



Correlation between the number of melanosomes, tyrosinase mRNA levels, and tyrosinase activity in cultured murine melanoma cells in response to various melanogenesis regulatory agents

Ando, Hideya

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1995-01-11

(Date of Publication)

2008-03-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1892

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3105492>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001892>

※ 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)	安藤秀哉 (愛知県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博ろ第1433号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成7年1月11日
学位論文題目	Correlation between the number of melanosomes, tyrosinase mRNA levels, and tyrosinase activity in cultured murine melanoma cells in response to various melanogenesis regulatory agents (培養マウス黒色腫細胞のメラニン色素生成調節物質処理におけるメラノソーム数、チロシナーゼmRNAレベル、およびチロシナーゼ活性の相関性について)
審査委員	主査 教授 市橋正光 教授 山本節 教授 西塚泰美

論文内容の要旨

緒言

メラニン色素は表皮に存在するメラノサイトで生成されるが、これはチロシンが酵素チロシナーゼの働きにより酸化をうけドーパ、ドーパキノンとなり、以後は自動酸化的に重合することによる。またメラニン色素は最終的にメラノサイトの特異的小器官であるメラノソームと呼ばれる小胞の中でのみ生成される。

これまでに種々のメラニン生成調節物質が報告されているが、中でもTPA(発癌プロモーター)とリノール酸(不飽和脂肪酸)はメラニン生成を抑制し、dbcAMP(サイクリックAMPのアナログ)とパルミチン酸(飽和脂肪酸)は逆にメラニン生成を促進する作用をもつことが知られている。

近年、培養マウス黒色腫細胞のチロシナーゼ活性がチロシナーゼmRNAレベルに相関し、培養ヒト黒色腫細胞およびヒトメラノサイトではこれらの相関性が認められないことが報告された。一方、チロシナーゼcDNAを導入した培養繊維芽細胞にメラノソーム様の黒色顆粒が出現することも知られている。このようにチロシナーゼ活性、チロシナーゼ遺伝子発現、およびメラノソーム数の相関性に関してはいくつかの報告がみられるが、同一の実験系を用いてこれらの関係を明らかにした報告はない。そこで本研究では培養マウス黒色腫細胞を用い、各種メラニン生成調節物質がチロシナーゼ活性、チロシナーゼmRNAレベル、およびメラノソーム数に与える影響を解析した。

実験方法

B16マウス黒色腫細胞を10%の脱脂した牛胎児血清を含むイーグルMEMにて培養し、TPA(25 nM)、dbcAMP(250 μM)、リノール酸(25 μM)、またはパルミチン酸(25 μM)を投与した。6日間処理したのち細胞を回収し、メラニン定量、チロシナーゼ活性測定、および電子顕微鏡観察に用いた。

メラニン量は細胞をエタノールとエーテル混液で細胞内脂溶性物質を取り除いたのち、10%ジメチルスルフォキシドを含む1N水酸化ナトリウムを加え、80°Cで30分間処理してメラニンを溶解した。

メラニン量は470 nmの吸光度測定により、一定細胞数あたりで求めた。

チロシナーゼ活性は細胞に0.5%デオキシコール酸ナトリウム水溶液を加え0℃で15分間処理したのち、0.1%L-ドーパ溶液を添加して10分間にチロシナーゼの働きにより生成されるドーパ酸化物の吸光度を475 nmで測定し、一定細胞数あたりで求めた。

チロシナーゼmRNAはノザンプロット法により定量した。細胞から抽出したトータルRNAを電気泳動してニトロセルロース紙に吸着させたのち、チロシナーゼcDNAもしくは内部標準であるβ-アクチンcDNAを用いてハイブリダイズした。そしてオートラジオグラムを作成し、デンシトメーターでチロシナーゼmRNAレベルを測定した。

メラノソーム数の測定は電子顕微鏡写真を作成したのち、メラノソームのカウントと細胞質面積の測定を行い、単位面積あたりで求めた。また各メラノソームの内部に占めるメラニン色素の量を指標としてメラノソームの成熟度を分類した。

結果

培養B16黒色腫細胞のメラニン生成はTPAとリノール酸により抑制され、dbcAMPとパルミチン酸により促進された。メラニン量は無処置コントロールを100%とすると、TPAで19%、リノール酸で29%に減少し、dbcAMPで191%、パルミチン酸で151%に増加した。またチロシナーゼ活性も、TPAで0%、リノール酸で36%に減少し、dbcAMPで463%、パルミチン酸で352%に増加し、メラニン量の増減と相関する結果であった。

ノザンプロット法により複数のチロシナーゼmRNAのバンドが出現した。これはマウスチロシナーゼ遺伝子がオールタナティブプライシングにより数種類の転写がおこるという以前の報告と一致する結果であった。TPAもしくはdbcAMPで24時間処理した細胞のチロシナーゼmRNAレベルは無処置コントロールを100%とすると、TPAで8%に減少し、dbcAMPで180%に増加した。これに対し、リノール酸もしくはパルミチン酸で3-72時間処理した細胞ではメラニン生成が顕著に変化しているにもかかわらず、チロシナーゼmRNAレベルはコントロールと比較しほとんど変化しなかった。これにより、脂肪酸のメラニン生成調節作用は遺伝子転写後の調節によることが示された。

電子顕微鏡によりメラノソームを観察したところ、コントロール細胞にはさまざまな成熟度のメラノソームが多数観察された(52個/100 μm^2 で成熟度比54%)。TPAで処理した細胞ではメラノソーム数が顕著に減少し(7個/100 μm^2 で成熟度比25%)、dbcAMPで処理した細胞では逆にコントロールよりも多数のメラノソームが認められた(83個/100 μm^2 で成熟度比59%)。これに対し、リノール酸もしくはパルミチン酸で処理した細胞ではメラノソームの成熟度は変化したもののその数はコントロールと比較しほぼ同等であった(リノール酸は49個/100 μm^2 で成熟度比16%、パルミチン酸は51個/100 μm^2 で成熟度比69%)。これらの結果より、メラノソーム数の変化はチロシナーゼmRNAレベルの変化と相関するものであり、成熟度の変化もメラニン量の変化に対応することが明らかとなった。

考察

培養マウス黒色腫細胞にメラニン生成調節物質を処理した実験系において、メラノソームの数がチロシナーゼmRNAレベルに相関することが本研究により明らかとなった。近年、チロシナーゼcDNAの細胞内導入がメラノソームの出現をもたらすことが明らかにされ、チロシナーゼ遺伝子の発現がメラノソームの形成に関与することが示唆された。また古くより、メラノソームはライソゾームや

ペルオキシゾームと深く関連していることが指摘されており、チロシナーゼ遺伝子の発現がこれら膜構造のメラノソームへの分化に関与している可能性が考えられた。

従来、メラノソームの数がメラニン生成調節物質により変化することは、ヒトメラノサイトにTPAを処理するとメラノソームが少なくなる傾向が認められることから知られていた。またメラノソーム数とチロシナーゼmRNAレベルについては、乳酸がこの両者を低下させる作用をもつことから関連性が示唆されていた。しかしながら、これらの報告からはメラノソームの数がチロシナーゼmRNAレベルに相関するのか、それともチロシナーゼ活性に相関するのかを判断することはできなかった。本研究はメラノソーム数、チロシナーゼmRNAレベル、そしてチロシナーゼ活性の関係をメラニン生成調節物質を用いることにより定量的にとらえ、メラノソームの形成がチロシナーゼ遺伝子の発現と相関し、チロシナーゼ活性とは必ずしも相関しないことを明らかにした。

一方、チロシナーゼmRNAレベルとチロシナーゼ活性の関係については、培養マウス黒色腫細胞では相関性が認められるが培養ヒト黒色腫細胞やヒトメラノサイトではこの関係が認められないことが報告されている。この不一致の原因が種の違いによるものかどうかは明らかでないが、今回得られた結果ではTPAとdbcAMPでチロシナーゼmRNAレベルとチロシナーゼ活性が相関したのに対し、リノール酸とパルミチン酸では相関性が認められなかった。このことは、培養マウス黒色腫細胞においても培養ヒトメラノサイトで報告されたものと同様な現象が起こり得ることを示している。これらのことを考え合わせると、チロシナーゼmRNAレベルとチロシナーゼ活性の関係はメラニン生成調節物質により変わることが示唆される。すなわち、TPAやdbcAMPはチロシナーゼ遺伝子発現を変化させるためチロシナーゼmRNAレベルとチロシナーゼ活性が相関するが、リノール酸やパルミチン酸はチロシナーゼ遺伝子転写後の調節によりチロシナーゼ活性を変化させるためチロシナーゼ活性との相関性が認められなかったものと考えられる。

本研究により、1)メラノソーム数はチロシナーゼmRNAレベルに相関して増減するがチロシナーゼ活性には相関しないこと、また2)チロシナーゼ活性は必ずしもチロシナーゼmRNAレベルに相関するとは限らないことが示された。

論文審査の結果の要旨

メラニン色素は表皮に存在するメラノサイトで生成されるが、これはチロシンが酵素チロシナーゼの働きにより酸化をうけることによる。またメラニン色素はメラノサイトの特異的小器官であるメラノソームと呼ばれる小胞の中でのみ生成される。

これまでに種々のメラニン生成調節物質が報告されているが、中でもTPAとリノール酸はメラニン生成を抑制し、一方ジブチリルcAMPとパルミチン酸は逆にメラニン生成を促進する作用をもつことが知られている。

近年、培養マウス黒色腫細胞のチロシナーゼ活性はチロシナーゼmRNAレベルに相関するが、培養ヒトメラノサイトではこれらの相関性が認められないことが報告された。一方、チロシナーゼcDNAを導入した培養繊維芽細胞にメラノソーム様の黒色顆粒が出現することも知られている。このようにチロシナーゼ活性、チロシナーゼ遺伝子発現、およびメラノソーム数の相関性に関してはいくつかの報告がみられるが、同一の実験系を用いてこれらの関係を明らかにした報告はない。

そこで本研究者は培養マウス黒色腫細胞に各種メラニン生成調節物質を処理する実験系を用い、チロシナーゼ活性、チロシナーゼmRNAレベル、およびメラノソーム数の相関性を解析した。

TPAとリノール酸はともにチロシナーゼ活性を抑制した。しかしTPAがチロシナーゼmRNAレベルとメラノソーム数の減少をもたらしたのに対しリノール酸はこれら両者の発現・生成に対し何らの変化も与えなかった。また、ジブチリルcAMPとパルミチン酸はともにチロシナーゼ活性を促進したが、ジブチリルcAMPはチロシナーゼmRNAレベルとメラノソーム数の増加をもたらしたのに対しパルミチン酸はリノール酸と同様に両者に影響を与えなかった。これらの結果より、チロシナーゼ活性は必ずしもチロシナーゼmRNAレベルに相関するとは限らないこと、またメラノソーム数はチロシナーゼmRNAレベルに相関して増減するがチロシナーゼ活性には相関しないことが示唆された。

本研究は、これまで断片的な情報しか得られていなかったチロシナーゼ活性、チロシナーゼmRNAレベル、およびメラノソーム数の相関性を同一の実験系で明らかにしたものであり、従来より課題であったチロシナーゼ活性とチロシナーゼmRNAの関係がメラニン調節物質により変わるという重要な知見を得たものとして、さらにメラノソーム数がチロシナーゼmRNAレベルに相関するという新しい事実を見い出しており、価値ある業績であると認める。

よって、本研究者は博士(医学)学位を得る資格があると認める。