

## ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

## 遺伝子改変マウスを用いた熱ショック転写因子群の機能解析

藤本充章

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丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : ストレス応答, 熱ショック転写因子, ノックアウトマウス, 白内障

## 和文抄録

熱ショック転写因子 (HSFs) は, 一群の熱ショック蛋白質の発現制御に関わる転写因子群である。哺乳動物細胞では3種類のHSF (HSF1, HSF2, HSF4) が存在している。遺伝子欠損マウスの解析からHSF1は卵成熟に必須で, HSF2は精子形成や脳形成に関与していることが知られている。しかしながら, HSF1とHSF2がどのような遺伝子の発現制御を介して発生過程に関与しているのかまったく明らかにされていない。一方, HSF4は脳や肺など多くの組織で発現しているが, 熱ショック応答にはほとんど関与しておらず, その生物学的意義は明らかにされていなかった。最近, ヒトの遺伝性白内障の原因遺伝子としてHSF4が同定され, HSF4欠損マウスも白内障を起こすことが判明した。本稿では, HSF欠損マウス解析からわかったHSFファミリーの新しい生理機能と分子機構について概説する。

## 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仕組みを備えている。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。高温ストレスは生存に必須な蛋白質の変性や凝集をきたし細胞に致命的な障害を与える。この蛋白質の障害を防ぐため

に一群の熱ショック蛋白質が誘導される。この応答は熱ショック応答と呼ばれ, 主に熱ショック転写因子 (HSF) によって転写のレベルで制御される。高等動物においては少なくとも3つのHSFを発現していることがわかっており, これらHSFが認識する結合配列はほぼ同じである。これまでに多くの研究者によって温熱ストレスによるHSFを介する熱ショック蛋白質の誘導機構の解析がなされてきた。さらに最近になって, 遺伝子改変マウスの作成によりHSFの個体レベルでの解析が進み, 予想しなかった結果が明らかになってきている。本稿では, 個体でのHSF群の生理機能を中心に述べる。

## HSFファミリー

哺乳類動物細胞においてはHSF1, HSF2, HSF4の少なくとも3つのHSF遺伝子産物が発現されている (図1)。一方で, ニワトリはHSF1, HSF2, そしてHSF3が同定されており, 酵母やショウジョウバエでは単一のHSFが存在する。これらのHSFは構造状よく保存されたDAN結合ドメイン (DBD), ロイシンジッパー様構造からなる三量体形成ドメイン (HR-A/B) を持つ。そして, カルボキシル末端に存在するもう一つのロイシンジッパー様構造 (HR-C) は三量体形成を抑制する<sup>2)</sup>。HSF群の中でもHSF4は特徴としてHR-Cドメインを持たず構成的に三量体を形成する (図2)<sup>3)</sup>。最近, DBDドメインのみ保存されている遺伝子として, 無精子症の責任領域に存在するHSFYや新規遺伝子

平成18年1月11日受理

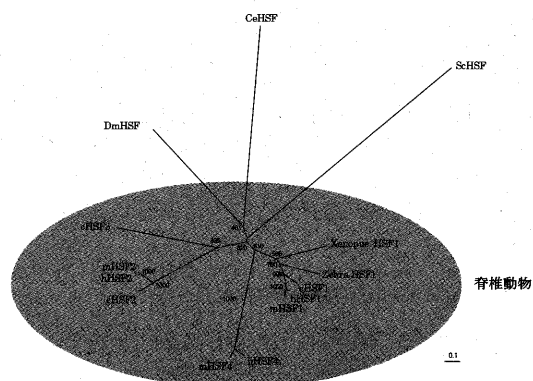


図1 HSF1系統樹

高等動物は、複数のHSFが存在する。ヒトとニワトリでアミノ酸配列は高く保存されている。Sc; 出芽酵母, Ce; 線虫, Dm; ショウジョウバエ, m; マウス, h; ヒトを表している。

LW-1が同定された<sup>4)</sup>。これらの遺伝子は、その領域以外のアミノ酸に対してHSF群との相同性は見られない。今後、新規のHSF関連遺伝子を含めたスーパーファミリーの機能と分子機能の解析を進めていく必要がある。

HSFのDNA結合能

HSF群は、熱ショック蛋白質遺伝子上流に存在する熱ショックエレメント (HSE) を認識し転写を制御する。in vitroの解析からHSE配列は、5'-nGAAn-3' (nは任意の塩基) を1ユニットとして3つ以上の逆向きの繰り返し配列から構成される<sup>5)</sup>。最近になって、in vivoのHSF1のターゲット遺伝子を同定する方法として、クロマチン免疫沈降の後にマイクロアレイ解析が行われたが、同様の結果が示されている (図3)<sup>6)</sup>。興味深いことは、HSF1がin vivoで結合しても活性化されない遺伝子が多数同定されたことだ。この結果は、HSF1がストレス応答を制御する意外にも分子機能を有していることを示唆している。

発生過程でのHSFの生理機能

1997年にショウジョウバエHSFの機能喪失変異体の解析が行われ、HSFが生存に必須ではないことがわかった。一方で、初めて卵形成と個体発生初期にHSFが必要であることが示された<sup>7)</sup>。哺乳動物細胞において、HSF1は細胞質と核に単量体のDNA

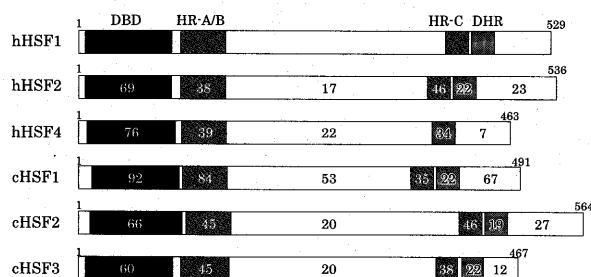


図2 HSFファミリー

数字は、hHSF1とそれぞれのHSFのアミノ酸の相同性を%で表している。DNA結合ドメインは、種間で高く保存されている。

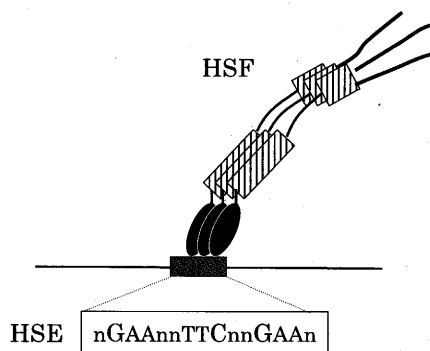


図3 HSEコンセンサス配列

HSFは、nGAAnを1ユニットとする3つの逆向きの繰り返し配列を認識し結合する。星印は必須の塩基を示す。

結合能を持たない状態で存在する。熱ショックによりDNA結合能を持つ三量体に転換される。現在までに、私たちを含めて3つのグループがHSF1欠損マウスの作成に成功している。HSF1欠損マウスの出生比率は遺伝背景で異なっており、129系ではほとんど生まれないのに対し、ICR系ではメンデルの法則に近い率で生まれた<sup>8, 9, 10)</sup>。生まれてきたHSF1欠損マウスは、体重がやや軽い以外は外見上顕著な異常は認められない。しかし、メスのHSF1欠損マウスは不妊で、体外受精卵は2細胞期まで発育しない。これらの分子機構は未だ明らかにされていない。私たちのグループはHSF1欠損マウスの解析をさらに進め、新しい生理機能を明らかにした。HSF1欠損マウスは抗原投与により脾臓細胞の増殖の低下とそれに伴う抗体産生の低下を明らかにした<sup>11)</sup>。この現象に関わる新しいHSF1のターゲット遺伝子として、免疫の分化・維持に関与するサイトカイン (IL-6) を同定し、免疫応答と熱ショック応答の分子レベルでの接点を明らかにした。

## 2) HSF2

HSF2は、すべての臓器で発現が確認され、熱ショック応答に必須のHSF1とは違い、転写活性可能度が極めて弱い<sup>12)</sup>。また、発生初期に脳神経で発現が高いこと、さらに精巣の発生過程で発現が高いことから、発生過程の役割が示唆されていた。3つのグループがHSF2欠損マウスの作成に成功し、そのマウスは出生し、軽度の水頭症様の形態異常や、やはり軽度の卵巣や精巣の異常が示された<sup>13, 14)</sup>。さらに、HSF1とHSF2の両遺伝子欠損マウスの解析が行われ、精子形成細胞が完全になく不妊であることが分かった<sup>15)</sup>。したがって、精子形成過程では両遺伝子が相補的な機能をもって働くことが示唆された。

## 3) HSF4

HSF4は、転写活性化能を持たないHSF4-aと活性のあるHSF4-bの2つのアイソフォームのうち、HSF4-bのみが組織での蛋白質の発現が認められている<sup>16)</sup>。脳と肺でHSF4の発現が比較的高いものの、その機能は不明であった。2002年、中国とデンマークのヒトの遺伝性白内障の家系の原因遺伝子が16番目の染色体に存在するHSF4遺伝であることがわかった<sup>17)</sup>。これらの家系では、HSF4のDNA結合のドメインに変異があることが示された。さらに、チュニジアの家系での先天性常染色体劣性遺伝白内障が、HSF4遺伝子のスプライスサイト変異で起こることも明らかとなった<sup>18)</sup>。

一方、HSF4欠損マウスも白内障を発症することを私たちともう一つ別のグループが明らかにした<sup>19, 20)</sup>。私たちの解析の結果、レンズ繊維細胞中に封入体の形成を認め、レンズに存在する蛋白質の安定化の異常が原因と考えられた。遺伝子発現を調べたところ、レンズ繊維細胞中の蛋白質のうち分子シャペロンであるHsp27とレンズ蛋白質の主要成分の一つであるγクリスタリンの著明な減少が見られた。特にγクリスタリンは、特徴的な立体構造を持つことでレンズのように高蛋白質濃度での蛋白質安定化に関わると考えられており、封入体様構造の形成の一因と考えられる。一方、形態学的にレンズ上皮細胞の著明な増殖分化異常を認めた。解析の結果、レンズ上皮細胞の増殖分化因子であるFGF (FGF-1, -4, -7)の発現がHSF4欠損レンズ上皮細胞で顕著に亢進していた。さらに興味深いことに、FGFの転写制御に関してはHSF1とHSF4の作用は拮抗しており、

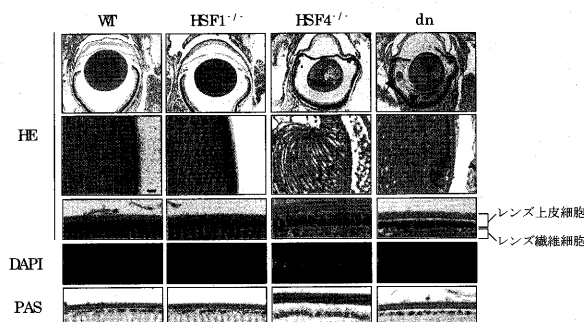


図4 HSF4欠損マウスの表現型

HSF4欠損マウスは白内障を発症する。上皮細胞で見られた形態異常が、HSF1とHSF4の両欠損マウスで改善された。WT; 野生型, ds; HSF1とHSF4の両遺伝子欠損マウスを表している。

両遺伝子の欠損でレンズ上皮細胞の増殖と分化は正常に近くまで改善された (図4)。

これらHSF4欠損マウスの表現型は胎児期で認められず出生後から見られる。このことから、レンズ形成に関与するPax6等の転写因子とは異なり、HSF群は出生後のレンズの維持に重要な役割を担っているといえる。この時期は外界からの紫外線などのストレスを受け始める時期であり、感覚器の発生・維持の過程にストレスに関連した仕組みがそなわっていることが明らかとなった。

## おわりに

HSF欠損マウスの解析から、HSFが外的ストレスに応答するだけでなく、生理的ストレスに対しても熱ショック蛋白質以外の遺伝子発現制御を行うことで恒常性を維持していることが明らかになってきた。一方、私たちは、HSF1を高発現するトランスジェニックマウスは蛋白質変性による病態を改善し、寿命を延長できることを示している<sup>21)</sup>。今後、熱ショック応答を制御することで、蛋白質の変性に起因する難病の治療に貢献したいと考えている。

## 謝 辞

中村賞受賞研究に当たり、終始適切な御助言を頂いた山口大学医学部応用医工学系生化学第二講座の中井彰教授と多数の共同研究者の方々に感謝しま

す。また中村賞という名誉ある賞を頂き、本誌掲載の機会を与えて下さった山口大学医学会の皆様にお礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) Wu C. Heat shock transcription factors : structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995 ; **11** : 441-469.
- 2) Nakai A, Morimoto RI. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Mol Cell Biol* 1993 ; **13** : 1983-1997.
- 3) Nakai A, Tanabe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI, Nagata K. HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 1997 ; **17** : 469-481.
- 4) Shinka T, Sato Y, Chen G, Naroda T, Kinoshita K, Unemi Y, Tsuji K, Toida K, Iwamoto T, Nakahori Y. Molecular characterization of heat shock-like factor encoded on the human Y chromosome, and implications for male infertility. *Biol Reprod* 2004 ; **71** : 297-306.
- 5) Kroeger PE, Morimoto RI. Selection of new HSF1 and HSF2 DNA-binding sites reveals differences in trimer cooperativity. *Mol Cell Biol* 1994 ; **14** : 7592-7603.
- 6) Trinklein ND, Murray JI, Hartman Sj, Botestein D, Myers RM. The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol Cell Biol* 2004 ; **15** : 1254-1261.
- 7) Jedlicka P, Mortin MA, Wu C. Multiple functions of drosophila heat shock transcription factor in vivo. *EMBO J* 1997 ; **16** : 2452-2462.
- 8) Inouye S, Katsuki K, Izu H, Fujimoto M, Sugahara K, Yamada S, Shinkai Y, Oka Y, Katoh Y, Nakai A. Activation of heat shock gene is not necessary for protection by heat shock transcription factor 1 against cell death due to a signal exposure to high temperatures. *Mol Cell Biol* 2003 ; **23** : 5882-5892.
- 9) McMillan Dr, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin IJ. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem* 1998 ; **273** : 7523-7528.
- 10) Zhang Y, Huang L, Zhang J, Moskophidis D, Mivechi NF. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J Cell Biochem* 2002 ; **86** : 376-393.
- 11) Inouye S, Izu H, Takaki E, Suzuki H, Shirai M, Yokota Y, Ichikawa H, Fujimoto M, Nakai A. Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1. *J Biol Chem* 2004 ; **279** : 38701-38709.
- 12) Yoshima T, Yura T, Yanagi H. Function of the C-terminal transactivation domain of human heat shock factor 2 is modulated by the adjacent negative regulatory segment. *Nucleic Acids Res* 1998 ; **26** : 2580-2585.
- 13) Kallio M, Chang Y, Manuel M, Alastalo TP, Rallu M, Gitton Y, Pirkkala L, Loones MT, Paslaru L, Larney S, Hiard S, Morange M, Sistonen L, Mezger V. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J* 2002 ; **21** : 2591-2601.
- 14) McMillan DR, Christianas E, Forster M, Xiao X, Connell P, Plumier JC, Zuo X, Richardoson J, Morgan S, Benjamin IJ. Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice. *Mol Cell Biol* 2002 ; **22** : 8005-8014.
- 15) Wang G, Ying Z, Jin X, Tu N, Zhang Y, Philips M, Moskophidis D, Mivechi NF. Essential requirement for both hsf1 and hsf2

- transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility. *Genesis* 2004 ; **38** : 66-80.
- 16) Tanabe M, Sasai N, Nagata K, Liu XD, Liu PC, Thiele DJ, Nakai A. The mammalian HSF4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing. *J Biol Chem* 1999 ; **24** : 27845-27856.
  - 17) Bu L, Jin Y, Shi Y, Chu R, Ban A, Eiberg H, Andres L, Jiang H, Zheng G, Qian M, Cui B, Xia Y, Liu J, Hu L, Zhao G, Hayden MR, Kong X. Mutant DNA-binding domain of HSF4 is associated with autosomal dominant lamellar and mutant cataract. *Nat Genet* 2002 ; **31** : 276-278.
  - 18) Smaoui N, Beltaief O, BenHamed S, M'Rad R, Maazoul F, Ouertani A, Chaabouni H, Hejtmancik JF. A homozygous splice mutation in the HSF4 gene is associated with an autosomal recessive congenital cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 ; **45** : 2716-2721.
  - 19) Fujimoto M, Izu H, Seki K, Fukuda K, Nishida T, Yamada S, Kato K, Yonemura S, Inouye S, Nakai A. HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during lens development. *EMBO J* 2004 ; **27** : 4297-4306.
  - 20) Min JN, Zhang Y, Moskophidis D, Mivechi NF. Unique contribution of heat shock transcription factor 4 in ocular lens development and fiber cell differentiation. *Genesis* 2004 ; **40** : 205-217.
  - 21) Fujimoto M, Takaki E, Hayashi T, Kitaura Y, Tanaka Y, Inouye S, Nakai A. Active HSF1 significantly suppresses polyglutamine aggregate formation in cellular and mouse models. *J Biol Chem* 2005 ; **280** : 34908-34916.

# Functional Analysis of Heat Shock Transcription Factors by Generating Knockout Mice

Mitsuaki FUJIMOTO

*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 transcription factor (HSF) family consists of three members in mammal and regulates expression of heat shock genes via heat shock element. HSF1 and HSF2 are involved in developmental processes such as oogenesis and spermatogenesis, but it is unclear how they regulate these processes. HSF4 is highly expressed in the brain and lung, but its roles are unclear yet. Recently, HSF4 was found to be associated with autosomal dominant and autosomal recessive congenital cataract. We found that HSF4-null mice causes cataract with abnormal lens fiber cells containing inclusion-like structure, and increased proliferation and premature differentiation of lens epithelial cells. HSF4 regulates expression of *γ-crystallin* and FGF genes directly. Thus, HSFs play roles not only in the induction of heat shock gene expression, but also in developmental processes.