

機関番号：34428

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790137

研究課題名 (和文) 転写因子 MTF-1 を介した重金属依存的転写活性化機構の解明

研究課題名 (英文) Mechanisms of heavy metal-dependent transactivation by transcription factor MTF-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

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、この遺伝子発現の調節には転写因子 MTF-1 が関与していることが知られている。しかしながら、遺伝子発現調節の詳細なメカニズムは不明であった。今回、MTF-1 が転写を活性化する分子メカニズムを解析し、亜鉛によるメタロチオネイン(MT)-I 遺伝子発現に伴って、MT-I プロモーター領域においてヒストン・コア粒子が除去されるというダイナミックな現象が起こってい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. We examined alterations in the chromatin structure of the MT-I promoter associated with enhanced transcriptional activation. Here, chromatin immunoprecipitation assays and micrococcal nuclease sensitivity of the MT-I promoter demonstrated that the chromatin structure in the promoter may be locally disrupted by zinc-induced nucleosome removal. Rapid disruption of nucleosome structure at the MT-I promoter is mediated by zinc-responsive recruitment of an active MTF-1-coactivator complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：亜鉛、MTF-1、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。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。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、亜鉛依存的な転写活性化を担う転写因子は、哺乳類では唯一、MTF-1 が知られているのみである。この

MTF-1 は、亜鉛貯蔵タンパク質メタロチオネイン(MT)-I、-II と、亜鉛排泄輸送体 ZnT-1 の発現誘導を介して細胞内亜鉛量の調節に関わっており、「亜鉛動態」と「亜鉛を介した細胞内シグナル伝達」を理解する上で、MTF-1 による転写活性化機構の解明は必須である。MTF-1 による転写活性化機構に関しては、MTF-1 の DNA 結合ドメインである C2H2 型ジンクフィンガーへの亜鉛の結合が、MTF-1 活性化に必要であることは知られていた。また、MTF-1 は、亜鉛以外の重金属(カドミウム、銅など)に反応して転写を活性化し、MT の発現誘導をもたらす。この MT 誘導系が、細胞に重金属耐性を付与する機構であることはよく知られている。しかし、どのようにしてこれら重金属が MTF-1 を活性化するのか、分子機構の詳細は不明である。その機構解明が待たれている。

一方、MTF-1 により転写活性化される遺伝子のプロモーターとしては、MT プロモーターがよく知られている。しかしながら、本プロモーターの活性化機構は、完全には解明されていない。特に、近年注目を集めている、クロマチン構造変化に関する報告は、MT の低発現細胞株と高発現細胞株との比較を行った報告が 2 報あるのみである。

2. 研究の目的

従来の MTF-1 研究は、MTF-1 のどのドメインが DNA 結合に必要なかといった、MTF-1 の構造に注目した解析ばかりが行われてきた。本研究では、MTF-1 が結合するプロモーター側に注目し、プロモーターのクロマチン構造が MTF-1 によってどのように変化するのか、この反応に関与するタンパク質は何か、という解析を行うことで重金属に反応した遺伝子発現の分子機構の詳細を解明する。

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(WT-MEF 細胞)および MTF-1 ノックアウトマウス胎仔由来線維芽細胞(MTF-KO MEF 細胞)を用いた。

(2) MT-I mRNA 量の定量

細胞から総 RNA を抽出し、逆転写後にリアルタイム PCR を行うことで MT-I mRNA 量を測定した。

(3) クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay)

MT-I プロモーター領域への MTF-1 の結合やプロモーター領域に存在するヒストンタンパク質側鎖の修飾、ヒストンタンパク質量について、それぞれに特異的な抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈した MT-I プロモーター DNA 量をリアルタイム PCR により定量す

ることで評価した。

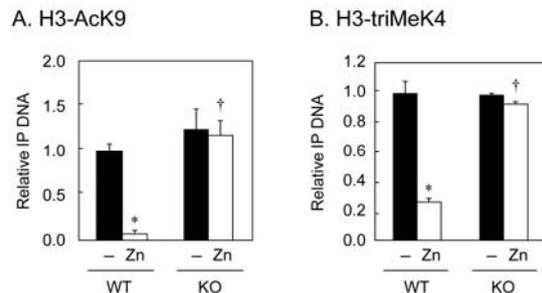
(4) マイクロコッカルスクレアーゼ(MNase)感受性の解析

細胞から核を単離し、MNase を処理した。クロマチン構造を取っている DNA は MNase による切断を受けにくいという性質を利用し、未切断の MT-I プロモーター DNA 量をリアルタイム PCR により定量することでクロマチン構造を推定した。

4. 研究成果

(1) 亜鉛による MT-I 遺伝子の転写活性化に伴うヒストン修飾

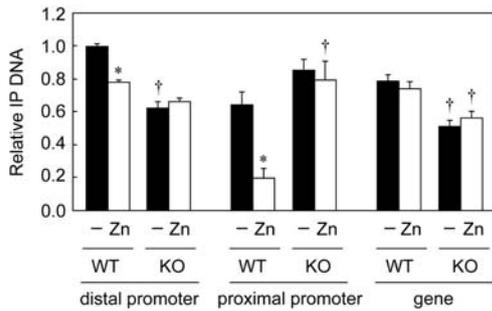
一般に、転写誘導に伴ってプロモーター領域のヒストン H3 の 4 番目リジン残基(H3K4)のメチル化および H3K9 アセチル化反応が亢進することが知られている。そこで、WT-MEF 細胞および MTF-KO MEF 細胞について亜鉛処理後の MT-I プロモーター領域のヒストン修飾変化を H3K4 のメチル化および H3K9 のアセチル化に着目し ChIP assay により調べた。その結果、WT 細胞ではプロモーター領域の H3-MeK4 量および H3-AcK9 量がともに亜鉛に依存して顕著に減少していたが、MTF-KO MEF 細胞ではこれらの変化は見られなかった。



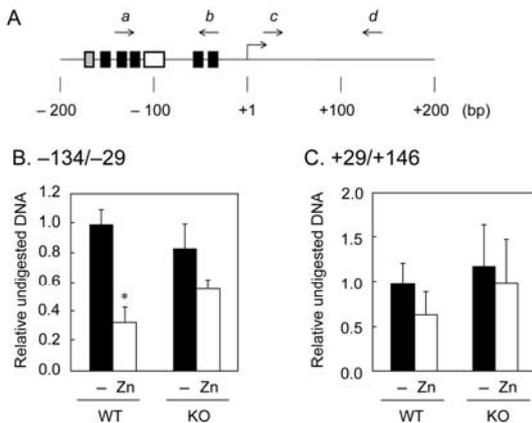
(2) MT 転写活性化にともなうヒストン H3 の減少

亜鉛に反応したヒストン H3 量の変化を調べるために、抗ヒストン H3 抗体を用いて ChIP assay を行った。その結果、WT-MEF 細胞において亜鉛依存的に MT-I プロモーター領域のヒストン H3 量が未処理の細胞に比べて約 70%減少していた。遠位プロモーター領域では亜鉛処理後に減少しているものの未処理に比べて約 20%程度であり、コード領域では有意な変化が見られなかった。これらの変化は MTF-KO MEF 細胞では見られなかった。つまり、ヒストン H3 量の劇的な現象は転写開始点付近に限られていた。

histone H3



ヒストン H3 の減少は、その領域のヒストン八量体が壊れて DNA から外れたことに起因する可能性が考えられる。そこで、ヌクレオソーム構造を呈していない DNA を優先的に切断できる DNA 分解酵素 MNase を用いて、この酵素に対する感受性を調べることでクロマチン構造を推定した。なお、MNase 感受性は未消化の DNA 量をリアルタイム PCR 法により測定することで検討した。WT-MEF 細胞および MTF-KO MEF 細胞から抽出した核画分を MNase で処理し、MT-I プロモーター領域およびコード領域に特異的なプライマーを用いて未消化 DNA 量をリアルタイム PCR により定量したところ、MT-I プロモーター領域の未消化 DNA 量が WT-MEF 細胞において亜鉛処理により減少していたが、MTF-KO 細胞では有意な減少が認められなかった。一方、転写開始点付近のコード領域では両細胞ともに亜鉛処理の有無で未消化 DNA 量への有意な影響は認められなかった

