

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16046

研究課題名(和文)熱ショック転写因子HSF1の温度感知機構の比較生物学的解析

研究課題名(英文)Thermo-sensing Mechanism of Heat Shock Factor 1 through Comparative Biology

研究代表者

坂本 丞 (Sakamoto, Joe)

基礎生物学研究所・生命熱動態研究室・特任助教

研究者番号：80804145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：熱ショック応答は生物が持つ過剰な温度負荷に対する防御機構である。地球上では地域ごとに様々な温度環境が存在する。そして、生物はこれらの温度環境に適応して生育している。そのため、熱ショック応答が惹起される温度が生育環境ごとに異なる可能性がある。本研究では、熱ショック応答の制御因子の一つである熱ショック転写因子(HSF)1に着目し、メダカをモデルとしてより低温な環境に生育するヒラメを比較対象として用いてHSF1の温度特性を解析することを目的とした。実際に、メダカとヒラメのhsf1遺伝子をクローニングし、その温度特性を解析する評価系の構築を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度は生物の生存にとって非常に重要な要素の一つである。熱ショック応答は古くから研究されているが、生物の生育環境温度の違いと熱ショック応答の関連について比較生物学的な観点から進められた研究は少ない。近年、温度センサーであるTRPチャンネルがノーベル賞を受賞するなど、生物と温度の関わりが注目を浴びている。そのような中で、本研究の成果は生物の環境温度適応戦略に新たな知見をもたらしているものであると言える。

研究成果の概要(英文)：Heat shock response is a biological system for the protection from heat stress. On the Earth, there are various temperature environments in every different region. Organisms adapt to and live in these temperature environments. Therefore, there is a possibility that the threshold temperature at which heat shock response is induced is different depending on the environments. In the current study, I focused on heat shock transcription factor (HSF) 1, one of the master regulators of heat shock response, and used medaka and flounder, which inhabit in the lower temperature than medaka, for the purpose of the comparison of HSF1 thermal property. I cloned hsf1 gene from both medaka and flounder, and proceeded to construct the evaluation systems to analyze temperature property.

研究分野：生物物理学

キーワード：熱ショック応答 HSF1 温度 比較生物学 メダカ ヒラメ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

熱ショック応答 (HSR) は過度な熱に対する細胞の保護機構であり、生物種間で非常によく保存されたシステムである。この熱ショック応答において、転写因子 HSF1 (Heat Shock Factor 1) が温度センサーとして働いており、上限温度を感知すると構造変化と三量体形成を経てゲノム上の標的遺伝子上流に存在するシス配列 (HSE; Heat Shock Element) に結合する。これにより、熱ショックタンパク質などの分子シャペロン機能を持つ一連の遺伝子群の発現が亢進し、タンパク質の品質管理が行われている。HSR のトリガー分子である HSF1 の DNA 結合ドメインのアミノ酸配列は、特に脊椎動物間で高度に保存されている。しかしながら、現存する生物種は多様な生育環境に適応しており、生育可能な環境温度域もさまざまである。例えば、哺乳類は一定の体温 (約 37 °C) に固定されており、外部の環境温度による影響を受けにくくなっている。他方で、爬虫類、両生類、魚類などは変温動物と呼ばれており、体温が環境温度により大きく影響を受ける。さらに変温動物は多様な環境温度に生育しており、魚類を例にするとメダカは約 25 °C 程度、ヒラメは約 20 °C 程度の水温に生育している。HSR は通常的环境温度から逸脱した高温に対する耐性機構であるため、生物の環境温度によって HSR が誘導される閾値となる温度 (生育上限温度) が異なっている可能性がある。研究代表者のこれまでの研究により、ヒラメの HSF1 はメダカ内在性 HSF1 よりも低温で活性化することが明らかとなっている。このことから、研究代表者はタンパク質自身が異なる温度を感知していると考えている。しかしながら、このような HSF1 活性化温度の違いがタンパク質のどの領域により生じているのかは、これまでのところ明らかになっていない。

2. 研究の目的

HSR は各生物種が生育できる環境温度の上限を規定する分子であるため、環境温度適応に深く関与しているはずである。また、HSF1 自身が温度センサーとして機能しているという報告もある。本研究では、HSR におけるトリガー分子の HSF1 の温度感知機構と生育環境温度を解析することで、転写因子のアミノ酸配列変化が生物の環境温度適応をどのようにコントロールしているのか、について明らかにすることを目的とする。そのために、HSF1 の分子進化およびメダカとヒラメ HSF1 の温度特性について解析する。

3. 研究の方法

HSF1 の分子進化の解析: 種々の塩基配列データベースから多岐にわたる生物種の HSF1 のアミノ酸配列を収集しこれにクローニングしたメダカとヒラメの HSF1 の配列を加えて、既存のアミノ酸進化速度モデルを使用して分子系統樹の推定を行った。また、メダカとヒラメの HSF1 について、タンパク質の機能に影響を与えるアミノ酸変異を PROVEAN により解析した。メダカとヒラメ HSF1 の温度特性の解析: これまでに、ヒラメの HSF1 がメダカの HSF1 よりも低温で機能することを示唆するデータが得られている。そこで、これら二種の HSF1 に着目して温度特性の解析を行った。HSF1 の温度特性を比較解析するためには、組換えタンパク質を使用した *in vitro* な評価系が有用である。そのため、メダカとヒラメ HSF1 の cDNA を組換えタンパク質発現を試みた。加えて、これらの HSF1 の温度負荷依存的な転写活性化能を解析するために、メダカ培養細胞を用いたアッセイ系の構築を進めた。さらに、*in vitro* 環境での解析を *in vivo* で解析するために、メダカとヒラメ HSF1 をそれぞれ発現するトランスジェニックメダカを CRISPR/Cas9 システムを用いたノックイン法により作成を試みた。

4. 研究成果

(1) HSF1 の分子系統解析

これまでに分子系統学的な解析を行うためのソフトウェアなどを導入し、種々の生物の HSF1 のアミノ酸配列を取得した。これらを用いて、分子系統学的な解析を行った。しかしながら、生育温度を反映した結果はこれまでのところ得られていない。これは、既存のアミノ酸一次配列を解析するためのモデルを使用したことが理由であると考えられる。生育温度を反映させるにはアミノ酸の一次構造に加えて、二次構造や三次構造を考慮したモデルを使用する必要がある。このようなモデルはいくつか報告されている。しかしながら、HSF1 の分子内では明瞭な立体構造を有する領域は少なく、半分以上の領域が天然変性領域となっている。これが原因で結晶構造解析が難しく、タンパク質全長の情報を得ることができず、モデルの適用が難しかった。DNA 結合ドメインなど一部のドメインの構造はわかっているため、それをもとに解析すれば生育環境温度の違いが解析結果に反映される可能性があることがわかった。

(2) HSF1 の機能に影響を与えるアミノ酸置換の解析

PROVEAN を使用して HSF1 の機能に影響を与えるアミノ酸置換の検出を試みた。この解析では、メダカ HSF1 の配列を基準として使用した。この解析により、HSF1 の機能に影響を与える多くのアミノ酸置換を検出することができた。解析結果の中には、メダカとヒラメの系統関係が離れ

ていることに起因するものも含まれているため、これらの結果をより精査することで HSF1 の温度特性に影響を与えうるアミノ酸置換を予想することができる可能性がある。

(3) HSF1 温度特性の *in vitro* 評価系の構築

in vitro で HSF1 の活性化温度を解析するために組み換えタンパク質発現系の構築を行った。ヒラメ HSF1 のクローニングは完了していたため、NBRP Medaka が提供する完全長 cDNA クローンライブラリーから、メダカ HSF1 の完全長 cDNA を入手した。これらを用いてメダカおよびヒラメ HSF1 の組み換えタンパク質の発現に必要なコンストラクトを作製した。これらを使用して HSF1 の組換えタンパク質を発現させるために最適な条件を探索している。更に、HSF1 の機能解析をハイスループットに行うために、メダカ培養細胞を利用した評価系の構築に着手した。使用する細胞株を入手して、リポフェクションによる遺伝子導入を試みた。しかしながら、細胞の増殖が遅いことや遺伝子導入効率が悪いことが障壁になっている。初代培養細胞や電気穿孔法などを使用することで、改善する可能性がある。

(4) HSF1 温度特性の *in vivo* 評価系の構築

HSF1 温度特性の *in vivo* で評価するためには、メダカ内在性 HSF1 の発現が模倣できるようなトランスジェニックメダカを作出して使用するのが理想的である。CRISPR/Cas9 法を用いたノックイン法を用いて、トランスジェニックメダカの作出を試みた。実験に使用する sgRNA はメダカ HSF1 遺伝子の 5' -UTR が標的となるように設計した。ノックインする HSF1 にはその局在がわかるように蛍光タンパク質 mNeonGreen を連結した。メダカ受精卵の一細胞期にマイクロインジェクションして導入を試みたが蛍光陽性の個体は得られなかった。これは、HSF1 に連結せずに GFP だけを発現させるような条件では蛍光陽性の個体が得られたため、sgRNA が機能していないわけではなかった。この時 GFP の蛍光が非常に微弱であったことや、HSF1 の核局在による蛍光の視認性の低下がトランスジェニックメダカの作出難易度を上げていると考えた。そこで、HSF1 の分解等に影響を受けないように T2A 配列を使って蛍光タンパク質を切り離す様に導入遺伝子を設計し直した。目下、これを用いてトランスジェニックメダカを作出中である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Abe Gembu, Hayashi Toshinori, Yoshida Keigo, Yoshida Takafumi, Kudoh Hidehiro, Sakamoto Joe, Konishi Ayumi, Kamei Yasuhiro, Takeuchi Takashi, Tamura Koji, Yokoyama Hitoshi	4. 巻 100
2. 論文標題 Insights regarding skin regeneration in non-amniote vertebrates: Skin regeneration without scar formation and potential step-up to a higher level of regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcdb.2019.11.014	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 坂本丞
2. 発表標題 レンオ型蛍光タンパク質性温度プローブgTEMPの熱動態解析への応用
3. 学会等名 Biothermology Workshop 2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Joe Sakamoto, Eriko Chisada, Pham Van Cuong, Masahiro Nakano, Takeharu Nagai, Hayato Yokoi, Takeshi Kitano, Yasuhiro Kamei
2. 発表標題 Thermo-sensory mechanism of Heat Shock Factor 1 and its Application to Local Gene Induction
3. 学会等名 2nd JSDB-GfE Young scientist exchange meeting inKyoto 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Joe Sakamoto, Yuko Kamikawa, Yasuhiro Kamei
2. 発表標題 osIR-LEGO: A protocol for DIY Local Gene Induction Microscope via Infrared Laser Irradiation
3. 学会等名 25th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Joe Sakamoto, Yuko Kamikawa, Yasuhiro Kamei
2. 発表標題 Open Source Local Gene Induction System by IR Laser Irradiation
3. 学会等名 "The 6th International Symposium on Bioimaging & The 28th Annual Meeting of the Bioimaging Society of Japan BIOIMAGING 2019" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Joe Sakamoto, Yuko Kamikawa, Yasuhiro Kamei
2. 発表標題 Open Source IR-LEGO: 赤外レーザー集光照射による局所遺伝子発現誘導顕微鏡の自作とその応用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本丞、上川優子、亀井保博
2. 発表標題 osIR-LEGO: An Open Source Gene Induction Microscope through InfraRed LASER Irradiation
3. 学会等名 Biothermology Work Shop 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 坂本丞、永井健治、亀井保博	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 60
3. 書名 月刊 細胞 12月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

亀井研究室：生命熱動態研究室 (Laboratory for Biothermology)
https://www.nibb.ac.jp/lspectro/kamei_lab.html

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
---------	---------