メタロチオネイン遺伝子の発現調節と重金属代謝

青木康展, 鈴木和夫

国立公害研究所環境保健部

Control Mechanism of Metallothionein Gene Expression and Its Relationship to Metabolism of Heavy Metals

YASUNOBU AOKI and KAZUO T. SUZUKI

National Institute for Environmental Studies,

Yatabe, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

Current studies on the gene structure and the control mechanism for gene expression of metallothionein were reviewed. Topics described in this review were i) isolation of c-DNA clones and genomic clones of metallothioneins from human, mouse and several other mammals along with *Drosophila* and yeast, ii) identification of the two control sequences that separately mediate the induction of metallothionein gene by heavy metals and glucocorticoid in the 5'-flanking sequences of mouse and human metallothionein genes, iii) amplification of metallothionein gene in cadmium resistant cultured cells, iv) determination of a chromosome that encodes metallothionein genes as a multi-gene family, and v) fusion of control sequence of metallothionein gene and structural sequence of foreign gene such as thymidine kinase and growth hormone, and the use of the hybrid plasmid for the induction and expression of foreign gene in mouse.

Keywords—metallothionein; gene cloning; gene expression; fusion gene; gene amplification; transgenic mouse; cadmium; heavy metal; glucocorticoid

1. はじめに

この宇宙が周期律表に示されている高々 100 種類の元素のみから出来上っているにもかかわらず、生物の世界は驚くほどの多様性を示している。これは生体を構成するタンパク質、核酸、脂質、糖等の有機物の多様性によっているのは言うまでもない。しかし、それら有機物の多様性に目をうばわれて、とすると忘れがちなのが生体中の微量元素である金属イオンの役割りである。特に、銅、亜鉛などで代表される、重金属イオンと呼ばれる 2 価遷移金属の役割りは興味深いものがある。この重金属イオンの生体内での役割りについては優れた成書があるのでそれにゆずりたい。^{1,2)}

本稿においては、これら重金属の代謝や解毒に関与していると考えられている低分子量タンパク質であるメタロチオネイン (metallothionein, 以下 MT と略す) 遺伝子の発現調節について述べたい。なお、初期の段階の仕事については木村と小泉の総説がある。³⁾ また, Karin^{4,5)} 及び Hamer⁶⁾ による総説もあり、あわせて参照していただきたい。

2. メタロチオネインとは

重金属の生体内の役割りに関する研究を続けていた Kägi と Vallee は 1960 年に、ウマ腎臓よりカドミウム、亜鉛、銅を含み、システイン残基含量の多い、低分子量のタンパク質を分離精製した。⁷⁾ このタンパク質は彼らによりその構造的特徴に基づいてメタロチオネイン (metallothionein ; metal+thiol+protein) と命名された。その後、この MT と同様のタンパク質が脊椎動物をはじめとして、昆虫、甲殻類など広く動物界さらには、カビ、酵母、植物にまで広く存在するタンパク質であることが知られるようになった。⁸⁾ また、同時に、MT には幾つかのイソタンパク質が存在することが明らかにされている。多くの哺乳動物では MT-I 及び MT-II と呼ばれる 2 種類のイソタンパク質の存在が示されている。

これまでの知見を集約して、現在では次のような 3 つの特徴を有するタンパク質を MT として分類している。⁸⁾ ①金属含量の高いこと (一般に哺乳類の場合、1 分子当り 7 原子の重金属 (亜鉛とカドミウムの場合) を結合している)。②システイン含量が高いこと (哺乳類

の場合61残基中20残基). ③低分子量であること(哺乳類では分子量6000—7000). しかし, タンパク質1分子当り, 金属やシステイン残基を何個以上含むとか, あるいは, 分子量がどの程度の大きさのものまで MT と呼べるのかなどに関しては必ずしも意見は一致していない. 特に下等動物や植物に由来する MT 又は, MT 様タンパク質が, 哺乳動物由来の MT とは性質が違っていることが明らかにされており, MT の定義をどうするか今後検討する必要がある. これまで一次構造が明らかにされているいくつかの MT を Fig. 1 に示す. これらの MT では金属の配位子はすべて, チオール基であり, システイン残基の位置は種をこえて固定されている. なお本稿では主として哺乳動物の MT の遺伝子発

現について述べていくものとする.

このように MT は特徴あるタンパク質であるために, タンパク化学的性質, 及び立体構造について多くの研究がなされている.⁹⁾

一方, MT の生物学的役割に焦点を当てた研究が数多く行なわれている. その第一は金属の解毒作用についてである. 1964年に Piscator によりカドミウム投与でウサギ肝臓に MT が誘導されることが示された.¹⁰⁾ それ以来, 他の重金属投与によっても, 動物の肝臓や腎臓などの臓器に MT が誘導されることが明らかにされてきている. MT を誘導し, かつ生体内で MT を結合し得る金属として亜鉛, 銅, カドミウム, 水銀, 金, 銀, ビスマス, が知られている. また, ニッケル, コバルト等の

Fig. 1. Amino Acid Sequences of Various Metallothioneins⁹⁾

ほとんどの金属も、MT を誘導するが、生体内では MT には結合されないことが知られている。¹¹⁾ 金属により誘導され、金属に対する強い親和性を持つというこの性質から、MT は臓器内に取り込まれた重金属を結合し、他の生体成分と重金属が結合するのを防ぐという、いわば重金属の解毒物質として働いていると考えられてきている。

MT の生物学的役割として次にあげられるのが、必須重金属の代謝に関する役割りである。MT は重金属以外にもいくつかの薬剤及び刺激により誘導されることが知られている。その代表的な薬剤はグルココルチコイドである。¹²⁻¹⁶⁾ グルココルチコイド投与により肝臓中の MT の含量が上昇し、同時に肝臓中の亜鉛濃度が上昇することが明らかにされている。¹⁷⁾ 他の薬剤としてはグルカゴン、¹⁸⁾ カテコールアミン、¹⁹⁾ エンドトキシン、^{20,21)} 並びにカラゲナンなどの起炎症剤、²²⁾ 更にはインターフェロン、²³⁾ インターロイキン²⁴⁾ などの投与によっても MT が誘導されることが報告されている。また、刺激としては、高温や低温、X線照射などのストレスによって肝臓中に MT が誘導されることが知られており、亜鉛の代謝との関連性が注目されている。²⁵⁾ 一方、このような人為的な誘導操作を行なわなくとも、細胞の増殖、²⁶⁾ 胎児の成長、²⁷⁻²⁹⁾ 胚発生^{30,31)} の途上などで MT の誘導が起こっており、細胞中の亜鉛濃度も高くなっていることが知られている。これらの現象より、MT は亜鉛、銅などの必須重金属の代謝に関与するタンパク質であると考えられている。

Fig. 1 で示したように、MT は種をこえて存在し、その構造が保存されていることから、生物の基本的機能に関与していることが予想される。したがって、MT 遺伝子の発現がどのように調節されているかは、生理学的に極めて興味の持たれる問題である。また、重金属に対する生体の耐性が MT 遺伝子の発現によりどのように獲得されているか、という中毒学的に重要な課題も含んでいる。以下、MT 遺伝子の発現の様式について述べる。

3. MT 遺伝子のクローニングで何が分かるのか

MT 遺伝子の発現には以下に述べるように幾つかの特徴ある現象が認められている。その機構を明らかにするために MT 遺伝子のクローニング (cloning) が行なわれた。

第一の現象は、MT には複数の誘導物質 (inducer) が存在することである。MT は重金属という極めて単純な物質によって誘導されると共に、グルココルチコイドなど、一見、重金属とは関係のない物質によっても誘導されることが知られている。それではこの 2 つの inducer

による MT 遺伝子の発現はどのように調節されているのであろうか。

第二の現象は MT のイソタンパク質間の誘導量の差がどのように調節されているかという問題である。哺乳類 MT に存在する 2 種のイソタンパク質の誘導量に経時的な変化が起こっていることが知られている。例えば、亜鉛、銅、カドミウムをラットに投与した後の肝臓において、初期には、MT-II の方が MT-I より多く誘導されるのに対して、時間を経るに従ってその量比が逆転することが明らかにされている。³²⁻³⁴⁾ この変化は単離肝細胞でも観察され、細胞中で自律的に生じている現象であると考えられる。³⁵⁾ また、前述のように胎児期には肝臓に MT が誘導されていることが知られているが、この場合も MT-I と MT-II の量比が胎児の成長に従って変化している。²⁷⁾

MT-I と MT-II の間で金属に対する親和性に差はあるが、金属の結合量に差は認められておらず、その量的変化が生物学上どのような意味を持つものか不明である。しかし、両者の誘導の様式あるいは役割りには何らかの違いが存在するのではないかと思われる。

さて、今まで“MT 遺伝子のクローニング”という言葉を使ってきた。ではこのクローニングとはどのようなことであろうか。本稿に則して言えば、MT 遺伝子と同じ塩基配列を持った DNA を多量に得ることとまとめることができる。MT に限らずタンパク質の誘導の様式を調べるためにはいくつかの方法がある。まず、そのタンパク質のメッセンジャー RNA (mRNA) の合成の様式を調べるというのが多く取られる立場である。また、遺伝子 DNA の中でどの部分がタンパク質の誘導に必要な塩基配列であるかを直接明らかにしていくことも行なわれている。これらを行なうためには、そのタンパク質をコードした DNA と同じ塩基配列を持つ DNA を多量に得ることが必要である。クローニングの技術が開発されたことによって生物の DNA を取り出し、それを純粋かつ多量に増やすことが可能になった。

4. MT 遺伝子のクローニング

マウス MT の遺伝子が Palmiter のグループによって、また、ヒト MT の遺伝子が Karin らによってクローニングされた。では実際に MT 遺伝子のクローニングはどのように行なわれたのであろうか。

その前に、真核生物の遺伝子 DNA の構造について若干述べておく (Fig. 2)。詳しくは成書を参照していただきたい。³⁶⁾ DNA の塩基配列が mRNA に転写されて、その情報がタンパク質のアミノ酸配列に翻訳されることはよく知られていることである。原核生物では DNA の

Fig. 2. Gene Structure of Eukaryote

□ : exon, ■ : intron.

塩基配列が連続的に mRNA に転写されている。それに対して、真核細胞生物では一部の例外を除いて、ほとんどすべての遺伝子で DNA の塩基配列が、一旦連続的に初期転写産物 (primary transcript) として RNA に転写されたのち、この RNA の一部が切り取られて、残りの部分が mRNA として再構成されることが明らかにされている (この過程を processing という)。切り取られてしまう RNA の塩基配列に対応する部分の DNA の塩基配列はイントロン (intron; intervening sequence), mRNA に再構成される部分の塩基配列はエキソン (exon) と呼ばれている。Exon 部分の塩基配列を調べることにより、そのタンパク質のアミノ酸配列を知ることが出来る。なお、RNA に転写される部分の DNA の塩基配列を構造配列 (structural sequence) あるいは構造遺伝子 (structural gene) と呼ぶ。構造配列の外側の部分は遺伝子の発現調節に重要な役割をはたしていると考えられている。構造配列の 5' 側の外側、並びに 3' 側の外側はそれぞれ 5'- 及び 3'-flanking region (5'- 及び 3'- 隣接領域), そして、その DNA の塩基配列は flanking sequence と呼ばれている。特に 5'-flanking sequence には、TATA box と呼ばれる RNA 合成酵素 (RNA polymerase II) の結合部位と考えられている TATAAA という特徴的な塩基配列や、mRNA 合成の on-off の調節に必要な塩基配列が存在することが明らかにされている。

現在ではクローニングにはさまざまな方法が用いられるが、MT に関していえば一般的なクローニングの方法である cDNA クローニングがまず行なわれた。この方法は mRNA と相補的な DNA (complementary DNA, 略して cDNA) を造ることによりクローニングを行なう

方法である (Fig. 3 A)。一番最初に成功したマウス MT の cDNA クローニングについて述べてみよう。³⁷⁾ カドミウムを投与したマウス肝臓より mRNA を抽出し、シロ糖密度勾配遠心にかけ、MT mRNA が濃縮された分画を得る。ここで得られた mRNA を鋳型として、RNA ウイルスの逆転写酵素 (reverse transcriptase) を用いて cDNA を合成したのち、アルカリ処理し RNA を分解する。これにより MT mRNA と相補的な塩基配列を持つ DNA を含む分画が得られたことになる。この cDNA を大腸菌の DNA ポリメラーゼ I を用いて 2 本鎖の DNA (double strand DNA) としたのち、大腸菌のプラスミド pBR 322 に組み込み、大腸菌に取り込ませる。プラスミドとは大腸菌中に存在する環状 DNA のことであり、大腸菌の増殖と共に増えるものである。最後にこのプラスミドを取り込んだ大腸菌の中から、MT cDNA が取り込まれたプラスミドを含む大腸菌を選び出し、cDNA クローニングは完了する。この大腸菌を増殖させ、プラスミド DNA を抽出することにより、MT 遺伝子の exon 部分と同じ塩基配列を持つ DNA を得ることが出来る。

以上のような操作の結果、MT-I について cDNA クローニングをすることが出来た。この DNA の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と、それまで知られていたマウス MT-I のアミノ酸配列とは極めてよく一致していた (Fig. 4 参照)。しかし、23 番目のアミノ酸はそれまでアスパラギン酸と考えられていたが、アスパラギンがコードされていることが示された。cDNA クローニングはマウスについては別に Mbikay 等により、³⁸⁾ 更にラット、^{39,40)} チャイニーズハムスター、⁴¹⁾ ヒツジ、⁴²⁾ ヒト、⁴³⁾ サル、⁴⁴⁾ ショウジョウバエ、⁴⁵⁾ についても行なわれてい

Fig. 3A. Procedure of cDNA Cloning

る。

しかしながら、cDNA クローニングした DNA から、intron や、3'-及び 5'-flanking sequence のように、mRNA に転写されない部分の塩基配列を知ることができない。特に MT 遺伝子の発現調節の機構を知るためには 5'-flanking region の塩基配列を明らかにすることが必須である。そこで MT 遺伝子の全体像を知るために MT 遺伝子を染色体の DNA から直接取り出すこと

