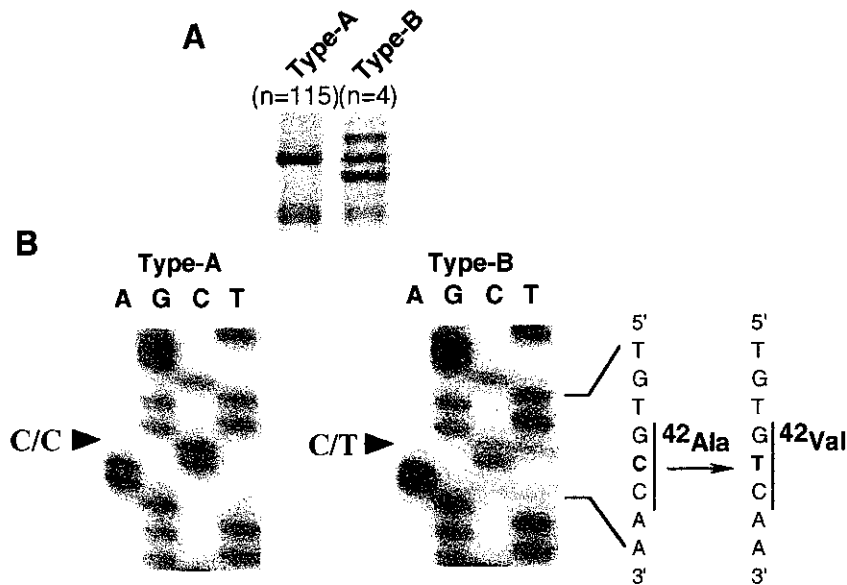
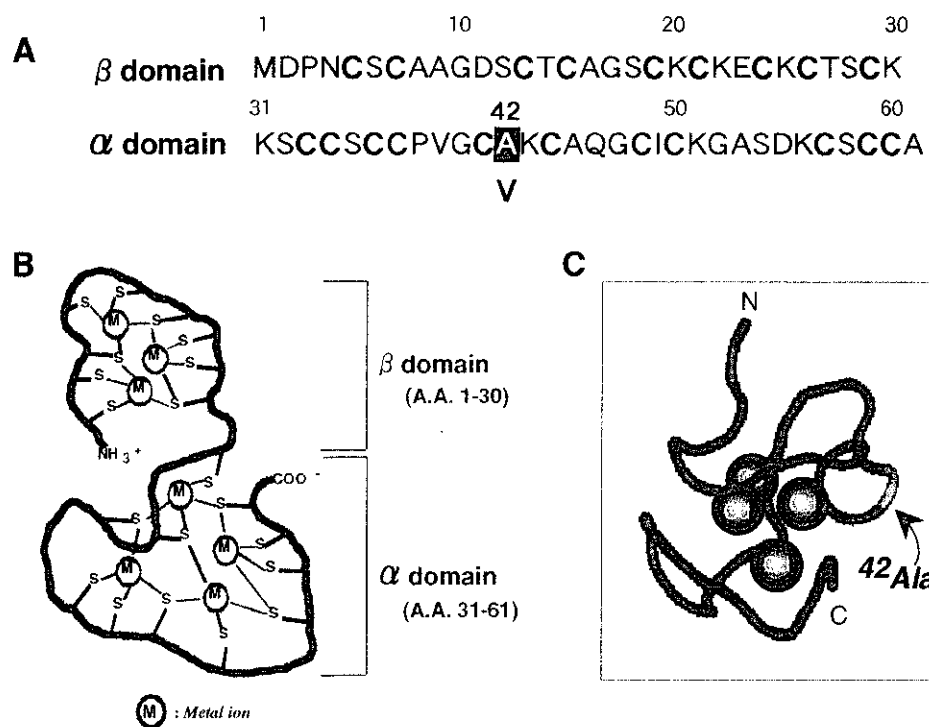


**Fig. 5 Examined regions of human metallothionein-IIA (hMT-IIA) exons for PCR-SSCP analysis**

The coding regions are indicated as closed square. These regions contain 186 bp and are translated to 61 amino acids. Open squares indicate 5' or 3' untranslated region. Each primer was designed to amplify the translational sequence, and obtained 141 bp for exon 1, 259 bp for exon 2 and 180 bp for exon 3 region, respectively. F : forward primer, R : reverse primer



