

る亜ヒ酸感受性の増大と PKC MAPK cascade の関連を PKC MAPK cascade の構成因子の欠損株を用いて検討したところ、*bck1* Δ 、*mpk1* Δ (Fig. 6-1aB)、*rom2* Δ (Fig. 6-1bC)は、亜ヒ酸に対して高い感受性を示した。また、*mkk1* Δ 、*mkk2* Δ (Fig. 6-1aB)、*wsc2* Δ 、*wsc3* Δ 、*wsc4* Δ (Fig. 6-2)は、正常細胞と比べて僅かに高い亜ヒ酸感受性を示したが、*mid2* Δ 、*lrg1* Δ の亜ヒ酸感受性は正常細胞とほぼ同程度であった (Fig. 6-1bA,B)。

PKC MAPK cascade によって発現が調節されている転写因子などがいくつか知られている。そこで、これら転写因子等を欠損させた酵母の亜ヒ酸感受性を検討したところ、kinase である Mck1 の欠損細胞 (*mck1* Δ) に高い亜ヒ酸感受性が認められた (Fig.

6-3aA)。また、転写因子である Swi4、Swi6、Rlm1 の欠損酵母も正常細胞に比べて僅かに高い感受性を示した (Fig. 6-3ab)。

これら欠損酵母にSlg1を高発現させたところ、*bck1* Δ はSlg1高発現の影響を示さなかった (Fig. 6-4B)。また、Bck1やMpk1よりもさらに下流の因子であるMck1の欠損細胞 (*mck1* Δ) は、Slg1高発現による僅かな亜ヒ酸耐性が認められた (Fig. 6-4C)。

本研究で明らかとなったSlg1関連因子と亜ヒ酸毒性との関係をFig. 7に要約した。

(5) Pbs2高発現による亜ヒ酸耐性獲得機構の解析

高発現によって酵母に亜ヒ酸耐性を与えることが判明したもう一つの因子Pbs2は HOG MAPK cascadeの構成因子である (Fig.

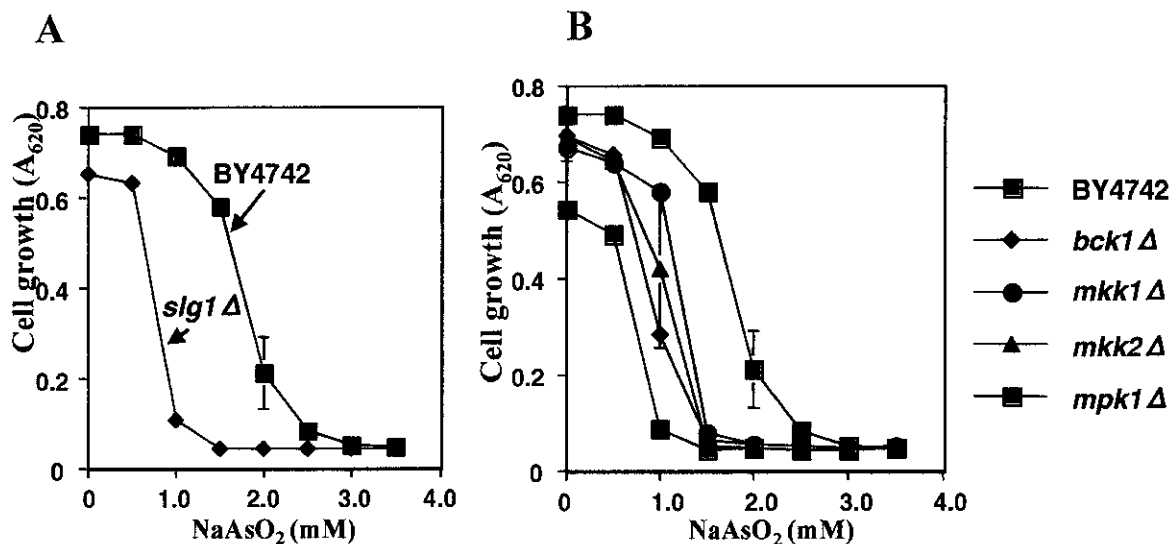


Fig. 6-1a PKC MAPK cascade 上流因子欠損酵母の As (III)存在下における生存曲線

8)。このcascadeは、PKC MAPK cascadeとは異なり、浸透圧ストレスによってのみ活性化することが報告されている。このPbs2を欠損した細胞 (*pbs2*Δ) の亜ヒ酸感受性を調べたところ、*pbs2*Δは顕著に高い亜ヒ酸感受性を示した (Fig. 9-1aA)。これらの現象とHOG MAPK cascadeとの関係をHOG MAPK cascadeの構成因子の欠損株を用いて検討したところ、*SSK1*、*SSK2*、*HOG1*の欠損酵母は亜ヒ酸に対して高い感受性を示した (Fig. 9-1aC,D)。また、*SHO1*、*STE11*、*SSK22*の欠損酵母は正常酵母と比べて僅かに高い亜ヒ酸感受性を示したが (Fig. 9-1aB,C)、*PTP2*、*PTP3*、*PTC1*の欠損酵母の亜ヒ酸感受性は正常酵母とほぼ同程度であった (Fig. 9-1b)。一方、HOG MAPK cascadeの下流に位置すると考えられている転写因子の中では、*SKO1*、カタラーゼ *CTT1*、グリセロールの合成に関与する因子*DOG2*など今回調べたほとんどの因子の欠損酵母株が高い亜ヒ酸感受性を示した (Fig. 9-2)。また、Pbs2の上流因子である*SSK1*、*SHO1*、*STE11*の欠損酵母にPbs2を高発現させたところ、明らかな亜ヒ酸耐性が観察された (Fig. 9-3B,C,D)が、直下流の因子である*hog1*Δでは、Pbs2高発現による亜ヒ酸耐性は認められなかった (Fig. 9-3E)。しかし、さらに下流の因子である*sko1*Δでは、Pbs2高発現による亜ヒ酸耐性が観察された (Fig. 9-3F)。

本研究で明らかとなったPbs2関連因子と亜ヒ酸毒性との関係をFig. 10に要約した。

D. 結論

本研究によって、酵母における亜ヒ酸耐性に関わる因子として、浸透圧ストレス防御に関与するMAPKKであるPbs2、および、細胞壁へのストレスに対する防御因子Slg1を同定した。ここで得られた2つの因子はともに、外界からのストレスに応答して細胞内でストレスを伝える因子であることが知られているが、それぞれのシグナル伝達経路が亜ヒ酸耐性に関与することも判明した。これらの結果は、生体がヒ素を感知し、その毒性を防御するためのシグナルを伝える特有の経路を持つ可能性を示すものであると考えられる。これまで、哺乳動物細胞を用いた検討から、MAP kinaseを含むシグナル伝達経路の活性化は、アポトーシス誘導などヒ素の毒性発現の一部であると考えられてきた。しかし本研究によって、MAP kinase を含むシグナル伝達経路が、少なくとも酵母では亜ヒ酸の毒性に対して防御的に働いていることが初めて示された。哺乳類において、MAPKは細胞内シグナル伝達を担う代表的な分子の一つであり、様々な生理機能を有しているゆえに、そのcascadeは大変複雑であり、詳細に関しては、まだまだ未解明な部分も多い。従って、哺乳類においてもヒ素に対して防御的に働く

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

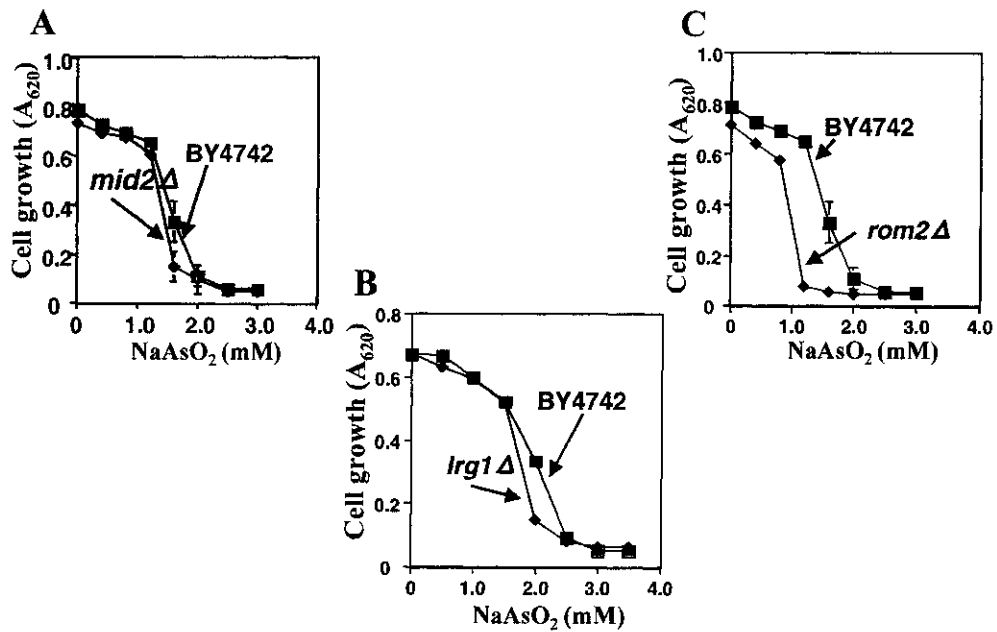


Fig. 6-1b PKC MAPK cascade 上流因子欠損酵母の As (III)存在下における生存曲線

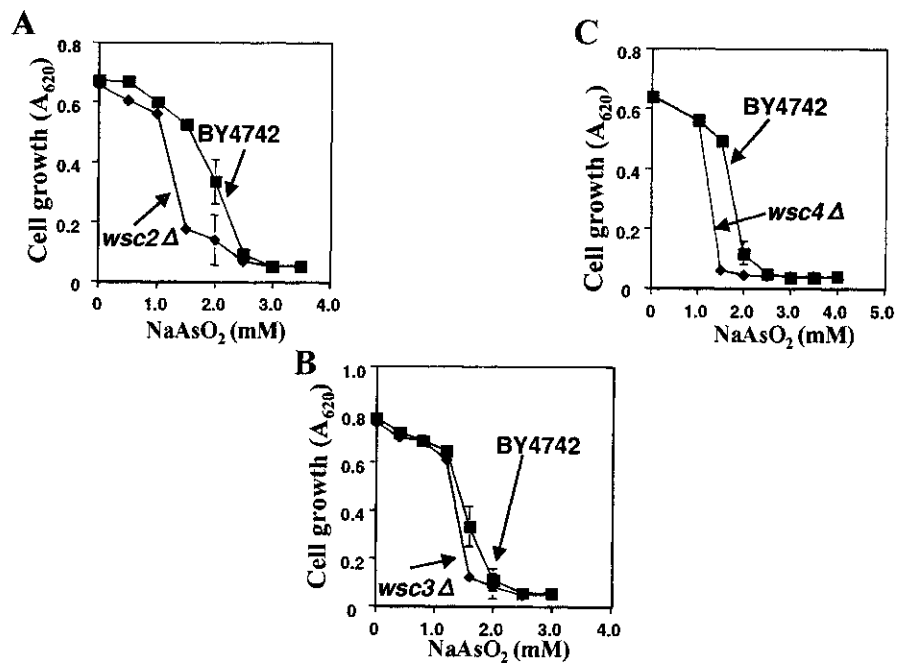


Fig. 6-2 Wsc family欠損酵母の As (III)存在下における生存曲線

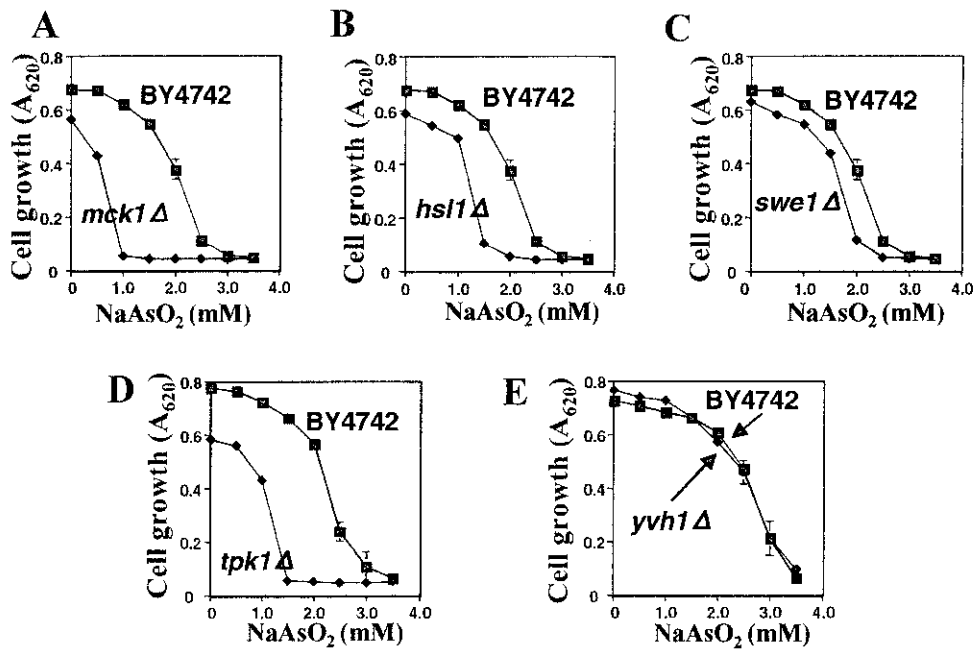


Fig. 6-3a PKC MAPK cascade 下流因子欠損酵母の As (III)存在下における生存曲線

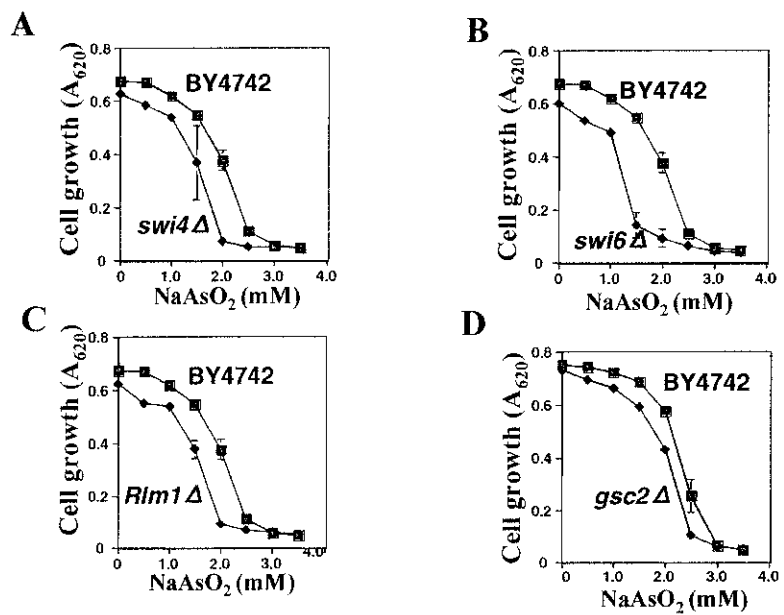


Fig. 6-3b PKC MAPK cascade 下流因子欠損酵母の As (III)存在下における生存曲線

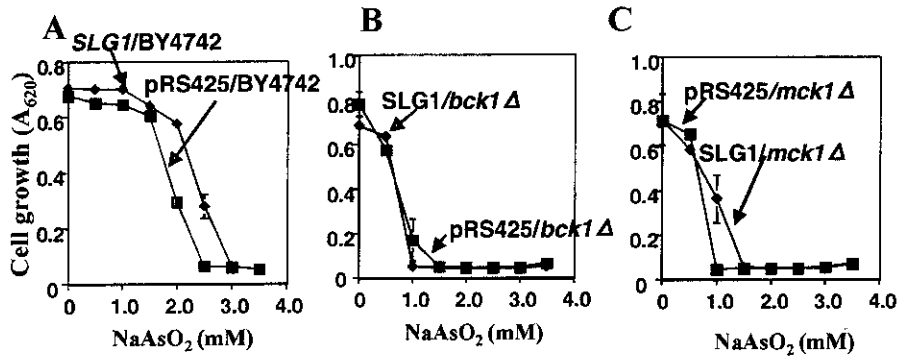


Fig. 6-4 PKC MAPK cascade 構成因子欠損酵母に *SLG1*を高発現させた際のAs (III)存在下における生存曲線

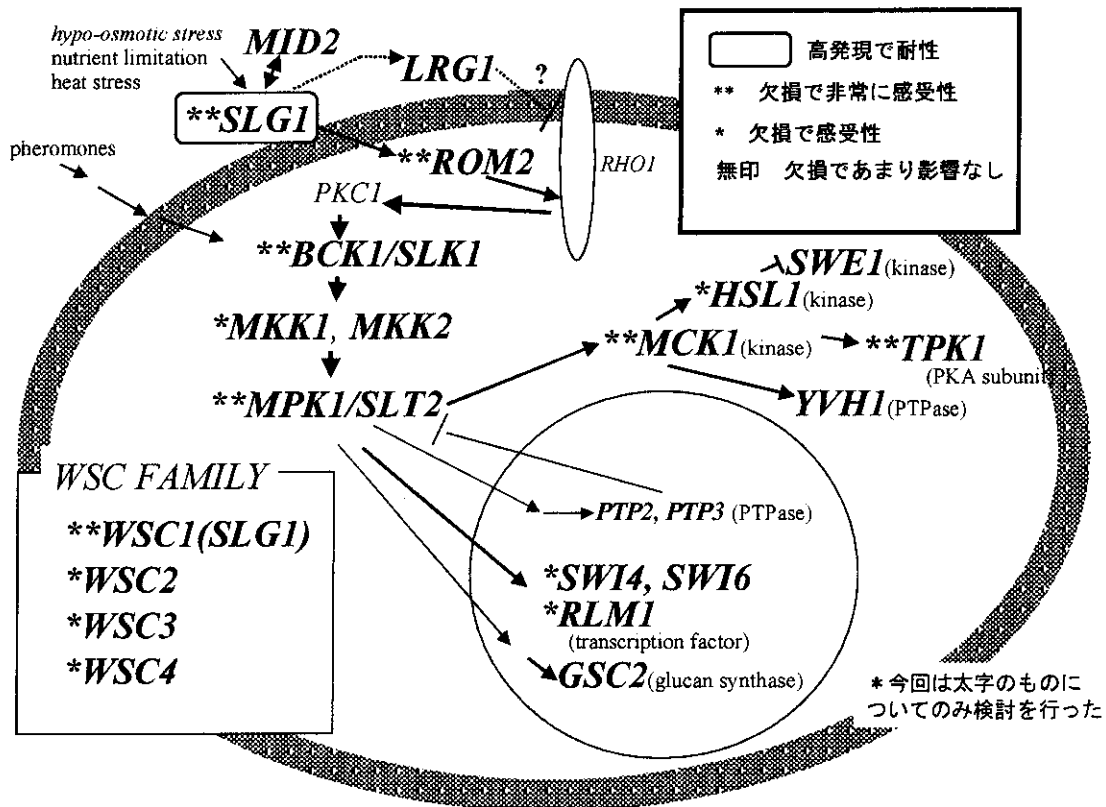


Fig. 7 PKC MAPK cascade

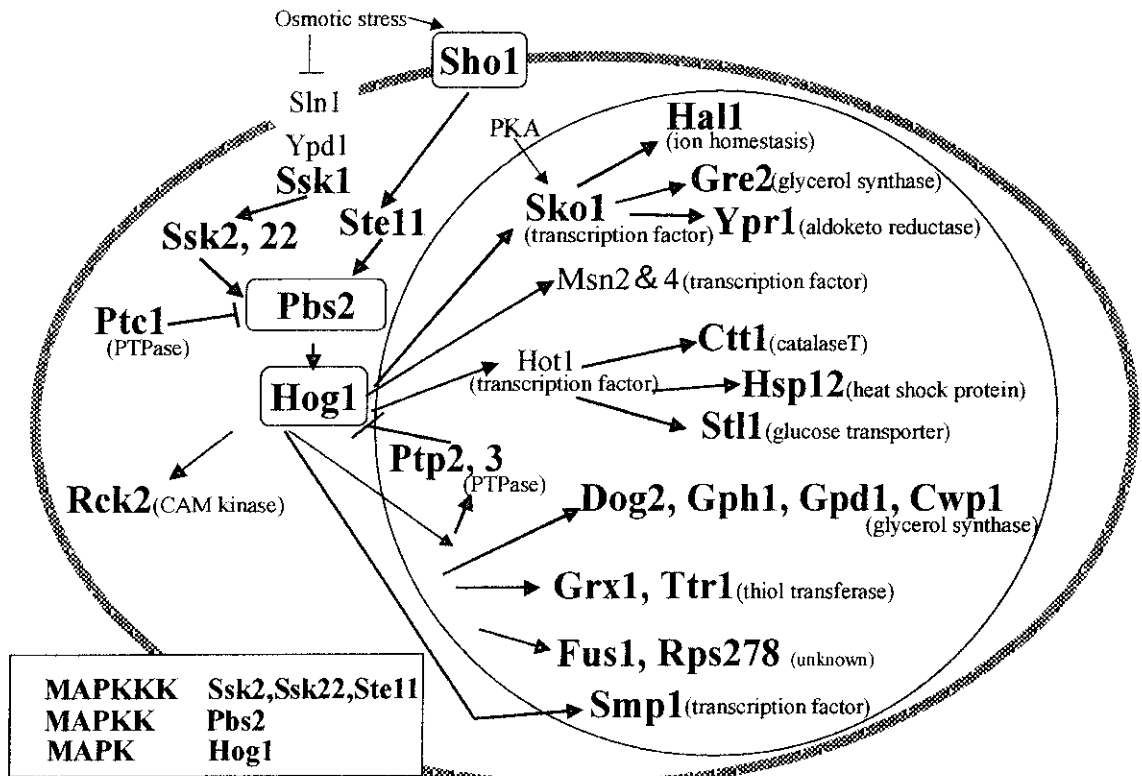


Fig. 8 HOG MAPK cascade

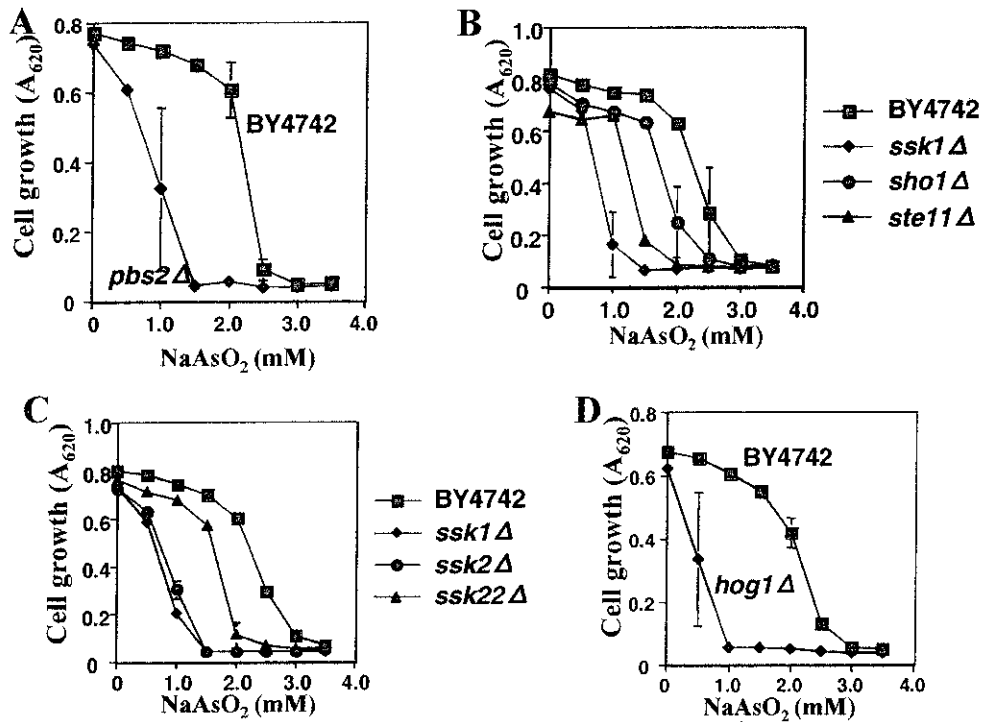


Fig. 9-1a HOG MAPK cascade 上流因子欠損酵母の As (III)存在下における生存曲線

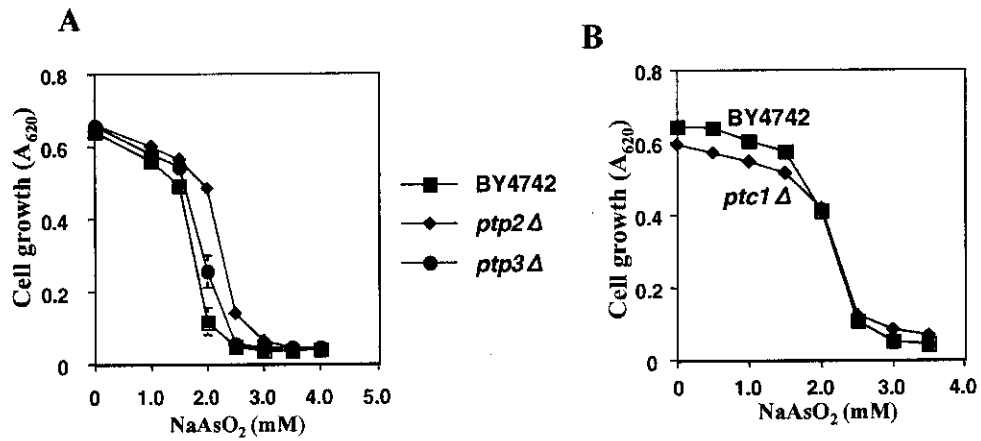


Fig. 9-1b HOG MAPK cascade 上流因子欠損酵母の
As (III)存在下における生存曲線

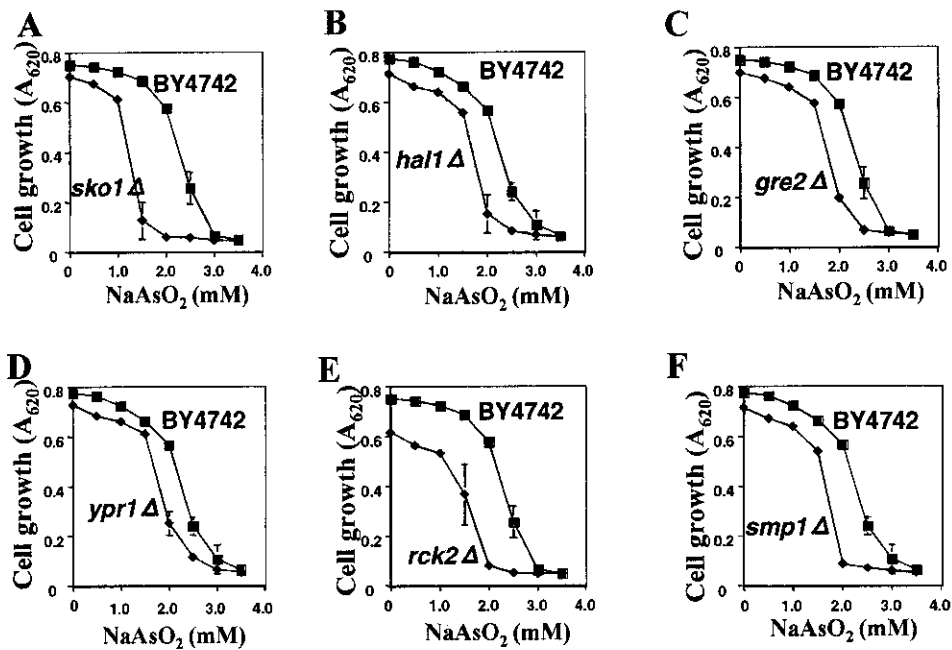


Fig. 9-2a HOG MAPK cascade 下流因子欠損酵母の
As (III)存在下における生存曲線

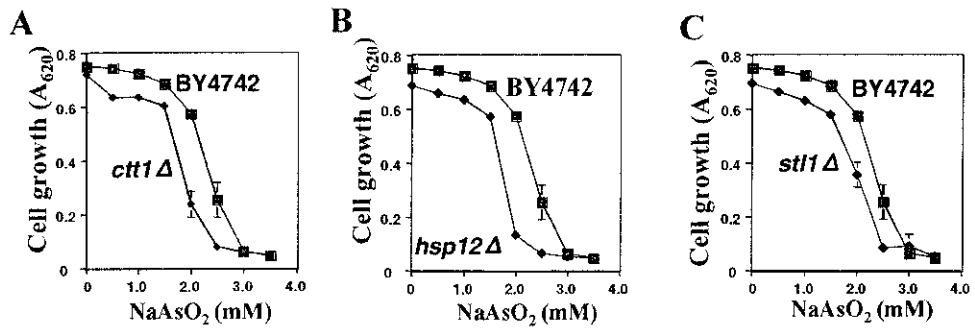


Fig.9-2b HOG MAPK cascade 下流因子欠損酵母の
As (III)存在下における生存曲線

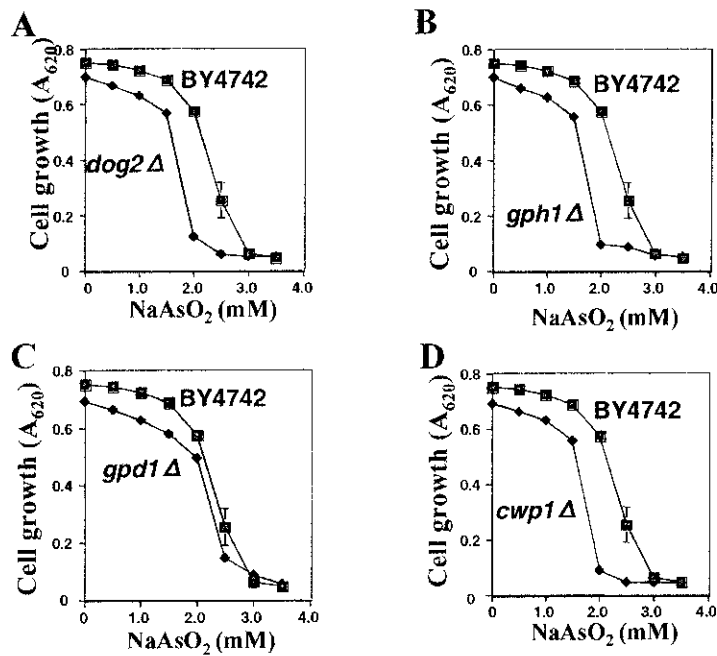


Fig.9-2c HOG MAPK cascade 下流因子欠損酵母の
As (III)存在下における生存曲線

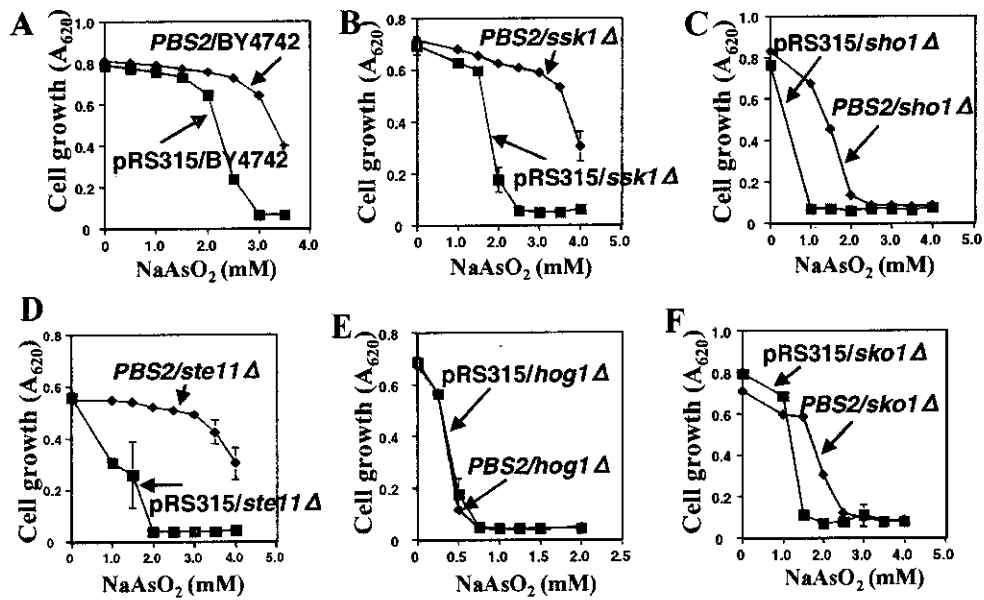


Fig. 9-3 HOG MAPK cascade 構成因子欠損酵母に *PBS2*を高発現させた際のAs (III)存在下における生存曲線

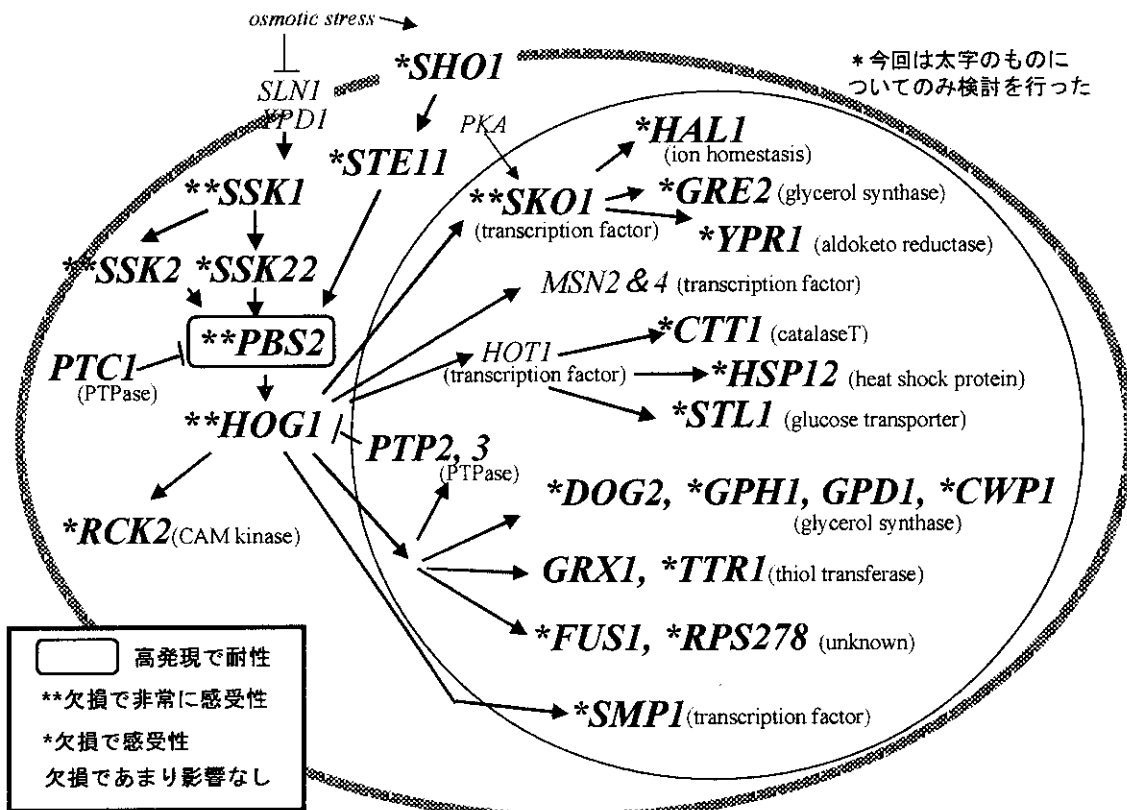


Fig. 10 HOG MAPK cascade

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 1. 論文発表 | グナル伝達機構の解明. 日本薬学会第 |
| なし。 | 123年会, 2003. |
| 2. 学会発表 | |
| 大谷朋子、大橋一品、永沼 章: 出芽 | G. 知的財産権の出願・登録状況 |
| 酵母において亜ヒ酸耐性に関わるシ | なし。 |

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
（分担）研究報告書

カドミウムに対する感受性決定因子メタロチオネインの遺伝子多型

分担研究者 久下周佐 東北大学大学院薬学研究科助教授
（協力研究者 北 加代子 日本食品衛生協会リサーチレジデント）

メタロチオネイン（MT）はカドミウム（Cd）などの重金属によってその合成が誘導され、さらにこれら重金属と強固に結合して毒性の発現を抑える生体防御蛋白質の一つである。近年、日本人の中に腎臓中メタロチオネイン濃度が非常に低い値を示す中高年者が存在することが判明した¹⁾。これらの人々は遺伝的にメタロチオネイン合成に何らかの異常がある可能性も考えられる。そこで本研究では、メタロチオネイン合成異常の原因として遺伝子変異に着目し、MT遺伝子のプロモーター領域と翻訳領域の変異をsingle-stranded conformation polymorphism（SSCP）法により検索した。その結果、プロモーター部の転写開始点から上流5塩基目にアデニンからグアニンへの一塩基置換のあることが明らかとなった。また、メタロチオネインの翻訳領域においてもエクソン3のコードン42番目のアミノ酸であるアラニンのバリンへの変異が認められた。一方、メタロチオネイン遺伝子の発現誘導に関わる転写因子MTF-1の遺伝子翻訳領域における遺伝子変異の検索を行ったところ、エクソン8中にアデニンからグアニンへの一塩基置換が1ヶ所認められたが本変異はアミノ酸置換を伴うものではなかった。今回見出されたメタロチオネイン遺伝子の多型が細胞増殖やカドミウム毒性感受性に及ぼす影響について今後検討することによって、その意義を明確にしていく予定である。

A. 研究目的

メタロチオネイン（MT）は構成アミノ酸の約1/3をシステインが占め、しかもS-S結合を一つも持たないというユニークな特徴を有する生体防御蛋白質であり、組織中でカドミウムなどの有害重金属と強固に結合してその毒性の発現を抑制する。カドミウムは穀類中に比較的高濃度に存在するため、米類を多食する日本人は欧米人に比べて組織中カドミウム濃度が高い。カドミ

