

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460179

研究課題名(和文) 亜鉛欠乏に应答するエピジェネティック制御の分子機構に関する研究

研究課題名(英文) Molecular mechanisms involved in zinc-deficiency mediated epigenetic regulation of gene expression

研究代表者

木村 朋紀 (KIMURA, Tomoki)

摂南大学・理工学部・准教授

研究者番号：70340859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

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。本研究課題では、亜鉛による転写活性化機構に関して、転写共役因子p300のHATドメインがDNA結合においても正の制御因子として機能していることを明らかにした。また、亜鉛欠乏に应答するエピジェネティックな制御に関しては、その分子機構を明確に示すことは出来なかったが、カドミウムがMTプロモーターにおいてDNAの脱メチル化というエピジェネティックな変化を引き起こし、MT遺伝子の発現を正に制御することを示した。

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 MT1 gene transcription is regulated by metal response element-binding transcription factor-1 (MTF-1), which is recruited to the promoter by zinc. Here, we showed that HAT domain of transactivation factor p300 was involved in MTF-1-DNA complex formation. It is not clear that the molecular mechanisms of zinc-mediated epigenetic modification of MT gene expression. But, MT induction in response to Cd in the 100 nM Cd, 1 week-treated mouse lymphoma P1798 cells was up-regulated compared to that in normal 1798 cells. Bisulfite sequence analysis reveals the demethylation of DNA in CpG island of MT1 promoter in the 100 nM Cd, 1 week-treated P1798 cells. The result suggests that 1 week Cd treatment affects epigenetic modification in MT gene.

研究分野：環境系薬学

キーワード：亜鉛 カドミウム エピジェネティクス メタロチオネイン MTF1 p300

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、この転写に関わる因子である MTF-1 に関して、その制御にエピジェネティックな機構が存在することを示す知見は非常に限られる。つまり、「亜鉛を介した細胞内シグナル伝達」の重要性が明らかとなった現時点においても、その制御系には不明な点が多く残されている。

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) 培養細胞およびリコンビナントタンパク質

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 細胞を用いた。リコンビナント MTF-1 および p300 は、それぞれ OriGene 社と ActiveMotif 社から購入した。欠変異型 p300 のリコンビナントタンパク質も ActiveMotif 社から購入した。

(2) 低亜鉛血清の調製

細胞培養用のウシ胎児血清からの亜鉛除去には Chelex[®] 100 Resin (BioRad 社) を用いた。

(3) Bio-Layer Interferometry (BLI) 法

BLItz[™] (プライムテック社) を用い、ストレプトアビジンに Bio-MREs×2 を固定化させたバイオセンサーにて解析した。このバイオセンサーに対し、リコンビナント MTF-1 および p300 の結合反応を解析した。

(4) ゲルシフトアッセイ (EMSA)

ビオチン標識 MRE への結合反応は LightShift 化学発光 EMSA キット (Thermo

Scientific) を用いて行った。4 の条件のもと 5% 非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その後、ナイロンメンブレンに転写し、化学発光により検出した。

³²P-標識 MRE への結合反応でも 4 の条件のもと 5% 非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その後、ゲルを乾燥させ、Fuji BAS1500 Phosphorimager を用いて、ラジオルミノグラフィによって検出した。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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。

(8) 細胞内 Cd 蓄積量

細胞を播種、継代および Cd 処理し回収後、細胞溶解液を調製した。その ¹⁰⁹Cd 放射活性を測定した。また、細胞溶解液のタンパク質量を行い、これをもとにタンパク質 1 mg 当たりの Cd のモル数 (nmol/mg protein) として細胞内の Cd 蓄積量を算出した。

(9) 細胞生存率

細胞懸濁液の一部を、0.4% トリパンブルー含有 PBS と 1:1 で混和し、染色細胞 (死細胞) と未染色細胞 (生存細胞) をそれぞれカウントし、細胞生存率を算出した。

