



東北大学

報道機関各位

平成 25 年 4 月 22 日
東北大学大学院生命科学研究科

メラニン合成酵素をメラノソームに受け渡す仕組み解明へ ～ メラニン合成酵素の受け渡しに関わる膜融合装置 SNARE ～

【ポイント】

- ・メラニン合成酵素は未成熟メラノソームに運ばれメラニン色素を合成するが、メラニン合成酵素をメラノソームに受け渡す仕組みは未解明
- ・メラニン合成酵素のメラノソームへの受け渡しには膜融合装置 SNARE（スネア）が関与
- ・この分子複合体の機能を阻害すると、メラノソームに運ばれなかったメラニン合成酵素は細胞内から除去（分解）

【概要】

国立大学法人東北大学は、メラニン合成酵素をメラノソームに受け渡す過程を制御する分子複合体を初めて同定しました。これは、東北大学大学院生命科学研究科の谷津彩香修士大学院生、福田光則教授らによる研究成果です。

わたしたちの肌や髪の色之源であるメラニン色素は、「メラノソーム」^{*1}と呼ばれる特殊な袋（小胞）の中で「メラニン合成酵素」^{*2}によって合成されます。メラニン合成酵素ははじめからメラノソームに存在する訳ではなく、無色の未成熟メラノソームが形成された後に小胞輸送^{*3}によって運ばれています。これまでメラニン合成酵素の輸送に関わる分子群が幾つか報告されていますが^{*4}、小胞に乗って運ばれてきたメラニン合成酵素がメラノソームの袋にどのように受け渡されるのかは良く分かっていませんでした。

今回、研究グループはマウスの培養メラノサイトを用いて、メラニン合成酵素をメラノソームに受け渡す過程に「膜の融合装置として働く SNARE（スネア）タンパク質複合体」^{*5}（シンタキシン 3、SNAP23、VAMP7 の 3 種類のタンパク質）が関与することを初めて突き止めました。シンタキシン 3 と SNAP23 はメラノソーム上に、VAMP7 はメラニン合成酵素（Tymp1）を含む小胞上に存在し、これらの分子が複合体を形成することにより、メラノソームへのメラニン合成酵素の受け渡しが促進されます。この複合体の構成因子のいずれか一つの機能が損なわれると、メラニン合成酵素はメラノソームに運ばれなくなり、リソソームという分解場所で分解を受けることが明らかになりました。

今回の発見は、メラニン色素の合成レベルだけでなく、輸送や受け渡しのレベルでの制御の重要性を示すもので、本研究成果を応用した美白剤の開発が今後期待されます。

本研究成果は、米国の皮膚科学専門雑誌『*Journal of Investigative Dermatology*』電子版（AOP, advance online publication）に掲載されます。

【背景】

わたしたちの肌や髪の毛に含まれる黒いメラニン色素は、有害な紫外線から体を守るために重要な役割を果たしていますが、その一方でしみやそばかすの原因ともなっています。メラニン色素は、メラノサイトに存在する「メラノソーム」^{*1}と呼ばれる袋（小胞）の中で、「メラニン合成酵素」^{*2}によって合成・貯蔵されます。メラニン合成酵素ははじめからメラノソームに存在する訳ではなく、タンパク質合成後、小胞輸送^{*3}によって未成熟なメラノソームに後から輸送されます（図1、ステップ①）。つまり、メラニン色素を正しく合成するためには、メラニン合成酵素をメラノソームに輸送するプロセスが重要です。実際、ヒトやマウスの遺伝病の中にはこのメラニン合成酵素の輸送に異常が起こり、肌や髪の毛が白くなる病気が知られています。これまでメラニン合成酵素の輸送に関わる分子群（Rab32/38-Varp など）^{*4}が報告されていますが、小胞に乗って運ばれてきたメラニン合成酵素がメラノソームの袋にどのように受け渡されるのかは（図1、ステップ②）良く分かっていませんでした。

