

ストレス応答の分子機構の解明

Studies on the mechanism of stress response

研究代表者 京都大学再生医科学研究所細胞機能調節学分野 助手 中井 彰
Department of Molecular Biology, Frontier Medical Sciences,
Kyoto University
Akira NAKAI

The vertebrate genome encodes a family of heat shock factors (HSFs 1-4). HSF1 has the properties of the classical heat shock factor and exhibits rapid activation of DNA binding and transcriptional activity upon exposure to conditions of heat shock and other stresses, whereas HSF3 is typically activated at higher temperatures and with distinct delayed kinetics. To address the role of HSF3 in the heat shock response, null cells lacking the *HSF3* gene were constructed by disruption of the resident gene by somatic recombination in an avian lymphoid cell line. Null cells lacking HSF3, yet expressing normal levels of HSF1, exhibited a severe reduction in the heat shock response as measured by inducible expression of heat shock genes. These results reveal that HSF3 has a dominant role in the regulation of the heat shock response. On the other hand, characterization of human HSF4 suggests that HSF4 regulates the expression of heat shock genes in the absence of stress.

1. 研究目的

ストレス（熱ショック）蛋白質は、細胞内のほとんど全ての蛋白質の成熟や分解を促進する、いわゆる分子シャペロンとして働き、細胞の生育に必須の蛋白質群である。熱ショックをはじめ様々な外的刺激や生理的要因によって、これらストレス蛋白質が、主として転写レベルで誘導される。その誘導のシグナル伝達経路を明らかにするために、その制御を司る熱ショック転写因子HSF (heat shock transcription factor)の機能解析を行う。HSFは遺伝子ファミリーを形成しており、申請者らの研究から、高等動物細胞では、少なくとも4種類のHSFが存在し、それぞれが独自の役割を担っていることが明らかになってきた。本研究はそれらの機能分担を解析することでストレス応答のシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とする。

2. 研究経過

2.1. ニワトリBリンパ球細胞DT40でのHSF3遺伝子変異導入

高効率で相同組み換えが起こることが知られているニワトリBリンパ球細胞DT40に、まずネオマイシン耐性遺伝子を持つターゲティングベクターを導入し片方のアレルに変異を入れる。さらに、ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つターゲティングベクターを導入することでHSF3遺伝子の両アレルに変異を入れた細胞を得た。さらに得られた表現形が

HSF3欠損によるものであるかを明らかにするために、ゼオシン耐性遺伝子をもつHSF3発現ベクターを導入した細胞株を樹立した。

2.2. 熱ショック蛋白質の発現の解析

トリの熱ショック蛋白質群Hsp110、Hsp90a、Hsp90b、Hsp70、Hsp40、そしてHsp25に対するcDNAをプローベとしてノーザンプロット解析を行った。また、蛋白質レベルでの解析は、細胞を³⁵Sメチオニンでメタボリックラベルしたあと二次元電気泳動を行った。

2.3. 温熱耐性獲得の解析

細胞をあらかじめ45度20分の処理をした後、37度に2時間もどした。その後、致死的温度である46度で60分までの処理をしてコロニーアッセイを行った。

2.4. ヒト組織特異的発現の解析

成人ヒト組織から得られたpoly(A)⁺RNAののったメンブレンを、ヒトHSF1、HSF2、そしてHSF4の各cDNAをプローベとしてノーザンプロット解析を行った。

2.5. DNA結合能の解析

ゲルシフトアッセイは常法を用いて行った。DNase Iフットプリント法は、³²PラベルしたヒトHsp70遺伝子断片とリコンビナントHSF4を結合させた後、DNase I処理して6%アクリルアミドゲルに泳動した。

2.6. 転写活性化能の解析

COS7細胞にHSF4発現ベクター、レポーターとしてHsp70遺伝子を上流に持つCAT遺伝子、コントロールとしてアクチン遺伝子のプロモーターを持つルシフェラーゼ遺伝子を同時にトランスフェクトした後、細胞を回収してCATアッセイ、ルシフェラーゼアッセイを行った。一方、GAL4を用いた解析では、GAL4 DNA結合ドメインに融合させたHSF4遺伝子、レポーターとしてGAL4結合部位を上流に持つルシフェラーゼ遺伝子、さらにコントロールとしてSV40のプロモーターを持つCAT遺伝子を同時にトランスフェクトした後、CATアッセイ、ルシフェラーゼアッセイを行った。

3. 研究成果

3.1. 標的遺伝子組み替えによるHSF3の機能の解析。

従来、熱ショックストレスはHSF1を活性化し、その結果熱ショック遺伝子の転写活性化が引き起こされると考えるのが定説であった。申請者は、トリの系で既知のHSF1とHSF2以外に新しい第3の因子HSF3を単離し、その役割を調べてきた。その結果、熱ショックストレスにおいてはHSF3がHSF1と相補的に働き、より強いストレスでHSF3が機能することが示唆された。この仮説をHSF3の遺伝子ノックアウトにより検証した。高効率にゲノムDNAの相同組み換えが起こるニワトリBリンパ球DT40細胞株を用いて、HSF3の遺伝子ノックアウトを行った。得られたHSF3欠損株は、正常の生育条件で生育することができた。HSF3欠損株の高温での熱ショック応答を各種熱ショック蛋白質のcDNAをプローベとしてノーザンプロット解析にて調べたところ、すべての熱ショック蛋白質のmRNAの誘導が著しく低下していた。二次元電気泳動により確かに一群の熱ショック蛋白質の誘導も著しく抑えられていることもわかった。この細胞に、HSF3発現ベク

