

## 重金属依存性転写因子 MTF-1 を介するメタロチオネイン遺伝子の活性化機構

大塚文徳,<sup>\*,a</sup> 大野正太郎,<sup>a</sup> 鈴木 薫,<sup>b</sup> 高橋和子,<sup>a</sup> 大沢基保,<sup>a</sup> 小泉信滋<sup>b</sup>**Mechanism of Metallothionein Gene Activation Mediated by Heavy-metal Dependent Transcription Factor MTF-1**Fuminori OTSUKA,<sup>\*,a</sup> Shotaro OHNO,<sup>a</sup> Kaoru SUZUKI,<sup>b</sup>Kazuko TAKAHASHI,<sup>a</sup> Motoyasu OHSAWA,<sup>a</sup> and Shinji KOIZUMI<sup>b</sup><sup>a</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagamiko-machi, Sagamihara City 229-0195, Japan, and <sup>b</sup>National Institute of Occupational Safety and Health, 6-21-1 Nagao, Tama-ku, Kawasaki 214-8585, Japan

(Received September 11, 2006)

Transcriptional activation of metallothionein (MT) genes by heavy metals is a valuable system for understanding the functions of MT as well as the cellular response against heavy metals. Although it is now known that heavy metal signals culminating in MT induction converge upon a transcription factor MTF-1, the mechanism underlying the MTF-1 response to heavy metals has not been elucidated. To address this issue, we investigated various aspects of the *in vivo* response of MTF-1 against heavy metals. Chromatin immunoprecipitation assay showed that heavy metal-dependent DNA binding of MTF-1 is the critical step *in vivo*. MTF-1 is primarily localized in the nucleus so that heavy metal-dependent nuclear translocation demonstrated by other groups does not seem to be universal and hence may not be critical for activation of MTF-1. In the six Zn finger motifs, the hallmark of MTF-1, the third and the fourth fingers are essential for the nuclear localization of MTF-1. Furthermore, all fingers except the last are important for transcriptional activation function of MTF-1, suggesting their key role for MTF-1 function. Also, a cysteine cluster structure located in the C-terminal region of MTF-1 is critical for transactivating function of MTF-1. These results suggest a central role of the Zn-finger domain and intramolecular cooperation through a structural change of MTF-1 for its response to heavy metal challenge.

**Key words**—metallothionein; heavy metal; transcription; metal-dependent transcription factor**1. はじめに**

馬の腎臓からカドミウム結合タンパク質として発見されたメタロチオネイン (MT) は、有害重金属や酸化ストレスなどの毒性発現を抑制する機能とともに必須重金属の細胞内ホメオスタシスの維持などにも関与することが予想される多機能性タンパク質である。<sup>1-3)</sup> MT の重金属結合性はその特徴的なタンパク構造に由来している。すなわち、比較的存在確率が低く重金属との相互作用に重要なアミノ酸でもあるシステインが全アミノ酸の 30% 近くを占め、それらが特徴的な配列を取っている。一方、

MT が重金属によって細胞内に誘導されるタンパク質であるということも MT の重要な性質としてよく知られており、古くから着目されてきた。重金属とタンパク質の相互作用は本来非特異的なものが多く含まれており、重金属の生物学的な役割や毒性を分子レベルで解析するには大きな障害となる。その点、MT の重金属誘導システムには様々な重金属種を特異的に認識する機構の関与が予想され、その意味で重金属に対する特異的な細胞応答システムを分子レベルで研究できる数少ない系の 1 つである。また、MT の誘導システムが分子レベルで解明できれば、MT の機能や生物学的な意義をより深く理解することができよう。

現在、MT 遺伝子の重金属依存的な転写活性化においては、重金属依存性の転写因子 MTF-1 (Fig. 1) が必須であることが分かっている。<sup>4-6)</sup> したがって

<sup>a</sup>帝京大学薬学部環境衛生学教室 (〒229-0195 相模原市相模湖町寸沢嵐 1091-1), <sup>b</sup>労働安全衛生総合研究所 (〒214-8585 川崎市多摩区長尾 6-21-1)

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

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S40 で発表したものを中心に記述したものである。

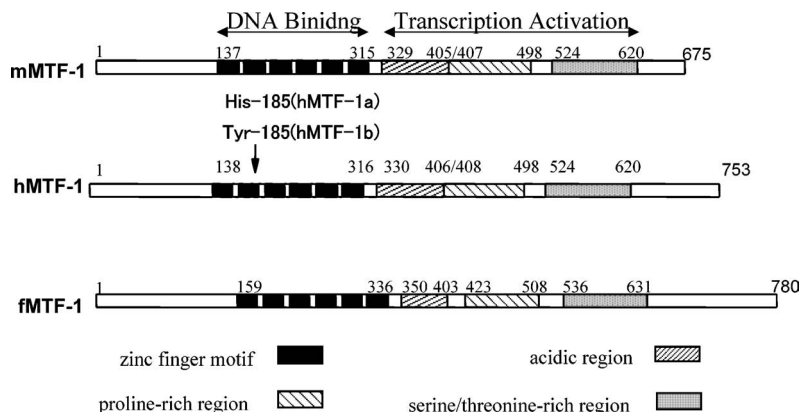


Fig. 1. Schematic Representation of the Protein Structure of MTF-1

m: mouse, h: human, f: fish. The characteristic structure of MTF-1 is six tandem repeats of the  $C_2H_2$  type zinc finger motif, and the transcription activation domain lies adjacent to the zinc finger domain. Functions of the both terminus regions has not been clarified. Such a protein structure of MTF-1 is well conserved from insects to humans. In hMTF-1, two types of cDNA has been reported, hMTF-1a and b, which differ one nucleotide in the second finger motif, so that amino acid-185 is different from each other as indicated in the figure.

MTF-1 を介する重金属応答機構の解明は、細胞内における重金属シグナルの伝達システムを理解するための重要なアプローチとなるはずである。本総説では、この MTF-1 の重金属応答機構に関する知見について、われわれのグループが得ている結果を踏まえて概説したい。

## 2. MT 遺伝子の重金属応答を担う転写因子 MTF-1

MT ファミリーに属するタンパク質は、シアノバクテリアから霊長類に至るまで広く存在している。特に高等動物細胞における MT には I—IV まで 4 つのサブファミリーが知られており、ヒトでは第 16 番染色体、マウスでは第 8 番染色体上にクラスターを形成して存在する。MT サブファミリーの中で、重金属誘導性を示すのは古典的な MT-I と -II であり、近年発見された MT-III と -IV は明確な重金属誘導性を示さず、かわりに組織特異的な発現が認められる。<sup>7-9)</sup> 重金属による MT の誘導は遺伝子の転写活性化の段階で制御されており、遺伝子の 5'-上流制御領域には重金属応答性を下流遺伝子に付与する塩基配列である MRE (metal responsive element) (Fig. 2) が複数個存在している。<sup>4)</sup> 現在までに MRE に結合するタンパク因子として、重金属依存的あるいは非依存的に結合する因子が多数報告されている<sup>5)</sup>が、その中で MT 遺伝子の重金属依存性転写因子として継続的な研究対象となっているのは MTF-1<sup>10)</sup> のみである。われわれはヒトの細胞から MTF-1 とよく似た性質を持つ ZRF (zinc regula-

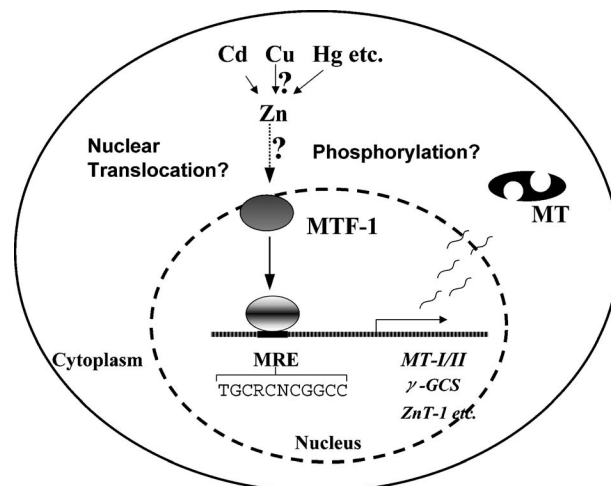


Fig. 2. Predicted Mechanism for Transcriptional Activation of MT-I and -II Genes Mediated by MTF-1

Heavy metal signals culminating MT-induction converge on MTF-1 to give rise to its binding to MREs existing in the upstream region of MT-I/II genes. On the other hand, since MTF-1 in itself can respond only to Zn *in vitro*, it is believed that MTF-1 is a Zn sensor and the heavy metal signal is thought to be converted into the Zn signal, such as the increase in free-Zn concentrations. MTF-1 has been reported to be phosphorylated and to translocate from cytoplasm to the nucleus under the serum free condition, but their meaning in MTF-1 activation is obscure.

tory factor)<sup>11,12)</sup>を見出したが、MTF-1 と ZRF は MRE とその周辺塩基配列に関する結合特異性に差があるため異なる因子であることも予想された。その後、ZRF の精製<sup>13)</sup>・クローニング<sup>14)</sup>を経て、ZRF が hMTF-1 のバリエーションであることが確かめられた。すなわち、hMTF-1 と ZRF はその cDNA 上で 1 塩基の相違があるために 1 個のアミノ酸が異なり、ZRF は hMTF-1 の遺伝子多型の 1 つである

うと考えて hMTF-1b と名付けた (Fig. 1). しかし, 北らによる多数のヒトサンプルの塩基配列解析では hMTF-1b タイプの配列しか認められておらず,<sup>15)</sup> 一般には MTF-1b タイプの配列が主たるものであると思われる.

MTF-1 のタンパク構造は哺乳類 (ヒト,<sup>14,16)</sup> マウス<sup>17)</sup> から魚類 (フグ<sup>18)</sup>), あるいは昆虫 (ショウジョウバエ<sup>19)</sup>) に至るまでよく保存されている (Fig. 1). そのタンパク構造において最も特徴的な点は典型的な C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> タイプの Zn フィンガーモチーフを連続して 6 個有することである. また, Zn フィンガーの C 末側には酸性アミノ酸領域, プロリンリッチ領域並びにセリン・スレオニンリッチ領域の 3 つの転写活性化ドメインがあり, さらに N 末端と C 末端にはそれぞれ機能不明の領域が存在し, 特に C 末端領域の長さは生物種によって異なっている. このような MTF-1 の構造的な特徴からは, その重金属応答性を担う部分を類推できない. これは酵母の銅チオネイン遺伝子の転写因子である ACE1 が, その N 末端側半分に MT タンパク質とよく似たシステインクラスターを持っているため銅の結合部位であることが比較的容易に分かるのとは対照的である.<sup>20,21)</sup>

MTF-1 の性質として, 現在までに確実に分かっていることは意外に少ない. すなわち, 1) *in vitro* では Zn 依存的に MRE に結合するが, Cd や Cu, Hg など他の MT 誘導金属では MRE への結合を誘導できない.<sup>11,22,23)</sup> しかし一方, MTF-1 ノックアウト細胞では各種重金属による MT 誘導が認められないこと<sup>24)</sup> から, 2) *in vivo* において, MTF-1 は Zn 以外の各種重金属による MT 誘導にとっても必須の因子であることが分かっている. また, 3) MTF-1 ノックアウトマウスは受精後 14 日目に肝臓の崩壊を起こすために生まれてこない.<sup>25)</sup> 一方, MT ノックアウトマウスが正常に生まれること<sup>26)</sup> を考えると, MTF-1 は MT 遺伝子以外の発生や分化に重要な遺伝子群を制御していることが予想される. これに関連して MTF-1 が制御する下流遺伝子の解析も行われており, ストレス応答に関与する  $\alpha$ -fetoprotein, C/EBP $\alpha$  及び tear lipocalin,<sup>27)</sup>  $\gamma$ -glutamyl cysteinyl synthetase ( $\gamma$ -GCS),<sup>25)</sup> Zn の細胞外排出に係わる ZnT1,<sup>28)</sup> 低酸素条件で誘導される Placenta growth factor<sup>29)</sup> などの遺伝子が報告され

ているが, 解析対象の細胞種の違いによっても結果が異なり, 統一的な見解には至っていない. いずれにしてもこのような遺伝子群の全貌解明は重金属応答の生物学的意義を考える上でも重要である.

