

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770148

研究課題名 (和文) 発生過程における熱ショック転写因子群の転写制御機構

研究課題名 (英文) Analysis of Transcriptional regulation by HSFs in development process

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：

レンズにおいて熱ショック転写因子 HSF4 の結合領域を網羅的に調べた結果、HSF4 結合領域のほとんどはイントロンあるいは近傍の遺伝子から 10 kb 以上離れた領域に存在した。この領域は、HSF 群の結合が発生過程で変化し、近傍に存在する遺伝子は熱ショックによって誘導されることが分かった。また、HSF4 の結合が周辺部のクロマチン修飾に影響を及ぼすことも明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

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：熱ショック転写因子, レンズ, 発生過程

1. 研究開始当初の背景

細胞が高温にさらされると一群の熱ショック蛋白質が合成される。この応答は熱ショック応答と呼ばれ、主に熱ショック転写因子 (HSF) によって制御される。熱ショック応答は、ストレスから自身を守るための基本的な生体防御機構の一つである。さらに、HSF が個体発生過程で重要な役割を担うことが示されているが、その制御機構は明らかにされていない。動物細胞においては HSF1、HSF2、そして HSF4 の少なくとも 3 つの HSF 遺伝子産物が発現している。このうち HSF1 が熱ショック応答を担う主要な因子である。HSF1 と

HSF2 の遺伝子欠損マウスの解析から、ともに精子形成と卵成熟、さらに脳形成に必須であることが報告されている。しかしながら、そのターゲット遺伝子を含めて分子機構については明らかにされていなかった。申請者らは、HSF1 と HSF4 の遺伝子欠損マウスを作成し、それらの個体レベルでの役割を明らかにするとともに、その制御に関わる幾つかのターゲット遺伝子を同定した。HSF4 遺伝子欠損マウスでは白内障を発症すること、そしてターゲット遺伝子として熱ショック蛋白質以外に、γクリスタリンとレンズ上皮細胞の増殖と分化を制御する FGF 群を見いだした。

興味深いことに、γクリスタリンの転写制御は HSF1 と HSF4 が協調的に働くのに対して、後者の FGF の転写制御に関しては HSF1 と HSF4 の作用は拮抗しており、両遺伝子の欠損でレンズ上皮細胞の増殖と分化は正常に近くなった。さらに、レンズ細胞と同様にブラコードに由来する嗅神経上皮細胞においても HSF1 と HSF4 は拮抗的に働き、その分化に関わる LIF の転写を調節していることがわかった。これらの分子機構の解析から、HSF が熱ショック蛋白質のみならず、細胞増殖と分化に関わるサイトカインの転写を制御すること、また HSF の活性化は発生段階特異的で、HSF は細胞の成熟と維持に必須であることを示した。したがって、発生段階特異的な HSF によるターゲット遺伝子群の活性制御機構を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

個体発生過程での HSF 群の活性化については未だ明らかにされていない。そこで本研究で、HSF 群の発生過程における活性化機構と、HSF 群のターゲット遺伝子の制御機構について解明したい。

3. 研究の方法

(1) マウスのレンズ発生過程における HSF 群 (HSF1, HSF2, HSF4) の発現レベルをウエスタンブロットで調べる。HSF4 は絶えず三量体を形成していると考えられているが、発生過程において同様の構造を維持しているのか、また他の HSF のオリゴマー構造の変化はないのかをゲル濾過で調べる。さらに、DNA 結合能力をゲルシフトアッセイ法によって調べた。

(2) 生後 2 日目のレンズ上皮細胞を用いて、HSF4 抗体によってクロマチン免疫沈降法を行い、HSF4 の結合する領域を同定する。生後 2 日目の野生型と HSF4 欠損マウスのレンズを用いて、同定領域に対する HSF4 の結合をクロマチン免疫沈降法によって再確認し、シーケンス解析によって塩基配列を決定し、マウスゲノムの位置を調べた。

(3) HSF4 結合領域に HSF1 と HSF2 が結合できるかを、クロマチン免疫沈降法で調べる。さらに、発生過程 (E18.5, P2, 3W) が進むにつれて、HSF4 結合領域への HSF 群の結合に変化が見られるかをクロマチン免疫沈降法で調べた。

