

亜鉛応答性転写因子 MTF-1 と Cr (VI) 毒性 —6 価クロムの発がん性と遺伝子発現抑制作用との関係—

木村 朋紀

Molecular Mechanism Involved in Chromium (VI) Toxicity

Tomoki KIMURA

Department of Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University,
45-1 Nagaotoge-cho, Hirakata City 573-0101, Japan

(Received August 1, 2007)

Chromium exists in many different oxidation states in the environment, Cr(VI) and Cr(III) being the most stable forms. Chromium has been known for over 100 years to be a human carcinogen. The greatest risk of cancer from chromium exposure is associated with Cr(VI). Cr(VI) enters cells via the sulfate anion transporter system and is reduced to intermediate oxidation states, such as Cr(V) and Cr(IV), in the process of forming stable Cr(III) forms. It is known that Cr(VI) affects expression of various genes. Metal responsive element-binding transcription factor-1 (MTF-1) is involved in sensing heavy metal load and the induced transcription of several protective genes, including metallothionein (MT)-I, MT-II, zinc transporter-1, and γ -glutamylcysteine synthetase. Cr(VI) inhibits zinc-induced MT transcription *via* modifying transactivation potential of MTF-1. However, the molecular mechanism for the Cr(VI)-mediated inhibition of MTF-1 has not been fully elucidated. In this review, I briefly summarize the previous studies and discuss the current status of research on Cr(VI) toxicity and Cr(VI)-mediated inhibition against transcription.

Key words—chromium; metal responsive element-binding transcription factor-1; NF-kappaB; aryl hydrocarbon receptor; histone deacetylase; p300/CBP

1. はじめに

Cr は必須微量元素であるが、Cr (VI) は毒性が高くしばしば土壌の Cr (VI) 汚染が問題視されている。特徴的な中毒症状としては、クロム酸工場の労働者に鼻中隔穿孔が多発したことが知られている。また Cr (VI) は発がん性物質としても知られている。国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer; IARC) では、Cr (VI) を「ヒトに対して発がん性がある」として発がん分類グループ 1 に分類している。Cr (VI) は、種々の DNA ダメージを与えることが知られており、これが発がん作用に係わっていると考えられてきた。一方、転写因子である、MTF-1 (metal responsive element-binding transcription factor-1) は、Zn を始め、

Cd などの重金属によっても活性化され、重金属結合タンパク質であるメタロチオネイン (MT) や Zn 排泄輸送体である Zn transporter-1 (ZnT-1) などの発現を誘導することから重金属耐性に係わる転写因子として考えられている。¹⁻⁴⁾ MTF-1 が発がん抑制因子としての機能を有するという報告もある。⁵⁾ これらの重金属に対する応答メカニズムに関しては、MTF-1 の DNA 結合ドメインである zinc finger への Zn 結合が、その転写活性を調節していることがいくつかの研究グループにより示されているものの、より詳細な Zn 依存的転写活性化の分子メカニズムには不明な点が多かった。⁶⁻⁹⁾ われわれは、MTF-1 の Zn 応答メカニズム解析及び、それに係わる転写共役因子の同定を進めており、その過程で Cr (VI) 毒性と MTF-1 とに接点があると思われる結果が得られた。本稿では、発がん過程における Cr (VI) の DNA 損傷メカニズムについて概説するとともに、われわれが新たに見出した MTF-1 への関与に関しても紹介したい。

摂南大学薬学部毒性学研究室 (〒573-0101 枚方市長尾峠町 45-1)

e-mail: tomoki@pharm.setsunan.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S17 で発表したものを中心に記述したものである。

2. Cr (VI) の変異原性

Cr (VI) の変異原性はバクテリアや酵母でよく検討されている。Ames 試験において、その変異は GC-rich 配列よりも AT-rich 配列で優先的に認められている。酸化ストレス高感受性 *Salmonella typhimurium* TA102 株では、Cr (VI) による変異は分子状酸素の存在に完全に依存しているとされている。¹⁰⁾ なお、Cr (III) は多くの変異原性試験で陰性である。Cr (VI) の変異原性はバクテリアや酵母のみならず、哺乳細胞系でも報告されている。哺乳細胞においては、Cr (VI) 化合物の種類や解析に用いる細胞株、染色体座によって異なる結果が報告されている。Hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase (hprt) 遺伝子について解析した報告によると、CHO 細胞では CrO₃ 処理によって引き起こされる変異の 90% が A/T pair で認められている。¹¹⁾ これに対し、ヒトリンパ芽球に重クロム酸カリウム (K₂Cr₂O₇) 処理を行った報告では、3 カ所の Hot Spot が GC-rich 領域にあるとされている。¹²⁾