が考えられた。これが genomic クローニングである。

マウス MT-I 遺伝子の genomic クローニングは、次のように行なわれた。^{37,46)} 基本的な考え方は、マウスの染色体の DNA (chromosomal DNA) を10000—20000 塩基対の長さの DNA に機械的あるいは酵素的に断片化し、このたくさんの断片の中から MT 遺伝子を含む DNA 断片を探し出そうとするものである (Fig. 3B)。そのためには、ファージが用いられた。まず、マウス

Fig. 3B. Procedure of Genomic Cloning

DNA の断片を大腸菌のファージ DNA (λ-phage, Charon 4A) に組み込み、大腸菌に感染させ、ファージを増殖させた。そして、これらのファージの中でマウス MT-I の遺伝子 DNA が組み込まれたファージをひろい出した。この操作はマウス MT-I の cDNA と相補的な DNA を含むファージをひろい出すことにより行なわれた。その結果、 10^6 個のファージ中 2 個が MT-I の遺伝子 DNA を含んでいることが明らかとなった。塩基配列の解析の結果、マウス MT-I の遺伝子 DNA の構造が次のように明らかとなった (Fig. 4)。MT-I の構造遺伝

子は 3 つの exon と 2 つの intron より構成されていた。exon 部分の長さの合計は約 1100 塩基対であったが、intron 部分は exon 部分よりかなり長いものであった。この 5'-flanking region には十分な長さの塩基配列 (Fig. 4 で負の数字で示されている) が含まれており、クローニングの目的は達せられた。マウス MT-II の遺伝子も同じグループによりクローニングされた。⁴⁷⁾

一方、ヒト MT-I 及び-II の genomic クローニングは Karin らによって行なわれた。^{48,49)} マウス MT-II やヒト MT-I 及び-II の構造遺伝子もマウス MT-I と同

様に3個の exon と2個の長い intron より構成されていた。また、ラット MT の genomic クローニングもなされているがその塩基配列は報告されていない。⁴⁰⁾

5. MT 遺伝子の発現調節の様式

MT 遺伝子は重金属やホルモンなどにより、その発現がどのように調節されているのだろうか。DNA 上に塩基配列として蓄えられている遺伝情報がタンパク質の合成という形で発現されるまでには mRNA の合成、リボソーム上でのタンパク質の合成等々、数多くの段階があり、それぞれの段階で調節が行なわれている。MT の場合、動物あるいは細胞へ、重金属、グルココルチコイドなどを与えると MT mRNA 量の増加が起こる。^{50,51)} そして、この mRNA の増加は MT 遺伝子の転写の増加により生じたものであることが示された。^{15,16,52)}

MT 遺伝子の転写の調節はどのような仕組みになっているのであろうか。重金属とグルココルチコイドという全く異なった inducer による転写の調節機構に興味が集まり、その機構の解明が進んでいる。

真核細胞生物の遺伝情報発現の調節機構については多くの作業仮説が立てられている。現在、広く受け入れられている仮説は、ある遺伝子の発現は、細胞外からの刺激にตอบสนองして、その遺伝子の 5'-flanking region の特定の塩基配列の部分に、特異的なタンパク質が結合することにより引き起こされる、というものである。この特異的なタンパク質の結合が引き金となり、RNA 合成酵素 (RNA ポリメラーゼ II) が DNA の特定の部位 (5'-flanking region の TATA box, Fig. 2 参照) に結合し、mRNA が合成されると考えられている。³⁶⁾ このような機構により遺伝子発現が起こっていると考えられる例の一つとしてステロイドホルモンを挙げることが出来る。ステロイドホルモンが細胞内に取り込まれると、ステロイドホルモンリセプターと呼ばれるタンパク質にホルモンが結合し、このホルモン-リセプター複合体が遺伝子の 5'-flanking region の特定の塩基配列を認識して、RNA の合成が引き起こされると考えられている。逆に言えば、この特定の塩基配列を持つ遺伝子がステロイドホルモンにより発現されるのである。現在すでにリセプタータンパク質の同定や、ホルモン-リセプター複合体の結合部位の同定が行なわれている。^{53,54)}

MT の場合もヒト MT-II について、MT 遺伝子の 5'-flanking region の中で各 inducer による MT の誘導に必要な塩基配列 (control sequence と呼ばれている) が同定された。^{55,56)} Karin らのこの実験では、培養細胞への形質導入 (transfection) の技術が利用された。培養細胞を DNA と共にリン酸カルシウムで処理すると、その

DNA は細胞内に取り込まれ mRNA 合成の鋳型となり得る。そこで人工的に一部の塩基配列を欠落させたヒト MT 遺伝子の 5'-flanking region と herpes simplex ウイルスの thymidine kinase (HSV-TK) の構造配列を結合させた DNA (Fig. 4) (以下 fusion gene と呼ぶ) を作製し、この fusion gene をラット繊維芽細胞に形質導入した。導入後、細胞を重金属やグルココルチコイドなどの inducer を含む培地中で培養することにより、細胞中に HSV-TK の mRNA が合成されるか否かを調べた。inducer の効果の発現に必要な control sequence が欠落した fusion gene が導入された細胞では、inducer の効果は現れないことが予想される。したがって、この実験から、5'-flanking sequence のどの部分が MT 遺伝子の発現調節に必要であるか知ることができる。

MT の 5'-flanking region の働きを明らかにするために、MT の構造配列のかわりに HSV-TK の構造配列を結合させた fusion gene を用いたのは以下の2つの理由による。

第一は、fusion gene が導入された細胞を選び出すためのマーカーとするためである。リン酸カルシウム処理によりすべての細胞に fusion gene が導入されるわけではない。そこで HSV-TK 遺伝子の導入がおこった細胞を選び出すという操作により、fusion gene が導入された細胞を選び出そうとするものである。第二は fusion gene の発現に対する inducer の効果のみを観察したいからである。ラットの細胞を inducer で処理した場合には、当然のことながら、ラット MT の mRNA も合成される。一般に mRNA の定量をするときにはその mRNA の cDNA と相補性をもつ RNA とヒト MT mRNA の構造が非常によく似ているため、両者の区別が付きにくくなる恐れがある。そこで細胞内に元来存在しない遺伝子である HSV-TK の構造遺伝子と MT の 5'-flanking sequence を結合して細胞中に導入し、inducer の効果の有無を HSV-TK の発現により調べようとしたのである。なお、第二の目的のためには HSV-TK の他に、大腸菌キサンチン-グアニンホスホリラーゼトランスフェラーゼ⁵⁷⁾ 大腸菌クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼなども用いられている。⁵⁸⁾

ヒト MT-II 遺伝子の 5'-flanking sequence のいろいろの部分に欠落させた fusion gene の形質導入の実験から、次のことが明らかにされた (Fig. 5 A)。第一にカドミウムによるヒト MT-II の誘導は、MT-II の 5'-flanking sequence の -30 - -50 base と -125 - -150 base の塩基配列のどちらか一方が存在すれば引き起こすことが出来た (塩基の番号付けは次のように行なう: 転写が開

```

-241
TGAGTTCTCG TAAACTCCAG AGCAGCGATA GGCCGTAATA TCGGGGAAAG CACTATAGGG
-181
ACATGATGTT CCACACGCTA CATGGGTCGT CCTATCCGAG CCAGTCGTGC CAAAGGGGCG
-121
GTCCGCGYGT GCACACTGGC GCTCCAGGGA GCTCTGCACT CCGCCCGAAA AGTGCCTCG
-61
GCTCTGCCAG GACGCGGGGC GCGTGAATAT GCGTGGGCTG GAGCAACCGC CTGCTGGGTC
-1
CAAACCCCTTT GCGCCCGGAC TCGTCCAAAG ACTATAAAGA GGGCAGGCTG TCCTCTAAGC
EXON 1 10 20 30 40 50 60
GTCACACAGA CTTCAACGTC CTGAGTACCT TCTCCTCACT TACTCCGTAG CTCCAGCTTC
ACCAGATCTC GGAATGGACC CCAACTGCTC CTGCTCCACC GGAAGACTC CCGATCCTTG
120
GTCTTTAGAA TACCAAGTTG GGACCGCAGA GCGGAATCCC CGAGTTGTAG AGGCTTGGCG
180
GGAATAGGCA CCTTTAGTTG GCGATTCAAT CCGGTTCTTT CTAGAATCCG CTCTTGCAAA
240
AGCCTTCATT AGTTACGAGT ATTGTGGAAC GGGTCCTTTG GCGGGGTTGG GGCTAGGATT
300
TAGACGCCCA AATGTCCGGT TCCTGATCAC CCAGTTAGTG GGGACATCTG GGTGAGTCC
360
CAGGCATTAC TAAACTTACT GTGAATTGCT TGAATTAAGA AAGAGGTGAA GGACCTTTAT
420
GTCTTGGGAC TCAAAGACAT AATCCCTGAC TTAACCTGTG AGGAGAAAAG TGGGCTAGG
480
CTCCCTCGAG CTCCGAGGAG GACTTAGTGA ACTGAGCCGG GACTCGTGGT GTTGGCCACT
540
GCTGTAATGC TGCCTCCCTC ATGCTGCTCT CTTCTCCTC CCAGGCGGCT CTGCACTTG
EXON 2 540 580
T S S C A C K N C K C T S C K K
CACCAGTCC TCGCTGCA AAGACTGCAA GTGCACCTCC TGCAAGAAGA GTGAGTTGGG
660
ACACCTTGGG TGGCGGCTAA GGCTAGGGGC GGGGAACCTC TACAAAAGTG GCTCTGAGAA
720
ATGTCCCTTG CTCCCGGAG GCCATTGTAT TGTCTCGGGG ACAGAACTAT ACAGAGAACT
780
ATTTAAAAA ACCGAGGTCT TCTCTGTTGG GGACAGGAAG CAGAGGTCTT CAGCCAGGCT
840
GCCTCTTCTC CTTCTCTCTA GGCTGCTGCT CCGTCTGCTC CGTGGGCTGC TCCAAATGTG
900
A Q G C V C K G A A D K C T C C A
CCCAGGCTG TGTCTGCAAA GCGCGCCGCG ACAAGTGCAC GTGCTGTGCC TGAATGTGAGC
960
AACAGCGCTG CCACCACGTC TAAATAGTAT CCGACCAACC CAGCGCTCTC CTATACAGTT
1020
CCACCGCTGT TACTAAACCC CCGTTTCTA CCGAGTACGT TAATAATAAA AGCCTGTTTG
1080
AGTCTAACTC TGCTTCTTGT GTGTGGTTTG GCAATAAGAA ACTGGGTGTA CTTGATAGTC
1140
TGGGATCTG GTTTTGGACC CCTCGTGGC TTTACCTCCG CCTCTGAGCC CTCACAGAGG
1200
GTAATGTCTT TTGGGTAAG CCAAGCTATA TCCATAAGC TTCTCATGG AAAACAGCTG
1260

```

始される塩基を1番とし、転写される側に正の番号を順につけていく。一方、5'側には負の番号を順次つけていく。しかし、これら双方の塩基配列を欠落させた場合にはカドミウムによる誘導は起こらなかった。ということは、重金属によるMTの誘導に必要なcontrol sequenceはこの両方の塩基配列に共通な部分ということになる。そこで調べてみると、両者に共通性の高い塩基配列が見出され、control sequenceであることが推定された。したがって細胞が重金属に暴露された時には何らかのタンパク質がこのMRE (Fig. 5, metal responsive element の略) として示された塩基配列に結合することが引き金となりTATA boxにRNAポリメラーゼが結合し、MT-II mRNAの合成が起こることが考えられる。fusion geneの形質導入で明らかにされた第二のことは、グルコルチコイドによるMTの誘導には-237- -267 baseが必要であるということである。更に、この塩基配列にはステロイドホルモンリセプターの1つであるグルコルチコイドリセプターが結合し得ることも明

Fig. 4. DNA Sequence of Mouse Metallothionein-I Gene⁴⁶⁾

Exons are shown in large print; introns and the regions flanking the gene are shown in small print. The TATAAA sequence (TATA box), initiation and termination codons are boxed. The MT-I protein sequence is indicated above the exon sequences using the one letter code: A, Ala; C, Cys; D, Asp; G, Gly; K, Lys; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; T, Thr; V, Val.

らかにされた (Fig. 5, GRE; glucocorticoid responsive element の略)。そして、GREの塩基配列は、これまでに知られているグルコルチコイドリセプター結合部位の塩基配列と非常によく似ていることも示された。この事実がグルコルチコイドによるMTの誘導はグルコルチコイドリセプターが5'-flanking regionに直接結合することにより起こることを示唆している。また、形質導入の実験でみるかぎり、MT-II mRNAの合成に必須ではないが、合成の効率を上昇させるのに必要な部位が-67- -91 baseの間に存在することが明らかになった。以上のことから、重金属(カドミウム)とグルコルチコイドによるMTの誘導は、遺伝子発現のレベルにおいて異なった機構で引き起こされていることが明らかとなった。

マウスMT-Iについても同様のことが示された (Fig. 5B).⁵⁹⁻⁶¹⁾ マウスMT-Iの5'-flanking regionはヒトの場合と同様にカドミウムによるMTの誘導に必要な部分が2ヵ所存在し、その塩基配列には、ヒトMT-IIのMREと比べて高い共通性があった。また、他に2つ

Fig. 5. Comparison of Mouse and Human Metallothionein Gene 5'-Flanking Sequences
A. Human Metallothionein-II⁵⁵; B. Mouse Metallothionein-I⁶⁰; C. Comparison of Metal Responsive Elements⁶¹

Regions important for hormonal induction (GRE for glucocorticoid responsive element), heavy metal induction (MRE for metal ion responsive element), and basal level of expression are indicated in open boxes. Glucocorticoid regulatory element: solid line, the region protected by binding of the receptor to DNA; broken line, uncertainties in exact borders of the region. Also indicated are the TATA box and the cap site (hatched boxes) and the first two amino acid codons of the translated region. Region of Z-DNA (alternating purine-pyrimidine sequence) was indicated by broken underline and palindromes by arrows.

