

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430090

研究課題名(和文)疾患モデルを用いた熱ショック転写因子HSF2が形成する転写複合体の機能解析

研究課題名(英文)The Roles of HSF2 Complex in Huntington's disease mice.

研究代表者

林田 直樹 (HAYASHIDA, Naoki)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40420517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：熱ショック転写因子HSF2について、新たな知見を得た。一部はすでに Hayashida, BBRC 2015 の論文で発表した。

研究代表者は、H3K4をメチル化して遺伝子を活性化するSet1/MLL複合体に不可欠なWDR5タンパク質とHSF2が結合していることを見出した。ハンチントン病マウス(HTT)で重要なalphaB-クリスタリン(CRYAB)のプロモーター上にSet1/MLL複合体は結合するが、これはHSF2依存性であった。HSF2欠損HTTでは顕著に寿命が短縮するが(Shinkawa, Hayashida et al., MBC 2011)今回その機構の一端を示した。

研究成果の概要(英文)：We discovered the novel functions of HSF2. We already published a few data in Hayashida, BBRC 2015.

We also discovered Set1/MLL complex, this complex is methylates H3K4 and activates many genes, binds to HSF2. We previously used Huntington's disease model mice and found alphaB-crystallin (CRYAB) is important, therefore, we analyzed the CRYAB promoter. HSF2 and Set1/MLL complex bound to the promoter under both normal and heat-stressed conditions. However, the binding of Set1/MLL complex depends on HSF2. We already HSF2 is critical factor in the survival of Huntington's mice (Shinkawa, Hayashida et al., MBC 2011), This time, we successfully revealed the novel mechanism why the life span of Huntington's disease mice become prominently shortened.

研究分野：老化学

キーワード：HSF2 Set1/MLL 複合体 H3K4 alphaB-クリスタリン プロモーター メチル化 遺伝子活性化 ハンチントン病マウス

1. 研究開始当初の背景

熱ショック転写因子は4種類が哺乳類では知られているが、過去30年はほとんどがシャペロン分子を誘導する HSF1 についての研究で、脳などで高発現しているにもかかわらず、HSF2 の役割はほとんど解析されていなかった。

研究代表者は、いくつかのプレデータから、「ヒトの体の恒常性を保っているのは実は HSF2 ではないか」という仮説を持ち、実際に2011年には HSF2 がハンチントン病の抑制に重要であることを証明した (Shinkawa, Hayashida et al., Mol. Biol. Cell 2011)。しかしその時点では現象しか確認できておらず、その分子機構は明らかに出来なかった。

本研究では、研究代表者が、培養細胞および動物モデルを用いて、その分子機構の一端を世界で初めて示した。非常に多くのデータを得たため、全てを書ききることは出来ないため、論文として発表したのもまだ少ないが、平成28年度は本助成によって得られたデータに基づいて、多くの論文を投稿する予定である。

2. 研究の目的

アルツハイマー病やハンチントン病を含む神経難病は長年の治療薬開発研究にも関わらず、いわゆる「アンメット・メディカル・ニーズ」の典型的な疾患である。神経難病(神経変性疾患)はこのほかパーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などが知られているが、いずれも対処療法薬しか開発されておらず、また、その効果も劇的とはいえない。

また、ハンチントン病は現在9種類が知られている「ポリグルタミン病」の1つで、こ

の病気は通常ならばタンパク質におけるグルタミンの繰り返しの数が多くても40以下に収まるのに対し、ハンチントン病の患者では200から300まで増えてしまう例がある。そして何より、神経変性疾患の共通の特徴として、「神経細胞内やグリア細胞内に、原因タンパク質が不溶性状態で蓄積する」というものがある。またこの時、他の重要な分子も巻き込んで凝集するため、現在精力的に研究が行われているにもかかわらず、完治に近づけるような薬剤開発は成功していない。アルツハイマー病を例にとれば、これまで400以上の薬剤開発に失敗している。

一方で、ハンチントン病は、アルツハイマー病とは同じ認知症と言う点で共通はしているものの、発症年齢は早いものも多く、さらに運動機能が徐々に低下し、寿命も大幅に短縮してしまう。多くのモデルマウスや論文が発表されているにも関わらず、ハンチントン病もいわゆる特効薬は開発できていない。

研究代表者は、脳で高発現する近い将来これらの疾患の完治を可能にする薬剤の開発や発見を目指して研究を始めた。

3. 研究の方法

今回はハンチントン病 (HTT) をメインに行い、そのモデルマウスで実験をした他、培養細胞での実験も並行して行った。動物実験では、HSF2 欠損 HTT マウスを用いるだけでなく、トランスジェニックマウス (Tg) の作製を行った。HSF の Tg では、脳で高発現は出来ないとされていたが、研究代表者は、脳で HSF2 が高発現する Tg を2ライン得て、その特徴の解析を行った。

