

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

東北大学大学院 薬学研究科

永 沼 章

Metallothionein has been known as one of photoprotection proteins. Effective inducers of metallothionein are needed for protection of skin from UVB-solar radiation. We have performed a search for non-metallic substances which activate metallothionein gene expression. Hinokitiol, an extract of steam distillation of the root or trunk of Japanese cypress, was found to activate the metallothionein promoter. The results of our study for elucidation of the mechanism of induction of metallothionein synthesis by hinokitiol suggest that hinokitiol activates MTF-1, a transcriptional factor, through mobilization of zinc, an activator of MTF-1, from medium to cells.

1. 緒 言

メタロチオネイン (MT) は 1957 年にウマの腎臓中からカドミウム結合蛋白質として発見された分子量約 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¹⁾。MT およびその類似蛋白質 (銅-ケラチン、フィトケラチンなど) は生物界に広く存在し、ヒトやげっ歯類などのほ乳類をはじめとした脊椎動物、酵母、植物などの真核生物のみならず、ラン藻などの原核生物にもその存在が認められている。

MT の性質として最もよく知られているのは重金属毒性軽減作用であり、MT はその SH 基を介して重金属と強固に結合することによって毒性の発現を抑制する。また、フリーラジカル消去作用や紫外線防御作用なども報告されており、生体内において多機能な防御因子として働いていると考えられている。

MT の合成は重金属に加え、グルココルチコイド、パラコート、インターロイキン 6 (IL-6)、紫外線照射²⁾ などの様々な刺激によって誘導される。重金属やグルココルチコイドによる MT の誘導は転写レベルで行われており、MT 遺伝子のプロモーター領域には重金属およびグルココルチコイドによる転写促進に必須の cis- エlement としてそれぞれ metal response element (MRE) および glucocorticoid responsive element (GRE) の存在が確認されている。ま

た、過酸化水素の刺激に応答する antioxidant responsive element (ARE) や IL-6 に応答する STAT3-binding site の存在も報告されている。しかしながら、これまで知られている非金属性の MT 誘導剤の MT 誘導能は亜鉛やカドミウムといった重金属と比べると非常に低い。

我々は、MT の示す紫外線防御作用に着目し、皮膚の MT 合成を誘導する金属を検索したが一般的に金属化合物は毒性が比較的高く、毒性の発現しない濃度範囲で効率良く MT 合成を誘導する金属は見出せなかった。そこで MT 遺伝子プロモーターを活性化する非金属化合物を約 400 種類の化合物中からスクリーニングしたところ、ヒノキチオール (ヒノキチオール, 別名 β -thujaplicin) が MT プロモーターを著しく活性化することを見出すことに成功した。ヒノキチオールは、タイワンヒノキや青森ヒバの精油に含まれる結晶性酸性物質で、1936 年に野副らによって天然物として初めて発見された炭素七員環芳香族化合物である^{3, 4)}。ヒノキチオールは殺菌・抗菌力に優れ^{5, 6)}、メラニン生成抑制作用^{7, 8)} などが認められているため、基礎化粧品や養毛剤等に広く用いられている。さらに、ある種の癌細胞を分化させたり、アポトーシスを引き起こしたりすることや、ヒノキチオールの基本骨格であるトロポロンの誘導体が抗腫瘍活性を持つことなどが数多く報告されている。しかし、これまでヒノキチオールが蛋白質の誘導合成に関与したり、特定の転写因子に作用したりするといった報告はほとんどなく、その MT プロモーター活性化機序に興味を持たれる。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。

2. 実 験

2・1 細 胞

マウス線維芽細胞株の Ltk-細胞、およびマウス MT-I プロモーター (MT-I 遺伝子の転写開始点から 1400bp 上



Induction of synthesis of metallothionein, a photoprotection protein, by hinokitiol

Akira Naganuma

Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku University

流までの領域)の下流に lacZ 遺伝子を連結したプラスミド 41) を Ltk-細胞に導入して得られた安定形質転換体である L13-17 細胞を実験に用いた)。

