

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770040

研究課題名(和文) HSP90を利用した細胞内シグナル伝達の解析

研究課題名(英文) Analysis of HSP90-Regulated Signaling Mechanisms in Plant

研究代表者

山田 健志 (YAMADA KENJI)

基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・助教

研究者番号：00360339

研究成果の概要：

シロイヌナズナを用い、HSP90 がどのような細胞内因子と結合し、その働きを調節するかを調べるため、HSP90 阻害剤を処理したシロイヌナズナの応答を解析した。その結果、植物においてHSP90は熱ショック応答を制御していることと、オーキシン応答を制御していることがわかった。HSP90はシロイヌナズナにおいて常に細胞内に蓄積している熱ショック転写制御因子、HSFA1と結合し、この結合はHSP90阻害剤により阻害された。HSP90阻害剤処理によりHSFA1が活性化された。これらのことから、HSP90は熱ショック転写制御因子と結合しその活性を負に制御していることが示唆された。一方、オーキシンの誘導されるレポーター遺伝子をもつシロイヌナズナを用い、HSP90阻害剤で、オーキシン応答が顕著に抑制されることがわかった。さらに、HSP90阻害剤で、内在性のオーキシン応答遺伝子の発現が顕著に抑制された。これらのことから、HSP90はオーキシン応答を制御することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 ・ 植物生理・分子

キーワード：シロイヌナズナ, HSP90, 熱ショック応答, シャペロン, 熱ショックタンパク質, 転写制御, 高温耐性

1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、HSP90は、基質タンパク質と常に結合し、基質タンパク質の活性化、不活性化を制御していることが明らかになり、HSP90の働きがシグナル伝達に必須であると考えられるようになってきた。

植物は様々な環境の変化を素早く感知し、速やかに応答する。温度や重力、傷害などの環境要因は、植物固有の応答を引き起こす。HSP90の阻害剤を作用させたシロイヌナズナにオーキシンを処理したところ、オーキシン応答遺伝子の発現が抑制されることを見い

だした。オーキシンのシグナル伝達には、ユビキチンリガーゼ複合体や、転写制御因子であるARF (auxin response factor)の関与が示されているが、シャペロンの活性がオーキシン応答に必要であるという報告はなかった。一方、HSP90の阻害剤を一過的に処理することで、シロイヌナズナの熱耐性が向上することを発見した。熱ショックによって植物が熱耐性を向上させることは以前から知られていたが、どのようにして植物が熱を感知するか分子機構は未知のままであった。HSP90が熱応答に関わる転写制御因子、HSF (heat shock response factor)を制御している可能性を考え、これらの仮説の立証を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HSP90の制御を受ける新しいシグナル伝達経路を明らかにすること、シグナル因子の活性調節の機構を理解し、それぞれのHSP90を介したシグナルがどのようにお互いに影響し合い植物の形態を形作っているかを明らかにすることである。このため、HSP90の機能を押さえた植物における表現型を解析し、さらにHSP90と基質の複合体を同定することを計画した。HSP90が様々な因子と結合することが考えられるが、本研究ではまず、オーキシン応答と熱応答においてHSP90と相互作用する因子を具体的に同定する。その上で、他の塩や乾燥ストレスなどシャペロンが必要とされる環境要因により引き起こされる現象に、これらのHSP90と相互作用する因子がどのように影響を受けるかを調べる一方、遺伝子発現の変化がHSP90を介しエピジェネティックに子孫へ伝わる可能性を追求する。

3. 研究の方法

(1) オーキシン応答におけるHSP90の役割

① HSP90がオーキシン応答遺伝子の発現に及ぼす影響

HSP90阻害剤であるゲルダナマイシン、ラディシコールを用いてHSP90の働きを特異的に阻害し、IAA1, IAA4, IAA5等のオーキシン応答遺伝子の変化をRT-PCRで調べる。

② HSP90がAUX/IAAタンパク質の分解に及ぼす影響

AUX/IAAタンパク質の分解は、オーキシン応答において重要な役割を果たしている。そこで、融合タンパク質、IAA7-GFPのオーキシン依存的な分解に対するHSP90阻害剤の影響を調べる。

③ オーキシン受容体の複合体構成成分の解

析

SCF複合体の成分であるTIR1がオーキシン受容体として働くことが示された。そこで、TIR1を含むSCF複合体にHSP90が含まれるか免疫沈降を行い解析する。現在、ヒスチジンタグを付加したTIR1 (TIR1-Ht)を導入したシロイヌナズナを既に作成しており、キレートカラムを用い、TIR1を含むSCF複合体の単離を試みている。

④ HSP90がオーキシン受容体、TIR1の働きに及ぼす影響

TIR1は核に局在し、ユビキチンリガーゼ活性をもつ複合体を形成する。HSP90がTIR1の核局在や、ユビキチンリガーゼ複合体の形成を促している可能性が考えられた。そこで、緑色蛍光タンパク質を付加したTIR1 (TIR1-GFP)を用い、HSP90阻害剤処理によるTIR1の局在やSCF複合体形成への影響、オーキシンへの結合能を調べる。

