

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570181

研究課題名（和文） 熱ショック転写因子による遺伝子特異的な転写制御機構

研究課題名（英文） Gene-specific transcriptional regulation by heat shock factor

研究代表者

桜井 博 (SAKURAI HIROSHI)

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：00225848

研究成果の概要（和文）：進化的に保存された熱応答性制御因子である HSF（熱ショック転写因子）三量体は、heat shock element（HSE）に結合し、標的遺伝子の発現を調節する。連続型 HSE は nGAAn 配列の連続した逆向き反復配列であり、不連続型 HSE はユニット間にギャップを含んでいる。本研究では、ヒトを含むさまざまな生物の HSF が、連続型 HSE と同様に不連続型 HSE にも結合することを明らかにした。さらに、三量体形成の制御は、HSF の HSE 特異性において重要であった。

研究成果の概要（英文）：HSF (heat shock factor) trimer, an evolutionarily conserved heat-responsive regulator, binds to heat shock element (HSE) and regulates expression of target genes. Continuous HSEs consist of contiguous inverted repeats of the nGAAn sequence, and discontinuous HSEs contain gaps in the array of the unit. This study shows that HSFs of various organisms, including human, bind discontinuous HSEs, as well as continuous HSEs. Furthermore, modulation of the trimer formation is important for the HSE specificity of HSFs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：ストレス応答, 熱ショック転写因子, 培養細胞, 酵母菌

1. 研究開始当初の背景

生物は常に温度や圧力、金属イオンや有機化合物、光や放射線、酸素量など、さまざまな外部環境の変動にさらされている。細胞はこれらをストレスとして感知し、対処するための応答反応を有している。たとえば、高温、重金属、アルコールなどは、タンパク質を変

性し細胞に障害を与える。すべての生物に普遍的な熱ショック応答は、タンパク質変性障害に対する防御反応であり、熱ショックタンパク質（Heat Shock Protein: HSP）と呼ばれる一群のタンパク質の合成を誘導する。一部の HSP は、タンパク質の変性予防・再生を促進するシャペロンであり、また、変性タンパク質の分解も促進する。真核生物において、

HSPの発現は熱ショック転写因子(Heat Shock Factor: HSF)により制御されている。HSFは三量体を形成し、HSP遺伝子のプロモーター領域に存在するnGAAn配列のinverted repeat (Heat Shock Element: HSE)に結合・転写を調節する。HSFのタンパク構造およびHSE配列は、単細胞生物の酵母菌からヒトに至るまで非常によく保存されていることより、HSF-HSE相互作用は、真核生物のストレス応答における普遍的な転写制御機構であると考えられる。

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のHSF(ScHSF1)は、ストレス条件下での生育のみならず、通常の生育にも必須である。ScHSF1は、熱ショック時に酵母ゲノムの約1%の遺伝子(約70個)の転写を誘導する。ScHSF1の標的遺伝子はHSPのみならず、タンパク分解、酸化ストレス応答、糖代謝、エネルギー生成、細胞壁形成に関与するさまざまなタンパク質をコードしている。また、ScHSF1の標的遺伝子のプロモーター領域には、連続Perfect型HSE(nGAAnのinverted repeatが3つ以上連続する)[nTTCnnGAAnnTTCn]、不連続Gap型HSE(inverted repeat内にギャップが1つある)[nTTCnnGAAn(5 bp)nGAAn]、不連続Step型HSE(inverted repeat内にギャップが2つある)[nTTCn(5 bp)nTTCn(5 bp)nTTCn]など、さまざまなHSEサブタイプが見出されている。

モデル生物である線虫(*Caenorhabditis elagans*)やショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)は、出芽酵母と同様に1種類のCeHSF-1とDmHSFを持つのに対し、ヒトは3種類(HsHSF1, HsHSF2, HsHSF4)、植物は20種類以上のHSFを持ちファミリーを形成している。HsHSF1は多くの組織で発現し、典型的なHSFとしてストレス応答の中心を担うのに対し、HsHSF2は脳や精子形成に、HsHSF4は眼の形成に関与する。興味深いことに、HsHSF1はPerfect型HSEにのみ結合するのに対し、HsHSF4はPerfect, Gap, Step型HSEに同程度の強さで結合し、HsHSF2はこれらの中間的な性質を示すことが示されている。

2. 研究の目的

HsHSFファミリーは異なるHSEサブタイプ特異性を示す。一方、ScHSF1やHsHSFの研究より、HSEサブタイプにおけるnGAAn配列の配向が遺伝子特異的な転写制御に重要であることが明らかになりつつある。本研究課題では、HSF-HSE相互作用とHSE塩基配列特異的な転写調節に注目し、以下について明らかにする。

(1) HsHSFファミリーが異なるHSEサブタイプ特異性を示す分子メカニズム

(2) さまざまな真核生物のHSFとHSEサ

ブタイプとの結合およびこれらを介した転写調節

(3) 遺伝性白内障の原因遺伝子の1つであるHsHSF4の変異とその標的遺伝子の発現さらに、転写調節因子の研究ではコンセンサス結合配列が注目されがちであるが、実際の遺伝子は、似通った(しかし同一ではない)cis-elementを持っており、この違いが遺伝子発現にどのような影響を与えるかについて考察する。

