

ヒトメタロチオネインアイソフォーム遺伝子の重金属応答

三浦伸彦,* 小泉信滋

Heavy Metal Responses of the Human Metallothionein Isoform Genes

Nobuhiko MIURA* and Shinji KOIZUMI

Mechanism of Health Effect Research Group, National Institute of Occupational Safety and Health, 6-21-1 Nagao, Tama-ku, Kawasaki 214-8585, Japan

(Received August 8, 2006)

Metallothioneins (MTs) are proteins known to be involved in defense mechanisms against heavy metals and reactive oxygen species. In human, more than ten MT isoform genes have been identified, in contrast to much fewer isoforms in other mammalian species. The increased number of isoforms in human may have some biological significance; for example, isoforms may have been functionally differentiated to deal with various environmental factors in the evolutionary process. However, we know little about the functions of the individual MT isoforms. To clarify functional differences between human MT isoforms, we developed a method to determine individual isoform mRNA levels using real-time polymerase chain reaction (PCR), and studied responses of the isoform genes against heavy metals (Zn, Cd, Cu) and As in HeLa cells. These metals induced all MT isoforms except for MT-1A by Cu, though their induced levels were different. Furthermore, these metals preferentially induced isoforms MT-2A and MT-1X suggesting that these isoforms may be important in protecting from their cytotoxicity.

Key words—metallothionein; isoform; gene expression; heavy metal; real-time polymerase chain reaction

1. はじめに

哺乳類のメタロチオネイン (MT) は 1957 年の発見以来、肝臓や腎臓を始め多くの組織に存在が認められた分子量約 6500 の低分子量タンパク質である。MT は構成アミノ酸の約 1/3 をシステインが占めるといった特徴的な構造を持ち、荷電で分離可能な 2 つの主要アイソフォーム (MT-1, MT-2) の存在が知られていた。¹⁾ MT の有する生理的機能として最もよく知られているのは重金属毒性の抑制で、その分子中に豊富に存在する SH 基を介して Cd や Hg などの重金属を結合することによりそれらの毒性発現を抑える。²⁾ さらにその後の研究から酸化ストレスが引き起こす障害に対しても防御的に働くことが示された。³⁾ MT の示すこれらの機能は MT-1/MT-2 ノックアウトマウス及び細胞を用いた実験により証明されている。^{4–6)} また MT は重金属や酸化

ストレスのみならず、多彩な誘導剤 (化学物質、サイトカイン、ホルモン、成長因子等) に応答することが報告されており、^{3,7)} MT がさらに様々なストレス応答や生体防御に関与していることを予想させる。1990 年代には MT-1, MT-2 に加え、2 つの新たなアイソフォーム MT-3, MT-4 が発見された。一次構造上の特徴として、MT-3 は MT-1, MT-2 に比べ N 末側・C 末側の 2 ヲ所に各々 1 アミノ酸・6 アミノ酸の挿入、⁸⁾ MT-4 は N 末側の 1 ヲ所に 1 アミノ酸の挿入⁹⁾を持つ。

2. マウス及びヒトの MT アイソフォーム遺伝子

マウスでは MT-1, MT-2, MT-3, MT-4 の 4 つの MT アイソフォーム遺伝子が第 8 番染色体上に同定されている。⁹⁾ 一方ヒトの MT にはタンパク質レベルでの多様性が指摘されていた^{10,11)}が、その後の遺伝子解析の結果、MT-2, MT-3, MT-4 の機能的遺伝子についてマウスと同様各 1 種類が同定された^{8,9,12)}のに加え、MT-1 には複数のサブアイソフォーム遺伝子が存在し、第 16 番染色体上 (16q13) にクラスターを形成していることが示された (Fig. 1)。^{13–15)} この領域内に同定された MT-1 アイソフ

独労働安全衛生総合研究所・産業医学総合研究所健康障害予防研究グループ (〒214-8585 川崎市多摩区長尾 6-21-1)

*e-mail: miuran@h.jniosh.go.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S40 で発表したものを中心に記述したものである。

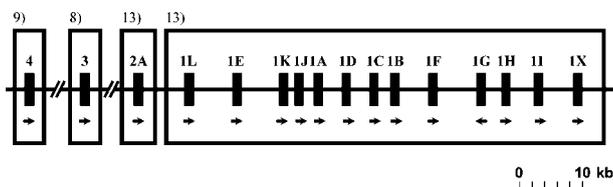


Fig. 1. Human MT Genes Located on Chromosome 16

This map was prepared based on the reports by Stennard et al.,¹³⁾ Palmiter et al.,⁸⁾ and Quaife et al.,⁹⁾ as well as the gene database of National Center for Biotechnology Information, USA.