2・2 メタロチオネインの定量

細胞の超音波破砕液を沸騰水浴中で 5 分間加熱して得た上清を ammonium 7-fluorobenz-2-oxa-1,3-diazole-sulfonate (SBD-F) と反応させて MT の SH 基を SBD 蛍光標識した。この反応液中の MT 濃度を蛍光検出高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 法⁹⁾ により定量した。

2・3 リポータージーンアッセイ

種々の長さのマウス MT-I プロモーターの下流に lacZ 遺伝子を連結したプラスミドと SV40 プロモーターの支配下でルシフェラーゼを発現するプラスミドを同時に Ltk-細胞に導入した。レポーター活性は、細胞抽出液に X-gal を加えて反応させた後、マイクロプレートリーダーで 650nm の吸光度を測定して求めた。遺伝子の導入効率は細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定して求めた。

3. 結果と考察

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 (HT) の MT-I プロモーター活性化作用を検討したところ、80 μ M 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 (Fig. 1)。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 μ M 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 (Fig. 1)、ここに比較的低濃度のヒノキチオール (15, 25 μ M) を共存させることでそのピークが亜鉛の低濃度側に移動する現象が認められた (Fig. 2)。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 μ M のヒノキチオールと 40 μ M の亜鉛の共存により、200 μ M 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 (Fig. 2)、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。しかし、ヒノキチオールは亜鉛処理によって得られる最大のプロモーター活性をさらに亢進させることはなかった (Fig. 2)。

次に、L13-17 細胞を用いた検討で見い出されたこれらの現象が実際の MT の合成誘導に反映するか否かを L13-17 細胞の親株である Ltk-細胞を用いて検討した。その結果、MT mRNA レベルおよび細胞内 MT 量は共にヒノキチ奥ールの濃度依存的に増加することが明らかになった。さらに、亜鉛 (10-80 μ M) とヒノキチオール (15 μ M) を併用することによって MT mRNA レベルが劇的に上昇

することおよび亜鉛処理による細胞内 MT 量の増加のピークが、ヒノキチ奥ールの共存により低濃度側に移動することが明らかになった。従って、これまでの検討により明らかになったヒノキチ奥ールの MT プロモーター活性化作用およびヒノキチオールと亜鉛の併用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実際の MT mRNA レベルの上昇や MT 蛋白質量の増加に反映するものであることが明らかになった。

またこのとき、解糖系の酵素である GAPDH の mRNA レベルがヒノキチ奥ールの濃度依存的に上昇することが観察された。GAPDH は house keeping gene であり、生体試料中の特定の蛋白質および mRNA を定量する際の内部標準として広く用いられているが、場合によってはそのレベルが変動することがいくつか報告されている。特に培養