3. Cr (VI) による DNA 損傷及び変異原性のメカニズム

DNA 損傷として、DNA 同士や DNA-タンパク質の架橋、DNA 鎖の切断、塩基の修飾そして Cr-DNA 付加体の形成が考えられる。Cr (VI) はこれらすべての損傷を引き起こすが、Cr (VI) を還元剤非存在下で精製 DNA や核とインキュベートしても DNA 損傷は全く認められない^{13,14)} ことから、Cr (VI) による DNA 損傷には還元剤の共存が必要であると考えられる。このことは、亜セレン酸ナトリウム (Na₂SeO₃) 処理により細胞内グルタチオン量を増加すると Cr (VI) による DNA 鎖の切断が増加したり、¹⁵⁾ 培地へのアセチルシステイン添加でも同様の効果が認められることから支持される。¹⁶⁾ Cr (VI) は、細胞内で Cr (VI) は比較的安定な Cr (III) にまで還元を受ける¹⁷⁾ が、DNA 損傷が還元剤存在下でのみ認められるということは、これらの DNA 損傷が細胞内で Cr (VI) が Cr (III) に還元される過程で起こる可能性を示唆している。Cr (VI) は sulfate anion transporter system により細胞内に取り込まれ^{18,19)} たのちに速やかに還元され、この過程で生じる中間体の Cr (V)、Cr (IV) が種々生体成分に結合、又は、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) を生じることで DNA が損傷される (Fig. 1)。このことは、Cr-DNA 付加体に結合している Cr はすべて 3 価であるという点からも支持される。^{17,20)} また Cr (VI) の還元には、グルタチオン (GSH)、システインなどの SH 化合物以外に、アスコルビン酸も係わっており、Cr-DNA 付加体の大部分は GSH、システイン若しくはアスコルビン酸とともに DNA のホスホジエステル結合部分に結合している。現に CHO 細胞において、全 Cr-DNA 付加体の 24% はシステインとの付加体、17% は GSH との付加体であると報告されている。²⁰⁾ ヒト肺がん細胞株 A549 細胞では、全 Cr-DNA 付加体のおよそ 6% がアスコルビン酸との付加体である。²¹⁾ Cr-DNA 付加体は除去修復機構により取り除かれるが、ミスマッチ修復では変異を引き起こしてしまうようである。²²⁻²⁴⁾ その一方で、GSH が Cr (VI) の変異原性を低下するという報告もある。前述のように、Cr (VI) による DNA 損傷には還元剤の存在が必要であるが、還元剤が過剰に存在すれば Cr (VI) による DNA 損傷が抑制される。バクテリアでの検討によると、GSH : Cr (VI) が 10 : 1 を超えると DNA 損傷の抑制が認められている。²⁵⁾ Cr (III) は DNA 損傷を引き起こさないことから、細胞内に存在する GSH 等の還元剤の量が、Cr (VI) による DNA 損傷の度合いを左右しているものと考えられる。

en species; ROS) を生じることで DNA が損傷される (Fig. 1)。このことは、Cr-DNA 付加体に結合している Cr はすべて 3 価であるという点からも支持される。^{17,20)} また Cr (VI) の還元には、グルタチオン (GSH)、システインなどの SH 化合物以外に、アスコルビン酸も係わっており、Cr-DNA 付加体の大部分は GSH、システイン若しくはアスコルビン酸とともに DNA のホスホジエステル結合部分に結合している。現に CHO 細胞において、全 Cr-DNA 付加体の 24% はシステインとの付加体、17% は GSH との付加体であると報告されている。²⁰⁾ ヒト肺がん細胞株 A549 細胞では、全 Cr-DNA 付加体のおよそ 6% がアスコルビン酸との付加体である。²¹⁾ Cr-DNA 付加体は除去修復機構により取り除かれるが、ミスマッチ修復では変異を引き起こしてしまうようである。²²⁻²⁴⁾ その一方で、GSH が Cr (VI) の変異原性を低下するという報告もある。前述のように、Cr (VI) による DNA 損傷には還元剤の存在が必要であるが、還元剤が過剰に存在すれば Cr (VI) による DNA 損傷が抑制される。バクテリアでの検討によると、GSH : Cr (VI) が 10 : 1 を超えると DNA 損傷の抑制が認められている。²⁵⁾ Cr (III) は DNA 損傷を引き起こさないことから、細胞内に存在する GSH 等の還元剤の量が、Cr (VI) による DNA 損傷の度合いを左右しているものと考えられる。

4. Cr (VI) による遺伝子発現抑制

前述のように Cr (VI) は DNA 損傷を引き起こ

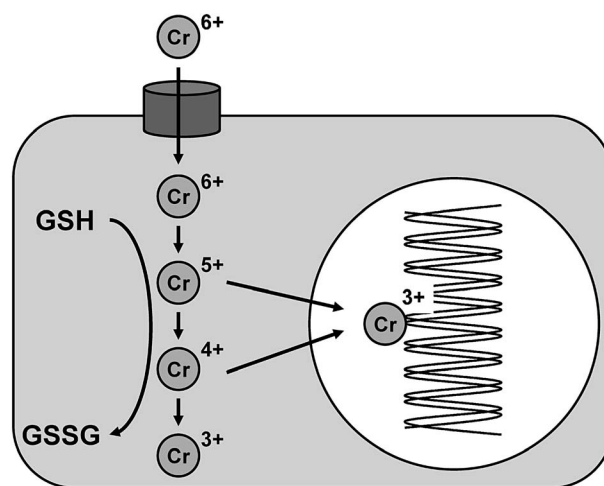


Fig. 1. A model for Formation of Chromium-induced DNA Lesions

す一方で、種々遺伝子の発現を抑制することも知られている。また、興味深いことに Cr (VI) による遺伝子発現抑制は、ハウスキーピング遺伝子のような恒常的に発現している遺伝子ではほとんど認められず、誘導性の遺伝子発現でのみ認められる。例えば、Cr (VI) は β -actin やアルブミン発現には影響しないが、重金属による MT 誘導、ホルモンによる phosphoenolpyruvate carboxykinase 誘導を阻害する。²⁶⁻³⁰⁾ これらのことから、Cr (VI) による遺伝子発現抑制作用はクロマチン構造変化と関係があるのではないかと考えられる。

