



Down-regulation of melanogenesis by phospholipase D2 through ubiquitin proteasome-mediated degradation of tyrosinase

蔭山，晶子

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2004-12-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3217

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003217>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 71 】

氏 名・(本 籍) 薮山 晶子 (奈良県)
博士の専攻分野の名称 博士(医学)
学 位 記 番 号 博い第1624号
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付 平成16年12月31日

【 学位論文題目 】

Down-regulation of Melanogenesis by Phospholipase D2 through
Ubiquitin Proteasome-mediated Degradation of
Tyrosinase
(ユビキチン-プロテアソーム系を介したチロシナーゼの
分解促進による PLD2 のメラニン生成抑制)

審 査 委 員

主 査 教 授 山村 博平
教 授 千原 和夫
教 授 丹生 健一

色素細胞のメラニン生成は、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)により強く抑制されることが知られているが、そのメカニズムは明らかにされていない。今回我々は B16 マウス悪性黒色腫細胞を用いて、TPA によって活性化をうける情報変換酵素ホスホリパーゼ D (PLD)がメラニン生成制御にかかわっている可能性を検討した。

B16 細胞に 5 nM の TPA を作用させると 72 時間後に 1 細胞当たりのメラニン量が減少し、一方 PLD の活性化がみられたことより、PLD の活性化がメラニン生成抑制に関与する可能性が示唆された。

TPA によるメラニン生成抑制機構に PLD の活性化が関与する可能性をさらに検討するために、PLD 活性化抑制剤である 1-butanol が TPA によるメラニン生成抑制に及ぼす影響をみたところ、TPA によるメラニン生成抑制は 1-butanol 存在下でほぼ完全に阻害されたが、PLD 活性化を抑制しない 2-butanol では阻害されなかつた。すなわち、TPA によるメラニン生成抑制においては PLD 活性化が必須であることが示された。

PLD には2つのアイソザイム、PLD1 と PLD2 が存在する。TPA によるメラニン生成抑制に関与するアイソザイムを調べるために、B16 細胞に存在する PLD アイソザイムを RT-PCR と immunoblot analyses を用いて同定したところ、B16 細胞には PLD1 および PLD2 の両方のアイソザイムが発現していることが明らかになった。

そこで、B16 細胞内の PLD1、PLD2 がそれぞれ TPA により活性化を受けるか否かをみるために、PLD1 および PLD2 に対するアデノウィルスベクターを作製し、それぞれのアデノウィルスベクターにより発現した PLD1 または PLD2 が TPA により活性化されるかどうかを検討したところ、新たに細胞内に発現した PLD1、PLD2 はどちらも TPA により活性化されることが確認された。すなわち、B16 細胞内の PLD1、PLD2 はともに TPA により活性化されることが明らかになり、TPA によるメラニン生成抑制には PLD1、PLD2 の両者が関与する可能性がでてきた。

メラニン生成抑制機構に関与する PLD アイソザイムを同定するために、まず B16 細胞に PLD1 または PLD2 をアデノウィルスベクターにより過剰発現させ、細胞内の PLD 活性を測定した。B16 細胞に PLD1 または PLD2 をアデノウィルスベクターにより過剰発現させたとき、PLD 活性は TPA 非依存性に上昇することが明らかとなり、アデノウィルスベクターによる過剰発現システムにより PLD1、PLD2 それぞれ単独の活性化の影響が観察されることが示された。このシステムを用いて、B16 細胞内の PLD1 または PLD2 をそれぞれ活性化状態にしたときの PLD 活性とメラニン量の相関を解析したところ、PLD2 を活性化させたときには細胞内メラニン生成は顕著に抑制されたが、同程度に PLD1 を活性化させたときには細胞内メラニン量は軽度減少

したのみであった。以上より PLD2 活性化は強いメラニン生成抑制作用をもつことが明らかとなった。

TPA は細胞内のプロテインキナーゼ (PKC) を強く活性化する作用をもつ。PLD2 活性化によるメラニン生成抑制が、PKC 活性化を介して行われている可能性を検討する目的で、アデノウィルスベクターによる PLD2 過剰発現時の PKC 活性化状態を、PKC の分子種別の細胞内分布を解析することにより検討した。B16 細胞には PKC の α 、 δ 、 ϵ 、および ζ 分子種が発現しており、これらの分子種の細胞内分布は PLD2 の過剰発現すなわち PLD2 活性化により影響を受けなかったことより、PLD2 活性化は PKC 活性化とは無関係にメラニン生成抑制を起こすことが示された。

TPA によるメラニン生成抑制に関与する PLD アイソザイムを同定するために、PLD1 または PLD2 の酵素活性をもたず、PLD1、PLD2 のドミナントネガティブ体として働く蛋白に対するアデノウィルスベクターを作製し、B16 細胞に感染させたところ、PLD1 のドミナントネガティブ体発現では、TPA のメラニン生成抑制効果は影響を受けなかつた。一方、PLD2 のドミナントネガティブ体発現では、メラニン量の増加がみられ、かつ TPA のメラニン生成抑制効果はほぼ完全に阻害され、通常状態の細胞においては PLD2 の活性によりメラニン生成が調節され、TPA によるメラニン生成抑制に関与する PLD アイソザイムは PLD2 であることが示された。

PLD2 活性化によるメラニン生成抑制機序を調べる目的で、アデノウィルスベクターにより PLD2 を B16 細胞に発現させたときの、チロシナーゼ蛋白およびチロシナーゼ mRNA 発現をみたところ、細胞内の PLD2 活性依存性にチロシナーゼ蛋白発現は減少していたが、チロシナーゼ mRNA 発現量には変化はみられなかつた。以上より、PLD2 活性化はチロシナーゼ蛋白発現を抑制することによってメラニン生成を抑制すると考えられたが、チロシナーゼ蛋白発現抑制機序はチロシナーゼ蛋白合成阻害にあるのではないことが示された。

PLD2 活性化によるチロシナーゼ蛋白発現抑制機序を調べる目的で、プロテアソーム阻害剤が PLD2 のメラニン生成抑制作用に与える影響を観察した。プロテアソーム阻害剤存在下では、TPA および PLD2 活性化によるメラニン生成抑制効果は完全に阻害された。

以上の実験から、PLD2 活性化は、ユビキチン-プロテアソーム系におけるチロシナーゼ蛋白の分解を促進させることによりメラニン生成を抑制することが示され、メラニン生成に関する新規の制御機構が明らかになった。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1626号	氏名	藤山 晶子
論文題目			Down-regulation of Melanogenesis by Phospholipase D2 through Ubiquitin Proteasome-mediated Degradation of Tyrosinase ユビキチン-プロテアソーム系を介したチロシナーゼの分解促進による PLD2 のメラニン生成抑制
審査委員	主査 山下大輔 副査 千原和夫 副査 丹生りまき		
審査終了日	平成16年11月18日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

色素細胞のメラニン生成は、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)により強く抑制されることが知られているが、そのメカニズムは明らかにされていない。申請者達は、B16マウス悪性黒色腫細胞を用いて、TPA によって活性化をうける情報変換酵素ホスホリバーゼD (PLD) がメラニン生成制御にかかわっている可能性を検討した。

B16 細胞に 5 nM の TPA を作用させると 72 時間後に細胞当たりのメラニン量が減少、PLD の活性化がみられたことより、PLD の活性化がメラニン生成抑制に関与する可能性が示唆された。さらに TPA によるメラニン生成抑制は PLD 活性化抑制剤である 1-butanol 存在下でほぼ完全に阻害されたが、PLD 活性化を抑制しない 2-butanol では阻害されなかつたことから、TPA によるメラニン生成抑制においては PLD 活性化が必須であることが示された。

PLD には 2 つのアイソザイム、PLD1 と PLD2 が存在するので、B16 細胞に存在する PLD アイソザイムを RT-PCR と immunoblot analysis を用いて同定したところ、B16 細胞には PLD1 および PLD2 の両方のアイソザイムが発現していることが明らかになった。そこで、B16 細胞内の PLD1、PLD2 がそれぞれ TPA により活性化を受けるか否かをみるために、アデノウイルスベクターを用いて、ベクターにより発現した PLD1 または PLD2 が TPA により活性化されるかどうかを検討したところ、B16 細胞内の PLD1、PLD2 はともに TPA により活性化されることが明らかになり、TPA によるメラニン生成抑制には PLD1、PLD2 の両者が関与する可能性が示された。

メラニン生成抑制機構に関与する PLD アイソザイムを同定するために、B16 細胞に PLD1 または PLD2 をアデノウイルスベクターを用いて過剰発現させ、細胞内の PLD 活性を測定したところ、PLD 活性は TPA 非依存性に上昇することが明らかとなり、この過剰発現システムにより、PLD1、PLD2 それぞれ単独の活性化の影響の観察が可能となった。さらに、B16 細胞内の PLD1 または PLD2 をそれぞれ活性化状態にした時の、PLD 活性とメラニン量の相関の解析により、PLD2 を活性化させた時には細胞内メラニン生成は顕著に抑制されるが、同程度に PLD1 を活性化させた時には細胞内メラニン量は軽度減少したのみであることから PLD2 活性化は強いメラニン生成抑制作用をもつことを明らかにした。

TPA は細胞内のプロテインキナーゼ (PKC) を強く活性化する作用をもつ。PLD2 活性化によるメラニン生成抑制が、PKC 活性化を介して行われている可能性を検討する目的で、アデ

ノウイルスベクターによる PLD2 過剰発現時の PKC 活性化状態を、PKC の分子種別の細胞内分布を解析することにより検討した。B16 細胞には PKC の α 、 δ 、 ϵ 、および ζ 分子種が発現しており、これらの分子種の細胞内分布は PLD2 の過剰発現すなわち PLD2 活性化により影響を受けなかったことより、PLD2 活性化は PKC 活性化とは無関係にメラニン生成抑制を起こすことを示した。

TPA によるメラニン生成抑制に関与する PLD アイソザイムを同定するために、PLD1、PLD2 のドミナントネガティブ体のアデノウイルスベクターを作製し、B16 細胞に感染させたところ、PLD1 のドミナントネガティブ体発現では、TPA のメラニン生成抑制効果は影響を受けなかつたが、PLD2 のドミナントネガティブ体発現では、メラニン量の増加がみられ、かつ、TPA のメラニン生成抑制効果はほぼ完全に阻害され、通常状態の細胞においては PLD2 の活性によりメラニン生成が調節された。よって TPA によるメラニン生成抑制に関与する PLD アイソザイムは PLD2 であることが示された。

PLD2 活性化によるメラニン生成抑制機序を調べる目的で、アデノウイルスベクターにより PLD2 を B16 細胞に発現させたときの、チロシナーゼ蛋白およびチロシナーゼ mRNA 発現をみたところ、細胞内の PLD2 活性依存性にチロシナーゼ蛋白発現は減少していたが、チロシナーゼ mRNA 発現量には変化はみられなかつた。以上より、PLD2 活性化はチロシナーゼ蛋白発現を抑制することによってメラニン生成を抑制するが、チロシナーゼ蛋白発現抑制機序はチロシナーゼ蛋白合成阻害にあるのではないことが示された。

さらにプロテアソーム阻害剤存在下では、TPA および PLD2 活性化によるメラニン生成抑制効果は完全に阻害された。

以上の実験から、PLD2 活性化は、ユビキチン・プロテアソーム系におけるチロシナーゼ蛋白の分解を促進させることによりメラニン生成を抑制することが示された。

本研究は、TPA による色素細胞のメラニン生成抑制メカニズムには PLD アイソザイムのうち PLD2 の活性化が関与していることを示した初めての論文であり、メラニン生成制御機構におけるシグナル伝達の流れを考える上で重要な知見を得たものと認める。よって、本研究は医学博士の学位を得る資格があると認める。