

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570164
 研究課題名（和文） 熱ショック転写因子による多様な塩基配列の認識と生物間での普遍性
 研究課題名（英文） Recognition of diverse nucleotide sequences by heat shock transcription factors of various organisms
 研究代表者
 桜井 博（SAKURAI HIROSHI）
 金沢大学・保健学系・准教授
 研究者番号：00225848

研究成果の概要 ストレス応答反応において重要な役割を担う熱ショックタンパク質群の遺伝子発現は、プロモーター領域にある HSE 配列とこれに結合する熱ショック転写因子 HSF により制御されている。本研究では、酵母 シロイヌナズナ 線虫 ショウジョウバエ ゼブラフィッシュ ヒトの HSF の HSE 配列特異性について検討した。生化学的、および、酵母菌・HeLa 細胞での発現実験より、これらの HSF は多様な HSE 配列を認識することが明らかになった。HSE 配列の多様性は、ストレスや遺伝子特異的な転写に関与すると考えられる。

交付額

	金額単位 円		
	直接経費	間接経費	合計
年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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 ストレス応答 熱ショック転写因子 培養細胞 酵母菌

研究開始当初の背景

温、重金属、アルコールなどは、タンパク質を変性し細胞に障害を与える。細胞はこれらをストレスとして感知し、対処するため熱ショック応答を示す。この応答反応はすべての生物に普遍的であり、シャペロンとして機能する熱ショックタンパク質 Heat Shock Protein; HSP が中心的な役割を担う。真核生物の HSP 遺伝子の発現は、熱ショック転写因子 heat shock transcription factor;

HSF により制御されている。HSF はホモ三量体を形成し、HSP 遺伝子のプロモーターに存在する nGAAn の inverted repeat heat shock element; HSE に結合・転写を調節する。HSF のタンパク構造は、単細胞生物の酵母菌からヒトに至るまで非常によく保存されていることより、HSF-HSE 相互作用は、真核生物のストレス応答における普遍的な転写制御機構であると考えられている。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の HSF ScHSF は、熱ショック時に酵母ゲノ

ムの約 1%の遺伝子 約 70 個 の転写を誘導する。ScHSF の標的遺伝子は、連続 Perfect 型 HSE nGAA_n の inverted repeat が 1 つ以上連続する、不連続 Gap 型 HSE inverted repeat 内にギャップが 1 つある、不連続 Step 型 HSE inverted repeat 内にギャップが 2 つある など、さまざまな HSE を持つ

Perfect型	nTTCnnGAA _n nTTCn
Gap型	nTTCnnGAA _n nnnnnnnGAA _n
Step型	nTTCnnnnnnnTTCnnnnnnnTTCn

図 さまざまな HSE タイプの分類

一方、ヒトでは 種の HSF hHSF1, hHSF2, hHSF4 がサブファミリーを形成している。hHSF1 は多くの組織で発現し、典型的な HSF としてストレス応答の中心を担うのに対し、hHSF2 は脳や精子形成に、また、hHSF4 は眼の形成に関与する。組換え hHSF を用いた DNA フットプリント解析より、これらは多少異なる HSE 特異性を示すことが報告されている。そのため、おのおの hHSF は異なる標的遺伝子の転写を制御すると考えられるが、確たる証拠は得られていない。

研究の目的

これまでの出芽酵母を用いた研究より、HSE 塩基配列の多様性は転写調節に関与しているのか、この多様性は酵母菌の生育と関連があるのか、他の生物のゲノムでも HSE 配列が多様化しているのか、という疑問が生じる。本研究課題では、これらについて検討することにより、「HSE 塩基配列の多様性と生物間での普遍性」について明らかにする。また、ヒトは 種類の HSF を持っている。そこで、「hHSF1, hHSF2, hHSF4 による HSE を介した遺伝子特異的転写調節機構」が存在するかについても検討を加える。さらに、HSE 塩基配列の多様化の意義について考察する。

研究の方法

「出芽酵母の HSE 塩基配列の多様性と転写調節」について
 酵母菌を種々のストレス条件下で培養し、菌体より RNA を抽出する。ScHSF 標的遺伝子の mRNA を reverse transcription (RT)-PCR 法により増幅し、さまざまな HSE を持つ遺伝子間で転写量を比較した。また、perfect 型 gap 型 step 型 HSE を挿入した lacZ レポーター遺伝子を酵母菌に導入し、種々のストレス条件下での転写活性の変動

を調べた。

「HSE 塩基配列の多様性と酵母菌の生育」について

ScHSF 標的遺伝子の HSE とその近傍の塩基配列をクローン化した。この HSE に部位指定変異導入法により塩基置換変異を導入した。DNA 断片を相同組換え法 pop-in/pop-out replacement により酵母染色体 DNA に組み込み、変異 HSE を持つ酵母株を作製した。この表現型 温・低温感受性 熱ショック感受性 酸化剤感受性 老化速度など を調べた。