(4) HSF4 結合領域に隣接する遺伝子の発現変化に HSF4 が関与しているか、野生型と HSF4 欠損マウスのレンズより RNA を調整し、各遺伝子のプライマーを用いて、RT-PCR 法で遺伝子発現変化を調べる。遺伝子発現変化が見られた遺伝子のプロモーター領域周辺のクロ

マチン修飾変化を、ヒストン H3 アセチル化あるいはメチル化特異的抗体を用いて、クロマチン免疫沈降法で調べた。

(5) 野生型および HSF4 欠損マウスのレンズで、HSF4 結合領域のヒストン H3 のアセチル化、メチル化状態を、特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降法で調べた。

(6) 熱ストレスを負荷することで、HSF4 結合領域に隣接した遺伝子の発現変化が起こるか、野生型、HSF4 そして HSF1 欠損レンズを培養し、熱ストレスを負荷した後に RNA を調整し、遺伝子発現変化を RT-PCR 法で調べた。さらに、HSF4 欠損レンズ上皮細胞にアデノウイルス HSF4 を導入することで、熱ストレス負荷による遺伝子発現が野生型程度まで回復するか調べた。

4. 研究成果

(1) マウスのレンズの発生過程における、HSF 群の発現変化を調べた結果、HSF4 は胎生期から幼児期まで、発現が持続しているが成人で若干の減少が認められた。胎生期では HSF 群全ての発現が高いのに対して、成人になると HSF1 と HSF2 の発現は極端に減少することが分かった (図 1)。発生過程が進むにつれて、HSF 群の DNA 結合能力は低下した。どの発生過程でも主に HSF4 が DNA 結合し、常に三量体を形成していることが分かった。

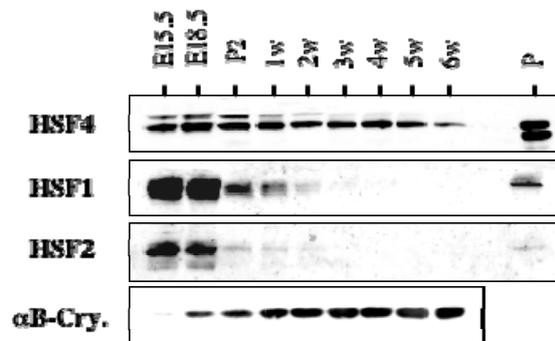


図 1 レンズ発生過程における HSF 群の発現

(2) HSF1 と HSF2 の発現がまだ若干残っている生後 2 日目のレンズ上皮細胞を構築して、クロマチン免疫沈降法から、HSF4 結合領域を 71 個同定した。生後 2 日目のレンズにおける同定領域の HSF4 の結合は、71 個中 53 個で再現性を得ることができた。さらに、レンズ上皮細胞を用いた際は、90%と高確率で再現できることが分かった。同定した領域を調べると、HSF1 と HSF2 で知られている DNA 結合配列である逆向きの繰り返し nGAA 配列よりも曖昧な nGnnn であることが明らかになった (図 2)。また、*In vitro* binding selection

法においても HSF4 結合配列は nGnnn の曖昧なコンセンサス配列であった。さらに、*In vivo* の HSF4 結合領域は、プロモーター領域の存在する 5' -UTR ではなくイントロン 1 や遺伝子からかなり離れた位置に多く存在する傾向が見られた(図 3)。

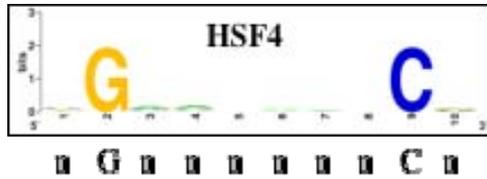


図 2 HSF4 の DNA 結合配列

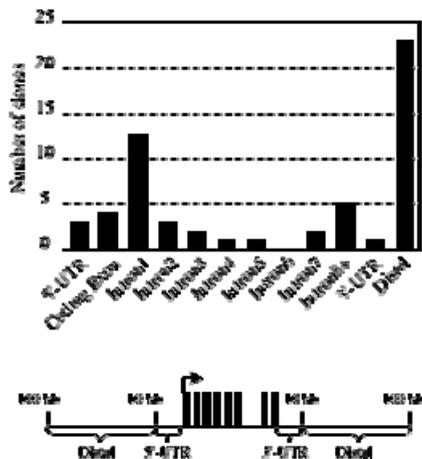


図 3 HSF4 の結合領域の位置

(3) HSF4 結合領域に HSF1 や HSF2 が結合することができるか、レンズ発生過程を追って検討した。結合領域を GroupA と B に分けることができた。GroupA の 17 領域は、レンズ発生過程のどの時期においても HSF4 のみが結合する領域である。GroupB の 34 領域は、全ての HSF が発現している E18.5 日目のレンズで、全てあるいは 2 つの HSF が結合できる領域である。この領域は、レンズ発生が進むにつれて、HSF1 と HSF2 の結合が減少した。このことから、GroupB は発現量に依存して結合が変化することが分かった(図 4)。

(4) GroupA の 17 領域に隣接する遺伝子の発現変化を野生型および HSF4 欠損マウスのレンズを用いて検討した結果、変化がないことがわかった。しかしながら、GroupB の 34 領域に隣接する遺伝子のうち 9 つの遺伝子は HSF4 欠損マウスにおいて遺伝子発現の変化が見られた。調べた全体の 9.7% (6 つ) 遺伝子で HSF4 により転写亢進がされること、さらに 4.8% (3 つ) 遺伝子が転写抑制することが分かった(図 5)。9 つの遺伝子のプロモーター領域では、転写亢進が見られた遺伝子は H3K9

アセチル化の亢進、さらにプロモーター領域への RNA ポリメラーゼ II のリクルートが確認された。一方、転写抑制がみられた遺伝子の結合領域では H3K9 メチル化が亢進していた。この 9 つの遺伝子は、糖転移酵素や転写因子、さらには機能がまったく分からない様々な遺伝子であった。今回行った HSF4 結合領域の同定によって、新たなターゲット遺伝子を見出すことができた。

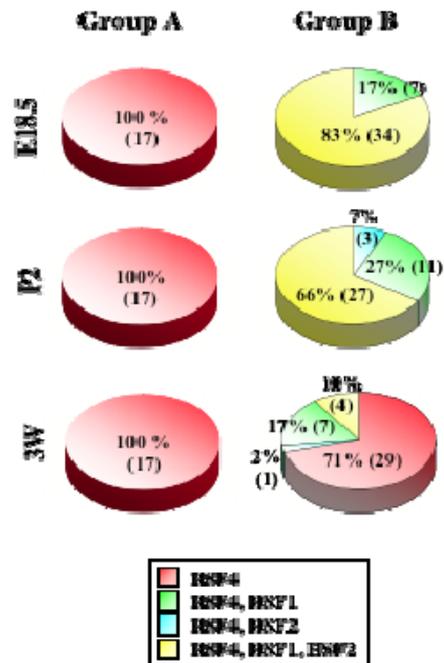


図 4 レンズ発生過程における HSF 群の結合

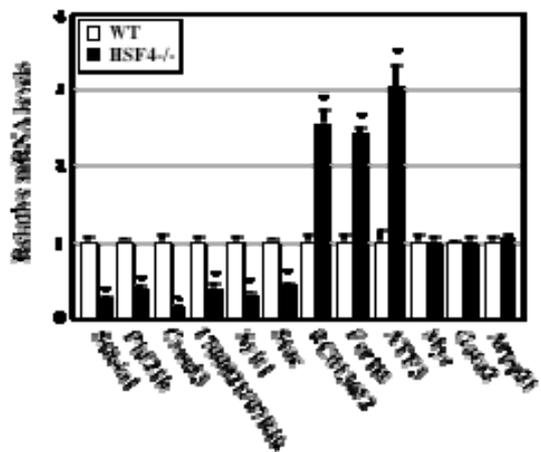


図 5 HSF4 結合領域に隣接した遺伝子の発現変化

(5) HSF1 が IL-6 のプロモーター領域に結合して、クロマチン修飾に関与していることが知られている。そこで、HSF4 結合領域でのクロマチン修飾変化が見られるか確認した。する

と、レンズ発生過程のどの時期も HSF4 のみ結合する GroupA の結合領域で、野性型に比べ HSF4 欠損マウスのレンズで H3K9 メチル化が亢進していることが分かった。また、GroupB においても同様の結果が得られている(図 6)。HSF4 欠損マウスのレンズ上皮細胞に HSF4 を戻すと H3K9 アセチル化が回復することから、HSF4 が結合してクロマチンを開いた状態にしていることが示唆された。

