

# メラニン色素合成の解明に向けて ～チロシナーゼ関連タンパク質の金属要求性に関する基盤研究～

京都大学大学院生命科学研究所

神戸 大朋

Melanin biosynthesis requires tyrosinase protein family consisting of tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1), and tyrosinase-related protein 2 (TYRP2). These three proteins show high sequence identity. TYR has oxidase activity, and possesses two copper ions coordinated at the active center. The Golgi-resident copper transporter ATP7A plays a pivotal role in the coordination of TYR with copper. In contrast, the coordination metals for TYRP1 and TYRP2 have not yet been clarified, although it was suggested that they have a homologous structure to TYR, and thus copper ions would be coordinated at their active site. The crystal structure of TYRP1 was recently reported, which showed that TYRP1 has homologous structure to TYR, as expected. However, it was a surprising result that the coordinated metals at the active center are not copper ions but zinc ions. Currently, information about the metals coordinated at the active center of TYRP1 and TYRP2 is complicated. In this study, we tried to address this unappreciated issue using the gene disruption/re-expression evaluation strategy. We first confirmed that TYR activation requires ATP7A using the cells deficient in *ATP7A* gene. We then showed that two Zn transporter (ZNT) complexes, specifically ZNT5-ZNT6 heterodimers and ZNT7 homodimers, which locate to the compartments of the early secretory pathway, play essential roles for TYRP1 expression. Moreover, we showed that the cells deficient in both *ZNT5* and *ZNT7* genes changed the color from black to brown in cell pellets, indicating that both ZNT complexes contribute to melanin synthesis. These results provide novel insights into the molecular mechanism underlying the melanin biosynthesis and TYRP1 expression.

## 1. 緒言

メラニン色素は、メラニン細胞においてメラノソーム中で、チロシンから数段階の酵素反応を経て合成される<sup>1,2)</sup>。このメラニン合成に関わる酵素として、チロシナーゼ (TYR)、チロシナーゼ関連タンパク質1 (TYRP1)、チロシナーゼ関連タンパク質2 (TYRP2)の3つが存在する<sup>3,4)</sup>。TYRは、活性中心に銅イオンを配位するタイプ3銅タンパク質であり、そのモノフェノールモノオキシゲナーゼ活性の発現には、活性中心への銅の配位が不可欠となる。また、この銅の配位にはトランスゴルジネットワークに局在する銅トランスポーター ATP7A (メンケスタンパク質)が必須の役割を果たす<sup>5)</sup>。そのため、ATP7Aの変異マウスはいずれも斑模様やうすい色を特徴とする被毛を呈する<sup>6,7)</sup>。一方、TYRP1とTYRP2に関しては、TYRと高い相同性を有すること、さらに相同の活性部位を持つと予想されることから、以前よりタイプ3銅酵素に分類されており、これまで十分な解析が実施されてこなかった<sup>2,3)</sup>。このような状況下、最近TYRP1の結晶構造解析から、TYRP1はTYRと相同な活性中心を持つものの、配位している金属は銅ではなく、亜鉛であることが報告された<sup>8,9)</sup>。

ヒト体内のタンパク質の中で亜鉛含有タンパク質は10%程度、また、銅含有タンパク質は多くても0.5%程度と予想されている<sup>10,11)</sup>。細胞内におけるこれらのタンパク質の生合成や活性発現には、亜鉛や銅が正しく配位される必要があるため、亜鉛や銅の運搬を担うトランスポーターは厳密に制御されている<sup>12,13)</sup>。上述の通り、TYRの活性中心に配位する銅はATP7Aにより供給されるが<sup>5)</sup>、本研究では、TYRP1・2に亜鉛を供給する亜鉛トランスポーターが存在すると仮定して解析を実施した。尚、我々のこれまでの解析から、亜鉛要求性のエクト型酵素は、亜鉛トランスポーター複合体であるZNT5-ZNT6ヘテロ二量体とZNT7ホモ二量体が機能することが明らかとなっているため<sup>14,15)</sup>、これを指標とし、補因子の観点からメラニン色素生合成の一端を解明することを試みた。

## 2. 方法

### 2.1. 細胞培養、トランスフェクション、亜鉛・銅トランスポーター欠損株の作成

ヒトメラノーマ細胞であるSK-MEL-2 (JCRB細胞バンク)の培養には10% FCSを添加したRPMI1640 (和光純薬工業株式会社)を用いて、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で10cm dishにて培養、および継代維持を行った。一方、別のヒトメラノーマ細胞であるHMV-II (理研BRC)にはRPMI1640ではなく、Ham's F-12 buffer (和光純薬工業株式会社)を用いた。亜鉛トランスポーター ZNT5およびZNT7、銅トランスポーター ATP7A欠損株を樹立するために、pX330-B/Bベクターにそれぞれの遺伝子のgRNAを接続したプラスミドを作成した。この作成したプラスミドをブ



Studies on the mechanism how melanin biosynthesis is regulated by metals

Taiho Kambe

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

ラストサイジンS耐性遺伝子発現ベクターと共にSK-MEL-2細胞およびHMV-II細胞にLipofectamine 2000を使用して導入し、薬剤耐性株を指標にそれぞれのトランスポーター欠損株(ZNT5ZNT7二重欠損株とATP7A単独欠損株)を樹立した。また、TYR、TYRP1、TYRP2およびトランスポーターの発現ベクターの導入にもLipofectamine 2000を使用した。

## 2. 2. Western blotting

膜タンパク質20 $\mu$ gを2 $\times$ SDS sample buffer (375mM Tris-HCl (pH6.8), 30% Glycerol, 6% SDS, 0.5M DTT, 0.1% BPB)に溶解し、37 $^{\circ}$ Cで15分間反応させサンプル溶液とした。8% SDS-polyacrylamide gelを用いて電気泳動を行った後、0.45 $\mu$ m PVDF膜 (Immobilon-P)にtransferした。以下に示した一次抗体にて4 $^{\circ}$ Cで一晩抗体反応を行い、PBS-Tで10分間の洗浄を3回行った後、二次抗体を反応させた。Immobilon<sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)を用いて化学発光させ、Image Quant LAS 500 (GE Healthcare Life Science)にて検出した。一次抗体には、anti-TYRP1 (1:3000; Sigma)、anti-Rab27a (1:1000; Cell Signaling technology)、anti-Halo Monoclonal Antibody (1:1000; Promega)、anti-ATP7A (1:3000)を使用した。二次抗体には、GE Healthcare社のHRP標識抗IgG抗体(1:3000)を使用した。

## 2. 3. 免疫蛍光染色

カバーガラス上で2日間培養したSK-MEL-2細胞をPBSで洗浄した後、中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業株式会社)にて固定した。PBSで3回の洗浄後、0.1% Triton (Nacalai Tesque)によって透過処理を15分間行った後、6% BSA/PBS溶液(アルブミン, ウシ血清由来, フラクションV, pH7.0(和光純薬工業株式会社))でブロッキングした後、2% BSA/PBS溶液に一次抗体を希釈して4 $^{\circ}$ Cで一晩抗体反応を行った。PBSで10分間の洗浄を3回行った後、同様に二次抗体、三次抗体それぞれを室温で1時間反応させた後、SlowFade Antifade kit (Molecular Probes)を用いてカバーガラスに封入した。蛍光観察には蛍光顕微鏡FSX100 (Olympus)を使用した。一次抗体には、anti-TYR [T311] (1:1000; Santa Cruz Biotechnology)、anti-TYRP1 (1:1000; Sigma)、anti-TYRP2 [C-9] (1:1000; Santa Cruz Biochemistry)を用いた。二次抗体、三次抗体にはMolecular ProbesのAlexa標識抗IgG抗体を使用した。核の染色には4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (1:1000; Abcam)を用いた。

## 2. 4. ザイモグラフィー

調整した膜タンパク質50 $\mu$ gに6 $\times$ SDS buffer: DTT(-)

(375mM Tris-HCl (pH6.8), 30% Glycerol, 6% SDS, 0.1% BPB)を8 $\mu$ L加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートした。Novex WedgeWell 4-12% Tris-Glycine Gels (Invitrogen)を用い、10mA、4 $^{\circ}$ Cの条件で3時間程度、電気泳動を行った。バッファーの置換とゲルの平衡化のため、泳動後のゲルを50mM phosphate buffer (pH6.0)で室温にて3時間振とうした。平衡化したゲルはcolor formation buffer (10mM phosphate buffer (pH6.8), 1.5mM L-DOPA, 4mM MBTH)中において37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。TYRによるL-DOPA酸化産物であるDOPA chromeのバンドの生成を褐色の色素として確認した。

## 3. 結果

### 3. 1. TYR活性はATP7Aによって制御される

TYRP1の解析を実施するにあたり比較対象となるTYRの銅依存性に関する解析を実施した。CRISPR/Cas9を使用してATP7Aを欠損させたSK-MEL-2細胞株を樹立した。TYR、TYRP1、TYRP2を一過的に発現させたところ、ATP7A欠損株および親株のどちらにおいてもメラノソームと思われる小胞への局在が観察された(図1A)。一方、ザイモグラフィーにおいては、ATP7A欠損株におけるTYR活性を検出することができなかった(図1B)。これらの結果から、ATP7A欠損株においては、TYRはアポ型酵素として存在することが明らかとなった。一方、TYRP1およびTYRP2の発現は、野生株とATP7A欠損株において差違はみとめられず、両者の発現にATP7Aは必要でないことが明らかとなった(Fig. 1A)。

### 3. 2. ZNT5ZNT7二重欠損株ではTYRP1は安定に発現できない

次に、SK-MEL-2細胞において、亜鉛トランスポーターZNT5とZNT7を共に欠損させたZNT5ZNT7二重欠損株を樹立した。本二重欠損株にTYR、TYRP1、TYRP2を一過的に発現させてImmunoblot解析を実施したところ、TYRとTYRP2は野生株と同様に欠損株においても発現が確認された。一方、TYRP1の発現は、欠損株においてみとめることができなかった。TYR、TYRP1、TYRP2の発現や局在へのZNT5とZNT7の影響をさらに詳細に解析するため、TYR、TYRP1、TYRP2を野生株とZNT5ZNT7二重欠損株に一過的に発現させ、免疫蛍光染色によるタンパク質発現と局在解析を行った。TYRとTYRP2はメラノソームと思われる小胞への発現が確認されたが、TYRP1は、野生株で観察された発現が欠損株においては消失していた(図2)。したがって、ZNT5-ZNT6ヘテロ二量体とZNT7ホモ二量体の発現が、TYRP1の安定発現に不可欠であることが示唆された。

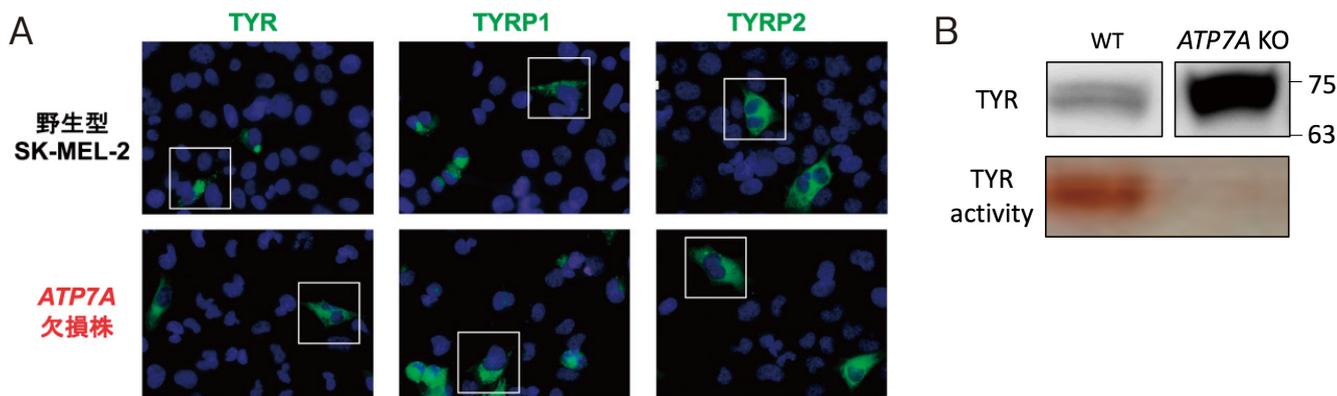


図1 ATP7A欠損SK-MEL-2細胞に発現させたTYR、TYRP1、TYRP2の免疫染色の結果

- A. ATP7A欠損株と野生株において、TYR、TYRP1、TYRP2の発現に顕著な変化はみとめられない。  
 B. ATP7A欠損株においてはTYRの酵素活性は消失する。TYRの活性はザイモグラフィーによって検出した。

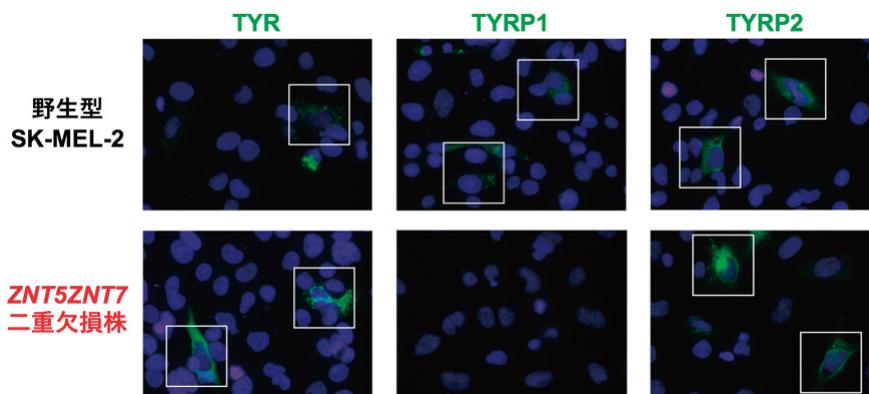


図2 ZNT5ZNT7二重欠損SK-MEL-2細胞に発現させたTYR、TYRP1、TYRP2の免疫染色の結果  
 ZNT5ZNT7二重欠損株においては、野生株で検出されたTYRP1の発現が完全に消失する。一方、TYRとTYRP2の発現には変化はみとめられない。

### 3. 3. TYRP1の発現にはZNT5-ZNT6ヘテロ二量体およびZNT7ホモ二量体が輸送した亜鉛が不可欠である

TYRP1の発現がZNT5とZNT7の輸送する亜鉛に依存しているのが明らかにするため、亜鉛輸送活性を失ったZNT5変異体を用いた解析を試みた。ZNT5の属するZNTファミリーには膜貫通領域内に高度に保存された2つのヒスチジン残基(H)と2つのアスパラギン酸残基(D)からなるHD-HDモチーフが存在する<sup>13)</sup>。このHD-HDモチーフ内のアミノ酸残基をアラニン(A)に置換した変異体ZNT5<sub>H451A</sub>とZNT5<sub>D599A</sub>は、ZNT6と正常にヘテロ二量体を形成できるが亜鉛結合能を失うため、どちらも亜鉛輸送活性をもたない変異体となる<sup>16)</sup>。野生株とZNT5ZNT7二重欠損株にTYRP1と共に、ZNT5、ZNT5<sub>H451A</sub>またはZNT5<sub>D599A</sub>を一過的に発現させたところ、野生株においては、いずれのZNT5においてもTYRP1は発現した。これに対し、欠損株においてはZNT5を発現させた場合のみTYRP1が検出され、ZNT5<sub>H451A</sub>またはZNT5<sub>D599A</sub>を発現

させた場合にはTYRP1の発現はみとめられなかった(図3)。以上の結果より、TYRP1の発現には、ZNT5とZNT6が結合したZNT5-ZNT6ヘテロ二量体の亜鉛輸送活性が必要であることが明らかとなった。また、ZNT7および亜鉛輸送活性を持たないZNT7変異体を用いても同様の結果が得られた(結果省略)。

### 3. 4. HMV-II細胞のZNT5ZNT7二重欠損株ではメラニン生成が障害される

ZNT5-ZNT6ヘテロ二量体とZNT7ホモ二量体(両ZNT複合体)がTYRP1の発現に影響を与えたことから、両ZNT複合体のメラニン色素合成に与える影響を解析した。SK-MEL-2細胞は、メラニン合成ができないメラノーマ細胞であったため、本解析では、黒色を呈するヒトメラノーマであるHMV-II細胞を使用した。HMV-II細胞のZNT5ZNT7二重欠損株と野生株のメラニン色素量を比較したところ、欠損株の黒色が肉眼で観察できるほど減少していた(図4)。このことより、両ZNT複合体が輸

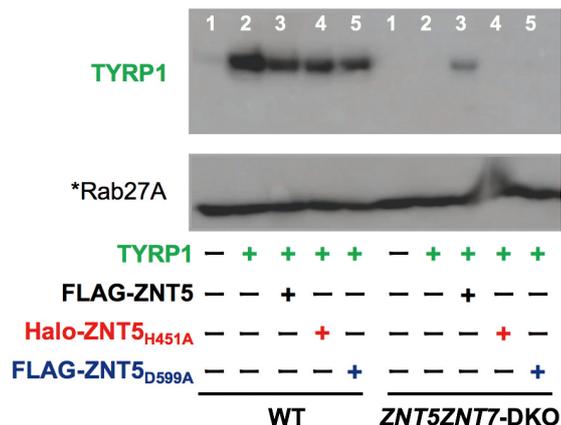


図3 TYRP1の発現にはZNT複合体が輸送した亜鉛が不可欠である  
ZNT5ZNT7二重欠損株において消失したTYRP1の発現が、ZNT5の再発現で回復する。



図4 ZNT5ZNT7二重欠損株ではメラニン生成が障害される  
野生株およびZNT5ZNT7二重欠損株の細胞ペレットの写真。

送した亜鉛がメラニン色素生成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### 4. 考察とまとめ

これまで、TYRとTYRP1およびTYRP2の補因子の観点からの成熟化過程についてはほとんど明らかにされていなかったが、本研究では、その分子メカニズムの一端を解明した。SK-MEL-2を用いたATP7AおよびZNT5-ZNT6ヘテロ二量体とZNT7ホモ二量体(両ZNT複合体)欠損株による解析の比較、さらに亜鉛輸送活性を持たないZNT5変異体であるZNT5<sub>H451A</sub>とZNT5<sub>D599A</sub>を用いた解析などから、TYRP1は両ZNT複合体によって輸送された亜鉛によって制御されることを示している。これまで、TYRP1はTYRと同じタイプ3銅タンパク質であると考えられてきたが、本結果は、TYRP1の結晶構造で亜鉛が配位していることを報告した論文の内容に呼応する結果と考えている<sup>8,9)</sup>。

本解析では、主にSK-MEL-2細胞を用いてTYR、TYRP1、TYRP2の発現解析を実施した。Western BlottingにおいてTYRP1が特異的に検出されなかった。ZNT5ZNT7二重欠損株において過剰発現させたTYRP1でさえ安定に存在できない事実は、細胞内で両ZNT複合体が存在しない場合、TYRP1の分解が極めて迅速に行われることを示唆する。TYR、TYRP1、TYRP2導入細胞から調整したRNAを鋳型にしたRT-PCR解析では、TYRP1もTYRとTYRP2と同様に発現していることが確認できており(結果省略)、この結果も本仮説を支持する。今後は、この素早いTYRP1の分解機構に関しても解析を進めていく予定である。

TYR、TYRP1、TYRP2はメラノソームマーカーとし

ても用いられるタンパク質である。ATP7A欠損細胞にTYRを発現させると、TYRの活性は消失するが、TYRタンパク質はメラノソームと予想される細胞内小胞に局在した。今後、この局在がメラノソームであるのかメラノソーム特異的タンパク質との比較により検討する予定である。また、このアポ型のTYRが正しくメラノソームに輸送される事実は、亜鉛が配位しないと速やかに分解されることが考えられるTYRP1の結果と対比すると非常に興味深い。

以前の論文で、TYRP2の活性が亜鉛に依存していると報告されていたため<sup>17)</sup>、本解析は当初、ZNT5ZNT7二重欠損株におけるTYRP2の発現に関して解析を進めていた。しかしながら、TYRP2の発現に関しては、欠損株において全く変化がみとめられなかった。したがって、上述の報告が間違いだった可能性もある。しかしながら、この報告を引き続き支持する場合、TYRP2への亜鉛供給は、両ZNT複合体以外の亜鉛トランスポーターが担っていると考えられる。細胞外や細胞小器官で機能する亜鉛酵素の多くは、両ZNT複合体によって亜鉛が輸送されると思われるため、本結果は非常に興味深い例となり、メラノソーム局在型の亜鉛トランスポーターが存在する可能性も浮上する。

これまで、本研究のように金属の中でも特に亜鉛に焦点を当て、メラニン生合成との関わりに着目した研究は、ほぼ皆無であった。メラニン生合成は、TYR酵素群の補酵素となる金属の観点からも複雑な活性発現制御機構が存在することが想定される。本研究の解析を進展させ、メラニン色素生合成の分子機序の解明に繋げたいと考えている。その成果は、美白効果を持つ化粧品などの開発に幅広く応用されることが期待される。

## (引用文献)

- 1) Yamaguchi, Y., and Hearing, V. J., Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4** (2014).
- 2) Solano, F., On the Metal Cofactor in the Tyrosinase Family. *Int J Mol Sci* **19**, 633 (2018).
- 3) Aguilera, F., McDougall, C., and Degan, B. M., Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the *Metazoa*. *BMC Evol Biol* **13**, 96 (2013).
- 4) Decker, H., and Tuczek, F., The Recent Crystal Structure of Human Tyrosinase Related Protein 1 (HsTYRP1) Solves an Old Problem and Poses a New One. *Angew Chem Int Ed Engl* **56**, 14352-14354 (2017).
- 5) Petris, M. J., Strausak, D., and Mercer, J. F., The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum Mol Genet* **9**, 2845-2851 (2000).
- 6) Bennett, D. C., Huszar, D., Laipis, P. J., Jaenisch, R., and Jackson, I. J., Phenotypic rescue of mutant brown melanocytes by a retrovirus carrying a wild-type tyrosinase-related protein gene. *Development* **110**, 471-475 (1990).
- 7) Guyonneau, L., Murisier, F., Rossier, A., Moulin, A., and Beermann, F., Melanocytes and pigmentation are affected in dopachrome tautomerase knockout mice. *Mol Cell Biol* **24**, 3396-3403 (2004).
- 8) Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M., and Dijkstra, B. W., Structure of Human Tyrosinase Related Protein 1 Reveals a Binuclear Zinc Active Site Important for Melanogenesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **56**, 9812-9815 (2017).
- 9) Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M., and Dijkstra, B. W. Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Chemistry* **24**, 47-55 (2018).
- 10) Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A., Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* **5**, 196-201 (2006).
- 11) Blockhuys, S., Celauro, E., Hildesjo, C., Feizi, A., Stal, O., Fierro-Gonzalez, J. C., and Wittung-Stafshede, P., Defining the human copper proteome and analysis of its expression variation in cancers. *Metallomics* **9**, 112-123 (2017).
- 12) Kambe, T., Metalation and maturation of zinc ectoenzymes: A perspective. *Biochemistry* **59**, 74-79 (2020).
- 13) Kambe, T., Taylor, K. M., and Fu, D., Zinc transporters and their functional integration in mammalian cells. *J Biol Chem* **296**, 100320 (2021).
- 14) Takeda, T. A., Miyazaki, S., Kobayashi, M., Nishino, K., Goto, T., Matsunaga, M., Ooi, M., Shirakawa, H., Tani, F., Kawamura, T., Komai, M., and Kambe, T., Zinc deficiency causes delayed ATP clearance and adenosine generation in rats and cell culture models. *Commun Biol* **1**, 113 (2018).
- 15) Suzuki, E., Ogawa, N., Takeda, T. A., Nishito, Y., Tanaka, Y. K., Fujiwara, T., Matsunaga, M., Ueda, S., Kubo, N., Tsuji, T., Fukunaka, A., Yamazaki, T., Taylor, K. M., Ogra, Y., and Kambe, T., Detailed analyses of the crucial functions of Zn transporter proteins in alkaline phosphatase activation. *J Biol Chem* **295**, 5669-5684 (2020).
- 16) Fukunaka, A., Suzuki, T., Kurokawa, Y., Yamazaki, T., Fujiwara, N., Ishihara, K., Migaki, H., Okumura, K., Masuda, S., Yamaguchi-Iwai, Y., Nagao, M., and Kambe, T., Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J Biol Chem* **284**, 30798-30806 (2009).
- 17) Solano, F., Jimenez-Cervantes, C., Martinez-Liarte, J. H., Garcia-Borron, J. C., Jara, J. R., and Lozano, J. A., Molecular mechanism for catalysis by a new zinc-enzyme, dopachrome tautomerase. *Biochem J* **313** (Pt 2), 447-453 (1996).