

平成21年 3月27日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590125
 研究課題名（和文） 高感度重金属バイオセンサーの開発を目的とする細胞内亜鉛応答システムの研究
 研究課題名（英文） Investigation of the intracellular zinc responsive system for development of a heavy metal biosensor with high sensitivity
 研究代表者
 大塚 文徳 （OTSUKA FUMINORI）
 帝京大学・薬学部・教授
 研究者番号：80160547

研究成果の概要：

細胞内の亜鉛センサーである転写因子 MTF-1 のシステイン、ヒスチジン残基の点変異体を作成し、それら変異体の転写活性化機能を調べることにより MTF-1 の亜鉛応答性に必要なアミノ酸を特定し、その亜鉛応答性機構解明の糸口を得た。また、緑色蛍光タンパク質である GFP および核外輸送シグナルを MTF-1 に付加し、亜鉛依存的に細胞質から核へ移行する MTF-1 を作成した。これは、蛍光の動きを指標にして亜鉛の細胞内濃度を感知する新規バイオイメージングセンサーとして利用できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境衛生学、亜鉛センサー、亜鉛、転写因子

1. 研究開始当初の背景

環境中に存在する微量化学物質の慢性暴露による健康影響が危惧される中、環境化学物質のモニタリングがきわめて重要になっている。特に重金属は土壌や水域の汚染物質として、重要な測定対象として注目されてきた。環境中の重金属の測定法としては、さまざまな機器分析法があるが、感度やコストの点から生体内物質を用いるバイオセンサーの利用が進んでいる。重金属結合タンパク質であるメタロチオネイン (MT) やフィトケラチン、あるいはバクテリアの水銀耐

性システムにおける転写因子 MerR などを重金属感知エレメントとして用い、分光学的あるいは電位差測定などの方法と組み合わせることによって検出感度を向上させた報告もある。しかし、これらは生体分子をバイオセンサーとして用いてはいるが、最終的に目指すところは環境中の各種重金属を超高感度で測定するという、きわめて工学的なものである。一方、生物体をそのままモニタリングに用いる方法、例えば魚類など脊椎動物体内の MT 量測定などによるモニタリングや、培養細胞を用いた評価シ

システムは、その生体影響を考える上できわめて重要な意味をもっている。すなわち、重金属の bioavailability と多様な生体内作用の集積としての効果を見ることができからである。その点、高等動物やその培養細胞を用いるシステムは微生物を用いる単純なものとは異なる有用性を持っており、その開発が期待される。

2. 研究の目的

メタロチオネイン (MT) 遺伝子の転写活性化は高等動物細胞の重金属応答システムの一つである。MT 遺伝子の上流には金属応答性エレメント(MRE)が複数存在し、それに結合する転写因子が MTF-1 である。本研究では MTF-1 を高感度重金属センサーとして利用するために、MTF-1 の重金属応答部位を明確にし、それを端緒として重金属応答機構を明らかにすることを目的としている。得られる結果は、将来的に環境中の重金属に反応する有用なモニタリング用生物を作出するための基礎データとなる。また、MTF-1 は細胞内遊離亜鉛に反応することが明らかになりつつあり、さらに近年細胞内遊離亜鉛の変動がさまざまなストレスや免疫機能、脳障害、老化などと関連することが指摘されていることから、本研究の対象となる重金属応答システムは、環境中重金属のモニタリングとしてだけではなく、細胞内遊離亜鉛濃度の変動を介した環境ストレス感知システムとしての応用も期待できる。

3. 研究の方法

(1) MTF-1 の発現ベクターとその点変異体の作成

ヒト MTF-1 の cDNA (2439-bp) は、その両端の制限酵素サイトを変更した後、真核細胞発現ベクター pCI (プロメガ) の XhoI サイトと NotI サイトの間、あるいは pEGFP/C3 (クロンテック) の HindIII サイトに挿入し、それぞれ pCI/MTF-1、pEGFP-MTF/C3 とした。これら野生型の cDNA に対して、LA PCR™ in vitro Mutagenesis Kit (TaKaRa) あるいは、PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa) を用いて部位特異的な点突然変異を導入した。導入された変異はシーケンシングにより確認した。

(2) 細胞培養

本研究で用いた細胞は dko7 細胞 (MTF-1^{-/-} マウス胎児繊維芽細胞) と HeLa 細胞 (ヒト子宮頸部癌由来) である。dko7 細胞は、10% 胎児血清添加 DMEM 培地、HeLa 細胞は 10% 胎児血清添加 MEM 培地を用いて維持した。

(3) 一過性形質転換による転写機能アッセイ (レポーターアッセイ)

野生型 MTF-1 およびその点変異体の亜鉛依存的な転写活性化能はレポーターアッセイによって評価した。レポータープラスミドとして、CAT 遺伝子の上流にヒト MTIIA 遺伝子の重金属応答性制御領域を有するプラスミド pUCMTCAT を用いた。また、遺伝子導入効率を補正するためのリファレンスプラスミドとして RSV ウィルスプロモーターによってホタルルシフェラーゼを構成的に発現する pRSV-Luc を用いた。

dko7 細胞 2×10^5 個を直径 35mm ディッシュに播種し、24 時間後に培養液を取り替え、その 30 分後に各種プラスミド DNA のトランスフェクションを行った。トランスフェクションするプラスミドは培養当たり、pUCMTCAT 0.4 μ g、pRSV-Luc 0.2 μ g、各種 MTF-1 発現ベクター 0.02 μ g であり、さらに pUC19 プラスミドを加えて全 DNA 量を 1.0 μ g とした。トランスフェクションは FuGENE HD (Roche) を用いた $\text{DNA} : \text{FuGENE HD} = 1(\mu\text{g}) : 3(\mu\text{l})$ 。トランスフェクション後 4 時間目に、最終濃度が 100 μ M となるよう ZnSO₄ を添加し、さらに 4 時間後に細胞をハーベスト、溶解して CAT 活性およびリファレンスの Luc 活性を測定した。それぞれの測定には CAT ELISA Kit (Roche) と Pica (東洋インキ) を用いた。測定値は、CAT 活性をリファレンスである Luc 活性で除し、トランスフェクション効率を補正して表した。

(4) EGFP 融合 MTF-1 および各種点変異体の細胞内分布解析

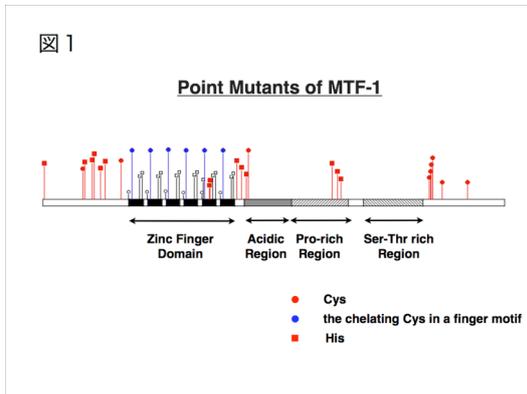
HeLa 細胞 1×10^5 個を含む 200 μ l の培養液を直径 35mm ディッシュ中に置いた直径 1.5cm のカバースリップ上に播種し、細胞付着後 1.8ml の培養液を添加した。細胞播種後 24 時間目に 1.0 μ g の各種 pEGFP-MTF/C3 および EGFP 融合各種変異体の発現ベクターを (3) と同様の方法を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後 24 時間の時点で亜鉛 200 μ M を添加し、1 時間培養した。細胞は Ca, Mg-free PBS <PBS(-)> で 2 回洗浄後、4%ホルムアルデヒド含有 PBS(-) で 20 分間室温に放置して固定を行った。固定液を除去し、PBS(-) で 2 回洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica) を用いて EGFP 融合 MTF-1 の細胞内分布を解析した。

4. 研究成果

(1) 重金属依存性転写因子 MTF-1 の各種点変異体の作成

細胞内での MTF-1 への重金属シグナルの伝達に関しては未だ不明であるが、精製した MTF-1 は試験管内において亜鉛依存的にその標的塩基配列である MRE (metal

responsive element)に結合する。すなわち、少なくとも亜鉛は直接的に MTF-1 に作用すると考えられる。一方、重金属とタンパク質との相互作用に重要なアミノ酸はシステイン (Cys) とヒスチジン (His) である。そこで、MTF-1 を構成するアミノ酸のうち Cys を Tyr あるいは Ser に、His を Asn に変換した点変異体を作成した (図 1)。

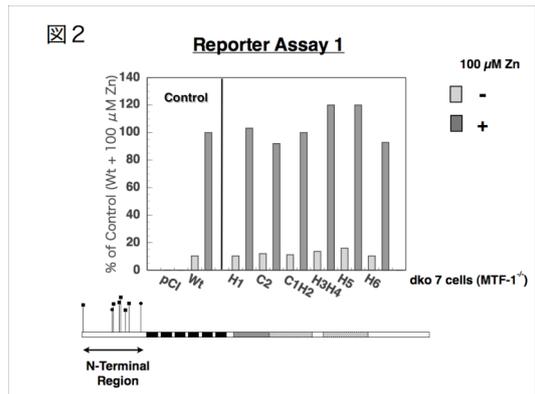


MTF-1 の N 末端領域には His 残基が多く認められる。N 末端領域のすぐ C 末側には 6 個の C₂H₂ 型亜鉛フィンガーを含む DNA 結合ドメインが存在するが、それぞれのフィンガーにおいて亜鉛のキレートに関与する 2 個目の Cys を Tyr に変換した。また、第 5 フィンガーは、亜鉛キレートに関与しないリンカーの位置に 2 個の His が存在しており、これらの変異体も作成した。その他、転写活性化領域および C 末端領域に存在する Cys と His の変異体を作成した。特に C 末端領域には Cys 4 個が一つおきに並ぶシステインクラスターが存在しており、この部分に関しては、Cys 4 個をすべて Tyr に変換した変異体を作成した。

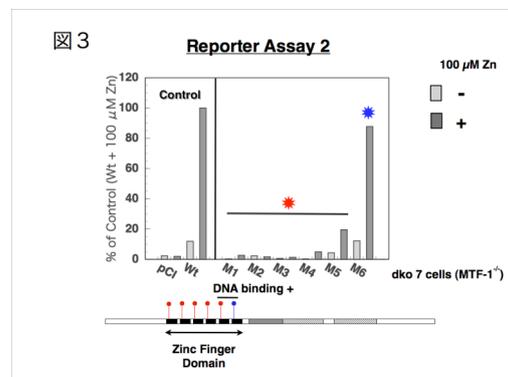
(2) Cys および His 点変異体のレポーターアッセイによる亜鉛依存的転写活性化能の評価

MTF-1 のレポーターアッセイは、無血清培養条件等により亜鉛欠乏状態とした細胞に亜鉛を添加して応答性を高めている研究者も存在するが、我々は通常の血清添加条件で十分に高い亜鉛応答性が得られる方法を確認しており、その方法を用いて点変異体の機能の評価した。

① 図 2 に示すように、MTF-1 の N 末端領域に存在する Cys および His の点変異体はいずれも野生型と遜色ない亜鉛応答性を示し、おそらく N 末端領域に存在する Cys、His 残基は MTF-1 の亜鉛応答には関与しないと思われる。



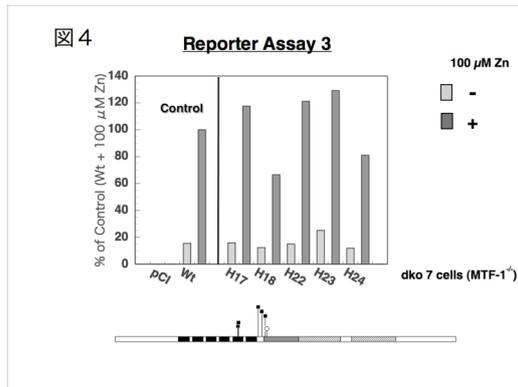
② 亜鉛フィンガードメインの変異体に関しては、第 1～5 フィンガーの変異によって亜鉛依存的な転写活性化能が低下した (図 3)。亜鉛フィンガーは DNA 結合性に関与す



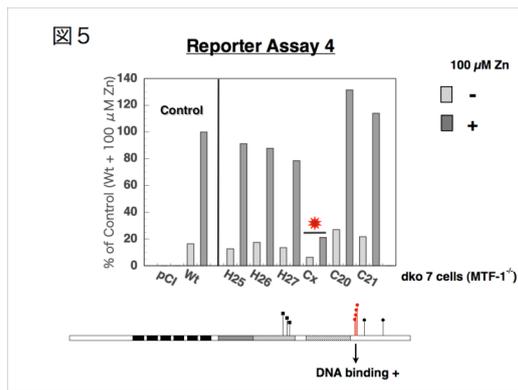
るモチーフであるため、転写活性化能低下の原因は MTF-1 の DNA 結合性の低下であると考えられる。実際、すでに報告しているように、第 1～4 フィンガーの変異は確かに DNA 結合性が低下する。しかし第 5、第 6 フィンガー変異による DNA 結合性の低下は認められないため、第 5、第 6 フィンガーは第 1～4 フィンガーとは性質が異なるものと考えられる。特に第 5 フィンガーは DNA 結合性には関与せず、転写活性化に関係するユニークなフィンガーであることが示唆される。さらに第 5 フィンガーのリンカー部に存在する 2 つの His 残基の変異によっても亜鉛依存的な転写活性化が低下することから (図 4)、おそらく第 5 フィンガーのアミノ酸組成の変化によるフィンガーのタンパク構造の変化も、転写活性化に影響するものと考えられる。また、第 6 フィンガーは DNA 結合性にも転写活性化能にも関与しない。これら 2 つのフィンガーモチーフの役割に関して今後さらなる解析が必要である。

③ 第 5 フィンガーから酸性アミノ酸領域に存在する His 残基の変異はどれも亜鉛依存的な転写活性化に影響を与えなかった (図

4)。酸性アミノ酸領域に存在する Cys の変異に関しては本研究期間内では解析が終了しなかった。



④ プロリンリッチな転写活性化領域に存在する4個の His 残基の変異は転写活性化能に影響しなかった。一方、C 末端領域に存在するシステインクラスターの変異は亜鉛依存的な転写活性を著しく低下させた (図5)。このシステインクラスターの亜鉛依存的な



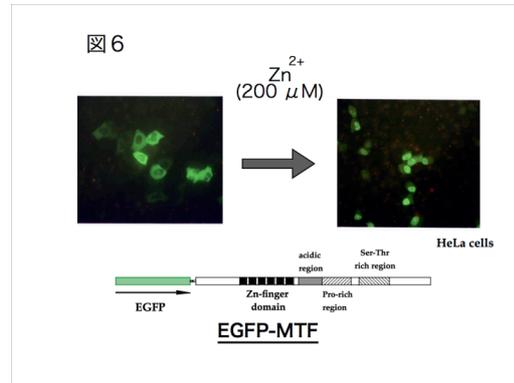
転写活性化への関与はすでに他の研究者からも報告されているが、そのアッセイ法は亜鉛欠乏状態に亜鉛を添加するものであり、今回我々の方法でもその重要性が確かめられた。一方、C 末端領域に存在するシステインクラスター以外の2個の Cys 残基の変異は転写活性化に影響を与えなかった。

以上の結果より、転写因子 MTF-1 において、第5フィンガーと C 末端領域に存在するシステインクラスターが亜鉛依存的な転写活性化に重要であることが示唆され、今後それらの関与する分子メカニズムに興味を持たれる。

(3) EGFP 融合 MTF-1 の亜鉛依存的な核移行とその応用について

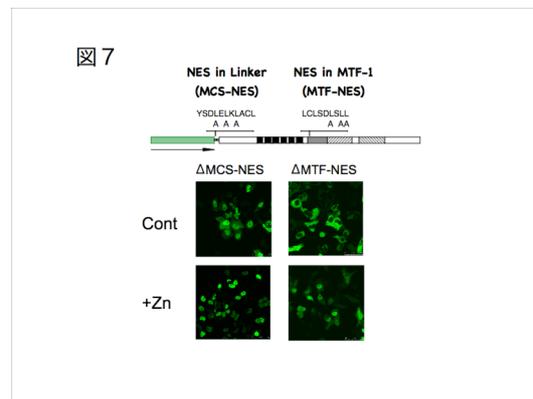
様々な培養細胞株において調べた限り、MTF-1 は亜鉛の添加・非添加に関わらず核に局在する。しかし我々は、N 末端に EGFP

(Enhanced Green Fluorescent Protein) を融合させた MTF-1 は細胞質に局在し、亜鉛の添加によって核移行する現象を見いだしていた (図6)。本研究では、この EGFP 融



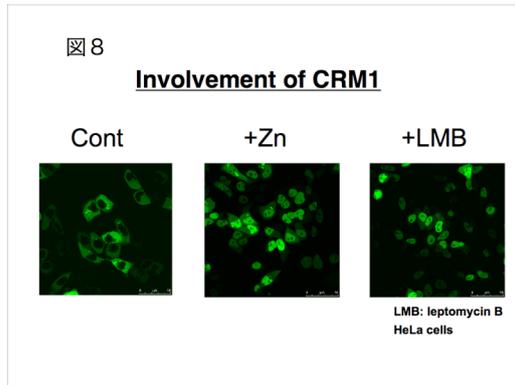
合 MTF-1 の亜鉛依存的核移行のメカニズムを詳細に解析し、以下のような結果を得た。

① NetNES 1.1 Server (Technical University of Denmark) によって EGFP 融合 MTF-1 における Leu-rich な核外輸送シグナル (NES: Nuclear Exporting Signal) の存在を予測したところ、MTF-1 の酸性アミノ酸領域と、EGFP と MTF-1 のリンカー部に NES 様配列の存在が認められた。そこでこれら NES 様配列中の Leu を Ala に変換した変異体を解析したところ、EGFP 融合 MTF-1 の細胞質局在は、EGFP と MTF-1 のリンカー部にある NES 様配列に起因し、MTF-1 内の配列は無関係であることが分かった (図7)。タンパク質の核外輸送に関わる因子は



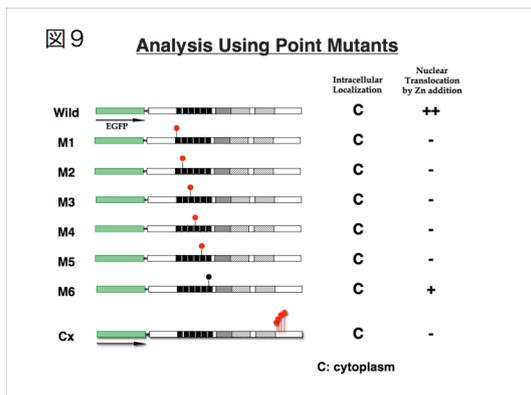
複数報告されているが、その一つである CRM1 の NES 配列への結合を阻害する Leptomycin B を HeLa 細胞培養液に添加して調べたところ、亜鉛の非存在下でも EGFP 融合 MTF-1 は核に局在した (図8)。従って、その細胞質局在には CRM1 が関与することが明らかとなった。以上の結果は、EGFP 融合 MTF-1 の細胞質局在が人工的な NES 付加に起因しており、その亜鉛依存的な核移行は亜鉛添加によって引き起こされた融合タンパクの構造変化により CRM1 が NES から離

脱するためであると考えられる。



② EGFP 融合 MTF-1 の亜鉛依存的な核移行に関わる領域を調べるため、まず、EGFP 部分を除去し、代わりに MTF-1 の C 末端に付加した FLAG タグを指標にして細胞内分布を調べたところ、EGFP 融合 MTF-1 と同様、細胞質局在と亜鉛依存的な核移行を示した。従って、EGFP 融合タンパクの亜鉛依存的な核移行は MTF-1 の亜鉛応答によるものであり、EGFP 部分は無関係であると考えられる。

③ EGFP 融合 MTF-1 の亜鉛依存的な核移行に関わる領域を特定するため、研究成果(1)で述べた様々な点変異体を EGFP と融合させた形で作成し、HeLa 細胞で発現させてその亜鉛依存的核移行を観察した。その結果、亜鉛添加による核移行が完全に抑制される変異は、第 1～第 5 フィンガーおよび、C 末端領域のシステインクラスターであった (図 9)。この結果は、レポーターアッセイで得



られた結果とよく一致する。おそらく、第 1～第 5 フィンガーへの亜鉛の配位が MTF-1 のタンパク構造全体に大きな影響を与えていることが予想される。また、C 末端のシステインクラスターと亜鉛との相互作用も CRM1 の離脱に結びつくようなタンパク構造変化を引き起こしていると考えられ、その転写活性化機構との密接な関係が示唆される。

本研究において、NES と EGFP を人工的に付加することにより、亜鉛依存的に核移行する MTF-1 を作出することができた。将来この分子は、環境中亜鉛濃度を感知するためのバイオイメージングセンサーとしての応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

① 下山多映、大沢基保、小泉信滋、大塚文徳
 重金属応答性転写因子 MTF-1 の細胞内局在
 メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会

2007 年 9 月 29 日、徳島文理大学

② 大塚文徳、下山多映、鈴木 薫、小泉信滋
 転写因子 MTF-1 を介する重金属依存性転写制御

第 52 回日本薬学会関東支部会

2008 年 10 月 4 日、東京理科大学

③ 下山多映、鈴木 薫、小泉信滋、大塚文徳
 重金属応答性転写因子 MTF-1 の細胞内局在
 フォーラム 2008 : 衛生薬学・環境トキシコロジー

2008 年 10 月 18 日、熊本市民会館

④ 鈴木 薫、大塚文徳、小泉信滋
 金属応答性転写因子・MTF-1 の Zn 応答に関与するアミノ酸残基の解析

第 32 回分子生物学会、第 81 回日本生化学会合同年会

2008 年 12 月 11 日、神戸国際展示場

⑤ 下山 多映 小泉信滋 大塚文徳
 重金属依存性転写因子 MTF-1 の亜鉛フィンガードメインは NLS として機能する
 日本薬学会第 129 年会 (京都)

2009 年 3 月 26 日、国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 文徳 (OTSUKA FUMINORI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：80160547

(2) 研究分担者

小泉 信滋 (KOIZUMI SHINJI)

(独) 安衛研 人間工学・リスク管理研究グループ・首席研究員

研究者番号：80183325

(3) 連携研究者

下山 多映 (SHIMOYAMA TAE)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：30433882