

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11501  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2015～2017  
課題番号：15K09756  
研究課題名(和文)メラニン合成機構に関わる新規分子の解明

研究課題名(英文)New targets for melanogenesis

## 研究代表者

川口 雅一 (Kawaguchi, Masakazu)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：10302291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Diacylglycerol kinase (DGK)は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。今回DGK阻害剤が、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に変化をきたすことを明らかにした。またPMEL17の切断に関わるプロテアーゼとして報告されているBACE2の発現が低下することを明らかにした。さらにDGKの下流のシグナルを解析しメラノジェネシスに関わるシグナル伝達分子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Diacylglycerol increases the melanin content of human melanocytes in vitro and increases the pigmentation of skin in vivo, but the mechanisms underlying those effects remain unknown. We characterized the role of diacylglycerol kinase (DGK) in the regulation of pigmentation. We examined the effect of DGK inhibitors on the modulation of melanogenesis in normal human epidermal melanocytes. Electron microscopy showed that the number of fibrillar and mature melanosomes was significantly reduced after treatment with DGK inhibitors. We therefore focused on the processing of PMEL17, a melanosomal glycoprotein that forms a fibrillar matrix on which melanin gets deposited. Recently, BACE2 was found to cleave PMEL17. We found that DGK inhibitors exerted effects on the processing of C-terminal and N-terminal fragments of PMEL17, and DGK affected PMEL17 processing in a BACE2-dependent mechanism. Furthermore, we identified downstream target of DGK signaling for melanogenesis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：メラニン メラノソーム メラノサイト BACE2 DGK PMEL17

## 1. 研究開始当初の背景

メラニン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。

これまで、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。ADAM 阻害剤はメラノソームを構成する蛋白質の一つである PMEL17 のプロセッシングに関与していた。

また、脂質性 2 次メッセンジャーの一つである 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

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 DGK の下流のシグナル伝達系を解析し target となる新たなシグナル伝達経路を明らかにする。また、UVB で発現が亢進する DGK isoform の機能解析を進める

## 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、細胞死はアラマブ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) メラノサイトにおける DGK の機能解析  
DGK 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メラノソーム数が減少し、メラノソームの構造も変化していた。ウエスタンブロットでは、阻害剤を添加した細胞では 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一つである 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、DGK 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 DGK 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 (BACE) などがある。そこで BACE1 と BACE2 の発現を調べたところ DGK 阻害剤は BACE2 の発現を低下させることを明らかにした。PMEL17 の C 末のプロセッシングに関する分子は BACE2 が知られているが、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、DGK の target を解析することで PMEL17 のプロセッシングに関わる分子を見つけることができる可能性がある。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、DGK やその下流シグナルの中

心に PMEL17 の切断に關与する新規分子の  
解明を進める予定である。

## (2) メラニン合成に關与する新しいシグナル 分子の同定

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關与するか、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。そのなかで time course で発現を調べたところ MITF の発現低下にともないある分子のリン酸化が低下することに着目し、その分子の阻害剤を用いて検討したところ、その分子を阻害すると MITF の mRNA や蛋白質の発現が低下することが分かった。この分子はこれまでメラニン合成や MITF の発現では注目されていなかった分子であり、今後はその分子の周辺を詳細に検討するために siRNA で knockdown しさらに解析を進める予定である。

## (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關与する。DGK が UVB 照射によるシグナル伝達系に關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。またこの DGK isoform は p53 を活性化させる薬剤で発現が増加した。RNA 干渉を用いて DGK isoform の発現を knockdown し、p53 関連遺伝子や細胞死に關わる遺伝子の発現を real time PCR やウエスタンブロットで調べたが、影響がみられなかった。解析をつづけたところ、この DGK isoform は細胞遊走に關わる遺伝子の発現に影響を与えることを明らかにした。さらに knockdown によりメラノサイトの細胞遊走能が低下することを明らかにした。詳細な機能解析を行うために、今後はウイルスベクター発現系で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 5 件)

Okamura K, Abe Y, Araki Y, Wakamatsu K, Seishima M, Umetsu T, Kato A, Kawaguchi M, Hayashi M, Hozumi Y, Suzuki T. Characterization of melanosomes and melanin in Japanese patients with Hermansky-Pudlak syndrome types 1, 4, 6, and 9. *Pigment Cell Melanoma Res* 31: 267-276, 2018 査読あり

Okamura K, Abe Y, Araki Y, Hozumi Y, Kawaguchi M, Suzuki T. Behavior of melanocytes and keratinocytes in reticulate acropigmentation of Kitamura. *Pigment Cell Melanoma Res* 29: 243-246, 2016 査読あり

Abe Y, Okamura K, Kawaguchi M, Hozumi Y, Aoki H, Kunisada T, Ito S, Wakamatsu K, Matsunaga K, Suzuki T. Rhododenol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin. *J Dermatol Sci* 81: 35-43, 2016 査読あり

Okamura K, Oiso N, Tamiya G, Makino S, Tsuchioka D, Abe Y, Kawaguchi M, Hozumi Y, Shimomura Y, Suzuki T. Waardenburg syndrome type IIE in a Japanese patient caused by a novel missense mutation in the SOX10 gene. *J Dermatol* 42: 1211-1212, 2015, 査読あり

Okamura K, Abe Y, Fukai K, Tsuruta D, Suga Y, Nakamura M, Funasaka Y, Oka M, Suzuki N, Wataya-Kaneda M, Seishima M, Hozumi Y, Kawaguchi M, Suzuki T. Mutation analyses of patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria: Ten novel mutations of the ADAR1 gene. *J Dermatol Sci* 79: 88-90, 2015 査読あり

(学会発表)(計 4 件)

川口雅一、色素増加症の鑑別診断、第 116 回日本皮膚科学会総会、2017 年 6 月 2 日、仙台国際センター(仙台市)

川口雅一、色素増加症に関する最近の知見、第 374 回日本皮膚科学会 東北 6 県

合同地方会、2016年7月9日、仙台ブラザホテル（仙台市）

川口雅一、色素増加症 最近の知見、第79回日本皮膚科学会 東京・東部支部合同学術大会、2016年2月21日、京王ブラザホテル（東京）

川口雅一、メラニン生合成総論、第114回日本皮膚科学会総会、2015年5月30日、パシフィコ横浜（横浜市）

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

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