

# チロシナーゼ酵素群の活性化に不可欠な金属獲得の分子機序の解明

京都大学大学院生命科学研究所

神戸 大朋

Melanin is an essential pigment involved in pigmentation and UV protection. Its biosynthesis depends on the tyrosinase protein family, which includes tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1), and tyrosinase-related protein 2 (TYRP2). These proteins share a high sequence identity but exhibit distinct biochemical properties. TYR contains two copper ions at its active center, supplied by the copper transporter ATP7A, which is crucial for its enzymatic activity. In contrast, TYRP1 contains two zinc ions coordinated at its active center, supplied by the zinc transporter complexes ZNT5-6 and ZNT7. Despite the importance of metal coordination, the regulatory mechanisms governing these processes within cells remain unclear.

In this study, we investigated TYR activation, a key step in melanin production. We confirmed that pigmentation requires copper supplied via ATP7A by demonstrating that ATP7A-deficient cells lost TYR activity, causing cell pellets to change from black to white. Furthermore, we identified a unique sequence in the carboxyl-terminal region of TYR that is essential for its activation. These findings provide new insights into the molecular mechanisms underlying TYR activation. Understanding ATP7A-mediated copper delivery to TYR and its specific activation may contribute to further research on melanin biosynthesis and pigmentation disorders.

## 1. 緒言

メラニン色素は、メラノソーム内でチロシンを出発点とする酵素反応を経て合成される。その反応では、チロシナーゼ (TYR)、チロシナーゼ関連タンパク質1 (TYRP1)、チロシナーゼ関連タンパク質2 (TYRP2) の3つのチロシナーゼ酵素群が必須の役割を果たしている。TYRに関しては解析が進展しており、70年以上前よりTYRの活性は銅に依存すること<sup>1)</sup>、さらにその後の解析からトランスゴルジネットワーク (TGN) に局在する銅輸送体ATP7Aによって輸送された銅を活性中心に配位することが示されている<sup>2)</sup>。TYRP1やTYRP2はTYRと高い相同性を有していることから、同様の特性を有していると考えられてきたが<sup>3)</sup>、最近、我々はTYRP1の機能発現に不可欠な金属は銅ではなく亜鉛であること、さらに、この亜鉛は初期分泌経路 (小胞体やゴルジ体) に局在する亜鉛輸送体ZNT5-6 (ZNT5とZNT6のヘテロ二量体) とZNT7 (ZNT7のホモ二量体) によって輸送されることを報告した<sup>4)</sup> (図1)。実際に、ZNT5とZNT7を欠損させたメダカにおいては、TYRP1遺伝子に変異がある動物と同じように、黒色のメラニン色素がブラウン調に変化し、メラノソームが成熟化されなかった<sup>4)</sup>。TYRとTYRP1は、40%以上のアミノ酸が一致するという高い相同性を有しており、両者の活性中

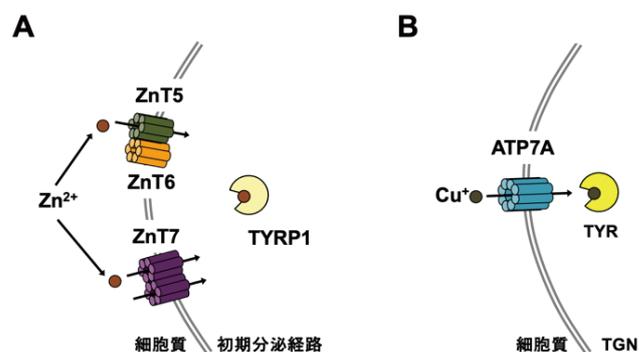


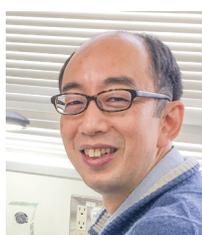
図1 TYRP1とTYRの金属による活性化のモデル  
A. 亜鉛輸送体ZNT5-6とZNT7によるTYRP1活性化機構  
B. 銅輸送体ATP7AによるTYRの活性化機構

