

高発現型メラニン色素産生遺伝子のコスメトロジーへの応用

杉山 政 則¹⁾、熊谷 孝 則¹⁾、森田 栄 伸²⁾

広島大学 医学部総合薬学科¹⁾、広島大学附属病院 皮膚科²⁾

筆者らは 200 種以上の放線菌を検索した成果として、*Streptomyces(S.)castaneoglobisporus* HUT6202 が、既にメラニン色素を産生することが知られている他の放線菌 *S.antibioticus* に比べ、100 倍以上高いメラニン色素産生能を有することを見出した。そこで、ショットガンクローニング法を用いて、本菌の染色体 DNA からメラニン色素産生遺伝子 (*mel*) をクローニングし、*mel* 遺伝子の構造を調べた結果、*S. castaneoglobisporus* の *mel* 遺伝子は、チロシナーゼをコードする 819 bp から成る遺伝子 (*tyrC*) とそのすぐ上流に存在する 378 bp から成る遺伝子 (*orf378*) とでオペロンを形成していることが明らかになった。

orf378 によってコードされるタンパク質の機能については、未だ不明な点が多いが、チロシナーゼ活性に必須な銅イオンの輸送に関与しているものと考えられている。

本研究は、以下に述べる 2 つを最終目標としている。そのひとつは、ヒトケラチノサイトおよびアルビノマウス毛穴細胞 (albino mouse hair follicle cells) において、*S.castaneoglobisporus* 由来 *mel* 遺伝子の発現系を構築することである。この系は、将来的に白斑病の遺伝子治療や白髪を黒髪に再生するための遺伝子治療へ応用できるものと考えられる。もうひとつは、*mel* 遺伝子を恒常的に発現する細胞株を樹立することである。樹立した細胞株はチロシナーゼ活性を阻害する物質を検定する細胞として利用できることから、美白成分を検索するための新規スクリーニング系が構築可能になると考えられる。

上記に掲げた最終目標を達成するためには、微生物由来の *mel* 遺伝子が真核細胞で発現可能か否か調査する必要がある。そこで、本研究では、COS-7 細胞およびヒト角化細胞 (keratinocyte) A431 株を用いて *mel* 遺伝子の発現を検討した成果について報告する。

【結果および考察】

1. COS-7 細胞における *mel* 遺伝子の発現性

まず、*mel* 遺伝子の真核細胞での発現性を COS-7 細胞を用いて調査した。*mel* 遺伝子に含まれる *tyrC* および *orf378* をそれぞれ PCR で増幅した後、真核細胞用ベクター-pcDNA 3.1 (-) および pcDNA 3.1/Hygro (-) にそれぞれ挿入し、それらの発現ベクターを構築し、COS-7 細胞への遺伝子導入実験を行った結果、*orf378* を保有するベクターのみ、あるいは、*tyrC* を保有するベクターのみを transfect した COS-7 細胞においては、チロシナーゼ活性は全く認められなかった。一方、*tyrC* を保有するベクターと *orf378* を保有するベクターを co-transfect した COS-7 細胞においては、チロシナーゼ活性が認められた。以上の結果から、*S. castaneoglobisporus* 由来の *mel* 遺伝子は真核細胞において発現可能であることが明らかになるとともに、チロシナーゼの活性発現には *tyrC* のみでは不十分であり、*orf378* の存在が必須であることがわかった。

2. *mel* 遺伝子の発現量の検討

発現するチロシナーゼ活性を高くする目的で Kozak の知見に基づき、1)スタートコドン(ATG)の直前に 5'-GCCGCCACC-3'(コザック配列)が存在する 2)スタートコドン直後の塩基が G である、という特徴を導入した *orf378* および *tyrC* 遺伝子を PCR 法により増幅し、*orf378* 系については pcDNA 3.1/Hygro (-) *tyrC* 系については pcDNA 3.1 (-) に挿入し、発現ベクターを構築した。構築後、それらを以下の組み合わせにしたがって COS-7 細胞に導入し、導入細胞におけるチロシナーゼ活性を比較した。その結果、コザック配列の挿入と 4 番目の塩基を G に置換することが、チロシナーゼ活性を上昇させるのに有効であることが改めて確認された。

3. *mel* 遺伝子の安定形質発現株の樹立

mel 遺伝子を構成的に発現する細胞株は、チロシナーゼ活性を阻害する物質を検索するための検定細胞として利用可能である。本研究では、Keratinocyte A431 細胞を用いて *mel* 遺伝子の安定形質発現株の樹立を試みた。*orf378* 用発現ベクターは hygromycin 耐性遺伝子を、*tyrC* 用発現ベクターは geneticin 耐性遺伝子を有することから、それぞれのベクターを A431 細胞に導入した後、2つの薬剤を用いて二重選択を行った。その結果、1つのクローンを得ることができた。現在、このクローンを増殖中であり、今後、本クローンのチロシナーゼ活性を測定する予定である。