**Fig. 6 Examples of conformational variants in hMT-IIA exon 3 region detected through PCR-SSCP (A) and sequence analyses of the type A and B PCR reactions (B)**  
 (A) One hundred and nineteen individuals were categorized in two SSCP patterns. (B) Point mutation at second nucleotide of codon 42 (C→T) was indicated by arrow head in the sequence. Type A and B indicate C/C and C/T nucleotide at codon 42 which induce one amino acid exchange from alanine to valine.



**Fig. 7 Structure of human metallothionein-IIA protein**

Metallothionein structure was divided into N-terminal  $\beta$  domain and C terminal  $\alpha$  domain. (A) Amino acids sequence of hMT-IIA protein. Cysteine residues were indicated as bold type.  $^{42}\text{Ala}$  was changed to Val by point mutation of GCC to GTC. (B) Two dimensional structure of MT protein.  $\beta$  domain and  $\alpha$  domain binds three and four atoms of metal through SH residue of cysteine. (C) Three dimensional structure of  $\alpha$  domain of cadmium binding form of MT protein (ref. 60).  $^{42}\text{Ala}$  were indicated by arrow.

ても、今回変異を認めたコドン 42 のアラニンは比較的によく保存されており、ヒト MT-I から-IV までの分子種間では、MT-IF がセリン、MT-IK がシステイン MT-III がグルタミン酸である以外 MT の偽遺伝子を含めても全てアラニンである。また、他の哺乳類においてもよく保存されており、少なくともコドン 42 番目にバリンの残基を持つ MT 分子種の存在は認められていない。さらに今回同定したコドン 42 番目のアラニンは Fig. 7 に示したように MT の  $\alpha$  ドメインに位置し、コドン 41 番目と 44 番目にはシステインが存在していることから、このアラニンがより疎水性の高いバリンに変わることによって、重金属との結合に影響を与えている可能性も否定できない。

一方、エクソン3に塩基変異の認められた4例の全てがコアプロモーター上にも変異を有するという興味深い事実が本研究によって見出された。両多型の存在率から計算すると、このような結果が得られる確率は約1,000分の1であり、偶然とは考えにくい。そうであれば、エクソン部とコアプロモーター上の両方に塩基変異のある人間は成人まで成長することができるが、エクソン3にのみ変異を有する個体は何らかの理由で生まれてこないか、生まれたとしても成人になる前に死亡してしまうという可能性が考えられる。MT遺伝子を欠損させてもマウスは正常に成長することから、エクソン3に塩基異常のある遺伝子から作られるMT蛋白質(変異MT)が人間の発生または生育の段階で“好ましくない”作用を発揮すると想像することもできる

### (3) メタロチオネインの転写発現調節に

### 関わる転写因子MTF-1の遺伝子多型検索

重金属による MT 遺伝子の発現調節には転写因子 MTF-1 が重要な役割を果たしている。MTF-1 は Fig. 10A に示すように、DNA 結合ドメインとして機能する N 末端側の 6 つの zinc finger ドメインを介して MT プロモーター領域中のシスエレメントである MRE に結合する。また C 末端側の acidic region, proline rich region, serine threonine rich region の 3 つの転写活性化ドメインは転写活性に関与することが知られている。本転写因子は重金属、特に細胞内の遊離の Zn に対するセンサーとして働き、MT をはじめプロモーター領域に MRE を有する遺伝子群の発現に関与すると考えられている<sup>62-64</sup>。また MTF-1 を欠損したマウスの胎児から単離した細胞では、Zn や Cd 等の重金属による MT の誘導合成が生じなくなると共に、MT の basal level での発現も認められなくなることから、MTF-1 は MT の発現において重要な転写因子であると考えられている。

