

50. HSF1 複合体によるエピジェネティックな遺伝子発現制御

藤本 充章

山口大学 大学院医学系研究科 医化学講座

Key words : 熱ショック応答, HSF1, TRRAP, エピジェネティック, 神経変性疾患

緒言

細胞は、温熱に曝されると一群の熱ショックタンパク質 (HSP)、またはシャペロンを誘導することでプロテオスタシス (タンパク質ホメオスタシス) を維持しようとする。この応答は熱ショック応答と呼ばれる普遍的な生体防御機構であり、主に熱ショック転写因子 (HSF) によって制御される [1]。つまり、HSF は、プロテオスタシス容量の主要な調節因子である。HSF はさらに、個体発生と維持、老化と関連した神経変性疾患やがんの発生や進展にも重要な役割を担うことが明らかにされている [2]。哺乳動物細胞の HSF 群の中で、熱ショック応答による HSP 遺伝子の発現誘導を担うのは HSF1 である。我々はこれまでに、細胞抽出液中での HSF1 相互作用タンパク質解析を基盤として 2 つの熱ショック応答の準備機構を明らかにした。まず、HSF1 は一本鎖 DNA 結合蛋白質 RPA とともにクロマチンにあらかじめ結合してその構造を開いた状態に保ち、ストレス時に転写を速やかに促進できる環境を整えていた [3]。次に、HSF1-PARP13-PARP1 複合体がポリ ADP リボシル化 (PAR 化) 酵素 PARP1 をゲノム上に留めておき、熱ショック条件下や DNA 損傷時には活性化 PARP1 がそれぞれ HSP 遺伝子上と DNA 損傷誘導遺伝子上に再分布することで遺伝子発現誘導を促進することを見出した [4, 5]。

ショウジョウバエに一つしかない HSF による転写制御機構は古くから研究されてきた。それらの研究から、熱ショックにより活性化された HSF が *HSP70* 遺伝子のクロマチン構造を変化させてその転写を亢進することが分かっている [6]。しかしながら、哺乳動物細胞での HSF1 による転写制御機構はショウジョウバエとは異なる点が少なくはなく、熱ストレス後の *HSP70* プロモーター上で起こるエピゲノム状態とクロマチン構造の調節機構は不明なままである。近年、ヒストン修飾が転写誘導の際のクロマチン構造変化に重要な働きを担うことが分かり、ヒストン修飾と疾患の関係も明らかになってきた [7]。本研究では、熱ストレス特異的にゲノム上の HSF1 転写複合体蛋白質を ChIP アッセイ法と質量分析法を統合した ChIP-mass 解析法を用いて同定する。その複合体を構成する新規エピジェネティック制御関連因子の解析から、HSF1 によるクロマチン構造変化のメカニズムを明らかにする。これまでに、プロテオスタシス容量破綻で起こる神経変性疾患 (アルツハイマー病やパーキンソン病など) で HSF1 転写複合体が有効なターゲット遺伝子として考えられている [8]。本研究により、HSF1 複合体によるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を解明し、ヒトの神経変性疾患等の新たな治療ターゲットを提案できる可能性があると考えられる。

方法および結果

1. 熱ストレスにおける HSF1 結合タンパク質の同定

HeLa 細胞に 42°C で 60 分の熱ショック処理を行った細胞と定常状態の細胞を準備した。超音波破碎によって DNA を断片化し、抗 HSF1 抗体と磁気ビーズを用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、HSF1 と共沈降する DNA およびタンパク質を濃縮した。高温処理により脱架橋し、その試料タンパク質を SDS-PAGE によって分離した。SDS-PAGE によって分離したタンパク質は、サイズによって 6 分画して質量分析により HSF1 結合タンパク質を同定し、MaxQuant により定量を行った。定常状態条件 (Cont) と比較して、熱ショック条件下 (HS) でペプチドが 3 以上増加したタンパク質を 31 個同定した。同定したタンパク質には、エピジェネティック制御の writer と関連する

ヒストンアセチル基転移酵素である p300 や CBP、ヒストンアセチル基転移酵素複合体因子 TRRAP やエピジェネティック制御の reader である TRIM24 や TRIM33 が存在した。

