

Title	Loss of DNA binding ability of the transcription factor encoded by the mutant mi locus
Author(s)	森井, 英一
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39896
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	もり 井 英 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 2 3 7 4 号
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	Loss of DNA binding ability of the transcription factor encoded by the mutant <i>mi</i> locus (<i>mi</i> 遺伝子座にコードされる変異型 <i>mi</i> 転写因子における DNA 結合能の欠如)
論文審査委員	(主査) 教授 北村 幸彦 (副査) 教授 西宗 義武 教授 青笹 克之

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

マウス第 6 染色体 *mi* 遺伝子座は basic-helix-loop-helix-leucine zipper 構造をもつ転写因子 *mi* transcription factor (MITF) をコードする。この遺伝子座に 2 個突然変異をもつ *mi/mi* ミュータントマウスの皮膚マスト細胞は、数の減少、表現型の異常を示す。表現型の異常のひとつとして、*mi/mi* ミュータントマウスのマスト細胞でマスト細胞特異的プロテアーゼの一種、マウス・マスト細胞プロテアーゼ 6 (MMCP-6) 遺伝子が著明な発現低下を示している。MITF が MMCP-6 遺伝子の発現を制御している可能性が考えられるが、発現調節機構は解明されていない。本研究では MITF による MMCP-6 遺伝子の発現調節機構を解析した。

[方法ならびに成績]

mi/mi ミュータントマウスのもつ変異型 MITF は正常 MITF の basic 領域に存在するアルギニンが 4 個並ぶ部分でアルギニンが 1 個欠失している。野性型マウス、および *mi/mi* ミュータントマウス由来培養マスト細胞より RNA を単離し、正常型および変異型 MITF cDNA の coding region を RT-PCR 法を用いてクローニングし、大腸菌で glutathione-S-transferase との融合蛋白質として正常型、および変異型 MITF 蛋白質を合成した。MMCP-6 遺伝子のプロモーター領域 200 塩基をクローニングしその塩基配列を調べたところ、転写開始点の上流約 100 塩基付近に MMCP-6 遺伝子と相同性の高いヒト皮膚マスト細胞トリプターゼ遺伝子のプロモーター領域でも保存されている部分があり、この部分が MMCP-6 遺伝子の発現調節に重要である可能性が示唆された。プロモーター領域で保存されている部分の中に MITF の結合すると考えられるコンセンサス配列、CACATG が存在したため、MITF 蛋白質が CACATG モチーフに結合するか検討した。CACATG モチーフを含むオリゴヌクレチドを合成しプローブとして用いて大腸菌で合成した MITF 蛋白質との結合をゲルシフトアッセイを行ったところ、正常型 MITF は CACATG モチーフに結合し、変異型 MITF は DNA に対する結合は認めなかった。MMCP-6 遺伝子プロモーター領域ルシフェラーゼ遺伝子上流につなぎ、発現ベクターに導入した正常型 MITF cDNA あるいは変異型 MITF cDNA と NIH/3T3 細胞に co-transfection を行いルシフェラーゼ活性を測定したところ正常型 MITF cDNA と co-transfection によりルシフェラーゼ活性は有意に上昇した。変異型 MITF cDNA と co-transfection してもルシフェラーゼ活性の上昇は認められなかった。CACATG モチーフを欠失、また CTCAAG 配列に変異させるとルシフェラーゼ活性の上昇は認められなくなった。以上の結果より正常型 MITF が MMCP-6

の遺伝子プロモーター領域に含まれる CACATG モチーフを介して転写を活性化すること、変異型 M I T F が転写を活性化する能力をもたないことがわかった。

[総括]

正常型 M I T F は M M C P - 6 の遺伝子プロモーター領域にある CACATG モチーフを介して転写を活性化していた。変異型 M I T F は転写を活性化する能力をもたないが、この理由として DNA に結合する能力が低下していることが考えられた。

論文審査の結果の要旨

森井英一君はマウス *mi* 遺伝子座にコードされる転写因子 *mi* transcription factor (M I T F) のマウス・マスト細胞のプロテアーゼ 6 (M M C P - 6) 遺伝子に対する発現調節機構を調べた。その結果、1. M I T F は M M C P - 6 遺伝子のプロモーター領域にある CACATG モチーフに結合すること、2. M I T F の basic 領域にあるアルギニンが 1 個欠失した変異型 M I T F では DNA に対する結合能が失われていること、3. M I T F は M M C P - 6 遺伝子のプロモーター領域にある CACATG, CATCTG の 2 個のモチーフを介して転写を活性化すること、4. 変異型 M I T F には転写を活性化する能力が認められないことを示した。変異型 M I T F をもつ *mi/mi* ミュータントマウスでは M M C P - 6 遺伝子の発現が著明に低下していることが明らかにされており、本研究によりその機構が明らかにされ、また M I T F のマスト細胞における機能の一端が明らかとなったので、これは学位論文に値すると思われる。