

「生体防御のメカニズム」
平成7年度採択研究代表者

永田 和宏

(京都大学再生医科学研究所 教授)

「普遍的な生体防御機構としてのストレス応答」

1. 研究実施の概要

ストレス応答による生体防御機構を解明するため、ふたつの大きな柱を立てている。第一は、転写制御因子によるストレス応答機構の解明であり、第二の柱は、ストレス蛋白質による生体防御の機構の解明である。第一の柱は、主として京大グループによってHSFファミリーの機能を中心に研究がなされ、奈良先端大グループも小胞体ストレスのシグナル機構に関する研究を進めている。第二の柱は、京大グループがHSP47を中心に、東京都臨床研グループがHSP90を中心に、奈良先端大グループがBiPおよびHSP70を中心に酵母で研究を行なっている。

2. 研究実施内容

Aグループ

1 - 1) HSFの作用機構に関する研究

ヒトHSF4の遺伝子解析を行ない、HSF4には種々の選択的スプライスフォームが存在すること、またマウスにもHSF4ホモログが存在することを明らかにした。マウスには主として2つのフォーム(a, b)が存在し、HSF4aは転写に阻害的に働き、逆にHSF4bは転写を促進する働きを持つことを明らかにした。またこれらの転写因子が、主として脳と肺に蛋白質として検出され、組織特異性を持つことも明らかになった。さらに、ニワトリにおいては、従来もっともよく研究が進んできたHSF1に比べて、HSF3の方が主たるストレス転写因子であることが明らかになり、どの転写因子が重要であるかについて、種特異性があることが明らかになった。

1 - 2) HSP47のノックアウトマウスの解析

昨年度より引き続きHSP47ノックアウトマウスの解析を続けている。ノックアウトマウスにおいては、I型、IV型コラーゲンのプロセシングに異常が起き、コラーゲン繊維や基底膜が形成されないことを明らかにした。さらに、このようなコラーゲン組織の異常を反映して、血管の破裂、アポトーシス、神経管への神経上皮細胞の流出など、さまざまな異常が組織レベルで認められた。一方、HSP47の機能をより詳細に調べるため、HSP47ノックアウトマウスの胎児

より、細胞株を樹立した。*hsp47+/+*、*hsp47+/-* 細胞より分泌されるコラーゲンは、正しい3本鎖構造を取っており、プロテアーゼ処理に対して耐性であったが、*hsp47-/-* 細胞より分泌されたコラーゲンは、プロテアーゼによって分解されてしまった。これは、HSP47がない細胞では、コラーゲンが正しい構造をとれないことを示唆しており、HSP47がコラーゲン特異的分子シャペロンであるということの大きな証拠となった。

1 - 3) HSP47の基質認識機構の解析

酵母two hybrid system に、ランダムペプチドライブラリーを用いて、HSP47によって認識されるコンセンサス配列の決定を試みた。その結果、HSP47はGly-X-Yのうち、Xの位置には常にプロリンを要求すること、Yの位置にはプロリン以外のアミノ酸が来ても認識されることがわかった。しかし、Y位のアミノ酸には特徴的な傾向があり、プロリン、アルギニンが特によく好まれること、逆にアスパラギン酸、フェニルアラニンなど数種のアミノ酸はほとんど認識されないことなどがわかった。これは、コラーゲンの3本鎖を安定させるアミノ酸に相当し、この実験以外の種々のデータをも総合すると、HSP47はコラーゲンの3本鎖を特によく認識することが明らかになった。

1 - 4) 小胞体における新たな分子シャペロンの探索

小胞体に存在するマンノシダーゼ様の蛋白質 (AMLG) に関して、研究を継続した。AMLGは、小胞体ストレスによって誘導されるマンノシダーゼ様蛋白質として特異的なものであるが、本年になってAMLGが小胞体における分解経路に深く関わる分子である可能性が出てきた。小胞体における蛋白分解は、いったん細胞質へ逆輸送された後にプロテアソーム系によって分解されるが、小胞体において、マンノースが8個ついたフォームを特異的に認識する分子の存在が想定され、世界中でその分子の同定が競われてきた。我々の偶然発見したAMLGが、その分子である可能性が出てきたのである。AMLGを細胞に発現させると、小胞体経由の分解 (ERAD) が促進される。本当にAMLGがERADに直接関与するマンノース8レクチンであればきわめて注目に値する発見になるわけで、目下、その詳細について検討を続けている。

1 - 5) HSP47結合蛋白質の検索

HSP47に結合する蛋白質を酵母two hybrid法によって検索する過程で、3つの新たな遺伝子を発見した。第1のユビキチン様ドメインをもった蛋白質はユービン (Ubin) と名付けたが、小胞体への移行シグナルに結合性を持つことがわかり、小胞体への分泌・膜蛋白質の輸送になんらかの関連があるのではないかと考え仕事を進めている。

