

氏 名	川 添 嘉 徳
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2103 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科分子医学系専攻
学位論文題目	Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat shock factor family (プロテアソーム活性の阻害による熱ショック転写因子の活性化) (主査)
論文調査委員	教授 佐々木正夫 教授 内海博司 教授 永田和宏

### 論 文 内 容 の 要 旨

熱ショック蛋白質や分子シャペロンは蛋白質の合成から分解までの様々な代謝過程に関与している。この代謝過程の異常、つまり熱ショックやアミノ酸アナログなどのストレスによって細胞内に異常蛋白質が蓄積することで熱ショック蛋白質の発現が誘導されると考えられている。この発現誘導は主に転写レベルで調節されており、それを担うのが熱ショック転写因子(HSF)である。トリの細胞で三つのHSFが同定されており、このうちストレスに応答するのがHSF 1とHSF 3である。HSF 2はストレスには応答せず、細胞分化や発生の過程で機能すると考えられている。最近、プロテアソームの阻害によって熱ショック蛋白質の発現亢進のみられることが報告された。本研究では、この誘導機構を明らかにする目的でプロテアソーム阻害剤によるHSFの活性化を調べた。

トリ赤芽球系細胞株HD 6をプロテアソーム阻害剤で処理し細胞抽出液を調製した後、HSFのDNA結合能をゲルシフト法により調べた。その結果、この処理によって熱ショックと同等のDNA結合活性が誘導された。また、様々なプロテアーゼ阻害剤を用いて同様の実験を行ったところプロテアソーム阻害剤によってのみ、特異的にHSFのDNA結合活性が認められた。次にこのDNA結合活性がHSF 1, HSF 2, HSF 3いずれのHSFによるものかを知るために各HSFに対する特異的抗体を用いてスーパーシフト実験を行ったところ、いずれの抗体を用いてもスーパーシフトが観察された。このことから、プロテアソームの阻害は特異的にすべてのHSFのDNA結合能の獲得を引き起こすことが明らかとなった。

HSFの活性化は、リン酸化、核移行、三量体形成を伴うことが知られている。そこでまず各HSFの蛋白量とリン酸化状態をウェスタンブロッティングにより調べたところプロテアソーム阻害剤処理によってHSF 2の蛋白量は5倍程度にまで増加していた。HSF 1とHSF 3についてはその蛋白量はやや減少がみられ、そのSDS-PAGE上の移動度が減少していた。

<sup>32</sup>P-正リン酸の取り込みによりこれがリン酸化のためであることを明らかにした。次にその細胞内局在を調べたところ、コントロールの状態ではほとんどのHSF 1, HSF 2, HSF 3が細胞質に存在していたのに対し、プロテアソーム阻害剤処理によって核への集積が見られた。最後にHSFのオリゴマー構造をゲルろ過法により調べた。それぞれ単量体、二量体、三量体であったHSF 1, HSF 2, HSF 3はプロテアソーム阻害剤によりほとんどのHSF 1, HSF 2および一部のHSF 3が三量体へと転換されていた。以上の結果よりプロテアソームの阻害によってすべてのHSFが活性化されることが明らかとなった。

次にこの活性化の機構を明らかにする目的で蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミドで細胞を前処理しておいたところ、プロテアソーム阻害剤によるHSFの活性化は全く観察されなかった。細胞内への異常蛋白質の蓄積がHSFの活性化を導くと考えられているが、これだけではプロテアソームの阻害によるHSFの活性化には説明がつかない。つまり、細胞内には新規合成蛋白質のほかにもプロテアソームによって分解を受けるべき多くの蛋白質が存在しており、シクロヘキシミド存在下においてもこれらの蓄積により、HSFの活性化が誘導されるはずである。しかしながらシクロヘキシミドによってHSF

の活性化が完全にブロックされてしまったことから、異常蛋白質の蓄積が一つの可能性として考えられるものの、プロテアソーム活性の阻害によるHSFの活性化を制御する様な因子の存在が示唆される。この仮想因子は不安定でありプロテアソームの阻害により蓄積するが、シクロヘキシミド存在下においてはこの因子自身が蓄積しないためにHSF 1とHSF 3の活性化が起こらないと考えられる。HSF 2はストレスによって活性化されないことから、その活性化機構はHSF 1、HSF 3とは全く異なると考えられている。プロテアソーム阻害剤によってHSF 2自身の蛋白質量が増加したことから、その活性化はそれ自身の蛋白質量で制御されていると考えられる。HSF 2自身がプロテアソームの標的となっている可能性が考えられる。

最後に、HSFのターゲットであるHSPの発現をみたところ、HSP90、HSP70、HSP40およびHSP25はすべて発現が誘導されていた。以上の結果からプロテアソームの阻害は、熱ショック類似の応答を引き起こすことが明らかとなった。

#### 論文審査の結果の要旨

蛋白質分解系がストレス応答に関わる転写因子であるHSFの活性化に関わるかどうかを明らかにする目的で、トリ赤芽球系細胞株HD 6を様々なプロテアーゼ阻害剤で処理しHSFの活性化を調べた。その結果、プロテアソーム阻害剤処理においてのみ特異的にHSFのDNA結合能の獲得が誘導された。このとき、トリの細胞に発現しているHSF 1、HSF 2、およびHSF 3の3つのHSF全てにDNA結合能が誘導されていた。さらにHSF 2においてはそれ自身の蛋白質量が増加しており、HSF 1とHSF 3について顕著なリン酸化を認めた。同処理により各HSFの三量体形成、核移行も確認され、プロテアソーム活性の阻害がすべてのHSFの活性化を引き起こすことが示された。

更に、HSFの標的遺伝子であるストレス蛋白質は全てmRNA、タンパク質のレベルで誘導されていたことからプロテアソームの阻害は熱ショック類似の応答を起こすことが示され、蛋白質分解系がHSFの活性化に関与することが明らかとなった。

以上の研究は、普遍的な生体防御機構である熱ショック応答の転写調節機構の理解に貢献し、様々な病的状態において生体が受けるストレスからの回避機構の解明に大きく寄与するものである。

従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成11年2月2日実施の論文内容とそれに関連した試問をうけ、合格と認められたものである。