一方、zinc regulatory factor (ZRF) は MTF-1 と同様に MT プロモーター上の MRE に結合する蛋白質としてヒト由来の培養細胞中から単離・同定された転写因子であるが、ヒトの MTF-1 と ZRF はコドン 185 (MTF-1 : histidine, ZRF : tyrosine) 以外のアミノ酸は全て一致することから、バリエーションである可能性が考えられる。それぞれを培養細胞で高発現させて Zn による MT 遺伝子の活性化をレポーター遺伝子アッセイ法で調べると、両転写因子共に basal level は上昇するものの、Zn による活性化は MTF-1 でより顕著に認められる。従ってヒトにおいてもこのような遺伝子変異が MT 誘導能

における個体差を与える可能性も考えられる。そこで、MTF-1の翻訳領域の多型を検索した。

MTF-1 蛋白質は 753 アミノ酸からなり、N 末端側に 6 つの zinc finger 領域、C 末端側に acidic, proline-rich, serine/threonine-rich の 3 つの転写活性化領域を有する (Fig. 10A)。そこで日本人 10 例について、MTF-1 遺伝子の翻訳領域をそれぞれの機能ドメイン毎に PCR 法で増幅し、それらの遺伝子変異を検索した。その結果、acidic region を一部コードしているエクソン 8 でのみ遺伝子変異が確認され、他の領域では少なくとも今回用いた諸条件では変異を認めなかった (Fig. 10B)。そこでエクソン 8 中の変異を計 103 例についても同様に調べてところ、Type-A (50 例), Type-B (43 例), Type-C (10 例) の 3 つのパターンに分類され (Fig. 11A)、direct sequence 法により変異部位の配列を調べたところ、コドン 390 の 3 番目の塩基にアデニン (Type-A) からグアニン (Type-B および-C) への一塩基置換が認められた (Fig. 11B)。しかしこの一塩基置換はアミノ酸変異を伴わず、従って、少なくとも MTF-1 遺伝子のエクソン 8 領域中にはアミノ酸変異を伴う遺伝子多型は今回調べた集団 (103 例) には存在しないことになる。なお、103 例中の遺伝子型分布を計算すると、50 例がアデニンのホモ接合体、43 例がアデニンとグアニンのヘテロ接合体、10 例がグアニンのホモ接合体となり、グアニンアレル頻度は約 30 %になることから、この変異は多型と判断できる (Table 3)。本知見は、MTF-1 遺伝子翻訳領域に遺伝子多型が存在することを示す最初のものである。

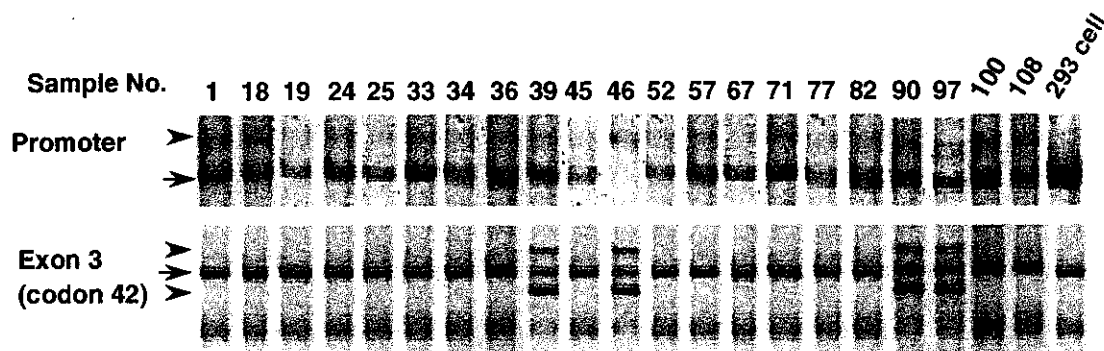
一方上述のように、MREに結合する蛋白質としてMTF-1とコドン185の一アミノ酸が異なる分子種であるZRFが同定されている (Fig. 12)。しかし、一アミノ酸が違うだけにもかかわらず、その転写活性はMTF-1の方がZRFより高いことが報告されていることから<sup>71)</sup>、この一アミノ酸の違いがMTの転写活性化に影響を与える可能性が考えられる。そこで、日本人30例 (本研究で用いた検体の中からランダムに選んだ) について、MTF-1とZRF遺伝子の日本人における存在割合を検討した。MTF-1とZRFでアミノ酸に相違が認められるzinc finger 2領域をPCR法で増幅し、direct sequence法によりそれらの塩基配列を調べたところ、30例全てにおいてコドン185番目がチロシン、即ちZRFをコードする塩基配列を示した。また3種類のヒト由来の培養細胞についても同様に調べたところ、3種類ともにZRF遺伝子を持つことが明らかになった (Fig.13)。