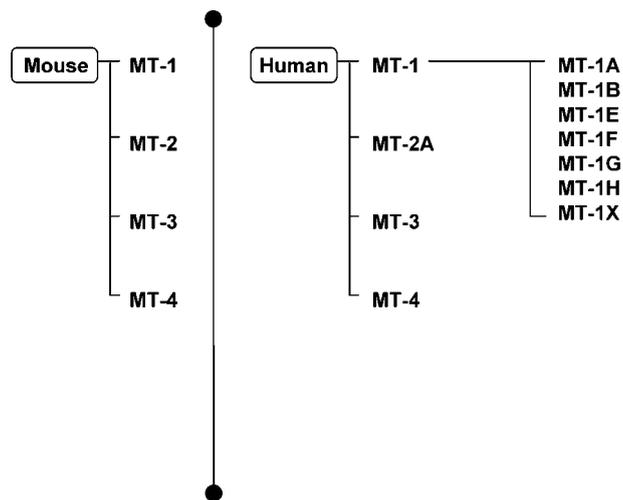


Fig. 2. Functional Metallothionein Isoform Genes in Mouse and Human

フォームで、塩基配列分析及び発現解析から機能的遺伝子と報告されているものは、MT-1A,¹⁶⁾ MT-1B,¹⁷⁾ MT-1E,¹⁸⁾ MT-1F,¹⁸⁾ MT-1G,¹⁹⁾ MT-1H,¹⁴⁾ MT-1X¹⁴⁾ の7種である (Fig. 2)。なお、MT-2には偽遺伝子であるアイソフォーム遺伝子 (MT-2B) が存在するため、機能的アイソフォーム遺伝子はMT-2Aと名付けられ区別されている。¹²⁾

マウスのMT-1, MT-2遺伝子は肝臓や腎臓など多くの組織あるいは培養細胞中でともに発現が認められ、各種誘導剤処理による発現応答の違いも認められないことから、機能的にも発現制御的にも同様と考えられていた。^{20,21)} しかしMT-1, MT-2遺伝子の発現比率が変化する事例がいくつか報告され、²²⁻²⁴⁾ アイソフォームの機能分化の可能性が示唆されている。一方ヒトの場合、MT-1, MT-2A遺伝子について、用いた細胞や誘導剤の種類によって明らかな発現の違いが報告されている。MT-2Aは多くの細胞や組織で発現・誘導が認められるのに対し、MT-1はアイソフォームに特異的な発現・誘導

を示すことが報告されている。^{25,26)} 最近ではヒトの組織を用いた検討例も増えつつあり、²⁷⁻²⁹⁾ 各MT-1アイソフォームの病態との関連をも含めた機能分化についての研究が進められているが、アイソフォーム多様化の必然性を説明できるような結論にはいまだに至っていない。

MT-3⁸⁾ は当初培養ニューロンの神経突起の伸長を抑制する growth inhibitory factor (GIF) として同定された。³⁰⁾ 発現は脳に局限するとされていた⁸⁾ が、最近になって腎臓及び腎臓由来の培養細胞^{31,32)} や前立腺、³³⁾ 精巣³⁴⁾ での発現、数種の癌細胞での発現増加^{33,35)} が報告されている。誘導に関しては、MT-1, MT-2とは異なりマウスの各組織で重金属に応答した発現は認められずストレス非応答性のアイソフォームと考えられていた⁸⁾ が、腎由来細胞において重金属応答が報告された例がある。^{32,36)} 一方MT-4は舌や皮膚、食道、胃などの重層扁平上皮細胞に局限して発現するアイソフォームである。Zn摂取マウスの胃での発現誘導、重層扁平上皮の分化過程における発現変動が報告されている。⁹⁾

上記のようにヒトのMTアイソフォーム遺伝子は多様化しているが、各々の機能的分化に関する研究は遅れている。その原因として各アイソフォームの特異的検出系が確立されていないことが挙げられる。すなわち、MTアイソフォームは互いに類似性が高いため、各々の発現レベルを正確に把握することは簡単ではない。アミノ酸配列の類似性により各アイソフォーム (特にMT-1アイソフォーム) を特異的に認識する抗体の取得が困難であることがタンパク質レベルの解析を阻んでいる。また逆相HPLC²⁵⁾ やキャピラリーゾーン電気泳動を用いたアイソフォームタンパク質の解析^{37,38)} も行われているが、MT-1アイソフォームの分解能には改善の余地を残している。同様にmRNA発現量の測定においても、塩基配列上の類似性が障害となっている。アイソフォーム特異的な定量のために3'-非翻訳領域 (UTR)^{16,26)} や5'-UTR³⁹⁾ の塩基配列をプローブとしたノーザンブロットや5'-UTRを用いたヌクレアーゼS1マッピング⁴⁰⁾ などの工夫がなされたが、多数のアイソフォームについて分別定量を行うには特異性確保等の面での困難があった。その後、PCRを利用したアイソフォームの個別定量法により機能的と考えられる10種のアイソフォーム遺伝

子の発現が検出されるようになった⁴¹⁾が、最も重要な点である特異性に関する情報は乏しい。当初は半定量的 PCR 法のため定量性に欠けていたこの方法も、リアルタイム PCR 法の利用により定量性や感度については改善されてきた^{27,42,43)}が、特異性に加えてアイソフォーム間の増幅効率の違い等の問題も残している。

われわれは、ヒト MT アイソフォームの機能的分化の理解を目的とし、各アイソフォームの発現レベルを正確に定量可能な方法を開発し、それを用いて重金属による各アイソフォームの発現変動を系統的に解析している。以下にその概要について述べる。

3. MT アイソフォーム遺伝子発現レベルの定量

分子生物学的手法を用いた実験系のキット化が進んだ現在、リアルタイム PCR 装置を用いた逆転写 (RT)-PCR 法も特別な手法ではなくなってきている。したがって各 MT アイソフォーム遺伝子を特異的に増幅する PCR プライマーがデザインできさえすれば、それぞれの発現量を調べることは難しいことではない。しかし上述のように MT アイソフォームは 61—68 アミノ酸で構成され、それらの mRNA は 500 塩基前後と短く、しかも翻訳領域の塩基配列は相同性が高い。われわれは 7 種の MT-1 アイソフォームに加え、MT-2A, MT-3, MT-4 を含む合計 10 種類のアイソフォーム (Fig. 2 参照) をクロス増幅することなく検出できるプライマーの作製を試みた。プライマーの設計に際しては以下の 3 点を考慮した。すなわち、(1) 1 つ以上のイントロンを挟む (ゲノム DNA 由来の増幅を避けるため)、(2) プライマーの融解温度値 (T_m 値) を可能な限り一致させる (共通した単一の PCR 反応を行うため; 55—59°C の範囲になるようにした)、(3) 10 種類の増幅産物の大きさをすべて異なるようにする (クロス増幅がないことを検証するため)。実際に反応を行わせた結果、PCR 産物のクロス増幅を認めた場合には設計・検証をやり直すという作業をくり返した。最終的に採用した各プライマーペア位置と増幅産物の大きさを Fig. 3 に示した。

クロス増幅の確認のために、各 MT アイソフォームの cDNA を組み込んだプラスミド 10 種類を作製し、これらの等モル混合物を鋳型としてプライマーの検証を行った。上記の各プライマーペアについて単一の PCR 産物が増幅されていること、かつ

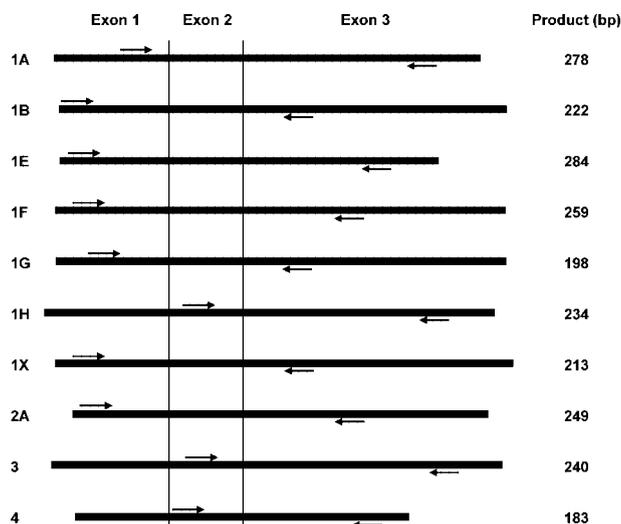


Fig. 3. Primers for Real-time PCR Analysis

The positions of PCR primer pairs (indicated by arrows) are schematically shown. The sizes of PCR products are indicated on the right in base pairs (bp).

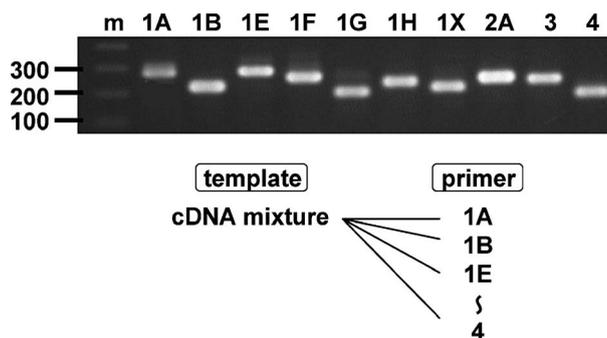


Fig. 4. Verification of Specific Isoform Sequence Detection

PCR amplification with each primer pair was performed. The reverse transcription products from HeLa and HepG2 RNA mixture were used as templates. PCR products were separated on 2% agarose gel followed by staining with ethidium bromide. m: size markers. DNA fragment sizes are indicated on the left (in bases).

その大きさは理論値と一致していることを確認した。さらに HeLa 細胞及び HepG2 細胞から抽出した RNA 混合物由来の cDNA を鋳型として用いた場合にも、プラスミドを用いた場合と同様に、各プライマーペアについて理論値と一致した大きさの単一の増幅産物が得られた (Fig. 4)。なおデータは示さないが、ライトサイクラー (後述) による PCR 産物の融解曲線解析からも各プライマーペアから単一の産物が得られることを確認している。以上の検討の結果、われわれは 10 種類の MT アイソフォーム遺伝子の発現を特異的に検出可能なプライマーを取得した。

各 MT アイソフォーム遺伝子の発現量はライトサイクラー (ロシュ社) を用いたリアルタイム PCR 法により測定した。この際、前記の各 MT アイソフォーム cDNA 配列を含むプラスミドを段階希釈して検量線を作成することにより、発現量の絶対値 (コピー数) を求めることができる。定量性について検討した結果、10 から 10^6 コピーの範囲で直線性が得られた。PCR 反応の理論的増幅効率率は 2^n であるが、実際にはより低値となる。それぞれの検量線の傾きから増幅効率を算出したところ、MT-1E の増幅効率が若干低いものの、本定量系ではすべての MT アイソフォームについて高感度の測定が可能であることを確認した。しかし増幅効率の差は誤差要因となるため、すべての増幅反応に段階希釈した標準 cDNA を含め、検量線から絶対コピー数を得ることとした。以上の検討から、リアルタイム PCR 法を用いた 10 種のヒト MT アイソフォーム遺伝子の発現レベルを特異的に定量する方法を確立することができた。

