

## 熱ショック応答における転写開始前複合体形成の調節機構

瀧井 良祐, 中井 彰

### 1. はじめに

細胞は急激な環境変化や刺激に対処して恒常性を維持するために、遺伝子の発現誘導を介する多様な適応機構を備えている。これらの細胞応答の主要なものの一つが遺伝子の転写誘導である。このような誘導性遺伝子発現の特徴は、一群の遺伝子群が刺激に対して急速にかつ特異的に転写誘導され、刺激がなくなると速やかに元の状態に戻ることである<sup>1)</sup>。一般に、タンパク質をコードする遺伝子の転写過程はRNAポリメラーゼII (Pol II) の転写開始点へのリクルート、転写開始 (initiation)、Pol IIのプロモーター近位部位での停止 (pausing)、転写伸長 (elongation) からなる。誘導性遺伝子発現の機構において、その中のPol IIリクルートと転写伸長の二つが重要な調節過程と考えられている。後者の過程については、Pol II停止の解除と伸長反応を促進する精巧な分子機構が明らかとなっている<sup>2)</sup>。一方、前者の過程では転写因子が特異的DNA配列へ結合し、それがクロマチン再構成複合体やヒストン修飾酵素などの転写コアクチベーターをリクルートして、その結果として基本転写因子 (general transcription factor: GTF) 群とPol IIからなる転写開始前複合体 (pre-initiation complex: PIC) の形成が促進される (図1A)。PIC形成はまず、TATAボックス結合因子のTBPが遺伝子プロモーターを認識することで始まる。そこへTFIIBが集積し、それがPol IIと直接相互作用することでPICが形成される<sup>3)</sup>。PIC形成を促進するコアクチベーターの中でも、特にメディエーター複合体の構成因子群は、Pol II, TFIIB, TFIIDに直接結合することでPICを安定化することも知られている。つま

り、メディエーターを含むPIC形成とその安定化が転写の重要な調節過程である。

熱ショック応答は、温熱ストレスなどによって生じた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) を調節する適応機構であり、フォールディングを介助する熱ショックタンパク質群 (HSP70他) の誘導を特徴とする。その転写誘導が顕著であることから、古くから転写機構の解析モデルとして精力的に解析されてきた。この応答を制御するのは主に熱ショック転写因子HSF1であり、HSF1はプロテオスタシス容量調節の鍵因子である<sup>4)</sup>。HSF1は細胞内でおおよそ不活性型単量体として存在するが、その一部はあらかじめ活性型三量体に転換しており、通常状態でのプロテオスタシス容量の維持に寄与する。このHSF1活性は老化とともに低下し、その増強は老化と関連する神経変性疾患の進行を抑制する。一方、がんの発症や進展はHSF1依存性であり、HSF1は神経変性疾患やがんの治療ターゲットとしても注目されている<sup>4,5)</sup>。我々はこれまで、HSF1転写複合体解析に基づいて熱ショック応答の転写誘導機構を解析してきた。本稿では、哺乳動物細胞の熱ショック応答機構の概要とHSF1のリン酸化を介した新規のPIC形成機構について解説する。

### 2. 熱ショック応答の概要

非ストレス条件下でHSF1の一部は、DNA複製因子RPAと複合体を形成することでヒストンシャペロンFACTとクロマチン再構成複合体 (BRG1を含む複合体) をリクルートしてHSP70プロモーターへ結合する (図1B)<sup>4,5)</sup>。同時に、このHSF1はポリADPリボシル化酵素PARP1を引き寄せている<sup>6)</sup>。この複合体は、Pol IIを導いて転写開始点下流で停止させ、ある程度オープンなクロマチン構造を維持する。一方で熱ストレス条件下で活性化されたHSF1は、HSP70プロモーターへ大量に結合してクロマチン再構成複合体とヒストンアセチル化酵素p300/CBPをリクルートし、PARP1の再分布を導くことでプロモーター周辺のクロマチン構造を弛緩させる。また、この活性化HSF1はメディエーターおよびGTF群と相互作用することで直接PIC形成を促進する。さらに、それは転写伸長因子P-TEFbをリクルートすることでPol II停止を解除し、伸長反応を促進する (図1A,d参照)。これらの中心的な転写機構以外に

