

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 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：25440010

研究課題名(和文) ポリADPリボシル化酵素PARPによる熱ショック因子HSF1の転写制御機構

研究課題名(英文) transcriptional regulation of HSF1 by polyADP-ribosylation enzyme PARP

研究代表者

藤本 充章 (FUJIMOTO, Mitsuaki)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80359900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：熱ショック応答は、主にHSF1により転写制御されている。しかしながら、熱ショックによるHSP蛋白質の転写制御メカニズムは、哺乳動物では未だよく知られていない。

HSF1がポリADPリボシル化酵素PARP1及びPARP13と複合体を形成した。PARP1或いはPARP13欠損はHSP70誘導を顕著に抑制した。さらに、HSF1はHSP70プロモーター領域にPARP1とPARP13をリクルートした。熱ショックで、PARP1とPARP13はHSF1から離れ、PARP1のみがHSP70遺伝子上へ再分布が見られた。HSF1-PARP複合体は、HSP70プロモーター領域のクロマチン構造変化に関与していた。

研究成果の概要(英文)：Heat shock response is regulated mainly at the level of transcription by heat shock factor 1 (HSF1). However, mechanisms of transcriptional induction of heat shock gene during heat shock (HSP) are not well known yet in mammalian.

I found that HSF1 forms a complex with PARP1, which has poly (ADP-ribose) polymerase activity, and PARP13, which lacks enzymatic activity. The depletion of PARP1 or PARP13 significantly reduced the induction of HSP70 mRNA during heat shock. Furthermore, HSF1 recruits PARP1 and PARP13 on HSP70 promoter region. In response to heat shock, PARP1 and PARP13 disappeared from the promoter and only PARP1 was redistributed on HSP70 gene body. HSF1-PARP complex associates with the change of chromatin components on HSP70 promoter in unstressed condition.

研究分野：分子生物学

キーワード：HSF1 PARP 転写 ポリADPリボシル化

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。最近の研究から HSF 群が個体発生と維持、老化と関連した細胞変性疾患、さらには癌の発生や進展にも大きな役割を持つことが分かってきた。HSF 群の中で HSF1 は、熱ショック応答による熱ショック蛋白質(HSP)の発現制御を担うことが知られている。主要な HSP 遺伝子の転写制御機構はショウジョウバエで良く研究されており、熱ショックによりクロマチン構造を変化させ、HSP70 誘導を亢進されることが分かっている。これまでに、申請者は HSF1 欠損マウスでは抗体産生が低下すること、さらに HSF1 がクロマチンの構造変化を引き起こし、IL-6 遺伝子の転写制御を行うことを明らかにした。また、ゲノム上の HSF4 結合領域の解析から、HSF4 は結合領域周辺のヒストン H3K9 の脱メチル化を促進することも報告している。これらの解析から、HSF 群がクロマチン構造の制御を介して転写調節を行うことが分かってきたが、その役割を担う HSF 複合体の詳細は明らかになっていなかった。最近、非ストレス状態、熱ショック過程、あるいは熱ショック後に HSF1 に結合する蛋白質を網羅的に同定した。すべての条件で HSF1 と結合する DNA 複製・修復に関与する RPA は、非ストレス条件下でも HSP70 の発現を調節することが分かり、その分子機構として HSF1-RPA 複合体は HSP70 プロモーターに結合し、ヒストンシャペロン(FACT)やクロマチンリモデリング因子(BRG1)を呼び込み、クロマチンを開いた状態にすることで RNA ポリメラーゼ II(Pol II)のプレロードを容易にしていた。この解析により、HSF1 が定常状態でターゲット遺伝子プロモーター領域のクロマチン構造に影響を及ぼすことが明らかになった。

2. 研究の目的

HSF1-RPA 複合体はヒストンシャペロンである FACT を介してクロマチン構造を変化させ、定常状態の遺伝子発現に関与することを明らかにした。しかしながら、熱ショックによる高等動物 HSF1 の転写制御に関与する蛋白質群は未だ不明である。本研究では、最近同定したヒト HSF1 の結合蛋白質であるポリ ADP リボシル化酵素(PARP-13)により促される HSF1 の活性制御、さらにクロマチン構造変化と関連したターゲット遺伝子の転写制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HEK293 細胞に Flag-HSF1 あるいは HSF1-Flag を高発現させ、Flag-抗体により共沈降してくる蛋白質として PARP13 をマス・

スペクトル法によって同定した。そこで、HEK293 細胞を用い、様々な PARP 群と HSF1 との相互作用を免疫沈降法で調べる。次に、HSF1 と PARP13 が直接結合するかを GST-pull down アッセイ法で明らかにする。さらに、HSF1 の GST 融合欠損変異体を作製し、GST-pull down アッセイを行って両蛋白質の結合領域を同定する。

(2) HeLa 細胞を用い、PARP1 あるいは PARP13 ノックダウン後の熱ショックによる HSP70 誘導変化を定量的 RT-PCR で調べる。さらに、HSP70 以外の HSP 群の誘導変化を明らかにする。

(3) HeLa 細胞を用い、HSF1 のターゲット遺伝子である HSP70 プロモーター領域に PARP1 と PARP13 がリクルートされるかをクロマチン免疫沈降法で調べる。また、熱ショック後の PARP1 と PARP13 のリクルートの変化を HSP70 プロモーター領域及び遺伝子上で検討する。これまでに、PARP によるポリ(ADP-リボシル)化(PAR)反応は様々なストレスで速やかに起こり、クロマチン蛋白質や核内蛋白質の可逆的な修飾を介して、転写調節に作用することが報告されている。そこで、熱ショック後の PAR 化が HSP70 プロモーター領域及び遺伝子上で見られるかをクロマチン免疫沈降法で調べる。

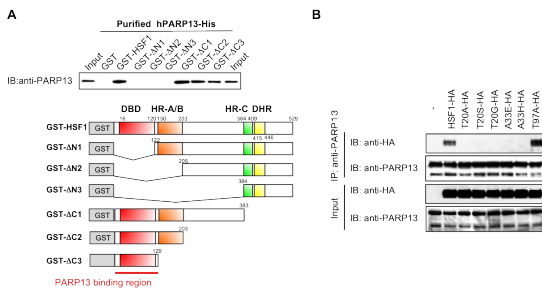
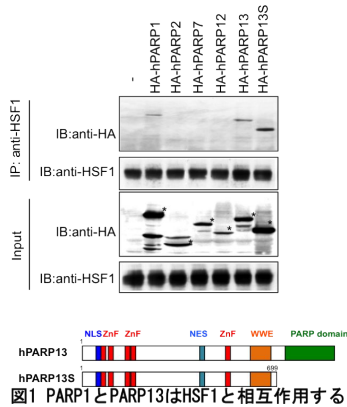
(4) PARP1 は自己 PAR 化が起こると PARP1 と相互作用していた蛋白質との結合を変化させることが知られている。そこで、熱ショック後の HSF1 と PARP1 と PARP13 の相互作用を免疫沈降法で調べる。さらに、PARP 阻害剤である PJ34 処理後の相互作用変化も検討する。

(5) PARP1 はヒストンを PAR 化することにより、転写制御や DNA 修復に関与していることが知られている。そこで、HeLa 細胞を用い、PARP1 あるいは PARP13 ノックダウンし、熱ショックによる HSP70 遺伝子上のクロマチン修飾(アセチル化、メチル化)のリクルート量の変化を定量的なクロマチン免疫沈降法で調べる。

