



東北大学

報道機関各位

平成 27 年 2 月 2 日

東北大学大学院生命科学研究科

メラニン合成酵素の分解を促す新分子を発見
～ 新分子をターゲットにした新たな美白剤への応用に期待 ～

【ポイント】

- ・メラニン合成酵素のメラノソームへの輸送を制御する Varp 分子の新たな結合パートナーとして Rab40C を同定
- ・Rab40C は Varp 分子のユビキチン化を促し、プロテアソームでの分解を促進
- ・Rab40C の発現を増加させたメラノサイトでは、Varp 分子の分解が促進されるため、メラニン合成酵素の輸送が阻害され、結果的にメラニン合成酵素の分解も促進

【概要】

国立大学法人東北大学は、メラニン合成酵素の分解を促す新分子を同定することに成功しました。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、島田光修士大学院生、大林典彦助教、福田光則教授による研究成果です。

有害な紫外線からわたしたちの体を守るメラニン色素は、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によって合成されています。メラニン合成酵素はメラノソームにはじめから存在する訳ではなく、メラノソームの袋の元ができてから、後からメラノソームへ輸送されることが知られています。私達はこれまで、この輸送を制御する分子として Varp（ヴァープ）^{*2}を同定しており、この分子の発現異常によりメラニン合成酵素の分解（すなわち、メラニン色素量の減少）が促進されることを見出しています。しかし、メラノサイトにおける Varp 分子の発現調節に関わる仕組みはこれまで全く分かっていませんでした。

今回、研究グループは Varp に結合する新たな分子として、Rab40C^{*3}を同定することに成功しました。Rab40C は Varp 分子のユビキチン化を促進し、プロテアソームと呼ばれるタンパク質分解酵素^{*4}で Varp 分子を分解に導くことが明らかになりました。したがって、Rab40C をメラノサイトに過剰に発現させると Varp 分子の分解が、逆に Rab40C の発現を低下させると Varp 分子の蓄積が観察されますが、メラニン合成酵素の輸送には適切な量の Varp が必要なため、いずれの場合でもメラニン合成酵素がメラノソームに正しく輸送されず、結果的に分解されてしまうことを突き止めました。

今回の『メラニン合成酵素には直接作用せず、メラニン合成酵素の分解を促進する分子』の発見により、従来の「メラニン合成酵素の直接的な酵素活性の阻害」とは異なるアプローチの美白化粧品の開発に応用されることが期待されます。

本研究成果は、英国の科学雑誌『*Biology Open*』電子版に2月6日に掲載される予定です。

【背景】

わたしたちの肌や髪の毛の色の源であるメラニン色素は、有害な紫外線からわたしたちの体を守るために重要な役割を果たしています。しかし、その一方でメラニン色素の肌への過剰な沈着はしみやそばかすの原因にもなっています。メラニン色素は、メラノサイト（メラニン色素産生細胞）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によって合成されています。メラニン合成酵素はメラノソームの袋にはじめから含まれている訳ではなく、メラノソームとは別個に作られ、後からメラノソーム内に運び込まれています（図1）。この運搬過程には、「Varp（ヴァープ）」^{*2} と呼ばれる分子が関与しており、この分子の発現異常（発現低下あるいは過剰な発現上昇）によりメラニン合成酵素の分解（すなわち、メラニン色素量の減少）が促進されることが明らかになっています。しかし、メラノサイトにおける Varp 分子の発現調節（特に分解制御）に関わる仕組みはこれまで全く分かっていませんでした。

【研究成果】

これまでの研究で、Varp 分子には4つの機能ドメイン（アミノ末端側から VPS9 ドメイン、ANKR1 ドメイン、VID ドメイン、ANKR2 ドメイン）が存在し、アミノ末端側の3つのドメインを介してメラノサイトの樹状突起の形成やメラニン合成酵素の輸送を制御することが明らかになっています（図2）^{*2}。一方、Varp 分子のカルボキシル末端側に存在する ANKR2 ドメインの機能はこれまで全く分かっていませんでした。本研究ではまず、ANKR2 ドメインに結合する分子の探索を行い、低分子量 G タンパク質の一種 Rab40^{*3} が特異的に結合することを見出しました（図3A）。構造上、Rab40 は SOCS ボックス^{*3} と呼ばれるタンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼ複合体^{*4} を結合する領域を持っていたことから、次に Varp 分子の分解に対する影響を検討しました（図4～図7）。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. マウス培養メラノサイトには Rab40C が内在性に発現しており、活性化型（GTP 結合型）依存的に Varp 分子と結合します（図3B,C）。
2. Rab40C の野生型あるいは常時活性化型変異体（Q73L）をマウス培養メラノサイトに発現させると、Varp 分子の発現量が顕著に低下します（図4、矢印の細胞）。一方、Varp との結合能をほとんど示さない常時不活性化型変異体（G28N）や SOCS ボックスを欠損させた ΔSOCS 変異体（Varp との結合能は正常）では、Varp の発現量には特に影響は見られません。
3. Rab40C は Varp 分子のポリユビキチン化を促進し、プロテアソーム（タンパク質分解酵素）での分解を誘導します。このため、Rab40C を発現するメラノサイトをプロテアソームの阻害剤で処理すると、Varp 分子の分解が抑制されます（図5）。
4. Rab40C の野生型あるいは常時活性化型変異体を発現するメラノサイトでは、Varp の発現量が低下しているため、Varp によってメラノソームに輸送されるメラニン合成酵素の一種チロシナーゼ関連タンパク質1（Tyrp1）の発現量も顕著に低下します（図6、矢印の細胞）。
5. メラノサイトに内在性の Rab40C を RNA 干渉法によりノックダウンすると（図7A）、Varp 分子の分解が抑制されるため、その発現量が増加します（図7B）。メラニン合成酵素の輸送には適切な量の Varp 分子が必要なため、過剰な Varp 分子を発現する Rab40C 欠損メラ

