

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591641

研究課題名(和文)色素異常に関与する新規分子の同定と機能解析

研究課題名(英文)The novel mechanisms for the regulation of melanogenesis

研究代表者

川口 雅一 (KAWAGUCHI, MASAKAZU)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：10302291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：メラニン合成に関わる新規分子をスクリーニングする過程で、ADAM (a disintegrin and metalloprotease) 阻害剤がメラニン合成を抑制することを明らかにした。ADAM阻害剤は、メラノソーム構成蛋白質であるPMEL17のプロセッシングを調節し、メラノソーム内の線維構造形成に関与していた。また、diacylglycerolの代謝に関与するdiacylglycerol kinaseが、MITF の発現を制御すること、PMEL17のプロセッシングに関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：ADAMs (a disintegrin and metalloprotease) are a family of proteases involved in ectodomain shedding that play a role in various biological processes such as cell adhesion and migration. We examined the effect of ADAM protease inhibitors on the modulation of melanogenesis in normal human epidermal melanocytes (NHEM). In NHEMs, melanin content was reduced by treatment with ADAM protease inhibitors. Electron microscopy showed that the number of fibrillar and mature melanosomes was significantly reduced and that the vacuolar compartments were filled with dense unstructured aggregates after treatment with ADAM protease inhibitors. We therefore focused on the processing of PMEL17, a melanosomal glycoprotein that forms a fibrillar matrix on which melanin gets deposited. We found that ADAM protease inhibitors exerted effects on the processing of C-terminal and N-terminal fragments of PMEL17.

研究分野：皮膚科学

キーワード：メラノサイト メラノソーム PMEL17 diacylglycerol kinase ADAM protease

## 1. 研究開始当初の背景

メラニン色素は色素細胞のメラノソーム内で合成され、その後ケラチノサイトに引き渡される。メラノソームはメラニンを合成、保持するメラノサイトに特有な細胞内小器官である。メラニン合成に必要な蛋白質は、メラノサイト内で粗面小胞体、ゴルジ体、エンドソームなどを経てメラノソームに輸送される。これらのメラニン合成反応にかかわる分子や、メラノサイト内でのシグナル伝達や膜輸送に関わる分子、あるいはメラノサイトの発生や分化に関与する分子の異常などによって色素異常症が生じる。近年、メラニン合成に関わる遺伝子が次々に明らかにされてきた。しかしそれらの機能については不明の点も多い。また現時点では、遺伝性色素異常症の有効な治療法はほとんどない。

本研究では、メラニン合成に関与する分子をスクリーニングする過程で、ADAM (a disintegrin and metalloprotease) 阻害剤がメラノサイトのメラニン量を抑制することを見出した。ADAM (a disintegrin and metalloprotease) は細胞膜上の増殖因子、受容体、接着分子のシェディングやインテグリンなどへの結合により、細胞の接着、運動、増殖に関与する多機能分子である。ADAM17 は TNF- $\alpha$ 、TNF receptor、KIT ligand (KITL) やその受容体 KIT のシェディングに関与する。ADAM17 のノックアウトマウスでは毛の色素異常を呈することが報告されている。また ADAM17 は東アジア人の皮膚の色調を決定する遺伝子の一つである可能性が報告されている。ADAM10 は CD44、E-cadherin、N-cadherin などのシェディングに関与しており、最近、網状肢端色素沈着症の原因遺伝子であると報告された。

脂質性 2 次メッセンジャーの 1 つである diacylglycerol は、メラノサイトのメラニン合成を促進し、紫外線照射により細胞内で増加することが知られている。Diacylglycerol の標的分子の一つである protein kinase C (PKC) はメラノサイトの tyrosinase を活性化し、メラニン合成を促進させることが報告されている。Diacylglycerol kinase (DGK) は、diacylglycerol 代謝に関与する分子で、これまで 10 種類の isoform が同定されており、様々なシグナル伝達系の活性を制御する。我々は、メラノサイトにおける DGK の発現を検討し、DGK の活性がメラニン合成に重要な役割を担うことを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

ADAM 阻害剤がどのようにメラニン合成を制御するか明らかにする。またメラノサイトにおける DGK の機能を解析する。これまでの研究で、DGK が tyrosinase の細胞内輸送に関与し、メラニン合成にかかわる分子であることを明らかにしており、本研究ではメラノサイトに発現している DGK isoform を RNA 干渉で knockdown し機能解析を行う。

特にメラニン合成に関与するか検討する。さらに diacylglycerol の標的分子である RasGRP についても同様に解析を進める。RasGRP は Ras シグナル伝達系を活性化させるため、MITF のリン酸化に関与し、メラニン合成を調節している可能性がある。

## 3. 研究の方法

培養正常ヒトメラノサイトやメラノーマ細胞株をもちいて研究を行った。細胞増殖、細胞死はアラマープルーによる蛍光法で解析した。メラニン量、tyrosinase 活性、およびメラニン合成関連分子 (tyrosinase、TRP-1、melan-A、PMEL17、MITF など) の発現は real-time PCR やウエスタンブロットで検討した。シグナル伝達系に対する影響は、ウエスタンブロットで蛋白質のリン酸化を検討した。各分子の発現は siRNA により knockdown した。細胞の形態やメラノソームの構造は電子顕微鏡を用いて観察した。