「他の生物のゲノムでも HSE 配列が多様化しているのか」について

シロイヌナズナ 線虫 ショウジョウバエ ゼブラフィッシュの HSF cDNA を、T7 ファージプロモーターを持つプラスミド、酵母菌発現プラスミド、および、哺乳動物細胞発現プラスミドにクローン化した。In vitro transcription/translation (reticulocyte) 法によりポリペプチドを合成し、HSF の三量体形成を化学架橋反応により、HSE との結合を EMSA (electrophoretic mobility shift assay) により検討した。酵母菌発現プラスミドにクローン化した HSF cDNA は、染色体 ScHSF 遺伝子を欠失した酵母菌に導入した。上述のように、酵母菌の表現型、および、mRNA 量の変動を調べた。哺乳動物細胞発現プラスミドにクローン化した HSF cDNA は、HeLa 細胞に導入した。このとき、さまざまな HSE 配列を持つルシフェラーゼレポータープラスミドも同時に導入し、ルシフェラーゼ活性の変動により遺伝子発現を調べた。

「ヒト hHSF1, hHSF2, hHSF4 による HSE を介した遺伝子特異的転写調節機構」について

hHSF1, hHSF2, hHSF4 の cDNA を、T7 ファージプロモーターを持つプラスミド、酵母菌発現プラスミド、および、哺乳動物細胞発現プラスミドにクローン化した。上述の方法に従い、hHSF ポリペプチドを合成し、三量体形成、HSE との結合、さらに、酵母菌内・HeLa 細胞内での HSE 特異性を検討した。

研究成果

「出芽酵母の HSE 塩基配列の多様性と転写調節」について

酵母菌を種々のストレス条件下 熱ショック 39 度・48 度 エタノールショック、酸化剤メナジオン、酸化剤ジアミド、タンパク変性条件 で培養し遺伝子の転写活性の変動を調べた。perfect 型 gap 型 step 型の HSE

を持つさまざまな ScHSF 標的遺伝子、および、perfect 型 gap 型 step 型 HSE を挿入したレポーター遺伝子の転写活性は、予想に反し、ストレスの種類に応じ HSE タイプ特異的に変動する結果は得られなかった。しかしながら、この解析過程において、スーパーオキシドによる ScHSF の転写活性化には cAMP 依存的プロテインキナーゼが負に作用することを明らかにした。また、ScHSF は、熱ショックストレスに対する適応、および、回復に重要な役割を担うことを明らかにした。

「HSE 塩基配列の多様性と酵母菌の生育」について

タンパク質複合体の形成に関与するシャペロンである Hsp90 の遺伝子 *HSP82* と *HSC82* の HSE に変異を導入した酵母株を作製した。おのおのの遺伝子の HSE を破壊しても、目立った表現型は認められなかったが、両遺伝子の HSE を破壊すると、温感受性になった。他の表現型は認められなかった。したがって、温での Hsp90 の発現は生育に必須であることが明らかになった。

ミトコンドリアの機能に関わる HSP 遺伝子 *HSP10*, *HSP60*, *HSP78*, *MDJ1*, *SSC1* の HSE を破壊した変異酵母株を作製した。

つすべての遺伝子の HSE を破壊した時のみ、温感受性になった。他の表現型は認められなかった。したがって、温でのミトコンドリア HSP の発現は生育に必須であることが明らかになった。

「他の生物のゲノムでも HSE 配列が多様化しているのか」について

シロイヌナズナ 線虫 ショウジョウバエ ゼブラフィッシュ HSF1 と HSF2 の HSF ポリペプチドの生化学的性質を調べた。シロイヌナズナ HSF 線虫 HSF ゼブラフィッシュ HSF2 は、25°C および 37°C で三量体を形成し、ショウジョウバエ HSF ゼブラフィッシュ HSF1 は、25°C でも少量の三量体を形成したが、37°C では形成が促進された。また、シロイヌナズナ HSF ショウジョウバエ HSF ゼブラフィッシュ HSF2 は、perfect 型 gap 型 step 型 HSE に強く結合した。一方、線虫 HSF ゼブラフィッシュ HSF1 は、perfect 型 HSE には結合したが、gap 型 step 型 HSE にはほとんど結合しなかった。同様の結果は、おのおのを酵母菌内または HeLa 細胞内で発現した場合にも得られた。したがって、少なくともシロイヌナズナ ショウジョウバエ ゼブラフィッシュのゲノムには、多様な HSE 配列が存在し、遺伝子特異的およびストレス特異的な転写調節に関与する可能性が示唆された。

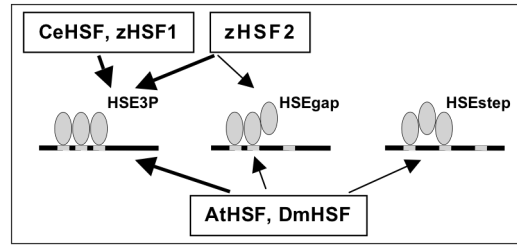


図 さまざまな HSF の HSE 特異性
楕円は HSF 三量体を示す。シロイヌナズナ AtHSF 線虫 CeHSF ショウジョウバエ DmHSF ゼブラフィッシュ zHSF1, zHSF2。線は DNA 白抜きは nGAAn 配列を示す。