2. HSF1-TRRAP 複合体は HSP70 誘導を促進する

定常状態と熱ショック条件の HeLa 細胞より細胞質と核画分の細胞抽出液を調製し、内在性の HSF1 と TRRAP の相互作用を免疫沈降法で確認した。細胞質分画では両条件共に HSF1-TRRAP 相互作用は見られず、核画分の熱ショック処理で HSF1-TRRAP 相互作用が顕著に増加した。HSF1 は熱ショックで高度にリン酸化を受けることが知られており、既知の HSF1 リン酸化部位変異体を作製し、HSF1-TRRAP の相互作用を免疫沈降法で検討した。HSF1-S419A の変異体は TRRAP との相互作用が消失することが分かった (図 1a)。HeLa 細胞の内在性 HSF1 を TRRAP と結合できない HSF1-S419 変異体 (HSF1-S419A、HSF1-S419G) へ置換し、熱ショックでの HSP70 誘導への影響をリアルタイム PCR 法で調べた。定常状態においては HSF1-S419 変異体では HSP70 発現の変化が見られず、熱ショックによる HSP70 誘導を顕著に抑制することが分かった (図 1b)。

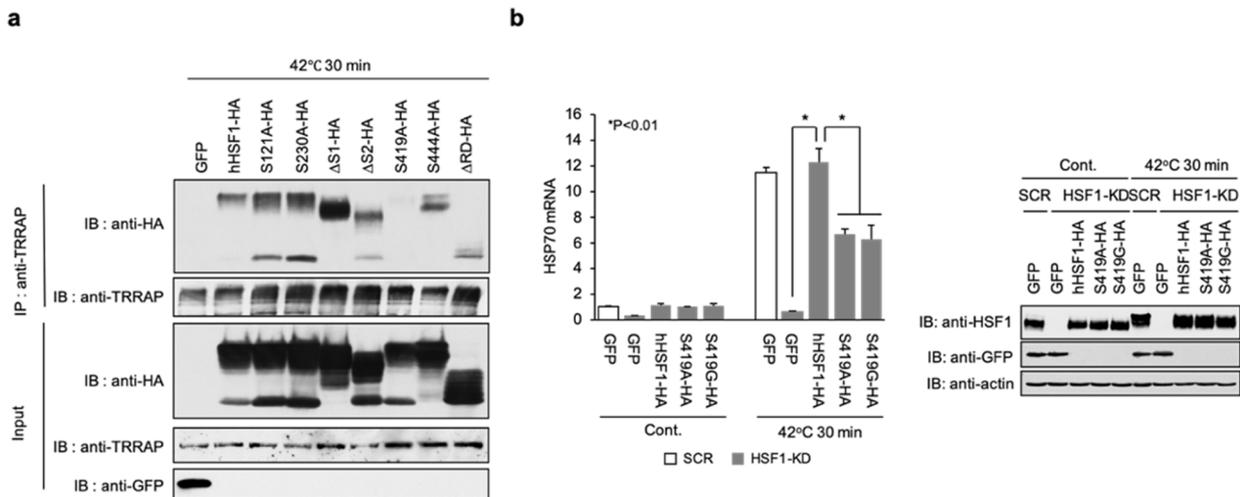


図 1. HSF1 の S419 リン酸化が HSP70 誘導に関与する

- HSF1 変異体と TRRAP の相互作用。HeLa 細胞に HSF1 あるいは HSF1 変異体を高発現させ TRRAP との結合を調べた。
- HSF1-S419 変異体による HSP70 誘導。HeLa 細胞の HSF1 を野生型 HSF1 あるいは TRRAP と相互作用しない変異型 HSF1 に置換し、熱ショックによる HSP70 誘導を調べた。アスタリスクは $*P < 0.01$ (Student t-test) を示す。

