亜鉛による遺伝子の制御機構：ヒトメタロチオネイン遺伝子上流の金属制御性配列に、亜鉛依存的に結合する因子の精製及びその性質

大塚文徳

帝京大学薬学部環境衛生学教室

Control of Gene Expression by Zinc : Purification and Characterization of a Zinc-Dependent Binding Factor to the Metal Regulatory Element in the Upstream Region of the Human Metallothionein Gene

FUMINORI OTSUKA

*Department of Environmental Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Teikyo University*

1. はじめに

必須金属である亜鉛は数多くの重要な生命現象に関与しており、カドミウムを始めとする有害重金属の毒性発現とも深く関連している。現在までに亜鉛の生物機能に関して大量の情報が集積しているが、その多くは亜鉛欠乏条件下で得られた知見に基づいているため、それらを生化学的・分子生物学的に掘り下げて亜鉛酵素・亜鉛タンパクとの直接的な関連を追及する必要があるであろう。その一つの方向として、Tリンパ球増殖過程の亜鉛要求性ステップにおいてカドミウムが亜鉛と拮抗することにより阻害作用を示すという結果¹⁾を基に、我々は亜鉛及びカドミウムをプローブとするウェスタンブロット法²⁾を用いてリンパ球活性化過程における亜鉛・カドミウム結合タンパクの検出・解析を進めている。このような細胞機能との相関による亜鉛結合タンパクの検索を行う一方で、分子レベルでの亜鉛機能解明のためには“亜鉛の関与が明確であり、かつその役割を生化学的・分子生物学的に十分解析し得るシステム”の確立が重要であると考え、“真核細胞メタロチオネイン (MT) 遺伝子の亜鉛による発現調節機構”に着目している。MT 遺伝子上流には重金属による遺伝子発現に必要な塩基配列 (MRE: Metal Responsive Element) が存在し、細胞内への亜鉛流入の情報はこの MRE 配列に結合する転写調節因子を経て基本的な RNA 合成関連タンパク複合体へ伝達され、最終的に遺伝子の転写活性化が起こると予想されている。このシステムにおいて最も重要な因子は MRE 結合タンパクであるが、我々はすでに二種類の因子を同定している。³⁻⁵⁾ここではそのうち亜鉛

に依存して MRE 配列に結合する因子 ZRF (Zinc Regulatory Factor) についてその精製及び性質を述べる。

2. 亜鉛依存性 MRE 結合タンパク-ZRF

ヒト MT-IIA 遺伝子上流最近位の MREa 28 bp をプローブとするゲルシフトアッセイにより、亜鉛依存的かつ MRE 配列特異的な結合因子を HeLa 細胞及び mouse L 細胞核抽出液に見だし、ZRF と名付けた。ZRF 活性はすでに報告している MRE 結合因子 (MREBP: Metal Responsive Element Binding Protein) の結合条件では全く検出できず、マグネシウム及び SH 基保護剤である dithiothreitol (DTT) の添加が必要であった。ZRF 活性の亜鉛依存性が亜鉛フィンガー構造によるのではないかと予想から 3 個の亜鉛フィンガーをもつ転写因子 Spl の標的塩基配列 (GC box) への結合を調べたところ、mM オーダーの DTT 存在下では Spl も亜鉛依存性を示した。しかし Spl は DTT 非存在下では亜鉛に依存することなく GC box に結合するため、ZRF の亜鉛依存性は亜鉛フィンガー構造に基づくものではないと思われる。

3. ZRF の精製及び同定

転写因子を始めとする塩基配列特異的な結合タンパクの精製には、標的となる配列を含む合成 DNA をリガンドとするアフィニティークラムを用いるのが一般的である。しかし、ZRF の精製に関してはこの塩基配列特異的なアフィニティークラムへの非特異的なタンパクの吸着及び活性収率の著しい低下が原因で比活性の上昇はほとんど見られず、精製には不適當であった。一方、効果的な ZRF の精製はアビジン

ービオチンシステムによって可能であることが判明した。このシステムでは末端にビオチンを導入した合成 MRE をプローブとして HeLa 細胞核抽出液と溶液系で結合反応を行わせる。形成された ZRF-MRE 複合体はストレプトアピジンアガロースビーズによって捕捉した後、塩によって ZRF 活性を抽出する。抽出液には再度ビオチンプローブを添加してさらに二回の精製サイクルを繰返すことにより、1 万倍以上の比活性の上昇とともに分子量 116 kDa の精製タンパク標品を得た。

