

Fig. 16. Effect of overexpression of Fre family on sensitivity to cisplatin

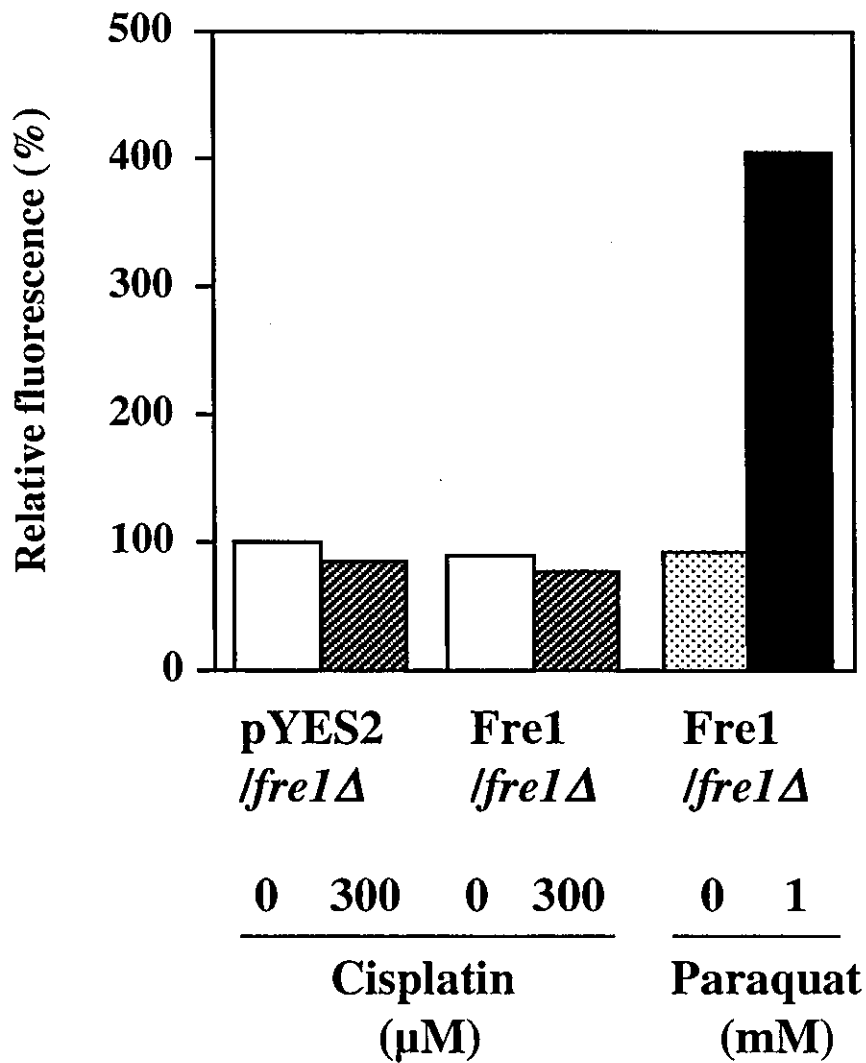


Fig. 17. Effect of overexpression of Fre1 on extracellular ROS production in yeast cells treated with cisplatin or paraquat

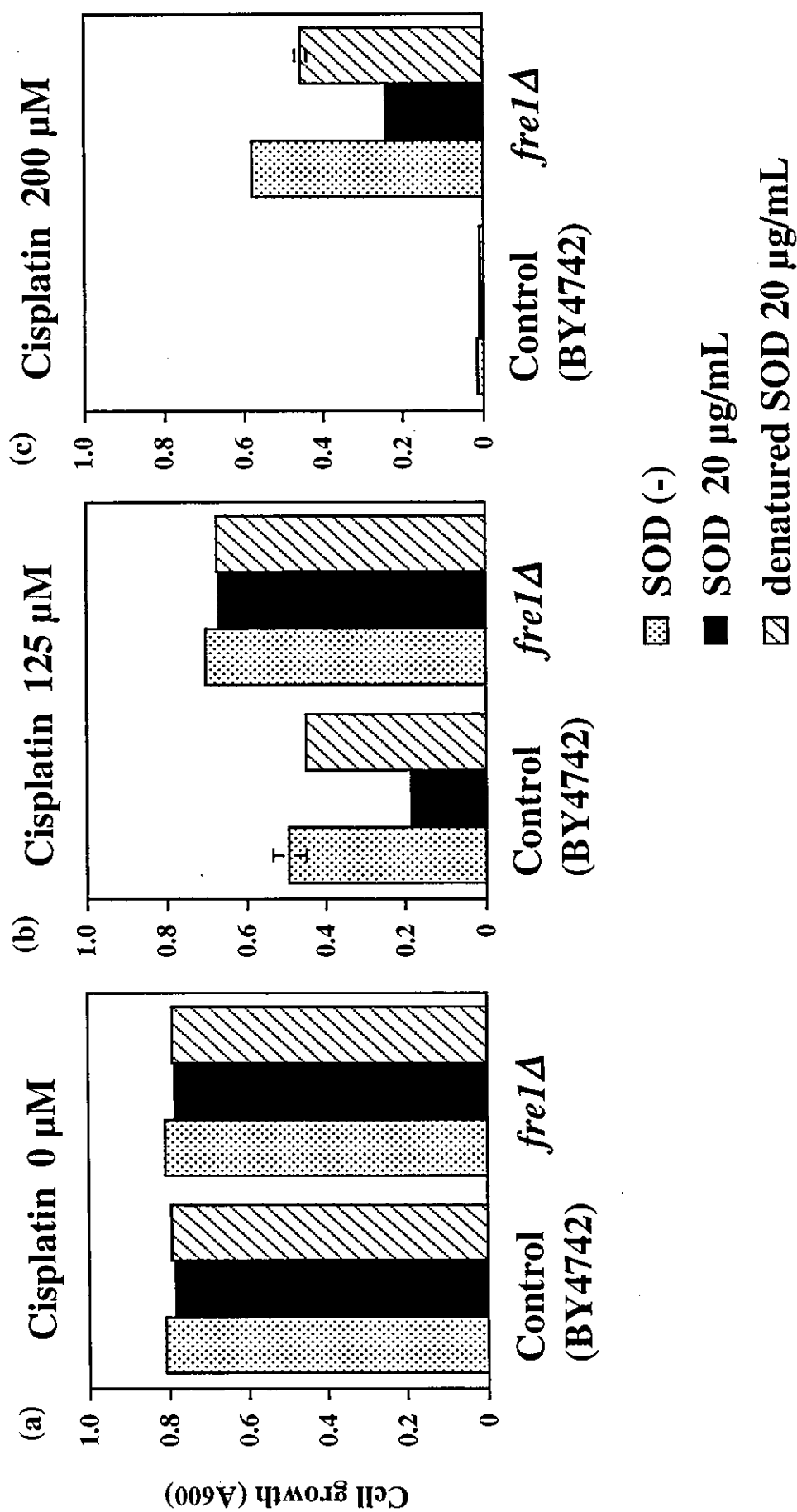


Fig. 18. Effect of SOD supplemented in media on sensitivity to cisplatin

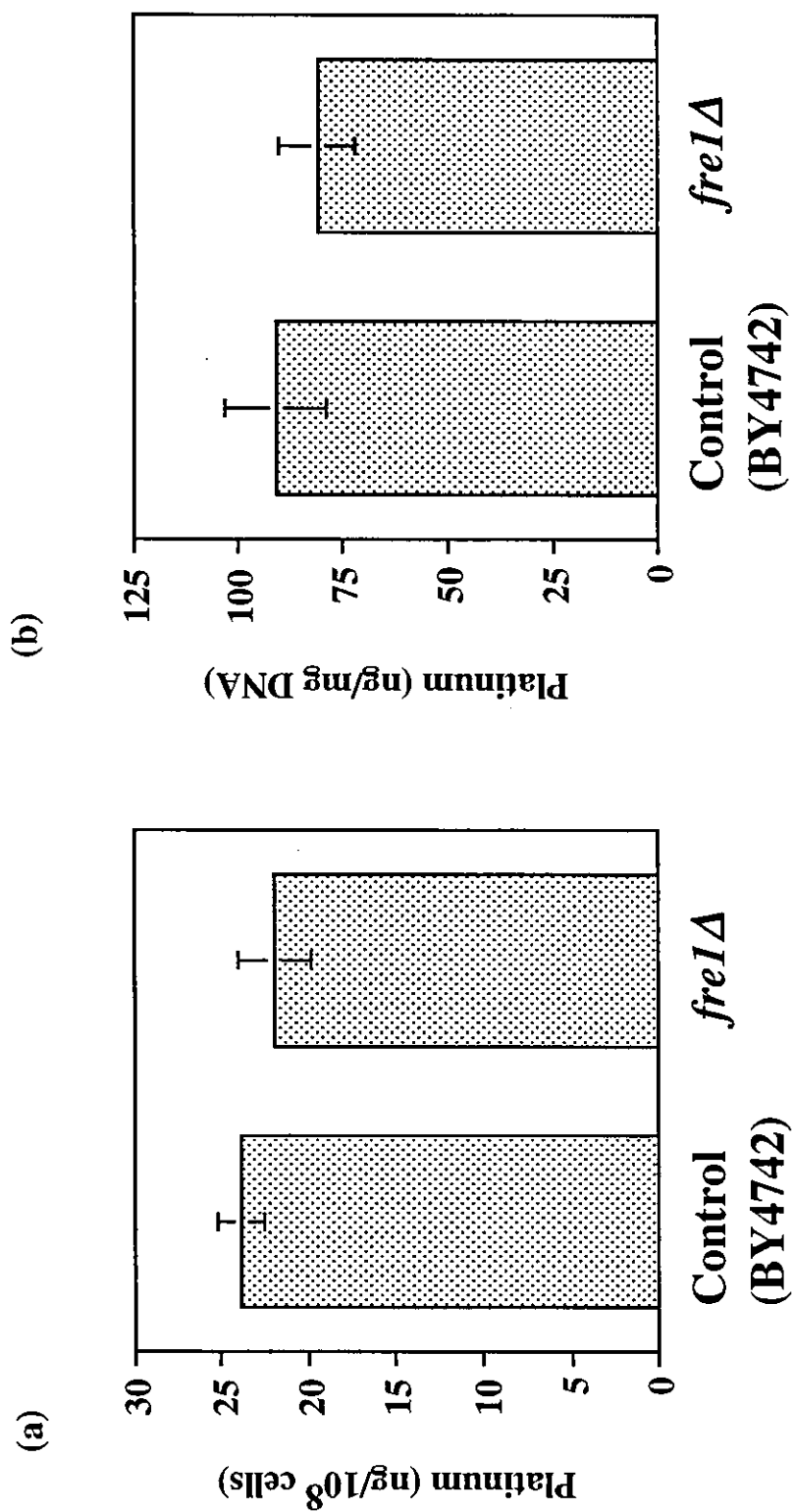


Fig. 19. Cellular accumulation (a) or binding to DNA (b) of platinum in *fre1Δ* mutant treated with cisplatin

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。(ⅱ)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組織中で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。(ⅲ)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。(ⅳ)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。(ⅳ)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100xg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、600xg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°C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、600xg、5分間遠心して、上清を除去後、250 μ lの0.2% NaClで懸濁した白血球に500 μ l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°Cで12時間反応後、等量のPCIを加え、室温で10分間振盪後、800xg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°Cで20分間放置して、20,000xg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250 μ lのTEを加え、DNAを溶解した。DNA溶液に250 μ lのSEと1/1,000容量の10mg/ml RNase Aを加え37°C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 % xylene 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ジオグラフィでバンドを検出し、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 で調製した。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 BspI を加え、molecular grade water で全量 10 μ l に調製し、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' -CGCCTGGAGCCGCAAGTGAC-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 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 \square F(-5g) :

5' -TAAACACTGCTTGCCGCGCTGCG-3'

hMT-IIA \square R (-5t) :

5' -GATGCAGCCCTGGGCACACTTGGa-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 $^{\circ}$ C で 10 分間熱変性した後、96 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C, exon 3, 4, 9-2, 11-1, 11-2 : 61 $^{\circ}$ C) で 30 秒、72 $^{\circ}$ 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' -CTCCGCGGCTCCCGGCAACG-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-R 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、個人情報には求めなかった。

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プロモーター部分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らかとなった (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番目のアラニンをバリンに変え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ても、今回変異を認めたコドン 42 のアラニンは比較的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 α 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⁶²⁻⁶⁴⁾。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ジーン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でもかかわらず、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⁷¹⁾、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。

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。

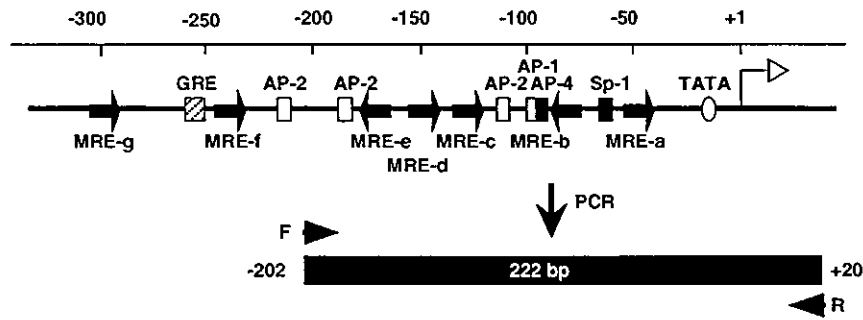


Fig. 1 Examined regions of the human metallothionein-IIA (hMT-IIA) promoter for PCR-SSCP analysis

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.