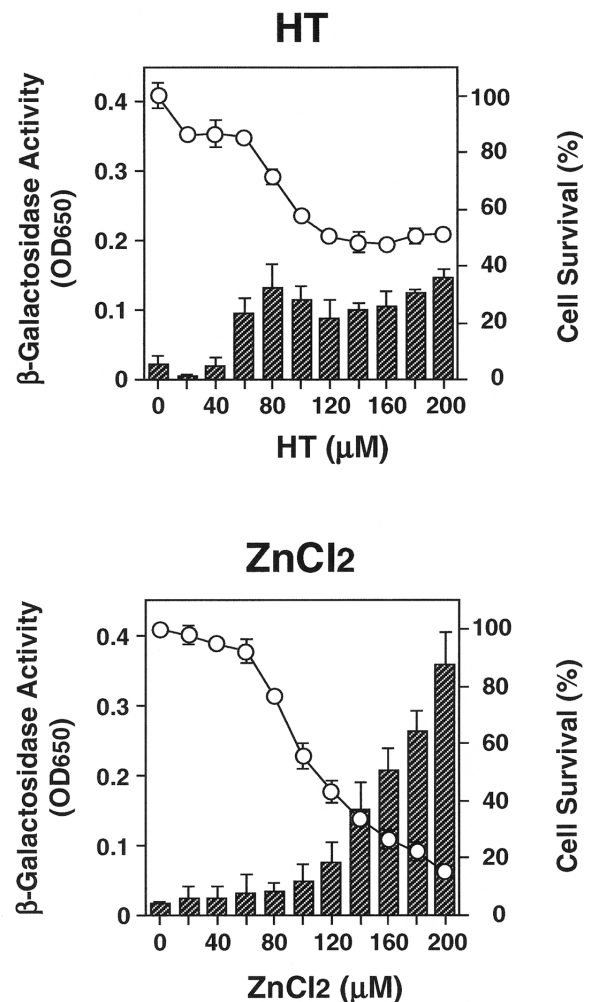


Figure 1 Effects of hinokitiol or ZnCl₂ on b-galactosidase activity and cell survival in L13-17 cells.

L13-17 cells (1×10^4 cells) were incubated for 24h in medium containing various concentrations hinokitiol (HT) or ZnCl₂. Then β -galactosidase activity (■) and cell survival (○) were determined. Values are the means $\pm$ SD from 4 samples. The results were confirmed three separate experiments.

