

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591331
 研究課題名 (和文) メラノサイト前駆細胞の生存における Mitf の作用機序
 —分化段階による相違—
 研究課題名 (英文) The role of Mitf and Tyrp1 as survival factor on melanocytes
 : involving an isoform of Tyrp1
 研究代表者
 河 陽子 (KAWA YOKO)
 聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
 研究者番号：10082273

研究成果の概要：前年度までの本研究により、メラノサイト前駆細胞株 (NCCmelb4M5) から Mitf のみならず Tyrp1 をノックダウンすると Fas の劇的な増加が起こり、細胞死に至った。メラニンの生合成に働く酵素である Tyrp1 がメラノサイト前駆細胞の生存に関与する事は新しい知見であるが、本年度の研究では、既知の Tyrp1 ではなく intron 2 の配列を含む新規アイソフォームがその役割をになっている可能性を見出した。現在 RACE 法により全配列の決定を試みている。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2008 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：melanocyte, Mitf, Tyrp1, neural crest cell, RNAi, RACE, NCCmelb4M5

1. 研究開始当初の背景

メラノサイトの初期の発生に関わる因子のうち、Mitfはメラニン生合成に働くチロシナーゼやtyrosinase related protein 1 (Tyrp1) の転写因子である事が明らかとなっているが、Mitfの重要なもう一つの役割は発生初期のメラノサイト前駆細胞の生存の維持と考えられている。しかし、その作用機序に関する報告はほとんどない。

作用機序の解明を目的にこれまでの本研究において、神経冠細胞由来メラノサイト前駆細胞株 (本研究で樹立した

NCCmelb4M5) からMitfをノックダウンした。すると、Fasの発現が上昇し細胞死に至ることが観察できたが、さらに Tyrp1をノックダウンしてもMitfより不完全だが細胞死が誘導された。また、以前の本研究でMitfのミュータントマウスの神経冠培養系にTPAとコレラトキシンを加えると、本来培養されないはずのメラノサイト前駆細胞が現れた。この細胞はチロシナーゼやtyrosinase related protein 2 は陰性であったが、Tyrp1は陽性であった。Kitはごく僅かの細胞で陽性だった。

以上の結果から、Tyrp1 は Mitf と同様にメラノサイト前駆細胞の生存に重要な役割を果たすと考えられた。

2. 研究の目的

当初の目的は、以前の本研究で樹立した分化段階の異なる3種類のメラノサイト前駆細胞株を用いて、Mitf がどの分化段階のメラノサイトの生存にその役割を果たすのか検討する予定であったが、Tyrp1 がメラニン合成のみならずメラノサイト前駆細胞の生存に関与する事実は新しい知見であるため、その説得力ある証明をする事の方が重要と考えた。

予備的な実験結果から、Tyrp1 の intron2 の配列で設計した siRNA がより強く細胞死を誘導した事や導入試薬の濃度により若干陰性コントロールも細胞死が起こる事から、ノックダウンの実験条件の再設定をする事、及び Tyrp1 の新規アイソホームの全配列を決定する事に目的を変更した。

3. 研究の方法

(1) RNA interference

siRNA をキットを用いて合成し、siRNA 導入試薬を用いてメラノサイト前駆細胞(NCCmelb4M5) 内に導入し、経時的に形態的变化、ダウン効率、Fas およびメラノサイト関連の遺伝子の発現量の変化をリアルタイム PCR で測定する。

① 導入試薬の細胞毒性を起こさない濃度をみつける。

② 陰性コントロール(GL3)の siRNA が細胞毒性を起こさない濃度をみつける。

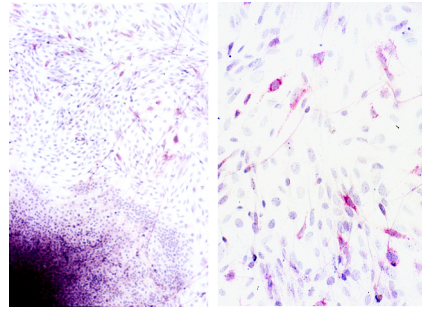
③ 条件が決定したら GL3、Mitf および Tyrp1 (exon2, intron2, exon4) の siRNA について本実験を行う。

(2) RACE 法にて新規アイソフォームの全配列を決定する。

4. 研究成果

(1)マウス神経冠初代培養

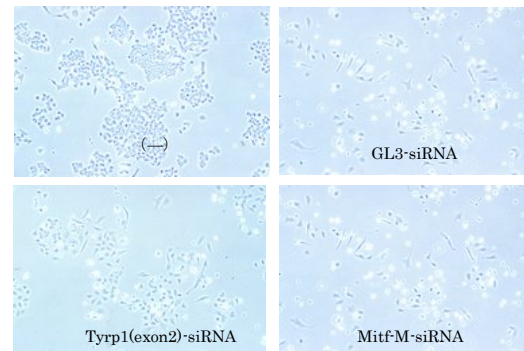
以前の研究で説得力ある写真が得られなかったので再度行った。Mitf のミュータントマウスの神経冠培養系に TPA とコレラトキシンを加え培養 15 日目の免疫染色の結果。



上は拡大の違う同一視野の顕微鏡写真。Mitf のミュータントマウスの神経冠培養系に TPA とコレラトキシンを加え培養 15 日目の免疫染色の結果で、免疫染色により赤く染まっているのは Tyrp1 陽性細胞である。本来培養されないはずのメラノサイト前駆細胞の出現を再確認し、また説得力ある写真が得られた。

(2) RNA interference

Tyrp1 の exon2 の配列で設計した siRNA を用いて行った前回のノックダウンの結果。



上はメラノサイト前駆細胞株(NCCmelb4M5)に siRNA を添加 5 日後の位相差顕微鏡写真。Mitf の siRNA を添加したものは、無添加の (-) や陰性コントロールの GL3 に比べ細胞数が激減し、細胞死が誘導された。既知の Tyrp1 の exon2 の配列で設計した siRNA の場合も、Mitf 程ではないがやはり細胞死が誘導された。

以上の結果は Tyrp1 は Mitf と同様にメラノサイト前駆細胞の生存に重要な役割を果たす事を示唆するものである。

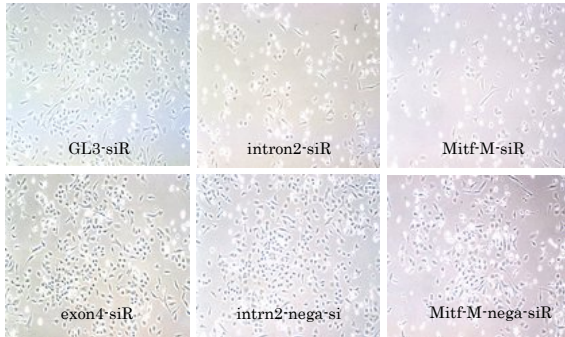
ノックダウンの実験条件の再設定と本実験

① RNAi に使用する導入試薬について、細胞毒性を起こさない濃度を検討した結果、導入時間 12 時間で 0.6% 以下であった。

② 導入試薬の濃度 0.67% で陰性コントロ

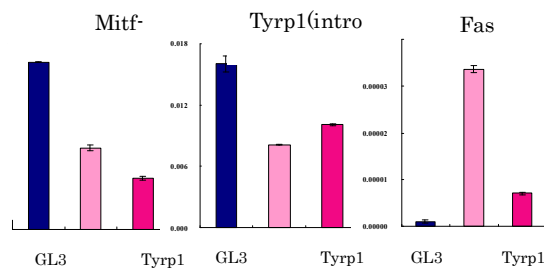
ール(GL3)のsiRNAが細胞毒性を起こさない濃度は導入時間12時間の時40nMであった。

③ 決定した条件による GL3、Mitf および Tyrp1 (intron2, exon4) の siRNA について本実験の結果。



上は、メラノサイト前駆細胞(NCCmelb4M5)に siRNA を添加後 5 日目の位相差顕微鏡像。GL3 は陰性コントロール。intron2 は既知の Tyrp1 には存在しない intron2 の配列で設計した siRNA。exon4 は既知の Tyrp1 の exon4 の配列で設計した siRNA (従来から Tyrp1 を検出する際に用いているプライマーの配列を含む)。nega-siRNA は intron 2 および Mitf の siRNA の配列のそれぞれの塩基の数を変えずに順番だけ変えたスクランブルドネガコン。GL3 とこれらのネガコンに比べ、intron 2 の siRNA は Mitf の siRNA と同程度に劇的に増殖を抑制した。既知の Tyrp1 の exon4 の siRNA は抑制しなかった。

④ siRNA 添加 48 時間後の mRNA の発現量をリアルタイム PCR にて測定した結果。



Mitf および Tyrp1-intron 2 の mRNA がダウンしていることが確認でき、その時 Fas mRNA が増加していた。以上の結果は、Mitf および intron 2 の配列を含む、新規アイソフォームがメラノサイトの生存に関与している事を強く示唆している。

一方、RNA interference の結果の最初に示し

た通り、exon2 の配列で設計した siRNA は Mitf より弱い細胞死を誘導したのに対し、exon4 の配列で設計したものは殆ど誘導できなかったことから推察すると、既知の Tyrp1 とは別のもの、すなわち exon2 と intron2 (一部?) を含むが exon4 は含まない、アイソフォームが存在する可能性が考えられる。

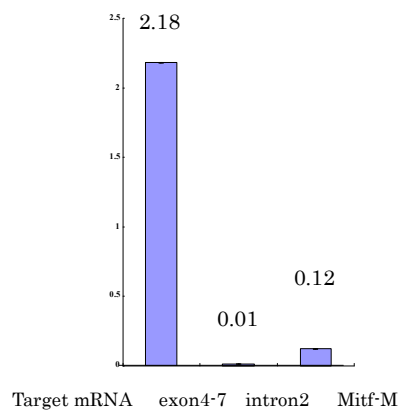
ではなぜ、intron2 に設計した siRNA は Mitf と同程度の細胞死を誘導したのに exon2 では弱い誘導効果しか発揮できないのか疑問が残る。

その理由として考えられるのは、仮に NCCmelb4M5 細胞において既知の Tyrp1 の mRNA の発現量がアイソフォームの mRNA のそれよりはるかに多かった場合、exon2 は両者に共通に存在する配列であると考えられるので、exon2 の siRNA は両者をダウンするのに使われるため、十分な量をアイソフォームをダウンするのに使う事ができないのではないか。

そこで、リアルタイム PCR にて NCCmelb4M5 細胞における既知の Tyrp1 とアイソフォームの発現量の比較をした。

既知の Tyrp1 の増幅に使用するプライマーは通常 Tyrp1 の検出に使用しているもので、5'側のプライマーは exon4 の配列を使用し、3'側のプライマーは exon7 の配列を使用した。

アイソフォームの増幅に使用するプライマーは、5'側のプライマーを exon2、3'側のプライマーは siRNA 作成に使用した配列の下流に設計したプライマーを使用した。



予想通り、既知の Tyrp1 の発現量はアイソフォームのそれより 200 倍発現量が多かった。

(3) RACE 法による新規アイソフォームの全配

列の検索。

ノックダウンの結果から、新規アイソフォームは exon2 と intron2 を含むと考えられるので、RACE 法に使用する gene specific primer (GSP) は、intron2 の siRNA を設計した配列の近くに設計した。

Cap 構造をターゲットに mRNA のみにキット付属のオリゴの配列をつないで、cDNA に変換する方法で Rady Race cDNA を作成。

GSP と Race primer を用いて 5' 側と 3' 側の PCR を行った。

バンドが得られないので、次に Nested PCR を行った。

3' Race のみバンドが得られ、シーケンスの結果は intron2 に存在する poly19A の手前までの配列が確認できた。しかし、それは単に poly19A にアニールしただけで、mRNA tail ではない可能性もあるため、より長いバンドを探してみたが、非特異バンドと同じサイズしか得られなかった。

バンドカットせず PCR 産物をダイレクトにクローニングしたが、得られたのは同じ poly19A の手前までの配列ばかりだった。

5' Race もやはりバンドが得られないので、仕方なくバンドカットせず PCR 産物をダイレクトにクローニングした。その結果、exon1 から exon2 そして siRNA の配列を含んで GSP の配列迄確認できた。しかし得られたコロニーのなかに、5' の開始位置が 3 種類見つかったため、まだ確定には至っていない。

一方、PCR の酵素を変えて見たところ、バンドが得られたので、これからの解析に期待できる。現在検索継続中である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

① 河 陽子、メラノサイトの生存に果たす Mitf と Tyrp1 の作用機序、第 21 回日本色素細胞学会年次学術大会、2007 年 12 月、愛知県豊明市

② Yoko Kawa, The role of Mitf and Tyrp1 as survival factor on melanocytes: involving an isoform of Tyrp1., XXth International Pigment Cell Conference, May 8, 2008, Sapporo Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河 陽子 (KAWA YOKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：10082273

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし