Osaka University Knowledge Archive

Title	Inhibitory Effect of the Transcription Factor Encoded by the Mutant mi Microphthalmia Allele on Transactivation of Mouse Mast Cell Protease 7 Gene
Author(s)	荻原, 秀樹
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42592
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【39】

氏　　名	荻原秀樹（おぎはらひでき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　16046　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Inhibitory Effect of the Transcription Factor Encoded by the Mutant *mi* Microphthalmia Allele on Transactivation of Mouse Mast Cell Protease 7 Gene （マウス・マスト細胞プロテアーゼ7遺伝子の転写活性化における変異型 *mi*−MITF による抑制効果）
論文審査委員	（主査） 教授　北村　幸彦 （副査） 教授　青笹　克之　　教授　西宗　義武

論文内容の要旨

【目的】

MITF は *mi* locus にコードされる basic-helix-loop-helix-leucine zipper ファミリーの転写因子であり、マスト細胞の分化に重要な役割を果たすことが知られている。*mi*／*mi* 変異マウスは MITF の basic 領域のアルギニンを一個欠失した変異型の *mi*−MITF を通常量発現する。この変異型 *mi*−MITF は DNA に結合できないこと、そして核移行の効率が悪いことが知られている。一方 *tg*／*tg* 変異マウスは MITF 遺伝子のプロモーター領域への transgene の挿入により MITF を全く発現しない。マウスのマスト細胞に特異的に発現するトリプターゼにはマウス・マスト細胞プロテアーゼ6（MMCP−6）と MMCP−7 という非常に高い相同性を有する二つの分子が報告されている。我々はこれまでに MMCP−6 の発現が *mi*／*mi*、*tg*／*tg* 両変異マウスのマスト細胞で顕著に低下していること、そして MMCP−6 遺伝子の発現は MITF によって直接的に制御されていることを報告した。今回、我々は *mi*／*mi*、*tg*／*tg* 両変異マウスのマスト細胞における MMCP−7 遺伝子の発現を解析し、その発現における MITFの効果について検討した。

【方法・成績】

MMCP−7 mRNA の発現は *tg*／*tg* マウス由来のマスト細胞では野生型＋／＋に対して、わずかに減少するのみであったのに対して、*mi*／*mi* マウス由来のマスト細胞では顕著に低下していることがノーザンブロットにより明かとなった。このことから MMCP−7 mRNA の発現に変異型 *mi*−MITF が抑制的に働いていることが示唆された。MMCP−7 mRNA の発現の抑制に *mi*−MITF が作用する分子機構を解析するために、MMCP−7 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、レポーターアッセイを行った。その結果、MMCP−7 遺伝子の転写活性には MITF の結合モチーフである CANNTG モチーフは重要でなく、転写開始部位から約150塩基上流の AP−1 結合モチーフが重要であることが明らかとなった。また、c−Jun や c−Jun のドミナントネガティブ変異体の cDNA をコトランスフェクトしたレポーターアッセイやゲルシフトアッセイから c−Jun が AP−1 結合モチーフに直接結合することにより MMCP−7 プロモーターは活性化されることが明らかになった。さらに c−Jun と＋−MITF をコトランスフェクトしたレポーターアッセイでは、MMCP−7 プロモーターは両分子により協調的に活性化された。c−Jun と MITF の協調性を調べるために、免疫沈降法によって両分子の物理的相互作用を解析したところ、＋−MITF も *mi*−MITF も同様に c−Jun と相互作用する事が確認された。しかし、その複合体の細胞内における局在は異なっていた。

すなわち、＋－MITF と c－Jun の複合体は全て核内に局在するのに対して、*mi*－MITF と c－Jun の複合体は主に細胞質に存在していた。

【総括】

MMCP－6遺伝子の発現が *mi*／*mi*、*tg*／*tg* の両変異マウス由来のマスト細胞で認められなかったのに対して、MMCP－7遺伝子の発現は *tg*／*tg* マウスのマスト細胞ではわずかな減少を認めるのみであり、*mi*／*mi* マウスのマスト細胞ではほとんど発現が検出されなかった。このことから *mi*－MITF は MMCP－7遺伝子の発現に抑制的に働いていることが示唆された。これは MMCP－7プロモーターを直接的に活性化する c－Jun に *mi*－MITF が結合して、c－Jun の核内への移行を阻害することによって起こるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

荻原秀樹君は転写因子 MITF によるマスト細胞の分化制御に関する研究を行った。マスト細胞に特異的に発現するトリプターゼとしてマスト細胞プロテアーゼ6（MMCP－6）と MMCP－7という高い相同性を有する二つの分子が報告されている。MMCP－6の発現が MITF の変異マウスのマスト細胞において減少しているが報告されていたので、荻原君は MMCP－7の発現を解析した。その結果、MITF を発現しない変異マウス *tg*／*tg* マウスでその発現が僅かに減少しているのみであるのに対して、変異型の MITF（*mi*－MITF）を通常量発現している *mi*／*mi* マウスではその発現が顕著に減少していることを発見した。MMCP－7遺伝子の転写に重要なプロモーター領域を同定したところ、予想外にも MITF の結合モチーフである CANNTG モチーフは存在せず、AP－1モチーフが存在した。そして、この AP－1 モチーフに転写因子 c－Jun が結合することで MMCP－7遺伝子の転写が促進されることを明らかにした。一方、野生型の MITF（＋－MITF）は c－Jun と協調してプロモーターを活性化することを示した。MITF と c－Jun の物理的に相互作用することを明らかにし、その細胞内における複合体の局在は異なっていることを示した。＋－MITF と c－Jun の形成する複合体は核内にのみ存在するのに対して、変異型の *mi*－MITF と c－Jun の形成する複合体は細胞質に多く存在していることを明らかにした。*mi*／*mi* マウスのマスト細胞では変異型の *mi*－MITF が c－Jun の核内への移行を阻害することで MMCP－7遺伝子のプロモーターの活性化を抑制しているものと考察した。本研究は個体レベル、そして分子レベルで MMCP－7の転写制御の解析がなされている点はおおいに評価できる。血液細胞、特にマスト細胞の発生機構の解明に大きく貢献するものであり学位の授与に値するものである。