【研究成果】

本研究では、メラニン合成酵素がメラノソームに受け渡される過程に膜融合が関与するのではないかと考え、「膜の融合装置として働く SNARE（スネア）タンパク質複合体」^{*5}に着目しました。一般的に、SNARE タンパク質複合体による膜融合は、輸送されて来た小胞上に存在する 1 種類の v-SNARE と受け手側の膜に存在する 2 種類の t-SNARE が、例えてみると鍵と鍵穴のような関係で結合することにより引き起こされます（図2）。研究グループのこれまでの研究で、メラニン合成酵素 Tyrp1 を含む小胞上に Varp 結合分子^{*4}として v-SNARE の一種 VAMP7 が存在することを見出していましたが、その詳細な機能は明らかではありませんでした。本研究ではまず、VAMP7 の相方となるメラノソーム上の 2 種類の t-SNARE を探索し、シンタキシン 3 と SNAP23 を見出すことに成功しました。次に、得られた 3 種類の SNARE タンパク質（シンタキシン 3、SNAP23、VAMP7）の細胞内局在、及び内在性分子のノックダウンによるメラニン合成酵素の発現・分布に対する影響を検討しました（図3及び図4）。その結果、以下のことを明らかにすることができました。

1. マウスの培養メラノサイト（melan-a 細胞）においては、t-SNARE の候補としてシンタキシン 3 と SNAP23 が内在性に発現しており（図3左）、これら 2 種類の t-SNARE はいずれもメラノソーム上に局在する（図3中央及び右）。
2. メラノサイトにおいてシンタキシン 3、SNAP23 及び VAMP7 は複合体を形成する。
3. 内在性の SNARE タンパク質（シンタキシン 3、SNAP23、VAMP7）を特異的にノックダウンすることにより、メラニン合成酵素 Tyrp1 やチロシナーゼがメラノソーム上から消失する（図4左及び中央）。メラニン合成酵素の量が減少するため、結果的に SNARE ノックダウン細胞においては細胞内のメラニン色素量が減少する（図4右）。
4. SNARE ノックダウン細胞におけるメラニン合成酵素 Tyrp1 の消失は、メラノソームへ正しく輸送されなかった分子がリソソームと呼ばれる場所で分解されることにより引き起こされる（図5）。

以上の結果から、マウスの培養メラノサイトにおいてメラニン合成酵素をメラノソームに受け渡すためには、3 種類の SNARE タンパク質が不可欠であることが明らかになりました。VAMP7 は Tyrp1 を含む小胞上に、シンタキシン 3 と SNAP23 はメラノソーム上に局在するこ

と、また、これらの **SNARE** タンパク質はメラノサイトにおいて複合体を形成することから、形成した **SNARE** 複合体がメラニン合成酵素を含む小胞とメラノソームの融合を促進するものと考えられました（図6）。さらに興味深いことに、**SNARE** タンパク質をロックダウンした細胞では、メラニン合成酵素がメラノソームに正しく輸送されず、リソソームで分解されるため、結果的に細胞内のメラニン色素量が減少するという事実も明らかになりました。

【今後の展開】

今回の研究により、小胞輸送によって運ばれて来たメラニン合成酵素を正しく目的のメラノソームに受け渡すことが出来ないと、メラニン合成酵素はリソソームで分解され、結果的に細胞内メラニン色素量が減少することが明らかになりました。現在の美白化粧品の主流は、『メラニン合成酵素（チロシナーゼ）の活性』を抑えるものですが、今回の研究成果により『メラニン合成酵素の分解（メラノソームへの輸送を抑える）』をコンセプトとした新たな美白化粧品開発への応用が今後期待されます。

※本研究成果は、文部科学省新学術領域研究細胞内ロジスティクス「リソソーム関連オルガネラの細胞内動態とその破綻による疾患発症の分子基盤」（研究代表者：福田光則 東北大学大学院生命科学研究科教授）によるものです。

【図及び説明】

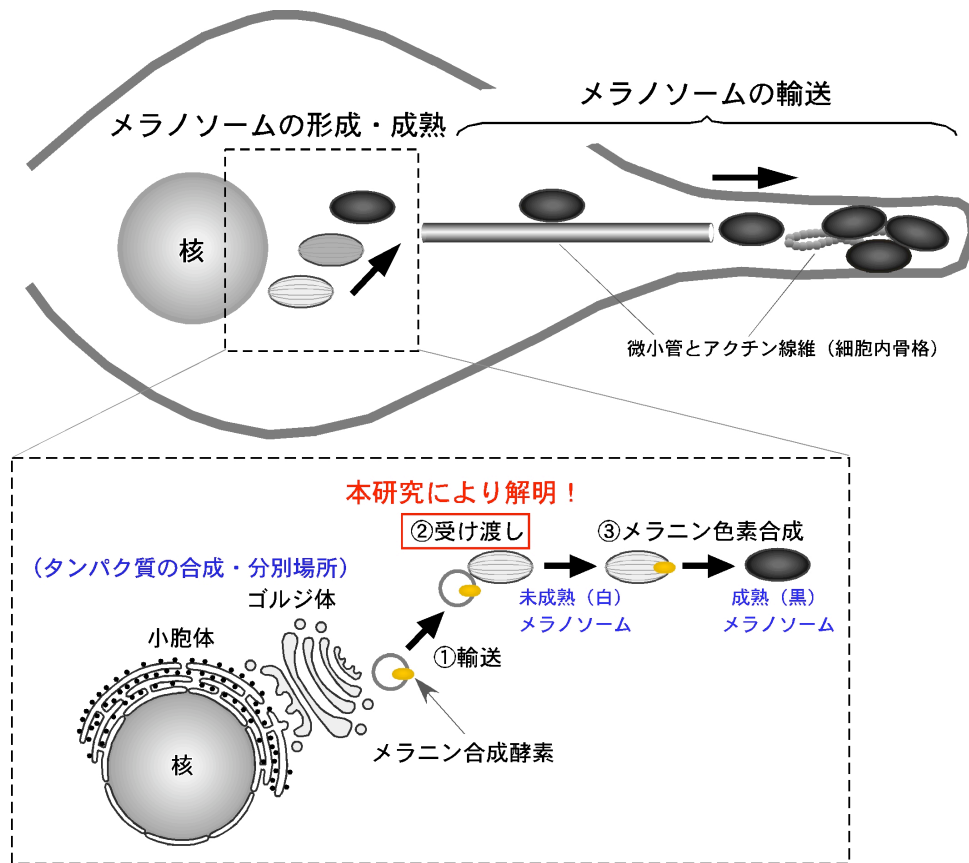
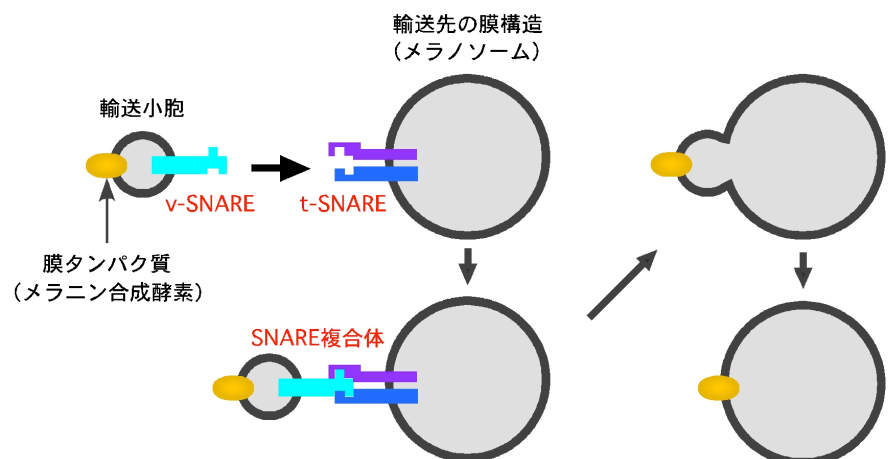


