

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

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

2001年

木村 朋紀

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

2001年

木村 朋紀

目 次

緒論		1
本論		
第一章 メ	タロチオネイン欠損により発現変動する遺伝子の検索	4
第一節	改良型Differential Display法による遺伝子の検索	4
第二節	小括	9
第二章 メ	タロチオネインによる転写因子MTF-1の活性調節	10
第一節	エンドトキシン投与による肝臓MTF-1のDNA結合活性上昇	
	およびAGP発現誘導へのMTの関与	10
第二節	MREを介するレポーター遺伝子発現へのIL-6の影響	15
第三節	小括	17
第三章 メ	タロチオネインによる遺伝子発現調節を介した生体防御反応	
	急性肝炎モデルを用いた検討-	20
第一節	LPS/GalN惹起致死作用へのZnの影響	21
第二節	LPS/GalN惹起致死作用へのMTの影響	22
第三節	LPS/GalN惹起致死作用関連メディエーターレベルへのMTの	
	影響	24
第四節	LPS/GalNによるPMN集積作用へのMTの影響	27
第五節	LPS/GalN惹起アポトーシス作用へのMTの影響	30
第六節	小括	34
総括		35
結論		38
謝辞		39
引用文献		40

緒論

メタロチオネイン (MT) は重金属結合タンパク質として1957年に Margoshes とVallee によって発見された⁽¹⁾。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。 MTのラジカルスカベンジ能は非常に高く、 MTと 同じSH基を有するGSHの10-100倍であると報告されている⁽²⁾。また、MTはCd、Zn、 Cu等の重金属や活性酸素種(ROS)を産生する化学物質の投与で誘導されることが知ら れている⁽³⁾。このような特徴から近年は、1) MTを生体防御因子と位置づけて重金属 との結合・解毒やフリーラジカル消去に注目する研究、および、2) 新たなMT誘導剤 を検索すると共にMT誘導機序を解明しようとする研究、という二方向からの研究が 行われてきた。MT誘導機序についてはZnに関する解析が最も進んでおり、MT遺伝 子の上流に Zn 応答配列、MRE (metal responsive element) が存在することが示されてい る⁽⁴⁾。また、Zn応答に関与する転写因子、MTF (MRE-binding transcriptional factor)-1も 同定されている⁽⁵⁾。MTF-1のDNA結合活性はZnにより直接活性化され⁽⁶⁾、なおかつ Zn刺激によりMTF-1が核移行する(7)ことが明らかにされており、ZnのMT誘導機序は 分子レベルでの説明が可能となっている。一方、MTはZn以外にも種々サイトカイン ⁽⁸⁻¹¹⁾、グルココルチコイドやレプチン投与⁽¹²⁾により誘導される。この他にもエンド トキシン (LPS) 投与などの実験的起炎刺激時 (13, 14)・新生仔期 (15)・肝再生 (16, 17)・ 担癌 (18, 19)・拘束ストレス (20, 21) など種々の刺激でも誘導される (Table 1)。MTは種々 の条件で誘導されるとともに各種動植物から酵母やカビ類に至るまで広く生物界に 存在が認められることから、MTが生体内でこれまでに知られていない重要な役割を 果たしている可能性が考えられる。また、1993年にMichalskaおよびChoo ⁽²²⁾、1994年 にMastersら(23)によってMT欠損マウスが相次いで作製された。これらマウスは正常 に成長・繁殖するもののMichalskaおよびChooが作製したMT欠損マウスの一部には体 重増加に異常が認められると報告されている⁽²⁴⁾。この報告もまた、生命活動におけ るMTの重要性を示唆している。

MTは細胞質タンパク質であり細胞質で重金属結合能およびラジカルスカベンジ能

を発揮して生体防御に関わっていることが示されてきたが、1982年にBanerjeeら(25) とDanielsonら(26)によって相次いでMTの核局在化現象が報告された。現在ではMT核 局在機序の解析が進み、未知の核移行経路を介してMTが積極的に核内に運搬されて いるとする報告(27)や受動拡散で核内に移行したMTが未知の核局在化因子と結合し 核内に保持されるとする報告(28)がなされている。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(29-34)。MTによって活性修飾を受け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等)、および2)レドックス制御を 受けるもの(NF-ĸB)の2種があり、MTのDNA結合活性修飾作用を示す実験系はともに 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 (electrophoretic mobility shift assay; 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にとどまっている。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。しかし

Table 1 Summary of MT-inducing agents and conditions

Chemicals				
Heavy metals	Cd, Zn, Cu, Hg etc.			
Oxidative stress	t-butylhydroperoxide, paraquat etc.			
Anticancer agents	cisplatin, doxorubicin etc.			
Hormone	glucocorticoid, leptin			
Cytokines	interleukin (IL)-1, IL-6 tumor necrosis factor (TNF)- α interferon			
Conditions	Postulated mediator			
Acute phase	IL-6			
Hepatic development	glucocorticoid			
Hepatic regeneration	IL-6			
Restraint	glucocorticoid			

ながら、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 (35,36)、 および 新生仔期 (37) 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欠損マウスを利用し、MTの遺伝子発現調節作用が in vivo で発揮されることを示した。さらに、遺伝子発現調節を介したMTの生体防御作用について興味ある知見を得たのでここに学位論文としてまとめた。なお、現在では MTとして4つの分子種 (MT-I、II、III、IV) がクローニングされている^(3, 38, 39)。これらのうちMT-I、IIが肝臓、腎臓、消化管、上皮系組織および脳をはじめとする生体内諸組織に広く存在する主要分子種である。他の分子種、すなわち、MT-IIIは脳および睾丸で、MT-IVは舌や皮膚の上皮細胞で組織特異的に発現している。これら分子種のうち、本研究ではMT-I、IIを対象とした。

本 論

第一章 メタロチオネイン欠損により発現変動する遺伝子の検索

MTにより遺伝子発現調節作用を受ける可能性が指摘されている転写因子は、Znフィンガーを有するSp1、TFIIIA、エストロゲンレセプター、およびレドックス制御を受けるNF-κBなどと多岐にわたる。しかしながら、これら転写因子の標的遺伝子の発現までを観察した例はなく、動物の個体レベルでの検討も行われていない。また、上記Znフィンガーを有する転写因子の活性をMTが修飾するとの報告はすべてMTをZnキレーターとして非生理的条件で作用させているに過ぎず、MTの生体内での機能を反映しているか疑問である。そこでMT誘導を遺伝子発現を調節するための生体応答であるととらえ、MTタンパク質レベルが劇的に上昇する新生仔肝臓にターゲットを絞りMT欠損により発現変動する遺伝子を検索した。

第一節 改良型Differential Display法による遺伝子の検索

従来、発現量に差のある遺伝子スクリーニングする手法としてサブトラクション 法やDifferential Display (DD) 法が用いられてきた (40,41)。これらの方法は優れた手法 ではあるがサブトラクション法は遺伝子群すべてを網羅している反面、詳細に差を とらえるには不向きであり、一方、DD法は微細な差をとらえることが可能であるが 遺伝子群の全体像を把握することが不可能であるなど、種々の欠点も指摘されている。本研究では遺伝子群すべてを網羅し、なおかつ微細な差をもとらえることが可能である改良型DD法(42)をスクリーニング法に採用した。

第一項 実験材料および実験方法

実験動物

MT-I, II遺伝子欠損マウスおよびその対照マウス(129/Svマウス)はJackson Laboratory (Bar Harber, ME, USA) から購入し、クローズドコロニーとして飼育・維持した。飼育は12時間ごとに明/暗が切り替わる23-24°Cに保たれた動物飼育室内で行い、実験動物用固形飼料(CE-2; 日本クレア, 大阪)と水は自由に摂取させた。雌性マウス3匹を妊娠するまで雄マウス1匹と同一ケージで飼育・交配した。マウスは出生日を0日齢と定義した。

改良型Differntial Display法

改良型Differential Display (DD) 法はKohroki らの方法に準じて行った⁽⁴²⁾。以下、操作を簡略に記す。7日齢の野生型およびMT欠損マウスから抽出した total RNA をオリゴdTプライマー(TEP; 5'-GCG AGT CGA CCG TTT TTT TTT TTT TTV N-3')を用いて逆転写し、2本鎖cDNAを合成してSau3AIで完全消化した。このようにして得た断片に2本のオリゴヌクレオチド(5'-CGG GTA AGG GGT CGA CAT GAG TGT-3', 5'-GAT CAC ACT CAT GT-3')から成るアダプターを連結した。アダプター連結cDNA断片を3'側に任意の2塩基を付加した FITC 標識 TEP とアダプタープライマー(AEP; 5'-GTC GAC ATG AGT GTG TGA TCNN-3')とでPCRを行い、その付加配列に相補的な2塩基を持つcDNA断片のみを増幅した。PCR反応生成物を6%変性アクリルアミドゲルで分離、FluorImager™(Molecular Dynamics, Sannyvale, CA, USA)で検出した。

サブクローニングと同定

バンドをゲルから切り出し再増幅後 pBluescript II にクローニングし、配列を決定した。BLASTプログラムを利用し、GeneBank/EMBL/DDBJデータベースとの相同性を検索した。

Northern blot 解析

3, 7, 21日齢および8週齢の野生型およびMT欠損マウスから抽出した total RNA を 10%ホルムアルデヒド含有 1.0%アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンメンブラン (Hybond-XL; Amersham Pharmacia Bioteck AB, Uppsala, Sweden)にトランスファーした。

クローニングしたDD断片を $[\alpha^{-32}P]$ dCTP (111TBq/mmol; Amersham Pharmacia Bioteck) を用いて標識し、プローブとして使用した。内部標準としてマウス 18S rRNA を検出し、プローブとして165bpから203bpまでの領域を用いた。

第二項 実験結果および考察

MT欠損マウスとその対照マウスの7日齢肝臓で発現に差のある遺伝子を改良型 DD 法により検索した結果、MT 欠損により発現変動する 5 種のクローンを得た (Fig. 1)。本実験で用いたMT欠損マウスの変異型 MT-I、II遺伝子には終止コドンをコードする配列が挿入されている。改良型DD法で用いた制限酵素 (Sau3AI) の認識配列の3'末端側に挿入配列がある変異型 MT-I は、理論上野生型 MT-I 遺伝子由来のバンドと異なるサイズのバンドとして検出される。変異型 MT-II は挿入配列が制限酵素認識配列の5'末端側にあり、本実験では同一サイズのバンドとして検出されることが予想される。各クローンの塩基配列を決定しデータベースに登録されている遺伝子とのホモロジー検索を行った結果、バンド1324AおよびBはそれぞれ、変異型MT-Iおよび野生型MT-Iと99%の相同性が認められた (Table 2)。理論通り2種のバンドが得られたこ

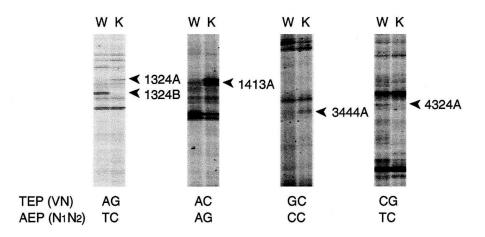


Fig. 1. Electrophoretic gel display of improved DD. Adapter-ligated 3'-end cDNA fragments were synthesized from 10 μg of total RNA isolated from wild type (W) and MT-null (K) mice, and the fragments were subjected to DD-PCR. PCR products were separated by PAGE and visualized by FluorImagerTM. Variable bases of TEP and AEP are indicated at the bottom of each lane.

