

Title	The Recessive Phenotype Displayed by a Dominant Negative Microphthalmia-Associated Transcription Factor Mutant Is a Result of Impaired Nuclear Localization Potential.
Author(s)	鈴木, 公子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/39989
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	すずき きみこ 鈴木 公子
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 12998 号
学位授与年月日	平成 9 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	The Recessive Phenotype Displayed by Dominant Negative Microphthalmia-Associated Transcription Factor Mutant Is a Result of Impaired Nuclear Localization Potential. (Mi転写因子の核移行能の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 北村 幸彦 (副査) 教授 西宗 義武 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

マウス第 6 染色体の *microphthalmia* (*mi*) 遺伝子座には basic helix-loop-helix leucine zipper 構造を持つ Mi 転写因子 (MITF) がコードされている。*mi* 遺伝子座には多くのミュータントが報告されており, *mi/mi* ホモミュータントマウスは小眼球症, 体毛白色, 難聴, 骨大理石症およびマスト細胞の分化異常を呈する。*mi* と *Mi^{wh}* の二種類のミュータントは, それぞれ塩基性領域中に 1 アミノ酸の欠損, 1 アミノ酸の置換を有する変異型 MITF をコードしている (*mi*-MITF, *Mi^{wh}*-MITF)。*mi*-MITF, *Mi^{wh}*-MITF はホモ二量体としての DNA 結合能を欠損しているだけでなく, 正常型 (wild-type MITF), あるいは他の bHLH 蛋白質とヘテロ二量体を形成した場合にも DNA 結合能を欠損しており, Dominant negative に作用することが知られている。しかしながら, ヘテロマウスの体色に関して *mi* は劣性, *Mi^{wh}* は優性であり, この優性と劣性の差異を生じる分子機構は明らかにされていない。我々は MITF の塩基性領域中に核移行シグナル様配列を見出したことから, 抗 MITF 抗体を作製し, 種々の変異型 MITF の核移行能について検討をおこなった。

【方法ならびに成績】

正常型 MITF は色素細胞特異的なチロシナーゼ遺伝子を転写活性化することが知られている。この転写活性化に対する変異型 MITF の影響について検討をおこなった。チロシナーゼ遺伝子のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流につなぎ, wild-type MITF と contransfection すると, ベクターだけを加えた場合に比べて, ルシフェラーゼ活性が 5 倍に上昇した。*Mi^{wh}*-MITF を contransfection すると wild-type MITF 単独の場合に比べてルシフェラーゼ活性は激減し wild-type MITF による転写活性化が強く抑制された。一方, wild-type MITF と *mi*-MITF を contransfection すると wild-type MITF 単独の場合と比べて有為な差が認められなかった。*mi*-MITF, *Mi^{wh}*-MITF は共に二量体としての DNA 結合能を欠損しているにも関わらず wild-type MITF によるチロシナーゼ遺伝子の転写活性化に対しては *Mi^{wh}*-MITF だけが抑制効果を示すことが明らかになった。

MITF の塩基性領域中に核移行シグナル様配列を見出したことから, MITF の C 末端ペプチドに対する抗体を作製し, イムブロットングおよび免疫組織染色法を用いて MITF の細胞内局在性を調べた。正常型あるいは変異型 MITF を NIH/3T3 細胞に発現させた場合, wild-type および *Mi^{wh}*-MITF のシグナルは核内にのみ検出されたが *mi*-MITF のシグナルは細胞質内に検出された。また, 同様に塩基性領域中に変異を持つミュータントである

Mi^{or} (1 アミノ酸の置換), mi^{tw} (25アミノ酸の欠損) についても検討をおこなった結果, Mi^{or} -MITF は核へ移行するが, mi^{tw} -MITF は核へ十分移行せずにその大部分が細胞質にとどまることが明らかになった。次に, MITF の塩基性領域が核移行シグナルとして機能するかを検討するため, 正常型および変異型 MITF の塩基性領域を合成したペプチドとウサギ IgG の複合体を正常腎細胞の細胞質へ微量注入し蛍光抗体法により検出をおこなった。その結果, wild-type MITF の塩基性領域ペプチドが核移行シグナルとして機能すること, また, Mi^{wh} -MITF の塩基性領域は wild-type MITF と同様に機能するが, mi -MITF の塩基性領域は核移行能を持たないことが判明した。以上の結果より, Mi^{wh} -MITF および Mi^{or} -MITF は核へ移行するが, mi -MITF および mi^{tw} -MITF は核へ十分移行せずにその大部分が細胞質にとどまることが明らかになった。

wild-type MITF によるチロシナーゼ遺伝子の転写活性化に対して Mi^{wh} -MITF は強い抑制能を持つが, mi -MITF ではほとんど抑制しない。この抑制効果の違いが核移行能の差によるものか検討するため, mi -MITF の N 末端側と C 末端側のそれぞれに, 人為的に SV40Large T 抗原由来の核移行シグナルを付加したものについて *transfection* の実験をおこなった。その結果, 核移行シグナルを付加した mi -MITF は wild-type MITF の転写活性化能を優位に抑制した。以上の結果より, 核移行能の低下している mi -MITF は, その核内量が Mi^{wh} -MITF に比べて少ないために両者の抑制能に差があることが示唆された。

次に, wild-type MITF と mi -MITF のヘテロ二量体の細胞内局在性について調べた。wild-type および mi -MITF をそれぞれ, Myc およびインフルエンザヘマグルチニン (HA) エピトープで標識したものをヒト胎児腎細胞内で同時に発現させた。細胞質および核に分画し抗 HA 抗体で免疫沈降をおこない, さらに抗 Myc 抗体を用いてイムプロットングをおこなった。その結果, wild-type MITF と mi -MITF のヘテロ二量体は細胞質内に検出された。以上の結果より, MITF の二量体は細胞質内で形成されること, wild-type MITF と mi -MITF のヘテロ二量体の核移行能に欠陥があることが判明した。

【総括】

本研究では mi -MITF, Mi^{wh} -MITF は同様に DNA 結合能が低下しているにも関わらず mi ヘテロマウスにおける体色に関して mi 遺伝子の効果が劣性である原因は mi -MITF の核移行効率が悪いためであることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

鈴木公子君は小眼球症, 体毛白色, 骨大理石症, マスト細胞数の減少等の症状を呈する mi 突然変異マウスの原因遺伝子, microphthalmia-associated transcription factor (MITF) の核移行能を解析し, その発症メカニズムについて検討をおこなった。MITF は bHLH-ZIP 構造を有し, 二量体を形成して DNA に結合する。basic domain に変異を持つ突然変異遺伝子, mi と Mi^{wh} , それぞれにコードされる mi -MITF および Mi^{wh} -MITF は正常型 MITF の DNA 結合を dominant negative に阻害することがゲルシフトアッセイにより明らかにされている。しかしながら, $Mi^{wh}/+$ マウスの毛色に dilution が認められるのに対し, $mi/+$ マウスでは dilution が認められず, ゲルシフトアッセイの結果とは異なる。MITF の basic domain 中に核移行シグナル様の配列が存在することから, MITF に対する抗体を作製し, 変異型 MITF の細胞内局在性を検討した。その結果, 正常型および Mi^{wh} -MITF は核へ移行するが, mi -MITF の大部分は細胞質にとどまっていた。正常型 MITF は, メラニン合成に重要な酵素のチロシナーゼ遺伝子の転写を活性化することが知られている。この活性化に対する変異型 MITF の抑制作用を評価するため, チロシナーゼ遺伝子プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流につなぎ, 正常型 MITF, mi -MITF あるいは Mi^{wh} -MITF をコードする cDNA とともに NIH/3T3 細胞に *transfection* してルシフェラーゼ活性を測定した。その結果, Mi^{wh} -MITF は強い抑制能を持つが mi -MITF では人工的に SV40Large T 抗原由来の核移行シグナルを付加した時にのみ抑制作用が認められた。本研究により, $mi/+$ マウスの毛色に dilution が起こらない原因は, mi -MITF の核移行効率が Mi^{wh} -MITF に比べて著明に低いためであることが明らかにされた。本研究は, $Mi^{wh}/+$ マウスと $mi/+$ マウスの毛色の違いを分子レベルで説明した点で, 学位論文に値すると思われる。