ウム毒性の主要標的組織は腎臓であるが、日本人の腎臓中に蓄積しているカドミウムはそのほとんどがメタロチオネインに結合して存在しており、一般成人の腎臓中に蓄積しているカドミウムの濃度はメタロチオネイン遺伝子を欠損させたマウスを死に至らす濃度の数倍にもものぼる。したがってマウスと人間の種差を無視すれば、メタロチオネインは日本人の生存に不可欠な蛋白質と考えることができる。

このようなことから、本研究申請者らは日本人腎臓中のメタロチオネイン濃度を測定したところ、その濃度が高いグループと低いグループの2群に分類され、しかもこの分類は腎臓中のカドミウム蓄積量には無関係であることを見いだした。この事実は、日本人の中にメタロチオネイン濃度が低く、カドミウムによる障害を受けやすいと考えられる一群が存在する可能性を強く示唆している。腎臓機能障害は日本人に比較的多い疾患であるが、その原因の一つにメタロチオネインの合成異常によるカドミウム障害の発現が含まれる可能性も否定できない。

そこで本研究は、日本人におけるメタロチオネイン合成異常者の存在を明らかにし、そのメカニズムを解明すると共に、腎臓機能障害の発症とメタロチオネイン合成異常との関係を検討し、さらに、メタロチオネイン合成異常の診断方法を確立することを目的とする。具体的な本研究の達成目標は以下の通りである。①メタロチオネイン合成異常が生じる原因として遺伝子の異常が考えられることから、まず、メタロチオネイン濃度が低いグループに分類される人々の腎臓組織中のメタロチオネイン遺伝子およびそのプロモーター領域における塩基配列の異常を調べ、検出された異常の中からメタロチオネイン蛋白質の合成量低下を引き起こす遺伝子異常を特定する。②その遺伝子異常がメタロチオネイン蛋白質の合成量を低下させる理由を分子生物学的に検討し、その機構を解明する。③腎臓機能障害患者中でメタロチオネイン遺伝子に異常が認められる患者の割合を調べると共に、動物実験によって腎臓機能障害の発症原因としてのメタロチオネイン遺伝子異常と腎臓中カ

ドミウムの意義を明らかにする。④末梢白血球を試料としたメタロチオネイン遺伝子異常の診断法を確立する。

B. 研究方法

1. DNAの調製

東北大学医学研究科倫理委員会による承認事項に基づいて同意を得た119名の健常人から血液を採取し、実験に用いた。ヘパリン存在下で採取した血液5mlを100×gで5分間遠心し、血清を除去後、血液量の5倍量の0.2% NaClを加え転倒混和し、600×gで5分間遠心した後に、上層を除去し、白血球の沈殿を得た。白血球の沈殿が白くなるまでこの操作を繰り返した後、-80℃で凍結し、残存した赤血球を破壊した。室温で融解後、少量の0.2% NaClに懸濁し、600×g、5分間遠心して、上清を除去後、250μlの0.2% NaClで懸濁した白血球に500μlのSEを加えてさらに懸濁した。次に1/200容量の20mg/ml proteinase Kを加えて、37℃で12時間反応後、等量のPCIを加え、室温で10分間振盪後、800×gで室温15分間遠心した。PCI処理を2回行って得られた水層に1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH 5.2)および2倍量のエタノールを加え攪拌し、-80℃で20分間放置して、20,000×gで10分間遠心分離しDNAの沈殿を得た。この沈殿を70%エタノールでリンス後250μlのTEを加え、DNAを溶解した。DNA溶液に250μlのSEと1/1,000容量の10mg/ml RNase Aを加え37℃で2時間処理しRNAを分解後、上記の手順でPCI処理2回、CIA処理1回を行い、DNAを精製した。

2. ヒトメタロチオネイン遺伝子のプロモーター領域の PCR 増幅

5 つの MRE および転写開始点を含む hMT-IIA プロモーター領域 (222 bp; Fig. 1) を PCR により増幅した。PCR 用の 0.5 ml チューブに 200 ng、10 x PCR buffer (10 μ l)、2 mM dNTP (10 μ l)、DMSO (10 μ l)、100 μ M forward primer (1 μ l)、100 μ M reverse primer (1 μ l) および 5 U/ μ l amply Taq Gold (0.5 μ l) を加えて全量が 100 μ l になるよう molecular grade water で調製した。PCR 反応は 95°C で 10 分間加熱して Taq Gold DNA ポリメラーゼを活性化した後、96°C/30 秒、61°C/30 秒、72°C/30 秒の増幅反応を 30 サイクル行った。PCR 産物は High Pure PCR Product Purification Kit を使用して未反応の dNTP や primer を除去後、一本鎖 DNA 高次構造多型 (single-stranded conformation polymorphism: SSCP) 分析に使用した。

3. 一本鎖 DNA 高次構造多型 (SSCP) 法による遺伝子異常の検出

精製した PCR 産物 8 μ l に対して 15 μ l の F-dye (95 %ホルムアミド、10 mM EDTA (pH7.5)、0.05 % bromophenol blue、0.05 % xylen cyanol) 溶液を加え全量を 23 μ l とし、沸騰水浴中で 5 分間煮沸後、氷上で急冷し二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に変性させ、SSCP 分析を行った。即ち、煮沸変性した DNA を、10 % (w/v) ポリアクリルアミドゲル (30 %アクリルアミド液 (acrylamide : bisacrylamide = 99:1 または 49:1)、0.5 x TBE buffer (43 mM Tris-borate (pH8.0)、1 mM EDTA) 中で 200 V 定電圧でおおよそ 90 分間泳動した。泳動時の温度は低温 (9~12°C) と室温 (20~25°C) の 2 条件で行った。な

