



# 論文内容要旨

## 【目 的】

メラニンは、広く動物界で見られる代表的な色素であり、その生成は主に神経堤由来のメラノサイトと脳の眼杯由来の網膜色素上皮細胞とに限定される。チロシナーゼ (EC 1.14. 18.1) はメラニン生合成系の律速酵素であり、メラノサイトにおいて発現される。メラノサイトの欠損をきたすマウスに mi 遺伝子座に変異のあるマウスがあり、その表現系はメラノサイトの欠損の他に、小眼球症、マスト細胞や好塩基球やNK細胞の減少、破骨細胞の機能異常による骨大理石病など多岐にわたる。最近、mi マウスの形質を持つトランスジェニックマウスが作製され、外来遺伝子をマーカーに mi 遺伝子が単離された。mi は basic-helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-LZ) 構造を持ち、チロシナーゼ遺伝子の転写因子と推定された。その後、mi のヒトホモログである小眼球症関連転写因子 Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF) の cDNA がクローニングされ、まもなく、MITF がヒトチロシナーゼ遺伝子の転写因子であることが示された。一方 MITF は、先天性感音難聴、虹彩の色素異常、毛髪の色素異常を三主徴とする優性遺伝疾患のワールデンブルグ症候群タイプ II A (WS2A) の原因遺伝子とされているが、MITF の発現制御機構はいまだ解明されていない。また、最近、mi マウスの心臓で、エクソン 1 が MITF の cDNA とは違うアイソフォームがクローニングされた。mi マウスの多彩な表現形から、MITF はヒトチロシナーゼ遺伝子の転写因子であるばかりでなく、メラノサイトや網膜色素上皮細胞など種々の分化過程に関与する因子と考えられる。

今回、色素細胞の分化機構の解明を目的に、MITF 遺伝子のメラノサイト特異的転写制御機構を解析する。すなわち、同遺伝子プロモーター領域を含むゲノム DNA 断片をクローニングし、その構造を決定し、同遺伝子プロモーターの機能を解析する。また、どのような因子によって発現が制御されているか解析するのが、本研究の目的である。

## 【方 法】

- 1) MITF をコードしているヒトゲノム DNA のクローニングとシーケンス解析
- 2) ゲノム DNA のサザンブロット解析
- 3) プライマー伸長法と S1 ヌクレアーゼ法を用いた転写開始点の決定
- 4) ノーザンブロットによる MITF の組織別発現解析
- 5) ルシフェラーゼ遺伝子上流に MITF のプロモーターを含む融合遺伝子の作製
- 6) MITF 遺伝子プロモーターの機能解析 (一過性発現)

## 7) 非メラノサイト型 MITF の cDNA クローニング

### 【結果及び考察】

メラノサイト型 MITF のプロモーターとエクソン 1 を含むゲノム DNA をクローン化し、2.2kb の長さのプロモーター領域が色素細胞特異的発現に必要であることを解明した。そのプロモーター領域には CANNTG の配列を持つ E box が存在することから、MITF 自身によって制御されている可能性が考えられたが、メラノサイト型 MITF によるメラノサイト型 MITF 遺伝子自身の発現制御は確認できなかった。MITF 遺伝子の転写制御は、チロシナーゼ遺伝子の場合とは異なっていると考えられた。そこで、-2.2kb より上流に位置するエンハンサーもしくは非メラノサイト型 MITF が、メラノサイト型 MITF 遺伝子の発現制御に関わっているのではないかと考え、非メラノサイト型 MITF を、RT-PCR にてヒト腎臓よりクローニングし、塩基配列を決定した。

本研究により、少なくとも 2 種類の MITF アイソフォームの存在が確認された。このことは、mi マウスの表現型が小眼球症、マスト細胞や好塩基球や NK 細胞の減少、破骨細胞の機能異常による骨大理石病など多岐にわたることが、一元的に説明ができないという事実を考えれば合致する。MITF が色素細胞の転写や分化制御に関わる因子のみならず、種々の分化及び増殖に関わる因子であると考えられる。そこで今後の問題は、まずメラノサイト型 MITF と非メラノサイト型 MITF の組織別分布はあるのか、非メラノサイト型 MITF の標的遺伝子は何かということを検索することである。眼においては、眼球形成にはどのアイソフォームが関わってくるのか、また網膜色素上皮細胞における遺伝子の発現制御は神経堤由来の色素細胞と同じであるのか興味ある問題である。また、MITF のアイソフォームの遺伝子ターゲティングを行えば、mi マウスのどの表現型の形成に寄与しているかが明らかにされるであろう。アイソフォームの機能解析により、細胞の分化及び増殖の複雑巧妙な制御ネットワークの一端が明らかにされよう。

## 審査結果の要旨

小眼球症関連転写因子 (MITF) は、網膜色素上皮細胞 (RPE) と神経堤由来のメラノサイトの分化制御因子である。両細胞はメラニン合成という形質を持ち、メラニン生合成系の律速酵素であるチロシナーゼを特異的に発現している。MITF は、このチロシナーゼ遺伝子の細胞特異的転写因子でもある。Mi (MITF のマウスホモログ) を欠失するマウスでは、RPE の分化異常に基づく眼球の形成不全とメラノサイトの欠損が見られる。一方、遅発性の網膜変性症を来す Mi 変異マウスも知られており、その本態が点突然変異による 1 個のアミノ酸置換によることが明らかにされている。従って、MITF は RPE の発生・分化のみならず、RPE の機能維持、さらには網膜の生理機能の維持にも重要であることが示唆される。

論文提出者の布施は、MITF 遺伝子の発現制御機構を解明する目的で、MITF 遺伝子をクローニングし、同遺伝子の転写開始点を決定した。次いで、一時的発現系により MITF 遺伝子プロモーター機能を解析し、同遺伝子の 5' 上流領域約 2 キロ塩基対の中に、メラノサイト特異的転写に関与する制御エレメントが存在することを明らかにした。しかも、MITF 自身による同遺伝子の転写活性化が検出されないことから、MITF 遺伝子のメラノサイト特異的転写機構はチロシナーゼ遺伝子の場合とは異なることが示唆された。興味深いことに、MITF 遺伝子の近位プロモーター領域内に、cAMP 応答エレメントやインターロイキン 6 応答エレメントなど、いくつかの既知の制御エレメントが存在しており、今後の解析に貴重な示唆を与えている。さらに、メラノサイト型 MITF に加え、N 末端領域が異なる非メラノサイト型 MITF の存在を証明し、MITF の多様性の一端を明らかにした。

本研究により初めてメラノサイト型 MITF 遺伝子プロモーターの構造が決定され、その機能が確認された。また、MITF の非メラノサイト型アイソフォームの構造も明らかにされた。今後、RPE における各 MITF アイソフォームの生理機能の異同、まだ原因遺伝子が特定されていない網膜色素変性症との関連などを解析することが可能となろう。以上のように、本論文は基礎研究としての価値のみでなく、臨床眼科学への貢献も多大であり、十分学位に値すると考える。