

紫外線誘発メラニン合成への スフィンゴシン 1-ホスフェートの抑制効果の検討

神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座皮膚科学

錦 織 千佳子

Melanin content in pigment cells is regulated by multiple mechanisms. We have previously shown that melanogenesis in mouse B16 melanoma cells is inhibited by activation of phospholipase D through ubiquitin proteasome-mediated degradation of tyrosinase. Further, we have recently found that sphingosine 1-phosphate, a lipid messenger that is implicated in the regulation of a wide variety of important cellular events acting through intracellular as well as extracellular mechanisms, suppresses melanin content in B16 cells. In this study, the involvement of phospholipase D and sphingosine kinase, a key regulator of intracellular sphingosine 1-phosphate level, in ultraviolet B-induced skin pigmentation and sphingosine 1-phosphate-induced suppression of melanin content in B16 cells was examined. Neither phospholipase D activity nor sphingosine kinase activity in B16 cells was affected by ultraviolet B, suggesting that these enzymes are not involved in ultraviolet B-induced pigmentation. We next investigated the involvement of phospholipase D and sphingosine kinase in the sphingosine 1-phosphate-induced suppression of melanin content. sphingosine 1-phosphate did not activate phospholipase D in B16 cells, indicating that phospholipase D activation is not involved in the sphingosine 1-phosphate-induced suppression of melanin content. However, treatment of B16 cells with the sphingosine kinase inhibitor dimethylsphingosine resulted in an increase in melanin content without affecting tyrosinase activity. Melanosomes were highly aggregated in the cells treated with dimethylsphingosine. Furthermore, sphingosine kinase colocalized with the aggregated melanosomes. These results suggest that sphingosine 1-phosphate, that is derived from sphingosine in the melanosome membrane through the catalytic activation of sphingosine kinase, regulates melanin content through melanosome distribution.

1. 緒 言

哺乳動物のメラニンは、色素細胞に存在する特殊な細胞内小器官であるメラノソーム内で合成される。メラノソームにおいて、メラニン合成はチロシナーゼによるチロシンの酸化反応を始めとする多段階のステップを経て遂行される。メラニンはこのステップの中で生じた色素を有する様々な生体高分子の混合物である。メラニンで満たされたメラノソームは色素細胞の樹状突起内を突起端まで運ばれ、色素細胞の周囲に存在する角化細胞に移送され、紫外線からの皮膚の防御、種々の毒物・化学物質の吸収、肌色の違いの原因等に重要な役割を果たしている。

我々は色素細胞内メラニン量調節機構の研究過程で、マウス黒色腫由来 B16 細胞をスフィンゴシン 1-ホスフェート (S1P) 処理した際、細胞内メラニン量が減少することを見い出した。S1P は生体膜スフィンゴ脂質由来の代謝産物で、細胞内セカンドメッセンジャーとして、あるいは細胞膜表面レセプターを介するリガンドとして働く新規の情報伝達脂質として注目されている¹⁾。細胞内 S1P レベル

は大部分スフィンゴシンキナーゼ (SPHK) によるスフィンゴシン代謝により制御されている。SPHK には SPHK1、SPHK2 の 2 つの分子種が存在する。一方、我々は細胞膜情報変換酵素であるホスホリパーゼ D (PLD) 活性化が同じく B16 細胞においてチロシナーゼのユビキチン-プロテアソーム系分解を促進した結果、メラニン生成抑制を起こすことを見い出し報告している²⁾。ある種の細胞では S1P により細胞内 PLD が活性化されることが報告されている^{3,4)}。

本研究において我々は、皮膚の色素沈着を起こす紫外線および色素細胞内メラニン量を減少させる S1P それぞれの作用への SPHK、PLD 活性化の関与を検討した。

2. 実 験

1) 細胞

マウス黒色腫由来 B16 細胞を使用し、継代および実験には 10%FCS を含む Eagle's minimal essential medium を用いた。

2) SPHK アッセイ

SPHK アッセイは、細胞溶解液とスフィンゴシンを ³²P で標識された ATP 存在下で反応させ、生成した S1P を薄層クロマトグラフィーにより分離し、S1P 中に含まれる ³²P をバイオイメージング分析器 (BAS2000, Fuji Photo Film) により測定することにより行った。

3) PLD アッセイ

PLD 活性は、¹⁴C で標識されたリゾホスファチジルコリ



Role of sphingosine 1-phosphate in ultraviolet-induced melanogenesis

Chikako Nishigori

Kobe University Graduate School of Medicine, Department of Clinical Molecular Medicine, Division of Dermatology

ンで標識した細胞をエタノール存在下で S1P で 30 分刺激したあと、ホスファチジル基転移反応によって生成されたホスファチジルエタノール中の ^{14}C 放射能が脂質中に取り込まれた全放射能に占める割合で表した。

4) メラニン定量およびチロシナーゼアッセイ

これまでに我々が用いた方法²⁾で行った。

5) 免疫染色及び観察

細胞の固定は 3% パラホルムアルデヒド/PBS で 20 分行った。0.2% Triton X-100 処理および BSA によるブロッキング後、抗メラノソーム抗体 (HMB45) および抗 SPHK1 抗体にて反応させ、2 次抗体にて発色後、共焦点顕微鏡にて観察した。