(2) HSP90阻害による熱耐性獲得の分子機構の解明

シロイヌナズナは熱応答遺伝子の発現により高温(45°C)耐性を獲得する。驚くことに、HSP90阻害剤を一時的に与えることで植物は高温耐性を獲得する。そこで、この現象の分子機構を調べる。

① HSP90の阻害による熱応答遺伝子の発現

HSP90が熱応答を負に制御していることが研究代表者らにより明らかにされた。そこで、マイクロアレイ解析を行い、HSP90の活性と熱応答遺伝子の発現を調べ、熱応答とHSP90阻害剤の影響がどの程度一致するか調べるとともに、熱耐性に必要な遺伝子群を見つける。

② HSP90が熱応答遺伝子の発現に関わる転写制御因子、HSFの活性に及ぼす影響

動物において、HSP90のターゲットとして、転写制御因子、HSFが知られている。HSFは常に発現し、熱に応答する遺伝子の発現に関わる。よって、植物のHSP90とHSFの結合が、熱応答によりどのように変化するかを調べる。

(3) シロイヌナズナHSP90変異株の単離、HSP90ドミナントネガティブ変異株の作成

阻害剤による実験を相補するため、遺伝学的な解析が必要である。シロイヌナズナには4つのHSP90ホモログが存在する。これら4つのHSP90遺伝子がそれぞれ破壊されている変異体を単離した。一方、4つのHSP90が相補的に働く可能性があるため、ドミナントネガティブ変異を導入したHSP90を発現するシロイヌナズナや、HSP90のRNAi株を作成し、

表現型を調べる。

4. 研究成果

(1) オーキシン応答におけるHSP90の役割

オーキシン応答プロモーター:: β -グルクロニダーゼ (GUS) をもつ形質転換シロイヌナズナを用い、オーキシン応答におけるHSP90阻害剤の効果を調べた。その結果、HSP90阻害剤はオーキシン応答プロモーターの活性を顕著に抑制することがわかった。さらに、内在性のオーキシン応答遺伝子の発現を調べたところ、これらの遺伝子の発現はHSP90阻害剤により抑制されることが明らかとなった。これらのことから、HSP90はオーキシン応答を制御することが示唆された。

オーキシンレセプターであるTIR1は、オーキシンを受容することでユビキチンリガーゼ活性を発揮し、AUX/IAAタンパク質のユビキチン化とそれに伴うAUX/IAAタンパク質の分解を引き起こす。そこで、TIR1の活性がHSP90阻害剤により影響を受けるかを検討した。IAA7-GFP融合タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナを作成し、オーキシンによるIAA7-GFPの分解を調べた。IAA7-GFPを発現する植物では、核にGFP蛍光が観察され、オーキシン処理によりGFP蛍光が消失した。一方、HSP90阻害剤を処理しても、オーキシンによるGFP蛍光の消失に変化は見られなかった。これらのことから、HSP90阻害剤はTIR1複合体の活性には影響を及ぼさないことが明らかとなり、HSP90はAUX/IAAタンパク質の分解よりも下流で起こる現象を制御していることが示唆された。現在、HSP90と結合する因子の網羅的探索をyeast two hybrid法により行っており、これらの因子の中から、オーキシン応答に関わる因子の候補が見つかることが期待される。

(2) HSP90阻害による熱耐性獲得の分子機構の解明

熱ショック応答プロモーター::GUSをもつ形質転換シロイヌナズナを用い、熱ショック応答におけるHSP90阻害剤の効果を調べた。その結果、熱ショックを与えなくても、HSP90阻害剤処理により、熱ショック応答プロモーターが活性化することが明らかとなった(図1)。このことから、HSP90阻害剤は熱ショック応答を引き起こすことが示唆された。植物は、熱ショックを与えることで高温耐性を獲得することが知られている。そこで、HSP90阻害剤処理により高温耐性が獲得されるかを調べたところ、HSP90阻害剤の一過的処理により、高温耐性が獲得された(図2)。このこ

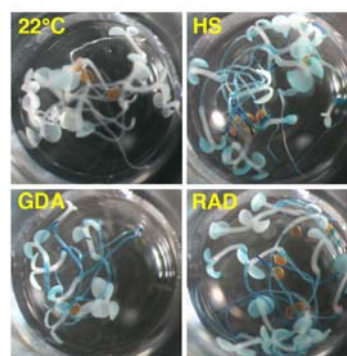


図1. HSP90阻害剤は熱ショック応答を起こす。熱ショックプロモーター::GUSをもつ形質転換シロイヌナズナに熱ショック(HS)、ゲルダナマイシン(GDA)、ラディシコール(RAD)処理を行い、GUS染色を行った。22°Cは無処理を示す。