「ヒト hHSF1, hHSF2, hHSF4 による HSE を介した遺伝子特異的転写調節機構」について

hHSF1, hHSF2, hHSF4 ポリペプチドの HSE 結合について調べた。種の hHSF を酵母菌や HeLa 細胞内で発現し、HSP 遺伝子および種々のレポーター遺伝子の転写活性を解析した。この結果、hHSF1 と hHSF2 は連続型 HSE に強く結合するのに対して、hHSF4 は連続型と不連続型の両方の HSE に結合することが明らかになった。図。

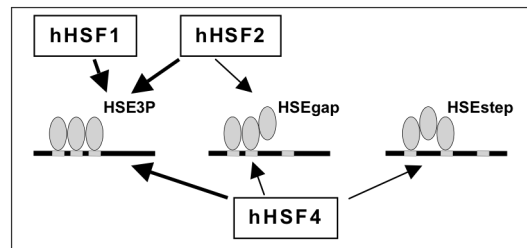


図 ヒト HSF の HSE 特異性
楕円は hHSF 三量体を示す。線は DNA 白抜きは nGAAn 配列を示す。

これらの結果より、シロイヌナズナ ショウジョウバエの HSF は酵母 HSF と同様に、多様な HSE 配列を認識し、したがってこれらの生物のゲノムには多様な HSE 配列が存在し、ストレスや遺伝子特異的な転写に関与すると考えられる。一方、ゼブラフィッシュ ヒトの HSF は、サブファミリーが異なる HSE 特異性を示すことが明らかとなり、HSE 配列は、サブファミリーによる遺伝子特異的な転写に関与することが示唆された。今後は、これらの HSF がどのようなメカニズムにより、異なる HSE 配列を認識するかについて明らかにする必要がある。

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 件

- ① Noritaka Yamamoto, Yukiko Takemori, Mayumi Sakurai, Kazuhisa Sugiyama, and Hiroshi Sakurai, Differential recognition of heat shock elements by members of the heat shock transcription factor family, *FEBS Journal*, 276, 1962-1974, 2009, 査読有
- ② Noritaka Yamamoto, Yuka Maeda, Aya Ikeda, and Hiroshi Sakurai, (2008) Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryotic Cell*, 7, 783-790, 2008, 査読有
- ③ Sricharan Bandhakavi, Hongwei Xie, Brennon O'Callaghan, Hiroshi Sakurai, Do-Hyung Kim, and Timothy J. Griffin, HSF1 activation inhibits rapamycin resistance and TOR signaling in Yeast revealed by combined proteomic and genetic analysis, *PLoS One*, 3, e1598, 2008, 査読有
- ④ Ayako Yamamoto, Junko Ueda, Noritaka Yamamoto, Naoya Hashikawa, and Hiroshi Sakurai, Role of heat shock transcription factor in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response, *Eukaryotic Cell*, 6, 1373-1379, 2007, 査読有
- ⑤ Hiroshi Sakurai and Yukiko Takemori, Interaction between heat shock transcription factors (HSFs) and divergent binding sequences: binding specificities of yeast HSFs and human HSF1, *Journal of Biological Chemistry*, 282, 13334-13341, 2007, 査読有
- ⑥ Naoya Hashikawa, Noritaka Yanamoto, and Hiroshi Sakurai, Different mechanisms are involved in the transcriptional activation by heat shock transcription factor through different types of heat shock elements, *Journal of Biological Chemistry*, 282, 10333-10340, 2007, 査読有

〔学会発表〕 計 件

- ① 山本慶隆 竹森優喜子 榎康明 桜井博 熱ショック転写因子ファミリーの異なったDNA塩基配列認識 第31回日本分子生物学会年会 2008.12.9 神戸

- ② 橋川直也 桜井博 酵母熱ショック転写因子 Hsf1 による遺伝子特異的なメディエーターのリクルートメント 第31回日本分子生物学会年会 2008.12.9 神戸
- ③ 村瀬茂雄 舟越靖 山上健 石野良純 山本慶隆 桜井博 田中俊樹 金属イオン誘導性人工転写因子の設計と構築 第81回日本生化学会大会 2008.12.9 神戸
- ④ 菅原大 舟越靖 山本慶隆 桜井博 山上健 石野良純 田中俊樹 金属誘導型転写因子タンパク質の設計 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008.9.18 横浜
- ⑤ 山本慶隆 池田彩 前田夕佳 竹森優喜子 桜井博 ヒト熱ショック転写因子による結合配列特異的な転写調節 第30回日本分子生物学会年会 2007.12.11 横浜

研究組織

(1) 研究代表者

桜井 博 SAKURAI HIROSHI
金沢大学・保健学系・准教授
研究者番号 00225848

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし