細胞の亜鉛応答に関与する転写因子 MTF-1

大塚文徳

Transcription Factor MTF-1 Involved in the Cellular Response to Zinc

Fuminori Otsuka

*Laboratory of Molecular Environmental Health, Faculty of Pharma-Sciences,
Teikyo University; 2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan.*

(Received December 1, 2020)

Heavy metals, both toxic and essential, have long been an important research focus in life science. To investigate the intracellular actions of heavy metals at the molecular level, I have been exploring protein factors involved in induction of metallothionein (MT) genes by heavy metals that specifically bind to a metal responsive element (MRE) in the region upstream of the human *MT-IIA* gene. Purification of a zinc-dependent MRE-binding factor, and cloning of its cDNA identified a sequence identical to that of metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1). MTF-1, which is characterized by six tandem repeats of the C₂H₂ type zinc finger motif, is indispensable for induction of MT gene expression by multiple types of heavy metal, but zinc is the only metal that can directly activate MTF-1 binding to the MRE, indicating that other heavy metal signals act through zinc as a second messenger. Functional analysis of various MTF-1 point mutants revealed several cysteine (Cys) residues critical for DNA binding and/or transactivation activity. Interestingly, six finger motifs seem to mediate several MTF-1 functions other than DNA binding. Immunohistochemical analyses of various mouse tissues revealed selective expression of MTF-1 in spermatocytes among the testicular cells, suggesting roles relevant to spermatogenesis. The zinc regulon, under the control of MTF-1, will likely provide good clues to aid in unraveling novel functions of intracellular zinc ions.

Key words—metallothionein; metal-responsive transcription factor-1; zinc, transcription; spermatocyte; zinc finger

1. はじめに

重金属は古くて新しい研究テーマである。しかもあらゆる研究領域にまたがる学際的なテーマであり、薬学領域では生化学・分子生物学を始めとして、特に衛生薬学領域の毒性学、環境衛生学、あるいは栄養学でもかならず取り上げられる物質である。筆者が重金属の研究に携わるようになったのは40年近くも前のことであるが、その当時重金属の知識は亜鉛 (Zn) を始めとする必須重金属の欠乏症や取り込みに関する遺伝病、あるいはカドミウム (Cd) や有機水銀などの毒性に関する研究が主であり、重金属の細胞内への取り込み機構や細胞内動態、オルガネラやタンパク複合体における重金属作用に関する知識など、いわゆるメゾスケールの情報

は不十分な状況であった。その後、分子生物学的手法の発展によって、重金属の細胞内機能とそのメカニズムに関する理解が急速に深まった。Zn に関して言えば、タンパク質構造の維持や酵素活性中心としての触媒機能という以前からよく知られていた機能¹⁾とともに、細胞内シグナルとしての機能²⁾や、多くの Zn トランスポーターによる細胞内濃度のホメオスタシス維持機構³⁾など、近年の発見を合わせて、現在 Zn を中心とした細胞像が構築されつつある。筆者は以前にも Zn 応答に係わる転写因子 metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) の研究に関して自らのデータを中心とした総説を本誌に発表した⁴⁾。今回定年退職を機にこれまでの研究を振り返る機会を頂いた。そこで前回の内容と重複する部分もあるが、メタロチオネイン (metallothionein; MT) 遺伝子の転写制御の研究を始めるに至った経緯と、当研究室の助教であった下山多映、長田洋一両博士とともに行った最近の研究内容を付け加え、時系列に沿った形でまとめてみたい。

帝京大学薬学部生命薬学講座環境衛生学研究室 (〒173-8605 東京都板橋区加賀 2-11-1)

e-mail: fumio@pharm.teikyo-u.ac.jp

本総説は、2019年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

2. T細胞増殖に対するCdの阻害作用とZnの回復効果

筆者が重金属研究を始めるきっかけとなったのは、帝京大学薬学部の大沢基保教授の下で免疫毒性物質のスクリーニングシステムとしてマウス培養脾臓細胞のマイトゲン反応を検討することになり、その際に免疫毒性物質のモデルとしてCdを用いたことにある。マウス脾臓細胞の培養時に植物レクチンであるコンカナバリンA (concanavalin A; Con A) を作用させるとT細胞が、グラム陰性菌由来のリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) を用いるとB細胞が活性化され、G₀期にあるそれぞれの細胞がG₁期への移行を開始する。細胞増殖の指標として [³H] チミジンの取り込みでDNA合成を測定すると、Con AによるT細胞増殖はLPSによるB細胞増殖よりもCdで阻害され易いことがわかった。⁵⁾ Cdの細胞毒性の一部は、イオンとしての性質が似ている必須重金属であるZnと拮抗することにあると考えられていたため、B細胞増殖を阻害せずT細胞増殖を約50%阻害する10 μMのCdCl₂と同時に30 μMのZn(CH₃COO)₂を添加して培養すると、Cdの阻害作用が部分的に回復することを見出した。一方、この条件下での細胞内へのCd取り込みはZn添加に影響されないため、Cd取り込みをZnが抑制しているわけではない。さらに、Cdの増殖阻害作用及びそれに対するZnの回復作用は、ともにT細胞活性化開始後、最初のDNA合成が起こるまでの約16時間内に認められることから、T細胞のG₀→G₁移行の過程でこれら2つの重金属イオンが拮抗するステップがあると考えた。しかしZnの回復効果のメカニズムとして、Cdを結合することによってその毒性を緩和するMTの誘導がZnによって高進される可能性もある。そこで¹⁰⁹CdCl₂を添加して培養を開始し、24時間後に調製した細胞抽出液中のMTレベルを、結合した¹⁰⁹Cdを指標にしてゲルろ過法によって調べると、Zn添加によるMTの増加は認められなかった。しかし、培養開始後16時間までの間のMTレベルの変動を詳細に解析するためには、多検体を一斉分析できるMT測定法を開発する必要があった。

