

## DNAに対する金属の結合が遺伝子発現調節においてなぜ重要なのか？

田 和 理 市, 桜 井 弘

(京都薬科大学・代謝分析学教室\*)

### Importance of Metal Binding to DNA on Regulation of Gene Expression

Riichi TAWA and Hiromu SAKURAI

*Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry*

*Kyoto Pharmaceutical University*

The biological trace elements contribute to many important cellular functions. It has been interested for their roles in regulation of gene expression. The metallothioneins (MTs) inductions in cells have been widely investigated as a cellular response for some exogeneous metals, and their inductions are mainly based on the transcriptional level which is regulated by some proteins reacting with metals. The upstream of the MT gene promoter region is located by the metal responsive elements (MRE) which react directly and characteristically with some metals, e.g., Cd, Zn, Ag, Cr or Cu. Many studies of finding and isolating the transcriptional factors as MT gene regulating protein have been started and some proteins, e.g., MTF-1 which reacts with zinc ion have been reported. Therefore, it is important to prove the secondary DNA structural changes by reaction with metal, especially those leading to study the metal effects to regulation of MT gene expression.

In this study we measured the digestive inhibitions of some restriction endonucleases by Cu (II) ion in a relatively quantitative manner using the new constructed plasmid DNAs which contain the human MT-IIA promoter gene (pKB8) or the rat SOD-Cu chaperon cDNA (pRCuSD) in pUC19. It was also indicated that the complex formation between linearized pKB8 fragments by *Bss*H II and the proteins involved in HeLa cell nuclear extract in the presence of Cu (II) ion.

生体微量金属の作用は、本来非特異的なものが多く、細胞機能に与える作用を分子レベルで明らかにしようとするのが困難な場合が多い。しかし、遺伝子の発現調節機構における金属の役割が注目されてきた<sup>1)</sup>。金属に対する細胞応答の一つとして、メタロチオネイン（以下MT）の誘導がある。その誘導は主としてその遺伝子転写活性の促進に基づき、金属はその転写活性化を直接制御するとされる<sup>2)</sup>。MT遺伝子上流には遺伝子に金属誘導性を与える金属制御性配列（MRE）が複数個同定されている（Fig. 1）。従来より、MREに結合し、転写を活性化する制御タンパク質の探索が多くの研究者により行われ、金属を介するMRE結合活性がいくつか報告された<sup>3)</sup>。したがってMT誘導機構の研究は、金属に対する細胞応答としての遺伝子発現調節を研究するうえでの有用なモデルとなる。本研究では、MREのDNA配列を複数個含むヒトMT-IIAプロモーター遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、Cu(II)イオンが及ぼすDNAの2次的な構造変化を制限酵素切断阻害から考察した。またCu(II)イオン存在下でのヒトMT-IIAプロモーター遺伝子を含むフラグメントと細胞核タンパク質との複合体生成についても検討した。

\*所在地：京都市山科区御陵中内町5（〒607-8414）

```

                                Nar I                                BssH II
tgtctgcaact tccaaccggc gccgcaagca gcattcccag tcccgetttc acccgcgcgc
acagacgtga aggttgccg cggcgttcgt cgtaagggtc agggcgaaag tgggcgcgcg

                                (g)
taacggctca ggttcgagta caggacagga gggaggggag ctgtgcacac ggcggaggcg
attgcccagat ccaagctcat gtcctgtcct ccctcccctc gacacgtgtg ccgcctccgc

Dra III                                (f)
caccggcgtgg gcaccagca cccggtacac tgtgtcctcc cgctgcaccc agccccttea
gtgcccacc cgtgggtcgt gggccatgtg acacaggagg gcgacgtggg tcggggaagt

                                Sac II
gcccgaggcg tccccgaggc gcaagtgggc cgccttcagg gaactgaccg cccgcggccc
cgggctccgc aggggctccg cgttcaccgc gcggaagtcc cttgactggc gggcgcggcg

                                (d)                                (c)    BssH II Eco52 I
gtgtgcagag ccgggtgcgc ccggcccagt gcgcgcggcc gggtgtttcg cttggagccg
cacacgtctc ggcccacgcg ggccgggtca cgcgcgcccg cccacaaagc gaacctcggc
                                (e)

                                Eco52 I                                (a)
caagtgactt ctagcgcggg gcgtgtgcag gcacggccgg ggcgggctt ttgcaactcgt
gttcaactgaa gatcgcgcgc cgcacacgtc cgtgcccggc ccgcccga aacgtgagca
                                (b)

cccggctctt tctagctata aacctgctt gccgcgctgc actccaccac gcctcctcca
gggcccagaa agatcgatat ttgtgacgaa cggcgcgacg tgaggtgggt cggagagggt

```

**Fig. 1** Recognition sequences (*italic*) by restriction enzymes and MRE a-g sites (underlined) in human MT-IIA promoter gene  
 (a) MREa, (b) MREb, (c) MREc, (d) MREd, (e) MREe, (f) MREf, (g) MREg;

## 実験方法

ヒトMT-IIAプロモーター遺伝子 (845 bp, ヒューマンサイエンス振興財団) を含むプラスミドpKB8 (3495 bp) とラットSOD銅シャペロンcDNA (837 bp, Hiromura, M. et al., AF255305) を含むpRCuSD (3487 bp) は, pUC19 (NEB) に構築し, 大腸菌DH5a (インビトロジェン) に導入したのからGenElute™ Plasmid Maxprep Kit (シグマアルドリッチジャパン) を用いて単離精製した。

pKB8およびpRCuSD (0.5 μg) を *Bst*X I (東洋紡) により消化して水 (Milli-QII, ミリポア) で全量500 μLとした後, アミコンMicropure-EX Enzyme Remover (ミリポア) とMicropure Concentration YM-100 (ミリポア) にて脱酵素, 脱塩したものを10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4), 50 mM NaCl, 30 mM CuCl<sub>2</sub>を加えて全量20 μLとし, 50℃で48時間反応した。反応後, 水で全量500 μLとしたものをMicropure Concentration YM-100 (ミリポア) にて脱金属処理し, *Bss*H II (東洋紡), *Sac* II (NEB), *Eco*52 I (宝酒造), *Eco*RI (宝酒造), *Nar* I (NEB), *Sma* I (東洋紡), *Dra* III (NEB) *Msc* I (NEB), *Pst* I (東洋紡) および *Nae* I (東洋紡) にて1時間消化反応した。酵素切断阻害は, 反応処理したプラスミドDNAをHowly緩衝液 (pH 8) 中, 0.8%アガロースゲル (Takara LO3) 電気泳動し, エチジウムブロミド (0.5 μg/mL) により染色し, 解析した。

ゲルシフトアッセイは, 既存の方法に従って行った<sup>4)</sup>。pKB8 (0.5 μg) を *Bst*X I (東洋紡), *Bss*H IIにより消化したものをアミコンMicropure-EX Enzyme Remover (ミリポア) とMicropure Concentration YM-100 (ミリポア) にて脱酵素, 脱塩し, HeLa細胞核抽出液 (タンパク質含量6.17 μg) と0, 500あるいは1000 μM CuCl<sub>2</sub>溶液の存在下, 反応液 (6 mM Tris-HCl pH 7.4, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.05 mg/mL BSA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) を加えて全量20 μLとしたものを37℃, 20分間反応した。反応後の核タンパク質-DNA複合体の生成は, Howly緩衝液 (pH 8) 中0.8%アガロースゲル電気泳動し, エチジウムブロミドにより染色し, 撮影した。

## 結果と考察

金属による制限酵素切断阻害 30 mM CuCl<sub>2</sub> による pKB8 および pRCuSD の制限酵素切断阻害の結果を Table. 1 に示す。pKB8 では各酵素が認識部位を持つにも関わらず、Cu (II) イオンと反応させると切断阻害が見られた。これは、*BssH* II, *Sac* II, *Eco52* I, *Nar* I, *Sma* I および *Nae* I の認識配列中に CG 配列を含むことで、G に対して親和性を持つ Cu (II) イオンの結合そのものによる酵素の結合を阻害したことによる、あるいは結合による DNA の立体構造変化 (屈曲、巻戻し) などの二次的な影響によるものと考えられる。しかし、*EcoR* I に対しては pBR8 が 1 箇所の認識部位を有するにも関わらず、Cu (II) イオンに関係なく 100% 切断が生じたが、その原因は判らない。一方、pRCuSD では、*Nae* I 以外の酵素において Cu (II) イオンの存在による切断阻害の影響は認められなかった。

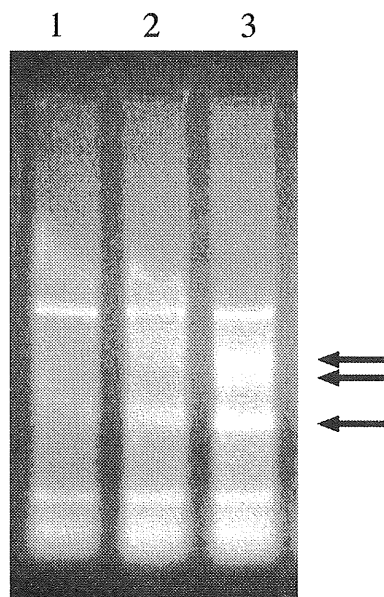
pKB8 - *BssH* II DNA 断片と HeLa 細胞核タンパク質との相互作用 Cu (II) イオン濃度の増加とともに、pKB8 の *BssH* II 処理により生じた断片 (2628 bp, 651 bp) 間に新たなバンドが認められた (Fig. 2)。これは、*BssH* II 処理により生じた断片のいずれかと核抽出物中のタンパク質との複合体が、Cu (II) イオンの存在により生成することを示している。しかし、pKB8 / *BssH* II からの DNA 断片と結合するタンパク質の詳細については、本実験では確認できていない。

**Table 1.** Remaining ratio (%) of the plasmid original DNA band of the after digestion with/without Cu (II) ion

Restriction Enzymes (Restriction Sites)	pKB8		pRCuSD	
	Cu (+)	Cu (-)	Cu (+)	Cu (-)
<i>BssH</i> II (G/CGCGC)	28.7 ± 3.2 (3)	0 (3)	100 (0)	100 (0)
<i>Sac</i> II (CCGC/GG)	2.6 ± 3.0 (2)	0 (2)	100 (0)	100 (0)
<i>Eco52</i> I (C/GGCCCG)	47.8 ± 4.1 (3)	3.1 (3)	100 (0)	100 (0)
<i>EcoR</i> I (G/AATTC)	0 (2)	0 (2)	0 (4)	0 (4)
<i>Nar</i> I (GG/CGCC)	13.8 ± 0.1 (3)	0 (3)	100 (3)	99.0 ± 1.8 (3)
<i>Sma</i> I (CCC/GGG)	13.7 ± 3.0 (2)	12.5 ± 2.5 (2)	0 (3)	0 (3)
<i>Dra</i> III (CACNNN/GTG)	100 (2)	100 (2)	97.9 ± 3.7 (0)	93.4 ± 7.0 (0)
<i>Msc</i> I (TGG/CCA)	-	-	0 (3)	0 (3)
<i>Pst</i> I (CTGCA/G)	-	-	0 (2)	0 (2)
<i>Nae</i> I (GCC/GGC)	-	-	46.1 ± 7.0 (3)	20.1 ± 7.0 (3)

\*pKB8 and pRCuSD were digested with *Bst*X I and *Hind* III, respectively, for linearization before reaction with 30 mM Cu (II) ion (more detail, see text).

\*The number of parenthesis represents the band numbers produced by digestion with each restriction enzyme.



**Fig. 2** Binding of HeLa cell nuclear extract to the pKB8 fragments by restriction enzyme *BssH* II digestion

The binding reaction of the HeLa cell nuclear extract (6.17 µg protein) to the linearized pKB8 DNA (0.5 µg) was carried out in the solution containing 6 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.05 mg/mL BSA and 2 mM MgCl<sub>2</sub> at 37 °C for 20 min

The concentration of Cu (II) ion is 1: None; 2: 500; 3: 1000 µM.

The arrows in Figure show the new bands indicating the complex formation of DNA fragments with the nuclear proteins.

文 献

- 1) Finney, L.A. and O'Halloran, T.V. (2003) *Science* 300: 931.
- 2) Murata, M., Gong, P., Suzuki, K. and Koizumi, S. (1999) *J. Cell. Physiol.* 180: 105.
- 3) Lichtleu, P., Wang, Y., Belser, T., Georgiev, O., Certa, U., Sack, R. and Schaffner, W. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29: 1514.
- 4) Taylor, J.D., Ackroyd, A.J. and Halford, S.E. (1994): *DNA-Protein Interaction* (Methods in Molecular Biology Vol. 30), ed. by Kueale, G.G., Humana Press, Totowa: pp. 263 - 279.