

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570216

研究課題名(和文) ストレスタンパク質ヘムオキシゲナーゼの熱ショック転写因子による発現制御

研究課題名(英文) Regulation of heme oxygenase 1 gene expression by heat shock factor1

研究代表者

井上 幸江 (Inoue, Sachie)

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60159978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ヘム分解酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)は、熱ショックタンパク質32としても知られているが、温熱刺激によるHO-1の誘導合成は、種や細胞株、培養条件により異なる。本研究では、熱ショック転写因子(HSF1)によるHO-1の発現制御を明らかにするため解析を行った。その結果、通常温度では、HSF1は、ヘムによるHO-1の誘導を抑制するが、温熱刺激後は、ヘムによるHO-1の誘導を促進した。HSF1は熱ストレスに対して熱ショックタンパク質(Hsps)を誘導するとともに、様々なストレス条件下でHO-1の発現を厳密に制御することによって細胞保護に働いていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Heme-degrading enzyme, heme oxygenase-1 (HO-1), plays a role protecting cells against oxidative stress. The HO-1 is also known as heat shock protein 32 (Hsp32), however, the heat inducible HO-1 is different in species, cell lines, and culture conditions. In this study, we examined the role of heat shock factor 1 (HSF1) on the regulation of HO-1 expression by using wild-type and HSF1-null mouse embryonic fibroblast (MEF). Our results showed that HSF1 suppressed heme-induced HO-1 expression in normal growth condition and facilitated heme-induced HO-1 expression during heat shock. In conclusion, HSF1 protect cells by not only inducing the expression of Hsps under heat stress condition but also fine controlling the expression of HO-1 under various stress conditions.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

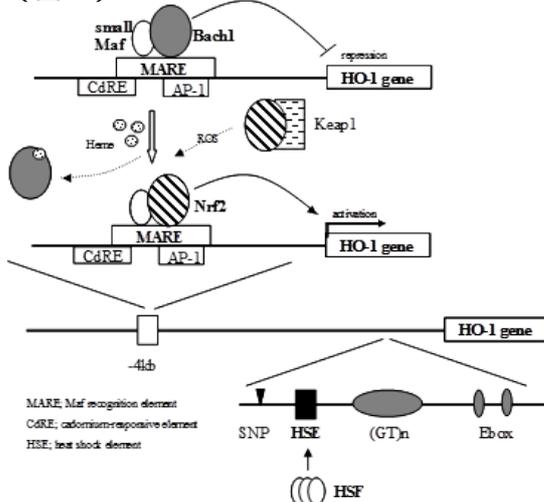
キーワード：熱ショック因子 ストレス応答 ヘムオキシゲナーゼ 発現制御 生体防御 小Maf転写因子

1. 研究開始当初の背景

ヘムオキシゲナーゼ (EC1.14.99.3) には 2つのアイソフォーム (HO-1、HO-2) がある。そのうち HO-1 は、さまざまなストレスによって誘導され、細胞毒性の高いフリー・ヘムを分解する律速酵素であり、その代謝産物であるビリベルジン、CO、Fe²⁺は酸化組織障害に防御的貢献をしている。一方、熱ショック転写因子には、4つのファミリー (HSF1、HSF2、HSF3、HSF4) がある。そのうち哺乳類では HSF1 がニワトリでは HSF3 が、温熱ストレスによって活性化され、熱ショックタンパク質 (Hsp) を誘導合成し、変性タンパク質による細胞障害からの保護に働く。

HO-1 のヘムによる誘導は、ヘムにより抑制性転写因子 Bach1 がはずれ、代わりに Nrf2 が結合することによって転写が促進することが報告されている (図1上)。HO-1 はストレス応答タンパク質として見出され Hsp32 とも呼ばれ、プロモーター上流には熱ショック配列 (HSE) が存在するが、熱ショックによる発現誘導は、動物種や細胞株によって異なり、その詳細は不明である (図1下)。

(図1)



2. 研究の目的

本研究では、HO-1 発現調節における HSF の作用機序および他の転写因子との関連性を解析することによって、HO-1 の生体防御機構における生理機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

野生型および HSF1 欠損マウス胎仔繊維芽細胞 (MEF) を用い、温熱ストレスやヘムを添加した後、HO-1 と Hsp70 の発現量をウエスタンブロット法やリアルタイム PCR で測定する。

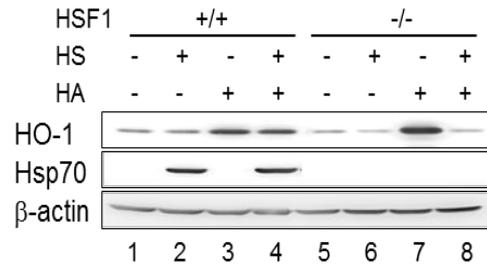
マウス DNA チップを用い、ストレス負荷後に RNA を回収し、アレイ解析を行い、発現変化が見られる遺伝子群を検索し、リアルタイム PCR 法で確認する。さらに、