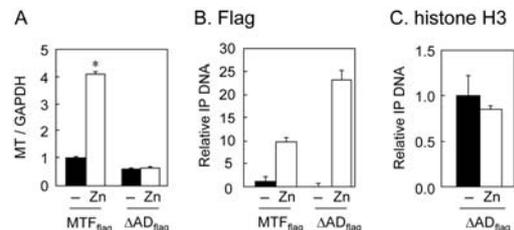


(3) ヒストン H3 量の亜鉛による減少における MTF-1 の役割

MTF-1 を介さない MT 誘導系において、MT-I 遺伝子の転写活性化に伴って MT-I プロモーターのヌクレオソーム構造が崩壊するのかが検討するために、IL-6 により MT 発現が誘導されることを MT-I mRNA 量をリアルタイム PCR により定量することで調べた。その結果、WT-MEF および MTF-KO MEF 細胞いずれの細胞においても IL-6 処理後に MT-I

mRNA 量が顕著に増加していた。次に、両細胞における IL-6 処理後のヌクレオソーム構造の変化を抗ヒストン H3 抗体を用いた ChIP assay および MT-I プロモーター特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR により MT-I プロモーターのヒストン H3 量を調べることで検討した。その結果、いずれの細胞においてもヒストン H3 量に有意な差は認められなかった

一方、亜鉛に応答した MT 誘導には、MTF-1 が転写共役因子 p300 と複合体を形成することが必要であることが明らかにされている。そこで、MT 誘導に伴って観察されるヒストン H3 減少に p300 との複合体形成が必要であるのか否かについて検討した。p300 との複合体は MTF-1 の酸性アミノ酸領域を介して形成されることから、この領域を欠損した Flag タグ付き変異体 MTF- Δ AD を安定的に発現する細胞(MTF- Δ AD 細胞)を用いて亜鉛処理による MT-I プロモーター領域のヒストン H3 量の変化を調べた。その結果、亜鉛に応答して MTF- Δ AD タンパク質が MRE に結合するものの、転写活性化能を失っていることが確認できた。そして、抗ヒストン H3 抗体を用いた ChIP assay および MT-I プロモーター特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR により MT-I プロモーターのヒストン H3 量を定量したところ、MTF- Δ AD 細胞では亜鉛処理前後で MT-I プロモーター領域のヒストン H3 量に有意な差は見られなかった。

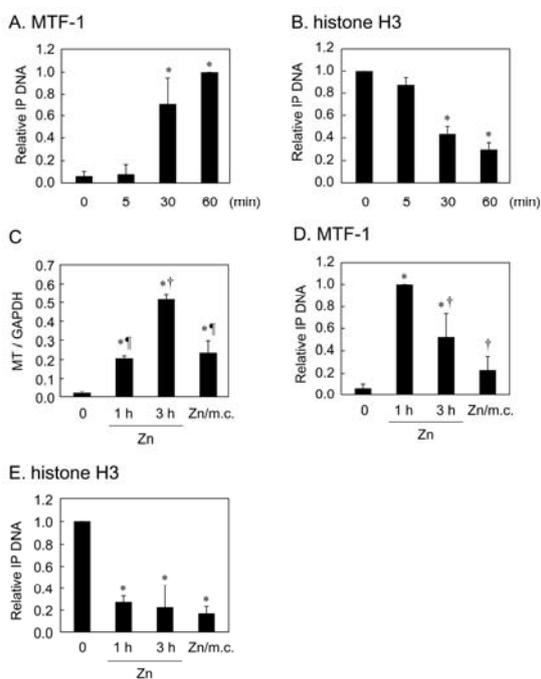


(4) 亜鉛処理後のヒストン H3 量の経時変化

MT-I 遺伝子の転写活性および MTF-1 の MT-I プロモーターへのリクルート、および MT-I プロモーター領域のヒストン H3 量について亜鉛処理後の変化を経時的に調べた。さらに、亜鉛処理 1 時間で培地交換により亜鉛を除去することで、亜鉛刺激によって変化したヒストン H3 量が亜鉛除去後どれだけの時間持続されるのか検討した。