ZRF 活性は最終精製ステップの結合反応から亜鉛を除去したり、非ビオチン化 MRE あるいは ZRF が結合できない変異 MRE を添加してビオチン化 MRE と拮抗させると全く回収できないが、それと 116 kDa タンパクの回収とは完全に一致していた。また精製 ZRF を放射能ラベルした MRE プローブと結合させた後、UV クロスリンクによってアフィニティーラベルし、電気泳動によって結合タンパクの分子量を測定したところやはり 116 kDa であった。以上二点の証拠により、分子量 116 kDa の精製タンパクが ZRF であると結論した。

4. ZRF の性質

4.1 一般的性質及び亜鉛特異性 精製した ZRF と MRE の結合の性質は MREa をプローブとするゲルシフトアッセイによって解析した。ZRF と MRE との結合には核抽出液と同様 30 μ M 以上の亜鉛、2 mM 以上のマグネシウム及び 3 mM 以上の DTT を絶対的に必要とする。また、ZRF-MRE 複合体形成は反応開始後 60 分近くまで増加し、時間依存性を示す。カドミウムを始めとする種々の MT 誘導重金属は全く無効であり、ZRF-MRE 複合体は亜鉛のみに依存して形成される。さらに ZRF は亜鉛の 40 倍濃度のカドミウムが存在しても亜鉛を選択して MRE と結合するため、ZRF は一種の亜鉛センサーとして働くと考えられる。一方いったん形成された複合体は、亜鉛に対して親和性の高いキレート剤である 1, 10-phenanthroline の添加で解離し、キレート効果のない phenanthroline 異性体は無効であった。このことは ZRF と MRE との結合が亜鉛によって直接制御されていることを示している。

4.2 MRE 配列特異性 プローブである MREa の塩基配列を組織的に変異させた数種の合成 DNA を用いた拮抗実験により、ZRF の MRE への結合には MRE コア配列(とくに最初の 8 塩基)が必須であった。この結果は CAT アッセイなどを用

いて今までに解析された、“MRE 機能に必要な配列域”と良く一致する。また、注目すべきことは MRE コア配列に次いでその上流 4 塩基の変異がプローブ MRE との拮抗作用を大幅に低下させることである。このことは MRE コア配列の外側に ZRF の結合にとって重要な配列が存在することを示唆している。

4.3 フットプリント ヒト MT-IIA 遺伝子上流には複数個の MRE 配列が認められる。ZRF がこれら MRE のすべてに結合し得るのかどうかを DNase-I Footprinting によって解析した。亜鉛依存的な ZRF のフットプリントは MREa 上に明確に認められたが、MREb 上のフットプリントはそれに比して極めて弱いものであった。さらに転写開始点に認められる MRE 配列は全く被覆されておらず、ZRF は MREa を選択的に認識することが明らかとなった。

以上のような ZRF の性質は亜鉛による MT 遺伝子活性化に関わる因子としての必要条件を十分満たすものであり、今後 ZRF をコードする遺伝子のクローニングを通じて亜鉛による MT 遺伝子活性化の分子機構解明が期待できる。それと同時に ZRF がかくも亜鉛を選択的に認識することを可能にするタンパク構造の解析、及び ZRF が MRE 配列を持つ MT 以外の遺伝子群を制御している可能性をも含めて、ZRF は亜鉛の分子生物学を展開する上で極めて重要な研究対象であると考えられる。

要約

ヒト MT-IIA 遺伝子上流の MREa に結合する因子 ZRF を精製し、その結合の性質を解析した。ZRF は MT を誘導する重金属の中では亜鉛のみに反応して MRE の塩基配列に特異的に結合するため、亜鉛による MT の誘導に重要な役割を果たしていると思われる。

引用文献

- 1) F. Otsuka, M. Ohsawa, *Chem-Biol. Interact.*, **78**, 193 (1991).
- 2) 大塚文徳, 組織培養, **17**, 56 (1991).
- 3) S. Koizumi, F. Otsuka, H. Yamada, *Chem-Biol. Interact.*, **80**, 145 (1991).
- 4) S. Koizumi, K. Suzuki, F. Otsuka, *J. Biol. Chem.*, **267**, 18659 (1992).
- 5) S. Koizumi, H. Yamada, K. Suzuki, F. Otsuka, *Eur. J. Biochem.*, **210**, 555 (1992).