同定された因子が HSF1 と相互作用を持つかどうかを免疫沈降法で確認する。

4. 研究成果

(1) 野生型および HSF1 欠損 MEF を用い、熱刺激 (HS; 42度1時間、37度6時間)、ヘム添加 (HA; 100 μM、6時間) およびその両者のストレスを与えた後、HO-1 と Hsp70 の発現量をウエスタンブロット法で解析した (図2)。

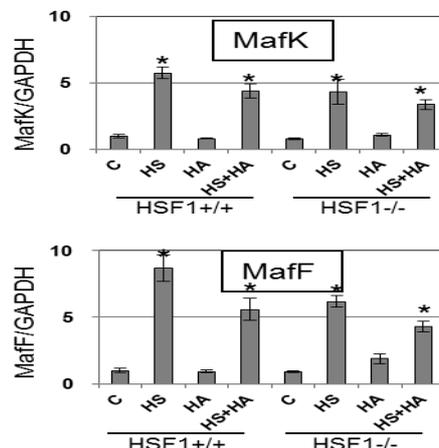
(図2)



その結果、Hsp70 と異なり、HO-1 は熱刺激のみでは誘導されなかった。ヘムによる HO-1 の誘導は、HSF1 欠損 MEF 細胞の方が強かった。このことは、HSF1 はヘムによる HO-1 の誘導に対して抑制的に働くことを示唆する。熱刺激とヘム添加の両者による HO-1 の誘導は、HSF1 欠損 MEF 細胞において著しく抑制された。このことは、何か抑制性の転写因子が誘導されることを示唆する。

(2) 野生型および HSF1 欠損 MEF 細胞を用い、熱刺激 (HS; 42度1時間、37度3時間)、ヘム添加 (HA; 100 μM、3時間) およびその両者のストレスを与えた後、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、3種類の小 Maf 転写因子のうち、MafK と MafF が熱刺激によって誘導されることが示されたので、リアルタイム PCR 法で確認した (図3)

(図3)



(3) 野生型およびHSF1欠損MEF細胞の両者でMafKとMafFが熱刺激によって誘導されることが示されたが、熱刺激とヘム添加の両者によるHO-1の誘導は、HSF1欠損MEF細胞において著しく抑制されていた。このことは、小Mafホモダイマーによる転写抑制が野生型MEF細胞では、HSF1によって阻害されている可能性があると考え、小Mafと結合する因子を免疫共沈降法により解析した。その結果、HSF1ではなく熱刺激によって誘導合成されたHsp70が小Mafと結合することが分かった。このことは、野生型MEF細胞では、MafKとMafFが熱刺激によって誘導されるが、同じく熱刺激により誘導されるHsp70によってトラップされるため、小Mafホモダイマーによる転写抑制が解除されることを示唆する。

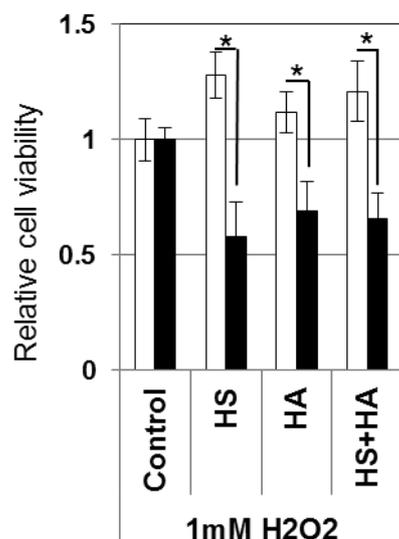
(4) 以上の結果は、HSF1が存在することによって、様々なストレス負荷時に発現誘導されるHO-1の量が適度に保持されていることを示す(図4)。

(図4)

	HSF1+/+	HSF1-/-
Heme or Cd		
HS + Heme or Cd		

そこで、その生理的意義について検証した。それぞれのストレス負荷後、過酸化水素を添加し、24時間後の細胞生存率を調べた(図5)。その結果、HO-1の過剰あるいは過小発現状態では、細胞の生存率が低下していた。

(図5)



(5) 以上の結果をまとめると、HSF1は、様々なストレス負荷時において、分子シャペロンであるHsp70の発現を制御するとともに、ヘム分解酵素HO-1の発現を小Mafを介して適正に制御することによって、細胞保護に働いていることが明らかとなった。

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4件)

Shinkawa T, Tan K, Fujimoto M, Hayashida N, Yamamoto K, Takaki E, Takii R, Prakasam R, Inouye S, Mezger V, Nakai A.: Heat shock factor 2 is required for maintaining proteostasis against febrile-range thermal stress and polyglutamine. (2011) **Mol Biol Cell.** 22(19):3571-83. doi: 10.1091/mbc.E11-04-0330. 査読有

Sachiye Inouye, Michiko Ohno, Hidetomo Kikuchi and Reiko Akagi: Heat Shock Response in Human Epithelial Colorectal Adenocarcinoma Caco-2 Cells. (2012) **J. Yasuda Women's University**, 40, 383-388.

Reiko Akagi, Michiko Ohno, Kiminori Matsubara, Mitsunori Fujimoto, Akira Nakai and Sachiye Inouye: Glutamine protects intestinal barrier function of colon epithelial cells from ethanol by modulating Hsp70 expression. (2013) **Pharmacology**, 91(1-2), 104-111. doi: 10.1159/000345930. 査読有

Prakasam R, Fujimoto M, Takii R, Hayashida N, Takaki E, Tan K, Wu F, Inouye S, Nakai A.: Chicken IL-6 is a heat-shock gene. (2013) **FEBS Lett.** 587(21):3541-3547. doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.012. 査読有

[学会発表](計19件)

井上幸江、藤本充章、中井彰、赤木玲子: 熱ショック転写因子によるストレスタンパク質ヘムオキシゲナーゼの発現制御、第52回日本生化学会中国・四国支部例会 2011.5.13-14(広島)

井上幸江、太野路子、菊地秀与、藤本充章、中井彰、赤木玲子: 熱ショック因子によるヘムオキシゲナーゼ1の転写制御、第84回日本生化学会大会 2011.9.21-24(京都)

赤木玲子、太野路子、菊地秀与、藤本充章、中井彰、井上幸江: 熱ショック転写因子によるHeme oxygenase-1の発現制御、第6回臨床ストレス応答学会 2011.11.4-5(名古屋)

赤木玲子、太野路子、菊地秀与、井上幸江:

消化管上皮におけるバリア機能障害のメカニズムの解析、第50回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国・四国支部学術大会 2011.11.12-13 (高松)

赤木玲子、井上幸江、太野路子、松原主典、藤本充章、中井彰：グルタミンによる消化管バリア機能保護作用のメカニズム、第53回日本生化学会中国・四国支部例会 2012.5.18 (岡山)

赤木玲子、藤本充章、中井彰、井上幸江：Heme Oxygenase-1の熱ショック転写因子による発現制御機構、第36回日本鉄バイオサイエンス学会 2012.9.1-2 (札幌)

赤木玲子、平本真菜、小川浩子、井上幸江：消化管バリア機能とヘムオキシゲナーゼ誘導との関係、第51回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2012.11.10-11 (松江)

井上幸江、大森智子、桃谷紗矢香、坂井原美希、笹川愛、赤木玲子：ヘムオキシゲナーゼ1の転写制御における熱ショック転写因子のはたらき、第51回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2012.11.10-11 (松江)

谷本愛、井上幸江、赤木玲子：ヒト肝癌由来細胞に及ぼす熱ショック応答性におけるグルタミンの効果、第51回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2012.11.10-11 (松江)

井上幸江、藤本充章、中井彰、赤木玲子：ヘムオキシゲナーゼ1の発現は熱ショック転写因子1によって巧妙に調節されている、第85回日本生化学会大会 2012.12.13-16 (福岡)

赤木玲子、井上幸江：消化管出血によるバリア機能障害機構、第54回生化学会・中国四国支部例会 2013.5.31-6.1 (徳島)

Sachiye Inouye, Mitsuaki Fujimoto, Ke Tan, Akira Nakai, Reiko Akagi : Modulation of heme-oxygenase gene expression by heat shock factor 1, CSSI 6th International Congress on Stress response in Biology and Medicine, 2013.8.18-22 (Sheffield, UK)

R. Akagi, M. Akagi, S. Inouye : Glutamine protects intestinal barrier function in Caco-2 from various stresses by modulating Hsps expression, CSSI 6th International Congress on Stress response in Biology and Medicine 2013.8.18-22 (Sheffield, UK)

赤木玲子、井上幸江：消化管出血によるバリア機能障害におけるH₂O₂の役割、第9回H₂O₂フォーラム 2013.8.30 (京都)

井上幸江、赤木玲子：ヘムオキシゲナーゼ1の発現調節における熱ショック応答の関与、第9回H₂O₂フォーラム 2013.8.30 (京都)

赤木玲子、井上幸江：ヘム鉄による消化管バリア機能障害機構の解明、第37回日本鉄バイオサイエンス学会 2013.9.7-8 (東京)

井上幸江、藤本充章、譚克、中井彰、赤木玲子：ヘムオキシゲナーゼ1の熱ショック転写因子1による発現調節における小Mafの関与、第86回日本生化学会大会 2013.9.11-13 (横浜)

Ramachandran Prakasam, Mitsuaki Fujimoto, Ryosuke Takii, Naoki Hayashida, Eiichi Takaki, Ke Tan, Sachiye Inouye, and Akira Nakai : Heat shock induces expression of pyrogenic cytokines in avian cells whereas it suppresses in mammalian cells, 第86回日本生化学会大会 2013.9.11-13 (横浜)

井上幸江、藤本充章、譚克、中井彰、赤木玲子：ヘムオキシゲナーゼ1遺伝子の発現調節における熱ショック応答の関与、第36回日本分子生物学会年会 2013.12.3-6 (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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 幸江 (INOUE, Sachie)
安田女子大学・薬学部・教授
研究者番号：60159978

(2) 研究分担者

赤木 玲子 (AKAGI, Reiko)
安田女子大学・薬学部・教授
研究者番号：50150967