

メタロチオネイン遺伝子発現における銅イオンによる メタルシグナリング機構

田 和 理 市^{1),2)}, 桜 井 弘²⁾

(¹⁾広島国際大学薬学部・薬物生体分析学教室*, (²⁾京都薬科大学・代謝分析学教室**)

Signal Transduction by Copper Ion for Metallothionein Gene Expression

Riichi TAWA^{1),2)} and Hiromu SAKURAI²⁾

¹⁾Laboratory of Medicinal and Biochemical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Science,
Hiroshima International University

²⁾Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

Transcription of mammalian metallothionein (MT) genes is activated by a various metals including Zn, Cd, Cu, Hg, Ag and so on. The control sequences located in the 5'-flanking region of MT genes revealed that the short DNA elements, which are called metal responsive elements (MREs) and contain less conserved GC-rich region, mediate metal responsiveness. MREs were initially shown to mediate transcriptional response of MT gene to Zn and Cd, and more recently to oxidative stress. However, the other metals have not shown to be essential for metal-induced transcriptional regulation of MT. In this study, the effect of Cu²⁺ ion to binding of MREs sequences to the nuclear protein from HeLa cells stimulated with TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate) was investigated by the gel shift assay, using the plasmid pKB8 which was constructed the human metallothionein (MT)-IIA promoter gene in pUC19.

メタロチオネイン (MT) 遺伝子の転写は種々の金属イオンに応答して誘導される。MT 遺伝子の5'上流の制御領域の解析から、重金属依存性の転写制御を担うMREs (Metal Responsive Elements) と言われるDNA配列が複数 (MRE_a-MRE_g) 存在することが証明された。また、MT-IおよびMT-II遺伝子の金属依存的な転写活性化に対して中心的な役割を果たす転写因子として、MTF-1が見い出された。この転写因子はZnフィンガー構造6個を有し、そのシグナル応答機構について詳細に調べられてきた¹⁾。しかし、Zn以外の他の金属、特にレドックス活性な金属に対するMTの発現誘導機構についてはいまだほとんど不明のままである。

我々は、金属によるMTの発現誘導機構をメタルシグナリング分子機構の一つと考え、ヒトMT-IIA遺伝子の制御領域中の全てのMREを含むプラスミドを構築し、各MRE中に認識配列を持つ制限酵素を検索し、Cu²⁺イオン等による認識・切断阻害およびCu²⁺イオン共存下での細胞核内タンパク質とMREを含むプラスミドDNAとの結合の可能性を示唆する結果を示した²⁾。本研究では、MT遺伝子を発現誘導するCu²⁺イオンのMRE配列へのレドックスを伴う直接的な結合による転写誘導活性な核タンパク質への影響などのメタルシグナリング機構についてより詳細に考察するため、サイトカインあるいは発ガンプロモーターなどによりMT遺伝子を高発現するように誘導処理した細胞の核抽出物を用いた核内タンパク質とMREとの結合における、Cu²⁺イオンの関与について検討した。

*所在地：呉市広古新開5-1-1 (〒737-0112)

**所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

実験方法

ヒトMT-IIAプロモーター遺伝子(840 bp)はプラスミドpJB8(8.14 kbp)(ヒューマンサイエンス振興財団から供与)をpUC19(NEB社)のHind III-BamH Iサイトに挿入し、pKB8とした(3495 bp)。構築したプラスミドを大腸菌DH5 α (インビトロジェン社)に導入し、pKB8をGenElute™ Plasmid Maxprep Kit(シグマアルドリッチ・ジャパン社)を用いて単離精製した。

HeLa細胞をTPA(12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate)50 ng/mL含む培地中で2時間、37°Cで培養したものから抽出した核タンパク質(20 mM Hepes pH 7.9, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 20% glycerol, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT)に懸濁し、3.9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Active Motif社製)を用いた。また、同様にHeLa細胞をTNF(Tumor Necrosis Factor)- α 20 ng/mLを含む培地中で30分間、37°Cで培養したものの核タンパク質をLysis緩衝液(20 mM Hepes pH7.5, 350 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Igepal-CA630, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 5 mM DTT, 0.5 mM PMSF)に懸濁したものをを用いた(2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)(Active Motif社)。核タンパク質はいずれもブラッドフォード法により定量した。

pKB8を制限酵素BstX Iによって切断して直鎖状としたものを、Micro-EZ Enzyme Remover(アミコン社)とMicrocon Concentration TM-100(アミコン社)により除蛋白・脱塩・濃縮し、さらに、pKB8中のMRE配列に認識サイトを持つ制限酵素BssH II, Eco52 I, Nar IおよびSac IIによりDNA断片化した。DNA断片0.5 μg を核タンパク質懸濁液(タンパク質5 μg)と0, 500, 1000あるいは2000 μM のCuCl₂溶液の存在下、結合反応液(6 mM Tris·HCl pH 7.4, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.05 mg/mL BSA, 2 mM MgCl₂)を加えて全量20 μL とし、37°C, 20分間反応した。核タンパク質とDNAとの複合体生成は、0.8%アガロースゲル電気泳動による新しいバンドの出現により確認し、エチジウムブロミド(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)により染色後撮影した。

