The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	メタロチオネイン欠損による遺伝子発現変化とその生体影響
Author(s)	木村, 朋紀
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3184257
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【12】

氏　　名	木村朋紀（きむらともき）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　16159　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	**メタロチオネイン欠損による遺伝子発現変化とその生体影響**
論文審査委員	（主査） 教　授　田中　慶一 （副査） 教　授　土井　健史　　教　授　西原　　力　　教　授　宮本　和久

論文内容の要旨

メタロチオネイン（MT）は重金属結合タンパク質として発見された。MTはその構成アミノ酸の約1／3をシステインが占めており、このシステイン残基が全てSHの状態で存在することから重金属結合能とともにラジカルスカベンジ能を有している。また、MTはCd、Zn、Cuなどの重金属や、活性酸素種（ROS）を産生する薬物の投与で誘導されることが知られている。このような特徴から、1）重金属との結合・解毒やフリーラジカル消去に注目し、MTを生体防御因子と位置づける研究、および2）MTの誘導機構に関する研究という二方向からの研究が行われてきた。しかしながら、MT欠損マウスは正常に繁殖するものの一部には体重異常が認められると報告されており、MTがこれまでに知られていない何らかの重要な役割を果たしている可能性が考えられる。また、細胞質タンパク質であると考えられてきたMTが核局在化する現象が報告された。核内におけるMTの役割としてはROSからのDNA保護が第一に挙げられる。しかし、特定の時期・細胞にのみMTの核局在が認められることから核内MTがDNA保護以外にも時期・細胞特異的な役割を果たしている可能性が考えられる。このような状況下、いくつかの研究グループからMTが転写因子のDNA結合活性を修飾すると報告されMTの遺伝子発現調節能が提唱された。MTによって活性修飾を受ける可能性のある転写因子としては、1）Znフィンガーを有するもの（Sp1、TFIIIA、エストロゲンレセプターなど）、および2）レドックス制御を受けるもの（NF－κB）の2種がある。しかしながら、MTのDNA結合活性修飾作用は現在のところ核抽出液を用いた*in vitro*タンパク質／DNA結合アッセイ（EMSA）や転写因子結合配列をレポーター遺伝子に連結したプラスミドを利用したレポーターアッセイなどの実験系でのみ示されている。つまり、実際に生体内でMTが遺伝子発現調節を行っているという確証はいまだに得られていない。現在までにMTの核局在が認められている時期には肝再生期、および新生仔期があり、これらはいづれも遺伝子発現が劇的に変動していると考えられる時期である。したがって実際に生体内でMTが遺伝子発現調節に関わっている可能性は十分考えられる。本研究ではMT欠損マウスと改良型ディファレンシャルディスプレイ法を駆使しMTが高発現する新生仔期にMT欠損により発現上昇する遺伝子2種と発現低下する遺伝子1種を同定した。MT欠損により発現上昇する2種の遺伝子はともに抗酸化作用に関わっている可能性のあるtransketolaseおよびvanin－3であった。これら遺伝子の発現上昇は抗酸化因子であるMTの欠損を補うための代償機構であると考えられる。MT欠損により発現低下する遺伝子は急性期タンパク質（APP）の一つであるcontrapsinであった。MT欠損により発現が低下することからMTの転写活性化機構の存在が示唆された。

次いでLPS投与やIL－6処理により、MT誘導とともにZn応答性転写因子であるMRE-binding transcriptional factor（MTF）－1が活性化されることを示した。また、このMTF－1活性化はMT欠損により消失した。以上の結果にもとづき、このMTF－1活性化機序がMT誘導の結果引き起こされる細胞内Znの増加によるというモデルを提示した。MT遺伝子の発現上昇により金属非結合型MT（apoMT）が合成される。このapoMTはただちに細胞内のZnと結合する。Znは血漿から十分供給されるのでMT誘導は細胞内Znの増加を引き起こす。その結果として細胞内Znプールが増加し、MTF－1が活性化されるというモデルである。APP遺伝子の中にはα_1－acid glycoprotein（AGP）をはじめとしてMTF－1支配のものが複数含まれている。MT欠損マウスはLPSによるAGP遺伝子発現誘導倍率が低下していることを見いだし、MTがAPP遺伝子発現調節を介して炎症反応を修飾する可能性を示した。さらに、炎症モデルの一つであるLPSとD－ガラクトサミンの同時投与によって引き起こされる急性肝炎に対し、MT欠損マウスが高感受性であることを示した。この急性肝炎モデルにおける肝障害および致死作用はAGP投与によって軽減されることが知られている。AGPによる保護作用の詳細な機序は不明であるが、AGP投与によって肝障害に先立って起こる肝アポトーシスの抑制が認められると報告されている。肝臓アポトーシスの程度をMT欠損マウスと野生型マウスとで比較したところ、MT欠損マウスでアポトーシスがより重篤であったことからMTはAGPと同様の作用機序により保護作用を発揮していると考えられた。つまり、先述のMT欠損マウスでのLPSによるAGP遺伝子発現誘導倍率低下が急性肝炎モデルにおける肝障害および致死作用感受性亢進の原因である可能性が示唆された。

MTは新生仔期および急性期のみならず、様々な局面で誘導される。他のMT誘導刺激、例えば肝再生、発癌、拘束ストレス等においてもMTの遺伝子発現調節作用が発揮されているのか、また、遺伝子発現調節作用が発揮されているならばそれはどの様な意義があるのかなど解明されなければならない点も多く残されている。重金属結合タンパク質としてMTが発見されてから40年以上が経過した。今日までにMTの役割としては主として重金属の解毒とフリーラジカルの消去が注目されてきたが、本研究はMT研究の新天地を切り開いたものと考える。

論文審査の結果の要旨

MTは重金属の解毒やフリーラジカルの消去などの機能から生体防御因子と位置づけられてきたが、これらはいずれもMT分子自体が防御反応に関わったものである。ところが最近MTが転写因子のDNA結合活性を修飾することからMTの遺伝子発現調節能が提唱された。しかし、今まで報告されているMTのDNA結合活性修飾作用を示す実験系はいずれもEMSAやレポーターアッセイなどを用いたin vitroでの検討にとどまっており実際に生体内でMTが遺伝子発現調節を行っているという報告はない。

このような観点から本研究ではまず、MT欠損マウスを用い現在知られているMT誘導条件の中で、最も生理的条件下で十分なMT誘導が認められ、遺伝子発現が劇的に変動していることが予想される新生仔肝臓についてMT欠損により発現変動する遺伝子を検索した。その結果MT欠損により発現上昇する遺伝子2種と発現低下する遺伝子1種を同定した。MT欠損により発現上昇する遺伝子は抗酸化作用に関わっているもので、これらの発現上昇は抗酸化因子であるMTの欠損を補うための代償機構であると考えられる。MT欠損により発現低下する遺伝子は急性期タンパク質（APP）の一つであるcontrapsinであった。MT欠損により発現が低下することからMTの転写活性化機構の存在が示唆された。次に、MTによる転写活性化の因子として重金属応答性の転写因子に着目し、ほ乳類で存在が確認されている唯一のZn応答性転写因子であるMRE-binding transcriptional factor（MTF）－1の可能性について検討した。その結果MT誘導によりMTF－1が活性化されること、また、このMTF－1活性化はMT欠損により消失する事を認めた。MTは炎症時に誘導されるが、APP遺伝子の中にはα_1－acid glycoprotein（AGP）のようなMTF－1支配のものがあるので、この発現について検討したところMT欠損マウスではLPSによるAGP遺伝子発現誘導が低下していることを見いだし、MTがAPP遺伝子発現調節を介して炎症反応を修飾する可能性を示した。そこで実際に炎症時にMTによる発現調節が起こりうるのかをLPS／ガラクトサミンによる急性肝炎モデル動物を用いて検討した。この実験的肝炎はAGP投与により肝障害に先立って起こるアポトーシスの抑制が起こり

保護作用を示すことが知られているが、この肝炎に対してMT欠損マウスがWTより高感受性であることがわかった。また、野生型マウスに比べて、MT欠損マウスでアポトーシスが顕著であったことからMTはAGPと同様の作用機序により保護作用を発揮していると考えられた。

以上の成果はMTの遺伝子発現調節作用が *in vivo* で発揮されていることを初めて示すと共に、遺伝子発現調節を介したMTの生体防御作用発現の可能性を示したもので博士の学位授与に値するものと認める。