene for a member of the DnaJ protein family. *J. Hum. Genet.* 44: 185-189.
- Schilling, B., De-Medina, T., Syken, J., Vidal, M., and Munger, K. (1998) A novel human DnaJ protein, hTid-1, a homolog of the *Drosophila* tumor suppressor protein Tid56, can interact with human papillomavirus Type 16 E7 oncoprotein. *Virology* 247: 74-85.
- Schuetz, T.J., Gallo, G.J., Sheldon, L. Tempst, P. and Kingston, R.E. (1991) Isolation of a cDNA for HSF2: evidence for two heat shock factor genes in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6911-6915.
- Shen, Y., Liu, J., Wang, X., Cheng, X., Wang, Y., and Wu, N. (1997) Essential role of the first intron in the transcription of hsp90 β gene. *FEBS Letters* 413: 92-98.
- Shoji, W., Inoue, T., Yamamoto, T., Obinata, M. (1995) MIDA1, a protein associated with Id, regulates cell growth. *J. Biol. Chem.* 270: 24818-24825.
- Sorger, P.K. (1991) Heat shock factor and the heat shock response. *Cell* 65: 363-366.
- Srinivasan, A., McClellan, A.J., Vartikar, J., Marks, L., Cantalupo, P., Li, Y., Whyte, P., Rundell, K., Brodsky, J.L., and Pipas, J.M. (1997) The amino-terminal transforming region of simian virus 40 large T and small t antigens functions as a J domain. *Mol.*

Cell Biol. 17: 4761-4773.

Sugito, K., Yamane, M., Hattori, H., Hayashi, Y., Tohnai, I., Ueda, M., Tsuchida, N., and Ohtsuka, K. (1995) Interaction between hsp70 and hsp40, eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ, in human cells expressing mutant-type p53. FEBS Lett. 358: 161-164.

Takayama, S., Bimston, D.N., Matsuzawa, S., Freeman, B.C., Aime-Sempe, C., Xie, Z., Morimoto, R.I., and Reed, J.C. (1997) BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. EMBO J. 16: 4887-4896.

Tang, Y., Ramakrishnan, C., Thomas, J., and DeFranco, D.B. (1997) A role for HDJ-2/HSDJ in correcting subnuclear trafficking, transactivation, and transrepression defects of a glucocorticoid receptor zinc finger mutant. Mol. Biol. Cell. 8: 795-809.

Terada, K., Kanazawa, M., Bukau, B., Mori, M. (1997) The human DnaJ homologue dj2 facilitates mitochondrial protein import and luciferase refolding. J. Cell. Biol. 139: 1089-1095.

Uoshima, K., Handelman, B., and Cooper, L.F. (1993) Isolation and characterization of a rat Hsp27 gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 197: 1388-1395.

Vanin, E.F. (1985) Processed pseudogenes: characteristics and evolution. Ann. Rev. Genet. 19: 253-272.

Vogel, J.L., Parsell, D.A., and Lindquist, S. (1995) Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation. Curr. Biol. 5: 306-317.

Wang, Y. and Morgan, W.D. (1994) Cooperative interaction of human HSF1 heat shock transcription factor with promoter DNA. Nucleic Acids Res. 22: 3113-3118.

Wu, C. (1984) Two protein-binding sites in chromatin implicated in the activation of heat-shock genes. Nature 309: 229-234.

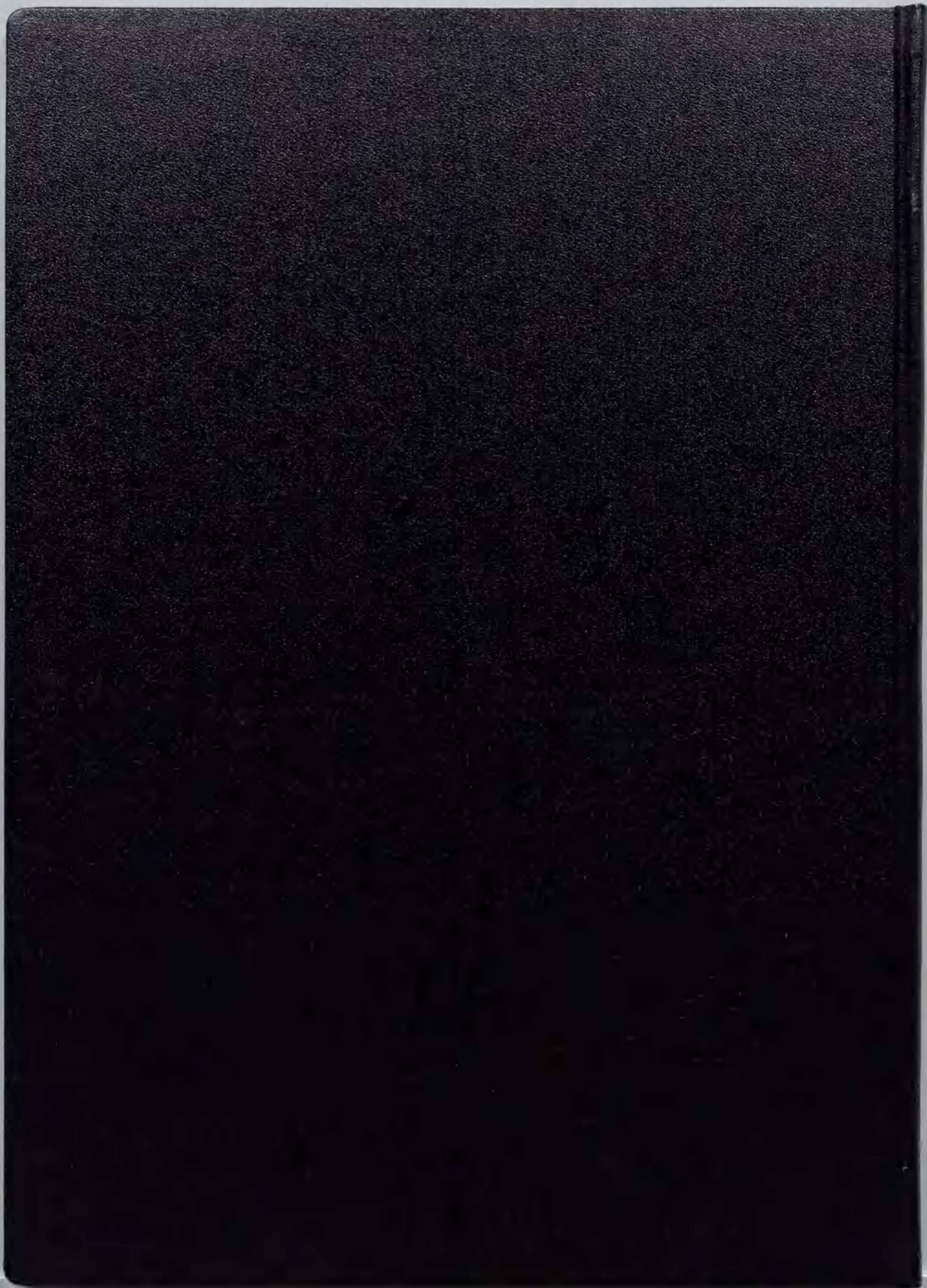
Wu, C. (1995) Heat shock transcription factors: structure and regulation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11: 441-469.

Xio, H. and Lis, J.T. (1988) Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. Science, 239: 1139-1142.

Yehiely, F., and Oren, M. (1992) The gene for the rat heat-shock cognate, hsc, can suppress oncogene-mediated transformation. Cell Growth Differ. 3: 803-809.

Yan, W. and Craig, E.A. (1999) The glycine-phenylalanine-rich region determines the specificity of the yeast Hsp40 sis1. Mol. Cell. Biol. 19: 7751-7758.

Yost, H.J. and Lindquist, S. (1986) RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. Cell 45: 185-193.



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



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