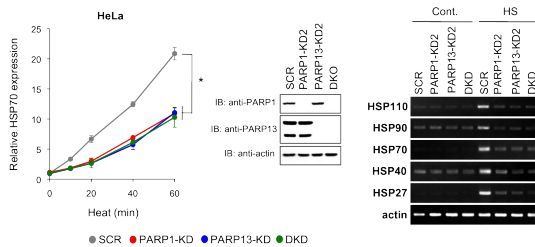
4. 研究成果

(1) HSF1 と様々な PARP 群の相互作用を検討した結果、PARP1 と PARP13 が HSF1 と結合することがわかった。PARP13 はスプライシングにより、配列が短い PARP13S も存在するが、これも HSF1 と結合が見られた(図1)。さらに、GST-pull down 法により、HSF1 が PARP13 に直接相互作用することが分かった。この HSF1-PARP13 相互作用は HSF1 の DNA 結合ドメイン(DBD)を介して結合していた(図2A)。しかしながら、PARP13 は HSF2 や HSF4 とは相互作用しなかった。そこで、HSF1 の DBD 領域で HSF2 と HSF4 において相同性がないアミノ酸を別のアミノ酸に置換し、相互作用を調べた結果、T20 と A33 が必要であることが分かった。また、T20 と A33 を HSF2 や HSF4 のアミノ酸に置換すると HSF1 と PARP13 の相互作用が阻害された(図2B)。このアミノ酸はヒト

やマウスでのみ保存されており、HSF1-PARP13 結合が高等動物にのみ見られる現象であることが示唆された。



(2) HSF1 は熱ショック応答の際に、熱ショック蛋白質(HSP 群)を誘導することが知られている。HeLa 細胞の内在性 PARP1、PARP13 あるいは両遺伝子を shRNA によりノックダウンした結果、熱ショックによる HSP70 の発現誘導が顕著に抑制することが分かった。しかしながら、非ストレス状態での HSP70 遺伝子の発現変化は見られなかった。また、他の HSP 群の発現誘導も抑制された(図 3)。以上のことから、HSF1-PARP 複合体は熱ショック後の HSP 群の誘導に必要であると考えられた。



(3) HSF1、PARP1 と RPA13 は非ストレス状態において、HSP70 プロモーター領域に存在する熱ショック応答配列(HSE)領域に存在することが分かった。驚いたことに、熱ショックにより、PARP1 と PARP13 は HSF1 から解離することが分かった。さらに、解離した PARP1 のみが HSP70 遺伝子上に再分布する現象が見られた(図 4)。これまでの報告から、PARP1

は熱ストレスにより、自己をポリ(ADP-リボシル)化(PAR)することが知られている。そこで、HSP70 遺伝子の PAR 量を調べた。非ストレス状態では HSP70 遺伝子における PAR 量は検出できなかったが、熱ショック時には PAR 量が HSP70 プロモーター領域や遺伝子上で顕著に増加することが分かった。この PAR 量は PARP1、PARP13 あるいは両遺伝子をノックダウンすると非ストレス状態まで低下した(図 5)。よって、HSF1-PARP 複合体を予め HSP70 プロモーター領域に留めておくことが、熱ショック後の HSP70 遺伝子で見られる PAR 量の増加に関与すると考えられた。