第2の蛋白質はコラーゲン様ドメインをもつものであり、そのうち精巢特異

的な発現を示す蛋白質 (t s) について、精巢のうち、どの種類の細胞が発現しているのか、3本鎖を形成するのか、分泌される蛋白質であるのか、また細胞外マトリックスに蓄積するのかなどについて研究を継続している。

B グループ

2 - 1) 変性蛋白質の再生と分解を振り分ける機構

これまでに、変性したルシフェラーゼ(L)はまずHSP90に結合し、プロテアソーム活性化因子PA28に受け渡され、次いでHSP70とHSP40の作用を受けて再生することを明らかにした。本年は、Lを結合したPA28が20Sプロテアソームに結合することを見いだした。この結果は、変性したLが分解を受ける経路にもPA28によって運ばれる可能性を示唆する。PA28の代わりにHSP104を加えても、効率よくLが再生するのが認められた。この結果は、酵母ではHSP104がPA28の代わりにしている可能性を示唆する。

2 - 2) HSP90の基質蛋白質としてのカルシニューリン

酵母においてHSP90の発現量が多すぎても少なすぎても、カルシニューリン (C N) の作用が抑制され、高塩濃度ストレスに弱くなることを明らかにしてきた。本年は、実際に細胞よりC Nを免疫沈殿し、その活性を測定した。その結果、HSP90と複合体をつくっているC Nは活性が著しく低いことが明らかとなった。両者の複合体は、Ca²⁺ - カルモデュリンによって解離し、C Nの活性が発現する。このイン・ビトロの結果は細胞レベルでみた、C N依存性遺伝子発現で推定したC N活性の結果とよく一致する。

2 - 3) HSP90に結合しやすいペプチドの選別

HSP90に結合しやすいペプチドとしてニューロペプチドNPYを同定した。NPYは溶液中で4量体として存在し、HSP90の電荷をもつアミノ酸に富むドメインに結合することを明らかにした。また、レティキュロサイトライセート中でmRNAより合成したNPYは、HSP90と実際に複合体を形成していることを示した。

C グループ

3 - 1) 小胞体 - 核間の情報伝達系の解明

細胞が小胞体ストレスにさらされ小胞体内に変性した蛋白質が蓄積すると、BiPをはじめとする小胞体シャペロンが転写レベルで誘導されることが知られている。このことから小胞体と核の間には情報交換が行われており、この反応経路をUPR (Unfolded Protein Response) 経路と呼んでいる。動物でのUPRを解析するために、この反応に重要な役割をになっているヒトIRE1の機能解析を行った。ヒトIRE1には酵母と異なり少なくとも2種類の遺伝子 (と) があることがわかったので、ヒトhIRE1 及びhIRE1 の野生型、変異型 (dominant

negative) をそれぞれ誘導的に発現する安定なHeLa細胞を取得し、誘導後における小胞体ストレス応答について解析した。それぞれの細胞をTet off の培地に変えると、転写レベル、蛋白レベルでの誘導が認められ、誘導されたhIRE1蛋白質は主に小胞体・核膜に局在した。hIRE1 の発現は、BiPの転写レベルでの誘導を起こしUPRに関わっていることを支持したが、hIRE1 の発現はBiPの誘導は起こさず、細胞のアポトシスを引き起こすことが明らかとなった。このことは と はホモログであるにも関わらず、異なる機能をになっていることを示唆している。

3 - 2) 小胞体シャペロンによる変性蛋白質の品質管理機構の解明

小胞体内腔でIre1pが変性蛋白質をどのように感知するのかについて、Ire1pの内腔領域とBiPとの結合・解離がそのシグナルのオン・オフに関与しているという仮説のもとに、現在酵母の系を用いて解析を進めており、その仮説が正しいことが明らかになった。さらに小胞体内で正しい高次構造をとった蛋白質は小胞の出芽によりゴルジ体へと輸送される。この小胞形成に關与するSec24pとそのホモログSfb2pに關し解析を進め、Sfb2pはSec24pの多くの機能を相補できるが、いくつかの輸送蛋白質の小胞内への濃縮機能が欠損していることがわかった。現在このサブレッサーを拾うことによりさらに解析を進めている。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Reactive oxygen species play an important role in the activation of haet shock factor 1 in ischemia-reperfused heart.

J. NISHIZAWA, A. NAKAI, K. MATSUDA, T. BAN & K. NAGATA

Circulation. 99(7):934-941 (1999)

Human genome has a functional hsp47 gene (CBP2) and pseudogene (pshsp47).