亜鉛処理後、MT 誘導が開始するまでに要する時間を検討するため、WT-MTF 細胞を用いて MT-I プロモーターへの MTF-1 リクルートおよびヒストン H3 量を経時的に調べた。その結果、MTF-1 のリクルートは、亜鉛処理後 5 分では観察されず、30 分後および 60 分後に認められた。同様に、MT-I プロモーター領域のヒストン H3 量も亜鉛処理後 5 分で変化は認められず、30 分後および 60 分後で顕

著に減少した。また、MTF-1のリクルートは亜鉛処理後1時間で最大値を示し3時間後には低下していたのに対し、MT-I mRNA量は亜鉛処理後3時間でより増加していた。次に、亜鉛によって変化したヒストンH3量が亜鉛除去後どのような変化を示すのかを検討するため、WT-MEF細胞を亜鉛処理し、その1時間後に培地交換により亜鉛を除去した場合に起きる変化を調べた。MT-I mRNA量を測定した結果、亜鉛を除去した場合ではMT-I mRNA量が亜鉛処理3時間後に比べて顕著に減少しており、かつ亜鉛処理1時間後の値とほぼ等しかった。MTF-1のリクルートについては、培地交換しなかった細胞に比べてさらに低下していた。しかし、MT-Iプロモーター領域のヒストンH3量については、亜鉛除去後も回復せず、減少した状態を維持していた。



以上、亜鉛によるMT-I転写活性化にともない、MTF-1依存的にMT-Iプロモーター領域のヌクレオソーム構造が部分的に崩壊していることが明らかになった。また、MTF- Δ AD細胞を用いて検討した結果より、亜鉛処理前後でMT-Iプロモーター領域のヒストンH3量に有意な差は見られなかったことから、MTF-1-p300複合体形成が亜鉛に依存したクロマチン構造の変化において重要なステップであることが示された。ただし、MTF-1-p300複合体には、この二つの因子以外にさらに多くのタンパク質が結合している可能性があることから、p300以外の何らかの因子がクロマチン構造の変化において重要な因子である可能性は否定できず、さらなる分子遺伝学および生化学的解析が必要である。また、ヒストン八量体のDNAから

の解離には、ヒストンシャペロンの関与が予想される。今後、クロマチン構造の変化を引き起こすヒストンシャペロンの同定が必須である。このヒストンシャペロンの同定は、MTF-1依存的な転写活性化メカニズムだけでなく、細胞外環境変化にตอบสนองした転写制御機構を理解する上で非常に重要であると考えられる。

MT-Iプロモーター領域のヒストンH3量は、亜鉛刺激除去後も回復せず、減少した状態を維持していたことから、MTF-1は変化したクロマチン構造の維持には関与しておらず、亜鉛にตอบสนองしたクロマチン構造変化の誘導過程において重要な役割を果たしていると推定された。胎生期に低亜鉛環境に曝されたマウスにおいて成長後の肝臓でMT濃度が増加していること、および同様のマウスで亜鉛不足が原因の免疫不全が3世代に渡って受け継がれることが報告されている。これらの現象は胎生期に亜鉛不足が刺激となって起きたクロマチン構造が成長過程、さらには世代を超えて維持されたことに起因する可能性が考えられる。本研究成果は、亜鉛不足が世代を超えて引き起こされる生体機能不全の機序を解き明かす一助となるものと考えられる。

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4件)

- ① 木村朋紀、奥村文香、小野寺章、中西剛、伊藤徳夫、磯部正和、Chromium (VI) inhibits mouse metallothionein-I gene transcription by modifying the transcription potential of the co-activator p300, *The Journal of Toxicological Sciences*, 査読有、36巻2011/4/1発行予定
- ② 奥村文香、Yong Li、伊藤徳夫、中西剛、磯部正和、Glen K. Andrews、木村朋紀、The zinc-sensing transcription factor MTF-1 mediates zinc-induced epigenetic changes in chromatin of the mouse metallothionein-I promoter, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 査読有、1809巻、2011、56-62
- ③ 木村朋紀、Molecular mechanisms of zinc-mediated induction and chromium(VI)-mediated inhibition of mouse metallothionein-I gene transcription, *Journal of Health Science*, 査読無、56巻、2010、161-166
- ④ 木村朋紀、伊藤徳夫、Glen K. Andrews、Mechanisms of heavy metal sensing by metal response element-binding transcription factor-1, *Journal of Health Science*, 査読有、

