

2006年9月14日
 独立行政法人 理化学研究所
 国立大学法人 東北大学

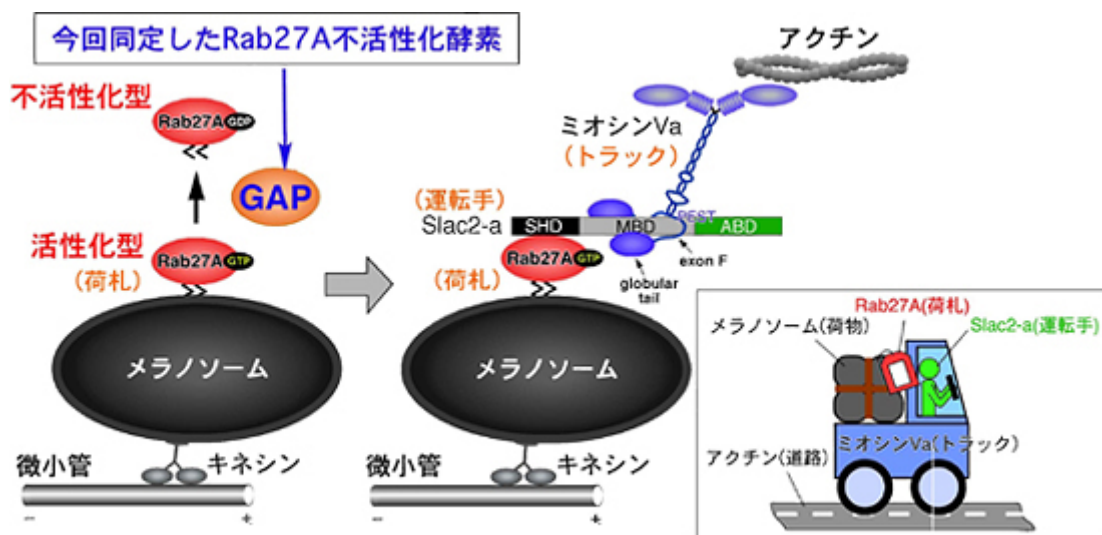
『メラニン色素』の輸送を阻害する新酵素発見

- 皮膚の暗色化制御を行う分子標的として期待 -

皮膚や髪の毛に含まれる「メラニン色素」は、小麦色の日に焼けた健康的な肌などをつくる一方、しみやそばかすの原因となります。体内で色素を生産する細胞「メラノサイト」で合成されたメラニン色素は、「メラノソーム」という袋に入って、皮膚に輸送・沈着することで、日焼け、しみ、そばかすになるとされています。メラノソーム輸送においては、荷札のような役割を果たす「ラブ27エー (Rab27A)」と呼ばれる小さなタンパク質が活性化して輸送が始まる、とされています。しかし、その分子が活性化したり不活性化したりするメカニズムは解明されないうままでした。

理研福田独立主幹ユニットと東北大学大学院生命科学研究科膜輸送機構解析分野の研究グループは、このラブ27エーを特異的に不活性化する酵素「ラブ27エー・ギャップ (Rab27A-GAP)」を発見しました。新酵素ラブ27エー・ギャップは、荷札のラブ27エーをはずしてメラニン色素の輸送を阻害するのです。

この新酵素は、ヒトの皮膚や毛根でも機能している可能性が高く、この研究がさらに進むと肌の美白維持や白髪の発生を止めることが期待されます。近い将来、しみ、そばかす、白髪に悩む人々を救うことになるかもしれませんね？



(図) Rab27A の不活性化・活性化のメカニズム

2006年9月14日
独立行政法人 理化学研究所
国立大学法人 東北大学

『メラニン色素』の輸送を阻害する新酵素発見

- 皮膚の暗色化制御を行う分子標的として期待 -

◇ポイント◇

- ・メラニン色素輸送に必須のタンパク質「Rab27A(ラブエー)」を不活性化する酵素を発見
- ・多様な Rab とその機能を制御する酵素との関係を探る新たな手法を開発
- ・肌の美白維持に期待

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）と国立大学法人東北大学（吉本高志総長）は共同で、肌や髪を黒くするメラニン色素の輸送を阻害する新しい酵素「Rab27A-GAP（ラブ 27 エー・ギャップ）」を発見しました。福田独立主幹研究ユニットの伊藤敬基礎科学特別研究員と東北大学大学院生命科学研究科福田光則教授（福田独立主幹研究ユニットユニットリーダー兼務）による研究成果です。

メラニン色素は、「メラノサイト^{*1}」と呼ばれる皮膚の基底層にある細胞の中で合成され、メラノソームと呼ばれる膜に包まれた袋（小胞）に貯蔵されています。このメラノソームが、メラノサイト内を移動し肌や髪を作る細胞に受け渡されることで、肌や髪の色が黒くなります。メラノサイトにおけるメラノソームの輸送は「Rab27A」と呼ばれる低分子量Gタンパク質^{*2}の活性化が不可欠で、GTP（ジー・ティー・ピー）と結合し活性化したRab27Aが、共に働くパートナーとなるタンパク質と結合することではじめて、正常に行われます。しかし、このRab27Aが活性化したり、逆に不活性化したりする分子メカニズムそのものは、これまで全く解明できていませんでした。

今回、研究グループは、Rab27A分子を特異的に不活性化させる分子の探索を行い、Rab27A不活性化酵素（Rab27A-GAP; Rab27A分子のGTP加水分解活性を促進する酵素）を同定することに初めて成功しました。同定した酵素「Rab27A-GAP」は、試験管内で活性化型の「GTP-Rab27A」から不活性化型の「GDP-Rab27A」への変換を促進するだけでなく、メラノサイトに過剰に発現させるとメラノソーム上のRab27A分子を不活性化し、メラノソームの輸送阻害を引き起こす新機能があることを明らかにしました。

今回同定したRab27A-GAP分子はヒトの皮膚や毛根においても機能している可能性が高く、メラノソーム輸送を人為的に制御するための新規の分子標的として応用可能です。今後、この分子の活性化・不活性化を促す薬の開発が進めば、肌の美白の維持や白髪発生の抑制などの研究にも役立つものと期待されます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『*The Journal of Biological Chemistry*』オンライン版に近く掲載されます。

1. 背景

皮膚や髪の毛に含まれるメラニン色素は、私達の体を有害な紫外線から守るために重要な役割を果たしていますが、その一方でしみやそばかすの原因ともなっています。メラニン色素は、メラノサイトと呼ばれる細胞で合成され、メラノソームに貯蔵されます。細胞の核周辺で成熟したメラノソームは、細胞内にはり巡らされた交通網（微小管とアクチン線維）に沿って細胞膜まで移動し、最終的に皮膚や髪の毛の細胞（ケラチノサイトや毛母細胞）に受け渡されます（図 1）。低分子量Gタンパク質の一つであるRab27Aは、メラノソーム輸送を司る『鍵タンパク質』（メラノソームの荷札役として機能する）として知られており、活性化型のGTPと結合したRab27A（GTP-Rab27A）は、エフェクターと呼ばれる特異的なパートナー分子と結合することでメラノソーム輸送を行います^{*3}。Rab27Aがメラノソームを正しく輸送するためには、不活性化型（GDP-Rab27A）と活性化型（GTP-Rab27A）の適切なサイクリングが重要と考えられていますが（図 2）、Rab27A自身の活性化・不活性化の分子メカニズムはこれまで全く解明されていませんでした。

2. 研究手法と成果

一般的に、低分子量Gタンパク質Rabの不活性化酵素としてはGTP加水分解活性タンパク質（GAP;ギャップ）^{*4}が想定されていますが、Rab27Aを含むほとんどのRabに関して特異的な不活性化酵素（GAP）が同定されていないのが現状です。最近、TBCドメイン^{*5}と呼ばれるタンパク質モチーフが、この不活性化酵素GAPのドメインにあたるのではないかと、という報告がされました。ところが、ヒトでは50種類近いTBCドメイン含有タンパク質（以下、TBCタンパク質と略）が存在するため、どのTBCタンパク質が60種類のどのRabに対するGAPなのか対応を付けることは容易ではありませんでした^{*5}。本研究では、Rab27A-GAPがRab27Aの機能を特異的に不活性化することに着目し、メラニン色素の輸送を指標とした新規のRab27A-GAPスクリーニング法を確立しました。具体的には、40種類のTBCタンパク質をメラノサイトに一つずつ導入し、Rab27Aが不活性化されメラノソームの輸送阻害すなわち核周辺でのメラノソーム凝集が起こることを観察しました（図 3）。