ノサイトでは、メラニン合成酵素がメラノソーム上から消失してしまいます（図7C、矢印の細胞）。

以上の結果から、Rab40CはVarp分子のメラノサイトでの発現量を厳密に制御する役割を担うものと考えられました。Varp分子はメラニン合成酵素のメラノソームへの輸送に必須の役割を果たすため、Rab40Cの発現異常（過剰発現あるいは発現低下）によりVarp分子の発現量が適切に保てなくなり、間接的にメラニン合成酵素のメラノソームでの発現に影響を与えることが明らかになりました。

【今後の展開】

今回の研究により、メラノサイトにはVarp分子を分解することによりメラニン合成酵素の輸送を抑制する機構が備わっていることが明らかになりました。これまでの美白化粧品の多くは「メラニン合成酵素の基質に類似した化合物による直接的な酵素活性の阻害」という観点から作製されており、一部の化合物ではメラニン合成酵素により有害な物質に代謝される危険性が指摘されていました。今回の『メラニン合成酵素には直接作用せず、メラニン合成酵素の分解を促進するRab40C分子』の発見により、従来のアプローチとは異なる美白化粧品の開発が可能と考えられます。今後、Rab40CなどVarp分子の分解に関与するタンパク質をターゲットとした薬剤スクリーニングが進めば、メラニン合成酵素の分解を促し、しみ・そばかすの予防、美白の維持が可能になるものと期待されます。

※本研究成果は、公益財団法人東京生化学研究会・研究助成金「メラノソームダイナミクスを制御する分子基盤の解明と創薬へのアプローチ」（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）、公益財団法人 東レ科学技術振興会・研究助成金「リソソーム関連オルガネラ輸送の分子機構の解明」（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）、独立行政法人日本学術振興会・学術研究助成基金助成金 基盤研究 C「色素細胞活性化におけるVarpの機能解析」（研究代表者：大林典彦 東北大学大学院生命科学研究科助教）のサポートによるものです。

