

令和元年6月17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：16K07256

研究課題名(和文) DNA損傷刺激によるHSF1-PARP複合体の転写制御とDNA修復機構の解明

研究課題名(英文) Transcriptional regulation and DNA repair mechanism of HSF1-PARP complex by DNA damage stimulation

研究代表者

藤本 充章 (FUJIMOTO, Mitsuaki)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80359900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：熱ショック転写因子1(HSF1)は足場タンパク質PARP13を介してPARP1と相互作用することが分かった。HSF1-PARP13-PARP1複合体形成の阻害は、DNA損傷ストレス後のPARP1のDNA損傷部位への再分布およびDNA修復の低下を引き起こした。さらに、この複合体は細胞をDNA損傷ストレスから保護するために必要であった。PARP阻害剤に感受性であるBRCA1欠損乳腺腫瘍細胞は複合体形成の阻害により細胞増殖とマウスでの腫瘍形成が抑制された。よって、HSF1はがん細胞のゲノムDNAの安定性に関与し、HSF1-PARP複合体の阻害がBRCA1欠損乳腺腫瘍形成の抑制に働くことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、HSF1-PARP13-PARP1複合体がDNAの安定性に関与することを明らかにした。DNAが不安定化するとDNA異常が起こり、この異常が蓄積するとがんが発症する。BRCA1遺伝子の変異で起こる乳がんはDNA修復機構に強く依存することが知られている。マウスを用いた実験から、この複合体の形成阻害がBRCA1変異乳がん細胞の腫瘍形成を顕著に抑制することを明らかにした。よって、HSF1-PARP13-PARP1複合体の解析から、乳がんなどの治療薬の開発に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Here, I show that heat shock transcription factor 1 (HSF1) interacts PARP1 through the scaffold protein PARP13. In DNA damage stimulation, inhibition of HSF1-PARP13-PARP1 complex formation caused a redistribution of PARP1 to the DNA damage site and a decrease. Furthermore, this complex formation was required to protect cells from DNA damage stress. Inhibition of complex formation. BRCA1-deficient mammary tumor cells which has a sensitive to PARP inhibitors were inhibited in cell growth formation and tumorigenesis in mice by inhibition of complex formation. These results suggest that HSF1 is involved in the stability of the genomic DNA of cancer cells, and HSF1-PARP complex acts to suppress BRCA1-deficient mammary tumorigenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：HSF1 PARP1 PARP13 転写 DNA修復

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

1. 研究開始当初の背景

細胞が高温に曝されると一群の熱ショックタンパク質(HSP)が合成される。この応答は熱ショック応答と呼ばれ、主に熱ショック因子(HSF)によって制御される。熱ショック応答は、ストレスから自身を守るための基本的な生体防御であり、プロテオスタシス(タンパク質ホメオスタシス)容量の重要な調節機構の一つでもある。さらに、HSF群が個体発生と維持、老化と関連した細胞変性疾患、さらにはがんの発生や進展にも重要な役割を持つことが分かってきた。哺乳動物細胞のHSF群の中で、熱ショック応答によるHSPの発現制御を担うのはHSF1である。これまでに、哺乳動物細胞のHSF1がDNA複製・修復に関わる一本鎖DNA結合蛋白質RPAとともにクロマチンにあらかじめ結合してその構造を開いた状態に保ち、ストレス時に転写を速やかに促進できる環境を整えていることを明らかにした。さらに、ミトコンドリアDNAの複製・修復に関わるミトコンドリア一本鎖DNA結合蛋白質SSBP1もまた、熱ストレス時に核へ移行してHSF1の転写を促進することも示した。これらの知見は、DNAの複製・修復因子群がHSF1を介してプロテオスタシス容量の調節に関与することを示している。しかしながら、HSF1を介するプロテオスタシス容量の調節機構がDNAの複製・修復過程で役割を担うかどうかについては不明である。国内外の研究者らにより、ショウジョウバエや哺乳類でのHSF1による制御遺伝子(HSP遺伝子など)の同定や転写制御機構が良く研究されている。また、熱ショックにより活性化されたHSFがHSP70遺伝子のクロマチン構造を変化させてその転写を亢進させることが分かっている。主な研究は、HSF1によるHSP70遺伝子の転写制御機構の解明であり、HSF1とDNA修復との観点からは十分な研究が行われていない。

