



色素細胞の分化調節機構の解明

(課題番号：08457043)

平成8年度～9年度科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）
研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 柴原茂樹
(東北大学医学部・教授)

はしがき

色素細胞はメラニン合成能という特異な分化形質を持つ細胞であり、神経堤由来のメラノサイトと脳由来の網膜色素上皮細胞から成る。メラニン合成系には、系の律速酵素であるチロシナーゼと、そのチロシナーゼとアミノ酸レベルで約40%の相同性を持つ二つの酵素(TRP1とTRP2)が関与する。これらの酵素はチロシナーゼファミリーを構成し、色素細胞で特異的に発現される。なお、TRP2にはメラノサイトの前駆体であるメラノブラストの段階から発現されるのみならず、胎児脳でも一過性に発現されるという特徴がある。一方、小眼球症関連転写因子(MITF)は、小眼球症(mi)マウスと関連する遺伝子産物(mitf)のヒトホモログであり、miマウス及びmitf欠失マウスでは、眼球形成不全とメラノサイトの欠損が見られるので、mitfは網膜色素上皮細胞とメラノサイトの分化・生存にも重要な役割を演じていると考えられる。mitf・MITFはDNAとの結合や二量体形成に重要な塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス-ロイシンジッパー(bHLH-LZ)構造を持つので、色素細胞の機能分化に関与する他の蛋白因子と二量体を形成することが予想される。そこで、色素細胞の分化調節機構を解明するために、チロシナーゼファミリーとMITF遺伝子の色素細胞特異的発現機構を解析する。さらに、転写因子であり色素細胞の分化制御因子でもあるMITFが、その機能発現の過程で複合体を形成する相手の蛋白因子を探索する。

研究組織

代表研究者：柴原 茂樹 (東北大学医学部・教授)
研究分担者：高橋 和広 (東北大学医学部・講師)
研究分担者：安元 研一 (東北大学医学部・助手)

研究経費

平成8年度 6、900千円
平成9年度 1、900千円
計 8、800千円

東北大学図書



00010139439

附属図書館

研究成果

1. MITFはチロシナーゼとTRP-1遺伝子のプロモーター機能を活性化するが、TRP-2遺伝子プロモーターに対しては有意な影響を及ぼさなかった。
2. ヒトチロシナーゼ遺伝子の5'上流領域には、それぞれ1コピーのCATGTGモチーフを含む3つの制御領域が存在する。各制御領域の同モチーフに塩基置換を導入し、転写活性及びMITFによる活性化への影響を解析することにより、メラノサイト特異的転写への各制御領域の関与の程度を明らかにした。
3. 種々の領域を欠失させたMITFの変異体の機能解析の結果、C末端領域を欠くMITFはチロシナーゼ遺伝子プロモーターの活性化能を失うが、TRP-2遺伝子プロモーターを著明に活性化した。よって、同領域はMITFの機能を制御すると推定される。そこで、MITFのC末端領域と相互作用する因子をイーストTwo Hybrid法にて探索した結果、複数の新規cDNAの単離に成功し現在解析中である。
4. MITFと関連する新規因子を探索する過程で、転写抑制因子としてラットで発見されていたTFECのアイソフォーム(TFECL)をcDNAクローニングにより同定した。さらに、TFECLが転写活性化機能を持つことを明らかにした。なお、TFECLには、ラットTFECでは欠落している転写活性化ドメインが存在すると考えられる。
5. cDNAクローニングにより、N末端が異なる3種の新規MITFアイソフォームを発見し、A、B、H型アイソフォームと命名した。次いで、既知のMITFがメラノサイトとメラノーマのみで発現されていることを明らかにし、同MITFをメラノサイト(M)型アイソフォームと命名した。以上4つのアイソフォームのN末端領域は互いに異なっているが、C末端領域はすべてに共通である(論文投稿中)。A型とH型MITFのmRNAは調べたすべての培養細胞・組織で発現しているのに対し、B型MITF mRNAの発現はメラノサイト、メラノーマ、網膜色素上皮細胞(RPE)、胎盤では検出できなかった。さらに、マウス胎児より採取した脳切片を用いたin situハイブリダイゼーションにより、A型あるいはH型アイソフォームがRPEに分化する細胞層で多く発現していた。一時的発現実験では、A型MITFはM型と同様にチロシナーゼとTRP-1遺伝子のプロモーター機能を活性化するが、TRP-2遺伝子

とM型MITFプロモーター活性に対しては有意な影響を及ぼさなかった。一方、B型とH型MITFは転写因子として機能することが示唆されるが、上記遺伝子プロモーター活性には有意な影響を及ぼさなかった。以上の結果により、A型MITFがRPEにおけるメラニン生成を制御すると考えられる（論文投稿中）。

6. 脳脈絡叢細胞由来のがん細胞よりアドレノメデュリンが分泌されることを見いだした。アドレノメデュリンは血管拡張性の降圧ペプチドであり、神経堤由来の褐色細胞腫での発現が高い。

