

ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

熱ショック転写因子HSF1を介した新たな細胞死の経路

林田直樹

山口大学医学部応用医工学系・生化学第二講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)

Key words : 熱ショック転写因子, 細胞死促進因子, 細胞生存, 細胞死

和文抄録

熱ショック転写因子 (heat shock transcription factor, HSF) は、一群の熱ショック蛋白質 (heat shock protein, Hsp) の発現制御に関わる転写因子群として知られ、哺乳動物細胞では3種類のHSF (HSF1, HSF2, HSF4) が明らかにされている。このうち、HSF1は蛋白質の変性を感知し、Hspの発現制御において中心的な役割を担い、温熱ストレスをはじめとする様々なストレスに対する耐性の獲得を通して細胞生存に働いている。一方、我々は活性型HSF1トランスジェニックマウス、ならびにHSF1欠損マウスの解析から、HSF1が細胞死を導く働きがあることを示唆する結果を得ていた。本稿では、HSF1がHspとは全く逆の働きを持つ細胞死促進因子TDAG51 (T-cell death associated gene 51) を直接誘導することを示し、これまで知られていた細胞防御能だけでなく細胞死誘導能を併せ持っていることを明らかにした。さらに、このHSF1-TDAG51経路が生体内でも重要な機能を担っていることを明らかにした。この経路と蛋白質変性にともなう細胞運命の決定との関わりについて概説する。

はじめに

すべての生物は様々な外的環境変化に対応するために一群の遺伝子発現を誘導する機構を備えている。ストレスの中でも、温度は生物が生存する上で

最も重要な環境要因の一つである。高温ストレスは、生物の生存に必須な蛋白質の変性や凝集を引き起こし、細胞に致命的な障害を与えるが、この障害を防ぐことを目的として一群の熱ショック蛋白質 (Hsp) が誘導されることが広く知られている。この応答は熱ショック応答と呼ばれ、主に熱ショック転写因子 (HSF) によって転写のレベルで制御を受ける。つまり、HSFの役割は細胞の生存を図ることであり、これまでのHSFの研究はこのような細胞防御機構の解析が中心であった¹⁾。この結果、蛋白質凝集体の抑制、温熱耐性、寿命の延長など、生体防御分子としてのHSF1の重要性が次々と明らかとなっている²⁾。一方我々は、活性型HSF1のトランスジェニックマウスの解析から、精巣においてHSF1がこれまで知られていた細胞防御と全く反対に、細胞死を誘導している可能性を見出していた^{3, 4)}。本稿では、細胞死促進因子TDAG51がHSF1の新たなターゲット遺伝子であり、かつ同じHSF1によって誘導される一群のHspと拮抗的に働くことを明らかにした。この新しい経路の生体内における重要性について述べてみたい。

TDAG51はHSF1によって直接誘導される

HSF1のターゲット遺伝子としてはHspをはじめとするシャペロン分子が広く知られていたが、細胞死に関連するような分子についての報告は全くなされていなかった。我々はマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) を用いたDNA マイクロアレイ解析を行い、多くのシャペロン分子とともに、細胞死促進因子TDAG51 (T-cell death associated gene 51) が温熱ストレスによっ

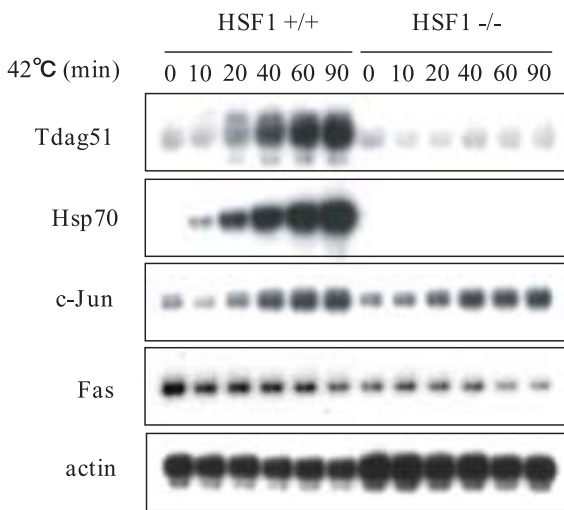


図1 温熱ストレスによるTDAG51の誘導

MEF細胞を42°Cで培養すると、Hsp70と同様に経時的にTDAG51の発現量が増加する。HSF1を欠損するMEFではTDAG51の発現誘導は認められない。

で発現が亢進することを見出した(図1)⁵⁾。TDAG51は抗T細胞受容体抗体でT細胞ハイブリドーマに刺激した際にアポトーシスを誘導する分子として発見された分子であり、T細胞ハイブリドーマ以外でも神経細胞やメラノーマ細胞でアポトーシスを引き起こすことが報告されている。また、ルシフェラーゼアッセイを行ないプロモーター領域の活性を調べたところ、熱ショックにより活性が上昇することが明らかとなった。ゲルシフトアッセイおよびクロマチン免疫沈降法から、TDAG51遺伝子のプロモーター領域にHSF1が結合することが明らかとなり、TDAG51はHSF1の直接のターゲット遺伝子であることが示された。

次に、様々な細胞でHspとTDAG51の制御機構を検討したところ、MEFではTDAG51もHspも誘導を受けていたが、マウス神経細胞Neuro-2aおよびNCB20ではTDAG51が主に誘導され、逆にマウス胚性癌細胞F9ではHsp70が誘導されていた。クロマチン免疫沈降法によってそれぞれの細胞におけるHSF1のプロモーターへの結合を調べたところ、Neuro-2a細胞ではTDAG51のプロモーターに、F9細胞ではHsp70のプロモーターに結合していることがわかった。従って、TDAG51はHSF1のターゲット遺伝子であるが、Hspの発現制御とは異なっていることが示された。

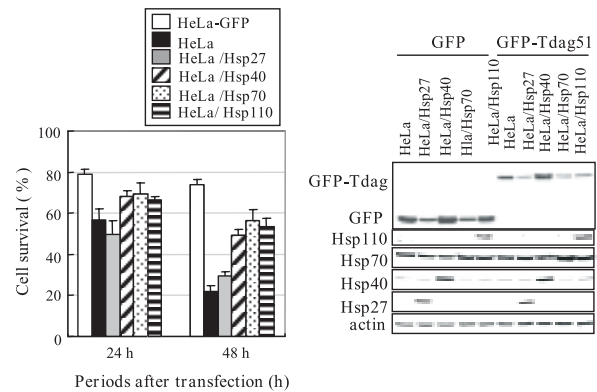


図2 TDAG51の細胞死誘導活性はHspによって抑制される
HeLa細胞でTDAG51を発現させると細胞死が引き起こされるが、この細胞死はHsp110, Hsp70, Hsp40の共発現により抑制される。

TDAG51の細胞死誘導活性に対してHspは抑制的に働く

HeLa細胞においてTDAG51を発現させたところ、核の断片化を特徴としたアポトーシスが確認された。このアポトーシスはカスパーゼ全般のインヒビターであるz-VADを用いても抑制されなかった。このことから、TDAG51によって誘導される細胞死は、カスパーゼに依存しない経路で引き起こされていることが示唆された。また、Hsp40, Hsp70, Hsp110を同時に発現させるとTDAG51によるアポトーシスは抑制された(図2)。このことは、HeLa細胞における細胞生存と細胞死の運命決定が、HspとTDAG51の発現量のバランスによってなされていることを示すものである。

TDAG51のN末端領域にHsp結合部位は存在し、一方でC末端領域に細胞死誘導活性が存在する

HspによるTDAG51の抑制が直接的な機構に拠るものかを調べるため免疫沈降を行なったところ、Hsp110, Hsp70, Hsp40の各HspがTDAG51に結合していることが分かった。続いて、結合部位の同定を試みた。TDAG51はN末端にPleckstrin-homology like (PHL) ドメインを持ち、C末端側にはプロリン残基とグルタミン残基の繰り返し(PQリピート)領域、プロリン残基とヒスチジン残基の繰り返し(PHリピート)領域という特徴的な配列を有している(図3)。それぞれの断片を用いて免疫沈降を行なったところ、PHLドメインにHspが特異的に結合していることがわかった。次に、TDAG51の細胞

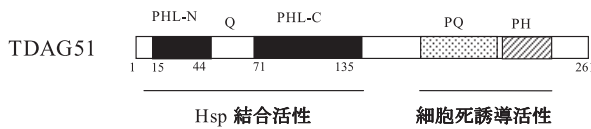


図3 TDAG51の構造

N末端側にはPHLドメインが2つ並んでおり、C末端側にはPQリピート領域、PHリピート領域という特徴的な配列を有している（本文参照）。細胞死誘導活性があるのはC末端のPQおよびPHリピート領域。PHLドメインにはHspが結合し、C末端の細胞死誘導活性を抑制する。