とより、本実験系の検出能力が確認された。MTタンパク質レベルは3日齢、7日齢ともに高レベルであり、その後徐々に減少し、21日齢で最大値の1/5-1/10、8週齢で1/10-1/20に低下する(43)。DD法は7日齢のマウスを用いて行ったが、Northern blot法によりこれら発現の差が週齢を追うごと減少する傾向を認めた(Fig. 2)。すなわち、MT発現量が高い時期にMT欠損の影響が強く現れるという結果を得た。

Table 2 Summary of clones identified by improved DD in MT-null mice

Clone	Change of gene expression ^a	Homology	Accession No.
1324A	↑	metallothionein-l (323/345: 94%) ^b	V00835
1324B	\downarrow	metallothionein-I (323/324: 99%)	V00835
1413A	↑	transketolase (121/124: 97%)	U90889
3444A	↑	vanin-3 (183/183: 100%)	AJ132103
4324A	1	contrapsin (245/247: 99%)	X55147

^a Up arrows indicate gene expression up-regulated in MT-null mice compared with wild-type mice; down arrows indicate gene expression down-regulated in MT-null mice compared with wild-type mice.

MT欠損によりシグナル強度が上昇するバンド、 1413A、3444Aはそれぞれ、 transketolase、vanin-3と95%以上の相同性が認められた (Table 2)。Transketolaseはペントースリン酸経路を構成する酵素の一つである。本経路はペントースを生合成するとともに細胞内で還元剤として作用するNADPHを再生する経路でもある。Vanin-3はそれ自体の機能は不明であるが、2000年、同じファミリーのvanin-1がパントテン酸をリサイクルし、システアミンを生合成する pantetheinaseであると報告された (44)。 Vanin-3 は vanin-1 の GPI (グリコシルホスファチジルイノシトール) アンカー構造欠失体であり、アンカー構造以外の領域の配列はvanin-1と相同性が高い (45,46)。このよ

^b The sequence of 1324A closely corresponds to that of MT-I mutant (343/345: 99%) oligonucleotide inserts (5'-CCG GAT AGG TAC CAA TTA T-3') encoding in-frame stop codons.

うな構造的特徴から、vanin-3はvanin-1と同様のpantetheinase活性を有していると考えられる。Pantetheinaseにより生合成されるシステアミンもNADPH同様、抗酸化作用を有する分子である。つまり、MTという抗酸化因子の欠損により抗酸化作用に関連した現象であるNADPH再生とシステアミン合成が亢進している可能性が示された。これら2遺伝子の発現変化はMT欠損に対する代償機構と考られる。胎仔・新生仔のMT誘導機序に関しては研究がほとんど進んでいない。唯一の知見は1986年のQuaifeらの報告である(15)。彼らは 1) 母体側への metyrapone 投与により血中グルココルチコイドレベルを低下すれば胎仔の肝臓 MT mRNA レベルが低下すること 2) グルココルチコイド応答配列を欠失したMTプロモーターの活性化が胎仔期に認められないことから、胎仔・新生仔MT誘導のメディエーターがグルココルチコイドである可能性を示している。一方、新生仔肝臓MT誘導の意義に関する知見は皆無である。本節の結果から考えられる、MT欠損に対する代償機構の存在は新生仔肝臓 MTが抗酸化因子として作用していることを示唆する初めての例である。

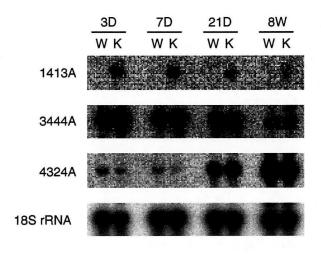


Fig. 2. Northern hybridization of MT-regulated genes during development. Total RNAs were isolated from gestational 3, 7, 21 days and 8 weeks of age in wild type (W) and MT-null (K) mice. Clones corresponding to bands 1413A, 3444A and 4324A were used as probes for transketolase, vanin-3, and contrapsin, respectively.

MT欠損によりシグナル強度が減少するバンド4324Aは血漿セリンプロテアーゼインヒビターのcontrapsinと99%の相同性が認められた。ContrapsinはMT同様、急性期に誘導される。Contrapsin 遺伝子の上流配列はいまだ決定されておらず、どの様な転写因子により発現調節されているのか等の情報が不足しているが、 MT欠損によりcontrapsinの発現が低下することからMTによる転写活性化機構の存在が予想される。

第二節 小括

本章では、新生仔期にMT欠損により発現変動する遺伝子を見いだした。本研究が動物の個体レベルでMT欠損により発現変動する遺伝子を示した初めての例である。MTはヒトをはじめ各種動植物から酵母や微生物に至るまで広く存在が認められることから生命活動に必須のタンパク質であると考えられていたが、その遺伝子欠損マウスが正常に成長・繁殖すると報告された(22, 23)。この報告を受け、多くの研究者は何らかの代償機構によりMT欠損による障害がレスキューされていると考えた。例えば、Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) 欠損マウスは MT-I, II の発現が亢進している(47)。これはCu/Zn-SOD欠損による抗酸化能力の低下をMTが補っているものと思われる。しかしながら、MT欠損マウスが作製されて6年経つ現在に至っても、MT欠損の代償機構の存在は示されなかった。本章で同定したMT欠損により発現上昇する2種遺伝子は、ともに抗酸化作用と関連のある遺伝子であった。本研究は動物の個体レベルでMT欠損により発現変動する遺伝子を示しただけにとどまらず、MT欠損の代償機構の存在を示唆した初めての例である。

上述の遺伝子に加えてMT欠損により発現が減少する遺伝子も同定した。この遺伝子は急性期タンパク質 (acute phase protein; APP) の一つ、contrapsin であった。急性期もまた新生仔期同様、MTが高発現する時期である。MTが急性期に APP 遺伝子の発現を調節するという現象の発見は今まで全く未知であった急性期反応 (acute phase reaction; APR) におけるMTの作用を明らかにする手がかりになると期待される。

第二章 メタロチオネインによる転写因子MTF-1の活性調節

第一章ではMT欠損により発現低下する遺伝子として APPであるcontrapsinを同定し、 MTによる遺伝子発現亢進機構の存在を示唆した。 Contrapsin遺伝子の解析はほとん ど進んでおらず、プロモーター領域の配列や転写制御に関与する転写因子に関する 情報は皆無である。しかしながら、多くの場合遺伝子の発現亢進は転写活性化の結 果である。本現象もMTによる転写因子活性化作用に基づいた現象である可能性を考 えて検討を行った。MTはZn結合タンパク質であるとともにラジカルスカベンジ能を 有していることから、MTによる活性調節を受ける転写因子の候補として 1) Znフィ ンガーを有するもの、および 2) レドックス制御を受けるものの 2 つが挙げられる。 このうちレドックス制御を受ける転写因子であるNF-κBやAP-1などはその活性が細 胞内酸化状態の亢進により増加する (48)。 Contrapsin は MT 欠損により発現が低下す る遺伝子であり、MT欠損によって細胞内酸化状態が亢進していると考えると転写因 子の活性と遺伝子発現レベルが一致しない。一方、Znフィンガーを有する転写因子 はZnとの結合によって活性型となる。MT誘導に関連して細胞内Zn量が増大すること は周知の事実であり(37,49)、MT欠損による細胞内Zn量の低下がMT欠損による遺伝子 発現の低下を引き起こすことが想定される。本章では、MTによるZnを介した遺伝子 発現調節機構の存在を示すことを目的とした。

第一節 エンドトキシン投与による肝臓MTF-1のDNA結合活性上昇、およびAGP発現誘導へのMTの関与

培養細胞および動物の個体レベルで重金属応答性の転写因子として現在までに報告されているものは、MTF-1 (重金属応答性; 哺乳動物に発現)、Ace1 (Cu応答性; 酵母に発現) (50)、およびZap1 (Zn応答性; 酵母に発現) (51) の3種であり、哺乳動物において存在が確認されているものはMTF-1のみである。ただし、ヒトMTF-1には1アミノ酸変異体が存在し、それぞれMTF-1 (別名MTF-1a)、ZRF (zinc regulatory factor; 別名MTF-

1b)と呼ばれている $^{(52)}$ 。また、MT誘導に関連して細胞内 $^{(52)}$ の事実である $^{(37,49)}$ 。第一章で、APPの contrapsin を MT欠損により発現低下する遺伝子として同定したので、MT誘導刺激としてAPRを惹起するエンドトキシン(LPS)を用い、MT誘導の結果起こる細胞内 $^{(52)}$ の増加がMTF-1の活性化を介して遺伝子発現を亢進する可能性を検討した。

第一項 実験材料および実験方法

動物実験

MT-I, II遺伝子欠損マウス (遺伝的背景は129/Sv) はJackson Laboratory、C57BL/6J マウスは日本クレア (大阪) から購入した。MT 欠損マウスとC57BL/6Jマウスを交配して得た129/Sv× C57BL/6J マウス同士をさらに交配し、その同腹仔を実験に用いた。MT遺伝子の分析はMT-I遺伝子を破壊するために挿入した DNA配列を含む領域をPCRにより増幅し (センスプライマー; 5'-CAC GAC TTC AAC GTC C-3'、アンチセンスプライマー; 5'-CGG TCC CAA CTT GGT A-3')、その増幅産物のサイズをポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析することにより行った。飼育は12時間ごとに明/暗が切り替わる23-24°Cに保たれた動物飼育室内で行い、固形飼料 (CE-2) と水は自由に摂取させた。

野生型およびMT欠損マウス (8-12週齡, 雌性) に LPS (from *Escherichia coli* O26:B5; Difco, Detroit, MI, USA) を1.0 mg/kg、腹腔内投与した。投与24時間後にエーテル麻酔下、肝臓を摘出した。Total RNAを抽出するために肝臓の一部を使用し、残りは核抽出液の調製とMT定量に用いた。MT濃度は¹⁰⁹Cd/ヘモグロビンアフィニティーアッセイにより測定した⁽⁵³⁾。

核抽出液の調製およびゲルシフトアッセイ

核抽出液はDaltonらの方法に従って調製した⁽⁵⁴⁾。本操作はDTT (1 mM)、PMSF (1 mM)、ロイペプチン (1 μg/ml)、ペプスタチンA (1 μg/ml)、アンチパイン (0.3 μg/ml) 存在下で行った。 ゲルシフトアッセイ (EMSA) の結合反応は、 結合緩衝液 (12 mM

HEPES, pH 7.9、5 mM MgCl₂、60 mM KCl、0.5 mM DTT) に 2 μg poly(dI-dC)、5-10 fmol ³²P標識MREsオリゴヌクレオチド (upper strand; 5'-GAT CCA GGG AGC TCT GCA CAC GGC CCG AAA AGT A-3')、核抽出液 (タンパク質 20 μg 相当量)を加え、最終容積を 20 μl として行った。氷冷下30分のインキュベート後、タンパク質-DNA 複合体を 6% 非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (15V/cm, 4°C)し分離した。ゲルは乾燥後、標識複合体をBAS system (フジフィルム,東京)により検出した。また、競合実験には変異型 MREs (mutMREs; upper strand; 5'-GAT CCA GGG AGC TAA TTA CTC CGC CCG AAA AGT A-3') および Sp1 オリゴヌクレオチド (upper strand; 5'-GAT CCC GGC CCC GCC CAT CCC CGG CCC CCC CCC A-3') を用いた。

Northern blot解析

第一章、第一節に準じて行った。 α_1 -酸性糖タンパク質 (AGP) のプローブとしてマウスAGP-1 cDNAの451bpから613bpまでの領域を使用した。

第二項 結果および考察

急性期のMT誘導がMTF-1活性の上昇をもたらすことを示す目的でMT欠損マウスを用いてLPS投与後のMTF-1のDNA結合活性をEMSAにより検討した。野生型マウス肝臓から調製した核抽出液と32P標識MREsとを混合することにより得られる移動度の小さいバンドは200倍の非標識プローブ自身では競合されたが、非標識 mutMREs および Sp1 では競合されなかった (Fig. 3C)。EMSAにおいて、プローブと結合しているタンパク成分を同定するには抗体によるスーパーシフトバンドを観察するのが通例である。しかしながら、現在のところ MTF-1/MREs複合体をスーパーシフトするMTF-1抗体の報告はない。MREsに結合するタンパク質としては唯一MTF-1が知られいること、および先述のバンド成分がMREsに特異的に結合していたことから、前述のバンドはMTF-1/MREs複合体バンドであると考えた。野生型マウスではLPS投与24時間後にMT誘導およびMTF-1のDNA結合活性の増加が認められた (Fig. 3A, B)。このMTF-1活性化はLPS投与による肝臓Zn含量の増加によるものであると考えられるが、

MTF-1は重金属以外に酸化的ストレスでも活性化される (54,55)。LPS投与は肝臓Zn含量を増加する一方で酸化的ストレスを惹起する (56) ことから、野生型マウスで認められたMTF-1活性化がLPS投与による酸化的ストレスに起因する可能性もある。しかしながら、MT 欠損マウスでは LPS 投与による MTF-1活性化が認められなかった (Fig. 3A)。LPS投与によりMT欠損マウスは野生型マウス同様、もしくはそれ以上の酸化的ストレスにさらされるものと考えられる。したがって、野生型マウスで認められたMTF-1活性化は、MT誘導の結果として増加したZnによるものであると考えられる。

次に、本条件下でMTF-1支配のAPPの発現がMT欠損による影響を受けることを確認するためMTF-1支配のAPPの発現をNorthern blot 法により調べた。Contrapsin 遺伝子の解析はほとんど進んでおらず、プロモーター領域の配列や contrapsin 遺伝子発現に関与する転写因子に関する情報はない。そこで、プロモーター領域に MRE配列がある急性期タンパク質のひとつ、AGPの発現をNorthern blot 法により調べた。その結

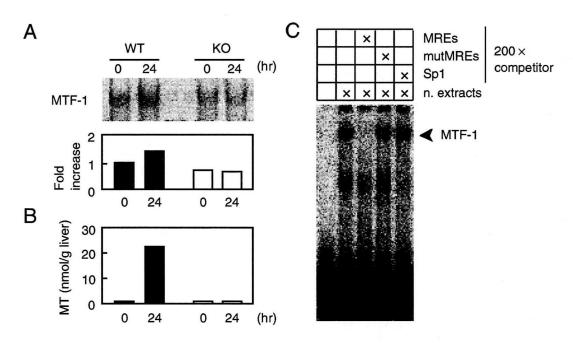


Fig. 3. Effects of LPS on MTF-1 DNA-binding activity and MT level in wild type and MT-null mice. Wlid type (WT) and MT-null (KO) mice were administrated LPS (1.0 mg/kg, *i.p.*). A, Nuclear extracts from liver were prepared and analyzed by EMSA. Graph indictes the quantification of MTF-1 DNA-binding band. B, Hepatic MT concentrations were measured by ¹⁰⁹Cd/hemoglobin affinity assay. C, Competition of MTF-1 specific binding were performed by 200-fold molar excess of non-labeled oligonucleotides. These experiments were repeated 3 times independently, and similar results were obtained. The results of one representative experiment are shown.

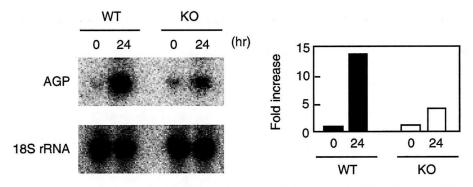


Fig. 4. Effect of LPS on AGP mRNA level in wild type and MT-null mice. Wlid type (WT) and MT-null (KO) mice were administrated LPS (1.0 mg/kg, *i.p.*). Total RNAs were then isolated and analyzed by Northern blot analysis. A nucleotide 451-613 of the mouse AGP-1 cDNA sequence and a nucleotide 165-203 of mouse 18S rRNA were used as mouse AGP and 18S rRNA probes, respectively. Graph indictes the quantification of the AGP mRNA levels. Intensities of the AGP mRNA signals were normalzed with those of 18S rRNA-derived signals. This experiment was repeated 3 times independently, and similar results were obtained. The results of one representative experiment are shown.

果、野生型、MT欠損マウスで定常状態での発現は同レベルであったが、LPS投与24 時間目においてAGP発現に差が認められた (Fig. 4)。野生型マウスではLPS投与によ りAGP発現が約14倍に増加したが、MT欠損マウスでは約4倍の増加に過ぎなかった。 本遺伝子は急性期においてMT欠損により発現低下する遺伝子であるにも関わらず、 第一章では新生仔期にMT欠損により発現変導する遺伝子として検出されなかった。 第一章でスクリーニング法として用いた改良型 DD法はcDNAを制限酵素で完全消化 して生じる3'末端側断片をPCRで増幅して検出する。したがって、本法は3'末端側断 片が極端に短くなる遺伝子は検出不可能であるという欠点を有している。本法で用 いる制限酵素は4塩基認識のSau3AIであるので平均サイズ 256 bpの断片が生じるが、 AGP遺伝子は 24 bpの3'末端断片を生じる。このためにAGPがMT欠損により変化す る遺伝子として検出されなかったのではないかと考えられる。 AGP誘導はLPS刺激 によりマクロファージ系細胞などから産生された IL-6が肝実質細胞に作用すること により起こる。したがって、MT欠損マウスにおいてIL-6産生やIL-6応答性が低下し たために急性期にMT欠損によりAGP発現が低下した可能性も考えられる。しかしな がら、RofeらはMTF-1支配ではないAPPの一つ、フィブリノーゲン発現のLPS応答性 が野生型、MT欠損マウスで差が認められなかったと報告している(57)。これらを総

合すると、急性期に認められるMT誘導の結果起こる肝臓Zn含量の増加がMTF-1 DNA 結合活性を上昇し、遺伝子発現を活性化すると考えられる。

第二節 MREを介するレポーター遺伝子発現へのIL-6の影響

第一節では急性期のMT誘導に関連してMTF-1が活性化される可能性を示した。しかしながら、LPSは多様な生理作用を有するため前節の検討のみではLPSのMT誘導以外の作用がMTF-1活性化を引き起こしている可能性を否定できない。そこで、マウス個体レベルではなく細胞レベルで同様の現象が認められるかどうか検討した。

第一項 実験材料および実験方法

試薬

リコンビナントヒトIL-6 (rhIL-6; 5.2×10^6 U/mg) は中外製薬株式会社より供与いただいた。

細胞培養と遺伝子導入

ヒト肝癌細胞、HepG2 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS; Filtron, Brooklyn, Australia) 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM; 日水製薬,東京) にて維持・継代を行った。遺伝子導入はリン酸カルシウム法により行った。遺伝子導入後、 12時間培養し、その後 rhIL-6 (500U/ml) とデキサメタゾン (Dex; 1 μM) で24時間処理した。細胞溶解液を調製し、溶解液中のルシフェラーゼ活性をルミノメーター (EG & G Berthold, Bed Wildbad, Germany) で測定した。ルシフェラーゼ活性はタンパク含量で補正した。また、細胞内MT濃度は109Cd/ヘモグロビンアフィニティーアッセイにより定量した(53)。

プラスミドの構築

遺伝子導入に用いる プラスミドは minimal SV40 プロモーターを持つベクター、

PGV-P2 (東洋インキ,東京) から構築した。MRE支配のレポーター遺伝子はSV40プロモーターの上流に MREd (マウスMT-Iプロモーターの-160bpから-128bpまでの領域) 配列を4コピー連結することにより得た。すべてのプラスミドは常法に従い増幅し、塩化セシウム密度勾配遠心法により精製した。

第二項 結果および考察

急性期MT誘導の最終的なメディエーターであるIL-6(14)がMTF-1活性化をもたらす ことをPGV-P2 MREd4 の一過性発現系を用いて解析した。本節でMRE配列として用 いた MREd はマウス MT-I プロモーター領域中、最大のZn応答性を示すと評価されて いるMRE配列である⁽⁴⁾。また、PGV-P2 MREd4 が Zn 応答性を示すことは確認済であ る。IL-6の24時間処理によりMTタンパク質は約1.4倍に誘導された (Fig. 5C)。SV40 プロモーターのみを連結したレポータープラスミド (PGV-P2) の活性は IL-6 による 影響を受けなかったが、PGV-P2 MREd4は IL-6 によって約2倍の活性化が認められた (Fig. 5B)。本節の検討により、急性期 MT 誘導の最終的なメディエーターである IL-6 の直接作用によりMRE活性化がもたらされることが明らかとなった。 IL-6シグナル にはRas依存経路と非依存経路の2経路が存在する。Ras依存経路ではIL-6刺激後Ras 依存性 MAP kinase カスケードによって転写因子NF-IL6がリン酸化を受けて転写が促 進される(58)。Ras非依存経路ではSTAT (signal transducers and activators of transcription) 3 が JAK (Janus kinase) により直接リン酸化を受け、ホモダイマーを形成して転写活 性可能を獲得することにより転写が活性化される(59)。このようにIL-6は多岐にわた る遺伝子の発現を誘導する。MT誘導はIL-6の転写活性化作用の一つに過ぎず、本節 の結果のみではMT誘導とMRE活性化が関連した現象であるとは言い切れない。しか しながら、本節の結果は少なくともMTF-1活性化がIL-6を介した現象であることを示 唆している。また、LPSによりMTF-1が活性化され、この活性化がMT欠損により消 失するという前節の結果と総合すると、急性期MT誘導がMTF-1活性化を引き起こし ていると考えられる。