山口大学大学院医学系研究科医化学講座 (〒755-8505 山口県宇部市南小串1-1-1)

**Regulatory mechanisms of the transcriptional preinitiation complex formation in the heat shock response**

**Ryosuke Takii and Akira Nakai** (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami-Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan)  
本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940102

投稿受付日: 2022年11月8日

© 2022 公益社団法人日本生化学会

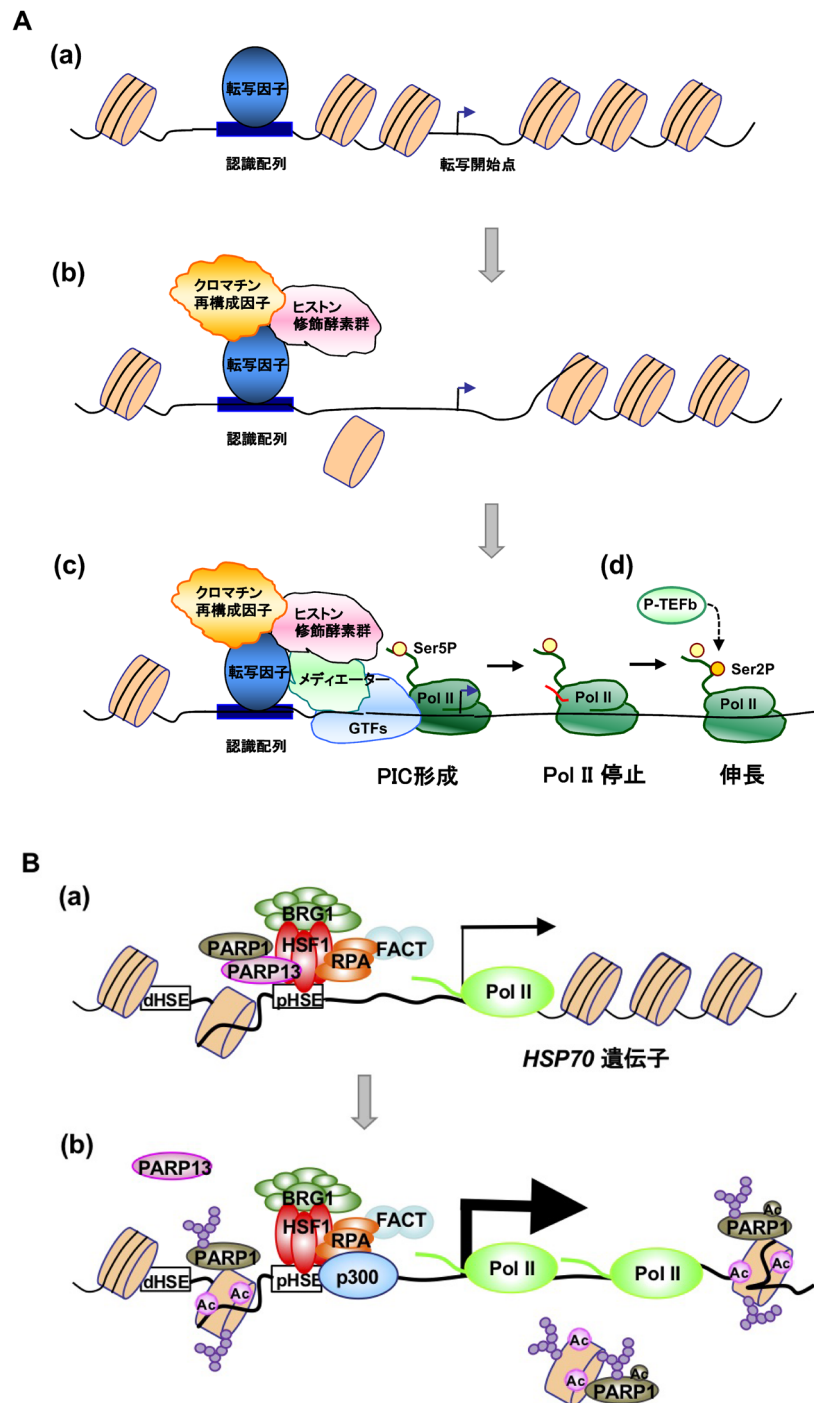


図1 刺激による転写誘導の初期過程

(A) 一般的な転写誘導の過程。(a)細胞が刺激を受けると、転写因子が特異的DNA配列を認識して遺伝子プロモーターへ結合する<sup>1)</sup>。(b)クロマチン再構成複合体やヒストン修飾酵素などの一連のコアクチベーターが転写因子との相互作用を介してリクルートされ、プロモーター周辺のクロマチン構造を弛緩する。(c)転写因子と一群のコアクチベーターはさらに、メディエーター、基本転写因子群 (GTFs)、Pol IIのリクルートを促進することでPICが形成される。Pol IIはTFIIHに含まれるCDK7によってSer5が速やかにリン酸化されて転写が開始するが、転写開始点下流で停止する。(d) P-TEFbに含まれるCDK9によってSer2がリン酸化されて伸長は促進される。(B)熱ショック応答の転写誘導の概要。(a)通常状態で存在する一部の三量体HSF1は、BRG1クロマチン再構成複合体やヒストンシャペロンFACTなどと複合体を形成することでHSP70プロモーターへ結合している。(b)熱ストレス条件下では、三量体へ転換した大量のHSF1がプロモーターへ結合してヒストンアセチル化酵素p300/CBPなどの集積とPARP1再分布を導き、Pol IIリクルートと転写伸長が促進される。

