

# Wnt シグナルによるメラニン産生の制御機構の解析

東北大学大学院 医学系研究科医学生物化学講座分子生物学分野

武田 和久

Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) consists of many isoforms that differ at their N-termini but share a basic helix-loop-helix and leucine-zipper (bHLH-LZ) structure. Among the isoforms, melanocyte-specific MITF (MITF-M) is of particular interest, because expression of MITF-M is under the regulation of the melanocyte-specific promoter (*M* promoter) of the *MITF* gene, and transcription from the *M* promoter is induced by Wnt signals through a nuclear mediator, lymphoid-enhancing factor 1 (LEF-1). Wnt, a group of secretory signaling molecule, evokes a signal to regulate the melanocyte differentiation. The binding of Wnt to its receptor Frizzled leads to inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), followed by the accumulation of  $\beta$ -catenin and its translocation to nucleus. LEF-1/TCF transcription factors can bind to the  $\beta$ -catenin, and the formed complexes transactivate the target genes. Recently, we have shown that functional cooperation of MITF-M with LEF-1 could lead to transcriptional activation of the *M* promoter and the dopachrome tautomerase (*DCT*) gene, an early melanoblast marker. The bHLH-LZ region of MITF-M is responsible for the physical interaction with LEF-1, and  $\beta$ -catenin is required for the collaboration between LEF-1 and MITF-M. Importantly, MITF-M could function as a non-DNA-binding cofactor for LEF-1. These results suggest that MITF-M may function as a self-regulator of its own expression to maintain a threshold level of MITF-M at a certain sensitive stage of melanocyte development, which could account for dominant inheritance of Waardenburg syndrome type 2 (WS2) that is characterized by deafness and hypopigmentation due to lack of melanocytes in the inner ear and skin. MITF-M therefore plays dual roles in the Wnt signaling pathway; MITF-M represents a downstream target and a nuclear mediator of Wnt signals in melanocytes.

## 1. 緒言

小眼球症関連転写因子 (MITF) は塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス-ロイシンジッパー (bHLH-LZ) 構造を持つ転写因子であり、神経堤由来のメラノサイトと脳由来の網膜色素上皮細胞 (RPE) の分化制御因子である<sup>1, 2)</sup>。Wnt は胚の形態形成や毛包の再生などに重要な細胞間シグナル分子であり、MITF 及びメラノブラストの初期分化マーカーである DCT (dopachrome tautomerase) の発現を誘導する<sup>3-5)</sup>。DCT はメラニン合成系酵素の一つであり、可溶性のメラニン前駆物質の解毒にも関与すると考えられている<sup>6)</sup>。

MITF は少なくとも 5 種のアイソフォーム (A, B, C, H, M) から成り、アイソフォームのアミノ末端はそれぞれ特異的なエキソン 1 によりコードされ、各エキソン 1 は固有のプロモーターの制御下にある (図 1)<sup>7-9)</sup>。MITF-M の発現がメラノサイト特異的であるのに対し、MITF-A など他のアイソフォームは RPE やメラノサイトを含めた種々の細胞で発現されている。すなわち、MITF-M の N 末をコードするエキソン 1 M は最も下流に位置する第一エキソンであり、その転写はメラノサイト特異的プロモーター

(M プロモーター) により制御される。

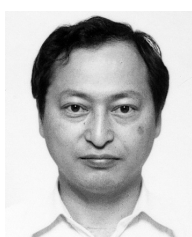
MITF 遺伝子の変異による難聴を伴う色素異常症としてワーデンブルグ症候群 2 型 (Waardenburg syndrome type 2, WS2) が知られている<sup>10)</sup>。WS2 患者は先天性感音難聴の他に、皮膚白斑、早発性白髪、虹彩色素異常を呈する。WS2 の発症は MITF-M の量不足 (haploinsufficiency) によると推定されている<sup>11)</sup>。

MITF の機能異常は色素異常症 (シミあるいは白斑)、毛包の機能低下 (白髪や脱毛) など、加齢に伴い遭遇する諸問題と関連する。本研究では、MITF の機能発現の多様な制御機構を解明し、肝斑などの色素沈着や白斑の有効な予防法と治療法の開発を目ざす。誰しも美しく老いたいと願うものであり、本研究は高齢者の良好な QOL の達成に貢献する。