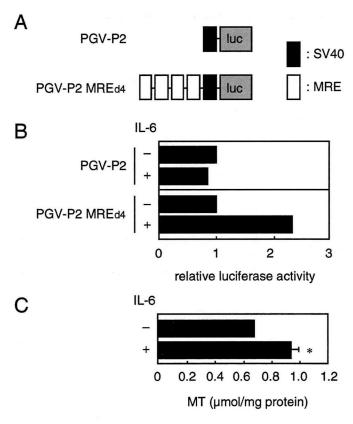


Fig. 5. Effect of IL-6 on MRE-drived gene expression in HepG2 cells. A, schematic representation of the reporter plasmid. B, relative luciferase activities in HepG2 cells transiently transfected with PGV-P2 or PGV-P2 MREd4 C, MT concentrations in HepG2 cells. These cells were treated with rhIL-6 (500 U/ml) plus Dex (1 μ M). These experiments were repeated 3 times independently, and similar results were obtained. The results of one representative experiment are shown. *Significantly different from control group (p < 0.01).

第三節 小括

本章の結果は急性期のMT誘導がMTF-1活性化をもたらすことを示唆している。MT 誘導に付随して細胞内Zn量が増大すること (37,49) から、MT誘導の結果引き起こされ る細胞内Zn量の増加がMTF-1の活性化を介して遺伝子発現を亢進するというモデル を考えた (Fig. 6)。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 の上昇を引き起こす。 その結果として細胞内の Zn プールが増加し、

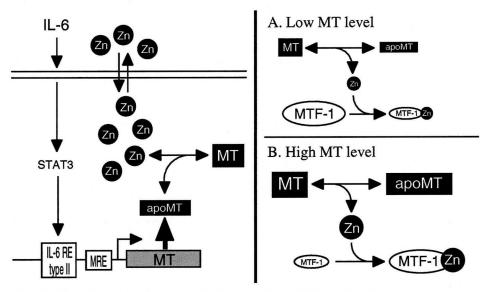


Fig. 6. Postulated mechanism of MT-mediated MTF-1 activation during acute-phase reaction.

MTF-1が活性化される、というモデルである。

MTF-1は6個の連続した C2H2型Znフィンガーを有しており、この領域が DNA結合 部位であることが示されている $^{(60)}$ 。 この Zn フィンガーのうち N 末端側の 4 つのZn

Table 3 Comparison of the MRE in the promoters of the MTF-1 targeting genes

Gene	MRE sequence and location		
MRE core sequence	TGCRCN		
MT-I (mouse)	-174 CTGTGCACACTG -163		
	-149 CTCTGCACTCCG -138		
	-131 AAGTGCGCTCGG -120		
	-56 GTTTGCACCCAG -67		
	-54 CTTTGCGCCCGG -43		
Zn transporter-1 (mouse)	-103 GTCTGCAAAGGA -92		
	-122 GAGTGCAAAGCA -111		
γ-glutamylcysteine synthetase (human)	-132 CCTTGCACACGC -127		
Cu/Zn-SOD (rat)	-277 CCAGGCGCGCAC -267		
AGP-1 (mouse)	-592 CTGTGCACAGAC -581		
	-149 AGCTGCACAAAG -138		
C-reactive protein (mouse)	-210 TTTTGCTTCCCT -199		

フィンガーは通常の DNA 結合に関与し、C 末端側の 2 つの Zn フィンガーが Zn によ る活性制御に関わっていると考えられている (61,62)。 また、 細胞あるいは動物の個 体レベルで MTF-1 を活性化する刺激としては重金属と酸化的ストレス $(H_2O_2, t$ butylhydroquinone) が知られていた (54,55)。一方、MT 遺伝子発現上昇が MTF-1 を活 性化することを示唆する知見は本章で記述した以外に Palmiter の報告がある (63)。彼 はハムスター腎臓細胞株 BHK 細胞に MT-I 遺伝子発現ベクターと MRE をプロモー ター領域に連結したレポータープラスミドとを安定発現し、各種濃度の Zn 存在下で の MRE 活性を評価した。培地中の Zn 濃度が 10 μM という生理的条件下における MRE 活性はコントロール細胞で最大活性の 1% 未満であるのに対し、MT-I 発現細胞 で約 10% であったと報告している。MTF-1 支配遺伝子には MT 以外に数種の遺伝子 がある (Table 3)。 Znを細胞内から外へ汲み出すトランスポーターであるZn transporter-1⁽⁶⁴⁾、細胞内レドックス環境の維持に関わる γ-glutamylcysteine synthetase⁽⁶⁵⁾と Cu/Zn-SOD (66)、APP である AGP と C-reactive protein (67)である。1) MTが急性期に誘導され ること、2) MTF-1がAPPの発現を調節していること、3) 新生仔期にMT欠損が Zn に より発現上昇する APP、 contrapsin の発現を低下することなどから MT 誘導の結果引 き起こされる細胞内 Zn 量の増加が MTF-1活性化を介して遺伝子発現を亢進するとい うモデルの妥当性がうかがえる。また、MTF-1が急性期にも活性化されることを示 したことにより、MTF-1が重金属および酸化的ストレス防御システムに関わるだけ でなく炎症反応にも関与する可能性を示したものと考える。

第三章 メタロチオネインによる遺伝子発現調節を介した生体防御反応 -急性肝炎モデルを用いた検討-

MTが急性期に、特に肝臓で誘導されて肝臓Zn量を増加することは古くから知られていた。しかしながらその生理的意義に関しては、1) Znを肝臓に集積しZn酵素などにZnを供給するため 2) 炎症反応に伴う酸化ストレスに対抗するためなどの説が提唱されてきたが、いづれも仮説の域を出ていない。この領域の報告は、1996年のRofeらによるものが唯一である(57)。彼らは「MT欠損により急性期の糖代謝変化に対する対応能が低下する」と報告しており、糖代謝に関わるZn酵素へのZn供給の不足がこの現象の原因ではないかと考察した。MTがZn酵素の活性を修飾する可能性は以前から指摘されており、aldoraseや carbonic anhydrase 活性への MT の修飾作用が in vitro実験系で調べられている(68)。一方、APPは何らかの形で炎症反応を調節すると考えられている。しかしながら、その意義が明確に示されている例は少なく、マウスにおいてはAGPに限られる。AGPはグラム陰性菌感染に対して防御的に作用する(69)とともに急性肝炎モデルにおいて生体防御作用を担っている(70)ことが示されている。LPSとD-ガラクトサミン(GalN)の同時投与は肝臓のネクローシスを誘導し、個体を

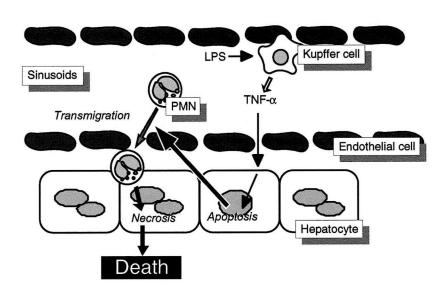


Fig. 7. Postulated mechanism of LPS/GalN-induced liver injury and lethality.

死に至らしめる急性肝炎モデルである⁽⁷¹⁾ (Fig. 7)。この際のメディエーターはTNF-αとされている⁽⁷²⁾。LPS刺激によりクッパー細胞など、マクロファージ系細胞から放出されたTNF-αは肝臓の実質細胞に作用しアポトーシスを引き起こす⁽⁷³⁾。このアポトーシスが引き金となり、好中球 (polymorphonuclear leukocytes: PMN) がシヌソイドから組織側へと浸潤する⁽⁷⁴⁾。PMNはROSを放出し肝臓を障害する。AGPはこのモデルにおいてアポトーシスを抑制することにより、後に起こるネクローシスを防ぐことが知られている。したがって、AGP発現の低下は、LPS/GalN惹起致死および肝障害感受性を亢進することが予想される。本章では、MT欠損によるZn動態の変化がもたらすAPP遺伝子発現の低下が生体に及ぼす影響を検討した。

第一節 LPS/GalN惹起致死作用へのZnの影響

MT誘導によりAGP発現レベルが上昇する原因のひとつと考えられる肝臓Zn量の増加がLPS/GalN惹起致死作用を軽減しうるかどうか検討した。

第一項 実験材料および実験方法

動物実験

実験動物は第一章、第一節に準じた。

C57BL/6Jマウス (8-10週齢, 雄性) にZn (20 mg/kg, s.c.) 投与し、その3時間後に LPS (5 μg/kg) とGalN (700 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO, USA) を腹腔内投与した。生存率を LPS/GalN投与24時間後まで観察した。

統計分析

生存率はKaplan-Meier法 (Product-limit法) により累積生存率を算出し、logrankテストによって有意差検定を行った。p < 0.05 を統計学的有意とした。

第二項 結果および考察

Zn投与はLPS/GalN 惹起致死作用を軽減した(Fig.8)。なお、予備実験によりLD₈₀となるLPS投与量を決定し、この条件で実験を行った。本結果は肝臓 Zn量の増加および、これに続くMTF-1活性化・AGP発現上昇がLPS/GalN 惹起致死作用を軽減しうる可能性を示している。しかし、Zn投与は肝臓Zn量のみを増加するわけではなく、各臓器のZn量を増加する。また、Zn自身がMT誘導剤であるとともに抗酸化因子として作用する可能性が報告されていること(75)などを考慮すると、以上の結果から短絡的に結論づけることは危険であると考えている。この危険性を示す例として以下のようなものがある。四塩化炭素は代謝活性化され三塩化炭素ラジカルとなり肝障害を引き起こす(76)が、この障害はZn前投与により軽減できる(77)。ZnがMTを誘導すること、および、MTがラジカルスカベンジ能を有していることからZn前投与による肝障害軽減作用の作用本体はMTであると考えられてきた。しかしながら、著者らの検討によりZn前投与による肝障害軽減作用はMT欠損マウスでも認められた(78)。本項において示したZnによる致死軽減についても上記のような誤認がないよう更なる検討が必要である。

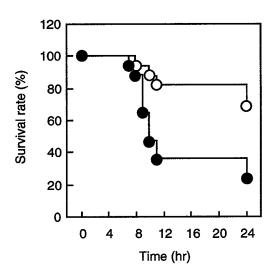


Fig. 8. Prevention of LPS/GalN-induced lethality by zinc. Mice were intraperitoneally given a single dose of LPS (5 μ g/kg) plus GalN (700 mg/kg) 3 hours after administration of saline (\bullet , n = 17) and zinc (20 mg/kg, s.c.; \bullet , n = 16). Significant differences were analyzed by the Kaplan-Meier (Product-Limit) method and logrank test. Survival rates in saline and zinc administrated mice were significantly different at p < 0.01.