培養細胞中のMTを細胞生物学的な視点で測定する方法としては、そのアイソフォームをも分離解析できる電気泳動による測定法が用いられていた。

すなわち、[³⁵S] システインを培養液に添加し、ラベルされたタンパク質を含む抽出液を煮沸・遠心分離後、その上清に回収される非変性画分中に存在するMTを電気泳動で測定するものである。しかしMTはCys残基を多く含むため、電気泳動試料調製中に生じる分子間S-S結合によって凝集し、高分子量のバンドを形成するか又はスミアしてしまう。そこで、Cys残基をカルボキシメチル化して単量体として維持する必要がある。⁶⁾ 筆者らは簡便な非RI法として銀染色による検出を試みたが、カルボキシメチル化されたMTにはAgイオンが結合せず、ネガティブ染色となってしまう。試行錯誤の末、銀染色に先立って泳動後のゲルをチオ硫酸ナトリウムで処理すると、カルボキシメチル化されたMTを銀染色することが可能となることが分かり、ナノグラムオーダーのMTを簡便に定量できる方法を確認した。⁷⁾ この方法で脾臓リンパ球を解析すると、G₀→G₁移行時にはCdによるMT誘導がほとんど認められず、有意なMT誘導はCon Aによる活性化後約20時間以降でなければ起こらない(未発表データ)。これはリンパ球活性化の初期段階では代謝反応が全体的に低レベルであることが一因かもしれない。以上の結果から、T細胞活性化の初期段階はCdなどの有害重金属に対して防御機能が低く、影響を受け易いことが示唆された。

次に、T細胞活性化の初期過程においてどのようなZn結合タンパク質が存在するのかを⁶⁵ZnCl₂をプローブとするブロッティング法を確認して解析した。⁸⁾ その結果脾臓細胞の細胞質に、Con Aによる活性化に伴って出現する分子量約100 kDaのZn結合タンパク質と思われるシグナルを検出した。⁹⁾ このシグナルは、HeLa細胞を始めとする増殖の盛んな複数の培養細胞株にも認められることまでは分かったが、当時の実験技法ではそのタンパク質の同定は容易ではなく、特に脾臓細胞はT、B細胞、及びマクロファージなど複数の細胞種を含んでいるため、T細胞内のタンパク質であるという証拠も簡単には得られなかった。このように、G₀→G₁期に変動するタンパク質というクライテリアで解析しても、当時はZn結合性という指標だけで対象を絞り込むことは容易ではなかった。そこで、重金属の細胞内機能をタンパク質レベルで研究するには、重金属結合性以外の指標で標的因子を捕捉・解析し得る

Fig. 1. Schematic Diagram of the Human MT Genes and the Region Upstream of the Human *MT-IIA* Gene

MT isoform gene cluster on human chromosome 16. With few exceptions, each gene contains three exons, represented by three vertical lines. There are thirteen MT-I subtype genes and some of these are shown in the figure. (B) Binding sites of various transcription factors in the region upstream of the *MT-IIA* gene.^{20,21)} The arrows indicate the MREs. Black and grey arrows indicate zinc responsive MREs with high and low activity, respectively. White arrows indicate MREs that are not responsive to zinc. Other symbols indicate binding sites for transcription factors specified below each symbol. (C) MREa and the flanking nucleotide sequences. The sequence corresponding to the MRE is boldfaced. Horizontal lines indicate the sequences used as probes to detect MREBP and MTF-1.

システムが望ましく、その目的にかなうものとして重金属の感知・応答システムの存在が確実であるMT遺伝子の重金属依存的な転写活性化に着目した。

3. MT 遺伝子の構造と転写制御

MTはウマの腎臓から発見された分子量約6000の低分子量タンパク質で、構成アミノ酸の約30%がCys残基であるという特徴を持つ。また、MTはCdやZn、銅(Cu)、水銀(Hg)など多様な重金属イオンで誘導される。^{10,11)} MTは重金属を結合することによりその毒性を緩和することが知られているほか、細胞内Znなど必須重金属濃度の恒常性維持機能や酸化ストレスに対する防御機能があると考えられており、薬学分野(特に衛生学)では周知のタンパク質である。高等動物細胞のMTと同様に、Cys残基を多く含む低分子量タンパク質は植物や単細胞生物(酵母、シアノバクテリアなど)にも存在し、ウマ腎臓のMTと相等性の高い動物細胞のMTをクラスI、単細胞生物などのMTはクラスIIとして分類される。植物のものはフィトケラチンと呼ばれ、遺伝子としてコードされてはならず、生物体内でフィトケラチン合成酵素によって合成される。

ヒトやマウスを始めとする哺乳類のMTには、少し配列が異なる4種のアイソフォーム(MT-I、

-II、-III、-IV)の存在が知られている。MT-IとMT-IIは様々な組織で重金属により高発現するが、MT-IIIは脳、MT-IVは舌などに選択的に発現し、重金属誘導性は明確ではない。¹²⁾ これらMTをコードする遺伝子は、ヒトの場合は16番染色体、マウスの場合は8番染色体上にクラスターを形成して存在している[Fig. 1(A)]。また、マウスの*MT-I*遺伝子は1種類であるが、霊長類の場合は6個の偽遺伝子も含めて13個のサブタイプが存在する。¹³⁾ しかし、それらの生物学的機能の違いはよく分かっていない。

重金属イオンによるMT誘導は、それをコードする遺伝子の転写レベルで制御されている。また、誘導要因としては、Cd、Zn、Cu、Hg、などの2価の重金属イオンのほか、1価のAgイオンも誘導能が高い。また例外の1つとして、酵母のMTはCdでは誘導されず、CuイオンとAgイオンによってのみ誘導される。¹⁴⁾ 一方、6価クロムでは誘導されないばかりか、逆にCdイオンやZnイオンによるMT誘導を阻害する。^{15,16)}

MT遺伝子の重金属による転写活性化に関する研究で最もよく用いられるのは、マウスでは*MT-I*遺伝子上流、ヒトでは*MT-IIA*遺伝子上流の転写制御領域である。Palmiterらはマウス*MT-I*遺伝子上

流制御領域をラットの成長ホルモン遺伝子上流に融合し、マウス受精卵に導入して世界初のトランスジェニックマウスを作製した。¹⁷⁾ このマウスは Zn 強化餌の投与により成長ホルモンが過剰に産生され、通常の約 2 倍の大きさに成長した。

Stuart らはさらにマウス *MT-I* 遺伝子上流制御領域中の重金属応答に関与する塩基配列を同定するため、当該上流域の 5', 3' 欠失、リンカースキニング、内部欠失など多数の変異体を作製してチミジンキナーゼ遺伝子に連結し、それぞれの Cd 依存的な転写活性化能をマウス受精卵細胞を用いたレポーターアッセイによって比較解析した結果、重金属応答に必須の塩基配列 metal responsive element (MRE: コンセンサスコア配列 TGCRNC) を見い出した。¹⁸⁾ MRE はマウス *MT-I* 遺伝子上流以外にも数多くの MT 遺伝子上流領域に複数個存在する。¹⁹⁾ MRE は、ヒト *MT-IIA* 遺伝子上流には転写開始点に近い方から MREa-g の 7 個 [Fig. 1 (B)], マウス *MT-I* 遺伝子上流には 5 個認められる。それらの転写活性化能は等価ではなく、ヒト *MT-IIA* 遺伝子の場合、Zn 依存的に転写を活性化できるものは MREa, MREb, MREe, MREg の 4 つであり、MREa が最も転写活性化能が高く MREb は最も弱い。²⁰⁾ MRE のほかにも、Sp1 の結合サイトである GC box, AP-1 の結合サイトである TPA responsive element (TRE), グルココルチコイドレセプター結合サイトである glucocorticoid responsive element (GRE) など多様な転写因子の結合配列が認められ、MT の生物学的意義を考える上で興味深い。

一般に同一転写因子の結合サイトが増えるに従って転写活性化能は上昇する。ヒト *MT-IIA* 遺伝子上流の MREa 配列を含む合成 DNA を連続的に連結してレポーター遺伝子上流に挿入すると、少なくとも 8 個まで相乗的に転写活性の上昇が認められる。²⁰⁾

4. MRE に結合する転写因子

1980 年代から 90 年代にかけては、Sp1, AP-1, NF- κ B など、現在ではよく知られている転写因子が次々に見つかった時代であり、同時に electrophoretic mobility shift assay (EMSA)、フットプリント法、サウスウェスタン法、あるいはクロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation; ChIP) 法などの転写因子の解析法も確立されていった。そ

のような時期に、旧労働省産業医学総合研究所（現在の独立行政法人労働安全衛生総合研究所）の小泉信滋博士との共同研究として、ヒト *MT-IIA* 遺伝子上流の MREa に結合する転写因子の探索を開始した。ちょうどその矢先、Cu イオン選択的に誘導される酵母 MT 遺伝子の Cu 依存性転写因子 ACE1 が遺伝学的な手法によって同定された。¹⁴⁾ ACE1 は N 末端側半分に存在する DNA 結合ドメインと C 末端側半分に存在する転写活性化ドメインで構成されており、DNA 結合ドメインには Cys 残基が CxC あるいは CxC のように規則的に並ぶ MT 様の配列が認められる。そのドメインに Cu イオンが結合することによってタンパク質構造が変化し、DNA 結合型となる。さらにそのドメインに結合できるのは Cu あるいは Ag イオンのみであることにより、酵母の MT が Cu, Ag イオン選択的に誘導される理由が理解できる。しかし、以下に述べるように高等動物細胞の転写因子は少なくともタンパク質構造的には ACE1 のホモログではない。

筆者らは、HeLa 細胞の核抽出液から EMSA 法によって MRE 結合因子の探索を開始したが、その際ヒト *MT-IIA* 遺伝子の転写開始点に最も近く、かつ最も転写活性化能が高い MREa を選び、MREa のコア配列のみ含むプローブと、その周辺配列をも含むプローブの 2 種類を作製した [Figs. 1 (B) and (C)]。研究開始当初、MT 誘導能が最も高い重金属種である Cd に依存して MRE に結合する因子を見つけるために様々な結合反応条件を試したが、目的にかなうシグナルは得られなかった。代わりに、それぞれのプローブにおいて興味ある結合タンパク質を 1 つずつ見つけることができた。MRE コンセンサスコア配列のみを持つプローブでは重金属非依存的に MRE に結合する因子、コア配列の周辺配列も含むプローブでは数十 μ M オーダーの Zn 添加に依存して MRE に結合する因子を検出し、それぞれを MRE binding protein (MREBP),²²⁾ zinc regulatory factor (ZRF)²³⁾ と名付けた。MRE 配列を持つ非標識合成 DNA の添加による拮抗実験により、これらの因子はともに MRE 配列に特異的に結合していることを確認したが、ZRF の方が MREBP よりも MRE 配列に対して結合親和性が高かった。

次にこれら 2 つの因子を HeLa 細胞核抽出液から

精製することを試みた。MREBP は、核抽出液を硫酸分画後、Sephacryl S-300 によるゲルろ過を経て、MREa 配列を含む合成 DNA をリガンドとするアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって、比活性約 10 万倍、電気泳動的に 7 つほどのタンパク質を含む標品にまで精製した。²⁴⁾ この精製標品を標識 MREa プローブを用いてサウスウェスタン解析を行い、分子量 112 kDa のタンパク質であることを突き止めた。MREBP の性質として興味深いのは、MREa プローブへの結合が、数十 μM オーダーの Cd イオンや Zn イオンで解離することである。すなわち、重金属暴露による細胞内重金属濃度上昇がない状態では、MREBP が MT 遺伝子の転写活性化を抑制している可能性が考えられた。ただし、上述したように MREBP は ZRF に比して MRE に対する親和性が低いため、以後研究の比重を ZRF に移すことにした。