も ATF1, PGC1 $\alpha$ , MLL1, ASC-2, SSBP1 などがコアクチベーターとして *HSP* 転写を修飾することが知られている。

この転写誘導の中心となる HSF1 活性の調節は、単量体から DNA 結合型の三量体への転換と転写活性化能の獲得の二つの過程に分けられる<sup>4,5)</sup>。いずれの過程も通常は HSP 群によって抑制されており、ストレス条件下ではその抑制が解除される。さらに、HSF1 のさまざまな翻訳後修飾がこれら二つの過程を調節することも知られている。特に、K80 のアセチル化は直接 DNA 結合を抑制することで転写誘導からの回復を促す。また、S303 と S307 のリン酸化は転写を抑制し、一方で S326 と S419 のリン酸化は転写を活性化する<sup>4,5)</sup>。しかし、これらリン酸化による転写活性調節の分子機構については不明である。

### 3. HSF1 転写因子複合体解析の進化的アプローチ

我々はこれまでに、FLAG 標識抗体を用いたヒト HSF1-FLAG の免疫沈降法と質量分析法により、HSF1 と相互作用する 30 因子群を同定した<sup>7)</sup>。それらの機能スクリーニングにより、11 因子が *HSP70* 転写誘導レベルを変えることがわかった。それらの多くが HSF1 転写複合体の構成因子であったが、この方法ではメディエーターを含む主要な転写装置の同定には至らなかった。そこで、HSF1 転写複合体の全貌を明らかにするために、*HSP70* プロモーター DNA 存在下での HSF1 転写複合体の網羅的解析を試みた。その際に、HSF1 の転写活性化能と関連する因子群を同定するために進化的アプローチを用いた。

これまでにヒト HSF1 は熱ストレスによる *HSP70* 誘導を引き起こすが、ニワトリ HSF1 はその誘導を起こさないこ

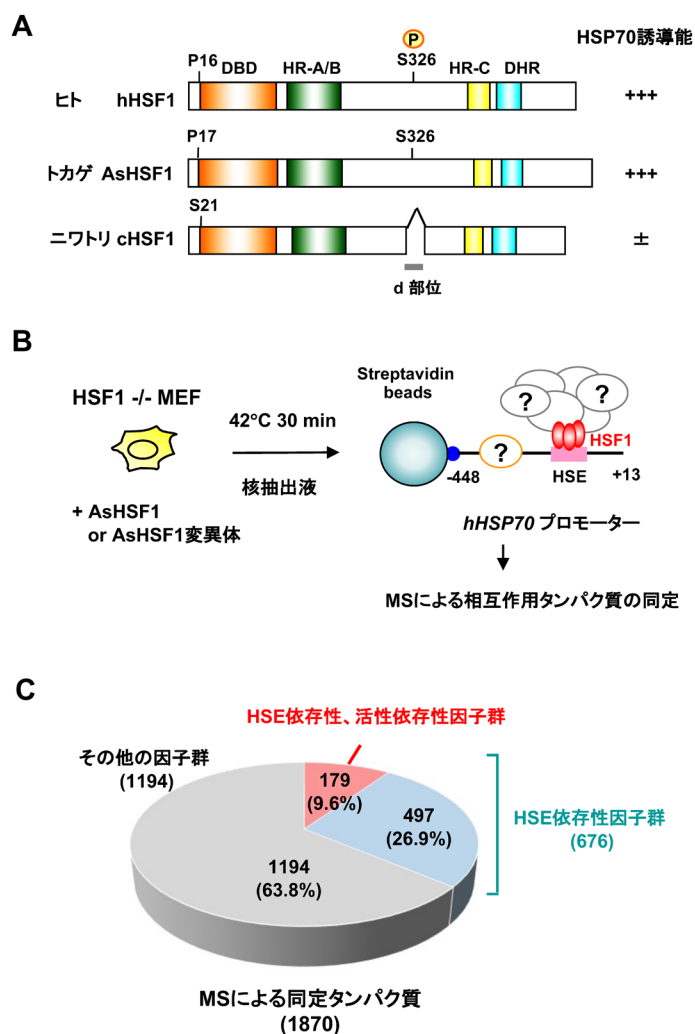


図2 HSF1 の構造と転写複合体解析

(A) ヒト、ニワトリ、トカゲの HSF1 の構造と *HSP70* 誘導能を示す<sup>9)</sup>。(B) トカゲ AsHSF1 の相互作用タンパク質の同定の過程を示す (詳細は本文参照)。(C) トカゲ AsHSF1 の相互作用タンパク質群の内訳を示す。HSE 依存性で、さらに転写活性依存性に同定されたのは 179 因子群であった。

とがわかっている (図2A)。一方、ニワトリと近縁のトカゲ HSF1 は *HSP70* 誘導活性を持つ。それらの比較から、トカゲ HSF1 の一つのアミノ酸 (Pro17) と1か所 (d部位) をともにニワトリ型に置換した変異体は、マウス MEF 細胞の *HSP70* を転写誘導しないことを見いだした。驚いたことに、d部位の活性は進化的に保存された S326 のリン酸化で調節された<sup>8)</sup>。そこで、これら野生型トカゲ HSF1 あるいはその活性変異型 HSF1 を HSF1 欠損 MEF 細胞へ発現させて熱ストレス後に核画分を抽出した (図2B)。この核抽出液と *HSP70* プロモーター DNA を *in vitro* で混合し、DNA プルダウン法により主要な転写装置を含む多くの熱ショック応答配列 (HSE) 依存性因子群 (676 因子) を同定した (図2C)。そして、HSF1 転写活性と相関して顕著に HSF1 転写複合体に集積する 179 因子の中から 10 因子群に絞った。さらに、遺伝子ノックダウンにより *HSP70* 転写誘導に大きな効果のあるシュゴシン SGO2 とメディエーター MED12 をつぎとめた<sup>9)</sup>。

#### 4. シュゴシンが Pol II リクルートを促進する

シュゴシンタンパク質の SGO1 と SGO2 は、細胞分裂期のセントロメア結合を保護する<sup>10)</sup>。しかし、間期におけるそれらの転写機構への関与については知られていなかった。まず、マウス MEF 細胞の内在性 SGO2 をノックダウン (KD) することで熱ストレス時の *HSP70* mRNA の誘導が顕著に減弱した<sup>9)</sup>。一方、SGO1 KD はその誘導に影響を与えなかった。そして、トカゲ HSF1 へ置換した MEF 細胞の *HSP70* 誘導は SGO2 KD によってまったく認められなかったことから、SGO2 が転写コアクチベーターとして重

要な役割を担うことがわかった。

次に、熱ストレス条件下で HSF1 と SGO2 が相互作用することを免疫沈降法によって確認した。上記の複合体解析から予想されたとおり、この相互作用は HSF1 転写活性と関連する S326 リン酸化に依存していた。そして、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により、熱ストレスに伴って HSF1-SGO2 複合体が *HSP70* プロモーターへ集積することがわかった。さらに、内在性 HSF1 を SGO2 と相互作用しないリン酸化部位変異体 HSF1-S326A に置換すると SGO2 の *HSP70* プロモーターへの集積はなく、熱ストレスによる *HSP70* mRNA 誘導が低下した。つまり、SGO2 の HSF1-S326 リン酸化依存的な *HSP70* プロモーターへのリクルートにより *HSP70* 転写が促進されることが明らかとなった。

さらに SGO2 が転写を誘導する機構を解明するために、SGO2-HA を高発現する MEF 細胞の核抽出液を用いて SGO2 相互作用タンパク質の網羅的な同定を試みた。驚いたことに、それら同定タンパク質の中で、Pol II の主要な構成因子である Rpb1 と Rpb2 が同定ペプチド数として最も多かった。また、Rpb3 のペプチドも多く同定された。実際に、温熱ストレスの有無にかかわらず SGO2-Pol II (以降は Rpb1 で確認している) の相互作用を免疫沈降法で確認できた。Pol II と相互作用しない変異体 SGO2Δ767-774 を作製し、細胞の内在性 SGO2 をその変異体に置換した。その結果、HSF1 と SGO2 自身の *HSP70* プロモーター上へのリクルートは一定であったが、Pol II リクルートは顕著に低下し、*HSP70* 転写レベルも減少した。つまり、HSF1-SGO2-Pol II 相互作用を介するユニークな PIC 形成機構が明らかとなった (図3)。HSF1-SGO2 複合体はプロテオスタシス容量の維持を介して細胞生存に働くことも示唆された<sup>9)</sup>。

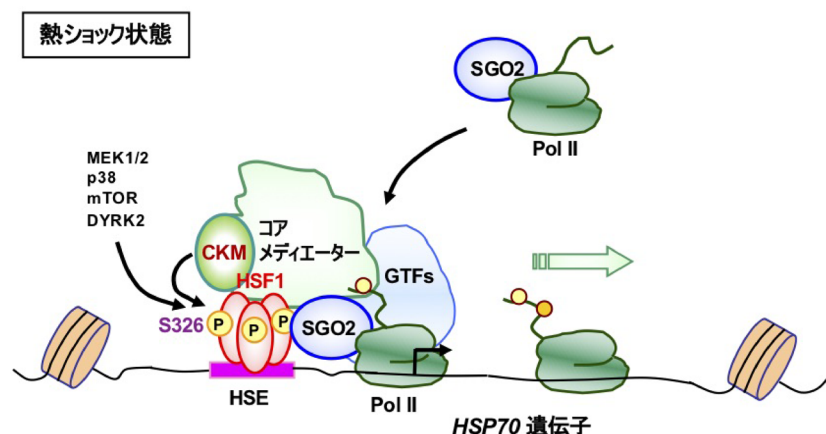


図3 SGO2 と CKM を介する *HSP70* の転写誘導機構

熱ストレス条件下では大量の三量体 HSF1 が *HSP70* プロモーターへ結合する。同時に、MEK1/2 を含むいくつかのリン酸化酵素が HSF1-S326 をリン酸化する。HSF1-S326 リン酸化は SGO2-Pol II をリクルートする。SGO2 はまた、コアクティベーターや CKM のリクルートを促進する。さらに、CKM は HSF1-S326 をリン酸化することで *HSP70* プロモーターの PIC を安定化している。SGO2 や CKM サブユニットのどの因子を欠いても熱ショック時の *HSP70* の転写誘導は減弱する。



