

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790316

研究課題名(和文)蛋白質ホメオスタシスの維持における熱ショック転写因子HSF4の役割

研究課題名(英文)The role of HSF4 in proteostasis

研究代表者

高木 栄一 (TAKAKI, Eiichi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・学術研究員

研究者番号：50525590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、新規に同定されたHSF4と相互作用のある蛋白質(#7)がHSF4の転写活性制御をどのように調節しているかを検討し、HSF4-蛋白質(#7)複合体の機能を明らかにする。本研究課題の成果として、蛋白質(#7)は、HSF4のリン酸化を介した転写活性制御に関わることが示唆された。また、蛋白質(#7)は、足場蛋白質としてHSF4のキナーゼによるリン酸化制御を行っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Heat shock factors (HSFs) maintain protein homeostasis through regulating expression of heat shock proteins (HSPs), and non-HSP proteins in both control and stressed conditions. HSF family members consist of four members in mammals. Among them, HSF4 is required for the maintenance of lens, and HSF4 mutation is associated with human inherited cataract. Recently, it reveals that HSF4 plays an important role in adaptation to stresses in other tissues or cell types. Uniquely, HSF4 constitutively forms a trimer, which can bind to DNA. However, it is unclear how the transcriptional activity of HSF4 is regulated in response to environmental or physiological signals. To find factors that regulate HSF4 activity, we performed immunoprecipitation analysis, followed by mass spectrometry. Furthermore, these factors were functionally screened. We identified a novel protein that promotes phosphorylation of HSF4. We propose a possible mechanism of HSF4 regulation by this novel factor.

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：熱ショック応答 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類では HSF1、HSF2、HSF3、HSF4 の 4 種の HSF が存在する。これら HSF ファミリーの一つ、HSF4 は遺伝性白内障の原因遺伝子の一つである。白内障はレンズ内部に異常蛋白質が蓄積して起こるコンフォーメーション病の一つである。申請者らは、HSF4 遺伝子欠損マウスが、レンズ内部でクリスタリンの封入体が蓄積する白内障を発症することを報告した。HSF4 は、レンズ以外の組織においても脳、肺、肝及び骨格筋などの組織でも比較的高く発現している。実際に、申請者らは、レンズ上皮細胞だけでなく、嗅神経上皮細胞の発生や維持に HSF1 と HSF4 が関与していることを明らかにしている。さらに、ポリグルタミン病の細胞モデルで、HSF4 は HSP を誘導することなく凝集体形成の抑制効果を示している。したがって、様々な組織で HSF4 が蛋白質ホメオスタシスの維持において重要な役割を担っていると考えられる。

(2) 申請者らは、Flag 標識したヒト HSF4 結合蛋白質を HEK293 細胞に発現させ、HSF4 と共沈降してきた 13 種の蛋白質を同定した。次に、これらの蛋白質の発現ベクターを作成し、HSP70 プロモーターを含むレポーター及び HSF4 発現ベクターとともに細胞へ導入し、HSF4 の転写活性化能に及ぼす影響を調べることで更なるスクリーニングを行った。その結果、HSF4 の転写活性を増強する蛋白質 SDCCAG3 (以後、蛋白質(#7)と表記)を同定した。蛋白質(#7)は大腸癌患者の自家血清に反応する抗原として同定されたが、その機能については未知である。293 細胞に HSF4 を高発現させると、ウエスタンブロットにより翻訳後修飾をうけた HSF4 と未修飾な HSF4 が検出される。その際に、蛋白質(#7)を共発現させると、翻訳後修飾をうけた HSF4 が増加し、未修飾な HSF4 が減少した。これまでに得られた結果から、新規に同定した HSF4 と相互作用する蛋白質(#7)は、HSF4 の翻訳後修飾を介した転写活性制御に関わることが示唆された。

## 2. 研究の目的

(1) HSF4 と相互作用のある蛋白質として新規に同定した蛋白質(#7)の HSF4 転写活性制御における分子機構の詳細を明らかにする。

(2) shRNA により蛋白質(#7)或いは HSF4 遺伝子の発現をノックダウンしたヒトおよびマウス細胞系を用いた DNA マイクロアレイを行い、HSF4-蛋白質(#7)複合体により発現制御を受けている標的遺伝子を同定する。

(3) 蛋白質ホメオスタシスの維持の指標としてポリグルタミン凝集体形成の実験系を用い、蛋白質(#7)と HSF4、同定された標的遺

伝子の発現を調節することによるポリグルタミン凝集体抑制効果を検討する。

## 3. 研究の方法

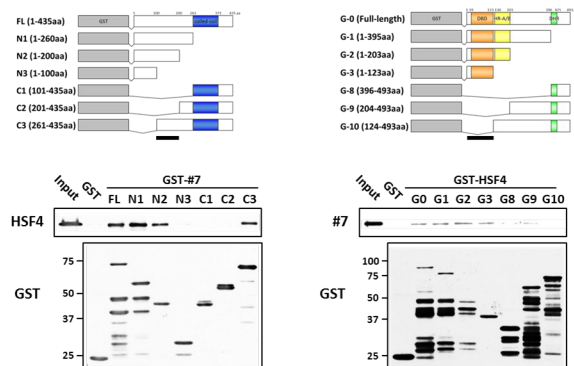
(1) HSF4 と蛋白質(#7)のそれぞれの組換え蛋白質を生成し、pull-down assay 及び免疫沈降法により互いの結合部位について検討した。

(2) HSF4 変異体を作製し、レポーターアッセイ系を用いて、蛋白質(#7)が影響を与えと思われるリン酸化部位について検討した。

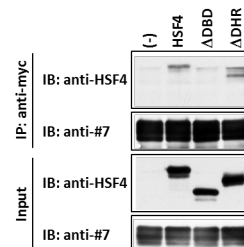
(3) shRNA により HSF4 遺伝子をノックダウンしたマウス細胞系を用いて DNA マイクロアレイを行い HSF4 の標的遺伝子群を同定し、検討した。

## 4. 研究成果

(1) GST-pull-down assay により蛋白質(#7)の 101-200 番目のアミノ酸配列の領域に HSF4 が結合していることが明らかになった。また、HSF4 の DNA 結合領域(DBD)に蛋白質(#7)が結合していた。



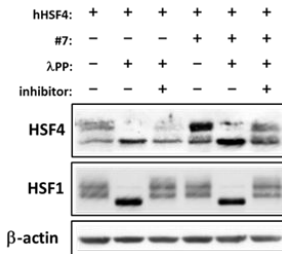
(2) HSF4 の DBD 欠損変異および、DHR 欠損変異を作製し、HEK293 細胞に蛋白質(#7)と共発現させ免疫沈降法を行ったところ、HSF4 の野生型及び DHR 欠損変異体では蛋白質(#7)との結合が確認できたが、DBD 欠損変異体では蛋白質(#7)との結合が見られなく、このことから HSF4 の DBD に蛋白質(#7)が結合していることが示された。



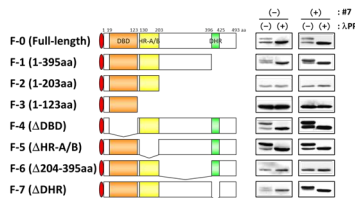
HSF4-DBD 欠損変異体は転写活性を持たないので、蛋白質(#7)の HSF4 転写活性制御における分子機構の解明をさらに進展させるために、転写活性をもち且つ蛋白質(#7)と結合

できない HSF4 の点変異を作製している。

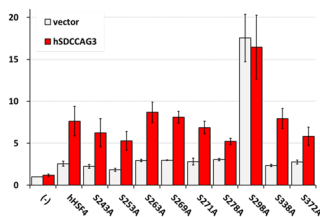
(3) 蛋白質(#7)は HSF4 の翻訳後修飾に影響を与えているが、この HSF4 の修飾がリン酸化であることを脱リン酸化酵素処理の実験により明らかにした。



更に、HSF4 のリン酸化部位を同定するために、複数の領域欠損変異体を作製し、脱リン酸化酵素処理を行い、HSF4 の HR-A/B と DHR の間の領域でリン酸化が起きていることを示した。



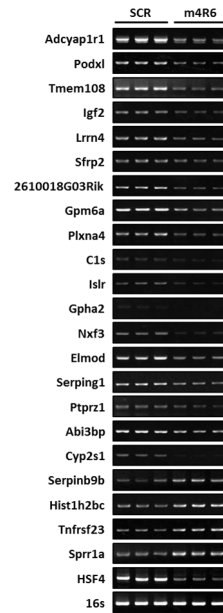
(4) 蛋白質(#7)が影響を与えている HSF4 のリン酸化部位を同定するために、HSF4 のセリン置換点変異体を複数作成し、レポーターアッセイを行ったところ、複数の点変異で蛋白質(#7)による HSF4 の活性増強が減少する傾向が見られた。このことから、複数個所のリン酸化が蛋白質(#7)と関与していることが示唆された。



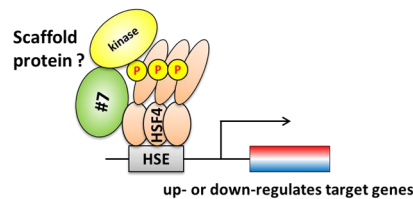
(5) HSF4 遺伝子に対する shRNA を発現するアデノウィルス感染により HSF4 をノックダウンした MEF 細胞から RNA サンプルを調整し、コントロールの RNA サンプルと共にマイクロアレイ解析を行った。MEF 細胞における HSF4 蛋白質の発現量は、レンズと比較して低レベルであるにもかかわらず、ノックダウンすることで、予想以上に多くの遺伝子で有意な発現量の変化が認められた。HSF4 は正常な生育条件下の MEF 細胞においても、多くの標的遺伝子の制御に関わっていることが示唆された。

Genes regulated by HSF4 in MEF (p<0.05 with FDR)

Gene_Symbol	Ratio	F.C.	p-value
Adcyap1r1	0.28	-3.51	0.00
Podxl	0.31	-3.26	0.00
Tmem108	0.31	-3.24	0.00
Igf2	0.31	-3.22	0.00
Lrrn4	0.32	-3.08	0.00
Sfrp2	0.35	-2.83	0.00
2610018G03Rik	0.36	-2.80	0.00
Gpm6a	0.37	-2.69	0.00
Plxna4	0.39	-2.58	0.00
C1s	0.45	-2.22	0.00
Islr	0.46	-2.19	0.00
Gpha2	0.46	-2.19	0.00
Nxf3	0.46	-2.17	0.00
Elmod2	0.47	-2.14	0.00
Serping1	0.47	-2.12	0.00
Ptprz1	0.48	-2.09	0.00
Abi3bp	0.48	-2.08	0.00
Cyp2s1	0.50	-2.01	0.00
Hsf4	0.73	-1.36	0.00
Serpinb9b	2.02	2.02	0.00
Hist1h2bc	2.10	2.10	0.00
Tnfrsf23	2.16	2.16	0.00
Spr1a	2.62	2.62	0.00



今後の展望として、これらの遺伝子の発現ベクターを作成し、ポリグルタミン凝集体形成の抑制活性を指標とした機能スクリーニングを行う。同定された遺伝子の機能解析を行うことで、新しい蛋白質ホメオスタシスの経路について検討する。さらに、蛋白質(#7)と HSF4 の複合体が、この経路を制御することでコンフォメーション病の病態を改善するかを細胞とマウスのモデルで検討する。



### 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4件)

Yamagata Y, Nishino K, Takaki E, Sato S, Maekawa R, Nakai A, Sugino N. (2014) Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells. PLoS One. 査読有 9:e83612.

Prakasam R., Fujimoto M., Takii R., Hayashida N., Takaki E., Tan K., Wu F., Inouye S. & Nakai A. (2013) Chicken IL-6 is a heat-shock gene. FEBS Lett. 査読有 587:3541-3547.

Maekawa R., Sato S., Yamagata Y., Asada H., Tamura I., Lee L., Okada M., Tamura

H., Takaki E., Nakai A. & Sugino N. (2013) Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. PLoS One. 査読有 8:e66632.

Fujimoto M., Takaki E., Takii R., Tan K., Prakasam R., Hayashida N., Iemura S., Natsume T. & Nakai A. (2012) RPA assists HSF1 access to nucleosomal DNA by recruiting histone chaperone FACT. Mol. Cell. 査読有 48:182-194.

〔学会発表〕(計2件)

高木栄一(代表)、熱ショック因子 HSF4 のターゲット遺伝子の同定、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日～13 日、横浜(パシフィコ横浜)

高木栄一(代表)、熱ショック因子 HSF4 のリン酸化を増強する因子の同定、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日～14 日、福岡(マリンメッセ福岡)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高木 栄一 (TAKAKI, Eiichi)  
山口大学・大学院医学系研究科・  
学術研究員  
研究者番号：50525590

### (2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者  
なし