

高発現型メラニン色素産生遺伝子のコスメトロジーへの応用

広島大学 医学部総合薬学科¹、広島大学附属病院 皮膚科²

杉山 政則¹、熊谷 孝則¹、森田 栄伸²

Streptomyces (S.) *castaneoglobisporus* HUT6202 produces a large amount of diffusible melanin-like pigment. We have cloned an operon, designated *mel*, which is responsible for the synthesis of melanin pigment, from the chromosomal DNA of *S. castaneoglobisporus*. The sequence analysis revealed that the *mel* operon consists of two genes: the tyrosinase gene (*tyrC*) consisting of 819 bp and a gene, designated *orf378*, consisting of 378 bp. The *orf378* was located just upstream of the *tyrC* gene. Although the precise function of the *orf378* product remains unclear, its function is thought to be involved in the transfer of copper ion which is essential for tyrosinase.

The present study has the following aims: the first is to express the microbial *mel* operon in human epidermis or in albino mouse hair follicle cells. This approach will be applicable for the gene therapy of pigment disorders. The second is to establish a cell line that expresses *mel* constitutively. The cell line can be used to screen inhibitors of melanin-synthesis, which will be applicable for the cosmetology.

In the present study, we tested whether the microbial *mel* operon is expressed in mammalian cells using COS-7 cells as host cells. The *orf378* and *tyrC* genes, contained in the operon, were PCR-amplified and independently inserted into downstream of the cytomegalovirus promoter, respectively. When COS-7 cells were co-transfected with the mammalian expression vectors, the transfectants expressed tyrosinase activity, suggesting that the microbial *mel* is expressed in mammalian cells. A human keratinocyte A431 cell was also used for constitutive expression of the *mel* operon.

1. 緒言

筆者らは200種以上の放線菌を検索した成果として、*Streptomyces* (S.) *castaneoglobisporus* HUT6202が、既にメラニン色素を産生することが知られている他の放線菌 *S. antibioticus* に比べ、100倍以上高いメラニン色素産生能を有することを見出した。そこで、ショットガンクローニング法を用いて、本菌の染色体DNAからメラニン色素産生遺伝子 (*mel*) をクローニングした。*mel* 遺伝子の構造を調べた結果、*S. castaneoglobisporus* の *mel* 遺伝子は、チロシナーゼをコードする819 bpから成る遺伝子 (*tyrC*) とそのすぐ上流に存在する378 bpから成る遺伝子 (*orf378*) とでオペロンを形成していることが明らかになった¹⁻³⁾。*orf378* によってコードされるタンパク質の機能については、未だ不明な点が多いが、チロシナーゼ活性に必須な銅イオンの輸送に関与しているものと考えられている。

本研究は、以下に述べる2つを最終目標としている。そのひとつは、ヒトケラチノサイトおよびアルビノマウス毛穴細胞 (albino mouse hair follicle cells) において、*S. castaneoglobisporus* 由来 *mel* 遺伝子の発現系を構築することである。この系は、将来的に白斑病の遺伝子治療や白

髪を黒髪に再生するための遺伝子治療へ応用できるものと考えられる。もうひとつは、*mel* 遺伝子を恒常的に発現する細胞株を樹立することである。樹立した細胞株はチロシナーゼ活性を阻害する物質を検定する細胞として利用することから、美白成分を検索するための新規スクリーニング系が構築可能になると考えられる。

上記に掲げた最終目標を達成するためには、微生物由来の *mel* 遺伝子が真核細胞で発現可能か否か調査する必要がある。そこで、本研究では、COS-7細胞およびヒト角化細胞 (keratinocyte) A431株を用いて *mel* 遺伝子の発現を検討した成果について報告する。

2. 実験

2.1 使用細胞と培養条件

COS-7細胞は、10% fetal bovine serum (FBS, PAA laboratories) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco BRL) を用いて、37℃、5% CO₂-95% air の条件下にて培養した。ヒト角化細胞 (keratinocyte) として A431細胞を用いた。

2.2 *mel* 遺伝子発現用ベクターの構築

orf378 発現用ベクターは、PCR法により増幅した *orf378* 遺伝子を真核細胞用ベクター pcDNA3.1/Hygro (-) (Invitrogen) に挿入することにより作製した。修飾を加えない *orf378* 遺伝子は、sense primer 5'-CACGGATCCATGCCCGAGATCAC CCGCCGC-3' (イタリックは *Bam*HI サイトを示す) および anti-sense primer 5'-CACAAGCTTTTCAGTTGGCGGGGAA CGGCAG-3' (イタリックは *Hind*III サイトを示す) を



Application to cosmetology of the highly expressed melanin-synthesizing gene operon from a microbial source

Masanori Sugiyama¹, Takanori Kumagai¹, Eishin Morita²

Institute of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Medicine, Hiroshima University¹ and Department of Dermatology, Hiroshima University Hospital²

用いて増幅した。*orf378* の4番目の塩基をCからGに変異させた遺伝子 (*orf378G*) は、sense primer 5'-CACCTCGAGATGGCCGAGATCACCCGCCGC-3' (イタリックは *XhoI* サイトを示す) および anti-sense primer 5'-CACAAGCTTTCAGTTGGCGGGGA-ACGGCAG-3' (イタリックは *HindIII* サイトを示す) を用いて増幅した。*orf378* のスタートコドンのすぐ上流にコザック配列⁴⁾ を挿入した遺伝子 (*orf378K*) は、sense primer 5'-CACCTCGAGGCGCCGCCACCATGCCCCGAGATCACCCGCCGC-3' (イタリックは *XhoI* サイトをアンダーラインはコザック配列をそれぞれ示す) および anti-sense primer 5'-CACGGATCCTTAGTTGGCG-GGGAACGGCAG-3' (イタリックは *BamHI* サイトを示す) を用いて増幅した。*orf378* のスタートコドンのすぐ上流にコザック配列を挿入し、さらに4番目の塩基をCからGに変異させた遺伝子 (*orf378KG*) は、sense primer 5'-CACCTCGAGGCGCCGCCACCATGGCCGAGATCACCCGC-CGC-3' (イタリックは *XhoI* サイトをアンダーラインはコザック配列をそれぞれ示す) および anti-sense primer 5'-CACGGATCCTTAGTTGGCGGGGAACGGCAG-3' (イタリックは *BamHI* サイトを示す) を用いて増幅した。なお、上記に述べた4種の遺伝子のPCR反応は全て、1サイクル目は96°C 4 min、65°C 1 min、72°C 1 min の条件で行い、その後、96°C 1 min、65°C 1 min、72°C 1 min の条件で30サイクル行った。また、鋳型DNAとしては、プラスミド pUCM1¹⁾ の *mel* 遺伝子を含む約2.3 kb の *KpnI* フラグメントを用いた。

tyrC 用発現ベクターは、PCR法により増幅した *tyrC* 遺伝子を真核細胞用ベクター pcDNA3.1 (-) (Invitrogen) に挿入することにより作製した。修飾を加えない *tyrC* 遺伝子は、sense primer 5'-CACGGATCCATGACCGTACGCAAGAACCA G-3' (イタリックは *BamHI* サイトを示す) および anti-sense primer 5'-CACAAGCTTTCAGGCGTCGAACGTGTAGTAG-3' (イタリックは *HindIII* サイトを示す) を用いて増幅した。*tyrC* 遺伝子の4番目の塩基をAからGに変異させた遺伝子 (*tyrCG*) は、sense primer 5'-CACCTCGAGATGGCCGTACGCAAGAACCAG-3' (イタリックは *XhoI* サイトを示す) および anti-sense primer 5'-CACGGATCCTCAGGCGTCGAACGTGTAGTAG-3' (イタリックは *BamHI* サイトを示す) を用いて増幅した。*tyrC* 遺伝子のスタートコドンのすぐ上流にコザック配列を挿入した遺伝子 (*tyrCK*) は、sense primer 5'-CACGGATCCGCCGCCACCATGACCGTACGCAAGAACCAG-3' (イタリックは *BamHI* サイトをアンダーラインはコザック配列をそれぞれ示す) および anti-sense primer 5'-CACAAGCTTTTAGGCGTCGAACGTGTAGTA-3' (イタリックは *HindIII* サイトを示す) を用いて増幅した。*tyrC* 遺伝子のスタートコドンのすぐ上流にコザック配列を挿入し、さらに4番目の塩基をAからGに変異させ

た遺伝子 (*tyrCKG*) は、sense primer 5'-CACGGATCCGCCGCCACCATGGCCGTACGCAAG AACCAAG-3' (イタリックは *BamHI* サイトをアンダーラインはコザック配列をそれぞれ示す) および anti-sense primer 5'-CACAAGCTTTTAGGCGTCGAACGTGTAGTA-3' (イタリックは *HindIII* サイトを示す) を用いて増幅した。なお、上記に述べた4種の遺伝子のPCR反応は全て、1サイクル目は96°C 4 min、65°C 1 min、72°C 2 min の条件で行い、その後、96°C 1 min、62°C 1 min、72°C 2 min の条件で30サイクル行った。また、鋳型DNAとしては、*orf378* の増幅に用いたものと同様のフラグメントを使用した。

2.3 COS-7細胞への遺伝子導入

COS-7細胞への遺伝子導入は、Lipofectamine (GIBCO BRL) を用いたリポフェクション法により行った。 $\phi 9$ cm のディッシュ当たり、Lipofectamine 試薬は80 μ L、COS-7細胞は 1×10^6 細胞となるように調整した。また、遺伝子導入は37°Cにて5時間行った。

2.4 チロシナーゼ活性測定

mel 遺伝子を導入したCOS-7細胞を37°Cにて66時間培養した後、0.1M phosphate buffer (pH 6.2) を用いて洗浄した。洗浄後、細胞を同buffer中に懸濁し、超音波破碎を行った後、15,000 $\times$ g、20 min、4°Cの遠心により得た上清をチロシナーゼ活性測定用の試料として用いた。チロシナーゼ活性測定は、Horowitzらの方法⁵⁾ に基づいて行った。すなわち、10 mMのL-DOPAおよび5 MのCuSO₄を含む0.1 M phosphate buffer (pH 6.2) 1.5 mLに100 μ Lのタンパク質試料を加えた後、475 nmの吸光度を10分間測定し、その初速度よりチロシナーゼ活性を求めた。なお、1分間に1 nmolのdopaquinoneを生成させる酵素量を1 U (unit) と定義した。

2.5 mel 遺伝子の安定形質発現株の作成

orf378 および *tyrC* を保有するベクターをそれぞれ8 μ gずつ、リポフェクション法により表皮細胞であるA431にco-transfectした。この際、A431は $\phi 9$ cmのディッシュ当たり、 1×10^6 細胞になるように調整した。遺伝子導入後、geneticin 500 μ g/ μ L および hygromycin 50 μ g/ μ L にて二重選択を行った。

3. 結果と考察

3.1 COS-7細胞における mel 遺伝子の発現性

まず、*mel* 遺伝子の真核細胞での発現性をCOS-7細胞を用いて調査した。*mel* 遺伝子に含まれる *tyrC* および *orf378* をそれぞれPCRで増幅した後、真核細胞用ベクター pcDNA 3.1 (-) および pcDNA 3.1/Hygro (-) にそれぞれ挿入し、それらの発現ベクターを構築した。構築した

ベクターを用いて COS-7 細胞への遺伝子導入実験を行った結果、*orf378* を保有するベクターのみ、あるいは、*tyrC* を保有するベクターのみを transfect した COS-7 細胞においては、チロシナーゼ活性は全く認められなかった。一方、*tyrC* を保有するベクターと *orf378* を保有するベクターを co-transfect した COS-7 細胞においては、チロシナーゼ活性が認められた。以上の結果から、*S. castaneoglobisporus* 由来の *mel* 遺伝子は真核細胞において発現可能であることが明らかになるとともに、チロシナーゼの活性発現には *tyrC* のみでは不十分であり、*orf378* の存在が必須であることがわかった。

3.2 *mel* 遺伝子の発現量の検討

COS-7 細胞におけるチロシナーゼ活性は、*tyrC* および *orf378* の発現量に依存するものと考えられる。本研究の最終目標を達成するためには、発現するチロシナーゼ活性は高ければ高いほどよい。Kozak は、真核細胞内において、遺伝子からタンパク質への翻訳効率を網羅的に調べた結果⁴⁾、遺伝子配列に以下のような特徴がある場合、効率的にタンパク質に翻訳されることを明らかにしている。(1)スタートコドン (ATG) の直前に 5'-GCCGCCACC-3' (コザック配列) が存在する。(2)スタートコドン直後の塩基が G である。

そこで、このような特徴を導入した *orf378* および *tyrC* 遺伝子を PCR 法により増幅し (図 1 および実験の項を参照)、*orf378* 系については pcDNA 3.1/Hygro (-)、*tyrC* 系については pcDNA 3.1 (-) に挿入し、発現ベクターを構築した。構築後、それらを以下の組み合わせにしたがって COS-7 細胞に導入し、導入細胞におけるチロシナーゼ活性を比較した: A) *orf378*/*tyrC* B) *orf378G*/*tyrCG* C) *orf378K*/*tyrCK* D) *orf378KG*/*tyrCKG*。B および D の

□ <i>orf378</i> □	5'	---	---	---	ATG	CCC	GAG	---	---	3'
					Met	Pro	Glu			
□ <i>orf378G</i> □	5'	---	---	---	ATG	GCC	GAG	---	---	3'
					Met	Ala	Glu			
□ <i>orf378K</i> □	5'	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>ACC</u>	ATG	CCC	GAG	---	---	3'
		Kozak			Met	Pro	Glu			
□ <i>orf378KG</i> □	5'	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>ACC</u>	ATG	GCC	GAG	---	---	3'
		Kozak			Met	Ala	Glu			
□ <i>tyrC</i> □	5'	---	---	---	ATG	ACC	GTA	---	---	3'
					Met	Thr	Val			
□ <i>tyrCG</i> □	5'	---	---	---	ATG	GCC	GTA	---	---	3'
					Met	Ala	Val			
□ <i>tyrCK</i> □	5'	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>ACC</u>	ATG	ACC	GTA	---	---	3'
		Kozak			Met	Thr	Val			
□ <i>tyrCKG</i> □	5'	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>ACC</u>	ATG	GCC	GTA	---	---	3'
		Kozak			Met	Ala	Val			

図 1 PCR で増幅した *mel* 遺伝子の 5' 末端配列

下線部はコザック配列を示す。塩基配列中の太字 G は、置換した塩基を示す。この塩基置換により、*orf378* によりコードされるタンパク質の 2 番目のアミノ酸は Pro から Ala に変異し、*tyrC* によりコードされるタンパク質では Thr から Ala に変異する。

組み合わせにおいては、それぞれの遺伝子の 4 番目の塩基が G に置換されているため、本来の遺伝子によってコードされるタンパク質と比較すると、2 番目のアミノ酸が置換することになる (図 1)。しかしながら、これらの組み合わせを導入した COS-7 細胞においてもチロシナーゼ活性が認められたことから、このアミノ酸置換がチロシナーゼ活性に影響を及ぼす可能性は否定できないものの、活性自体を失わせることはないものと考えられた。A ~ D の組み合わせについて、それぞれの遺伝子を保有するベクターを 16μg ずつ用いて COS-7 細胞に導入した際、それらの導入細胞で発現したチロシナーゼ活性を図 2 に示す。各々のチロシナーゼ活性を比較すると D の組み合わせが最も高く、コザック配列の挿入と 4 番目の塩基を G に置換することが、チロシナーゼ活性を上昇させるのに有効に働いているものと考えられた。ただし、コザック配列のみを挿入した C の組み合わせの場合、本来の遺伝子の組み合わせである A と比較して活性が減少していること、および、4 番目の塩基を G に置換したのみの B の組み合わせでは、A と比較して活性が若干高いことを考慮すると、4 番目の塩基置換のほうがチロシナーゼ活性の上昇に有効に働くものと考えられる。次に、導入するベクター量のチロシナーゼ活性への影響を調べるため、A ~ D の組み合わせについて、それぞれの遺伝子を保有するベクターを 8μg ずつ用いて同様の実験を行った。その結果、A ~ D の組み合わせ全てにおいて、16μg ずつ用いた場合に比べ活性が上昇した。また、A ~ D の組み合わせ間の比較では、16μg ずつ用いた場合と同様に、D の組み合わせがもっとも活性

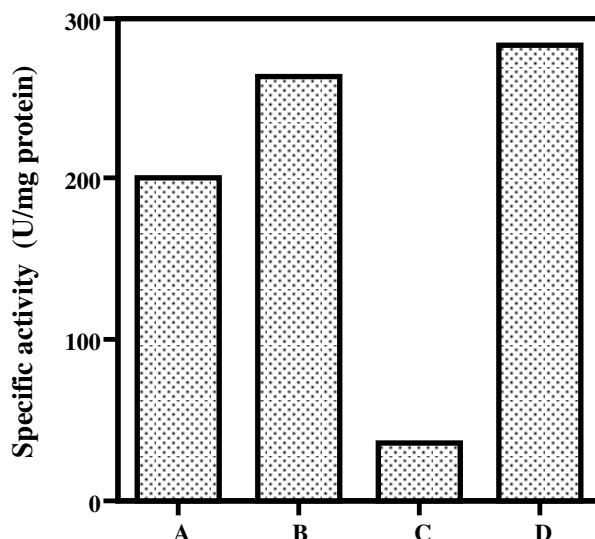


図 2 各種組み合わせの *mel* 遺伝子を導入した COS-7 細胞におけるチロシナーゼ活性

各種 *orf378* および *tyrC* 遺伝子を保有するベクターを 16μg ずつ、A ~ D の組み合わせにしたがって COS-7 細胞に導入し、チロシナーゼ活性を測定した。

A : *orf378*/*tyrC* B : *orf378G*/*tyrCG* C : *orf378K*/*tyrCK*
D : *orf378KG*/*tyrCKG*

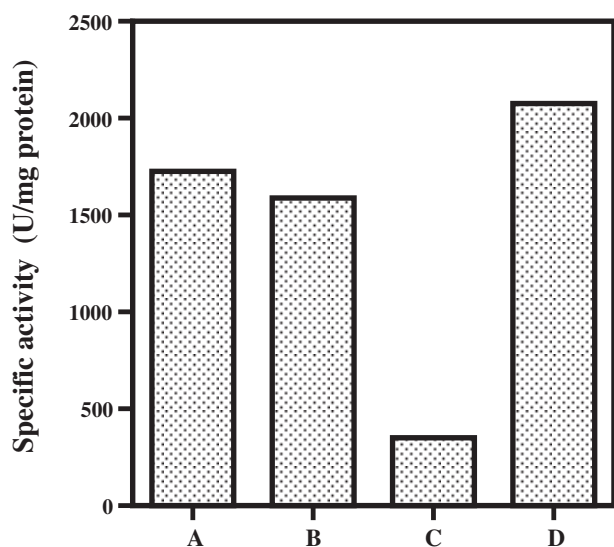


図3 各種組み合わせの *mel* 遺伝子を導入した COS-7 細胞におけるチロシナーゼ活性

各種 *orf378* および *tyrC* 遺伝子を保有するベクターを 8μg ずつ、A～D の組み合わせにしたがって COS-7 細胞に導入し、チロシナーゼ活性を測定した。

A : *orf378*/*tyrC* B : *orf378G*/*tyrCG* C : *orf378K*/*tyrCK*
D : *orf378KG*/*tyrCKG*

が高く、コザック配列の挿入と 4 番目の塩基を G に置換することが、チロシナーゼ活性を上昇させるのに有効であることが改めて確認された。本研究では、導入するベクター量のチロシナーゼ活性に及ぼす影響を調べたのみであるが、遺伝子導入に使用する細胞数や遺伝子導入時間を至適化することにより、さらにチロシナーゼ活性を上昇させることが可能であると考えられる。

3.3 *mel* 遺伝子の安定形質発現株の樹立

mel 遺伝子を構成的に発現する細胞株は、チロシナーゼ活性を阻害する物質を検索するための検定細胞として利用可能である。本研究では、Keratinocyte A431 細胞を用いて *mel* 遺伝子の安定形質発現株の樹立を試みた。*orf378* 用発現ベクターは hygromycin 耐性遺伝子を、*tyrC* 用発現ベクターは geneticin 耐性遺伝子を有することから、それぞれのベクターを A431 細胞に導入した後、2つの薬剤を用いて二重選択を行った。その結果、1つのクローンを得ることができた。現在、このクローンを増殖中であり、今後、本クローンのチロシナーゼ活性を測定する予定である。

4. 総括

本研究において、放線菌 *S. castaneoglobisporus* 由来のメラニン色素産生遺伝子 *mel* は真核細胞内で発現できることを示した。この成果は、微生物由来のメラニン産生遺伝子が白斑病の遺伝子治療や白髪を黒髪にするための遺伝

子治療に応用可能であることを示唆する。さらに、本研究において、*mel* 遺伝子を構成的に発現する候補細胞が1株取得できた可能性がある。この株が実際にメラニン色素を産生することが視覚的に判別できれば、チロシナーゼ活性の阻害物質をスクリーニングするための検定細胞となり得るとともに、その阻害剤が美白剤として利用できることを示唆するものである。

(引用文献)

- 1) Ikeda, K., Masujima, T., Suzuki, K. and Sugiyama, M.: Cloning and sequence analysis of the highly expressed melanin-synthesizing gene operon from *Streptomyces castaneoglobisporus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 45, 80-85, 1996.
- 2) Ikeda, K., Masujima, T. and Sugiyama, M.: Effects of methionine and Cu²⁺ on the expression of tyrosinase activity in *Streptomyces castaneoglobisporus*. J. Biochem., 120, 1141-1145, 1996.
- 3) Ikeda, K., Suzuki, K., Yoshioka, H., Miyamoto, K., Masujima, T. and Sugiyama, M.: Construction of a new cloning vector utilizing a cryptic plasmid and the highly expressed melanin-synthesizing gene operon from *Streptomyces castaneoglobisporus*. FEMS Microbiol Lett., 168, 195-199, 1998.
- 4) Kozak, M.: The scanning model for translation: an update. J. Cell Biol., 108, 229-241, 1989.
- 5) Horowitz, N.H., Fling, M. and Horn, J.: Tyrosinase (*Neurospora crassa*). Methods Enzymol., 17, 615-620, 1970.