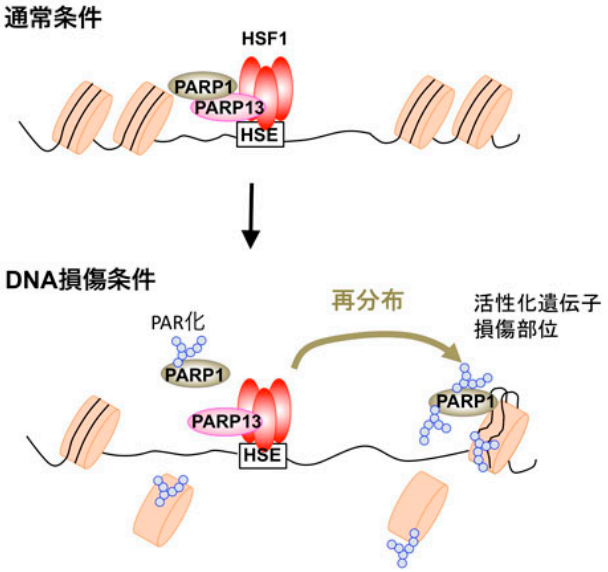
54　HSF1によるDNAの恒常性維持機構の解明	中井　彰

【目的】細胞はタンパク質や核酸などの細胞構成成分の恒常性を維持することによりその健常状態を保つ。様々な環境および代謝変化によるその破綻に対処するために、細胞は巧妙な仕組みを進化させてきた。その一つである DNA 損傷応答は、様々なシグナルタンパク質の働きにより、最終的には DNA 傷害を修復し、DNA 複製を促進する適応機構である。その中でも、ポリ ADP リボシル化酵素 1（PARP1）は、DNA 傷害部位へ最初に集積して DNA 修復を促進し、さらに活性化された遺伝子座にも局在して転写を促進することが知られている。しかし、DNA 損傷時に PARP1 が DNA へ再分布する機構については不明であった。

【方法】我々は、HSF1 と複合体を形成する PARP 群を GST プルダウン法や共免疫沈降法などを用いて検索した。さらに、その複合体の存在下および非存在条件下での DNA 修復を相同組換えレポーターなどを用いて調べた。また、DNA 損傷誘導性遺伝子発現は DNA マイクロアレイ法や RT-qPCR 法などで調べた。その際の HSF1 や PARP 群のゲノム上での局在は、ChIP 法および ChIP-seq 法などで明らかにした。

【結果】我々は、タンパク質恒常性調節の鍵因子である熱ショック転写因子 HSF1 が、PARP13 を介してあらかじめ PARP1 をゲノムに留めておくことを見出した。DNA 損傷ストレスにより、活性化されて自己 PAR 化された PARP1 は HSF1-PARP13 から解離し、DNA 損傷部位および DNA 損傷誘導性遺伝子座へ再分布した。HSF1-PARP13-PARP1 複合体形成を阻害すると、DNA 損傷時の PARP1 の再分布は抑制された。同時に、遺伝子発現誘導と DNA 修復は低下した。さらに、この三者複合体形成と PARP1 の再分布は、DNA 損傷から細胞を保護するだけでなく、PARP 阻害剤感受性の BRCA1 欠損乳がん細胞の増殖と腫瘍形成を促進した。以上の結果は、HSF1 がゲノム恒常性の調節因子であることを示し、この役割が特定の乳腺腫瘍形成に寄与することを明らかにした。

DNA 損傷ストレスによる HSF1 を介する PARP1 再分布のモデル



54. HSF1 による DNA の恒常性維持機構の解明

中井　彰

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，DNA 修復，ポリ ADP リボースポリメラーゼ，乳がん

緒　言

細胞の恒常性とはタンパク質や核酸などの細胞構成成分のバランスを維持することであり、それにより細胞は健常状態に保たれている。様々な環境および代謝変化によるそれらのバランスの偏りに対処するために、細胞は巧妙な仕組みを進化させてきた。その一つである DNA 損傷応答は、様々なシグナルタンパク質の働きにより、最終的には DNA 傷害を修復し、DNA 複製を促進する適応機構である。