N. NAGAI, T. YORIHUZI, N. HOSOKAWA & K.NAGATA

Gene. 227(2):241-248 (1999)

The mammalian HSF4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing.

M. TANABE, N. SASAI, K. NAGATA, X-D. LIU, P. C. C. LIU, D. J. THIELE & A. NAKAI.

J. Biol. Chem. 274(39):27845-27856 (1999)

Substrate recognition of collagen-specific molecular chaperone HSP47:Structural requirements and binding regulation.

T. KOIDE, S. ASADA & K. NAGATA

J. Biol. Chem. 274(49):34523-34526 (1999)

Separate cis-acting DNA elements control cell type- and tissue-specific expression of

collagen-binding molecular chaperone HSP47.

H. HIRATA, I. YAMAMURA, K. YASUDA, A. KOBAYASHI, H. TADA, M. SUZUKI, K. HIRAYOSHI, N. HOSOKAWA & K. NAGATA

J. Biol. Chem. 274(50):35703-35710 (1999)

Effect of HSP47 on prolyl 4-hydroxylation of collagen model peptides.

S. ASADA, T. KOIDE, H. YASUI & K. NAGATA

Cell Struct. Funct. 24(4):187-196 (1999)

HSF3 is a major heat shock responsive factor during chicken embryonic development.

Y. KAWAZOE, M. TANABE, N. SASAI, K. NAGATA & A. NAKAI

Eur. J. Biochem. 265(2):688-697 (1999)

Enhancement of secretion of human procollagen I in mouse HSP47-expressing insect cells.

M. TOMITA, K. YOSHIZATO, K. NAGATA & T. KITAJIMA

J. Biochem. 126(6):1118-1126 (1999)

Procollagen binding to both prolyl 4-hydroxylase/protein disulfide isomerase and HSP47 within the endoplasmic reticulum in the absence of ascorbate.

N. HOSOKAWA & K. NAGATA

FEBS. Letters. 466(1):19-25 (2000)

Interaction of Collagen-specific Molecular Chaperone HSP47 with Collagen-model Peptides

T. KOIDE, S. ASADA & K. NAGATA

Peptide Science 1999 (Ed. N. Fujii) The Japanese Peptide Society, pp. 17-20 (2000)

Regulation of heat shock transcription factors by hypoxia or ischemia/reperfusion in the heart and brain.

J. NISHIZAWA & K. NAGATA

Handbook of Experimental Pharmacology "Stress Proteins" Volume 136 (Ed. Latchman, D.S.) Springer-Verlag 1999., pp. 201-224.

Maruya, M., Sameshima, M., Nemoto, T. and Yahara, I. (1999). Monomer arrangement in HSP90 dimer as determined by decoration with N- and C terminal region specific antibodies. J. Mol. Biol. 285: 903-906.

Yahara, I. (1999). The role of HSP90 in evolution. Genes to Cells, 4:375-379.

Schnaider, T., Oikarienen, J., Ishiwatari-Hayasaka, H., Yahara, I. and Csermely, P. (1999). Interaction of Hsp90 with histone and related peptides. Life Sci., 65: 2417-2426.

Minami, Y., Kawasaki, H., Minami, M., Tanahashi, N., Tanaka, K. and Yahara, I. (2000). The protease activator PA28 is required for proper Hsp90 dependent protein

folding in vitro in association with Hsc70 and Hsp40. *J. Biol. Chem.*, 275: 9055-9061.

Miyata, Y. and Yahara, I. (2000). p53-independent association between SV40 large T antigen and the major cytosolic heat shock protein, HSP90. *Oncogene*, 19: 1477-1484.

Shimada, A., Kato, S., Enjo, K., Osada, M., Ikawa, S., Kohno, K., Obinata, M., Kanamaru, R., and Ishioka, C. The transcriptional activities of p53 and its homologue-51: similarities and differences. *Cancer Res.* 12, 2781-2786 (1999)

Kimata, Y., Lim, C. R., Kiriyama, T., Nara, A., and Kohno, K. Mutation of the yeast e-COP gene ANU2 causes abnormal nuclear morphology and defects in intracellular vesicular transport. *Cell Struc. Funct.* 24, 197-208 (1999)

Kohno, K., Tsuru, A., and Kimata, Y. Green fluorescent proteins as a new tool for study of cellular function: a thermostable green fluorescent protein variant. *Cytometry Res.* 9, 21-26 (1999) (Japanese)

Kimata, Y., Higashio, H., and Kohno, K. Impaired proteasome function rescues thermosensitivity of yeast cells lacking the coatomer subunit e-COP. *J. Biol. Chem.* 275, 10655-10660 (2000)