### 3. MTF-1 を介する重金属応答機構の仮説

それでは MTF-1 はどのような機構で複数の重金属種に応答して MT 遺伝子の転写活性化を引き起こすのであろうか? この答えは解明されておらず, 仮説の提唱に留まっているというのが現状である (Fig. 2). まず, 精製した MTF-1 やリコンビナント MTF-1 は *in vitro* で Zn 依存的に MRE に結合するため, MTF-1 は細胞内においても Zn と直接相互作用して MT 遺伝子の 5'-上流制御領域にある MRE に結合し, MT 遺伝子の転写活性化を引き起こすと考えられる. そして恐らく, 誘導された MT タンパク質はその誘導要因となった重金属をトラップしてその細胞内濃度を減少させることにより, MT 遺伝子の転写を終息させるものと思われる. そこで第一の問題は, MTF-1 の *in vitro* での MRE 結合性は Zn のみに依存しているのに, 細胞内では複数の金属種に応答して MT 遺伝子の転写を活性化することである.<sup>24)</sup> この事実に対してかなり以前から, すべての重金属種のシグナルは Zn のシグナルに変換されるという考え方があり,<sup>30)</sup> 現在最も支持される仮説となっている. この場合, Cd などの重金属は細胞内のタンパク質表面に弱く結合している Zn と置換し, その結果増加した遊離 Zn 濃度を MTF-1 が感知すると考える. しかし, MT 遺伝子の転写活性化を引き起こす Cd 濃度が 10  $\mu$ M 程度であるのに比して, Zn では 100  $\mu$ M 以上の濃度を必要とするため, 単純な化学量論的な見方では説明できないことも事実である. なにはともあれこの仮説に従えば, MTF-1 は細胞内 Zn センサーとして機能しているということになり, 実際酵母で MTF-1 を発現させて MRE 経由のレポーターアッセイを行うと, いくつかの重金属種の中では Zn にしか応答しない.<sup>31)</sup> この結果はまた, 哺乳類細胞内で起こると考えられている遊離 Zn 濃度上昇が, 単純に細胞内の不特定タンパク質表面における重金属置換によって生じるのではなく, ある特異的なメカニズムが存在することを示唆している.

いずれにせよ, 以上のような "Zn シグナル仮説" によって MTF-1 の作用機構はある程度理解するこ

とができるが、さらに複雑な機構が絡んでくることも予想されている。その1つとしてMTF-1のリン酸化が報告されている。<sup>32,33</sup> 現在のところ、MTF-1のリン酸化がそのDNAへの結合性を左右するものではないことは一致しているものの、主たる解析がリン酸化酵素の阻害剤を用いて行われており、重金属処理によるMTF-1のリン酸化の変動についても統一的な見解は得られていない。今後、MTF-1の特定部位におけるリン酸化の変動と特異的なシグナル伝達経路との関連が確定されれば、重金属を含む多様なストレスによるMT誘導の意義解明に結びつく可能性はあると思われる。

MTF-1に関するもう1つの知見は、Zn依存的な核移行<sup>34,35</sup>である。これに関しては、われわれの結果を交えて後述するが、この現象はMTF-1<sup>-/-</sup>のMEF細胞(mouse embryonic fibroblasts)を無血清で培養したときに認められたものであり、同様の無血清条件下でも細胞種によって結果が異なることが報告されている。最近ではMTF-1の核移行がユニバーサルであると記述している論文もあるが、培養条件や細胞種による相違も含め、その重金属依存的な転写活性化における意義ははまだ明らかになっていない。

#### 4. *In vivo*におけるMTF-1の重金属依存的なDNA結合

*In vitro*でみられるMTF-1のZn依存的なMREへの結合が、*in vivo*でも同じように起こり、それが重金属依存的なMT遺伝子の転写活性化に重要なステップであるのかどうかに関して、われわれはクロマチン免疫沈降法(ChIP法: Chromatin Immunoprecipitation)を用いて確かめている。すなわち、HepG2細胞を各種重金属で処理後、DNA・MTF-1複合体をホルムアルデヒドでクロスリンクする。クロマチンを超音波によって適当な長さに切断したのち、抗MTF-1抗体によって得た免疫沈降物から精製したDNA中におけるMTII<sub>A</sub>遺伝子の5'-上流制御領域(-79~-277)の量を、PCRによって測定した(Fig. 3)。重金属未処理のコントロールと比較して、重金属処理した細胞ではMTF-1のDNA結合量が増加し、その程度は重金属の種類によっても異なっている(Fig. 3)。また、各種重金属添加時のMTII<sub>A</sub> mRNA量をRT-PCRで測定したところ、Cd, ZnあるいはAgに比べて

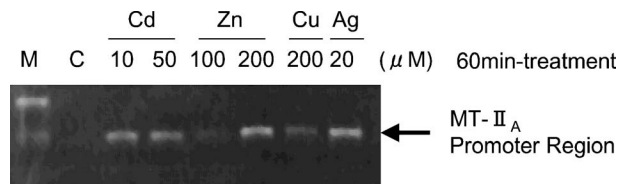


Fig. 3. Chromatin Immunoprecipitation Analysis

HepG2 cells were treated with various heavy metals as indicated in the figure. After formaldehyde fixation, chromatin was mechanically sheared by sonication and MTF-1/DNA complexes were immunoprecipitated with  $\alpha$ -hMTF-1. The precipitates were heated to reverse fixation to liberate DNA. The DNA was purified and amounts of the promoter region of the MT-IIA gene was estimated by PCR and subsequent agarose gel electrophoresis. "C" indicates a control without addition of heavy metals, and "M" indicates a DNA ladder marker.

CuやHgによる誘導は低レベルであり、ChIP法によるDNA結合量の結果とよく一致していた(大塚, 未発表データ)。したがって、MTF-1のDNAへの結合は重金属依存的なMT遺伝子の発現を制御する重要なステップであると考えられる。

#### 5. MTF-1は核移行するか?

MTF-1のDNA結合が直接MT遺伝子の転写活性化につながるとすると、次に問題となるのは、MTF-1がDNA結合に至るメカニズムである。精製MTF-1を用いたゲルシフトアッセイの結果は、MTF-1がZnによって直接活性化されてMREに結合することを示唆する<sup>13,14</sup>が、細胞内でも同じであるという保証はない。また、重金属未処理の細胞から得た抽出液中のMTF-1が始めからMRE結合活性を示す場合があることから、NF- $\kappa$ Bの活性化と同じく、MTF-1は構成的に活性型であり、細胞内では他の因子と複合体を形成することによってその活性が抑制されているのではないかという考え方もある。<sup>30</sup> そこで、MTF-1の細胞内分布を調べるために、HeLa細胞を界面活性剤であるNP-40を含む溶液で細胞膜を破壊して核抽出液と細胞質を調製し、両画分中のMTF-1の存在量をウェスタンブロット法を用いて解析した(Fig. 4(A))。Cd未処理細胞からのサンプルでは、MTF-1は主として細胞質に存在し、Cdの処理時間に従って細胞質中のMTF-1量は減少し、それと逆相関して核抽出液中の量は増加する。この結果の解釈として、MTF-1がCd依存的に細胞質から核へ移行すると考えることができるが、その一方で低張水溶液によって細胞膜を破碎して細胞分画を行うと、重金属未処理細胞でもMTF-1由来のDNA結合活性は核抽出液に存

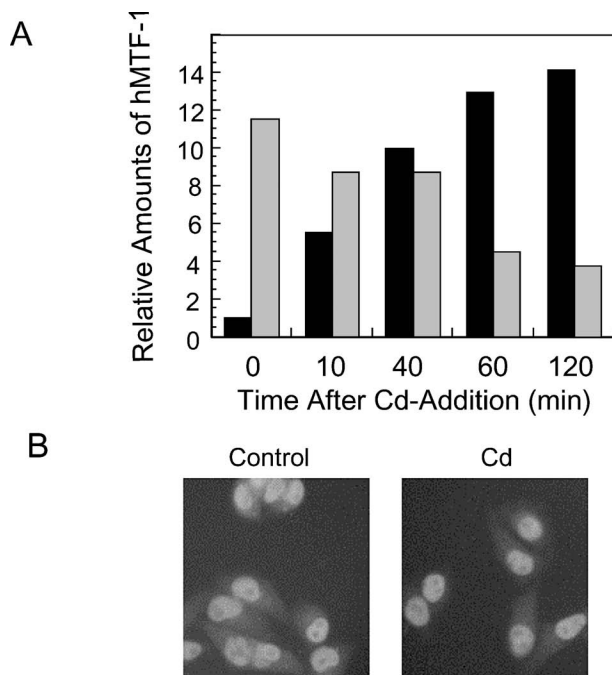


Fig. 4. Intracellular Localization of hMTF-1 in HeLa Cells

**A:** Quantification of hMTF-1 amounts in cytosol and nuclear extracts. HeLa cells were treated with  $10 \mu\text{M}$  Cd for up to 60 min. After the cells were lysed by a buffer containing NP-40, nuclei and cytoplasm were separated by centrifugation. The nuclear extracts and cytosol were then prepared by the method reported previously.<sup>14)</sup> hMTF-1 in both fractions were analysed by Western blot analysis using  $\alpha$ -hMTF-1. The amounts of hMTF-1 were quantified by measuring its band intensity with NIH Image, and represented by the graph. Black bar: hMTF-1 amounts in nuclear extracts, gray bar: hMTF-1 amounts in cytosol. **B:** HeLa cells were treated with or without  $10 \mu\text{M}$  Cd for 60 min. After the cells were fixed with formaldehyde, endogenous hMTF-1 was detected by immunocytochemical analysis using  $\alpha$ -hMTF-1 and an FITC-conjugated second antibody.

在し、細胞質には認められない。そこで、MTF-1の細胞内分布を抗 MTF-1 抗体を用いた蛍光抗体法により解析すると、重金属処理、未処理に関わらず、MTF-1 は主として核に存在していた (Fig. 4 (B))。この核局在性は、MTF-1 の C-末端に EGFP (Fig. 7(B)) や FLAG タグ (大塚, 未発表データ) を持つ融合タンパクを発現させることによっても確かめられている。

以上のように細胞分画による方法と免疫染色による方法とでは結果が異なり、細胞分画によって細胞質画分に MTF-1 が認められるのは、分画操作の際に核からの漏出が起こると考えるのが妥当であろう。漏出の程度は恐らく細胞破砕法によって異なり、われわれが HeLa 細胞から MTF-1 を精製する際に用いた低張水溶液による細胞膜破壊法 (Dignam 法) は、界面活性剤である NP-40 を用いる方法に比べて MTF-1 の核保持率が高いものと思われ

