

令和元年5月18日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07292

研究課題名(和文) 熱ショック転写因子によるシャペロン非依存的恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of non-chaperone target genes for heat shock transcription factor in cell homeostasis.

研究代表者

桜井 博 (Sakurai, Hiroshi)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：00225848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：熱ショック転写因子HSF1は、シャペロンの発現を誘導する主要な転写調節因子として機能するが、通常の細胞増殖においても、シャペロン以外のさまざまな遺伝子群の発現を調節する。本研究では、HSF1の非シャペロン型標的遺伝子に注目し、1)初期応答因子IER5はプロテインホスファターゼ2Aのモジュレーターとして細胞周期を制御する、2)基本転写因子TAF7はシャペロン遺伝子の持続的な発現に必要である、3)細胞増殖制御因子GADD45は熱ショックによる細胞死に関与することを示した。これらの結果より、HSF1はさまざまな非シャペロン遺伝子の発現を制御することにより細胞増殖や細胞死に関与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HSF1は、タンパク質の恒常性維持や細胞の増殖・がん化などさまざまな生理現象に関与するが、その多くはHSPシャペロンの発現を介しての効果であると考えられている。本研究では、HSF1の多様な機能の重要性について明らかにした。得られた結果は、細胞増殖やタンパク変性ストレスに対する応答機構、および、恒常性維持機構の解明において、重要な知見を与えるものである。また、HSF1やその標的遺伝子であるIER5、およびIER2は、がん細胞で高発現しており、がん治療や予後の予測において、これらの遺伝子の役割の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：Heat shock factor HSF1 is known as the major transcriptional regulator for chaperone genes, and it also regulates the expression of non-chaperone genes under normal growth conditions. In this study, I focused on the roles of HSF1-target genes, including immediate-early response factor IER5, general transcription factor TAF7, and cell growth regulator GADD45. IER5 functions as a modulator of protein phosphatase 2A and regulates the protein stability and activity of cell division cycle regulators. Heat-induced TAF7 is necessary for the prolonged expression of chaperone genes. GADD45 is necessary for heat stress survival. These results suggest that HSF1 is involved in the control of cell proliferation and death through regulating the expression of various non-chaperone target genes.

研究分野：生物学

キーワード：細胞増殖 ストレス応答 ターゼ 初期応答遺伝子 熱ショック転写因子 基本転写因子 MAPキナーゼ経路 プロテインホスファ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

すべての生物は、高温・重金属・アルコールなどのタンパク変性ストレスに対し、熱ショック応答という防御反応を示す。この中心を担うのが HSP (heat shock protein) であり、一部の HSP は、タンパク質の変性予防・再生を促進するシャペロンとしてはたらく。HSF (heat shock factor) は、HSP 遺伝子のプロモーター領域に存在する HSE (heat shock element) に結合し mRNA 合成を制御する転写調節因子として同定された。この HSF - HSE 相互作用は、真核生物の熱ショック応答の普遍的な転写制御機構である。

ヒトでは3種類の HSF (HSF1, HSF2, HSF4) がファミリーを形成している。HSF1 は熱ショック応答を制御、HSF2 は正常な神経の発生や精子の形成に必要であり、HSF4 は眼のレンズ形成に関与する。多くの HSF1 分子は、生理的状態では単量体で細胞質に存在する。熱ショックにより活性化された HSF1 は、三量体を形成し、核内に移行後、HSP 遺伝子の HSE に結合し転写を誘導する。一方、HSF1 ノックアウトマウスでは、細胞増殖、胎盤や神経の形成、免疫系、サーカディアンリズムにも影響が生じる。また、悪性度の高いがん細胞では、HSF1 ががん化に重要な遺伝子発現プログラムを支配している。これまでの研究より、転写因子 c-Jun をコードする原がん遺伝子 JUN が HSF1 の標的遺伝子であり、HSF1 により c-Jun が増加し、さらに、c-Jun 標的遺伝子の発現が誘導されるという、HSF1 JUN c-Jun 標的遺伝子という転写カスケードから、HSF1 が細胞の腫瘍化に関与する可能性が示されている。

### 2. 研究の目的

いくつかの HSF1 標的遺伝子について研究してきたが、HSF1 の多彩な生理作用には、未解明な点が多数ある。本研究では、シャペロン非依存的なストレス応答や細胞増殖に関与すると推定される HSF1 標的遺伝子群の機能について解析する。その候補として、初期応答遺伝子 IER5 (immediate-early response 5)、基本転写因子 TFIID (Transcription factor IID) の構成タンパクである TAF7 (TBP-associated factor 7)、細胞増殖関連因子 GADD45 (Growth arrest and DNA damage inducible 45) に注目し、これらタンパク質の生理的な環境およびストレス状態での機能について検討する。その結果をもとにして、HSF1 の機能と細胞増殖との関連を明らかにする。