ヒトのゲノム上に存在する40種類のTBCタンパク質を一つずつマウスの培養メラノサイトに導入した結果、二種類のTBCタンパク質（以下、Rab27A-GAP α と β と呼びます）^{*6}だけで強いメラノソームの輸送阻害が観察されました。図 3 にその一例を示したように、コントロールの細胞ではメラノソームは細胞膜の周辺に局在しますが、これらのTBCタンパク質を発現するメラノサイトでは、メラノソームの凝集すなわち輸送の阻害が見られます（中段及び下段の矢印の細胞）。また、Rab27A-GAP α を導入した細胞を抗Rab27A抗体で染色すると、荷札役のRab27Aがメラノソーム上から遊離し、積み荷のメラノソームが輸送されなくなっていることも明らかになりました（図 4 下）。

本研究ではさらに、Rab27A-GAP α に着目し、この分子が試験管内でRab27Aに対し特異的なGAP活性を示す（すなわちRab27Aを不活性化する）こと、TBCドメイン内に存在する酵素活性に必要なアミノ酸を置換した変異体では、Rab27A-GAP活性が消失することも見いだしました（図 5）。これらの結果から、Rab27A-GAP α は特異的なRab27A-GAPとしてメラノサイトの細胞内で機能することが明らかに

なりました。

TBCタンパク質は、低分子量Gタンパク質Rabの不活性化酵素として機能すると予想されていますが、これまでターゲットのRabを体系的に同定する手法が確立されていませんでした。今回確立したRabの局在を指標としたスクリーニング法は、Rab27A以外の他のRabに関する基本的に応用可能であり、他のRabに対するGAPのスクリーニングにも有用と考えられます。膜輸送過程におけるRabの不活性化機構の解明は、重要な研究課題にもかかわらず大部分のGAPが未同定なこともあり未開拓の研究分野です。今後、このスクリーニング法を用いたGAPの同定が進めば、Rab不活性化の分子メカニズムの解明が急速に進展するものと考えられます。

3. 今後の展開

紫外線を浴びると、私達の体内ではメラノサイトが活性化され、合成されたメラニン色素が皮膚に輸送・沈着することにより日焼け、しみ、そばかすが発生します。つまり、メラノサイトにおけるメラニン色素輸送の人為的制御は、肌の美白維持とも密接な関連があると言えます。今回発見した Rab27A 不活性化酵素

(Rab27A-GAP) は培養メラノサイトにも発現しており、ヒトの皮膚や毛根においても機能している可能性が極めて高いことから、皮膚の暗色化制御の分子標的や白髪発生の抑制などに応用可能です。今後、Rab27A-GAP の GAP 活性を促進・阻害する薬の開発が進むことが期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

福田独立主幹研究ユニット

独立主幹研究員 (ユニットリーダー)

福田 光則

基礎科学特別研究員

伊藤 敬

Tel : 048-462-4994 / Fax : 048-462-4995

国立大学法人東北大学

大学院生命科学研究科 生命機能科学専攻

膜輸送機構解析分野

教授 福田 光則

Tel : 022-795-7731 / Fax : 022-795-7733

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 メラノサイト

脊椎動物のメラニン色素（メラニン色素を含む黒色の色素顆粒=メラノソーム）を産生する細胞で、表皮の内側（基底層）や毛髪の付け根（毛球）に存在する。メラノソームを皮膚や毛髪の細胞に受け渡すことにより、体色の変化に関わる細胞。紫外線、ストレス（活性酸素）、ある種のホルモンに応じてメラニン色素の合成を活性化し、生体防御に携わる一方で、メラノサイトが合成するメラニン色素はしみ、そばかすの原因となる。またメラノサイトががん化すると、メラノーマ（悪性黒色腫）という非常に危険ながん細胞になる。

※2 低分子量 G タンパク質 Rab(ラブ)

メラノソームなどの小胞や膜の輸送（膜輸送と総称される）を適切に行うためには交通整理人（制御タンパク質）の存在が不可欠である。この交通整理人の一つとしてヒトを含む真核生物普遍的に存在しているのが低分子量 G タンパク質 Rab。ヒトには 60 種類以上の Rab が存在しており、それぞれが固有の膜輸送を制御すると考えられている。Rab は GTP（ヌクレオチドの一種で、グアノシンにリン酸基が 3 個結合）を結合した活性化型と GDP（ジューディーピー;グアノシンにリン酸基が 2 個結合）を結合した不活性化型の二つの状態をとり、活性化型の GTP-Rab はエフェクターと呼ばれる特異的なパートナー分子と結合することにより膜輸送を促進する。

※3 プレスリリース『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—（2004 年 11 月 15 日）

※4 GAP(GTP 加水分解活性促進酵素)(ギャップ)

GAP は、低分子量 G タンパク質の GTP 加水分解活性（GTP のリン酸基が一つ取れ、GDP へ変換）を促進する G タンパク質の不活性化酵素。Rab の場合には、*5 の TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) ドメインを持つ分子が Rab に対する GAP として機能すると考えられているが、その機能の詳細は明らかではない。

※5 TBC ドメイン

TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) ドメインは、約 200 アミノ酸からなるタンパク質モチーフで、ヒトの場合には Rab の種類数に匹敵する約 50 種類の分子に見いだされている。Rab-GAP ドメイン候補として最近注目を集めているが、ターゲットの Rab は何かなどその機能の詳細は明らかではない。これまで酵素-基質特異性に基づく Rab と TBC タンパク質の物理的結合を指標にした Rab-GAP のスクリーニング法が開発されているが、この手法では Rab27A-GAP を同定することは出来ていない (*Genes Cells* (2006) 11, 1023-1037)。

※6 Rab27A-GAP α 及び β

EPI64 はアクチン線維の束化に関与するタンパク質 (EBP50; イービーピー50) の結合タンパク質として既に同定されていたが、その詳細な機能やターゲットの Rab (どの Rab に対する GAP として作用するのか) に関しては全く分かっていない。FLJ13130 は新規のタンパク質で EPI64 と非常に高い相同性を示すことから (図 4 上)、ここでは、EPI64 を Rab27A-GAP α 、FLJ13130 を Rab27A-GAP β と呼ぶことにする。

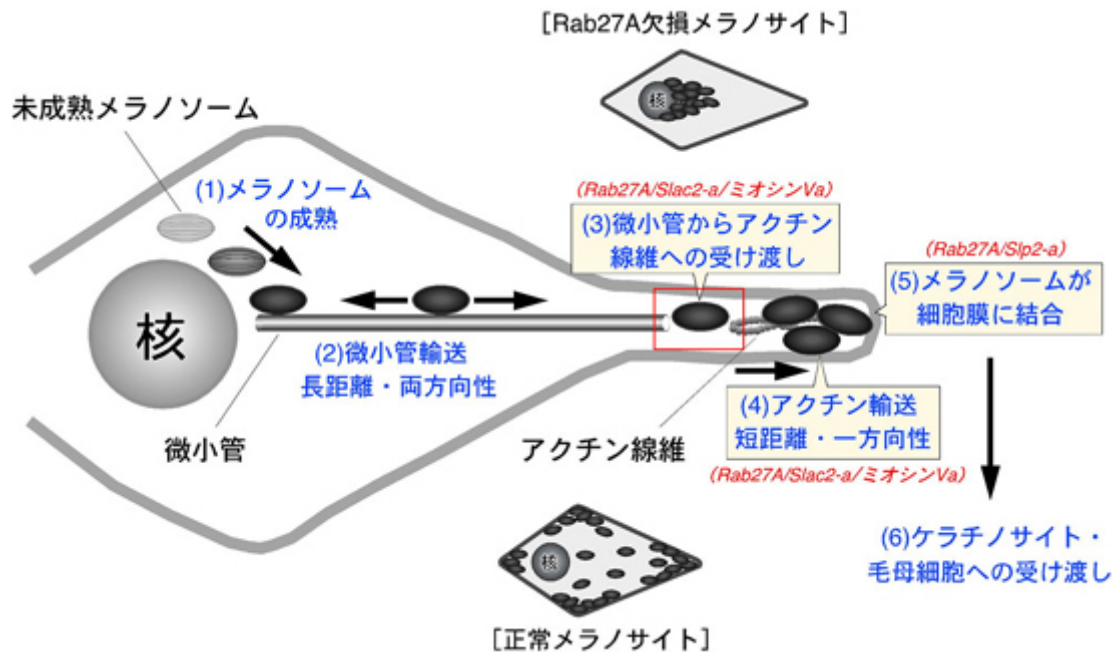


図 1 細胞レベルで見たメラノソームの輸送メカニズム

- (ステップ 1) メラノサイトの核の周辺で合成されたメラニン色素は、メラノソームに蓄積される。
- (ステップ 2) 成熟したメラノソームはまず長距離・両方向性の微小管輸送により細胞膜の近くまで輸送される。
- (ステップ 3) 細胞膜近くまで輸送されたメラノソームは、微小管から短距離・一方向性のアクチン線維に乗り換える。
- (ステップ 4) メラノソームはアクチンにより細胞膜直下まで輸送される。
- (ステップ 5) メラノソームは細胞膜につなぎ止められる。
- (ステップ 6) メラノソームは最終的に隣接する肌を作る細胞(ケラチノサイト)あるいは毛を作る細胞(毛母細胞)に受け渡され、皮膚や毛髪の色化が起る。

低分子量 G タンパク質の一つ「Rab27A」は、ステップ 3~5 に必須の因子で、Rab27A が欠損するとメラノソーム輸送の阻害 (メラノソーム凝集) が起る。

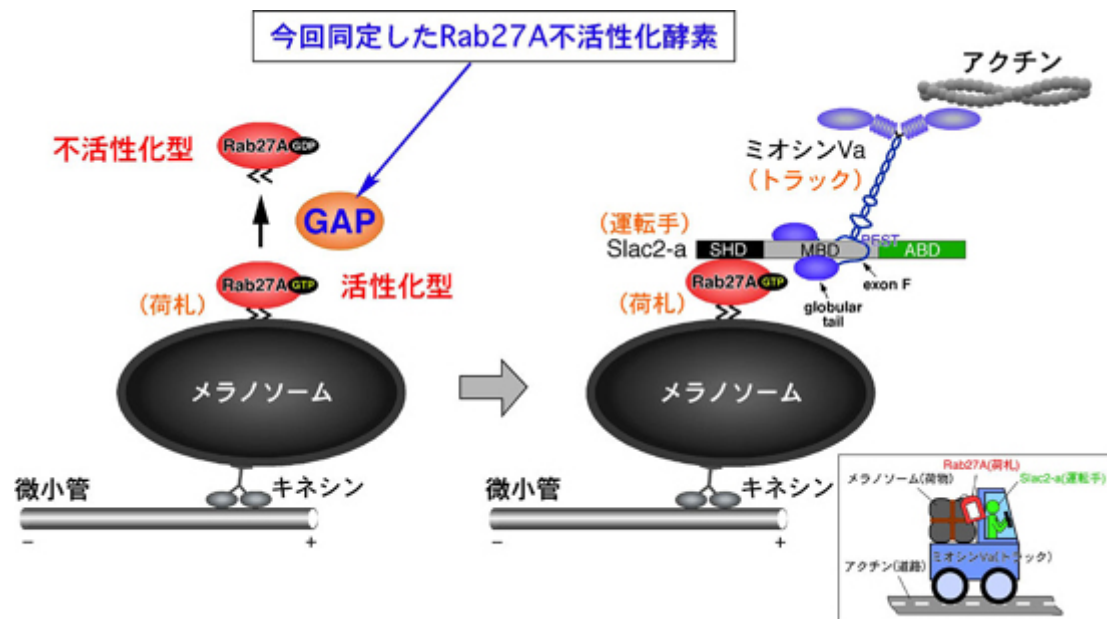


図2 Rab27Aの不活性化・活性化のメカニズム

活性化型である「GTP-Rab27A」は、成熟したメラノソームを示す荷札的な役割を持ち、不活性化型の「GDP-Rab27A」はメラノソームから遊離し、細胞質中に存在すると考えられている。Rab27Aの不活性化には「GAP」という酵素の関与が示唆されているが、その実体はこれまで明らかではなかった。今回同定した「Rab27A-GAP」は、Rab27Aを不活性化型の「GDP-Rab27A」に変換するため、メラノソーム上には荷札役のRab27Aが存在しなくなる。このため、「Rab27A-Slac2-a-ミオシンVa（荷札・運転手・トラック）」の輸送複合体が形成できず（図1のステップ3に相当）、メラノソームの輸送障害が引き起こされたと考えられる。

