

平成 30 年 9 月 27 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18755

研究課題名(和文) エイコサペンタエン酸・ドコサヘキサエン酸による蛋白質局在の調節機構解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism to regulate protein localization by EPA and DHA

研究代表者

山田 秀俊 (Yamada, Hidetoshi)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主任研究員

研究者番号：70511955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：EPA・DHAによるメラニンおよびメラノーマ増殖の抑制メカニズムを明らかにする目的で、蛋白質局在に着目し研究を行った。

EPAによるメラニン抑制は、メラニン合成酵素であるチロシナーゼ(Tyr)およびチロシナーゼ関連蛋白質(Tyrp1)の細胞膜局在が抑制されることで発揮されていること、DHAによる腫瘍細胞増殖抑制は、G2/M細胞の増加を伴う細胞周期の遅延によって引き起こされていることを明らかにした。

メカニズム解明のために低分子GDP結合蛋白質の発現および局在を解析したが、変化が観察されなかった。そこで、細胞骨格に着目し解析を行ったところ、EPAがF-actinを抑制することを見出した

研究成果の概要(英文)：In this study, we studied the mechanism of anti-melanogenic and anti-tumorgrowth effects of EPA and DHA. We revealed that 1) EPA decreased Tyrosinase and Tyrosinase related protein 1 that located on membrane, 2) DHA delayed the cell cycle of melanoma that involved G2/M phase cell increase. To reveal these mechanism, we examined the protein expression and localization of small GDP-binding proteins. However, we could not observe any difference whether EPA or DHA treated. Therefore, we analyzed cytoskeleton protein, and observed fiber actin was decreased by EPA treated. Our results suggested that a new mechanism of anti-melanogenic and anti-tumorgrowth effects of EPA and DHA via decreasing of F-actin was exist.

研究分野：脂質生化学

キーワード：EPA DHA メラノーマ細胞 メラニン 腫瘍増殖 チロシナーゼ F-Actin

### 1. 研究開始当初の背景

EPA・DHAには広範な生理活性があり、メラニン抑制作用および抗腫瘍増殖作用もEPA・DHAの生理作用の一つであるが、作用メカニズムは明らかにされていない。我々は、EPA・DHAによるメラニンおよびメラノーマ増殖の抑制メカニズムを明らかにする目的で、マウスメラノーマ細胞株 (B16F10) を用いて研究を行った。

メラニンはチロシン代謝物が重合することで形成される色素であり、紫外線によるDNA損傷を防ぐ働きがある。脊椎動物におけるメラニンは皮膚の基底層や毛髪の毛母などに存在するメラノサイトで合成される。メラノサイトにはメラノソームというライソゾーム様の細胞内小器官が存在し、メラノソーム内でチロシンが tyrosinase (Tyr)、tyrosinase-related protein 1 (Typr1)、3,4-dihydroxyphenylalanine chrome tautomerase (DCT)によって代謝され、メラニンが形成される。メラノソームにはIからIVのステージがあり、ステージIからIIにかけてメラノソーム内の構造が形成され、ステージIIIのメラノソームにおいてメラニン合成が開始される。メラニンを蓄積し黒くなったステージIVのメラノソームは細胞膜から放出され、ケラチノサイトなどの細胞にメラニンが供給される。これまでに、リシノール酸やDHAによるメラニン抑制作用が報告されており、メラニン合成の律速酵素である Tyr のユビキチン-プロテアソームによる蛋白質分解の亢進が、リシノール酸によるメラニン抑制のメカニズムとして報告されている。一方で、ユビキチン-プロテアソーム阻害剤 (MG132) 添加によっても、リシノール酸によるメラニン抑制が解除されないなど、Tyr 蛋白質分解だけでは説明がつかない結果も報告されており、分子メカニズムには未解明の部分が残されている。

メラノサイトの癌化細胞がメラノーマであり、転移能の高い悪性腫瘍である。DHAにはメラノーマ細胞に対する抗腫瘍効果が報告されており、EPA・DHA摂取によるメラノーマリスクの低減効果がヒトでも報告されている。DHAによる抗腫瘍効果のメカニズムとしては、核内βカテニン増加やCox2遺伝子発現抑制が報告されているが、抗腫瘍効果のメカニズムについても議論の余地が残されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、EPA・DHAによる蛋白質の細胞内局在調節に着目し、メラニン抑制および腫瘍増殖抑制の作用メカニズム解明を目指して研究を行った。

### 3. 研究の方法

メラニン抑制メカニズム解析は、マウスメラノーマ細胞株 (B16F10) に 50μM の脂肪酸を添加・培養後に解析した。細胞内メラニン

量は吸光プレートリーダーで定量し、細胞内DopaはLC/QTOFMSで定量した。Tyr取り込みおよび代謝解析は<sup>13</sup>C標識チロシンを培地に添加し、3時間後の細胞中の<sup>13</sup>Cチロシンおよび<sup>13</sup>C-DopaをLC/QTOFMSで定量した。細胞内Tyr蛋白質はウェスタンブロットにて、Typr1蛋白質は蛍光免疫染色によって解析した。

抗腫瘍メカニズム解析には、B16F10の他に、ヒトメラノーマ細胞株 (Colo679, G361, HOMM, HTMM) を用い、25μMのDHAを添加して解析した。細胞増殖は6cm dishに1x10<sup>5</sup>細胞を播種し、48時間後の細胞数を計測した。細胞周期は、DHA添加培地で2日間培養したB16F10細胞にBrdUを取り込ませ、抗BrdU抗体およびPIで染色し、フローサイトメトリーで解析した。

細胞内のF-Actin解析には蛍光標識ファロイジンを用い、共焦点顕微鏡および蛍光プレートリーダーを用いて解析した。Actin重合解析にはピレン傾向標識蛍光Actinを用いて、蛍光プレートリーダーで解析した。

### 4. 研究成果

#### 脂肪酸のメラニンへの作用解析

B16F10細胞を用いて脂肪酸がメラノーマ細胞のメラニン量に与える影響について解析した。炭素数14, 16, 18の飽和脂肪酸によって細胞内のメラニン量が優位に増加し、多価不飽和脂肪酸 (C18:2, C18:3, C18:4, C20:5, C22:6) によってメラニン量が有意に減少した。(図1)

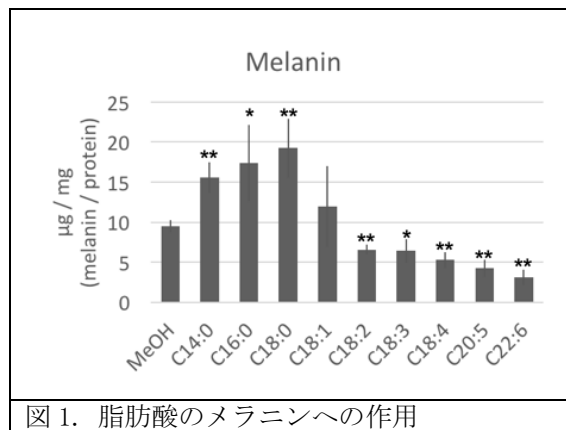


図1. 脂肪酸のメラニンへの作用

多価不飽和脂肪酸によるメラニン量減少の機序について検討するため、メラニン合成の初期反応であるチロシンからドーパへの代謝について検討した。多価不飽和脂肪酸によるドーパの減少傾向が観察され、EPA・DHAではドーパの有意な減少が観察された。(図2) チロシンからドーパへの代謝について詳細に検討するため、<sup>13</sup>C標識したチロシンの取り込みおよび代謝を解析した。細胞内へのチロシン取り込みには変化がなかったものの、EPAによってチロシンからドーパへの代謝が抑制されていることが確認された(図3)。

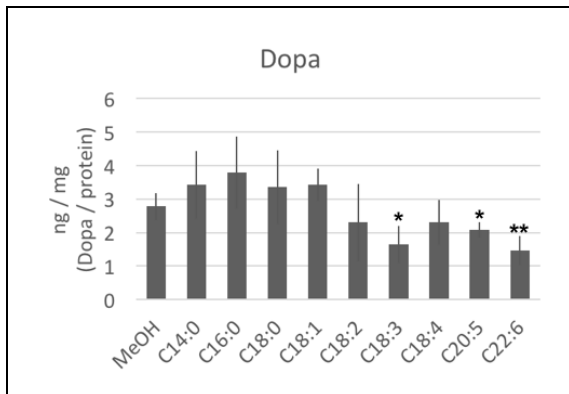


図2. 脂肪酸のドーパへの作用

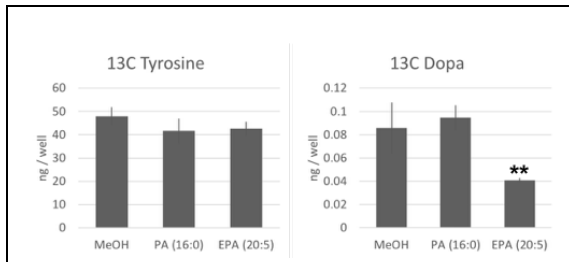


図3. 13C チロシンを用いた解析

EPAによるメラニン合成抑制の機序について検討するため、チロシナーゼ (Tyr) およびチロシナーゼ関連蛋白質 (Tyrl) 細胞内局在を、ウェスタンブロットおよび蛍光細胞免疫染色によって解析した。EPAによって膜に局在する Tyr および Tyrl が減少していた。(図4、5)

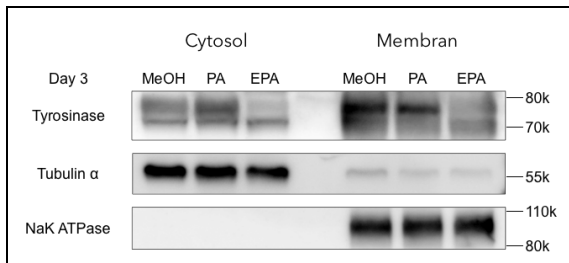


図4. Tyr のウェスタンブロット解析

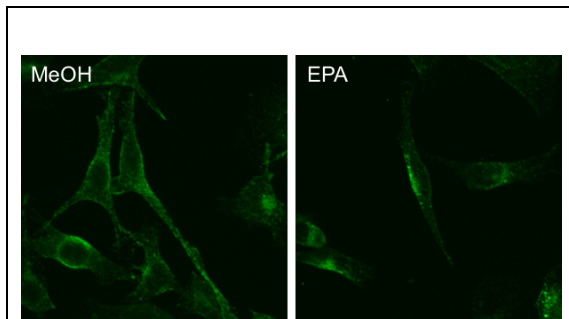


図5. Tyrl の細胞免疫染色

以上の結果から、EPAによって膜に局在するメラニン合成酵素 Tyr および Tyrl が減少したことで、メラノーマ細胞内でメラニン合成が抑制され、細胞内の量が抑制されたと考え

られる。

### DHAによるメラノーマ腫瘍細胞増殖抑制

メラノーマ細胞増殖に対するDHAの作用について検討するため、マウス (B16F10) およびヒト (Colo679, G361) のメラノーマ細胞株を用いて解析を行った。DHAはマウスメラノーマ細胞に対しても、ヒトメラノーマ細胞に対しても同様に細胞増殖抑制活性を示した。(図6)

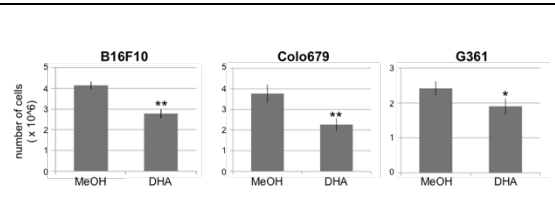


図6. DHAのメラノーマ細胞増殖抑制作用

DHAがメラノーマ細胞の細胞周期に対する影響を解析するため、蛍光の減衰を指標とした細胞分裂解析およびBrdUとPIを用いた細胞周期の解析を行った。DHAによるメラノーマ細胞の細胞周期遅延(図7)とG2/M期の細胞割合増加(表1)が観察された。