心に金属を配位するアミノ酸残基も6つのヒスチジンで一致している<sup>3)</sup>。また、TYRとTYRP1はどちらも小胞体で生合成された後、シスゴルジ体やTGNを通過して、メラノソームに輸送されてメラニン合成に寄与する酵素である<sup>5)</sup>。すなわち、両酵素は非常に高い共通性が見出されるにもかかわらず、TYRは銅と、TYRP1は亜鉛と結合してメラニン合成に機能している。TYRとTYRP1は、どのようにして銅と亜鉛を区別し、正しくそれぞれの活性中心に配位できるのだろうか？本研究は、この謎の解明を目指して、TYRの活性化の機序に焦点を当てて解析を行った。

## 2. 方法

### 2.1. 細胞培養とトランスフェクション

ヒトメラノーマSK-MEL-2細胞の培養には、10% FCSを添加したRPMI1640培養液を使用し、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で継代維持を行った。ATP7A欠損細胞およびZNT5ZNT7二重欠損SK-MEL-2細胞は、先行研究で樹



Elucidating the Molecular Mechanism of Metal Acquisition Critical for the Activation of Tyrosinase Enzymes

Taiho Kambe

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

立していた株を使用した<sup>4)</sup>。また、ヒトメラノーマ Mewo 細胞の培養には、10% FCS を添加した EMEM 培養液を用いた。Mewo 細胞の ATP7A 欠損株は、先行研究で用いた gRNA 発現プラスミド<sup>4)</sup> を使用して樹立した。TYR、TYRP1 およびそれらの変異体を発現するプラスミドのトランスフェクションには、Lipofectamine 2000 を使用した。細胞を  $0.5 \times 10^5$  cells/well になるように 12well plate に播種し、48h 培養後にトランスフェクションに用いた。

## 2.2. 発現プラスミド構築

TYR と TYRP1 のドメイン交換変異体は、TYR と TYRP1 において組換える部位に相当する DNA 塩基配列を 15 塩基ずつ組み合わせたプライマーを合成し、2-stepPCR 法を使用して作成した<sup>6)</sup>。1 アミノ酸置換変異体の作成には、変異アミノ酸をコードする塩基に置換したプライマーを合成し、2-stepPCR 法を使用して作成した。作成した各 cDNA を pcDNA3 に挿入し、発現ベクターとした。Halo-tag や HA-TEV-tag を挿入した変異体については、それぞれのアミノ酸配列をコードするプライマーを設計し、2-stepPCR 法を使用して構築した。

## 2.3. Immunoblot 解析

全細胞抽出タンパク質を超音波処理後、20 $\mu$ g 相当量を終濃度  $2 \times$  SDS sample buffer (375mM Tris-HCl (pH6.8), 30% Glycerol, 6% SDS, 0.5M DTT, 0.1% BPB) となるように溶解し、37 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させサンプル溶液とした。8% SDS-polyacrylamide gel を用いて電気泳動を行った後、PVDF 膜に transfer した。ブロッキングの後、一次抗体を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させ、PBS-T で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、二次抗体と反応させた。Immobilion<sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrate を用いて化学発光させ、Image Quant LAS 500 にて検出した。一次抗体には、anti-TYR (Santa Cruz Biotechnology, Inc)、anti- $\alpha$ -actin (the Developmental Studies Hybridoma Bank)、anti- $\beta$ -galactosidase (MBL) を使用した。二次抗体には、HRP 標識抗 IgG 抗体 (1:3000) を使用した。

## 2.4. L-DOPA 酸化活性測定

細胞抽出タンパク質 10 $\mu$ g 相当量の SK-MEL-2 サンプルを 1.5mL tube に取り、反応液 ((10mM phosphate buffer (pH 6.8)、4% N, N-Dimethylformamide) 100 $\mu$ L、5mM L-DOPA 50 $\mu$ L、20.7mM 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine (MBTH) 50 $\mu$ L) を 200 $\mu$ L 添加してインキュベートした (37 $^{\circ}$ C、1h)。サンプル 190 $\mu$ L を 96 well plate にアプライし、505nm における吸光度を測定することで L-DOPA 酸化活性を評価した。