3. 研究の方法

HsHSF1, HsHSF2, HsHSF4, CeHSF-1, DmHSF, ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*) HSF(DrHSF1, DrHSF2), シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*) AtHsfA2, ライス(*Oryza sativa*) OsHsfのcDNAを、T7フェージプロモーターを持つプラスミド、酵母菌発現プラスミド、および、哺乳動物細胞発現プラスミドにクローン化した。In vitro transcription/translation T7法によりHSFポリペプチドを合成した。HSFの三量体形成はEGS(ethyleneglycol bis-succinimidylsuccinate)化学架橋反応により、HSEとの結合はelectrophoretic mobility shift assayにより検討した。酵母菌発現プラスミドにクローン化したHSF cDNAは、染色体ScHSF1遺伝子を欠失した酵母菌に導入した。酵母菌のmRNA量の変動はRT-PCR法により定量した。哺乳動物細胞発現プラスミドにクローン化したHSF cDNAは、HeLa細胞に導入した。このとき、さまざまなHSE配列を持つルシフェラーゼレポータープラスミドも同時に導入し、ルシフェラーゼ活性の変動により遺伝子発現を調べた。また、遺伝性および加齢性白内障に関連したアミノ酸置換を伴う塩基置換変異をHsHSF4 cDNAに導入した。これをレンズ上皮培養細胞であるSRA01/04に導入し、クリスタリンやレンズ繊維タンパクのmRNA量の変動を解析した。

4. 研究成果

(1) 「HsHSFファミリーが異なるHSEサブタイプ特異性を示す分子メカニズム」について

ScHSF1遺伝子を破壊した酵母菌は致死であるが、HsHSF1をこの酵母株に導入すると、高温感受性となり生育する。HsHSF1遺伝子にランダム点変異を導入し、この酵母株の高温での生育を維持する変異HsHSF1を分離し

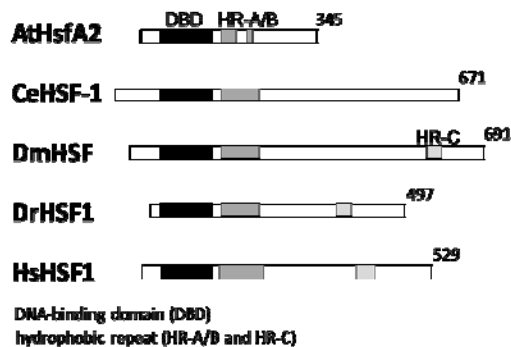
た。変異は HsHSF1 の DNA 結合ドメインに認められた (L25F; 25 番のロイシンがフェニルアラニン, I35V)。In vitro で合成したタンパクを用いて解析した結果、変異により HsHSF1 の三量体形成能力が上昇し、特に不連続型 HSE との結合が強くなっていること示された。これに伴う転写の活性化は、酵母菌でも HeLa 細胞でも認められた。これらの結果より、三量体形成は、HsHSF1-HSE 相互作用および HSE サブタイプ特異性において重要であると考えられる。

さまざまなアミノ酸領域を欠失した変異 HsHSF1 を作製し詳細なドメイン解析を行い、HSE サブタイプ特異性に関与する短いアミノ酸配列を同定した(アミノ酸 260~280 番)。相同な配列が、HsHSF4b、DrHSF1、CeHSF-1、DmHSF にも存在することより、HSF の分子構造、および、HSE サブタイプ特異的な結合において重要であると考えられた。事実、このアミノ酸領域を DrHSF1 と DmHSF から除くと、おのこの HSE 特異性は大きく変化した (CeHSF-1 では、HSE 特異性は変化しなかった)。今後は、この領域の作用メカニズムについての解析が必要である。

HsHSF1 260-SSGPIISDITELAPASPMAS-280
HsHSF4b 258-ARGPIISDI PEDSPSPGTR-278
DrHSF1 257-KTGPIISDITELAQSSPVAT-277
CeHSF-1 339-NEGPLISEVTDEFGN SPVGR-350
DmHSF 263-GGGPVIHELREELLDVMMNP-273

(2) 「さまざまな真核生物の HSF と HSE サブタイプとの結合およびこれらを介した転写調節」について

AtHsfA2、DmHSF、CeHSF-1、DrHSF1、DrHSF2 の三量体形成能力、HSE 結合能力、酵母菌と HeLa 細胞内での転写活性化能力について検討した。AtHsfA2、DmHSF、DrHSF1、DrHSF2 は連続型 HSE と同様に不連続型 HSE にも結合できる。しかしながら、CeHSF-1 は不連続型 HSE には結合できなかった。この結果は、すべてではないが、多くの生物のゲノム中で不連続型 HSE が HSF 結合配列として機能することを示唆している。また、HsHSF1 と同様に、これらの HSF でも三量体形成能力が高いものほど、不連続型 HSE との結合が強くなること示された。