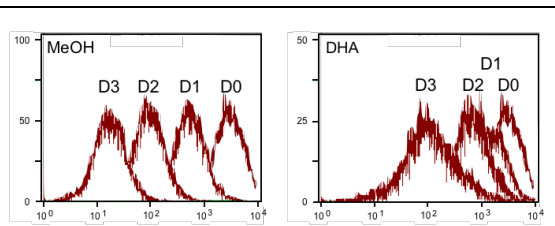


図7. DHAのメラノーマ細胞周期遅延作用

	G1	S	G2/M
MeOH	50.57 ± 0.002	44.81 ± 0.015	0.57 ± 0.001
DHA	52.36 ± 0.080	38.84 ± 0.012	2.09 ± 0.007

表1. メラノーマ細胞の細胞周期解析

### メラノーマ細胞に対する脂肪酸の作用機序解明

Tyr および Tyrl はメラノソーム膜に輸送されることで生理機能を発揮する蛋白質である。Tyr および Tyrl のオルガネラ輸送には Rab32、Rab38 という低分子量 G 蛋白質が重要な役割を担っている。メラノーマ細胞の腫瘍増殖には Ras 蛋白質の活性化が重要な役割を担っていることが報告されている。Rab 蛋白質と Ras 蛋白質は同じ低分子量 GTP 結合蛋白質であることから、脂肪酸によるメラノーマ細胞に対する作用の標的因子が低分子量 GTP 結合蛋白質ではないかと考え、Rab38 および Ras 蛋白質について発現および局在を解析したが、脂肪酸による変化は解析されな

かった。

次に、蛋白質のオルガネラ輸送の足場であり、細胞周期 M 期の染色体分配および細胞質分裂に働く細胞骨格蛋白質について解析した。中間系フィラメント (Tubulin) には変化が観察されなかったが、繊維状アクチン (F-Actin) が PA によって増加し、EPA によって減少することを見出した。(図 8)

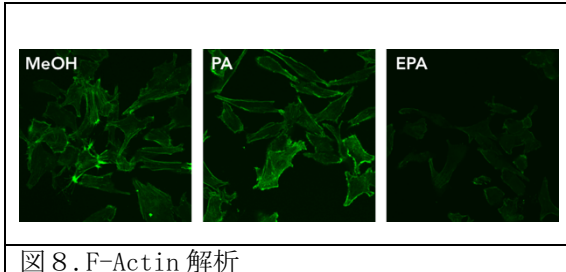


図 8. F-Actin 解析

脂肪酸によって F-Actin が変化する一方で、Actin 蛋白質総量は変化していなかった。(図 9)

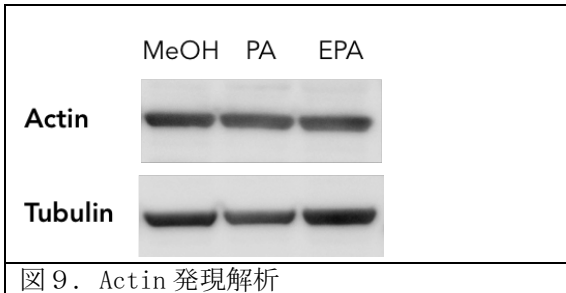


図 9. Actin 発現解析

以上の結果から、PA による細胞内メラニン増加は、F-Actin の増加によるメラノソーム蓄積によって、EPA によるメラニン合成抑制は、F-Actin 減少によるメラノソーム機能抑制によって、DHA による細胞周期遅延は、F-Actin 抑制による細胞質分裂遅延によって引き起こされている可能性が示唆された。

##### 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] (なし)

[学会発表] (計 3 件)

[図書] (なし)

[産業財産権]

○出願状況 (なし)

○取得状況 (なし)

##### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田秀俊 (公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部)