の両者に共通な塩基配列が見出された。1つは Fig. 5 で矢印で示した同一の DNA 鎖内で二重らせんを形成し得るような相補性をもつ塩基配列 (palindrome) がほぼ同様な位置に存在していることであり、他の1つは Fig. 5 で破線のアンダーラインで示した Z-form DNA (左まきの DNA) を形成し得る塩基配列 (alternating purine-pyrimidine sequence) が2つの MRE の中間に存在していることである。ここで示した 5'-flanking sequence 中の特徴的な塩基配列はマウス MT-II, ヒト MT-I でも認められた。⁴⁷⁻⁴⁹ 興味深いことに、4種の MT (マウス MT-I と-II, ヒト MT-I と-II) 遺伝子の 5'-flanking region の -50 base の近傍の塩基配列には特に高い共通性が存在した (Fig. 5 C)。⁶¹ この共通性の高い塩基配列 (consensus sequence) 中には、ヒト MT-II の MRE

と推定された塩基配列 (Fig. 5 A) も含まれていた。マウス MT-I の consensus sequence に対応する塩基配列を、5'-flanking sequence 中の任意の位置に複数個並べた fusion gene でも、カドミウムによる HSV-TK の発現がおこることが示され、^{62,63} この consensus sequence が重金属による MT 遺伝子発現の調節に重要な役割をはたしている塩基配列、MRE であることが示唆された。また、この MRE と高い共通性を持つ塩基配列が、4種の MT 遺伝子の 5'-flanking region の同じような位置に存在することから、重金属による MT 遺伝子の発現調節機構には種を越えた共通性が存在することが予想される。

一方、グルココルチコイドによる MT 誘導の調節機構はマウスとヒトで若干様子が違っているものと思われ

る。マウスの培養細胞 (hepatoma, Hepa 1 A) のカドミウムとグルココルチコイドによる MT-I と-II の誘導能を比較したところ、両者に大きな差は認められないことが明らかにされている。⁶⁴⁾ ところが、マウス MT-I の 5'-flanking sequence をヒトの場合と同様に形質導入してみると、グルココルチコイドによる形質発現の程度はカドミウムに比べてかなり低いものであった。^{57,65)} この原因としてマウスの場合、グルココルチコイドによって MT 遺伝子が発現されるためには、グルココルチコイド-リセプター複合体が 5'-flanking sequence に結合することに加えて、他の要因が必要であるか、あるいは複合体の結合部位が、MT の構造遺伝子とはかなり離れている可能性などが考えられる。

カドミウムによる MT の誘導に際して control sequence にどのようなタンパク質が結合するかという点についてはまだ明らかにされていない。しかし、MT の誘導には、MT 遺伝子とは独立した別の遺伝子に由来する factor (タンパク質) が control sequence に結合することにより引き起こされることを示唆する報告があり、^{58,66)} これより先に述べた作業仮説に近い機構の存在が示唆される。

MT 遺伝子の発現には、他の調節機構が介在していることも考えられる。例えば、カドミウムによる MT 遺伝子の発現に伴い、MT 遺伝子 DNA のシトシン残基がメチル化されるとか、⁶⁷⁾ クロマチンの構造が変化することを示唆する報告がある。^{68,69)} 更に、Palmiter のグループはエンドトキシン (リポポリサッカライド) によるマウス MT-I の誘導には 5'-flanking sequence の -185 -350 base の領域が必要であり、カドミウムやグルココルチコイドによる発現機構とは異なる第三の機構が存在することを示唆している。⁷⁰⁾

6. MT-I と MT-II の役割りに差はあるか

MT-I と MT-II の役割りが違うことを示唆する結果がヒト繊維芽細胞を用いて報告されている。⁴⁹⁾ 各種の inducer (カドミウム、亜鉛、グルココルチコイド) を用いて細胞の MT-I と MT-II の mRNA への転写能の差を比較したところ、Table I に示すように MT-I mRNA はカドミウムにより比較的特異的に転写されることが示された。

形質導入の手法を用いてもほぼ同様の結果が得られている。⁴⁹⁾ すなわち、MT-I 又は MT-II の 5'-flanking sequence と HSV-TK の構造配列の fusion gene を形質導入し、各種 inducer による HSV-TK の発現を比較した。MT-II の 5'-flanking sequence の場合には、カドミウム、亜鉛、グルココルチコイドのすべてで HSV-

TABLE I. Relative Induction of Human Metallothionein Genes by Heavy Metals and Glucocorticoid Hormone⁴⁹⁾

MT-I	Control	1
	Dexamethasone	4
	Zinc	4
	Cadmium	14
MT-II	Control	1
	Dexamethasone	12
	Zinc	14
	Cadmium	10

Primary cultures of human fibroblasts were incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum (control) or in the presence of 10^{-6} M dexamethasone, 10^{-4} M zinc ion or 10^{-6} M cadmium ion. Cytoplasmic RNA was extracted and 40 μ g samples were analyzed by electrophoresis on agarose gels and Northern hybridization.⁹⁹⁾ Relative inducibility was determined from densitometer traces of the autoradiographs.

TK が発現されたのに対して、MT-I ではカドミウムだけが HSV-TK を特異的に発現させた。したがって、カドミウムによる MT-I の特異的な誘導は、5'-flanking sequence により決定されていると考えられる。以上より、ヒトにおいては MT-II は亜鉛の代謝に主としてかわり、MT-I は有害重金属に対する保護作用にかかわっていることが示唆された。しかし、前述のように、マウス培養細胞ではどの inducer (亜鉛、銅、カドミウム、グルココルチコイド) を用いても MT-I と MT-II の mRNA の転写量には大きな差は認められていない。⁶⁴⁾ したがって、MT-I と MT-II の役割りの違いについてはまだ一般化できないものと考えられる。

7. MT 遺伝子の重複

これまで述べてきたように、細胞は重金属の毒性を MT を誘導することにより防いでいる。培養細胞をカドミウムを含む培地中で培養していると重金属に対して耐性を持った細胞株が生じてくる。通常のマウス Friend leukemia 細胞では、培地に 12 μ M のカドミウムを添加すると、50% の細胞が死んでしまう (Cd^s cell)。ところが、培地中のカドミウム濃度を次第に上昇させて細胞を継代し続けると、220 μ M のカドミウムを培地に添加して初めて50%の細胞が死ぬという、カドミウムに対して強い耐性を示す細胞株 (Cd^r cell) が生じてくる。カドミウム暴露により、 Cd^r cell では Cd^s cell に比べて大量の MT が誘導され、 Cd^r cell の細胞当りの MT-I mRNA 量は Cd^s cell の14倍となっていた。⁷¹⁾

mRNA 量増加の原因の1つとして、単に mRNA の転写の効率が上昇するだけでなく、遺伝子の数が増すこ

とが考えられる。例えば, dihydrofolate reductase 遺伝子などがその例として知られている。⁷²⁾ そこで細胞当りの MT-I 遺伝子の数を定量したところ, Cd^r cell は Cd^s cell の 6 倍の MT-I 遺伝子を持っていた。⁷¹⁾ このことは, 培養細胞の重金属耐性獲得の機構として, MT 遺伝子の重複が重要であることを示唆している。しかし, 不思議なことにこのような重複された MT-I 遺伝子はグルココルチコイドに対する感受性を失っており, グルココルチコイドによる MT の誘導量の増加は認められなかった。⁷³⁾ では, Cd^r cell の他の重金属に対する耐性はどうなっているのだろうか。細胞内で MT に結合していることが知られている亜鉛と銅に対しては Cd^r cell は耐性を示した。しかし, 水銀とビスマスに対しては若干の耐性を示したものの, 銀, コバルト, 及びニッケルに対する耐性は示さなかった。⁷⁴⁾ MT の機能を考える上で興味ある知見である。同様な MT 遺伝子の増幅はチャイニーズハムスターの細胞^{75,76)} や酵母⁷⁷⁾ においても認められた。また, このような遺伝子の重複が, カドミウムを投与したマウスの肝臓でも起こっていることが明らかにされた。¹⁰⁰⁾

8. MT 遺伝子の染色体上の位置

MT-I と MT-II の遺伝子は染色体の上でどのように配置されているのであろうか。これも MT の生物学上の役割りを考える上で重要な問題であり, マウスとヒト及びチャイニーズハムスターにおいて調べられている。まず, マウスでは MT-I と MT-II 遺伝子は共に 8 番の染色体の近接した位置に存在していることが明らかとなった。^{47,78)}

一方, ヒト MT の場合, マウスとはかなり様子が異なっていた。マウスでは現在のところ MT-I 及び -II の遺伝子の数は haploid 当たりそれぞれ 1 個存在するとされているのに対し,^{47,78)} ヒトでは 4 個の遺伝子が存在するとされている。それらは MT-IA (今まで述べてきた MT-I に相当), MT-IE,⁷⁹⁾ MT-IF,⁷⁹⁾ MT-IIA (同じく MT-II に相当) と呼ばれている。この多様性はヒト MT には 4 個以上のイソタンパク質が存在するとの報告に対応している。⁸⁰⁾ 更に MT 遺伝子と極めて構造が似ているが, その構造から考えて実際には発現していないと思われる遺伝子 (pseudogene) が 5 個見出されている。(φMT-IC,⁴⁹⁾ φMT-ID,⁴⁹⁾ φMT-IG,⁷⁹⁾ φMT-IH,⁸¹⁾ φMT-IIB,⁴⁸⁾ 略名は Hamer の総説⁸⁾ による。この他に発現の有無が不明である MT-IB が存在する)。このうち, φMT-IC, -ID と -IG 遺伝子は MT の構造遺伝子, あるいは 5'-flanking sequence の一部の塩基が他の塩基に変換されたり, 欠落したため, 発現されなくなったと考えられ

る遺伝子である。それに対して, φMT-IH と -IIB は極めて特徴ある塩基配列をしており, あたかも mRNA が逆に DNA に転写されたような構造をしている。このような pseudogene は一般に processed gene と呼ばれている。

Processed gene について φMT-IIB を例に述べよう (Fig. 6)。MT-IIA 遺伝子と比較すると明らかなように, intron が全く存在せず, 5'-flanking sequence の塩基配列も全く変ってしまっている。そして 3' 末端には mRNA に存在する poly A が存在する。更に, 遺伝子の 3' と 5' 末端の外側の塩基配列は極めて類似している。このような構造は染色体 DNA に外部より挿入された遺伝子に認められる塩基配列である。⁸²⁾ これらの知見から, この pseudogene は細胞内で MT-II mRNA より cDNA が合成され, これがヒトの発生過程等で染色体中に組み込まれたために生じたのではないか, という想像がなされる。このような processed gene は α-globin 遺伝子をはじめとして他にもいくつかの例が知られている。⁸³⁾

それではこれらのヒト MT 遺伝子の染色体上の配置はどのようになっているのであろうか。processed gene である φMT-IIB は 4 番の染色体に存在するのに対して,⁸⁴⁾ 発現されている MT 遺伝子や他の pseudo MT gene は 16 番染色体の近接した位置に存在している (ただし, φMT-IH の位置は不明)。^{26,85,86)} 特に MT-IA, φMT-ID, φMT-IC, MT-IB 遺伝子についてはこの順番で染色体 DNA の 5' から 3' の方向に並んで存在していることが明らかにされている。⁴⁹⁾ チャイニーズハムスターでは, 3 番の染色体上に MT-I と MT-II との遺伝子が存在していることが明らかにされている。⁸⁷⁾

遺伝子の重複という過程は進化が起こる上で重要な役割りを果たしているとの仮説が提出されている。⁸⁸⁾ したがって, 体細胞中にも MT 遺伝子及びその pseudogene が複数個存在している事実は, 遺伝子の重複が MT 遺伝子の発現の調節と進化に重要な意味を持っていると思われる。また, MT 遺伝子 (群) は進化そのものを考える上でも興味ある系と考えられる。

9. MT 遺伝子の形質導入の応用

MT 遺伝子の 5'-flanking sequence と HSV-TK の構造配列からなる fusion gene を導入した細胞に重金属を暴露すると, HSV-TK を発現させることが出来た。同様に HSV-TK にかわる他の遺伝子の構造配列を MT の 5'-flanking sequence と結合させた fusion gene を細胞に形質導入すれば, その遺伝子に対応する生理活性物質などを細胞内で生産することに応用出来るはずである。この応用例としてすでに B 型肝炎ウイルス抗原を

ンの fusion gene を microinjection したのち、子宮に入れたところ、21匹のマウスが出生した。これらのマウスのうち7匹が成長ホルモンの遺伝子を持っていた。これらのマウスに亜鉛を添加した (5 mg/g) 飼料を与えたところ、肝臓で成長ホルモンが発現され、体重は通常のマウスの1.2—1.9倍に増加していた。このように本来その動物が持っていない遺伝子を形質導入することによって、いわば遺伝形質の転換が可能になることが示された。しかし、このマウスにおけるラットの成長ホルモンの発現の調節は複雑なものであるらしく、例えば、本来亜鉛に依存した形では MT 遺伝子の発現が起こらない脳でも、ラット成長ホルモンの発現が起こっていた。⁹⁵⁾

10. ま と め

MT 遺伝子に係る研究は今後どのように進んでいくであろうか。第一は、MT 遺伝子の発現調節機構に関する問題である。MT 遺伝子の発現には重金属やホルモン等複数の inducer が存在し、5'-flanking sequence にそれら inducer に対応する MT 遺伝子の発現に必要な部位が存在することが確認されている。次の段階として、5'-flanking sequence にどのようなタンパク質が結合することにより MT 遺伝子の発現が引き起こされるのかという点に興味が集まっている。このような試みは他の遺伝子についても行なわれており、すでに heat shock protein などで 5'-flanking sequence に結合するタンパク質が同定されている。⁹⁶⁾

MT 遺伝子は重金属の有無という非常に単純な条件で発現の調節が行なわれる遺伝子であり、遺伝子の発現調節機構を明らかにしていく上で有利な系であると考えられる。一方、複数の inducer が存在するという複雑な側

面も持っている。今後、MT 遺伝子の発現調節機構が明らかにされるに伴ない、遺伝子発現に共通な機構と共に MT 遺伝子の発現に特異的な機構も見出される可能性があり、興味ある問題が提起されてくるものと思われる。

第二点として、金属タンパク質としての MT 自体の構造と機能に関する問題を挙げることができる。最近、タンパク質工学と呼ばれるように、人工的なタンパク質を創り出し、タンパク質の機能を明らかにしたり、特徴ある性能を持ったタンパク質を生み出す試みがなされている。MT についても、配列の塩基の変換を行ない、その人工的な遺伝子を大腸菌に形質導入することにより、天然にはない MT を創り出そうとする試みがなされている。^{97,98)} この方法により、MT の機能の解明あるいは、優れた重金属の chelater の開発がすすめられるものと思われる。

毒性学、あるいは衛生化学の一つの目標は毒物がどのような機構で毒作用を示すのか、あるいは、毒物に対して生体がどのような反応や適応を示すのかを明らかにすることである。このような研究を通して、毒性発現の予測を行なうことができる段階にまで研究をすすめることが必要であると思われる。

毒物が生物に与えられた時、生物は毒物に対して、その生物固有の法則性に則って必ず反応を示すはずである。したがって毒性の研究も生物の機能を明らかにしていくという方向性を持ちつつすすめられるべきであると思われる。本稿で紹介した MT 遺伝子の発現機構に関する研究が、毒物の生体影響を研究するにあたっての参考になることを期待したい。

引 用 文 献

- 1) 不破敬一郎(編), “生体と重金属,” 講談社サイエンティフィク, 東京, 1981.
- 2) H. Sigel (ed.), “Metal Ions in Biological Systems,” Vol. 1—18, Marcel Dekker, New York, (1974—1984).
- 3) 木村正己, 小泉信滋, 蛋白質・核酸・酵素, **27**, 1893 (1982).
- 4) M. Karin, *Cell*, **41**, 9 (1985).
- 5) M. Karin, R.I. Richards, *Environ. Health Perspect.*, **54**, 111 (1984).
- 6) D.H. Hamer, *Annu. Rev. Biochem.* in press, (1986).
- 7) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.* **235**, 3461 (1960).
- 8) J.H.R. Kägi, M. Nordberg (ed.), “Metallothionein,” Birkhäuser Verlag, Basel, 1979.
- 9) M. Webb (ed.), “The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium,” Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979.
- 10) M. Piscator, *Nord. Hyg. Tidskr.* **45**, 76 (1964).
- 11) 鈴木和夫, “化学増刊 95, 金属イオンの生物活性,” 喜谷喜徳, 田中 久, 中原昭次編, 化学同人, 京都, 1982, pp.91—108.
- 12) K.R. Etzel, S.G. Shapiro, R.J. Cousins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1120 (1977).
- 13) M. Karin, R.D. Andersen, E. Slater, K. Smith, H.R. Herschman, *Nature* (London), **286**, 295 (1980).

- 14) M. Karin, R.D. Andersen, H.R. Herschman, *Eur. J. Biochem.*, **118**, 527 (1981).
- 15) K.E. Mayo, R.D. Palmiter, *J. Biol. Chem.*, **256**, 2621 (1981).
- 16) L.J. Hager, R.D. Palmiter, *Nature* (London), **291**, 340 (1981).
- 17) M.L. Failla, R.J. Cousins, *Biochim. Biophys. Acta*, **538**, 435 (1978).
- 18) B.S. Helving, F.O. Brady, *Life Sci.*, **35**, 2513 (1984).
- 19) F.O. Brady, B. Helvig, *Am. J. Physiol.*, **247**, E318 (1984).
- 20) P.Z. Sobocinski, W.J. Canterbury Jr., C.H. Mapes, R.E. Dinterman, *Am. J. Physiol.*, **234**, E399 (1978).
- 21) K.T. Suzuki, M. Yamamura, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 2260 (1980).
- 22) T. Maitani, K.T. Suzuki, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 2353 (1981).
- 23) R.L. Friedman, G.R. Stark, *Nature* (London), **314**, 637 (1985).
- 24) R.A. Disilvestro, R.J. Cousins, *Life Sci.*, **35**, 2113, (1984).
- 25) S.H. Oh, J.T. Deagen, P.D. Whanger, P.H. Weswig, *Am. J. Physiol.*, **234**, E282 (1978).
- 26) M.M. Le Beau, M.O. Diaz, M. Karin, J.D. Rowley, *Nature* (London), **313**, 709 (1985).
- 27) K.T. Suzuki, Y. Ebihara, H. Akitomi, M. Nishikawa, R. Kawamura, *Comp. Biochem. Physiol.*, **76C**, 33 (1983).
- 28) A.J. Ouellette, *Dev. Biol.*, **92**, 240 (1982).
- 29) J.E. Piletz, R.D. Andersen, B.W. Birren, H.R. Herschman, *Eur. J. Biochem.*, **131**, 489 (1983).
- 30) M.P. Richards, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **3**, 128 (1984).
- 31) M. Nemer, E.C. Travaglini, E. Rondinelli, J. D'Alonzo, *Dev. Biol.*, **102**, 471 (1984).
- 32) K.T. Suzuki, M. Yamamura, *Toxicol. Lett.*, **6**, 59 (1980).
- 33) K.T. Suzuki, M. Yamamura, *Toxicol. Lett.*, **6**, 301 (1980).
- 34) K.T. Suzuki, M. Yamamura, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 2407 (1980).
- 35) Y. Aoki, K.T. Suzuki, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 1713 (1985).
- 36) B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, "Molecular Biology of the Cell," Garland, New York, 1983.
- 37) D.M. Durnam, F. Perrin, F. Gannon, R.D. Palmiter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 6511 (1980).
- 38) M. Mbikay, I.B. Maiti, J-P. Thirion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 825 (1981).
- 39) J.F.B. Mercer, P. Hudson, *Biosci. Rep.*, **2**, 761 (1982).
- 40) R.D. Andersen, B.W. Birren, T. Ganz, J.E. Piletz, H.R. Herschman, *DNA*, **2**, 15 (1983).
- 41) B.B. Griffith, R.A. Walters, M.D. Enger, C.E. Hildebrand, J.K. Griffith, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 901 (1983).
- 42) M.G. Peterson, I. Lazdins, D.M. Danks, J.F.B. Mercer, *Eur. J. Biochem.*, **143**, 507 (1984).
- 43) M. Karin, R.I. Richards, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 3165 (1982).
- 44) C.J. Schmidt, D.H. Hamer, *Gene*, **24**, 137 (1983).
- 45) D. Lastowski-Perry, E. Otto, G. Maroni, *J. Biol. Chem.*, **260**, 1527 (1985).
- 46) N. Glanville, D.M. Durnam, R.D. Palmiter, *Nature* (London), **292**, 267 (1981).
- 47) P.F. Searle, B.L. Davison, G.W. Stuart, T.M. Wilkie, G. Norstedt, R.D. Palmiter, *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1221 (1984).
- 48) M. Karin, R.I. Richards, *Nature* (London), **299**, 797 (1982).
- 49) R.I. Richards, A. Heguy, M. Karin, *Cell*, **37**, 263 (1984).
- 50) S.G. Shapiro, K.S. Squibb, L.A. Markowitz, R.J. Cousins, *Biochem. J.*, **175**, 833 (1978).
- 51) R.D. Andersen, U. Weser, *Biochem. J.*, **175**, 841 (1978).
- 52) D.M. Durman, R.D. Palmiter, *J. Biol. Chem.*, **256**, 5712 (1981).
- 53) H.M. Westphal, M. Beato, *Eur. J. Biochem.*, **106**, 395 (1980).
- 54) C. Scheidereit, S. Geisse, H.M. Westphal, M. Beato, *Nature* (London), **304**, 749 (1978).
- 55) M. Karin, A. Haslinger, H. Holtgreve, R.I. Richards, P. Krauter, H.M. Westphal, M. Beato, *Nature* (London), **308**, 513 (1984).
- 56) M. Karin, H. Holtgreve, *DNA*, **3**, 319 (1984).
- 57) K.E. Mayo, R. Warren, R.D. Palmiter, *Cell*, **29**, 99 (1982).
- 58) C. Séguin, B.K. Felber, A.D. Carter, D.H. Hamer, *Nature* (London), **312**, 781 (1984).
- 59) R.L. Brinster, H.Y. Chen, R. Warren, A. Sarthy, R.D. Palmiter, *Nature* (London), **296**, 39 (1982).
- 60) A.D. Carter, B.K. Felber, M.J. Walling, M-F. Jubier, C.J. Schmidt, D.H. Hamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 7392 (1984).

- 61) G.W. Stuart, P.F. Searle, H.Y. Chen, R.L. Brinster, R.D. Palmiter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 7318 (1984).
- 62) P.F. Searle, G.W. Stuart, R.D. Palmiter, *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1480 (1985).
- 63) G.W. Stuart, P.F. Searle, R.D. Palmiter, *Nature* (London), **317**, 828 (1985).
- 64) M.K. Yagle, R.D. Palmiter, *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 291 (1985).
- 65) G.N. Pavlakakis, D.H. Hamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 397 (1983).
- 66) A. Leone, G.N. Pavlakakis, D.H. Hamer, *Cell*, **40**, 301 (1985).
- 67) S.J. Compere, R.D. Palmiter, *Cell*, **25**, 233 (1981).
- 68) A.W. Seneear, R.D. Palmiter, *Proc. Cold Spring Harbor Symp.*, **47**, 539 (1982).
- 69) J. Koropatnick, G. Andrews, J.D. Duerksen, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 3255 (1983).
- 70) D.M. Durnam, J.S. Hoffman, C.J. Quaife, E.P. Benditt, H.Y. Chen, P.L. Brinster, R.D. Palmiter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1053 (1984).
- 71) L.R. Beach, R.D. Palmiter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 2110 (1981).
- 72) F.W. Alt, R.E. Kellems, J.R. Bertino, R.T. Schimke, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1357 (1978).
- 73) K.E. Mayo, R.D. Palmiter, *J. Biol. Chem.*, **257**, 3061 (1982).
- 74) D.M. Durnam, R.D. Palmiter, *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 484 (1984).
- 75) G.G. Gick, K.S. McCarty, Sr., *J. Biol. Chem.*, **257**, 9049 (1982).
- 76) B.D. Crawford, M.D. Enger, B.B. Griffith, J.K. Griffith, J.L. Hanners, J.L. Longmire, A.C. Munk, R.L. Stallings, J.G. Tesmer, R.A. Walters, C.E. Hildebrand, *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 320 (1985).
- 77) S. Fogel, J.W. Welch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 5342 (1982).
- 78) D.R. Cox, R.D. Palmiter, *Hum. Genet.*, **64**, 61 (1983).
- 79) C.J. Schmidt, M.F. Jubier, D.H. Hamer, *J. Biol. Chem.*, **260**, 7731 (1985).
- 80) S. Koizumi, N. Otaki, M. Kimura, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3672 (1985).
- 81) U. Varshney, L. Gedamu, *Gene*, **31**, 135 (1984).
- 82) H.E. Varmus, *Science*, **216**, 812 (1982).
- 83) Y. Nishioka, A. Leder, P. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 2806 (1980).
- 84) H.B. Lieberman, M. Rabin, P.E. Barker, F.H. Ruddle, U. Varshney, L. Gedamu, *Cytogenet. Cell Genet.*, **39**, 109 (1985).
- 85) C.J. Schmidt, D.H. Hamer, O.W. McBride, *Science*, **224**, 1104 (1984).
- 86) M. Karin, R.L. Eddy, W.M. Henry, L.L. Haley, M.G. Byers, T.B. Shows, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 5494 (1984).
- 87) R.L. Stallings, A.C. Munk, J.L. Longmire, C.E. Hildebrand, B.D. Crawford, *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 2932 (1984).
- 88) S. オオノ, "遺伝子重複による進化," 岩波書店, 東京, 1977.
- 89) N. Hsiung, R. Fitts, S. Wilson, A. Milne, D. Hamer, *J. Mol. Appl. Genet.*, **2**, 497 (1984).
- 90) J.H. Weis, J.G. Seidman, *J. Immunol.*, **134**, 1999 (1985).
- 91) R.D. Palmiter, R.L. Brinster, *Cell*, **41**, 343 (1985).
- 92) R.D. Palmiter, R.L. Brinster, R.E. Hammer, M.E. Trumbauer, M.G. Rosenfeld, N.G. Birnberg, R.M. Evans, *Nature* (London), **300**, 611 (1982).
- 93) R.L. Brinster, H.Y. Chen, M. Trumbauer, *Cell*, **27**, 223 (1981).
- 94) R.D. Palmiter, H.Y. Chen, R.L. Brinster, *Cell*, **29**, 701 (1982).
- 95) L.W. Swanson, D.M. Simmons, J. Arriza, R. Hammer, R. Brinster, M.G. Rosenfeld, R.M. Evans, *Nature* (London), **317**, 363 (1985).
- 96) C.S. Parker, J. Topol, *Cell*, **37**, 273 (1984).
- 97) R. Pine, M. Cismowski, S.W. Liu, P.C. Huang, *DNA*, **4**, 115 (1985).
- 98) M. Mbikay, R. Brzezinski, J-P. Thirion, *DNA*, **2**, 23 (1983).
- 99) P. Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 5201 (1980).
- 100) J. Koropatnick, R. Winning, E. Wiese, M. Heschl, L. Gedamu, J. Duerksen, *Nucleic Acids Res.*, **13**, 5423 (1985).