ZRF も MREBP と同様にゲルろ過と DNA アフィニティーカラムを用いて精製を試みたが、精製度は全く上昇しなかった。しかし、ビオチン化した MREa プローブと ZRF の結合反応を EMSA 法と同じ条件で行い、DNA-タンパク質複合体をストレプトアビジンビーズによってトラップする方法、いわゆる DNA アフィニティー沈殿法が奏功することを見い出した。²⁵⁾ その際、MREa プローブにおいてビオチンを MREa 配列の上流側の DNA 末端に付加すると複合体を全く回収できないことから、おそらく MRE-ZRF 複合体の立体構造的な問題によって、カラム担体に固定した MRE への ZRF 結合がうまくいかなかったものと考えられた。ストレプトアビジンビーズで回収した MRE-ZRF 複合体から 0.4 M の NaCl を含む緩衝液で ZRF を抽出し、脱塩後再度 DNA 沈殿を行うというサイクルを 3 回繰り返すことにより、62.5 g の HeLa 細胞から電気泳動上分子量 116 kDa の単一バンドの精製標品約 100 ng を得ることができた。²⁵⁾ ZRF と MREBP は電気泳動的にはほぼ同じ移動度を持ち、MREBP の精製標品中には ZRF 活性が存在していた²⁶⁾ が、これら 2 つがプローブの違いによって異なる挙動を示す同一のタンパク因子ではなく、確かに異なる因子であることをグリセロール密度勾配遠心法、²⁷⁾ 及び ZRF の精製標品中には MREBP 活性が存在しないこと²⁵⁾で確かめている。

次に ZRF の精製標品を用いてその部分アミノ酸配列を決定し、それから予想される DNA 塩基配列をプローブとして HeLa 細胞 cDNA ライブラリーからプラークリフティングによって ZRF をコードする全長 cDNA をクローニングした。²⁸⁾ その塩基配列は既に Brugnera らによってクローニングされたヒト MTF-1 cDNA²⁹⁾ と 1 塩基の相違があるものの同一の因子であることが明らかとなり、本稿でも以降 MTF-1 の名称を使用する。また、以下に述べる MTF-1 の性質に関する筆者らの研究結果はヒト MTF-1 を用いて得られたものである。

5. MTF-1 のタンパク質構造と性質

MTF-1 のタンパク質構造は、ヒト、マウスなどの哺乳類、魚類 (Fugu) のものがよく知られており、基本的にそのドメイン構造はよく保存されているが、C 末端領域の長さが異なっている。³⁰⁾ MTF-1 のタンパク質構造を特徴づけるのは、N 末端側半分の中に存在している 6 個の連続した C_2H_2 タイプの Zn フィンガーモチーフであり、このドメインは MRE への結合を担っている。また、C 末端側半分には酸性アミノ酸領域、プロリンリッチ領域、セリン/スレオニンリッチ領域等の転写活性化領域が存在する。N 末端領域と C 末端領域の機能は不明であるが、C 末端領域にはヒト、マウス、フグに共通して CQCQCAC の配列を持つ Cys クラスターが存在しており、MTF-1 の機能に重要であると考えられている (Fig. 2)。^{31,32,34)} MTF-1 はリン酸化^{35,36)} や SUMO 化³⁷⁾ などの翻訳後修飾を受けることが知られており、リン酸化に係わるキナーゼや、SUMO 化が関与する MTF-1 と細胞内因子との複合体形成などが報告されているが、MTF-1 の細胞内機能全体における位置付けは未解明である。

ヒト及びマウスの MTF-1 をコードする遺伝子は、ハウスキーピング遺伝子に多くみられる TATA レス、かつ CpG island を持つ遺伝子であり、その上流制御領域に MRE は存在しない。³⁸⁾ 実際、MTF-1 は程度に差はあるものの、ほぼすべての組織・細胞において普遍的に発現しており、³⁸⁾ MTF-1 自身が Zn や Cd などの重金属イオンによって誘導されることはない。²⁸⁾

精製 MTF-1 やリコンビナント MTF-1 はともに EMSA 法において Zn イオンにのみ依存して MRE に結合し、Zn イオン以外の MT を誘導する Cd,

Fig. 2. Domain Architecture of Human MTF-1,²⁹⁾ and the Cys Residues Involved in Its Function

Numerals indicate amino acid residue numbers starting from the MTF-1 N-terminus. Vertical lines with closed circles indicate Cys residues involved in MTF-1 functions, which are summarized based on previous findings.^{4,32,33)}

Hg, Cu, Agなどの重金属イオンは全く無効である。^{20,23)} 一方, *MTF-1* 遺伝子のノックアウト細胞であるマウス ES 細胞 *dko739)* では, Zn イオンのみでなくその他の MT 誘導能を持つ重金属イオンすべてによる MT 誘導が認められなくなるため, MT を誘導する重金属イオンはすべて MTF-1 を介して MT 遺伝子の転写を活性化する。⁴⁰⁾ したがって, Zn 以外の重金属イオンは細胞に取り込まれたのち細胞内遊離 Zn 濃度の上昇を惹起し, MTF-1 はそれを直接感知して活性化が起こるものと考えられている (Fig. 3).⁴¹⁾

結合標的である MREa 配列の様々な変異体を用いた拮抗実験によれば, ヒト MTF-1 の DNA 結合には MRE コンセンサス配列とともに, それに隣接する上流側 4 塩基の配列が重要である。²⁰⁾ また *in vitro* での Zn イオン依存的なフットプリントが少なくともヒト *MT-IIA* 遺伝子上流に存在する MREa と MREb に認められる。²⁵⁾ 一方, TATA box と重なって存在する MRE のコンセンサス配列にはフットプリントが形成されない。また前述のように, *MT-IIA* 遺伝子上流制御領域に存在する 7 つの MRE の転写活性の強弱は MTF-1 との結合親和性の度合いと一致するが, MREb に関しては, *in vitro* において精製 MTF-1 と強く結合するにもかかわらず, 細胞内での Zn 依存的な転写活性化能は低い。²⁰⁾ これは, MREb 配列の 3' 側に Sp1 の結合配列が存在し, そこに結合した Sp1 が MTF-1 の結合を妨げるためと考えられる。²¹⁾ 通常, Sp1 は転写活

Fig. 3. MTF-1 Activation by Heavy Metals

When multiple types of heavy metal ions are incorporated into a cell, the intracellular free zinc ion concentration increases by some mechanism (acting as a second messenger). Zinc-activated MTF-1 binds to the MRE, culminating in transcriptional activation of genes, such as the MT genes. Under some cell culture conditions, MTF-1 has been reported to localize in the cytoplasm, and nuclear translocation is promoted by zinc ions. The significance of MTF-1 self-assembly in response to zinc ions prior to MRE binding has not yet been elucidated. A question mark indicates that the respective step is presently controversial.

