

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870427

研究課題名(和文)メラノサイトの光受容機序を探る～光受容タンパク質の作用～

研究課題名(英文)Expression of photoreceptor protein on the melanocyte

研究代表者

藤井 美樹 (Fujii, Miki)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80444602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚組織ならびに培養細胞からOPN4 variant 1が確認できた。さらに既知のvariantではない、41bp挿入された塩基配列を認めた。挿入塩基配列はexon3とexon4の間に認められ、この塩基配列は選択的スプライシングにより生じた新規のvariantであると考えられた(variant 3)。培養されたメラノサイトにおけるOPN4とGnaqの共発現を検討したところ、組織学的にもウェスタンブロットティングでもOPN4ならびにGnaqの共発現を認めた。

研究成果の概要(英文)：Expression of OPN4 variant 1 from a skin tissue and a cultured cell was confirmed. Furthermore, we confirmed new variant (variant 3) with 41bp of insertion. The insertion was recognized between exon3 and exon4, and it was suspected that this was new variant which occurred during splicing. Coexpression of OPN4 and Gnaq was confirmed in cultured melanocyte with western blotting and histology.

研究分野：形成外科学

キーワード：メラノサイト 光受容

1. 研究開始当初の背景

地球上の多くの生物は光のエネルギーを活用しながら生存している。例えば、植物は光合成を介して光エネルギーを有機物質としてのエネルギーに変換することができるし、われわれ脊椎動物では網膜に飛び込んできた光を映像として捉え、情報伝達的手段として用いている。また、明暗は文明をもつヒトでは時間の概念を作り出し、また多くの生物では体内時計を調整するのに利用している。

多くの無脊椎動物や脊椎動物では光受容器官としての眼を持つ。眼は神経系の器官の一つであり、光情報を電気情報に変換し、情報として伝達する。網膜におけるロドプシンを始めとするオプシンの発現は光エネルギーの情報交換を理解する上で極めて重要な研究成果となった。以後、網膜は唯一の光受容器官としての位置づけを担い、視覚に関する様々な研究がなされてきた。当時は、サーカディアンリズムは網膜に入った光によってリセットされるとされていたが、その後、松果体にオプシンの発現が認められ、メラトニン分泌を介してリズムが刻まれることが明らかとなった。さらに膝窩に光を照射することでサーカディアンリズムが調整されるとの報告がなされたが(参考文献4)、後に他の研究チームにより否定された。

1998年になり、カエルの皮膚より無脊椎動物タイプのオプシンが発現していることが明らかとなった。カエルなど一部の両棲類や魚類では、周囲の環境に合わせて体色を変化させることができる。このとき、色素胞では光を受容し、細胞内でのメラニンの分布を変化させることにより細胞の色調の濃淡を調節する。色素胞における光受容タンパク質が同定され、メラノプシン(OPN4)と命名された。この光受容タンパク質は興味深いことに脊椎動物のオプシンファミリーではなく、無脊椎動物型のオプシンファミリーに属することが明らかとなった。(参考文献7)。その後、OPN4の発現は高等脊椎動物でも明らかとなり、その局在は網膜や脳といった中枢神経系に認められた。網膜においては網膜神経節細胞の一部に発現が認められた。さらにその作用について検討がなされた結果、網膜に入った光がOPN4を介して高次中枢へと伝えられ、これがサーカディアンリズムを形成することが示された。OPN4ノックアウトマウスではサーカディアンリズムが崩れていることが明らかとなり、この事象をサポートしている。ただし、ノックアウトマウスであるので、全身の全ての領域でOPN4が発現していないことに注意しなければならない。

さて、われわれ人類は常に光とともに生活している。体のもっとも大きな組織である皮膚は常に光に曝露されている一方で光受容器官は網膜と一部の中枢神経系(松果体)とされている。果たして皮膚は光を受容しないのだろうか。われわれは外で日光にあたる

メラノサイトが活性化し、melanogenesisの系が活性化され日焼け(tanning)を起こす。このmelanogenesisは、広域の波長の光を吸収することにより紫外線による癌化からわれわれの体を守っていると理解されている。メラニンの生合成の経路はL-tyrosineから始まりL-Dopaquinoneを経て合成される(Raper-Mason pathway)ことは古くから知られている。ではどのようにして光エネルギーをメラノサイトが受容し、これを細胞内シグナルへと変換するのであろうか。メラノサイトの研究者らは、UVBにより損傷を受けたDNAがcyclobutane pyrimidine dimers(CPD)(特にチミンダイマー)を形成し、これをT4 endonuclease V(T4N5)が認識することでmelanogenesisのトリガーを引くと考えている。実際にこの系は実験的にも証明されている。しかし、ステロイドの長期使用により皮膚が黒色化することも古くから知られており、コルチゾールとmelanogenesisとの関連も示唆されていた。実際にメラノサイトにはACTH(adrenocorticotrophic hormone)受容体が発現しており、この受容体を刺激することでmelanogenesisを活性化することが示されている。ACTH受容体は7回膜貫通型のGPCR(G protein-coupled receptor)ファミリーに属し、Gタンパク質系を介してシグナル伝達を行い、この系はメラニン合成ともリンクしている。

2. 研究の目的

私たちは生物進化の観点から、両棲類の色素胞が哺乳類のメラノサイトと相同であると仮定してみた。その上でこれらの事象を組み合わせると、一つの仮説が生まれた。つまり、色素胞と相同であるメラノサイトには、GPCRの一つであるOPN4が発現しており、OPN4が光受容を行うことでGPCRが活性化し、Gタンパク質の系を活性化する。このようにして光のエネルギーは細胞内シグナルとして伝達されmelanogenesisに繋がる、と考えた。また、日焼けは短波長側に感受性を持つ視物質としてOPN4の発現を考慮した。メラノサイトはその由来は神経堤細胞であり、これまで発現が認められてきた中枢神経系の細胞と発生学的な起源を同じくすることもこの仮説を下支えする事柄として考えた。

3. 研究の方法

melanocyteのCell culture: 初代培養、細胞培養(皮膚組織から分離)
皮膚組織採取後すぐに10mm大にカットし、4℃で、1晩、0.3%トリプシン/PBSに浸漬した。トリプシン処理した皮膚組織を、鑷子を用いて表皮と真皮の間で剥離し、アンピシリンを添加したDulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)(和光、大阪、日本)の入った培養皿内で真皮側剥離面をメスで

こすり、melanocyte を分離した。培養液ごとコニカルチューブに回収し、遠心分離を行った。ペレットを選択培地である MGM-4(Lonza) で懸濁後、培養皿に移し、37 °C、5%CO₂ 下で、1 晩インキュベートした。翌日、dish に細胞が接着していることを確認し、選択培地で培地交換を行い、その後、2,3 日ごとに培地交換を行った。

Total RNA 抽出 (皮膚組織、培養細胞)
皮膚検体は、ISOGEN II(NIPPON GENE ,Tokyo , Japan) を用いて total RNA をプロトコールに則り抽出した。簡単に、ISOGEN II (NIPPON GENE) を加えホモジネートした後、distilled water をアプライし、強く shake した。室温で 15 分放置後、遠心分離し、上清を回収した。75%エタノールをアプライし、転倒混和した後、10 分間放置した。遠心分離した後、上清を廃棄した。75%エタノールをアプライし、遠心分離した。これをもう一度繰り返した後、上清を廃棄し、RNase free 水 をアプライし、total RNA を回収した。また、培養細胞は、サブコンフルエンスの状態 で ISOGEN II (NIPPON GENE) で total RNA をプロトコールに則り抽出した。簡単に、培養液をアスピレート後、ISOGEN II (NIPPON GENE) をアプライし、ホモジネートした。これ以降の操作は皮膚組織の場合と同様に行った。

Reverse Transcription PCR 法 (RT-PCR)
皮膚組織、ならびに単離培養細胞から得られた total RNA をサンプルとして使用し、OPN4 に対する RT-PCR を行った。PrimeScript™ One Step RT- PCR Kit Ver. 2.0 (Takara Bio) を用いて、RT- PCR をプロトコールに則って行った。簡単に、酵素 (逆転写酵素、DNA ポリメラーゼ、RNase inhibitor)、buffer (反応バッファー、dNTP Mix、1 step Enhancer Solution)、forward primer (20 μ M)、reverse primer (20 μ M)、total RNA、RNase free water を混合して PCR を行った。PCR は、逆転写反応 50 30 分、熱変性 94 2 分、熱変性 denaturation 94 30 秒、アニーリング annealing 59.9 20 秒、伸長反応 extention 72 30 秒 (以上を 35 サイクル)、伸長反応 72 7 分 (TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Version TP600/ Tp650、Takara Bio) の条件で行った。得られた PCR 産物は、T-vector pMD20(Takara Bio) に挿入し、シーケンス解析を行った。

タンパク質抽出

(1) 皮膚組織

タンパク質溶解バッファー (20mM HEPES、0.5%CHAPS、2% SDS、1% PIC、10mM DTT) を用いて皮膚組織をホモジネートし、タンパク質を抽出した。

(2) 培養細胞

サブコンフルエンスの状態 で、タンパク質溶解バッファーをアプライし、タンパク質を抽

出した。回収したタンパク質抽出液は Quick Start™ Bradford protein assay (Bio-Rad、Hercules、USA) を用いてタンパク質の定量を行った。実験に使用するタンパク質濃度は、組織で 10 μ g/20 μ l、培養細胞で 20 μ g/20 μ l とした。

Western blotting 法

SDS PAGE を行った後、Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad) でメンブレントランスファーを行った。1% Tween 20/ TBS (1 \times TBST) で洗浄後、5%ブロッキングワンプ (ナカライテスク、京都、日本) を使用し、ブロッキングを 30 分間行った。OPN4 に対する一次抗体として抗 Melanopsin 抗体 (ab19383、Abcam、Cambridge、USA) (1:500) を使用し、Gnaq に対する一次抗体として抗 Gnaq 抗体 (ab128060、Abcam) (1:2000) を使用し、室温で 1 時間インキュベートした。1 \times TBST で十分洗浄後、抗 Melanopsin 抗体に対する二次抗体として、anti-rabbit IgG (HRP) (Bio-Rad) (1:20000)、抗 Gnaq 抗体に対する二次抗体として、anti-goat IgG (HRP) (Abcam) (1:5000) を使用し、室温で 1 時間インキュベートした。1 \times TBST で十分に洗浄後、ECL™ prime (GE Healthcare、東京、日本) を用いて、Molecular imager® (Bio-Rad) 検出・解析を行った。

免疫組織学的検討 (蛍光抗体法) (皮膚組織ならびに培養細胞)

《皮膚組織 (頭部、前腕部)》

採取した皮膚組織を 10%中性緩衝ホルマリン液に 4 日で 1 晩浸漬し、1 \times PBS で脱ホルマリンした後、パラフィン包埋した。切片は 3 μ m 厚とした (ミクロトーム、Leica、Wetzlar、ドイツ)。1 \times PBS で洗浄後、ブロッキングワンプ histo (ナカライ) を使用し、ブロッキングを 10 分間行った。また、Histo VT one (ナカライ) を用いて、90 °C で、30 分間抗原賦活化処理を行った。OPN4 に対する一次抗体として抗 Melanopsin 抗体 (ab65641、Abcam) (1:1000) を使用し、Gnaq に対する一次抗体には、抗 Gnaq 抗体 (ab128060、Abcam) (1:200) を使用した。一次抗体の希釈には 3%BSA-0.1%Triton- X 100/ PBS を使用した。室温で 2 時間、その後、4 日で 48 時間 1 次抗体を反応させた。抗 Melanopsin 抗体に対する二次抗体として、Alexa Fluor® 488 (anti-rabbit) (life technology、Carlsbad、USA) (1:500)、抗 Gnaq 抗体に対する二次抗体として、Alexa Fluor® 594 (anti-goat) (life technology) (1:500) を使用した。二次抗体の希釈には 1 \times PBS を使用した。一次抗体を反応させた後、1 \times PBS で洗浄し、二次抗体を室温で 2 時間反応させた。また、4' 6- Diamidino- 2- phenylindole dihydrochloride (DAPI) (同仁化学研究所、熊本、日本) (2 μ g/ml) を使用して核の染色を行った。1 \times PBS で洗浄後、Fluoromount™

(K024, Diagnostic BioSystems, USA) を用いて封入した。蛍光顕微鏡(Biozero BZ- 8100, KEYENCE、大阪、日本)を用いて観察を行った。

《培養細胞》

培養皿で、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で30分間固定した。1×PBSで洗浄後、ブロッキングワン histo(ナカライ)で10分間ブロッキングを行い、OPN4 ならびに Gnaq に対する一次抗体として抗 Melanopsin 抗体(ab19383, Abcam)(1:500)、抗 Gnaq 抗体(ab128060, Abcam)(1:200)を用い、室温で2時間、その後、4 で48時間、1次抗体を反応させた。1×PBSで洗浄後、抗 Melanopsin 抗体に対する二次抗体として Alexa Fluor® 488 (anti-rabbit)(life technology)(1:500)、抗 Gnaq に対する二次抗体として Alexa Fluor® 594 (anti-goat)(life technology)(1:500)を室温で2時間反応させた。また DAPI(同仁化学研究所)(2µg/ml)で核の染色を行った。蛍光顕微鏡(Biozero BZ- 8100, KEYENCE)を用いて観察を行った。

4. 研究成果

皮膚組織ならびに培養細胞におけるメラノプシン(OPN4) Gnaq の発現

皮膚組織ならびに培養細胞から OPN4 variant 1 が確認できた。さらに既知の variant ではない、41bp 挿入された塩基配列を認めた。挿入塩基配列は exon3 と exon4 の間に認められ、この塩基配列は選択的スプライシングにより生じた新規の variant であると考えられた(variant 3)。

OPN4/Gnaq の Western blotting

皮膚組織、培養細胞いずれも OPN4 と考えられる 53kDa 付近にバンドを認め、また翻訳後修飾によると思われる 60kDa 付近にもバンドを認めた。

皮膚組織では 42kDa にバンドを認めた。また、53kDa のバンドは、サブユニットは約 35kDa、サブユニットは約 10kDa であることから、サブユニットの抗体結合部位と / サブユニットが 3 量体を形成したものと考えられた。培養細胞では 42kDa にバンドを認めた。

皮膚組織における免疫組織学的検討

(A) 皮膚組織全体における免疫組織学的検討による OPN4 と Gnaq の共発現

OPN4 および Gnaq の共発現は、皮膚組織を構成する表皮、毛包、汗腺に認められた。

(B) 表皮における免疫組織学的検討による OPN4 と Gnaq の共発現

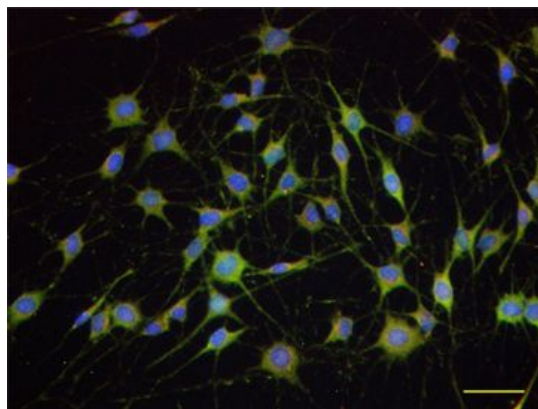
OPN4 ならびに Gnaq はケラチノサイトに、基底層の細胞から分化度の違いに関わらず発現していた。基底層のメラノサイトも同様に発現が認められた。

(C) 毛包、脂腺における免疫組織学的検討による OPN4 と Gnaq の共発現

毛包、立毛筋、毛包バルジ領域(矢頭)、脂腺を示す。毛包において、外側の外毛根鞘では OPN4 ならびに Gnaq は発現を認め、両者の共発現を認めた。一方、内側の内毛根鞘では、OPN4 の発現を認めず、明らかな共発現は認めなかった。立毛筋が付着するバルジ領域は、OPN4 と Gnaq の共発現を認めた。脂腺の腺内において、Gnaq は発現しているが、OPN4 の発現は認めず、明らかな共発現は認めなかった。

(D) メラノサイトにおける免疫組織学的検討による OPN4 と Gnaq の共発現

OPN4 ならびに Gnaq は細胞全体に樹状突起に及び均一に発現し、共発現を認めた。



《図：メラノサイトにおけるメラノプシンおよび Gnaq の共発現》

培養メラノサイトにおいて、メラノプシン(緑)および Gnaq(赤)の蛍光免疫染色を行った。核は DAPI により青く染色されている。Gnaq は比較的細胞質内の核周囲に局限されているのに比して、メラノプシンは比較的細胞膜側に局在している様子が観察された。ただし、本検討は共焦点レーザー顕微鏡ではなく、蛍光顕微鏡を用いている為、局在の詳細については述べる事が出来ない。

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)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 美樹 (FUJII MIKI)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：80444602