結果と考察

これまでの結果として、MRE_a~MRE_gを含むヒトMT-IIAプロモーター遺伝子をpUC19に構築したプラスミドpKB8に対して、種々の金属イオン(Cd²⁺, Zn²⁺, Cr³⁺, Ag⁺ならびにCu²⁺)の存在下でMRE配列中に認識サイトを持つ制限酵素(BssH II, Sac II, Eco52 I, EcoR I, Nar IおよびSma I)による消化実験を試みたところ、特に30 mM Cu²⁺イオンにおいて切断阻害が認められ、Cu²⁺イオンのMRE配列への結合および結合によるDNAラセンの屈曲あるいは巻き戻しなどの構造変化の影響が示唆された²⁾。また、pKB8のMRE_c配列中に認識切断サイト(G/CGCGC)を持つBssH IIにより消化したDNA断片を用いて、Cu²⁺イオン(500および1000 μM)の存在下でのMTを発現するHeLa細胞からの核タンパク質との結合実験をゲルシフトアッセイにより検討したところ、Cu²⁺イオン濃度の増加とともに複合体の生成が認められ、MRE_c配列と核タンパク質との結合におけるCu²⁺イオンの必要性が示唆された²⁾。

本研究では、ヒトMT-IIA遺伝子プロモーターのMRE配列と核タンパク質との複合体生成におけるCu²⁺イオンの必要性についてより詳細に検討した。すなわち、MT-IIA遺伝子の発現増加の誘導が確認されている発ガンプロモーターとしてのTPAあるいはサイトカインの一つであるTNF- α により処理したHeLa細胞の核タンパク質との複合体生成に対するCu²⁺イオンの存在効果について考察した。MTは発ガンイニシエーターや発ガンプロモーターに対する重要な感受性ファクターとして働き、また、これらによる酸化ストレスに対する強力な抗酸化物質である³⁾。実際、TPAによりマウス皮膚においてMT遺伝子が発現増加することが報告されている⁴⁾。また、サイトカインであるインターロイキン(IL)-6やTNF- α がAPPs(急性血漿タンパク質)遺伝子の発現を介したMT発現の増加に影響するということが明らかにされた⁵⁾。

pKB8の制限酵素消化DNA 0.5 μg に対するTPAにより処理したHeLa細胞からの核タンパク質5 μg の結合について、100~2000 μM Cu²⁺イオン存在下において検討した結果がFig. 1である。TPA 50 ng/mLで2時間処理した細胞からの核タンパク質との結合においてDNA断片との複合体形成を示すバンドが明瞭に認められた。一方、TNF- α 処理した細胞からの核タンパク質との場合には複合体生成を示すバンドが検出されたが、その濃度は少なかった。この相違は、

TPAとTNF- α の刺激に対するHeLa細胞におけるMT発現応答の差によるものか、或いは、もしそれぞれの核タンパク質が互いに異なるものであれば、各DNA断片への結合に対するCu²⁺イオンの影響の違いによるものと考えられるが、詳細は今後検討しなければならない。

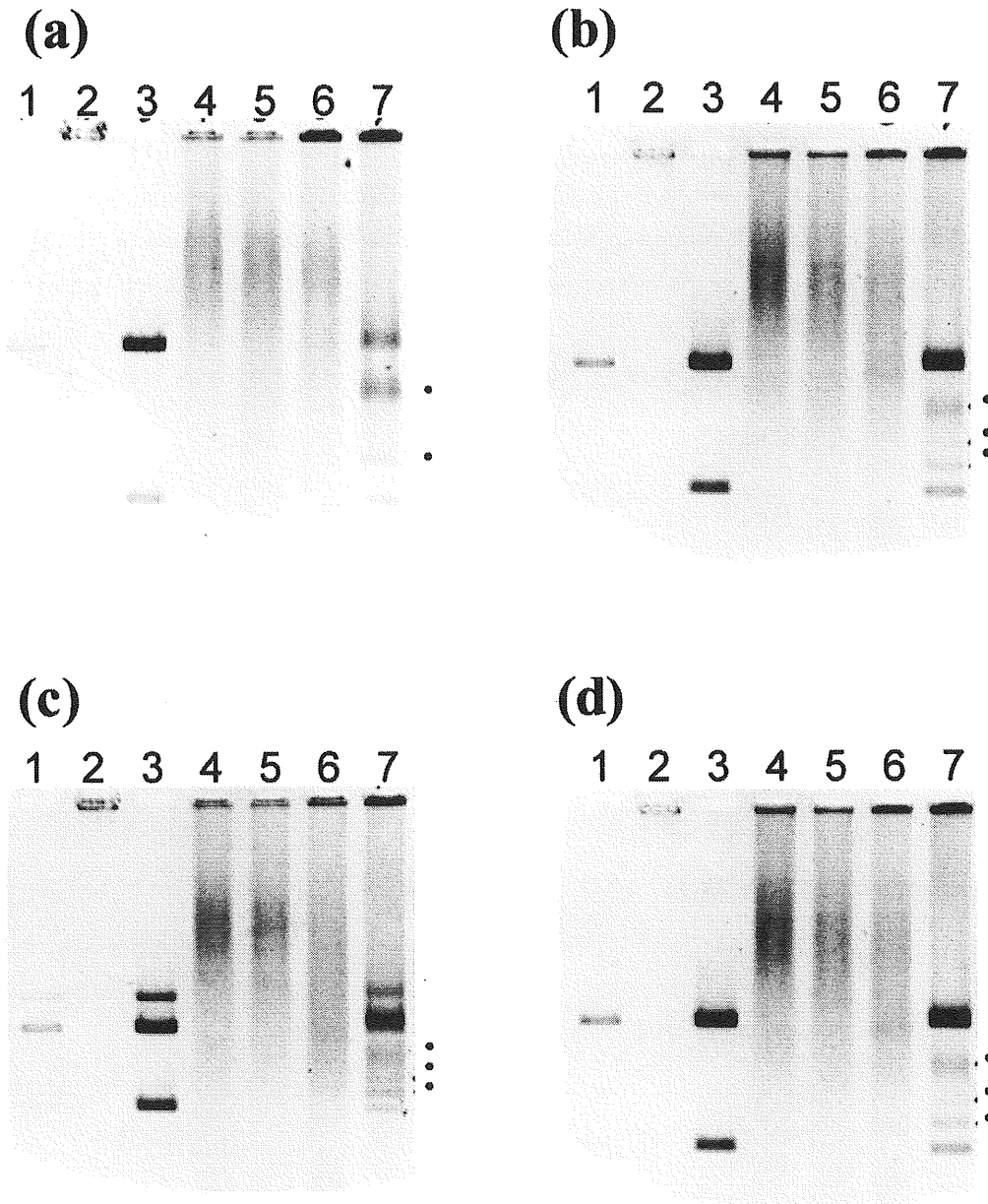


Fig. 1 Effect of Cu²⁺ ion on binding of HeLa cells nuclear protein to the DNA fragments produced from pKB8 by the restriction enzymes.

The linearized pKB8 with *Bst*X I was digested with a: *Bss*H II, b: *Eco*52 I, c: *Nar* I, d: *Sac* II. The binding reaction of the HeLa cell nuclear protein (5 μ g) to the linearized pKB8 DNA (0.5 μ g) digested with the restriction enzymes in the presence of Cu²⁺ ion was carried out in the solution containing of 6 mM phosphate buffer (pH 7.4), 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.05 mg/mL BSA and 2 mM MgCl₂ at 37°C for 2 min. 1: the linearized pKB8 (DNA), 2: the protein and Cu²⁺ 2000 μ M, 3: DNA and the protein 4: DNA, the protein and Cu²⁺ 100 μ M, 5: DNA, the protein and Cu²⁺ 500 μ M, 6: DNA, the protein and Cu²⁺ 1000 μ M, 7: DNA, the protein and Cu²⁺ 2000 μ M. The dots are the new bands indicating the complex formation between DNA fragment and the nuclear proteins.

文 献

- 1) Westin G, Schaffner W (1988) A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *EMBO J* 7: 3763-3770.
- 2) 田和理市, 桜井 弘 (2003) 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? 微量栄養素研究 20 : 85-88.
- 3) Bilodeau JF, Mirault ME (1999) Increased resistance of GPx-1 transgenic mice to tumor promoter-induced loss of glutathione peroxidase activity in skin. *Int J Cancer* 80: 863-867.
- 4) Oguro T, Liu J, Klaassen CP, Yoshida T (1998) Inhibitory effect of oleanolic acid on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced gene expression in mouse skin. *Toxicol Sci* 45: 88-93.
- 5) Lee DK, Carrasco J, Hidalgo J, Andrews GK (1999) Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem J* 337: 59-65.