6 種類の OsHsf (OsHsfA2c, OsHsfA7, OsHsfA9, OsHsfB4b, OsHsfB4c, OsHsfC1b) の三量体形成能力と HSE 結合能力について検討した。OsHsfA7、OsHsfB4c、OsHsfC1b はホモ三量体が形成できず HSE にも結合しないこと、また、OsHsfA2c、OsHsfA9、OsHsfB4b は異なる熱誘導性と異なる HSE サブタイプ特異性を示すことを明らかにした。さらに、ライスの ClpB 遺伝子 (Hsp100) の HSE には OsHsfA2c のみが結合し転写を活性化することを明らかにした。

(3) 「遺伝性白内障の原因遺伝子の 1 つである HsHSF4 の変異とその標的遺伝子の発現」について

HsHSF4 はレンズ白内障の原因遺伝子の 1 つである。これまでに先天性白内障に関連する 6 つのミスセンス変異が報告されている (A20D, R74H, I87V, L115P, R120C, R176P)。また、加齢性白内障に関連する 2 つのミスセンス変異が報告されている (Q62R, R117H)。これら 8 つの変異 HsHSF4b 遺伝子を作製し、合成変異タンパクの生化学的性質、および、ヒトレンズ培養細胞内での転写調節能力について検討した。その結果、先天性白内障の 5 つの原因変異 (A20D, R74H, L115P, R120C, R176P) は、HsHSF4b の DNA 結合を阻害し、転写調節能力を低下させることが明らかになった。したがって、HsHSF4b 標的遺伝子であるクリスタリン (CRYAB, CRYGC) やレンズ繊維タンパク (BFSP1, BFSP2) の mRNA 量の低下が白内障を引き起こすと考えられる。また、加齢性白内障の原因として報告されている 2 つのミスセンス変異は、HsHSF4b の DNA 結合および転写調節能力に影響を与えなかったことより、他の遺伝的要因や環境要因が関与していることが推察された。

	WT	A20D	Q62R	R74H	I87V	L115P	R117H	R120C	R176P
DNA結合	+++	+	+++	-	+++	-	+++	-	-
CRYAB mRNA	+++	++	+++	-	+++	-	+++	-	-
CRYGC mRNA	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	-
BFSP1 mRNA	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	-
BFSP2 mRNA	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	-

(4) 「コンセンサス結合配列と非コンセンサス結合配列の相違と転写制御」について

HSF の場合、連続型 HSE と不連続型 HSE の認識は、三量体形成能力の違いにより制御されており、これは、熱ショックなどのストレスにより変化する。また、HsHSF ファミリーの場合、三量体を形成しにくい HsHSF1 は連続型 HSE を認識し、三量体を形成しやすい HsHSF4 は不連続型 HSE を認識できる。このようなメカニズムにより、遺伝子特異的な転写制御が行われていると考えられる。

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 7 件)

- ① Sakurai, H., Ota, A., Regulation of chaperone gene expression by heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*: Importance in normal cell growth, stress resistance and longevity, FEBS Letters, 585 (2011), 2744-2748, 査読有
- ② Mittal, DJ., Enoki, Y., Lavania, D., Singh, A., Sakurai, H., Grover, A., Binding affinities and interactions among different heat shock element types and heat shock factors in rice (*Oryza sativa* L.), FEBS Journal, 278 (2011), 3076-3085, 査読有
- ③ Enoki, Y., Sakurai, H., Diversity in DNA recognition by heat shock transcription factors (HSFs) from model organisms, FEBS Letters, 585 (2011) 1293-1298, 査読有
- ④ Sakurai, H., Enoki, Y., Novel aspects of heat shock factors: DNA recognition, chromatin modulation and gene expression, FEBS Journal, 277 (2010), 4140-4149, 査読有
- ⑤ Enoki, Y., Mukoda, Y., Furutani, C., Sakurai, H., DNA-binding and transcriptional activities of human HSF4 containing mutations that associate with congenital and age-related cataracts, Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease, 1802 (2010), 749-753, 査読有
- ⑥ Takemori, Y., Enoki, Y., Yamamoto, N., Fukai, Y., Adachi, K., Sakurai, H., Mutational analysis of human heat-shock transcription factor 1 reveals a regulatory role for oligomerization in DNA-binding specificity, Biochemical Journal, 424 (2009), 253-261, 査読有
- ⑦ Fukasawa, T., Sakurai, H., Nogi, Y., Baruffini, E., Galactose transporters discriminate steric anomers at the cell surface in yeast, FEMS Yeast Research, 9 (2009), 723-731, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 桜井博, 太田あづ美, 酵母 Hsf1 によるシャペロン遺伝子の発現調節: 細胞増殖、ストレス抵抗性、寿命における重要性, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15

日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

- ② 榎康明, 桜井博, 熱ショック転写因子 HSF1 の DNA 結合調節, 第 33 回日本分子生物学会年会, 2010 年 12 月 8 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ③ 榎康明, 向田裕香, 古谷智慧, 桜井博, さまざまな生物の熱ショック転写因子の機能解析, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 12 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桜井 博 (SAKURAI HIROSHI)
金沢大学・保健学系・准教授
研究者番号: 00225848

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし