

「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戦略を解明するため、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

<京大グループ>

(1) HSF1のノックアウトを行ないHSF3との共同作用の機構を明らかにする
前年度、HSF3遺伝子のノックアウトに成功したので、今年度は、さらにHSF1のノックアウトを試みた。HSF3をノックアウトすると、細胞はHSF1を正常に持っているにも関わらず、ストレス応答能が低下した。これはHSF1とHSF3に共通の負の制御因子の存在を示唆している。HSF1は、もっとも主要な熱ショック転写因子であるが、ニワトリDT40細胞を用いて、細胞レベルでの2重欠損を作成した。ところが、HSF1遺伝子の乗っている染色体はトリソミーとなっていたので、3回の薬剤耐性選択を行い、最終的にはまったく発現しない細胞、すなわちHSF1のノックアウト細胞を得ることに成功した。現在、この細胞株を用いて、HSF1遺伝子破壊の増殖などに及ぼす効果、ストレスに対する感受性、さらにHSF3との共同作用などについて解析を進めている。

(2) HSP47のノックアウトマウスの解析

ES細胞を用いた常法により、HSP47を欠損するホモノックアウトマウスの作成を試みた。HSP47遺伝子を破壊した homozygote は生まれて来なかった。胎児を調べたところ、11日目までのマウスでは homozygote は検出されな

かったが、10.5日目の胎児では homozygote を認めた。このような胎児は、野生型に比べて1/3程の大きさしかなく、きわめて壊れやすい胎児であった。興味深いことに、このような homozygote においては、基質であるコラーゲン分子に異常が見られた。すなわち、コラーゲンのプロセシングに異常が起こり、成熟型コラーゲンが組織中に検出できなかった。また、コラーゲン微繊維の蓄積や、基底膜の発達もきわめて貧弱であった。このような組織の発生上の異常を反映して、特に間葉系組織細胞にアポトーシスが観察された。血管壁の破裂なども観察され、コラーゲンの蓄積異常によって、各処に異常が生じた結果、胎児が死亡したものと考えられる。これらの結果は、HSP 47が胎児の発生にとって、エッセンシャルな遺伝子であることを示唆しているが、重要なことは、分子シャペロンをロックアウトすることによって、その基質に異常が生じ、その結果胎児が死亡するという点である。これは、HSP 47の重要性だけでなく、分子シャペロン自体の機能解析にとってもきわめて重要な貢献をするものと考えられる。

(3) 小胞体における新たな分子シャペロンの探索

昨年度に引き続いて、小胞体中のあらたな分子シャペロン（ストレス誘導性の分子）の探索を行った。今回、新たに新規遺伝子が見つかった。これはアルファ・マンノーシダーゼのホモログと考えられる遺伝子であったが、ツニカマイシン処理などの小胞体ストレスによって誘導され、新たなストレス蛋白質であると考えられた。機能としてシャペロン機能や小胞体品質管理機構への関与が想定され、現在その解析を進めている。

<東京都臨床研グループ>

(1) 熱変性した蛋白質を再生させるときに働く分子シャペロン群

ルシフェラーゼを熱処理するとき、HSP 90を共存させると、不可逆的な会合沈殿が抑制され、変性したルシフェラーゼはHSP 90にトラップされる。こうして生じたルシフェラーゼとHSP 90の複合体を、HSP 70、HSP 40そしてレティキュロサイトライセート（RL）に含まれる未知の成分と加温すると、ルシフェラーゼの再生が見られる。この未知の成分がプロテアソーム活性化因子の一つであるPA 28であることを活性物質の精製によって同定した。変性したルシフェラーゼはHSP 90から、PA 28に移され、次いでHSP 70/HSP 40に移行し、最終的にはATP水解に依存して再生することが明らかとなった。一方、PA 28とルシフェラーゼの中間複合体は、20Sプロテアソームに結合することも明らかにした。これらの結果は、変性ルシフェラーゼは、PA 28に結合した段階で、再生か分解かの選択分岐点にあることを示唆している。

<奈良先端大グループ>

(1) 小胞体一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Ire1pのクローニングを行った。ヒトIre1pには少なくとも2種類以上の遺伝子があり、新しく発見した遺伝子をhIRE1bと名付けその機能解析を行っている。hIRE1bの発現は非常に低いですが、大腸ガン由来のHT29細胞では正常細胞の5倍程度高い発現を示しており興味深い。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は全くわかっていないので、動物細胞及び酵母の系両者でその解析を進めている。また動物細胞では、Ire1pの機能は多岐にわたると考えられ、その上流、下流の遺伝子を明らかにしたいと考えており、酵母の2ハイブリッドシステムによるスクリーニングを開始した。

3. 研究成果の発表 (論文発表)

- M. TANABE, Y. KAWAZOE, S. TAKEDA, R. I. MORIMOTO, K. NAGATA & A. NAKAI Disruption of the HSF3 gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance. *EMBO J.* 17(6):1750-1758 (1998)
- I. YAMAMURA, H. HIRATA, N. HOSOKAWA & K. NAGATA: Transcriptional activation of the mouse HSP47 gene in mouse osteoblast MC3T3-E1 cells by TGF- β 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 244:68-74 (1998)
- Y. KAWAZOE, A. NAKAI, M. TANABE & K. NAGATA : Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family. *European Journal of Biochemistry.* 255:356-362 (1998)
- H. MASUDA, N. HOSOKAWA & K. NAGATA: Expression and localization of collagen-binding stress protein HSP47 in mouse embryo development : Comparison with types I and II collagen. *Cell Stress & Chaperones.* 3(4):256-264 (1998)
- N. HOSOKAWA, M. SATOH, C. HOHENADLE, K. KUHN & K. NAGATA: HSP47, a collagen-specific molecular chaperone, delays the secretion of type III procollagen transfected in human embryonic kidney cell line 293: A possible role for HSP47 in collagen modification. *J. Biochem.* 124(3):654-662 (1998)

- K. NAGATA, T. KOIDE, H. HIRATA, N. NAGAI, M. SATOH, N. HOSOKAWA: Role of Molecular Chaperone HSP47 in the Synthesis and Secretion of Procollagens. THE 1998 TANIGUCHI INTERNATIONAL SYMPOSIUM "From Molecules to Man: Frontiers in Cell Biology".
- M. SUNAMOTO, K. KUZE, H. TSUJI, N. OHISHI, K. YAGI, K. NAGATA, T. KITA & T. DOI: Antisense oligonucleotides against collagen-binding stress protein HSP47 suppress collagen accumulation in experimental glomerulonephritis. *Lab. Invest.* 78(8):967-972 (1998)
- T. KOIDE & K. NAGATA: HSP47, A Molecular Chaperone which Interacts with Procollagens in the Endoplasmic Reticulum. *Connective Tissue.* 30(4):307-314 (1998)
- J. NISHIZAWA & K. NAGATA: Regulation of heat shock transcription factors by hypoxia or ischemia/reperfusion in the heart and brain. *Handbook of Experimental Pharmacology × Stress Proteins ㊦ Volume 136* (Ed. Latchman, D.S.) Springer-Verlag 1999., pp.201-224.
- N. NAGAI, T. YORIHUZI, N. HOSOKAWA & K. NAGATA: The human genome has a functional hsp47 gene (CBP2) and pseudogene (pshsp47). *Gene.* 227(2):241-248 (1999)
- J. NISHIZAWA, A. NAKAI, K. MATSUDA, T. BAN & K. NAGATA: Reactive Oxygen Species Play an Important Role in the Activation of Heat Shock Factor 1 in Ischemia-Reperfused Heart. *Circulation.* 99(7):934-941(1999)

他 5 件