

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号： 15501  
 研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2011~2012  
 課題番号： 23790368  
 研究課題名（和文） 転写因子 ATF1 による熱ショック応答の制御機構の解明  
 研究課題名（英文） ATF1 modulate Heat shock response regulated by HSF1 activity.  
 研究代表者  
 瀧井 良祐 (TAKII RYOUSUKE)  
 山口大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号： 00419558

研究成果の概要（和文）：熱ストレス時における HSF1 の活性化機構を明らかにするために、HSF1 に結合するタンパク質を解析し、その構成タンパク質の1つである転写因子 ATF1 について解析を行った。マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用いて、ATF1 ファミリー群の中で ATF1 と CREM のノックダウンが、熱ストレスによる HSP70 誘導の減弱、及び回復過程の遷延を導くことを明らかにした。さらに ATF1 は BRG1 や p300/CBP を呼び込むために必要であることも分かった。

研究成果の概要（英文）：To identify HSF1 activation mechanisms, we screened HSF1 binding protein and we identified that ATF1 (activating transcription factor 1) functioned important role during heat shock. In MEF (mouse embryonic fibroblasts), ATF1 and CREM is required for heat-inducible HSP70 expression during heat shock and attenuation of HSF1 activity in recovery after heat shock. Then ATF1 is recruited to HSP70 promoter region during heat shock depend on HSF1 and ATF1 is necessary to recruit BRG1 and p300/CBP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、病態医化学

キーワード：HSF1、転写因子、ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は、温熱ストレスに曝されると一群の熱ショックタンパク質 (HSP) 及び多くの非 HSP タンパク質 (non-HSP) を誘導して適応

する。この仕組みは熱ショック応答と呼ばれ、タンパク質フォールディングを担う HSP とその分解を担う一部の non-HSP を介するタンパク質ホメオスタシス容量の調節機構で

ある。この応答は、熱ショック因子 (HSF、heat shock factor) によって主に転写のレベルで制御されている。HSF1 の構造と熱ストレスによる活性化の機構は進化の過程で保存されている。一般に、ストレスのない条件下であらかじめ存在する DNA に結合できない単量体 HSF1 (非活性型) が、ストレスによって DNA 結合型の三量体 (活性型) へ転換する。申請者らは、最近、DNA 複製と修復に必要な RPA が HSF1 と結合し、この HSF1-RPA 複合体が非ストレス状態で遺伝子上流のクロマチンを開けることで状態を維持することで、3 量体の HSF1 が速やかに DNA に結合できることを明らかにした (Fujimoto et al, Mol. Cell 2012)。しかし、熱ストレスによって三量体を形成した HSF1 が、その後、RNA ポリメラーゼを効率よく引き寄せて転写を促進する機構は未解明のままである。

## 2. 研究の目的

そこで、HSF1 による転写制御機構を明らかにするために、申請者らは HSF1 の相互作用タンパク質ネットワーク解析を行った (Fujimoto et al, Mol. Cell 2012)。その結果、HSF1 が、DNA 障害ストレスでリン酸化を受けて活性化する ATF1 (activating transcription factor 1) 及びそのファミリー (CREB、CREM) を同定した。これまでの研究から、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) において、ATF1 は、熱ストレスによる HSP70 の転写誘導に必要であり、さらに熱ストレスから回避した後の転写回復過程にも重要な役割を担っていることが分った。ATF1 は、HSP70 プロモーターへ直接結合する HSF1 を介して引き寄せられる。したがって、今後は、HSF1-ATF1 を核とする転写複合体をさらに解明すること

で、ATF1 を活性化する DNA 障害ストレスが熱ショック応答やタンパク質ホメオスタシスに及ぼす影響を明らかにできると考えた。

## 3. 研究の方法

HSF1 に結合し、HSF1 の転写活性を制御するタンパク質として同定した ATF1 の関連性を明らかにするために、まず ATF1 family タンパク質群 (ATF1, CREB, CREM) ノックダウン細胞における HSP70 発現誘導の影響を調べた。

