

## シスプラチン耐性細胞におけるメタロチオネイン遺伝子の発現と細胞内在性金属の関与

堀部紗世，立花陽子，田和理市\*

( 広島国際大薬学部・薬物生体分析学 )

【目的】シスプラチン ( CDDP ) に対する細胞の耐性獲得機構にはメタロチオネイン ( MT ) の発現誘導，および細胞内の  $\text{Cu}^{2+}$  の関与することが報告されている。しかしながら，CDDP による MT の発現誘導のメカニズムについては，詳細が不明である。これまでに我々は，12-O-Tetradecanoyl phorbol-13-acetate ( TPA ) または Tumor necrosis factor  $\alpha$  ( TNF $\alpha$  ) で刺激して MT を発現誘導させた HeLa 細胞の核抽出物中から，遺伝子 MT-IIA プロモーター中の転写制御 DNA 配列としての金属応答エレメント ( Metal responsive elements, MREs ) に対して  $\text{Cu}^{2+}$  共存下で結合する核タンパク質の存在を確認した。本研究では，CDDP 耐性細胞における MT-IIA mRNA の変化について解析した。次いで，CDDP 耐性細胞からの抽出核タンパク質と MT 遺伝子の MREs との結合における  $\text{Cu}^{2+}$  の関与について検討した。

【方法】CDDP 耐性細胞は，1  $\mu\text{M}$  または 5  $\mu\text{M}$  CDDP を含む DMEM 中に 3 ヶ月間暴露し，CDDP 存在下で増殖する細胞を用いた。HeLa 細胞は DMEM ( 10% FBS ) を用いて培養した。全 RNA は Gen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit ( Sigma-Aldrich ) を用いて調製した。RT-PCR 反応後，電気泳動し，Quantity One ( Bio-RAD ) を用いて HeLa および耐性細胞における MT-IIA mRNA の発現量を比較した。さらに，耐性細胞および 1  $\mu\text{M}$  CDDP で 1 時間処理した細胞から核抽出物を調製し， $\text{Cu}^{2+}$  存在下におけるヒト MT-IIA プロモーターを含むプラスミド pKB8 の制限酵素消化断片との結合性について，ゲルシフト法により検討した。

【結果】CDDP 耐性細胞の MT-IIA mRNA は HeLa 細胞に比べて有意に発現した。また，1  $\mu\text{M}$  CDDP で 1 時間刺激した HeLa 細胞および 1  $\mu\text{M}$  CDDP 耐性細胞において，MRE<sub>d</sub> の 3' 末端 DNA 断片と核抽出物との結合に対する  $\text{Cu}^{2+}$  の関与を示唆する結果を得た。