DNA 損傷応答シグナルタンパク質は DNA 修復、クロマチン再構成、転写などの多様な過程に大きな影響を与える。DNA 修復の過程では、多くのシグナルタンパク質と修復タンパク質が協調して次々に損傷部位へ集積する。その中でも、ポリ ADP リボシル化酵素 1（PARP1）は、DNA 傷害部位へ最初に集積するタンパク質の一つで、単鎖 DNA 上の傷害の修復だけでなく DNA 二本鎖切断の相同組換え修復（HR 修復）や非相同末端結合（NHEJ）にも関与している［1］。PARP1 は DNA 修復因子、クロマチン再構成複合体、ヒストン修飾因子などの DNA 損傷部位への集積を促進し、その欠損は HR 修復や NHEJ による修復効率を低下させる。一方、PARP1 が DNA 損傷による遺伝子発現誘導に関与するかどうかは知られていないが、それが熱ストレスやホルモン刺激による遺伝子発現誘導を促進することが報告されている［2］。重要なことは、これら PARP1 のクロマチンと関連する機能は、PARP1 の DNA 損傷部位と誘導遺伝子座への再分布を伴う。しかしながら DNA 損傷による PARP1 の再分布の機構は十分には明らかにされていない。

細胞はまた、タンパク質の変性に対処するためのタンパク質毒性ストレス応答機構を備えている。その中でも生物に普遍的に保存された仕組みが熱ショック応答（HSR、heat shock response）であり、シャペロンとして働く熱ショックタンパク質（HSP）の誘導を特徴とする。HSR は進化上古い転写因子である熱ショック転写因子（HSF）によって制御される［3］。哺乳動物細胞では、HSF ファミリーの中で HSF1 が HSR の主要な調節因子である。通常、HSF1 は活性のない単量体として存在し、熱ストレスにより DNA 結合能と転写活性化能のある活性型の三量体へと転換して HSP を誘導する。しかし、非ストレス条件下であっても HSF1 は発生や老化の過程で重要な役割を担っており、その機能は老化と関連する神経変性疾患の進行を抑制する［4］。一方で、HSF1 はがん細胞で活性化され、少なくとも細胞毒性のある凝集体とアミロイドの形成を抑制することでがんの進展を促進する［5］。実際に、通常状態でわずかに存在する三量体の HSF1 は、ヒストンシャペロンを含む複合体を形成してクロマチンへ安定に結合する［6］。最近の全ゲノム解析からも、HSF1 が数百にも及ぶ領域へ構成的に結合していることが分ってきた。

我々は、これまでにヒト HSF1 と相互作用するタンパク質を網羅的に同定して解析し、HSF1 転写複合体形成の調節が糖・脂質代謝やエネルギー代謝と関連していることを明らかにしてきた［7，8］。最近、HSF1 と酵素活性のない PARP13 の相互作用を糸口として、HSF1 が足場タンパク質 PARP13 を介して PARP1 と複合体を形成することを見いだした。本研究により、この HSF1-PARP13-PARP1 複合体が、DNA 損傷誘導性の遺伝子発現と DNA 修復に重要な役割を担うことを見出した。さらに、この複合体は、BRCA1 欠損乳がん細胞の増殖と腫瘍形成を促進することを明らかにした［9］。

方法および結果

1. HSF1-PARP13-PARP1 複合体と DNA 損傷ストレスによる解離

大腸菌で合成した精製タンパク質の解析から、HSF1-PARP13 および PARP13-PARP1 の相互作用はそれぞれ直接的であった。さらに、PARP13 をノックダウンしたヒト HeLa 細胞では HSF1-PARP13-PARP1 複合体は形成されないことから、HSF1 と PARP1 の結合は足場タンパク質 PARP13 を介することが分った。また、DNA 損傷により PARP1 が自己ポリ ADP リボシル(PAR 化されて HSF1-PARP13 から解離することも明らかとなった。一方、HSF1 と PARP1 を高発現する HeLa 細胞を用いて PARP1 の ChIP-seq 解析を行い、全ゲノムで 744 の PARP1 ピークを同定した。このピーク数は、PARP13 ノックダウンにより著減した。さらに、*BCL11A* 遺伝子座の PARP1 ピークについて解析したところ、この PARP1 ピークが HSF1 および PARP13 に依存し、ドキソルビシン（DOX）、電離放射線（IR）、あるいは紫外線（UV）の処理で消失することも分った。これらの結果は、HSF1-PARP13-PARP1 複合体はゲノム全体に存在し、DNA 損傷ストレスにより自己 PAR 化した PARP1 が解離することが示唆された［9］。

2. HSF1-PARP13-PARP1 複合体による DNA 損傷時の遺伝子発現誘導

HeLa 細胞の内在性 HSF1 を PARP13 と結合できない HSF1 相互作用変異体（HSF1-T20A）へ置換し、マイクロアレイ解析により非ストレス条件下で発現変化の見られる遺伝子群を同定した。その結果、HSF1-PARP13-PARP1 複合体が多くの DNA 損傷誘導遺伝子の発現に関与することが示された。それらの遺伝子群の中で、*GADD34* 遺伝子の発現を詳細に解析したところ、HSF1 欠損または HSF1 相互作用変異体への置換は *GADD34* の構成的発現を数倍にまで上昇させるが、DOX 処理による発現誘導は減弱した。つまり、HSF1-PARP13-PARP1 複合体は DNA 損傷時の遺伝子発現誘導を促進していた。その分子機構を明らかにするために、*GADD34* 遺伝子プロモーターを ChIP アッセイ法で調べた。HSF1-PARP13-PARP1 複合体はこのプロモーター上にあらかじめ存在していた。DNA 損傷時には、活性化した PARP1 が遺伝子領域へ再分布し、クロマチンの PARP 化によってその構造を弛緩させていた。HSF1 を欠損させるか HSF1 相互作用変異体へ置換することで、PARP1 の再分布は全く認められなくなった。以上の結果は、HSF1-PARP13-PARP1 複合体が通常は *GADD34* の発現を抑制しており、PARP1 は DNA 損傷ストレスによる再分布とクロマチンの PAR 化を介して転写誘導を促進することを示す。

3. HSF1-PARP13-PARP1 複合体は DNA 修復を促進する

DOX 処理によって DNA が損傷されると、PARP1 をはじめ、リン酸化 H2AX、RAD51、53BP などの修復因子群が DNA 損傷部位へ集まり、HR 修復や NHEJ を介して損傷が修復される。HSF1 を欠損する、あるいは HSF1 相互作用変異体へ置換することで修復因子群の集積が減少することが明らかとなった。コメット法による解析から、同時に DNA 損傷が増強することも分った。さらに、制限酵素 I-SceI で切断後に HR 修復により GFP が発現する HR 修復カセットを導入した HeLa 細胞を用いることで、HSF1 相互作用変異体への置換によって PARP1 の集積が減少し、HR 修復効率も低下することも明らかとなった（図 1）。NHEJ カセットを導入した HeLa 細胞においても同様に、HSF1 相互作用変異体への置換によって PARP1 の集積の減少と NHEJ 修復効率の低下を確認した。これらの結果は、DNA 損傷ストレス条件下では、HSF1-PARP13-PARP1 から再分布した活性化 PARP1 が DNA 損傷部位へ集積し、それに続いて修復因子群が引き寄せられて HR 修復や NHEJ による修復が促進されることを示す。

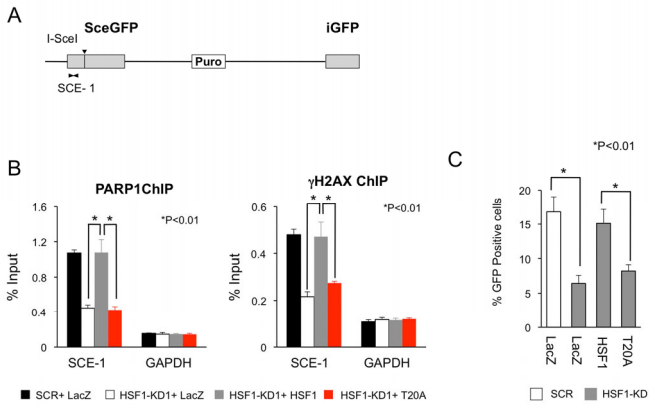


図 1. HSF1-PARP13-PARP1 複合体が DNA 損傷部位への PARP1 の集積を促進する

A : HeLa 細胞のゲノムに組み込まれた相同組換え修復をモニターするレポーター遺伝子。I-SceI 制限酵素部位と不完全な 2 つの GFP 遺伝子を持つ。B : I-Sce1 で切断した後に、SCE-1 部位への PARP1 の集積を ChIP アッセイ法で調べた。C : 細胞修復効率を完全な GFP を発現する細胞%で示す。アスタリスクは*P < 0.01（Student t-test）を示す。

4. HSF1-PARP13-PARP1 複合体は *BRCA1* 変異乳がん細胞の腫瘍形成を促進する

内在性 HSF1 を HSF1 相互作用変異体へ置換した HeLa 細胞を DOX 処理した後、細胞生存をコロニーアッセイ法で調べたところ、予想どおりに変異体へ置換した細胞の生存率は低下した。興味深いことに、BRCA1 欠損乳がん細胞の増殖には PARP1 を介する DNA 修復機構が必要であることが知られている。そこで、*BRCA1* 遺伝子に点変異を持つヒト乳がん細胞の増殖を調べたところ、HSF1 相互作用変異体へ置換することで細胞増殖がある程度抑制された。そこで、*BRCA1* 遺伝子を完全に欠失するマウス乳がん細胞について解析したところ、HSF1 相互作用変異体へ置換することで、非ストレス条件下で DNA 損傷が増加し、細胞の増殖が低下した。マウスへの同種移植実験を行ったところ、HSF1 相互作用変異体を発現する BRCA1 欠失マウス乳がん細胞の腫瘍形成は抑制された。つまり、HSF1-PARP13-PARP1 複合体は、BRCA1 欠失マウス乳がん細胞の DNA 修復を促進することでその腫瘍形成を助けることが明らかとなった。

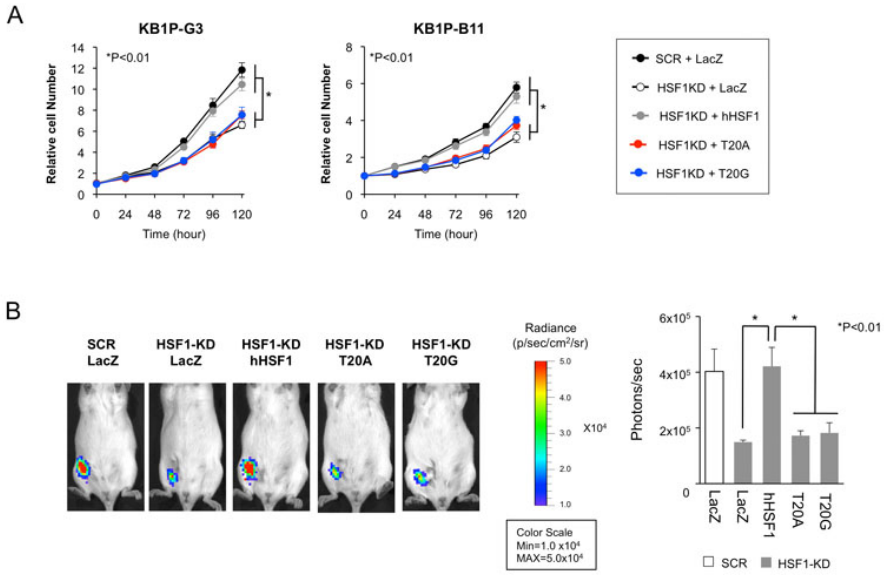


図 2. BRCA1 を欠損するマウス乳がん細胞の増殖と腫瘍形成

A : BRCA1 欠損マウス乳がん細胞 KB1P-G3 と KB1P-B11 の増殖。HSF1 は野生型 HSF1（グレイ）あるいは相互作用しない変異型 HSF1（赤と青）へ置換した。B : KB1P-G3 を FBV/N マウスへ同種移植し、4 週間後に腫瘍サイズを生体イメージング法によって定量した。アスタリスクは*P < 0.01（Student t-test）を示す。

考　察

細胞内のミスフォールディングタンパク質に対処できる容量（プロテオスタシス容量）は老化とともに低下する。HSF1 は HSR を介するプロテオスタシス容量の主要な調節因子であり、タンパク質のミスフォールディングを抑制することで老化や老化と関連する神経変性疾患の進行を抑制している［10］。本研究によりはじめて、この太古から存在する HSF1 がタンパク質恒常性だけでなくゲノム安定性の重要な調節因子であることを示した。そして、その分子機構は予想外のものであった。PARP1 は DNA 修復、クロマチン構造、転写などの調節因子で、その際に PARP1 がゲノム上に再分布することが知られている。本研究により、あらかじめ HSF1-PARP13-PARP1 複合体がゲノム上に結合していることが必要で、DNA 損傷により自己 PAR 化された PARP1 が HSF1-PARP13 から解離して DNA 損傷部位および誘導遺伝子座へ再分布することが明らかとなった（図 3）。これらの知見は、タンパク質と DNA の修復機構が密接に関連していることを示す。