3. 結果

3.1 紫外線が SPHK、PLD 活性に及ぼす影響

B16 細胞に紫外線 B を 5、10、30mJ/cm² 照射したときの PLD、SPHK 活性を測定したが、どの照射量の場合も SPHK、PLD 活性には影響を与えなかった (データ省略)。

3.2 S1P が細胞内のメラニン量、PLD 活性に及ぼす影響

B16 細胞を 10 μM S1P で処理すると 72 時間後には細胞内のメラニン量はコントロールに比べて減少していた (図 1A)。しかし、10 μM S1P 処理により B16 細胞内の PLD は活性化されなかった (図 1B)。

3.3 SPHK 阻害剤が細胞内のメラニン量、メラノソームの局在に及ぼす影響

B16 細胞には S1P レセプターが発現していることは示

されている⁵⁾が、S1P による B16 細胞内メラニン量減少は、細胞膜 S1P レセプターを刺激するのに用いられる S1P 濃度に比べて高い濃度を要するため、S1P は細胞内に直接入って効果を現わしている可能性を考え、細胞内の S1P レベルを制御する SPHK の関与について検討することにした。B16 細胞を SPHK 阻害剤である dimethylsphingosine (DMS) (3 μM) で処理したところ、72 時間後にはコントロールに比べて細胞内メラニン量は増加していた (図 2A)。しかし、チロシナーゼ活性は DMS 処理細胞とコントロール細胞で差がなかった (図 2B)。DMS 処理した B16 細胞内における SPHK1 の局在をメラノソームの局在と比較したところ、DMS 処理によりメラノソームは凝集し (図 3)、このときメラノソームと SPHK1 の局在はよく一致していた (図 4)。

4. 考察

紫外線 B は PLD、SPHK 活性には影響を与えなかったため、紫外線による皮膚色素沈着機序への PLD、SPHK 活性変化の関与は否定的と考えられた。次に我々は、S1P による B16 細胞内メラニン量減少機序への PLD、SPHK 活性の関与を調べた。まず、S1P が B16 細胞表面のレセプターを介して PLD 活性化を起こし、その結果我々が以前報告した機序¹⁾、すなわちチロシナーゼのユビキチン-プロテアソーム系分解促進により細胞内メラニン量が減少する可能性を考え、B16 細胞内のメラニン量を減少させる濃度の S1P による PLD 活性化は起こらず、この S1P が PLD 活性化を介してメラニン量を減少させる可能性を否定した。次に、S1P が細胞内に入って効果を発揮する可能性を考え、細胞内の S1P 量を制御する SPHK の阻害剤

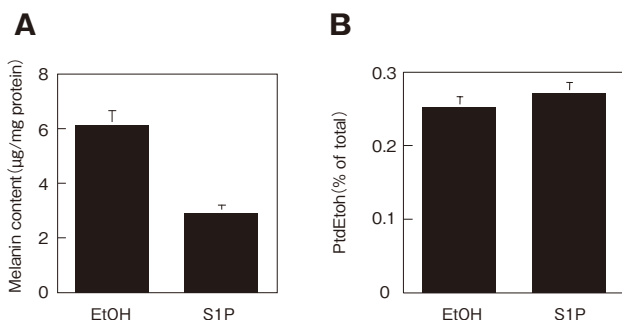


図 1 (A) S1P 処理による B16 黒色腫細胞内メラニン量の変化 B16 細胞を 10 μM S1P 処理し、72 時間後のメラニン量をコントロール (0.1% エタノール: EtOH) 細胞とともに測定した。(B) S1P 処理による B16 黒色腫細胞内 PLD 活性変化: B16 細胞に ^{14}C で標識されたリゾホスファチジルコリンを取り込ませ、エタノール存在下で 10 μM S1P で 30 分刺激し、PLD 活性をコントロール (0.1% エタノール: EtOH) 細胞とともに測定した。PLD 活性は、ホスファチジル基転移反応によって生成されたホスファチジルエタノール (PtdEtOH) 中の ^{14}C 放射能が、脂質中に取り込まれた全放射能に占める割合で表した。

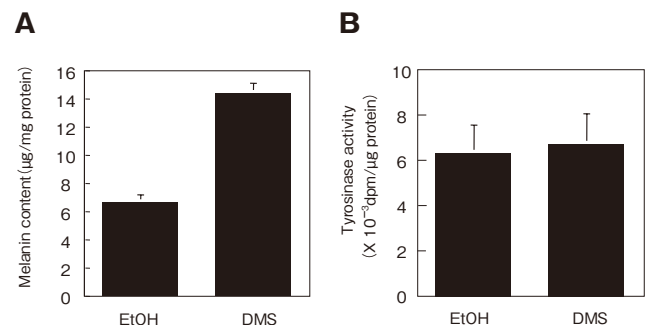


図 2 (A) DMS 処理による B16 黒色腫細胞内メラニン量の変化 B16 細胞を 3 μM DMS 処理し、72 時間後のメラニン量をコントロール (0.1% エタノール: EtOH) 細胞とともに測定した。(B) DMS 処理による B16 黒色腫細胞内チロシナーゼ活性変化: B16 細胞を 3 μM DMS 処理し、72 時間後のチロシナーゼ活性をコントロール (0.1% エタノール: EtOH) 細胞とともに測定した。