2. 研究の目的

HSF1と結合するタンパク質としてポリADPリボシル化酵素(PARP)の酵素活性のないPARP13を同定した。17種類存在するPARPファミリーの中で、PARP1もHSF1とPARP13にそれぞれ相互作用してHSF1-PARPの三者複合体を形成し、熱ショックによりHSF1から解離したPARP1がHSP70遺伝子上に再分布し、HSP70誘導に必要であることを見いだした。さらに予備的実験より、HSF1とPARP13のターゲット遺伝子としてDNA損傷誘導遺伝子の発現調節に関与することが分かってきた。本研究では、HSF1-PARP複合体によるDNA損傷誘導遺伝子群の転写制御、さらにDNA修復機構やがん形成への影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)非ストレス状態でHSF1は、PARP1そしてPARP13と三者複合体を形成することが分かっている。PARP1は様々なストレスにより、自己PAR化が起こるとPARP1と相互作用していたタンパク質との結合を変化させることが知られている。そこで、DNA損傷ストレス(ドキシソルビシン)後のHSF1とPARP1とPARP13の相互作用を免疫沈降法で調べる。また、HeLa細胞の内在性PARP1をPARP1の酵素活性を欠損した変異体に置換した際の相互作用変化も検討する。

(2)以前の報告で、HSF1をノックダウンした細胞を用いたマイクロアレイ法により、HSF1がDNA損傷誘導遺伝子群などの発現を抑制することが示されている。そこで、HSF1-PARP13-PARP1複合体により遺伝子発現が制御される遺伝子を同定するために、HeLa細胞のHSF1をノックダウンした細胞とHeLa細胞の内在性HSF1を野生型HSF1あるいはPARP1やPARP13と結合できないHSF1点変異体(HSF1-T20A)へ置換した細胞を用いて、DNAマイクロアレイ解析を行う。さらに、HSF1、PARP1、PARP13をノックダウンしたHeLa細胞で、マイクロアレイ解析より同定した三者複合体のターゲット遺伝子の発現変化をRT-PCRで調べる。また、HSF1-T20A変異体へ置換した細胞を用いて、ドキシソルビシン刺激後のターゲット遺伝子の発現変化を調べる。

(3)HSF1-PARP13-PARP1複合体が(2)で同定したDNA損傷誘導遺伝子(GADD34)のプロモーター領域に存在することを、HSF1、PARP1、PARP13抗体を用いてChIPアッセイ法により調べる。これまでに、熱ショックでHSF1から解離したPARP1がHSP70遺伝子上に再分布することが分かっている。そこで、HeLa細胞の内在性HSF1をHSF1-T20A変異体へ置換した細胞を用い、非ストレス状態でGADD34プロモーター領域に存在したPARP1がドキシソルビシン刺激後にGADD34遺伝子上に再分布するかをChIPアッセイ法で明らかにする。

(4)DNA損傷刺激によりPARP1をはじめ、リン酸化H2AX、53BPやRad51などの修復因子群が損傷部位へ集まり、免疫染色によりfociの形成を導く。

HeLa細胞を用いHSF1のノックダウンを行い、内在性HSF1を野生型HSF1あるいはHSF1-T20A点変異体を置換し、ドキシソルビシン処理後のfoci形成への影響をリン酸化H2AXとRad51抗体を用いて免疫染色で検討する。

制限酵素I-SceIで切断後に相同組換え修復によりGFPが発現するカセットを導入したHeLa細胞を用い、HSF1ノックダウンにより内在性HSF1を野生型HSF1あるいはHSF1-T20A点変異体に置換する。これらの細胞にI-SceIを高発現させ、修復因子群の集積変化をChIPアッセイ法で定量化し、同時に修復の効率(相同組換え効率)をGFP発現細胞数で比較する。

(5)BRCA1遺伝子に変異をもつ乳腺細胞の進展にPARP1活性が強く依存している。そこで、BRCA1欠損の乳腺細胞を用い、内在性HSF1を野生型HSF1あるいはHSF1-T20A点変異体に置換し、細胞増殖変化を検討する。同様の処理をした細胞をマウスの乳腺に移植し、腫瘍の形成変化を発光イメージングシステム(IVIS imaging system)により定量化する。

4. 研究成果

(1)これまでの解析で HSF1-PARP13-PARP1 複合体は、足場タンパク質として働く PARP13 を介して HSF1 と PARP1 が結合することが分かっている。DNA 損傷ストレスであるドキシソルビシン (DOX) 刺激により自己ポリ ADP リボシル化 (PAR 化) することが分かった (図 1A)。この PARP1 の PAR 化により HSF1-PARP13 から PARP1 が解離することが分かった。PARP の酵素活性阻害剤である PJ34 を処理すると HSF1-PARP13-PARP1 複合体形成が維持された (図 1B)。しかしながら、DOX 刺激では HSF1-PARP13 相互作用には影響を与えなかった (図 1C)。さらに、内在性 PARP1 を酵素活性を欠損した HYA あるいは AAA に置換することで、DOX 刺激後の PARP13 の解離を阻害することができた (図 1D)。このことは、DNA 損傷ストレスにより PARP1 が自己 PAR 化を起こし、この三者複合体から解離することを示唆している。

(2) HSF1-PARP13-PARP1 複合体が遺伝子発現を調節しているかどうかを理解するために、HSF1 ノックダウンと野生型 HSF1 または HSF1-T20A で置換した HeLa 細胞を用いて DNA マイクロアレイ分析を行った。HSF1 ノックダウン細胞で 79 個の遺伝子の発現上昇が見られ、その中の 71 個の遺伝子 (90%) の発現が HSF1-T20A に置換することで上昇した (図 2A)。上昇した遺伝子の遺伝子オンロジー分析を行い、その遺伝子が細胞周期、アポトーシス、ストレスの調節に関与する GADD45A、GADD34、DDIT3、IL17R、および EPHA2 などの多くの DNA 損傷誘導遺伝子が含まれていた (図 2B)。同定した遺伝子の発現は、HSF1、PARP1 または PARP13 ノックダウンによって発現が上昇したが、PARP2 ノックダウンでは変化が見られなかった (図 2C)。これらの結果は、HSF1-PARP13-PARP1 複合体が DNA 損傷誘導遺伝子群の構成的発現を抑制することを示唆している。次に、DNA 損傷刺激による GADD34 と GADD45A の遺伝子発現変化を調べた。HSF1 ノックダウン細胞または HSF1-T20A 変異体に置換した細胞では、GADD34 および GADD45A の誘導発現は、DNA 損傷刺激である DOX 処理後 16 および 24 時間で著しく抑制されたが、構成的発現レベルは上昇した (図 2D)。よって、HSF1-PARP13-PARP1 複合体が GADD34 や GADD45A の構成的発現を抑制し、DNA 損傷中のその誘導を増強することが明らかになった。

(3) HSF1-PARP13-PARP1 複合体が GADD34 プロモーター領域に存在するかを調べた。GADD34 プロモーター領域には HSF1 が結合する HSE 領域が 2 つ存在することが分かった (図 3A)。非ストレス状態で、HSF1、PARP13 が GADD34 の HSE 領域に存在した。HSF1 ノックダウンでは PARP1 と PARP13 のリクルートが消失し、PARP13 ノックダウンでは PARP1 のリクルートのみが消失した (図 3B)。次に、DNA 損傷後の PARP1 のプロモーター領域から遺伝子上への再分布の有無を調べた。DOX 処理後に PARP1 は GADD34 の HSE 領域から解離し、GADD34 遺伝子上の 1 や 2 の領域に再分布することが分かった。この再分布は、HSF1-T20A や HSF1-T20G 変異体に置換することで顕著に減少した。さらに、再分布した領域で PAR 化のリクルートが亢進した (図 3C) これらの結果は、HSF1-PARP13-PARP1 複合体が DOX 処理中 GADD34 遺伝子上への PARP1 再分布に必要であることを示唆している。