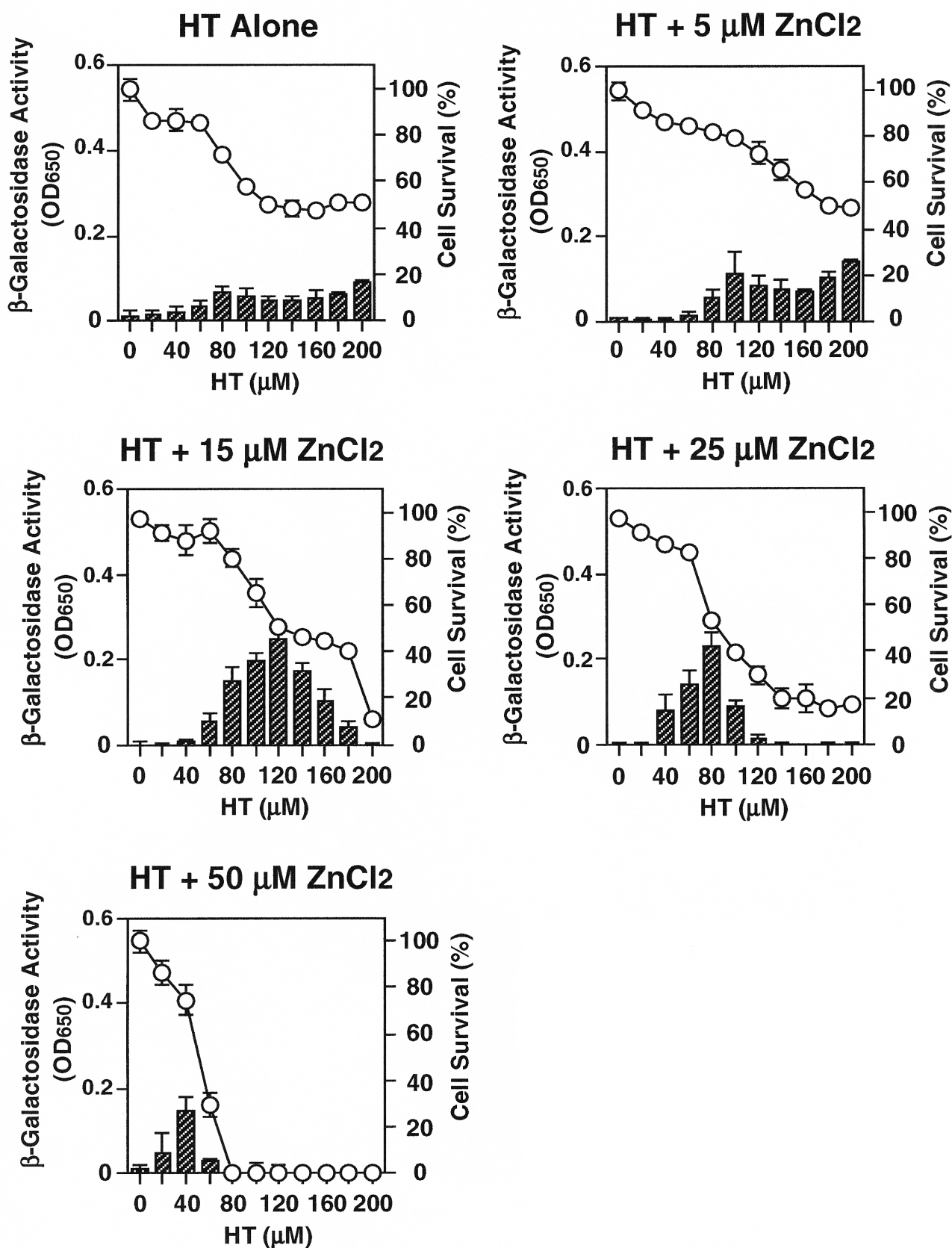


Figure 2 Effects of ZnCl₂ on β-galactosidase activity and cell survival in hinokitiol-treated L13-17 cells.

L13-17 cells (1×10^4 cells) were incubated for 24 h in medium containing various concentrations of hinokitiol (HT) with ZnCl₂. Then β-galactosidase activity (■) and cell survival (○) were determined. Values are the means $\pm$ SD from 4 samples. The results were confirmed three separate experiments.

細胞を低酸素条件下で培養することや低酸素状態をミックスすると考えられている遷移金属のコバルトや鉄キレーターの deferoxamine の存在下で培養することで GAPDH mRNA レベルが上昇するという報告が多くある。一方で、ヒノキチオールはその分子内に β -diketone 構造を持っておりキレーターとして働くことが知られている。その金属錯塩の形成能は $\text{Cu (II)} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Zn}$ の順であり、またヒノキチオールの母核である tropolone の場合も、一般の β -diketone の場合と同様に、 $\text{Cu (II)} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cd} > \text{Fe (II)} > \text{Mn (II)} > \text{Mg} > \text{Ca}$ の順である¹⁰⁾。ヒノキチオールが赤色の鉄錯体である hinokitin から単離精製されたことからわかるように、ヒノキチオールは鉄ともキレートを形成する。そのためヒノキチオールが deferoxamine と同様の機構により GAPDH mRNA レベルを上昇させることも考えられる。最近、低酸素条件下で細胞を培養すると MTF-1/MRE 系を介して MT が誘導されるという報告¹¹⁾ がなされているため、ヒノキチオールが MT プロモーター活性化する機構の一つとして、ヒノキチオールが低酸素状態をミックスし、その低酸素ストレスにより MT プロモーターが活性化されるという可能性も考えられる。しかし、どうして鉄キレーターが GAPDH を誘導させるのか、鉄キレーターが本当に低酸素状態をミックスしているのかといった点に関しては未だ明らかにされていない。

一方、本研究によってヒノキチオールの共存により亜鉛による MT プロモーター活性化のピークが移動し、より低濃度の亜鉛で最大のプロモーター活性が得られるようになるという興味深い現象が起きることが明らかになった。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、MT プロモーターの -150bp から -135bp の領域にヒノキチオールの応答領域の一つが存在すると考えられた。この領域には亜鉛やカドミウムなどの重金属に加え、過酸化水素や低酸素ストレスといった重金属以外の刺激による MT の誘導にも必須

のエLEMENTである MRE の一つ、MREd が存在している。この MREd はマウス MT プロモーター上に存在する 6 つの MRE の中で、亜鉛で処理した場合最も高い転写活性化能を示すELEMENTである。また、この MREd が欠失している変異体 (-135 - -1) にもわずかにヒノキチオール応答能があったが、MREd とその下流の MREc を欠失した変異体 (-117 - -1) ではヒノキチオールに対する応答が全く無かったため、MREc も弱いながらヒノキチオール応答ELEMENTとして働いていることが示唆された。

さらに TATA box 領域から MREd までの MT プロモーターを 3' 側から短くすると、最も転写開始点に近い MRE である MREa を欠失ただけで著しいプロモーター活性の減少が認められた。しかし、MREd と MREc を欠失させた場合と異なり、ヒノキチオールに対する応答の完全な消失は認められなかった。従って、MREa には MREd と MREc によるヒノキチオール応答を増強するはたらきがあると考えられる。

また以上のリポータージーンアッセイすべてに渡って、ヒノキチオール処理群と亜鉛処理群のリポーター活性はプロモーターの欠失に対しほぼ同様の変動パターンを示した。このことから、ヒノキチオールは最終的には亜鉛と同一の作用点、つまり 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。ヒノキチオールと亜鉛の併用によっても、亜鉛によって得られる最大のプロモーター活性を越えるような活性が得られなかったことも、このようにヒノキチオールと亜鉛の作用点が同一であると考えたと説明できるものと思われる。

ほ乳類の MT の誘導において亜鉛は特別の役割があると考えられている。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亜鉛、カドミウム、ニッケル、銀、銅、コバルトといった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¹²⁾。つまり、亜鉛だけが MTF-1 に直接作用して MTF-1 の MRE への結合活性を促進し、MT プロモーターを活性化するのであり、亜鉛以外の重金属は亜鉛の redistribution を介して間接的に MTF-1/MRE に作用するか、カドミウムのように MRE 以外の cis- ELEMENT にも作用することで MT プロモーターを活性化すると考えられている。

先の結果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。そこで次に、ヒノキチオールによる MT プロモーター活性化における亜鉛の影響を検討した。細胞培養に使用した培地には通常、約 $4 \mu\text{M}$ の亜鉛が含まれており、この亜鉛は

全て血清由来だと考えられる。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、この無血清培地に亜鉛を添加して通常の半分量に当たる $2\mu\text{M}$ 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。

4. まとめ

本研究の結果、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。

(文献)

- 1) Webb, M., :The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium. Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, 196-266, 1979.
- 2) Angel, P., Potting, A., Mallick, U., et al. :Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 1760-1766, 1986.
- 3) Nozoe, T., :Über die Farbstoffe im Holzteil des "Hinoki"-Baumes. I. Hinokitin und hinokitiol, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 11, 295-298, 1936.
- 4) Kubo, M., Nozoe, T. and Kurita, U., :Dipole moments of tropolone and related compounds, *Nature*, 167, 688-689, 1951.
- 5) Miyamoto, D. et al., :Thujapulicin-copper chelates inhibit replication of human influenza viruses, *Antiviral Res.*, 39, 89-100, 1998.
- 6) Akiyama, H., Yamasaki, O., Kanzaki, H., et al. :Effects of zinc oxide on the attachment of *Staphylococcus aureus* strains, *J. Dermatol. Sci.*, 17, 67-74, 1998.
- 7) Baba, T., et al. :Inhibitory effect of beta-thujapulicin on ultraviolet B-induced apoptosis in mouse keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 110, 24-28, 1998.
- 8) Sakuma, K., Ogawa, M., Sugibayashi, K., et al. :Relationship between tyrosinase inhibitory action and oxidation-reduction potential of cosmetic whitening ingredients and phenol derivatives, *Arch. Pharm. Res.*, 22, 335-339, 1999.
- 9) Miyairi, S., Shibata, S., and Naganuma, A., :Determination of metallothionein by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using an isocratic solvent system, *Analytical Biochemistry* 258, 168-175, 1998.
- 10) 野副鐵男, :トロポロン (II), *化学*, 7, 344-351, 1952.
- 11) Murphy, B.J., Andrews, G.K., Bittel, D., et al. :Activation of metallothionein gene expression by hypoxia involves metal response elements and metal transcription factor-1, *Cancer Res.* 59, 1315-1322, 1999.
- 12) Bittel, D., Dalton, T., Samson, S.L.A., et al. :The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated in vivo and in vitro by zinc, but not by other transition metals, *J. Biol. Chem.*, 273, 7127-7133, 1998.