## 2. 実験

### 2・1 RT-PCR 法による新規アイソフォームの探索と発現解析

マウス RPE で発現される新規 *Mitf* アイソフォームを探索するため、マウス眼球組織由来の mRNA を用いた cDNA の 5' 端増幅法 (5'-RACE 法) にて、*Mitf* cDNA を解析した。その結果、*Mitf*-D を新たに同定した<sup>12)</sup>。ついで、そのヒト cDNA である MITF-D をヒト RPE 細胞株からクローン化した。さらに、マウス及びヒト遺伝子断片を単離し、該当するエキソン (エキソン 1D) の位置を決定した (図 1)。種々ヒト細胞やマウス組織における MITF-D mRNA の発現をノーザンブロット法により解析した。



Role of Wnt signaling in the regulation of melanin biosynthesis

Kazuhisa Takeda

Department of Molecular Biology and Applied Physiology, Tohoku University School of Medicine

### 2・2 M プロモーター機能解析によるエンハンサーの探索

MITF-M を発現するメラノーマ細胞における M プロモーター機能解析用の融合遺伝子の一時的発現法により、エンハンサーを探索し、MDE を同定した<sup>13)</sup>。さらに、MDE の機能を詳細に解析し、結合タンパクを探索した。

### 2・3 MITF の機能制御因子の探索

DCT プロモーター機能解析用の融合遺伝子との一時的共発現法により、MITF-M と LEF-1 の相互作用を解析し、

関与するシスエレメントを探索した。Tag 付きの各蛋白を調製し、pull-down 法と免疫沈降法により in vivo での結合を解析した。

### 2・4 cAMP シグナルと Wnt シグナルのクロストークの解析

上記実験により、DCT 遺伝子の CRE 類似配列が、MITF-M と LEF-1 の相互作用による活性化に必須なことが判明した (図 2A)<sup>5)</sup>。そこで、DCT 遺伝子の CRE 類似配

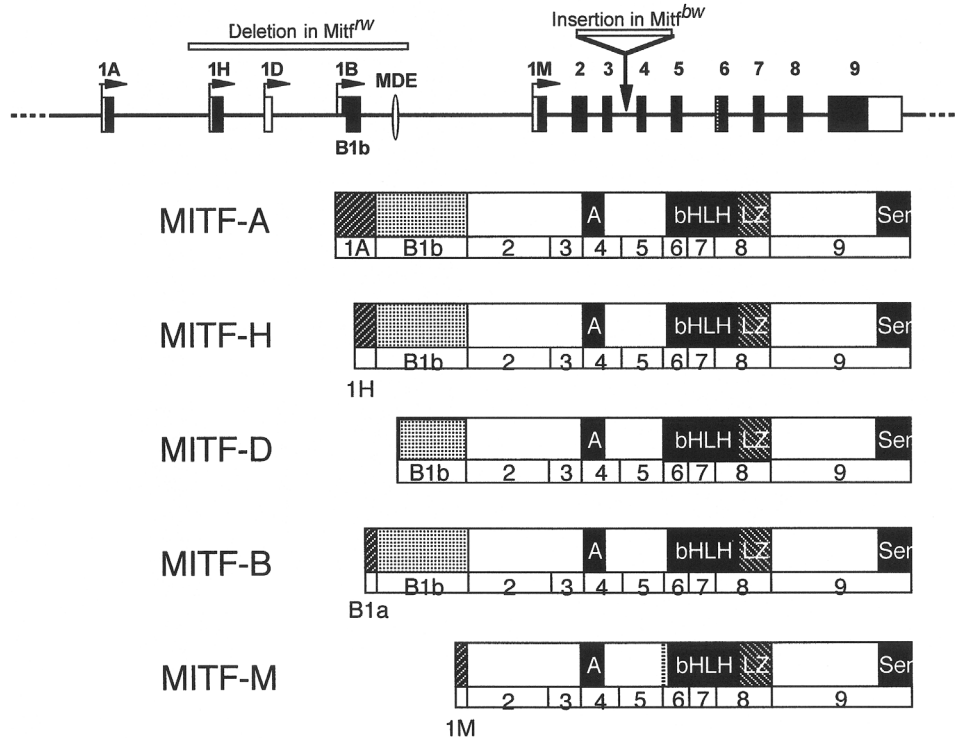


図 1 MITF 遺伝子と MITF アイソフォームの模式図

黒い部分はタンパクをコードするエクソン領域を、白い部分は 5' あるいは 3' の非翻訳領域を示す。エクソン 2～9 はすべてのアイソフォームに共通である。4 種の MITF アイソフォームの N 末をエクソン 1N と示した。エクソン 1B の 3' 側の B1b 領域は、MITF-A mRNA などの生成の際に第 2 エクソンとして利用される。M プロモーター (エクソン 1M の転写開始点の上流) はメラノサイト特異的に機能する。bw マウスの外来 DNA 挿入部と rw マウスで見られる DNA 欠失領域に相当する部分も示す。後者の欠失領域には、M プロモーターのエンハンサー (MDE) が存在する。

