

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月20日現在

機関番号：32643
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590136
 研究課題名（和文）細胞内亜鉛応答システムの分子基盤と重金属イメージングセンサーとしての応用
 研究課題名（英文）Molecular basis for intracellular zinc-responsive system and its application as the imaging sensor for heavy metals.
 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（和文）：

新たな重金属センサーを作成する目的で、転写因子 MTF-1 の重金属応答メカニズムを解析した。MTF-1 の欠失変異体や点変異体を用いて、重金属依存的な転写活性化能、細胞内局在、および亜鉛依存的な自己重合などに関与する領域を検索した結果、MTF-1 の亜鉛フィンガードメインはそれらすべてに関与する多機能性フィンガーであることが明らかになった。従って、MTF-1 の亜鉛フィンガードメインは新規重金属センサーをデザインするために有用なモジュールであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

MTF-1 is a heavy-metal dependent transcription factor and the molecular basis of its response to heavy metals is thought to be useful for developing a novel sensor system for heavy metals. Using various deletion and point mutants of MTF-1, we found that the Zn-finger domain does not solely function as the DNA-binding domain, but it plays multifunctional roles for the responses of MTF-1 against heavy metals. This indicates that the Zn-finger domain of MTF-1 is a useful module to design a novel artificial molecule for sensing heavy metals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

生活環境中に存在する微量化学物質の慢性曝露による健康影響が危惧されており、環境化学物質のモニタリングがますます重要になっている。特に重金属は土壌や水域の

汚染物質として現在においても以前と変わらず重要な測定対象である。重金属のモニタリングに生物体や培養細胞を用いる方法は、工学的なセンサーを使用した測定法とは異なり、重金属の生体影響を考える上できわめ

て重要な意味を持っている。すなわち、これらの生物の重金属応答は *bioavailability* を初めとした多様な生体内作用の総合的な結果を反映しているからである。しかし、今のところ生物や生物体内の分子の重金属応答を利用したとしても重金属感知エレメントとして工学的な超高感度測定法へ応用したものが多い。また、重金属に対する生物反応として、重金属誘導性のタンパク質であるメタロチオネイン量を測定するものがあるが、対応する特別な測定法が必要である。そこで、生物の重金属応答を簡便なシグナルに変換して検出できるようなシステムの開発が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、高等動物細胞の重金属応答性転写因子 MTF-1 に着目し、その重金属応答メカニズムを明らかにすることを第一の目的としている。その結果を利用して、細胞内重金属濃度を鋭敏に感知するイメージングシステムを構築し、最終的にはそれを組み込んだ新たなモニタリング生物を作出することを企図している。

3. 研究の方法

(1) MTF-1 の欠失変異体、点変異体あるいは亜鉛フィンガースワッピング変異体の作成。

MTF-1 の各種変異体は、基本的に PCR を用いて作成した (PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit : TAKARA)。また、MTF-1 の 6 個の亜鉛フィンガースワッピング変異体 (フィンガースワッピング) も、PCR によるアミノ酸置換により作成した。すなわち、6 個の亜鉛フィンガーはきわめて似ているため、いくつかの点変異を導入してアミノ酸配列を変化させることにより、配列交換を行った。また、亜鉛フィンガースワッピングの近傍、あるいは中に存在するユニークな制限酵素サイトをj利用してスワッピングを行った。

上記変異体のうちいくつかは、大腸菌の発現ベクターである pET ベクターに搭載し、大腸菌で発現させた後、全長リコンビナントタンパクを SDS ゲル電気泳動により分離・精製した。

(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 HEK293 細胞 (ヒト腎臓由来細胞) である。Dko7 細胞には 10% ウシ胎児血清添加 DMEM 培地、HEK293 培地には 10% ウシ胎児血清および 2mM L-グルタミン添加 DMEM 培地を用い、5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。

(3) 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。すなわち、dko7 細胞 2 × 10⁵ 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。プラスミド DNA は OptiMEM (GIBCO) により希釈し、その組成は pUCMTCAT (レポータープラスミド) 0.4 μg、pRSV-Luc (リファレンスプラスミド) 0.2 μg、各種 MTF-1 発現ベクター 0.02 μg および pUC19 プラスミドにより全 DNA 量を 1.0 μg とした。トランスフェクションは FuGENE HD (Roche) を用い、DNA と FuGENE HD の比は 1(μg) : 3(μl) とした。トランスフェクション後 4 時間目に最終濃度が 100 μM となるように 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。

HEK293 細胞 1 × 10⁵ 個/200 μl 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、細胞が付着した後 1.8ml の培養液を添加した。細胞播種後 1 日目に 1.0 μg の C-末端 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 時間後に培養液を除去し、Ca, Mg-free PBS < PBS(-) > で 2 回洗浄した後、4% ホルムアルデヒド-PBS(-) で室温 20 分間細胞の固定を行った。固定液を除去した後、PBS(-) で 2 回洗浄し、カバースリップをスライドグラス上にのせてサンプルを作成した。細胞内分布は共焦点レーザー顕微鏡 (Leica) を用いて解析した。

(5) シフトウエスタン解析

MTF-1 とその変異体は、培養細胞あるいは大腸菌で発現させた後、その抽出液あるいは精製標品をその結合標的 DNA 配列 (MRE : metal responsive element) と結合反応を行わせた後、シフトウエスタン解析を行った。この解析法では、EMSA 解析と同様の反応と電気泳動解析を行うが、検出するものはラベルした DNA ではなく、泳動ゲル中のタンパクを転写膜上に転写し、免疫染色により MTF-1 を検出した。

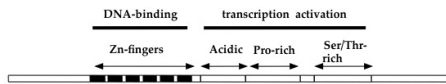
4. 研究成果

(1) 各種変異体の概要

ヒト MTF-1 (hMTF-1) のタンパク構造は図 1 に示すように、典型的なドメイン構造をと

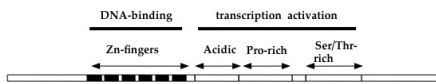
っている。
特に特徴的な構造は6個の連続したC2H2タイプの亜鉛フィンガーを含むドメインで、そのC末側には転写活性化ドメインが3つ存在する。N末領域あるいはC末領域は機能不

図1:hMTF-1のタンパク構造



明
そ
領
の

hMTF-1のタンパク構造



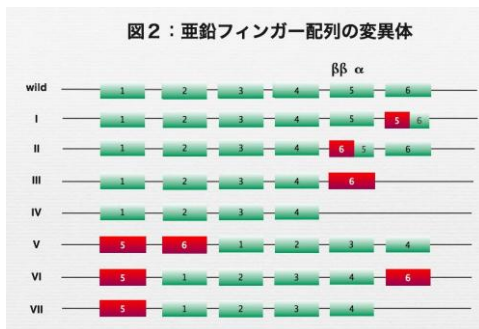
端
或

キ

レートに因する第一スライスをナロシンに変換するように作成しており、すでに作成済みであるフィンガーそれぞれを単独で変異させたものに加え、2個ずつのフィンガー、4個ずつのフィンガーおよび全フィンガーを変異させたものなどを系統的に作成した。

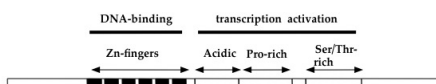
亜鉛フィンガー内部の欠失変異体あるいは配列順番を変えた変異体は、第1～第4フィンガーをDNA結合のコアと考えて変異させないグループとし、①第5および第6フィンガーのββ配列を互いに交換したもの、②第5あるいは第6フィンガーの位置を交換したもの、③第5と第6フィンガーを第1～4フィンガーを挟むように配置したもの、あるいは④第5、6フィンガーの欠失体を作成

図2:亜鉛フィンガー配列の変異体



し;

hMTF-1のタンパク構造



与
点

て、第5フィンガーの亜鉛依存的な転写活性化への関与を示唆する結果を得ていた。そこで今回、第5フィンガーのアミノ酸配列とフィンガードメインにおける位置を変えた変異体を作成し、それが第5フィンガーのアミノ酸配列によるものか、あるいはフィンガー

の位置によるものかを検証した。

第5フィンガーのββ配列を第6フィンガーに変異させたもの(II)や第5フィンガーの位置に第6フィンガーがあるもの(IV)では野生型の約7割の転写活性を維持していた。一方、第5フィンガーの位置をフィンガードメインの最初に移動させると(V～VII)、ほぼすべての転写活性が消失した。従って、第5フィンガーの転写活性に対する関わりとして、フィンガードメインにおける位置が重要であると考えられる。

(3) MTF-1の核局在への亜鉛フィンガーの関与

現在、MTF-1の細胞内局在に関しては未だ確定していない状態である。細胞質に存在しているMTF-1が亜鉛処理によって核移行するという報告もあるが、我々が複数の樹立細胞株(HeLa, HEK293, MCF7, V79など)を調べた結果、重金属未処理条件下ですべて核に局在していた。

そこで、C末端にEGFPを融合したMTF-1の欠失変異体を用いて、HEK293細胞中の局在性を調べたところ、亜鉛フィンガーを含んでいるもの、および亜鉛フィンガードメインのみで核に局在することがわかった。また、亜鉛フィンガードメインに隣接するN末端側には典型的なNLS(nuclear localization signal)が存在するが、この配列の変異によっても核局在性は変化しなかった。これらの結果は亜鉛フィンガードメインの中に核局在シグナルが存在することを示している。

次に、全長のMTF-1において、2個ずつのフィンガー、4個ずつのフィンガーおよび全フィンガーを変異させたものなどを系統的に調べたところ、第3、および第4フィンガーの変異によって核局在が緩み、細胞内全域に分布するようになった。さらに第3、第4フィンガーそれぞれの点変異体の比較により、特に第3フィンガーが核局在に関与しているフィンガーであることが明らかになった。一方、第3フィンガーの重要性は、それ以外のフィンガーすべてに変異が導入されていても弱いながらも核局在性が認められることによって裏付けられた。

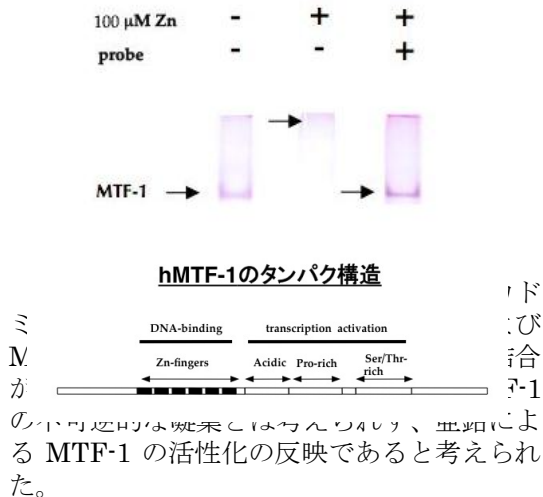
一方、亜鉛フィンガーのみを発現させた場合、その第3フィンガーを変異させても核局在性に変化はない。従って、亜鉛結合した第3フィンガーのタンパク構造自体がNLSではなく、正常な第3フィンガーへの亜鉛結合によって形成される全長MTF-1のタンパク構造が重要であるものと思われる。

(4) 亜鉛によるMTF-1の自己重合への亜鉛フィンガードメインの関与

MTF-1をEMSAで解析すると、亜鉛添加によって標的DNA配列であるMREとの複

合体が形成される。その際、MTF-1の動きをウェスタンブロット解析すると（シフトウェスタン解析）、亜鉛添加によっていったんMTF-1は電気泳動的な移動度の遅れが生じ、その後MREプローブの添加によってDNA複合体が形成される（図3）。

図3：Zn-dependent Mobility Change



そこでまず、亜鉛添加時の移動度の変化が MTF-1 同士の間で重なるのかどうかを確認するために、異なるタグ（FL と S）を融合させた MTF-1 それぞれを dko7 細胞に共発現させ、培養液に亜鉛添加処理を行った後、細胞抽出液中の MTF-1 をタグに対する抗体で免疫沈降させた。その結果、亜鉛処理によって異なるタグを持つ MTF-1 が共沈することが明らかとなり、亜鉛による電気泳動的な移動度変化が MTF-1 の自己重合によるものであることが分かった。

MTF-1 の亜鉛による自己重合に必要な MTF-1 のタンパク領域を知るために、大腸菌で発現させた種々の欠失変異体をシフトウェスタン法で解析した。その結果、亜鉛依存的な自己重合には亜鉛フィンガードメインが重要であることが分かった。そこで6個の亜鉛フィンガーそれぞれの点変異体をさらに解析したところ、第3および第4フィンガーの破壊によって特異的に亜鉛による自己重合が抑制された。

(5) まとめ

MTF-1 の重要な性質と機能のいくつかについて、それに必要な MTF-1 のタンパク領域を解析した結果、すべてが亜鉛フィンガードメイン、特に第3および第4フィンガーに収束するという結果を得た。一方、亜鉛フィンガーのみによって MTF-1 の重金属応答性を説明することはできず、おそらく第3、第4フィンガーへの亜鉛結合によって、全長

MTF-1 の構造が決定され、亜鉛応答や核局在に重要なタンパク内、あるいは他のタンパクとの相互作用に必要なインターフェースの出現があることが示唆される。いずれにせよ、MTF-1 の亜鉛フィンガードメインは新規な重金属応答分子をデザインする上で有用なモジュールであり、今後その機能解明が重要である。

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8件）

① 下山多映, 長田洋一, 鈴木 薫, 小泉信滋, 大塚文徳
 重金属依存性転写因子 MTF-1 の亜鉛による自己重合と亜鉛フィンガー部の寄与の検証
 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 2011
 2011年12月9日
 名古屋

② 長田洋一, 下山多映, 小泉信滋, 大塚文徳
 重金属依存性転写因子 MTF-1 の亜鉛による自己重合と亜鉛フィンガー部の寄与の検証
 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 2011
 2011年12月9日
 名古屋

③ 長田洋一, 下山多映, 小泉信滋, 大塚文徳
 重金属依存性転写因子 MTF-1 の亜鉛による自己重合と亜鉛フィンガー部の寄与の検証
 フォーラム 2011：衛生薬学・環境トキシコロジー
 2011年10月31日
 金沢

④ 下山多映, 長田洋一, 大野正太郎, 大塚文徳
 重金属依存性転写因子 MTF-1 制御下にある遺伝子群の探索
 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会
 2010年12月7日
 神戸ポートアイランド

⑤ 下山多映, 長田洋一, 鈴木 薫, 小泉信滋, 大塚文徳
 重金属依存性転写因子 MTF-1 が有する亜鉛フィンガードメインの多機能性について
 フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー

2010年9月9日
星薬科大学

⑥長田洋一, 下山多映, 鈴木薫, 小泉信滋,
大塚文徳
転写因子 MTF-1 の多様な亜鉛応答とそれに関
連するタンパク領域
フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロ
ジー
2009年11月5日
沖縄コンベンションセンター

⑦長田洋一, 下山多映, 鈴木薫, 小泉信滋,
大塚文徳
シフトウエスタン法を用いた転写因子 MTF-1
の重金属応答解析
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 2009
2009年10月17日
東京大学山上会館

⑧下山多映, 長田洋一, 鈴木薫, 小泉信滋,
大塚文徳
重金属依存性転写因子・MTF-1 の核局在にお
ける亜鉛フィンガーの役割
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 2009
2009年10月17日
東京大学山上会館

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

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・研究企画調整部.
特任研究員
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

(4)連携研究者

長田 洋一 (OSADA YOICHI)
帝京大学・薬学部・助教
研究者番号：50545572