7. ラットニューロフィブロミンの完全長cDNAのクローニングにより、全アミノ酸配列を明らかにした。

Publications

1. Nakayama, M., Takahashi, K., Murakami, O., Shirato, K., and Shibahara, S. (1998) Induction of Adrenomedullin by Hypoxia and Cobalt Chloride in Human Colorectal Carcinoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press
2. Shibahara, S., Yasumoto K. and Takahashi, K. (1998) Genetic Regulation of the Pigment Cell. In *The Pigmentary System. Physiology and Pathophysiology*, edited by J. J. Nordlund, R. E. Boissy, V. J. Hearing, R. A. King and J.-P. Ortonne. Oxford University Press, New York, NY, in press.
3. Takahashi, K., Satoh, F., Hara, E., Sone, M., Murakami, O., Kayama, T., Yoshimoto, T. and Shibahara, S. (1997) Production and Secretion of Adrenomedullin from Glial Cell Tumors and its Effects on cAMP Production. *Peptides* 18, 1117-1124.
4. Takahashi, K., Satoh, F., Sone, M., Murakami, O., Sasano, H., Mouri, T. and Shibahara, S. (1997) Expression of Adrenomedullin mRNA in the Human Brain and Pituitary. *Peptides* 18, 1051-1053.
5. Yasumoto, K. and Shibahara, S. (1997) Molecular Cloning of a cDNA Encoding a Human TFEC Isoform, a Newly Identified Transcriptional Regulator. *Biochim. Biophys. Acta* 1353, 23-31.
6. Takahashi, K., Hara, E., Ogawa, K., Kimura, D., Fujita, H. and Shibahara, S. (1997) Possible Implications of the Induction of Human Heme Oxygenase-1 by Nitric Oxide Donors. *J. Biochem. (Tokyo)* 121, 1162-1168.
7. da Silva, J.-L., Stoltz, R. A., Dunn, M. W., Abraham, N. G. and Shibahara, S. (1997) Diminished Heme Oxygenase-1 mRNA Expression in RPE Cells from Diabetic Donors as Quantitated by Competitive RT/PCR. *Curr. Eye Res.* 16, 380-386.
8. Kimpara, T., Takeda, A., Watanabe, K., Itoyama, Y., Ikawa, S., Watanabe, M., Arai, H., Sasaki, H., Higuchi, S., Okita, N., Takase, S., Saito, H., Takahashi, K. and Shibahara, S. (1997) Microsatellite

Polymorphism in the Human Heme Oxygenase-1 Gene Promoter and its Application in Association Studies with Alzheimer and Parkinson Disease. *Hum. Genet.* 100, 145-147.

9. Takahashi, K., Satoh, F., Hara, E., Murakami, O., Kumabe, T., Tominaga, T., Kayama, T., Yoshimoto, T. and Shibahara, S. (1997) Production and Secretion of Adrenomedullin by Cultured Choroid Plexus Carcinoma Cells. *J. Neurochem.* 68, 726-731.

10. Yasumoto, K., Yokoyama, K., Takahashi, K., Tomita, Y. and Shibahara, S. (1997) Functional Analysis of Microphthalmia-Associated Transcription Factor in Pigment Cell-specific Transcription of the Human Tyrosinase Family Genes. *J. Biol. Chem.* 272, 503-509.

11. Suzuki, S., Takimoto, H., Masui, S., Kato, T., Shibata, K., Tomita, Y., Shibahara, S. and Nakano, H. (1996) Detection of Mouse Tyrosinase with a Monoclonal Antibody MAT-1 Against Human Tyrosinase. *Pigment Cell Res.* 9, 298-303.

12. Suzuki, H., Takahashi, K., Yasumoto, K., Fuse, N. and Shibahara, S. (1996) Differential Tissue-Specific Expression of Neurofibromin Isoform mRNAs in Rat. *J. Biochem. (Tokyo)* 120, 1048-1054.

13. Hara, E., Takahashi, K., Tominaga, T., Kumabe, T., Kayama, T., Suzuki, H., Fujita, H., Yoshimoto, T., Shirato, K. and Shibahara, S. (1996) Expression of Heme Oxygenase and Inducible Nitric Oxide Synthase mRNA in Human Brain Tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 153-158.

14. Takahashi, K., Hara, E., Suzuki, H., Sasano, H. and Shibahara, S. (1996) Expression of Heme Oxygenase Isozyme mRNAs in the Human Brain and Induction of Heme Oxygenase-1 by Nitric Oxide Donors. *J. Neurochem.* 67, 482-489.

15. Okinaga, S., Takahashi, K., Takeda, K., Yoshizawa, M., Fujita, H., Sasaki, H. and Shibahara, S. (1996) Regulation of Human Heme Oxygenase-1 Gene Expression under Thermal Stress. *Blood* 87, 5074-5084.

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録していません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。