おアクリルアミド溶液 15 ml は 0.22 μ m のフィルターで濾過した後、10 % (w/v) 過硫酸アンモニウム (APS) (150 μ l) および *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediammonium (TEMED) (15 μ l) を加えてよく混合し、ゲル板 (8.5 cm x 16 cm) の間に流し込み重合させた。泳動 buffer には 0.5 x TBE buffer を用いた。泳動終了後、PlusOne[®]DNA Silver Staining Kit で銀染色し、バンドを検出した。

4. 塩基配列異常部位の同定

変異パターンを示した PCR 産物の塩基配列を direct sequence 法により決定した。まず、遺伝子増幅に使用したプライマー 10 pmol に 1 μ l の 10 x T4 polynucleotide kinase buffer、5 U の T4 polynucleotide kinase、1.295 MBq [γ -³²P] ATP を加え molecular grade water で 10 μ l に調製後、37°C、30 分間反応することによって ³²P 標識した。95°C で 5 分間反応して酵素を失活させた後、10 μ l の molecular grade water を加え全量を 20 μ l とし、1 μ l を cycle sequencing 反応に使用した。

Cycle sequencing 反応液は、精製した PCR 産物を 350 fmol になるよう調製し、2 μ l の reaction buffer、1 μ l の標識 primer および 2 μ l の Thermo sequenase DNA polymerase を加え molecular grade water で 17.5 μ l に調製した。次にこの反応液 4 μ l をあらかじめ各 ddNTP を 4 μ l ずつ分注しておいたチューブに分け、95°C で 5 分間熱変性した後、96°C/30 秒、61°C/30 秒、72°C/30 秒の cycle sequencing 反応を 25 サイクル行った。反応終了後、4 μ l の stop solution を加えてよく混和し、95°C で 3 分間熱変性させ、氷上で急冷した反応液 3 μ l を 6 % (w/v) の変

性ポリアクリルアミドゲル (7 M urea、15.0 % (w/v) Super Reading DNA Sequence Solution、1 x TBE buffer (89 mM Tris-borate (pH8.0), 2 mM EDTA, 10 % (w/v) APS (350 μ l), TEMED (35 μ l)) 中で 80 W、75 分間泳動した。泳動 buffer には 1 x TBE buffer を用いた。泳動終了後、ゲルを乾燥させ、Scientific Imaging Film (Kodak) に露光してオートラディオグラフィーでバンドを検出し、塩基配列の異常部位を同定した。

5. 制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism : RFLP) 法による塩基配列異常の検索

上記の direct sequence 法で塩基配列に変異が認められた部位を含む領域 (241 bp) を下記に示した primer を用いて増幅した。PCR 用の 0.5 ml チューブに白血球から抽出したゲノム DNA 200 ng、10 x PCR buffer (5 μ l)、2 mM dNTP (5 μ l)、100 μ M forward primer (0.5 μ l)、100 μ M reverse primer (0.5 μ l) および 5 U/ μ l Taq Gold (0.25 μ l) を加えて全量が 50 μ l になるよう molecular grade water で調整した。PCR 反応は 95°C で 10 分間熱変性した後、96°C/30 秒、60°C/30 秒、72°C/30 秒の増幅反応を 30 サイクル行った。PCR 産物は High Pure PCR Product Purification Kit を使用して未反応の dNTP や primer を除去後、RFLP 分析に使用した。

精製した PCR 産物 5 μ l に 1 μ l の 10 x NEB buffer-4 (50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9)) および 0.75 U の BsgI を加え、molecular grade water で全量 10 μ l に調整し、37°C で 90 分間反応させた。反応後 2.5 μ l の 5 x gel loading buffer (1 x TAE,

20 % ficoll 400, 0.05 % bromophenol blue, 0.05 % xylene cyanol)を加え、10 % (w/v) ポリアクリルアミドゲル (30 %アクリルアミド液 (acrylamide : bisacrylamide = 99 : 1 または 49 : 1), 0.5 x TBE, 10 % (w/v) APS 150 μ l, TEMED 15 μ l) 中で 200 V 定電圧でおよそ 90 分間泳動した。泳動 buffer には 0.5 x TBE buffer を用いた。泳動終了後、エチジウムブロマイドで DNA を染色した。

hMT-IIA pro-F4 primer : 5'-
CGCCTGGAGCCCGCAAGTGAC-3'

hMT-IIA exon 1-R primer : 5'-
TGGGCATCCCCAGCCTCTTA-3'

6. ヒトメタロチオネイン遺伝子の翻訳領域の PCR 増幅

hMT-IIA 遺伝子の翻訳領域は 3 つのエクソンから成る。この hMT-IIA 翻訳領域を増幅するために、以下に記したプライマーを作製し、PCR 反応を行った。PCR 用の 0.5 ml チューブに白血球から抽出したゲノム DNA 200 ng、10 x PCR buffer (10 μ l)、2 mM dNTP (10 μ l) 100 μ M forward primer (1 μ l)、100 μ M reverse primer (1 μ l) および 5 U/ μ l Taq Gold (0.5 μ l) を加えて全量が 100 μ l になるよう molecular grade water で調整した。PCR 反応は 95°C で 10 分間熱変性した後、96°C で 30 秒、各アニーリング温度 (exon 1 : 54°C, exon 2 : 59°C, exon 3 : 54°C) で 30 秒、72°C で 30 秒の増幅反応を 30 サイクル行った。PCR 反応により、エクソン 1 は 141 bp、エクソン 2 は 259 bp およびエクソン 3 は 180 bp を増幅した。PCR 産物は High Pure PCR Product Purification Kit を使用して未反応の dNTP や primer を除去後、SSCP 分析に使用した。

エクソン 1

・ hMT-IIA exon 1-F primer : 5'-
TGCTTGCCGCGCTGCACTCC-3'

・ hMT-IIA exon 1-R primer : 5'-
TGGGCATCCCCAGCCTCTTA-3'

エクソン 2

・ hMT-IIA exon 2-F primer : 5'-
TGCTCAAGTTCCCAGGAATC-3'

・ hMT-IIA exon 2-R primer : 5'-
CTTTAATTCCCCTGAGGATG-3'

エクソン 3

・ hMT-IIA exon 3-F primer : 5'-
TCCCGGTGTCGCTAGTACTC-3'

・ hMT-IIA exon 3-R primer : 5'-
AAGTCGCGTTCTTTACATCT-3'

7. アレル特異的 PCR

変異部位が 3' 端となるようにデザインした変異アレル特異的なプライマーと野生型アレル特異的なプライマーを作製し、アレル特異的 PCR を行った。なお、この方法は PCR プライマーの 3' 端に鋳型 DNA に対して一塩基のミスマッチがあった場合、DNA ポリメラーゼが働かず DNA の増幅が起こらないことを利用している。下記に示した野生型と変異型のプライマーを用い、4 通りのプライマーの組み合わせの条件で増幅した。A の条件ではプロモーターおよびエクソン 3 の両方が野生型アレルであった場合増幅される。また B の条件ではプロモーターが変異型アレル、C の条件ではエクソン 3 が変異型アレル、そして D の条件ではプロモーターとエクソン 3 の両方が変異型アレルであった場合に増幅されるようにデザインした。PCR 用の 0.2 ml チューブに白血球から抽出したゲノム DNA 20

ng、10 x PCR buffer (1 μ l)、2 mM dNTP (1 μ l) 100 μ M forward primer (0.1 μ l)、100 μ M reverse primer (0.1 μ l) および 5 U/ μ l Taq Gold (0.05 μ l) を加えて全量が 10 μ l になるよう molecular grade water で調製した。PCR 反応は 95°C で 10 分間熱変性した後、96°C/30 秒、74 °C/30 秒、72°C/60 秒の増幅反応を 30 サイクル行った。反応後 2 %アガロースゲル電気泳動を行いエチジウムブロマイド染色した後、UV を照射し DNA を可視化した。

hMT-IIA -F(-5A) : 5'-

TAAACACTGCTTGCCGCGCTGCA-3'

hMT-IIA -R (-5C) : 5'-

GATGCAGCCCTGGGCACACTTGG-3'

hMT-IIA -F(-5g) : 5'-

TAAACACTGCTTGCCGCGCTGCg-3'

hMT-IIA -R (-5t) : 5'-

GATGCAGCCCTGGGCACACTTGa-3'

8. ヒト MTF-1 遺伝子の各エクソンの PCR 増幅

PCR 用の 0.5 ml チューブにヒト白血球から抽出したゲノム DNA 200 ng、10 x PCR buffer (10 μ l)、2 mM dNTP (10 μ l)、100 μ M forward primer (1 μ l)、100 μ M reverse primer (1 μ l) (それぞれ下記に示した) および 5 U/ μ l Taq Gold (0.5 μ l) を加えて全量が 100 μ l になるよう molecular grade water で調製した。PCR 反応は 95°C で 10 分間熱変性した後、96°C で 30 秒、各アニーリング温度 (exon 1, 2-1, 2-2, 6, 7, 9-1, 9-3 : 58°C, exon 3, 4, 9-2, 11-1, 11-2 : 61°C) で 30 秒、72°C で 30 秒の増幅反応を 30 サイクル行った。PCR 反応により、exon 1 は 101 bp、exon 2-1 は 259 bp、exon 2-2 は 266 bp、exon 3 は 239 bp、exon 4

は 132 bp、exon 5 は 74 bp、exon 6 は 137 bp、exon 7 は 78 bp、exon 8 は 103 bp、exon 9-1 は 236 bp、exon 9-2 は 266 bp、exon 9-3 は 290 bp、exon 10 は 64 bp、exon 11-1 は 282 bp および exon 11-2 は 292 bp を増幅した。PCR 産物は High Pure PCR Product Purification Kit を使用して未反応の dNTP や primer を除去後、SSCP 分析に使用した。

エクソン 1

• hMTF-1/Exon 1-F primer : 5'-AAGAGGAAGCGGAAGTGACG-3'

• hMTF-1/Exon 1-R2 primer : 5'-CTCCGCGGCTCCCGCAACG-3'

エクソン 2-1

• hMTF-1/Exon 2-F primer : 5'-ACAAGTCATTACGTTTTTCAT-3'

• hMTF-1/Exon 2-R primer : 5'-TTCTTTACGTTTTGTTTCCG-3'

エクソン 2-2

• hMTF-1/Exon 2-F2 primer : 5'-CTGTTCTTATTGAGCAGGAC-3'

• hMTF-1/Exon 2-R2 primer : 5'-GTTCTCCGCACTGTCCGTCG-3'

エクソン 3

• hMTF-1/Exon 3-F primer : 5'-GTAAAGCGGTACCAATGTAC-3'

• hMTF-1/Exon 3-R primer : 5'-CTGTACAGTGTGTTGAATGC-3'

エクソン 4

• hMTF-1/Exon 4-F primer : 5'-GCTGAAAGCACATCAGAGGC-3'

• hMTF-1/Exon 4-R primer : 5'-CGAAATGGCTTTTCCCCTGT-3'

エクソン 5

• hMTF-1/Exon 5-F primer : 5'-GTGCGATCACGATGGCTGTG-3'

• hMTF-1/Exon 5-R primer : 5'-CAGTATGTGTACGAACGTGA-3'
エクソン 6

• hMTF-1/Exon 6-F primer : 5'-GTGAAAGACCCTTCTTCTGC-3'

• hMTF-1/Exon 6-F primer : 5'-CTCTGATCCATTGTGTTGTG-3'
エクソン 7

• hMTF-1/Exon 7-F primer : 5'-GATACAAATCACTCACTTT-3'

• hMTF-1/Exon 7-R primer : 5'-CGTACTGGAATTTTCTCGCA-3'
エクソン 8

• hMTF-1/Exon 8-F primer : 5'-ACCCAGGGCCAGGACCTCAG-3'

• hMTF-1/Exon 8-R primer : 5'-CTGTCTGTTGAGGATCTTCC-3'
エクソン 9-1

• hMTF-1/Exon 9-F1 primer : 5'-CTTCCTTGACTGAAAGTTTT-3'

• hMTF-1/Exon 9-R1 primer : 5'-TTCTGGAGGTTGTAAGAGAG-3'
エクソン 9-2

• hMTF-1/Exon 9-F2 primer : 5'-TGCTCCCTCCCTAGGACCTG-3'

• hMTF-1/Exon 9-R2 primer : 5'-CCATGGCTGGCAGGGGCTCA-3'
エクソン 9-3

• hMTF-1/Exon 9-F3 primer : 5'-AGCCCATTTGTACCAGGACTT-3'

• hMTF-1/Exon 9-R3 primer : 5'-AATTTGTTCTTGGTTTTGTG-3'
エクソン 10

• hMTF-1/Exon 10-F primer : 5'-CAGCAAGCATCTAAAGTTGA-3'

• hMTF-1/Exon 10-R primer : 5'-

CTGGGCTACTGGCTACTGGT-3'
エクソン 11-1

・ hMTF-1/Exon 11-F1 primer : 5'-
GGAGCTCTGTCCAGCAGATT-3'

・ hMTF-1/Exon 11-R1 primer : 5'-
ATCCTTCAAATTTCTGACCC-3'
エクソン 11-2

・ hMTF-1/Exon 11-F2 primer : 5'-
TCCTCTACCTTGCCCTCCTC-3'

・ hMTF-1/Exon 11-R2 primer : 5'-
AAGGAGTCTCTGCTTGTCGG-3'

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトの遺伝子解析を行ったが、実施に当たっては倫理委員会で承認された方法に従い、提供者に研究内容を十分に説明してインフォームドコンセントを得た。なお、試料提供者、その家族、血縁者、その他関係者の人権および利益の保護の取り扱いには十分に配慮し、個人情報 は求めなかった。

C. 結果・考察

(1) ヒトメタロチオネイン遺伝子のプロモーター領域の多型検索

健常な日本人119例の白血球から単離したDNAについてSSCP法でhMT-IIAプロモーター部の変異の有無を検索したところ、119例の検体はType-A (98例), Type-B (20例), Type-C (1例) の3種類のパターンに分類された (Fig. 2A)。この3種類のパターンを示すPCR産物をそれぞれ数例ずつ選び、それらの塩基配列をdirect sequence法により調べたところ、転写開始点 (+1) から上流5塩基目 (-5) がType-AはA/A、Type-BはA/G、Type-CはG/Gであり、A→Gの一塩基置換

のあることが明かとなった (Fig. 2B)。なお、この一塩基置換はTATA boxと転写開始点との間のコアプロモーター上に存在していた (Fig. 3)。Type-Aの存在率が高いこと、さらにヒト由来細胞である293細胞のhMT-IIA遺伝子プロモーターもType-Aを示すことから、Type-Aが野生型と考えられる。この一塩基置換によって切断部位が出現または消失する制限酵素を検索したところ、Type-Aに存在するBsgIの切断部位が消失することが判明した。そこで次に、119例全てのPCR産物をBsgIで処理し、その断片長の違いからA→G変異の有無を調べた (Fig. 4A)。変異部位を含む領域241 bp (野生型にはBsgI切断部位が2ヶ所ある) をPCRで増幅後、制限酵素BsgIで処理すると、本法では野生型であるアデニンのアレルを持つ検体はBsgIで切断され、144 bp、56 bp、41 bpの3つの断片を生じるが、変異型であるグアニンのアレルを持つ場合にはBsgIで1ヶ所しか切断されず185 bpと56 bpの2つの断片を生じる (Fig. 4B)。119例のPCR産物をそれぞれBsgIで処理した後に10 %アクリルアミドゲルで電気泳動し、そのパターンを分類したところ、Type-Aを示した98例が野生型であるアデニンのホモ接合体、Type-Bを示した20例がアデニンとグアニンのヘテロ接合体、そしてType-Cを示した1例がグアニンのホモ接合体であることが確認された (Table 1)。なお、一般的に変異遺伝子保有者の存在割合が1 %以上である場合にその変異を多型と呼ぶが、本研究によって見出されたアデニンからグアニンへの一塩基置換はグアニンのアレル頻度が約9 %であったことから多型であると判断できる。

(2) ヒトメタロチオネイン遺伝子の翻訳領域における多型検索

hMT-IIA 遺伝子の翻訳領域は 3 つのエクソンから成る (Fig. 5)。これら 3 つのエクソン領域における遺伝子変異を健常な日本人 119 例の白血球から単離した DNA について SSCP 法で検索した。その結果エクソン 1 および 2 領域は全ての検体が同一の SSCP パターンを示したが (データ示さず)、エクソン 3 領域では 119 例の検体は Type-A (115 例) と Type-B (4 例) の 2 種類のバンドパターンを示した (Fig. 6A)。約 97 % の日本人が Type-A を示すこと、およびヒト胎児腎由来の 293 細胞も Type-A を示したことから、Type-A が野生型と考えられる。この 2 種類のバンドパターンを示す PCR 産物の塩基配列を各 1 例について direct sequence 法により調べたところ、コドン 42 の 2 番目の塩基にシトシン (Type-A) からチミン (Type-B) の一塩基置換が認められた (Fig. 6B)。また、この一塩基置換はコドン 42 番目のアラニンを変換する一アミノ酸置換を伴う変異であった (Fig. 6B, 7)。この一塩基置換によって切断部位が出現または消失する制限酵素を検索したが、適切な制限酵素は存在しなかった。そこで、Type-B のパターンを示した 4 例全てと Type-A のバンドパターンを示した 115 例中の 5 例について direct sequence 法により、塩基配列を調べた結果、それぞれ検討した全ての検体のコドン 42 の 2 番目の塩基が Type-A ではシトシン、Type-B ではチミンであり、その他の塩基配列には Type-A と Type-B との間に違いは認められなかった。したがって SSCP パターンから 119 検体の遺伝子型を分類すると、115 例がシトシン

のホモ接合体、4 例がシトシンとチミンのヘテロ接合体ということになる (Table 2)。なお、今回検討した 119 例中にはチミンのホモ接合体は認められなかった (Table 2)。またチミンのアレル頻度 (1.7 %) が 1 % 以上であったことから、hMT-IIA 遺伝子のエクソン 3 に見出された変異は多型と判定される。

またに興味深いことに、エクソン 3 に変異が認められる 4 例全てに第 1 章で認められたコアプロモーター上の変異が同時に存在しており、エクソン 3 のみに変異が認められる例は皆無であった (Fig. 8)。そこで、これら 2 箇所の変異が同一のアレル上に存在するかどうかを検討するため、これら 4 例について allele specific PCR (方法の項および Fig. 9A 参照) を行った。その結果、4 例全てにおいて、プロモーターとエクソン 3 の変異が同一アレル上に存在していることが判明した (Fig. 9B)。なお、4 例中 1 例はプロモーターが変異型のホモ接合体であるためプロモーターに変異のあるアレルと、プロモーターとエクソン 3 の 2 ヶ所に変異のあるアレルを保持しており、その他の 3 例は片方のアレルが野生型ということになる (Fig. 9B)。

哺乳類の MT 群の一次構造はアミノ酸または DNA の塩基配列分析によってヒト、サル、ウマ、ヒツジ、ハムスター、ラット、マウス について決定されているが、異なる MT 分子種間のアミノ酸配列の保存性は高く (たとえばヒト MT-IIA とマウス MT-I は 82 % のホモロジーを示す)、特に MT の機能的な中核をなす 20 個のシステインの位置は分子種間で非常に高度に保存されている。システイン以外のアミノ酸残基におい

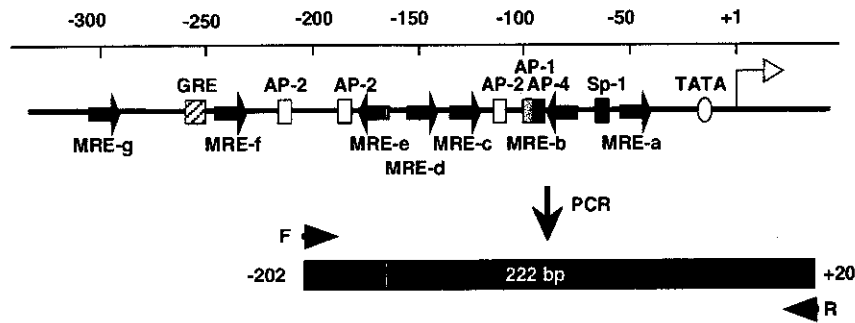


Fig. 1 Examined regions of the human metallothionein-IIA (hMT-IIA) promoter for PCR-SSCP analysis

Transcriptional regulatory elements located upstream of the hMT-IIA gene. The location and orientation of MREs are indicated by closed arrows. The transcription start site is indicated by open arrow. Promoter region (-202~+20) were amplified by forward (F) and reverse (R) primer.

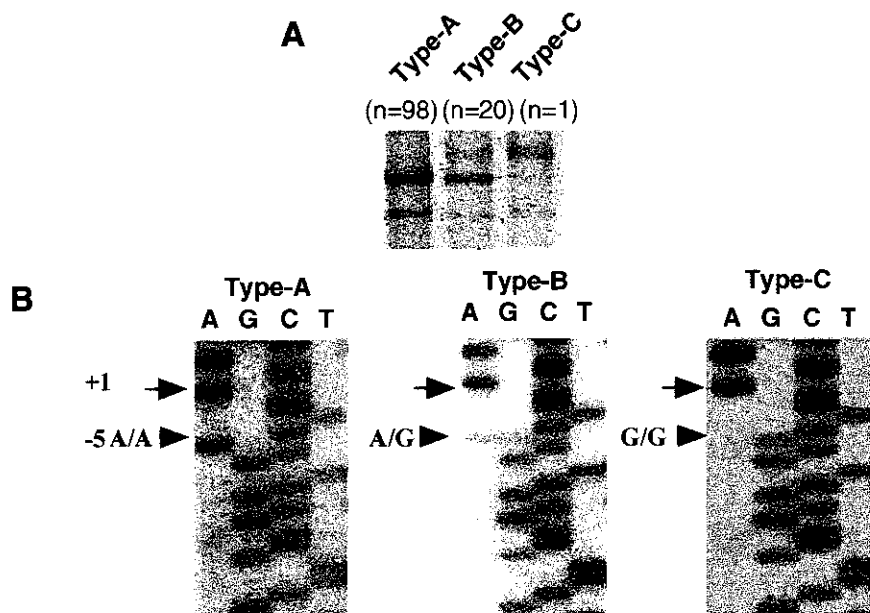


Fig. 2 Examples of conformational variants in hMT-IIA promoter region detected through PCR-SSCP (A) and sequence analyses of the type A , B and C PCR reaction products (B)

(A) One hundred and nineteen individuals were categorized in three SSCP patterns. (B) Point mutation at nucleotide positions -5 (A→G) was indicated by arrow head in the sequence. Nucleotides position +1 indicates the transcription start site. Type A, B and C were indicated A/A, A/G and G/G nucleotide at -5 position in hMT-IIA promoter region.

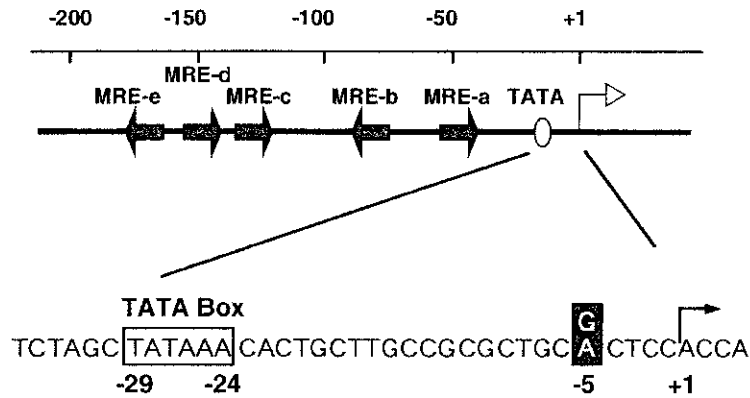


Fig. 3 The point mutation A→G at -5 position in hMT-IIA promoter region
 Point mutation at nucleotide position -5 (A→G) was located core promoter region between TATA box and transcription start site.

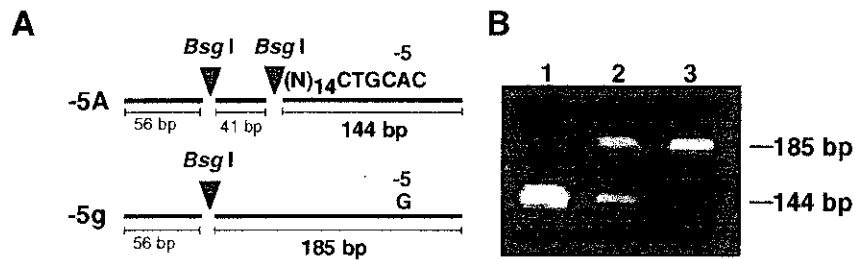


Fig. 4 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of candidate mutated DNA

(A) A schematic representation of RFLP. The two different allelic fragments (241 bp) were amplified. The wild-type allelic sequence (-5A) have two restriction sites for *Bsg* I ((N)₁₄CTGCAC) and can be digested into three fragments (144 bp, 56 bp and 41 bp), whereas the mutant allelic sequence (-5g) missing one of the *Bsg* I site and can be digested into two fragments (185 bp and 56 bp) by the restriction enzyme. (B) Two bands (185 bp and/or 144 bp products) digested with *Bsg* I were visualized in acrylamide gel according to wild-type (lane 1), mutant (lane 3) or heterogenous alleles (lane 2).

Table 1. Genotype and allele frequency of a polymorphism at -5 position in hMT-IIA promoter region in 119 healthy individuals

Promoter (-5)	Genotype frequency			Allele frequency	
	A/A	A/G	G/G	A	G
	(n=98)	(n=20)	(n=1)		
	0.824	0.168	0.009	0.908	0.092