3. HSF1-TRRAP 複合体は HSP70 プロモーターのクロマチン弛緩に必要である

TRRAP は NuA4/TIP60 ヒストンアセチル基転移酵素複合体の構成因子であること、そしてヒストンアセチル基転移酵素 GCN5 と相互作用することが知られている。そこで、HeLa 細胞の内在性 HSF1 を TRRAP と結合できない HSF1-S419 変異体へ置換し、HSF1-TRRAP 複合体が HSP70 プロモーターにリクルートされるかを ChIP アッセイ法で調べた。また H3 や H4 のアセチル化に HSF1-TRRAP 複合体が関与しているかを検討した。その結果、熱ショックで HSF1 と TRRAP は顕著に HSP70 プロモーターにリクルートされ、HSF1-S419 変異体の置換によりそれらのリクルート量が減少した (図 2a)。さらに、熱ショック条件下で、HSP70 プロモーター領域の H3 や H4 のアセチル化量が増加するが、HSF1-S419 変異体の置換により減少することも分かった (図 2b)。熱ショックで TRRAP に結合するヒストンアセチル基転移酵素を明らかにするために、質量分析により TRRAP 結合タンパク質を同定した。その結果、TRRAP が p400/TIP60 複合体の幾つかの因子と結合することが分かった。よって、HSF1-TRRAP 複合体が HSP70 プロモーター領域に p400/TIP60 複合体をリクルートさせ、クロマチンを弛緩させていることが示唆された。

4. HSF1-TRRAP 複合体はポリグルタミン凝集体を抑制する

HSF1 は神経変性疾患の一つであるポリグルタミン病の凝集体を抑制することが知られている。そこで、HSF1-TRRAP 複合体がポリグルタミン病の凝集体を抑制するかを調べるために、凝集体を形成しやすいタンパク質 (PolyQ81-GFP-NLS) が核だけに発現する発現ベクターを構築した。HeLa 細胞に PolyQ81-GFP-NLS を高発現させると、コントロールの GFP に比べて HSF1-S419 のリン酸化が亢進していることが分かった。次に、HeLa 細胞の内在性 HSF1 を HSF1-S419 変異体へ置換し、PolyQ81-GFP-NLS を発現させて凝集体形成変化を観察した。HSF1 ノックダウンでは顕著に凝集体が増加し、野生型 HSF1 に置換した細胞の凝集体形成はコントロール (SCR+LACZ) のレベルまで改善された。一方、HSF1-S419 変異体の置換は野生型 HSF1 に比べ、凝集体形成の抑制効果は部分的であった (図 3a)。また、不溶性画分の PolyQ81-GFP-NLS 量を調べた結果、凝集体抑制効果と同様に、野生型 HSF1 の置換で顕著に改善されたが、HSF1-S419 変異体の置換はわずかな改善しか見られなかった (図 3b)。PolyQ81-GFP-NLS の高発現によるわずかな HSP70 誘導に HSF1-TRRAP 複合体が必要であることも分かった。

