

Title	Isoforms of mi Transcription Factor Preferentially Expressed in Cultured Mast Cells of Mice.
Author(s)	大保木, 啓介
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45224
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	おほき けいすけ 大保木 啓介
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 18473 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Isoforms of <i>mi</i> Transcription Factor Preferentially Expressed in Cultured Mast Cells of Mice. (培養マスト細胞において優位に発現する <i>mi</i> 転写因子のアイソフォーム)
論文審査委員	(主査) 教授 北村 幸彦 (副査) 教授 西宗 義武 教授 仲野 徹

論文内容の要旨

〔目的〕

mi 転写因子 (MITF) をコードする *mi* 遺伝子座の変異アリル *mi* をホモに持つ *mi/mi* マウスでは、マスト細胞の欠損、メラノサイトの欠損、小眼球症、骨大理石病、NK 活性の低下などの異常を呈する。我々は MITF がマスト細胞の分化形質の発現に重要な役割を演ずることをこれまで明らかにしてきた。MITF には N 末端の異なる複数のアイソフォームが報告されているが、マスト細胞においてどのようなアイソフォームが発現するのか明らかでない。そこで、マスト細胞に発現する MITF のアイソフォームの種類とその発現量を調べた。

〔方法ならびに成績〕

培養マスト細胞より精製した mRNA から 5'Rapid Amplification of cDNA Ends (5'RACE) 法を用いて MITF の 5' 末端の配列を取得した。5'RACE 産物中にこれまでに知られている配列とは異なる未報告のエクソンを見出し、これをエクソン 1e と名付けた。このエクソン 1e を 5' 末端にもつアイソフォームはマスト細胞に発現する新規のアイソフォーム (MITF-E) であった。MITF-E は 10 のエクソンから構成され、MITF-E の翻訳開始点は第 2 エクソン内にあり、新規のエクソン 1e は 5' 非翻訳領域であることが示唆された。

次に Celera Discovery System よりゲノム配列を取得し、*Mitf* 遺伝子のゲノム構造を決定した。その結果、*Mitf* 遺伝子は 207 kb にわたって存在することが明らかとなった。

RT-PCR 法により、MITF-E と、これまでに報告のあるアイソフォーム MITF-M、MITF-H、MITF-A の相対的な発現量を調べた。培養マスト細胞では MITF-E が優位に発現しており、MITF-E と比較して、MITF-M は 10% 程度、MITF-H は 1% 程度、MITF-A は 0.1% 程度の発現であった。

骨髄より分化誘導する培養マスト細胞は未熟な分化形質を示すが、腹腔から得られる腹腔マスト細胞は成熟した分化形質を示すことが知られている。この分化形質の異なるそれぞれのマスト細胞について、MITF アイソフォームの発現を検討した。培養マスト細胞において優位に発現するアイソフォームは MITF-E であったが、腹腔マスト細胞においては MITF-M のみを発現していた。また、MITF-E が細胞ないし組織ごとに特異性を持って発現するかどうかを

調べるために、MITF-M を優位に発現するメラノーマ細胞株 B16、MITF-H を優位に発現する心臓について MITF-E の発現を検討した。メラノーマ細胞株 B16、心臓のいずれにおいても MITF-E は検出されず、MITF-E はマスト細胞特異的に発現することが示唆された。

次にこれまでよく解析されてきた MITF-M との比較をすることで、MITF-E の機能を検討した。NIH3T3 細胞へ MITF-E と MITF-M をそれぞれ強制発現し、抗 MITF 抗体をもちいた免疫染色により細胞内局在を検討したところ、MITF-E は MITF-M と同様に核への局在を示した。MITF-E の転写活性化能を MITF の標的遺伝子である mouse mast cell protease-6 (mMCP-6) 遺伝子のプロモーターを用いて検討した。MITF-E は MITF-M と同程度に mMCP-6 遺伝子のプロモーターを活性化し、mMCP-6 遺伝子のプロモーター中の MITF 結合配列へも正常に結合した。

[総括]

培養マスト細胞に特異的かつ優位に発現する MITF の新規のアイソフォーム MITF-E を見出した。加えて MITF アイソフォームの発現はマスト細胞の分化段階に影響される事が示唆された。

論文審査の結果の要旨

MITF 遺伝子はマスト細胞の分化に必要とされる。MITF 遺伝子はマスト細胞だけでなく、メラノサイトや網膜色素上皮細胞、破骨細胞などの分化を制御する事も知られており、これらの細胞には、N 末端の異なる MITF アイソフォームが発現する。しかし、マスト細胞に発現する MITF アイソフォームはどのようなものかは全く不明であった。そこでマウス脾臓細胞から培養マスト細胞を樹立し、5'RACE 法によって MITF のアイソフォームの単離を行い、新規のアイソフォーム MITF-E を見出した。MITF-E は未熟な分化形質を示す培養マスト細胞に優位に発現し、成熟した分化形質を示す腹腔マスト細胞では発現していなかった。

本研究により、MITF-E 遺伝子の働きや MITF-E 遺伝子の発現制御を研究する端緒が得られたと考えられる。本研究はマスト細胞の分化メカニズムの理解に寄与すると考えられることから、学位に値するものと認める。