【図及び説明】

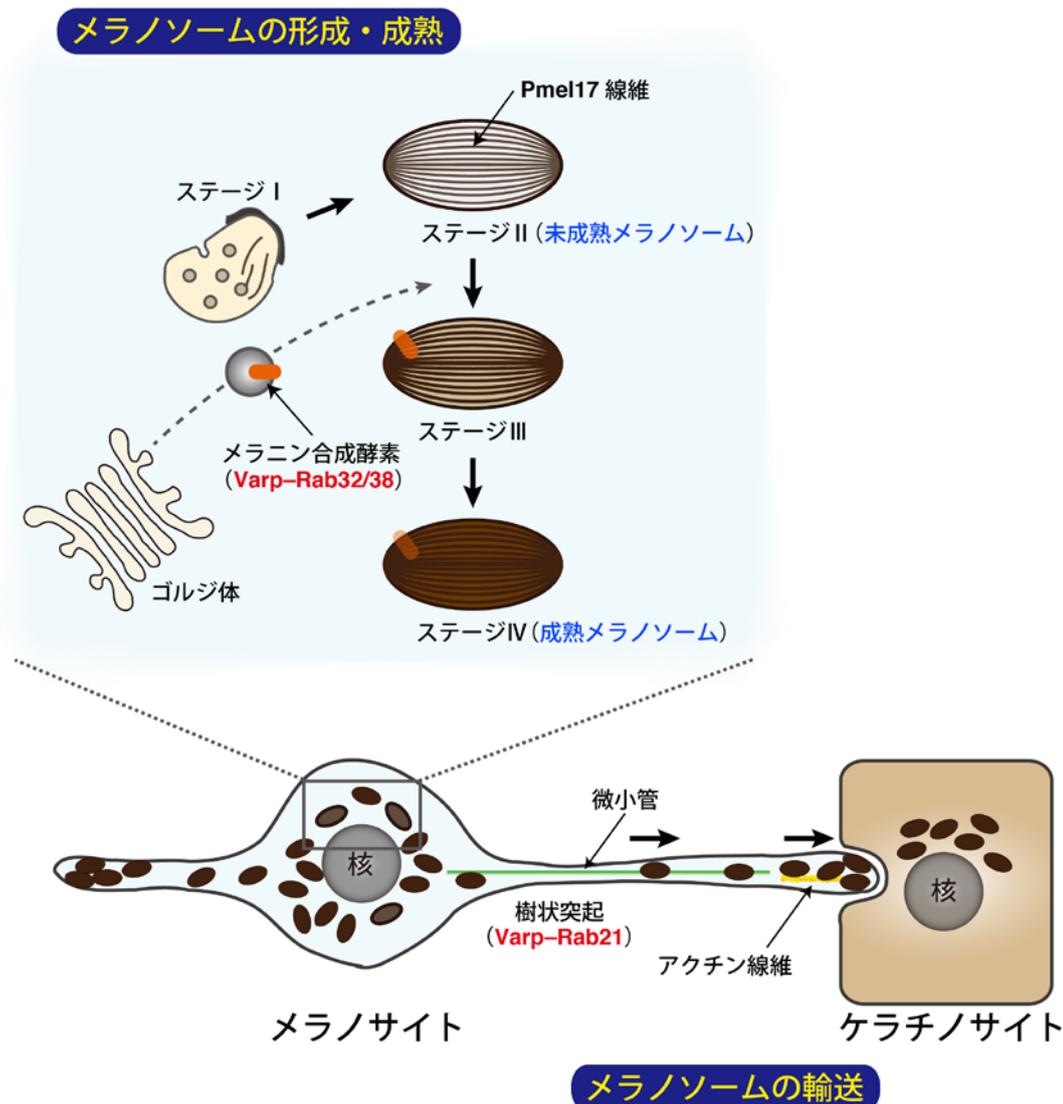


図1 メラノサイトにおけるメラノソームの形成・成熟・輸送の仕組み

メラニン色素を合成・貯蔵するメラノソームは、その成熟度合いによって形態学的に4つのステージに分類されています。ステージI、IIの段階（未成熟メラノソーム）では、メラノソームの元となる袋とメラニン色素が将来沈着する Pmel17 線維が形成されていますが、メラニン合成酵素が無いため色は付いていません。メラニン合成酵素は未成熟メラノソームとは別個に合成され、Varp-Rab32/38 (*2 参照) の作用により未成熟メラノソームへと輸送されます。その後、メラニン色素が Pmel17 線維に沈着して行き（ステージIII）、やがて黒いメラノソームへと成熟します（ステージIV）。核周辺で成熟したメラノソームは、細胞内の二種類の道路（細胞骨格：微小管とアクチン線維）に沿って細胞膜の直下まで輸送され、最終的に隣接するケラチノサイト（あるいは毛母細胞）に受け渡されて肌（あるいは髪の毛）の暗色化が起こります。なお、微小管上の輸送は順行性と逆行性の両方向性に輸送されますが、アクチン線維上の輸送は一方方向に起こります。これまでの本研究グループの解析で、微小管順行性輸送には Rab1A が、微小管逆行性輸送にはメラノレギュリンや Rab36 が、またアクチン輸送には Rab27A が関与することが既に明らかになっています。