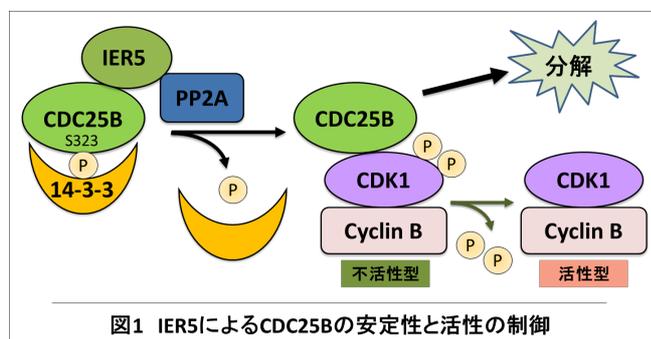
### 3. 研究の方法

HeLa (ヒト子宮頸がん由来) と HEK293 (ヒト胎児腎臓由来) 細胞を用いた。遺伝子 DNA 断片や cDNA は HeLa 細胞より PCR および RT-PCR 法により増幅し、哺乳動物細胞内発現ベクター (pcDNA3.1, pEB-Multi-Hyrgomycin) や大腸菌内発現ベクター (pGEX) にクローン化した。プラスミド DNA や siRNA は Lipofectamine 3000 と RNAiMAX を用いて細胞内に導入した。リアルタイム PCR には Power SYBR Green PCR Master Mix と LightCycler 96 System を用いた。ルシフェラーゼレポーターアッセイにはプロモーターDNA を連結した pGL3 ベクターと pRL-TK を用い Dual-Luciferase Reporter Assay System によりルシフェラーゼ活性を測定した。ウエスタンブロッティング、Phos-tag を用いたウエスタンブロッティング、クロマチン免疫沈降、共免疫沈降、ブルダウンアッセイ、ユビキチン化アッセイ、キナーゼ・ホスファターゼアッセイは常法に従った。抗体は、Abcam, Cell Signaling Technology, Assay Biotechnology, BD Biosciences, EnoGene Biotech, Bethyl Laboratories, Proteintech Group, Abgent, Santa Cruz Biotechnology, GeneTex, R&D System, Stress Marq Biosciences, Enzo Life Sciences, Signalway Antibody, Sigma-Aldrich, MBL 社から購入した。統計解析には t-検定を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) IER5 ファミリーメンバーの機能解析

非シャペロン型 HSF1 標的遺伝子である初期応答遺伝子 IER5 (immediate-early response 5) に注目し、その細胞内における機能について解析した。IER5 の N 末端領域は protein phosphatase 2A (PP2A) に結合し、PP2A 標的タンパクの脱リン酸化を調節する。PP2A-IER5 の標的タンパク質として、細胞周期を制御する cell division cycle CDC25A および CDC25B を同定した。IER5 は PP2A による CDC25B の Ser323 の脱リン酸化を促進するが、これにより CDC25B からリン酸化アミノ酸結合タンパクの 14-3-3 が解離し、CDC25B はユビキチン化され分解される(図1)。同様の機構により PP2A-IER5 は 14-3-3 との結合に必要な CDC25A の Thr507 を脱リン酸化



IER5 は PP2A による CDC25B の Ser323 の脱リン酸化を促進するが、これにより CDC25B からリン酸化アミノ酸結合タンパクの 14-3-3 が解離し、CDC25B はユビキチン化され分解される(図1)。同様の機構により PP2A-IER5 は 14-3-3 との結合に必要な CDC25A の Thr507 を脱リン酸化

し CDC25A の安定性も調節する (図 2)。これらの結果より、IER5 は CDC25A/B を介して細胞増殖の制御に関与していることを明らかにした。また、IER5 の N 末端領域は IER2 や IER5L と高い相同性を示し、これらの IER タンパクも CDC25A/B を含めた PP2A 標的タンパクの脱リン酸化を調節する。しかし、IER5 の発現は熱ショック時に HSF1 により強く誘導されるが、IER2 と IER5L は熱ショックとは異なる細胞ストレスにより発現が調節される。したがって、IER ファミリーは、さまざまな細胞増殖条件下で PP2A による標的タンパクの脱リン酸化を制御すると考えられる。