#### D. 結論

メタロチオネイン遺伝子のプロモーターおよび翻訳領域に一塩基置換を有する人間の存在が初めて明らかとなった。これらの遺伝子変異がメタロチオネインの合成異常や機能異常を引き起こす可能性が考えられる。もしそうであれば、変異を有する人々はカドミウムに対して高い感受性を示すことになる。一般的な日本人の腎臓中カドミウム濃度はマウスでの中毒濃度の半分近くにも上ることから、メタロチオネイン遺伝子に変異のある人々はカドミウム摂取量に特別な注意が必要かも知れない。

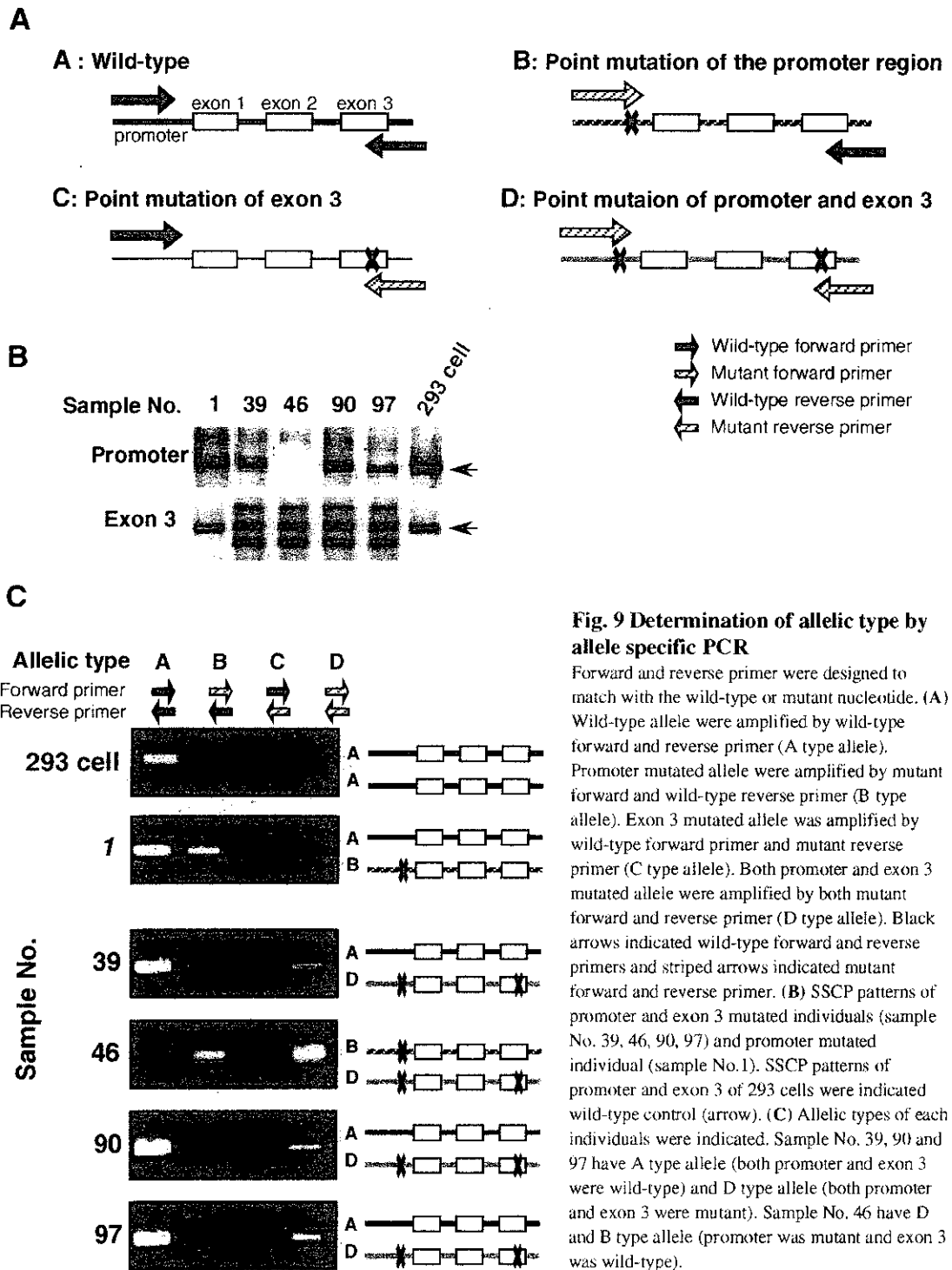
**Table 2. Genotype and allele frequency of the polymorphisms at second nucleotide of codon 42 in 119 healthy individuals**

