

# メラノソーム膜に局在する OCA4 型アルビノ原因遺伝子 MATP を標的としたメラニン合成阻害剤の開発

名古屋市立大学大学院薬学研究科

保嶋 智也

Melanin is produced from tyrosine by tyrosinase localized in melanosomes in melanocytes present at the cutaneous epithelium. There are also many reports indicating that various amino acid-related compounds other than tyrosine are involved in controlling melanin synthesis. Based on these, it may be likely that transport of amino acid-related compounds for the supply or elimination at the melanosomal membrane by a transporter is involved in melanin synthesis as the rate-determining step. Solute Carrier (SLC) 45 A2, which has been identified as a causative gene for Oculocutaneous Albinism Type 4 (OCA4), is for a transporter that operates for translocation of small molecules across biological membranes. It is also notable that the OCA4 patients are present at a quite high frequency among the Japanese. Thus, the designated genetic polymorphism of SLC45 A2 has already been indicated to be linked to a major type of OCA, but the mechanism behind that remains to be elucidated. We, therefore, attempted to investigate into that possibility and successfully identified putrescine, an amino acid-related compound as a substrate of SLC45 A2. Putrescine has been reported to suppresses melanin synthesis by inhibiting tyrosinase. Based on these, it would be possible to hypothesize that melanin synthesis is impaired in OCA4 patients because of its extensive accumulation into melanosomes due to the dysfunction of SLC45 A2. Therefore, elucidation of the function of SLC45 A2 and its role in the synthesis of melanin in relation to OCA4 should be of great help in the development of melanin synthesis inhibitor.

## 1. 緒言

現代の日本においては、多くの女性が肌を白く保とうとする傾向があり、美白を目的とした化粧品・医薬部外品等が多く販売されている。しかしながら、それら化粧品・医薬部外品等に配合される有効成分は、メラニン合成酵素であるチロシナーゼの阻害を標的としているものがほとんどであり、それ以外の分子標的については、ほとんど明らかとなっていないのが現状である。肌の黒色化は、主にメラニン合成の亢進によるが、そのメラニンはチロシンを原料として皮膚上皮細胞のメラノソーム内に局在するチロシナーゼにより産生される。メラニンはその物理化学的性質として水や有機溶媒に不溶で安定な化合物であるため、一度生成されると除去されにくい特徴を有するが、その中でも特に安定性の高い亜メラニンの生成にはシステインが関与していることが知られている。また、細胞増殖に不可欠な化合物と知られているポリアミンが、メラニン合成を制御しているとの報告がある。このように、メラニン合成の律速段階としてメラノソーム内へのチロシンやシステイン、ポリアミン等のアミノ酸関連物質の供給過程が関与している可能性が極めて高いと考えられる。アミノ酸関連物質は

高水溶性(低脂溶性)である等の物理化学的性質から、メラノソーム膜をはじめとする生体膜(脂質膜)を透過する過程においては、その分配を要する単純拡散機構の寄与は小さく、トランスポーター(膜内在性輸送タンパク質)による担体介在的な機構が関与していると考えられている。

そこで、メラノソーム膜に局在しアミノ酸関連化合物を輸送するトランスポーター群の候補遺伝子を探索し、Membrane-Associated Transporter Protein (MATP)に着目した。MATPはOCA4型アルビノの原因遺伝子として発見され<sup>1)</sup>、特に日本人のアルビノ罹患者に最も多くみられる型の一つであることが報告されている<sup>2)</sup>。近年、MATPがメラノソーム内pHの調整を行い、それによってチロシナーゼの活性を制御しているとの報告がされた<sup>3)</sup>。このことから、BinらのグループはMATPがH<sup>+</sup>を輸送基質にしていると考察しているが、明確なデータを示せておらずH<sup>+</sup>が輸送基質であるか現在のところ断定されていない。MATPはsolute carrier 45 (SLC45) familyに属しており、proton-associated sugar transporterであるSLC45A1と高い相同性を有している<sup>4)</sup>。このことから、MATPは糖類を輸送基質とすることが予想されたが、これまでの申請者の検討からそれらを輸送基質としないことが分かっている。また、MATPは有機物(糖類)を輸送するSLC45A1と高い相同性を有することから、無機物であるH<sup>+</sup>を本来の輸送基質にすることは考え難い。以上のような研究現状より、本研究では、MATPの機能解明を行い、メラニン合成阻害の有望な標的分子になりうるかを検証した。



Development of melanin synthesis inhibitor targeting MATP localized in melanosomal membrane

Tomoya Yasujima

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

## 2. 方法

### 2.1. ヒトMATP (hMATP)のクローニング

hMATP (accession no, NP\_057264.3) のcDNAは、ヒト皮膚のtotal RNA試料よりRT-PCRによってクローニングをした。1µgのtotal RNAを用い、オリゴdTプライマーと逆転写酵素ReverTra Ace (TOYOBO, Japan) によってcDNA試料を得た。hMATPのcDNAはGenBankに登録されている配列よりopen reading frame領域が増幅されるよう設計したプライマーを用い、KOD plus polymerase (TOYOBO, Japan) を使用してPCRを行った。得られたhMATPのcDNA配列は自動シーケンサー ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, U.S.A.) にて確認した。発現ベクターであるpCI-neo vector (Promega, U.S.A) にhMATPのcDNAを組み込んで、hMATPプラスミドを作成した。また、その際にN末端にFLAG sequence (DYKDDDDK)が付与されるように組み込んだ。

### 2.2. hMATPの各種変異体の作製

各種変異体を作製するにあたり、pCI-neo vectorに組み込んだFLAG-hMATPを鋳型とし、所定の変異が導入されるよう設計したプライマーを用い (Table 1)、PrimeSTAR Max DNA Polymeraseを使用しPCRを行った。得られたPCR産物を37℃で1時間のDpnI (TOYOBO, Japan) 処理後、T4 Polynucleotide Kinase (TOYOBO, Japan)、2 ×

ligation mix (NIPPON GENE, Japan) を用いてライゲーションし、ヒートショック (42℃、1 min) によって大腸菌(DH5α) に導入した。その大腸菌を、ampicillinを添加したLBプレートに播き、37℃で一晩培養した後、プレート上のコロニーを採取した。そこからプラスミドDNAを抽出し、制限酵素処理後、電気泳動を行うことによりインサート部分を確認した。予想された長さのインサート部分が確認されたコロニーから得られたプラスミドの配列は、自動シーケンサー ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, U. S. A.) により確認し、目的とする部分の塩基配列に変異があることを確認した。

### 2.3. hMATPとその各種変異体の一過性発現系細胞

実験には、イヌ腎由来MDCK II細胞を用いた。MDCKII細胞は継代に際し、ビュルケルチュルク盤を用いて細胞数を計測した後、 $3 \times 10^5$  cells/mlとなるように調製し、24wellプレートに500µl/wellずつ播種した。その約1時間後、導入試薬として3µg/wellのpolyethyleneimine (Polyscience, U. S. A.) を用いて、各プラスミド (hMATPとその各種変異体) を導入した。その後、36-48時間の培養によって、一過性にそれぞれのタンパクを発現させ、コンフルエントに達した状態のものを実験に用いた。また、対照としてpCI-neo vectorのみを導入したmock細胞を作成した。細胞培養培地として、10% fetal bovine serum、1% penicillin/streptomycinを含むDulbecco's modified

Table 1 各種hMATP変異体作製のためのプライマー配列

| Mutant     | Orientation | Sequence (5' to 3')   |
|------------|-------------|---|
| N-deletion | Forward     | GGTAAGCTTACAGCATGGCCATGGCCATGTTTCG                                      |
|            | Reverse     | -   |
| Y268S      | Forward     | TGTACGAGTCTGGTTCATCGAGAAAGTT  |
|            | Reverse     | ATAGAACCAGACTCGTACATTCCATCTGA   |
| Y317S      | Forward     | CTCCTCACTCCCCTACCTTTGCATCA  |
|            | Reverse     | AGGTAGCGGGAGTGAGGAGGCATGTTC   |
| Y319S      | Forward     | ACTACCGCTCCCTTTGCATCAGCCACCTC   |
|            | Reverse     | ATGCAAAGGGAGCGGTAGTGAGGAGGC   |
| KVK273AVA  | Forward     | ATCGAGGCAGTTGCAAATGGTTACGTAAATCCAATCG<br>AGGCAGTTGCAAATGGTTACGTAAATCCA  |
|            | Reverse     | ACCATTTGCAACTGCCTCGATAGAACCATACTCGAGTA<br>TGGTTCATCGAGGCAGTTGCAAATGGT   |
| KNK289ANA  | Forward     | GGAGCAGCAAACGCAAATCATGCTGAACAGACTGGA<br>GCAGCAAACGCAAATCATGCTGAACAGACT  |
|            | Reverse     | ATGATTTGCGTTTGGCTGCTCCCTGCATTGCCAGCTGGC<br>AATGCAGGGAGCAGCAAACGCAAATCAT |