る。

Andrews のグループが最初に MTF-1 の核移行を報告したのは、MTF-1<sup>-/-</sup> の MEF に MTF-1 を強制発現させ、かつ無血清培地で培養した場合であり、<sup>34)</sup> その後 Schaffner のグループは MTF-1 の細胞質局在は無血清条件下でのみ観察される現象で、細胞種にも依存することを示している。<sup>35)</sup> 実際、HeLa 細胞では無血清条件下で細胞形態が変化するまで培養してもなお、MTF-1 は核に局在していた (下山, 未発表データ)。したがって、細胞分画で得たサンプルを Western 法で解析した結果でのみ核移行があるとするのは危険と言わざるを得ない。さらに、Andrews のグループの結果では、MTF-1 の核移行を引き起こす重金属は主として Zn であり、MT 誘導能が最も高い Cd はその効果が低い。そして HepG2 細胞や HeLa 細胞では、血清を添加した培養条件においても重金属依存的な MT 誘導は起こる。したがって細胞種と培養条件によっては MTF-1 が Zn 依存的に核移行する場合があるにしても、それが MTF-1 の重金属応答機構の本質であるとは考えにくい。

## 6. 非変性ゲル電気泳動における MTF-1 の挙動

それでは細胞分画によって細胞質に回収される MTF-1 と核抽出液に回収されるものとは、なにが違うのだろうか？その相違を調べるための 1 つのアプローチとして、それぞれの画分を非変性アクリルアミドゲルで電気泳動したのち、Western 法を用いて解析を行った結果、細胞質のものと核抽出液のものとは泳動における移動度が明らかに異なることが分かった (Fig. 5 (A)).<sup>14)</sup> このような差異は細胞を Cd で処理することにより引き起こされたものであり、細胞内 MTF-1 の重金属応答の 1 つであると考えられる。そこで、同様の変化が *in vitro* における Zn 誘導性の DNA 結合の際にも起きているのかどうかを確かめるために、シフトウェスタン法を用いて解析した (Fig. 5 (B))。この方法は、通常のゲルシフト法と全く同じであるが、ゲルシフト法では放射能標識した DNA プローブの挙動を調べるのに対して、シフトウェスタン法では、電気泳動後にゲル中の複合体を転写膜上にプロットし、抗体を用いて DNA 結合タンパク質の挙動を解析するものである。核抽出液中の MTF-1 は Zn 及び MRE プローブ非添加時には明確なバンドを形成するが、

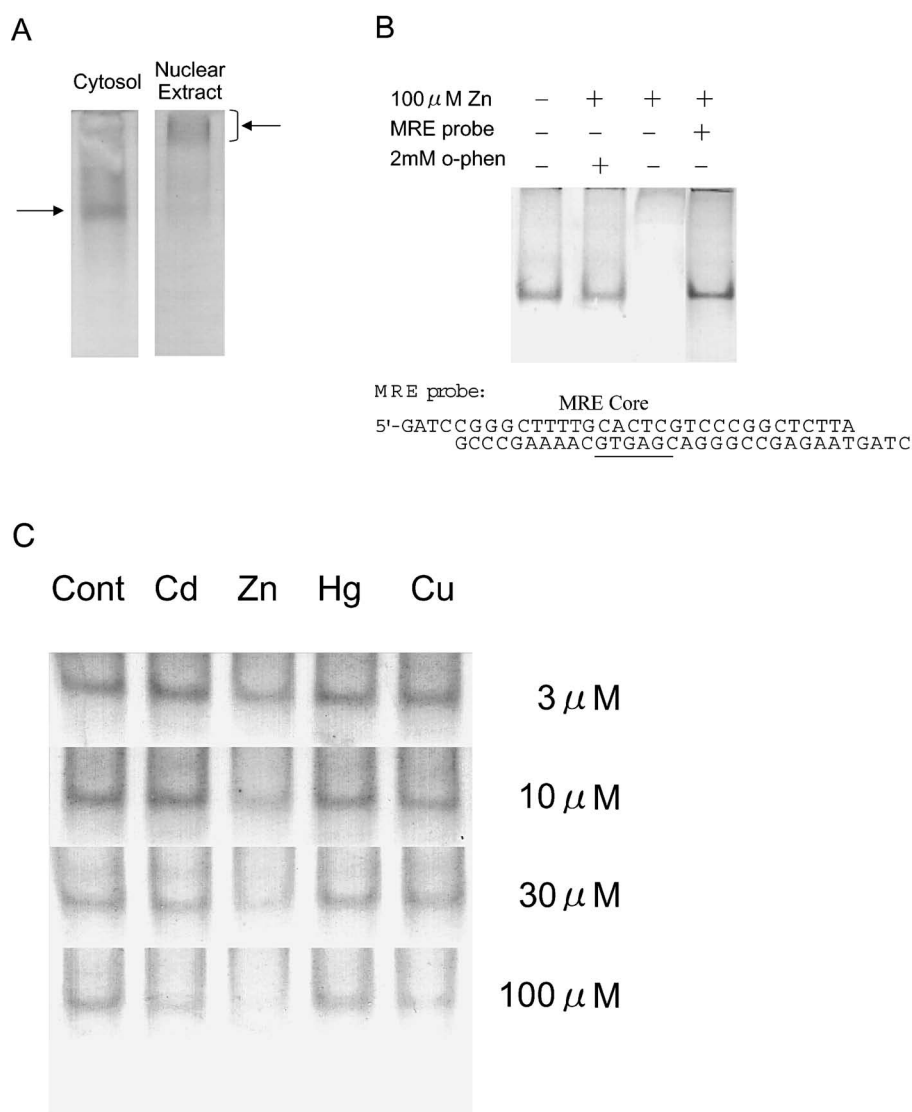


Fig. 5. Behavior of hMTF-1 on Native Gel Electrophoresis in Response to Heavy Metals

A: Nuclear extracts were prepared from HeLa cells treated with 10  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> for 60 min, and the cytosol fraction was from the cells without Cd-treatments. Both fractions were subjected to 5% native acrylamide gel electrophoresis, and Western blot analysis was performed to identify the migrating position of hMTF-1, which are pointed with arrows. B: Nuclear extracts prepared from HeLa cells were treated with 100  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 100  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> plus 1 mM *o*-phenanthroline (*o*-phen), or 100  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> plus the synthetic MRE probe *in vitro*, then analysed with the same method as A. C: Recombinant hMTF-1 was treated with various concentrations of heavy metals *in vitro*, then analysed with the same method as A. "Cont" indicates a control without addition of heavy metals for each row.

Zn を添加すると移動度が遅くなりバンドはブロードとなる。この移動度の変化は Zn のキレート剤である *o*-phenanthroline を添加すると起こらない。一方、Zn によって移動度が変化した MTF-1 に MRE 配列を含むプローブを添加すると DNA 結合が起こり、再び明確なバンドを形成する。Zn 添加時のこのような移動度変化は MTF-1 の DNA 結合型への活性化に対応している可能性があるが、移動度が遅いブロードなバンド形成は単純に重金属による MTF-1 の凝集によるとも考えられる。そこで Zn 以外の重金属によっても同様な現象が起こるかどう

かをリコンビナント hMTF-1 を用いて検討した。Figure 5(C)に示すように、Zn では 10  $\mu$ M の濃度から MTF-1 の移動度変化が顕著に起こるのに比して、Cd, Cu, Ag, Hg では 30  $\mu$ M まで変化が認められず、この現象が Zn に選択的に起こることが分かる。このことは、*in vitro* における MTF-1 の DNA 結合が Zn にのみに依存しているという結果と一致している。

以上のような非変性ゲル電気泳動上における MTF-1 の挙動の実態は現在のところ不明であり、Zn によるタンパク構造の変化ではないかと予想し

ているが、ZnによるMTF-1の重合体形成である可能性も否定できない。いずれにせよこのような変化がMTF-1のDNA結合型への活性化に対応していることが考えられるため、後述するような様々なMTF-1変異体を用いた解析によってこの現象に関与するタンパク領域を確定できれば、MTF-1の重金属依存的な転写活性化機構を考える上で重要な情報になるものと期待できる。

### 7. MTF-1のZn応答領域の解析

MTF-1タンパク質の重金属応答領域に関しては、一般的なZnフィンガー構造を除けばそのタンパク構造自体に一見して重金属と特異的に相互作用すると思われる領域が存在せず、いまだ明確になっていない。現在までに報告された重金属応答領域の候補をFig. 6に示している。Schaffnerのグループは、ヒトとマウスのMTF-1の転写活性化能の比較から、hMTF-1がmMTF-1に比べてZn依存性が高いことに着目し、これらのキメラタンパクの解析からZnフィンガードメインのC末端側に存在する酸性領域中に重金属応答領域があると報告している。<sup>36)</sup> われわれは種々のMTF-1欠損変異体のZn依存的なDNA結合性を解析した結果、N末端領域の欠失がDNA結合のZn依存性を低下させることを報告している。<sup>37)</sup> さらに、C末端領域に存在する4つのシステイン残基がアミノ酸1個おきに並ぶクラスターの変異がZn依存的な転写活性を消失させる。<sup>38)</sup> これらの結果はZn応答性というよりも、DNA結合性や転写活性そのものの低下である可能性もあり、MTF-1のZn応答性との直接的な関連に言及するには不十分である。一方、MTF-1の6個のZnフィンガーのZn親和性が比較的低いこと

から、それがZn応答性フィンガーではないかと推測され、<sup>10,17)</sup> 実際に第5、第6フィンガーが他の4つのフィンガーと比べ親和性が低いことが示されている。<sup>39,40)</sup> MTF-1のZnフィンガードメインに関しては欠損変異体の機能解析から、第1フィンガーもZn応答性に関与するとの報告もある。<sup>41)</sup> また、最近MTF-1のZnフィンガーのリンカーが通常のC<sub>2</sub>H<sub>2</sub>フィンガーとはアミノ酸配列が異なることに着目し、第1フィンガーと第2フィンガーのリンカー部分を変化させることによってMTF-1の重金属応答性がなくなるという報告もなされており、<sup>42)</sup> Znフィンガードメインにおける解析結果だけでも相当に複雑で統一的なイメージを描くことは困難である。このようにZn応答性領域を確定しにくい理由の1つとして、MTF-1はどのような欠損変異でもその機能への影響が大きいことが挙げられ、<sup>36)</sup> 恐らくタンパク質全体としての構造が重要であると考えられる。

### 8. MTF-1のシステイン残基点変異体を用いた解析

前述したように、MTF-1の重金属応答性がZnとの直接的な相互作用に基づく可能性が高いこと、及びMTF-1の全体としての構造が重要であると考えられることの2点から、われわれは重金属とタンパク質との相互作用にとって重要なアミノ酸であるシステイン残基とヒスチジン残基に点突然変異を導入し、機能解析を行っている (Fig. 7)。

現在解析を進めているのは機能不明なN末端領域のヒスチジン残基とシステイン残基、6個のZnフィンガーモチーフそれぞれのZnキレートに関与する第二システイン残基、及びC末端領域にある

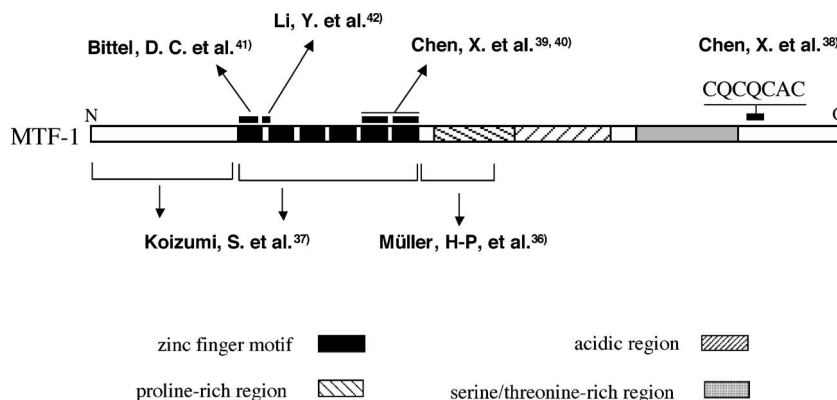


Fig. 6. Protein Regions Reported to Affect DNA Binding or Transcriptional Activity of MTF-1

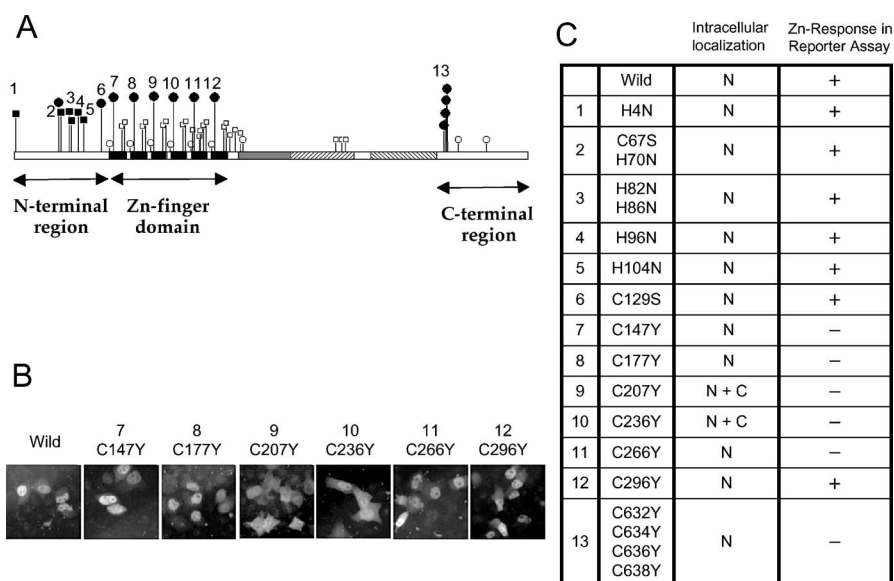


Fig. 7. Analyses of Cysteine- and Histidine-mutants of hMTF-1

A: Positions of histidine and cysteine residues in the primary structure of hMTF-1. Circles and squares indicate cysteine and histidine residues, respectively. Numerals associated with closed symbols correspond to the mutations indicated in B and C. B: C-terminally EGFP tagged MTF-1, which carries a mutation at the second chelating cysteine in each finger motif, were expressed in HeLa cells, and analyzed their intracellular distribution. C: Summary of intracellular distribution and transcriptional activities of various point mutants. Transcriptional activities were estimated by reporter assay using MTF-1<sup>-/-</sup> MEF cells transfected with the expression vector carrying cDNA encoding various point mutants of hMTF-1 and the CAT reporter plasmid driven by the upstream region of the hMT-1IA gene. N and C indicate nuclear and cytoplasmic localization, respectively. The symbol, +, indicates that the mutant exhibits the Zn-dependent transcriptional activation at the same level with the wild type. The symbol, -, indicates no increase in the transcriptional activity regardless of the Zn-addition.

システインクラスターである (Fig. 7(A)). まず, これらの点変異体の C 末端に EGFP を付加したタンパクを HeLa 細胞で発現させて細胞内分布を調べると, 6 個の Zn フィンガーのうちの第 3 及び第 4 フィンガーの変異を除いて, すべて野生型と同じく核に局在していた (Fig. 7(B)). 一方, 第 3 及び第 4 フィンガーの変異体は核局在性がゆるみ, 細胞全体に分布するようになる. 同様の結果は EGFP を FLAG タグに変えても認められる (大塚, 未発表データ). これら 2 つのフィンガー変異体がなぜ核局在しなくなるかその原因は今のところ不明であるが, 少なくとも Western Blot 解析ではこの 2 つの変異体も含め, すべての変異体は野生型と同一の移動度を示すためタンパクの分解が原因ではない. 恐らく, この 2 つのフィンガーへの Zn 結合が MTF-1 の構造に極めて重要であることが考えられる.

次に, 各点変異体の転写活性化機能を調べるために, HeLa 細胞を用いてレポーターアッセイを行った (Fig. 7(C)). N 末端領域の点変異体はすべて野生型と同様, Zn 依存的な転写活性を示すが, Zn フィンガードメインでは第 1—5 フィンガーの変異に

より Zn 依存的な転写活性化能の消失が認められ, 第 6 フィンガーの変異は影響がなかった. さらに C 末端領域のシステインクラスターの変異によっても Zn 依存的な転写活性化能が抑制される.

Zn フィンガードメインは DNA 結合に関与するため, その変異体の転写活性化能低下は DNA 結合性の消失によると考えることができる. しかし, 少なくとも第 5, 6 フィンガーの変異は野生型と同様に DNA 結合能を有している.<sup>37)</sup> したがって, 第 5 フィンガーは DNA 結合には関与せず, むしろ転写活性化に関与しているフィンガーかもしれない. また, 前述したように第 3, 4 フィンガーは核局在性とも関連していることを考えると, MTF-1 の 6 個の Zn フィンガーは多様な役割を持つフィンガーの集合体である可能性がある. 一方, MTF-1 の N 末端領域の欠損変異は DNA 結合において Zn 依存性が消失するが, その領域のシステイン, ヒスチジンの点変異は機能には影響しなかった. 恐らく Zn がこの領域に直接結合するのではなく, N 末端領域が MTF-1 の全体構造, 特に隣接する Zn フィンガードメインの構造などに大きく影響しているものと考えられる. しかし, C 末端領域のシステインク



ラスターには Zn が結合する可能性があり、それが Zn 依存的な転写活性化能にどのように関わるのかは今後興味あるところである。

われわれの得ている以上のような実験結果を踏まえて現在知られている知見を総合すると、MTF-1 の重金属応答領域はある特定の部分に集約されてはおらず、MTF-1 の様々な領域に点在しており、それらを結び付けるものは MTF-1 のタンパク構造全体であると思われる。その際、Zn フィンガードメインは MTF-1 のタンパク構造において中心的な役割を果たしている可能性が高い。その意味で、酵母の MT 遺伝子の転写因子である ACE1 は一次構造上 MTF-1 とは全く異なるものの、重金属によってタンパク構造の変化を引き起こし、活性化されるという点に関しては種を越えて保存されているのかもしれない。

#### REFERENCES

- 1) Hamer D. H., *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 913–951 (1986).
- 2) Kägi J. H., Schaffer A., *Biochemistry*, **27**, 8509–8515 (1988).
- 3) Palmiter R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8428–8430 (1998).
- 4) Otsuka F., Koizumi S., “*Toxicant-Receptor Interactions and Modulation of Gene Expression*,” eds. by Denison M. S., Helferich W. G., Taylor & Francis, Philadelphia, 1998, pp. 143–158.
- 5) Otsuka F., *J. Health Sci.*, **47**, 513–519 (2001).
- 6) Otsuka F., *J. Health Sci.*, **50**, 332–335 (2004).
- 7) Uchida Y., Takio K., Titani K., Ihara Y., Tomonaga M., *Neuron*, **7**, 337–347 (1991).
- 8) Palmiter R. D., Findley S. D., Whitmore T. E., Durnam D. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 6333–6337 (1992).
- 9) Quaife C. J., Findley S. D., Erickson J. C., Froelick G. J., Kelly E. J., Zambrowicz B. P., Palmiter R. D., *Biochemistry*, **33**, 7250–7259 (1994).
- 10) Westin G., Schaffner W., *EMBO J.*, **7**, 3763–3770 (1988).
- 11) Koizumi S., Yamada H., Suzuki K., Otsuka F., *Eur. J. Biochem.*, **210**, 555–560 (1992).
- 12) Koizumi S., Otsuka F., *Ind. Health*, **32**, 193–205 (1994).
- 13) Otsuka F., Iwamatsu A., Suzuki K., Ohsawa M., Hamer D. H., Koizumi S., *J. Biol. Chem.*, **269**, 23700–23707 (1994).
- 14) Otsuka F., Okugaito I., Ohsawa M., Iwamatsu A., Suzuki K., Koizumi S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1492**, 330–340 (2000).
- 15) Kita K., Miura N., Yoshida M., Matsubara M., Imai Y., Naganuma A., *J. Health Sci.*, **47**, 587–590 (2001).
- 16) Brugnera E., Georgiev O., Radtke F., Heuchel R., Baker E., Sutherland G. R., Schaffner W., *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3167–3173 (1994).
- 17) Radtke F., Heuchel R., Georgiev O., Hergersberg M., Gariglio M., Dembic Z., Schaffner W., *EMBO J.*, **12**, 1355–1362 (1993).
- 18) Auf der Maur A., Belser T., Elgar G., Georgiev O., Schaffner W., *Biol. Chem.*, **380**, 175–185 (1999).
- 19) Zhang B., Egli D., Georgiev O., Schaffner W., *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 4505–4514 (2001).
- 20) Fürst P., Hu S., Hackett R., Hamer D., *Cell*, **55**, 705–717 (1988).
- 21) Fürst P., Hamer D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 5267–5271 (1989).
- 22) Bittel D., Dalton T., Samson S. L., Gedamu L., Andrews G. K., *J. Biol. Chem.*, **273**, 7127–7133 (1998).
- 23) Koizumi S., Suzuki K., Ogra Y., Yamada H., Otsuka F., *Eur. J. Biochem.*, **259**, 635–642 (1999).
- 24) Heuchel R., Radtke F., Georgiev O., Stark G., Aguet M., Schaffner W., *EMBO J.*, **13**, 2870–2875 (1994).
- 25) 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).
- 26) Masters B. A., Kelly E. J., Quaife C. J., Brinster R. L., Palmiter R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 584–588 (1994).
- 27) Lichtlen P., Wang Y., Belser T., Georgiev O., Certa U., Sack R., Schaffner W., *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1514–1523 (2001).
- 28) Langmade S. J., Ravindra R., Daniels P. J., Andrews G. K., *J. Biol. Chem.*, **275**, 34803–34809 (2000).
- 29) Green C. J., Lichtlen P., Huynh N. T., Yanovsky M., Laderoute K. R., Schaffner W., Murphy B. J., *Cancer Res.*, **61**, 2696–2703

- (2001).
- 30) Palmiter R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 1219–1223 (1994).
  - 31) Daniels P. J., Bittel D., Smirnova I. V., Winge D. R., Andrews G. K., *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3130–3140 (2002).
  - 32) LaRochelle O., Gagne V., Charron J., Soh J. W., Seguin C., *J. Biol. Chem.*, **276**, 41879–41888 (2001).
  - 33) Saydam N., Adams T. K., Steiner F., Schaffner W., Freedman J. H., *J. Biol. Chem.*, **277**, 20438–20445 (2002).
  - 34) Smirnova I. V., Bittel D. C., Ravindra R., Jiang H., Andrews G. K., *J. Biol. Chem.*, **275**, 9377–9384 (2000).
  - 35) Saydam N., Georgiev O., Nakano M. Y., Greber U. F., Schaffner W., *J. Biol. Chem.*, **276**, 25487–25495 (2001).
  - 36) Muller H. P., Brungnera E., Georgiev O., Badzong M., Muller K. H., Schaffner W., *Somat. Cell Mol. Genet.*, **21**, 289–297 (1995).
  - 37) Koizumi S., Suzuki K., Ogra Y., Gong P., Otsuka F., *J. Cell. Physiol.*, **185**, 464–472 (2000).
  - 38) Chen X., Zhang B., Harmon P. M., Schaffner W., Peterson D. O., Giedroc D. P., *J. Biol. Chem.*, **279**, 4515–4522 (2004).
  - 39) Chen X., Agarwal A., Giedroc D. P., *Biochemistry*, **37**, 11152–11161 (1998).
  - 40) Chen X., Chu M., Giedroc D. P., *Biochemistry*, **38**, 12915–12925 (1999).
  - 41) Bittel D. C., Smirnova I. V., Andrews G. K., *J. Biol. Chem.*, **275**, 37194–37201 (2000).
  - 42) Li Y., Kimura T., Laity J. H., Andrews G. K., *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 5580–5587 (2006).