

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06500

研究課題名(和文)核-細胞質間輸送分子Hikeshiが制御するHSP70核内機能とストレス応答

研究課題名(英文) Nuclear function and stress response of HSP70 regulated by nucleocytoplasmic transport carrier Hikeshi

研究代表者

小瀬 真吾 (Kose, Shingo)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：90333278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子シャペロンHSP70が、熱ストレス時だけでなく、正常温度においてもHikeshiによって細胞質から核に輸送されることを明らかにした。多くの熱ストレスタンパク質は転写因子HSF1によって発現誘導されるが、HSP70が核内で機能することが、HSF1の活性制御と適切な熱ストレス応答に必要であることを明らかにした。さらに、HSP70が核で機能することが、核でのタンパク質恒常性維持に重要であることを明らかにし、HikeshiによるHSP70の核内輸送の重要性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Hikeshiによって核に輸送される分子シャペロンHSP70は、細胞生存に必須であり、その機能は多岐にわたる。しかし、これまでのHSP70の機能解析の多くは細胞質での機能についてであり、核内におけるHSP70の機能解析は非常に少なかった。Hikeshiの輸送機能を阻害することで、HSP70の核内移行を阻害することが初めて出来るようになり、HSP70の核内機能に焦点を当てた解析が可能となった。本研究成果は、神経変性疾患発症機序理解の基礎ともなるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that Hikeshi regulates the nucleocytoplasmic distribution of HSP70 not only under heat-shock conditions but also under nonstressed conditions. We demonstrated that the function of nuclear HSP70 is necessary for the regulation of transcriptional activity of HSF1 and for an appropriate heat stress response. Furthermore, we demonstrated that the function of nuclear HSP70 is important for maintaining nuclear protein homeostasis. These results indicate the importance of the Hikeshi-mediated nuclear import of HSP70.

研究分野：核-細胞質間輸送

キーワード：核-細胞質間輸送 分子シャペロン 熱ストレス応答 転写制御 Hikeshi HSP70 HSF1

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物では、機能分子の核と細胞質間の局在変化は厳密に制御されており、その機構の破綻は、細胞、個体において様々な障害を及ぼす。核-細胞質間分子流通の大部分は、運搬体分子である Importin  $\beta$ ファミリーを中心とする輸送システムによって担われている。近年、この輸送システムの機能的変化が、細胞分化やストレス応答に重要であることが判ってきた。本研究者は、熱ストレス時には、Importin  $\beta$ ファミリーの輸送効率が抑制される一方で、分子シャペロン HSP70 の細胞質から核への移行は促進されることを見出し(Genes Cells, 2004)、30年以上不明であった HSP70 の運搬体分子「Hikeshi (火消し)」を同定した(Cell, 2012)。そして、Hikeshi と HSP70 の核内機能が、熱ストレスに対しての細胞防御に必要であることを明らかにした。

Hikeshi 遺伝子は、真核生物で広く保存されている。本研究者は、ヒト Hikeshi 遺伝子のミスセンス点変異 Val54Leu が、ミエリン形成不全による白質ジストロフィーを伴う重篤な家族性遺伝疾患の起因となることを明らかにした(J. Med. Genet., 2016)。また、別グループが別の Hikeshi 変異 Cys4Ser も似た症状の遺伝性疾患となることを報告している(Eur. J. Hum. Genet. 2017)。これらの疾患の発症機序は不明であるが、Hikeshi が、熱ストレス時以外にも機能を持ち、個体発生においても重要な役割があることを示唆する結果であった。

## 2. 研究の目的

Hikeshi の輸送基質である分子シャペロン HSP70 は、細胞生存に必須であり、新生ペプチド鎖のフォールディングに始まり、その機能は多岐にわたる。しかし、精力的になされてきた HSP70 の機能解析は主に細胞質での機能についてであり、核内での HSP70 の機能解析は細胞質機能と比べると非常に少ない。Hikeshi 機能を阻害することで、HSP70 の核内移行を阻害することが初めて可能になった。そのため、Hikeshi ノックアウト細胞を利用することで、HSP70 の核内機能に焦点を当てた解析が可能となった。

予備の結果として、Hikeshi ノックアウト細胞では、HSP70 や HSP40 など熱ストレスタンパク質の発現が亢進されていることを見出していた。これらの熱ストレスタンパク質は熱ストレス応答のマスター転写因子である HSF1(Heat shock factor 1)によって発現誘導される。本研究計画では、Hikeshi の機能解析を通して、HSF1 活性制御やタンパク質恒常性維持など HSP70 の「核内」機能の一端を明らかにすることを研究目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 分子シャペロン HSP70 の細胞内局在制御における Hikeshi の機能解析

Hikeshi は熱ストレス時に HSP70 を細胞質から核に輸送する運搬体分子として同定された。熱ストレス時だけでなく、正常温度においても Hikeshi が HSP70 の核内移行を制御するのかわかりやすくするため、Hikeshi ノックアウト細胞を用いて、HSP70 の細胞内局在を免疫染色によって観察した。細胞は、HeLa がん細胞と正常細胞に近い hTERT-RPE1 細胞、それぞれの野生型細胞と Hikeshi ノックアウト細胞を用いた。

### (2) Hikeshi ノックアウト細胞での HSF1 関連遺伝子の発現解析

予備の結果として、Hikeshi ノックアウト細胞は、野生型細胞に比べて、正常温度においても転写因子 HSF1 によって転写される遺伝子(HSF1 関連遺伝子)の発現が亢進していることが、RNA-seq 解析によって明らかになった。この結果をさらに確認するために、幾つかの HSF1 関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR で解析した。

### (3) 核内 HSP70 による HSF1 活性制御の解析

HSF1 転写活性における HSP70 の核内機能を明らかにするため、上流に HSF1 応答配列(熱ショック応答配列)をもつルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドを Hikeshi ノックアウト細胞と野生型細胞に導入し、リポーターアッセイによって HSF1 転写活性を比較した。さらに、核局在化シグナル(NLS)を付加した HSP70(NLS-HSP70)を発現させると、HSF1 転写活性がどう変化するのかを調べた。

さらに、NLS-HSP70 安定発現細胞を樹立し、HSF1 関連遺伝子の発現がどう変化するのかを RNA-seq とリアルタイム PCR で解析した。

### (4) 核内タンパク質恒常性維持機構における HSP70 の役割解析

ルシフェラーゼをモデルタンパク質として使用し、Hikeshi ノックアウトが核内タンパク質の構造的維持、恒常性維持に与える影響を解析した。ルシフェラーゼは通常、時間経過とともにタンパク質構造が不安定化し、酵素活性が失活していく。通常のもので核局在化シグナルを付加したルシフェラーゼ発現プラスミドを野生型と Hikeshi ノックアウト細胞に導入し、シクロヘキ

シミドでタンパク質合成を阻害した後、ルシフェラーゼの残存酵素活性を測定した。各条件でのルシフェラーゼ活性の失活程度を比較することで、核と細胞質のタンパク質構造安定性を解析した。

神経変性疾患の一つとして、ポリグルタミン病が知られている。ポリグルタミン病は、特定のタンパク質のポリグルタミン鎖が異常伸長し、変異タンパク質として発現することで、神経細胞内に封入体として蓄積することで生じる。ポリグルタミン(polyQ)タンパク質にNLSもしくは核外移行シグナル(NES)を付加して、核もしくは細胞質に発現誘導し、polyQタンパク質の凝集体形成と細胞毒性を指標に、核内タンパク質の恒常性維持活性を解析した。

#### (5) Hikeshi ノックアウト細胞の熱ストレス応答解析

Hikeshi ノックアウト細胞でも熱ストレス応答が適切に起こるかどうかを明らかにするために、熱ストレスに応答して発現が誘導される遺伝子(熱ストレス応答遺伝子)の発現量をRNA-seqで解析した。特定のHSF1関連遺伝子に関してはさらにリアルタイムPCRで定量解析を行った。正常時、熱ストレス時、熱ストレス解除後の回復期(熱ストレス解除後、1.5時間、3時間、4.5時間)の野生型細胞とHikeshi ノックアウト細胞のmRNA発現解析を行い、比較検討した。熱ストレスは43℃、1時間の処理で導入した。

### 4. 研究成果

#### (1) Hikeshi は正常温度においても分子シャペロン HSP70 の細胞内局在を制御する

正常温度において、HSP70の大部分は細胞質に局在しているが、少し核にも存在している。しかし、HeLaがん細胞と正常細胞に近いhTERT-RPE1細胞のHikeshi ノックアウト細胞では、野生型細胞と比べて、核内HSP70が減少していた。Hikeshiは、正常温度においてもHSP70を核に輸送する活性を持ち、HSP70の核-細胞質間局在を制御していることが判った。

#### (2) 正常温度の HSF1 転写活性制御に核内 HSP70 が重要である

RNA-seq解析から、Hikeshi ノックアウト細胞では、野生型細胞に比べて、HSF1によって転写される遺伝子(HSF1関連遺伝子)の発現が亢進していることが判った。同様の結果は、各HSF1関連遺伝子をターゲットにしたリアルタイムPCRによるmRNA発現解析でも確認出来た。さらに、HSF1応答配列(熱ショック応答配列)を用いたルシフェラーゼ転写リポーターアッセイでも、Hikeshi ノックアウト細胞ではリポーター遺伝子の発現亢進が確認された。これらの結果から、Hikeshi ノックアウト細胞では、野生型細胞と異なり、正常温度においてもHSF1が少し活性化していることが明らかとなった。

Hikeshi ノックアウト細胞では正常温度においても核内HSP70が野生型細胞に比べて減少していたので、HSF1転写活性における核内HSP70の効果を確認した。Hikeshi ノックアウト細胞に核局在化HSP70(NLS-HSP70)を発現させると、HSF1応答配列転写リポーターアッセイで顕著な発現抑制が観察された。また、NLS-HSP70安定発現細胞で、HSF1関連遺伝子の発現をRNA-seq及びリアルタイムPCRで解析すると、野生型細胞に比べて顕著に発現が抑制されていた。これらの結果から、正常温度でのHSF1活性抑制に核内HSP70が重要であることが強く示唆された。

