東北大学

報道機関各位

平成２９年１月１９日
東北大学大学院生命科学研究科

メラニン色素を可視化する新規ツール（M-INK（エム インク））を開発

～ メラノサイトからケラチノサイトへのメラニン色素受け渡しの仕組み解明に期待 ～

【ポイント】

・ケラチノサイトに受け渡されたメラニン色素を効率よく観察することはこれまで困難
・ケラチノサイト内のメラニン色素を可視化する新しいツール（M-INK）を開発
・M-INK を用いてメラノサイトからケラチノサイトに受け渡されたメラニン色素を３次元的に観察することに成功

【概要】

国立大学法人東北大学は、メラニン色素を可視化する新しいツールの開発に成功しました。これは、東北大学大学院生命科学研究科の石田森衛博士（日本学術振興会特別研究員 PD）、福田光則教授らによる研究成果です。

有害な紫外線からわたしたちの体を守るメラニン色素は、メラノサイトの内部に存在するメラノソーム[*1]と呼ばれる特殊な小胞（袋）の中で合成されています。メラノサイト内で形成されたメラノソームは、隣接する皮膚を作る細胞・ケラチノサイトへと受け渡され、そこで沈着することによって肌の暗色化（日焼け）が起こります。メラノサイト内でのメラノソームの輸送の仕組みに関しては、ここ十年ほどでかなりの部分が解明されましたが[*2]、メラノサイトからケラチノサイトにどのようにメラノソームが運ばれるのかは未だ謎に包まれています。メラノサイト内のメラノソーム輸送に比べ解析が遅れている理由の一つとして、ケラチノサイトに受け渡されたメラノソームのみを効率良く顕微鏡で観察することが困難であることが挙げられます。メラノサイト内のメラノソームを観察する抗体などのツール[*3]は幾つか知られていますが、残念ながらこれらのツールではケラチノサイト内のメラノソームを効率良く認識することができませんでした。

今回、研究グループはメラノソーム輸送を行う新規分子の探索過程で、偶然ケラチノサイトのメラノソームも認識できる分子を見出し、メラニン色素を可視化する『M-INK』と名付けて新しいツールの開発に成功しました。今回の M-INK の開発により、ケラチノサイトに受け渡されたメラニン色素を３次元的に観察することが可能となり、メラノサイトからケラチノサイトへのメラノソームの受け渡しの分子機構の解明が飛躍的に進むことが期待されます。

本研究成果は、日本生化学会の国際英文誌『*The Journal of Biochemistry*』の電子版（2017 年１月１７日付）に掲載されました。

【背景】

わたしたちの肌や髪の毛の色の源であるメラニン色素は、有害な紫外線からわたしたちの体を守るために重要な役割を果たしています。しかし、その一方でメラニン色素の肌への過剰な沈着はしみやそばかすの原因にもなっています。メラニン色素は、メラノサイト（メラニン色素産生細胞）に存在する「メラノソーム」と呼ばれる小胞（袋）の中でのみ合成されています。このメラノソームがメラノサイトの細胞内を輸送され、樹状突起と呼ばれる構造物から隣接する肌を作る細胞・ケラチノサイトに受け渡されることによって、はじめて肌の暗色化（日焼け）が起こります（図１）。メラノサイト内でメラノソームがどのように運ばれるかはこの十年ほどでかなり明らかになりましたが、メラノサイトからケラチノサイトへのメラノソームの受け渡しの仕組みはほとんど明らかになっていません。その最大の理由の一つとして考えられているのが、ケラチノサイトに受け渡されたメラノソームのみを効率よく観察するツールがこれまで無かった点です。メラニン色素を含むメラノソームは黒色であるため、光学顕微鏡でも観察可能ですが、ケラチノサイト内の構造物が光の加減で黒っぽく見えることもあり、条件によっては判別が困難なことが多々あります（図２下段、明視野像）。また、メラノサイト内のメラノソームを可視化できるツールとして、メラニン合成酵素や Pmel17（メラニン色素沈着の足場になるタンパク質）に対する抗体が良く用いられていますが、これらの抗体ではケラチノサイト内の黒いメラノソームを効率よく検出することができませんでした（図２上段）。このため、ケラチノサイトに受け渡されたメラノソームを効率よく、且つ３次元的に観察可能な手法の開発が待たれていました。

【研究成果】

研究グループは、メラノソーム輸送を制御する新たな分子の探索の過程で、偶然メラノソームの内部（メラノコア）を認識するタンパク質として Kif1c のテール部分（尾部）を偶然見出しました。Kif1c はモータードメインを持つキネシン分子の一種で、細胞内の物質輸送に関与すると考えられていますが、面白いことに Kif1c そのものはメラノソームの輸送には関与していませんでした（Kif1c のノックダウンでもメラノソームの分布には影響がありません）。そこで、このメラノソームを特異的に認識できるという性質を利用して、メラノソームを可視化する新しいツールの開発に取り組みました。その結果、M-INK（エム-インク：**M**elanocore-**IN**teracting **K**if1c-tail）と名付けた新規のメラノソームの可視化ツールの開発に成功しました。

１．Kif1c のテール領域には幾つかのタンパク質モチーフが存在しますが（図３A）、欠失変異体を用いた解析から、カルボキシル末端側の 879–1100 アミノ酸の部分でメラノサイト内のメラノソームを認識することが明らかになりました（図３B、下段）。すなわち、Myc タグを付加した Kif1c テール（879–1100）を発現させ、免疫染色した細胞を蛍光顕微鏡で観察すると、メラノソーム上でのみシグナル（緑色の蛍光）が観察されました。

２．次に、Kif1c テール（879–1100）をグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質の形で培養細胞に発現させ、リコンビナントタンパク質を生化学的に精製しました（図４A）。精製した GST-Kif1c(879–1100)（以下、M-INK と表記）は、固定したメラノサイト内のメラノソームを免疫蛍光染色法により観察することができました（図４B、右側）。

３．M-INK はメラノコアと呼ばれるメラノソームの内部を認識すること（図５A、下段）、及びチロシナーゼ（メラニン合成酵素の鍵酵素）を欠損しメラニン色素を持たないメラノソ

ームは認識できないことから（図５B、上段）、成熟した黒いメラノソーム（メラニン色素）を認識するものと考えられました。

４．M-INK はメラノサイト内のメラノソームだけでなく、ケラチノサイトに受け渡されたメラノソームも効率よく認識することができました（図６）。また、共焦点蛍光顕微鏡を用いてケラチノサイトに受け渡されたメラノソームを３次元的に観察すること（メラノサイト内のメラノソームとケラチノサイト内のメラノソームを区別すること）にも成功しました（図７）。

以上の結果から、M-INK はケラチノサイトに受け渡されたメラノソーム（メラニン色素）を検出する理想的なタンパク質ベースのツールであることがはじめて明らかになりました。

【今後の展開】

今回の M-INK の開発により、メラノサイトからケラチノサイトに受け渡されたメラノソームを効率よく可視化し、３次元的に観察することが可能になりました。M-INK がどのようしてメラノソームの内部を認識するかは今後の課題ですが、このツールを駆使することにより、これまで謎に包まれていたメラノサイトからケラチノサイトへのメラノソームの受け渡しの分子機構の解明が飛躍的に進むものと考えられます。また、従来の美白化粧品のターゲットの主流はメラノサイト側（例えば、メラニン合成酵素の活性阻害など）になっていますが、今回の M-INK によるケラチノサイト内のメラノソーム量の評価系を用いることにより、ケラチノサイト側（例えば、メラノサイトからケラチノサイトへのメラノソームの受け渡しの阻害やケラチノサイト内でのメラノソームの代謝の促進など）をターゲットにした美白化粧品の開発が今後進むことが期待されます。

※本研究成果は、公益財団法人 東レ科学技術振興会・研究助成金「リソソーム関連オルガネラ輸送の分子機構の解明」（研究代表者：福田光則 東北大学大学院生命科学研究科教授）、花王メラニン研究会「Kif1c モータータンパク質によるメラノソーム輸送メカニズムの解明：新規メラノソーム特異的マーカーの開発」（研究代表者：石田森衛 日本学術振興会特別研究員 PD）等のサポートによるものです。