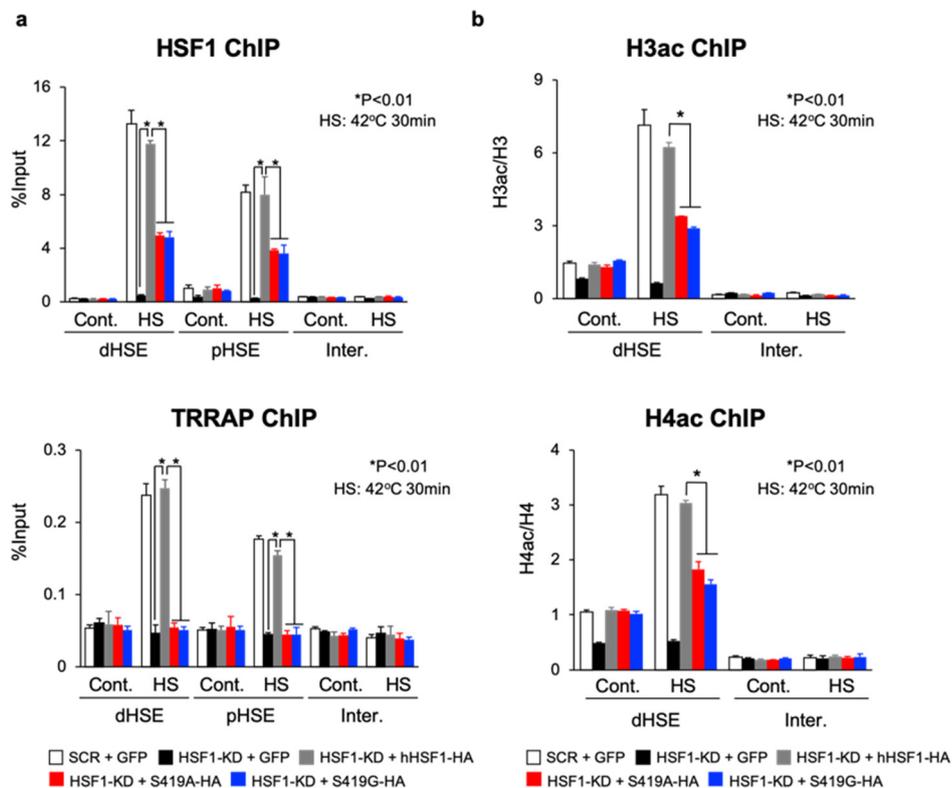


図 2. HSF1-TRRAP 複合体はヒストンアセチル化を調節する

- HSF1-TRRAP 複合体は HSP70 プロモーターにリクルートする。HeLa 細胞の HSF1 を野生型 HSF1 あるいは TRRAP と相互作用しない変異型 HSF1 に置換し、HSF1 と TRRAP のリクルートを調べた。アスタリスクは*P < 0.01 (Student t-test) を示す。
- HSF1-TRRAP 複合体は、ヒストンアセチル化を亢進させる。HeLa 細胞の HSF1 を野生型 HSF1 あるいは TRRAP と相互作用しない変異型 HSF1 に置換し、H3 と H4 アセチル化のリクルートを調べた。アスタリスクは*P < 0.01 (Student t-test) を示す。

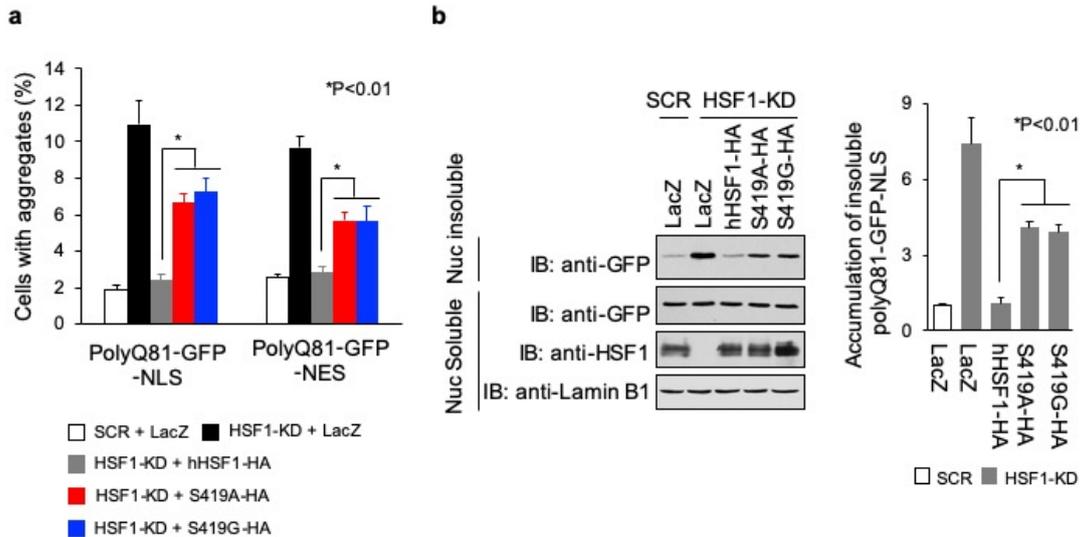


図3. HSF1-TRRAP 複合体によるポリグルタミン凝集体の抑制効果

- a) HSF1-TRRAP 複合体はポリグルタミン凝集体を抑制する。HeLa 細胞の HSF1 を野生型 HSF1 あるいは TRRAP と相互作用しない変異型 HSF1 に置換し、PolyQ81-GFP-NLS を高発現させてポリグルタミン凝集体形成細胞の割合を調べた。アスタリスクは* $P < 0.01$ (Student t-test) を示す。
- b) a) と同様の処理を行い、細胞中の可溶性と不溶性画分を SDS-PAGE で泳動して、PolyQ81-GFP-NLS、HSF1 や Lamin B1 を検出した。アスタリスクは* $P < 0.01$ (Student t-test) を示す。

