

「パルミトイル化修飾を介したメラニン合成制御機構の解明と応用」
神戸大学バイオシグナル総合研究センター 足立直子

1 研究の背景と目的

メラニンは、皮膚、毛髪、眼の色調を決定する重要な色素であり、紫外線防御や視覚機能の維持に関与している。健康的な肌の色調や美白は世界的に高い関心を集めており、その調節機構の解明は、美容分野への応用のみならず、色素異常に対する治療法の開発にもつながる。

我々は、ヒト 3D 皮膚培養モデルを用いた検討により、パルミトイル化修飾（タンパク質に可逆的に脂質が付加される翻訳後修飾）を阻害すると、細胞の黒化が促進されることを見出した（図 1、Niki Y*, Adachi N* et al., *共同筆頭著者, J Invest Dermatol. 2022）。パルミトイル化修飾は、全タンパク質の約 13%に存在するとされる重要な翻訳後修飾であるが、メラニン合成関連因子に対する影響については十分に解明されていない。

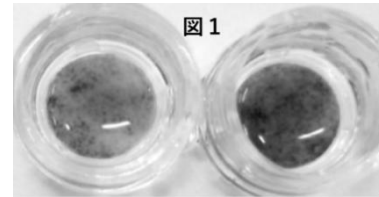


図 1 コントロール パルミトイル化阻害

皮膚においてメラニン産生を担うメラノサイトでは、多くのパルミトイル化修飾酵素 DHHC 群が発現している。定常状態では、メラニン合成の律速酵素であるチロシナーゼ（TYR）はパルミトイル化修飾を受けたのち、ユビキチン化を介して分解される。一方、DHHC 酵素阻害薬により TYR のパルミトイル化修飾を阻害すると、その分解が抑制されて発現量が増加し、メラニン産生が促進されることで、皮膚の黒化が引き起こされる。しかし、生体内で DHHC 酵素がどのような機構で調節されるのか、また TYR 以外のメラニン合成関連因子に対してパルミトイル化修飾がどのような影響を及ぼすのかは、いまだ明らかではない。

そこで本研究では、メラニン生合成におけるパルミトイル化修飾の役割を解明し、パルミトイル化修飾の制御を介した新たなメラニン合成調節機構の確立を目指す。今回特に以下の 3 つ項目について注目し研究を行った

- ① 生理的条件下でのパルミトイル化修飾阻害メカニズムの解明
- ② 眼皮膚白皮症（OCA）変異型メラノサイトにおけるメラニン合成回復機構の探索
- ③ メラニン合成関連分子のパルミトイル化修飾の検出と役割の同定

2 研究の方法・研究内容

メラノサイト：

本研究では、日本人由来のメラノーマ細胞株である HM3KO と、白人由来メラノーマ細胞株である MEWO、また CRISPR-Cas9 システムにて OCA3 の原因遺伝子である TYRP1 遺伝子をノックアウトした MEWO-TYRP1 KO 細胞（京都大学生命科学研究科 神戸大朋先生との共同研究）を用いた。

メラノサイトの UV 照射実験：

京都府立医科大学皮膚科学、福本毅先生との共同研究により HM3KO 細胞に UV 照射・ α MSH (UV 照射に応答して皮膚で産生されメラニン産生を促進するペプチドホルモン) 刺激を行いメラニン合成関連遺伝子のパルミトイル化動態を定量した。

OCA 関連遺伝子コンストラクトの作成：

今回、メラニン合成関連遺伝子のパルミトイル化修飾をスクリーニングするにあたって、OCA2 の原因遺伝子である P protein, OCA4 の原因遺伝子である SLC45A2, OCA6 の原因遺伝子である SLC24A5, OCA7 の原因遺伝子である C10orf11 を Addgene 社より購入し、Flag タグを付加したコンストラクトを作成した。

パルミトイル化修飾同定：

パルミトイル化修飾同定には目的に応じて以下の 3 つ手技を使用した。

- ・代謝標識 Click chemistry 法 (Martin et al., Nat Methods. 2010)
パルミチン酸アナログである 17-ODYA をメラノサイトの培地中に添加し、4 時間標識後細胞を回収し Click Chemistry に供しパルミトイル化タンパク質を SDS-PAGE/WB にて検出した。本手法により標識中に付加したパルミトイル化修飾を検出した。
- ・Acyl-RAC 法 (Forrester et al., J Lipid Res. 2011)
総パルミトイル化タンパク質検出法であり、細胞・組織回収時点で含まれる全てのタンパク質を検出可能。ヒドロキシルアミンによりパルミトイル化修飾を特異的に切断し、パルミトイル化タンパク質をビーズに結合させて精製した。
- ・APEGS 法 (Kanadome et al., Methods Mol Biol)
パルミトイル化修飾部位を PEG に置換し、SDS-PAGE にて泳動することにより、修飾部位の数だけバンドシフトを起こし、修飾数とその量を定量的に測定した。

ZDHHC 酵素活性測定：

TYR のパルミトイル化修飾責任酵素である zDHHC2/3/15 の酵素活性を我々が新規に開発した手法 (Adachi et al., J Lipid Res. 2025) を用いて測定した。各 zDHHC 遺伝子を HEK293 細胞に発現後、Forskolin/IBMX 処置により細胞内 cAMP 量を上昇させ、刺激後の細胞をタイムコースで回収し、酵素活性シグナルを検出した。

3 研究成果

① 生理的条件下でのパルミトイル化修飾阻害メカニズムの解明

UV 照射によりチロシナーゼのパルミトイル化修飾の低下と発現量の上昇

表皮では UV 刺激により産生された α MSH がメラノサイトを活性化しメラニン合成を増加させる。本研究ではこの生理的メラノサイト活性化状態を模倣するために、UV 照射と α MSH 刺激を HM3KO 細胞に加え、刺激後 4, 24, 48, 72 時間後に回収し、Acyl-RAC 法を用いてチロシナーゼ (TYR) とチロシナーゼ関連タンパク質 (TYRP1) の発現量とパルミトイル化量を定量した。その結果、TYR のパルミトイル化量は刺激後 24, 48 時間後に有意に低下し、一方で、発現量は刺激後 48, 72 時間後に有意に上昇した。その結果、72 時間後には明らかな細胞の黒化 (メラニン合成が促進して細胞が黒くなる現象) が見られた。TYRP1 にはこのような明らかな変化は観察されなかった。これは、生理的

刺激によりメラニン合成の主要な酵素である TYR 発現量がパルミトイル化修飾により制御されている可能性を示している。

zDHHC 酵素の活性は cAMP シグナルの下流で抑制される

では、UV/ α MSH 刺激はどのような機構で TYR のパルミトイル化修飾を抑制するのだろうか。UV 刺激を受けたケラチノサイト（表皮を構成する主要な細胞）は、ペプチドホルモンである α MSH を産生し、メラノサイトに発現するメラノコルチン 1 受容体

(MC1R) を刺激する。MC1R は G タンパク質共役型受容体であり、その活性化により細胞内 cAMP 産生が促進され、下流シグナルが活性化されることで、メラニン合成が促進される。そこで我々は、cAMP の下流でパルミトイル化修飾酵素である zDHHC の活性が抑制されている可能性を検討した。zDHHC 酵素はヒトでは 23 種存在するが、その内、TYR は zDHHC2/3/15 によってパルミトイル化修飾を受ける。そこで、これらの酵素を HEK293 細胞に発現させ、cAMP の上昇を Forskolin/IBMX 刺激により誘導した。細胞刺激後、5, 15, 30, 60 分に回収し、zDHHC 酵素の活性化状態を定量したが、酵素活性に明らかな変化はみられなかった。そこで、刺激後 4, 8, 24, 48 時間後に回収し、活性化状態をモニターしたところ、刺激後 24, 48 時間で有意に活性化の低下がみられた。これは、メラノサイトを UV/ α MSH で刺激後に TYR のパルミトイル化状態が低下するタイムコースと一致する。つまり、UV/ α MSH 刺激 \rightarrow cAMP 産生 \rightarrow zDHHC 酵素活性抑制 \rightarrow TYR のパルミトイル化修飾低下 \rightarrow TYR のユビキチン化阻害 \rightarrow TYR 発現量増加 \rightarrow メラニン合成促進、の経路が示唆された。

② 眼皮膚白皮症 (OCA) 変異型メラノサイトにおけるメラニン合成回復機構の探索

パルミトイル化修飾阻害は OCA3 によるメラニン合成低下を回復させる

眼皮膚白皮症 (Oculocutaneous albinism OCA) は出生時よりメラニン合成が低下、もしくは、消失する常染色体劣性遺伝の疾患であり、現在 OCA1-8 が同定されている。今回、OCA3 の原因遺伝子であるチロシナーゼ関連遺伝子 1 (TYRP1) を白人由来のメラノサイトである MEWO 細胞で CRISPR-Cas9 システムを用いてノックアウト (TYRP1 KO) し、OCA3 のモデル細胞とした。そこで我々は、図 2 に示すように、野生型と TYRP1 KO の MEWO 細胞のメラニン合成能をパルミトイル化阻害薬である 2-bromopalmitate (2-BP) 添加有無の条件で確認した。野生型 MEWO 細胞では細胞播種後 7 日目より細胞の黒化が明らかとなり、14 日、21 日と時間経過により黒化が促進した。2-BP の添加はこの黒化を促進した。一方で、TYRP1 KO 細胞では細胞播種後 7 日目では明らかな黒化は見られず、その後も OCA3 患者と同様にメラニン合成に明らかな低下がみられた。しかしながら、2-BP の添加により、細胞播種後 14 日目には明らかな細胞の黒化がみられ、21 日目には無処置の野生型細胞と同等までメラニン産生量は回復した。この結果は、パルミトイル化修飾阻害が少なくとも OCA3 患者に対して治療標的となることを示している。

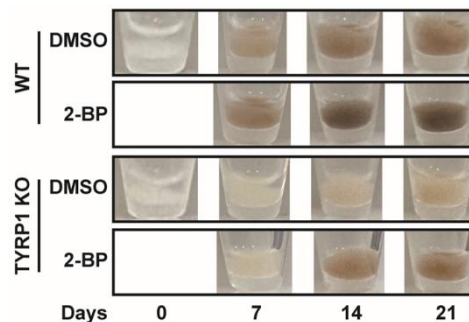


図 2 パルミトイル化阻害薬によるメラニン合成促進

③ メラニン合成関連分子のパルミトイル化修飾の検出と役割の同定

常時 40% のチロシナーゼはパルミトイル化され分解誘導を受ける

既に、OCA1 の原因遺伝子である TYR と OCA3 の原因遺伝子である TYRP1 のパルミトイル化修飾は同定しており、また、OCA8 の原因遺伝子である TYRP2 はパルミトイル化修飾を受けない。今回、TYR と TYRP1 のパルミトイル化修飾状態を APEGS 法で解析したところ、およそ定常状態で 40% の TYR、20% 弱の TYRP1 がパルミトイル化修飾を受けることが判明した。また、TYR はパルミトイル化部位が 1 カ所なのに対して、TYRP1 は少なくとも 2 カ所のパルミトイル化修飾部位が存在する。つまり、パルミトイル化修飾阻害により、これらの酵素の分解誘導を阻害することでメラニン合成を亢進させる。現在は、OCA2 の原因遺伝子である P protein, OCA4 の原因遺伝子である SLC45A2, OCA6 の原因遺伝子である SLC24A5, OCA7 の原因遺伝子である C10orf11 の発現ベクターを作成し、パルミトイル化の同定と機能解析を進めている。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究により、パルミトイル化修飾の制御を介したメラニン合成促進機構の一端が明らかとなり、この現象が UV 刺激によって誘導される生理的応答であることが示された。これにより、メラニン合成制御の新たな分子基盤が提示され、美容分野への応用に加え、色素異常症の病態理解と治療法開発への展開が期待される。

実際に、本機序を標的とすることで、眼皮膚白皮症 3 型 (OCA3) のモデルメラノサイトにおいてメラニン合成を回復できる可能性が示された。この知見は、他の OCA や、Hermansky-Pudlak 症候群、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群など、メラニン合成障害を伴う疾患に対する新規治療法開発の基盤となりうる。

さらに本研究成果は、皮膚のみならず眼組織における色素制御への応用可能性を示すものであり、出生早期からの介入による視覚機能改善の可能性も示唆する。加えて、本研究成果は、化粧品、医薬品、点眼薬、再生医療関連製品などの開発にも波及し、生活の質の向上と関連産業の発展に貢献することが期待される。