なお試料間のばらつきを抑えるために、 β -アクトニンやグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ等のハウスキーピング遺伝子 (HKG) の発現量を用いて目的とする遺伝子の発現量が補正されることが多い。しかしわれわれの予備検討では β -アクトニンの発現量は Cd 及び Zn の添加により変動することを認めており、また今後様々な誘導剤について検討していく上でも HKG の発現が変動しないという保証はない。このためわれわれの測定法では HKG による補正は行わないこととした。

4. 非誘導時における HeLa 細胞での MT アイソフォーム遺伝子の発現

上記の方法を用い、非誘導時における HeLa 細胞での各アイソフォームの発現について調べた。1 条件当たり培養ディッシュ 3 枚を用い ($n=3$)、それぞれのディッシュから抽出した RNA について分析し、平均を求めた。この結果、MT-2A アイソフォームの発現レベルが際立って高く、ついで MT-1X が高いことを認めた (Table 1)。これらに比べて他のアイソフォームの発現レベルは著しく低く (MT-1F>MT-1E>MT-4>MT-1B)、MT-1G、MT-1A、MT-1H 及び MT-3 については定量可能範囲外であった (Table 1)。このように、発現量にはアイソフォーム間で大きな差があることを見出した。

Table 1. Steady-State Expression Levels of MT Isoform Genes in HeLa Cells

	Level of gene expression (cDNA copy numbers \pm S.E./ μ g RNA)
MT-1A	2.2 \pm 0.4
MT-1B	15.1 \pm 3.0
MT-1E	222 \pm 12.1
MT-1F	1709 \pm 91.2
MT-1G	8.9 \pm 3.7
MT-1H	2.1 \pm 1.1
MT-1X	168833 \pm 4449
MT-2A	1985333 \pm 68957
MT-3	1.5 \pm 0.0
MT-4	88 \pm 5.2

The expression levels were determined by a real-time PCR method, and are indicated by cDNA copy numbers/ μ g RNA.

MT の生理的機能の 1 つとして Zn や Cu などの必須微量元素の貯蔵・供給が考えられているが、今回の結果は非誘導時における HeLa 細胞では主に MT-2A、MT-1X がこれらの金属の濃度調節に実質的な役割を果たしており、その他のアイソフォームの関与は低い可能性を示唆した。

5. 金属化合物による MT アイソフォーム遺伝子の発現誘導プロファイル

次に HeLa 細胞の培養液に金属化合物 (硫酸亜鉛 (ZnSO₄), 硫酸カドミウム (CdSO₄), 硫酸銅 (CuSO₄), 亜ヒ酸ナトリウム (NaAsO₂)) を添加し、6 時間後の MT アイソフォーム遺伝子の発現レベルを定量した。上記と同様 1 群 3 枚のディッシュを用い、それぞれの化合物につき 5 点の濃度で測定を行った。各 MT アイソフォーム発現のレベルを、最大値を与える金属濃度及び金属非存在下 (対照) について示した (Fig. 5)。Zn, Cd, As については、発現レベルに大きな差があるものの、MT-3 及び MT-4 アイソフォームを含むすべてのアイソフォームが誘導されることを見出した。Cu に対しては、MT-3、MT-4 を含め MT-1A 以外のアイソフォームが発現応答した。

Figure 5 では最大誘導を与える金属濃度での各 MT アイソフォーム mRNA 量を示している。この濃度を比較すると、Zn, Cd については各アイソフォーム間で大きな違いは認められなかった。しかし

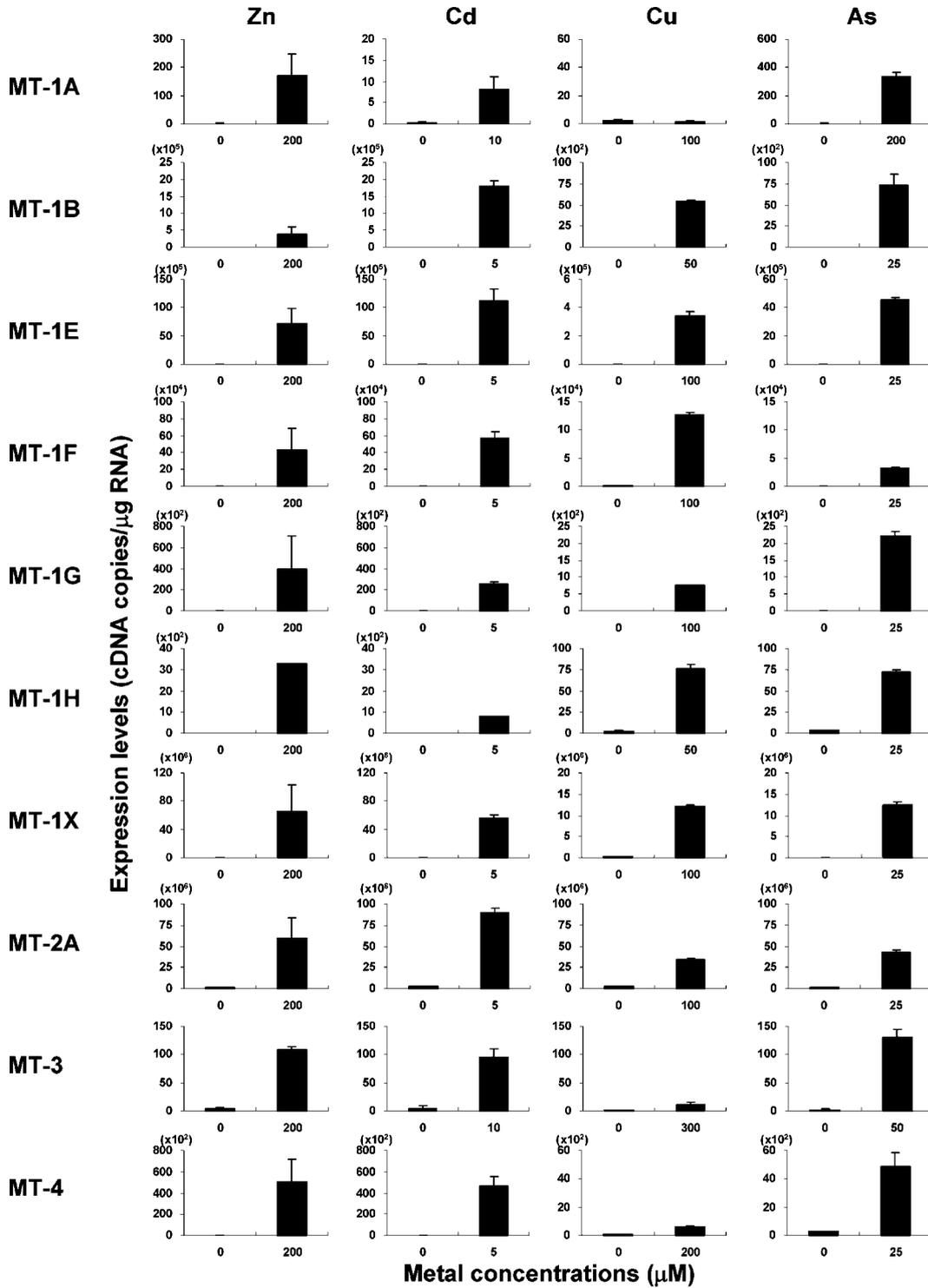


Fig. 5. Metal-induced Expression of MT Isoform Genes in HeLa Cells

HeLa cells were seeded on 60-mm dishes ($n=3$) and cultured for 3 days. After incubation with Zn, Cd, Cu or As for 6 hrs, total RNA was isolated and the expression levels of MT isoform genes were determined by the real-time PCR method. For each isoform, maximal responses (metal concentrations required are indicated below columns) and control uninduced levels are shown.

Cu では多くのアイソフォームの最大誘導濃度が $100 \mu\text{M}$ であったのに対し、MT-3, MT-4 ではそれぞれ $300 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{M}$ と高濃度側にシフトしていた。また As の場合、MT-1A のみが $200 \mu\text{M}$ であっ

たのに対し、他のアイソフォームの多くでは $25 \mu\text{M}$ であった。MT-1A は発現レベルが極めて低く、Cu 応答を欠くという特徴がみられた。これらの結果の生物学的意義については不明である。多くのアイソ

フォームが類似した応答キネティクスを示すこと、MT アイソフォーム遺伝子上流に MRE (重金属応答配列エレメント) 様配列が認められること⁴⁴⁾から、MRE に結合する転写因子 MTF-1 が各アイソフォームの重金属応答に関与していると予想されるが、独自の応答をするアイソフォームについては、MTF-1 以外の転写因子による制御の可能性も考えられる。

200 μ M Zn 及び 5 μ M Cd における各アイソフォームの誘導量を 1 つのグラフにまとめた (Fig. 6)。両金属の発現量を同一スケールで示し、また左図を linear スケール、右図を log スケールで表してある。いずれの金属でも MT-2A 及び MT-1X の発現量が際立って高く、ついで MT-1E が多いことが分かる (Fig. 6 左図)。Figure 6 には示していないが Cu, As についても同様であった。したがって高濃度におけるこれらの金属の調節には、MT-2A 及び MT-1X が主に関与すると思われる。Zn による誘導では MT-1X の誘導レベルが MT-2A よりむしろ高いことが特徴的であり、MT-1X は Zn の調節においてより重要な役割を担うことが示唆された。MT-2A, MT-1X, MT-1E 以外のアイソフォームについては (Fig. 6 右図)、全体として類似した誘導

パターンがみられたが、MT-1A の応答に違いがみられた。全アイソフォーム発現量の合計に対する各アイソフォーム発現量の比率を比較すると (Fig. 7), MT-1A の Zn, Cd に対する応答性の違いがより明確に示された。MT-1A ほど著明ではないが他のアイソフォーム (例えば MT-1B) についても金属間で違いが認められた。このような解析を進めていくことにより、異なる誘導剤に対するアイソフォーム応答の特異性が明らかになっていくと期待される。化学物質に特有な MT アイソフォーム発現パターン把握は、生体がどのような化学物質に曝露されているのかを推定するためのバイオマーカーとしての活用という、応用面での発展につながる可能性を有している。