第二節 LPS/GalN惹起致死作用へのMTの影響

本節では、MT欠損がLPS/GalN惹起致死および肝障害感受性を亢進する可能性について検討を行った。

第一項 実験材料および実験方法

動物実験

実験動物は第一章、第一節に準じた。

野生型およびMT欠損マウス (8-12週齡, 雄性) にLPS (100 μg/kg) とGalN (700 mg/kg) を腹腔内投与し、生存率を24時間後まで観察した。

組織学的観察のため、野生型およびMT欠損マウスをエーテル麻酔下、中性緩衝ホルマリンによる灌流固定を行った。肝臓・肺・脾臓・脳・心臓・腎臓をパラフィン包埋し切片のヘマトキシリン-エオシン染色を行った。

統計分析

有意差検定法は第三章、第一節に準じた。

第二項 結果および考察

Fig. 9 にLPS/GalN投与後の生存曲線を示した。本実験では投与量を野生型マウスで

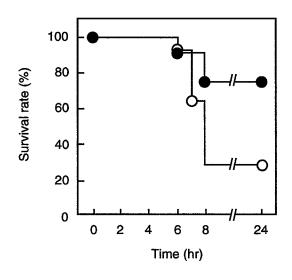


Fig. 9. Survival curve of wild type (\bigcirc , n = 12) and MT-null mice (\bigcirc , n = 14) in response to intraperitoneal administration of LPS (100 µg/kg) plus GalN (700 mg/kg). Survival rates in wild type and MT-null mice were significantly different at p < 0.05.

 LD_{20} となるように設定した。MT欠損によってLPS/GalN惹起致死感受性の亢進が認められた (p < 0.05)。また、LPS/GalN 投与 6 時間後の肝臓の組織像から、野生型およびMT欠損マウスともに肝細胞の肥大 (単細胞あるいは小葉中心性)、空胞化および壊死が観察された (Fig. 10)。肝細胞壊死の病変程度は野生型マウスよりもMT欠損マウスにおいて、より重篤であった。脳、心臓および腎臓に異常は認められなかった。 LPS/GalN投与6時間後に肺の血管周囲性もしくはびまん性の細胞浸潤、脾臓の赤脾髄の萎縮も観察されたが、死亡原因となるような重篤な変化ではなかった。以上の結果は、MT 欠損による AGP 発現の低下が LPS/GalN 惹起肝障害感受性を亢進するという仮説に合致する。

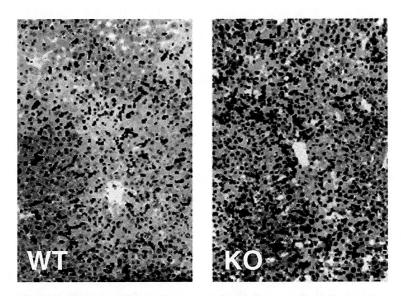


Fig. 10. Hematoxylin and eosin-stained liver section from mice 6 hours after administrated with LPS/GalN.

第三節 LPS/GalN惹起致死作用関連メディエーターレベルへのMTの影響

LPS/GalN惹起急性肝炎モデルの致死メディエーターはTNF-αである⁽⁷³⁾。マクロファージ系細胞のTNF-α産生は転写因子、NF-κBによる制御を受けている⁽⁷⁹⁾。MTがNF-κBの活性を修飾していることが指摘されている^(24, 25)ことから、MT欠損によるLPS/GalN 惹起肝障害感受性亢進は TNF レベルの差に起因しているかもしれない。本節ではこの可能性について検討した。また、このモデルにおける肝障害をメディ

エートする因子として、 $TNF-\alpha$ 以外に一酸化窒素 (NO) $^{(80)}$ および血小板活性化因子 (PAF) $^{(81)}$ が知られている。これら因子の血中レベルに関しても検討を加えた。

第一項 実験材料および実験方法

試薬

リコンビナントマウスTNF-α はPepro Tech, Inc. (Canton, MA, USA) から購入した。 PAF (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine)は Sigma (St. Louis, MO, USA) から入手した。

動物実験

実験動物は第一章、第一節に準じた。

野生型およびMT欠損マウス (8-12週齢, 雄性) にLPS (100 μg/kg) とGalN (700 mg/kg) を腹腔内投与し、エーテル麻酔下採血を行い血清を得た。血漿を得るための採血では抗凝固剤としてヘパリンもしくは1/10容のクエン酸ナトリウム (0.1 M)を使用した。

血清中TNFおよび血漿中NO代謝物の定量

血清中TNFレベルはL929細胞を用いたバイオアッセイで定量した $^{(82)}$ 。NO生成量を評価するため、NO $_2$ $^-$ とNO $_3$ $^-$ 量を測定した。以下に測定法を簡略に記す。NO $_3$ $^-$ は nitrate reductase で NO $_2$ $^-$ に還元し、NO $_2$ $^-$ は Griess 反応に基づいた分光学的測定法で定量した $^{(83)}$ 。

血漿中PAFレベルの定量

血漿PAFレベルはウサギ血小板のセロトニン放出量から評価した。血漿中のPAFは逆相カラム (Amprep Minicolumn; Amersham Intrenational, Bucks, UK) により抽出した⁽⁸⁴⁾。 このPAF抽出液はPAF濃度依存的なセロトニン放出を引き起こすため、ウサギ血小板に添加した⁽⁸⁵⁾。放出されたセロトニンは 0.05% *o*-phthaldialdehyde/ 10% ethanol/8 M HCI と反応させ、生じた蛍光物質を蛍光分光光度計で測定 (Ex; 360 nm, Em; 475 nm)

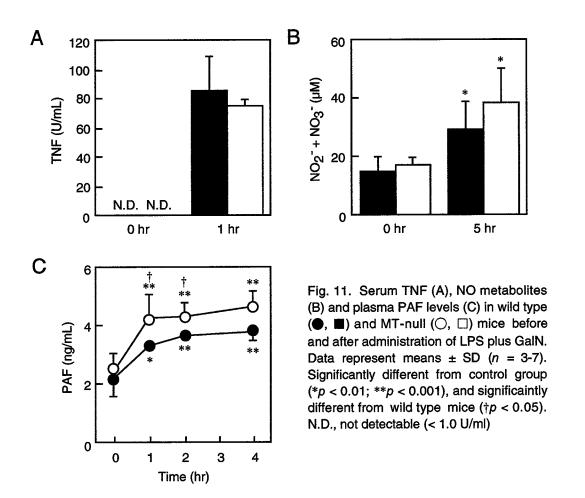
した。

統計分析

有意差検定には ANOVA とポストホックテストとして Fisher's protected least-significant difference テストを用いた。p < 0.05 を統計学的有意とした。

第二項 結果および考察

Fig. 11A に LPS/GaIN 投与後の血中TNFレベルを示した。血中TNFレベルはLPS投与1時間後に一過性のピークを示すことが知られているのでこの時点で測定を行った。その結果、NF-кB制御を受けている TNF 血中レベルに差は認められなかった。 また、投与5時間後において NOレベルにも顕著な差が認められなかった (Fig. 11B)。



LPS/GalN 投与後の NO 合成は主に誘導型の NO 合成酵素である iNOS によるものである⁽⁸⁶⁾。iNOS の発現も NF-кB により制御されている。NF-кB活性とMTとの関係は現在、MTとNF-кBとの相互作用によりNF-кBが活性化されるという結果⁽³²⁾とNF-кB 活性化に必要な細胞内レドックス状態の変化をMTが阻害することによりNF-кB活性を抑制するという結果⁽³³⁾の相反する2つの結果が報告がなされているが、本急性肝炎モデルにおいてMTのNF-кB活性修飾作用が発揮されている可能性は低いと考えられる。血中PAFレベルには有意な差は認められたものの上昇倍率が約2倍に過ぎず、致死感受性の差を説明するには不十分であると考えられる(Fig 11C)。以上の結果より、本モデルにおける致死感受性の差は血中メディエーターレベルの差ではなく、主にこれ以降の段階の差に起因しているものと考えた。

第四節 LPS/GalNによるPMN集積作用へのMTの影響

MTのラジカルスカベンジ能もまた、MT欠損によるLPS/GalN惹起肝障害感受性亢進の原因になり得る。つまり、組織学的観察から LPS/GalN投与したマウス肝臓にPMNが集積・浸潤していることが明らかにされており、PMNが放出するROSが脂質過酸化や細胞脂質機能を破壊し肝障害を引き起こすと考えられている。このため、ROS感受性の差はLPS/GalN惹起肝障害感受性の差としてあらわれる。グルタチオンペルオキシダーゼ(Gpx)-1 は細胞質およびミトコンドリアの主要なグルタチオンペルオキシダーゼ分子種であり、細胞質の抗酸化因子の一因として位置づけられている。このGpx-1遺伝子を欠損したマウスはLPS/GalN惹起致死感受性および酸化的ストレスの亢進は確認されたが他のパラメーター (NF-κB活性など) には差がないと報告されている (87)。MT 欠損マウスも Gpx-1 欠損マウスと同様の機構により本モデルの致死感受性の差があらわれている可能性が考えられる。そこで ROS産生以前の段階である、肝臓へのPMN集積までの段階に差が認められるかを検討した。なお、以後の検討はマウスの系統を 129/Sv から LPS に対する感受性の高い 129/Sv × C57BL/6J に変更して行った。本変更に先立って投与量をLPS 50 μg/kg、GalN 700 mg/kg とした際に

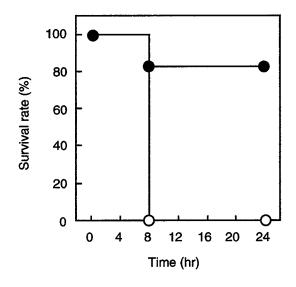


Fig. 12. Survival curve of wild type (igodots, n=5) and MT-null mice (igodots, n=5) in response to intraperitoneal administration of LPS (50 µg/kg) plus GalN (700 mg/kg). Survival rates in wild type and MT-null mice were significantly different at p < 0.05.

