

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06490

研究課題名(和文) HSF1複合体によるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of gene expression via epigenetic regulation by HSF1 complex

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：HSF1が熱ショック時にHSP70プロモーターにおいてTRRAP-TIP60複合体を、HSF1-S419のリン酸化に依存してリクルートすることを明らかにした。また、TRIM33はHSF1との相互作用とTIP60を介したアセチル化によってプロモーターにリクルートされ、TRIM24と協力してヒストンH2BのK120をモノユビキチン化した。これらのヒストン修飾の変化は、PLK1を介したHSF1-S419のリン酸化によって引き起こされ、HSP70プロモーターにおけるHSF1-転写複合体を安定化させる。さらに、メラノーマ細胞ではHSF1-S419のリン酸化が構成的に亢進し、増殖を促進することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、HSF1-TRRAP-TIP60複合体が、HSF1結合領域周辺のクロマチン修飾を変化させ、がん細胞の増殖に関与することを明らかにした。この複合体形成はHSF1のS419リン酸化に依存した。さらに、マウスを用いた実験から、この複合体の形成阻害するHSF1-S419変異体はメラノーマ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-TRRAP-TIP60複合体の解析から、腫瘍形成に重要なHSF1リン酸化依存的な活性型クロマチン状態の確立の新規メカニズムを提供し、このメカニズムをターゲットとした新たな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)：I demonstrate that HSF1 recruits the TRRAP-TIP60 acetyltransferase complex in HSP70 promoter during heat shock in a manner dependent on phosphorylation of HSF1-S419. TRIM33 recruited to the promoter by interactions with HSF1 and an TIP60-mediated acetylation mark, and cooperated with the related factor TRIM24 for mono-ubiquitination of histone H2B on K120. These changes in histone modifications are triggered by phosphorylation of HSF1-S419 via PLK1, and stabilize the HSF1-transcription complex in HSP70 promoter. Furthermore, the HSF1-S419 phosphorylation is constitutively enhanced in and promotes proliferation of melanoma cells. Our results provide novel mechanisms for HSF1 phosphorylation-dependent establishment of an active chromatin status, which is important for tumorigenesis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：HSF1 TRRAP TIP60 TRIM33 PLK1 メラノーマ細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞は、温熱に曝されると一群の熱ショック蛋白質(HSP)、またはシャペロンを誘導することでプロテオスタシス(蛋白質ホメオスタシス)を維持しようとする。この応答は熱ショック応答と呼ばれる普遍的な生体防御機構であり、主に熱ショック転写因子(HSF)によって制御される。つまり、HSFは、プロテオスタシス容量の主要な調節因子である。HSFはさらに、個体発生と維持、老化と関連した神経変性疾患やがんの発生や進展にも重要な役割を担うことが明らかにされている。哺乳動物細胞のHSF群の中で、熱ショック応答によるHSP遺伝子の発現誘導を担うのはHSF1である。研究代表者はこれまでに、細胞抽出液中でのHSF1相互作用蛋白質解析を基盤として2つの熱ショック応答の準備機構を明らかにした。まず、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HSP70の転写を速やかに促進できる環境を整えていた。次に、HSF1-PARP13-PARP1複合体がポリADPリボシル化(PAR化)酵素PARP1をHSP70プロモーターに留めておき、熱ショック条件下で自己PAR化したPARP1は複合体から解離し、最初はプロモーター領域、その後遺伝子コード領域へと移動することでクロマチン弛緩を促進させた。同時に起こるPARP13解離は、HSF1のプロモーターへの結合を促進することでHSP70転写を誘導することも明らかにした。また、DNA損傷時にもこの複合体のPARP1が活性化し、自己PAR化したPARP1がHSF1-PARP13から解離してDNA損傷誘導遺伝子群の遺伝子上に再分布することで遺伝子発現誘導を促進していた。同時に、自己PAR化したPARP1はDNA損傷部位へ速やかに再分布し、DNA修復も促進する。これまでに、熱ショック誘導性のクロマチン制御に関しては、HSP70プロモーター領域でのクロマチン修飾変化やヒストンバリエーションH3.3の入替えの現象が知られている。しかしながら、哺乳動物細胞での、熱ストレス後のHSP70プロモーター上で起こるエピゲノム状態とクロマチン構造の調節機構の解明は十分な研究が行われていない。