[学会発表] (計 14 件)

- ① 古田雄三、木村朋紀、奥村文香、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内ヒストンH3 減少の機序解析、第 2 回メタロミクス研究フォーラム (京都薬科大、京都)、2010 年 11 月 2~3 日
- ② 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. 第 60 回藤原セミナー (大阪国際会議場、大阪)、2010 年 10 月 29~31 日
- ③ 木村朋紀、古田雄三、奥村文香、磯部正和、亜鉛によるメタロチオネイン遺伝子発現に伴うクロマチン構造変化に関与する因子群の解析、フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー (星薬科大学、東京)、2010 年 9 月 9~10 日
- ④ 木村朋紀、奥村文香、小野寺章、中西剛、伊藤徳夫、磯部正和、Chromium(VI) inhibits mouse metallothionein-I gene transcription by modifying transactivation potential of the co-activator p300、The XII International Congress of Toxicology (バルセロナ、スペイン)、2010 年 7 月 19~23 日
- ⑤ 木村朋紀、奥村文香、小野寺章、中西剛、伊藤徳夫、磯部正和、Cr(VI) inhibits mouse metallothionein-I gene transcription by modifying transactivation potential of the co-activator p300、第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2010) (徳島文理大、徳島)、2010 年 6 月 25~26 日、
- ⑥ 木村朋紀、奥村文香、小野寺章、中西剛、伊藤 徳夫、磯部 正和、6 価クロムによるメタロチオネイン遺伝子発現抑制機構の解析、第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会 (沖縄コンベンションセンター、沖縄)、2010 年 6 月 16~18 日
- ⑦ 奥村文香、木村朋紀、磯部正和、重金属応答性転写因子 MTF-1 によるメタロチオネイン誘導における細胞内シグナル伝達系の役割、日本薬学会第 130 年会 (桃太郎アリーナ、岡山)、2010 年 3 月 28~30 日
- ⑧ 木村朋紀、重金属応答性転写因子 MTF-1 による転写活性化機構に関する研究、フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー (沖縄コンベンションセンター、沖縄)、2009 年 11 月 6 日、
- ⑨ 奥村文香、木村朋紀、Yong Li、伊藤徳夫、中西剛、磯部正和、Glen K. Andrews、転写因子 MTF-1 を介した遺伝子発現にともなうクロマチン構造変化とその持続性、フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー

ー (沖縄コンベンションセンター、沖縄)、2009 年 11 月 5~6 日

- ⑩ 木村朋紀、奥村文香、磯部正和、カドミウムによるメタロチオネイン誘導におけるリン酸化シグナル伝達系の役割、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 (東京大学、東京)、2009 年 10 月 16~17 日
- ⑪ 木村朋紀、Chromium(VI) inhibits mouse metallothionein-I gene transcription by preventing the zinc-dependent formation of an MTF-1-p300 complex、The 5th International Congress of Asian Society of Toxicology (台北、台湾)、2009 年 9 月 13 日
- ⑫ 奥村文香、木村朋紀、Yong Li Y、伊藤徳夫、中西剛、曾根知道、磯部正和、Glen K. Andrews、Zinc-induced epigenetic changes in the mouse metallothionein-I promoter chromatin are mediated by the zinc-sensing transcription factor MTF-1、The 5th International Congress of Asian Society of Toxicology (台北、台湾)、2009 年 9 月 13 日
- ⑬ 奥村文香、木村朋紀、磯部正和、カドミウムによるメタロチオネイン誘導における JNK の役割、第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会 (岩手県民情報交流センター、盛岡)、2009 年 7 月 6~8 日
- ⑭ 木村朋紀、奥村文香、Yong Li、伊藤徳夫、中西剛、曾根知道、磯部正和、Glen K. Andrews、転写因子 MTF-1 を介したマウスメタロチオネイン-I 遺伝子発現にともなうクロマチン構造変化、第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会 (学術総合センター、東京)、2009 年 5 月 22~23 日

[その他]

ホームページ

<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