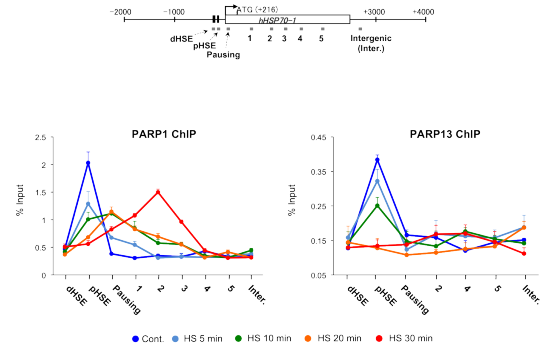


図4 熱ショックによりPARP1とPARP13はHSF1より解離する

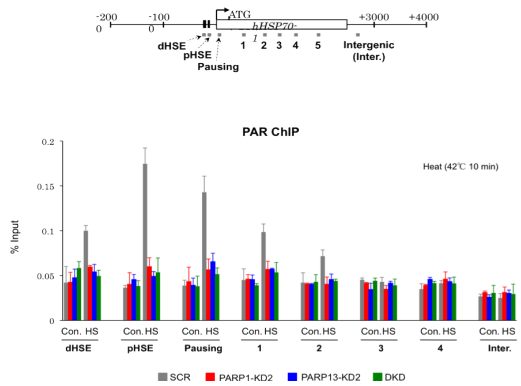


図5 熱ショックによりHSP70遺伝子上でのPAR化量が増加する

(4) (3)の解析から、熱ショックにより PARP1 と PARP13 が解離すること分かった。そこで、PARP1 の自己 PAR 化が HSF1-PARP 複合体形成に及ぼす影響を調べた。相互作用を調べる免疫沈降法の解析から、新たに PARP1 と PARP13 が結合することが分かった。この結合は、熱ショックにより解離し、PARP1 の自己 PAR 化を抑える PARP 阻害剤(PJ34)を処理すると結合阻害が改善された。しかしながら、PJ34 処理しても HSF1 と PARP13 の結合阻害は改善されなかった(図 6)。以上のことから、熱ショックにより、PARP1 は自己 PAR 化を起こすことで PARP13 から解離し、さらに HSF1 の構造変化により PARP13 が HSF1 から解離することが示唆された。

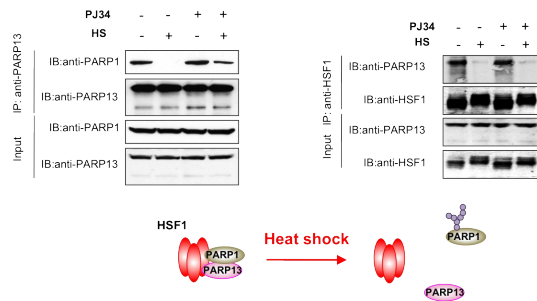


図6 PAR化がHSF1-PARP複合体の解離に必要である

(5)PARP1は自己PAR化以外にもヒストンやヒストン修飾因子のPAR化に関与していることが知られている。また、熱ショック後にHSP70遺伝子上でのPAR量が増加することから、クロマチン構造変化を検討した。熱ショックにより、クロマチン弛緩のマーカーであるH3K4me3、H3K9Ac、H3K27ac、H3K14Ac、H4Ac量がHSP70遺伝子上で増加していることが分かった。さらに、PARP1、PARP13あるいは両遺伝子をノックダウンすると、これらクロマチン弛緩のマーカー量の顕著な低下が見られた(図7)。この結果から、熱ショック後にPARP1はHSP70遺伝子上にリクルートされ、ヒストンのPAR化を亢進し、クロマチンの弛緩に関与することが示唆された。

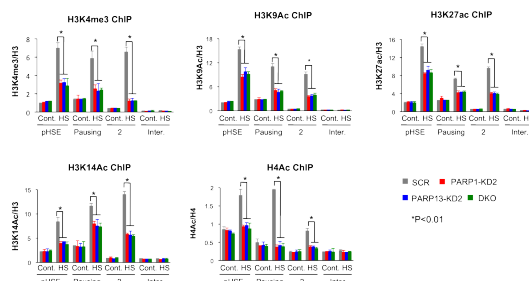


図7 PARP1とPARP13はHSP70遺伝子のクロマチン構造変化に必要である

<引用文献>

Steven J Petesch, John T Lis, Rapid, Transcription-Independent Loss of Nucleosomes over a Large Chromatin Domain at *Hsp70* Loci, *Cell*, 134,74-84, 2008.

Sachiye Inouye, Hana Izu, Eiichi Takaki, Harumi Suzuki, Mutsunori Shirai, Yoshifumi Yokota, Hitoshi Ichikawa, Mitsuaki Fujimoto and Akira Nakai. Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1. *J. Biol. Chem.* 279, 38701-38709, 2004.