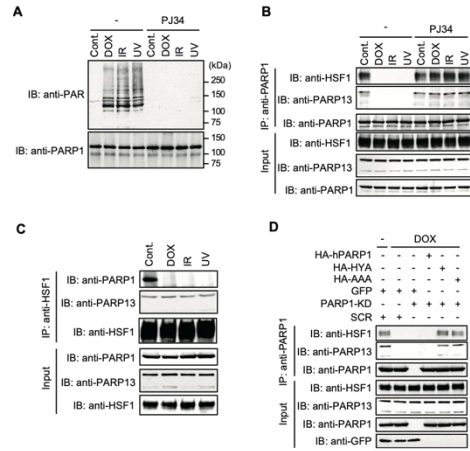


図1. PARP1活性がHSF1-PARP13-PARP1複合体形成を調節する

(2) HSF1-PARP13-PARP1 複合体が遺伝子発現を調節しているかどうかを理解するために、HSF1 ノックダウンと野生型 HSF1 または HSF1-T20A で置換した HeLa 細胞を用いて DNA マイクロアレイ分析を行った。HSF1 ノックダウン細胞で 79 個の遺伝子の発現上昇が見られ、その中の 71 個の遺伝子 (90%) の発現が HSF1-T20A に置換することで上昇した (図 2A)。上昇した遺伝子の遺伝子オンロジー分析を行い、その遺伝子が細胞周期、アポトーシス、ストレスの調節に関与する GADD45A、GADD34、DDIT3、IL17R、および EPHA2 などの多くの DNA 損傷誘導遺伝子が含まれていた (図 2B)。同定した遺伝子の発現は、HSF1、PARP1 または PARP13 ノックダウンによって発現が上昇したが、PARP2 ノックダウンでは変化が見られなかった (図 2C)。これらの結果は、HSF1-PARP13-PARP1 複合体が DNA 損傷誘導遺伝子群の構成的発現を抑制することを示唆している。次に、DNA 損傷刺激による GADD34 と GADD45A の遺伝子発現変化を調べた。HSF1 ノックダウン細胞または HSF1-T20A 変異体に置換した細胞では、GADD34 および GADD45A の誘導発現は、DNA 損傷刺激である DOX 処理後 16 および 24 時間で著しく抑制されたが、構成的発現レベルは上昇した (図 2D)。よって、HSF1-PARP13-PARP1 複合体が GADD34 や GADD45A の構成的発現を抑制し、DNA 損傷中のその誘導を増強することが明らかになった。

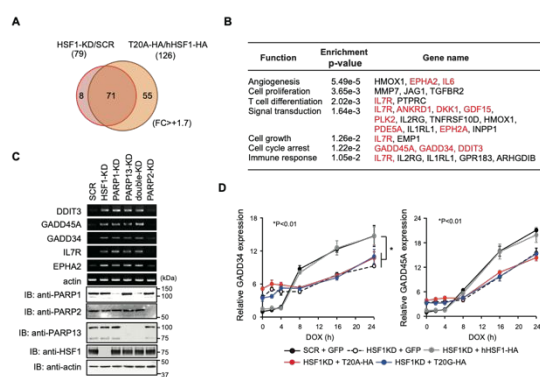


図2. HSF1-PARP13-PARP1複合体はDNA損傷時の遺伝子発現を増強する

(3) HSF1-PARP13-PARP1 複合体が GADD34 プロモーター領域に存在するかを調べた。GADD34 プロモーター領域には HSF1 が結合する HSE 領域が 2 つ存在することが分かった (図 3A)。非ストレス状態で、HSF1、PARP13 が GADD34 の HSE 領域に存在した。HSF1 ノックダウンでは PARP1 と PARP13 のリクルートが消失し、PARP13 ノックダウンでは PARP1 のリクルートのみが消失した (図 3B)。次に、DNA 損傷後の PARP1 のプロモーター領域から遺伝子上への再分布の有無を調べた。DOX 処理後に PARP1 は GADD34 の HSE 領域から解離し、GADD34 遺伝子上の 1 や 2 の領域に再分布することが分かった。この再分布は、HSF1-T20A や HSF1-T20G 変異体に置換することで顕著に減少した。さらに、再分布した領域で PAR 化のリクルートが亢進した (図 3C) これらの結果は、HSF1-PARP13-PARP1 複合体が DOX 処理中 GADD34 遺伝子上への PARP1 再分布に必要であることを示唆している。

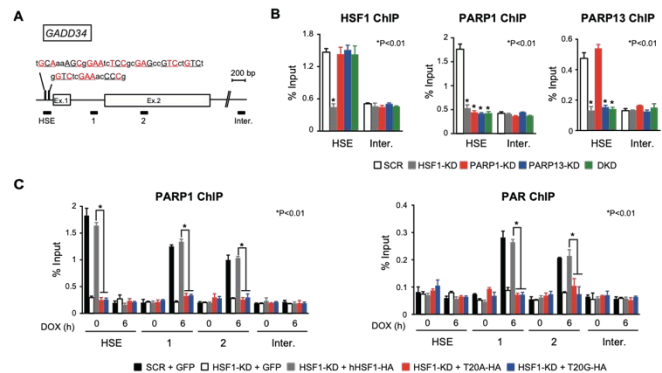


図3. HSF1-PARP13-PARP1複合体はGADD34遺伝子上へのPARP1再分布に必要である

(4)非ストレス状態で、HSF1-PARP13-PARP1 複合体はゲノム上に存在し、さらに DNA 損傷ストレス化では PARP1 のみがこの複合体から解離することが分かった。この PARP1 は DNA 損傷部位にリクルートされ、相同組換え修復や非相同末端結合修復に関わる因子であることが知られている。そこで、HSF1-PARP13-PARP1 複合体が DNA 損傷の修復に関与するかどうかを調べるために、免疫蛍光により修復因子の蓄積を調べた。H2AX の foci が DOX 処理の 6 時間後に出現し、HSF1 ノックダウン細胞あるいは HSF1-T20A 変異体に置換した細胞

では foci 形成が顕著に減少した。RAD51 の foci 形成でも同様の結果が得られた(図 4A)。次に、制限酵素 I-SceI で切断後に相同組換え修復により GFP が発現するカセットを導入した HeLa 細胞を用いて(図 4B)、DNA 損傷部位への PARP1 の蓄積を調べた。制限酵素 I-SceI 発現後に、SCE-1 領域に PARP1 および H2AX の蓄積が確認された。HSF1 ノックダウン細胞あるいは HSF1-T20A 変異体に置換により、これらの集積が顕著に減少し(図 4C)、さらに相同組換え修復効率も低下することが分かった。これらの結果は、DNA 損傷後に PARP1 が HSF1-PARP13-PARP1 複合体から解離し、DNA 損傷部位周辺にリクルートし、その部位への DNA 修復因子の補充を通して DNA 修復効率が改善することを示唆している。

(5)興味深いことに、BRCA1 欠損乳がん細胞の増殖には PARP1 を介する DNA 修復機構が必要である。そこで、HSF1-PARP13-PARP1 複合体が BRCA1 欠損乳がん細胞の増殖に関与するか調べた。BRCA1 欠損マウス乳腺細胞(KB1P-G3 と KB1P-B11 細胞)を HSF1 ノックダウンあるいは HSF1-T20A 変異体に置換することで細胞増殖が抑制されることが分かった(図 5A)。次に、マウスの乳腺に同種移植実験を行ったところ、HSF1 ノックダウンあるいは HSF1-T20A 変異体に置換した細胞では腫瘍形成が顕著に抑制された。よって HSF1-PARP13-PARP1 複合体は BRCA1 欠損マウス乳腺細胞の DNA 修復を亢進させて腫瘍形成を助けていることが明らかになった。