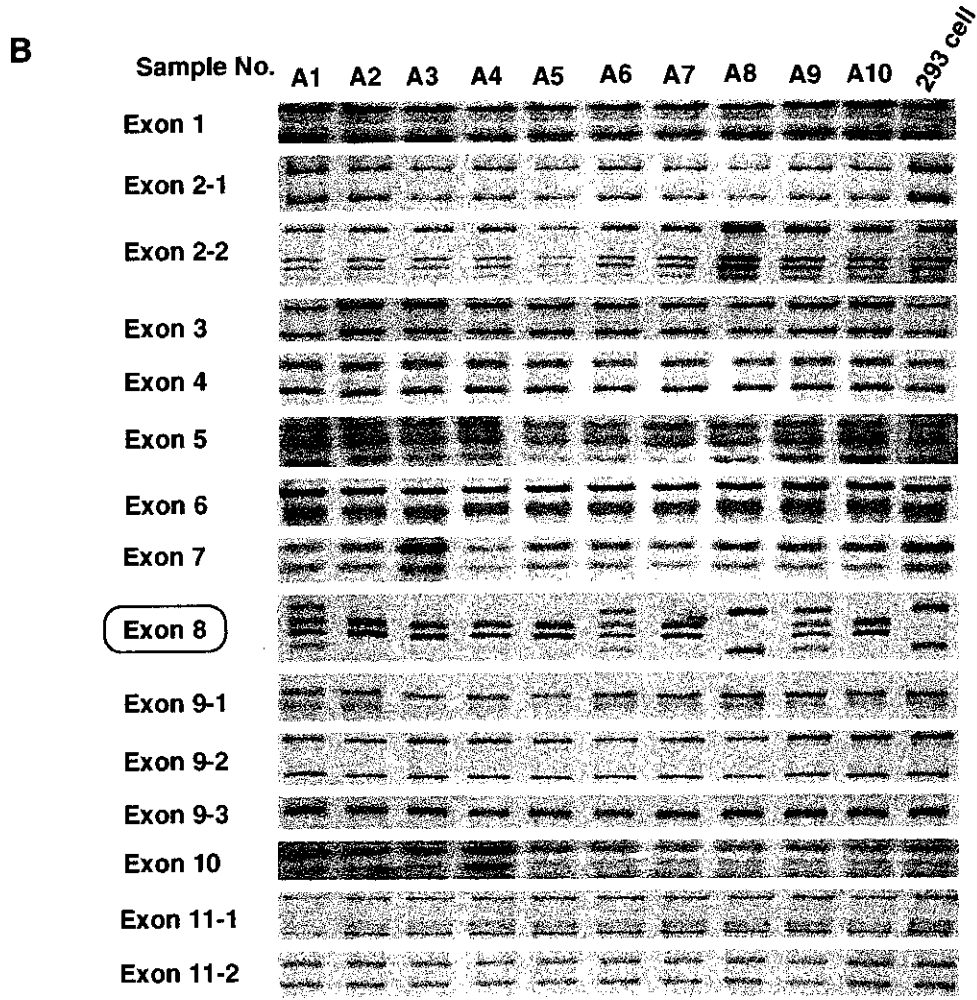
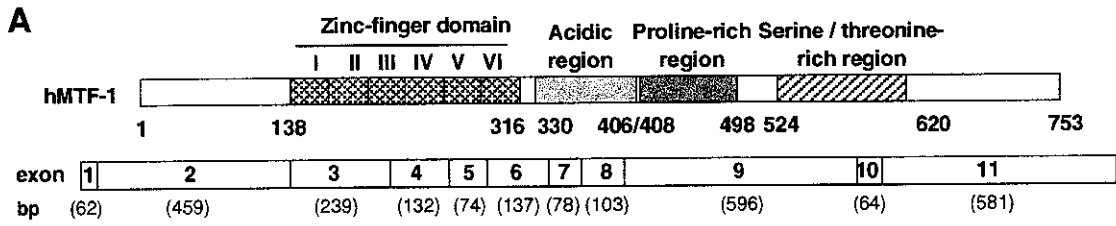
Codon 42	Genotype frequency			Allele frequency	
	C/C (n=115)	C/T (n=4)	T/T (n=0)	C	T
	0.967	0.033	0.000	0.983	0.017