性を促進するタンパク因子であるが, 転写抑制に働く場合があるという興味深い例の 1 つである。さらに MTF-1 の MRE への結合は Zn 以外に還元状態によっても左右され,³³⁾ その活性化はレドックス制御を受けている可能性もある。

ヒト MTF-1 のアミノ酸配列 No. 430–450 をエピトープとして作製した抗体で細胞を免疫染色すると, HeLa 細胞では MTF-1 は核に局在し, さらに核の中では核小体以外の核質に均一に分布していた。²⁸⁾

この染色像は、FLAG タグを付加したりコンビナント MTF-1 を細胞内に発現させ、抗 FLAG 抗体で解析しても同じであった。その他多くの培養細胞株や精巣などのマウスの組織切片でも MTF-1 は核局在を示すが、マウス脾臓細胞などで例外的に細胞質に存在する場合があります。その意義としては細胞内 Zn 動態となんらかの関係があるのかもしれない(未発表データ)。

MTF-1 の興味深い性質として、Zn 依存的に二量体あるいはそれ以上の重合体を形成することが知られている。^{28,34,37)} 筆者らはこの現象を、Cd 処理した HeLa 細胞中の内在性 MTF-1 を、EMSA 法と同じ非変性ゲル電気泳動で解析することにより見出した。²⁸⁾ すなわち、Cd 処理した HeLa 細胞の核を界面活性剤を含む試薬を用いて単離し、その抽出液を非変性ゲル電気泳動後にイムノブロット解析を行うと、MTF-1 は泳動オリジン付近に凝集体と思われるスミアとして存在しており、通常の EMSA 法で検出される位置には存在しない。一方 Cd 非処理細胞の MTF-1 は細胞質画分に回収され、EMSA 法で認められるのと同様の位置に泳動される。MTF-1 が細胞質画分にも回収されるという結果は、MTF-1 の精製を重金属処理していない細胞から調製した核抽出液を用いて行ったことや、核局在を示す免疫染色の結果と矛盾しているように思えるが、精製の際の核単離に用いた低張緩衝液とは異なる、界面活性剤 (NP-40) を含む核単離試薬を使用することにより、細胞分画時に核からの漏出が起こるためと考えられる。すなわち、Cd 処理した細胞中では MTF-1 がなんらかの複合体を形成しており、核から漏出し難くなっているものと考えられる。さらに EMSA 法に抗 MTF-1 抗体を用いたイムノブロットを組み合わせたシフトウェスタン法を用いて、核抽出液中の MTF-1 やリコンビナント MTF-1 の重金属に対する挙動を *in vitro* で解析すると、Cd 処理細胞からの核抽出液でみられたものと同様に、Zn や MREa プローブを添加しない状態では EMSA 法によって検出される位置にシングルバンドとして存在しているが、Zn の添加によって泳動オリジン付近にシフトアップしてスミアし、MREa プローブの添加によってシフトダウンして再び明確なバンドとして検出される。^{4,28)} これは Zn によるタンパク質間架橋によって生じる MTF-1 の非特異的

な凝集体ではなく、活性化された MTF-1 が DNA 結合する前段階として形成する、意味のある自己集合体であると思われる。この現象は *in vitro* では Zn 特異的に認められ、他の MT 誘導能を持つ重金属種である Cd や Cu によっては生じない。⁴⁾ また、この自己集合が Cd 処理細胞内でも生じていることを、異なるタグを付加したヒト MTF-1 を細胞内に共発現させ、一方の抗タグ抗体による免疫沈降物中に他方のタグを持つ MTF-1 が共沈することで確認している(長田、未発表データ)。現在のところ MTF-1 の自己集合の意義は不明であるが、DNA 結合以外の Zn 応答指標としても有用であると考えている。

6. MTF-1 の Zn 応答機構

MTF-1 の Zn 応答機構は最も知りたいことの 1 つであり、そのシステムを応用すれば比較的毒性の低い Zn によって起動する細胞内スイッチとしても応用可能であろう。前述したように酵母の Cu チオネイン遺伝子の転写因子 ACE1 はその分子内に MT 様のアミノ酸配列が存在しているため、タンパク一次構造から Cu 応答メカニズムが類推できた。しかし MTF-1 のタンパク質一次構造には明確な Zn 応答配列の候補が見当たらない。Zn が結合する構造として MTF-1 は Zn フィンガーと Cys クラスターを持つが、Zn 応答に関与するためには Zn イオンとの結合・解離が容易である必要があり、これらの構造がその条件を満たすのかどうかは現在でも完全には解明できていない。

MTF-1 が標的遺伝子の転写を Zn 依存的に制御するステップとしては、*in vitro* の EMSA 法における Zn 依存的 DNA 結合で明らかのように、主として標的 DNA への結合段階にあることは間違いない。実際に ChIP アッセイによって、細胞内でも Zn, Cd, Cu, Ag など複数種の重金属イオン依存的な DNA 結合が認められる。⁴⁾ いくつかの論文や総説では、NF- κ B のように MTF-1 が細胞質内に存在し、Zn 依存的に核移行するという記述があるが、この現象はもともと無血清培地を用いた培養条件下で観察されたものであり、^{42,43)} HeLa 細胞を始めとして MTF-1 が核に存在する多くの培養細胞でも重金属依存的な MT 遺伝子の活性化が起こるため、Zn 依存的核移行は活性化の主たるメカニズムとは考え難い。

MTF-1 の Zn 応答性に関与するタンパク質領域に関して、様々な欠失変異体を用いたレポーターアッセイの結果が報告されているが、いまだに統一見解には至っておらず、各研究室間で結果が異なっている状況である。⁴⁾ 一方、MTF-1 の精製標品は単独で Zn 依存的に DNA に結合することから、MTF-1 は直接 Zn イオンと相互作用すると考えられること、及び MTF-1 は欠失変異によって活性が著しく低下する傾向があること³⁹⁾ などから、Zn イオンとの結合に重要なアミノ酸残基である Cys と His に的を絞り、これら 2 つのアミノ酸残基のすべてをカバーするようにヒト MTF-1 点変異体を多数作製し、*MTF-1*^{-/-} の dko7 細胞におけるレポーターアッセイによってそれぞれの Zn 依存的な転写活性化能を解析した。³²⁾ その結果 His 残基の変異による影響は少なく、主として 3 つのタンパク質領域で Cys 残基の変異による Zn 依存的転写活性の著しい低下を認めた。すなわち、①第 1-第 5 フィンガーそれぞれの Zn をキレートする 2 つ目の Cys 残基の変異 (フィンガーの Zn 結合能の破壊)、②転写活性化に係わる酸性アミノ酸ドメイン中の Cys 残基 (アミノ酸残基 No. 337) の変異、③C 末端領域の Cys クラスター (4 個の Cys 残基すべての同時変異) である (Fig. 2)。さらに点変異体のリコンビナントタンパク質を用いて EMSA 解析を行うと、Zn 依存的な DNA 結合活性が低下するのは第 1-第 4 フィンガーの変異体であり、②や③の変異体は DNA 結合活性を維持していた (長田、未発表データ)。^{31,33)} また、第 5、第 6 フィンガーの Zn 結合能を破壊しても DNA 結合活性は低下しないことから、6 個の連続した Zn フィンガーモチーフのうち、DNA 結合に係わるのは第 1-第 4 フィンガーであり、第 5 フィンガーは DNA 結合ではなく転写活性に係わる特異なフィンガーである。また、②や③の変異は DNA 結合には影響せずに Zn 依存的な転写活性化に係わることから、MTF-1 が標的 DNA に結合した後も転写制御ステップが存在する可能性がある。特に②の Cys 残基は転写活性化ドメインである酸性領域の中にあり、その領域にはコアクチベーター p300/CBP と MTF-1 との Zn 依存的な相互作用が報告されている。⁴⁴⁾

以前より、MTF-1 を DNA 結合型に活性化するために Zn 応答している領域は、Zn フィンガード

メインではないかと考えられてきた。すなわち、MTF-1 の Zn フィンガードメインは Zn の出入りが可能な Zn 応答フィンガーであるという仮説である。Chen らは、6 個のフィンガーの Zn 親和性を比較した結果、第 5、第 6 フィンガーの Zn 親和性が他のフィンガーよりも低いことから、Zn フィンガードメイン末端の 2 つのフィンガーが Zn 応答フィンガーである可能性を示唆した。⁴⁵⁾ しかしこれら 2 つのフィンガーの Zn 結合能を破壊してもなお Zn 依存的な DNA 結合が可能であり、むしろ第 1-第 4 のフィンガーの中に Zn 応答性フィンガーがあると考えべきである。しかし、この中のどれが Zn 応答性フィンガーであるのかを特定するためには、これらのフィンガーが関与している DNA 結合性や、それを介した転写活性化による判定は不可能であり、それぞれのフィンガーへの Zn 結合・解離を直接解析できる物理化学的な方法が必要であると思われる。

MTF-1 の 6 個の Zn フィンガーはそれぞれが典型的な C₂H₂ タイプのフィンガーであるにもかかわらず、DNA 結合のみならず転写活性化に直接関与するフィンガーを含んでいる。また、フィンガーの欠失実験により、核局在シグナルが第 2、第 3 フィンガーにあるという報告がある。⁴⁶⁾ 筆者らもヒト MTF-1 の点変異体を用いて、第 3、第 4 フィンガーへの Zn 結合が核局在に必要であること、⁴⁾ 並びに前述した Zn 依存的な MTF-1 の自己集合にも特定のフィンガーへの Zn 結合が必須であるという結果 (長田、未発表データ) を得ている。このように、Zn フィンガードメインは MTF-1 の複数の機能と関連しており、これを多機能性 Zn フィンガードメインと称してもよいのではないだろうか。おそらくフィンガーへの Zn 結合が、ドメイン間相互作用など、MTF-1 のタンパク質構造全体の変化を介して複数の機能に係わっていると考えられ、これはある意味酵母の ACE1 における Cu イオンによる構造変化を彷彿とさせる。今後、MTF-1 の Zn 依存性は、タンパク質の構造変化との関連でも興味ある研究課題になるものと思われる。

7. MTF-1 の生物学的役割

MTF-1 の Zn 応答機構の解明という方向性とは別に、本転写因子をプローブとして Zn の生物学的意義を探ることができる。すなわち、Zn 依存的な

Fig. 4. Immunohistochemical Analysis of Mouse Testicular Sections Using an Anti-MTF-1 Antibody

Testes isolated from 16-week-old ddY mice were fixed with Bouin's solution, embedded in paraffin, and sliced into thin sections with a microtome. Sliced sections were then treated with the anti-MTF-1 antibody or a control rabbit IgG antibody. Sections were successively treated with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody and stained with 3,3'-diaminobenzidine (DAB). In the cross section of the seminiferous tubule (right panel), a donut-shaped staining signal produced by the anti-MTF-1 antibody was observed, which corresponds to spermatocytes and round spermatids.

