

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460086

研究課題名(和文) 銅輸送体細胞内発現・局在制御によるメラニン合成調節機構の解明

研究課題名(英文) Melanogenesis regulation by expression and localization of copper-transporters.

## 研究代表者

藤田 英明 (Fujita, Hideaki)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：80291524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：銅結合タンパク質であり、メラニン合成の主要酵素であるチロシナーゼの銅濃度依存的な活性発現制御および発現量調節の分子機構を明らかにする目的で研究を行った。その結果、チロシナーゼを特異的にユビキチン化するユビキチンリガーゼRNF152を同定した。RNF152は別のメラニン合成酵素であるTyrp-1には相互作用・ユビキチン化を示さないことから、チロシナーゼの発現量・細胞内局在制御によるメラニン合成調節に関与することが示唆された。チロシナーゼの活性発現・発現量調節が銅輸送体であるCRT1・ATP7Bにより制御されている可能性について検討を行ったが解明には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：We have examined a possibility that an activity and expression of tyrosinase, a copper binding protein and key enzyme of melanin synthesis, is regulated by an intracellular level of copper ion. We found that RNF152, an ubiquitin ligase, specifically interacts with and ubiquitinates tyrosinase. Since RNF152 does not interact with and ubiquitinates other melanin synthesis enzyme, Tyrp-1, we concluded that RNF152 may be involved in the regulation of melanin synthesis by controlling an expression level and intracellular localization of tyrosinase in melanocytes. We are unable to show the data that copper-transporters regulate an expression level and intracellular localization of tyrosinase in melanocytes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：チロシナーゼ、銅輸送体、銅シャペロン、メラノソーム、リソソーム、ユビキチン、ユビキチンリガーゼ、タンパク質分解

## 1. 研究開始当初の背景

メラノサイトにおける主要なメラニン合成酵素であるチロシナーゼは、膜タンパク質として細胞内の小胞体で合成された後、トランスゴルジ領域 (TGN) においてその活性中心に銅を配位することで活性型酵素となる。その後チロシナーゼはメラノソームへと輸送され、メラノソーム内においてメラニンの合成・蓄積を制御している。チロシナーゼの酵素活性発現には細胞内の銅輸送体 (ATP7A) が関与することも知られている。申請者はこれまで美白効果を示す天然物化合物イヌラボシンの作用機序について検討を行ってきた。イヌラボシンはチロシナーゼ遺伝子の発現 (mRNA 転写) や *in vitro* でのチロシナーゼ酵素活性には影響を及ぼさず、細胞内で新規合成されたチロシナーゼタンパク質を選択的にリソソームへと誤輸送させて分解へと導くことで美白効果を示すことが明らかとなった (*J. Investig. Dermatol.* (2009) **129**, 1489-99)。しかしながら、イヌラボシンの分子作用機構については未解明であった。

## 2. 研究の目的

マウスメラノサイトを用いて銅輸送体 (CTR1, CTR2 および ATP7A, ATP7B) により制御される TGN 内腔の銅濃度がメラニン合成量・チロシナーゼの安定性に及ぼす影響について明らかにする。

銅濃度に依存したチロシナーゼ分解を制御する特異的ユビキチンリガーゼの同定を試みる。

チロシナーゼへの銅配位を制御する銅シャペロンの同定をチロシナーゼ結合タンパク質の中から試みる。

## 3. 研究の方法

**マウスメラノサイトにおける細胞内銅輸送体 (CTR1, CTR2, ATP7A, ATP7B) の**

## **発現量とメラニン合成量・チロシナーゼの安定性の相関解析**

マウスメラノサイトにおいて、shRNA/siRNA を用いた細胞内銅輸送体 (CTR1, CTR2, ATP7A, ATP7B) のノックダウンを行い、メラニン合成・チロシナーゼの安定性について解析を行う。

