The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	メタロチオネインによる転写因子NF-κBの活性調節とサイトカイン遺伝子発現変化
Author(s)	金清, 雅子
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43351
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【3】

氏　　名	金　清　雅　子（かね　きよ　まさ　こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　16956　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	**メタロチオネインによる転写因子NF-κBの活性調節とサイトカイン遺伝子発現変化**
論文審査委員	（主査） 教　授　田中　慶一 （副査） 教　授　那須　正夫　　教　授　土井　健史　　教　授　西原　　力

論文内容の要旨

メタロチオネイン（MT）は、分子量約6kDaの低分子量タンパク質であり、その構成アミノ酸の約1/3をシステイン残基が占め、すべてのシステインのSH基が遊離した形で存在するといった特徴的な構造を有している。MTは、哺乳類に属する種々の動物の間に構造的に非常によく保存された形で存在し、さらに哺乳類のMTと類似性の高いタンパク質がそれ以外の動物や植物、微生物にまで存在することが確認されている。MTは金属により誘導され、また金属に対する強い親和性を持つ。そのため、MTの生物学的役割として、第一に重金属の解毒物質としての役割が考えられてきた。一方、MTは定常状態での発現レベルも比較的高く、生体内において亜鉛や銅などの必須金属と結合した状態で存在していることから、これら必須金属の組織内濃度を調節し、その代謝に関与していると考えられている。MTは通常細胞質に存在しているが、ある種の増殖刺激を受けた細胞や、癌細胞など、増殖の盛んな細胞においては核局在が認められていることから、細胞内の亜鉛の動態を調節することなどによりシグナル伝達に関わる可能性が指摘されている。

一方、human Cytomegalovirus（CMV）はヘルペスウイルスの一属である。最近、このCMVに対して金属キレーターdiethylenetriaminepentaacetic acid（DTPA）が複製を抑制することが発見されたが、その作用メカニズムについては明らかにされていない。そこで本研究では、CMV前初期（MIE）promoterへのDTPAの作用が亜鉛の制限にあることを端緒として研究を進め、亜鉛及びそれにより誘導されるMTによる転写因子NF-κBの活性調節と、サイトカイン遺伝子発現変化について明らかにした。

CMV MIE promoterに対するDTPAの影響を検討したところ、CMV MIE promoter（-735bp/+62bp）の転写活性はDTPAにより濃度依存的に減少した。この応答にはCMV MIE promoterの5'上流領域にあるエンハンサー部分（-735bp/-117bp）が必要であった。また、CMV MIE promoterの転写活性は、細胞内亜鉛含有量及び細胞内MT含量の変動と相関性があった。さらに、CMV MIE promoterの転写活性は亜鉛の添加により濃度依存的に上昇し、この現象においてもエンハンサー部分が必要であった。このエンハンサー部分には、これまでに金属により転写調節されると報告されているAP-1 site及びκB elementのほかに、MREのコンセンサス配列にホモロジーの高いエレメントの存在を確認した。しかしながら、亜鉛によるCMV MIE promoterの活性はAP-1 siteまたはMREを持つ他のpromoterと異なる経時的変化を行ったことから、これらの応答配列を介する調節系は関与していないことが示唆された。次に、亜鉛の処理がNF-κBの活性に与える影響を検討したところ、EMSA及びデコイを用いた系

で亜鉛によるCMV MIE promoterの活性化にNF-κBが関与することが示めされた。さらに、内在性遺伝子であるM－CSF遺伝子発現変化は、亜鉛により濃度依存的に上昇した。この遺伝子発現上昇は転写後調節でなく、M－CSF promoterの転写活性の上昇によるものであった。

次に、亜鉛によるM－CSF遺伝子発現上昇メカニズムの解明を試み、亜鉛によるNF-κBの活性化にはタンパク質の*de novo*合成が重要であり、このタンパク質はMTであることを明らかにした。さらに、遺伝子導入によりMT発現量を上昇させた際のNF-κBの転写活性、DNA結合活性、NF-κB支配遺伝子M-CSF　mRNA発現、及びM-CSFタンパク質発現は全て上昇していた。以上の結果から、MT発現量の上昇は、NF-κBの活性を特異的に上昇させ、その支配遺伝子の発現を上昇させることが示された。