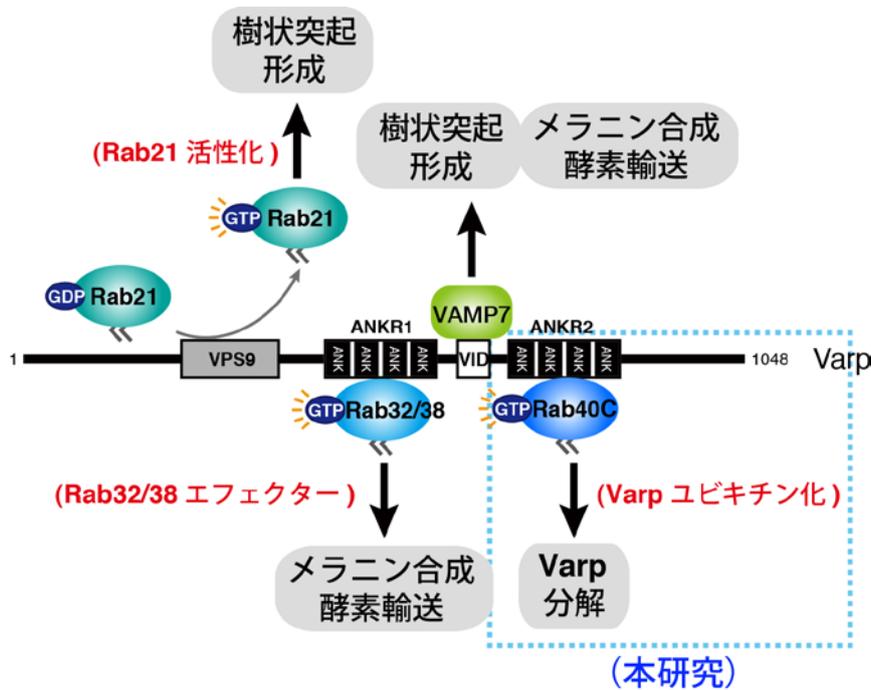


図2 Varp 分子の構造と機能

マウスの Varp 分子は 1048 アミノ酸からなり、アミノ末端側から Rab21 を活性化する VPS9 ドメイン、活性化型の Rab32/38 を結合する ANKR1 ドメイン、VAMP7 を結合する VID ドメイン、及びこれまで機能未知の ANKR2 ドメインにより構成されています (*2 参照)。これまでの研究で、Varp 分子はメラノサイトの樹状突起の形成とメラニン合成酵素 (チロシナーゼや Tyrp1) の輸送に関与することが明らかになっています。本研究により、ANKR2 ドメインには Rab40C (*3 参照) が結合することにより、Varp 分子の分解を制御することが明らかになっています。

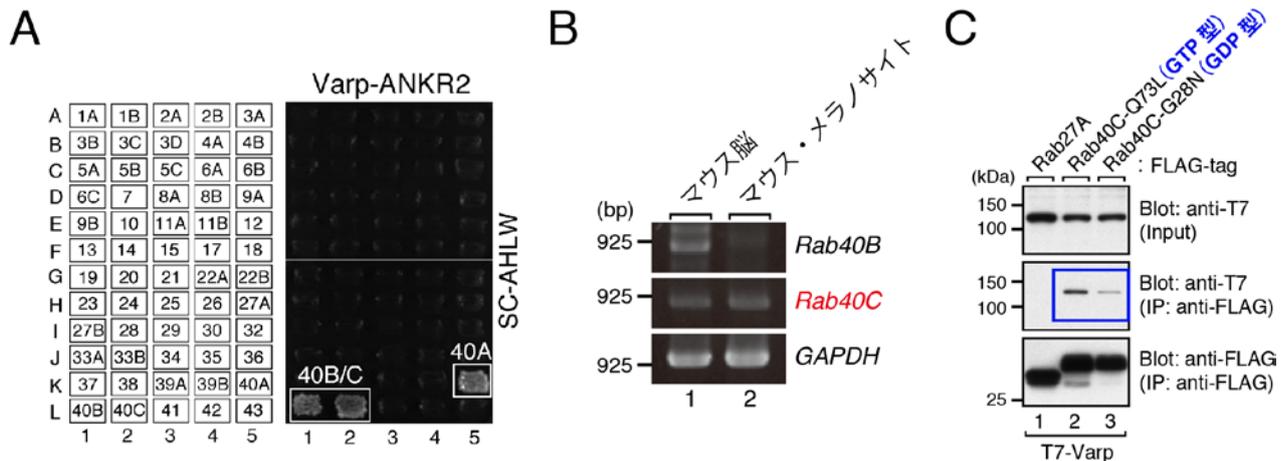
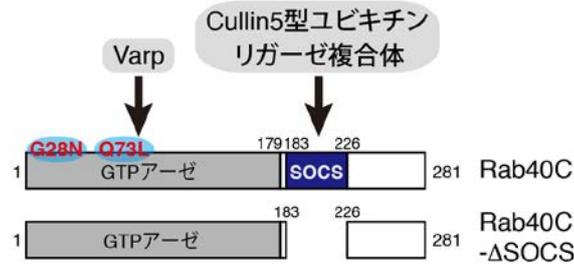


図3 Varp ANKR2 ドメインの新規結合分子 Rab40 の同定

(A) Varp 分子の ANKR2 ドメインは Rab32/38 を結合する ANKR1 ドメインとも相同性があり、酵母 two-hybrid スクリーニングの結果、ANKR2 ドメインには Rab40 のサブファミリー (Rab40A/B/C) が特異的に結合することが明らかになりました。(B) Rab40A はマウスには保存されていないため、Rab40B/C のマウスメラノサイトにおける発現を RT-PCR 法により確認したところ、Rab40C が主に発現していました。(C) Rab40C と Varp の結合は GTP 依存的で、常時不活性化型変異体 (G28N) よりも常時活性化型変異体 (Q73L) に強く結合しました。