今まで同様の致死感受性の差が認められることの確認も行った(Fig. 12)。

第一項 実験材料および実験方法

動物実験および肝臓ミエロペルオキシダーゼ活性の測定 実験動物は第二章、第一節に準じた。

野生型およびMT欠損マウス (8-12週齡, 雄性) にLPS (50 μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) を腹腔内投与し、7時間後に肝臓ミエロペルオキシダーゼ (MPO)活性を測定してPMN 数を評価した。MPO活性測定法を以下に示す。エーテル麻酔下肝臓を摘出し、19倍 容の 20 μ g/kg) との μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) を腹腔内投与し、7時間後に肝臓ミエロペルオキシダーゼ (MPO)活性を満出し、19倍 容の 20 μ g/kg) との μ g/kg) との μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) と同かの μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) と同かの μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) との μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) との μ g/kg) との μ g/kg) との μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) と同かの μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) との (700 μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) との (700 μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg) とGalN (700 μ g/kg

統計分析

有意差検定法は第三章、第三節に準じた。

第二項 結果および考察

MT欠損マウスにおいて、PMN マーカーである MPO 活性は MT 欠損マウス肝臓でのみ有意に増加していた (Fig. 13)。PMN 抗体による PMN デリーション (88) や PMN の血管内皮細胞・肝実質細胞への接着に関わる intracellular adhesion molecule-1 (89) および CD11b/CD18 インテグリン抗体 (90) の投与によって LPS/GalN 肝障害が軽減されることが知られており、上記結果は LPS/GalN 肝障害感受性の差を十分説明しうるものと考えられる。一方、 MT がラジカルスカベンジ能を有することから、 MT 欠損により ROS 感受性が亢進することは容易に予想される。 Laso らが MT欠損細胞が た butylhydroquinone、paraquatに高感受性であることを報告したのを初めとして、 MT 欠損細胞・マウスが種々の ROS 産生化合物の毒性に高感受性であることが示されている (91)。本モデルにおいてROSによる細胞障害作用へのMTの関与については検討を行っていないため、 MTの抗酸化作用がどれほどの意味を持つのかは明らかではない。しかしながら、本節の結果はMT欠損によるLPS/GalN感受性亢進の原因の一つが少なくともROSによる細胞障害より初期段階にあることを示している。

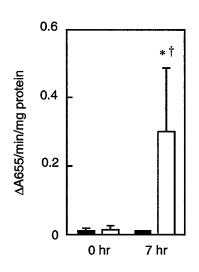


Fig. 13. Hepatic MPO acitvities in wild type (\blacksquare) and MT-null (\square) mice before and after administration of LPS/GalN. Data represent means \pm SD (n=3-4). *Significantly different from control group (p<0.05). †Significaintly different from wild type mice (p<0.05).

第五節 LPS/GalN惹起アポトーシス作用へのMTの影響

LPS/GalN モデルで MT が抗アポトーシス作用を発揮すれば、 前節までに得られた 結果が説明可能である。 Kondo らは抗癌剤である cytosine arabinoside、 bleomycin、 melphalan、cisplatin によるアポトーシスの出現頻度が MT 欠損細胞で亢進しており、 これは MT 欠損細胞が定常状態でアポトーシス促進因子である Bax の発現が高いた めではないかと考察している (92)。 このように MT が抗アポトーシス作用を有すると する研究グループもあり、本作用がMT欠損による感受性亢進の原因である可能性が 想定できる。そこで本項ではMTの抗アポトーシス作用が肝障害感受性の差として考えうるのかを検討した。

第一項 実験材料および実験方法

試薬

変異型 $I\kappa$ B発現アデノウイルスベクター (Ad $5I\kappa$ B) は University of North Carolina, David A. Brenner 博士より供与された。対照ベクターとして β -ガラクトシダーゼ発現アデノウイルスベクター (Ad5LacZ) を用いた。

動物実験

実験動物は第二章、第一節に準じた。

野生型およびMT欠損マウス (8-12週齡, 雄性) にLPS (50 μg/kg) とGalN (700 mg/kg) を腹腔内投与し、エーテル麻酔下門脈から10 mM EDTA含有PBSを灌流した後、肝臓を摘出した。肝臓を同緩衝液でホモジナイズした後フェノールクロロホルム抽出・エタノール沈殿を行いDNAを得た。抽出したDNAを2.0% アガロースゲルにて泳動し、DNAラダーを検出した。

初代培養肝細胞の調製および肝細胞への処理

肝細胞はKlaunigらによって改良された、in situ 2段階コラゲナーゼ灌流法により単

離した⁽⁹³⁾。実験にはトリパンブルー排除テストにより生存率 80% 以上と判定した細胞を使用した。細胞は 5% FBS, 1 μM Dex, 1 μM インスリン含有 Williams' medium E 培地 (ICN, Irvine, CA, USA) を用い、コラーゲン (type I-P; 新田ゼラチン, 大阪) コートした12穴培養プレートに細胞密度3.6 × 10⁵ cells/well で播種した。2時間の培養後、非接着細胞を培地交換により取り除いた。細胞は24時間培養後、rmTNF-αを各濃度で処理した。転写抑制剤としてアクチノマイシンD (ActD) を用いた実験では、rmTNF-α処理30分前に培地を 0.1% BSA、400ng/ml ActD含有Williams' medium E培地に交換した。NF-κB活性化阻害のためにAd5IκBを用いた実験では、rmTNF-α処理の2時間前から培地を 0.1% BSA 含有 Williams' medium E 培地に交換し、rmTNF-α処理前の2時間のみ30 M.O.I. のAd5IκBを感染した。rmTNF-α処理20時間後にMTT法により生細胞数を評価した。

高力価アデノウイルスベクター液の作製および力価測定

アデノウイルスベクターはヒト胎児腎臓細胞株HEK293細胞を用いて増幅し、細胞溶解液の遠心上清をウイルスベクター液として用いた。ウイルスタイターは50% 細胞変性終末点から決定した。

第二項 結果および考察

野生型、MT欠損マウスから初代培養肝細胞を調製し、rmTNF-αによるアポトーシス感受性を比較した。TNF-αによるアポトーシス誘導にはNF-κBを介する遺伝子発現を抑制する必要があり (94,95) (Fig. 14)、本研究ではこの目的で転写抑制剤のActDもしくはAd5IκBを用いた。Ad5IκBはリン酸化、およびその次のステップであるプロテアソームによる分解を受けない変異型 IκBα (S32A, S36A) を発現することによってNF-κB活性化シグナルを阻害する (96)。肝細胞がTNF-α単独処理やActD処理、Ad5IκB感染のみでは障害を受けないことは確認している。また、Ad5IκBのコントロールベクターとしてAd5LacZを用いた際も肝細胞の障害は認められなかった。 ActD処理とAd5IκB感染のどちらにおいても両マウスから調製した肝細胞で TNF-α 感受性の差は

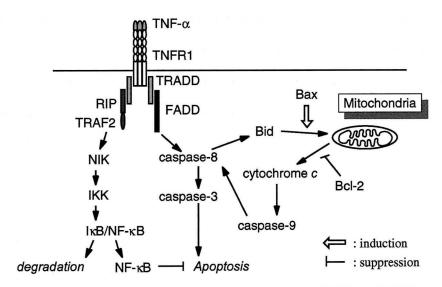


Fig. 14. Proapoptotic and antiapoptotic signaling by TNFR1. TRADD: TNFR1-associated death domain; RIP: receptor-interacting protein; TRAF2: TNFR-associated factor-2; FADD: Fas-associated death domain; NIK: NF-κB-inducing kinase; IKK: IκB kinase complex

認められなかった (Fig. 15A, B)。近年、アポトーシスには、1) caspase-8の著しい活性化が認められる type I 経路、2) caspase-8 のわずかな活性化とcytochrome c の遊離が認められる type II 経路、および 3) caspase に非依存の第3の経路が存在し、刺激に応じて細胞はこれらの経路を介してアポトーシスを起こすと考えられるようになった。

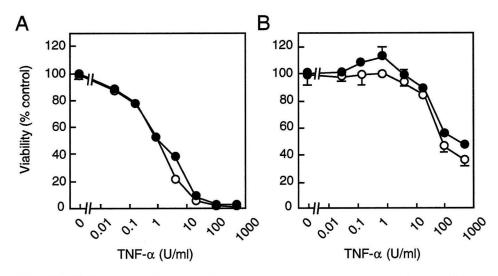


Fig. 15. TNF- α -induced cytotoxicity in primary hepatocytes derived from wild type (\bullet) and MT-null (\bigcirc) mice. Cell viability was assessed after 20 hours treatment by a MTT assay. Primary hepatocytes were treated with ActD and rmTNF- α (A), infected with Ad5I κ B and treated with rmTNF- α (B). Data represent means \pm SD (n=3).

肝細胞培養系への TNF-α 処理はActDを用いれば第 3の経路、Ad5IκBを用いれば type II 経路を介してアポトーシスが起こるとされている⁽⁹⁵⁾。また、初代培養肝細胞への TNF-α 処理によりtype I アポトーシスを引き起こす条件は知られていない。Mouse embryonic cell (MEC) においてMT欠損により type II アポトーシスの促進因子である Baxタンパク質レベルが上昇すると報告されていることから ⁽⁹²⁾、初代培養肝細胞へのAd5IκB/TNFによるアポトーシス感受性がMT欠損により上昇している可能性を想定した。しかしながら、初代培養肝細胞系ではMTの抗アポトーシス作用は全く観察されなかった。先述のMT欠損によるBax高発現はMEC細胞特異的な現象なのかもしれない。一方、肝臓特異的 Bcl-2 過剰発現マウス ⁽⁹⁷⁾ や caspase 阻害剤 ^(74,98) を用いた検討から、LPS/GalN惹起アポトーシスはTNFR1を介するtype II アポトーシスであると考えられている。LPS/GalN投与7時間後の肝臓DNAの電気泳動像を観察した結果、MT欠損マウスでのみDNAラダーが観察された (Fig. 16)。本節の結果より、MTが直接肝細胞内で抗アポトーシス作用を発揮しているとは考えられないものの、MTが何らかの間接的機序によりLPS/GalN惹起アポトーシス作用に対して抑制因子として作用していることが示された。

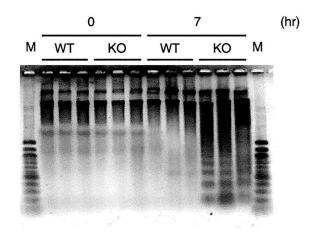


Fig. 16. DNA electrophoresis of liver extracts. DNA was extracted from mice liver before and after administration of LPS/GalN. Extracted DNA was electrophoresed on a 2.0% agarose gel. M; 100 bp ladder marker