(10) バイサルファイトシーケンス

細胞から DNA を抽出し、この DNA について、MethylEasy[™] Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (TaKaRa) を用い非メチル化シトシン残基をウラシルに変換した。その後、シーケンス解析を行うことでシトシン残基におけるメチル化の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) 転写共役因子 p300 と MTF-1 との結合に関する解析
亜鉛依存的な転写活性化に関わる転写因子 MTF-1 は亜鉛依存的に p300 と結合し、この結合は転写活性化に必須である。この結合は細胞抽出液中で観察されていたため、第 3 の

要因の関与の可能性が否定できなかった。リコンビナントタンパク質を用いた BLI 法により、この結合が直接的なものであることが明らかとなった。また、亜鉛依存性および結合に関わるドメインの同定のために EMSA を行ったところ、亜鉛依存的な MTF-1-DNA 複合体形成が p300 により促進された。さらに、ヒストンアセチル化ドメイン(HAT ドメイン)の添加でこの促進作用が観察されたことから、この HAT ドメインが MTF-1-DNA 複合体形成作用を有していることが明らかとなった。

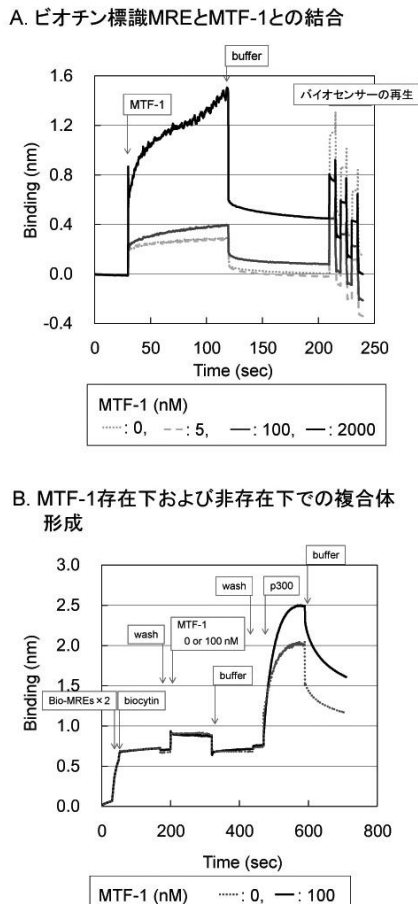


図 1. BLI 法による p300-MTF-1-MRE 複合体形成の解析
(A) アビジン結合プローブに Bio-MREs x 2 を結合し、これに精製 MTF-1 が結合するかを調べた。(B) アビジン結合プローブに Bio-MREs x 2 を結合し、これにリコンビナント MTF-1 を結合したものを用意し、これにさらにリコンビナント p300 が結合するかを調べた。

(2) 亜鉛濃度の変化がもたらすエピジェネティックな変化
MEF 細胞と P1798 細胞を用い、亜鉛処理および低亜鉛培地での培養によるエピジェネティックな変化を観察したところ、MEF 細胞において、数時間の亜鉛処理によってヒストン H3 が減少するという現象は再現性よく

観察されたものの、低亜鉛培地での培養によるエピジェネティックな変化は観察できなかった。

(3) 低濃度カドミウムへの長期曝露によるエピジェネティックな変化
上記(2)の通り、亜鉛によるエピジェネティックな変化は観察されなかったが、亜鉛と同族元素である有害金属として知られているカドミウムについて、P1798 細胞への低濃度曝露がメタロチオネイン(MT)誘導能を上昇させることを見出した。この機序として、MTF-1 を介した転写システムの活性化やカドミウム取り込み速度の変化の可能性が考えられるが、前者については、ルシフェラーゼアッセイによって、後者については細胞内 Cd 蓄積量の測定によって、これらの関与を否定した。次に、MT プロモーター領域の CpG アイランドについて、DNA のメチル化状態をバイサルファイトシークエンスにより調べたところ、低濃度カドミウムへの長期曝露によって、メチル化頻度が低下することが明らかとなった。低濃度カドミウムへの長期曝露は、MT プロモーターにおいて DNA の脱メチル化というエピジェネティックな変化を引き起こし、MT 遺伝子の発現を正に制御していると考えられる。

