

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22570171
 研究課題名（和文） DNA複製・修復因子RPAによる熱ショック転写因子HSF1の転写制御機構
 研究課題名（英文） Transcriptional regulation of HSF1 by RPA
 研究代表者
 藤本 充章 (FUJIMOTO MITSUAKI)
 山口大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：80359900

研究成果の概要（和文）：

HSF1は熱ショックなどのストレスによって、DNAのアクセスが顕著に亢進することが分かっている。しかしながら、高等動物でのHSF1のDNAアクセスのメカニズムはよく分かっていない。HSF1がRPAと相互作用することが分かった。RPAの減衰により、定常状態でのHSFP70遺伝子プロモーター領域へのHSF1アクセスの低下が見られ、HSP70発現の遅れが観察された。HSF1-RPA複合体は、RNAポリメラーゼIIのプレロードを導き、さらにFACTをさらに呼び込むことで、クロマチン構造を開かせることを明らかにした。この複合体は、がん細胞の増殖に必要なことも分かった。

研究成果の概要（英文）：

Heat shock factor 1 (HSF1) plays roles in control and stressed conditions by gaining access to target elements, but mechanisms of HSF1 access are not well known in mammalian cells. I found the physical interaction between the wing motif of human HSF1 and replication protein A (RPA), which is involved in DNA metabolism. Depletion of RPA1 abolishes HSF1 access to the promoter of HSP70 in unstressed condition and delays its rapid activation in response to heat shock. The HSF1-RPA complex leads to preloading of RNA polymerase II and opens the chromatin structure by recruiting a histone chaperone, FACT. Furthermore, this interaction is required for melanoma cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、分子生物学

キーワード：HSF1, RPA, FACT, がん

1. 研究開始当初の背景

生物が高温にさらされると一群の熱ショック蛋白質(HSP)が誘導されるシステムが備

わっており、その転写制御に関わっているのが熱ショック転写因子(HSF)である。この応答は熱ショック応答と呼ばれ、基本的な生体

防御機構の一つである。酵母やショウジョウバエでは単一の HSF 遺伝子が存在するが、高等動物においては HSF 遺伝子ファミリー (HSF1, HSF2, HSF3, HSF4) を形成している。申請者らの HSF 欠損マウスの解析から、HSF1 欠損マウスにおいて抗体産生が低下していることを見だし、HSF1 がクロマチンの構造変化を引き起こすことによって IL-6 遺伝子の転写制御を行うことを明らかにした。さらに、HSF4 欠損マウスにおいては感覚器のレンズの発生や分化に関与していることを明らかにした。HSF4 の DNA 結合領域を半網羅的に調べてみると、プロモーター領域以外のイントロンあるいは近傍の遺伝子から離れた領域に存在する傾向が見られた。HSF4 は結合領域の近傍に存在する多くの遺伝子の発現に影響を与えないが、興味深いことに HSF4 結合領域周辺のヒストン H3K9 の脱メチル化が促進していることがわかった。また、熱ショック後に多くの近傍遺伝子が誘導され、HSF4 は HSF1 による転写誘導を速やかに行えるようにクロマチン構造変化を変えていることが示唆された。これらの解析から、HSF 群がクロマチン構造を制御することで転写調節を行うことが分かってきたが、その役割を担う HSF 複合体の詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

ショウジョウバエ HSF1 による古典的熱ショック遺伝子 (HSP) の転写制御機構は良く研究されており、遺伝子発現制御にクロマチン構造変化が関連していることが報告されている。しかしながら、高等動物の HSF1 の転写制御に関与する蛋白質群は未だ不明である。本研究では、最近同定したヒト HSF1 の結合蛋白質により促される HSF1 の活性制御、さらにクロマチン構造変化と関連したターゲット遺伝子の転写制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HEK293 細胞に Flag-HSF1 あるいは HSF1-Flag を高発現させ、Flag-抗体により共沈降してくる蛋白質として RPA (RPA1, RPA2, RPA3) をマス・スペクトル法によって同定した。そこで、HEK293 細胞を用い、免疫沈降法で *in vivo* の HSF1 と RPA の結合を熱ショックの有無によって調べる。一般的に RPA は RPA1, RPA2, RPA3 と三量体を形成している。よって、HSF1 に直接結合している RPA を同定するために、大腸菌から各 GST-RPA と HSF1-His の蛋白質を精製し、GST-pull down アッセイを行う。次に、HSF1 と直接結合する RPA と HSF1 の GST 融合欠損変異体を作製し、GST-pull down アッセイを行って両蛋白質の結合領域を同定する。また、HSF1-RPA 相互作用を阻害する HSF1 変異体も同定する。