## **チロシナーゼ特異的ユビキチンリガーゼの同定およびその機能解析**

銅輸送体の細胞内発現量・細胞内局在の変化が引き起こす TGN 内腔の銅濃度低下により、銅を含まないチロシナーゼが合成され、不良タンパク質としてリソソームで分解を受けているという作業仮説を提唱しているが、細胞がどのようにして銅を含まないチロシナーゼを認識しているのかは明らかでない。小胞体では不良膜タンパク質をユビキチン化して、細胞質に輸送してプロテアソームで分解する小胞体関連タンパク質分解経路 (ER-associated degradation: ERAD) が知られている。一方、TGN・エンドソームにおいては、膜タンパク質をユビキチン化してリソソームへと輸送して分解する経路が存在する。イヌラボシンの作用点が TGN 以降であることから、後者の可能性が考えられる。銅を配位していないチロシナーゼを特異的に認識するユビキチンリガーゼがチロシナーゼのリソソームへの誤輸送に関与するという作業仮説を立て、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いたユビキチンリガーゼタンパク質アレイを用いてチロシナーゼ特異的ユビキチンリガーゼの同定を試みる (愛媛大学プロテオサイエンスセンターとの共同研究)。

## **チロシナーゼ銅シャペロンタンパク質の同定およびその機能解析**

イヌラボシンが直接結合を阻害している動物細胞由来銅シャペロンホモログ (mCaddie) の同定とその機能について明らかにすることで、チロシナーゼの酵素活

性発現の新たな分子機構の解明とより効果的な美白剤の開発のための基礎的な知見を得ることを目的とする。マウスメラノサイト抽出液よりチロシナーゼ抗体を用いた免疫沈降（もしくはアフィニティ精製）により、チロシナーゼ結合タンパク質を同定する。また、チロシナーゼと Halotag 融合タンパク質を発現するメラノサイト細胞株を作成し、チロシナーゼ結合タンパク質を同定する。イヌラボシンの有無で結合に有為差があるタンパク質が目的の銅シャペロンである可能性が高い。

#### 4. 研究成果

イヌラボシンおよびそのベンゾ誘導体化合物と放線菌由来チロシナーゼタンパク質とのドッキングシミュレーションの結果、これらの化合物はチロシナーゼの活性中心付近に位置する窪みに結合することが予測された。この窪みは、放線菌チロシナーゼにおいて Caddie タンパク質とよばれる銅シャペロンの結合部位に相当する。従って、イヌラボシンおよびそのベンゾ誘導体化合物はマウスメラノサイトにおいて、チロシナーゼへの銅シャペロンの結合を競合的に阻害することでチロシナーゼへの銅配位を阻害していることが示唆された。これらの結果から申請者らは現在、イヌラボシンおよびそのベンゾ誘導体化合物が細胞内で新規合成されたチロシナーゼタンパク質への銅シャペロンの結合を阻害するため、合成された銅を含まないチロシナーゼが不良タンパク質としてリソソームでの分解を受けているという作業仮説を提唱している (*Pigment Cell & Melanoma Research*, 2014)。

マウスチロシナーゼ結合タンパク質の中で、イヌラボシン存在下で特異的に結合が阻害されるタンパク質の同定を試みたところ、小胞体に局在する PDI (Protein Disulfide Isomerase) ファミリーに属するシャペロン

分子を同定することができた。放線菌において Caddie タンパク質とよばれる銅シャペロンがチロシナーゼへの銅結合に参与していることから、我々は同定した PDI ファミリータンパク質を「mCaddie」と名付けた。mCaddie はその C 末端に小胞体残留シグナル (KDEL) 配列を有しており、細胞内に発現させた mCaddie-myc は小胞体に局在する。現在 mCaddie のメラニン合成への関与について解析を行っている (2015 日本色素細胞学会)。無細胞タンパク質合成系を用い、チロシナーゼに結合するユビキチンリガーゼの網羅的スクリーニングを行った。その結果、膜結合型ユビキチンリガーゼである RNF152 がチロシナーゼと相互作用することが示唆された。さらに HEK293T 細胞を用い、チロシナーゼ-HA と RNF152-myc の発現プラスミドをトランスフェクション後、免疫沈降を行うと両者が共免沈されてくることが明らかとなった。また COS 細胞において発現させた両タンパク質は、細胞内の後期エンドソームとみられる顆粒状のコンパートメントで共局在を示した。これらの結果から、RNF152 がチロシナーゼをユビキチン化し、チロシナーゼのリソソームへの選別輸送に参与している可能性が示唆された (2016 日本色素細胞学会)。

膜結合型ユビキチンリガーゼの機能解析の共同研究過程で、MARCH8 が抗ウイルス宿主タンパク質であることを見出し、*Nature Medicine* (2015) に報告することができた。

#### 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 6 件)

- (1) Y. Fujii, H. Fujita, S. Yokota, Synthesis of  $\alpha$ -tubulin occurs within chromatoid body of round spermatids. "Cytoskeleton 74, 197-204 2017
- (2) Y. Fujii, T. Fujiwara, Y. Koide, I. Hasan, S. Sugawara, S. Rajia, S.M. Kawsar, D. Yamamoto, D. Araki, R.A. Kanaly, Y. Ogawa, H. Fujita, Y. Ozeki,

Internalization of a novel, huge lectin from *Ibacus novemdentatus* (slipper lobster) induces apoptosis of mammalian cancer cells. *Glycoconj. J.* 34, 85-94, 2017

- (3) Y. Fujii, Y. Onohara, H. Fujita, S. Yokota, Argonaute2 protein in rat spermatogenic cells is localized to nuage structures and LAMP2-positive vesicles surrounding chromatoid bodies. *J. Histochem. Cytochem.* 64, 268-279, 2016
- (4) T. Tada, Y. Zhang, T. Koyama, M. Tobiume, Y. Tsunetsugu-Yokota, S. Yamaoka, H. Fujita, K. Tokunaga, MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Nat. Med.* 21, 1502-1507, 2015
- (5) Hasan, S. Sugawara, Y. Fujii, Y. Koide, D. Terada, N. Imura, T. Fujiwara, K.G. Takahashi, N. Kojima, S. Rajia, S.M. Kawsar, R.A. Kanaly, H. Uchiyama, M. Hosono, Y. Ogawa, H. Fujita, J. Hamako, T. Matsui, Y. Ozeki, MytiLec, a Mussel R-Type Lectin, Interacts with Surface Glycan Gb3 on Burkitt's Lymphoma Cells to Trigger Apoptosis through Multiple Pathways. *Mar. Drugs.* 13, 7377-89, 2015
- (6) H. Fujita, J.C. Menezes, S.M. Santos, S. Yokota, S.P. Kamat, J.A. Cavaleiro, T. Motokawa, T. Kato, M. Mochizuki, T. Fujiwara, Y. Fujii, Y. Tanaka, Inulavosin and its benzo-derivatives, melanogenesis inhibitors, target the copper loading mechanism to the active site of tyrosinase. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, 376-386, 2014

[学会発表](計13件)

- (1) 高橋紫蓉、濱美月、藤井佑樹、José C.J.M.D.S. Menezes、高橋宏隆、竹田浩之、澤崎達也、本川智紀、徳永研三、藤田英明「膜結合型ユビキチンリガーゼ RNF152 は後期エンドソームにおいてチロシナーゼと相互作用・共局在する」/2016年11月12日/第26回日本色素細胞学会
- (2) T. Tada, W. Yao, Y. Zhang, H. Fujita, S. Yamaoka, and K. Tokunaga “MARCH2

is another antiviral MARCH family member that inhibits HIV-1 infection” /2016年10月23日/第64回日本ウイルス学会年会

- (3) ムラサキインコガイ(二枚貝)由来の新規アジアロ GM1 糖鎖結合性レクチンを介した細胞死シグナルに関する研究 /2016年12月3日/日本薬学会九州支部会 第136年会(鹿児島)
- (4) 藤田英明、José C. J. M. D. S. Menezes、横田貞記、本川智紀、藤井佑樹、藤原俊幸「美白剤イヌラボシンが標的とするチロシナーゼ特異的銅シャペロンの同定」/2015年11月14日/第26回日本色素細胞学会
- (5) 張延昭、多田卓哉、山岡昇司、藤田英明、徳永研三「MARCH8の細胞質領域のYxxモチーフはHIV-1エンベロープのダウンレギュレーションに重要である」/2015年11月23日/第63回日本ウイルス学会
- (6) T. Tada, Y. Zhang, T. Koyama, M. Tobiume, Y. Tsunetsugu-Yokota, S. Yamaoka, H. Fujita, K. Tokunaga “Novel antiviral factor MARCH8 restricts HIV-1 infectivity by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins” /2015年12月2日/第38回日本分子生物学会年会(BMB2015)
- (7) T. Tada, Y. Zhang, T. Koyama, M. Tobiume, Y. Tsunetsugu-Yokota, S. Yamaoka, H. Fujita, K. Tokunaga “MARCH8 Restricts HIV-1 Infection by Reducing Envelope Incorporation Into Virions” /2016年2月23日/Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI)2016
- (8) 下條俊介、山本要、小池徹、藤原俊幸、小川由起子、Sarkar M.A. Kawsar、Imtiaj

- Hasan、小出康裕、大関泰裕、藤井佑樹、藤田英明「新規海洋生物レクチンの生化学的分子特性と糖鎖依存的細胞死誘導の分子機構に関する研究」/2016年3月29日/日本薬学会 第136年会(横浜)
- (9) H. Fujita, J.C. Menezes, S.M. Santos, S. Yokota, S.P. Kamat, J.A. Cavaleiro, T. Motokawa, T. Kato, M. Mochizuki, T. Fujiwara, Y. Fujii, Y. Tanaka, Inulavosin and its benzo-derivatives affect on copper-loading mechanism to tyrosinase, a key enzyme of melanin synthesis in melanocytes / 2014年9月5日 / 第22回国際色素細胞学会
- (10) 藤井佑樹、藤原俊幸、小川由起子、Imtiaj Hasan、小出康裕、大関泰裕、藤田英明 抗腫瘍効果を有する新規甲殻動物レクチンを用いたヒトがん細胞におけるグライコシグナルの解明 / 2014年12月7日 / 第31回日本薬学会九州支部会
- (11) T. Tada, Y. Zhang, T. Koyama, S. Yamaoka, H. Fujita, and K. Tokunaga “Novel restriction factor MARCH8 blocks HIV-1 replication” / 2014年7月21日 / 第20回日本ウイルス学会
- (12) 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三「新規抗ウイルス宿主因子 MARCH8 による HIV-1 感染抑制機構の解明」/ 2014年12月11日 / 第62回国際エイズ学会
- (13) 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三「新規宿主因子 MARCH8 による HIV-1 エンベロープ蛋白のダウンレギュレーション」/ 2014年12月4日 / 第28回日本エイズ学会(ワークショップ)

〔図書〕(計 3件)

- (1) 新しい機能形態学-ヒトの成り立ちとその働き 第3版 / 共著 / 2015年8月 / 廣

川書店 / p89-99 伊藤萌子、稲葉二郎、江川祥子、岡美佳子、籠田智美、川井範夫、木澤靖夫、黒岩美枝、小崎康子、佐々木啓子、篠塚和正、清水典史、高橋知子、竹鼻眞、馬場広子、藤田英明、益子崇、松岡耕二、森山賢治、山口宣秀

- (2) プロGRESSIVE 生命科学, 南山堂, オルガネラと疾患 「エンドソーム」共著者: 藤田英明, 藤本景子, 田中嘉孝 p66-69, 2014.09.
- (3) プロGRESSIVE 生命科学, 南山堂, オルガネラと疾患 「リソソーム」共著者: 藤本景子, 藤田英明, 田中嘉孝 p63-66, 2014.09.

〔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:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
藤田 英明 (FUJITA, Hideaki)  
長崎国際大学・薬学部・教授  
研究者番号: 80291524

(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 ( )