死誘導活性の存在する領域の同定を行なったところ、PQリピート領域およびPHリピート領域にのみ細胞死誘導活性が認められた。これらの結果から、HspはTDAG51のN末端領域のPHLドメインに結合することによって、C末端の細胞死誘導活性を抑制していると考えられた。

TDAG51欠損はストレスに対する抵抗性を増加させる

野生型MEFとTDAG51欠損MEFを用いて温熱ストレスをかけたところ、いずれも細胞の生存率は経時的に減少したが、TDAG51欠損MEFの生存率は野生型のそれに比して常に高い値を示した。続いて亜硫酸存在下で同様の実験を行なったところ、この条件下でもTDAG51欠損MEFの方が高い生存率を示した。これらの結果から、内在性のTDAG51の欠損によって、細胞の生存が促進されることが考えられた。

温熱ストレスによってマウス精巣で引き起こされる細胞死はHSF1-TDAG51経路を介している

生体内においてもHSF1-TDAG51経路が重要な役割を担っているかを調べるため、温熱感受性の高い精子形成過程を調べたところ、温熱ストレスに曝した際に認められる精子形成細胞の細胞死が、野生型に比較してTDAG51欠損マウスでは抑制されていた（図4）。従って、生体内においても、HSF1-TDAG51経路が細胞生存と細胞死の決定において、重要であると考えられた。

今後の展望

これまで細胞生存を担う分子としてのみ考えられていたHSF1が、全く反対に細胞死を誘導すること

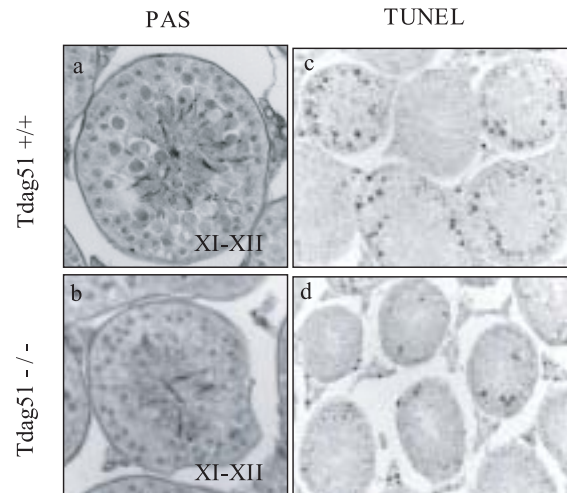


図4 精子形成細胞で認められるHSF1-TDAG51経路による細胞死

TDAG51欠損マウスの精子形成細胞では、野生型マウスに比較して温熱ストレスによる細胞死が抑制される。

が明らかとなった。この機構を担うTDAG51はHspと同様に直接HSF1によって誘導される分子である。つまり、HSF1は、細胞の生存を担うHspと細胞の死を引き起こすTDAG51という、相反する機能を持った両分子の発現のバランスを調節することによって細胞の生と死を決定しうることを示した。このHSF1-TDAG51経路が*in vitro*だけでなく*in vivo*でも重要であることを精子形成細胞で初めて示したが、MEFで示されたように、他の細胞や組織でもこの経路は重要であると考えられる。Hspはその高発現と細胞の癌化の関連性が報告されているが³⁰⁾、対照的に転移性メラノーマや乳癌でTDAG51の抑制が報告されており、精子形成細胞以外でもHspとTDAG51のバランスと細胞生存との関連、ならびにHSF1-TDAG51経路の重要性を示唆する例として非常に興味深い。

細胞にDNA傷害が生じるとp53を介して細胞周期停止か細胞死の誘導が起こることが知られており、これは、p53という単一の分子が細胞の生死を司り、修復不能な遺伝子の異常が次の世代に伝わることを防ぐ機構だと考えられている。一方、蛋白質の傷害はHSF1の活性化を導き、活性化されたHSF1は多くの細胞でHspを誘導して細胞の生存に働くが、精子形成細胞ではHspは誘導されずTDAG51のみが誘導されて細胞死が促進される。精子形成過程は異常が起こりやすい過程であり、前駆細胞から精子になる過程で25-75%の細胞が細胞死を起こす機構が存