#### (3) 核内タンパク質恒常性維持に核内 HSP70 が重要である

核局在化ルシフェラーゼをHikeshi ノックアウト細胞に発現させると、野生型細胞に比べて、核局在化ルシフェラーゼの酵素活性が早く失活した。そして、Hikeshi もしくは核局在化HSP70(NLS-HSP70)をHikeshi ノックアウト細胞に導入すると、核局在化ルシフェラーゼの失活が抑制された。また、細胞質に発現させたルシフェラーゼの失活は、野生型細胞とHikeshi ノックアウト細胞で違いが見られなかった。

核局在化ポリグルタミンタンパク質(NLS-polyQ)を細胞に発現導入すると、核外移行シグナルを付加したポリグルタミンタンパク質(NES-polyQ)に比べて、強い細胞毒性を持ち、アポトーシスが誘導された。そして、野生型細胞に比べて、Hikeshi ノックアウト細胞は、より強い細胞毒性感受性を示し、アポトーシスが強く誘導された。このHikeshi ノックアウト細胞でのNLS-polyQ発現によるアポトーシス誘導も、Hikeshi もしくは核局在化HSP70をHikeshi ノックアウト細胞に発現誘導することで抑制された。

以上の結果から、Hikeshiによって核に輸送されるHSP70が、正常温度下においても、核でのタンパク質構造維持やタンパク質恒常性維持機構に重要な役割を持っていることが示された。

#### (4) 核内 HSP70 による HSF1 活性制御が適切な熱ストレス応答に重要である

野生型細胞において、熱ストレスに応答してmRNA発現が二倍以上上昇する遺伝子を熱ストレス応答遺伝子と定義し、それらの遺伝子のmRNA発現量変化をRNA-seqとリアルタイムPCRで解析した。野生型細胞では、熱ストレスを解除すると、熱ストレス応答遺伝子の発現量は徐々に低下していく。しかし、Hikeshi ノックアウト細胞では、まず熱ストレス時の発現上昇率が野生型細胞に比べて低く、さらに熱ストレスを解除した細胞ストレス回復期においても、発現量が低下

せず、逆に徐々に上昇していくことが判った。熱ストレス解除後の回復期(3時間後)においては、Hikeshi ノックアウト細胞では、野生型細胞よりも熱ストレス応答遺伝子の発現量が多くなった。これらの結果から、HSP70 が核内で HSF1 の転写活性制御に関与し、適切な熱ストレス応答に重要な役割を持っていることが示唆された。

主に細胞質に局在する分子シャペロン HSP70 の機能解析の多くは、細胞質イベントのものであった。しかし、本研究によって、HSP70 は正常温度においても、Hikeshi によって核に輸送されていることが判った。そして、核に輸送された HSP70 は、HSF1 など転写因子の活性制御やタンパク質恒常性維持に重要であることが明らかとなった。HSP70 の核内機能の重要性が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kose, S., Imai, K., Watanabe, A., Nakai, A., Suzuki, Y., Imamoto, N.	4. 巻 5
2. 論文標題 Lack of Hikeshi activates HSF1 activity under normal conditions and disturbs the heat-shock response.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sci. Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202101241.	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11件（うち招待講演 6件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小瀬真吾、渡邊愛、今本尚子
2. 発表標題 Hikeshiによる分子シャペロンHSP70核輸送：HSF1転写制御と核タンパク質恒常性機構における役割
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小瀬真吾、渡邊愛、今本尚子
2. 発表標題 Hikeshiによる分子シャペロンHSP70の核輸送が適切なHSF1転写制御とタンパク質恒常性維持に重要である
3. 学会等名 第16回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小瀬真吾、渡邊愛、今本尚子
2. 発表標題 HikeshiによるHSP70核輸送：温度依存性、転写制御・核タンパク質恒常性機維持における役割
3. 学会等名 Biothermology Workshop 2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shingo Kose, Naoko Imamoto
2. 発表標題 Analysis of physiological functions of Hikeshi, a nuclear import factor of HSP70
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 小瀬真吾、今本尚子
2. 発表標題 Hikeshiによる分子シャペロンHSP70核輸送とその機能
3. 学会等名 第14回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小瀬真吾、渡邊愛、今本尚子
2. 発表標題 Hikeshiによる分子シャペロンHSP70核輸送：その分子メカニズムと細胞機能
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小瀬真吾、渡邊愛、今本尚子
2. 発表標題 HSP70核移行運搬体分子Hikeshiが制御する細胞ストレス応答とその役割
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小瀬真吾、渡邊愛、今本尚子
2. 発表標題 Hikeshiによる分子シャペロンHSP70の核輸送とその機能：転写活性制御と核タンパク質恒常性維持における役割
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小瀬真吾、渡邊愛、今本尚子
2. 発表標題 Hikeshiによる分子シャペロンHSP70の核移行とその機能
3. 学会等名 第17回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小瀬真吾、渡邊愛、今本尚子
2. 発表標題 HSP70核輸送運搬体分子Hikeshiが制御するストレス顆粒形成の解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------