近年、転写誘導の際に、ヒストン修飾によるクロマチン構造変化が重要な働きをすることが明らかにされてきた。DNA 結合性の転写活性化因子が標的遺伝子プロモーターに結合すると、転写共役因子がリクルートされる。転写共役因子はヒストンアセチル転移酵素 (HAT) 活性を持っており、プロモーター周辺のヒストンをアセチル化する。これが引き金となりクロマチン・リモデリング因子がリクルートされ、クロマチンのリモデリングが誘導され、基本転写因子と RNA ポリメラーゼによる転写が開始する。ヒストンはアセチル化以外にもメチル化やリン酸化などの修飾を受け、転写の制御・サイレンシング・クロマチン凝縮などを引き起こすことが考えられている。Cr (VI) による DNA-タンパク質の架橋が、転写及び複製の足場である核マトリックスで優先的に認められる³¹⁾ ことから、Cr (VI) による遺伝子発現抑制作用とクロマチン構造変化との関連がうかがえる。Shumilla らは、腫瘍壊死因子- α (TNF- α) により誘導されるインターロイキン (IL)-8 の発現に対する Cr (VI) の影響を A549 細胞で検討し、その作用点が転写共役因子にあることを報告している。³²⁾ TNF- α による IL-8 誘導には、転写因子 nuclear factor κ B (NF- κ B) が係わっている。細胞毒性を示さない低レベル (5-20 μ M) の Cr (VI) は I κ B の分解、それに続く NF- κ B の核移行には影響せず、NF- κ B の p65 サブユニットと転写共役因子 cAMP-responsive element-binding protein-binding protein (CBP) との結合を阻害する。この報告では、Cr (VI) は c-Jun と CBP との結合は阻害しないことも示されている。CBP は様々な転写因子 (CREB, c-Jun, p53, グルココルチコイドレセプター, aryl hydrocarbon receptor (AhR), reti-

noid X receptor) と結合するが、Cr (VI) がこれらすべての転写因子との結合を阻害する訳ではないという点は非常に興味深い。

Cr (VI) とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) との関係を論じた報告もある。³³⁾ ヒストンのアセチル化はコアヒストン N 末端領域に存在するいくつかのリジン残基の ϵ -アミノ基で起こり、クロマチン構造の調節を通じて転写活性に影響を与える。ヒストンがアセチル化されるとヌクレオソーム構造が変化し、クロマチン構造が弛んで遺伝子発現が活性化される。ヒストンが脱アセチル化されることにより、ヌクレオソーム構造は元に戻り、遺伝子は不活性化される。Wei らは Cr (VI) が CYP1A1 プロモーターからの HDAC1 遊離を阻害することをクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) により明らかにしている。³³⁾ さらに、HDAC 阻害剤 sodium butyrate が Cr (VI) の阻害作用をキャンセルできることも示している。これらの事実は、Cr (VI) による遺伝子発現抑制は転写阻害によるものであり、クロマチン構造変化の阻害がその作用メカニズムであると考えられる。またわれわれは、このような遺伝子発現抑制機構が Cr (VI) による発がんに係わっている可能性を見出したが、これについては後述する。

5. 重金属応答性転写制御因子 MTF-1

MTF-1 は MT の重金属依存的転写活性化に必須の zinc finger 型転写因子である。^{1-3,34)} C2H2 型の zinc finger を連続して 6 つ有しており、これら zinc finger すべてに Zn が結合することにより DNA 結合能を獲得すると考えられる (Fig. 2)。⁶⁻⁹⁾ MTF-1 は酸化ストレスや低酸素条件下でも活性化される^{35,36)} が Zn 以外の MTF-1 活性化刺激に対する対応メカニズムに関しては不明な点が多い。精製 MTF-1 やリコンビナント MTF-1 は、*in vitro* で Zn 依存的に metal responsive element (MRE) に結合する。しかし、細胞レベルでは Cd, Cu を始めとする種々重金属や酸化ストレスによって MTF-1 依存的な MT 誘導や MT プロモーターへの MTF-1 のリクルートが観察されるのに対し、*in vitro* での MRE 結合は Zn のみに依存している。³⁷⁾ Zhang らは MTF-1 依存的転写システムを無細胞系で構築し、このシステムを利用した MTF-1 活性化機構の解析結果を報告している。Zn による MTF-1 活性化は、Zn の添加のみで観察されるものの、Cd, Cu

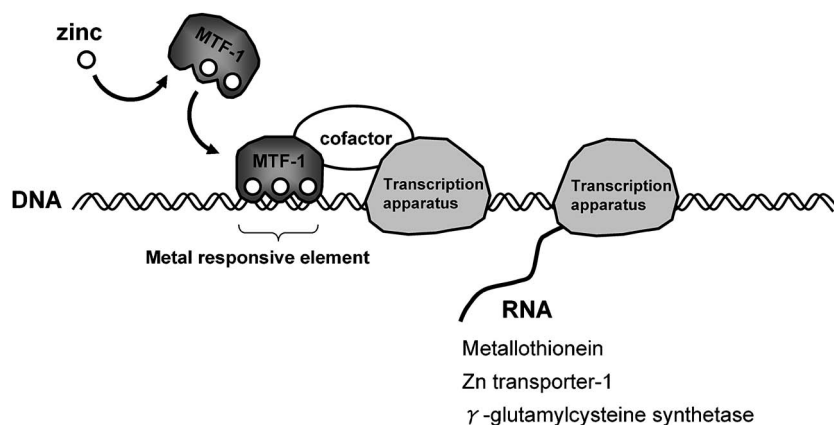


Fig. 2. Schematic Representation of Zinc-mediated MTF-1 Activation

及び過酸化水素による MTF-1 活性化には Zn 飽和 MT の添加が必要であるという結果を示している。³⁸⁾ 彼らは、これらの結果から重金属や酸化ストレスが MT を含む細胞構成要素から Zn を遊離し、この Zn が MTF-1 による転写を活性化することで MT の発現を誘導しているものと考察している。しかし、Cd による MT 誘導は $10\ \mu\text{M}$ 程度であるのに対し、Zn では $100\ \mu\text{M}$ 程度を必要とする。 $10\ \mu\text{M}$ の Cd 処理により $100\ \mu\text{M}$ Zn 処理に相当する Zn が細胞内で遊離するとは考え難く、細胞構成要素からの Zn 遊離以外の、さらに複雑な機構の存在が予想される。さらに、MTF-1 の C 末端に存在する 4 つのシステイン残基がアミノ酸 1 つおきに並ぶクラスターの変異が Zn 依存的な転写活性化能を消失させるという報告もあり、³⁹⁾ zinc finger への Zn 結合だけでは転写活性化を説明することはできない。一方、MTF-1 の転写活性化ドメインに関しては、zinc finger の C 末端側に存在する、酸性アミノ酸領域、プロリンリッチ領域及びセリン・スレオニンリッチ領域の 3 つが報告されている。Radtke らは、これら領域を Gal4 の DNA 結合ドメインに連結した融合タンパク質を作製し、転写活性化能の有無を調べた。その結果、どのドメインにも転写活性化能が観察され、特に、酸性アミノ酸領域に強力な転写活性化能が認められた。⁴⁰⁾ これら領域は転写共役因子結合ドメインとして機能していると考えられる。Andrews は、MTF-1 は重金属依存的に転写共役因子を含むなんらかのタンパク質と複合体を形成する可能性を考え、ヒトグリオーマ由来 A7 細胞に Flag タグ付 MTF-1 (MTF-1_{flag}) を発現させ、未処理及

び重金属処理した同細胞抽出液をゲルろ過カラム (Superose 6 HPLC) により分画して MTF-1_{flag} がどのフラクションに溶出されるかを調べた。その結果、未処理細胞抽出液での MTF-1_{flag} (72 kDa) は 310 kDa 付近に、重金属処理細胞抽出液では 790 kDa 付近に溶出されることを見出した (Andrews 未発表データ)。この現象は、MTF-1 はなんらかの細胞成分と複合体を形成した状態で存在しており、複合体構成因子は重金属処理により増加 (若しくは置換) することを示唆している。Ohtsuka らは、HeLa 細胞核抽出液に $10\ \mu\text{M}$ の Zn を添加することにより非変性ゲル上での MTF-1 の移動度が遅くなりバンドがブロードになることを見出している。⁴¹⁾ 彼らは、この MTF-1 の挙動の実態は不明であるとしているが、MTF-1 が Zn 依存的になんらかの因子と複合体を形成することによって引き起こされた現象と考えることもできる。さらに亜鉛処理により誘導される転写因子 c-fos の MT-I プロモーターへのリクルートが MTF-1 依存的であるという報告⁴²⁾ や、低酸素状態では MTF-1 と NF- κ B が複合体を形成しているという報告、⁴³⁾ 肝がん細胞株で MTF-1 と CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) が複合体を形成しているという報告⁴⁴⁾ などもあり、MTF-1 による転写活性化過程におけるダイナミックな MTF-1 複合体形成が予想される。

6. MTF-1 と転写共役因子

重金属依存的 MT 誘導が HDAC 阻害剤の前処理により亢進することは以前から知られており、⁴⁵⁾ MT 誘導に HAT が関与する可能性が指摘されていた。HAT 活性を有する転写共役因子 p300/CBP が

MTF-1 と複合体を形成するならば、HDAC 阻害剤による MT 誘導の機序が説明可能となる。そこでわれわれは抗 p300/CBP 抗体及び抗 MTF-1 抗体による免疫沈降を行い、MTF-1 と p300/CBP の複合体形成の有無を検討した。その結果、Zn 依存的一過的な MTF-1-p300/CBP 複合体形成が確認された。さらに MTF-1 の種々欠失変異体を用いて解析を行ったところ、p300/CBP が MTF-1 の酸性アミノ酸領域に結合することも明らかとなった。また、酸性アミノ酸領域欠失体 (MTF Δ AD) は MRE との結合能はあるものの転写活性化能が消失していた (未発表データ, Fig. 3(A))。

一部の MT 発現が認められない細胞株を除き、MT プロモーターのヒストンは恒常的に高アセチル化状態にあり DNase I 高感受性である。^{46,47} DNase I は比較的大きい分子 (31 kDa) であるため通常のクロマチン構造 (30 nm クロマチンファイバー) を採った DNA には自由に接近することができない。DNase I 高感受性領域 (DNase I hypersensitive site; DHS) では転写調節因子が認識配列に結合しているなどの理由によりヌクレオソームが欠けている、

あるいは、クロマチン構造が弛んでいるおり、DNase I に対する感受性が高くなっていると考えられる。DHS は、その部位におけるクロマチン構造が開いている (open である) ことの現れである。つまり、多くの細胞において MT プロモーターは定常状態で open であると考えられる。また、p300/CBP はヒストン以外のいくつかのタンパク質をアセチル化することから、p300/CBP の役割はヒストンアセチル化以外のところにある可能性がある。⁴⁸⁻⁵³ さらに MTF-1 活性がリン酸化により調節を受けているという報告^{54,55} もあり、アセチル化による調節を受けている可能性も考えられる。MTF-1-p300/CBP 複合体の機能は不明な部分が多く残されているが、少なくとも、この複合体形成は MTF-1 依存性の遺伝子発現誘導において極めて重要なステップであると考えられる。

7. 発がん抑制因子としての MTF-1

MTF-1 と発がん抑制に関しては、以下のような興味深い報告がある。⁵⁾ 種々系統のマウスで γ 線による胸腺性リンパ腫発生率とハプロタイプの比較を行ったところ、リンパ腫発生率に関連する遺伝子の

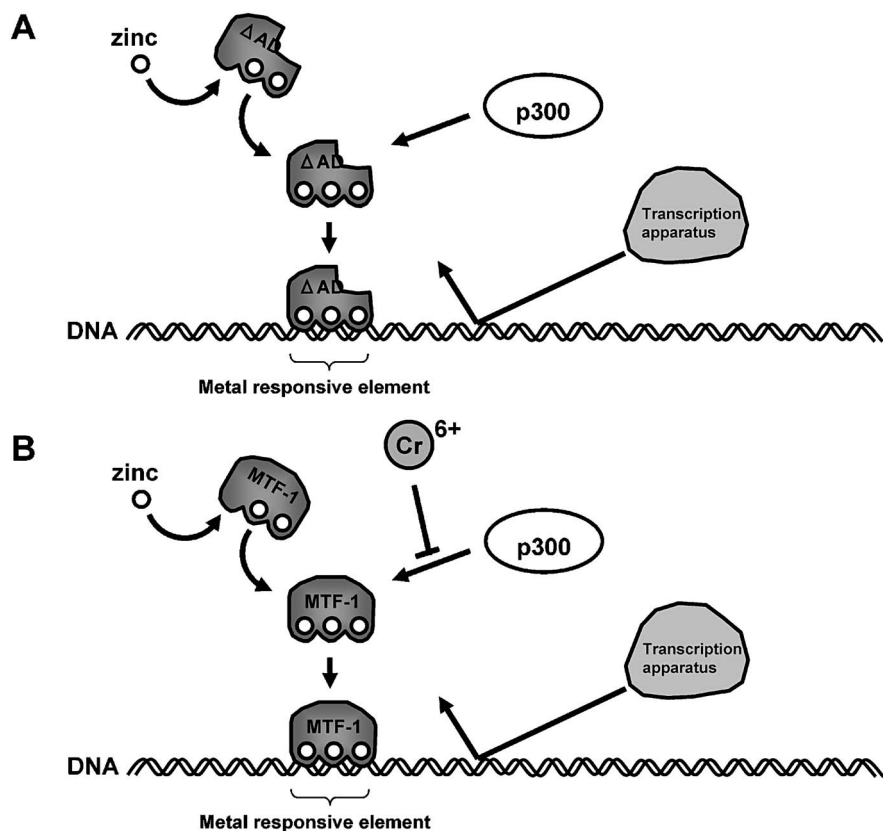


Fig. 3. Postulated Effect of Deletion of Acidic Domain (A) and Chromium (B) on Zinc-mediated MTF-1 Activation

候補として MTF-1 が挙がってきた。MTF-1 のプロリンリッチ領域の 424 番目のアミノ酸残基がセリンのものは高感受性、プロリンのものは抵抗性という解析結果であった。これらアミノ酸残基が与える MTF-1 活性化への影響を調べたところ、プロリンへの変異により金属応答性が亢進していた。また、プロリン型 MTF-1 を持つマウス系統では、 γ 線による MTF-1 ターゲット遺伝子の誘導レベルが上昇していた。さらに、高感受性の系統では、 γ 線により生じる細胞内 ROS の量が高レベルのままで維持されていた。⁵⁶⁾ MTF-1 ターゲット遺伝子には ROS 除去能を有する MT, GSH 生合成律速酵素 γ -glutamylcysteine synthetase などが存在するが、その 1 つである MT の欠損マウスが化学発がんに対して高感受性であることを示す報告もある。⁵⁷⁻⁵⁹⁾ これらの結果から、MTF-1 ターゲット遺伝子が高発現することによって、細胞内 ROS が低レベルとなり、リンパ腫発生に抵抗性になっているのではないかと考えられる。⁶⁰⁾

一方、既がんにがん化した細胞においては、MTF-1 は増悪の方向に働く可能性が高い。MTF-1 が細胞増殖につながる細胞内シグナル伝達系、Ras-extracellular signal-regulated kinase (ERK) カスケードを活性化すると考えられるからである。われわれは、マウス初代培養肝細胞の endothelial growth factor 依存的 DNA 合成が、MTF-1 を阻害することで抑制されること、また、その機構が ERK 阻害であることを示している。⁶¹⁾ MTF-1 のターゲット遺伝子である亜鉛トランスポーター ZnT-1 が、細胞増殖につながる細胞内シグナル伝達系、ERK カスケードに対して促進的な作用を有することを示した論文もある。^{62,63)} さらに、ヌードマウスにがん細胞を移植し、その後の腫瘍サイズを観察したところ、移植がん細胞における MTF-1 発現により、腫瘍増殖が亢進することが報告されている。⁶⁴⁾ 培養液中での増殖速度には MTF-1 発現の有無による影響が認められないにも係わらず、皮下に移植した場合には腫瘍サイズの増加が MTF-1 欠損によって遅くなっている。細胞外マトリクスの生成・安定化に係わる TGF- β 1 と tissue transglutaminase の発現量が MTF-1 欠損により増加していたことから、これらが腫瘍サイズに差を生じる原因であると考えられる。