Eagle's mediumを使用し、37°C、95% air-5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

## 2.4. 取り込み実験

取り込み実験用緩衝液として、10mM HEPESを加えた Hanks' solution (136.7mM NaCl, 5.36mM KCl, 0.952mM CaCl<sub>2</sub>, 0.812mM MgSO<sub>4</sub>, 0.441mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.385mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25mM D-glucose) または、10mM HEPESを加えた Mannitol buffer (5.37 mM K-gluconate, 273.4mM Mannitol, 0.441mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.812mM MgSO<sub>4</sub>, 0.952mM Ca-gluconate, 0.385mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25mM D-glucose) を用い、2M の NaOH を用いて pH7.4 に調整した。この緩衝液中に [<sup>3</sup>H] tyrosine (5nM) または [<sup>3</sup>H] putrescine (2nM) を加え、取り込み試験液とした。

取り込み実験に際して、まず、well 中の培地を吸い取り、37°C の Hanks' solution (1ml) を加えて 5 分間プレインキュベーションした。その後、取り込み試験液 (250μl) を加え、取り込みを開始させた。所定の時間経過後、氷冷した Hanks' solution (stop solution, 1ml) を加えることにより反応を停止させ、stop solution (2ml) で細胞を 2 回洗浄した。続いて、0.5% SDS を含む 0.2M NaOH を 500μl 加え、細胞を可溶化させ、カウンティングバイアルに回収した。そこに液体シンチレーションカクテル 2 ml を加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloka Co., Tokyo, Japan) により放射能活性を測定することで取り込み量を評価した。

## 2.5. データ解析

### 2.5.1. 取り込みデータ解析

細胞への薬物の取り込み量は以下の式を用いて算出した。

$$Uptake = \frac{A_s C_m}{A_{ct} A_v}$$

ここで、*Uptake* は取り込み量 (pmol/mg protein)、*A<sub>s</sub>* はサンプルの放射能 (dpm/well)、*A<sub>ct</sub>* は取り込み試験液の放射能 (dpm/μl)、*A<sub>v</sub>* は細胞のタンパク量 (mg protein/well)、*C<sub>m</sub>* は取り込み試験液の基質濃度 (μM) である。

取り込み量 (*Uptake*) を取り込み時間 (*t*, min) で割ることにより、取り込み速度 (*V*, pmol/min/well) を求めた。

$$V = \frac{Uptake}{t}$$

### 2.5.2. 統計処理

MDCKII 細胞における 1 回の実験のデータは、同時に調製した細胞の 2 サンプル (well) における実験値として得た。実験回ごとに細胞を調製して、複数回の実験を行い、合計のサンプル数を例数 (*n*) とした。

データは、原則として平均値 ± 標準誤差として示した。2 群間の比較には、Student's *t*-test を用いた。多重比較

を要する場合には、ANOVA の後に Dunnet's test を用いた。

## 3. 結果

### 3.1. MATP のメラノソーム膜局在シグナル配列の探索

現在までに MATP の輸送基質は同定されておらず、MATP の機能変動に起因する OCA4 型アルビニズム発症の機構については不明なままである。前述したように、MATP の輸送基質としてアミノ酸関連物質が予想されるため、それら化合物が MATP の輸送基質となるか検証を行う必要があるが、MATP はメラノソーム膜に局在するため、細胞外に暴露された検討対象化合物を輸送することができない。細胞内小器官に局在するトランスポーターの生体膜透過の検討には、ジキトニンをはじめとした界面活性剤で細胞表面を処理することにより細胞膜透過性を上昇させ、検討対象化合物を細胞質内へ移行させ評価する方法が一般に用いられている。しかし、界面活性剤処理の条件設定が難しく、再現性や安定性に問題がある。そこで、メラノソーム膜に局在させる移行シグナルに着目した。膜貫通タンパクの細胞内ドメインに D/ExxxLL や Yxxφ、KxK (x: 任意のアミノ酸、φ: 疎水性アミノ酸) の配列を有するとメラノソーム膜やライソソーム膜に局在することが知られている<sup>5,6)</sup>。そこで、MATP のアミノ酸配列を解析すると、細胞内に複数の YxxL、KxK 配列を有していることが確認された。また、その配列は種間の保存性が高く MATP のメラノソーム膜への局在制御に関わっている可能性が強く示唆された (Fig. 1)。よって、この配列を Sxxφ、AxA に変換することでシグナルを除去し、メラノソーム膜に発現する MATP を強制的に細胞膜へ移行させることで輸送基質の検討を行うこととした。