ターを再導入すると熱ショック応答が回復することが確かめられた。また、HSF3欠損細胞においてもHSF1は核へ移行しDNA結合能を獲得していた。つまりHSF1の存在下でも、HSF3は転写活性化に必須の因子であることが明らかとなった。HSF3欠損細胞の温熱耐性獲得を調べたところ予想どおり耐性は十分獲得できないことが分かった。このことは、HSF3が細胞のストレス下での生存に必要なことを示唆しており、また、温熱耐性獲得にストレス応答が必要なことを直接的に示した最初の例である。

一方、比較的低温のストレスでは、野生型細胞ではHSF1のみの活性化がみられ、熱ショック蛋白質の誘導が認められるが、HSF3欠損細胞ではHSF1のDNA結合型への転換は全く認められなかった。このことはHSF1が絶対温度を感知しているのではないことを示唆しており、HSF3の活性化とHSF1の活性化の調節の機構がリンクしていることを示していた。つまり、HSF1とHSF3の活性化に対して共通の負の制御因子が存在することを示唆している。

3.2. 新しいHSF4の機能の検索。

新規のヒトHSF4はそのDNA結合ドメインがHSF1により相同性が高い。リコンビナントHSF4を用いてDNase I フットプリントアッセイを行うとHSF2とは異なりHSF1と同じ結合様式を示すことがわかった。その構造上の特徴はHSF活性化の抑制に必須なロイシンジッパー様構造からなるHR-C領域を持たないことである。実際に、ヒトHeLa細胞に外来性に発現させると、その発現量に関わらず構成的にDNA結合型の三量体を形成した。次に転写活性化能について調べると、レポーターアッセイではほとんど活性化能を持たず、高発現ではむしろ抑制性に働くことがわかった。さらにHeLa細胞への安定発現株を作成して熱ショック蛋白質群の発現を調べると、どの熱ショック蛋白質の発現も低下していた。この様に構成的発現を制御できるのはHSF4に特異的な性質である。HSF4は組織特異的な発現パターンを示しており、筋組織、脳に比較的多い。以上のデータからHSF4は熱ショック蛋白質の構成的発現を細胞特異的に制御する因子であると推測している。

4. 今後の課題と発展

HSF3遺伝子ノックアウト細胞の解析からHSF3の熱ショック応答における役割が決定となった。また、HSF1とHSF3の2つの因子が協調的に働いていることも明らかとなった。さらにこの系で、従来より提示されていた問題に示唆を与えている。一つは温熱のセンサーはなにかということ、HSF自身かあるいは調節性因子が考えられていた。今回の結果は、HSF3を欠失したことでHSF1の温度を感じる閾値が上昇したことを示しており、HSF1自身が絶対温度を感じているのではなくなんらかの調節性因子を介したものであることを示唆している。二つめはストレス応答、つまり熱ショック蛋白質の誘導は温熱耐性に必須かどうかについてであり、これについては多くの議論があり間接的な多くの報告がある。今回の結果は、ストレス応答の必要性を直接的に示した初めての報告となる。今後は、HSF活性化を制御する因子を同定することでシグナル伝達の機構をさらに解析してゆく予定である。また、HSF1とHSF3の機能的相互作用については今のところ全く明らかにされていない。HSF1の遺伝子破壊や物理的相互作用の有無の解析

などを通じてそれらについて明らかにしてゆきたい。

一方、構成的発現を制御すると推測されるHSF4については、その機能について確固たる結果を得ていない。また、最近、alternative splicingによって生じたHSF4アイソフォームが活性化因子として働くことも明らかとなった。今後、遺伝子破壊などの手法を用いてHSF4の生体における生物学的意義を明らかにしてゆきたいと考えている。

5. 発表論文リスト

1) Akira Nakai, Masako Tanabe, Yoshinori Kawazoe, Johji Inazawa, Richard I. Morimoto, and Kazuhiro Nagata. HSF4, a new member of the human heat shock factor gene family which lacks properties of a transcriptional activator. **Mol. Cell. Biol.** 17: 469-481, 1997.

2) Masako Tanabe, Akira Nakai, Yoshinori Kawazoe, and Kazuhiro Nagata. Different Thresholds in the response of two heat shock transcription factors, HSF1 and HSF3. **J. Biol. Chem.** 272: 15389-15395, 1997.

3) Chie Kanei-Ishii, Jun Tanikawa, Akira Nakai, Richard I. Morimoto, and Shunsuke Ishii. Activation of heat shock transcription factor 3 by c-myc in the absence of cellular stress. **Science** 277: 246-248, 1997.

4) Naoki Watanabe, Naoki Tsuji, Shinichiro Akiyama, Hiroyoshi Sasaki, Tetsuro Okamoto, Daisuke Kobayashi, Tsutomu Sato, Tsukasa Hagino, Naofumi Yamauchi, Yoshiro Niitsu, Akira Nakai, and Kazuhiro Nagata. Induction of heat shock protein 72 synthesis by endogenous tumor necrosis factor via enhancement of the heat shock element-binding activity of heat shock factor 1. **Eur. J. Immunol.** 27: 2830-2834, 1997.

5) Masako Tanabe, Yoshinori Kawazoe, Shunichi Takeda, Richard I. Morimoto, Kazuhiro Nagata, and Akira Nakai. Disruption of the *HSF3* gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance. **EMBO J.** 17: 1750-1758, 1998.

6) Yoshinori Kawazoe, Akira Nakai, Masako Tanabe, and Kazuhiro Nagata. Proteasone inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family. **Eur. J. Biochem.**, 1998, in press.