図1 メラノサイトにおけるメラニン合成酵素の輸送とメラノソームへの受け渡し

メラニン色素はメラノソームと呼ばれる袋（小胞）の中で、メラニン合成酵素によって合成・貯蔵されます。その後メラノソームは、細胞内骨格（微小管とアクチン線維）と呼ばれる道路に沿って細胞膜近傍まで輸送されます（輸送の詳細は*1を参照）。メラニン合成酵素ははじめからメラノソームに存在する訳ではなく、メラノソームとは別に作られ、小胞に乗って無色の未成熟メラノソームへと運ばれます（①）。メラノソームへと受け渡されたメラニン合成酵素は（②）、メラノソームの中でメラニン色素を合成し（③）、黒い成熟したメラノソームになります。ステップ①のメラニン合成酵素の輸送には、Rab32/38-Varp 複合体^{*4}が関与することが明らかになっていますが、ステップ②のメラノソームへの受け渡しの仕組みはこれまでほとんど分かっていませんでした。

図2 SNARE タンパク質複合体による膜融合の促進

メラニン合成酵素などの膜に突き刺さったタンパク質は小胞に乗って目的地の膜構造（オルガネラ）に運搬されます。膜タンパク質の受け渡しには、二つの膜が融合する必要がありますが、この融合には SNARE^{*5} と呼ばれる膜の融合装置が重要な役割を果たしています。輸送小胞上には1種類の v-SNARE が、輸送先には2種類の t-SNARE が存在し、これらが「鍵と鍵穴」のような関係で複合体を形成し、膜の融合を促進します。



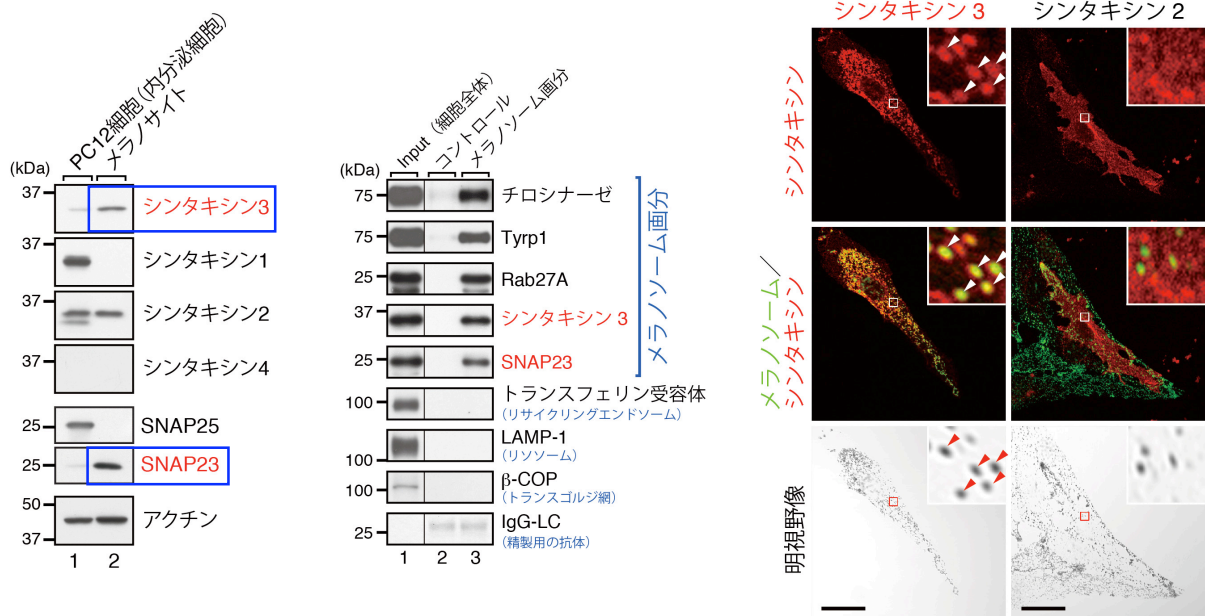


図3 メラノソーム上に局在する t-SNARE (シンタキシン 3 及び SNAP23)