とから、HSP90阻害剤処理を行うことで、シロイヌナズナは熱ショックを与えた場合と同じ反応を示すことが明らかとなった。この分子機構を調べるために、マイクロアレイ解析を行い、HSP90阻害剤処理により発現量が変化する遺伝子を調べた。その結果、157遺伝子が、熱処理およびHSP90阻害剤により共通して上昇することが明らかとなった。これらの遺伝子のプロモーター領域を調べたところ、熱応答シス配列(heat shock response element: HSE)が見つかった。このことから、HSP90阻害剤により、HSEを介した熱応答のシグナル伝達が働くことが示唆された。HSEには熱ショック転写制御因子(heat shock transcr

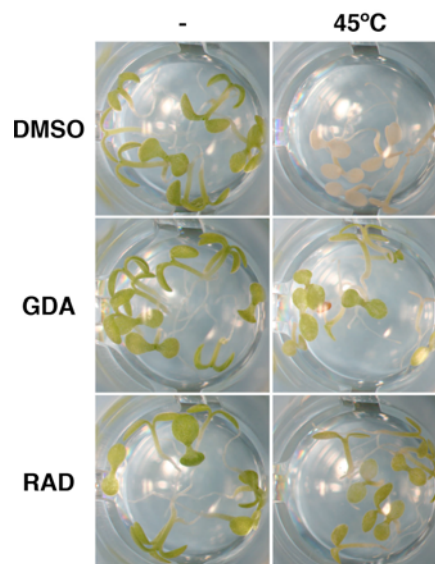


図2. HSP90阻害剤は高温耐性を誘導する。シロイヌナズナ野生株にゲルダナマイシン(GDA)、ラディシコール(RAD)を処理し、阻害剤を洗った後、高温処理(45°C)を行った。-は高温処理を行わなかったもの。HSP90阻害剤を処理しなかったもの(DMSO)では、高温処理により植物が枯死した。

ription factor: HSF)が結合する. トマトの HSF1 は細胞内に常に蓄積し, 熱ストレスが無い場合には, その働きは負に制御されている. これらのことから, HSP90 が HSF と結合し, HSF の活性を負に制御していると考えられた. そこで, シロイヌナズナの HSF1d に注目し, シロイヌナズナの HSP90.2 との結合を免疫沈降および Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)法を用いて調べたところ, 両者は結合することが明らかとなった. また, この結合は HSP90 阻害剤により阻害された. ドミナントネガティブ変異型の HSP90 を発現する形質転換シロイヌナズナでは熱ショック応答遺伝子の発現が上昇した. これらのことから, 植物において, HSP90 は HSF と結合しその活性を負に制御していることが示唆され, HSP90 は熱ショック応答を制御する因子であることが明らかとなった (図3). この成果は, 論文として Journal of Biological Chemistry 誌に掲載され, 高い評価を受けた.

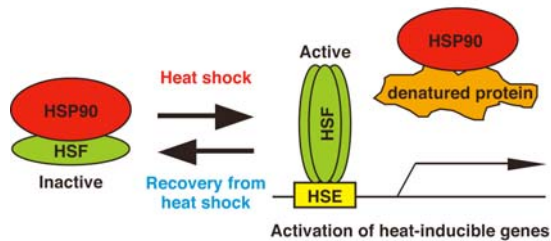


図3. 熱ショック応答の模式図

HSP90 は HSF と結合し, HSF の働きを阻害する. 熱ショックにより変性タンパク質が増えると, HSP90 は変性タンパク質と結合し, 変性タンパク質の巻き戻りを促す. HSP90 から離れた HSF は活性化し, 熱ショック応答遺伝子の転写制御因子として働く.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① K. Yamada, A. J. Nagano, M. Nishina, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura
NAI2 is an endoplasmic reticulum body component that enables ER body formation in *Arabidopsis thaliana*.

Plant Cell (2008) 20: 2529-2540. (査読有)

② K. Yamada, M. Nishimura
Cytosolic heat shock protein 90 regulates heat shock transcription factor in *Arabidopsis thaliana*.

Plant Signal. Behav. (2008) 3: 660-662. (査読無)

③ K. Yamada, Y. Fukao, M. Hayashi, M.

Fukazawa, I. Suzuki, M. Nishimura
Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*.

J. Biol. Chem. (2007) 282(52): 37794-37804. (査読有)

[学会発表] (計4件)

① K. Yamada, A. J. Nagano, M. Nishina, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura
NAI2 is an endoplasmic reticulum (ER) body component that enables ER body formation
The 55th NIBB Conference Arabidopsis Workshop 2008, Aichi, Japan, September 13-15, 2008

② 山田健志, 西村幹夫
シロイヌナズナの薬剤耐性獲得における HSP90 の役割
第30回日本分子生物学会, 第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 2007年12月11-15日

③ K. Yamada, Y. Fukao, M. Hayashi, M. Fukazawa, I. Suzuki, M. Nishimura
HSP90 regulates heat shock response that is responsible for heat adaptation
18th International Conference on Arabidopsis Research, Beijing, China, June 20-23, 2007

④ 山田健志, 深沢美津江, 鈴木育, 西村幹夫
熱処理による HSP90 活性の減少が熱応答を引き起こす
第48回日本植物生理学会年会, 松山, 2007年3月28-30日

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/celmech/jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 健志 (YAMADA KENJI)

基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・助教

研究者番号: 00360339