### 3.2. hMATP とその各種変異体による tyrosine 輸送能の解析

メラニンは、メラノソーム内のチロシナーゼの働きにより、アミノ酸の一種である tyrosine を原料に合成される。そのため、メラノソーム内へのメラニン供給経路は、生体におけるメラニン合成において、律速段階になっていると考えられる。アミノ酸は一般的に高水溶性 (低脂溶性) であるため、その物理化学的な性質から、脂質膜で構成される生体膜を透過する過程においては、細胞膜 (脂質膜) への分配を要する単純拡散機構の寄与は小さい。そのため、トランスポーター (膜内在性輸送タンパク質) による担体介在的な機構の関与が古くから示唆されており、現在までに多くのアミノ酸トランスポーターの分子実体が明らかになってきた<sup>7)</sup>。メラノソーム膜においても例外ではなく、アミノ酸などの高水溶性化合物の膜透過過程には、トランスポーターが重要な役割を担っていると考えられる。メ

|        |     |  |               |
|--------|-----|--|---------------|
| human  | 1   | -----  | MGSNSGQAGRH   |
| monkey | 1   | -----  | MGGNSGQAGGHI  |
| mouse  | 1   | -----  | MSSGNGPTDHT   |
| rat    | 1   | -----  | MSSGNGPTDTRA  |
| dog    | 1   | -----  | MGGNIIGQLGHT  |
| pig    | 1   | -----  | MDESSGQPDVHT  |
| cattle | 1   | MKEFEPRPQPGRLCGPCSQAPCQIHLGARTPGPRRRWWACRQVPRPVM               | MDKSSGQSPLRHT |
|        |     |  |               |
| human  | 13  | YKSLAIDGPEISVEPPKRPTRLIMHSMAMFGREFCYAVEAAYVTPVLLSVGLPSSLSYSL   |               |
| monkey | 13  | YKSLAIDGPFDSVEPPKRPTSRLLMHSMAMFGREFCYAVEAAYVTPVLLSVGLPNSLSYSL  |               |
| mouse  | 13  | YQSLAEDCPFGSVEPPKRSTGRMLVMHSMAMFGREFCYAVEAAYVTPVLLSVGLPKSLYSM  |               |
| rat    | 13  | YQSLAEDCPFGSVEPPKRSTGRMLVMHSMAMFGREFCYAVEAAYVTPVLLSVGLPKSLYSM  |               |
| dog    | 13  | YKSLAEDDHFDEVEPPKRPTSNLIMHSMAMFGREFCYAVEAAYVTPVLLSVGLPKSLYSL   |               |
| pig    | 13  | YKSLAEDGPFCSVEPPKRPTGSLVMHSMAMFGREFCYAVEAAYVTPVLLSVGLPKSLYSV   |               |
| cattle | 61  | YKSLAEDGPFCSVEPPKRPTGSLVMHSMAMFGREFCYAVEAAYVTPVLLSVGLPKSLYSM   |               |
|        |     |  |               |
| human  | 73  | VWFLSPILGFLLPVVGASDHCRRSRWGRRRYPYILTLGVMLLGMALYLNGLTVAALIA     |               |
| monkey | 73  | VWFLSPILGFLLPVVGASDHCRRSRWGRRRYPYILTLGVMLLGMALYLNGLTVAALIA     |               |
| mouse  | 73  | VWLLSPILGFLLPVVGASDHCRRARWGRRRYPYILTLGMMLLGMALYLNGLDAVVSALIA   |               |
| rat    | 73  | VWLLSPILGFLLPVVGASDHCRRARWGRRRYPYILTLGVMLLGMALYLNGLDAVVSALIA   |               |
| dog    | 73  | VWLLSPILGFLLPVVGASDHCRRARWGRRRYPYILTLGMMLLGMALYLNGLDAVVSALIA   |               |
| pig    | 73  | VWLLSPILGFLLPVVGASDHCRRARWGRRRYPYILTLGVMLLGMALYLNGLTVAALIA     |               |
| cattle | 121 | VWLLSPILGFLLPVVGASDHCRRARWGRRRYPYILTLGMMLLGMALYLNGLDAVVSALIA   |               |
|        |     |  |               |
| human  | 133 | NPRRKLVAISITMIGVVLDFDAADFIDGPIKAYLFDVCSHQDKEKGLHYHALFTGFGG     |               |
| monkey | 133 | NPRRKLVAISITMIGVVLDFDAADFIDGPIKAYLFDVCSHQDKEKGLHYHALFTGFGG     |               |
| mouse  | 133 | NPRKLIWAISITMIGVVLDFDAADFIDGPIKAYLFDVCSHQDKEKGLHYHALFTGFGG     |               |
| rat    | 133 | NPRKLIWAISITMIGVVLDFDAADFIDGPIKAYLFDVCSHQDKEKGLHYHALFTGFGG     |               |
| dog    | 133 | DPRRKLVAISITMIGVVLDFDAADFIDGPIKAYLFDVCSHQDKEKGLHYHALFTGFGG     |               |
| pig    | 133 | DPRRKLVAISITMIGVVLDFDAADFIDGPIKAYLFDVCSHQDKEKGLHYHALFTGFGG     |               |
| cattle | 181 | DPRRKLVAISITMIGVVLDFDAADFIDGPIKAYLFDVCSHQDKEKGLHYHALFTGFGG     |               |
|        |     |  |               |
| human  | 193 | LGYLGAIDWAHLELGRLLGTEFQVMFFFSALVLTLCFTIHLCSISEAPLTDVAKGIPTPO   |               |
| monkey | 193 | LGYLGAIDWAHLELGRLLGTEFQVMFFFSALVLTLCFTIHLCSISEAPLTDVAKGIPTPO   |               |
| mouse  | 193 | LGYLGAIDWVHLGRLLGTEFQVMFFFSALVLTLCFTIHLCSISEAPLRDAATDPSQ       |               |
| rat    | 193 | LGYLGAIDWVHLGRLLGTEFQVMFFFSALVLTLCFTIHLCSISEAPLRDAATDPSQ       |               |
| dog    | 193 | LGYLGAIDWAHLELGRLLGTEFQVMFFFSALVLTLCFTIHLCSISEAPLRDVAKDIPTPO   |               |
| pig    | 193 | LGYLGAIDWAHLELGRLLGTEFQVMFFFSALVLTLCFTIHLCSISEAPLRDVAKDIPTPO   |               |
| cattle | 241 | LGYLGAIDWAHLELGRLLGTEFQVMFFFSALVLTLCFTIHLCSISEAPLRDVAKDIPTPO   |               |
|        |     |  |               |
| human  | 253 | QTPQDPPLSSDGMYYEGSISKVKNQYVNEELAQGKKNKIQTRMTKSLLRALV           |               |
| monkey | 253 | QTPQDPPLSSDGMYYEGSISKVKNQYVNEELAQGKKNKIQH-ABQTCREMTKSLLRALV    |               |
| mouse  | 253 | QDPQGSLLSASGMYYEGSISKVKNQADTEQPVQEVKKNKIP-SCQSORTMSKSLLRALV    |               |
| rat    | 253 | PDQGSLLSADGMYYEGSISKVKNQDADTCLPQCKKNKIP-SCQSORTMSKSLLRALV      |               |
| dog    | 253 | QAPQDFLLSSDKMYEGSISKAKNQYVNEELAQGKKNKIP-SKQISITMTKSLLRALV      |               |
| pig    | 253 | QAPQDPASSDRMYEGSISKVKNQYVNEELAQGKKNKIPAPQOTQRTMTKSLLRALV       |               |
| cattle | 261 | QAPQDPASSDRMYEGSISKVKNQYVNEELAQGKKNKIPAPQOTQRTMTKSLLRALV       |               |
|        |     |  |               |
| human  | 312 | NMPFHYRCLCISHLIGWTAFLSNMLFFTFDMGQIVYHGDYPYSAHNSTEFLEYRGVEVGC   |               |
| monkey | 312 | SMPFHYRCLCISHLIGWTAFLSNMLFFTFDMGQIVYHGDYPYSAHNSTEFLEYRGVEVGC   |               |
| mouse  | 312 | NMPFHYRCLCISHLIGWTAFLSNMLFFTFDMGQIVYHGDYPYSAHNSTEFLEYRGVEVGC   |               |
| rat    | 312 | NMPFHYRCLCISHLIGWTAFLSNMLFFTFDMGQIVYHGDYPYSAHNSTEFLEYRGVEVGC   |               |
| dog    | 312 | NMPFHYRCLCISHLIGWTAFLSNMLFFTFDMGQIVYHGDYPYSAHNSTEFLEYRGVEVGC   |               |
| pig    | 313 | SMPFHYRCLCISHLIGWTAFLSNMLFFTFDMGQIVYHGDYPYSAHNSTEFLEYRGVEVGC   |               |
| cattle | 280 | SMPFHYRCLCISHLIGWTAFLSNMLFFTFDMGQIVYHGDYPYSAHNSTEFLEYRGVEVGC   |               |
|        |     |  |               |
| human  | 372 | WGLCINSVFSSLYSFQKRVLSYIIGLKGLYFTGYLLFGLGTGFIGLFPNVYSTLVLCSEF   |               |
| monkey | 372 | WGLCINSVFSSLYSFQKRVLSYIIGLKGLYFTGYLLFGLGTGFIGLFPNVYSTLVLCSEF   |               |
| mouse  | 372 | WGLCINSVFSSLYSFQKRVLSYIIGLKGLYFMGYLLFGLGTGFIGLFPNVYSTLVLCSEF   |               |
| rat    | 372 | WGLCINSVFSSLYSFQKRVLSYIIGLKGLYFMGYLLFGLGTGFIGLFPNVYSTLVLCSEF   |               |
| dog    | 372 | WGLCINSVFSSLYSFQKRVLSYIIGLKGLYFTGYLLFGLGTGFIGLFPNVYSTLVLCSEF   |               |
| pig    | 373 | WGLCINSVFSSLYSFQKRVLSYIIGLKGLYFMGYLLFGLGTGFIGLFPNVYSTLVLCSEF   |               |
| cattle | 340 | WGLCINSVFSSLYSFQKRVLSYIIGLKGLYFMGYLLFGLGTGFIGLFPNVYSTLVLCSEF   |               |
|        |     |  |               |
| human  | 432 | GVMSSSTLYTVPFNLIETEHREEEKE-RQQAEGGDPDNSVRGKGDCAAALTCMVQLAQILV  |               |
| monkey | 432 | GVMSSSTLYTVPFNLIETEHREEEKE-RQQAEGGRHPDNSVRGKGDCAAALTCMVQLAQILV |               |
| mouse  | 432 | GVMSSSTLYTVPFNLIAEYHREEEKE-RQQAEGGDPDNGRGKGDCAAALTCMVQLAQILV   |               |
| rat    | 432 | GVMSSSTLYTVPFNLIAEYHREEEKE-RQQAEGGDPDNGRGKGDCAAALTCMVQLAQILV   |               |
| dog    | 432 | GVMSSSTLYTVPFNLIAYHREEEKE-RQQAEGGSDSGERGKGDCAAALTCMVQLAQILV    |               |
| pig    | 433 | GVMSSSTLYTVPFNLIAYHREEEKE-RQQAEGGSDSGERGKGDCAAALTCMVQLAQILV    |               |
| cattle | 400 | GVMSSSTLYTVPFNLIAEYHREEEKE-RQQAEGGSDSGERGKGDCAAALTCMVQLAQILV   |               |
|        |     |  |               |
| human  | 491 | GGGLGFLVNTAGSVVVVITASAVALIGCCFVALFVRYVD                        |               |
| monkey | 491 | GGGLGFLVNTAGSVVVVITASAVALIGCCFVALFVRYVD                        |               |
| mouse  | 491 | GGGLGFLVNMAGSVVVVITASAVSLIGCCFVALFVRYVD                        |               |
| rat    | 491 | GGGLGFLVNMAGSVVVVITASAVSLIGCCFVALFVRYVD                        |               |
| dog    | 491 | GGGLGFLVNTAGSVVVVITASAVALIGCCFVALFVRYVD                        |               |
| pig    | 493 | GGGLGFLVNTAGSVVVVITASAVALIGCCFVALFVRYVD                        |               |
| cattle | 457 | GGGLGFLVNTAGSVVVVITASAVALIGCCFVALFVRYVD                        |               |