## 4. 研究成果

(1)メラニン合成に関与する新しい分子の同定

ADAM 阻害剤はヒトメラノサイトのメラニン量を低下させた。また  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone 誘導性のメラニン合成を抑制した。電子顕微鏡で形態変化を検討したところ、阻害剤で処理した細胞では stage 1 のメラノソーム数が減少していた。ウエスタンブロットでは、阻害剤は MITF や tyrosinase、TRP-1 などのメラニン合成関連蛋白質の発現にはほとんど影響を与えなかったが、HMB-45 の発現に変化が見られた。HMB-45 は、メラノソーム構成蛋白質の 1 つである PMEL17 に対する抗体であることから、PMEL17 の発現やプロセッシングを検討したところ ADAM 阻害剤で細胞を処理すると、PMEL17 の C 末と N 末のプロセッシングに変化が見られた。このことから ADAM 阻害剤は、PMEL17 のプロセッシングを調節することでメラノソーム形成に関与する可能性が示唆された。これまでに PMEL17 のプロセッシングに関与することが知られている分子としてガンマセクレターゼや  $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE2) などがある。そこで、ガンマセクレターゼ阻害剤や BACE2 siRNA をもちいて、PMEL17 のプロセッシングパターンを比較したところ、ADAM 阻害剤による PMEL17 の切断パターンとは異なっていた。PMEL17 の C 末のプロセッシングに関する分子はガンマセクレターゼのみが知られている。また、PMEL17 の N 末のプロセッシング機構についてはこれまでほとんどわかっておらず、ADAM プロテアーゼが PMEL17 のプロセッシングに関わる分子である可能性がある。PMEL17 はガンマセクレターゼにより切断された後、C 末は急速に分解されるが、その分解機構も不明である。興味深いことに、ア

ルツハイマー型認知症で蓄積するアミロイドの前駆体である amyloid precursor protein (APP) もガンマセクレターゼ、BACE1、ADAM10、ADAM17 などで切断されることが知られており、共通の切断機構の存在が示唆される。PMEL17 のプロセッシングには複数の分子が関与する可能性があり、ADAM プロテアーゼを中心に PMEL17 の切断に関与する新規分子の解明を進める予定である。ADAM プロテアーゼは 20 種類以上あるため、RNA 干渉によりその発現を knockdown し、どの分子がメラニン合成に関与するか検討している。

#### (2)メラノサイトにおける DGK の機能解析

DGK 阻害剤は低濃度では tyrosinase 蛋白質の発現のみを抑制しメラニン量を減少させるが、高濃度では MITF の蛋白質発現と mRNA 発現を抑制し、tyrosinase 以外のメラニン合成関連蛋白質 (TRP-1, melan-A, DCT など)の発現に影響を与えた。DGK 阻害剤がどのシグナル伝達系に関与するか、メラノサイトを培養し阻害剤を添加後、経時的に Erk、Akt、p38、PKC、mTOR などの様々なシグナル伝達分子のリン酸化を詳細に検討したところ、複数のシグナル伝達系の活性化に変化が見られた。このことから DGK 阻害剤により細胞内の diacylglycerol 量が変化を起し、様々なシグナル伝達系に影響を与え、MITF の発現を調節する可能性が示唆された。

また、DGK 阻害剤は PMEL17 の N 末と C 末のプロセッシングに影響を与えることを明らかにした。現在、DGK 阻害剤がどのように PMEL17 のプロセッシングを調節するか検討している。

#### (3) UVB により発現調節される DGK isoform の機能解析

Diacylglycerol はメラノサイトにおいてメラニン合成を促進し、UVB 照射により細胞内で増加することが知られている。増加した diacylglycerol は PKC を活性化させる。また diacylglycerol は DGK により phosphatidic acid に変換される。Phosphatidic acid も下流の分子の活性を調節し細胞機能に関与する。DGK が UVB 照射によるシグナル伝達系に関与する可能性を考え、UVB によりメラノサイトで発現が亢進する DGK を検索し同定した。RNA 干渉を用いて DGK の発現を knockdown し、DNA damage、アポトーシス、細胞周期への影響などを検討した。この DGK isoform は、メラニン合成やメラニン合成関連蛋白質の発現には関与していなかったが、メラノサイトでこの isoform を knockdown すると細胞死が促進する可能性が示唆された。詳細な機能解析を行うために、今後はノックアウトマウスからメラノサイトを単離培養し、解析する予定である。

#### 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 1 件)

Kawaguchi M, Hozumi Y, Suzuki T. ADAM protease inhibitors reduce melanogenesis by regulating PMEL17 processing in human melanocytes. J Dermatol Sci. 査読あり, 78, 2015, 133-142

[学会発表](計 6 件)

Kawaguchi M et al, The role of ADAM proteases on the processing of PMEL17, 第 39 回日本研究皮膚科学会, 2014 年 12 月 13 日, ホテル阪急エキスポパーク (大阪市)

Kawaguchi M et al, ADAM protease inhibitor modulates melanogenesis in human melanocytes, 12<sup>th</sup> international pigment cell conference, 2014.9.4-7, Shangri-La Hotel (Singapore)

川口雅一ら、ADAM プロテアーゼ阻害剤はヒトメラノサイトの melanogenesis を調節する、第 25 回日本色素細胞学会学術大会、2013 年 11 月 16 日、大阪大学吹田キャンパス (大阪市)

Kawaguchi M et al, ADAM protease inhibitor regulates chemokine expression in human keratinocytes, and modulates melanogenesis in human melanocytes, International Investigative Dermatology, 2013.5.11, Edinburgh International Conference Centre (Scotland, Edinburgh)

川口雅一ら、Diacylglycerol kinase regulates tyrosinase expression and function in human melanocytes、第 37 回日本研究皮膚科学会、2012 年 12 月 7 日、ロワジールホテル (沖縄県那覇市)

川口雅一ら、Diacylglycerol kinase はメラノサイトの tyrosinase 発現と機能を調節する、第 24 回日本色素細胞学会 2012 年 11 月 24、長浜バイオ大学 (滋賀県長浜市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川口 雅一 (KAWAGUCHI MASAKAZU)  
山形大学・医学部・講師  
研究者番号：10302291