2. 研究の目的

これまでに、ショウジョウバエの一つしかないHSFによる転写制御機構が古くから研究されてきた。それによると、熱ストレスにより活性化されたHSFがHSP70プロモーターに結合し、転写活性化に働くヒストン修飾(H3K4me3、H3K9ac、H3K27ac、H3K18acなど)を導き、転写を促進する。しかし、HSFと相互作用するヒストン修飾関連因子は明らかにされていない。一方、哺乳動物細胞でのHSF1による転写制御機構はショウジョウバエとは異なる点が少なくはなく、熱ストレス後のHSP70プロモーター上で起こるエピゲノム状態とクロマチン構造の調節機構も不明なままである。近年、ヒストン修飾が転写誘導の際のクロマチン構造変化に重要な働きを担うことが分かり、ヒストン修飾と疾患の関係も明らかになってきた。HSF1転写複合体に含まれるヒストン修飾関連因子を同定することで、プロテオスタシス容量破綻で起こる神経変性疾患にクロマチン構造変化が関与することを提唱できる可能性がある。さらに、HSF1はがん形成に関与していること、またがん細胞ではヒストン修飾変化が驚くほどの高頻度で起こっていることが知られている。

ゲノム上の熱ストレス特異的なHSF1転写複合体蛋白質をChIPアッセイ法と質量分析法を統合したChIP-MS解析法を用いて同定している。以前の細胞抽出液を用いたHSF1免疫沈降法と異なり、当該ChIP-MS法ではエピジェネティック制御のwriterと関連するヒストンアセチル基転移酵素複合体因子TRRAPやエピジェネティック制御のreaderであるTRIM24やTRIM33を同定した。そこで、第一の研究目的は、HSF1とTRRAP、TRIM24、TRIM33の相互作用の詳細を明らかにし、熱ストレスによるこの複合体のゲノム上の集積部位とターゲット遺伝子を同定する。TRIM24とTRIM33は複合体を形成し、TRRAPはヒストンアセチル基転移酵素(HAT)であるTIP60やGCN5と複合体を形成することが知られている。そこで、第二として、HSF1-TRRAP複合体に含まれるHATの同定を行い、熱ストレス後のクロマチン修飾変化を解明する。これらの因子群とHSF1は熱ストレス条件下で複合体を形成し、クロマチン制御とHSP誘導を介してプロテオスタシス容量調節の鍵となる複合体であることが示唆される。第三に、HSF1-TRRAP複合体とHSF1-TRIM複合体が蛋白質ホメオスタシスへ関与し、がんの新たな治療ターゲットになり得るかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HSF1とTRRAPの相互作用を明らかにするために、HeLa細胞の非ストレス状態と熱ストレス下でのHSF1とTRRAPの相互作用を細胞質と核画分抽出液を用い、免疫沈降法で検討する。さらに、HSF1は熱ショックで高度にリン酸化を受けることが知られており、既知のHSF1リン酸化部位変異体とTRRAPとの相互作用を検討する。

(2) HSF1-TRRAP複合体に含まれるヒストンアセチル基転移酵素を同定する。これまでに、TRRAPはNuA4/TIP60ヒストンアセチル基転移酵素複合体の構成因子であることが知られている。TIP60がHSP70プロモーターにリクルートされるかをChIPアッセイ法で検討する。さらに、HeLa細胞の内在性HSF1を同定したHSF1変異体に置換しTIP60のリクルート、またHSP70プロモーター

領域にChIP-MSで同定したTRIM24あるいはTRIM33がリクルートされるかを調べる。

(3) HSF1-TRRAP複合体によるクロマチン修飾変化を調べる。HeLa細胞の内在性HSF1を同定したHSF1変異体(HSF1-S419AあるいはHSF1-S419G)に置換し、*HSP70*プロモーター領域でのヒストンH3やH4のアセチル化の変化をそれぞれの特異的抗体を用いてChIPアッセイ法で明らかにする。クロマチンリーダーであるTRIM24やTRIM33がヒストンアセチル化依存的に*HSP70*プロモーターにリクルートされるか、またTRIM24とTRIM33がH2BK120のコピキチン化に関わるかをChIPアッセイ法で検討する。

(4) HSF1-TRRAP複合体がタンパク質ホメオスタシスに関わるかを検討する。HeLa細胞の内在性HSF1をHSF1変異体に置換し、熱ストレス化での細胞生存やコピキチン化タンパク質の蓄積変化をウエスタンブロット法で調べる。

(5) 様々なヒトメラノーマ細胞株(MeWo, HMV-1, MMAc)でのHSF1-S419リン酸化状態をウエスタンブロット法で調べる。ヒトメラノーマ細胞の、内在性HSF1をHSF1変異体に置換し、細胞増殖を調べた。さらに、MeWo細胞を上記と同様の処理をし、ヌードマウスの皮下に投与し腫瘍形成の変化を検討する。

4. 研究成果

(1)ChIP-MS解析から、熱ストレスによりHSF1に相互作用するタンパク質として236個を同定した。その中にはTRIM33、TRIM24、TRRAP、およびEP300(p300)とCREBBP(CBP)などヒストン修飾に関連する遺伝子が存在していた。SAGAやTIP60 HAT複合体の足場であるTRRAPに注目して解析を行った。HSF1とTRRAPの相互作用を免疫沈降法で調べた結果、熱ショック細胞の核抽出液でTRRAPがHSF1と共沈していることを発見した(図1A)。次に、HSF1は熱ショック時にリン酸化されることから、HSF1とTRRAPの相互作用への関与を検討した。その結果、HSF1-S419変異体を除く大部分のHSF1リン酸化部位変異体は、熱ショック細胞からの抽出液中でTRRAPと共沈することが分かった(図1B)。以上のことから、HSF1とTRRAPの相互作用にはHSF1-S419のリン酸化が必要であることを明らかにした。

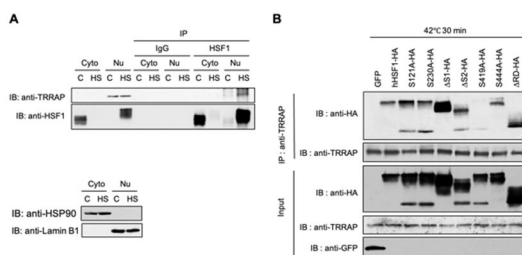


図1. HSF1とTRRAPの相互作用

(2) TRRAPはTIP60やGCN5を含むいくつかのHAT複合体の共通サブユニットである。熱ストレスでTRRAPに相互作用するタンパク質を質量分析法で解析した結果、p400, ING3, GAS41, BAF53, TIP60などのTRRAP-p400-TIP60(NuA4)複合体の構成要素が含まれていた。そこで、ChIPアッセイ法により、*HSP70*プロモーターへのTIP60が存在するかを検討した。TIP60は熱ショックにより*HSP70*プロモーターにリクルートされたが、HSF1ノックダウン(HSF1-KD)やhHSF1-S419変異体に置換した細胞では、TIP60量は顕著に減少した(図2A)。同様の方法で調べた結果、TRIM33の*HSP70*プロモーターへのリクルートは、HSF1-S419リン酸化に依存していることが分かった(図2B)。これらの結果から、HSF1-TRRAP-TIP60複合体がHSF1-S419のリン酸化により*HSP70*プロモーターにリクルートし、ヒストンのアセチル化を引き起こすことを明らかにした。また、TRIM33の*HSP70*プロモーターへのリクルートには、HSF1結合とヒストンのアセチル化が必須であることが示唆された。

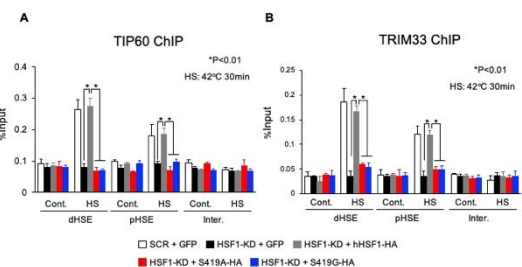


図2. TIP60とTRIM33は*HSP70*プロモーターにリクルートされる

(3) TRRAPを含むHAT複合体が、*HSP70*プロモーターのヒストンアセチル化に与える影響を始めて調べた。アセチル化ヒストンH3(H3ac)とH4(H4ac)のレベルは熱ショック中に著しく上昇し、hHSF1-S419変異体への置換により、アセチル化ヒストン量は減少した(図3A)。TRIM33は、H3K18acを認識するヒストンリーダーであることが知られている。ChIPアッセイ法により、TRRAPまたはTIP60のノックダウンは、熱ショックによってH3K18acとH4K16acのマークを消失させた(図3B)。TRIM33とTRIM24はRINGドメインを持ちコピキチン化酵素としても働く。そこで転写活性化のヒストンマークであるH2BK120のコピキチン化への影響を調べた。TRIM33またはTRIM23のノックダウンは、熱ショック中のH2BK120ubレベルを減少させた(図3C)。さらに、H2BK120ubレベルの増加は、内在性TRIM33をRINGドメイン変異体HA-hTRIM33-C125A/C128Aで置換することで

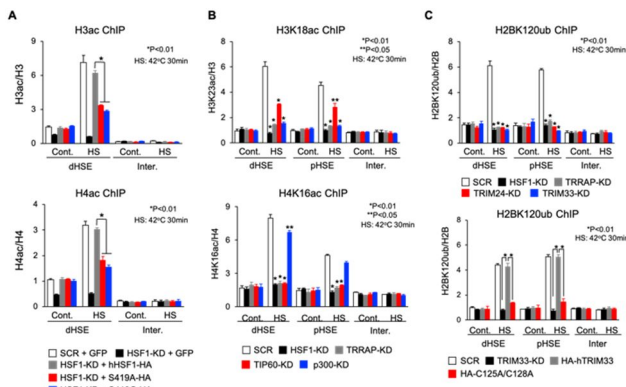


図3. HSF1-TRRAP複合体は*HSP70*プロモーターのヒストン修飾を変化させる

図3. HSF1-TRRAP複合体は*HSP70*プロモーターのヒストン修飾を変化させる。さらに、H2BK120ubレベルの増加は、内在性TRIM33をRINGドメイン変異体HA-hTRIM33-C125A/C128Aで置換することで

抑制された。これらの結果から、HSF1-TRRAP 複合体が熱ショック時 *HSP70* プロモーターのアセチル化を変化させ、さらにアセチル化依存的にリクルートされる TRIM33 が H2BK120 のユビキチン化に必要であることが示された。

(4) HSF1-S419 のリン酸化がプロテオスタシス能と関連しているかどうかを調べた。その結果、TRRAP のノックダウンまたは hHSF1-S419 変異体への置換により、極端な熱ショック時の細胞生存率が著しく低下することが分かった (図 4A)。また、細胞生存率の低下は、細胞内の不溶性ユビキチン化タンパク質の蓄積の増加を伴っていた (図 4B)。これらの結果は、HSF1-S419 のリン酸化が熱ショック中のプロテオスタシス能を維持するのに必要であることが示された。

(5) がん細胞では慢性的なタンパク質毒性ストレスに対処するために HSF1 が活性化されている。特にメラノーマ細胞の増殖は HSF1 に強く依存していることから、S419 のリン酸化ががん細胞の増殖に与える影響について検討した。様々なヒトメラノーマ細胞株 (MeWo, HMV-1, MMac) では HSF1-S419 が高度にリン酸化されていたが、不死化細胞 (OUMS-36T) では僅かなリン酸化のみ見られた (図 5A)。hHSF1-S419 変異体への置換は、メラノーマ細胞株の増殖を約 50% 減少させたが、不死化細胞の増殖には影響を与えなかった (図 5B)。内在性の HSF1 を HSF1-S326、hHSF1-S419 あるいは両変異体に置換した MeWo 細胞をヌードマウスの皮下に投与し、異種移植実験を行った。HSF1-S326A または hHSF1-S419A を発現する MeWo 細胞による腫瘍形成は、野生型 HSF1 を発現する細胞よりも腫瘍形成を顕著に抑制し、さらに両変異体は単独変異体よりも腫瘍形成を抑制した (図 5C)。これらの結果は、HSF1-S419 リン酸化がメラノーマ細胞の増殖や腫瘍形成に強く影響することを示唆している。