## 2.5. In Gel Zymography

調整した膜タンパク質 50 $\mu$ g 相当量に  $6 \times$  SDS buffer: DTT (-) (375mM Tris-HCl (pH6.8), 30% Glycerol, 6% SDS, 0.1% BPB) を 8 $\mu$ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートした。7.5% アクリルアミドゲルを用い、10mA、4 $^{\circ}$ C の条件で約 3 時間、電気泳動を行った。バッファの置換とゲルの平衡化のため、泳動後のゲルを 50mM phosphate buffer (pH6.0) で室温にて 3 時間振とうした。平衡化したゲルは基質反応液 (10mM phosphate buffer (pH6.8), 1.5mM L-DOPA, 4mM MBTH) 中において 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。TYR による L-DOPA 酸化産物である DOPA chrome のバンドの生成を褐色の色素として確認した。

## 3. 結果と考察

### 3.1. 培養細胞の色素形成におけるトランスポーター依存性の確認

TYR の ATP7A 依存性、TYRP1 の ZNT5-6, ZNT7 依存性を確認するために、培養時に濃褐色を呈色するヒトメラノーマ Mewo 細胞を用いて解析した。Mewo 細胞における ATP7A 欠損株、ZNT5 と ZNT7 の二重欠損株は、それぞれ、白色、薄い茶色を呈色し、動物において報告されている ATP7A と ZNT5-6, ZNT7 の機能消失で予想される変化と同じであった<sup>4,7)</sup> (図 2)。このことから、ATP7A が輸送した銅、ZNT5-6, ZNT7 が輸送した亜鉛が、正確に区別されメラニン生合成に関与していることが確認された。

### 3.2. 変異体を用いた TYR 活性化機構に関する解析

TYR と TYRP1 は共に小胞体で生合成され、メラノソ

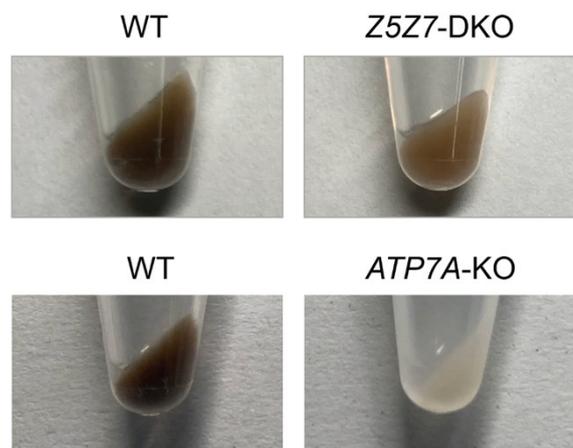


図 2 Mewo 細胞野生株、ZNT5ZNT7 二重欠損株、ATP7A 欠損株の呈色  
(上段) 野生株と ZNT5ZNT7 二重欠損株の細胞ペレットの写真  
(下段) 野生株と ATP7A 欠損株の細胞ペレットの写真

ームに輸送されるという共通点を有する。しかしながら、細胞質に存在するカルボキシ末端の配列の違いに起因するアダプタータンパク質の相違から、両者は異なる小胞輸送によってメラノソームに運ばれると考えられていた。この相違が、金属要求性の違いに関わる可能性を考え、TYRのカルボキシ末端領域を様々な長さでTYR<sub>P1</sub>の相当する領域と交換したドメイン交換キメラ変異体を構築し(図3A)、SK-MEL-2細胞に発現させることで、TYRの活性化に関わる領域の同定を試みた。解析の当初、細胞質領域の交換によってTYRの活性が消失することを予想していたが、予想に反して、この領域の交換ではL-DOPA酸化活性およびIn Gel Zymographyで評価したTYRの活性

は全く影響を受けなかった(図3B)。次に交換する領域を徐々にTYRのアミノ末端側に広げていき、ドメイン交換変異体を作成した。結果、膜貫通領域を含む領域でTYRとTYR<sub>P1</sub>を交換しても、TYRの活性は影響を受けなかったが、C末端のループ領域近傍でドメインを交換すると、L-DOPA酸化活性およびZymographyでのシグナルが消失した。したがって、この交換したドメインの近傍にTYRの活性化に関わる重要な領域が存在することが予想された。