考 察

HSF による *HSP70* 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いる。ショウジョウバエではショック後、すみやかに *HSP70* 遺伝子のヌクレオソームの除去と転写誘導を認める。これまでに、哺乳動物での熱ショック応答の調節機構を明らかにするために HSF1 結合蛋白質の解析が多くの研究者によってなされてきた。しかし、HSF1 を免疫沈降してその複合体を質量分析する従来の方法では、ゲノムやクロマチンは不溶性画分に存在するために主要な転写装置因子群がほとんど同定されてこなかった。本研究で、新しい ChIP-mass 法による複合体解析を試み、エピジェネティック制御の writer や reader に関わる因子を同定することができた。この因子の中の TRRAP は熱ショックで HSF1 と相互作用し、HSF1-TRRAP 複合体が *HSP70* プロモーターにリクルートされ、ヒストンアセチル基転移酵素を呼び込み、クロマチン構造を弛緩させることで転写を亢進することを明らかにした。この HSF1-TRRAP 複合体形成には HSF1 のリン酸化が関与していた。よって、熱ストレスで起こる HSF1 のリン酸化がヒストンアセチル基転移酵素のリクルートに必要であることが示された。

近年、ヒストン修飾が転写誘導の際のクロマチン構造変化に重要な働きを担うことが分かり、ヒストン修飾と疾患の関係も明らかになっている。また、HSF1 はプロテオスタシス容量の主要な調節因子であり、老化と関連した神経変性疾患やがんの発生や進展にも重要な役割を担うことが明らかにされている。本研究から、HSF1-TRRAP 複合体がポリグルタミン病の凝集体抑制に働くことが分かった。よって、HSF1 転写複合体に含まれるヒストン修飾関連因子を同定したことで、プロテオスタシス容量破綻で起こる神経変性疾患にクロマチン構造変化が関与することが示唆された。今後、HSF1-TRRAP 複合体のさらなる詳細な解析により、ヒトの神経変性疾患等の新たな治療ターゲットを提案できることを期待している。

文 献

- 1) P Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rec Cell Dev Biol.* 1995 11:441-69. PMID: 8689565 DOI: 10.1146/annurev.cb.11.110195.002301
- 2) Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Biol.* 2018 Jan 19(1):4-19. Epub 2017 Aug 30. PMID: 28852220. DOI: 10.1038/nrm.2017.73
- 3) Fujimoto M, Takaki E, Takii R, Tan K, Prakasam R, Hayashida N, Lemura S, Natsume T, Nakai A. RPA assists HSF1 access to nucleosomal DNA by recruiting histone chaperone FACT. *Mol Cell.* 2012 Oct 26;48(2):182-94. Epub 2012 Aug 30. PMID* 22940245. DOI: 10.1016/j.molcl.2012.07.026
- 4) Fujimoto M, Takii R, Takaki E, Katiyar A, Nakato R, Shirahige K, Nakai A. The HSF1-PARP13-PARP1 complex facilitates DNA repair and promotes mammary tumorigenesis. *Nat Commun.* 2017 Nov 21;8(1):1638. PMID: 29158484. DOI: 10.1038/s4167-017-01807-7
- 5) Fujimoto M, Takii R, Katiyar A, Srivastava P, Nakai A. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Promotes the Human Heat Shock Response by Facilitating Heat Shock Transcription Factor 1 Binding to DNA. *Mol Cell Biol.* 2018 Jun 14;38(13). Pii: e00051-18 Print 2018 Jul 1. PMID: 29661921. DOI: 10.1128/MCB.00051-18
- 6) Petesch SJ, Lis JT. Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci. *Cell.* 2008 Jul 11;134(1):74-84. PMID: 18614012. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.029
- 7) Portela A, Esteller M. Epigenetic modification and human disease. *Nat Biotechnol.* 2007;25(10):1057-68. PMID: 20944598. DOI: 10.1038/nbt.1685
- 8) Labbadia J, Morimoto RI. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem.* 2015 84: 435-64 Epub 2015 Mar 12. PMID: 25784053. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-033955