Sachiye Inouye, Mitsuaki Fujimoto, Tamami Nakamura, Eiichi Takaki, Naoki Hayashida, Tsonwin Hai and Akira Nakai. Heat shock transcription factor 1 opens chromatin structure of interleukin-6 promoter to facilitate binding of an activator or a repressor. *J. Biol. Chem.* 282, 33210-33217, 2007.

Mitsuaki Fujimoto, Koji Oshima, Toyohide Shinkawa, Bei Bei Wang, Sachiye Inouye, Naoki Hayashida, Ryosuke Takii and Akira Nakai. Analysis of HSF4 binding regions reveals its necessity for gene regulation during development and heat shock response in mouse lenses. *J. Biol. Chem.* 283, 29961-29970, 2008.

Mitsuaki Fujimoto, Eiichi Takaki, Ryosuke Takii, Ke Tan, Ramachandran Prakasam, Naoki Hayashida, Shu-ichiro Iemura, Tohru Natsume and Akira Nakai. RPA assists HSF1 access to nucleosomal DNA by recruiting histone chaperone FACT. *Mol. Cell* 48, 182-194, 2012.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 4件)

Ke Tan, Mitsuaki Fujimoto, Ryosuke Takii, Eiichi Takaki, Naoki Hayashida, and Akira Nakai. Mitochondrial SSBP1 protects cells from proteotoxic stresses by potentiating stress-induced HSF1 transcriptional activity. *Nat. Commun.* 6, 6580, 2015. 査読有

DOI:10.1038/ncomms7580

Ryosuke Takii, Mitsuaki Fujimoto, Ke Tan, Eiichi Takaki, Naoki Hayashida, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, and Akira Nakai. ATF1 modulates the heat shock response by regulating the stress-inducible HSF1-transcription complex. *Mol. Cell. Biol.* 35, 11-25, 2015. 査読有

DOI: 10.1128/MCB.00754-14

Yoshitaka Nakamura, Mitsuaki Fujimoto, Sonoko Fukusima, Akiko Nakamura, Naoki Hayashida, Ryosuke Takii, Eiichi Takaki, Akira Nakai. and Masahiko Muto. Heat shock factor 1 is required for migration and invasion of human melanoma *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Letters.* 354, 329-335, 2014. 査読有

DOI: 10.1016/j.canlet.2014.08.029

Ramachandran Prakasam, Mitsuaki Fujimoto, Ryosuke Takii, Naoki Hayashida, Eiichi Takaki, Ke Tan, Fangxu Wu, Sachiye Inouye, and Akira Nakai. Chicken *IL-6* is a heat-shock gene. *FEBS Lett.* 587, 3541-3547, 2013. 査読有

DOI: 10.1016/j.febslet.2013.09.012

(学会発表)(計 4件)

藤本充章、タンパク質毒性ストレス応答とDNA損傷ストレス応答の接点
第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会、2015年12月1日、兵庫県・神戸

市(神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、
神戸国際展示場、神戸商工会議所)

藤本充章、HSF1-PARP 相互作用が HSP70 遺
伝子座のクロマチン構成を調節する
第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 17 日、
京都府・京都市 (国立京都国際会館・グラ
ンドプリンスホテル京都)

藤本充章、HSF1-PARP13-PARP1 複合体形成
の熱ストレスによる制御
第 36 回日本分子生物学会大会 2013 年 12 月 3
日、兵庫県・神戸市(神戸国際会議場、神戸
国際展示場、神戸ポートピアホテル)

藤本充章、PARP13 は HSF1 を介する HSP70
誘導に必要である
第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 12 日、
神奈川県・横浜市(パシフィコ横浜)

〔その他〕

ホームページ等

[http://ds22.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~seika
2/](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・准教授

研究者番号：80369900