

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860932

研究課題名(和文) 眼皮膚白皮症4型の原因遺伝子SLC45A2の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of OCA4 mutant sequences using under white mouse melanocytes

研究代表者

紺野 隆之 (KONNO, TAKAYUKI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：00359564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：眼皮膚白皮症とはメラニン色素合成障害により発症する疾患で、そのうちの4型というタイプは、SLC45A2というタンパクをコードする遺伝子異常が原因であることが分かっている。その機能を解析するために、日本人患者に多い2つの変異であるD157N、G188Vの変異遺伝子を、疾患モデルマウスからの培養メラノサイトへ導入し、wild typeの遺伝子を導入した細胞と、メラニン合成量の違い、電子顕微鏡でのメラノソームの違いを見出した。また、SLC45A2タンパクの抗体を用いて、ウェスタンブロット法で変異によるタンパク発現の低下を見出した。

研究成果の概要(英文)：Oculocutaneous albinism Type IV (OCA4) is the result of single gene mutation in Solute Carrier Family 45, member 2 gene (SLC45A2). The clinical phenotypes of OCA4 patients vary depending on their mutant genotypes. Two of these mutations, the p.D157N and the p.G188V alleles, were the first and second most frequently found variants in Japanese patients. I investigated the differential complementation of defective melanin biosynthesis and the hypopigmentation in melanocytes (under white cells; uw) established from an OCA4 mouse model by transfection with wild and mutant human SLC45A2 cDNA sequences. Over-expression of normal human SLC45A2 protein in uw cells restored melanin production, while the p.D157N-mutant, p.G188V-mutant protein failed.

研究分野：皮膚科学

キーワード：眼皮膚白皮症 遺伝子 機能解析

1. 研究開始当初の背景

OCA4 は SLC45A2 遺伝子の変異によりメラニン合成に障害を生じる眼皮膚白皮症の 1 病型である。SLC45A2 遺伝子のコードするタンパクは、メラニン合成を行っているメラノソームの膜タンパクで、530 個のアミノ酸より構成され、12 個の膜貫通ドメインを有している。OCA4 の症状はパラエティーに富んでおり、同じ OCA4 の患者でも白髪、白い皮膚といった、全くメラニン合成を認めない症例から、褐色の頭髮など、かなりの色素合成を認める例が見られる。日本人の OCA の患者の中では多い病型で、変異は D157N と G188V の頻度が高く、さらに、G188V 変異は比較的軽症の OCA4 と関連しており、変異によって重症度に違いが見られ、in vitro では変異型によってメラニン発現量に違いがあることも分かっている。しかし、そのタンパクの機能は、一部のアミノ酸配列が植物のショ糖トランスポーターと相同性があることから、メラニン合成に関わる何らかの物質輸送に関与していると考えられているが、詳細は不明である。そこで、このタンパクの機能解析を行う方法を考えた。

2. 研究の目的

まず、形態学的な観察として、OCA のモデルマウスである under white mouse (Slc45a2 のナンセンス変異が確認されている) からの培養メラノサイトと wild type のメラノサイトを電子顕微鏡で観察し、メラニン合成のどの段階で異常が生じ、OCA4 が発症しているのかを解明する。

さらに、このタンパクに対する抗体が未だ作られていないため、抗体を作成する。

そして、その抗体を用いて、タンパクの局在や、それぞれの変異型での発現の変化、他のタンパクとの相互作用などについても検討し、メラニン合成のどの部分に関わっているかを解明したい。また、遺伝子変異型による臨床的な重症度の違いの生じる機序を解明する。

3. 研究の方法

まず、形態学的な観察として、OCA のモデルマウスである under white mouse (Slc45a2 のナンセンス変異が確認されている) からの培養メラノサイトと wild type のメラノサイトを電子顕微鏡で観察し、それぞれの細胞のメラノサイトの量、メラノサイトの形態、

第 1 期メラノソーム～第 3 期メラノソームまでの割合やその形態、につき検討し、このタンパクの変異によりメラノソームのどのような変化が生じているかを検討する。さらに、これまでにわれわれは、SLC45A2 遺伝

子の in vitro での発現系を確立している。その方法を用いて D157N と G188V 変異によるメラニン合成能への影響の違いを検討する。まず、wild-type および D157N、G188V の両変異の SLC45A2cDNA の作成を作成する。ヒトメラノーマ細胞を用いて、RT-PCR 法にて wild-type の cDNA を作成し、site-directed mutagenesis 法にて両変異の cDNA を作成。それぞれを TOPO TA cloning kit を用いてクローニングし、塩基配列を確認する。次に、発現ベクターである pIRESHyg3 へ wild-type、両変異の cDNA を ligation する。そして、これらのベクターを under white cell (under White mouse の培養メラノサイト) へ transfection し、stable transformant を樹立する。これらの stable transformant の細胞の形態もそれぞれ電子顕微鏡で観察し、この両変異間でのメラノソームの形態の変化、メラニン合成量の違いを検討し、それぞれの変異間でのメラニン合成への影響の違いを検討する。

さらに、SLC45A2 タンパクに対する抗体を用いて、このタンパクの機能解析を行う。ウェスタンブロットにて、まず wild type のタンパクの局在を検出し、D157N と G188V の両変異 cDNA を導入した under white cell にて、このタンパクの発現がどのように変化するかを確認する。

4. 研究成果

(1) 形態学的観察

under white cell へ wild type、D157N、G188V それぞれの変異を導入したものと、コントロールとして遺伝子を導入していない細胞株で、培養した細胞を顕微鏡で観察した。その結果、wild type を導入したものではメラニンの合成が認められるのに対して、D157N、G188V 両変異を導入した細胞では、陰性コントロールのモック細胞と同様に、ほとんどメラニンが認めらなかつた (図 1)

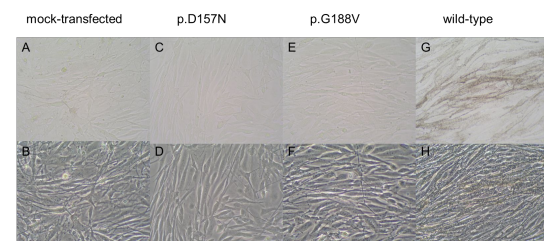


図 1 顕微鏡によるメラニンの観察

それぞれ培養細胞を電子顕微鏡的にも観察した。wild type を導入したものに比べて、両変異を導入した細胞株では、陰性コントロールのモック細胞と同様に明らかにメラノソームの減少を認めたが、培養期間や培養環

境によってデータにばらつきがあるため、今後のさらに検討していきたい。

(2) メラニンの定量

比色法によるメラニンの定量を行った。475nm の吸光度を測定し、メラニン量は、イカ墨由来のメラニン (SIGMA 製) を使って標準曲線を作成し定量した。その結果、Wild type を導入した細胞では、モック細胞に比べ有意に多くのメラニンを合成しており、両変異を導入した細胞では、モック細胞とほぼ同様のメラニン含有量であった (図 2)

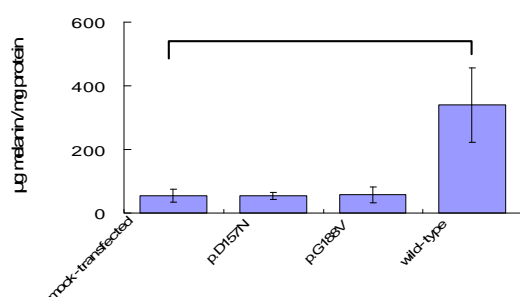


図 2 一番右が wild type を導入した細胞で、他のモック細胞、両変異を導入した細胞に比べて、明らかにメラニン合成量が多いことが分かる。

(3) mRNA 発現の確認

各々の樹立した細胞株から RNA を精製し、SLC45A2 遺伝子の発現を RT-PCR 法で調べた。何も導入していない陰性コントロールのモック細胞では発現が認められなかったが、モック以外では SLC45A2 の mRNA の発現が確認された (図 3)

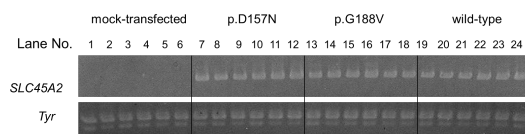


図 3 一番左のモック細胞では mRNA の発現が認められない。その他の両変異を導入した細胞、wild type を導入した細胞では、発現を認めた。

(4) タンパク発現の確認

各々の樹立した細胞株を培養し、その細胞からタンパクを抽出し、ウェスタンブロット法にて SLC45A2 タンパクの発現を確認した。wild type を導入した細胞に比べて、両変異

を導入した細胞では、SLC45A2 タンパクの発現は認めるものの、その発現量は少なかった。ただし、両変異間での発現量の差などは有意では無く、今後さらに検討していく必要がある。

(5) まとめ

眼皮膚白皮症 4 型の原因遺伝子である SLC45A2 の日本人患者に多い変異である D157N、G188V 変異は、wild type に比べて明らかにメラニン合成量の減少を示すことが分かった。

電子顕微鏡的な観察では、両変異を導入した細胞では、メラノソームの数が wild type に比べて少ないことが観察され、この遺伝子は、メラノソームの合成や成熟過程に何らかの影響を及ぼして、メラニン合成に関わっている可能性も考えられた。

今後はさらに形態学的な観察や、SLC45A2 の局在なども検討し、この原因遺伝子の機能解析を進めていきたい。

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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

紺野 隆之 (KONNO, Takayuki)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：00359564