

多様な分化制御転写因子 *Mitf* の役割

The role of microphthalmia-associated transcription factor (Mitf), a tissue-specific transcription factor, which acts as a master regulator of diverse cell differentiation

村上 賢, 舟場正幸

麻布大学獣医学部

Masaru Murakami, Masayuki Funaba

Azabu University School of Veterinary Medicine

Abstract: Microphthalmia-associated transcription factor (*Mitf*), a member of the basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-ZIP) transcription factors, is required for proper development of several cell lineages including osteoclasts, melanocytes, retinal pigment cells and mast cells. *Mitf* has been implicated to be a key regulator of the later steps of osteoclastogenesis, but the role of *Mitf* is not fully elucidated; although nine distinct *Mitf* isoforms, which contain an isoform-specific first exon and are identical exons 2 to 9, have been identified at the RNA level, it is unclear whether any isoforms are unique to the osteoclast lineage cells. Treatment of RAW264 macrophage-like cells with sRANKL (100 ng/ml) for 72 h resulted in the increase in the number of Trap-positive multinucleated cells. The present study examined expression of *Mitf* isoforms in sRANKL-induced osteoclast-like cells. The s-RANKL treatment induced robust expression of *Mitf-E* gene. In addition, *Tfe3*, another member of the bHLH-ZIP family, was also significantly expressed throughout the differentiation of RAW264 cells. E isoform of *Mitf*s may be involved in the regulation of the late process in osteoclast development. Previous studies have revealed that tartrate-resistant acid phosphatase (*Trap*) is a transcriptional target of *Mitf* in osteoclasts. Thus, we also examined factors affecting *Trap* gene transcription in HepG2 cells that are responsive to *Mitf* overexpression. Transcriptional activation assays using luciferase-based reporter gene containing *Trap* promoter (-2049 - +1) revealed that overexpression of *Mitf-J/-D/-E* but not *Mitf-A* slightly increased luciferase expression. The overexpression of c-Jun but not c-Fos and JunB increased expression of *Trap* reporter gene, and synergistic effects of c-Jun and *Mitf*s (-A and -J/-D/-E) on *Trap* gene transcription were detected. In contrast, no synergism was observed between *Mitf* and the other AP-1 component (c-Fos and JunB). Distinct expression of *Mitf* isoforms and functional interaction between *Mitf* and the other transcription factor such as c-Jun during the terminal differentiation of osteoclasts suggests discrete regulation of osteoclastogenesis.

1. 目的

Mitf (microphthalmia-associated transcription factor; 小眼球症関連転写因子) は、小眼球症、大理石骨病と色素細胞の欠失を特徴とする *mi/mi* マウスの変異遺伝子として同定された塩基性ヘリックス・

ループ・ヘリックス-ロイシンジッパー (bHLH-LZ) 領域をもつ転写因子である [1]。この転写因子は、マスト細胞、破骨細胞、色素細胞や心筋細胞で組織特異的に発現しており、これらの細胞の分化や成熟に深く関わっている。*Mitf* にはエクソン1の選択的スプライシングによりN末端領域のみが異なる少な

くとも9種類のアイソフォーム (Mitf-A, -B, -C, -D, -E, -H, -J, -M, -mc) がある。また, Mitf-A, -H, -M及び-E, -J, -mcではエクソン6a (18塩基対)の選択的スプライシングによる6アミノ酸残基の挿入/欠失を伴う2種類の変異体の存在が知られている [2-5]。しかし, Mitfアイソフォームや変異体による遺伝子発現制御やそれらの機能については, まだよくわかっていない。

破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化には破骨細胞分化因子であるRANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) が必須であり [6], RANKLを介した細胞内のシグナル伝達によってMitfやNFAT (nuclear factor of activated T cell) c1, PU.1といった多くの転写因子が活性化し, これらの転写因子が破骨細胞分化に重要な遺伝子発現を促進することがわかっている [7-9]。これらの転写因子の中でMitfはRANKL刺激によって破骨細胞分化マーカー遺伝子であるTRAP (tartrate resistant acid phosphatase), カテプシンK, OSCAR (osteoclast-associated receptor) 等の発現を調節することが知られている。Mitfは破骨細胞分化に重要な役割を果たすことがわかっているが, Mitfアイソフォームと破骨細胞分化の関連性についてはよくわかっていない。Mitfに変異をもつマウスは破骨細胞異常による大理石骨病を呈する。ヒトではMitf遺伝子に変異がおこると, 聴覚異常や毛髪・皮膚の色素欠失等の症状を示すワーデンブルグ症候群やテイツ症候群といった先天的疾病となる。また破骨細胞の骨吸収能の異常な亢進によっておこる骨粗鬆症や関節リウマチのような病態は近年, 増加の一途をたどっている。Mitfなどの制御因子による破骨細胞の分化調節機構の解明は, これら疾病の機序の解明や新たな治療法への発展の一助となるかもしれない。本研究では, Mitfの破骨細胞分化における役割に注目し, 破骨細胞前駆細胞であるRAW264を用い, RANKL刺激による破骨細胞分化における各Mitfアイソフォームの遺伝子発現様態や機能の解析を行った。

2. 方法

細胞培養, RNA抽出, RT-PCR, PCR-RFLP, ルシフェラーゼレポーターアッセイについては文献 [5] に示した方法を用いた。

3. 結果と考察

3-1 RANKL刺激によるRAW264の破骨細胞様細胞の形成

100 ng/mLのRANKLでRAW264細胞を3日間刺激したところ, 多核化した巨大な細胞が形成された。この細胞にTRAP染色を行ったところ, 核と細胞質が紫~赤紫色に染まりTRAP陽性の破骨細胞様細胞であった。

3-2 破骨細胞分化マーカー遺伝子と各Mitfアイソフォームの発現

RAW264にRANKL刺激を加え多核・巨細胞化した細胞からRNAを抽出しRT-PCRを行なった。破骨細胞分化マーカー遺伝子であるカテプシンK, OSCAR, TRAP, CTR (calcitonin receptor) は破骨細胞様細胞において有意な発現が確認できた。分化マーカー遺伝子の1つである β_3 インテグリンはRANKL未刺激のRAW264で既に発現していた。また, リアルタイムPCRによる定量解析を行ったところ, TRAPとカテプシンKは, 破骨細胞様細胞でそれぞれ750倍と90倍の発現量の上昇がみられた。

破骨細胞様細胞の各Mitfアイソフォームの発現をRT-PCRによって調べたところ, Mitf-Aと-Jの発現はRANKL刺激の有無に関係なく見られたが, Mitf-EはRANKL刺激により得られた破骨細胞様細胞に特異的に発現していることがわかった。その他の転写因子NFATc1とPU.1はRANKL未刺激のRAW264と破骨細胞様細胞の両方で発現が確認できた。また, リアルタイムPCRによる定量解析を行ったところ, RANKL未刺激のRAW264と破骨細胞様細胞の間で, common MitfとMitf-Aで変化はみられなかった。

次に, 発現の見られたMitf-A, -J, -E, common MitfについてPCR-RFLP法とバイオアナライザを用いて, RAW264と破骨細胞様細胞の2つの変異体の存在 (6abと6bタイプ) とそれらの変異体の発現量比を測定した。Mitf-Aの2つの変異体の発現量比 (6ab:6b) は未刺激RAW264で1.60, 破骨細胞様細胞で1.85であった。Mitf-Jでの6ab:6bの発現量比はそれぞれの細胞で1.52と2.10であった。破骨細胞様細胞のみに発現がみられたMitf-Eの6ab:6bの発現量比は1.89であった。これらのことから破骨細胞様細胞

の分化において、Mitf-Eの6abと6bタイプの両変異体が発現しており、またMitf-Aと-Jの発現は全体量だけでなく2つの変異体の発現量比においても有意な差はみられないことがわかった。

3-3 ルシフェラーゼレポーターアッセイによる Mitf アイソフォームの転写活性能

HepG2細胞にそれぞれのMitfアイソフォームを過剰発現させ、TRAP, OSCAR, E-cadherin 遺伝子のプロモーター領域を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。また、転写因子AP-1の共発現による影響も調べた。TRAP-lucレポーターにおいて、Mitf-J/D/Eはわずかに転写活性を増加させた。また、AP-1の構成成分の一つであるc-junは単独で転写活性を上昇させ、さらにMitfとの共発現では相乗的効果を示した。c-fosやjunBではそのような効果は認められなかった。OSCAR-luc及びE-cadherin-lucレポーターでは、Mitf-AやMitf-J/D/Eによる有意な転写活性の変化はみられなかった。

なお、本研究の派生及び関連研究として、文献[10]と[11]に報告した。

要 約

小眼球症関連転写因子 (Mitf) は塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス-ロイシンジッパー (bHLH-LZ) 構造を持つ組織特異的転写因子であり、破骨細胞、マスト細胞、神経堤由来メラノサイト、網膜色素上皮細胞などの分化制御因子である。Mitfには、N末領域のみの配列が異なる少なくとも9種類のアイソフォーム (Mitf-A, -B, -C, -D, -E, -H, -J, -M, -mc) と、さらにエクソン6aの選択的スプライシングによる変異体 (6abと6b) が存在することが知られている。本研究では、RAW264細胞を用いて、RANKL刺激による破骨細胞様細胞への分化におけるMitfの各アイソフォームと変異体の遺伝子発現お

よび破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現をRT-PCR, リアルタイムPCR, PCR-RFLP法により調べた。その結果、RANKL刺激によりMitf-Eの特徴的な遺伝子発現が認められた。また、RANKL刺激によりTRAP, カテプシンK, OSCAR, CTRの破骨細胞分化マーカー遺伝子が発現することを確認した。次に、分化マーカー遺伝子の各制御領域をもつルシフェラーゼレポーターを用いて、各Mitfアイソフォームの転写活性機能を比較したところ、TRAPレポーターに対してMitf-J/D/Eがわずかに転写活性を上昇させ、さらにc-junの共発現が相乗的効果を示すことがわかった。破骨細胞分化の後期過程においてMitfアイソフォームの特徴的な発現及びMitfとその他の転写因子との機能的相互作用が破骨細胞分化を制御しているのかもしれない。

文 献

- 1) Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A et al., *Cell*, 74: 395-404, 1993.
- 2) Steingrímsson E, Moore KJ, Lamoreux ML et al., *Nat Genet*, 8: 256-263, 1994.
- 3) Yasumoto K, Amae S, Udono T et al., *Pigment Cell Res*, 11: 329-336, 1998.
- 4) Hallsson JH, Favor J, Hodgkinson C et al., *Genetics*, 155: 291-300, 2000.
- 5) Murakami M, Iwata Y, Funaba M, *Mol Cell Biochem*, 303: 251-257, 2007.
- 6) Lacey DL, Timms E, Tan HL et al., *Cell*, 93(2): 165-176, 1998.
- 7) Takayanagi H, Kim S, Koga T et al., *Dev Cell*, 3(6): 889-901, 2002.
- 8) So H, Rho J, Jeong D et al., *J Biol Chem*, 278(26): 24209-24216, 2003.
- 9) Sharma SM, Bronisz A, Hu R et al., *J Biol Chem*, 282(21): 15921-15929, 2007.
- 10) Murakami M, Kondo S, Funaba M, *Cell Biol. Int*, 37(7): 848-854, 2008.
- 11) Nakaya K, Murakami M, Funaba M, *J. Cell. Biochem*, 105(3): 801-813, 2008.