また、熱刺激だけでなく、様々なストレス誘導物質による HSP70 の誘導に対しても ATF1 family タンパク質が必要であるか検討を行った。

さらに、HSF1 と ATF1 の結合を細胞におけるタンパク質過剰発現系により確認し、さらに両タンパク質の結合に必要なアミノ酸部位の同定を行った。

次に、HSP70 プロモーター部位における HSF1、ATF1 および転写の促進因子 BRG1 および p300/CBP のリクルートの解析を行う。さらにクロマチン部位での変化を調べ、これらの因子と転写誘導に対する影響を調べた。

## 4. 研究成果

我々は、HSF1 による転写調節機構を明らかにするために、HSF1 相互作用タンパク質の解析を行った。30 のタンパク質を同定し、その中で、まず HSF1-RPA (DNA 複製・修復因子) が、非ストレス条件下でヌクオソームを形成する DNA への結合に必要であることを報告した (Fujimoto et al, Mol. Cell 2012)。一方、熱ストレス条件での HSF1 複合体については未解明であった。本研究で、

世界ではじめて、HSF1 による転写誘導に、別の転写因子 ATF1 が極めて重要な役割を担っていることを明らかにした（未発表）。

まず、マウス胎児線維芽細胞（MEF）を用いて、ATF1 ファミリー群（ATF1、CREB、CREM）の中で ATF1 と CREM のノックダウンが、熱ストレスによる HSP70 誘導の減弱、及び回復過程の遷延を導くことを明らかにした。両遺伝子のノックダウンは同程度の効果であったので、以下の実験は ATF1 に焦点を絞った。

次に、ATF1 は、熱ストレスの際に HSF1 に依存して HSP70 プロモーターへリクルートされること、そのリクルートには ATF1 の DNA 活性を必要としないことを明らかにした。

さらに、ATF1 は BRG1 や p300/CBP を呼び込むために必要であった。つまり、ATF1 は転写仲介因子群の TetheringFactor として働くことが明らかとなった。

これらの結論は、HSF1 を介する転写調節機構において新しい分子機構を示している。同時に、HSF1 転写複合体が、クロマチン修飾や HSF1 自身の化学修飾をどのように書き換えて調節するのか、さらに ATF1 が DNA 障害ストレスによって制御されるが HSF1-ATF1 複合体の生理的意義はなにかなど、解明すべき疑問は多く残された。

## 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）

①RPA Assists HSF1 Access to Nucleosomal DNA by Recruiting Histone Chaperone FACT. Fujimoto M, Takaki E, Takii R, Tan K,

Prakasam R, Hayashida N, Iemura SI, Natsume T, Nakai A. *Mol Cell*. 査読有 2012; 48 : 182-94.

②Heat shock factor 2 is required for maintaining proteostasis against febrile-range thermal stress and polyglutamine aggregation. Shinkawa T, Tan K, Fujimoto M, Hayashida N, Yamamoto K, Takaki E, Takii R, Prakasam R, Inouye S, Mezger V, Nakai A. *Mol Biol Cell*. 査読有, 22, 3571-3583, 2011.

③ Geranylgeranylacetone suppresses noise-induced expression of proinflammatory cytokines in the cochlea. Nakamoto T, Mikuriya T, Sugahara K, Hirose Y, Hashimoto T, Shimogori H, Takii R, Nakai A, Yamashita H. *Auris Nasus Larynx*. 査読有, 39, 270-274, 2011.

〔学会発表〕（計4件）

① 瀧井 良祐 HSF1-ATF1 を介する p300/CBP のリクルートはクロマチン弛緩に必要な 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14 日～16 日 福岡国際会議場(福岡)

② 瀧井 良祐 ATF1 は熱ショックタンパク質の誘導と減衰の調節する 生命素子による転写と代謝のクロストーク制御 第3回領域班会議 2012年7月2日～4日 つくばグランドホテル（茨城）

③ 瀧井 良祐 ATF1 による熱ショック応答の誘導と減衰の調節 第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜（横浜）

④ 瀧井 良祐 ATF1 は熱ショックタンパク

質の誘導に必要である 第 84 回日本生化学  
会 2011 年 9 月 21 日 国立京都国際会議場  
(京都)

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀧井 良祐 (TAKII RYOUSUKE)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00419558