

## 多様な分化制御因子である転写因子 *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, 池田輝雄

獣医学部

Masaru Murakami, Masayuki Funaba, Teruo Ikeda

Azabu University School of Veterinary Medicine

**Abstract.** Microphthalmia-associated transcription factor (*Mitf*) is a tissue-specific transcription factor. At least nine distinct mouse isoform mRNAs are encoded by alternative splicing of the first exon of *Mitf* (*Mitf-A*, *-B*, *-C*, *-D*, *-E*, *-H*, *-J*, *-M* and *-mc*), while exons 2 to 9 of all *Mitf* isoforms examined to date are identical. In addition, alternative splice variants of exon 6a encoding 6 amino acid proximal to the basic region of the protein are known in *Mitf-A*, *-H*, and *-M*. In this study, we identified alternative splice variants of exon 6a in other *Mitf* isoforms (*Mitf-E*, *-J* and *-mc*) in melanocytes, mast cells, macrophages, and heart. We also compared the transcriptional activity of *Mitf* variants containing exon 6a to that of *Mitf* variants that did not contain exon 6a. PCR-RFLP analysis revealed that expression of *Mitf* with exon 6a was comparable with that of *Mitf* without exon 6a, irrespective of the specificity of the first exon, or cell type, although *Mitf* isoforms with different first exons were expressed in a cell type-dependent manner. Luciferase-based reporter assays revealed that transcription of *Tyrosinase*, which is known *Mitf*-regulated gene, was elicited more efficiently by expression of *Mitf* isoforms containing exon 6a, compared to isoforms that did not contain exon 6a. However, when transcription of *Tyrp-1*, *Mmcp-6* and *Pai-1* was examined, significant differences were detected between *Mitf* isoforms with exon 6a and those without exon 6a, except for *Tyrp-1* transcription by *Mitf-D/E* isoform. These results reveal a diverse pattern of gene expression and different transcriptional activities of *Mitf* isoforms, suggesting discrete regulation of gene transcription in specific tissues by *Mitf*.

### 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*) があり、組織特異的に発現している。また、*Mitf-A*, *-H*, *-M* では exon 6a (18塩基対) の alternative splicing による6アミノ酸残基の挿入/欠失を伴う2種類の variant の存在も知られている [2-4]。しかし、*Mitf* アイソフォームや variant 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。本研究では、上記細胞における各アイソフォームの存在様態を明らかにし、*Mitf* に

よる遺伝子発現活性を、分子生物学的手法を用いて明らかにすることを目的とする。

## 2. 方法

本研究に使用した方法（細胞培養，RNA抽出，RT-PCR，PCR-RFLP，プラスミドベクター構築，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。

## 3. 結果と考察

詳細は文献[5]に報告した。

### ・ Mitfの各アイソフォームと variantの遺伝子発現

色素細胞（B16メラノーマ），マスト細胞（P-815細胞株と骨髓由来初代培養肥満細胞BMMC）と alternative splice variantの遺伝子発現を特異的RT-PCRによって調べた。Mitf-Mは色素細胞に，Mitf-mcはマスト細胞に優位に発現し，Mitf-Eは両細胞に発現していた。Mitf-Hはマスト細胞と心筋細胞に，Mitf-Jは色素細胞，BMMCとマクロファージ系細胞に適度に発現していた。Mitf-B，-C，-Dはいずれの細胞にも発現していなかった。このように細胞種によって各Mitfアイソフォームの発現は制御されていることを示した。一方，PCR-RFLP法を利用して解析した，Mitfの exon 6aにおける2種類の variant（6a + bと6bタイプ）の発現量は，アイソフォームに関係なくほぼ同じであった。また，6a + bと6bタイプの variantは，これまでに知られていたMitf-A，-H，-Mだけでなく，Mitf-E，-J，-mcにも存在することがわかった。

### ・ 2種類の Mitf variant（6a + bと6bタイプ）の転写活性

exon 6aにおける2種類の alternative splice variantの転写活性を調べるためにルシフェラーゼレポーターアッセイを行なった。すなわち，Mitf-D/-E，Mitf-M，Mitf-Aについてそれぞれ6a + bと6bタイプの variantの発現プラスミドベクターを構築し，Mitf応答遺伝子である *Tyrosinase*，*Tyrp-1*，*Mmcp-6*，*PAI-1*のプロモーター領域をもつルシフェラーゼレポーターとともにHepG2細胞に強制発現させ，それぞれの Mitf variantの転写活性を評価した。*Tyrosinase*レポ

ーターに対して，Mitf-M 6a + bはMitf-Aや-D/-Eの6a + bタイプよりも強い活性を示し，またアイソフォームの種類に関係なく6a + bタイプは6bタイプの variantよりも強い活性を示した。*Tyrp-1*レポーターに対しては，Mitf-M 6a + bは，上記と同様にMitf-Aや-D/-Eの6a + bタイプよりも強い転写活性を示したが，6a + bタイプと6bタイプでは差がなく，6a存在による転写活性の増強は認められなかった。*Mmcp-6*及び *PAI-1*レポーターに対しては，いずれのアイソフォームにおいても6a + bと6bタイプの variantで転写活性に差は見られなかった。

MitfはDNAのE-box（CANNTG）へ結合することにより，その転写活性を示す。今回 *Tyrosinase*レポーターで見られた6a + bタイプの強い転写活性は6bタイプよりもE-boxへの結合能が強いこと[6]を反映した結果であることは考えられるが，E-boxへの結合の強さだけでMitfの転写活性を説明することはできない。Mitfアイソフォームの種類やE-boxの配列も関連しているかもしれない。

MitfはhomodimerとしてDNAに結合し，その転写機能を示すだけでなく，同じbHLH-LZファミリーの転写因子に属するTfe3とheterodimerを形成することによってもその機能を発揮することができる[7]。本研究で用いた細胞はすべてこのTfe3を発現していた。そこで，MitfとTfe3の共発現によるレポーターアッセイを行い，転写活性を調べた。Tfe3単独の強制発現では，強い転写活性を示したが，Mitfとの共発現ではむしろその活性が減少しており，MitfはTfe3の負の調節因子として働いているように考えられた。この抑制効果はMitfの6a + bと6bタイプの variantで差は見られなかった。

遺伝的にMitfの6a + bタイプをもたず6bタイプしか発現していない *mi<sup>sp</sup>/mi<sup>sp</sup>*マウスがいる[8]。このマウスは正常マウスと比べてほとんど異常は認められないが，皮膚での *Tyrosinase*活性が低いことが知られている。この低い *Tyrosinase*活性は，本研究で見られたように，Mitfの6bタイプが6a + bタイプよりも *Tyrosinase* 遺伝子に対する転写活性が低いことが原因なのかもしれない。

## 4. 要約

組織特異的転写因子であるMitfには，exon 1の

alternative splicing により 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) がある。Mitf-A, -H, -M ではさらに, exon 6a (6 個のアミノ酸をコードする) の alternative splicing による variant (6a + b と 6b) が存在することが知られている。本研究では, 色素細胞, マスト細胞, マクロファージ系細胞と心筋細胞での Mitf の各アイソフォームと variant の遺伝子発現を調べ, 細胞種によって異なるアイソフォームの発現が見られることを示した。また, これらの細胞に存在する Mitf -E, -J, -mc のアイソフォームにも 6a + b と 6b の variant があることを見つけた。PCR-RFLP 解析により, これら 6a + b と 6b の variant の発現量はアイソフォームや細胞種に関係なく, ほぼ同じであることがわかった。次に, これらの variant の転写活性機能を比較するため, ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。Mitf の応答遺伝子である *Tyrosinase*, *Tyrp-1*, *Mmcp-6*, *PAI-1* のそれぞれの制御領域配列をもつルシフェラーゼレポーターを構築し, Mitf-A, -D/E, -M それぞれの 6a + b と 6b の variant を強制発現させた。*Tyrosinase* 制御領域配列をもつレポーターに対して 6a + b は 6a の variant に比べてよ

り強い促進活性を示したが, *Tyrp-1*, *Mmcp-6*, *PAI-1* のレポーターに対しては, *Tyrp-1* レポーターへの Mitf -D/E の variant の活性を除いて, 6a + b と 6b の variant で活性に違いは見られなかった。以上, 細胞に依存した Mitf アイソフォームの多様な遺伝子発現パターンと異なる転写活性を示した。

#### 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] Hemesath TJ, Steingrímsson E, McGill G et al., *Genes Dev*, 8: 2770-2780, 1994.
- [7] Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA, *Annu Rev Genet*, 38: 365-411, 2004.
- [8] Wolfe HG, Coleman DL, *Genet Res Camb*, 5: 432-440, 1964.