

令和元年6月4日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08625

研究課題名(和文) 進化的アプローチとプロテオーム解析を基盤とした熱ショック応答機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of HSF1 transcription complex by evolutionary approach

研究代表者

瀧井 良祐 (TAKII, Ryosuke)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00419558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：熱ショック応答の仕組みを明らかにするために、進化的アプローチから熱ショック因子(HSF1)の転写活性に必要なアミノ酸を同定した。それはトカゲHSF1の1つのアミノ酸(P17)と1か所(site-d: 22アミノ酸)で、同部位は哺乳動物のHSF1にも保存されている。次に転写活性化能の異なる4つの変異HSF1を作成し、ヒトHSP70プロモーターをDNAプローブとして用い、転写複合体の構成因子を質量分析を行い解析した。さらにHSP70転写活性と相関のある因子群の中から、これまで転写との関連が報告のない因子Aに着目した。Aは、染色体分配に関わる因子であるが、熱依存的なHSP70の誘導に必要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内のタンパク質の正しい構造と量は常に一定に保たれている。それらを担う因子の1つが熱ショック転写因子(HSF)である。HSF1は神経変性疾患やがんの病態との関連が報告されているが、治療薬として副作用なくHSF1の活性化を制御する薬剤は現時点ではない。そこで、HSF1転写複合体の構成因子を明らかにし、その活性化機構を解析することは、最終的には上述の病態の改善へつながる。

これまでもHSF1転写複合体の構成因子を明らかにするために、様々な研究者が挑んでいるが強力な制御因子は見つかっていない。そこで、本研究では新たにDNAプルダウン法を通じて、HSF1転写複合体の構成因子群を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：To identify the mechanism of HSF1 transcription, we used evolutionary approach. From this results, we identified that two amino acids of HSF1 are necessary to induce HSP70 during heat shock. These two amino acids are conserved form lizard to mammalian HSF1. Finally we identified Factor A by using DNA pulldown assay. Factor A is able to promote HSP70 induction and related cell division.

研究分野：分子生物学

キーワード：熱ショック応答 HSF DNAプルダウン 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質はリボソームで合成されると速やかに折りたたまれて正しい立体構造を持つ成熟タンパク質となる。一方でその約 30%は異常構造をとるが、再折りたたみや分解を受けることで、タンパク質の正しい構造と適切な量が保たれる。細胞が持つこの異常タンパク質に対する処理能はプロテオスタシス容量と呼ばれ、その破綻はタンパク質凝集体の蓄積を引き起こし、細胞の機能障害を引き起こす。神経細胞でのプロテオスタシス容量の低下は、認知症や異常行動を導き、アルツハイマー病やポリグルタミン病などの神経変性疾患の原因となる。生物におけるプロテオスタシス容量を調節する主要な仕組みの 1 つが熱ショック応答である。この応答はシャペロンである熱ショックタンパク質 (HSP) 群やタンパク質分解に関与する因子群の誘導を特徴とし、タンパク質毒性に対する生物が有する普遍的な適応機構である。熱ショック応答は、哺乳類では主に熱ショック因子 (HSF1) が HSP の発現誘導を担う。様々な研究者が HSF1 の活性化機構を明らかにすることを目指しているが、強力な制御因子は見つかっていない。

2. 研究の目的

熱ショック応答は、熱刺激による急激な HSP 群の誘導が見られることから、古くから転写のモデルとして研究されてきた。その主要な制御因子が熱ショック転写因子 (HSF) である。HSF は酵母からヒトに至るまで、進化の過程でよく保存されている。高等動物では HSF ファミリー (HSF1-4) が存在し、中でも HSF1 が哺乳動物の HSP 発現誘導を担う。

これまでマウスやヒトの哺乳類の HSF1 は HSP 誘導能を持つが、ニワトリの HSF1 はこれを持たないことがわかっている。そこで、ニワトリと近縁のトカゲの HSF1 のクローニングを行い様々な生物種における HSF1 の HSP 誘導活性を調べる。またニワトリ、トカゲの HSF1 をスワップ解析により、HSF1 の活性に必要な領域を同定する。またこの領域がヒトを含めた HSF1 に保存されているか確認する。さらにこれらの HSF1 の情報を基に、DNA プルダウン法を用いて、新規の HSF1 転写複合体の構成因子の同定を行う。またこの因子と HSF1 の相互作用部位を調べ、新規因子群と HSF1 との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 様々な生物種における HSF1 の解析

ニワトリと近縁の爬虫類であるトカゲの HSF1 のクローニングを行う。トカゲは東北大学 生物多様性進化分野の河田教授の協力の下で、トカゲ (*Anolis sagrei*) の組織を採取する。またトカゲと近縁のカエルの HSF1 をクローニングするために、広島大学 両生類研究センターよりカエル (*Xenopus tropicalis*) を供与いただく。これらの生物種から、爬虫類および両生類の HSF 群 (HSF1-4) をクローニングする。

マウス HSF1-/-線維芽細胞 (MEF) は、熱依存的な HSP 誘導能を持たない。そこで、この細胞にクローニングした各種 HSF 群をアデノウイルスを用い発現し、それぞれの HSP 誘導能を確認する。次にトカゲおよびカエルの組織からタンパク質を抽出し、HSF1 群の発現量を比較する。また培養細胞においても各種 HSF 群の発現を比較する。さらに組織および細胞に熱刺激を加え、HSF 群の活性化をゲルシフトアッセイおよびゲルろ過を行い調べる。

(2) 進化的アプローチとプロテオーム解析による HSF1 転写複合体の解析

下記に示すがトカゲ HSF1 が HSP 誘導活性をもつことがわかり、ニワトリ HSF1 とのスワップ解析により HSF1 の転写活性に必要な部位を調べることが可能となった。我々は 2003 年時点でヒト HSF1 とニワトリ HSF1 のアミノ酸の比較から、その活性に必要な部位を同定しようとした。しかし、ヒト-ニワトリ HSF1 間では異なるアミノ酸も多く、解析ができなかった。しかし、ニワトリと近縁のトカゲの HSF1 をクローニングし、そこに HSP 誘導活性があることを見出したことで、トカゲ-ニワトリ-ヒトの 3 者のアミノ酸を比較することが可能となり、HSF1 の転写活性に必要な領域を調べることが可能となる。

また同定した領域をトカゲ、ニワトリ、ヒト HSF1 に変異を導入し、それぞれの HSP 誘導能の変化を調べる。次に、野生型および変異型トカゲ HSF1 を用い、HSF1 転写複合体の解析を行う。具体的には、HSF1-/- MEF にトカゲ HSF1 をアデノウイルスにより過剰発現する。次にこの細胞に熱刺激を加え、細胞核抽出液を調整する。ここにピオチン標識したヒト HSP70 プロモーター DNA を加え混和し、ストレプトアビジンビーズを用いた沈降法により HSF1 転写複合体を得る。その構成因子は九州大学 生体防御医学研究所 松本雅記博士の下でプロテオーム解析を行うことで同定する。

(3) HSF1 転写複合体における転写の促進因子の同定

HSF1 変異体間の比較から HSF1 の転写活性と相関する因子に着目する。上位約 10 因子に絞り、ノックダウンにより、HSF1 の転写の促進因子を明らかにする。

(4) 相互作用部位の同定

HSF1 転写複合体として同定した因子 A が HSF1 と結合することを細胞抽出液を用いて調べる。また様々な変異 HSF1 を用い、因子 A の相互作用に必要な領域を明らかにする。また因子 A が熱刺激依存的に HSP70 プロモーター部位へ呼び込まれることをクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) により調べる。

4. 研究成果

(1) トカゲおよびカエル HSF 群の解析

まず爬虫類であるトカゲ (*Anolis sagrei*) から組織を採取し、そこから HSF 群 (HSF1-4) をクローニングした。同様に両生類であるカエル (*Xenopus tropicalis*) から HSF 群をクローニングした。HSF1^{-/-} MEF にこれらの HSF 群を発現し、熱依存的な HSP70 の発現誘導を比較した結果、驚いたことにトカゲ、カエル共に、HSF1 と HSF3 が HSP70 の誘導能を持つことがわかった。また両者ともに熱により DNA 結合能を獲得し、三量体への変換が促進した。

これまでニワトリでは HSF1 が HSP 誘導能を持たず、HSF3 がこれを持つため、進化の過程で4つのうち単一の HSF が活性を持つと考えられていた。実際に、魚類、哺乳類では HSF1 が HSP 誘導能を持つ。しかし、爬虫類や両生類では HSF1 と HSF3 の両者が HSP 誘導能を持つことがわかった。つまりそれぞれの生物は進化の過程で、HSP 誘導能を持つ単一の HSF を持つのではなく、元々4つの HSF がそれぞれ HSP 誘導能を持ち、それが進化の過程で少しずつ失われていった、と考えられる。

(2) HSF1 の転写の活性に必要な領域の同定

ニワトリの HSF1 は熱依存的な HSP70 誘導能を持たないが、トカゲの HSF1 はこれを有する。これまでニワトリとヒトの HSF1 のアミノ酸の比較からは HSF1 の転写活性に必要な領域は同定できなかった。しかし、ニワトリ HSF1 と非常に似たアミノ酸配列を持つが HSP 誘導能を有するトカゲ HSF1 を同定できたことで、ニワトリとトカゲ HSF1 の比較が可能となった。まず、スワップ解析を行って、最終的に HSF1 の転写活性に必要なアミノ酸を同定するために、数種のキメラ HSF1 を作成した。その結果、DNA 結合領域と領域 X が転写の促進を行うことがわかった。さらに詳細にキメラ HSF1 を作成し、HSP70 の誘導量の変化を調べた結果、DBA 結合領域の17番目のプロリンと d 領域と名付けた22アミノ酸の2つの領域が HSP70 の誘導を促進することがわかった。ニワトリではプロリンがセリンに置換されて、また d 領域を欠く。しかし、ニワトリ HSF1 にこれらの変異を導入したトカゲ型ニワトリ HSF1 は HSP70 誘導能を獲得し、一方でニワトリ型トカゲ HSF1 では HSP70 誘導能が大きく減弱した。この結果からもプロリン17と d 領域の22アミノ酸が HSF1 の活性に必須のアミノ酸であることがわかった。またトカゲ HSF1 ではこれらの変異を導入することで HSP70 誘導能が約 1/20 に減少した。

(3) HSF1 転写複合体の同定

まず両端をビオチン標識したヒト HSP70 プロモーター領域約 450bp を用意し、これが DNA プロローブとして活性化した HSF1 を沈降できるプルダウンアッセイを確立した。そこで、HSF1^{-/-} MEF に野生型および変異型トカゲ HSF1 を過剰発現した細胞を用意し、熱刺激を加える。この細胞の核抽出液を調整し、DNA プロローブと混和し、それぞれの HSF1 転写複合体の構成因子を同定した。まず約 1800 の因子を同定し、その中でも転写装置を担う既知の因子を含む 278 の HSF1 転写複合体タンパク質を同定した。さらに HSF1 変異体間の比較から HSF1 の転写活性と相関する約 20 因子を見出した。

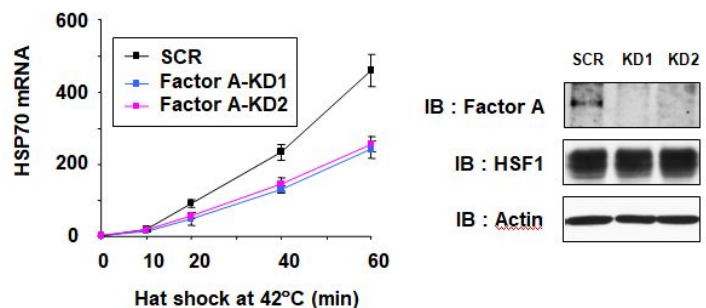
(4) 因子 A は HSP70 の転写の促進因子である

20 因子の中から既知のヒストンアセチル化酵素群やクロマチン再構成複合体因子を除いた 11 因子をノックダウンして熱ストレスによる HSP70 の転写誘導を調べた。その結果、5 因子が促進因子として、3 因子が抑制因子として働くことがわかった (A)。Mediator の1因子である Med? が最も強力な HSP70 の誘導因子であった。そこで、染色体分配に関わる因子 A に着目した。因子 A のノックダウンは、熱依存的な HSP70 の誘導の減弱が見られた (B)。

A

shRNA target gene	Function	HSP70 (%)
Med ?	Mediator	49.4
Factor A	Cell division	53.6
Phf6	Transcription	70.6
Mccc1	Mitochondria enzyme	70.9
Morf412	HAT	78.5
Mcm5	DNA replication	95.9
Mcm10	DNA replication	105.7
Chd4	NuRD complex	107.1
Gcn111	Translation	121.6
Ilf3	Translation	126.4
Pdcd11	RNA binding	128.5

B



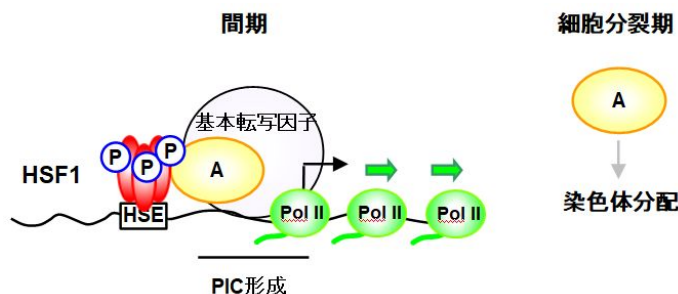
また因子 A のノックダウンは、細胞周期に影響を与えず、細胞周期の変化ではなく、因子 A が HSP70 の促進因子であることがわかった。

(5) 相互作用部位の同定

DNA プロローブを用いたプルダウンアッセイの結果、HSF1 の転写複合体の構成因子として因子 A を同定したが、実際に内在性の HSF1 と因子 A が相互作用するか免役沈降法により確認を行った。熱刺激時のみ HSF1 と因子 A の結合が確認できた。

次に、数種の HSF1 変異体を用い、HSF1 の 326 番目のセリンに対し因子 A が相互作用することがわかった。HSF1 のセリン 326 のリン酸化は転写活性化の標識としてよく知られており、同部位をアラニンまたはグリシンに置換した HSF1 とは相互作用を示さなかった。

またクロマチン免疫沈降法を行い、HSF1 と因子 A が熱依存的に HSP70 プロモーター部位へ呼び込まれることを確認した。さらにその呼び込みは HSF1 依存的に因子 A が呼び込まれた。さらにセリン 326 の変異体では因子 A の呼び込みが見られず、熱刺激時に HSF1 のセリン 326 のリン酸化に依存して、因子 A がプロモーター部位に呼び込まれ HSF1 転写複合体の構成因子として働くことが明らかになった（下図）。



今後の課題として、因子 A がどのように転写を促進するのか、その制御機構の解明とプロテオスタシス容量を調節する新しい役割について明らかにしていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Fujimoto M, Takii R, Katiyar A, Srivastava P, Nakai A, Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Promotes the Human Heat Shock Response by Facilitating Heat Shock Transcription Factor 1 Binding to DNA. *Molecular and cellular biology* 38(13) e00051-18 2018、査読あり

doi: 10.1128/MCB.00051-18

Takii R, Kadowaki T, Tsukuba T, Yamamoto K, Inhibition of gingipains prevents *Porphyromonas gingivalis*-induced preterm birth and fetal death in pregnant mice. *European journal of pharmacology* 824 48-56 2018、査読あり

doi:10.1016/j.ejphar.2018.01.028

Fujimoto M, Takii R, Takaki E, Katiyar A, Nakato R, Shirahige K, Nakai A, The HSF1-PARP13-PARP1 complex facilitates DNA repair and promotes mammary tumorigenesis. *Nature communications* 8(1) 1638 2017、査読あり

doi:10.1038/s41467-017-01807-7

Oka S, Shiraishi K, Fujimoto M, Katiyar A, Takii R, Nakai A, Matsuyama H, Role of Heat Shock Factor 1 in Conserving Cholesterol Transportation in Leydig Cell Steroidogenesis via Steroidogenic Acute Regulatory Protein. *Endocrinology* 158(8) 2648-2658 2017、査読あり

doi:10.1210/en.2017-00132

Takii R, Fujimoto M, Matsuura Y, Wu F, Oshibe N, Takaki E, Katiyar A, Akashi H, Makino T, Kawata M, Nakai A, HSF1 and HSF3 cooperatively regulate the heat shock response in lizards. *PLoS one* 12(7) e0180776 2017、査読あり

doi:10.1371/journal.pone.0180776

Nagata Y, Fujimoto M, Nakamura K, Isoyama N, Matsumura M, Fujikawa K, Uchiyama K, Takaki E, Takii R, Nakai A, Matsuyama H, Anti-TNF- α Agent Infliximab and Splenectomy Are Protective Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation* 100(8) 1675-1682 2016、査読あり

doi: 10.1097/TP.0000000000001222

〔学会発表〕(計 8 件)

染色体関連因子による熱ショック遺伝子の転写誘導機構の解明 瀧井 良祐

第41回 日本分子生物学会年会 2018年

トカゲでは HSF1 と HSF3 が協調的に熱ショック応答を制御する 瀧井 良祐

第91回 日本生化学会年会 2018年

染色体関連因子による熱ショック応答の制御 瀧井 良祐

2017年度 生命科学系学会合同年次大会 2017年

HSF1 の活性調節に働くリン酸化部位 Ser326 は進化的に保存されている 瀧井良祐、藤本充章、Arpit Katiyar、Pratibha Srivastava、中井 彰

第12回臨床ストレス応答学会 2017年

HSF1 and HSF3 cooperatively regulate the heat shock response in lizards. Ryosuke Takii, Mitsuaki Fujimoto, Arpit Katiyar, Pratibha Srivastava, Akira Nakai

8th International Congress on Stress Responses in Biology & Medicine 2017年

HSF1 転写複合体解析による熱ショック応答機構の解明

瀧井良祐、藤本充章、Arpit Katiyar、松本雅記、中井 彰

転写研究会 冬の若手ワークショップ2017 2017年

HSF1 転写複合体の同定と機能解析

瀧井良祐、藤本充章、Arpit Katiyar、松本雅記、中井 彰

第39回 日本分子生物学会 2016年

進化的アプローチによる熱ショック因子 HSF1 転写複合体の同定

瀧井良祐、藤本充章、高木栄一、Arpit Katiyar、松本雅記、中井 彰

第89回 日本生化学会年会 2016年

〔図書〕(計 1 件)

Heat Shock Factor

Nakai Akira (担当:分担執筆, 範囲:Structure and Function of the HSF Family Members: Ryosuke Takii)

Springer 2016年 総ページ 301、研究代表者担当分 31-50

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：藤本 充章
ローマ字氏名：FUJIMOTO,Mitsuaki

研究協力者氏名：中井 彰
ローマ字氏名：NAKAI,Akira

研究協力者氏名：松本 雅記
ローマ字氏名：MATSUMOTO,Masaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。