

89-3007

## 新しく発見されたストレス(熱ショック)蛋白質 の発現調節に関する研究

代表研究者 京都大学胸部疾患研究所教授 永田 和宏  
協同研究者 京都大学胸部疾患研究所助手 平 芳一 法

### 研究目的

熱や重金属など、種々のストレスにさらされたとき、生体は細胞レベルでそのストレスに対応し、速やかに一群のストレス蛋白質(熱ショック蛋白質、HSPと呼ばれることが多い)を合成する。HSPの機能に関する研究は、ここ1、2年急速に進展し、ストレス時の応急防御機能だけでなく、蛋白質の膜透過や会合等、細胞の生存そのものにとってなくてはならない役割を果たしていることが明らかになってきた。

本研究者は、従来のHSPの他に分子量47,000の新しいHSP(HSP 47)を発見した。HSP 47は、熱ショックのみならず、細胞の悪性転換によっても、また細胞分化によっても発現調節を受けており、きわめて興味深いHSPである。本研究は、HSP 47の遺伝子をクローニングし、そのプロモーター領域の解析を通じて、ストレスおよび悪性転換、分化に伴うHSP 47の発現調節機構を遺伝子レベルで明らかにするとともに、本蛋白質の生理的な機能を探ることを目的とする。また、熱ショック感受性のプロモーターを利用することで、将来的には重金属などの環境汚染に対するバイオセンサー開発が考えられ、その基礎研究ともなるものである。

### 研究経過および成果

HSP 47は、熱ショックなどのストレスによって誘導されるほかに、細胞の癌化によって発現が抑制され、またF9細胞などある種の細胞が分化する際には、劇的に発現が促進される。HSP 47は、小胞体内でプロコラーゲンと結合し、その分泌あるいはプロセッシングに関与するコラーゲン特異的分子シャペロンと考えられるが、興味深いことに、HSP 47の発現はこれまで例外なくコラーゲンの発現と相関している。すなわち、コラーゲンを産生している細胞ではHSP 47の合成も多く、逆にコラーゲン産生のない細胞には、HSP 47は検出されない。従ってHSP 47の発現調節機構を探ることは、その機能を探る上でも重要な点である。

本助成期間中に次のような成果を得た。

#### 1. HSP 47のcDNA クローニング

ニワトリおよびマウスの繊維芽細胞よりcDNAライブラリーを作成し、HSP 47のcDNAをクローニングした。HSP 47はその配列から、セリン型プロテアーゼの阻害剤であるセルピファミリーに属する蛋白質であることが判明した。他のセルピファミリー蛋白質はすべて分泌されるのに対し、HSP 47は小胞体に局在する蛋白質であることがわかっている。HSP 47 cDNAのN末端にはシグナルペプチドがあるが、C末端には、RDEL(Arg-Asp-Glu-Leu)が存在し、このRDEL配列が小胞体への残留シグナルとして機能していることがわかり、HSP 47は、セルピファミリーでありながら、小胞体に存在することの理由が明らかになった。

#### 2. HSP 47のゲノムDNA クローニング

マウス肝より調製した遺伝子DNAライブラリーより、マウスcDNAをプローブとしてゲノムDNAのクローニングを行った。全長約7.5 kbのクローンを得、そのエキソン・イントロン構造を明らかにした。HSP 47遺伝子は、6つのイントロンより成り、そのエキソン・イントロン構造はセルピファミリーのものと酷似していた。

さらにHSP 47遺伝子のプロモーター領域を調べたところ、TATAボックス上流約80 bpのところに、典型的なheat shock element(HSE)が存在し、HSP 47が正しくストレス蛋白質であることが証明された。このHSEが、熱ショックによるHSP 47の誘導に関与しているかを明らかにするため、プロモーター領域における種々の欠損変異を作成し、CAT解析を用いて、プロモーター活性を調べた。その結果HSP 47においても、このHSEが熱ショックによる誘導を担っていること、熱ショックによって正常時(非ストレス下)の約180倍の誘導が見られることが明らかになった。

現在、このプロモーター領域において、HSP 47の構成的発現を担っているエレメントの同定を行っている。すでにTATAボックス上流約380 bp以内のところに構成的発現に関与するエレメントを特定しており、この部分にtype Iコラーゲンの同じ部位と共通す

るエレメントの存在も認めている。今後は、これらの部位が、HSP 47 とコラーゲンとの協調的な発現調節に関与しているものか否かを明らかにしていく。

### 3. 熱ショックによる HSP 47 の alternative splicing

熱ショックをかけることにより、HSP 47 遺伝子は、その 5' 非コード領域においてのみ alternative splicing を受けることが明らかになった。alternative splicing は発生途上の遺伝子発現や、組織特異性に関与する現象として重要であるが、今回それが人工的操作によって引き起こされることがわかった意義は大きい。

### 主な発表や論文

- 1) A. Nakai, K. Hirayoshi and K. Nagata: Transformation of BALB/3T3 cells by simian virus 40 causes a decreased synthesis of a collagen-binding protein (HSP47), *J. Biol. Chem.* **265**(2): 992-999 (1990).
- 2) A. Tsuru, N. Nakamura, E. Takayama, Y. Suzuki, K. Hirayoshi and K. Nagata: Regulation of the expression of vimentin gene during the differentiation of mouse myeloid leukemia cells, *J. Cell Biol.* **110**(5): 1655-1664 (1990).
- 3) A. Nakai, C. Hirayama, K. Ohtsuka, K. Hirayoshi and K. Nagata: A novel ATP-binding heat inducible protein of Mr=37,000 that is sensitive to transformation in BALB/3T3 cells, *J. Cell. Physiol.* **143**(3): 577-589 (1990).
- 4) A. Utani, T. Tanaka, C. Nishigori, Y. Miyachi, S. Imamura, M. Hosokawa, T. Takeda, K. Hirayoshi and K. Nagata: Another mechanism of the defect in type III collagen accumulation into the tissues of a patient with Ehlers-Danlos syndrome type IV: Increased intracellular degradation of type III procollagen, *Lab. Invest.* **63**(2): 181-188 (1990).
- 5) N. Hosokawa, K. Hirayoshi, A. Nakai, Y. Hosokawa, N. Marui, M. Yoshida, T. Sakai, H. Nishino, A. Aoike, K. Kawai and K. Nagata: Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins, *Cell Struct. Funct.* **15**(6): 393-401 (1990).
- 6) A. Nakai, M. Satoh, K. Hirayoshi and K. Nagata: Identification of the ATP-binding heat-inducible protein of Mr=37,000 as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**(1): 59-64 (1991).
- 7) K. Hirayoshi, A. Tsuru, M. Yamashita, Y. Yamamoto-Yamaguchi, K. Yasukawa, M. Hozumi, D. V. Goeddel and K. Nagata: Both D factor/LIF and IL-6 inhibit the differentiation of mouse teratocarcinoma F9 cells, *FEBS Lett.* **282**(2): 401-404 (1991).
- 8) M. Michishita, M. Satoh, M. Yamaguchi, M. Okuma and K. Nagata: Phosphorylation of the stress protein HSP27 is an early event in murine myelomonocytic leukemic cell differentiation induced by leukemia inhibitory factor/D factor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**(3): 979-984 (1991).
- 9) K. Hirayoshi, H. Kudo, H. Takechi, A. Nakai, A. Iwamatsu, K. M. Yamada and K. Nagata: HSP47: a tissue-specific, transformation-sensitive, collagen-binding heat shock protein of chick embryo fibroblasts, *Mol. Cell. Biol.* **11**(8): 4036-4045 (1991).
- 10) K. Nagata, A. Nakai, N. Hosokawa, M. Kudo, H. Takechi, M. Satoh and K. Hirayoshi: Interaction of HSP47 with newly synthesized procollagen, and regulation of HSP expression, In *Heat Shock*. (Eds. B. Maresca and S. Lindquist), 105-110 (1991).
- 11) K. Nagata, H. Takechi, H. Kudo, A. Nakai, M. Satoh and K. Hirayoshi: Regulation and function of collagen-binding heat shock protein: HSP47, In *Radiation Research* (Eds. W. C. Dewey, M. Edington, R. J. M. Fry, E. J. Hall and G. F. Whitmore), Academic Press, pp. 976-979 (1992).
- 12) H. Takechi, K. Hirayoshi, A. Nakai, H. Kudo, S. Saga and K. Nagata: Molecular cloning of a mouse 47-kDa heat-shock protein(HSP47), a collagen-binding stress protein, and its expression during the differentiation of F9 teratocarcinoma cells, *Eur. J. Biochem.* **206** (2): 323-329 (1992).
- 13) N. Kioka, N. Hosokawa, T. Komano, K. Hirayoshi, K. Nagata and K. Ueda: Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the increase of human multidrug resistance gene (MDR1) expression caused by arsenite, *FEBS Lett.* **301** (3): 307-309 (1992).
- 14) A. Nakai, M. Satoh, K. Hirayoshi and K. Nagata: Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum, *J. Cell Biol.* **117** (4): 903-914 (1992).
- 15) N. Hosokawa, K. Hirayoshi, H. Kudo, H. Takechi, A. Aoike, K. Kawai and K. Nagata: Inhibition of the activation of heat shock factor *in vivo* and *in vitro* by flavonoids, *Mol. Cell. Biol.* **12** (8): 3490-3498 (1992).
- 16) N. Hosokawa, H. Takechi, S. Yokota, K. Hirayoshi and K. Nagata: Structure of the gene encoding mouse 47-kDa heat-shock protein (HSP47), *Gene*, In press (1993).