

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07402

研究課題名(和文) 染色体分配関連因子による熱ショック遺伝子の転写誘導機構の解明

研究課題名(英文) The pericentromeric protein shugoshin 2 cooperates with HSF1 in heat shock response and RNA Pol II recruitment.

研究代表者

瀧井 良祐 (Taki i, Ryosuke)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00419558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、DNAプルダウンアッセイとプロテオーム解析を基盤とした手法により、HSF1転写複合体の構成因子を同定した。まずDNAプルダウンを行い、HSF1の転写活性と関連する約200の因子を同定した。その中でも染色体分配関連因子(Shugoshin2)に着目した。この因子は、熱刺激時にHSF1依存的にHSP70プロモーター領域へ呼び込まれることが分かった。熱依存的な細胞死についても、同因子のノックダウンは、強い細胞死の誘導とユビキチンタンパク質の蓄積の上昇が見られ、熱依存的なプロテオスタシスの維持に必要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱ショック応答は、温熱ストレスによる応答機構というだけでなく、通常状態においてもこのストレス応答は弱いレベルではあるが、持続的に働いている。また応答機構が神経変性疾患やがんの発生および進展と関連することが知られる。つまり熱ショック応答の解明は、単なる熱ショック応答機構の解明だけでなく、神経変性疾患やがんの治療へとつながる。本研究課題では新たに、本来は染色体分配に関わるSGO2が熱ショック応答を制御するHSF1転写複合体の構成因子の1つであること、さらにSGO2がストレスによって蓄積するユビキチンタンパク質の除去に関わる因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In response to heat shock, heat shock transcription factor 1 (HSF1) is activated and occupies heat shock gene promoters. Here, we show in comparative analyses of HSF1 paralogs and their mutants that HSF1 interacts with the pericentromeric adaptor protein shugoshin 2 (SGO2) during heat shock in mouse cells, in a manner dependent on inducible phosphorylation of HSF1 at serine 326, and recruits SGO2 to the HSP70 promoter. Furthermore the HSF1-SGO2 complex supports cell survival and maintenance of proteostasis in heat shock conditions.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：熱ショック応答 転写因子 HSF DNAプルダウン 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質はリボソームで合成されると速やかに折りたたまれて正しい立体構造を持つ成熟タンパク質となる。一方でその約 30%は異常構造をとるが、再折りたたみや分解を受けることで、タンパク質の正しい構造と適切な量が保たれる。細胞が持つこの異常タンパク質に対する処理能はプロテオスタシス容量と呼ばれ、その破綻はタンパク質凝集体の蓄積を引き起こし、細胞の機能障害を引き起こす。神経細胞でのプロテオスタシス容量の低下は、認知症や異常行動を導き、アルツハイマー病やポリグルタミン病などの神経変性疾患の原因となる。生物におけるプロテオスタシス容量を調節する主要な仕組みの 1 つが熱ショック応答である。この応答はシャペロンである熱ショックタンパク質 (HSP) 群やタンパク質分解に関与する因子群の誘導を特徴とし、タンパク質毒性に対する生物に普遍的な適応機構である。熱ショック応答は、哺乳類では主に熱ショック因子 (HSF1) が HSP の発現誘導を担う。様々な研究者が HSF1 の活性化機構を明らかにすることを目指しているが、強力な制御因子は見つかっていない。そこで研究代表者は新たに DNA プルダウン法を確立し、ヒト HSF1 転写複体の解析を開始した。

2. 研究の目的

熱ショック応答は、熱刺激による急激な HSP 群の誘導が見られることから、古くから転写のモデルとして研究されてきた。その主要な制御因子が熱ショック転写因子 (HSF) である。HSF は酵母からヒトに至るまで、進化の過程でよく保存されている。高等動物では HSF ファミリー (HSF1-4) が存在し、中でも HSF1 が哺乳動物の HSP 発現誘導を担う。

これまでマウスやヒトの哺乳類の HSF1 は HSP 誘導能を持つが、ニワトリの HSF1 はこれを持たないことがわかっている。そこで、ニワトリと近縁のトカゲの HSF1 のクローニングを行い様々な生物種における HSF1 の HSP 誘導活性を調べる。またニワトリ、トカゲの HSF1 をスワップ解析により、HSF1 の活性に必要な領域を同定する。またこの領域がヒトを含めた HSF1 に保存されているか確認する。さらにこれらの HSF1 の情報を基に、DNA プルダウン法を用いて、新規の HSF1 転写複体の構成因子の同定を行った。その結果、676 の新規 HSF1 複体の構成因子群を同定した。さらに上位 10 の因子にしぼり機能スクリーニングを行い、染色体分配に関わる因子 SGO2 (Shugoshin 2) が熱ショック応答に必要であることを見出した。そこで SGO2 による HSF1 活性の促進機構についてその分子機構の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 進化的アプローチとプロテオーム解析による HSF1 転写複体の解析

