

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21148

研究課題名(和文)メラノソーム成熟におけるBACE2パルミトイル化の役割

研究課題名(英文)The role of BACE2 palmitoylation on melanosome maturation

研究代表者

仁木 洋子(Niki, Yoko)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・バイオシグナル研究員

研究者番号：60633617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：色素細胞に特異的な細胞小器官メラノソーム(MS)の構成タンパク質PMEL17の形成及びMS成熟にパルミトイル化が及ぼす影響を理解することを目的とした。PMEL17のプロセッシング酵素のBACE2は色素細胞内でパルミトイル化を受ける。しかし、パルミトイル化の阻害は、BACE2の発現量には影響しないが、PMEL17の発現レベルそのものを増加させた。またPMEL17もパルミトイル化されることが明らかとなった。以上の結果からPMEL17及びMS成熟には当初予想していたBACE2ではなく、PMEL17のパルミトイル化が関与する可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Melanosome (MS) is a pigment cell specific cellular organelle. In this study I aimed to understand the effect of palmitoylation on the formation of PMEL17 and MS maturation. BACE2 which is the processing enzyme of PMEL17 was palmitoylated in pigment cells. However, the inhibition of palmitoylation did not affect the expression level of BACE2, but increased the expression level of PMEL17 protein. The results showed that PMEL17 was palmitoylated. From the above results, it was suggested that palmitoylation of PMEL17 may be involved rather than BACE 2, which was originally expected for PMEL17 and MS maturation.

研究分野：色素細胞学

キーワード：メラノソーム パルミトイル化 BACE2

1. 研究開始当初の背景

パルミトイル化は多くのタンパク質の局在や機能を調整する役割を果たしていることが、多数の研究グループによって報告されている。しかしながらメラノソームの成熟やメラニン合成に関連するタンパク質の脂質修飾、パルミトイル化に関する研究はほとんど行われていない。申請者らは近年、哺乳類の体色決定色素であるメラニンの生合成がメラニン合成酵素チロシナーゼの脂質修飾 (S-パルミトイル化) によって調節される可能性を明らかにし、報告した。またその研究過程で、メラニン合成の場であるメラノソームの構成タンパク質 premelanosome protein17 (PMEL17) の断片化に働く -セクレターゼの Beta-Site APP-cleaving enzyme2 (BACE2) ⁽¹⁾ も S-パルミトイル化を受けること可能性を見出した。メラノソームは成熟の度合いによって4つのステージ (I-IV) に分類される。PMEL17 は、ステージ I メラノソームの膜に輸送された後、内部小胞の形成と共に内腔に取り込まれる。そこで PMEL17 は数段階切断され、その断片が重合してアミロイド繊維 (シート) を形成し、ステージ II メラノソームで観察される特徴的なラメラ構造を構築する。このシートは、ステージ III-IV メラノソームで合成されるメラニン色素の足場となるため、PMEL17 の断片化と重合はメラノソーム成熟とメラニン合成において重要な役割を果たしている (図 1)。PMEL17 の断片化は、メラノソームの成熟に必須であるが、その切断過程は不明な点も多く、PMEL17 が未成熟であると色素異常を伴う眼白皮症の原因となるなど、正常な色素形成に重要な役割を果たすことが知られている。本研究では、パルミトイル化によるメラニン合成の調節のさらなる理解を目的として、PMEL17 の断片化酵素の BACE2 のパルミトイル化に着目した。BACE2 の PMEL17 切断活性の調節を解明することは、メラノソームの形成・成熟を明らかにする上で重要であると考えられている。

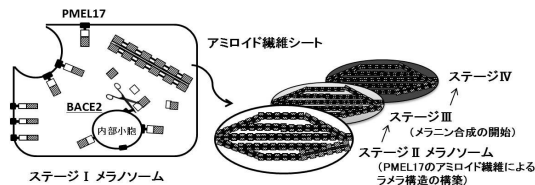


図 1. PMEL17 のアミロイド繊維形成とメラノソームの成熟

2. 研究の目的

本研究では、上記背景を元に、メラニン色素を生成する色素細胞 (メラノサイト) に特異的な細胞小器官メラノソーム内でメラニ

ン色素がデポジットする足場となるアミロイド用タンパク質の PMEL17 の形成及びメラノソーム成熟に PMEL17 の切断酵素の 1 種である BACE2 のパルミトイル化が及ぼす影響を解析し、メラニン生成のレギュレーションを理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BACE2 の色素細胞内でのパルミトイル化の確認を目的としてパルミトイル化タンパク質を特異的に検出する S-acylated proteins resin-assisted capture (Acyl-RAC) 法とウェスタンブロット法を用いて検出を行った。また、BACE2 のパルミトイル化サイトの同定を目的とし、パルミトイル化部位予想ソフト (CSS - Palm Ver. 3.0) で予想された 479 番目、496 番目のシステインをパルミトイル化反応を受けないアラニンに変異させた BACE2 (以下、変異型 BACE2) をメラノーマ細胞で過剰発現させ、パルミトイル化修飾を受けるかを確認した。

(2) パルミトイル化修飾の有無によって BACE2 の細胞内局在が変化し、PMEL17 の切断に影響を及ぼす可能性を野生型と変異型 BACE2 の細胞内局在を調べることによって検討した。

(3) BACE2 のパルミトイル化が PMEL17 の切断に与える影響を調べる目的で、パルミトイル化阻害剤である 2-プロモパルミチン酸 (2-BP) を色素細胞に暴露し、PMEL17 の断片化やメラニン合成に及ぼす影響の解析をウェスタンブロット法やリアルタイム PCR 法を用いて試みた。

4. 研究成果

今回の研究によって以下のことが明らかとなった。

(1) BACE2 はヒトメラノサイトにおいて、パルミトイル化修飾を受けることが示された。またそのサイトは 2 個のシステイン残基 (C476、C496) である可能性が高いことが明らかとされた。

(2) パルミトイル化は、膜への親和性を高めることから、タンパク質の細胞内局在を調節する要因の 1 つであることが知られている。しかしながら、野生型とパルミトイル化を受けない BACE2 の細胞内局在に大きな変化は無く、ゴルジ体、またメラノソームに局在が認められた。この結果から、BACE2 がパルミトイル化の有無によって、細胞内局在が変化し、メラノソームへの輸送が阻害される可能性は低いと考えられた。

(3) パルミトイル化阻害剤 2-BP を暴露したメラノサイトでは、BACE2 のパルミトイル化が阻害される傾向であることが確認できた。この際の PMEL17 の断片化への影響を各切断片に特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法で解析することを試みた。しかしながら、2-BP によるパルミトイル化阻害処理によって、BACE2 の発現量に変化は無かったが、PMEL17 そのもののタンパク質発現レベルが顕著に増加し、BACE2 による切断の影響は明確には確認できなかった。この際、PMEL の mRNA レベルには変化が無く、翻訳後修飾過程において影響を受ける可能性が示唆された。2-BP 処理を行った色素細胞では、メラニン合成が亢進する(図 2)。この現象は、メラニン色素合成の鍵酵素であるチロシナーゼがパルミトイル化によって、レギュレーションを受けることが主たる要因であると我々の研究から示唆されているが、今回の研究において、パルミトイル化は、PMEL17 の発現量に影響を及ぼし、メラニン合成を調節している可能性が示唆された。

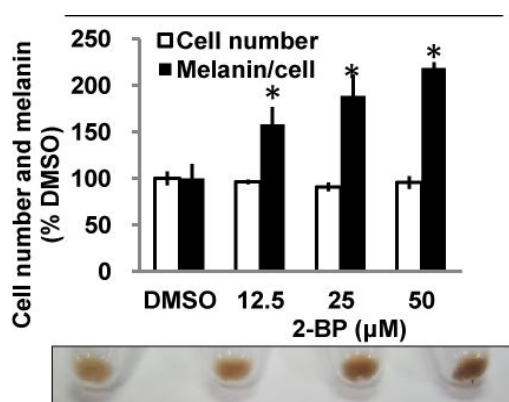


図2 パルミトイル化阻害剤2-BP処理によるメラニン生成の亢進(ヒトメラノーマ細胞)

そこで、PMEL17 自身がパルミトイル化を受ける可能性を検討したところ、修飾を受けることが示された。PMEL17 は、C 末端付近でメラノソーム膜を貫通する1回膜貫通型タンパク質であることが知られており、膜への親和性及び安定性においてパルミトイル化が影響を及ぼす可能性は考えられる。PMEL17 のパルミトイル化サイトの検討のために、可能性が高いと予想された 8、301、647 番目のシステイン残基をアラニンに置換した変異型 PMEL の過剰発現株での検討を実施したが、サイトの同定には至らなかった。予想部位以外のパルミトイル化サイトの存在が示唆された。PMEL17 は、メラニン色素生成の場であるメラノソーム内で、2 種類ある哺乳類のメラニン色素のうちユウメラニンモノマーの重

合を促進し、メラニン生成を亢進させるとの報告がある⁽²⁾。つまり、パルミトイル化は、メラニン生成の制御において、酵素チロシナーゼ量のレギュレーションだけではなく、足場となる PMEL17 の挙動に影響している可能性が示唆された。

以上の結果から、詳細は明らかではないが、PMEL17 の切断及びメラノソームの成熟には当初予想していたプロセシング酵素 BACE2 のパルミトイル化ではなく、PMEL17 自身のパルミトイル化が関与している可能性も示唆されたと考える。メラニン生成のレギュレーションには、まだ不明な点も多く、例えば人間でのメラニン生成量の差が何に起因するかはいくつかの説があるが明確にはなっていない。本研究の結果は、パルミトイル化がメラニン生成のレギュレーションにおいて、重要な役割を果たすことを示唆しており、メラニン生成制御の理解への一助になると期待できる。

<引用文献>

- (1) Rochina, b et al., Jun 25;110(26):10658-63 *PNAS*, 2013
- (2) Fowler, D.M. et al., Jan;4(1):e6. *PLoS Biol.* 2006

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

取得年月日：

国内外の別：

6．研究組織

(1)研究代表者

仁木 洋子 (NIKI Yoko)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センタ

ー・バイオシグナル研究員

研究者番号：60633617

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()