6. おわりに

哺乳類 MT の多様化がどのような生物学的意義を持つのかは興味深いことであるが、現状ではそのほとんどが未知といってもよい。本稿の後半に記したように、われわれの研究室では特に多様化の顕著なヒト MT アイソフォーム遺伝子の発現解析により、MT の機能分化の意義を探ろうとしている。この目的のため、各アイソフォーム遺伝子産物レベルを的確に定量できる方法を開発した。本法を用いた

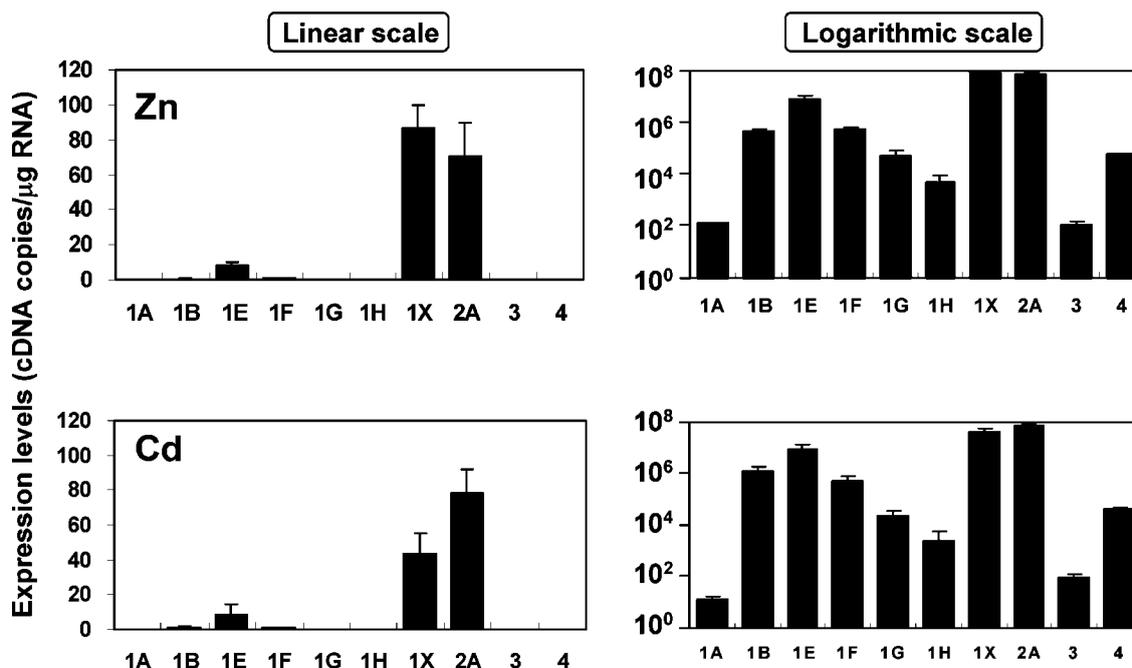


Fig. 6 Comparison of the Patterns of MT Isoform Gene Expression Induced by Zn and Cd

MT isoform gene expression levels are represented in an identical scale for cells exposed to 200 μ M Zn and 5 μ M Cd, either in linear scale (left) or in logarithmic scale (right).