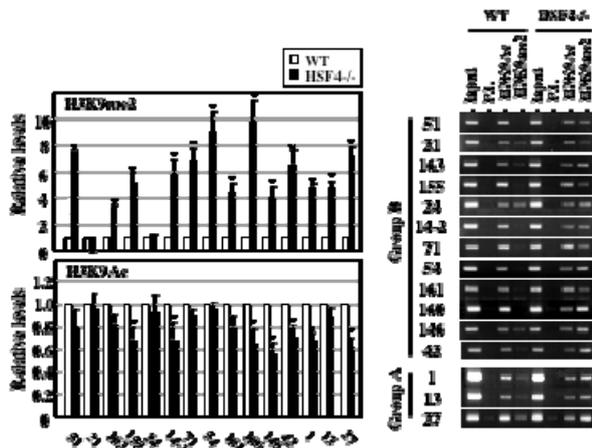


図 6 HSF4 結合領域のクロマチン修飾変化

(6) 今回同定した HSF4 結合領域には古典的な熱ショック遺伝子のプロモーター領域は同定できなかった。そこで、HSF4 結合領域に隣接する遺伝子が熱ストレスで誘導することができるかレンズ培養系で調べた。全体では 33% の遺伝子が誘導され、GroupA では 17 個中で 3 個、GroupB では 44 個中で 17 個が熱ストレスで誘導されることが分かった。興味深いことに、全体の 15% の遺伝子は HSF4 に依存的に誘導されていた(図 7)。さらに、GroupA の C330019L16Rik, 2310046K01Rik, Cetn1 は HSF1 あるいは HSF4 欠損レンズ上皮細で共に熱ストレスによって発現誘導を起こさなかった。そこで、HSF4 欠損マウスレンズ上皮細胞に HSF4 を戻すと、C330019L16Rik, 2310046K01Rik は熱ストレスによる遺伝子誘導が回復することがわかった。驚いたことに、熱ストレスによって 2310046K01Rik, Cetn1 の HSF4 結合領域に HSF1 や HSF2 も結合することができるようになった。一方、HSF4 欠損マウスレンズ上皮細胞では、熱ストレスを負荷しても HSF1 と HSF2 の結合は見られなかった。このことから、HSF4 はクロマチン制御を起こすことで、熱ストレスにおける遺伝子発現制御に関与していることが示唆される。

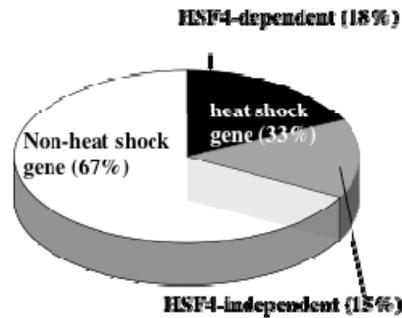


図 7 熱ストレスによる HSF4 結合領域に隣接した遺伝子の発現変化

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)

① MITSUAKI FUJIMOTO, KOJI OSHIMA, TOYOHIDE SHINKAWA, BEI BEI WANG, SACHIYE INOUE, NAOKI HAYASHIDA, RYOSUKE TAKII, AKIRA NAKAI, Analysis of HSF4 Binding Regions Reveals Its Necessity For Gene Regulation during Development and Heat Shock Response in Mouse Lenses, The Journal of biological Chemistry, 30, 29961-29970, 2008, 査読有

② TAKEFUMI MIKURIYA, KAZUMA SUGAHARA, KAZUTAKA SUGIMOTO, MITSUAKI FUJIMOTO, TSUYOSHI TAKEMOTO, MAKOTO HASHIMOTO, YOSHINOBU HIROSE, HIROAKI SHIMOGORI, NAOKI HAYASHIDA, SACHIYE INOUE, NAKAI AKIRA, HIROSHI YAMASHITA, Attenuation of Progressive Hearing Loss in a Model of Age-related Hearing Loss by a Heat Shock Proteins Inducer, Geranylgeranylactone, Brain Research, 1212, 9-17, 2008, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① 藤本充章、熱ショック転写因子 HSF4 の発生過程と熱ショック応答での役割、日本分子生物学会・日本生化学会、2008 年 12 月 10 日、神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし