

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究B

研究期間：2011～2012

課題番号：23790163

研究課題名（和文）亜鉛に応答した遺伝子発現変化に対するエピジェネティック制御機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of zinc-induced epigenetic changes in chromatin of MTF-1 target gene promoters

研究代表者

木村 朋紀 (KIMURA TOMOKI)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：70340859

研究成果の概要（和文）：亜鉛は必須微量元素で、生理的役割は多岐にわたる。その役割いくつかは遺伝子発現を介して発揮されていると予想され、遺伝子発現の調節には転写因子 MTF-1 が関与している。今までに我々は、メタロチオネイン-I (MT-I) 遺伝子プロモーターの構造が亜鉛に応答して変化し、転写が促進されることを明らかにしてきた。本研究課題では、この構造変化は MTF-1 支配遺伝子にほぼ共通であり、これに関わる因子は Brm と Brg1 以外の因子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Zinc is an essential micronutrient. It is critically important to control intracellular zinc concentrations tightly. In mammals, metallothionein (MT), a small metal-binding protein, plays important roles in zinc homeostasis. Mouse MT-I gene transcription is regulated by metal response element-binding transcription factor-1 (MTF-1), which is recruited to the promoter by zinc. Previously we showed that alterations in the chromatin structure of the MT-I promoter associated with enhanced transcriptional activation. Here, we showed that chromatin remodeling factor Brm and Brg1 was not involved in the gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：MTF-1、亜鉛、メタロチオネイン

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は必須微量元素で、その生理的役割は免疫機構の補助・創傷治癒・精子形成・味覚感知・胎発生・小児の成長など多岐にわたる。また近年、Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD: 成長過程における栄養障害や環境因子の作用に起因する疾患の発生) という概念 (Science, (2004) 305:1733-1736) が提唱されているが、亜鉛についても、胎仔期に経験した亜鉛欠乏が成獣へと成長した後の遺伝子発現応答 (Proc Soc

Exp Biol Med, (1988) 188:30-34) や免疫応答 (Science (1982) 218:469-471) に影響を及ぼすことが報告されている。一方、近年になって、亜鉛量・分布を調節する分子が次々とクローニングされ、亜鉛によって細胞内機能を調節する分子機構が明らかになってきた。その結果、亜鉛はカルシウムにも匹敵する細胞内情報伝達物質として機能する可能性が指摘されるようになった (総説: Adv Immuno, (2008) 97:149-176)。前述の亜鉛の作用のいくつかは、遺伝子発現を介して発揮されてい

ると予想されるが、亜鉛によって直接的に転写活性化能が制御されている転写因子は、哺乳類では唯一、重金属応答性転写因子 MTF-1 が知られているのみである。この MTF-1 による遺伝子発現に対してエピジェネティックな制御が存在するならば、それは、エピジェネティックに「亜鉛を介した細胞内シグナル伝達」が攪乱されうるということを意味し、胎仔期あるいは出生後早期の亜鉛欠乏がもたらす DOHaD において重要な意味を持つと考えることができる。

2. 研究の目的

亜鉛に応答した遺伝子発現について、エピジェネティックな制御機構の存在を明示するとともに、その機序を解明する。これにより、DOHaD 機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

実験には、マウス胎仔由来線維芽細胞(MEF)、マウスリンパ肉腫細胞株 P1798 細胞、ヒト副腎皮質腺癌細胞株 SW13 細胞を用いた。

(2) 各種 mRNA の定量

細胞から総 RNA を抽出し、逆転写後に各種遺伝子に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を行うことで各種 mRNA を定量した。

(3) ルシフェラーゼアッセイ

細胞にレポーターベクターとして pGL4.12-MT-264/+42 を導入し、48 時間後に細胞抽出液を作成、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ)

遺伝子プロモーター上に存在するタンパク質量を評価するため、ホルマリンによりタンパク質-DNA を架橋し、その後、超音波処理による DNA 鎖の切断、免疫沈降を行い、共沈した DNA をリアルタイム PCR により定量した。

(5) 各種遺伝子発現プラスミド導入による遺伝子の強制発現および siRNA 導入による遺伝子発現の抑制

FuGENE HD あるいは Lipofectamine RNAiMAX を用いてプラスミドあるいは siRNA を細胞に導入し、その後、細胞を 48 時間培養することで遺伝子の強制発現あるいは遺伝子発現の抑制を行った。発現プラスミドには、Brm 発現プラスミド pCAGF1-BRM-IG と Brg1 発現プラスミド pCAGF1-BRG1-IG を用いた。これらは東京大学医科学研究所 伊庭英夫教授から供

与された。siRNA は全て Ambion 社のものを購入し使用した。

(6) 各種遺伝子発現プラスミド導入細胞における導入遺伝子発現の確認
導入した遺伝子発現はウエスタンブロット法により確認した。抗 Brg1 抗体は Cell Signaling Technology 社から、抗 Brm 抗体は Abcam 社から購入した。各レーンの泳動タンパク質量が一定であることは、 β -アクチンの発現量から確認した。抗 β -アクチン抗体 (クローン AC-15) は、シグマアルドリッチジャパン社から購入した。

4. 研究成果

(1) エピジェネティックな影響を与える環境要因の検索

エピジェネティックな影響を与える環境要因・条件を見出すため、エピジェネティックに定常的な MT-I 遺伝子発現が抑制され、なおかつ、亜鉛による MT-I 誘導が認められないリンパ肉腫細胞株 P1798 細胞を用いた解析を行った。この細胞が、MTF-1 依存的な転写活性化システムを有していることは、あらかじめルシフェラーゼアッセイを行い、MTF-1 依存的な MT-I プロモーター活性の上昇が認められることにより確認した。その後、1 月間の亜鉛処理では MT-I 誘導能を変化しないが、1 週間のカドミウム処理が MT-I 発現を増加する傾向を観察した。これは、環境要因によって MT 発現がエピジェネティックな影響を受けてその発現が変化する可能性を示すものである。

(2) 亜鉛依存的な MTF-1 支配遺伝子プロモーターからのヒストンコア粒子の除去

亜鉛処理に反応して遺伝子プロモーターのクロマチン構造が変化するという現象が、マウス MT-I プロモーターに特異的な現象なのか、MTF-1 によって発現制御を受けている遺伝子に共通の現象なのかを明らかにするため、ChIP アッセイを行った。その結果、MEF において、MT-II および ZnT-1 遺伝子プロモーターでも亜鉛に反応したクロマチン構造変化が観察された。これにより、本現象が MTF-1 支配遺伝子に共通したものであることが示唆された (図 1)。

(3) クロマチンリモデリングファクター遺伝子発現の抑制の MT-I 遺伝子発現への影響

クロマチンリモデリングファクター、Brm および Brg1 の発現を抑制するため、MEF に各種 siRNA を導入することでノックダウンを行い、その 48 時間後の mRNA 量を定量してノックダウン効率を調べた。

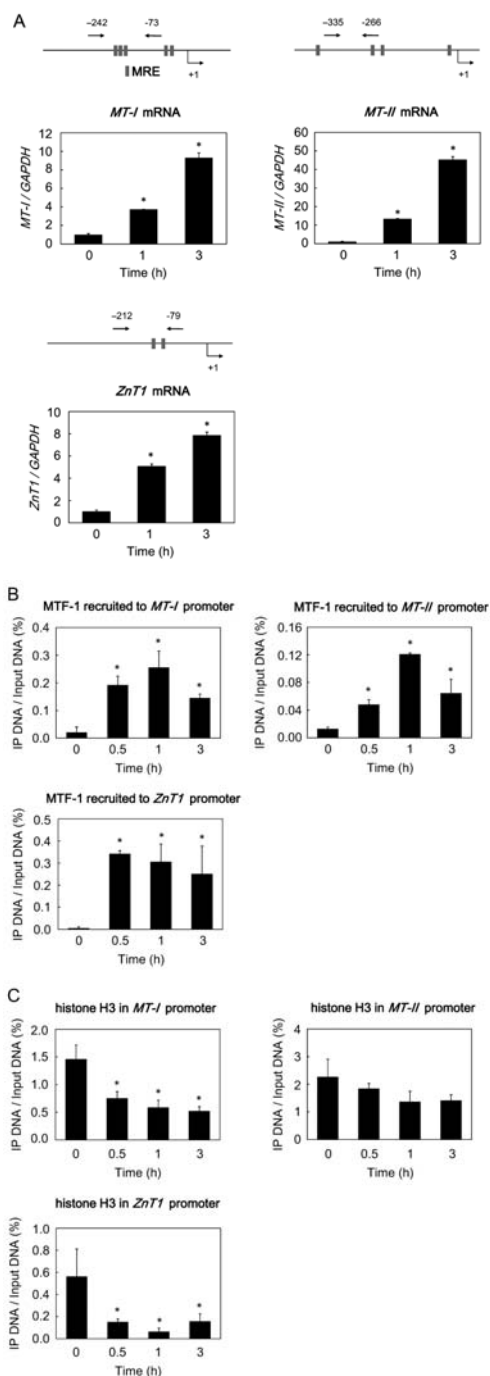


図 1. クロマチンリモデリング因子遺伝子発現の抑制の MT-I 遺伝子発現への影響

MEF 細胞に 100 μ M Zn を処理し、その後、1~3 時間後に RNA を抽出し、各遺伝子の発現量を定量した (A)。また、Zn 処理 0.5~3 時間後に ChIP アッセイを行った (B、C)。

その結果、Brm および Brg1 mRNA 発現量は、20%程度にノックダウン出来ることが明らかとなった。この時の亜鉛依存的な MT-I 遺伝子発現を観察したところ、MT-I 遺伝子発現に影響は認められなかった (図 2)。

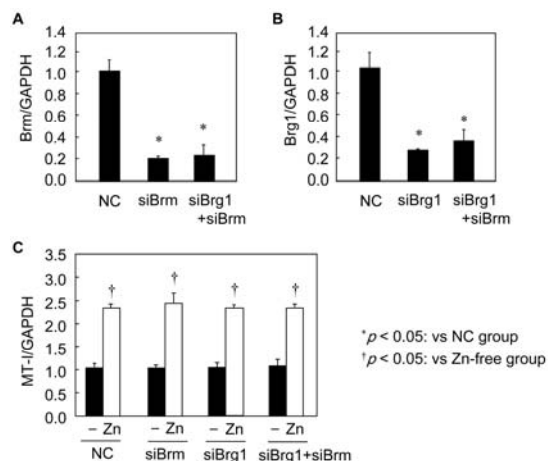


図 2. クロマチンリモデリング因子遺伝子発現の抑制の MT-I 遺伝子発現への影響

(A、B) Brm および Brg1 のノックダウン効率。Brm および Brg1 の発現を抑制するため、MEF に各種 siRNA を導入し、その 48 時間後の mRNA 量を定量した。(C) Brm および Brg1 のノックダウンの MT-I 遺伝子発現への影響。Brm および Brg1 用 siRNA を導入し、その 48 時間後に 100 μ M Zn 処理を行った。3 時間後に RNA を抽出し、MT-I mRNA と GAPDH mRNA の定量を行った。各 siRNA 導入細胞において、無処理細胞を 1 として相対値として結果を示した。

(4) クロマチンリモデリング因子遺伝子欠損細胞における亜鉛依存的な MT-I 遺伝子発現

まず、Brm および Brg1 を欠失している細胞株 SW13 細胞における亜鉛依存的な MT-I 遺伝子発現を観察した。その結果、SW13 細胞では、亜鉛による MT-I 誘導はほとんど観察されなかった。次に、Brm および Brg1 を強制発現し、亜鉛による MT-I 誘導が認められるようになるのかを調べたが、これらリモデリング因子は亜鉛に応答した発現誘導には影響を与えないことが明らかとなった (図 3)

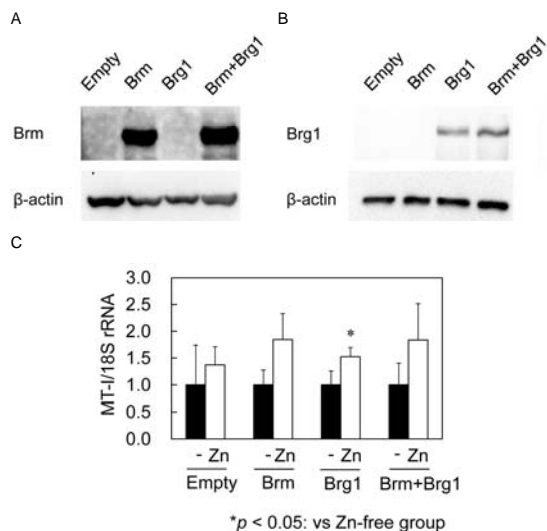


図3. BrmおよびBrg1欠損細胞株SW13へのBrmおよびBrg1過剰発現をもたらすMT-I遺伝子発現への影響

(A, B) SW13細胞に各種プラスミドを導入して48時間後に細胞抽出液を調製し、抗Brm抗体および抗Brg1抗体を用いてウエスタンブロットを行った。(C) SW13細胞に各種プラスミドを導入して2日後に200 μM Zn処理を行った。3時間後にRNAを抽出し、MT-I mRNAと18S rRNAの定量を行った。MT-I RNA定量に用いたプライマーは分子種を区別せずに増幅できるように設計したものを用いた。無処理細胞を1として相対値として結果を示した。

以上より、本研究課題により亜鉛に応答して遺伝子プロモーターの構造が変化するという現象は、MTF-1支配遺伝子に共通であり、これに関わる因子はBrg1やBrm以外の因子であることを明らかにすることができた。

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12件)

- ①木村朋紀、奥村文香、Yong Li、伊藤徳夫、中西剛、磯部正和、Glen K. Andrews、The zinc-sensing transcription factor MTF-1 mediates zinc-induced epigenetic changes in chromatin of the mouse metallothionein-I promoter、2011 International Conference Metals and Genetics、2011年9月4-8日、神戸
- ②保坂卓臣、木村朋紀、射手園雄一、岡田和也、藤森廣幸、磯部正和、メタロチオネイン遺伝子発現に関わるクロマチンリモデリングファクター、フォーラム2011 衛生薬学・環境トキシコロジー、2011年10月27-28日、

金沢

③木村朋紀、奥村文香、古田雄三、保坂卓臣、藤森廣幸、磯部正和、メタロチオネイン遺伝子の転写に伴うクロマチン構造変化とその意義、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8日、名古屋

④木村朋紀、古田雄三、奥村文香、保坂卓臣、磯部正和、Glen K. Andrews、The zinc-sensing transcription factor MTF-1 mediates zinc-induced epigenetic changes in chromatin of the mouse metallothionein-I promoter and the epigenetic changes brings enhanced transcriptional activation、The International Society of Zinc Biology Conference、2012年1月15-19日、メルボルン、オーストラリア

⑤保坂卓臣、木村朋紀、古田雄三、藤森廣幸、磯部正和、マウスメタロチオネイン-I遺伝子プロモーター領域におけるクロマチン構造変化と転写量との関連性、日本薬学会第132年会、2012年3月31日、札幌

⑥木村朋紀、重金属によるメタロチオネイン遺伝子の転写制御、第39回日本毒性学会学術年会、2012年7月17日~2012年7月20日、仙台

⑦保坂卓臣、木村朋紀、古田雄三、藤森廣幸、磯部正和、亜鉛によるメタロチオネイン遺伝子発現におけるクロマチン構造変化とその意義、第39回日本毒性学会学術年会、2012年7月17日~2012年7月20日、仙台

⑧保坂卓臣、木村朋紀、古田雄三、藤森廣幸、磯部正和、Transcriptional activation enhanced by the change in chromatin structure of mouse metallothionein-I promoter、第6回アジア毒性学会学術集会、2012年7月17日~2012年7月20日、仙台

⑨岡田和也、保坂卓臣、射手園雄一、木村朋紀、藤森廣幸、磯部正和、クロマチンリモデリングファクターBrm・Brg1欠損細胞におけるメタロチオネイン遺伝子発現、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、2012年10月20日、武庫川女子大学

⑩射手園雄一、保坂卓臣、岡田和也、木村朋紀、藤森廣幸、磯部正和、メタロチオネイン-I遺伝子の転写におけるクロマチンリモデリングファクターSnf2Hの役割、フォーラム2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2012年10月25日~2012年10月26日、名古屋

⑪田中亨、古田雄三、保坂卓臣、木村朋紀、藤森廣幸、磯部正和、メタロチオネイン-I遺伝子プロモーター領域のクロマチン構造と転写活性、フォーラム2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2012年10月25日~2012年10月26日、名古屋

⑫保坂卓臣、藤森廣幸、木村朋紀、重金属凶

答性転写因子 MTF-1 の標的遺伝子における
亜鉛によるクロマチン構造変化、日本薬学会
第 133 年会、2013 年 3 月 27 日～2013 年 3
月 30 日、横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-doku/doku-top.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 朋紀 (KIMURA TOMOKI)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：70340859

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし