

メラニン合成関連酵素のパルミトイル化による可逆性の皮膚色制御

神戸大学バイオシグナル総合研究センター分子薬理研究分野

上山 健彦

Palmitoylation is a lipid modification involving the attachment of palmitic acid to a cysteine residue, thereby affecting protein function. We investigated the effect of palmitoylation of tyrosinase, the rate-limiting enzyme in melanin synthesis, using a human 3-D skin model system and melanocyte culture. The palmitoylation inhibitor, 2-bromopalmitate (2-BP), increased melanin content and tyrosinase protein levels in melanogenic cells by suppressing tyrosinase degradation. The palmitoylation site was Cys⁵⁰⁰ in the C-terminal cytoplasmic tail of tyrosinase. The non-palmitoylatable mutant, tyrosinase (C500A), was slowly degraded and less ubiquitinated than wild-type tyrosinase. Screening for the DHHC (Asp-His-His-Cys) family of proteins for tyrosinase palmitoylation suggested that DHHC2, 3, 7, and 15 are involved in tyrosinase palmitoylation. Knockdown of DHHC2, 3, or 15 increased tyrosinase protein levels and melanin content. Taken together, tyrosinase palmitoylation at Cys⁵⁰⁰ by DHHC2, 3, and/or 15 regulate melanogenesis by modulating tyrosinase protein levels. Additionally, we developed a facile auto-S-palmitoylation assay for DHHC activation using NBD-palmitoyl-CoA. This assay elucidates the effect of DHHC posttranslational modification and disease-related point mutations on DHHC activation.

1. 緒 言

パルミトイル化修飾は、脂質であるパルミチン酸が蛋白質のシステイン残基のチオール基に付加される可逆的な翻訳後修飾で、修飾を受けた蛋白質は疎水性が上昇し、細胞膜や細胞内小器官膜への親和性が上がる。これまでに2000以上の蛋白質がこの修飾を受けることが知られており、この修飾機構の破綻は神経疾患や免疫疾患、加えて、様々な癌と関連することが報告されており、ここ数年の論文数の上昇は顕著である。ヒトで3種存在するメラニン合成の律速酵素である tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (Tyrp1), and Tyrp2 のパルミトイル化酵素 DHHC によるパルミトイル化が、これらメラニン合成酵素の発現量を調整(増減)し、メラニン合成量を可逆的に調節しているのではないかと予測した。本研究では、以下の目標達成により、メラニン合成酵素のパルミトイル化を標的とした、新たなメラニン産生制御法の確立に挑んだ。

- ①メラニン産生律速酵素 (tyrosinase, Tyrp1, Tyrp2) のパルミトイル化修飾部位特定
- ②パルミトイル化修飾がメラニン産生酵素の発現調節をする機序の解明
- ③UVやαMSH等の生理的刺激によるメラニン産生酵素のパルミトイル化の証明
- ④パルミトイル化酵素の自己パルミトイル化を簡便に安価

で検知できるアッセイ法開発

2. 方 法

2. 1. メラニン産生律速酵素 (tyrosinase, Tyrp1, Tyrp2) のパルミトイル化修飾部位特定

まず、ヒト表皮3次元培養モデル(ケラチノサイトとメラノサイトの両方を含む)にパルミトイル化阻害剤 2-bromopalmitate (2-BP) を処置して、皮膚色を観察した。Palmitoylation sites prediction ソフト (CSS-Palm 4.0) と蛋白質立体構造予測ソフト (CueMol 2.0) を用いて、パルミトイル化を受けるシステイン残基 (C, Cys) を予測した。パルミトイル化蛋白質は、Acyl-RAC (resin-assisted capture of fatty-acylated proteins) 法により検知した¹⁾。Tyrosinase のパルミトイル化部位は、Halo タグ標識した野生型と予測 Cys をアラニン (A, Ala) に変換した変異型 tyrosinase を発現するプラスミドを作製し、メラノーマ不死化細胞 (MNT-1) に発現させ、回収蛋白質を用いて Acyl-RAC 法により特定した。

2. 2. パルミトイル化修飾がメラニン産生酵素の発現調節をする機序の解明

Tyrosinase の分解速度 (半減期) 測定は、cycloheximide (CHX) を用いた。HA 標識した野生型と C500A 変異型 tyrosinase をメラノーマ不死化細胞 (HM3KO) に強制発現した後、CHX を処置 (0.5~4 時間) して HA 抗体を用いて免疫プロットングした。また、HM3KO 細胞における内在性の tyrosinase の分解速度の測定を、CHX と 2-BP を用いて同様に行った。

Tyrosinase のユビキチン化は、FLAG 標識した野生型と C500A 変異型 tyrosinase を HA 標識したユビキチン (HA-Ub) と共に HM3KO 細胞に強制発現して、FLAG 抗体で免



Reversible skin color control by palmitoylation of melanin synthesis-related enzymes

Takehiko Ueyama

Laboratory of Molecular Pharmacology,
Biosignal Research Center, Kobe
University

疫沈降後、HA抗体を用いた免疫プロットングにて解析した。

2. 3. UVや α MSH等の生理的刺激によるメラニン産生酵素のパルミトイル化の証明

メラノーマ不死化細胞 (HM3KO) を $10\text{mJ}/\text{cm}^2$ UV と $1\mu\text{M}$ α MSHで刺激後、経時的に細胞を回収し、Acyl-RAC法及びメラニン含有量測定により (見た目のペレットの黒さも)、上記の刺激とパルミトイル化、皮膚色との関連を明らかにした。

2. 4. パルミトイル化酵素の自己パルミトイル化を簡便に検知できるアッセイ法開発

蛍光色素NBD (nitrobenzodiazole) を標識した palmitoyl-CoA (NBD-palmitoyl-CoA) を用いた²⁾。

3. 結果

まず、ヒト表皮3次元初代培養モデルをパルミトイル化阻害剤 2-bromopalmitate (2-BP) 処置すると、コントロールと比較し処置群では、黒化が進むことが分かった (図1A)。そこで、tyrosinase がパルミトイル化されるかどうかを調べるため、メラノーマ細胞株 (HM3KO) と Acyl-RACアッセイを行うと、tyrosinase はパルミトイル化され、2-BPで抑制されることが分かった (図1B)。次に、tyrosinaseのC8, C35, C500 (C末端に近い細胞質内領域に存在) に着目して、パルミトイル化されない変異体 (Cys $\rightarrow$ Ala変異体) C8A, C35A, C500Aを作製してMNT-1細胞に発現後、Acyl-RACアッセイを行い、C500が唯一のパルミトイル化部位であると同定した (図1C)。

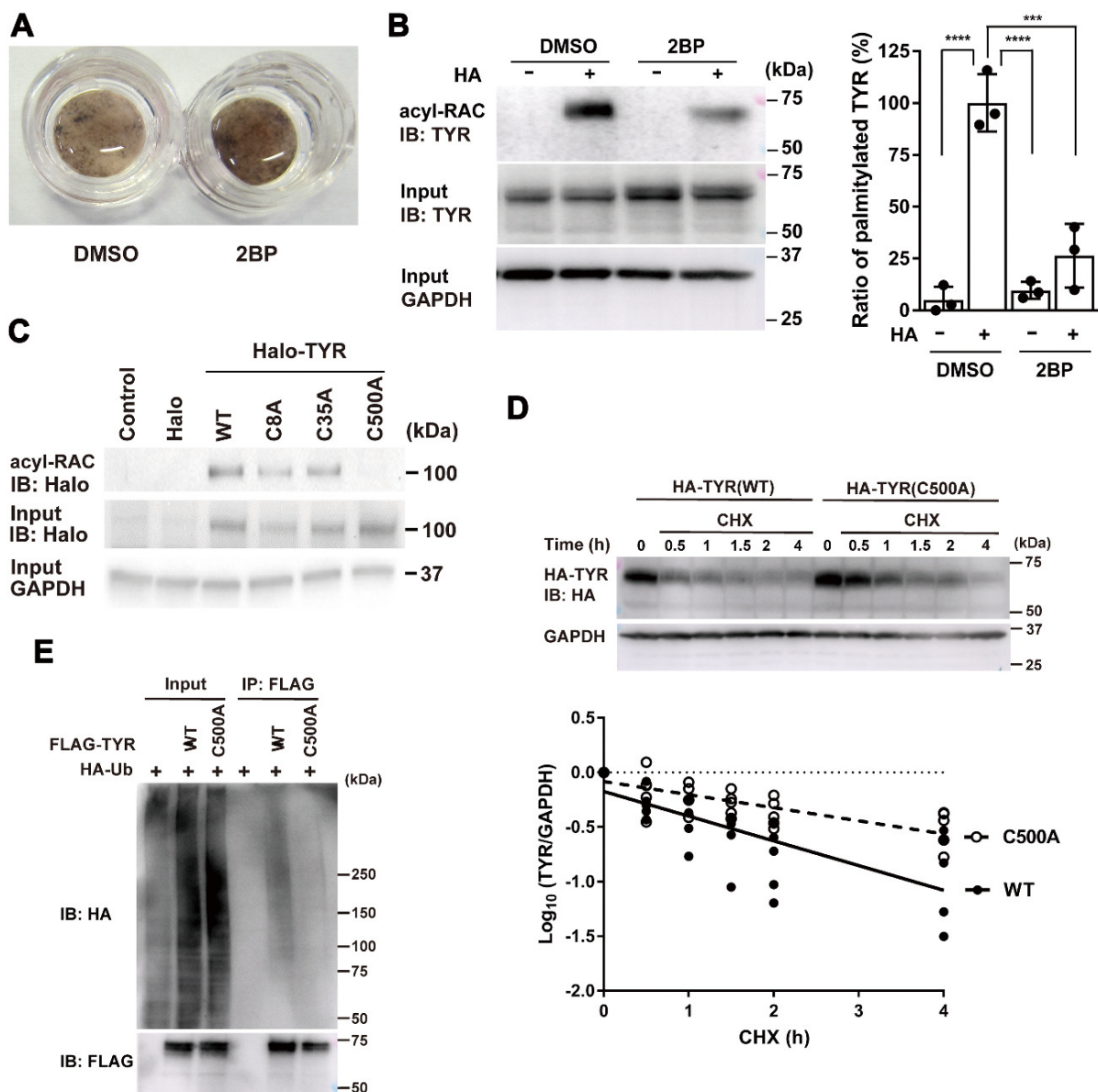


図1 Tyrosinaseのパルミトイル化に続くユビキチン化による発現制御

パルミトイル化によるtyrosinaseの機能変化を調べるため、cycloheximide (CHX) を用いてtyrosinaseの分解速度(半減期)を調べた。C500A変異体の分解速度は、野生型に比べて著明に遅くなっており(図1D)、2-BP処置によりHM3KO細胞の内在性tyrosinaseの分解速度も著明に遅くなっていた。即ち、パルミトイル化によりtyrosinaseの分解が促進されることが明らかになった。

以前に我々は、tyrosinaseがユビキチン化により分解されることを報告している³⁾、FLAG標識した野生型とC500A変異体tyrosinaseをHA標識したUbと共にHM3KO細胞に発現させて、ユビキチン化を定量すると、C500A変異体では明らかに低下することが分かった(図1E)。まとめると、tyrosinaseはパルミトイル化されると、ユビキチン化が促進され、tyrosinaseの分解が促進されることが明らかとなった。即ち、2-BPによるtyrosinaseパルミトイル化の阻害は、tyrosinase分解が低下(tyrosinaseが増加)し、メラノサイトでのメラニン産生量が増加し、皮膚が黒化することを明らかにした。

続いて、ヒトで23種存在するパルミトイル化修飾酵素DHHCの中で、tyrosinaseのパルミトイル化修飾に関わるDHHCのスクリーニング(HEK293細胞にDHHCとHA標識したtyrosinaseを過剰発現させ、³H-Palmitateで4時間ラベル後、³H-Palmitateでラベルされたtyrosinaseを検出する系)を行い、候補としてDHHC3, 15, 7を同定した(図2A)。DHHC15と同じサブファミリーに属するDHHC2を加えた4種(DHHC2, 15, 3, 7)のメラノサイト細胞(HM3KO)の安定過剰発現株の作製(図2B)及びノック

ダウン(図2C)により、DHHC2, 15, 3がそれぞれメラニン産生量の低下と上昇に関与することを明らかにした。

一方、上記の実験中に、簡便で低コストなパルミトイル化検知法が開発できないかを模索した。パルミトイル化修飾酵素DHHC群は、細胞内でパルミトイル-CoAを用いて、活性中心部位に存在するシステイン残基を自己パルミトイル化し、続いて基質蛋白質のシステイン残基にパルミトイル基を転移する。DHHC酵素の活性状態は、自己パルミトイル化されたDHHC酵素を検出することでモニターできるが、これまでの手法では膜貫通蛋白質であるDHHC酵素を多量に精製する必要があったことから、DHHC酵素の大半で未解析のままであった。今回我々は、HA標識した野生型もしくは変異型DHHCをHEK293細胞に過剰発現させ、HEK293細胞の膜画分を調整し、蛍光色素NBD標識palmitoyl-CoAを加え、SDS-PAGE後に蛍光イメージングする(図3)ことにより、NBD-palmitoyl-CoAで標識される自己パルミトイル化されたDHHC酵素を検知できることが分かった。この方法を用いれば、DHHC酵素の異常によって起こる疾患(具体的には、種々の癌で発見されたDHHCの変異体)が、自己パルミトイル化障害に起因するものか、DHHCがパルミトイル化する基質蛋白質との結合変化・障害などによるものかを、簡便に区別することができる²⁾。

4. 考 察

本研究により、メラニン合成律速酵素の1つであるtyrosinaseの発現量がパルミトイル化により可逆的に調整

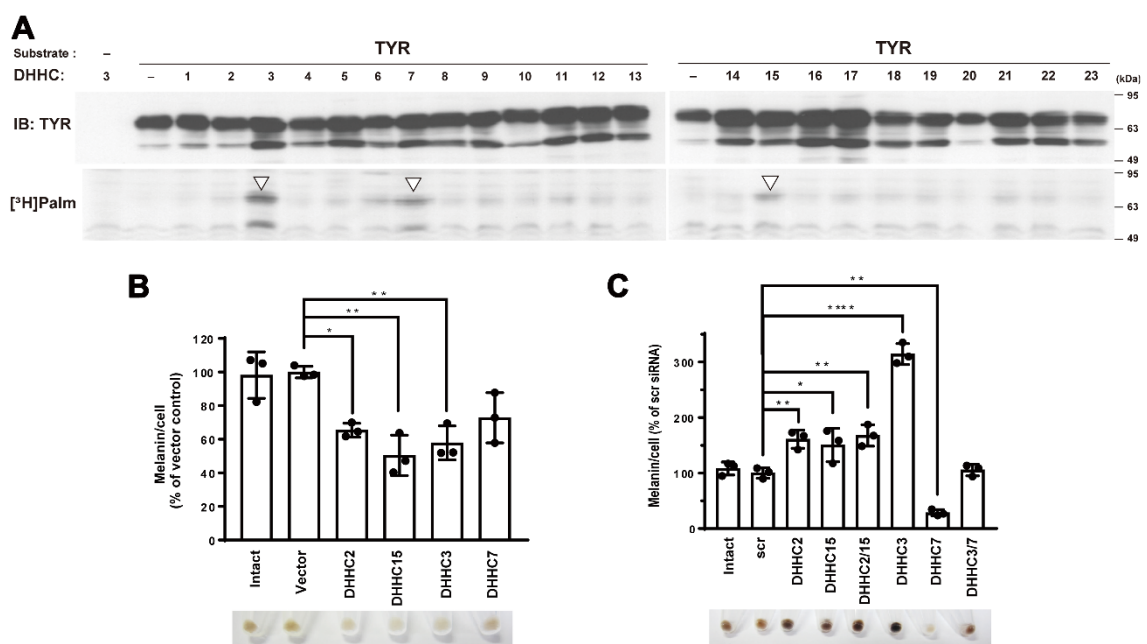


図2 Tyrosinaseをパルミトイル化する酵素DHHC2, 15, 3 (A: スクリーニング, B: 過剰発現細胞, C: ノックダウン細胞)

Assay of activation of the zDHHC palmitoyl transferases

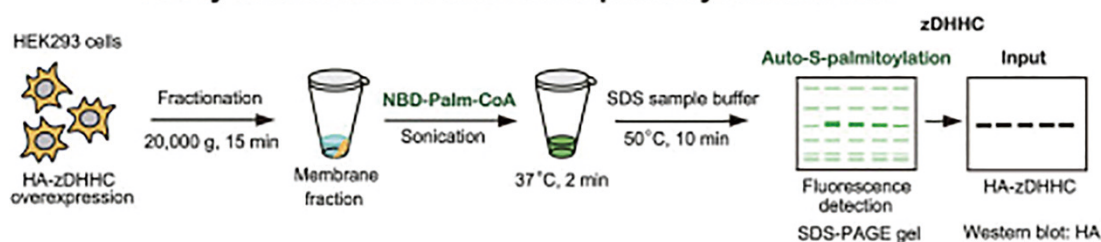


図3 簡便で低コストな自己パルミトイル化検知法

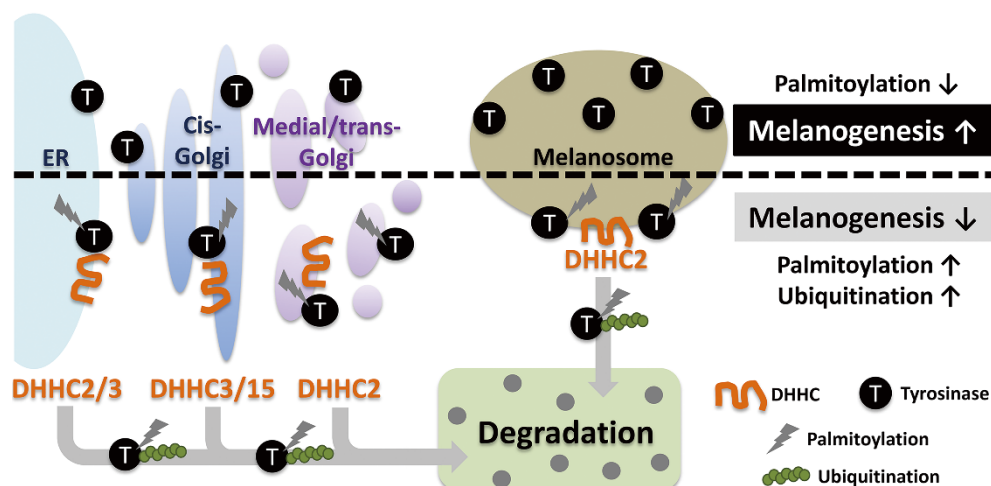


図4 Tyrosinaseのパルミトイル化による分解を利用したメラニン産生の制御

されていることを明らかにした(図4)。本研究は、メラニン合成酵素のパルミトイル化を標的とした、新たなメラニン産生制御法の確立の可能性を示唆するものである。

現在、UV + α MSHなどの生理的刺激によっても、tyrosinaseはパルミトイル化されることを明らかにしている(未報告)。また、Acyl-RACアッセイを用いて、Tyrp1はパルミトイル化されるがTyrp2はされないことを明らかにしている(未報告)。今後、Tyrp1のパルミトイル化の生理的機能を検証していく予定である。

本研究の過程で我々は、自己パルミトイル化DHHC酵素を簡便に短時間で、更に、低コストに検出する手法を開発した²⁾。加えて、癌患者より同定されたDHHC酵素の変異をスクリーニングしたところ、自己パルミトイル化能を完全に消失し、不活性化された変異DHHC酵素を発見した。本手法により、パルミトイル化修飾酵素DHHCタンパク質の機能解析が大きく前進し、パルミトイル化修飾が関与する様々な病因の解明が期待できる。

(引用文献)

- 1) Niki Y, Adachi N, Fukata M, Fukata Y, Oku S, Makino-Okamura C, Takeuchi S, Wakamatsu K, Ito S, Declercq L, Yarosh DB, Mammone T, Nishigori C, Saito N, and Ueyama T. S-Palmitoylation of Tyrosinase at Cysteine (500) Regulates Melanogenesis. *J Invest Dermatol.* 2023;143 (2): 317-27 e6. doi: 10.1016/j.jid.2022.08.040. PubMed PMID: 36063887.
- 2) Adachi N, Hess DT, and Ueyama T. A facile assay for zDHHC palmitoyl transferase activation elucidates effects of mutation and modification. *J Lipid Res.* 2025;66 (2):100743. doi: 10.1016/j.jlrl.2025.100743. PubMed PMID: 39800157.
- 3) Kageyama A, Oka M, Okada T, Nakamura S, Ueyama T, Saito N, Hearing VJ, Ichihashi M, and Nishigori C. Down-regulation of melanogenesis by phospholipase D2 through ubiquitin proteasome-mediated degradation of tyrosinase. *J Biol Chem.* 2004;279 (26):27774-80. doi: 10.1074/jbc.M401786200. PubMed PMID: 15067002.