下記に示すがトカゲ HSF1 が HSP 誘導活性をもつことがわかり、ニワトリ HSF1 とのスワップ解析により HSF1 の転写活性に必要な部位を調べることが可能となった。我々は 2003 年時点でヒト HSF1 とニワトリ HSF1 のアミノ酸の比較から、その活性に必要な部位を同定しようとした。しかし、ヒト-ニワトリ HSF1 間では異なるアミノ酸も多く、解析ができなかった。しかし、ニワトリと近縁のトカゲの HSF1 をクローニングし、そこに HSP 誘導活性があることを見出したことで、トカゲ-ニワトリ-ヒトの 3 者のアミノ酸を比較することが可能となり、HSF1 の転写活性に必要な領域を調べることが可能となる。

また同定した領域をトカゲ、ニワトリ、ヒト HSF1 に変異を導入し、それぞれの HSP 誘導能の変化を調べる。次に、野生型および変異型トカゲ HSF1 を用い、HSF1 転写複体の解析を行う。具体的には、HSF1^{-/-} MEF にトカゲ HSF1 をアデノウイルスにより過剰発現する。次にこの細胞に熱刺激を加え、細胞核抽出液を調整する。ここにビオチン標識したヒト HSP70 プロモーター-DNA を加え混和し、ストレプトアビジンビーズを用いた沈降法により HSF1 転写複体を得る。その構成因子は九州大学 生体防御医学研究所 松本雅記博士の下でプロテオーム解析を行うことで同定する。

(2) HSF1 転写複体における転写の促進因子の同定

HSF1 変異体間の比較から HSF1 の転写活性と相関する因子に着目する。上位約 10 因子に絞り、ノックダウンにより、HSF1 の転写の促進因子を明らかにする。

(3) 相互作用部位の同定

HSF1 転写複体として同定した SGO2 が HSF1 と結合することを細胞抽出液を用いて調べる。また様々な変異 HSF1 を用い、SGO2 の相互作用に必要な領域を明らかにする。また SGO2 が熱刺激依存的に HSP70 プロモーター部位へ呼び込まれることをクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) により調べる。

(4) SGO2 による HSF1 転写活性促進機構の解明

SGO2 による転写の促進機能の解明を明らかにするために、MEF 細胞に SGO2 過剰発現細胞に熱刺激を加えた核抽出液を作成し、SGO2 による免疫共沈降とタンパク質質量分析を行い、SGO2 による転写の促進因子を同定する。また、その因子が HSF1 や SGO2 と相互作用するこ

と、相互作用変異 SGO2 を導入することで、熱ショック応答の減少、細胞内プロテオスタシス容量が減少することを確認する。

4. 研究成果

(1) HSF1 の転写の活性に必要な領域の同定

ニワトリの HSF1 は熱依存的な HSP70 誘導能を持たないが、トカゲの HSF1 はこれを有する。これまでニワトリとヒトの HSF1 のアミノ酸の比較からは HSF1 の転写活性に必要な領域は同定できなかった。しかし、ニワトリ HSF1 と非常に似たアミノ酸配列を持つが HSP 誘導能を有するトカゲ HSF1 を同定できたことで、ニワトリとトカゲ HSF1 の比較が可能となった。まず、スワップ解析を行って、最終的に HSF1 の転写活性に必要なアミノ酸を同定するために、数種のキメラ HSF1 を作成した。その結果、DNA 結合領域と領域 X が転写の促進を行うことがわかった。さらに詳細にキメラ HSF1 を作成し、HSP70 の誘導量の変化を調べた結果、DBA 結合領域の 17 番目のプロリンと d 領域と名付けた 22 アミノ酸の 2 つの領域が HSP70 の誘導を促進することがわかった。ニワトリではプロリンがセリンに置換されて、また d 領域を欠く。しかし、ニワトリ HSF1 にこれらの変異を導入したトカゲ型ニワトリ HSF1 は HSP70 誘導能を獲得し、一方でニワトリ型トカゲ HSF1 では HSP70 誘導能が大きく減弱した。この結果からもプロリン 17 と d 領域の 22 アミノ酸が HSF1 の活性に必須のアミノ酸であることがわかった。またトカゲ HSF1 ではこれらの変異を導入することで HSP70 誘導能が約 1/20 に減少した (図 1A)。

