

チロジナーゼ抑制因子の精製と応用

北里研究所メディカルセンター病院

亀山 孝一郎

Using antibodies that recognize either tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), or tyrosinase-related protein-2 (TRP2, DOPAchrome tautomerase), the quantities of those melanogenic enzymes were analyzed in five melanoma cell lines that possess various degrees of melanin production. There was a positive correlation between quantities and synthetic rates of those melanogenic enzymes and their melanin formation. Surprisingly, pigmented cells showed higher levels of melanogenic inhibitors activity. These results clearly suggest that melanin production is regulated by a subtle balance between the activities of these enzymes and other factors such as the melanogenic inhibitor.

概要

メラニン産生に関与する3つの酵素、すなわち、チロジナーゼ、チロジナーゼ関連蛋白1、チロジナーゼ関連蛋白2 (DOPAchrome tautomerase) を認識する抗体を用いて、これらメラニン産生に関与する酵素の量とメラニン産生の関係について検討した。なお使用した細胞はメラニン産生能の異なる5つの細胞株である。JB/MS-Wを除くすべての細胞は4日間のMSH処理にてメラニン産生能を4倍から30倍まで増加した。JB/MS-Wのメラニン産生能はMSHの処理の有無にかかわらずバックグラウンド以下であった。これら3つの酵素の量ないしは合成速度と細胞のメラニン産生能の間には正の相関関係が認められた。JB/MS-Wを用いて熱耐性型のチロジナーゼ抑制因子の精製を行ったところ、20,000倍以上の精製

効率であった。また各細胞が有している熱耐性型チロジナーゼの抑制因子の量を検討したところ、驚くべきことに、メラニン産生の高い細胞のほうが低い細胞よりも、大量のチロジナーゼ抑制因子を有していた。MSH処理をした際にはメラニン産生が上昇するが、この際にはチロジナーゼ活性の上昇とメラニン産生の抑制因子の活性の低下が観察された。興味深いことには熱耐性型のチロジナーゼ抑制因子はチロジナーゼの活性だけでなく、チロジナーゼ関連蛋白2 (DOPAchrome tautomerase) の活性も抑制した。これらの結果はメラニン産生がチロジナーゼ、チロジナーゼ関連蛋白1、2およびそれらの抑制因子により微妙に制御されていることを強く示唆する。さらに熱耐性型の抑制因子のメラニン産生後期に及ぼす影響を人由来のメラノーマを用いて検討したところ、抑制因子は5,6-dihydroxyindole (DHI) の酸化反応をチロジナーゼの存在下、あるいは非存在下にて抑制した。このことはこの抑制因子がメラニン産生の各種段階にてメラニン産生を制御していることを示唆している。

Purification of melanogenic inhibitor



Koichiro Kameyama

Kitazato Institute
Medical Center Hospital

材料および方法

1. 培養細胞

C57/BL6 マウス由来の JB/MS メラノーマ細胞およびそのサブクローン、B16F10 メラノーマ細胞を用いた。培養は10%の牛の血清を添加した Dulbeccos' modified Eagle's medium を用いた。

2. 抗体

チロジナーゼのC末端を認識する Anti-PEP7 抗体、チロジナーゼ関連蛋白1を認識する TMH1 モノクローナル抗体、チロジナーゼ関連蛋白2を認識する Anti-PEP8 抗体を用いた。

3. フローサイトメトリー

2×10^6 個の細胞を70%エタノールにて固定した後に50 μ lの抗体を加え、4 $^{\circ}$ Cにて1時間反応させた後に FITC をラベルした2次抗体を反応させた。2回洗浄の後に解析を行った。

4. メラニン産生能の評価

14 C-tyrosine を用いメラニン産生を測定した。

5. 免疫沈降法

35 S-methionine を用いて型どおり行った。

6. チロジナーゼ抑制因子の精製

JB/MS-W メラノーマ細胞をヌードマウスに植え込み採取した。腫瘍500グラムあたり2.5リッターの純水を加え Polytron disruptor にて細胞を粉碎した。酢酸にて pH5.3 として 65 $^{\circ}$ C 1時間処理した。40,000G、10分遠心し、上澄みを採取した。次に0.45 μ mのミリポアを通過させ Ultra-filtration にて分子量1,000以下を採取した。NH₄OH にて pH8.5 とし DEAE25 を通過した後に酢酸にて pH を 3.5 として Dowex50w-8 を通過させた。Evaporation の後にメタノール

を添加し、40,000G、20分遠心、上澄みを採取した。そしてクロロホルムを添加し40,000G、20分遠心し、脱塩の後に順相シリカゲルを通過させチロジナーゼ抑制活性を有する部分を採取した。