以上のように MTF-1 は、がん発生に対して抑制

的に作用する一方で、がんの悪性化に対して促進的に作用するという 2 面性を有しているようであるが、これらの事実は、MTF-1 が発がん過程に対し複雑かつ密接に係わっていることを示唆していると考えられる。

8. Cr (VI) による MTF-1 転写活性化阻害と発がんとの関係

最後に、Cr (VI) による MTF-1 転写活性化阻害と発がんとの関係を示唆するわれわれの成果を紹介させていただきたい。最近われわれは、Zn によって誘導される MT の mRNA 発現を Cr (VI) が用量依存的に阻害することを見出した (Fig. 4)。MTF-1 は、Zn 処理 30 分後には MT プロモーターへリクルートされるが、Cr (VI) 前処理はこのリクルートにほとんど影響しなかった(未発表データ)。Cr (VI) 処理が Zn による MTF-1 リクルートを阻害しないという報告は、Majumder らによってもなされている。⁶⁵⁾ 一方、Cr (VI) 前処理は Zn 依存的 MTF-1-p300/CBP 複合体形成を阻害した。Cr (VI) 処理後の MTF-1 のこれら性質は、MTF- Δ AD の性質と酷似している (Fig. 3(B))。以上より、Cr (VI) の作用点は MTF-1-p300/CBP 複合体形成阻害にあると考えられる。前述のように、転写活性化における MTF-1-p300/CBP 複合体の役割は全く未知である。MT プロモーターのヒストンは恒常的に高アセチル化状態にあることから、p300/CBP の役割がヒストンアセチル化以外のところにある可能性が考えられるが、MT プロモーターの micrococcal nuclease (MNase) 感受性が Cd 処理により高まるという報告⁶⁶⁾があることから、重金属依存的に MT プロモーターのクロマチン構造が open になるという可能性を完全には否定できない。Cr (VI) による転写抑制作用の詳細を明らかにするには、重金属依存的な MT プロモーター構造変化、及び MT プロモーター構造変化に対する Cr (VI) の影響を解析する必要があると考えられる。

またわれわれのデータは、MTF-1 の転写活性化に対する Cr (VI) の影響を MT の発現をアウトプットとして解析したものであるが、先述の通り MTF-1 は発がんの抑制やがんの悪性化に係わっていることから、DNA 損傷以外にも Cr (VI) が MTF-1 による転写活性化を修飾することでがん化を誘導している可能性は十分に考えられる。Cr

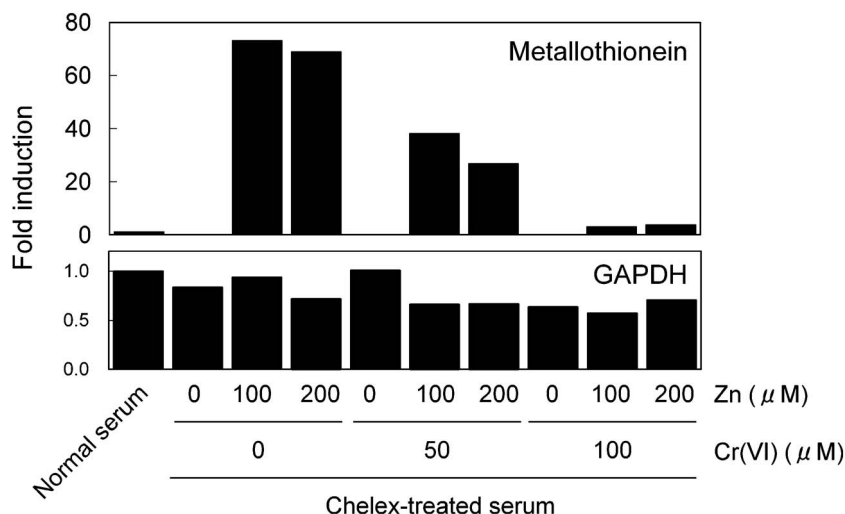


Fig. 4. Effect of Chromium on Zinc-induced MT Transcription

Mouse embryo fibroblast cells (MEFs) were cultured with DMEM 10%FBS or Chelex-treated FBS for 2 days. MEFs were pretreated with Cr(VI) for 3 h followed by treatment with zinc for 6 h before harvest. Total RNA from each set of cells was subjected to real-time PCR with primers specific for mouse MT-I or GAPDH, respectively.

(VI) の発がん性における MTF-1 の関与については、さらに詳細な検討を行う必要があるが、われわれは今後も Cr (VI) による発がんメカニズムを転写制御因子に対する影響という観点から解明していきたいと考えている。

9. おわりに

本稿では、Cr (VI) 毒性、特に発がん性に関する現在までの知見と、Cr (VI) の転写抑制作用を紹介した。また、Cr (VI) による MTF-1 阻害の機構と MTF-1 の発がん抑制作用を概説した。Cr (VI) は古くから毒物であることが知られ、変異原性を示すことからその発がんメカニズムも DNA 損傷を中心に検討が行われてきた。しかしながら、本稿で示したように、Cr (VI) が発がん抑制に係わる転写因子 MTF-1 の機能を阻害することが明らかとなった。Cr (VI) の発がんメカニズムと MTF-1 との関連を裏付けるにはまだまだデータは未熟ではあるものの、このような阻害が Cr (VI) による発がんメカニズムの一端を担っている可能性は十分に考えられる。さらに、Cr (VI) のように既にその作用機序が解明されたと思われているものについて、分子生物学的手法を用いて毒性発現機序を再解析することが、新たな作用機構、未知の生体応答の発見につながると考えられる。今後は、このような「Molecular Toxicology」が益々駆使されることで、作用メカニズム等が未解決な化学物質の毒性発現における分子メカニズムや、それらに対する生体応答について有用

な知見が得られることを期待したい。

謝辞 本総説で紹介させていただいた研究成果は摂南大学薬学部毒性学研究室の磯部正和教授、Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Kansas Medical Center の Dr. Glen K. Andrews の指導の下で得られたものであり、ここに心から感謝申し上げます。また総説中に引用した研究の一部は文部科学省／日本学術振興会科学研究補助金により行われたものであり、ここに深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Radtke F., Heuchel R., Georgiev O., Hergersberg M., Gariglio M., Dembic Z., Schaffner W., *EMBO J*, **12**, 1355–1362 (1993).
- 2) Brugnera E., Georgiev O., Radtke F., Heuchel R., Baker E., Sutherland G. R., Schaffner W., *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3167–3173 (1994).
- 3) Otsuka F., Iwamatsu A., Suzuki K., Ohsawa M., Hamer D. H., Koizumi S., *J. Biol. Chem.*, **269**, 23700–23707 (1994).
- 4) Langmade S. J., Ravindra R., Daniels P. J., Andrews G. K., *J. Biol. Chem.*, **275**, 34803–34809 (2000).
- 5) Tamura Y., Maruyama M., Mishima Y., Fujisawa H., Obata M., Kodama Y., Yoshikai Y., Aoyagi Y., Niwa O., Schaffner W., Kominami R., *Oncogene*, **24**, 399–406 (2005).

- 6) Bittel D. C., Smirnova I. V., Andrews G. K., *J. Biol. Chem.*, **275**, 37194–37201 (2000).
- 7) Chen X., Agarwal A., Giedroc D. P., *Biochemistry*, **37**, 11152–11161 (1998).
- 8) Chen X., Chu M., Giedroc D. P., *Biochemistry*, **38**, 12915–12925 (1999).
- 9) Koizumi S., Suzuki K., Ogra Y., Gong P., Otuska F., *J. Cell. Physiol.*, **185**, 464–472 (2000).
- 10) Sugden K. D., Burriss R. B., Rogers S. J., *Mutat. Res.*, **244**, 239–244 (1990).
- 11) Yang J. L., Hsieh Y. C., Wu C. W., Lee T. C., *Carcinogenesis*, **13**, 2053–2057 (1992).
- 12) Chen J., Thilly W. G., *Mutat. Res.*, **323**, 21–27 (1994).
- 13) Tsapakos M. J., Wetterhahn K. E., *Chem. Biol. Interact.*, **46**, 265–277 (1983).
- 14) Kortenkamp A., O'Brien P., Beyersmann D., *Carcinogenesis*, **12**, 1143–1144 (1991).
- 15) Sugiyama M., Ando A., Furuno A., Furlong N. B., Hidaka T., Ogura R., *Cancer Lett.*, **38**, 1–7 (1987).
- 16) Cupo D. Y., Wetterhahn K. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 6755–6759 (1985).
- 17) Zhitkovich A., *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 3–11 (2005).
- 18) Buttner B., Beyersmann D., *Xenobiotica*, **15**, 735–741 (1985).
- 19) Alexander J., Aaseth J., *Analyst*, **120**, 931–933 (1995).
- 20) Zhitkovich A., Voitkun V., Costa M., *Carcinogenesis*, **16**, 907–913 (1995).
- 21) Quievryn G., Messer J., Zhitkovich A., *Biochemistry*, **41**, 3156–3167 (2002).
- 22) Reynolds M., Peterson E., Quievryn G., Zhitkovich A., *J. Biol. Chem.*, **279**, 30419–30424 (2004).
- 23) Peterson-Roth E., Reynolds M., Quievryn G., Zhitkovich A., *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 3596–3607 (2005).
- 24) Reynolds M., Stoddard L., Bespalov I., Zhitkovich A., *Nucleic Acids Res.*, **35**, 465–476 (2007).
- 25) Kortenkamp A., Ozolins Z., Beyersmann D., O'Brien P., *Mutat. Res.*, **216**, 19–26 (1989).
- 26) Hamilton J. W., Wetterhahn K. E., *Mol. Carcinog.*, **2**, 274–286 (1989).
- 27) Wetterhahn K. E., Hamilton J. W., Aiyar J., Borges K. M., Floyd R., *Biol. Trace Elem. Res.*, **21**, 405–411 (1989).
- 28) Wetterhahn K. E., Hamilton J. W., *Sci. Total Environ.*, **86**, 113–129 (1989).
- 29) Manning F. C., Xu J., Patierno S. R., *Mol. Carcinog.*, **6**, 270–279 (1992).
- 30) Alcedo J. A., Misra M., Hamilton J. W., Wetterhahn K. E., *Carcinogenesis*, **15**, 1089–1092 (1994).
- 31) Xu J., Manning F. C., Patierno S. R., *Carcinogenesis*, **15**, 1443–1450 (1994).
- 32) Shumilla J. A., Broderick R. J., Wang Y., Barchowsky A., *J. Biol. Chem.*, **274**, 36207–36212 (1999).
- 33) Wei Y. D., Tepperman K., Huang M. Y., Sartor M. A., Puga A., *J. Biol. Chem.*, **279**, 4110–4119 (2004).
- 34) Wang Y., Wimmer U., Lichtlen P., Inderbitzin D., Stieger B., Meier P. J., Hunziker L., Stallmach T., Forrer R., Rulicke T., Georgiev O., Schaffner W., *FASEB J.*, **18**, 1071–1079 (2004).
- 35) Dalton T. P., Li Q., Bittel D., Liang L., Andrews G. K., *J. Biol. Chem.*, **271**, 26233–26241 (1996).
- 36) Murphy B. J., Andrews G. K., Bittel D., Discher D. J., McCue J., Green C. J., Yanovsky M., Giaccia A., Sutherland R. M., Laderoute K. R., Webster K. A., *Cancer Res.*, **59**, 1315–1322 (1999).
- 37) Bittel D., Dalton T., Samson S. L., Gedamu L., Andrews G. K., *J. Biol. Chem.*, **273**, 7127–7133 (1998).
- 38) Zhang B., Georgiev O., Hagmann M., Gunes C., Cramer M., Faller P., Vasak M., Schaffner W., *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 8471–8485 (2003).
- 39) Chen X., Zhang B., Harmon P. M., Schaffner W., Peterson D. O., Giedroc D. P., *J. Biol. Chem.*, **279**, 4515–4522 (2004).
- 40) Radtke F., Georgiev O., Muller H. P., Brugnara E., Schaffner W., *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2277–2286 (1995).
- 41) Otsuka F., Ohno S., Suzuki K., Takahashi K., Ohsawa M., Koizumi S., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 675–684 (2007).
- 42) Daniels P. J., Andrews G. K., *Nucleic Acids Res.*, **31**, 6710–6721 (2003).
- 43) Cramer M., Nagy I., Murphy B. J., Gassmann M., Hottiger M. O., Georgiev O., Schaffner W., *Biol. Chem.*, **386**, 865–872 (2005).

- 44) Datta J., Majumder S., Kutay H., Motiwala T., Frankel W., Costa R., Cha H. C., MacDougald O. A., Jacob S. T., Ghoshal K., *Cancer Res.*, **67**, 2736–2746 (2007).
- 45) Andrews G. K., Adamson E. D., *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5461–5475 (1987).
- 46) MacArthur C. A., Lieberman M. W., *J. Biol. Chem.*, **262**, 2161–2165 (1987).
- 47) Majumder S., Kutay H., Datta J., Summers D., Jacob S. T., Ghoshal K., *J. Cell. Biochem.*, **97**, 1300–1316 (2006).
- 48) Boyes J., Byfield P., Nakatani Y., Ogryzko V., *Nature*, **396**, 594–598 (1998).
- 49) Gu W., Roeder R. G., *Cell*, **90**, 595–606 (1997).
- 50) Liu L., Scolnick D. M., Trievel R. C., Zhang H. B., Marmorstein R., Halazonetis T. D., Berger S. L., *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1202–1209 (1999).
- 51) Suzuki T., Kimura A., Nagai R., Horikoshi M., *Genes Cells*, **5**, 29–41 (2000).
- 52) Huang W., Zhao S., Ammanamanchi S., Brattain M., Venkatasubbarao K., Freeman J. W., *J. Biol. Chem.*, **280**, 10047–10054 (2005).
- 53) Hung J. J., Wang Y. T., Chang W. C., *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 1770–1785 (2006).
- 54) Saydam N., Adams T. K., Steiner F., Schaffner W., Freedman J. H., *J. Biol. Chem.*, **277**, 20438–20445 (2002).
- 55) Jiang H., Fu K., Andrews G. K., *Biochem. J.*, **382**, 33–41 (2004).
- 56) Maruyama M., Yamamoto T., Kohara Y., Katsuragi Y., Mishima Y., Aoyagi Y., Kominami R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 209–215 (2007).
- 57) Waalkes M. P., Liu J., Kasprzak K. S., Diwan B. A., *Int. J. Cancer*, **119**, 28–32 (2006).
- 58) Suzuki J. S., Nishimura N., Zhang B., Nakatsuru Y., Kobayashi S., Satoh M., Tohyama C., *Carcinogenesis*, **24**, 1123–1132 (2003).
- 59) Zhang B., Satoh M., Nishimura N., Suzuki J. S., Sone H., Aoki Y., Tohyama C., *Cancer Res.*, **58**, 4044–4046 (1998).
- 60) Gunes C., Heuchel R., Georgiev O., Muller K. H., Lichtlen P., Bluthmann H., Marino S., Aguzzi A., Schaffner W., *EMBO J.*, **17**, 2846–2854 (1998).
- 61) Kimura T., Itoh N., Sone T., Kondoh M., Tanaka K., Isobe M., *J. Cell. Biochem.*, **99**, 485–494 (2006).
- 62) Bruinsma J. J., Jirakulaporn T., Muslin A. J., Kornfeld K., *Dev. Cell*, **2**, 567–578 (2002).
- 63) Jirakulaporn T., Muslin A. J., *J. Biol. Chem.*, **279**, 27807–27815 (2004).
- 64) Haroon Z. A., Amin K., Lichtlen P., Sato B., Huynh N. T., Wang Z., Schaffner W., Murphy B. J., *FASEB J.*, **18**, 1176–1184 (2004).
- 65) Majumder S., Ghoshal K., Summers D., Bai S., Datta J., Jacob S. T., *J. Biol. Chem.*, **278**, 26216–26226 (2003).
- 66) Koropatnick J., Andrews G. K., Duerksen J. D., Varshney U., Gedamu L., *Nucleic Acids Res.*, **11**, 3255–3267 (1983).