(2) マウス線維芽細胞 (MEF) を用い、RPA1 ノックダウン後の HSP70 誘導変化を定量的 RT-PCR で調べる。HSF1 のターゲット遺伝子である HSP70 プロモーター領域に RPA がリクルートされるかをクロマチン免疫沈降法で調べる。また、RPA ノックダウンを行った際の HSF1 のリクルートも明らかにする。さらに、ヒストン H3, H2B, H3 (アセチル化、メチル化) を認識する特異的抗体を用いて、HSP70 遺伝子のクロマチン構造変化をクロマチン免疫沈降法で調べる。

(3) RPA1 は、酵母で転写伸張時にクロマチンの構造変換を促進する FACT と結合することが知られている。この FACT はヒストン H2A/H2B 二量体を解離させることで RNA ポリメラーゼ II の通過を容易にさせることができる。そこで、PRA1, RPA2, RPA3 のノックダウンを行った際のターゲット遺伝子上に存在する H2A/H2B の量に変化があるかをクロマチン免疫沈降法で調べる。

(4) HSF1-RPA 複合体によるヒストンタンパク質の除去、及びそれにもなう安定な結合が一般的な仕組みかどうかを明らかにするために、DNA マイクロアレイ解析によりターゲット遺伝子群を同定する。HSF1-RPA 相互作用を阻害する HSF1G87A 変異体を HSF1 ノックダウン MEF 細胞に導入し、HSF1-RPA 新規ターゲット遺伝子の発現変化を調べる。

(5) (4) の実験から、HSF1-RPA ターゲット遺伝子の幾つかの遺伝子は、がんの増殖や発生に関与する遺伝子であることが分かった。これまでに、HSF1 ががんの増殖に関与することが知られている。悪性黒色腫細胞 (MeWo, HMV-1) の増殖に HSF1 が必須であるかを明らかにするために、HSF1 をノックダウンし、細胞の増殖を調べる。HSF1 をノックダウンした悪性黒色腫細胞に野生型 HSF1 や HSF1G87 変異体を導入し、細胞増殖の抑制効果を検討する。さらに、これらの細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍の形成変化も調べる。

4. 研究成果

(1) HSF1 と RPA と相互作用を詳細に調べた結果、免疫沈降実験により RPA1, 2, 3 が熱ショックの有無に関わらず HSF1 と複合体を形成することを確認した。さらに、GST-pull down 法により、HSF1 が RPA1 に直接相互作用することが分かった。この相互作用は HSF1 の DNA 結合ドメインと PRA1 の一本鎖 DNA 結合ドメインを介していた。HSF1 の DNA 結合ドメインは、winged helix-turn-helix 構造をとるが、その中でも決まった構造をとらない wing モチーフ (13 アミノ酸からなる) に結合することが分かった。特に、87 番目のグリシン

に点変異を加えた HSF1 変異体(G87S, G87A) は RPA1 と相互作用しなかったが、このアミノ酸は酵母からヒトの HSF1 において wing モチーフの中で唯一保存されていた(図1)。

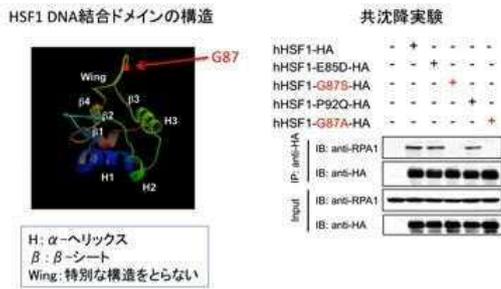


図1 RPA1はHSF1のwing motifに結合する

(2)MEF 細胞の RPA1 量を減少させると、非ストレス状態でも HSP70 の発現低下が観察された。HSF1 と RPA1 は非ストレス状態でも熱ショック応答配列(HSE)領域に存在することが分かった。驚いたことは、RPA1 をノックダウンすると、HSF1 は HSE 配列へほとんど結合できなかつた。内在性の HSF1 を RPA1 と結合できない変異体 HSF1G87A に置換すると、HSF1G87A も RPA1 も HSE 領域に存在できなかつた。つまり、HSF1 は RPA1 と複合体を形成することでプロモーターに結合できることが明らかとなった。RPA1 ノックダウンによって、HSP70 プロモーター領域のヒストン H3, H2B 量は増加し、クロマチン構造を緩めるヒストン修飾(H3K4me3, H3K9Ac, H3K27Ac)は減少した。さらに、転写開始点付近に停止した RNA ポリメラーゼ II はほとんど認められなくなった。この結果は、HSF1-RPA 複合体がクロマチン構造を開き、Pol II の呼び込みに関与することを示している(図2)。

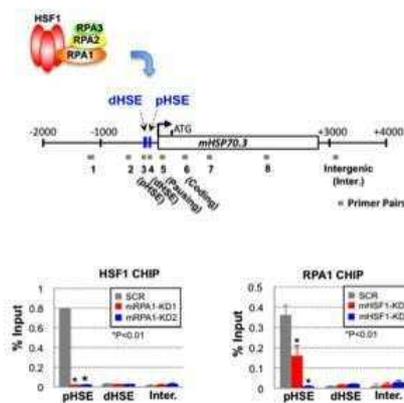


図2 HSF1のDNAへの結合にはRPA1が必要である

(3)ヒト RPA1 が FACT (Spt16 と SSRP1 の二量体) と相互作用するかを免疫沈降法で検討したところ、RPA1-FACT が複合体を形成することが分かった。さらに、SPT16 をノックダウ

ンすると、HSP70 プロモーター領域への HSF1 の結合量が減少し、ヒストン量 (H2B) が増加するとともにクロマチン構造を緩めるヒストン修飾は低下した。つまり、HSF1-RPA 複合体のヌクレオソーム DNA への結合は、一部は FACT によるヒストン除去によるものであることが分かった(図3)。

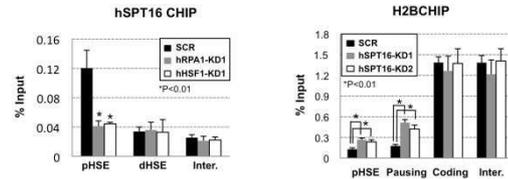


図3 HSF1-RPA1はFACTを引き寄せること
でヒストンタンパク質を除く

(4)HSF1 ノックダウンによって発現低下した遺伝子 (564 遺伝子) の 70%が RPA1 ノックダウンによっても低下した。その中の5つの遺伝子プロモーターを解析したところ、すべて HSF1-RPA1 複合体が存在していた。HSF1 ノックダウンした細胞へ野生型 HSF1 を再導入するとそれらの発現はもとのレベルにまで回復するが、変異体 HSF1G87A を導入してもそれらの遺伝子発現を全く変えなかつた。これらの結果は、一般に HSF1 を介する遺伝子発現には HSF1-RPA 複合体が関与していることを示している(図4)。

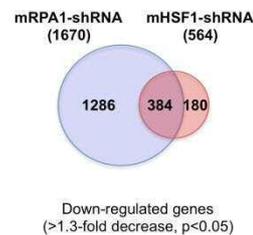


図4 DNAマイクロアレイ解析

(5)悪性黒色腫細胞(MeWo, HMV-1)の HSF1 ノックダウンは、その増殖を顕著に抑制した。HSF1 をノックダウンした悪性黒色腫細胞に野生型 HSF1 を再導入すると増殖は回復するが、RPA1 と相互作用できない変異体 HSF1G87A を導入しても全く回復しないことを明らかにした。これらの細胞をヌードマウスへ移植すると、野生型 HSF1 をもつ悪性黒色腫細胞は腫瘍を形成するが、変異体 HSF1G87A をもつ細胞は腫瘍をほとんど形成しなかつた。以上の結果は、HSF1-RPA 複合体の形成ががん細胞の増殖に必要であることを示している(図5)。

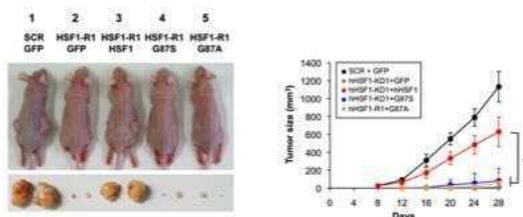


図5 HSF1-RPA1相互作用は腫瘍形成に必要である

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2件)

①Mitsuaki Fujimoto, Eiichi Takaki, Ryosuke Takii, Ke Tan, Ramachandran Prakasam, Naoki Hayashida, Shun-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. 査読有

②Shusaku Uchida, Kumiko Hara, Ayumi Kobayashi, Mitsuaki Fujimoto, Koji Otsuki, Hirotake Yamagata, Teruyuki Hobara, Naoko Abe, Fumihiro Higuchi, Tomohiko Shibata, Shunsuke Hasegawa, Satoshi Kida, Akira Nakai, and Yoshifumi Watanabe.

Impaired hippocampal spinogenesis and neurogenesis and altered affective behavior in mice lacking heat shock factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1681-1686, 2011. 査読有

[学会発表] (計4件)

①藤本充章、HSF1-RPA 複合体は腫瘍形成に必要である、第85回日本生化学会、2012年12月16日、福岡(マリンメッセ福岡)

②藤本充章、HSF1-RPA 複合体はヌクレオソーム構造をとるDNAにアクセスする、第34回日本分子生物学会、2011年12月16日、横浜(パシフィコ横浜)

③藤本充章、HSF1-RPA 複合体はHSP70遺伝子へのRNAポリメラーゼのプリロードに必要なである、第84回日本生化学会大会、2011年9月24日、京都(国立京都国際会館)

④藤本充章、DNA修復因子RPAはHSF1を介するHsp70誘導に必要なである、第33回日本分子生物学会大会・第83回日本生化学会大会、2010年12月10日、神戸(神戸国際会議場)

[その他]

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 充章 (FUJIMOTO MITSUAKI)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80359900