## 5. メディエーターキナーゼによるHSF1リン酸化とPIC安定化

我々はさらに、上記DNAプルダウン法により同定されたHSE依存性因子群の中から33のメディエーターサブユニットに焦点を絞って解析を進めた。メディエーターは、コアメディエーター（Head, Middle, Tailモジュール）とCDK8キナーゼモジュール（CKM）で構成される<sup>11, 12</sup>。本解析からHeadとTailモジュールのサブユニットは多く同定された一方で、MiddleモジュールとCKMからわずかに一つずつが同定された<sup>13</sup>。CKMはCDK8, CCNC, MED12, MED13からなるが、その中で同定されたのはMED12であった。これまでに酵母を用いた研究から、メディエーターCKMは熱ストレス時にHSP70プロモーターへ集積するが、それは熱誘導性のHSP70 mRNA発現に関与しないことが知られている。我々は、マウスMEF細胞においてCKMのすべてのサブユニットが熱ストレス誘導性HSP70 mRNA発現を促進することを明らかにした。ChIPアッセイにより、HSF1とともにMED12, CDK8, そしてコアメディエーターサブユニットMED1が熱ストレス誘導性にHSP70プロモーターへ集積することがわかった。予想されるようにMED12 KDによってCDK8は集積しないが、興味深いことにMED1の集積も顕著に減少した。コアメディエーターは同じ部位でCKMとPol IIに結合し、それらの結合は互いを阻害する。我々の結果は、CKMのリクルートが一過性にコアメディエーターの安定化に関与し、その後Pol IIと置き換わることでPIC形成を促進する可能性を示唆する。

CDK8を含むCKMは、そのリン酸化活性を介して転写を促進することが推測される。実際に、CDK8およびそのパラログCDK19の阻害剤で細胞を処理すると熱ストレス誘導性HSP70 mRNA発現が抑制された<sup>13</sup>。CDK8/19のターゲットとしては基本転写因子、メディエーター、いくつかの転写因子が知られている。驚いたことに、CDK8, CDK19, またはMED12のKDはHSF1-S326のリン酸化を低下させた。つまり、CKMは熱ストレス条件下でHSF1-S326のリン酸化を促進することがわかった。以上の結果は、HSP70プロモーター上のHSF1活性とメディエーターを含むPICはCKMを介するリン酸化によって安定化されることを示唆する（図3）。

## 6. おわりに

我々の独自の進化的アプローチによる解析から、マウス細胞における熱ショック応答にユニークなPIC形成の促進機構を明らかにした。その中でも、染色体分配関連因子SGO2が転写コアクチベーターとして間期の重要な転

写調節因子として働くことは驚きであった<sup>14</sup>。ヒトSGO1がPol IIと相互作用して分裂期のセントロメアの転写に関与すること、そして間期でもSGO1の分裂酵母オルソログ（SGO2）がサブセントロメア領域のクロマチン構造の調節に関与していることが明らかにされている<sup>15</sup>。マウスとヒトの間でもSGO1とSGO2のアミノ酸配列の相同性は低く、今後はシュゴシンによるHSP転写調節が種間で保存されているかを明らかにする必要がある。もう一つの重要な知見は、HSF1のリン酸化が転写複合体形成を調節することである。特に、HSF1-S326リン酸化はHSF1の転写活性とよく相関しており、その活性化の指標としても知られている<sup>4, 5</sup>。このS326はMEK1/2, p38, mTOR, DYRK2などの多くのリン酸化酵素によってリン酸化されることが知られており、細胞のがん化と密接に関連している。HSF1転写複合体の構成因子であるCDK8によってもS326がリン酸化されることが明らかとなり、リン酸化阻害によるHSF1転写複合体の調節ががんの新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆される。