転写因子である MTF-1 が制御する遺伝子群は、Zn によって制御される 1 つの遺伝子グループ (Zn レギュロン) を形成しているはずであり、MTF-1 のノックアウトやノックダウン細胞を用いて変動する遺伝子を調べたり、MTF-1 と結合する遺伝子プロモーターを解析することにより、細胞内遊離 Zn 濃度上昇に伴う細胞応答を知ることができるはずである。

MTF-1 のノックアウトマウスは Günes らによって作製され、その最も特徴的な形質は、妊娠 14 日齢で肝臓の崩壊により死に至ることにある。⁴⁷⁾ *MTF-1*^{-/-} マウスの胎児期に発現する mRNA を正常胎児のものと比較することにより、肝臓崩壊の原因は MTF-1 のノックアウトによって発現が低下する転写因子 C/EBP α ではないかと報告されている。⁴⁸⁾ また、同時に LCN1/tear lipocalin の発現も低下しており、細胞防御機能の低下もその一因となると考えられる。Langmade らは、Zn イオンの排出に係わるトランスポーターである ZnT1 をコードする遺伝子の発現が MTF-1 によって制御されていることを報告しており、⁴⁹⁾ 上昇した細胞内遊離 Zn 濃度を通常の状態に戻すことは MTF-1 の働きとして合理的である。それ以外の数種の Zn トランスポーター遺伝子のほか、細胞内レドックス制御関連の遺伝子発現にも MTF-1 が関与している。⁵⁰⁾ MTF-1 と疾病との関連としては、神経変性疾患の原因とみなされているレビー小体を構成する α -シヌクレインの凝集を阻止する β -シヌクレインの誘導に関与するという報告がある。⁵¹⁾ また、ショウジョウバエの場合ではあるが、MTF-1 が MT の発現誘導を介して ROS の消去に働き、個体の運動性

や寿命にも関与すると報告されている。⁵²⁾ このように MTF-1 が関与する生体反応は多様であり、細胞種、生物種の違いにおける Zn の多様な機能の一部を反映しているものと考えられる。

MTF-1 を介する Zn 機能を探索するための 1 つのアプローチとして、筆者らはマウスの各組織における MTF-1 の存在場所と発現レベルを抗 MTF-1 抗体を用いた免疫組織染色で解析している。現在までに調べた限りすべての組織で MTF-1 の発現が認められるが、その中で特徴的な局在を示したのが MTF-1 の高発現が報告されている精巣である。^{38,41)} 精巣切片を免疫染色して観察すると、精細管断面の中心腔の近傍において、MTF-1 はドーナツ状の染色像を呈し、その位置から考えて主として精母細胞及び円形精子細胞の核に選択的に高発現しているものと思われる (Fig. 4)。⁵³⁾ 精巣は Zn 濃度が高い臓器であり、Zn 欠乏が精子形成を阻害することが知られているが、Zn の存在場所としては Leydig 細胞や精子尾部が目され、男性ホルモン合成や精子の運動性などとの関連が示唆されてきた。⁵⁴⁾ 一方、近年卵母細胞の減数分裂時における Zn シグナルの重要性が指摘されており、⁵⁵⁾ 精母細胞における減数分裂の際にも Zn が重要な役割を果たすことも考えられる。現在のところ、MTF-1 の役割が精子形成に必須であるかどうかは不明であるが、精巣細胞 (Sertoli 細胞, Leydig 細胞, 精原細胞, 精母細胞) それぞれの樹立培養細胞株を用いて、Zn 添加や MTF-1 ノックダウンの条件下での遺伝子発現解析の結果、Zn 応答遺伝子の種類が各細胞種によって大きく異なることや、MTF-1 によって発現促進されるものと同時に、抑制される遺伝子も複数存在す

ることを確認しており、今後新たな展開が期待できる（下山、発表準備中）。

以上のように、CdによるT細胞増殖阻害作用からZnに興味を持ち、Znに応答する転写因子MTF-1を中心に研究を行ってきた。Znを必要とする生物システムは各組織、細胞種の機能の相違によって異なり、それに伴ってMTF-1の制御下で発現する遺伝子グループも異なっているはずである。それらの解析によって新規なZn機能の発見も期待できている。筆者の在職中にはMTF-1のZn及びCd応答機構などを完全には解明できず、今後自ら直接研究できなくなるのは残念である。しかし、新しいZn機能の解明が進んでいる現在、有用な実験方法の開発と相まって急速に研究が進むと思われる。今後、Znという切り口で細胞を覗いた場合、どのような風景が見えてくるのか楽しみでもある。

謝辞 重金属に関する研究を始める契機と有益な助言を与えて頂いた帝京大学名誉教授 大沢基保先生に感謝いたします。また、(独)労働安全衛生総合研究所に在職されていた小泉信滋博士とはMT及びMTF-1に関して常に二人三脚の共同研究を行い、多くの卓越した指針を与えて頂きました。心よりお礼申し上げます。また、留学先の米国NCI/NIHのDean H. Hamer博士にはZRF/MTF-1の精製に関して多大なるご援助を頂きました。改めて謝意を表します。そして長い間支えて頂きました帝京大学薬学部環境衛生学研究室の職員の皆様、大学院生、並びに400名に及ぶ研究室配属学生の皆様に深く感謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Vallee B. L., Falchuk K. H., *Physiol. Rev.*, **73**, 79–118 (1993).
- 2) Yamasaki S., Sakata-Sogawa K., Hasegawa A., Suzuki T., Kabu K., Sato E., Kurosaki T., Yamashita S., Tokunaga M., Nishida K., Hirano T., *J. Cell Biol.*, **177**, 637–645 (2007).
- 3) Kimura T., Kambe T., *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 336 (2016).
- 4) Otsuka F., Ohno S., Suzuki K., Takahashi K.,