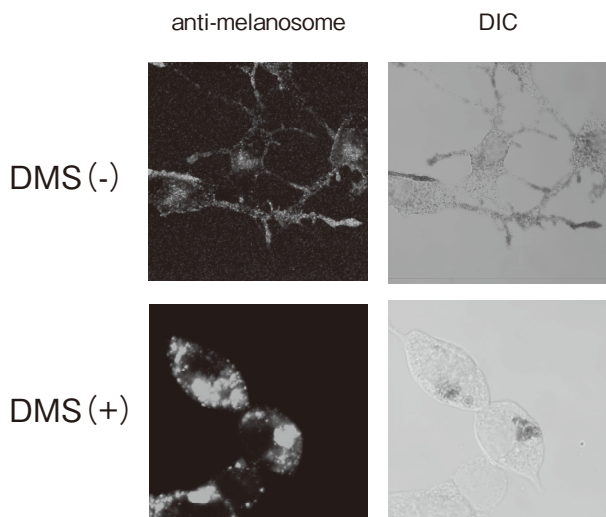


図3 DMS 処理による B16 黒色腫細胞内のメラノソーム局在の変化

B16 細胞を 3 μ M DMS 処理し (DMS (+))、72 時間後、DMS 処理を行わなかった細胞 (DMS (-)) とともに抗メラノソーム抗体 (anti-melanosome) を用いて免疫染色を行い共焦点顕微鏡にて観察した。

である DMS で細胞を処理したところ、B16 細胞のメラニン量は増加した。よって SPHK 活性化によって生じる細胞内 S1P はメラニン量制御因子として働く可能性が示唆された。DMS によるメラニン量増加はチロシナーゼ活性増加を伴わないことから、S1P はメラニン生成を促進するという機序以外の機構により細胞内のメラニン量を制御すると推定した。そこで DMS 処理した細胞を顕微鏡で観察したところ、メラノソームの著明な凝集が起っていた。この結果より、SPHK により産生された S1P はメラノソームの凝集・拡散を制御していると考えられ、DMS によるメラニン量増加はメラノソームの凝集過多の結果、拡散して細胞外に分泌されるメラノソームが減少した結果であると推定した。さらに、メラノソームと SPHK1 は局在がよく一致したことから、SPHK1 はメラノソーム膜のスフィンゴシンからの S1P 産生を制御することによりメラノソームの凝集・拡散を調節していると推定した。細胞内で生じた S1P がどのような機序でメラノソームの凝集・拡散を制御しているかは現時点では不明であるが、その機序の解明は色素細胞のメラニン量制御機構およびメラニン分泌機構の理解に大きく役立つと期待される。

謝 辞

本研究は、神戸大学大学院医学系研究科分子生物学講座生化学 中村俊一教授との共同研究である。

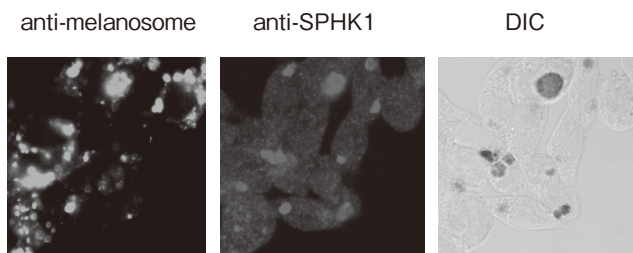


図4 (A)DMS 処理した B16 黒色腫細胞内のメラノソームと SPHK1 の局在

B16 細胞を 3 μ M DMS 処理し、72 時間後、抗メラノソーム抗体 (anti-melanosome) および抗 SPHK1 抗体 (anti-SPHK1) で免疫染色を行い共焦点顕微鏡にて観察した。

(文献)

- 1) Taha TA, Hannun YA, and Obeid LM, : Sphingosine kinase: Biochemical and cellular regulation and role in disease. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39, 113-131, 2006.
- 2) Kageyama A, Oka M, Okada T, *et al.* : Down-regulation of melanogenesis by phospholipase D2 through ubiquitin proteasome-mediated degradation of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 279, 27774-27780, 2004.
- 3) Cummings RJ, Parinandi NL, Zaiman A, *et al.* : Phospholipase D activation by sphingosine 1-phosphate regulates interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 30227-30235, 2002.
- 4) Banno Y, Takuwa Y, Akao Y, *et al.* : Involvement of phospholipase D in sphingosine 1-phosphate-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt in Chinese hamster ovary cells overexpressing EDG3. *J. Biol. Chem.* 276, 35622-35628, 2001.
- 5) Arikawa K, Takuwa N, Yamaguchi H, *et al.* : Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S₁P₂ G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 32841-32851, 2003.