7. Gelfiltration Chromatography

細胞成分を1% NP40 にて抽出した後に SephadexG75 を通過させた。

8. チロジナーゼの精製

B16 メラノーマを用いて、カラム電気泳動法にて精製を行った。

9. 抑制因子のDHIに及ぼす影響

生成した DHI は東ソーの4mm \times 25cm RP-18 カラムを用いて HPLC にてモニターした。溶媒は0.15 M Na₂B₄O₇/methanol (75%:25%)、pH2.5を用い、毎分0.5mlにて流した。DHIの検出は東ソーの紫外線検出器にて波長280nmにて行った。

結果

1. メラニン産生能と MSH の効果

チロジナーゼが触媒する反応である tyrosine hydroxylase、メラニン産生、DOP Achrome tautomerase の活性の間には正の相関関係が認められた (表1)。

表1 各種細胞のメラニン産生能(pMOL/10⁵ cells/h)

メラニン類性	Tyrosine hydroxylase	メラニン産生能	DOP Achrome tautomerase
JB/MS	++	137	19
JB/MS P	+	101	14
JB/MS W	-	6	2
JB/MS B	++	980	275
B16F10	++	725	32

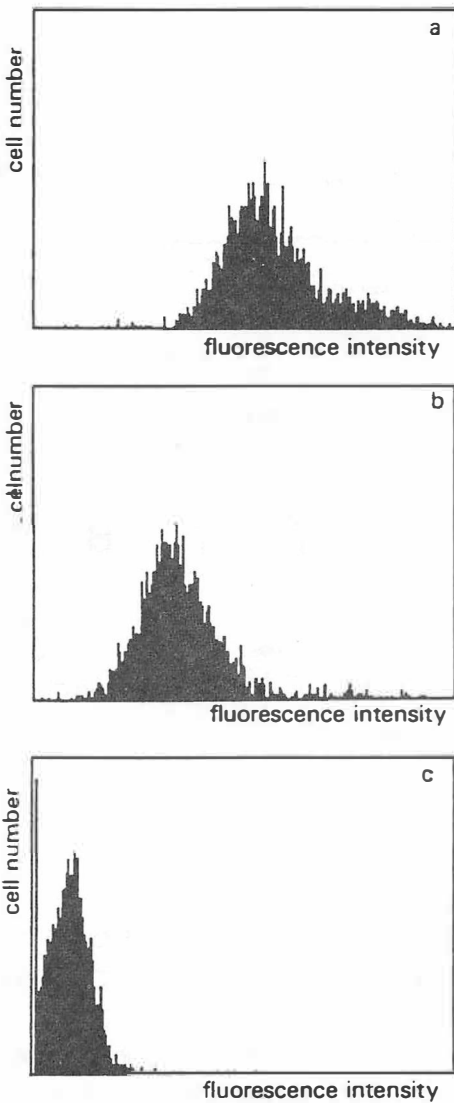


図1 Flow cytometric analysis of tyrosinase
a. JB/MS tyrosinase, b. JB/MS-W tyrosinase, c. Negative control

2. メラニン産生に關与する酵素の量および合成速度

フローサイトメトリーの結果を図1に示す。メラニン産生の異なる細胞間においてメラニン産生量とチロジナーゼの量との間には正の相関関係が認められた(図1、2)。またチロジナーゼ、チロジナーゼ関連蛋白1、2の合成速度とメラニン産生能の間にも正の相関関係が認められた(図3)。