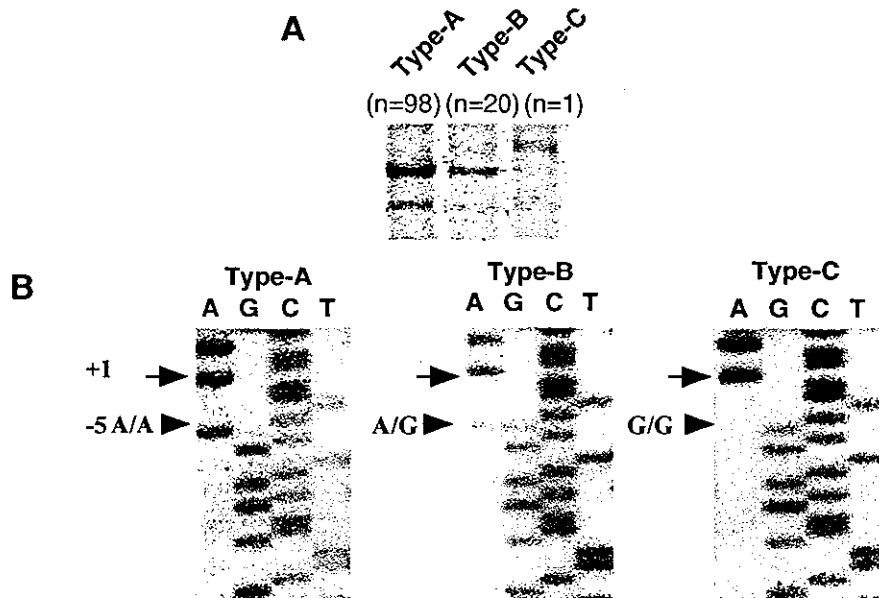


Fig. 2 Examples of conformational variants in hMT-IIA promoter region detected through PCR-SSCP (A) and sequence analyses of the type A, B and C PCR reaction products (B)

(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.

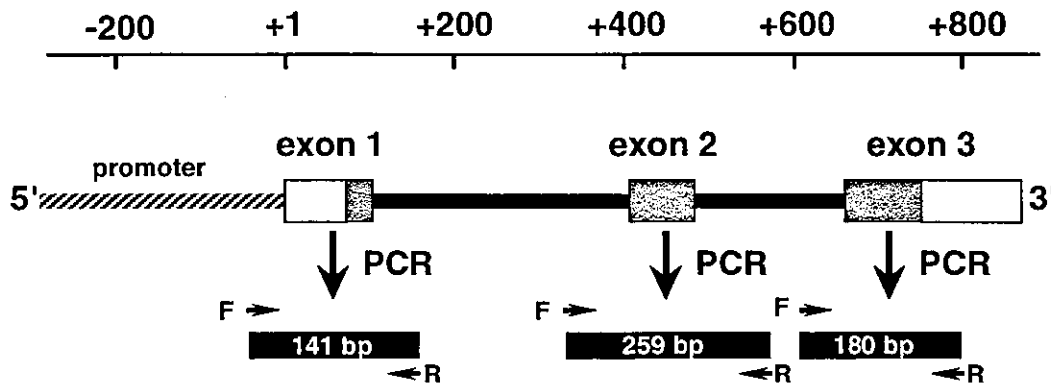


Fig. 5 Examined regions of human metallothionein-IIA (hMT-IIA) exons for PCR-SSCP analysis

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

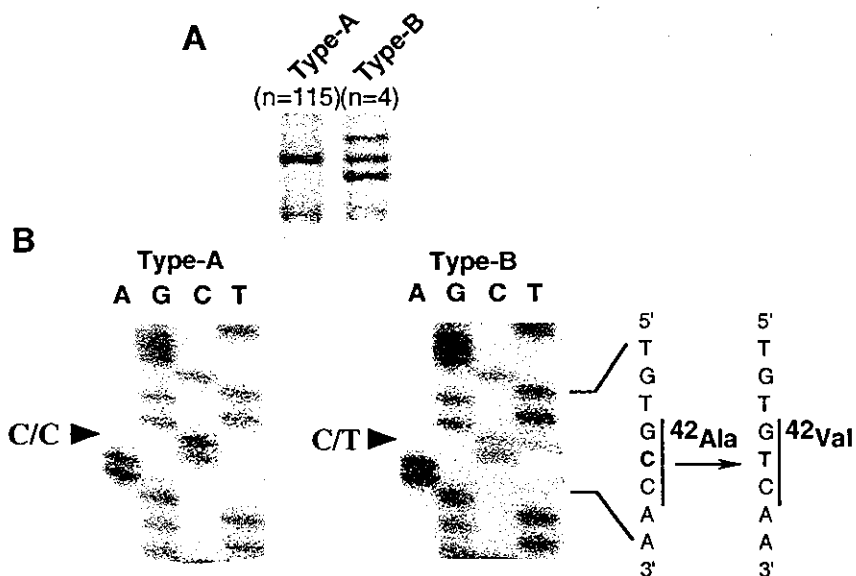


Fig. 6 Examples of conformational variants in hMT-IIA exon 3 region detected through PCR-SSCP (A) and sequence analyses of the type A and B PCR reactions (B)

(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.

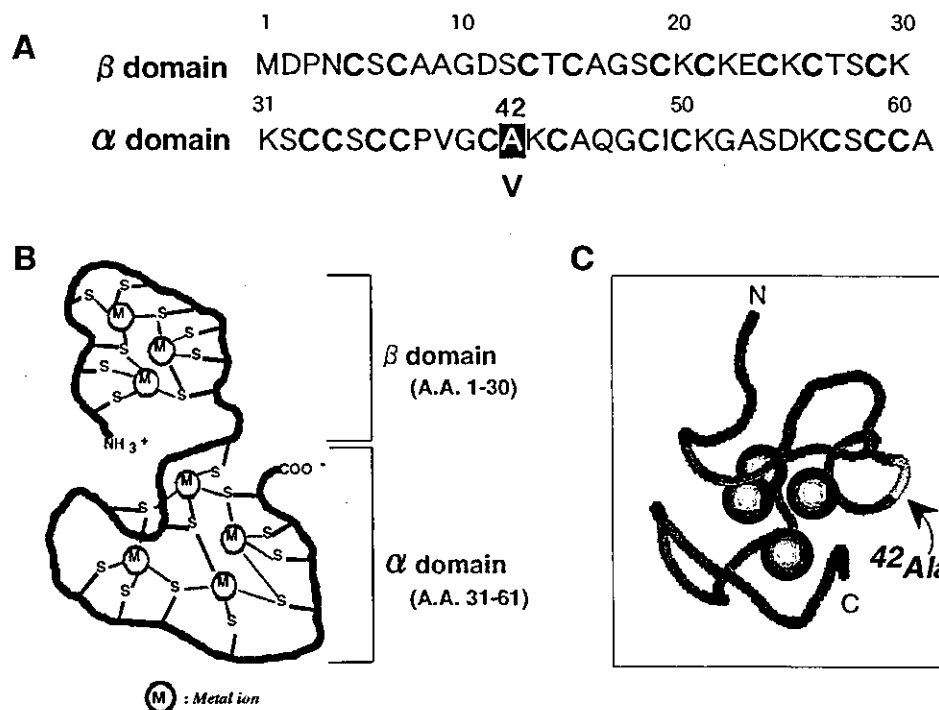


Fig. 7 Structure of human metallothionein-IIA protein

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

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

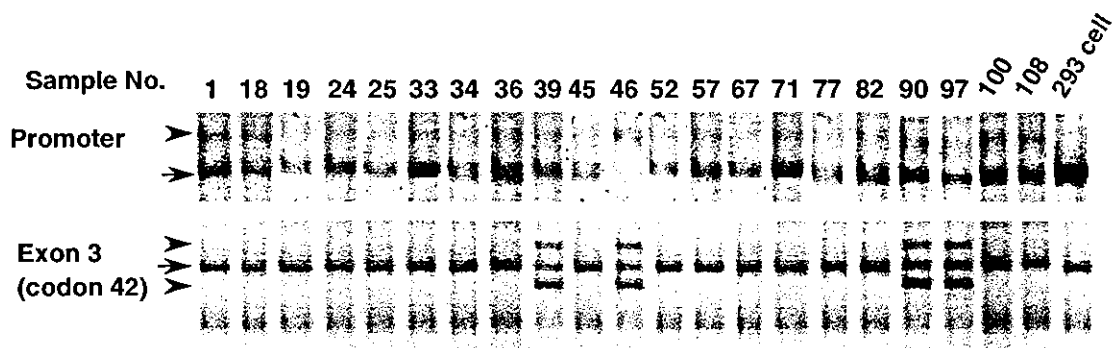


Fig. 8 SSCP patterns of hMT-IIA promoter and exon 3 regions

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).