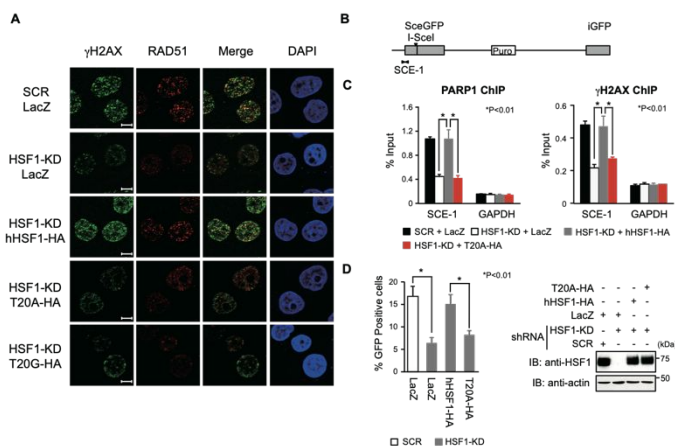


図4. HSF1-PARP13-PARP1複合体はDNA修復を促進する

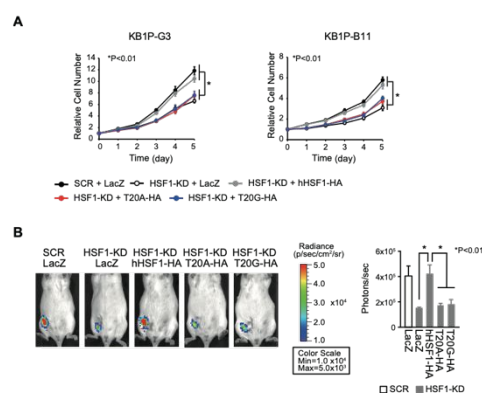


図5. BRCA1欠損マウス乳腺細胞の増殖と腫瘍形成

<引用文献>

- Mitsuaki Fujimoto, Eiichi Takaki, Ryosuke Takii, Ke Tan, Ramachandran Prakasam, Naoki Hayashida, Shu-ichiro Iemura, Tohru Natsume and Akira Nakai. RPA assists HSF1 access to nucleosomal DNA by recruiting histone chaperone FACT. *Mol. Cell* 48, 182-194, 2012.
- Ke Tan, Mitsuaki Fujimoto, Ryosuke Takii, Eiichi Takaki, Naoki Hayashida, and Akira Nakai. Mitochondrial SSBP1 protects cells from proteotoxic stresses by potentiating stress-induced HSF1 transcriptional activity. *Nat. Commun.* 6, 6580, 2015.
- Steven J Petesch, John T Lis, Rapid, Transcription-Independent Loss of Nucleosomes over a Large Chromatin Domain at *Hsp70* Loci. *Cell* 134,74-84, 2008.
- Marc L. Mendillo, Sandro Santagata, Maritina Koeva, George W. Bell, Rong Hu, Rulla M. Tamimi, Ernest Fraenkel, Tan A. Ince, Luke Whitesell and Susan Lindquist. HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. *Cell* 150, 549-562, 2012.
- Hanan Khoury-Haddad, Noga Guttmann-Raviv, Inbal Ipenberg, David Huggins, Anand D. Jeyasekharan and Nabieh Ayoub. PARP1-dependent recruitment of KDM4D histone demethylase to DNA damage sites promotes double-strand break repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 111, E728-737, 2014.
- Peter Bai. Biology of poly(ADP-ribose) polymerases: the factotums of cell maintenance. *Mol. Cell*, 58, 947-958, 2015.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 7件)

- Mitsuaki Fujimoto, Ryosuke Takii, Arpit Katiyar, Pratibha Srivastava and Akira Nakai. PARP1 promotes the human heat shock response by facilitating HSF1 binding to DNA. *Mol. Cell. Biol.* 38, MCB.00051-18, 2018. 査読有. DOI:10.1128/MCB.00051-18

Tsukasa Oda, Takayuki Sekimoto, Kiminori Kurashima, Mitsukai Fujimoto, Akira Nakai and Takayuki Yamashita. Acute HSF1 depletion induces cellular senescence through the MDM2-p53-p21 pathway in human diploid fibroblasts. *J. Cell Sci.* 131, jcs210724, 2018. 査読有.DOI:10.1242/jcs.210724

Mitsuaki Fujimoto, Ryosuke Takii, Eiichi Takaki, Arpit Katiyar, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige and Akira Nakai. The HSF1-PARP13-PARP1 complex facilitates DNA repair and promotes mammary tumorigenesis. *Nat. Commun.* 8, 1638, 2017. 査読有. DOI: 10.1038/s41467-017-01807-7

Ryosuke Takii, Mitsuaki Fujimoto, Yuki Matsuura, Fangxu Wu, Namiko Oshiba, Eiichi Takaki, Arpit Katiyar, Hiroshi Akashi, Takashi Makino, Masakado Kawata and Akira Nakai. HSF1 and HSF3 cooperatively regulate the heat shock response in lizards. *PLoS One* 12, e0180776, 2017. 査読有.DOI: 10.1371/journal.pone.0180776

Seiji Ishii, Masaaki Torii, Alexander I. Son, Meenu Rajendraprasad, Yury M. Morozov, Yuka Imamura Kawasaki, Anna C. Salzberg, Mitsuaki Fujimoto, Kristen Brennand, Akira Nakai, Valerie Mezger, Fred H. Gage, Pasko Rakic and Kazue Hashimoto-Torii. Variations in brain defects result from cellular mosaicism in the activation of heat shock. *Nat. Commun.* 8, 15157, 2017. 査読有.DOI: 10.1038/ncomms15157

Junko Tsuda, Kazuma Sugahara, Takeshi Hiri, Eiju Kanagawa, Eiichi Takaki, Mitsuaki Fujimoto, Akira Nakai and Hiroshi Yamashita. A study of hearing function and histopathologic changes in the cochlea of the type 2 diabetes model Tsumura Suzuki obese diabetes mouse. *Acta Otolaryngol.* 136, 1097-1106, 2016. 査読有. DOI: 10.1080/00016489.2016.1195912

Yudai Nagata, Mitsuaki Fujimoto, kimihiko Nakamura, naohito Isoyama, Masafumi Matsumura, Kiki Fujikawa, koichi Uchiyama, Eiichi Takaki, Ryosuke Takii, Akira Nakai and Hideyasu Matsuyama. Anti-TNF- Agent Infliximab and Splenectomy Are Protective Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation* 100, 1675-1682, 2016. 査読有.DOI: 10.1097/TP.0000000000001222

[学会発表] (計 7 件)

藤本充章、熱ショック応答と DNA 修復機構、第 35 回日本ハイパーサーミア学会、2018 年
藤本充章、HSF1-PARP 複合体の PAR 化とリン酸化による制御、第 13 回臨床ストレス応答学会、2018 年

藤本充章、HSF1-PARP 複合体による熱ショック応答の調節、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年

藤本充章、HSF1 の新たな機能とがん、第 34 回日本ハイパーサーミア学会、2017 年

藤本充章、Regulation of heat shock response by HSF1-PARP complex in mammalian cell、8th International Congress on stress Responses in Biology & Medicine、2017 年

藤本充章、熱ショック応答におけるポリ ADP リボシル化酵素の役割、第 11 回臨床ストレス応答学会、2016 年

藤本充章、HSF1-PARP 複合体は DNA 損傷応答に関与する、第 89 回日本生化学会大会、2016 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://ds22.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~seika2/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

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。