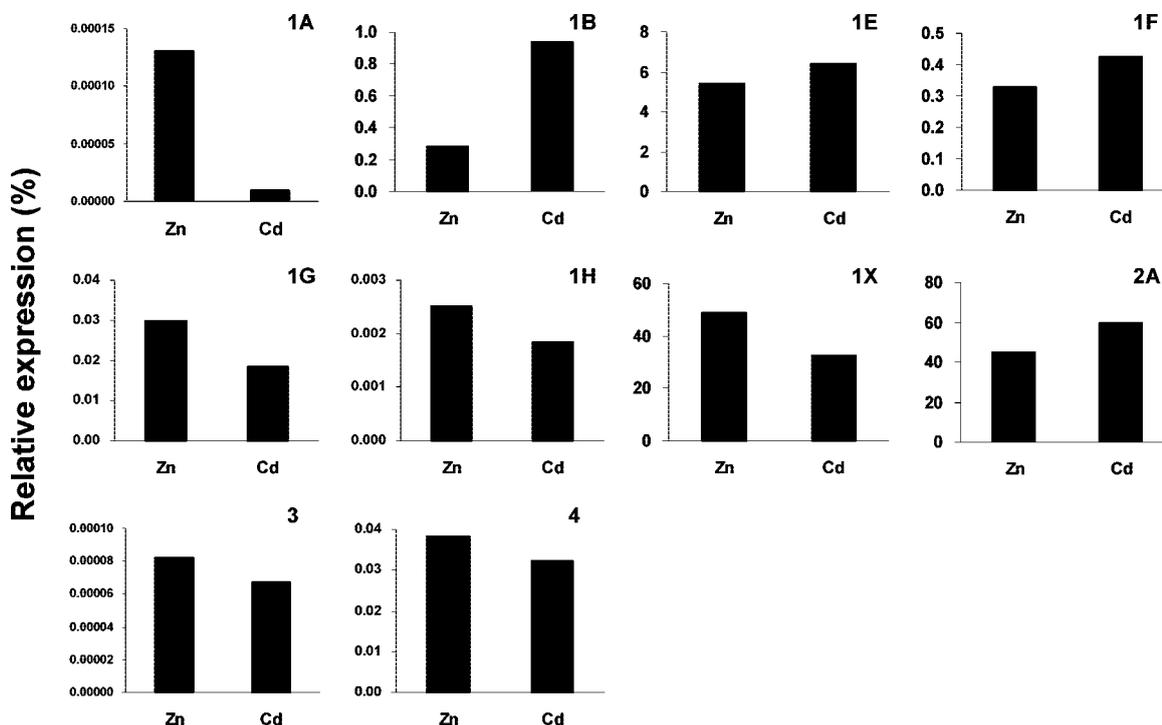


Fig. 7 Relative Expression of MT Isoform Genes

MT isoform gene expression levels from Fig. 6 are represented by percentages relative to total MT gene expression levels.

解析により、初めて各アイソフォーム遺伝子の発現レベルを正しく比較することが可能になったといえる。

われわれの研究では、主にヒト子宮癌由来の HeLa 細胞を用いている。Zn, Cd, Cu, As による MT アイソフォーム遺伝子の発現誘導を調べた結果では、いくつかの特異的応答はみられたものの全体としては金属間で類似した発現応答パターンが認められ、誘導機構の共通性を反映しているようにみえる。発現誘導のレベルから、HeLa 細胞において高濃度の金属に対する応答に重要なアイソフォームは、MT-2A, MT-1X 及び MT-1E と考えられた。同様の応答をヒト肝癌由来細胞・腎由来細胞においても観察しており、組織間での共通性が高いものかもしれない。しかし HeLa 細胞においては Zn による MT-1X の発現比率が大きいという特徴が認められ、アイソフォームの機能的特異性を示唆する 1 つの例となっている。これまでに行った実験の範囲では上記 3 種以外のアイソフォームの発現レベルは極めて低く、用いた金属に対する応答において主要な役割を果たしているとは考え難い結果であった。今後異なる組織・細胞での発現や異なる誘導剤に対する応答を調べ特異的な発現応答を見出していくことが、個

々のアイソフォーム機能の理解につながると思われる。

MT-3, MT-4 の重金属応答については前半で述べたようにこれまで曖昧であったが、われわれの解析から HeLa 細胞において、複数の金属に対し応答することが明らかとなった。さらに、肝臓・腎臓由来の細胞でも同様の応答を認めている。これらの結果は、少なくとも両遺伝子が重金属応答のための分子機構を備えていることを示すものである。組織特異性が高いといわれる MT-3, MT-4 については、特定組織での高発現レベルや金属応答の抑制等の可能性も考えられる。異なる組織におけるこれらの発現の違いを比較・検討していくことも、アイソフォーム機能分化の追究の上で興味深い課題である。

加えて防御タンパク質である MT のアイソフォーム機能分化の研究には、実用的な面での展開も期待できる。アイソフォームの機能分担が明らかになれば、特異アイソフォームの活性化を図ることにより特定の生体防御機能の賦活が可能になるかもしれない。また、誘導剤とアイソフォームの発現パターンの関連を明確にできれば、それをバイオマーカーとして利用し、曝露された誘導剤の種類や量を推定できる可能性が考えられる。近年では発癌等の

病態と関連した MT アイソフォームの特異的発現変化も研究されており、^{42,43,45)} 診断・治療面での利用に向けた洞察も図られている。このような活用面での展望も含め、今後の MT アイソフォーム研究の進展が期待される。