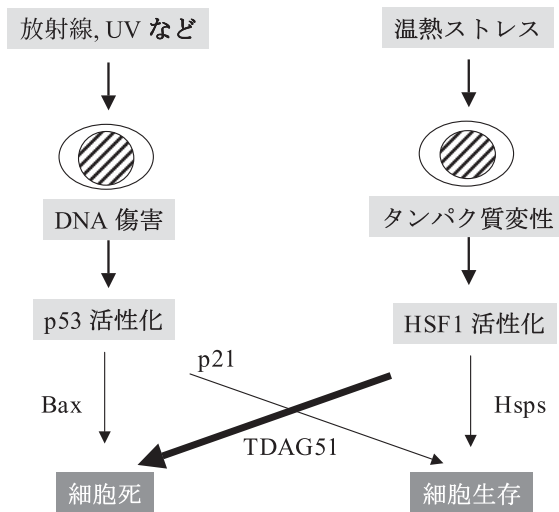


図5 HSF1は蛋白質傷害による異常が次世代に影響することを防ぐ

p53は細胞に生じたDNA傷害に対し、細胞周期の停止もしくは細胞死の誘導の両者を司ることにより、修復不能な遺伝子の異常を次世代に伝えない役割を担っている。HSF1は蛋白質の傷害を生じた細胞を生存に導くだけでなく、積極的に死に誘導することによって、p53と同様の役割を持っていると考えられる。

在している。HSF1は蛋白質傷害を生じた細胞をTDAG51を介して積極的に排除することにより、異常な性質が次世代に伝播することを防いでいると考えられる(図5)。HSF1は、DNA傷害に対応するp53と同様に、蛋白質傷害に対して単一分子で細胞生存と細胞死の決定が担える分子であると言える。

謝 辞

中村賞受賞研究に当たり、終始適切な御助言を頂きました山口大学大学院医学系研究科医化学分野の中井彰教授、井上幸江講師、藤本充章講師ならびに多数の共同研究者の方々に心より感謝致します。また、中村賞という名誉ある賞を頂き、本誌掲載の機会をお与え下さいました山口大学医学会の皆様へ深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of the heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Gene Dev* 1998; **12**: 3788-3796.
- 2) 中井 彰, 藤本充章, 井上幸江. 熱ショック転写因子 HSF と高次生命現象. *実験医学* 2007; **25**: 1547-1553.
- 3) Nakai A, Suzuki M, Tanabe M. Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J* 2000; **19**: 1545-1554.
- 4) Izu H, Inouye S, Fujimoto M, Shiraishi K, Naito K, Nakai A. Heat-shock transcription factor 1 is involved in quality control mechanisms in male germ cells. *Biol Reprod* 2004; **70**: 18-24.
- 5) Hayashida N, Inouye S, Fujimoto M, Tanaka Y, Izu H, Takaki E, Ichikawa H, Rho J, Nakai A. A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. *EMBO J* 2006; **25**: 4773-4783.
- 6) Whitesell L, Lindquist SL. Hsp90 and the chaperoning of cancer. *Nature Rev Cancer* 2005; **5**: 761-772.

A Novel HSF1-mediated Death Pathway

Naoki HAYASHIDA

*Department of Biochemistry II. and Bio-Signal Analysis,
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

SUMMARY

Heat shock response is an adoptive response to proteotoxic stress, and a major heat shock transcription factor 1 (HSF1) has been believed to protect cells from cell death by inducing heat shock proteins (Hsps) that assist protein folding and prevent protein denaturation. We found a proapoptotic Tdag51 (T-cell death associated gene 51) gene as a direct target gene of HSF1 and that heat shock response and other stresses induced different levels of Hsps and Tdag51, which depend on cell types. Hsps bound directly to the N-terminal pleckstrin-homology like (PHL) domain of Tdag51, and suppressed the death activity. Tdag51, but not major Hsps, were induced in male germ cells exposed to high temperatures, in addition, analysis of Tdag51-null testes showed that Tdag51 played substantial roles in promoting heat shock-induced cell death *in vivo*. Therefore, it was suggested that cell fate on proteotoxic condition is determined at least by balance between Hsp and Tdag51 levels, which are differently regulated by HSF1.