(左図) メラノサイトにおける t-SNARE タンパク質の発現。マウス培養メラノサイト (melan-a 細胞) においては、t-SNARE としてシンタキシン 3 と SNAP23 が豊富に発現する。(中央図) シンタキシン 3 及び SNAP23 はメラノソーム画分に豊富に存在。抗チロシナーゼ抗体によりメラノソームを生化学的に単離すると、2 種類の t-SNARE はメラノソームのマーカであるチロシナーゼ、Typr1、Rab27A と共にメラノソーム画分に存在する。(右図) シンタキシン 3 はメラノソーム上に存在。Myc タグを付加したシンタキシン 2 及び 3 (上段、赤色) をメラノサイトに発現させると、シンタキシン 3 のみがメラノソーム (中段、緑色の疑似カラー) と共局在する様子が頻繁に観察されます (左写真、挿入図の矢頭)。一方、シンタキシン 2 はメラノソームとは共局在しません (右写真)。スケールバー = 20 μm。

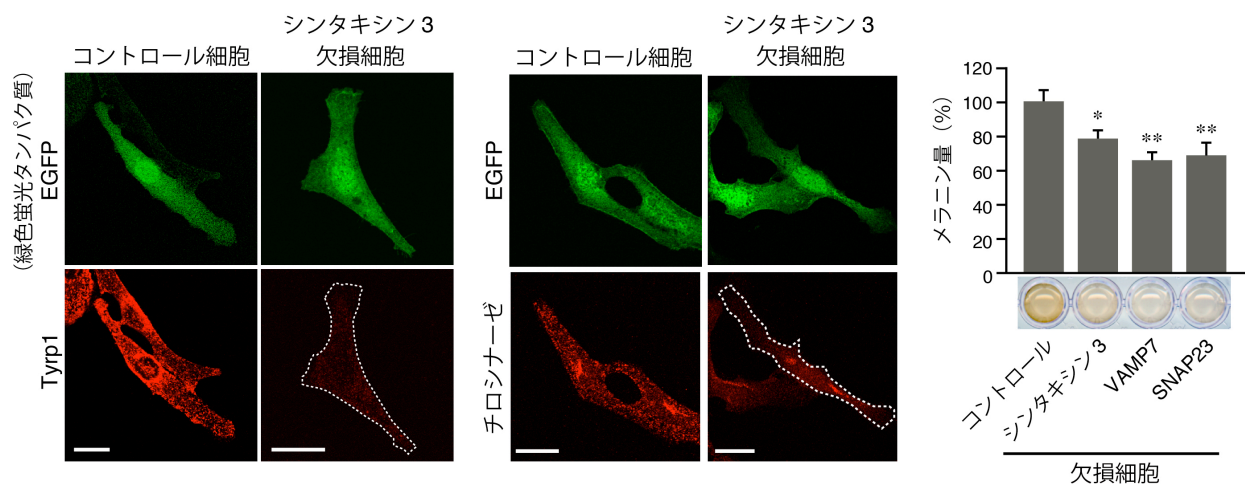


図4 SNARE タンパク質ノックダウン細胞におけるメラニン合成酵素の消失

RNA 干渉法により SNARE タンパク質 (シンタキシン 3、VAMP7、SNAP23) のいずれかをノックダウンしたメラノサイト (左図及び中央図、白い波線の細胞) では、メラニン合成酵素 Typr1 及びチロシナーゼのシグナルが顕著に減少します。メラニン合成酵素の量が減少するため、結果的に細胞内のメラニン色素量も減少することになります。スケールバー = 20 μm。

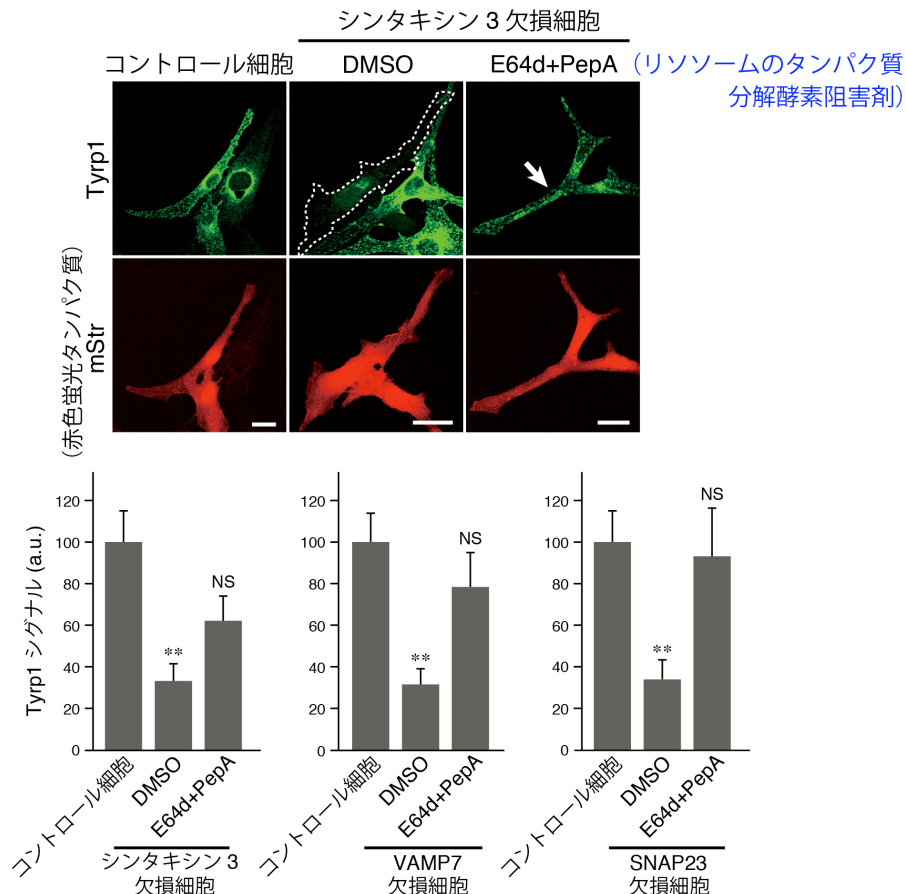


図5 SNARE タンパク質ノックダウン細胞におけるメラニン合成酵素 Typr1 のリソソームでの分解
 SNARE タンパク質 (シンタキシン 3、SNAP23、VAMP7) をノックダウンしたメラノサイトをリソソームのタンパク質分解酵素阻害剤で処理すると (上図、矢印の細胞)、Typr1 のシグナルが回復します (下図) (DMSO は阻害剤無添加)。このことから、SNARE タンパク質複合体の機能が損なわれて、メラノソームに受け渡されなかったメラニン合成酵素はリソソームと呼ばれる細胞内の分解場所で壊されてしまうことが明らかになりました。スケールバー = 20 μ m。

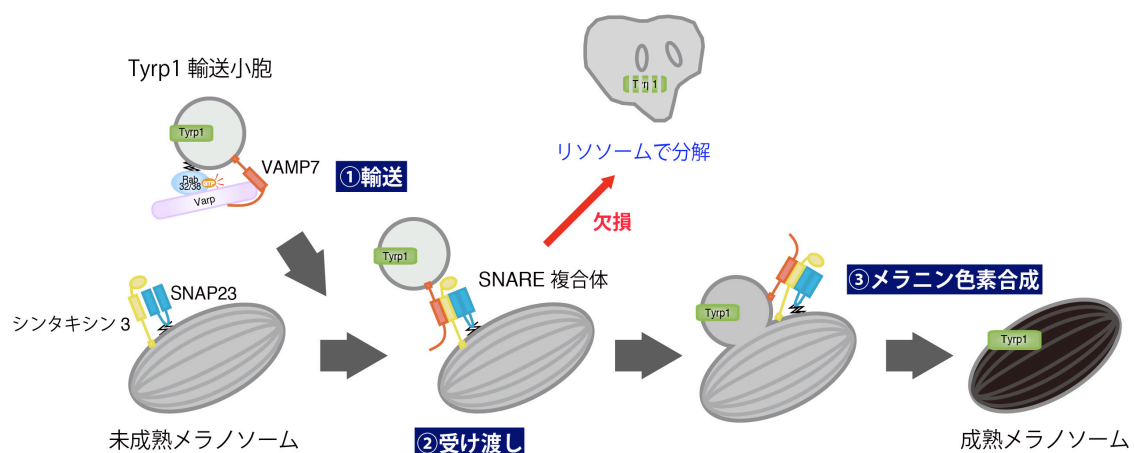


図6 SNARE タンパク質複合体によるメラニン合成酵素のメラノソームへの受け渡しモデル

メラノソームとは別に合成されたメラニン合成酵素は、v-SNARE の VAMP7 を含む小胞に乗って未成熟メラノソームへと運ばれます。メラノソーム上には VAMP7 と対をなす t-SNARE としてシンタキシン 3 と SNAP23 が存在し、複合体を形成します。これにより膜融合が促進され、メラニン合成酵素がメラノソームに受け渡されます。メラノソームに受け渡されたメラニン合成酵素は、メラニン色素を合成し、成熟した黒いメラノソームになります。膜融合に関わる SNARE タンパク質複合体の機能が損なわれると、メラニン合成酵素はメラノソームに受け渡されず、細胞内の分解場所であるリソソームで壊されてしまいます (赤矢印)。

【用語説明】

* 1 メラノソーム

細胞内には膜で包まれたオルガネラ（細胞内小器官）と呼ばれる構造物が多数存在しており、それぞれが特殊な役割を担っています。メラノソームはメラニン色素を合成・貯蔵するのに特化した袋状のオルガネラで、メラノサイトと呼ばれる特殊な細胞にのみ存在しています。メラノソームはメラノサイトの細胞内を輸送され、肌や髪の毛を作る細胞に受け渡され、はじめて肌や髪の毛の暗色化が起こります（メラノソームの輸送に関する詳細は下記の URL を参照）。

プレスリリース（2004 年 11 月 15 日）

『メラニン色素』の輸送メカニズムを解明 - 肌や髪の毛が黒くなる仕組み-

(http://www.riken.jp/~media/riken/pr/press/2004/20041115_1/20041115_1.pdf)

プレスリリース（2012 年 1 月 30 日）

『メラニン色素』の逆行性輸送の仕組みを解明 ～ 白髪予防の新たな分子標的として期待？ ～

(<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20120130.pdf>)

プレスリリース（2012 年 7 月 11 日）

メラニン色素の『微小管順行性輸送』を制御する分子を遂に発見！ ～ メラニン色素を運ぶ三種類の輸送経路の最後の仕組み解明へ ～

(http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20120704_01web.pdf)

* 2 メラニン合成酵素

メラニン色素はチロシンというアミノ酸から複雑な酵素反応のステップを経て、メラノソーム（*1 参照）の中で合成されます。メラニン合成酵素としては、チロシナーゼ（Tyr）、チロシナーゼ関連タンパク質 1（Tyrp1）、チロシナーゼ関連タンパク質 2（Trp2/Dct）の三種類が知られていますが、本研究では主に Tyrp1 に焦点を当てています。Tyrp1 は小胞体で合成され、ゴルジ体で糖鎖修飾を受けた後、Rab32/38-Varp 複合体（*4 参照）依存的に未成熟メラノソームに輸送されますが（図 1）、Tyrp1 を含む小胞からメラノソームにどのような仕組みで受け渡されるかは、これまで明らかではありませんでした。なお、ヒトの *TYR* 遺伝子や *TYRP1* 遺伝子の変異により肌や髪から色素が欠乏する眼皮膚白皮症 I 型や III 型が発症することが知られています。