次に、NF-κBの活性化時における定常レベルのMTの働きについてMT欠損マウス由来のチオグリコレート誘発腹腔浸出マクロファージを用いて検討した。マクロファージをLPSで処理した際のNF-κBのDNA結合活性は、野生型マクロファージにおいて顕著な活性化が認められたが、MT欠損マクロファージでは活性化の程度が減少していた。さらに、TNF-α　mRNAレベル及び培養上清中へのTNF分泌量は、野生型マクロファージにおいてはLPS処理により顕著な発現上昇が観察されたが、MT欠損マクロファージでは野生型に比べ発現の時間的変化は野生型と同様であったものの発現量が低下していた。MT欠損マクロファージにおけるTNF産生の低下は、LPSの濃度が高いほど顕著に観察された。さらに、LPSレセプターであるToll-like receptorからのシグナルは、細胞質でIKKカスケードとMAPKカスケードに分岐し、それぞれ転写因子NF-κBとAP-1を活性化するが、LPS刺激後のAP-1のDNA結合活性は、両マクロファージにおいて同様の活性化が観察され、MTがNF-κB特異的に転写因子の活性修飾を行うことが示された。さらに、LPSで処理した時の野生型及びMT欠損マクロファージのIL-1α、IL-6、MIP-1α、GM-CSF mRNAの発現は、TNF-αと同様、MT欠損マクロファージにおいて低下していた。

本研究で、著者はMTが転写因子NF-κBの活性を調節することを明らかにした。MTは、重金属のみならず、ホルモン、サイトカイン、種々の化学物質やストレス条件下で誘導され、また、刺激によっては細胞質から核に移行することなどから、細胞内シグナル伝達において何らかの役割を果たすことが予想されている。しかしながら、現時点ではまだ、MTから他のタンパク質への亜鉛供給の機構、MTが細胞質から核に移行するメカニズムなど不明な点が多く、MTは「シグナル伝達修飾因子」として認知されていないのが現状であろう。本研究は、MTのシグナル伝達調節作用の一端を明らかにするものであり、今後、実験結果が蓄積し、MTの機能ならびにその活性調節機構が解明されていくことが期待される。

論文審査の結果の要旨

メタロチオネイン（MT）は、広く動物界に分布しており、重金属の解毒や必須金属のホメオスタシスに関与する重金属結合タンパク質である。MTは通常細胞質に存在しているが、ある種の増殖刺激を受けた細胞や、癌細胞など、増殖の盛んな細胞においては核移行が認められていることから、シグナル伝達などに関わる可能性が注目されてきた。しかし、これまでは限られた転写因子についての無細胞系での検討にとどまり、MTの新たな機能は推測の域を出ていない。

申請者は亜鉛の細胞内動態とシグナル伝達に関する検討を端緒として、亜鉛およびこれが誘導するMTによる転写因子NF-κBの活性調節、およびその支配遺伝子発現への役割を明らかにした。すなわち、まず金属キレーターDTPAによって複製が抑制されるhuman Cytomegalovirus（CMV）に注目して、その作用メカニズムについて検討したところ、CMV前初期promoterへのDTPAの作用が亜鉛の制御にあることを見いだした。このpromoterの転写活性は、細胞内の亜鉛およびMT含量の変動と相関するとともに、この活性化にNF-κBが関与することを示した。さらに、内在性遺伝子であるTNFおよびM-CSF遺伝子の発現も亜鉛およびMTにより調節を受けることを、MT遺伝子改変マウスおよび改変細胞を用いた系でサイトカイン活性、mRNA発現、ゲルシフトアッセイなどによる解析によって明らかにした。そしてさらにMTがNF-κB特異的に転写因子の活性修飾を行うことを明らかにするとともに、その支配遺伝子であるいくつかのサイトカイン遺伝子発現もMTの有無により大きく左右されること

を示した。

本研究はMTが細胞および個体レベルでシグナル伝達調節作用およびサイトカイン発現に関与することを初めて明らかしたものであり、これらの成果は博士（薬学）の学位論文として十分価値あるものと考えられる。