(2) HSF1 転写複合体の同定

まず両端をビオチン標識したヒト HSP70 プロモーター領域約 450bp を用意し、これが DNA プローブとして活性化した HSF1 を沈降できるプルダウンアッセイを確立した (図 1B)。そこで、HSF1^{-/-} MEF に野生型および変異型トカゲ HSF1 を過剰発現した細胞を用意し、熱刺激を加える。この細胞の核抽出液を調整し、DNA プローブと混和し、それぞれの HSF1 転写複合体の構成因子を同定した。まず約 1800 の因子を同定し、その中でも転写装置を担う既知の因子を含む 278 の HSF1 転写複合体タンパク質を同定した (図 1C)。さらに HSF1 変異体間の比較から HSF1 の転写活性と相関する約 20 因子を見出した。

(3) SGO2 は HSP70 の転写促進因子である

20 因子の中から既知のヒストンアセチル化酵素群やクロマチン再構成複合体因子を除いた 11 因子をノックダウンして熱ストレスによる HSP70 の転写誘導を調べた。その結果、5 因子が促進因子として、3 因子が抑制因子として働くことがわかった。Mediator の 1 因子である Med12 が最も強力な HSP70 の誘導因子であった。そこで、染色体分配に関わる因子 SGO2 に着目した。SGO2 のノックダウンは、熱依存的な HSP70 の誘導の減弱が見られた。また SGO2 のノックダウンは、細胞周期に影響を与えず、細胞周期の変化ではなく、SGO2 が HSP70 の促進因子であることがわかった。

(4) 相互作用部位の同定

DNA プローブを用いたプルダウンアッセイの結果、HSF1 の転写複合体の構成因子として因子 A を同定したが、実際に内在性の HSF1 と SGO2 が相互作用するか免疫沈降法により確認を行った。熱刺激時のみ HSF1 と SGO2 の結合が確認できた。

次に、数種の HSF1 変異体を用い、HSF1 の 326 番目のセリンに対し SGO2 が相互作用することがわかった。HSF1 のセリン 326 のリン酸化は転写活性化の標識としてよく知られており、同部位をアラニンまたはグリシンに置換した HSF1 とは相互作用を示さなかった。

またクロマチン免疫沈降法を行い、HSF1 と SGO2 が熱依存的に HSP70 プロモーター部位へ呼び込まれることを確認した。さらにその呼び込みは HSF1 依存的に SGO2 が呼び込まれた。さらにセリン 326 の変異体では SGO2 の呼び込みが見られず、熱刺激時に HSF1 のセリン 326 のリン酸化に依存して、SGO2 がプロモーター部位に呼び込まれ HSF1 転写複合体の構成因子として働くことが明らかになった (図 2)。

(5) SGO2 による転写の促進機構の解明

熱依存的に転写開始点近傍に HSF1 依存的に SGO2 が呼び込まれ転写が促進することが分かった。そこで、SGO2 がどのように転写の促進に寄与するのか明らかにするために、MEF 細胞に SGO2 を過剰発現した細胞を用意し、熱刺激を加え核抽出液を調整した。

次に、核抽出液を抗 SGO2 抗体と混和し免疫共沈降を行い、相互作用因子をタンパク質質量分析 (LC-MS/MS) を行い同定した。その結果、SGO2 の既知の相互作用因子である PP2A 複合体の構成因子群が見られた。また驚くべきことに、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の構成因子群である RPB1、RPB2、RPB3 が上位に見られた。この結果は SGO2 が常に Pol II と結合しており、熱刺激時に SGO2-Pol II が HSF1 がある部位に呼び込まれ転写を促進するという新しい機構を発見した。

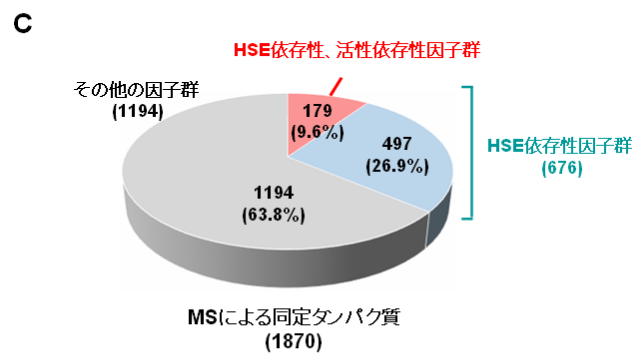
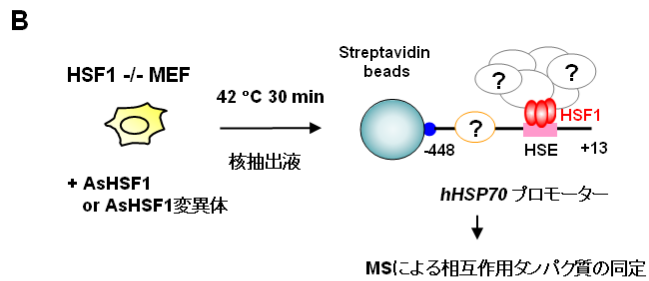
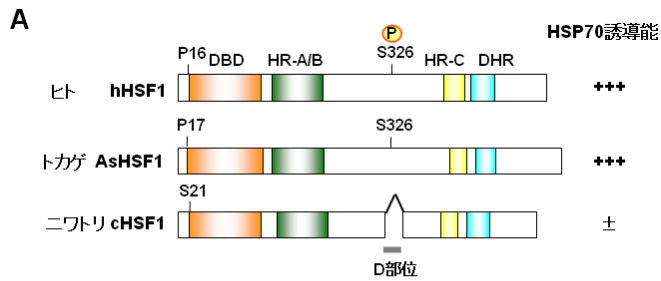