同定した領域の機能について詳細に解析するため、1アミノ酸挿入変異体や1アミノ酸置換変異体を作成し、同様のトランスフェクション解析を実施した。図4Aで示し

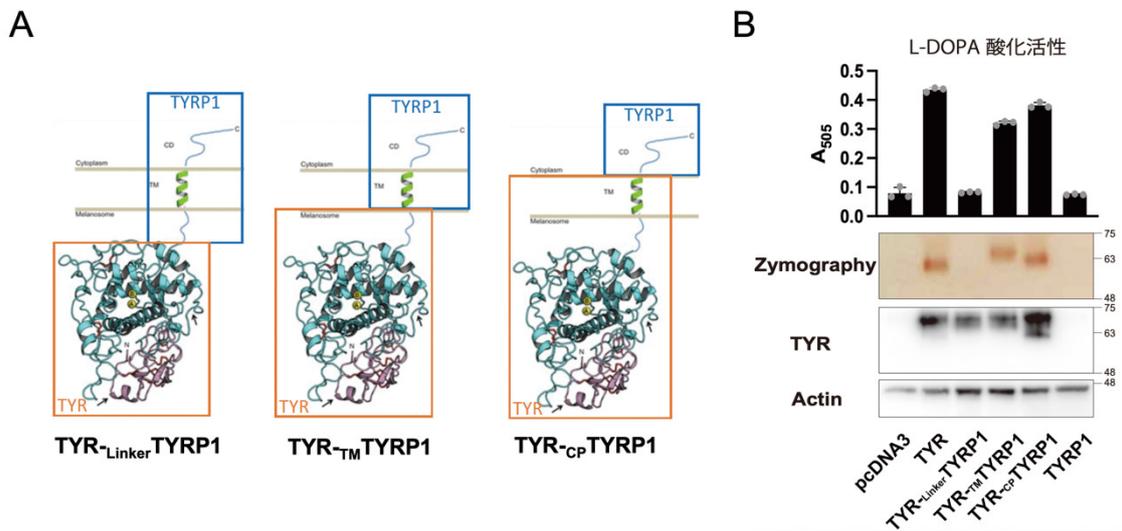


図3 TYRのドメイン交換変異体におけるL-DOPA酸化活性  
 A. TYRのカルボキシ末端領域をTYR<sub>P1</sub>の相当する領域と交換して作成したTYR変異体のモデル(引用論文5)の図を改変。  
 B. Aで作成したTYR交換変異体におけるTYR活性。L-DOPA酸化活性とZymographyで評価した。

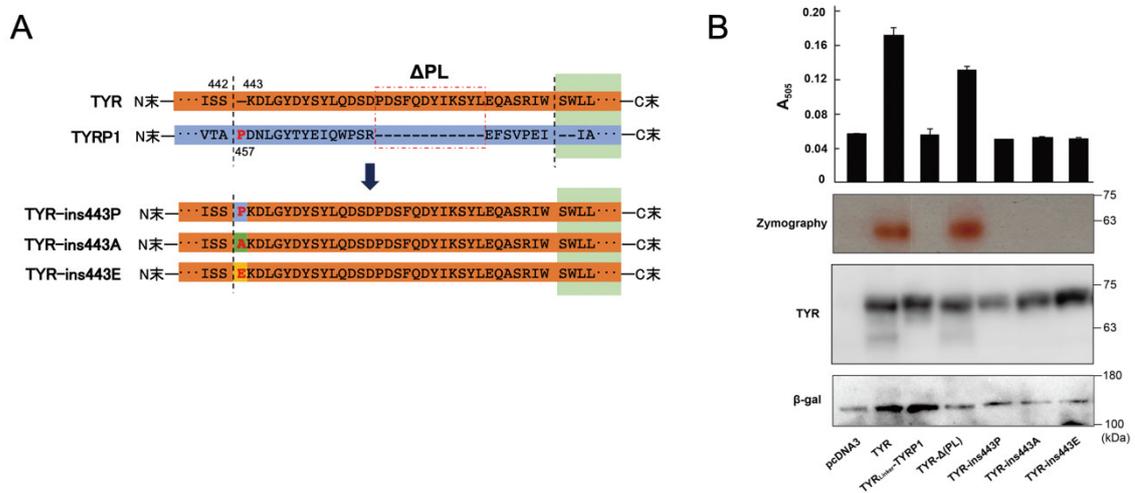


図4 TYRのドメイン交換変異体におけるチロシナーゼ活性  
 A. TYRのカルボキシ末端領域に着目して作成した変異体における1アミノ酸挿入部位と削除した配列の部位の模式図。  
 B. Aで作成したTYR交換変異体におけるTYR活性、L-DOPA酸化活性とZymographyで評価した。

たように、カルボキシ末端領域でのTYRとTYRP1の顕著な違いとして、TYRP1にのみ存在するプロリン残基が見出されたため、TYRにおいて対応する部位にプロリン、またアラニン、グルタミン酸を挿入したTYR変異体を作成して解析した。3つの変異体全てにおいて、TYR活性(L-DOPA酸化活性およびIn Gel Zymography)は見出されず、この部位の重要性が確認された(図4B)。一方、TYRに特異的にみとめられる挿入配列を除去したTYR変異体( $\Delta$ PL)の活性は野生型TYRのレベルに保持されており、この配列はTYRの活性化には重要でないことが判明した。

今後は、さらに解析を進め、カルボキシ末端領域においてTYRの活性化に重要な配列を同定する予定である。

### 3.3. 培養細胞からのTYR精製法に関する検討

動物細胞で発現するTYRに配位する金属を定量的に解析するため、TYRを精製する系の構築を試みた。TYRのカルボキシ末端にHA-tagを融合させた融合タンパク質をSK-MEL-2細胞に発現させたところ、Halo-tagを融合させていない野生型TYRに比べ、そのL-DOPA酸化活性が著しく減少していた。そのため、カルボキシ末端へのタグ融合が適していないことが予想された。そこで、上記解析で配列の有無によってもTYRの活性に大きな影響が現れないことが判明した領域にHA-tagおよびTEVプロテアーゼ切断部位をコードする配列を挿入したTYR改変体(TYR-HA-TEV)を作成した。TYR-HA-TEVをSK-MEL-2細胞に発現させたところ、野生型TYRと遜色ない活性を有していた。また、TYR-HA-TEVを発現させ、TEVプロテアーゼで切断後にHA抗体で精製したTYRには、期待通りチロシナーゼ活性が保有されており、現在、高発現株の樹立を進めている。

## 4. 総括

見出したTYRの活性に重要な配列の中には、I型眼皮膚白皮症(OCA1)の発症につながるミスセンス変異が報告されている<sup>5)</sup>。したがって、本配列にはTYRの活性化に必須となる配列が含まれていることが予想される。今後は、この変異の情報を考慮しながら、新たな変異タンパク質を作成し、解析を進めることを計画している。この情報と、

作成した改変体(TYR-HA-TEV)を使用した解析で得られた金属配位に関する情報を融合させ、TYRの活性化の機序、およびTYRP1とTYR間の金属配位の違いを生む機序を明らかにしたいと考えている。

TYRとTYRP1がどのようにして銅と亜鉛を区別できるのか明らかにできれば、金属タンパク質の機能発現の機序に関する重要な知見を提示できるだけでなく、美白効果を持つ化粧品などの開発に幅広く応用されることが期待される。

### (引用文献)

- 1) Lerner AB, Fitzpatrick TB, Calkins E, Summerson WH. Mammalian tyrosinase; the relationship of copper to enzymatic activity. *J Biol Chem* **187**, 793-802 (1950).
- 2) Petris MJ, Strausak D, Mercer JF. The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum Mol Genet*, **9**, 2845-2851 (2000).
- 3) Solano F. On the Metal Cofactor in the Tyrosinase Family. *Int J Mol Sci*, **19**, 633 (2018).
- 4) Wagatsuma T, Suzuki E, Shiotsu M, Sogo A, Nishito Y, Ando H, Hashimoto H, Petris MJ, Kinoshita M, Kambe T. Pigmentation and TYRP1 expression are mediated by zinc through the early secretory pathway-resident ZNT proteins. *Commun Biol*, **6**, 403 (2023).
- 5) Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M., and Dijkstra, B. W. Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Chemistry* **24**, 47-55 (2018).
- 6) Takeda, T. A., Miyazaki, S., Kobayashi, M., Nishino, K., Goto, T., Matsunaga, M., Ooi, M., Shirakawa, H., Tani, F., Kawamura, T., Komai, M., and Kambe, T., Zinc deficiency causes delayed ATP clearance and adenosine generation in rats and cell culture models. *Commun Biol*, **1**, 113 (2018).
- 7) Murisier, F., Beermann, F., Genetics of pigment cells: lessons from the tyrosinase gene family, *Histol Histopathol*, **21**, 567-78 (2006).