**Fig. 8 SSCP patterns of hMT-IIA promoter and exon 3 regions**

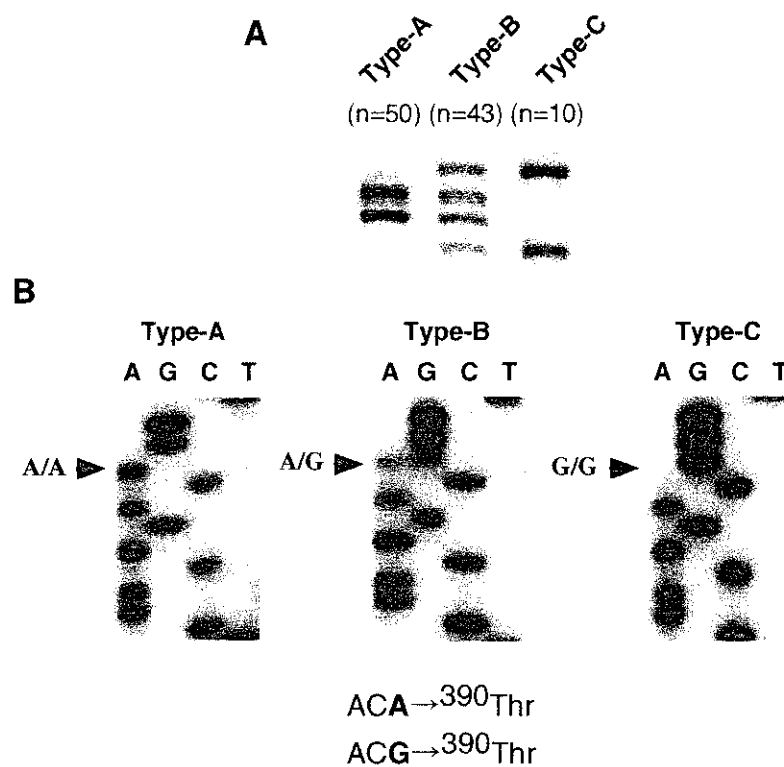
Individuals having point mutation of promoter or/and codon 42 were indicated. Twenty individuals contain both wild-type and mutant allele (arrow head), and only one individuals (sample No. 46) has mutant allele in promoter region. Four individuals (sample No. 39, 46, 90, 97) that having both wild-type (arrow) and mutant (arrow head) allele in codon 42 having mutant allele in promoter region. SSCP patterns of promoter and exon 3 of 293 cells were indicated wild-type control (arrow).





**Fig. 10 PCR-SSCP analyses of human metal transcription factor-1 (hMTF-1)**

(A) Examined regions of hMTF-1 for SSCP analysis. Each exon were amplified and each length of the PCR fragment is displayed as base pairs (bp). Exon 2, 9 and 11 were divided into two or three regions and amplified. (B) The SSCP band patterns of 10 subjects were indicated. Different SSCP patterns were observed only in exon 8 which encoded one part of acidic region.



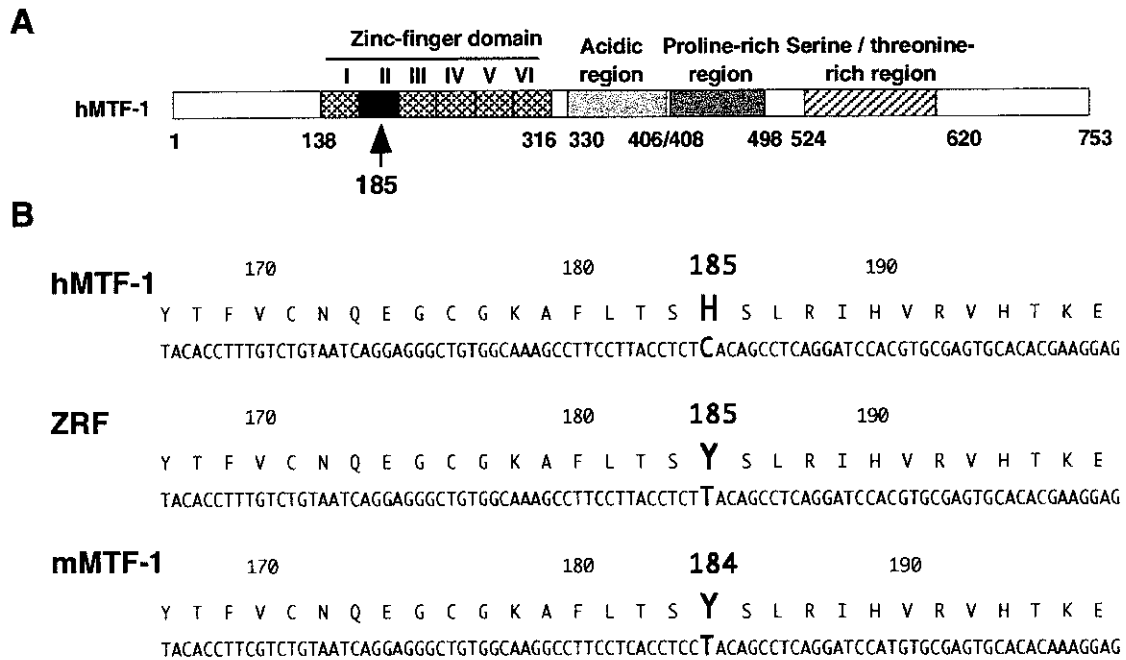
**Fig. 11** Examples of conformational variants in hMTF-1 exon 8 region detected through PCR-SSCP (A) and sequence analyses of the type A, B and C PCR reaction products (B)

(A) One hundred and three individuals were categorized in three SSCP patterns. (B) Point mutation at third nucleotide of codon 390 (A→G) was indicated by arrow head in the sequence. Type A, B and C were showed A/A, A/G and G/G nucleotide at codon 390.

**Table 3.** Genotype and allele frequency of the polymorphisms at third nucleotide of codon 390 of hMTF-1 acidic region in 103 healthy individuals

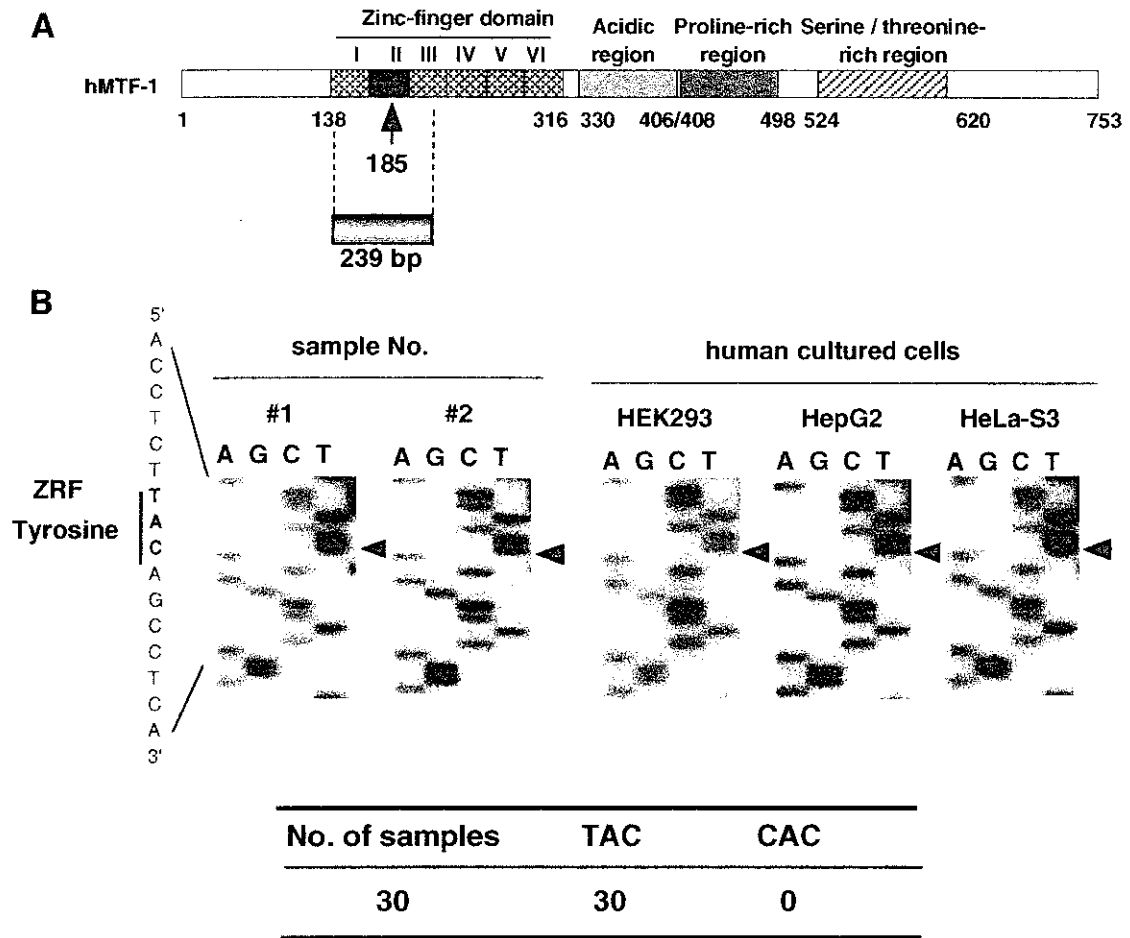
codon 390	Genotype frequency			Allele frequency	
	A/A (n=50)	A/G (n=43)	G/G (n=10)	A	G
	0.482	0.425	0.093	0.694	0.306





**Fig. 12 Structural features of human MTF-1, ZRF and mouse MTF-1**

(A) Schematic representation of hMTF-1. (B) Nucleotides and amino acids sequences of the second zinc finger domain of hMTF-1, ZRF and mouse MTF-1. Amino acids are indicated in the one letter code above the nucleotide sequences.



**Fig. 13 Direct sequence analysis of the 239 bp fragment of second zinc finger domain in human MRE-binding transcription factor**

(A) Codon 185 in second zinc finger domain was indicated by arrow. (B) Sequence patterns of two typical Japanese out of thirty individuals, and three human cultured cells lines (293, HeLa-S3 and HepG2 cells) were indicated. First nucleotide in codon 185 are indicated by arrow head. All Japanese subjects and three human cultured cell lines showed the same sequence (TAC).

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし。

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Furuchi, T., Hwang, G. W. and Naganuma, A.	Overexpression of the ubiquitin- conjugating enzyme Cdc34 confers resistance to methylmercury in Saccharomyces cerevisiae	Mol. Pharmacol.	61	738-741	2002
Hwang, G. W., Furuchi, T. and Naganuma, A.	A ubiquitin- proteasome system is responsible for the protection of yeast and human cells against methylmercury	FASEB J.	16	709-711	2002
Naganuma, A., Furuchi, T., Miura, N., Hwang, G. W. and Kuge, S.	Investigation of intracellular factors involved in methylmercury toxicity	Tohoku J. Exp. Med.	196	65-70	2002
永沼 章、黄 基旭	メチル水銀の毒性 発現機構	医学のあゆみ	202	895-898	2002

20020948

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.68の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。