## 文 献

- 1) Weake, V.M. & Workman, J.L. (2010) Inducible gene expression: Diverse regulatory mechanisms. *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 426–437.
- 2) Jonkers, I. & Lis, J.T. (2015) Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 167–177.
- 3) Cramer, P. (2019) Organization and regulation of gene transcription. *Nature*, **573**, 45–54.
- 4) Gomez-Pastor, R., Burchfiel, E.T., & Thiele, D.J. (2018) Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 4–19.
- 5) Nakai, A. ed. (2016) Heat Shock Factor, Springer, Japan.
- 6) Fujimoto, M., Takii, R., Katiyar, A., Srivastava, P., & Nakai, A. (2018) Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 promotes the human heat shock response by facilitating heat shock transcription factor 1 binding to DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **38**, e0005–e0018.
- 7) Fujimoto, M., Takaki, E., Takii, R., Prakasam, R., Hayashida, N., Iemura, S., Natsume, T., & Nakai, A. (2012) RPA assists HSF1 access to nucleosomal DNA by recruiting histone chaperone FACT. *Mol. Cell*, **48**, 182–194.
- 8) Takii, R., Fujimoto, M., Matsuura, Y., Wu, F., Oshibe, N., Takaki, E., Katiyar, A., Akashi, H., Makino, T., Kawata, M., et al. (2017) HSF1 and HSF3 cooperatively regulate the heat shock response in lizards. *PLoS One*, **12**, e0180776.
- 9) Takii, R., Fujimoto, M., Matsumoto, M., Srivastava, P., Katiyar, A., Nakayama, K.I., & Nakai, A. (2019) The pericentromeric protein shugoshin 2 cooperates with HSF1 in heat shock response and RNA Pol II recruitment. *EMBO J.*, **38**, e102566.
- 10) Watanabe, Y. (2005) Sister chromatid cohesion along arms and at centromeres. *Trends Genet.*, **21**, 405–412.
- 11) Soutourina, J. (2018) Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 262–274.
- 12) 筒井大気, 大熊芳明 (2010) メディエーター複合体によ

るタンパク質リン酸化がもたらす転写制御機構. 生化学, **82**, 191-199.

- 13) Srivastava, P., Takii, R., Okada, M., Fujimoto, M., & Nakai, A. (2021) MED12 interacts with the heat-shock transcription factor HSF1 and recruits CDK8 to promote the heat-shock response in mammalian cells. *FEBS Lett.*, **595**, 1933-1948.
- 14) Kainth, A.S., Meduri, R., Pandit, V., Rubio, L.S., & Gross, D.S.

(2020) Shugoshin 2-a new guardian for heat shock transcription. *EMBO J.*, **39**, e104077.

- 15) Tashiro, S., Handa, T., Matsuda, A., Ban, T., Takigawa, T., Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, Y., et al. (2016) Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. *Nat. Commun.*, **7**, 10393.

## 著者寸描

### ●瀧井 良祐 (たきい りょうすけ)



山口大学大学院医学系研究科医化学講座学内講師。歯学博士。

■略歴 1976年兵庫県に生る。2001年九州大学歯学部卒業。同大学院（歯科薬理）修了。05年九州大学生体医学防御研究所特任助教。06年九州大学歯学部助教。08年現所属。

■研究テーマと抱負 様々な最新の手法にチャレンジしつつ、熱ショック転写因

子を介した熱ストレス応答の解明を目指す。

■ウェブサイト <http://ds22.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~seika2/>

■趣味 ジョギング、山口県内をドライブ。

### ●中井 彰 (なかい あきら)



山口大学大学院医学系研究科医化学講座教授。医学博士。

■略歴 兵庫県出身。1987年鳥取大学医学部卒業。同大学院（第2内科）修了後、91年米国ノースウエスタン大学にて熱ショック応答の研究を開始。京都大学助手を経て、2000年より山口大学医学部生化学第二講座教授。改組を経て現職。

■研究テーマと抱負 原始的な熱ストレス応答の分子機構の解明を基盤として、統合的な生体機能調節を理解し、難治性疾患の治療に結びつけたい。

■趣味 読書、釣り。