【図及び説明】

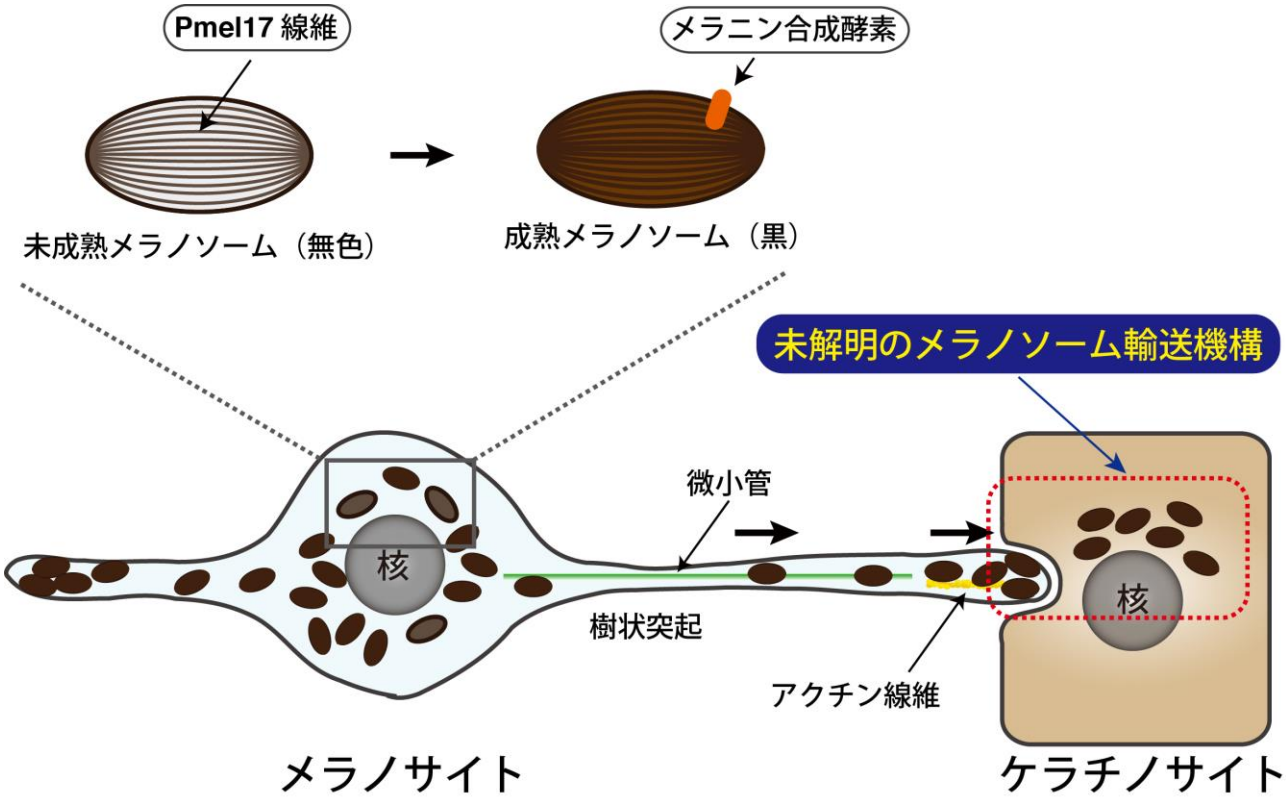

図１　メラノサイトからケラチノサイトへのメラノソームの輸送の概要（日焼けの過程）

メラニン色素を合成・貯蔵するメラノソームは、その成熟度合い（色の濃さ）によって未成熟メラノソームと成熟メラノソームに大別されます。未成熟メラノソームでは、メラノソームの元となる袋とメラニン色素が将来沈着する Pmel17 線維が形成されていますが、メラニン合成酵素が無いため色は付いていません。一方、成熟メラノソームにはメラニン色素を合成するメラニン合成酵素が存在し、黒く着色されています（上段）。このため、Pmel17 は未成熟メラノソームのマーカーとして、メラニン合成酵素は成熟メラノソームのマーカーとして、頻繁に使用されています。

核の周辺で成熟したメラノソームは、細胞内の二種類の道路（細胞骨格：微小管とアクチン線維）に沿って細胞膜の直下まで輸送され、最終的に隣接するケラチノサイトに受け渡されて肌の暗色化（日焼け）が起こります。これまでの研究グループの解析により、メラノサイト内のメラノソーム輸送の分子機構はかなり明らかになっていますが（*2 参照）、メラノサイトからケラチノサイトへのメラノソームの受け渡しやその後のケラチノサイト内でのメラノソーム輸送の仕組みの詳細はほとんど分かっていません（下段、赤点線の部分）。これらの機構の解明が遅れている理由の一つとして、ケラチノサイトに受け渡されたメラノソームを従来のマーカーでは効率良く認識することができなかった点が挙げられます。例えば、メラノサイトでは良く用いられるメラニン合成酵素に対する抗体は、ケラチノサイト内のメラノソームを検出することができません（図２参照）。

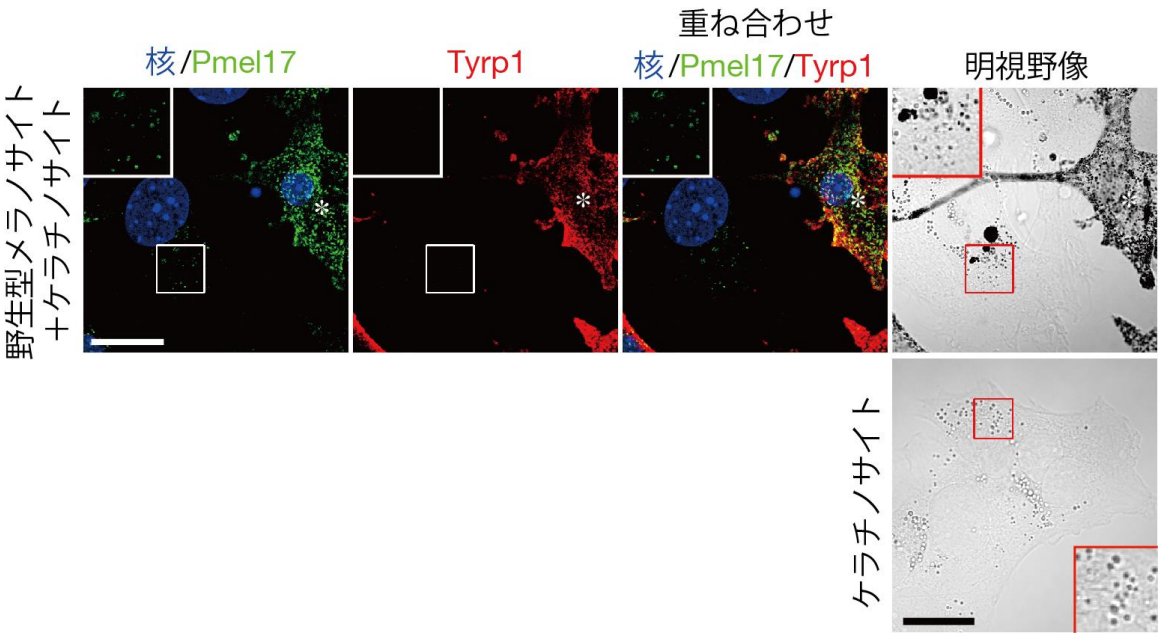

図２　従来のツールによるケラチノサイト内のメラノソームの検出と問題点

（上段）マウス培養メラノサイト（melan-a 細胞）とケラチノサイト（XB2 細胞）を共培養し、メラノソームの受け渡し後に、メラノソームを検出する従来のツールを用いて免疫染色を行いました（上段）。未成熟メラノソームのマーカーである Pmel17 に対する抗体（緑色）、成熟メラノソームのマーカーである Tyrp1（メラニン合成酵素）に対する抗体（赤色）は、いずれもメラノサイト内のメラノソームを綺麗に染色できますが（＊の細胞）、ケラチノサイトに受け渡された黒いメラノソームはほとんど認識できません（挿入図）。Pmel17 に対する抗体ではある程度シグナルが見られますが、明視野像で見られる黒い成熟さしたメラノソームはあまり認識されていません。左上の挿入図は写真の四角の部分の拡大図を示します。なお、青色は核（DAPI）の位置を示します。スケールバー ＝ 20 μm。

（下段）ケラチノサイト単独で培養した際の明視野像。ケラチノサイト内の構造物が光の加減で黒っぽく見えることがあり（挿入図：四角の拡大図）、メラノソームとの判別が困難なことがあります。スケールバー ＝ 20 μm。

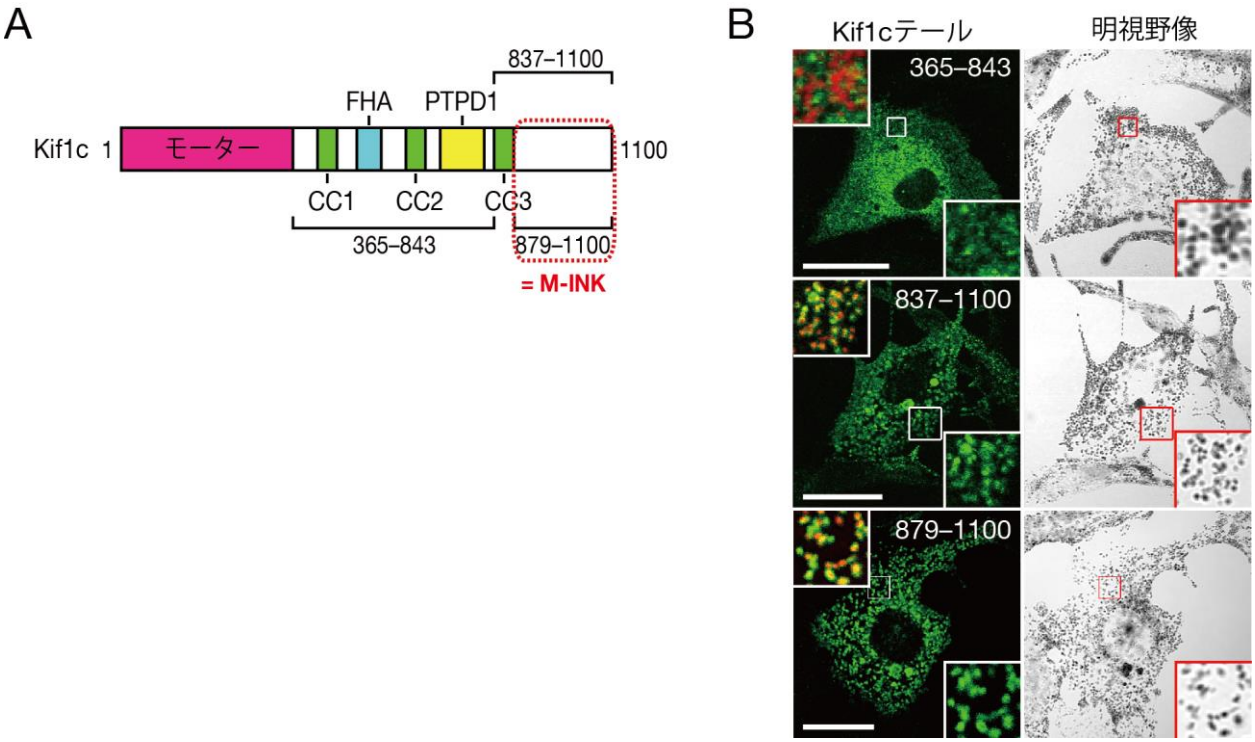

図３　Kif1c のドメイン構造とメラノソームを認識するテール領域の決定

（A）Kif1c はアミノ末端側にモータードメインを持ち、テール領域には三つのコイルド-コイルドメイン（CC1-3）、FHA ドメイン、及び PTPD1 ドメインが存在しています。欠失変異体を用いた解析から、カルボキシル末端側の 879–1100 アミノ酸の部分でメラノソームを認識することが明らかになりました（B 参照）。

（B）各種 Kif1c テール領域の欠失変異体に Myc タグを付加し、マウス培養メラノサイト（melan-a 細胞）に発現させた後、抗 Myc タグ抗体で免疫染色（緑色）を行いました。その結果、メラノソームの認識には、Kif1c テール領域の 879–1100 アミノ酸が必要十分であることが明らかとなり、この領域を M-INK として用いることしました（図４A 参照）。右下の挿入図は写真の四角の部分の拡大図を示し、左上の挿入図はメラノソーム（赤色の疑似カラー）と Kif1c テール領域との共局在を示しています。スケールバー ＝ 20 μm。

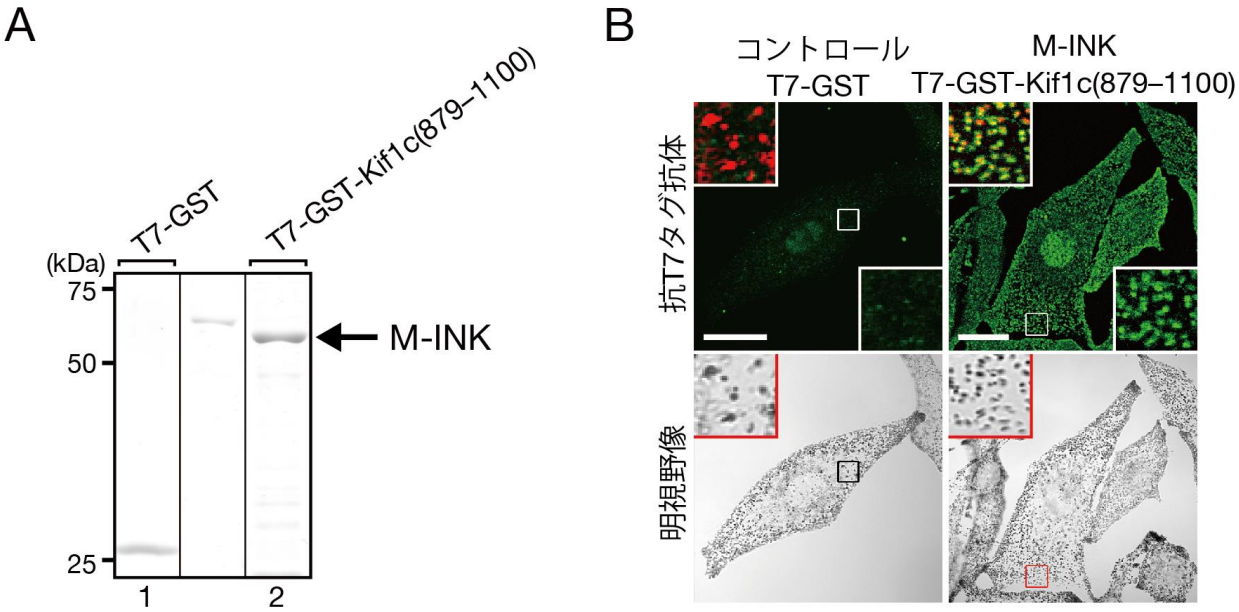

図４　M-INK によるメラノサイトのメラノソームの染色

（A）Kif1c テール(879–1100)に T7-GST タグを付加し、培養細胞（HEK293T 細胞）に発現させた後、グルタチオンセファロースによりリコンビナントタンパク質の精製を行いました。本研究では、このリコンビナント分子を M-INK として使用しました。

（B）マウス培養メラノサイト（melan-a 細胞）を固定後、M-INK とインキュベーションし、抗 T7 タグ抗体で M-INK を検出しました。右下の挿入図は写真の四角の部分の拡大図を示し、左上の挿入図はメラノソーム（赤色の疑似カラー）との共局在を示しています。スケールバー＝ 20 μm。

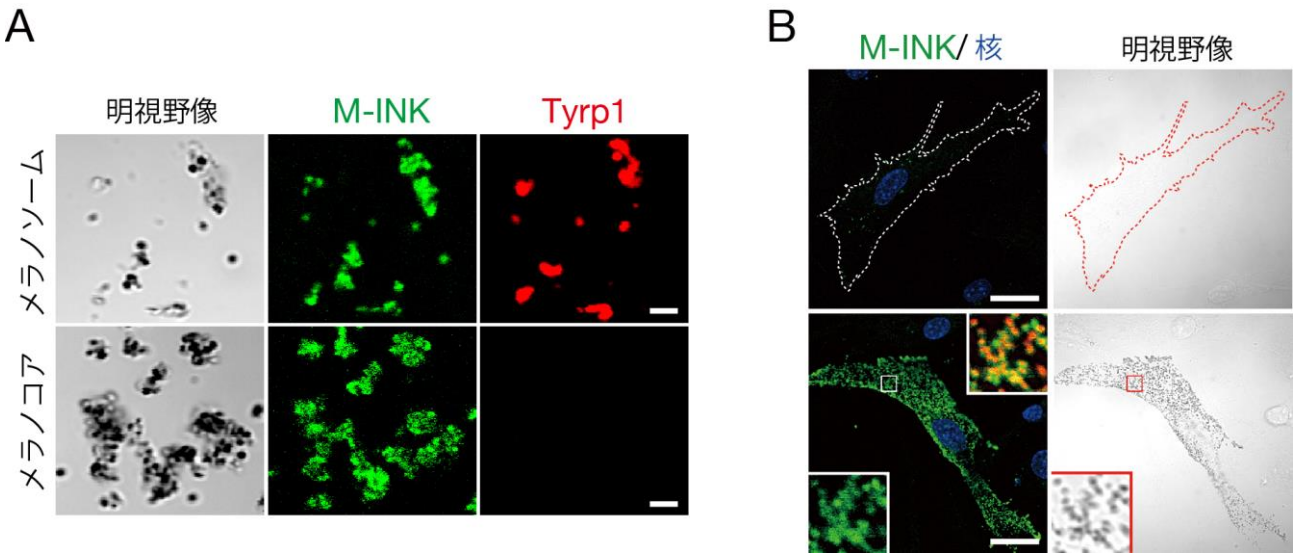

図５　M-INK はメラノソームの内部（メラノコア）を認識する

（A）メラノサイトから生化学的に精製したメラノソーム及びその内部（メラノコア）を M-INK やメラニン合成酵素 Tyrp1 に対する抗体より免疫染色しました。Tyrp1 はメラノソームの膜上に存在するため、精製したメラノコアでは Tyrp1 のシグナルは見られませんが、M-INK ではメラノコアも検出することができます。左下の挿入図は写真の四角の部分の拡大図を示しています。スケールバー ＝ 2 μm。

（B）メラニン合成酵素（チロシナーゼ）を欠損するマウス培養メラノサイト（melan-c 細胞）を固定後、M-INK による免疫染色を行いましたが、メラニン色素が無いためシグナルは観察されません（上段）。この細胞にチロシナーゼを再発現させると、M-INK により綺麗に染色されるようになります。左下の挿入図は写真の四角の部分の拡大図を示し、右上の挿入図はメラノソーム（赤色の疑似カラー）との共局在を示しています。なお、青色は核（DAPI）の位置を示します。スケールバー ＝ 20 μm。

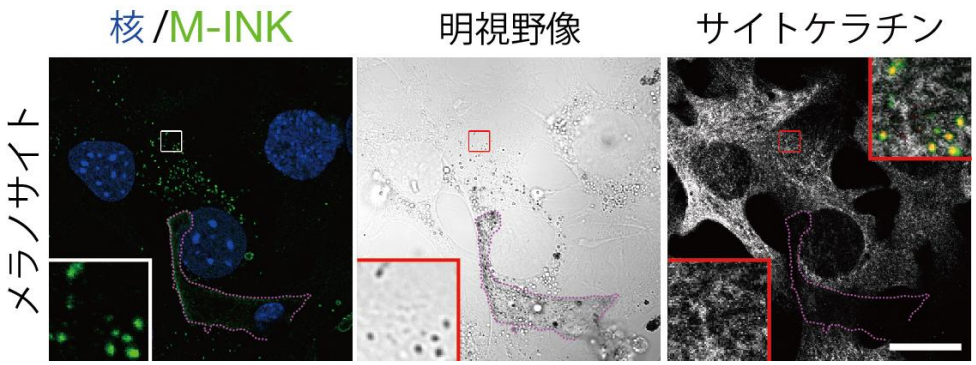

図６　M-INK によるケラチノサイトに受け渡されたメラノソームの検出

共培養したマウス培養メラノサイト（melan-a 細胞：点線の部分）とケラチノサイト（XB2 細胞：サイトケラチンで染色）を固定し、免疫染色法により M-INK を用いてメラノソームを検出しました。左下の挿入図は写真の四角の部分の拡大図を示し、右上の挿入図はメラノソーム（赤色の疑似カラー）との共局在を示しています。なお、青色は核（DAPI）の位置を示します。スケールバー ＝ 20 μm。

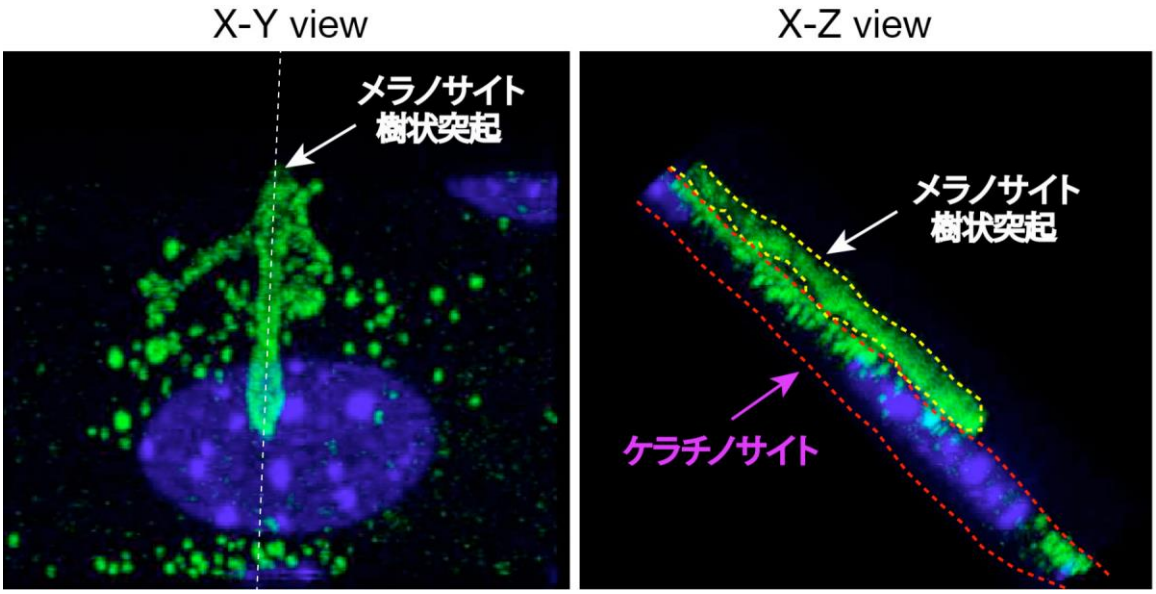

図７　M-INK によるケラチノサイトに受け渡されたメラノソームの３次元的観察

図６と同様に、マウス培養メラノサイト（melan-a 細胞）とケラチノサイト（XB2 細胞）を共培養し、固定後に M-INK を用いてメラノソーム（緑色）を検出しました。平面的に見た場合には（右図、X-Y view）、メラノサイト内のメラノソームとケラチノサイト内のメラノソームを区別することはできませんが、共焦点顕微鏡を用いて３次元的に観察することにより（左図、X-Z view：右図の白点線の断面図に相当）、メラノサイトの樹状突起（黄色の点線）からケラチノサイト内（赤色の点線）に受け渡されたメラノソームを観察することが初めて可能になりました。なお、青色は核（DAPI）の位置を示します。

【用語説明】

＊１　メラノソーム

真核細胞の細胞内には膜で包まれた細胞小器官（オルガネラ）と呼ばれる袋状の構造物が多数存在しています。メラノソームはメラニン色素を合成・貯蔵するのに特化したオルガネラで、メラノサイト（メラニン色素産生細胞）と呼ばれる特殊な細胞にのみ存在しています。メラニン色素はメラニン合成酵素（チロシナーゼやチロシナーゼ関連タンパク質 1（Tyrp1）など）によって生成され、メラノソームに貯蔵されます。成熟した黒いメラノソームは、メラノサイトの細胞内を細胞骨格に沿って輸送され（図１）、隣接する肌を作る細胞・ケラチノサイトに受け渡され、はじめて肌の暗色化が起こります。

＊２　メラノサイト内でのメラノソーム輸送機構

研究グループでは、これまでメラノサイト内の細胞骨格（微小管とアクチン線維）に沿ったメラノソーム輸送の分子機構の解明に成功しています（下記 URL 参照）。

プレスリリース（2004 年 11 月 15 日）
『メラニン色素』の輸送メカニズムを解明 － 肌や髪の毛が黒くなる仕組み－
http://www.riken.jp/~/media/riken/pr/press/2004/20041115_1/20041115_1.pdf

プレスリリース（2012 年 1 月 30 日）
『メラニン色素』の逆行性輸送の仕組みを解明 ～ 白髪予防の新たな分子標的として期待？ ～
http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20120130.pdf

プレスリリース（2012 年 7 月 11 日）
メラニン色素の『微小管順行性輸送』を制御する分子を遂に発見！ ～ メラニン色素を運ぶ三種類の輸送経路の最後の仕組み解明へ ～
http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20120704_01web.pdf

＊３　従来のメラノソームを検出するツール

メラノサイト内のメラノソームを検出するツールとしては、メラノソーム膜に局在するタンパク質に対する抗体が最もよく用いられています。例えば、メラニン合成酵素であるチロシナーゼや Tyrp1 に対する抗体は、メラノサイト内のメラノソームを効率よく染色できますが、ケラチノサイトに受け渡されたメラノソームを全く検出することができません（図２上段：緑色）。このため、Pmel17 と呼ばれるメラノソーム内部のタンパク質（メラニン色素が沈着する線維を形成）に対する抗体がケラチノサイトに受け渡されたメラノソームの検出に用いられることがあります。しかし、Pmel17 は黒くない未成熟なメラノソームのマーカーであるため、ケラチノサイトに受け渡された黒いメラノソームの一部しか実際には認識することができません（図２下段：赤色）。また、メラニン色素を化学的に染色する手法としてフォンタナ・マッソン法が知られていますが、光学顕微鏡による観察のため３次元的な観察には不向きで、メラノサイト内のメラノソームとケラチノサイト内のメラノソームを区別することができないというデメリットがあります（図７参照）。

【論文題目】

Ishida, M., Marubashi, S. & Fukuda, M. (2017) M-INK, a novel tool for visualizing melanosomes and melanocores. ***J. Biochem.***, in press (doi: 10.1093/jb/mvw100)

「メラノコア及びメラノソームを可視化する新規ツール M-INK の開発」

URL: https://academic.oup.com/jb/article/2917747/M-INK-a-novel-tool-for-visualizing-melanosomes-and

お問い合わせ先
（研究に関すること）
東北大学大学院生命科学研究科
教授　福田　光則　（ふくだ　みつのり）
電話番号：　022-795-7731（or 022-795-3641）
Ｅメール：　nori@m.tohoku.ac.jp

（報道に関すること）
東北大学大学院生命科学研究科広報室
担当　高橋　さやか
電話番号：　022-217-6193
Ｅメール：　lifsci-pr@grp.tohoku.ac.jp