第六節 小括

本章はMT欠損によるAGP発現の低下が、LPS/GalN惹起致死感受性の亢進という現象としてあらわれる可能性を示した。LPS/GalN惹起致死感受性亢進の機序は、1)血中メディエーターレベルの上昇、2)肝臓のアポトーシス感受性の亢進、3)肝臓へのPMN集積・浸潤数の増加、4) ROS感受性の亢進という4点が想定できる。MTがNF-кBのDNA結合活性修飾作用、アポトーシス抑制作用およびラジカルスカベンジ作用を発揮すれば、それぞれ、1)-4)、2)-4)、4)に MT 欠損の影響があらわれると考えられる。また、主たる原因がAGP発現レベル低下にあるならば、2)-4)にMT欠損の影響が認められるはずである。本章での検討の結果、MT欠損の影響は 2)-4)に認められた。第五節での詳細な検討によりMT欠損の影響は初代培養肝細胞を用いたアポトーシス誘導系では認められず、in vivoでのみ確認された。AGPもまた、MT 同様 in vivoで抗アポトーシス作用を発揮するが、培養細胞を用いたアポトーシス誘導系でアポトーシス作用を発揮するが、培養細胞を用いたアポトーシス誘導系でアポトーシスを抑制しないと報告されている (99)。これらを総合すると、MT欠損マウスでのLPS/GalN致死感受性増大の原因は急性期におけるAGP誘導率の低下にあると考えられる。

総 括

本研究では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示すとともに、遺伝子発現調節を介した MTの生体防御作用の存在の可能性を示した。 MTの研究は 1) 重金属との結合・解毒やフリーラジカルスカベンジ能に注目し、MTを生体防御因子として位置づける研究、および 2) MTの誘導に関する研究という二方向から行われてきた。この中でもMTの誘導に関する研究では、1982年にPalmiterが成長ホルモンをMTプロモーターを利用してマウスに強制発現し、ジャイアントマウスを作製した例は余りにも有名である(100)。 MTプロモーターは比較的強いプロモーター活性を有すると共に重金属刺激により活性化されるという特性を生かして他の遺伝子の誘導型強制発現に利用されてきた。重金属などの投与以外にもMTの誘導条件は数多く知られており、炎症(13, 14)・新生仔期(15)・肝再生(16, 17)・担癌(18, 19)・拘束ストレス(20, 21)などで肝臓の MT が誘導されることが明らかにされている。これらの時期におけるMT誘導のメディエーターは IL-6やグルココルチコイドであることが示されている。しかしながらその一方で、MT誘導の意義に関する知見は非常に限られており、その意義をZn結合能もしくはラジカルスカベンジ能に求めるものがほとんどであった。

まず第一章では、MT欠損マウスと改良型DD法を駆使して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。

次いで第二章では、急性期に誘導されるMTがAPPの一つ、AGP遺伝子の発現を上昇することを見いだした。APRはIL-1、-6等のサイトカインをメディエーターとする反応で、炎症部位でのサイトカイン産生、肝実質細胞のレセプター刺激、細胞内シグナル伝達、転写因子の活性化に至る反応である。APPはこの一連の応答により誘

導される血漿タンパク質であり、何らかの形で炎症反応を調節する役割を果たして いると考えられる。MTは APR 同様の機序、つまり、IL-6 が肝実質細胞の IL-6 レセ プターに結合し、JAK-STAT 経路を活性化し、プロモーター領域の IL-6 responsive element type 2 を介して発現上昇するとされている (101, 102)。MTは血漿タンパク質で はないことからAPPとして位置づけられていないが、上記のことを考えあわせると MTをAPPとしてとらえ炎症反応との接点を詳細に検討すべきであると考えられる。 また、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MTF-1が 活性化されることと、このMTF-1活性化がMT欠損により消失するという結果にもと 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。転写因子は核内でその活性 を発揮する。前述のモデルではMTが核内に移行する必要はないが、種々の条件下で MT は核移行することが確認されている (25, 26, 35-37)。この MT 核移行の意義として DNAをROSから保護するという仮説が提示され、核移行シグナルを連結したMTを強 制発現することによりこの仮説の妥当性が示されている(103)。しかしながら、MTが 核内で何らかの転写活性を修飾している可能性も残っており、このような視点から の研究が待たれる。

さらに第三章では、炎症モデルの一つであるLPS/GalN惹起急性肝炎に対し、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投与により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(70)。MT 欠損マウスでは野生型マウスとで比較して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APRにおける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の亢進の原因である可能性を示唆した。

以上、本研究ではMTが生体内で遺伝子発現調節を行っていることを初めて明らかにするとともに、この遺伝子発現調節作用もまた、MTの生体防御作用の一端を担っていることを示した。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年以上がたつ。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。

結 論

MTによる遺伝子発現調節および遺伝子発現調節を介した MTの生体防御作用に関する検討を行い、以下の結論を得た。

- 1. 新生仔肝臓においてMT欠損により発現変動する遺伝子を同定した。また、MT 発現が高い時期にMT欠損の影響が強くあらわれることを示し、MT誘導が遺伝 子発現を調節するための生体応答である可能性を示した。
- 2. MTが細胞内Zn量の増加・MTF-1活性化を介して遺伝子発現を亢進するというモデルを提唱し、実際にMTがMTF-1支配のAPPの一つであるAGPの発現を上昇していることを示した。
- 3. MT欠損マウスがLPS/GalN惹起肝障害に高感受性であることを明らかにし、この原因がAGP発現低下にある可能性を示した。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始暖かい御指導ならびに御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科教授、田中慶一先生に篤く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、終始御指導ならびに御助言をいただきました、大阪大学大学院薬学研究科講師、伊藤徳夫先生、大阪大学大学院助手、中西剛先生に深謝致します。

動物実験に関し、種々御便宜、御指導を賜りました大阪大学大学院微生物研究所、西宗義武先生に深く感謝致します。

さらに、本研究に関する種々御助言をいただきました大阪大学大学院微生物研究 所、興梠順也博士に心より感謝致します。

病理組織検査に関し、種々御便宜、御指導を賜りました大日本製薬株式会社 糀谷高敏博士に深く感謝致します。

リコンビナントヒトIL-6を御供与いただきました中外製薬株式会社に感謝致します。 また、Ad5IkBベクターを御供与いただきましたUniversity of North Carolina、David A. Brenner 博士に感謝致します。

さらに、本研究を遂行するにあたり、苦労を共にし、励ましあった竹原都修士、 小黒育代学士、石崎順一学士に心から感謝いたします。

また、本稿をまとめるにあたり御協力いただきました藤田勇修士をはじめとする 大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野の皆様に感謝の意を表します。

最後に、在学中の経済的援助を賜りました、日本育英会に感謝致します。

参 考 文 献

- 1. Margoshes, M. and Vallee, B.L. (1957) J Am Chem Soc 79, 4813-4.
- 2. Miura, T., Muraoka, S. and Ogiso, T. (1997) Life Sci 60, 301-9.
- 3. Hamer, D.H. (1986) Annu Rev Biochem 55, 913-51.
- 4. Stuart, G.W., Searle, P.F. and Palmiter, R.D. (1985) Nature 317, 828-31.
- 5. Westin, G. and Schaffner, W. (1988) Nucleic Acids Res 16, 5771-81.
- Bittel, D., Dalton, T., Samson, S.L., Gedamu, L. and Andrews, G.K. (1998) J Biol Chem 273, 7127-33.
- 7. Smirnova, I.V., Bittel, D.C., Ravindra, R., Jiang, H. and Andrews, G.K. (2000) *J Biol Chem* 275, 9377-84.
- 8. DiSilvestro, R.A. and Cousins, R.J. (1984) Life Sci 35, 2113-8.
- 9. Schroeder, J.J. and Cousins, R.J. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87, 3137-41.
- 10. Sato, M., Sasaki, M., Hojo, H. (1994) Int J Immunopharmacol 16, 187-95.
- 11. Friedman, R.L. and Stark, G.R. (1985) Nature 314, 637-9.
- Waelput, W., Verhee, A., Broekaert, D., Eyckerman, S., Vandekerckhove, J., Beattie,
 J.H. and Tavernier, J. (2000) Biochem J 1, 55-61.
- Sobocinski, P.Z., Canterbury, W., Jr., Mapes, C.A. and Dinterman, R.E. (1978) Am J Physiol 234, E399-406.
- 14. Itoh, N., Kasutani, K., Muto, N., Otaki, N., Kimura, M. and Tanaka, K. (1996)

 Toxicology 112, 29-36.
- 15. Quaife, C., Hammer, R.E., Mottet, N.K. and Palmiter, R.D. (1986) *Dev Biol* 118, 549-55.
- 16. Ohtake, H. and Koga, M. (1979) Biochem J 183, 683-90.
- 17. Molotkov, A., Nishimura, N., Satoh, M. and Tohyama, C. (2000) Life Sci 66, 963-70.
- 18. Takeda, A., Sato, T., Tamano, H. and Okada, S. (1992) Biochem Biophys Res Commun 189, 645-9.

- 19. Takeda, A., Tamano, H., Hoshino, A. and Okada, S. (1994) Biol Trace Elem Res 41, 157-64.
- 20. Ghoshal, K., Wang, Y., Sheridan, J.F. and Jacob, S.T. (1998) *J Biol Chem* 273, 27904-10.
- 21. Hernandez, J., Carrasco, J., Belloso, E., Giralt, M., Bluethmann, H., Kee Lee, D., Andrews, G.K. and Hidalgo, J. (2000) *Cytokine* 12, 791-6.
- 22. Michalska, A.E. and Choo, K.H. (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90, 8088-92.
- 23. Masters, B.A., Kelly, E.J., Quaife, C.J., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. (1994)

 Proc Natl Acad Sci USA 91, 584-8.
- 24. Beattie, J.H., Wood, A.M., Newman, A.M., Bremner, I., Choo, K.H., Michalska, A.E., Duncan, J.S. and Trayhurn, P. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 358-63.
- 25. Banerjee, D., Onosaka, S. and Cherian, M.G. (1982) Toxicology 24, 95-105.
- Danielson, K.G., Ohi, S. and Huang, P.C. (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79, 2301-4.
- 27. Nagano, T., Itoh, N., Ebisutani, C., Takatani, T., Miyoshi, T., Nakanishi, T. and Tanaka, K. (2000) *J Cell Physiol* 185, 440-6.
- 28. Woo, E.S., Dellapiazza, D., Wang, A.S. and Lazo, J.S. (2000) *J Cell Physiol* 182, 69-76.
- 29. Zeng, J., Heuchel, R., Schaffner, W. and Kagi, J.H. (1991) FEBS Lett 279, 310-2.
- 30. Zeng, J., Vallee, B.L. and Kagi, J.H. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88, 9984-8.
- 31. Cano-Gauci, D.F. and Sarkar, B. (1996) FEBS Lett 386, 1-4.
- 32. Abdel-Mageed, A.B. and Agrawal, K.C. (1998) Cancer Res 58, 2335-8.
- Sakurai, A., Hara, S., Okano, N., Kondo, Y., Inoue, J. and Imura, N. (1999) FEBS Lett 455, 55-8.
- 34. Roesijadi, G., Bogumil, R., Vasak, M. and Kagi, J.H. (1998) *J Biol Chem* 273, 17425-32.
- 35. Tohyama, C., Suzuki, J.S., Hemelraad, J., Nishimura, N. and Nishimura, H. (1993)