- Ohsawa M., Koizumi S., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 675–684 (2007).
- 5) Otsuka F., Ohsawa M., *Chem.-Biol. Interact.*, **78**, 193–205 (1991).
- 6) Kimura M., Koizumi S., Otsuka F., “Methods in Enzymology,” Vol. 205, 1991, pp. 114–119.
- 7) Otsuka F., Koizumi S., Kimura M., Ohsawa M., *Anal. Biochem.*, **168**, 184–192 (1988).
- 8) Otsuka F., *Tissue Cult.*, **17**, 56–59 (1991).
- 9) Ohsawa M., Otsuka F., Sugizaki S., *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **38**, 518–521 (1992).
- 10) Hamer D. H., *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 913–951 (1986).
- 11) Kägi J. H., Schäffer A., *Biochemistry*, **27**, 8509–8515 (1988).
- 12) Otsuka F., *J. Health Sci.*, **50**, 332–335 (2004).
- 13) Miura N., Koizumi S., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 665–673 (2007).
- 14) Fürst P., Hu S., Hackett R., Hamer D., *Cell*, **55**, 705–717 (1988).
- 15) Majumder S., Ghoshal K., Summers D., Bai S., Datta J., Jacob S. T., *J. Biol. Chem.*, **278**, 26216–26226 (2003).
- 16) Kimura T., Li Y., Okumura F., Itoh N., Nakanishi T., Sone T., Isobe M., Andrews G. K., *Biochem. J.*, **415**, 477–482 (2008).
- 17) Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., Trumbauer M. E., Rosenfeld M. G., Birnberg N. C., Evans R. M., *Nature*, **300**, 611–615 (1982).
- 18) Stuart G. W., Searle P. F., Chen H. Y., Brinster R. L., Palmiter R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7318–7322 (1984).
- 19) Koizumi S., Otsuka F., “Genetic Response to Metals,” Chap. 25, ed. by Sarkar B., Marcel Dekker, Inc., New York, 1995, pp. 397–410.
- 20) Koizumi S., Suzuki K., Ogra Y., Yamada H., Otsuka F., *Eur. J. Biochem.*, **259**, 635–642 (1999).
- 21) Ogra Y., Suzuki K., Gong P., Otsuka F., Koizumi S., *J. Biol. Chem.*, **276**, 16534–16539 (2001).
- 22) Koizumi S., Otsuka F., Yamada H., *Chem.-Biol. Interact.*, **80**, 145–157 (1991).
- 23) Koizumi S., Yamada H., Suzuki K., Otsuka F., *Eur. J. Biochem.*, **210**, 555–560 (1992).
- 24) Koizumi S., Suzuki K., Otsuka F., *J. Biol. Chem.*, **267**, 18659–18664 (1992).
- 25) Otsuka F., Iwamatsu A., Suzuki K., Ohsawa

- M., Hamer D. H., Koizumi S., *J. Biol. Chem.*, **269**, 23700–23707 (1994).
- 26) Otsuka F., Ohsawa M., Koizumi S., *Ind. Health*, **31**, 133–142 (1993).
- 27) Koizumi S., Otsuka F., *Ind. Health*, **32**, 193–206 (1994).
- 28) Otsuka F., Okugaito I., Ohsawa M., Iwamatsu A., Suzuki K., Koizumi S., *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expr.*, **1492**, 330–340 (2000).
- 29) Brugnera E., Georgiev O., Radtke F., Heuchel R., Baker E., Sutherland G. R., Schaffner W., *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3167–3173 (1994).
- 30) Otsuka F., *J. Health Sci.*, **47**, 513–519 (2001).
- 31) Chen X., Zhang B., Harmon P. M., Schaffner W., Peterson D. O., Giedroc D. P., *J. Biol. Chem.*, **279**, 4515–4522 (2004).
- 32) Suzuki K., Otsuka F., Yamada H., Koizumi S., *Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 611–617 (2015).
- 33) Koizumi S., Suzuki K., Ogra Y., Gong P., Otsuka F., *J. Cell. Physiol.*, **185**, 464–472 (2000).
- 34) Günther V., Davis A. M., Georgiev O., Schaffner W., *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 476–483 (2012).
- 35) LaRochelle O., Gagné V., Charron J., Soh J. W., Séguin C., *J. Biol. Chem.*, **276**, 41879–41888 (2001).
- 36) Saydam N., Adams T. K., Steiner F., Schaffner W., Freedman J. H., *J. Biol. Chem.*, **277**, 20438–20445 (2002).
- 37) Liu Y. C., Lin M. C., Chen H. C., Tam M. F., Lin L. Y., *J. Biol. Chem.*, **286**, 42818–42829 (2011).
- 38) Auf der Maur A., Belser T., Wang Y., Günes C., Lichtlen P., Georgiev O., Schaffner W., *Cell Stress Chaperones*, **5**, 196–206 (2000).
- 39) Radtke F., Georgiev O., Müller H. P., Brugnera E., Schaffner W., *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2277–2286 (1995).
- 40) Heuchel R., Radtke F., Georgiev O., Stark G., Aguet M., Schaffner W., *EMBO J.*, **13**, 2870–2875 (1994).
- 41) Palmiter R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1219–1223 (1994).
- 42) Saydam N., Georgiev O., Nakano M. Y., Greber U. F., Schaffner W., *J. Biol. Chem.*, **276**, 25487–25495 (2001).
- 43) Smirnova I. V., Bittel D. C., Ravindra R., Jiang H., Andrews G. K., *J. Biol. Chem.*, **275**, 9377–9384 (2000).
- 44) Li Y., Kimura T., Huyck R. W., Laity J. H., Andrews G. K., *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 4275–4284 (2008).
- 45) Chen X., Chu M., Giedroc D. P., *Biochemistry*, **38**, 12915–12925 (1999).
- 46) Lindert U., Cramer M., Meuli M., Georgiev O., Schaffner W., *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 6283–6293 (2009).
- 47) Günes C., Heuchel R., Georgiev O., Müller K. H., Lichtlen P., Blüthmann H., Marino S., Aguzzi A., Schaffner W., *EMBO J.*, **17**, 2846–2854 (1998).
- 48) Lichtlen P., Wang Y., Belser T., Georgiev O., Certa U., Sack R., Schaffner W., *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1514–1523 (2001).
- 49) Langmade S. J., Ravindra R., Daniels P. J., Andrews G. K., *J. Biol. Chem.*, **275**, 34803–34809 (2000).
- 50) Günther V., Lindert U., Schaffner W., *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.*, **1823**, 1416–1425 (2012).
- 51) McHugh P. C., Wright J. A., Brown D. R., *PLoS One*, **6**, e17354 (2011).
- 52) Saini N., Georgiev O., Schaffner W., *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 2151–2161 (2011).
- 53) Osada Y., Shimoyama T., Otsuka F., *BPB Reports*, **3**, 166–169 (2020).
- 54) Fallah A., Mohammad-Hasani A., Colagar A. H., *J. Reprod. Infertil.*, **19**, 69–81 (2018).
- 55) Kim A. M., Vogt S., O'Halloran T. V., Woodruff T. K., *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 674–681 (2010).