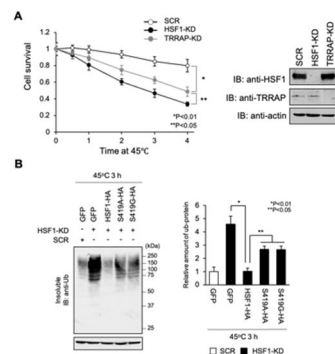


図4. HSF1-TRRAP複合体はプロテオスタシスの維持に必要である

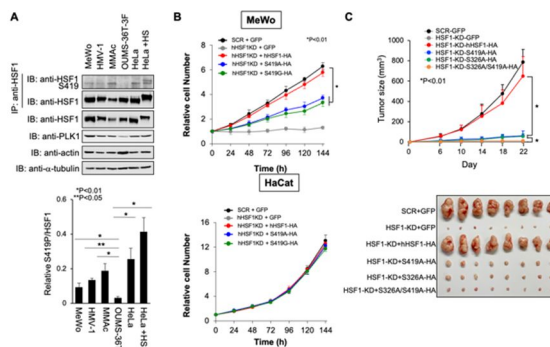


図5. HSF1-S419のリン酸化が腫瘍形成を亢進させる

<引用文献>

Mitsuaki Fujimoto, Eiichi Takaki, Ryosuke Takii, Ke Tan, Ramachandra Parkasam, Naoki Hayashida, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume and Nakai Akira. RPA assists HSF1 access to nucleosomal DNA by recruiting histone chaperone FACT. *Mol. Cell* 48, 182-194, 2012.

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.

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.

Hyunjung Kim, Kyu Heo, Jongkyu Choi, Kyunghwan Kim and Woojin An. Histone variant H3.3 stimulates HSP70 transcription through cooperation with HP1. *Nucleic Acids Res.* 39, 8329-8341, 2011.

Michael J. Guertin and John T. Lis. Chromatin Landscape Dictates HSF Binding to Target DNA Elements. *PLoS Genet.* 6, e1001114, 2010.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Srivastava Pratibha, Takii Ryosuke, Okada Mariko, Fujimoto Mitsuaki, Nakai Akira	4. 巻 595
2. 論文標題 MED12 interacts with the heat shock transcription factor HSF1 and recruits CDK8 to promote the heat shock response in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1933 ~ 1948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katiyar Arpit, Fujimoto Mitsuaki, Tan Ke, Kurashima Ai, Srivastava Pratibha, Okada Mariko, Takii Ryosuke, Nakai Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 HSF1 is required for induction of mitochondrial chaperones during the mitochondrial unfolded protein response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1135 ~ 1148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12863	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takii Ryosuke, Fujimoto Mitsuaki, Matsumoto Masaki, Srivastava Pratibha, Katiyar Arpit, Nakayama Keiich I, Nakai Akira	4. 巻 38
2. 論文標題 The pericentromeric protein shugoshin 2 cooperates with HSF1 in heat shock response and RNA Pol II recruitment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e102566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019102566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤本 充章
2. 発表標題 Phosphorylation of HSF1 facilitates establishment of active chromatin states and maintains proteostasis in cancer cells
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本 充章
2. 発表標題 HSF1-TRRAP複合体によるエピゲノムとプロテオスタシス容量の制御
3. 学会等名 第15回 日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本 充章
2. 発表標題 HSF1-S419リン酸化による熱ショック応答の調節
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本 充章
2. 発表標題 HSF1-PARP複合体のPAR化とリン酸化による熱ショック応答の調節
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本 充章
2. 発表標題 HSF1-TRRAP複合体によるプロテオスタシス容量の制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山口大学大学院医学系研究科 医化学講座
<http://ds22.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~seika2/index-3.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------