がん細胞は HSF1 活性が増強しており、その増殖は HSF1 依存的である。がん細胞内はタンパク質が変性して凝集体やアミロイド線維を形成しやすい環境にあるが、HSF1 がシャペロンの発現を介してそれらの細胞毒性のある異常構造の形成を抑制していることが知られている［5］。一方、*BRCA1* 変異をもつ乳がん細胞の増殖は PARP1 を介する DNA 修復に依存することが知られている。実際に、このがん細胞の増殖は PARP1 阻害剤への感受性が高く、PARP1 阻害剤は乳がん治療薬としての臨床研究が進められている。本研究から、HSF1 は PARP1 を介する DNA 修復機構を促進し、*BRCA1* 変異をもつ乳がん細胞の増殖に重要な役割を担うことを示した。今後、HSF1-PARP13-PARP1 複合体の HSR や神経変性疾患における役割の解明も期待される。

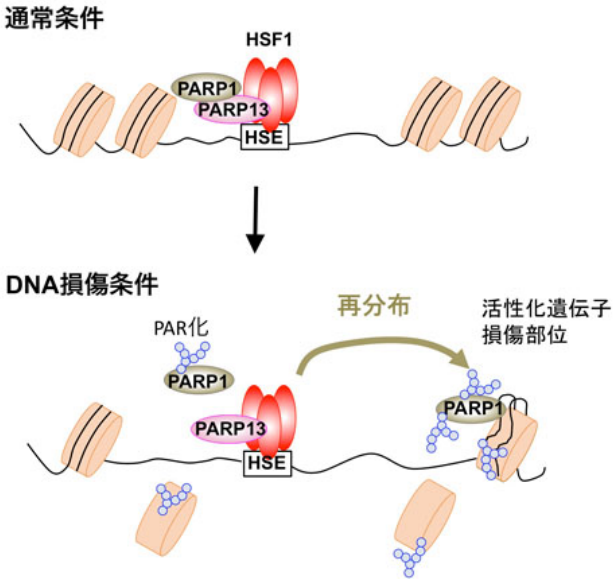


図 3.　DNA 損傷ストレスによる HSF1 を介する PARP1 再分布のモデル

あらかじめ HSF1-PARP13-PARP1 複合体がゲノムに結合している。DNA 損傷ストレスによって PARP1 が活性化され、自己 PAR 化された PARP1 は DNA 損傷部位に集積して DNA 修復を促進する。また、DNA 損傷誘導遺伝子へ再分布してクロマチンを PAR 化することで転写を促進する。

文 献

1) Gupte R, Liu Z, Kraus WL. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. Genes Dev. 2017 Jan 15;31(2):101-126. PMID: 28202539 DOI: 10.1101/gad.291518.116.

2) Petesch SJ, Lis JT. Activator-induced spread of poly(ADP-ribose) polymerase promotes nucleosome loss at Hsp70. Mol Cell. 2012 Jan 13;45(1):64-74. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22178397 DOI: 10.1016/j.molcel.2011.11.015.

3) Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018 Jan;19(1):4-19. Epub 2017 Aug 30. PMID: 28852220 DOI: 10.1038/nrm.2017.73.

4) Nakai A. (ed) Heat Shock Factor (Springer Japan, 2016).

5) Tang Z, Dai S, He Y, Doty RA, Shultz LD, Sampson SB, Dai C. MEK guards proteome stability and inhibits tumor-suppressive amyloidogenesis via HSF1. Cell. 2015 Feb 12;160(4):729-44.PMID: 25679764 DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.028.

6) Fujimoto M, Takaki E, Takii R, Tan K, Prakasam R, Hayashida N, Iemura 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.molcel.2012.07.026.

7) Takii R, Fujimoto M, Tan K, Takaki E, Hayashida N, Nakato R, Shirahige K, Nakai A. ATF1 modulates the heat shock response by regulating the stress-inducible heat shock factor 1 transcription complex. Mol Cell Biol. 2015 Jan;35(1):11-25. Epub 2014 Oct 13. PMID: 25312646 DOI: 10.1128/MCB.00754-14.

8) Tan K, Fujimoto M, Takii R, Takaki E, Hayashida N, Nakai A. Mitochondrial SSBP1 protects cells from proteotoxic stresses by potentiating stress-induced HSF1 transcriptional activity. Nat Commun. 2015 Mar 12;6:6580. PMID: 25762445 DOI: 10.1038/ncomms7580.

9) 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/s41467-017-01807-7.

10) 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.