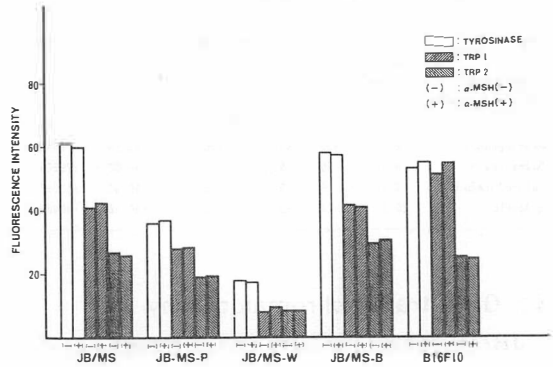


図2 Flow cytometric analysis of tyrosinase, TRP1 and TRP2

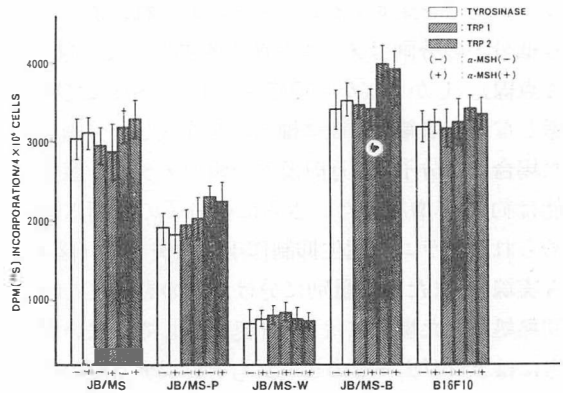


図3 Synthesis of tyrosinase, TRP1 and TRP2

3. チロジナーゼ抑制因子の精製

100グラムのJB/MS-W細胞を100mlの純粋を用いて精製を行った際の代表的なデータを示す(表2)。Dowex50WX-8以降の段階は蛋白濃度が低く測定限度以下のため実際の精製効率率は判定不能であった。しかしその後順相クロマトグラフィーの精製法を加えることにより、ほぼシングルピークの活性を得ることができた。

異なるメラニン産生能を有する細胞よりチロジナーゼ抑制因子を精製しその活性を比較したところ、驚くべきことにメラニン産生能とチロジナーゼ抑制因子の活性との間には正の相関関係が認められた。

表2 チロジナーゼ抑制因子の精製効率

段階	総電量 (mz)	総量 (ml)	抑制率 (%)	総合抑制活性 (unit)	特異的抑制	精製効率
最初の抽出液	100,000	500	76	1000	0.01	1
pH5.5, 65°C処理	80.0	450	65	675	8.44	844
Ultrafiltration	24.5	430	60	538	21.96	2196
DEAESephadex	4.5	430	55	430	95.56	9556
Dowex50W X 8	<0.1	20	15	5	>50.00	>10000
chloroform抽出	<0.1	5	28	3	>50.00	>10000
順相HPLC	<0.1	4	20	3	>50.00	>10000

4. Gel filtration chromatography

JB/MS細胞の1% NP40抽出液をSephadexG75を通過させて分子量別に分けて、精製したチロジナーゼに加えメラニン産生能に対する効果を検討した。その結果、分子量約7万のところにメラニン産生を促進するピークが認められ、またより低分子の分画はメラニン産生を抑制した(図4A点線)。しかしながら細胞を4日間MSHにて刺激しながら培養した後に抽出液を作成し、分画した場合には分子量7万前後の分画のメラニン産生能は約20倍増加した。さらに低分子の分画に認められたメラニン産生抑制作用は消失した(図4A実線)。また分子量別に分けたものを65°C1時間熱処理した場合にはMSH処理をしていない場合にはチロジナーゼのピークもチロジナーゼの抑制因子のピークも残るが(図4B点線)、MSH処理をしている場合には驚くべきことに、低分子分画に認められたチロジナーゼに対する抑制因子は逆に促進因子となった(図4B実線)。

5. チロジナーゼ抑制因子のチロジナーゼ、チロジナーゼ関連蛋白2、メラニン産生に及ぼす効果

チロジナーゼの抑制因子をチロジナーゼが触媒する tyrosine hydroxylase activity に対する効果を検討したところ1280倍までチロジナーゼ抑制因子を希釈しても酵素反応を抑制した(図5上段)。メラニン産生についても1280倍まで希釈しても抑制効果が観察された。また興味深いことには10倍希釈までの高濃度においてはチロジナーゼ関連蛋白2(DOPAchrome tautomerase)

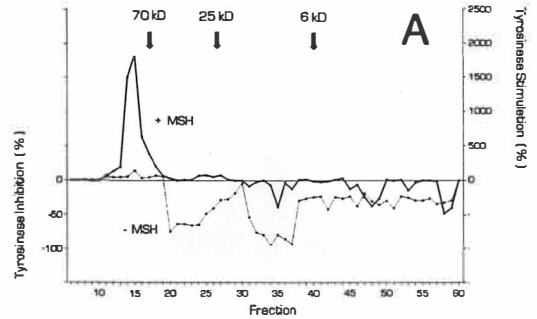


図4A

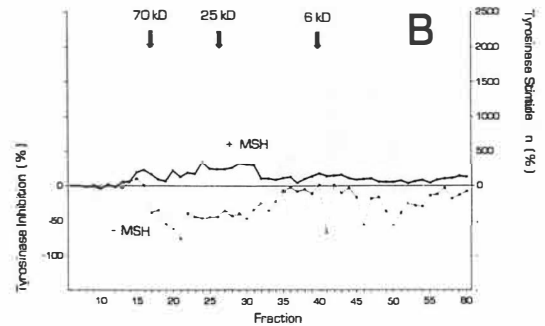


図4B

の活性をも抑制した(図5中段)。またメラニン産生は1280倍まで抑制因子を希釈しても認められた(図5下段)。

次に抑制因子のDHIの酸化に及ぼす影響を検討したところ37°C、60分の処理にて10%のDHIが失われた(図6a,b)。DHIをチロジナーゼの存在下にて同処理をしたところ50%のDHIが失われた(図6c)。しかしながらDHIをチロジナーゼと抑制因子の存在下にて処理したところDHIの低下率はわずか25%であった(図6d)。興味深いことにはDHIを抑制因子の存在下のみにて処理した場合にはDHIの量は全く不変であった(図6e)。

考 察

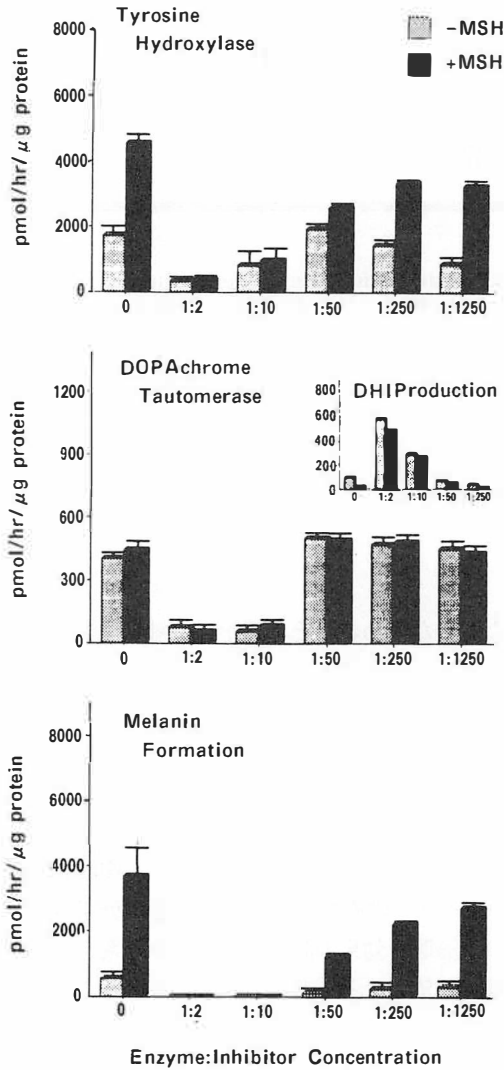


図 5

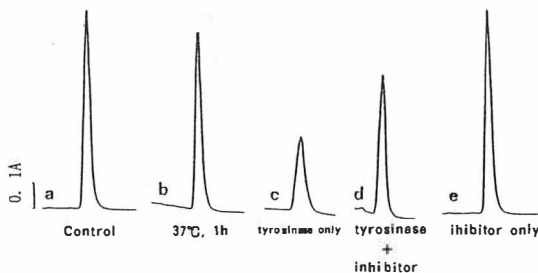


図 6

メラニン産生の盛んな細胞ほどチロジナーゼの抑制因子をよりたくさん有していることは興味深い結果であった(表3)。またこの抑制因子がMSH処理にて活性を失い、さらに熱処理をすることによりメラニン産生を逆に刺激した(図4)。以上の結果はチロジナーゼの抑制因子が実はチロジナーゼ抑制因子-中性因子-チロジナーゼ促進因子と変化することでメラニン産生を制御していることを明らかにした。またよりたくさんのメラニン産生を制御するためにはよりたくさんの制御因子(抑制因子)が必要とされることを明らかにした。また抑制因子のDHIに及ぼす影響を検討したところ抑制因子はDHIの特発的な酸化のみならず、チロジナーゼ依存性の酸化を抑制した。以上の結果はチロジナーゼの抑制因子として我々が追っていたものが、チロジナーゼが触媒するメラニン産生初期のtyrosine hydroxylaseだけでなくDOPAchrome tautomerase、そしてDHI oxidationをも制御していることを示唆する。

さて精製の結果であるが従来の方法に順相クロマトグラフィーの手段を加えることにより、紫外線235nmにてほぼシングルピークの分画が採取された。このメラニン産生の制御因子の構造決定を行うことにより、生体内におけるメラニン産生の制御機構が明らかになることが期待される。現段階での精製効率は20,000倍であった。

表3 メラニン産生能に対するチロジナーゼ抑制因子の効果

	粗精製分画	低分子分画
コントロール	16±2 pmol/16h	
JB/MS	86%	73%
JB/MS-P	80%	70%
JB/MS-W	60%	42%
JB/MS-B	88%	76%
B16F10	86%	72%