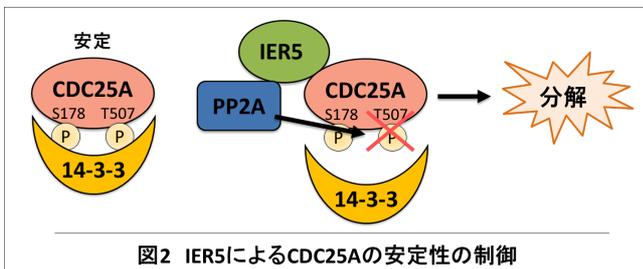


図2 IER5によるCDC25Aの安定性の制御

### (2) 熱ショック応答における TAF7 の機能

基本転写因子 TFIID (Transcription factor IID) の構成タンパクである TAF7 (TBP-associated factor 7) は、TAF1 や CTD kinase (RNAPII C-terminal domain をリン酸化する) と相互作用し転写開始を制御する。熱ショック細胞では TAF7 タンパク量が約 2 倍に増加すること、TAF7 遺伝子のプロモーター内には HSF1 結合配列が存在し、この配列には熱ショック誘導的に HSF1 が結合することより、TAF7 が HSF1 の標的遺伝子であることを明らかにした。TAF7 はユビキチン プロテアソーム系で分解される不安定なタンパク質であった。TFIID 複合体と TAF7 の相互作用は TAF7 のリン酸化により制御されており、また、細胞内の約 2/3 の TAF7 は TFIID 複合体には結合せず遊離していた。さらに、TAF7 ノックダウン細胞を用いた実験より、TAF7 は熱ショック細胞の増殖に必要であることが示された。ノックダウン細胞では、シャペロン遺伝子の mRNA 量が減少していた。クロマチン免疫沈降実験の結果より、遊離型の TAF7 はシャペロン遺伝子のプロモーターに結合し、RNAPII が転写開始から伸長反応へ移行する過程を制御していることが示された(図 3)。

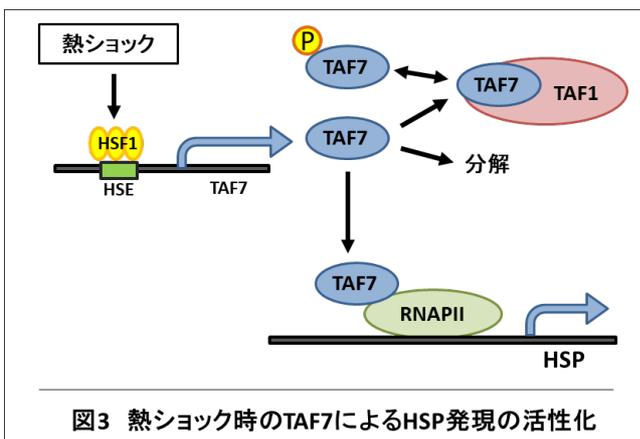


図3 熱ショック時のTAF7によるHSP発現の活性化

### (3) 熱ショック応答における GADD45 ファミリーの機能

非シャペロン型 HSF1 標的遺伝子である Growth arrest and DNA damage-inducible 45 (GADD45) ファミリーに注目し、その熱ショック応答における機能について解析した。GADD45 ファミリーの  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  は、細胞増殖や細胞死の制御に関与する。これらのうち、GADD45 $\beta$  と GADD45 $\gamma$  遺伝子の発現は熱ショックにより亢進した。さらに、GADD45 $\beta$  プロモーター内に HSF1 結合配列を同定し HSF1 標的遺伝子であることを示した。また、GADD45 ファミリー遺伝子は、酸化ストレスや変異原ストレスに対して異なる発現をすることを明らかにした。GADD45 $\beta$  ノックダウン細胞を用いて、GADD45 $\beta$  が熱ショック細胞の生存に必要であることを示した。熱ショック細胞では、Mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 7 (MKK7) が細胞死に関与するストレス応答性 MAP kinase の c-Jun N-terminal kinase (JNK) を活性化するが、GADD45 $\beta$  は MKK7 に結合し JNK の活性化を阻害することを明らかにした。したがって、HSF1 は GADD45 $\beta$  を介して細胞死を制御していることが示唆された。また、GADD45 $\alpha$  と GADD45 $\gamma$  も MKK7 阻害活性を持つことも示した(図 4)。

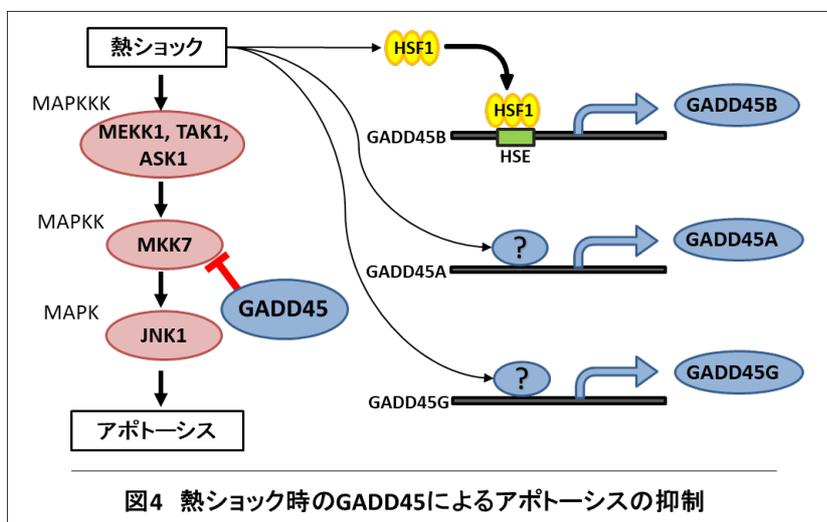


図4 熱ショック時のGADD45によるアポトーシスの抑制

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

(1) Ueda T, Kohama Y, Sakurai H.  
IER family proteins are regulators of protein phosphatase PP2A and modulate the phosphorylation status of CDC25A.  
Cellular Signalling, 2019, 55:81-89, 査読有  
doi: 10.1016/j.cellsig.2018.12.012.

(2) Kohama Y, Saito M, Yada M, Sakurai H.  
Regulation of the stability and activity of CDC25A and CDC25B by protein phosphatase PP2A and 14-3-3 binding.  
Cellular Signalling, 2019, 54:10-16, 査読有  
doi: 10.1016/j.cellsig.2018.11.017.

(3) Nagashimada M, Ueda T, Ishita Y, Sakurai H.  
TAF7 is a heat-inducible unstable protein and is required for sustained expression of heat shock protein genes.  
FEBS Journal, 2018, 285:3215-3224, 査読有  
doi: 10.1111/febs.14604.

(4) Ueda T, Kohama Y, Kuge A, Kido E, Sakurai H.  
GADD45 family proteins suppress JNK signaling by targeting MKK7.  
Archives of Biochemistry and Biophysics, 2017, 635:1-7, 査読有  
doi: 10.1016/j.abb.2017.10.005.

(5) Nagai M, Nagai Y, Aki Y, Sakurai H., Mizusawa N, Ogura T, Kitagawa T, Yamamoto Y, Nagatomo S.  
Heme orientation of cavity mutant hemoglobins (His F8 → Gly) in either  $\alpha$  or  $\beta$  subunits: circular dichroism, (1) H NMR, and resonance raman studies.  
Chirality. 2016, 28:585-592, 査読有  
doi: 10.1002/chir.22620.

(6) Ito T, Ozaki S, Chanasong R, Mizutani Y, Oyama T, Sakurai H., Matsumoto I, Takemura H, Kawahara E.  
Activation of ERK/IER3/PP2A-B56 $\gamma$ -positive feedback loop in lung adenocarcinoma by allelic deletion of B56 $\gamma$  gene.  
Oncology Reports, 2016, 35:2635-2642, 査読有  
doi: 10.3892/or.2016.4677.

〔学会発表〕(計 4 件)

( 1 ) 小濱祐里、齋藤愛望、矢田瑞恵、櫻井博  
14-3-3 タンパクによる CDC25 の安定性と活性調節  
第 41 回日本分子生物学会年会 ( 2018 )

( 2 ) 上田拓実、小濱祐里、櫻井博  
初期応答遺伝子 IER タンパク質群による protein phosphatase 2A 活性の制御  
第 40 回日本分子生物学会年会 ( 2017 )

( 3 ) 小濱祐里、上田拓実、櫻井博  
プロテインホスファターゼ PP2A/調節タンパク IER5 による CDC25B の活性調節  
第 40 回日本分子生物学会年会 ( 2017 )

( 4 ) 上田拓実、小濱祐里、久下綾菜、城戸恵梨子、太田あづ美、櫻井博  
DNA 損傷誘導性タンパク GADD45 による熱ショック応答と MAP キナーゼの制御  
第 39 回日本分子生物学会年会 ( 2016 )

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://lab-science.w3.kanazawa-u.ac.jp/research/research%20-%20Sakurai.htm>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。