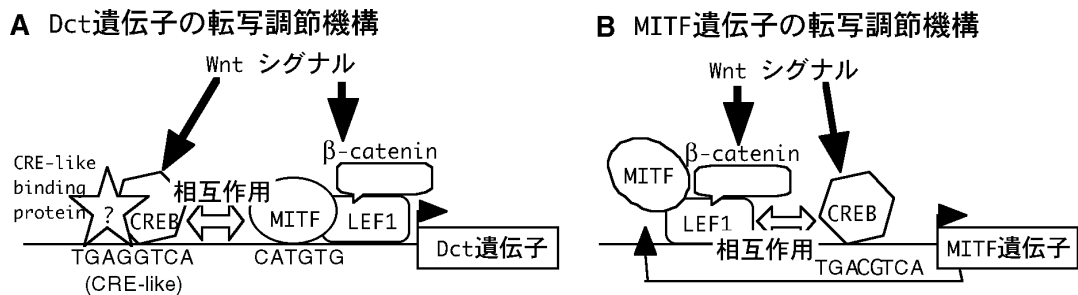


図 2 MITF と LEF-1 の相互作用による転写調節

A. DCT 遺伝子の転写調節機構。DCT プロモーター領域には、MITF 結合部位、LEF-1 結合部位、及び CRE 類似配列が存在する。CRE 類似配列に結合するタンパクはまだ不明である。  
B. M プロモーターの転写調節機構。MITF 遺伝子の M プロモーター領域を模式的に示す。M プロモーターには LEF-1 結合部位と CRE は存在するが、MITF の結合部位は存在しない。

列をプローブにしたゲルシフトアッセイにより解析する。場合によっては、サウスウェスタン法にて結合蛋白を探索する。

## 2・5 MITF-M による M プロモーターの自己制御機構の解析

培養細胞での一時的発現解析では、MITF-M は LEF-1 による M プロモーターの活性化を促進する<sup>14)</sup>。しかし、同領域には MITF-M の結合部位は存在しない (図 2B)。よって、LEF-1 を介した MITF-M による未知の転写活性化機構の存在が示唆され、その分子基盤を明らかにする。

## 3. 結果

### 3・1 新規アイソフォーム MITF-D の同定

RPE と破骨細胞で発現される MITF-D を新たに同定した (図 1)<sup>12)</sup>。MITF-D の翻訳開始 Met は下流のエキソン 1B に位置する。MITF-D mRNA の非翻訳領域はエキソン 1D によりコードされる。

### 3・2 M プロモーターの上流エンハンサー MDE の同定

M プロモーターの機能解析により、エキソン 1M の上流約 14kb にエンハンサー MDE を同定した (図 1)<sup>13)</sup>。MDE には 2 つの SOX10 結合部位が存在し、エンハンサー機能に必須である。事実、SOX10 は MDE に作用して、M プロモーターを活性化した。さらに、Mitf 変異マウスである red-eyed white (rw) のホモ接合体は赤眼、小眼球、広範な白毛を呈する<sup>15)</sup>。その本態はエキソン 1H、エキソン 1D、及びエキソン 1B を含む DNA 断片の欠失である (図 1)<sup>16)</sup>。よって、rw マウスは MITF-A など B1b 領域を持つすべてのアイソフォームを欠損する。さらに、白毛を呈することから、MITF-M の発現も欠損していることが示唆される。実際、rw マウスでは、MDE が欠失していることを明らかにした<sup>13)</sup>。

これらの結果は Pigment Cell Research 誌に発表され、2002 年の最優秀論文賞を受賞した (文献 13)。

### 3・3 Wnt シグナル伝達系の構成因子としての MITF

MITF-M が Wnt シグナル伝達系の転写因子 LEF-1 と協調的に作用してメラノblastマーカーでもある DCT 遺伝子プロモーターを活性化することを発見した<sup>5)</sup>。この作用には、LEF-1 と共に  $\beta$ -カテニンも関与する (図 2A)。ヒト培養細胞における two-hybrid 法と抗体を用いた pull-down 解析法により、MITF の bHLH-LZ 領域が LEF-1 と相互作用することを明らかにした。よって、MITF-M は Wnt シグナル伝達系の構成因子でもある。MITF は DNA との結合の有無に関わらず LEF-1 のコアクチベーターとして機能する。

bHLH-LZ 領域はすべての MITF アイソフォームに共通であり、MITF-A などのアイソフォームも LEF-1 と相互

作用する<sup>5)</sup>。すなわち、MITF は Wnt シグナル伝達系の構成因子としての役割も担うことが示唆される。この結果、Wnt シグナルは種々細胞において効率的に伝達されると考えられる。一方、LEF-1 ファミリーに属する TCF-1 は MITF と相互作用しない<sup>17)</sup>。よって、Wnt シグナル伝達経路における LEF-1 と TCF 1 との機能的差異が明らかになった。

### 3・4 Wnt シグナル伝達系と cAMP シグナル伝達系のクロストーク

cAMP と Wnt シグナルによる DCT プロモーターの活性化には、共通の cAMP-response element (CRE) 類似配列が関与するが、既知の CREB はこの配列には結合しない<sup>5)</sup>。Wnt シグナル伝達系と cAMP シグナル伝達系のクロストークの可能性が示唆される (図 2A)。

### 3・5 MITF による M プロモーターの自己活性化機構

WS2 の発症は MITF-M の量不足 (haploinsufficiency) によると考えられるが、その発症機構は不明であった。MITF 自身が、LEF-1 を介して M プロモーター (自己遺伝子) の転写を促進する事を明らかにした (図 2B)<sup>14)</sup>。この場合、MITF は M プロモーターに結合する必要は無い。すなわち、DNA との結合に関わらず MITF は LEF-1 のコアクチベーターとして機能し得る。よって、発生過程で効率良く MITF-M の発現量を維持できると考えられる。

### 3・6 RPE における OTX2 の役割

RPE は脱落・生成を繰り返す杆体細胞外節片を絶えず貪食・処理するのみならず、ロドプシンの構成成分である 11-シス-レチナールを再生し視細胞に供給する。このように、RPE は視細胞の機能維持に必須である。また、RPE はメラニン合成という分化形質を持ち、メラニン合成系の 3 つの酵素 (チロシナーゼ、TRP1、DCT) を発現する。RPE に存在するメラニンは視覚機能に重要であるばかりでなく、視神経の適正な伸張にも関与する。転写因子 OTX2 が RPE 特異的に DCT プロモーターを活性化することを発見した<sup>18,19)</sup>。

## 4. 考察

最近の美白ブームによりメラニンに対する一般の関心は高く、美白のためのさまざまな化粧品が登場している。さらに、高齢化が進む我が国においては、単に健康で長生きできればよいというわけではなく、その余生の質が重要視されている。今や、美しく老いるという願望は必ずしも女性だけのものではない。実際、皮膚の老化の指標の一つである色素沈着 (シミ) を予防できるような化粧品・薬剤の開発が待ち望まれている。

オゾン層の破壊により地上に到達する紫外線量が増加

し、世界的にメラノーマが増加している。メラニンの主な機能は紫外線に対する防護作用であるが、様々な皮膚の炎症後にもメラニン色素の沈着がおこる。また、加齢に伴う白髪形成には、毛包メラノサイトの細胞死による脱落などの病態が考えられる。しかし、現時点でもメラノサイトの機能制御因子が続々と発見されており、メラノサイトの分化・生存には従来考えられてきたよりも複雑な制御機構が存在する。本研究は、メラノサイトの分化と機能維持に重要な液性因子 Wnt に焦点を当てるものであり、コスメトロジーにとって重要な知見を提供する。すなわち、我々が明らかにする Wnt シグナル伝達に関連する新規因子の機能制御法を開発することにより、将来、皮膚を守る化粧品・薬剤の開発へと発展する可能性がある。

MITF は色素細胞のみならずマスト細胞、破骨細胞などの分化制御因子であり、MITF 変異が及ぼす効果の多面性の分子基盤の解明も今後の重要な研究課題である。一方、Wnt シグナルは、メラノサイトを含めた毛包細胞間の相互作用にも関与する。Wnt が毛包メラノサイトの生存維持をどのように制御するのも興味深い問題である。

#### (文 献)

- 1) Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Arnheiter H. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein: *Cell* 1993; 74: 395-404.
- 2) Hughes MJ, Lingrel JB, Krakowsky JM, Anderson KP. A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the mi locus: *J Biol Chem* 1993; 268: 20687-20690.
- 3) Dorsky RI, Raible DW, Moon RT. Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway: *Genes Dev* 2000; 14: 158-162.
- 4) Takeda K, Yasumoto K, Takada R, Takada S, Watanabe K, Uono T, Saito H, Takahashi K, Shibahara S. Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a: *J Biol Chem* 2000; 275: 14013-14016.
- 5) Yasumoto K, Takeda K, Saito H, Watanabe K, Takahashi K, Shibahara S. Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *EMBO J* 2002; 21: 2703-2714.
- 6) Steel KP, Davidson DR, Jackson IJ. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor: *Development* 1992; 115: 1111-1119.
- 7) Amae S, Fuse N, Yasumoto K, Sato S, Yajima I, Yamamoto H, Uono T, Durlu YK, Tamai M, Takahashi K, Shibahara S. Identification of a novel isoform of microphthalmia-associated transcription factor that is enriched in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 710-715.
- 8) Uono T, Yasumoto K, Takeda K, Amae S, Watanabe K, Saito H, Fuse N, Tachibana M, Takahashi K, Tamai M, Shibahara S. Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters: *Biochim Biophys Acta* 2000; 1491: 205-219.
- 9) Fuse N, Yasumoto K, Takeda K, Amae S, Yoshizawa M, Uono T, Takahashi K, Tamai M, Tomita Y, Tachibana M, Shibahara S. Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus: *J Biochem (Tokyo)* 1999; 126: 1043-1051.
- 10) Tassabehji M, Newton VE, Read AP. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene: *Nature Genet* 1994; 8: 251-255.
- 11) Nobukuni Y, Watanabe A, Takeda K, Skarka H, Tachibana M. Analyses of loss-of-function mutations of the MITF gene suggest that haploinsufficiency is a cause of Waardenburg syndrome type 2A: *Am J Hum Genet* 1996; 59: 76-83.
- 12) Takeda K, Yasumoto K, Kawaguchi N, Uono T, Watanabe K, Saito H, Takahashi K, Noda M, Shibahara S. Mitf-D, a newly identified isoform, expressed in the retinal pigment epithelium and monocyte-lineage cells affected by Mitf mutations: *Biochim Biophys Acta* 2002; 1574: 15-23.
- 13) Watanabe K, Takeda K, Yasumoto K, Uono T, Saito H, Ikeda K, Takasaka T, Takahashi K, Kobayashi T, Tachibana M, Shibahara S. Identification of a distal enhancer for the melanocyte-specific promoter of the MITF gene: *Pigment Cell Res* 2002; 15: 201-212. (2002年の最優秀論文賞を受賞)
- 14) Saito H, Yasumoto K, Takeda K, Takahashi K, Fukuzaki A, Orikasa S, Shibahara S. Melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform activates its own gene promoter through physical interaction with lymphoid-enhancing factor 1: *J Biol Chem* 2002; 277: 28787-28794.
- 15) Steingrímsson E, Moore KJ, Lamoreux ML, Ferr\_-D'Amaré AR, Burley SK, Sanders Zimring DC, Skow LC, Hodgkinson CA, Arnheiter H, Copeland NG, Jenkins NA. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi)



- 
- mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences: *Nature Genet* 1994; 8: 256-263.
- 16) Hallsson JH, Favor J, Hodgkinson C, Glaser T, Lamoreux ML, Magnusdottir R, Gunnarsson GJ, Sweet HO, Copeland NG, Jenkins NA, Steingrímsson E. Genomic, transcriptional and mutational analysis of the mouse microphthalmia locus: *Genetics* 2000; 155: 291-300.
- 17) Waterman ML, Fischer WH, Jones KA. A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C $\alpha$  enhancer: *Genes Dev* 1991; 5: 656-669.
- 18) Simeone A, Acampora D, Mallamaci A, Stornaiuolo A, D'Apice MR, Nigro V, Boncinelli E. A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo: *EMBO J* 1993; 12: 2735-2747.
- 19) Takeda K, Yokoyama S, Yasumoto K, Saito H, Uono T, Takahashi K, Shibahara S. OTX2 regulates expression of DOPAchrome tautomerase in human retinal pigment epithelium: *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 908-914.