

紫外線防御因子メタロチオネインのヒノキチオールによる合成誘導とその意義

永 沼 章

東北大学大学院 薬学研究科

【目的・背景】

メタロチオネイン (MT) は分子量約 6000 の蛋白質で、構成アミノ酸の約 1/3 をシステインが占めているながら S-S 結合を一つも持たず、かつ芳香族性アミノ酸を一つも持たないという特徴的な構造を有している。MT は重金属毒性軽減作用、フリーラジカル消去作用、紫外線防御作用などを有し、生体内において多機能な防御因子として働いている。

MT の合成は *in vivo* では様々な因子によって誘導されるが、細胞レベルで MT の合成を効率良く誘導する物質は亜鉛などの重金属化合物に限られる。我々は MT 遺伝子プロモーターを活性化する非金属化合物をスクリーニングし、約 400 種類の化合物中から MT プロモーターを著しく活性化する物質としてヒノキチオールを見いだすことに成功した。そこでヒノキチオールの MT プロモーター活性化機構の解明を試みた。

【結果・考察】

マウス MT-I プロモーターの支配下で β -ガラクトシダーゼを発現する安定形質転換体である L13-17 細胞を用いてヒノキチオールの MT-I プロモーター活性化作用を検討したところ、80 μM までのヒノキチオールによって濃度依存的に β -ガラクトシダーゼ活性が上昇し、それ以上高い濃度ではプラトーに達した。一方、最も強力な MT 誘導剤の一つである亜鉛で処理した場合は、200 μM 付近でピークに達し最大の β -ガラクトシダーゼ活性を示したが、ここに比較的 low 濃度のヒノキチオール (15, 25 μM) を共存させることでそのピークが亜鉛の low 濃度側に移動する現象が認められた。このとき、単独ではほとんど β -ガラクトシダーゼ活性が認められない 15 μM のヒノキチオールと 40 μM の亜鉛の共存により、200 μM の亜鉛処理の場合と同等の強力な β -ガラクトシダーゼ活性が認められることから、ヒノキチオールと亜鉛は非常に強力な相乗作用により MT プロモーターを活性化させると見ることもできる。実際にヒノキチオールは L13-17 細胞の親株である Ltk⁻ 細胞の MT mRNA レベルおよび細胞内 MT 濃度を増加させることが確認され、また、亜鉛とヒノキチオールの併用によって MT mRNA レベルが劇的に上昇することも明らかになった。そこで、この現象が亜鉛に特異的なものであるかどうかを調べるために、亜鉛以外の MT 誘導剤 (DEX, カドミウム、銅、水銀、鉛およびビスマス) について検討したが、亜鉛の場合に見られたようなピークの移動は認められなかった。従って、ヒノキチオールによるピークの移動を伴う MT プロモーター活性化促進作用は亜鉛との併用の場合に比較的特異的に認められる現象であることが示唆された。なおこれらの MT 誘導剤のうち、ビスマスはヒノキチオールと併用すると非常に強く MT プロモーターを活性化させ、且つほとんど細胞毒性を示さないことが明らかになった。そのため、ヒノキチオールとビスマスの併用は MT

プロモーターを活性化する理想的な方法であることが示唆された。次に、ヒノキチオールによる MT プロモーター活性化機構を明らかにするため、MT プロモーター上のヒノキチオール応答領域の検索を行った。その結果、ヒノキチオールは亜鉛と同一の作用点 (MRE) に作用して MT プロモーター活性を上昇させる可能性が強く示唆された。MT プロモーター上に存在する MRE に結合する転写因子として MTF-1 が知られており、重金属による MT の誘導は主に MTF-1/MRE の系を介していると考えられている。リコンビナント MTF-1 を用いた無細胞系での実験では遷移金属のうち亜鉛だけが MTF-1 のコンセンサス MRE への結合を促進することが報告されていることから、ヒノキチオールがこの亜鉛を介して間接的に MT プロモーターを活性化させる可能性が考えられた。そこで、亜鉛を含まない無血清培地において、ヒノキチオールの MT プロモーター活性化能について検討したところ、ヒノキチオールによる MT プロモーターの活性化はほとんど認められなかった。さらに、この無血清培地に通常の培地が含有する量の半分に当たる 2 μM の亜鉛を存在させた場合にはヒノキチオールによる MT プロモーターの活性化が認められた。従って、ヒノキチオールは細胞外の亜鉛に依存して MT プロモーターを活性化させるものと考えられる。

以上の結果から、ヒノキチオールによる MT プロモーターの活性化には亜鉛の動員を介した MTF-1 の MRE への結合活性の促進が関与していることが強く示唆された。これまでに報告されているヒノキチオールの多彩な生理作用の一部もこのような亜鉛の動員を介している可能性が考えられる。