Fig. 1 MATP の種間の相同性とメラノソーム膜局在シグナル配列

メラノソーム膜におけるチロシン輸送には、トランスポーターの関与を示唆する報告はあるが<sup>8)</sup>、その分子実体の同定には至っていない。そこで、MATPがこの過程を担う分子実体であるとの仮説をたて、MATPとその各種変異体による tyrosine 輸送能の解析を行った (Fig. 2)。その結果、Y317S変異体においてわずかながら tyrosine 輸送量の増加傾向がみられた。このことから、Y317S変異体はMATPのメラノソーム膜局在シグナルが除去され細胞膜に局在し、tyrosine 活性を有していることが示唆された。ただ、その活性は非常に弱いことから、他に良好な輸送基質が存在していることが考えられたため、Y317S変異体を用いて、他の輸送基質の探索を進めた。

### 3.3. hMATPとその各種変異体による putrescine 輸送能の解析

細胞の増殖等、生理機能の維持に重要であるポリアミンは、チロシナーゼ活性を抑制しメラニン合成を減少させるとの報告がある<sup>9,10)</sup>。MATPの遺伝子多型による機能不全

によりメラノソーム内からのポリアミン排出が停止し、メラニン合成能不全が惹起されている可能性が考えられる。

ポリアミンはポリカチオン構造を有することから高水溶性であるため、その生体膜透過にはトランスポーターが必要であると考えられている。そこで、MATPのY317S変異体を用いて、ポリアミンの一種である putrescine 輸送能の解析を行った (Fig. 3)。その結果、ナトリウムイオン、塩化物イオンを除去した条件では (mannitol buffer)、mock細胞と比較してY317S変異体における putrescine 輸送量は有意に上昇した (約3倍)。このことから、MATPはメラノソームからポリアミンを排出し、チロシナーゼの活性の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

## 4. 考 察

本研究において、hMATPのアミノ酸配列の中の Y<sup>317</sup>XXL<sup>320</sup> がメラノソーム膜局在に重要である可能性が示唆された。また、Y317Sの変異体は細胞膜に局在し、細胞膜輸送に基づいた簡便で再現性の高い機能評価系の

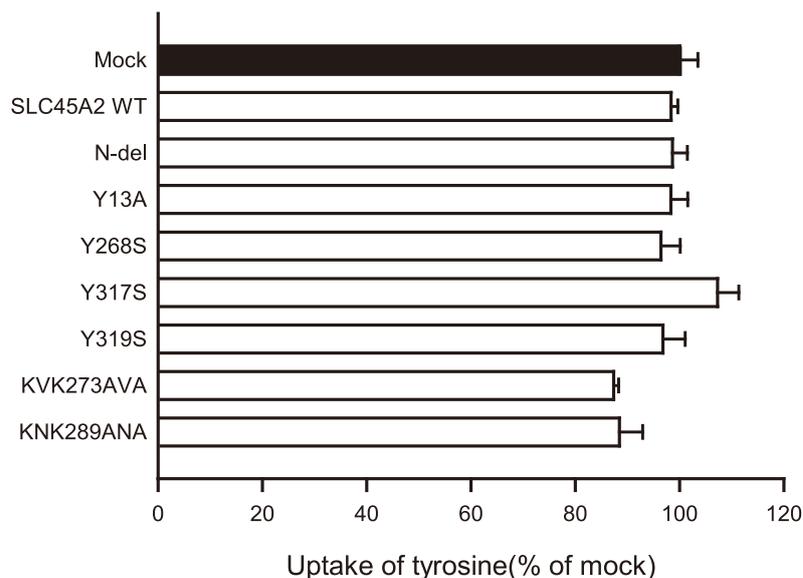


Fig. 2 hMATP とその各種変異体による tyrosine 輸送能の解析

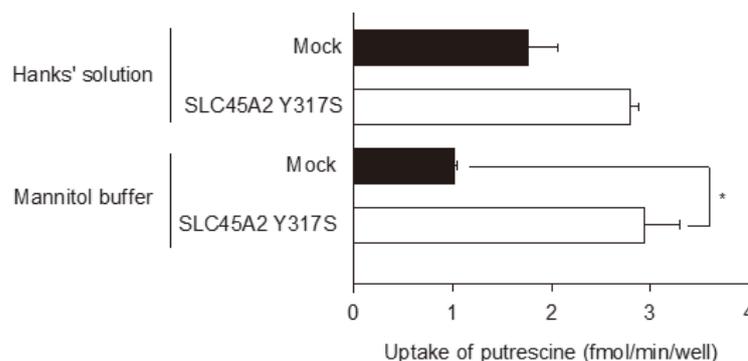


Fig. 3 hMATP とその変異体 (Y317S) による putrescine 輸送能の解析

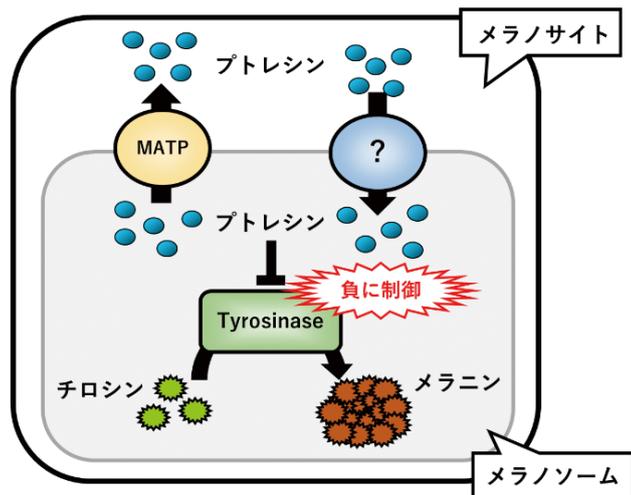


Fig. 4 メラニン合成に係る MATEP の寄与

確立に成功した。MATEPはtyrosine輸送能を有していたが、その活性は弱く、生体における役割においては重要ではないことが示唆された。一方、ポリアミンの一種であるputrescineの輸送活性が認められた。MATEPの遺伝子多型による機能不全は、メラニン合成能が欠損しアルビノを発症するため、MATEPがメラニン合成酵素であるチロシナーゼの活性低下に寄与するポリアミンをメラノソーム外に排出している可能性が示唆された (Fig. 4)。よって、MATEPの阻害剤はメラノソーム内にポリアミンを蓄積させることに貢献し、チロシナーゼ活性を抑制する可能性が示唆された。この知見は、MATEPの輸送機能及び分子特性の解明を進展させ、MATEPの機能変動に起因するOCA4型アルビニズム発症の機構の解明、また、その阻害剤がメラニン合成阻害の有望な化合物の開発に役立つ情報の提供につながるものと期待される。

(引用文献)

1) Newton JM, Cohen-Barak O, Hagiwara N, Gardner JM, Davisson MT, King RA, Brilliant MH. Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (uw) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *Am J Hum Genet*, **69**, 981-988, (2001).  
 2) Inagaki K, Suzuki T, Shimizu H, Ishii N, Umezawa

Y, Tada J, Kikuchi N, Takata M, Takamori K, Kishibe M, Tanaka M, Miyamura Y, Ito S, Tomita Y. Oculocutaneous albinism type 4 is one of the most common types of albinism in Japan. *Am J Hum Genet*, **74**, 466-471 (2004).  
 3) Bin BH, Bhin J, Yang SH, Shin M, Nam YJ, Choi DH, Shin DW, Lee AY, Hwang D, Cho EG, Lee TR. Membrane-Associated Transporter Protein (MATEP) Regulates Melanosomal pH and Influences Tyrosinase Activity. *PLoS One*, **10**, e0129273 (2015).  
 4) Shimokawa N, Okada J, Haglund K, Dikic I, Koibuchi N, Miura M. Past-A, a novel proton-associated sugar transporter, regulates glucose homeostasis in the brain. *J Neurosci*, **22**, 9160-9165 (2002).  
 5) Dietrich J, Kastrup J, Nielsen BL, Odum N, Geisler C. Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J Cell Biol*, **138**, 271-281 (1997).  
 6) Guarnieri FG, Arterburn LM, Penno MB, Cha Y, August JT. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J Biol Chem*, **268**, 1941-1946 (1993).  
 7) Fotiadis D, Kanai Y, Palacín M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med*, **34**, 139-158 (2013).  
 8) Gahl WA, Potterf B, Durham-Pierre D, Brilliant MH, Hearing VJ. Melanosomal tyrosine transport in normal and pink-eyed dilution murine melanocytes. *Pigment Cell Res*, **8**, 229-233 (1995).  
 9) Käpyaho K, Jänne J. Stimulation of melanotic expression in murine melanoma cells exposed to polyamine antimetabolites. *Biochem Biophys Res Commun*, **113**, 18-23 (1983).  
 10) Sunkara PS, Chang CC, Prakash NJ, Lachmann PJ. Effect of inhibition of polyamine biosynthesis by DL-alpha-difluoromethylornithine on the growth and melanogenesis of B16 melanoma in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **45**, 4067-4070 (1985).