 Hepatology 18, 1193-201.
- 36. Tsujikawa, K., Suzuki, N., Sagawa, K., Itoh, M., Sugiyama, T., Kohama, Y., Otaki,

- N., Kimura, M. and Mimura, T. (1994) Eur J Cell Biol 63, 240-6.
- 37. Lau, J.C. and Cherian, M.G. (1998) Biochem Cell Biol 76, 615-23.
- 38. Palmiter, R.D., Findley, S.D., Whitmore, T.E. and Durnam, D.M. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6333-7.
- 39. Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P. and Palmiter, R.D. (1994) *Biochemistry* 33, 7250-9.
- Luda, D., Yun-Fai, C.L., Aaron, P.C., Alex, C., Fauzia, M., Betty, H., Sergey, L., Konstantin, L., Nadya, G., Eugene, D.S. and Paul, D.S. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93, 6025-30.
- 41. Liang, P. and Pardee, A.B. (1992) Science 257, 967-71.
- 42. Kohroki, J., Tsuchiya, M., Fujita, S., Nakanishi, T., Itoh, N. and Tanaka, K. (1999) Biochem Biophys Res Commun 262, 365-7.
- 43. Kershaw, W.C., Lehman-McKeeman, L.D. and Klaassen, C.D. (1990) *Toxicol Appl Pharmacol* 104, 267-75.
- 44. Maras, B., Barra, D., Dupre, S. and Pitari, G. (1999) FEBS Lett 461, 149-52.
- Aurrand-Lions, M., Galland, F., Bazin, H., Zakharyev, V.M., Imhof, B.A. and Naquet,
 P. (1996) *Immunity* 5, 391-405.
- 46. Granjeaud, S., Naquet, P. and Galland, F. (1999) Immunogenetics 49, 964-72.
- 47. Ghoshal, K., Majumder, S., Li, Z., Bray, T.M. and Jacob, S.T. (1999) Biochem Biophys Res Commun 264, 735-42.
- 48. Dalton, T.P., Shertzer, H.G. and Puga, A. (1999) Annu Rev Pharmacol Toxicol 39, 67-101.
- Philcox, J.C., Coyle, P., Michalska, A., Choo, K.H. and Rofe, A.M. (1995) Biochem
 J 308, 543-6.
- 50. Furst, P. and Hamer, D. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86, 5267-71.
- 51. de Pater, S., Greco, V., Pham, K., Memelink, J. and Kijne, J. (1996) Nucleic Acids Res 24, 4624-31.
- 52. Otsuka, F., Okugaito, I., Ohsawa, M., Iwamatsu, A., Suzuki, K. and Koizumi, S. (2000) *Biochim Biophys Acta* 1492, 330-40.

- 53. Eaton, D.L. and Toal, B.F. (1982) Toxicol Appl Pharmacol 66, 134-42.
- 54. Dalton, T.P., Li, Q., Bittel, D., Liang, L. and Andrews, G.K. (1996) *J Biol Chem* 271, 26233-41.
- 55. Dalton, T., Palmiter, R.D. and Andrews, G.K. (1994) Nucleic Acids Res 22, 5016-23.
- 56. Raetz, C.R. (1990) Annu Rev Biochem 59, 129-70.
- 57. Rofe, A.M., Philcox, J.C. and Coyle, P. (1996) *Biochem J* 314, 793-7.
- 58. Kishimoto, T., Akira, S. and Taga, T. (1992) Int J Immunopharmacol 14, 431-8.
- 59. Schindler, C. and Darnell, J.J. (1995) Annu Rev Biochem 64, 621-51.
- 60. Radtke, F., Georgiev, O., Muller, H.P., Brugnera, E. and Schaffner, W. (1995)

 Nucleic Acids Res 23, 2277-86.
- 61. Chen, X., Agarwal, A. and Giedroc, D.P. (1998) Biochemistry 37, 11152-61.
- 62. Chen, X., Chu, M. and Giedroc, D.P. (1999) Biochemistry 38, 12915-25.
- 63. Palmiter, R.D. (1995) Toxicol Appl Pharmacol 135, 139-46.
- 64. Langmade, S.J., Ravindra, R., Daniels, P.J. and Andrews, G.K. (2000) *J Biol Chem* 275, 34803-9.
- 65. Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M. and Schaffner, W. (1994) EMBO J 13, 2870-5.
- 66. Yoo, H.Y., Chang, M.S. and Rho, H.M. (1999) Mol Gen Genet 262, 310-3.
- 67. Yiangou, M., Ge, X., Carter, K.C. and Papaconstantinou, J. (1991) *Biochemistry* 30, 3798-806.
- 68. Udom, A.O. and Brady, F.O. (1980) *Biochem J* 187, 329-35.
- 69. Hochepied, T., Van Molle, W., Berger, F.G., Baumann, H. and Libert, C. (2000) J Biol Chem 275, 14903-9.
- 70. Libert, C., Brouckaert, P. and Fiers, W. (1994) J Exp Med 180, 1571-5.
- 71. Galanos, C., Freudenberg, M.A. and Reutter, W. (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 5939-43.
- 72. Tiegs, G., Wolter, M. and Wendel, A. (1989) Biochem Pharmacol 38, 627-31.
- 73. Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Tiegs, G., Germann, P.G. and Wendel, A. (1995)

- Am J Pathol 146, 1220-34.
- 74. Jaeschke, H., Fisher, M.A., Lawson, J.A., Simmons, C.A., Farhood, A. and Jones, D.A. (1998) *J Immunol* 160, 3480-6.
- 75. Iszard, M.B., Liu, J. and Klaassen, C.D. (1995) Toxicology 104, 25-33.
- 76. Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. (1985) FEBS Lett 183, 265-9.
- 77. Cagen, S.Z. and Klaassen, C.D. (1979) Toxicol Appl Pharmacol 51, 107-16.
- 78. Itoh, N., Kimura, T., Nakanishi, H., Muto, N., Kobayashi, M., Kitagawa, I. and Tanaka, K. (1997) *Toxicol Lett* 93, 135-40.
- 79. Bellezzo, J.M., Leingang, K.A., Bulla, G.A., Britton, R.S., Bacon, B.R. and Fox, E.S. (1998) JLab Clin Med 131, 36-44.
- 80. Morikawa, A., Kato, Y., Sugiyama, T., Koide, N., Chakravortty, D., Yoshida, T. and Yokochi, T. (1999) *Infect Immun* 67, 1018-24.
- 81. Libert, C., Van Molle, W., Brouckaert, P. and Fiers, W. (1995) J Inflamm 46, 139-43.
- 82. Wang, A.M., Creasey, A.A., Ladner, M.B., Lin, L.S., Strickler, J., Van Arsdell, J.N., Yamamoto, R. and Mark, D.F. (1985) Science 228, 149-54.
- 83. Sherman, P.A., Laubach, V.E., Reep, B.R. and Wood, E.R. (1993) *Biochemistry* 32, 11600-5.
- 84. Sugatani, J., Miwa, M., Komiyama, Y. and Murakami, T. (1993) J Immunol Methods 166, 251-61.
- 85. Pinckard, R.N., Farr, R.S. and Hanahan, D.J. (1979) J Immunol 123, 1847-57.
- 86. Kroncke, K.D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. (1997) Nitric Oxide 1, 107-20.
- 87. Jaeschke, H., Ho, Y.S., Fisher, M.A., Lawson, J.A. and Farhood, A. (1999)

 Hepatology 29, 443-50.
- 88. Komatsu, Y., Shiratori, Y., Kawase, T., Hashimoto, N., Han, K., Shiina, S., Matsumura, M., Niwa, Y., Kato, N., Tada, M., Ikeda, Y., Tanaka, M. and Omata, M. (1994) *Hepatology* 20, 1548-56.
- 89. Essani, N.A., Fisher, M.A., Farhood, A., Manning, A.M., Smith, C.W. and Jaeschke, H. (1995) *Hepatology* 21, 1632-9.

- 90. Jaeschke, H., Farhood, A. and Smith, C.W. (1991) Am J Physiol 261, G1051-6.
- 91. Lazo, J.S. and Basu, A. (1991) Semin Cancer Biol 2, 267-71.
- Kondo, Y., Woo, E.S., Michalska, A.E., Choo, K.H. and Lazo, J.S. (1995) Cancer Res 55, 2021-3.
- 93. Klaunig, J.E., Goldblatt, P.J., Hinton, D.E., Lipsky, M.M., Chacko, J. and Trump, B.F. (1981) *In Vitro* 17, 913-25.
- 94. Bradham, C.A., Qian, T., Streetz, K., Trautwein, C., Brenner, D.A. and Lemasters, J.J. (1998) Mol Cell Biol 18, 6353-64.
- Jones, B.E., Lo, C.R., Liu, H., Srinivasan, A., Streetz, K., Valentino, K.L. and Czaja,
 M.J. (2000) J Biol Chem 275, 705-12.
- Xu, Y, Bialik, S., Jones, B.E., Iimuro, Y, Kitsis, R.N., Srinivasan, A., Brenner, D.A. and Czaja, M.J. (1998) Am J Physiol 275, C1058-66.
- 97. Van Molle, W., Denecker, G., Rodriguez, I., Brouckaert, P., Vandenabeele, P. and Libert, C. (1999) *J Immunol* 163, 5235-41.
- 98. Mignon, A., Rouquet, N., Fabre, M., Martin, S., Pages, J.C., Dhainaut, J.F., Kahn, A., Briand, P. and Joulin, V. (1999) Am J Respir Crit Care Med 159, 1308-15.
- Van Molle, W., Libert, C., Fiers, W. and Brouckaert, P. (1997) J Immunol 159, 3555-64.
- 100. Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C. and Evans, R.M. (1982) Nature 300, 611-5.
- 101. Kasutani, K., Itoh, N., Kanekiyo, M., Muto, N. and Tanaka, K. (1998) *Toxicol Appl Pharmacol* 151, 143-51.
- 102. Lee, D.K., Carrasco, J., Hidalgo, J. and Andrews, G.K. (1999) *Biochem J* 337, 59-65.
- 103. Woo, E.S. and Lazo, J.S. (1997) Cancer Res 57, 4236-41.