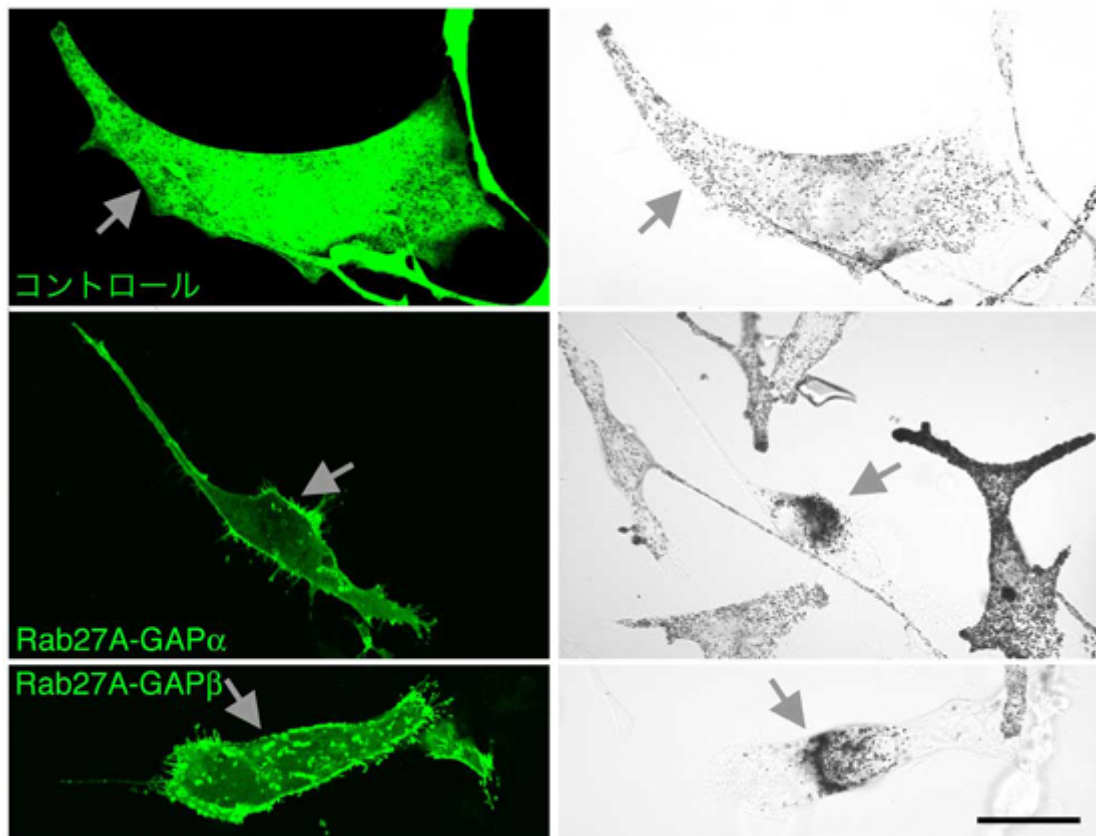


図3 TBC タンパク質発現によるメラノソーム輸送の阻害

緑色蛍光タンパク質 (GFP) と融合した TBC タンパク質を、培養メラノサイト (melan-a 細胞) に導入すると、Rab27A-GAP α 及び Rab27A-GAP β でメラノソームの強い凝集、すなわち輸送阻害が観察された (中段及び下段の矢印の細胞)。蛍光タンパク質 GFP のみあるいは他の TBC タンパク質では、このような強いメラノソームの輸送阻害は観察されなかった。(左図) GFP あるいは GFP-Rab27A-GAP を発現する細胞、(右図) 左図に対応する明視野像。

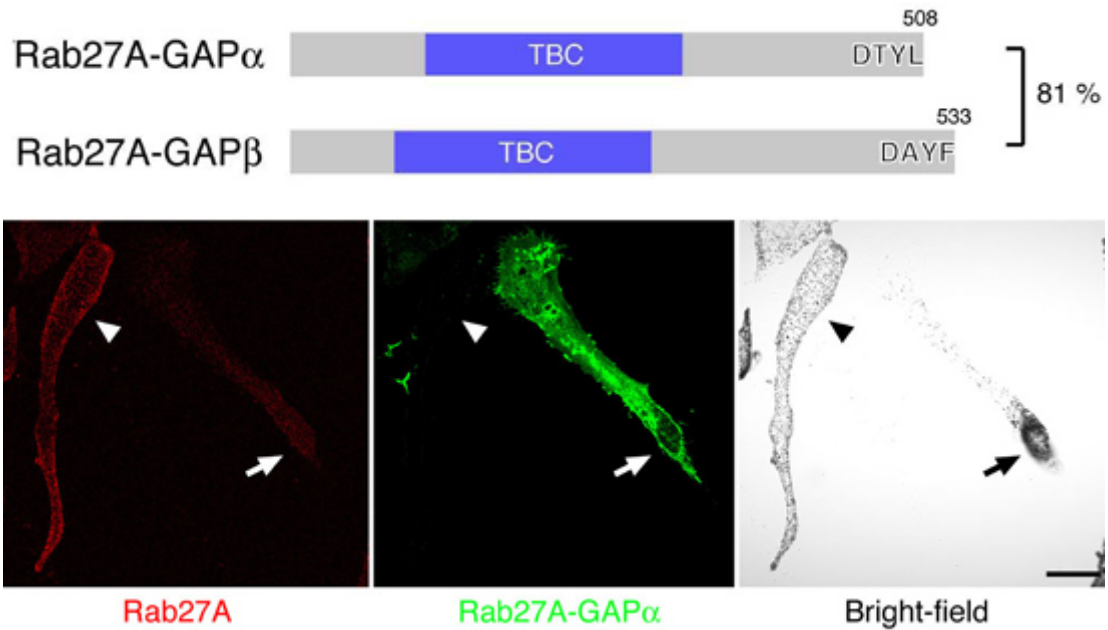


図4 Rab27A-GAP α の過剰発現による Rab27A のメラノソームからの遊離

(上図) Rab27A-GAP α 及び Rab27A-GAP β のドメイン構造。
 (下図) Rab27A-GAP α を発現するメラノサイト (下図中央の矢印で示した緑色の細胞) では、コントロールの細胞 (下図左、矢頭) に比べ Rab27A を示す赤色のシグナルがメラノソーム上から顕著に減少し (下図左、矢印)、明視野で観察するとメラノソームの核周辺での凝集が見られる (下図右、矢印)。

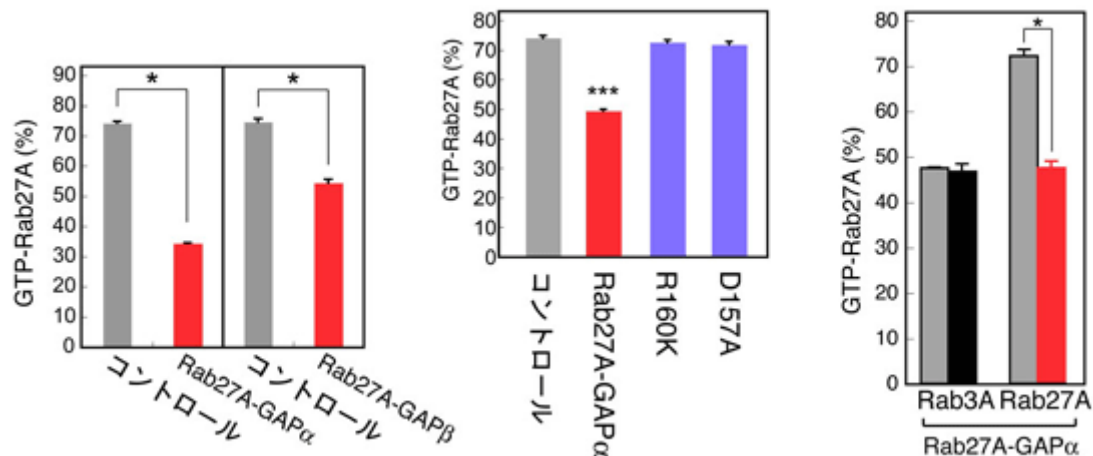


図5 試験管内での Rab27A-GAP 活性

Rab27A-GAP α 及び Rab27A-GAP β は、試験管内で Rab27A-GAP 活性 (すなわち Rab27A の不活性化) を示すため (左)、試験管内の GTP 型 Rab27A の量がコントロール (灰色のバー: Rab27A-GAP 無し) に比べ顕著に減少した (赤色のバー)。この Rab27A-GAP 活性は、TBC ドメイン内のアミノ酸変異 (R160K, D157A) により消

失する（中央の青色のバー）。 Rab27A-GAP α は Rab27A に近縁の Rab3A に対しては活性を示さない（右）。すなわち、Rab27A-GAP α の有り（黒のバー）無し（灰色のバー）で GTP 型の Rab3A の量に差がない。