

魚類のストレス応答を制御する熱ショック転写因子

尾島信彦*・山下倫明*

Heat shock transcription factors: regulators of cellular stress response in fish

Nobuhiko OJIMA* and Michiaki YAMASHITA*

Abstract Fish are exposed to various environmental stressors such as temperature shifts, chemical contaminants, and low dissolved oxygen levels. In particular, adaptation to temperature shifts is essential for the survival of fish, which are poikilothermic animals. Thus, we have studied the molecular basis of the heat shock response in fish. Meanwhile, all organisms respond to high temperatures by inducing the expression of heat shock proteins (HSPs). Transcriptional activation of the eukaryotic HSP genes is regulated by heat shock transcription factors (HSFs), which bind to the heat shock element (HSE) in the upstream region of HSP genes. The HSF family consists of four members, HSF1-4, in vertebrates. In fish species, the expression of HSF1 and HSF2 genes has been detected in rainbow trout and zebrafish. New insights into the function of HSF family members have recently obtained from knockout mice that lack genes of the family. Here, we briefly review recent findings on the function and the activation mechanism of mammalian HSF, and we also review our studies on HSF1 in rainbow trout.

Key words : fishes, gene expression regulation, heat-shock response, heat shock transcription factor, *Oncorhynchus mykiss*

魚類は自然環境や養殖環境において、水温・重金属等の化学物質・溶存酸素量など様々な環境因子の変動に曝されている。これらの環境因子は魚類にストレス状態を引き起こす外部刺激、すなわちストレッサーとなりうる。ストレッサーには物理的・化学的・生物学的なものがある(室伏きみ子, 2005)が、水温変化は物理的ストレッサーとなり変温動物である魚類の発生・成長・成熟に大きな影響を及ぼす。特にニジマスなどの冷水性魚類は気候変動などによる水温上昇の影響を受けやすいと考えられる。

生物は通常の生育温度より高い温度に曝されたとき、熱ショックに対する応答として細胞内でストレスタンパク質(Heat Shock Protein;HSP)群を誘導発現させる。発見当初HSPは「熱ショックタンパク質」と呼ばれたが、後に熱以外のストレッサーによっても発現が誘導されることが分かり「ストレスタンパク質」と呼ばれるようになった。しかし個々のタンパク

質名は便宜上HSPのままである。HSPは熱などによって変性・凝集した細胞内タンパク質を再生する働き、いわゆる分子シャペロン機能を持つ。魚類ではゼブラフィッシュなど複数の魚種から主要なHSP遺伝子が単離され、その発現が解析されている(Basu *et al.*, 2002)が、機能の解析はほとんど進んでいない現状にある。

真核生物HSPの発現は熱ショック転写因子(Heat Shock transcription Factor;HSF)により転写レベルで制御されている。HSFタンパク質は三量体を形成してHSP遺伝子上流域にある熱ショックエレメント(Heat Shock Element;HSE)と呼ばれるDNA配列に特異的に結合し、HSP遺伝子の転写を調節する(Fig. 1)。筆者らは冷水性魚類におけるストレス応答の分子機構を明らかにするため、ニジマスからHSF1遺伝子を単離し、その生化学的な性状を解析した。本稿では筆者らの研究成果を含め、魚類のHSF遺伝子に関する最近の知見を紹介する。

2008年4月23日受理(Received on April 23, 2008)

* 中央水産研究所 〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-4 (National Research Institute of fisheries science, 2-12-4, Fukuura, Kanazawa, Yokohama 236-8648, Japan)

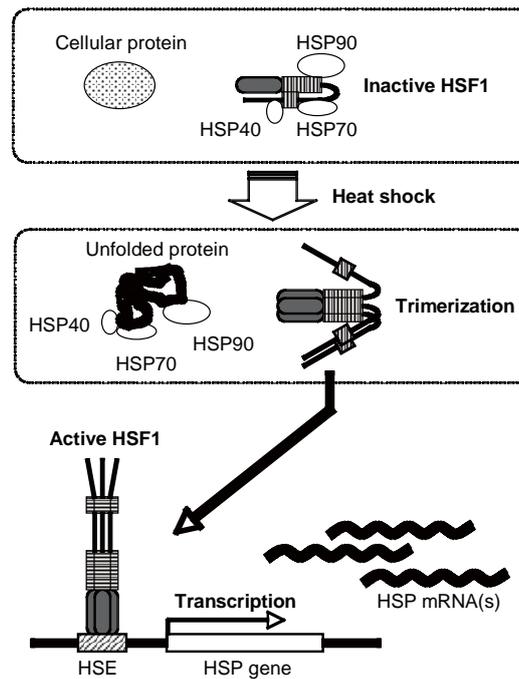


Fig. 1. Model of the regulatory mechanisms underlying the expression of heat-shock protein genes in mammalian cells. HSF1 is present mainly in the nucleoplasm as inactive monomers under normal conditions. The inactivation of HSF1 is associated with the binding of HSPs to the protein. When unfolded proteins accumulate in the cytosol by heat shock, HSPs dissociate from HSF1 to function as molecular chaperones. Subsequently, HSF1 acquires DNA binding ability through trimerization. Trimeric HSF1 binds to HSEs in the upstream region of HSP genes and activates their transcription.

熱ショック転写因子ファミリー

脊椎動物の HSF ファミリーは 4 種類からなり、発見順に HSF1, HSF2, HSF3, HSF4 と名付けられている。このうち HSF3 遺伝子の存在が報告されているのはニワトリ *Gallus gallus* だけである。HSF タンパク質ファミリー間で保存性の高い領域は、DNA 結合ドメイン (DNA-Binding Domain; DBD) とロイシンジッパー様構造の三量体形成ドメイン (Hydrophobic heptad Repeat-A/B; HR-A/B) である (Fig. 2)。HSF1 から HSF3 までは、カルボキシル末端側にもう一つロイシンジッパー様構造 (HR-C) を持っている (Fig. 2) が、HSF4 は HR-C を持っていない。

HSF ファミリーのうち魚類で遺伝子の発現が確認されているのは HSF1 と HSF2 であり、これら遺伝子が単離された魚種はニジマス (Le Goff *et al.*, 2004; Ojima and Yamashita, 2004) とゼブラフィッシュ (Räbergh *et al.*, 2000; Yeh *et al.*, 2006) である。単離

された HSF1 と HSF2 は哺乳類のものと同様のドメイン構造 (DBD, HR-A/B, HR-C) を保持している。

近年、様々な生物のゲノム情報がインターネット上で公開されており、DNA 塩基配列情報から遺伝子の存在を予測することが可能となっている。欧州の Ensembl ゲノムブラウザ (<http://www.ensembl.org/index.html>) では次の 5 魚種のゲノム情報が公開されている。トラフグ *Takifugu rubripes*, メダカ *Oryzias latipes*, イトヨ *Gasterosteus aculeatus*, ミドリフグ *Tetraodon nigroviridis*, ゼブラフィッシュ *Danio rerio*。これらのゲノム情報から魚類には HSF1 と HSF2 に加え HSF4 遺伝子も存在することが予測されるが、その発現はまだ *in vivo* で確認されていない。また予測によるとトラフグとミドリフグでは HSF1 と HSF4 の 2 遺伝子しか存在しないようである。もしこの予測が正しければ、フグが既知の脊椎動物の中では最小のゲノムサイズをもつことから、脊椎動物に必要な HSF の最少セットは HSF1 と HSF4 であることが予想される。

熱ショック転写因子の機能

HSFファミリーの機能は各遺伝子を欠失させたノックアウトマウスの解析により明らかになりつつある。HSF1 遺伝子欠失マウスは成体になるまで生き残るが、HSP 遺伝子の誘導発現は消失する (Xiao *et al.*, 1999)。したがって HSF1 は熱ショック応答の主要な転写制御因子である。HSF2 遺伝子欠失マウスでは減数分裂時の染色体対合不全や精巣におけるアポトーシスの増加、メスの生殖能力異常、脳の形態変化が主な表現型として観察される (Kallio *et al.*, 2002)。一方、HSF2 遺伝子欠失マウスは目立った表現型の異常を示さないという報告 (McMillan *et al.*, 2002) もあり、HSF2 の機能は完全には解明されていないと言える。なお、HSF1 と HSF2 両遺伝子を欠失させたマウスではオスが不妊になる (Wang *et al.*, 2004)。HSF4 遺伝子欠失マウスは白内障を発症することから、HSF4 は目のレンズ形成に特異的な機能を持つことが示唆されている (Fujimoto *et al.*, 2004)。

魚類では HSF 遺伝子の発現を阻害したノックダウンゼブラフィッシュの解析例がある。HSF1 遺伝子の発現を阻害したゼブラフィッシュ胚では熱ショックによるアポトーシス細胞数が対照に比べて増加する (Wang *et al.*, 2001)。別の研究グループのノックダウンゼブラフィッシュ胚では眼が小さくなる表現型が観察され、HSF1 が HSP70 遺伝子の構成的なレンズ特異的発現制御に関与することが示唆されている (Evans *et al.*, 2007)。HSF2 遺伝子の発現を阻害したゼブラフィッシュ胚では眼が小さくなる表現型は観察されない (Evans *et al.*, 2007)。ただし、これらの結果は遺伝子の欠失ではなく発現阻害の影響を観察したものであることから、魚類 HSF の機能解明にはさらなる検証が必要である。

熱ショック転写因子の活性化

1) 哺乳類 HSF1 の活性化機構

HSFファミリーのうち、熱ショック応答に必須である HSF1 の活性化機構が最もよく研究されている。HSF1 の活性化は3つの過程に分けて考えることができる。単量体から三量体への転移、核内集積、広範な翻訳後修飾である。

単量体から三量体への転移にはロイシンジッパー様構造 HR-A/B と HR-C (Fig. 2) が関与している。HSF1 は非ストレス時に DNA 結合活性を持たない単量体として細胞内に存在する。この単量体は、分子内では HR-A/B と HR-C との疎水性相互作用により、また分子間では HSP70 や HSP90 などのストレスタンパク質との結合により保持されていると考えられている。HSF1 の三量体化機構としては次のようなモデルが広く受け入れられている。ストレスの影響で細胞内に増加した変性中間体タンパク質を修復するために HSP が HSF1 から遊離し、HSF1 は DNA 結合活性を持つ三量体へと転換する (Fig. 1)。HSF1 三量体は HR-A/B 同士の疎水性相互作用により保持されている。

核内集積については、細胞質に存在する HSF1 単量体が三量体化して核内に移行するというモデルが一般に受け入れられていた。しかし近年の報告 (Vujanac *et al.*, 2005) によると、不活性な HSF1 単量体は主に核内に存在しており、核と細胞質の間を往復しているらしい。また、ストレスの影響で活性化された HSF1 単量体や三量体は細胞質から核内へ効率的に移行するが、逆に核内から細胞質への移行は非効率的であることが示されている。結果として活性化された HSF1 が核内に集積することになるようである。

翻訳後修飾については、HSF1 は様々なストレスの影響により転写活性化能と関連する過剰リン酸



Fig. 2. Schematic representation of HSF1 domain structures. The DNA-binding domain (DBD) is the most conserved region among the HSF family members. HR-A/B and HR-C represent N-terminal and C-terminal hydrophobic heptad repeats, respectively. HR-A/B are involved in trimerization. HR-C is suggested to maintain HSF1 in an inactive state by interacting with the HR-A/B.

化を受けることが知られている。しかし、リン酸化によって HSF1 の転写活性化能が増強されるという報告は少なく、多くはリン酸化によって転写活性化能が抑制されることが示されている (Anckar and Sistonen, 2007)。

2) 魚類 HSF1 の活性化

魚類 HSF1 は共通のドメイン構造を持つことから哺乳類 HSF1 と同様の活性化機構を持つと考えられる。魚類 HSF1 が熱ショックによって HSE 結合活性を獲得することはニジマス (Airaksinen *et al.*, 1998; Le Goff and Michel, 1999; Ojima and Yamashita, 2004) およびゼブラフィッシュ (Evans *et al.*, 2007) で確認されている。しかし活性化機構の詳細についてはまだ不明な点が多い。

一方、筆者らはニジマスに 2 種類の HSF1 アイソフォームが存在することを見出した (Ojima and Yamashita, 2004)。ニジマスの祖先種はゲノムが 4 倍体化したと考えられていることから、これらアイソフォームは遺伝子重複によって生じたパラログと推定される。2 種類のアイソフォームを *in vitro* で発現させて多量体形成能を調べたところ、ニジマス HSF1 はホモ三量体とヘテロ三量体の両方を形成することが明らかとなった。ヘテロ三量体化が *in vivo* でも起こるかどうかはまだ明らかでない。

魚類 HSF1 の特徴

魚類の HSF1 で特徴的なのは哺乳類よりも活性化温度が低いことである。哺乳類 HSF1 が約 42°C で活性化するのに対し、魚類 HSF1 の活性化が確認された温度はゼブラフィッシュでは 37°C (Evans *et al.*, 2007)、ニジマスでは 25°C (Ojima and Yamashita, 2004) である。この HSF1 活性化温度の違いは各生物種が適応している環境温度を反映している。一方、マウス HSF1 が *in vitro* で熱や過酸化水素によって直接活性化されて三量体化する (Ahn and Thiele, 2003) ことから、HSF1 はそれ自身がストレスセンサーとして機能すると考えられる。しかし HSF1 活性化の温度依存性は調べられておらず、HSF1 のストレス感知能が生物種ごとに異なるのかは不明であり、今後の研究が待たれる。

また、ニジマス HSF1 がヘテロ三量体を形成することは特徴的である。遺伝子重複によって生じた HSF1 アイソフォームを持つ生物はニジマス以外に見つかっていない。一方、HSF1 三量体が疎水性相互作用により保持されているとすれば、共通の HR-A/B

ドメインを持つ分子同士が多量体を形成しても不思議ではない。にもかかわらず、脊椎動物の HSF ファミリーはホモ三量体を形成すると一般に考えられてきた。しかし最近の報告 (Loison *et al.*, 2006; Östling *et al.*, 2007) によると HSF1 と HSF2 がヘテロ三量体を形成して機能する可能性が示されている。ニジマス HSF1 のヘテロ三量体にも特異的な機能が存在する可能性があり、新たな研究展開が期待される。

おわりに

哺乳類 HSF ファミリーの構造や機能は膨大な研究により次第に明らかとなってきた。その一方で魚類 HSF ファミリーの研究は端緒にすぎたばかりである。変温動物である魚類の多くは卵生であり、発生段階から環境の影響を直接的に受ける。したがって細胞保護作用を持つ HSP や、その発現を主に制御する HSF に関しては、魚類における研究がより必要であると考えられる。また進化的な観点からも魚類は脊椎動物におけるストレス応答の分子機構を研究するための理想的なモデル生物であると言える。今後、魚類 HSF や HSP の発現および機能をさらに詳しく明らかにすることにより、自然環境や養殖環境における魚類のストレス度判定や、ストレス耐性を高めた魚類育種などへの展開が期待される。

文 献

- Ahn S. G. and Thiele D. J., 2003: Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.*, **17**, 516-528.
- Airaksinen S., Råbergh C. M. I., Sistonen L. and Nikinmaa M., 1998: Effects of heat shock and hypoxia on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cells. *J. Exp. Biol.*, **201**, 2543-2551.
- Anckar J. and Sistonen L., 2007: Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **594**, 78-88.
- Basu N., Todgham A. E., Ackerman P. A., Bibeau M. R., Nakano K., Schulte P. M. and Iwama G. K., 2002: Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, **295**, 173-183.
- Evans T. G., Belak Z., Ovsenek N. and Krone P. H., 2007: Heat shock factor 1 is required for constitutive Hsp70 expression and normal lens development in

- embryonic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **146**, 131-140.
- Fujimoto M., Izu H., Seki K., Fukuda K., Nishida T., Yamada S., Kato K., Yonemura S., Inouye S. and Nakai A., 2004: HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. *EMBO J.*, **23**, 4297-4306.
- Kallio M., Chang Y., Manuel M., Alastalo T. P., Rallu M., Gitton Y., Pirkkala L., Loones M. T., Paslaru L., Larney S., Hiard S., Morange M., Sistonen L. and Mezger V., 2002: Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J.*, **21**, 2591-2601.
- Le Goff P. and Michel D., 1999: HSF1 activation occurs at different temperatures in somatic and male germ cells in the poikilotherm rainbow trout. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **259**, 15-20.
- Le Goff P., Le Drean Y., Le Peron C., Le Jossic-Corcous C., Ainouche A. and Michel D., 2004: Intracellular trafficking of heat shock factor 2. *Exp. Cell Res.*, **294**, 480-493.
- Loison F., Debure L., Nizard P., Le Goff P., Michel D. and Le Dréan Y., 2006: Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes. *Biochem. J.*, **395**, 223-231.
- Mcmillan D. R., Christians E., Forster M., Xiao X., Connell P., Plumier J. C., Zuo X., Richardson J., Morgan S. and Benjamin I. J., 2002: Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice. *Mol Cell Biol.*, **22**, 8005-8014.
- 室伏きみ子, 2005: ストレスの生物学, 第1版, オーム社, 東京, 136pp.
- Ojima N. and Yamashita M., 2004: Cloning and characterization of two distinct isoforms of rainbow trout heat shock factor 1. Evidence for heterotrimer formation. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 703-712.
- Råbergh C. M. I., Airaksinen S., Soitamo A., Björklund H. V., Johansson T., Nikinmaa M. and Sistonen L., 2000: Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *J. Exp. Biol.*, **203**, 1817-1824.
- Vujanac M., Fenaroli A. and Zimarino V., 2005: Constitutive nuclear import and stress-regulated nucleocytoplasmic shuttling of mammalian heat-shock factor 1. *Traffic*, **6**, 214-229.
- Wang G., Huang H., Dai R., Lee K. Y., Lin S. and Mivechi N. F., 2001: Suppression of heat shock transcription factor HSF1 in zebrafish causes heat-induced apoptosis. *Genesis*, **30**, 195-197.
- Wang G., Ying Z., Jin X., Tu N., Zhang Y., Phillips M., Moskophidis D. and Mivechi N. F., 2004: Essential requirement for both hsf1 and hsf2 transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility. *Genesis*, **38**, 66-80.
- Xiao X., Zuo X., Davis A. A., Mcmillan D. R., Curry B. B., Richardson J. A. and Benjamin I. J., 1999: HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J.*, **18**, 5943-5952.
- Yeh F. L., Hsu L. Y., Lin B. A., Chen C. F., Li I. C., Tsai S. H. and Hsu T., 2006: Cloning of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 2 (HSF2) and similar patterns of HSF2 and HSF1 mRNA expression in brain tissues. *Biochimie.*, **88**, 1983-1988.
- Östling P., Björk J. K., Roos-Mattjus P., Mezger V. and Sistonen L., 2007: Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *J. Biol. Chem.*, **282**, 7077-7086.