



Isolation and biochemical characterization of tyrosinase-rich GERL and coated vesicle in melanin synthesizing cells ; Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced...

芋川, 玄爾

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1984-02-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0923

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000923>

※ 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。



氏名・（本籍）	芋 ^{いも} 川 ^{かわ} 玄 ^{げん} 蘭 ^{らん} （栃木県）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第815号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	昭和59年2月22日
学位論文題目	I Isolation and biochemical characterization of tyrosinase-rich GERL and coated vesicle in melanin synthesizing cells （メラニン生成細胞におけるチロシナーゼ高含有 GERL 及び coated vesicle の分離と生化学的特性） II メラニン生成細胞内における tyrosinase 活性部位 — Coated vesicle の生化学的解析 — III Loss of Melanogenic Properties in Tyrosinases Induced by Glycosylation Inhibitors within Malignant Melanoma Cells （糖合成阻害剤による悪性黒色腫細胞内チロシナーゼのメラニン生成特性の消失）
審査委員	主査 教授 三 島 豊 教授 西 塚 泰 美 教授 杉 山 武 敏

論文内容の要旨

I 緒 言

メラニン生成の特異的小器官である melanosome 内に輸送される tyrosinase 酵素の色素細胞内での活性化部位に関して、melanosome と活性化 tyrosinase の両起源を Golgi 装置に求める Golgi-melanosome system 説が Fitzpatrick 教授らを中心とする Harvard 学派により 1960 年代に提出され、近年まで大旨支持されて来た。この Golgi-melanosome system 説はリボゾームで合成された tyrosinase が粗面小胞体を経て Golgi 野に運ばれ Golgi 嚢にて濃縮され Golgi vesicle に移行後その増大融合により melanosome stage I ~ IV が形成されるとするもので、従って始めから tyrosinase 酵素の活性化と premelanosome の形成は Golgi 装置の同一部位で行なわれるという一説である。しかしその後、細胞内膜系の三次元構造とその機能的分化の解析により、tyrosinase の

活性化及び濃縮配列部位と premelanosome 形成部位は細胞内膜系の構造的にも機能的にも相異なる部位で行なわれており、前者は GERL-coated vesicle 系で後者は Golgi 装置ないし滑面小胞体であるとの二元的メラニン生成機構が Mishima らにより明らかにされ 1979 年報告された。従ってメラニン生成初期の tyrosinase 活性化部位としての GERL の構造的、機能的特徴及び活性化 tyrosinase のこの GERL から early premelanosome への輸送をコントロールしている細胞内膜系各 compartments 内の制御機構の解明が次の重要な points となって来ている。我々にかかる視点により以下の研究を行ない、その結果、tyrosinase の活性化とその特異的輸送系の両者は 2 つの糖蛋白、tyrosinase ならびに premelanosome の独立かつ相補性を示す glycosylation process によって大きく制御されていることを明らかにした。本論文には以下の研究が含まれている。

1. Golgi 装置関連滑面小胞体の分離と生化学的並びに微細構造的特徴の解明 (論文 I)
2. 酵素 Tyrosinase の輸送機能が推論される Coated Vesicle の生化学的分離及び微細構造的、酵素学的特徴の解明 (論文 II)
3. Tyrosinase 成熟活性化発現過程への Glycosylation の関与の解明 (論文 III)

II 実験方法

省 略

III 実験結果

1. Golgi 装置関連滑面小胞体の分離と生化学的並びに微細構造的特徴の解明

Greene のハムスター 黒色腫細胞を材料として所謂 Golgi 分画を蔗糖密度勾配分画法により分離し、Golgi 装置の標識酵素である galactosyl-transferase 及び thiamine pyrophosphatase (TPPase) 活性がそれぞれ homogenate に比べ 18 倍、10 倍高値を示す分画をリンタングステン酸 negative 染色を用い電顕的に観察すると、本分画内には Golgi 装置の特徴である fenestrated sheet 構造のみならず GERL と考えられる嚢状、吻合状、管状構造及び coated vesicle と考えられる spheroid bodies よりなるヘテロな構成要素がみられた。斯る Golgi 分画を更に dopa incubation 後蔗糖密度勾配遠心分画法により本分画内 dopa 陽性沈渣 2 次分画を分離し検討した結果、本沈渣 2 次分画は主に嚢状、管状構造の GERL 及び coated vesicle よりなるとともに酵素活性的にも tyrosinase 活性の高値、TPPase 活性の欠如ないし乏値を示した。また本分画の Triton x-100 処理後に遊離して来る tyrosinase 及び acid phosphatase を他分画と比較した結果、tyrosinase の遊離は dopa 陽性沈渣 2 次分画でのみ認められるのに対し、acid phosphatase は Golgi 分画及び dopa 陰性上清分画にも認められた。

2. 酵素 Tyrosinase 転送機能が推論される Coated Vesicle の生化学的分離及び微細構造的、酵素学的特徴の解明

Greene のハムスター黒色腫細胞の homogenate (Ho) より遠心分画法及び DEAE-sephadex column chromatography を用い negative 染色電顕像で主に 400 Å 直径よりなる coated vesicle 分画を分離した。本分画の tyrosinase 活性は Ho の約 100 倍の高値であり、また高い acid phosphatase, ATPase 活性を示した。しかし Golgi 装置の標識酵素である thiamine pyrophosphatase

(TPPase) 及びマイクロゾーム酵素である glucose-6-phosphatase は陰性であった。

Melanogenesis 関連内膜小器管である Golgi 装置, GERL-coated vesicle 系, coated vesicle, premelanosome, melanosome 各分画間で tyrosinase 及び acid phosphatase 酵素は premelanosome 分画よりも coated vesicle 分画で最高値を示した。また TPPase 活性は Golgi 装置と premelanosome 分画で高値を示した。一方 β -glucuronidase, β -galactosidase, β -glucosidase の活性分布は前述の 3 酵素とは異なり coated vesicle 分画で特に高値傾向は認められなかった。Tyrosinase, acid phosphatase, ATPase 3 酵素の coated vesicle 分画での高活性分布も premelanosomes で既に知られている酵素分布と類似し、電顕的にも本 coated vesicle はその大きさ及び形状ともに premelanosome 辺縁上に認められていた小球状隆起構造物と一致した。

3. Tyrosinase 成熟活性化発現過程への Glycosylation の関与の解明

アスパラギン結合型糖鎖合成の特異的阻害剤として知られている tunicamycin 及び glucosamine をマウス培養 B-16 黒色腫細胞にそれぞれ $0.2 - 0.4 \mu\text{g}/\text{m}\ell$, $1 \text{mg}/\text{m}\ell$ 濃度で加え培養を行なうと, DNA, RNA, 蛋白合成阻害に比べ ^3H -mannose の著明なとり込み抑制で表わされる強い糖合成の阻害を示し, 若干の増殖の抑制を伴うが著明な色素脱失作用が誘導された。本色素脱失細胞の homogenate より細胞分画法を行ない, 細胞内における tyrosinase の分布を検索した結果, 細胞の総 tyrosinase 活性は実質的に減少していないにもかかわらず melanosome-rich large granule 分画では著しい減少を示し, さらに premelanosome 及び melanosome 分画ではより強い活性の減少を認めた。30,000 g 遠心上清分画における tyrosinase の電気泳動を行なうと T_1 型の soluble tyrosinase の相対的増加が認められる一方, small 及び large granule 分画においては, 膜結合性の T_3 型 tyrosinase の特異的消失が観察された。

IV 考 察

Golgi 野内 tyrosinase 陽性部位として新らたに見い出された GERL-coated vesicle 系に基づいてメラニン生成初期過程をさらに生化学的並びに細胞生物学的に解析した結果: 1. 生化学的に分離した GERL-rich 分画が premelanosome に比べても高い tyrosinase 活性を有し, 2. GERL の tubular 部位より, さらに高い tyrosinase 活性をもつ coated vesicle がその先端より budding され premelanosome に fuse される像を多数認め, 3. GERL より budding off した coated vesicle はメラニン生成関連各種小器管中最高の premelanosome の10倍以上の tyrosinase 活性を示した。

以上の諸点より GERL は tyrosinase 酵素の濃縮配列化部位として働き, ついで, その先端より遊離される coated vesicle は tyrosinase 酵素の段階的活性化過程における最終小器管として, tyrosinase 酵素を premelanosome へ輸送する enzyme carrier であることが結論される。さらに 4. かかる tyrosinase 酵素の段階的活性化及び輸送過程はアスパラギン結合型糖鎖合成の特異的阻害剤である tunicamycin 及び glucosamine により選択的に阻害され, tyrosinase 酵素の生体内活性型とも言うべき膜結合型 T_3 tyrosinase の特異的消失をきたす。その結果, tyrosinase の本質的機能である premelanosome 上での melanin 合成は未熟型 T_1 , T_2 tyrosinase の残存にもかかわらず

ず完全に停止することにより、tyrosinase の糖鎖部分はこれら tyrosinase の GERL-coated vesicle 系における成熟活性化及び作用発現を決定する essential な signal として働いていることが新らたに見い出された。

論文審査の結果の要旨

色素細胞内における *in vivo* メラニン生成はその特異的細胞内小器官である melanosome 内のみ認められる。この melanosome 内の特異酵素である tyrosinase の色素細胞内での生成、活性化及び輸送機構に関しては、従来リボソームで合成された tyrosinase は粗面小胞体を経て Golgi 嚢に濃縮され、次いで Golgi vesicle に移行し、それらの増大融合により stage I より IV に至る melanosome が形成されるとする Golgi-melanosome system 説が 1960 年代に Harvard 学派により提出されていた。本説は tyrosinase 酵素と premelanosome の分泌は Golgi 装置の同一部位で行なわれているという一元説である。しかし、その後、すでに我々のグループにより tyrosinase 陰性の early premelanosome の存在や、tyrosinase 陽性出現部位が Golgi 装置とは異なる GERL-coated vesicle 系にあることが電顕的に見い出され、Golgi-melanosome system 説による initial melanogenesis の解釈には矛盾のあることが判明していた。本論文はこの点をさらに生化学的に追究し、メラニン生成初期の tyrosinase 活性化部位としての GERL の機能的特徴及び活性化 tyrosinase の輸送機構及びそれらをコントロールしている細胞内膜系の制御因子の解析を行なったもので、以下の研究を含むものである。

1. Golgi 装置関連滑面小胞体 (GERL) の分離と生化学的並びに微細構造的特徴の解明 (論文 I)
2. 酵素 tyrosinase 輸送機能が推論される coated vesicle の生化学的分離及び微細構造的・酵素学的特徴の解明 (論文 II)
3. Tyrosinase 成熟活性発現過程への Glycosylation の関与の解明 (論文 III)

蔗糖密度勾配分画法によりまずゴルジ分画を分離し、ついで tyrosinase 活性を利用し dopa-melanin 生成能を有する tyrosinase 陽性 2 次分画を分離すると、これは主に嚢状管状構造の GERL 及び coated vesicle より構成され、かつ酵素活性的にも Golgi 装置とは異なりその標識酵素チアミンパイロホスファターゼを欠き、独立した細胞内小器官であることを見い出した。さらに tyrosinase の細胞内輸送に関与すると考えられる coated vesicle を遠心分画法及び column chromatography を用い分離し、その酵素学的性質を検索した結果、coated vesicle はメラニン生成関連各種小器官中最高の tyrosinase 活性を示し premelanosome の 10 倍以上であることを見い出した。又 vesicle は中枢神経細胞で輸送と関連して豊富に見い出される Acpase, ATPase をも有すること等より、tyrosinase 酵素を GERL より premelanosome へ輸送する enzyme carrier であることが結論された。さらに本 tyrosinase の成熟活性化と輸送過程における tyrosinase 蛋白の Glycosylation の重要な役割りを推定確認した。すなわちアスパラギン結合型糖鎖合成の特異的阻害剤 tunicamycin 及び glucosamine の培養黒色腫細胞への添加は Tyrosinase の T_1 , T_2 より T_3 型への成熟化阻止

と GERL-coated vesicle 系より premelanosome への輸送の阻害をきたし、可逆的色素脱失を誘導することを見い出した。

本研究は以上の如く新らたにメラニン生成における GERL-coated vesicle 系による酵素活性化及び輸送機構を明らかにするとともに、それらの制御因子としての糖鎖の特異的役割りについての新知見を示したもので、重要な価値ある業績と認める。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。