* 3 小胞輸送

メラニン合成酵素などの膜タンパク質（細胞膜などに突き刺さったタンパク質）は、細胞質を拡散して移動することは出来ないため、「小胞に乗せた状態」で目的地（この場合、メラノソーム）へと輸送します（図 1）。この過程を一般的に小胞輸送と呼び、輸送を円滑に行うための交通整理人役のタンパク質（メラニン合成酵素の場合には、Rab32/38(ラブ)-Varp(バープ)複合体など、*4 参照）が細胞内に存在しています。

* 4 メラニン合成酵素の輸送に関わる分子群

メラニン合成酵素のメラノソームへの輸送に関わる分子群（交通整理人役のタンパク質複合体）としては、Rab32/38-Varp 複合体が同定されています。これらのメラニン合成酵素の輸送に関わる分子に変異が起こると、肌や髪の毛が白くなるヒトやマウスの遺伝病（例えば、ヘルマンスキー・パドラック症候群など）が発症することが知られています。当研究グループでは、

これまで Varp に結合する分子として v-SNARE の一種 VAMP7 (*5 参照) を Tyrp1 陽性小胞に見出していますが、その詳細な機能はこれまで明らかではありませんでした。

プレスリリース (2009 年 4 月 28 日)

「メラニン合成酵素」を輸送する新分子発見 ― 新たな美白ターゲットとして期待 ―

(<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/20090428.pdf>)

* 5 膜の融合装置 : SNARE (スネア) タンパク質複合体

soluble *N*-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein receptor の略で、膜の融合装置の実体と考えられています。*3 の小胞輸送で運ばれて来た小胞 (ここでは、メラニン合成酵素を含む小胞) が目的の膜構造 (ここでは、メラノソーム) に融合する際に重要な役割を果たします。多くの場合、運ばれてくる小胞側に 1 種類の v-SNARE (vesicle SNARE、小胞側のスネアの意味)、受け手側の膜側に 2 種類の t-SNARE (target SNARE、ターゲット側のスネアの意味) が存在し、これらが鍵と鍵穴のような関係で複合体 (実際には 4 本の束) を形成し、膜融合を促進します (図 2 参照)。ヒトやマウスには多数の v-SNARE や t-SNARE が存在し、その組み合わせ (鍵と鍵穴の組み合わせ) により小胞輸送の特異性が決定されていると考えられています。本研究では、メラニン合成酵素 Tyrp1 を含む小胞上には VAMP7 (ヴェンプ 7 : vesicle-associated membrane protein 7) と呼ばれる v-SNARE が、メラノソーム上にはシンタキシン 3 (syntaxin-3) と SNAP23 (スナップ 23 : synaptosome-associated protein of 23 kDa) の 2 種類の t-SNARE が存在することを明らかにしています (図 6 参照)。

【論文題目】

Yatsu, A., Ohbayashi, N., Tamura, K. & Fukuda, M. (2013) Syntaxin-3 is required for melanosomal localization of Tyrp1 in melanocytes. *J. Invest. Dermatol.*, in press (doi: 10.1038/jid.2013.156)

「シンタキシン 3 はメラニン合成酵素 Tyrp1 のメラノソーム局在に必要である」

(お問い合わせ先)

東北大学大学院生命科学研究科

教授 福田 光則 (ふくだ みつのり)

電話番号 : 022-795-7731 (or 022-795-3641)

E メール : nori@m.tohoku.ac.jp