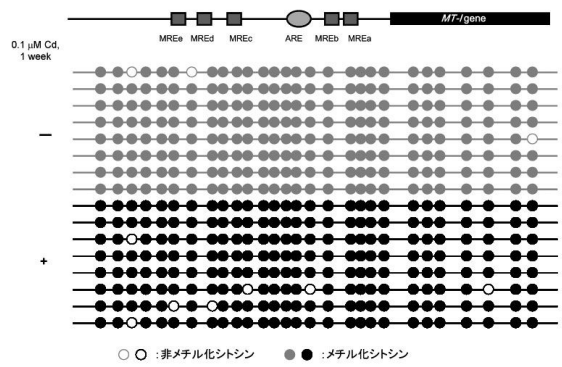


図 2. 0.1 mM Cd を 1 週間処理した P1798 細胞の MT-I 遺伝子プロモーター領域 DNA のメチル化状態

以上の通り、本研究課題により、亜鉛による転写活性化機構に関しては、転写共役因子 p300 の HAT ドメインが DNA 結合においても正の制御因子として機能していることを明らかにした。また、亜鉛欠乏に反応するエピジェネティックな制御に関しては、その分子機構を明確に示すことは出来なかったが、カドミウムが MT プロモーターにおいて DNA の脱メチル化というエピジェネティックな変化を引き起こし、MT 遺伝子の発現を正に制御することを示すことができた。

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1件)

木村 朋紀、神戸 大朋、The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective、Int J Mol Sci、査読有、17(3)、2016、336
DOI:10.3390/ijms17030336

〔学会発表〕(計8件)

木村 朋紀、川嶋 真実、青笹 治、リンパ肉腫細胞P1798におけるカドミウム長期曝露によるメタロチオネイン誘導能の変化とその役割、第43回日本毒性学会学術年会、2016年6月29日~7月1日、名古屋

木村 朋紀、金属曝露がもたらすエピジェネティックな変化とその分子機構、日本薬学会第136年会、2016年3月29日、横浜

木村 朋紀、メタロチオネイン遺伝子発現に対するエピジェネティックな防御機構の解析、第42回日本毒性学会学術年会、2015年6月30日、金沢

福本 冬里、木村 良宇、保坂 卓臣、木村 朋紀、リンパ肉腫細胞 P1798 におけるカドミウム長期曝露によるメタロチオネイン誘導能の変化とその役割、フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2014年9月19日~9月20日、つくば

木村 朋紀、金属曝露がもたらすエピジェネティックな変化とその分子機構、フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2014年9月19日~9月20日、つくば

友近 祐真、北澤 文子、竹村 知、下村 希実、保坂 卓臣、木村 朋紀、重金属応答性転写因子 MTF-1 の亜鉛依存的な DNA 結合における転写共役因子 p300 の役割、日本薬学会第 134 年会、2014年3月28日、熊本

木村 朋紀、Mechanisms of metallothionein gene transcription and epigenetic changes in the promoter、X ISTERH2013、2013年11月19日、東京

保坂 卓臣、友近 祐真、竹村 知、下村 希実、木村 朋紀、重金属応答性転写因子 MTF-1 による転写活性化に対する転写共役因子 p300 の促進作用、フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2013年9月13日、福岡

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~bio/labo/kimura.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 朋紀 (KIMURA, Tomoki)
摂南大学・理工学部・生命科学科・准教授
研究者番号: 70340859

(2)研究分担者

保坂 卓臣 (HOSAKA, Takuomi)
静岡県立大学・薬学部・助教
研究者番号: 30611579
(削除:平成27年3月13日)