REFERENCES

- 1) Kägi J. H., Kojima Y., "Chemistry and Biochemistry of Metallothionein," eds. by Kägi J. H., Kojima Y., Metallothionein II, Birkhauser, Basel, 1987.
- 2) Cherian M. G., Chan H. M., "Biological Functions of Metallothionein—A Review," eds. by Suzuki K. T., Imura N., Kimura M., Metallothionein III, Birkhauser, Basel, 1993.
- 3) Sato M., Bremner I., *Free Radic. Biol. Med.*, **14**, 325–337 (1993).
- 4) Lazo J. S., Kondo Y., Dellapiazza D., Michalska A. E., Choo K. H., Pitt B. R., *J. Biol. Chem.*, **270**, 5506–5510 (1995).
- 5) Masters B. A., Kelly E. J., Quaife C. J., Brinster R. L., Palmiter R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 584–588 (1994).
- 6) Zheng H., Liu J., Liu Y., Klaassen C. D., *Toxicol. Lett.*, **87**, 139–145 (1996).
- 7) Kagi J. H., *Methods Enzymol.*, **205**, 613–626 (1991).
- 8) Palmiter R. D., Findley S. D., Whitmore T. E., Durnam D. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 6333–6337 (1992).
- 9) Quaife C. J., Findley S. D., Erickson J. C., Froelick G. J., Kelly E. J., Zambrowicz B. P., Palmiter R. D., *Biochemistry*, **33**, 7250–7259 (1994).
- 10) Koizumi S., Otaki N., Kimura M., *J. Biol. Chem.*, **260**, 3672–3675 (1985).
- 11) Hunziker P. E., Kagi J. H., *Biochem. J.*, **231**, 375–382 (1985).
- 12) Karin M., Richards R. I., *Nature*, **299**, 797–802 (1982).
- 13) Stennard F. A., Holloway A. F., Hamilton J., West A. K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1218**, 357–365 (1994).
- 14) West A. K., Stallings R., Hildebrand C. E., Chiu R., Karin M., Richards R. I., *Genomics*, **8**, 513–518 (1990).
- 15) Karin M., Eddy R. L., Henry W. M., Haley L. L., Byers M. G., Shows T. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 5494–5498 (1984).
- 16) Richards R. I., Heguy A., Karin M., *Cell*, **37**, 263–272 (1984).
- 17) Heguy A., West A., Richards R. I., Karin M., *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 2149–2157 (1986).
- 18) Schmidt C. J., Jubier M. F., Hamer D. H., *J. Biol. Chem.*, **260**, 7731–7737 (1985).
- 19) Foster R., Jahroudi N., Varshney U., Gedamu L., *J. Biol. Chem.*, **263**, 11528–11535 (1988).
- 20) Searle P. F., Davison B. L., Stuart G. W., Wilkie T. M., Norstedt G., Palmiter R. D., *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1221–1230 (1984).
- 21) Yagle M. K., Palmiter R. D., *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 291–294 (1985).
- 22) Kloth D. M., Chin J. L., Cherian M. G., *Br. J. Cancer*, **71**, 712–716 (1995).
- 23) Kershaw W. C., Lehman-McKeeman L. D., Klaassen C. D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **104**, 267–275 (1990).
- 24) Kobayashi S., Sayato-Suzuki J., *Biochem. J.*, **251**, 649–655 (1988).
- 25) Cavigelli M., Kagi J. H., Hunziker P. E., *Biochem. J.*, **292** (Pt 2), 551–554 (1993).
- 26) Jahroudi N., Foster R., Price-Haughey J., Beitel G., Gedamu L., *J. Biol. Chem.*, **265**, 6506–6511 (1990).
- 27) Lim D., Phan T. T., Yip G. W., Bay B. H., *Int. J. Mol. Med.*, **17**, 385–389 (2006).
- 28) Garrett S. H., Sens M. A., Shukla D., Flores L., Somji S., Todd J. H., Sens D. A., *Prostate*, **43**, 125–135 (2000).
- 29) Somji S., Sens M. A., Lamm D. L., Garrett S. H., Sens D. A., *Cancer Detect. Prev.*, **25**, 62–75 (2001).
- 30) Uchida Y., Takio K., Titani K., Ihara Y., Tomonaga M., *Neuron*, **7**, 337–347 (1991).
- 31) Garrett S. H., Sens M. A., Todd J. H., Somji S., Sens D. A., *Toxicol. Lett.*, **105**, 207–214 (1999).
- 32) Hoey J. G., Garrett S. H., Sens M. A., Todd J. H., Sens D. A., *Toxicol. Lett.*, **92**, 149–160 (1997).
- 33) Garrett S. H., Sens M. A., Shukla D., Nestor S., Somji S., Todd J. H., Sens D. A., *Prostate*, **41**, 196–202 (1999).
- 34) Moffatt P., Seguin C., *DNA Cell Biol.*, **17**, 501–510 (1998).
- 35) Sens M. A., Somji S., Garrett S. H., Beall C. L., Sens D. A., *Am. J. Pathol.*, **159**, 21–26

- (2001).
- 36) Garrett S. H., Phillips V., Somji S., Sens M. A., Dutta R., Park S., Kim D., Sens D. A., *Toxicol. Lett.*, **126**, 69–80 (2002).
- 37) Minami T., Ichida S., Kubo K., *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **781**, 303–311 (2002).
- 38) Kawata T., Nakamura S., Nakayama A., Fukuda H., Ebara M., Nagamine T., Minami T., Sakurai H., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 403–409 (2006).
- 39) Yang Y. Y., Woo E. S., Reese C. E., Bahnson R. R., Saijo N., Lazo J. S., *Mol. Pharmacol.*, **45**, 453–460 (1994).
- 40) Schmidt C. J., Hamer D. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 3346–3350 (1986).
- 41) Mididoddi S., McGuirt J. P., Sens M. A., Todd J. H., Sens D. A., *Toxicol. Lett.*, **85**, 17–27 (1996).
- 42) Tan O. J., Bay B. H., Chow V. T., *Oncol. Rep.*, **13**, 127–131 (2005).
- 43) Tai S. K., Tan O. J., Chow V. T., Jin R., Jones J. L., Tan P. H., Jayasurya A., Bay B. H., *Am. J. Pathol.*, **163**, 2009–2019 (2003).
- 44) Koizumi S., Otsuka F., “Transcriptional Regulation of the Metallothionein Gene: Metal-responsive Element and Zinc Regulatory Factor,” ed. by Sarkar B., Genetic Response to Metals, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1995.
- 45) Jin R., Chow V. T., Tan P. H., Dheen S. T., Duan W., Bay B. H., *Carcinogenesis*, **23**, 81–86 (2002).