

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on the regulatory mechanisms involved in the expression of heat-shock protein genes from rainbow trout
(ニジマス熱ショックタンパク質遺伝子の発現調節機構に関する研究)

氏 名 尾島 信彦

あらゆる生物は、熱ストレスに応答して細胞内に熱ショックタンパク質 (heat-shock protein ; HSP) の合成を誘導する。HSP は主に細胞内タンパク質のフォールディングを助ける働き、いわゆる分子シャペロン機能をもつ。この機能により HSP は熱変性した細胞内タンパク質を修復し、熱ストレスによる細胞死を抑制すると考えられている。HSP の発現は転写レベルで制御されており、その特異的転写因子は熱ショック転写因子 (heat-shock transcription factor ; HSF) と呼ばれる。主要転写因子の HSF1 は HSP 遺伝子プロモーター上流域の熱ショックエレメント (heat-shock element ; HSE) に特異的に結合し、HSP 遺伝子の転写を促進する。

変温動物である魚類は、その発生、成長、代謝などにおいて環境水温の影響を直接的に受ける。したがって温度に対する適応応答は魚類の生存にとって必須で、その分子機構の解明は魚類の増養殖にも基礎的知見を与える。中でもサケ科魚類のように冷水に適応進化した魚種では、低い温度も熱ストレスになり得るため、熱ストレス抵抗性は特に重要と考えられる。魚類細胞においては他の動物細胞と同様、熱ストレスによる HSP の合成誘導がこれまでに観察されている。しかし魚類 HSP の研究はその多くがタンパク質レベルでの誘導の観察にとどまっており、遺伝子レベルでは未だ不明な点が多い。本研究は以上の背景の下、熱ストレスの影響を特に受けやすいと考えられる冷水性魚

類ニジマス *Oncorhynchus mykiss* を対象に、HSP の構造と遺伝子発現特性、並びに発現調節機構を明らかにすることを目的として行われたもので、結果の概要は以下の通りである。

1. Hsp70 の構造と mRNA 発現特性の解析

Hsp70 は脊椎動物における主要なストレス誘導性タンパク質で、そのアミノ酸配列は生物種間で非常に高く保存されている。一方、ニジマスは 4 倍体化した祖先種をもつと考えられており、重複した *Hsp70* の存在が推定される。そこで、実際に重複遺伝子が存在するかどうかを明らかにするため、3 ヶ月齢のニジマスを 25℃、30 分間の熱処理に付して Hsp70 の全長をコードする cDNA クローンを 12 個単離し、それらの塩基配列を決定した。その結果、2 つの *Hsp70*、すなわち *Hsp70a* と *Hsp70b* が同定された。これら Hsp70 の推定アミノ酸配列は互いに 98.1% の同一率を示した。サザンブロット解析の結果、*Hsp70a* と *Hsp70b* はニジマスゲノム上で異なる遺伝子として存在していることが示された。

次に *Hsp70a* と *Hsp70b* の mRNA 発現特性をニジマス RTG-2 細胞を用いて解析した。2 つの遺伝子を区別して検出したノーザンブロット解析の結果、熱ストレスを与えた細胞において、長さの異なる 2 種類の mRNA の蓄積がいずれの *Hsp70* にも観察された。各 2 種類の mRNA 蓄積量を *Hsp70a* と *Hsp70b* で比較したところ、長短 mRNA のいずれも熱ストレス下では常に *Hsp70b* の方が *Hsp70a* より蓄積量は高かった。一方、温度や時間を変化させたときに観察された発現動態は両遺伝子で類似していた。興味深いことに、*Hsp70a* と *Hsp70b* の双方で検出された長短 2 種類の mRNA のうち、長い方の mRNA はいずれも 28℃ 以上の強い熱ストレス下でのみ検出された。

これらの結果から、ニジマスにおいては予想通り重複した *Hsp70* が存在し、熱ストレスの強さにより各 mRNA の発現パターンが変化することが明らかとなった。また、ニジマスを対象に遺伝子の発現特性を正確に調べるためには、まず重複遺伝子の包括的な同定が必要であることが示唆された。

2. HSP ファミリーの mRNA 発現特性の解析

Hsp70 以外の HSP ファミリー遺伝子について熱ストレスによる発現特性を正確に解析することを目的とし、重複遺伝子を含めた包括的な探索を試みた。その際、一度に出来るだけ多数の HSP ファミリー遺伝子が単離できるように方法を工夫した。具体的には 25℃、24 時間の熱ストレス処理した RTG-2 細胞から cDNA ライブラリーを作製し、任意に 200 クローンを単離してそれらの塩基配列を決定した。その結果、HSP をコード

する 9 種類の cDNA が同定された。単離された遺伝子は *Hsp90 β a*, *Hsp90 β b*, *Grp78*, *Hsp70a*, *Hsc70a*, *Hsc70b*, *Cct8*, *Hsp47*, *DnaJ* のホモログであった。これら遺伝子は RTG-2 細胞のノーザンブロット解析により、熱ストレスの有無にかかわらず単一バンドとして検出された。ただし *Hsp70a* は上述同様、強い熱ストレス下で mRNA のバンドが 2 本検出された。

上述した *Hsp70* も含めて各 HSP ファミリー遺伝子の mRNA 蓄積量の熱ストレスによる変化をさらに詳細に調べるため、定量的 RT-PCR 解析を行った。その結果、*Hsp70a*, *Hsp70b*, *Hsc70a*, *Hsc70b*, *Hsp47* の 5 遺伝子において、熱ショックにより mRNA 蓄積量が有意に増加した。とくに *Hsp70a* と *Hsp70b* の mRNA 蓄積量の変化は顕著で、28、3 時間の熱ショック後、それぞれ定常状態の 480 倍および 510 倍に増加した。他方、*Hsc70a*, *Hsc70b*, *Hsp47* の mRNA 蓄積量は、同じ熱ショック条件下でそれぞれ定常状態の 1.3 倍、2.8 倍、1.6 倍に増加した。

以上のように HSP ファミリー遺伝子の熱ストレスによる mRNA の蓄積量変化を包括的に解析することにより、重複遺伝子間や HSP ファミリー間での mRNA 発現特性の差異が明らかとなった。またニジマス HSP ファミリー遺伝子も他生物種同様に転写レベルで制御されていることが示され、特異的転写因子の存在が示唆された。

3. HSF1 のクローン化とタンパク質レベルでの性状解析

ニジマスにおける HSP ファミリー遺伝子の転写調節機構を明らかにするため、RTG-2 細胞から熱ショック転写因子 HSF をコードする cDNA のクローン化を試みた。その結果、上記 HSP ファミリー遺伝子と同様に重複遺伝子と考えられる 2 つの *HSF1* が同定されたので、それらを *HSF1a* および *HSF1b* と名付けた。両タンパク質の推定アミノ酸配列は互いに 86.4% の同一率を示した 2 つのニジマス HSF1 はいずれも他生物種 HSF1 に共通のモチーフ構造、すなわち DNA 結合ドメイン、ロイシンジッパー様構造、核移行シグナルを有していた。サザンブロット解析の結果、*HSF1a* および *HSF1b* はニジマスゲノム上でそれぞれ異なる遺伝子として存在していることが示された。

クローン化した遺伝子が RTG-2 細胞のほか、実際にニジマス生体中で転写されていることを確認するため、RT-PCR 解析を行った。その結果、*HSF1a* と *HSF1b* の mRNA は非ストレス下の諸組織において共発現していることが明らかとなった。

2 つの HSF1 アイソフォームの性状を生化学的に調べるため、*HSF1a* にはヘマグルチニンタグ、*HSF1b* にはプロテイン C タグを融合させる発現ベクターを構築し、*in vitro* 転写・翻訳を行った。ウェスタンブロット解析の結果、*HSF1a* および *HSF1b* の各融合タンパク質の単一バンドがそれぞれのエピトープタグに特異的な抗体により検出され、

各融合タンパク質の合成が確認された。

次に *in vitro* 翻訳産物を用いてニジマス HSF1 の DNA 結合能を調べた。HSE コンセンサス配列の合成オリゴヌクレオチドを用いてゲルシフトアッセイを行った結果、2 つの HSF1 はいずれも本 HSE に結合することが示された。また熱ショック前後の RTG-2 細胞抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、熱ショック後の細胞抽出液においてのみ内在性 HSF1 と合成 HSE との結合が認められた。このことからニジマス HSF1 は既報の他生物種 HSF1 と同様に、熱ショックによる 3 量体形成を介した DNA 結合活性化機構をもつことが推定された。

そこでさらにニジマス HSF1 の多量体形成能について調べた。上記の翻訳産物を化学的に架橋し、各エピトープタグに特異的な抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、各 HSF1 のホモ 3 量体形成が確認されただけでなく、HSF1a と HSF1b のヘテロ 3 量体が形成されることも示された。

これらの結果から、ニジマスには HSF1 アイソフォームが 2 種類存在することが明らかとなり、その両方が HSP ファミリー遺伝子の熱ストレス誘導性転写調節に関与していることが示唆された。

以上、本研究により、冷水性魚類のニジマスを対象とした HSP ファミリー遺伝子の包括的かつ定量的な mRNA 発現特性の解析で、本魚種には重複遺伝子を介する独特な熱ストレス応答の分子機構が存在することが明らかとなった。従来からニジマスにおいてはその 4 倍体性から重複遺伝子の存在が予想されていたが、本研究により初めて重複した HSP ファミリー遺伝子や *HSF* の存在が明らかとなり、それらを区別して検出することが可能となった。本研究は魚類の増養殖に基礎的知見を与えるのみならず、今後さらに重複遺伝子の存在意義や種々のストレス因子の解明へと発展することが期待されることから、応用上および比較分子・細胞生物学上に資するところが大きいと考えられる。

(3874 文字)