4. 研究成果

培養細胞を使った実験では、予想通り、HSF2を過剰発現させると、ハンチントン病に特徴的な細胞内のタンパク質凝集を大幅に抑制することに成功した。逆にノックダウンでは凝集は増加した。また、ユビキチン陽性のあらゆるタンパク質も凝集することから、HSF2が細胞内の恒常性の維持に重要であることは明らかになった。

また、ヒストンのH3K4をメチル化して遺伝子を活性化し発現誘導を行うSet1/MLL複合体が、HSF2と結合していることを明らかにし、これは、Set1/MLL複合体の必須因子であるWDR5とHSF2が直接結合していることによることを突き止めた。さらに、HSF2がなければ、いくつかの遺伝子群ではSet1/MLL複合体は遺伝子のプロモーターに結合できないこともわかった。

一方で、マウスを用いた実験では、HSF2を欠損させたHTTマウスでは寿命が顕著に短くなることが分かっていたため、Tgとの交配によって、逆に寿命が延長することを試みたが、その実験を行う前に、原因はわからないものの、Tgがどんどん死亡するという表現型に気がついた。そのため、Tgの背景をICRにしたところ、このようなことは起きず、このマウスを用いてハンチントン病マウスの寿命が延びるかを調べたが、残念ながら寿命の延長は認められなかったものの、発症時期がやや遅れることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. **Hayashida, N.** (2015) Metallomics and metal effects in vascular systems. **Biochemistry & Analytical Biochemistry** 4, 231. doi:10.4172/2161-1009.1000231 (Corresponding Author) 査読有.

2. **Hayashida, N.** (2015) Set1/MLL complex is indispensable for the transcriptional ability of heat shock transcription factor 2. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 467, 805-812. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.061. (Corresponding Author) 査読有.

3. **Hayashida, N.** (2015). Non-Hsp genes are essential for HSF1-mediated maintenance of whole body homeostasis. **Experimental Animals** 64, 397-406. doi: 10.1538/expanim.15-0023. (Corresponding Author) 査読有.

4. Fujimoto, M., Takii, R., **Hayashida, N.**, Nakai, A. (2015). Analysis of the heat shock factor complex in mammalian HSP70 promoter. **Methods in Molecular Biology** 1292, 53-65. doi: 10.1007/978-1-4939-2522-3_4. 査読有.

5. Tan, K., Fujimoto, M., Takii, R., Takaki, E., **Hayashida, N.**, Nakai, A. (2015). Mitochondrial SSBP1 protects cells from proteotoxic stresses by potentiating stress-induced HSF1 transcriptional activity. **Nature Communications** 6, 6580-6594. doi: 10.1038/ncomms7580. 査読有.

6. Takii, R., Fujimoto, M., Tan, K., Takaki, E., **Hayashida, N.**, Nakato, R., Shirahige, K., Nakai, A. (2015). ATF1 modulates the heat shock response by regulating the stress-inducible heat shock factor 1 transcription complex. **Molecular and Cellular Biology** 35, 11-25. doi: 10.1128/MCB.00754-14. 査読有.

7. Nakamura, Y., Fujimoto, M., Fukushima, S., Nakamura, A., **Hayashida, N.**, Takii, R., Takaki, E., Nakai, A., Muto, M. (2014). Heat shock factor 1 is required for migration and invasion of human melanoma in vitro and in vivo. **Cancer Letters** 354, 329-335. doi: 10.1016/j.canlet.2014.08.029. 査読有.

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

〔学会発表〕(計3件)

1. **Naoki Hayashida**, Transcription factors HSF1, HSF2 and NFATc2 suppress Huntington's disease progression. **The 1st International Symposium of "Brain Protein Aging and Dementia Control"** Nagoya, Japan (名古屋大学) 2015/10/9~10

2. **林田直樹** 「Protein-Agingにより抗原結合部位に起きた脱アミド化によって生じたイ

ソアスパラギン酸は抗体の親和性を低下させる」第13回日本プロテオーム学会大会、熊本（くまもと森都心プラザ）2015/7/23～24

3. 林田直樹「神経変性疾患ハンチントン病を抑制する転写因子群とその分子機構」第62回日本実験動物学会大会、京都（京都テルサ）2015/5/28～30

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

林田 直樹 (HAYASHIDA, Naoki)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：40420517