図1 DNA プルダウン法による HSF1 活性の促進因子の同定

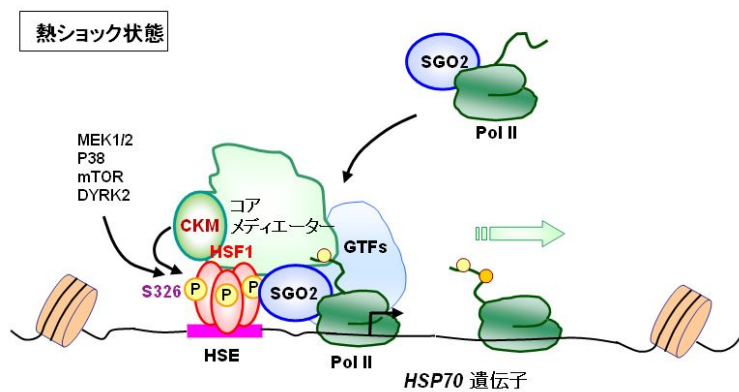


図2 SGO2 を介した HSF1 転写体機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Srivastava P, Takii R, Okada M, Fujimoto M, Nakai A	4. 巻 595
2. 論文標題 MED12 interacts with the heat-shock transcription factor HSF1 and recruits CDK8 to promote the heat-shock response in mammalian cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 1933-1948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tabara M, Shiraishi K, Takii R, Fujimoto M, Nakai A	4. 巻 105
2. 論文標題 Testicular localization of activating transcription factor 1 and its potential function during spermatogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Reprod.	6. 最初と最後の頁 976-986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioab099.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katiyar Arpit, Fujimoto Mitsuaki, Tan Ke, Kurashima Ai, Srivastava Pratibha, Okada Mariko, Takii Ryosuke, Nakai Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 HSF1 is required for induction of mitochondrial chaperones during the mitochondrial unfolded protein response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1135 ~ 1148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12863	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takii R, Fujimoto M, Matsumoto M, Srivastava P, Katiyar A, Nakayama KI, Nakai A.	4. 巻 38
2. 論文標題 The pericentromeric protein shugoshin 2 cooperates with HSF1 in heat shock response and RNA Pol II recruitment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 e102566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019102566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀧井良祐、Pratibha Srivastava、藤本充章、Arpit Katiyar、岡田真理子、中井 彰
2. 発表標題 MED12による熱ショック応答の制御機構の解析
3. 学会等名 第43回日本生化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Pratibha Srivastava, Ryosuke Takii, Mariko Okada, Mitsuaki Fujimoto, and Akira Nakai
2. 発表標題 MED12-CDK8 promotes the heat shock response in mammalian cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本充章、瀧井良祐、Pratibha Srivastava、岡田真理子、中井 彰
2. 発表標題 HSF1-S419リン酸化による熱ショック応答の調節
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧井良祐、藤本充章、Pratibha Srivastava、Arpit Katiyar、岡田真理子、中井 彰
2. 発表標題 染色体関連因子SGO2は熱ストレス時の転写促進因子として働く
3. 学会等名 第14回 日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧井良祐、藤本充章、Arpit Katiyar、Pratibha Srivastava、岡田真理子、中井 彰
2. 発表標題 染色体関連因子SGO2が熱ショック応答を促進する機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 中井彰、瀧井良祐、藤本充章	4. 発行年 2020年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 458
3. 書名 ミトコンドリアダイナミクス：機能研究から疾患・老化まで	

1. 著者名 瀧井 良祐, 中井 彰	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本生化学会	5. 総ページ数 149
3. 書名 生化学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------