A



B

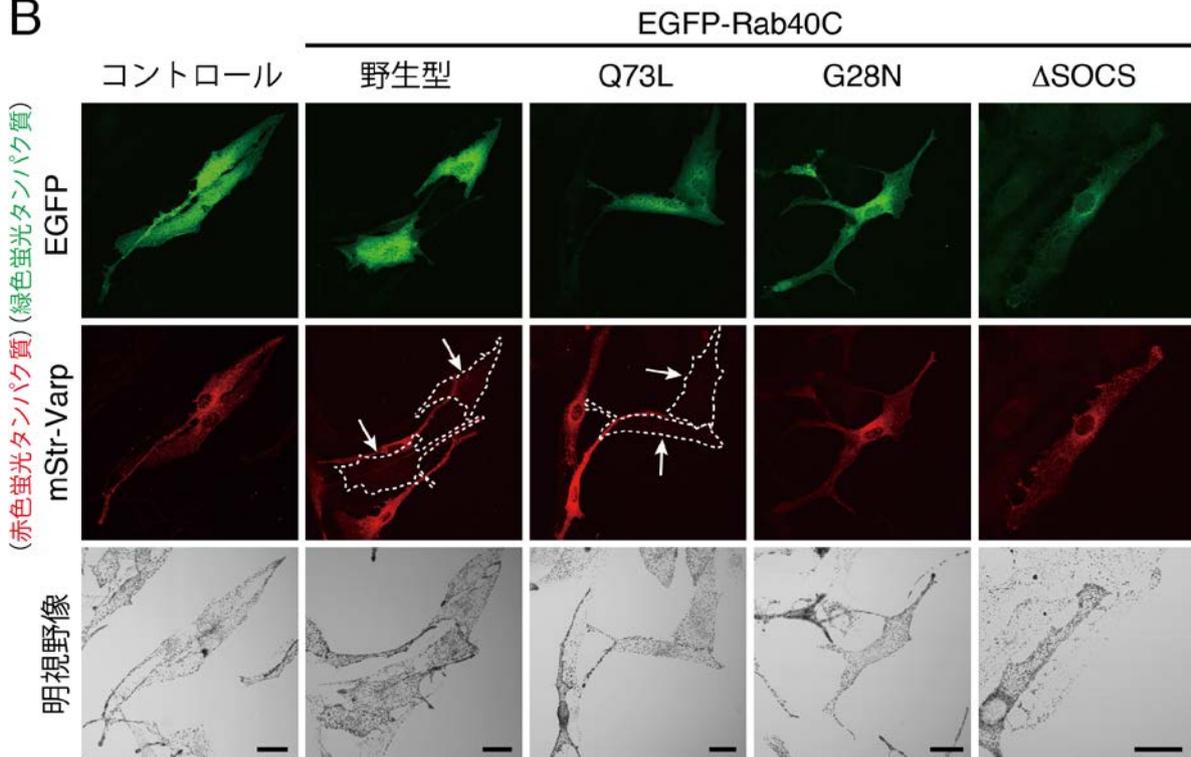


図4 Rab40Cの構造とVarpの発現への影響

(A) Rab40Cを含むRab40のサブファミリーは他のRabとは異なり、GTPアーゼドメイン (GTP/GDPを結合する領域) に加え、SOCSボックスと呼ばれるCullin5型のユビキチンリガーゼ複合体を結合する領域を有しています (*3 及び *4 参照)。VarpはRab40CのGTPアーゼドメインに結合しますので、SOCSボックスを欠損させたΔSOCS変異体でも野生型と同じようにVarpとの結合が観察されます。28番目のグリシン (G) をアスパラギン (N) に置換したG28N変異体は常時不活性化型 (GDP結合型) として、73番目のグルタミン (Q) をロイシン (L) に置換したQ73L変異体は常時活性化型 (GTP結合型) として作用します。(B) マウス培養メラノサイト (melan-a細胞) に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を付加したRab40C (野生型及び各種変異体) と赤色蛍光タンパク質 (mStr) を付加したVarpを発現させ、Varpの発現に対する影響を蛍光観察により検討しました。Varpとの結合能を有する野生型Rab40CやQ73L変異体を発現する細胞では、Varpの発現が顕著に低下していることが明らかになりました (点線の細胞、矢印)。一方、Varpとの結合能が弱いG28N変異体やCullin5型ユビキチンリガーゼ複合体と結合が出来ないΔSOCS変異体では、このようなVarpの発現低下は観察されませんでした。スケールバー = 20 μm。

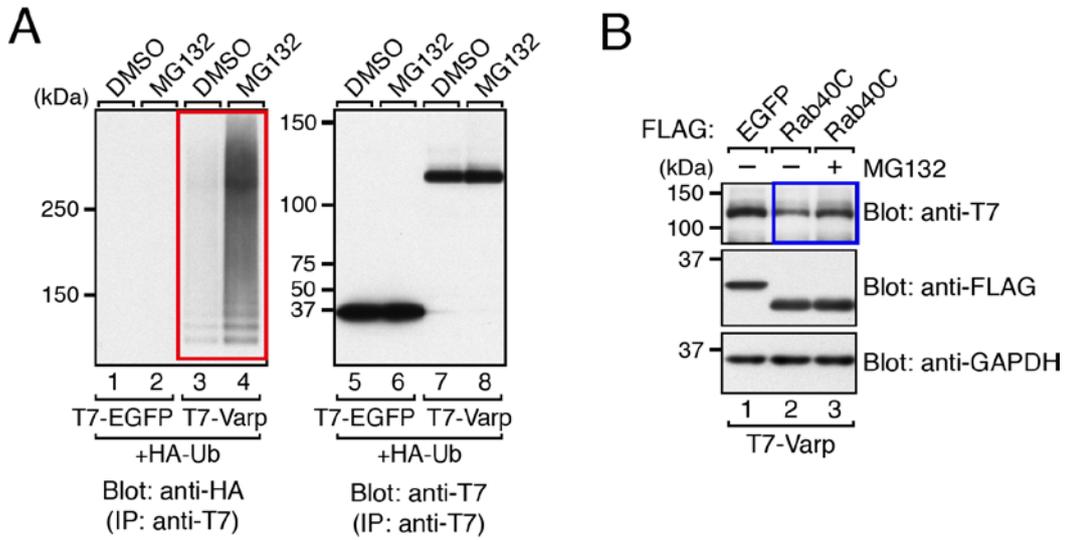


図5 Varp分子のユビキチン化と Rab40C 依存的な分解

(A) メラノサイトに発現した Varp 分子のポリユビキチン化 (赤枠)。プロテアソーム (*4 参照) の阻害剤である MG132 で処理すると、Varp 分子のポリユビキチン化 (HA タグ抗体で検出) がより顕著になります (レーン 3 と 4 の比較)。(B) Varp 分子のメラノサイトでの発現量は Rab40C の発現により低下し、この低下は MG132 処理により相殺されます (青枠)。

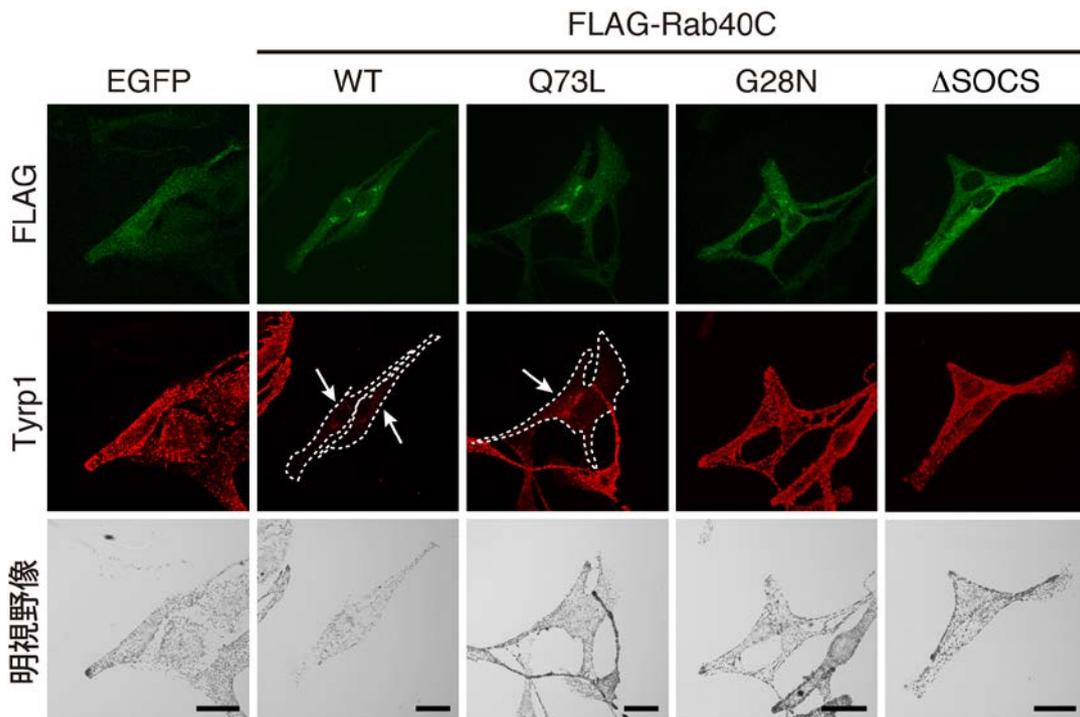


図6 Rab40C 発現によるメラニン合成酵素 Tyrp1 の発現低下

マウス培養メラノサイトに緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を付加した Rab40C (野生型及び各種変異体) を発現させ、メラニン合成酵素 Tyrp1 の発現に対する影響を免疫染色法により検討しました。野生型 Rab40C や Q73L 変異体を発現する細胞では、Varp 分子の発現が低下するため、Tyrp1 の発現が顕著に低下していることが明らかになりました (点線の細胞、矢印)。一方、G28N 変異体や ΔSOCS 変異体では、Varp の発現量に影響を与えないため、このような Tyrp1 の発現低下は観察されませんでした。スケールバー = 20 μ m。

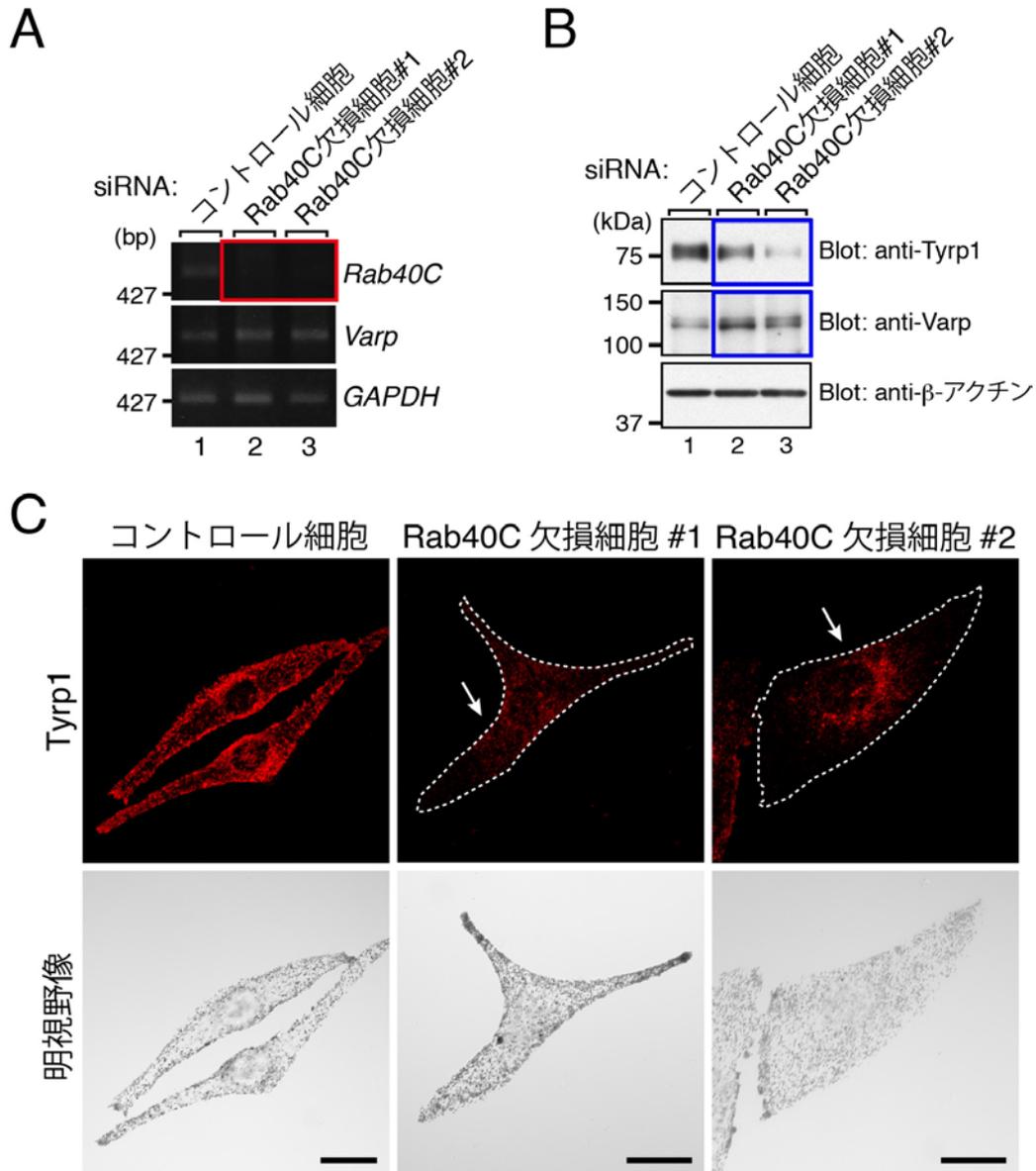


図7 Rab40C欠損細胞におけるメラニン合成酵素 Tyrp1の発現低下

(A) RNA干渉法を用いメラノサイトに内在性の *Rab40C* の mRNA をノックダウンしても (赤枠)、*Varp* の mRNA の発現量には影響はありません。(B) *Rab40C* を欠損させたメラノサイトでは、*Varp* 分子の分解が抑制されるため、*Varp* 分子のタンパク質発現量が増加します (青枠)。メラニン合成酵素のメラノソームへの輸送には適切な量の *Varp* が必要なため、*Varp* 分子が過剰に発現した状態ではメラニン合成酵素 Tyrp1 を正しくメラノソームに輸送できず、細胞内で分解されてしまいます。(C) このため、*Rab40C* を欠損させたメラノサイトでは Tyrp1 のシグナルの顕著な低下が観察されます (点線の細胞、矢印)。スケールバー = 20 μ m。

【用語説明】

* 1 メラノソーム

細胞内には膜で包まれた細胞内小器官（オルガネラ）と呼ばれる袋状の構造物が多数存在しています。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オルガネラで、メラノサイト（メラニン色素産生細胞）と呼ばれる特殊な細胞にのみ存在しています。メラニン色素を合成するメラニン合成酵素（チロシナーゼやチロシナーゼ関連タンパク質1（Tyrp1）など）は、はじめからメラノソームに存在する訳ではなく、メラノソームの袋の元（未成熟メラノソーム）ができてから、後からメラノソームへ輸送されます。成熟した黒いメラノソームは、その後メラノサイトの細胞内を細胞骨格に沿って輸送され（図1）、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。

* 2 Varp（ヴァープ）

Varp（VPS9-ankyrin-repeat protein）は分子内に VPS9 ドメインと呼ばれる Rab21（*3 参照）の活性化ドメイン（グアニンヌクレオチド交換因子）、2 個のアンキリンリピートドメイン（様々なタンパク質に見られる、33 アミノ酸の繰り返し配列で、分子間・分子内の相互作用に寄与）、VAMP7 を結合する VID ドメインを持つタンパク質です（図2）。これまでの研究で、Varp は VPS9 ドメインで Rab21 の活性化を行い樹状突起の形成を促進し、最初のアンキリンリピート（ANKR1）ドメインで活性化型の Rab32/38 を結合し（Rab32/38 のエフェクター分子として機能）、メラニン合成酵素のメラノソームへの輸送を制御すること、VID ドメインは樹状突起の形成とメラニン合成酵素の輸送の両方のプロセスに関与することが明らかになっています。一方、カルボキシル末端側の ANKR2 ドメインの機能はこれまで明らかではありませんでした。本研究により、ANKR2 ドメインには Rab40C（*3 参照）が結合し、Varp 分子のプロテアソームでの分解（*4 参照）を制御することが初めて明らかになりました。

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>

プレスリリース（2011年12月13日）

Varp 分子の新たな機能「樹状突起形成の促進作用」—メラニン色素のケラチノサイトへの転移に関与—

http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/%28HP%29tohokuuniv-press20111213_2.pdf

プレスリリース（2013年4月24日）

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～

http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press_20130422_01web.pdf

* 3 低分子量 G タンパク質 Rab40C と SOCS ボックス

膜で包まれた小胞（メラノソームなど）の輸送を適切に行うためには交通整理人（制御タンパク質）の存在が不可欠です。この交通整理人の一つとして酵母から高等哺乳動物のヒトまで普遍的に存在しているのが、低分子量 G タンパク質 Rab（ラブ）です。Rab は GTP というヌクレオチドを結合した活性化型と GDP を結合した不活性化型の二つの状態をとり、活性化型の GTP-Rab（例えば GTP-Rab32/38）がエフェクターと呼ばれる特異的なタンパク質（例えば Varp ANKR1）と結合することにより小胞（例えばメラニン合成酵素を含む小胞）を輸送します。不活性化型の GDP-Rab を GTP-Rab に変換し、活性化を行う酵素をグアニンヌクレオチド

交換因子（GEF）と呼び、Varp の VPS9 ドメインは Rab21 の活性化を行います。

Rab40C も Rab の一種ですが、他の Rab とは異なり、SOCS（suppressor of cytokine signaling）ボックスと呼ばれる Cullin5 型のユビキチンリガーゼ複合体（*4 参照）と結合する領域をさらに持っています（図 4 A）。しかし、哺乳動物の Rab40 の SOCS ボックスの機能はこれまで明らかではありませんでした。今回の研究により、Rab40C は Cullin5 型ユビキチンリガーゼ複合体と基質となる Varp の両方に結合し、Varp のユビキチン化と分解を促進することが明らかになりました。

* 4 ユビキチン-プロテアソーム

2004 年のノーベル化学賞の対象となった生命現象で、ユビキチンリガーゼ（今回の場合、Cullin5 型ユビキチンリガーゼ複合体）の作用により、ユビキチン（76 アミノ酸からなるタンパク質）が標的タンパク質（今回の場合、Varp）のリジン残基に付加されます。ユビキチンのリジン残基にはさらに次のユビキチンが付加され、ポリユビキチン化された標的タンパク質はプロテアソームと呼ばれるタンパク質分解酵素で分解されます。

【論文題目】

Yatsu, A., Shimada, H., Ohbayashi, N. & Fukuda, M. (2015) Rab40C is a novel Varp-binding protein that promotes proteasomal degradation of Varp in melanocytes. *Biol. Open*, in press (DOI: 10.1242/bio.201411114)

「メラノサイトにおいて Rab40C は Varp 分子に結合し、プロテアソームでの分解を促進する」

(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

東北大学大学院生命科学研究科広報室

広報担当 高橋 さやか

Eメール： lifsci-pr@ige.tohoku.ac.jp