

修 士 論 文

色素産生細胞におけるメラノサイト刺激ホルモン誘導
メラニン生成を制御するマイクロ RNA の同定とその利用

令和 5 年 3 月

三重大学大学院 生物資源学研究科
生物圏生命科学専攻 海洋生命分子化学講座
水圏材料分子化学教育研究分野
古市 圭

目 次

略語一覧

序論	1
第 1 章 メラニン生成に関与する miRNAs の同定と作用機序の解明	
1. 1. 緒論	9
1. 2. 実験材料と実験方法	9
1. 3. 結果	27
1. 4. 考察	44
第 2 章 miRNA の美白素材のスクリーニングマーカー適性について検証	
2. 1. 緒論	47
2. 2. 実験材料と実験方法	47
2. 3. 結果	49
2. 4. 考察	57
総括	58
参考文献	60
謝辞	66

略語一覽

ACTH : adrenocorticotropic hormone

AMP : adenosine monophosphate

ATP : adenosine triphosphate

α -MSH : α -melanocyte stimulating hormone

CRE : cyclic adenosine monophosphate responsive element

CREB : cyclic adenosine monophosphate responsive element-binding protein

DCT : dopachrome tautomerase

ET-1 : endothelin-1

MITF : microphthalmia-associated transcription factor

miRNA : microRNA

POMC : pro-piomelanocortin

PKA : protein kinase A

RISC : RNA-induced silencing complex

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TYR : tyrosinase

TRP1 : tyrosinase related protein-1

TRP2 : tyrosinase related protein-2

UV : ultraviolet

UTR : untranslated region

cAMP : 3',5'-cyclic adenosine monophosphate

序 論

皮膚は、表皮、真皮の二層から構成され¹⁾、表皮は主に三層の細胞からなる0.06~0.2 mm ほどの薄い組織で、表層から角質細胞層、顆粒細胞層、有棘細胞層、基底細胞層の順で構成される (Fig. 1-1)^{1,2)}。真皮は、コラーゲンなどの繊維組織からなり、微細な血管網、神経を有しており、上層から乳頭層、乳頭下層、網状層の三層から成る。^{1,2)}。皮膚は外部からの刺激から体を守るためのバリア機能を担っており、皮膚の健康な状態を維持するために、基底細胞が分裂し、表層に向かって移動しながら、最終的に垢となって剥がれ落ちる新陳代謝を繰り返している^{1,2)}。このターンオーバーには、基底細胞から分裂して顆粒細胞層までに約 2 週間、その後、角質細胞になって剥がれ落ちるまで約 2 週間を要する²⁾。また、表皮には、樹枝状細胞である色素細胞が存在している。色素細胞の細胞質中には、核の中の遺伝情報を紫外線から守る役目をするメラニン顆粒という小器官があり、この中でメラニンが生合成される²⁾。メラニンはメラニン色素とも呼ばれ、肌や毛髪、瞳の色を作る色素である³⁾。メラニンには二種類存在し、黒色あるいは褐色のユーメラニンと黄色あるいは赤色のフェオメラニンがある³⁾。メラニンは太陽光に含まれる紫外線を吸収し、細胞を防御する働きがあり、日焼けによって皮膚が黒くなるのは、細胞を一時的に防御する反応である³⁾。しかし、ストレスによる肌のターンオーバーのサイクルの乱れや紫外線の過剰照射はメラニン生成と排出のバランスを崩し、表皮へのメラニンの過剰蓄積を誘導し、シミやそばかすとなる⁴⁾。

メラニンの生成メカニズムとして、太陽光に含まれる紫外線 (ultraviolet, UV) の照射により炎症が起きると、表皮層を構成するケラチノサイトではメラノサイト刺激ホルモン (α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH) やエンドセリン (endothelin-1, ET-1) などメラニンの生合成を促進する様々なサイトカインを放出する⁵⁾。このうち、 α -MSH はプロピオメラノコルチン (pro-piomelanocortin, POMC) のプロセッシングにより、 β -MSH, γ -MSH および副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) とともに産生、分泌される。 α -MSH はメラノサイトの表面に存在するメラノコルチン 1 レセプター (melanocortin 1 receptor, Mc1R) と結合することで、G タンパクを介してアデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase, AC) を活性化し、アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate, ATP) からサイクリック AMP (3',5'-cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 合成を促進する⁶⁾。細胞内の cAMP 濃度の上昇により、プロテインキナーゼ A (protein kinase A, PKA) が活性化され、cAMP 応答配列結合タンパク質 (cyclic AMP-responsive element-binding protein, CREB) をリン酸化し、リン酸化した CREB は核内に移行する。核内に移行したリン酸化 CREB は、ソマトスタチン遺伝子のプロモーター領域に存在する cAMP 応答配列 (cAMP-responsive element, CRE) に結合すると小眼球症関連転写因子 (microphthalmia-associated transcription factor, MITF) の

発現を誘導する^{6,7)}。その後、MITFは細胞質内でリン酸化され、核内に移行することで、メラニン生合成酵素群であるチロシナーゼ (tyrosinase, TYR), チロシナーゼ関連タンパク 1 (tyrosinase related protein-1, TRP1), ドーパクロムトートメララーゼ (チロシナーゼ関連タンパク 2) (dopachrome tautomerase, DCT (tyrosinase related protein-2, TRP2)) 遺伝子のプロモーター領域に存在する M-box に結合し^{8,9)}、これらのメラニン生合成酵素群の発現をそれぞれ上方制御する (Fig.1-2)⁶⁾。

皮膚における過剰なメラニン生成を抑制し、シミやそばかすとなるのを防ぐため、美白化粧品が販売されている。日本における美白とは、紫外線の害悪に対する対策と肌色の白さとが結びついたものであり、独自の概念であるとされており¹⁰⁾、欧米人への憧れに端を発するものではない。日本では古来から人の美しさと、とりわけ女性の美しさの条件として、肌の美しさを最も重視してきた歴史が存在する¹⁰⁾。奈良時代の歴史書である「日本書紀」では、女性の美しさを肌で表現する記述が存在する¹⁰⁾。日本書紀によると、当時は鉛製の白粉を顔に塗った真っ白な肌が美しいとされており、人々の間で美白の意識があったことを推測することができる¹⁰⁾。江戸時代になると化政文化の江戸では地肌が透けるくらい薄く白粉を塗る薄化粧と呼ばれる新しい化粧が存在するようになる。このころから素肌の状態の良し悪しが重要視される現在の美白の意識と近くなった¹⁰⁾。その後、鉛白粉の害が明らかにされた 1890 (明治 23) 年から、無鉛白粉の商品開発が進んだ。鉛の代替品として白粉の原料に用いられたのは現在でも安価な白色顔料として用いられているチタニウムおよび酸化チタンであった。その後、欧米流の化粧品が流通していくにつれて、1960 年代中頃から日本人の美容観の欧米化が進んでいき¹¹⁾、「美白」とは白粉を塗った肌ではなく、「素肌そのものを白くすること、また素肌の白さを保つこと」とされるようになった¹⁰⁾。1970 年代に入ると、紫外線の慢性傷害作用が報告された¹²⁾。このころから、素肌を白く保つために美白化粧品が開発されるようになっていった。近年、欧米の化粧品大手では Black Lives Matter 運動により、美白を意味する「ホワイトニング」という表現を撤廃する動きが高まっており、今後の国内における「美白」の考え方はさらに変化していくものと予想される。

2019 年度における我が国の美白化粧品製品売り上げは 2,600 億円/年に達し、1 兆 1,850 億円ほどのスキンケア市場において約 20%を占め、堅調に拡大している¹³⁾。2019 年度は売り上げが前年度比 98.9%となったが、今後新型コロナウイルスが沈静化するにつれて国内および訪日外国人の美白化粧品需要は回復していくとみられている (Fig.1-3)¹³⁾。

シミ・そばかすを予防する美白化粧品製品には、医薬部外品への配合が認められている成分が含まれている。それらのなかでも、メラニン生合成の律速酵素であるチロシナーゼの活性を抑制する成分やケラチノサイト由来因子に作用する成分が含まれていることが多い¹⁴⁾。メラニン生合成の律速酵素であるチロシナ

ーゼの活性を抑制する成分として、アルブチン、ビタミン C、ルシノールがある。アルブチンは生薬であるコケモモやウワウルシ中に 5~7.5%含まれるハイドロキノンとグルコースが β 結合したハイドロキノン誘導体である^{14,15)}。チロシナーゼの活性阻害作用を示すほかに、紫外線誘導色素沈着防止効果を示すことが知られている¹⁴⁾。ビタミン C は古くから知られている美白成分で、ドーパキノンをもドーパに還元する。しかし、ビタミン C は外用した場合、安定性に欠けるため、安定な誘導体として使用されている¹⁴⁾。ルシノールはシベリアのモミの木に含まれる成分であり¹⁶⁾、チロシナーゼの活性阻害とともに TRP-1 活性を阻害する¹⁴⁾。一方、ケラチノサイト由来因子に作用する成分として、カミツレエキスが知られている¹⁴⁾。カミツレは茶剤や食用として用いられており、紫外線に暴露された表皮ケラチノサイトから分泌されるエンドセリン 1 がメラノサイトを活性化する機構が明らかにされており、カミツレエキスはエンドセリン 1 の受容体をブロックすることでメラノサイトの活性化反応を抑制する。また、紫外線誘導色素沈着防止効果を示すことが知られている¹⁴⁾。これらの美白有効成分以外にも、メラニンのケラチノサイトへの移送を抑制するニコチン酸アミド¹⁷⁾、また皮膚の新陳代謝を向上させ、生成されたメラニンの滞留を抑制するアデノシンーリン酸二ナトリウム¹⁸⁾など、様々な働きを持つ成分が既に化粧品として使用されている¹⁹⁾。このようなメラニン生合成過程を制御する化粧品が市販されるまでには、美白有効成分の効果を的確に裏付けるスクリーニングが必要である。現在行われているスクリーニング法は、被験物質(美白成分)をメラノサイトに処理し、 α -MSH や ET-1 等を用いて、メラニン生合成を誘導させ、生成されたメラニン量を定量することでその美白成分の効能を評価している。この一般的な美白素材探索のためのスクリーニング法では、メラノサイトを被験物質で処理後、 α -MSH を加え、培養に 3 日、産生されたメラニン量の測定に 1 日の時間が必要となり、スクリーニング期間が約 6 日間と長い。したがって、化粧品企業はより迅速で安価なメラニン生合成調節機能を判定できるスクリーニング法の開発が求められている。

十数年前までヒトゲノムではタンパク質の設計情報が保存されているコード領域は全体の 2%程度とされ、生物にとって重要なゲノム上の情報は、タンパク質のアミノ酸配列情報とプロモーターなどの発現調節領域情報であり、それ以外の部分は意味をもたない塩基配列の連続であると信じられていた²⁰⁾。しかしながら、タンパク質をコードしていないノンコーディング RNA が大量に存在していることが明らかとなり、さらに、近年の飛躍的な RNA 研究の進展によって、かつては意味をもたない転写産物または転写の際に生じたジャンクと考えられてきた多くのノンコーディング RNA は、ヒトの生命活動において重要かつ多様な機能をもっているという、旧来のゲノム観を大きく覆す新たなゲノム観が誕生した²⁰⁾。ノンコーディング RNA の一つである microRNA (miRNA) は、真核生物に見られる約 22 塩基ほどの遺伝子発現調節に関与する small RNA であ

る。miRNA のシード配列と呼ばれる 5'-末端の僅か 7~8 塩基²¹⁾が相補的な配列をもつ mRNA と塩基対を形成し、翻訳を抑制することでタンパク質の発現を調節する働きを持つ²²⁾。翻訳抑制のメカニズムとして、核内で miRNA 遺伝子から RNA ポリメラーゼIIにより転写されたプライマリーmiRNA はリボヌクレアーゼ III系酵素である Drosha により一部が切断され、プレカーサーmiRNA が産生する。その後輸送タンパクである Exportin-5 により核から細胞質に移動した後、別のリボヌクレアーゼIII系の酵素である Dicer によりヘアピン構造が切断され、二本鎖の miRNA duplex となる。このうちの片側 1 本鎖が Argonaute タンパク質 1 (AGO1) と安定な複合体となり RISC を形成する。miRNA が miRNA 結合タンパク質であるアゴ 1 タンパク質と結合し、RISC (RNA-induced silencing complex) を形成することで、標的 mRNA の相補的領域と一致した部分がヌクレアーゼによって分解される (Fig. 1-4)²³⁾。つまり、miRNA は mRNA と完全に相補的に結合するわけではないため、miRNA 一分子で多くの mRNA を標的として分解することができる²³⁾。

近年では、miRNA はガンやアルツハイマー病などの様々な疾病を発見するための早期スクリーニングマーカーとなる可能性があることが報告されている²⁴⁻²⁷⁾。miRNA はガンの種類によって発現プロファイルが固有のパターンを示すことがわかっており、バイオマーカーとしての有用性を示した²⁸⁾。また、既にメラニン合成においても miR-137 および miR-148 が MITF の mRNA を下方制御するという報告がされている^{6,29-31)}。このような miRNAs が美白剤のスクリーニングに使用できればメラノサイトで被験物質を処理後、 α -MSH を加え、全 RNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR で miRNA の発現の変動を測定するだけで美白成分の効果があるか検証できる。全 RNA を抽出してから 2 日しか時間がかからないため、現在行われているスクリーニング法と比較すると 4 日間の期間短縮になる。

そこで本研究では、美白剤開発のための新しいスクリーニングマーカーとして利用でき、メラニン生合成関連因子の mRNA と相補的な配列を持つ miRNA を探索するために、 α -MSH 刺激におけるメラニン生成過程で発現が変動する miRNA について検討した。

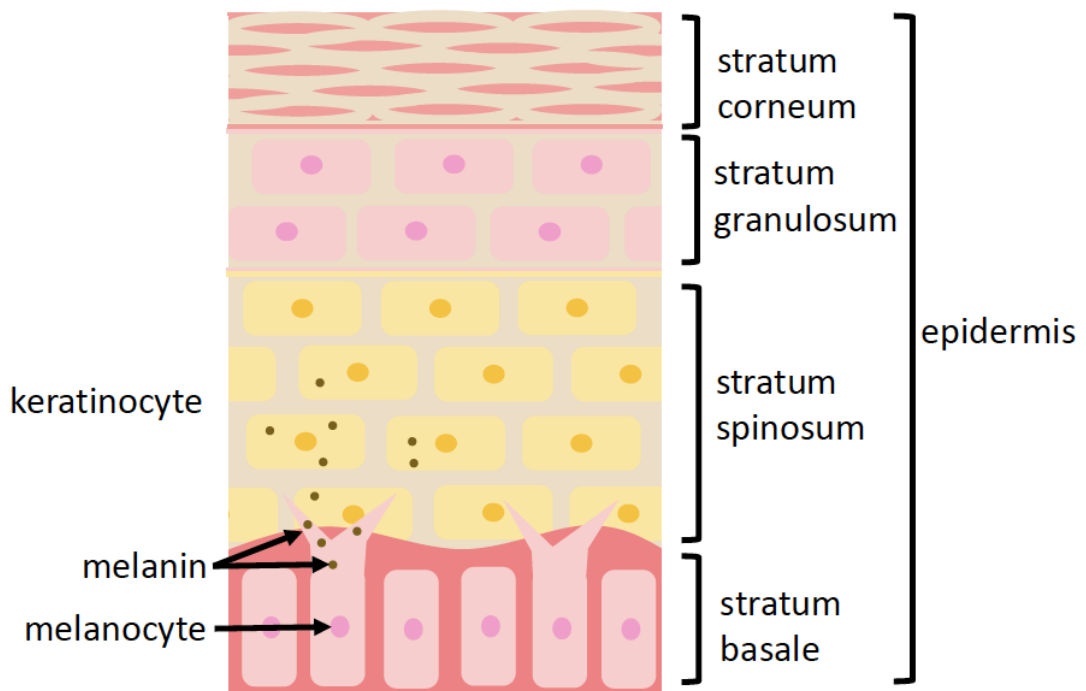


Figure 1-1. Structure of the epidermis. The epidermis is composed of the stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum, and stratum basale, in that order, from the superficial layer. Melanin produced by melanocytes in the basal layer is passed to keratinocytes in the spinous layer.

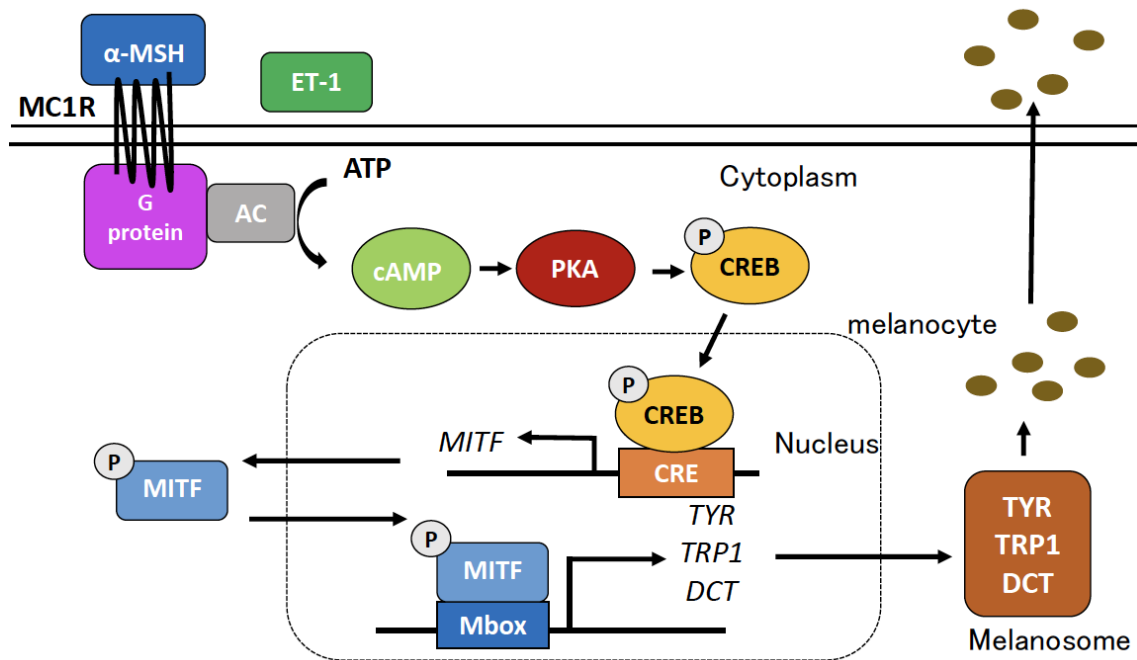


Figure 1-2. Melanin biosynthesis signaling pathway in α -MSH stimulated-melanocyte. When skin is exposed to UV light, keratinocytes secrete α -MSH. α -MSH binds MC1R on the cell surface, melanocytes produce melanogenesis. Increased stimulation of MC1R by α -MSH triggers intracellular cAMP production, following by the activation of PKA signal pathway. The expression of the transcription factor MITF and its activation by phosphorylation stimulate the transcription of upregulates the expression of TYR, TYRP1, and DCT, which a group of melanin synthase enzymes.

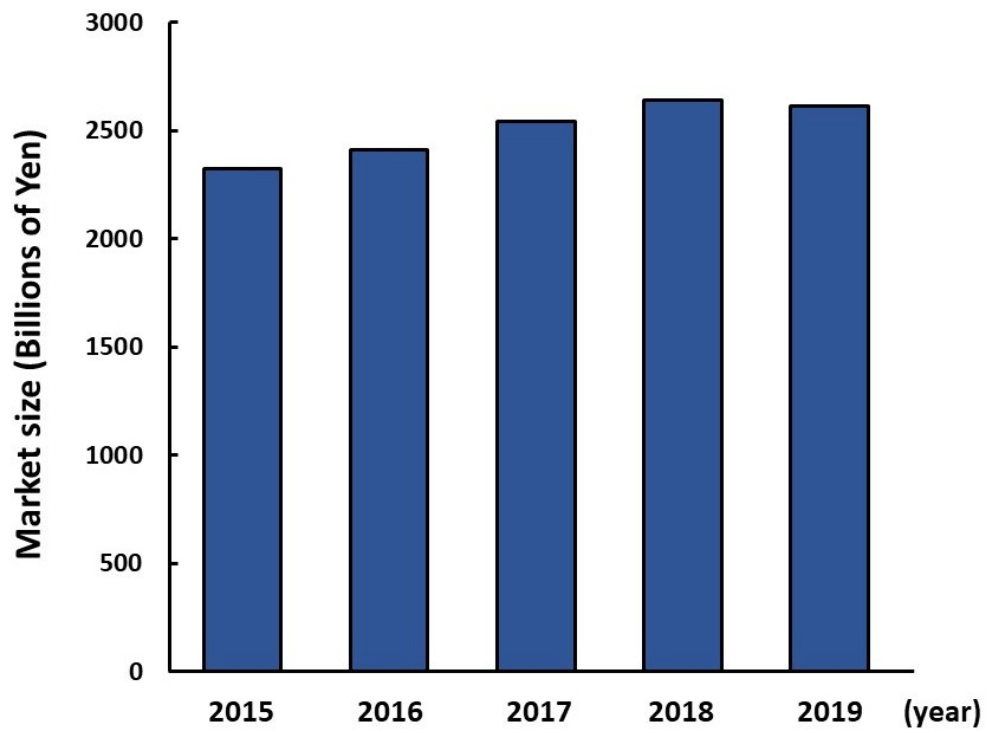


Figure 1-3. Domestic sales of whitening cosmetics¹⁾.

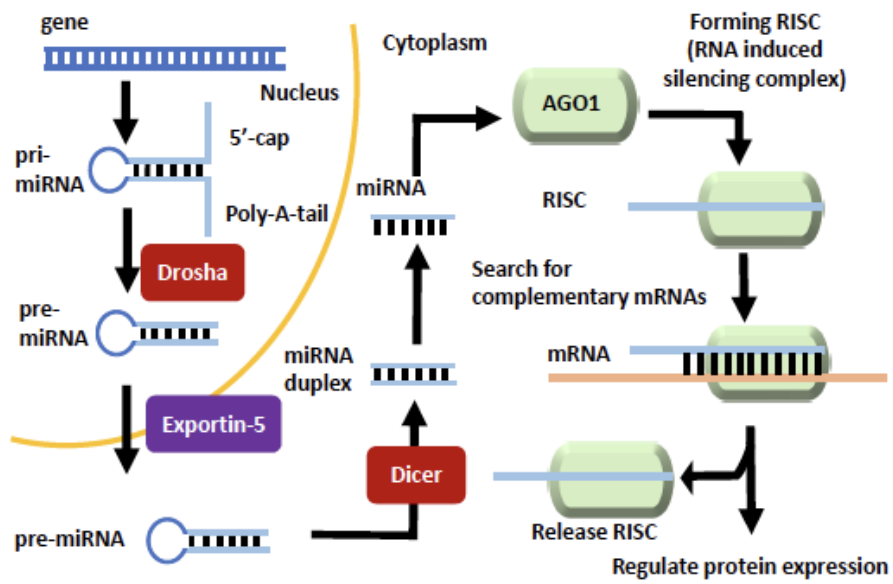


Figure 1-4. MicroRNA translation repression. MicroRNAs complex with AGO1 to form RISC, which base pairs with complementary sites on the target mRNA to regulate protein expression stability and translation and repress expression.

第1章 メラニン生成に関与する miRNAs の同定と作用機序の解明

1. 1. 緒 論

miRNA はその特徴から 1 : 多数の遺伝子発現に関与するため、様々な疾患のバイオマーカーとなり得る可能性が報告されており³²⁻³⁴⁾、特にガン治療のバイオマーカーとしての利用に向けた研究が盛んである。バイオマーカーとしての有用例として、前立腺ガンにおいては、14 種類の miRNA の発現パターンが腫瘍の悪性度の違いによって異なることが示されており³⁵⁾、肺ガンでは血中の miR-13 の存在量が患者を発見するためのバイオマーカーとなる可能性が報告されている³⁶⁾。一方、アルツハイマー病といったガン以外の疾患でも miRNA をバイオマーカーとして用いるための検証が進んでいる²⁷⁾。メラニン生合成過程においても序論にて示した miR-137⁹⁾および miR-148²⁹⁻³¹⁾のように、多数の miRNA が関与していることが報告されている。本研究では、美白素材のスクリーニングマーカーとして miRNA の利用を目指すため、本章では、マウスメラノーマ B16 細胞における α -MSH 誘導メラニン生成過程で発現が変動する miRNA を同定し、その miRNA のメラニン生成過程における作用機序を検討した。

1. 2. 実験材料および実験方法

1. 2. 1. マウスメラノーマ細胞培養

マウスメラノーマ B16-F10 細胞および B16-4A5 細胞は、理化学研究所バイオリソースセンター（つくば市）から入手した。B16-F10 細胞は、50 U/mL ペニシリンおよび 50 μ g/mL ストレプトマイシンを含む 10%ウシ胎児血清（Fetal bovine serum, FBS）含有 Roswell Park Memorial Institute（RPMI-1640）（富士フイルム和光純薬工業株式会社、大阪市）培地で、37°C、95%空気-5%CO₂ 環境下に設定した CO₂ インキュベーター（MCO-19AIC、三洋電機株式会社、大阪市）にて培養した。B16-4A5 細胞は 50 U/mL ペニシリンおよび 50 μ g/mL ストレプトマイシンを含む 10%FBS 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium（D-MEM）低グルコース培地（富士フイルム和光純薬工業株式会社）で、37°C、95%空気-5%CO₂ 環境に設定した CO₂ インキュベーターにて培養した。

1. 2. 2. Small RNA シーケンス解析

1. 2. 2. 1. 全 RNA の抽出

5.0 \times 10⁴ cells/mL に調製した B16-F10 細胞または B16-4A5 細胞に α -MSH（SIGMA, St. Louis, MO, USA）（1 μ M）を添加し、24 時間処理した。その後、アスピレーターで培地を除去し、リン酸緩衝液（phosphate-buffered saline, PBS）

(-)にて2回洗浄した。細胞に、TRIzol (Invitrogen, Waltham, MA, USA) 1 mL を加え、1.5 mL エッペンチューブに移した後、激しく振盪させ、細胞を溶解させた。次にクロロホルム (試薬特級, 富士フイルム和光純薬工業株式会社) 200 μ L を添加し、30 秒激しく振盪後、8,100 \times g, 15 分にて遠心分離後、上清を新しい 1.5 mL エッペンチューブに回収した。2-プロパノール (試薬特級, 富士フイルム和光純薬工業株式会社) 500 μ L を加え、10 分静置した後、8,100 \times g, 10 分、4°Cにて遠心分離した。上澄みを除去し、沈殿した核酸ペレットに 75%エタノールを 500 μ L 加え、洗浄し、5,000 \times g, 5 分、4°Cにて遠心分離した。上清を除去後、核酸ペレットを 30 分乾燥させ、Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 水 (Invitrogen) 180 μ L, DNase I 2 μ L およびその 10 \times Buffer 20 μ L (タカラバイオ株式会社, 草津市, 滋賀県) を加え、37°Cで1時間保温した。DNase I処理後、1.5 mL エッペンチューブに 3M 酢酸ナトリウム (株式会社ニッポンジーン, 富山市) 40 μ L, フェノールクロロホルム (Invitrogen) 150 μ L を加え激しく振盪後、13,000 \times g, 5 分、4°Cにて遠心分離機に供し、上清を新しいチューブに移した後、エタノール (試薬特級, 富士フイルム和光純薬工業株式会社) 800 μ L を加えた。その後、1.5 mL エッペンチューブを 13,500 \times g, 30 分、4°Cにて遠心分離した。上澄みを取り除き、沈殿した核酸ペレットを 75% エタノール 500 μ L にて洗浄し、13,500 \times g, 15 分、4°Cにて遠心分離した。核酸ペレットを1時間風乾させ、Nuclease free water (Invitrogen) 25 μ L にて溶解し、これを全 RNA とした。抽出した RNA の品質を確認するために Agilent 2100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) に供した。

1. 2. 2. 2. Small RNA シーケンス解析

α -MSH処理B16-F10細胞と α -MSH未処理B16-F10細胞から1. 2. 2. 1. 項に順じ全 RNAを抽出した。抽出したRNAの品質をAgilent 2100により解析したところ、18S, 28Sのピークとsmall RNAの領域にピークを確認し、RNAの品質として純度9.70 であり、次世代シーケンサーに供するものとして適切な純度であった (Fig. 1-5)。

その後、シーケンスライブラリーを形成し、次世代シーケンサー (HiSeq2500SE) を用いた Small RNA Sequencing 解析に供した。このシーケンス作業および各種バイオインフォマティクス解析は、Filgen 株式会社 (名古屋市), Novogene 社 (北京, 中国) に受託した。miRNA の発現はマウスのゲノム配列 (リファレンス配列) にマッピングし、各種 miRNA コード領域にマッピングされたリード数を計数した。

1. 2. 2. 3. miRNA 発現解析

次世代シーケンスで得られたリード数から、miRNA の発現量を解析した。生物学的複製がないサンプルの場合、Trimmed of M values (TMM) を使用してリード計数値を正規化し、DEGseq (Wang et al., 2010) を使用して発現量の差分を算

出した。 α -MSH 未処理 B16-F10 細胞と α -MSH 処理 B16-F10 細胞間の miRNA 発現変動の Fold Change と miRNA 発現差の統計的有意性をボルケーノプロットにより示した。さらに、クラスター解析は、Transcripts Per Kilobase Million (TPM) 正規化法で全体の \log_{10} (TPM+1) 値で組み分けした。

1. 2. 3. miRNA の標的遺伝子の探索 (*in silico* 解析)

α -MSH 未処理 B16-F10 細胞と α -MSH 処理 B16-F10 細胞の間で発現が大きく変動した miRNAs の標的遺伝子の検索は、TargetScan7.2 (http://www.targetscan.org/vert_72/) および miRDB (<http://mirdb.org/>) のデータベースを用いて *in silico* 解析をそれぞれ行った。

1. 2. 4. メラニン生成量定量試験

1. 2. 4. 1. 遺伝子導入 (リポフェクション法)

メラニン生成過程において発現が変動した miRNA のメラニン生合成機能を検討するために、人工的に模倣した各種 precursor miRNA とヒト、マウスの miRNA 配列との相同性が低い miR-Negative Control (NC) (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) を以下の手順で細胞内に導入した。

miRNA の終濃度が 20 nM の場合、OPTI-MEM (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) : Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen) : miRNA (20 μ M) = 96: 3: 1 (μ L) に、miRNA の終濃度が 40 nM の場合、OPTI-MEM: Lipofectamine RNAi MAX: miRNA (20 μ M) = 95: 3: 2 (μ L) にそれぞれ調製し、軽くピペッティング後、30 分静置した。静置している間に、12 ウェルマルチプレートに 5×10^4 cell/mL に播種し、一晩プレートに吸着させた B16-4A5 細胞を PBS(-) で 2 度洗浄後、OPTI-MEM 900 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C、95% 空気-5%CO₂ に設定されているインキュベーターにて保管した。30 分後、ウェルに前述した miR-OPTI-MEM 混合液を 100 μ L/well 添加し、37 $^{\circ}$ C、95% 空気-5%CO₂ に設定されている CO₂ インキュベーター内で 24 時間、培養した。24 時間後 D-MEM 低グルコース培地に切り換え、各種試験に供した。

1. 2. 4. 2. メラニン標準曲線の作成

メラニン生成量を定量するためにメラニン標準曲線を以下の手順で作成した。合成メラニン (SIGMA) を 1 mg 正秤し、100 mL 容メスフラスコに加えた。1N NaOH を加え、卓上超音波洗浄機にて溶解し、100 mL に 1N NaOH を用いてメスアップした。96 ウェルマルチプレートに調整したメラニン溶液を 10 μ g/mL となるように加え (50 μ L/well)、マルチ検出モードプレートリーダー VARIOSKAN LUX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) にて 475 nm における吸光度を測定し、標準曲線を作成した。

1. 2. 4. 3. 細胞内メラニン量の測定

メラニン生合成誘導剤として α -MSH (SIGMA) を終濃度 1 μ M となるように B16-4A5 細胞 (5.0×10^4 cells/mL) に添加し、72 時間処理した。72 時間の培養後、セルスクレーパーにより細胞をかきとり、培地とともに新しい 1.5 mL 容エッペンチューブに移し、13,500 \times g, 15 分, 4°Cにて遠心した。遠心後 PBS(-)にて2回洗浄後、13,500 \times g, 15 分, 4°Cにて遠心分離した。上清を取り除き、細胞ペレットに 1N NaOH 200 μ L を加え、60°Cにて1時間細胞を溶解させた。96 ウェルマルチプレートに溶解液 50 μ L を移し、マルチモードプレートリーダーにより 475 nm における吸光度を測定した。同時に、溶解液のタンパク質量を DC™ プロテインアッセイキット (Bio Rad, Hercules, CA, USA) により測定した。メラニン量は予め 1. 2. 4. 2. 項の手順に準じて作成した標準曲線から算出し、同時に測定したタンパク質量により補正後、比較した。

$$\text{細胞内メラニン量} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg protein}} \right) = \frac{\text{吸光度測定後、標準曲線より算出したサンプルのメラニン生成量} (\mu\text{g})}{\text{回収した細胞のタンパク質量} (\text{mg})}$$

1. 2. 4. 4. 明視野位相差観察

1. 2. 4. 1. 項に準じて各 miRNA を導入し、 α -MSH 刺激から 48 時間後の B16-4A5 細胞を、小型オールインワンボックス型蛍光顕微鏡 (FSX100, OLYMPUS, 東京) を用いて明視野位相差観察した。

1. 2. 5. 細胞内マイクロ RNA の測定

1. 2. 2. 1. 項に準じて α -MSH 刺激から 0, 1, 3, 6, 12, および 24 時間後に抽出した全 RNA の濃度を NanoDropLite (Thermo) にて測定した。その後、Nuclease free water を用いて 25.0 ng/ μ L に調製し、逆転写反応用のテンプレートとした。各種 miRNA の発現量を測定するために、TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, USA) を用い、Table 1-1 に従って逆転写酵素液を調整した。逆転写プライマーは、TaqMan® MicroRNA Assays mmu-miR-122b-3p (code #464780_mat) を用い、内部標準には、TaqMan® MicroRNA Assays RNU6B (code #001093) (以上 Applied Biosystems) の逆転写用プライマーを用いた。各々調製後、逆転写酵素液を 8 連チューブにそれぞれ 10 μ L/tube ずつ加え、逆転写反応を行った。逆転写反応の条件は、4°C で 3 分、16°C で 30 分、42°C で 30 分、85°C で 5 分とした。逆転写反応終了後、cDNA テンプレートと TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) を用いて TaqMan プロブリアルタイム PCR を行った。48 ウェルマルチプレートに Table 1-2 に従って調製したリアルタイム PCR 反応液を 20 μ L/well ずつ分注した。TaqMan® MicroRNA Assays mmu-miR-122b-3p, また内部標準として TaqMan® MicroRNA Assays RNU6B のリアルタイム PCR 用プライマーを用いた。リアルタイム PCR 条件は Holding Stage ; 50°C で 2 分、

95°Cで20秒, Cycle Stage ; 95°Cで1秒, 60°Cで20秒を40サイクルし, その後, 4°Cで冷却した。

1. 2. 6. チロシナーゼ活性評価

1. 2. 6. 1. 粗酵素液の調製

B16-4A5 細胞をセルスクレーパーでかきとり, 回収し, 12,000×g, 3分にて遠心分離した。上清を除去後, PBS(-)で沈殿を2回洗浄した。上清を除去して細胞ペレットに0.1 Mリン酸バッファ250 μL 中に TRITON®X-100 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) を5%含む溶液を加えて懸濁し, 1.5 mL チューブに移した。水中で細胞懸濁液を超音波破碎機を用いて粉碎した (10秒×3回)。その後, 遠心分離 (14,800×g, 15分, 4°C) に供し, 上清をマウス粗チロシナーゼ酵素液とした。

1. 2. 6. 2. 基質液の調製とチロシナーゼ活性測定

96穴マイクロウェルプレートに基質である1% L-DOPA (#D9628, SIGMA) を50 μL加え, 調製したマウス粗チロシナーゼ酵素液を50 μL加えた。その後, 37°Cで3時間保温し, 反応させた。反応後, マルチプレートリーダーにより475 nmにおける吸光度を測定した。チロシナーゼ活性比は, 以下の計算式により算出した。同時に, 酵素液のタンパク質量を DC™ プロテインアッセイキット (Bio Rad) により測定した。

$$\text{チロシナーゼ活性比} = \frac{\alpha\text{-MSH処理, miRNA導入または未導入細胞における吸光値 (475 nm)} / \text{回収した細胞のタンパク質量}}{\alpha\text{-MSH未処理, miRNA未導入細胞における吸光値 (475 nm)} / \text{回収した細胞のタンパク質量}}$$

1. 2. 7. リアルタイム PCR

1. 2. 7. 1. 逆転写反応

High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo) に構成される2×RT Buffer (10 μL) と20×RT Enzyme Kit (1 μL) を混合させたRT master mixに, 1. 2. 2. 1. の項に準じて抽出したRNAサンプルを50 ng/μLとなるように加え, DNase-RNase free water を溶液全量が20 μLになるように調整した。次に, Veriti 96 well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) を用いて, RNAからcDNAへの逆転写反応を37°Cで60分, 逆転写酵素の熱失活を95°Cで5分行い, 4°Cで冷却した。

1. 2. 7. 2. リアルタイムPCR

Power SYBR Green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) を10 μL, DNase-RNase free waterを6.4 μL, cDNAサンプル溶液を2 μL, 各プライマー (10 μM) (タカラバイオ株式会社, Table 1-4) を0.8 μL加え, 20 μLのリアルタイムPCR反応液を作製した。Fast Optical 48-well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific) に

リアルタイムPCR反応液を20 μL /well入れ、プレートに48-well Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific) でシールした。その後、Step One Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) により各種遺伝子の発現量を定量した。PCR条件は、Holding Stage ; 95°Cで10分、Cycle Stage ; 95°Cで15秒、60°Cで1分を45サイクル行い、Melt Curve Stage ; 95°Cで15秒、60°Cで1分とした。内部標準遺伝子には *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (以下、*GAPDH*) を用い、比較 C_t 法によって相対的定量を行った。

1. 2. 8. タンパク質発現解析

1. 2. 8. 1. 細胞溶解サンプルの調製

B16-4A5細胞 (5.0×10^4 cells/mL) を6ウェルマルチプレートに2 mLずつ播種し、接着確認後、1. 1. 4. 1. の項に準じて各miRNAを導入した。次にメラニン産生誘導剤 α -MSHを終濃度1 μM となるように添加し、72時間処理した。処理後、細胞をPBS(-)で洗浄し (1.0 mL \times 3回)、2% protease inhibitor, 2% phosphatase inhibitor (以上 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を含む Radio-Immunoprecipitation (RIPA) Buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)) にて細胞を溶解した。回収した細胞溶解液は超音波破碎機を用いて (10秒 \times 3回) 氷上にて破碎した。細胞破濁後、13,500 $\times g$, 15分, 4°Cにて遠心分離し、上清をサンプル溶液として回収した。サンプル溶液中のタンパク質濃度は、DC™ プロテインアッセイキット (Bio Rad) を用いて測定した。タンパク質量を調節したサンプル溶液に、10%メルカプトエタノールを含むサンプルバッファーを加え、98°Cの条件下で5分間加熱し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-Poly Acrylamide gel Electrophoresis, SDS-PAGE) に供した。

1. 2. 8. 2. SDS-PAGE

泳動層に目的タンパク質分離に適した濃度のポリアクリルアミドゲルをセットし、泳動バッファー (Bio Rad, Tris/Glycine Buffer 10%, 超純水90%) を泳動層の約3分の1まで入れた。ゲルの各レーンに12 μL (タンパク質 : 20 μg /Lane) ずつサンプルを、左端のレーンには等量のサンプルのタンパク質分子量マーカーを注入した。その後、125V, 90分にて泳動することで、被験物質のタンパク質を分離した。泳動後、ガラスプレートからゲルを慎重に外し、不要な濃縮ゲルを切り取り、ブロットイングバッファー (Bio Rad, Tris/Glycine Buffer 10%, メタノール20%, 超純水70%) に浸した濾紙の上に移した。

1. 2. 8. 3. ウェスタンブロットイング

Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (GE Healthcare UK Ltd, Amersham Place, England) を、メタノールに1分間浸し、親水化処理後、ブロットイングバッファ

ーに浸して平衡化した。ブロッキングバッファーをよく染み込ませたスポンジと濾紙のそれぞれ2枚を一組とし、1.2.8.2. 項で述べたSDS-PAGEを行ったゲルとPVDF膜を挟み、ブロッキング槽にセット後、氷水で冷やしながら60V、90分でSDS-PAGEによって分離したタンパク質をPVDF膜に転写した。転写後、PVDF膜を5%脱脂粉乳 (Difco Laboratories Inc, MI, USA) 含有トリス緩衝化生理食塩水 (1×T-TBS) 溶液に浸して1時間ブロッキングを行った。ブロッキング終了後、T-TBSで洗浄後 (10分 × 3回), Tyrosinase (#C2-B5, NOVUS Biologicals LLC, Centennial, CO, USA), MITF (D5G7V, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), β -actin (#0000093224, SIGMA) の各種一次抗体溶液 (希釈倍率 1:1,000) に浸して、4°Cで一晩振盪した。その後、T-TBSで洗浄後 (10分 × 3回), 5%脱脂粉乳含有 T-TBS 溶液により希釈した二次抗体 (Enhanced chemiluminescence™ (ECL) Anti-Mouse IgG, Horseradish peroxidase linked whole antibody または ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish peroxidase linked whole antibody, GE Healthcare = 希釈倍率 1:10,000) に浸して再び室温 (22±1°C) にて、1時間振盪した。その後、T-TBSにて洗浄し (10分 × 3回), ECL Prime 検出試薬 (GE healthcare) で5分処理後、iBright Imaging System (Thermo Fisher Scientific) にて検出した。

1. 2. 9. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

miR-122b-3pの標的遺伝子を同定するため、*Tyr* mRNA 3'-非翻訳領域 (UTR, untranslated region) に存在するmiR-122b-3pが結合する部位を組み込んだセンサーベクターを用い、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した。

1. 2. 9. 1. *TYR*-3' -非翻訳領域のクローニング

1.2.2.1. の項に準じて抽出した全 RNA を 500 ng/ μ L に調整し、逆転写反応用のテンプレートとした。PrimeScript™ RT reagent Kit (タカラバイオ株式会社) を用い、Table 1-6 に従って逆転写酵素液を調製した。調製後、8 連チューブに逆転写酵素液を 10 μ L/tube 入れ、逆転写反応を行った。逆転写反応条件は 37°C; 1 分, 37°C ; 15 分, 85°C ; 5 秒, 4°C で冷却を行った。逆転写反応終了後、反応生成物と、ルシフェラーゼレポーターアッセイに用いるセンサーベクターである pmirGLO (Promega, Madison, WI, USA) 概略図 (Fig. 1-6) のルシフェラーゼ下流に存在するマルチクローニングサイトに組み込む *Tyr*-3'-UTR の各領域を各プライマーセット (Table 1-7, Fig. 1-7) を用いて、クローニングを行った (Table 1-8)。PCR は以下の条件によって行った; Holding Stage ; 94°C で 1 分, Cycle Stage ; 94°C で 30 秒, 55°C で 30 秒, 72°C, 1 分を 30 サイクル, その後、4°C で冷却した。PCR 反応終了後、PCR 産物を 2%アガロースゲル電気泳動に供し、目的とした領域がクローニングできているか確認した。電気泳動の際、マーカーは 100bp DNA Ladder (Dye Plus) (タカラバイオ株式会社) を用いた。

1. 2. 9. 2. DNA断片の精製（切り出し）

1. 2. 9. 1. の項に準じて増幅した PCR 産物 50 μL にフェノールクロロホルム (Invitrogen) 200 μL を加え, 30 秒激しく振盪した。次に 11,300 $\times g$, 10 分, 4°Cにて遠心分離後, 上清を新しい 1.5 mL 容エッペンチューブに回収し, クロロホルム 200 μL を加え, 30 秒激しく振盪した。遠心分離後 (11,300 $\times g$, 10 分, 4°C), 上清を新しいチューブに回収し, 800 μL のエタノールを加え, -80°Cで一晩静置した。-80°C静置後, 17,600 $\times g$, 30 分, 4°Cにて遠心分離し, エタノールを取り除き, 核酸ペレットを乾燥させた。次に Table 1-9 に従って調整した制限酵素 (Pme Iおよび Xba I) 液 50 μL を加え, 37°Cで 1 時間保温した。核酸ペレットを制限酵素処理後, 軟寒天ゲル (Lonza, Rockland, ME, USA) にて 50V, 1 時間で冷却しながら電気泳動し, エチジウムブロマイドで 20 分間, 室温にて染色した。その後, 蒸留水で 5 分洗浄し, UV トランスイルミネーター上でゴーグルを着用後, カッター刃により DNA 断片を切り出した。切り出した DNA 断片ゲルを新しいチューブに回収し, 65°Cに加温したカッティングバッファー 1000 μL (Table 1-10) を加えた。その後, 65°Cで 15 分保温し, ゲルを完全に溶解した。ゲル溶液を 3~4 分割し, フェノールクロロホルム 200 μL を加え, 30 秒激しく振盪した。次に 11,300 $\times g$, 10 分, 4°Cにて遠心分離後, 上清を新しいチューブに回収し, クロロホルム 200 μL を加え, 30 秒激しく振盪した。その後, 11,300 $\times g$, 10 分, 4°Cにて遠心分離後, 上清を新しいチューブに回収し, 800 μL のエタノールを加え, -20°Cで一晩静置した。その後, 核酸ペレットを 1 時間乾燥させた。得られた DNA 断片は-20°Cにて保管した。

1. 2. 9. 3. ライゲーション

クローニングした DNA 断片と pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega) のライゲーション作業は, Promega 社に作製委託した。また, 点変異ベクターの作製は, 作製された miR-122b-3p-Tyr センサーベクターを使用し, Table1-7 に示した Tyr-MUT プライマーセットを用い, Gene Script 社 (Piscataway, NJ, USA) に委託した。

1. 2. 9. 4. 形質転換

構築した pmirGLO-miR-122b-3p-Tyr-3'UTR-Binding site (miR-122b-3p-Tyr-WT) Vectorまたは, pmirGLO-miR-122b-3p-Tyr-3'UTR-Binding site-mutation (miR-122b-3p-Tyr-MUT) Vectorを, *Escherichia coli* DH5 α を用いて形質転換をそれぞれ行った。*E. coli* DH5 α : miR-122b-3p-Tyr-WT Vector (10 ng/ μL) または, miR-122b-3p-Tyr-MUT Vector (10 ng/ μL) =100 : 2 (μL) の比で混合し, 1時間氷中で静置した。この間, 15分毎に指でタッピング処理をしながら攪拌させた。1時間後, 42°Cで2分ヒートショックを与え, 2分後直ちに氷中へ5分戻した。その後, Super optimal broth with catabolite repression (SOC) 培地を250 μL 加え, 37°Cで1時間ローテーターに

より攪拌しながら前培養した。次に、37°Cに加温したアンピシリン含有Lysogeny Broth (LB, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 寒天培地に、菌液を滴下し、滅菌コンラージ棒とターンテーブルを用いて塗抹し、37°Cで一晩静置した。その後、生育したコロニーを滅菌爪楊枝を用いて掻き取り、ライブラリー用のLB寒天培地にコピーした。コピーした菌が各々の領域を組み込んだベクターが導入されているか確認するために、QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてベクターを抽出し、Table1-11に従って調製した制限酵素液 (Pme IおよびXba I) 処理後、組み込んだ領域のDNA断片長を2%アガロースゲル電気泳動により確認した。電気泳動の際、マーカーは1KB Plus (0.1-10 kb) (SMOBIO Technology, Hsinchu, Taiwan) を用いた。

1. 2. 9. 5. センサーベクターの大量作製

miR-122b-3p-Tyr-WTまたは、miR-122b-3p-Tyr-MUTのルシフェラーゼセンサーベクターを発現する大腸菌をそれぞれライブラリー寒天培地から滅菌爪楊枝を用いて掻き取り、LB液体培地100 mLに加えた。その後、37°Cで48時間通気培養した。次に菌体を6,000 × g, 15分, 4°Cにて遠心分離後、上清を除去した。回収した菌体ペレットから各々のセンサーベクターをQIAGEN Plasmid Midi Kitのプロトコルに準じ大量調製した。

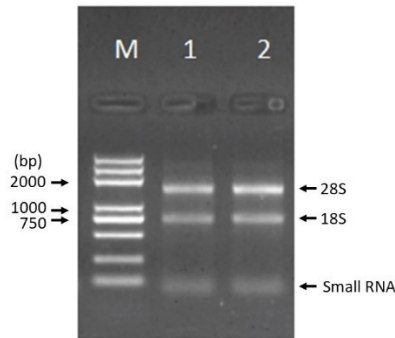
1. 2. 9. 6. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

12ウェルマルチプレートにB16-4A5細胞を 5×10^4 cells/mLとなるように播種し、37°C, 95%空気-5%CO₂に設定されているインキュベーター内で24時間プレートに接着させた。接着確認後、miR-NC, miR-122b-3pまたは、miR-122b-3p inhibitor (終濃度が20 nM) と、センサーベクター (250 ng/μL) (終濃度が10 ng/μL) を、リポフェクション法によりそれぞれ細胞に導入後、24時間培養した。ルシフェラーゼレポーターアッセイは、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) を用いて行った。本キットに同梱されているPassive Lysis Bufferにて細胞溶解後、予めLuciferase Assay Reagent IIを100 μLずつ分注しておいたルミノメーター用の1.5 mLチューブに、20 μLの細胞溶解液を加えた。直ちにこのチューブを激しく振盪し、ルミノメーターGloMax® 20/20 Luminometer (Promega) により発光強度を測定した。測定後、Stop & Glo® Bufferを100 μL加え、ウミシイタケルシフェラーゼの発光強度を測定した。発光強度はホタルルシフェラーゼの発光値をウミシイタケのルシフェラーゼによる発光値で補正した。

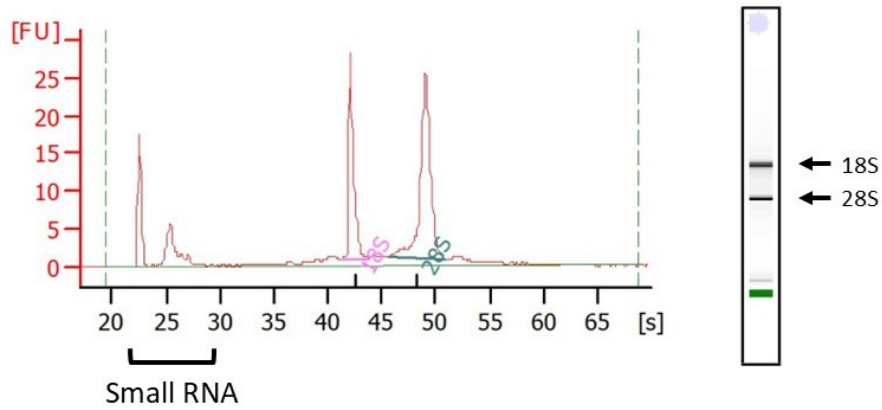
1. 2. 10. 統計処理

測定値は、平均±標準誤差で示した。多群間の処理はDuncan法 ($p < 0.05$) により、それぞれ有意差の検定を行った。

(A) RNA quality check



(B) RNA quality check of α -MSH unstimulated B16-F10 cell



(C) RNA quality check of α -MSH stimulated B16-F10 cell

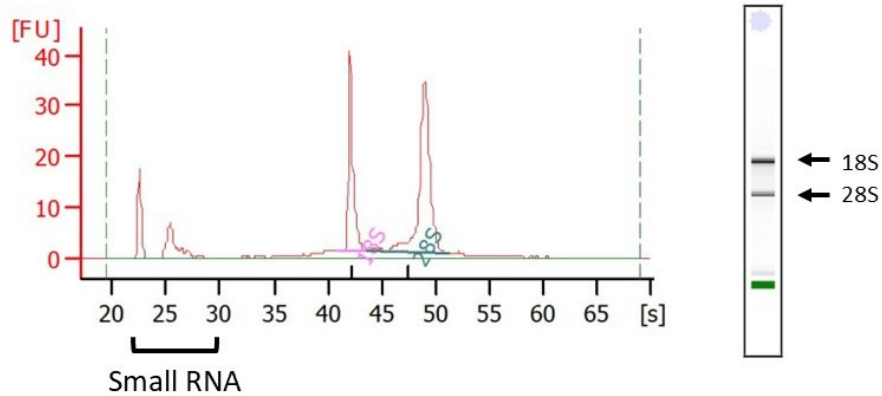


Figure 1-5. Quality check of RNA extracted from B16-F10 cells. (A) From left to right, M: DNA ladder marker (Trans 2K plus), 1: RNA extracted from α -MSH unstimulated cells, 2: RNA extracted from α -MSH stimulated cells. 18S and 28S peaks were observed for both RNAs, indicating that RNA is not degraded. (B) RNA extracted from α -MSH unstimulated cells was electrophoresed and graphed. (C) RNA extracted from α -MSH stimulated cells was electrophoresed and graphed.

Table 1-1. Composition of reverse transcriptase solution

Reagent	Volume (μL)
10 \times RT Buffer	1.00
10mM dNTP mix	0.10
Nuclease free water	4.77
RT enzyme	0.67
RNase Inhibitor	0.13
RT primer	2.00
Total RNA solution	1.33
Total	10.00

Table 1-2. Composition of real-time PCR reaction solutions

Reagent	Volume (μL)
TaqMan [®] Fast Advanced Master Mix (2 \times)	4.0
TaqMan [®] Gene Expression Assay (20 \times)	1.0
cDNA template	2.0
Nuclease free water	11.0
Total	20.0

Table 1-3. Composition of reverse transcriptase solution

Reagent	Volume (μL)
2 \times RT Buffer mix	10.0
20 \times Enzyme mix	1.0
Total RNA solution	x
Nuclease free water	9.0-x
Total	20.0

Table 1-4. Primer sequences for real-time PCR

Gene name	Primer sequences
<i>Mitf</i>	Forward: 5'-ACTATGGCCAAGGCAGAGCAAC-3'
	Reverse: 5'-TCAGAGGCTACAAGCCAAGGTAATG-3'
<i>Tyr</i>	Forward: 5'-CAAGTACAGGGATCGGCCAAC-3'
	Reverse: 5'-GGTGCATTGGCTTCTGGGTAA-3'

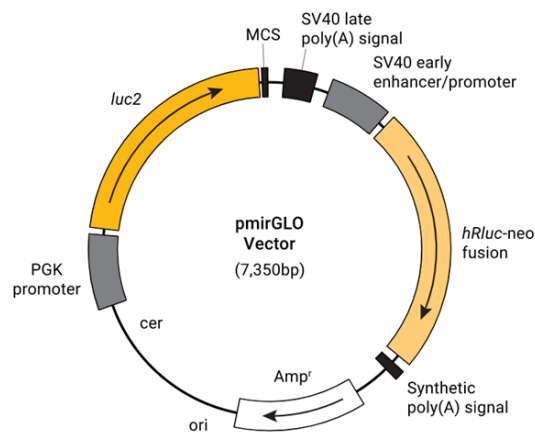
Table 1-5. Composition of real-time PCR reaction solutions

Reagent	Volume (μ L)
Master mix	10.0
Nuclease free water	6.4
Primer (Forward)	0.8
Primer (Reverse)	0.8
cDNA sample	2.0
Total	20.0

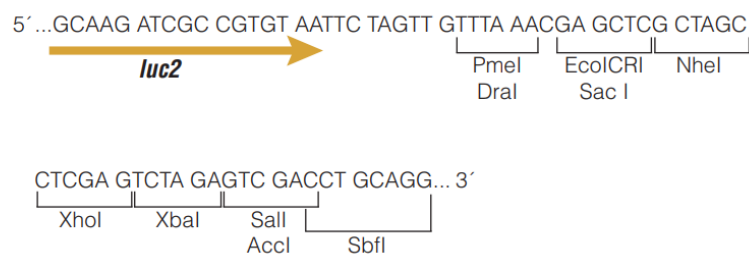
Table 1-6. Composition of reverse transcriptase solution

Reagent	Volume (μ L)
5 \times PrimeScript Buffer	2.0
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5
50 μ M Oligo dT Primer	0.5
100 μ M Random 6 mers	0.5
RNase Free dH ₂ O	5.5
Total RNA solution	1.0
Total	10.0

(A) PmirGLO vector³⁷⁾



Multi cloning site³⁷⁾



(B) pmirGLO-Tyr-miR-122b-3p sensor

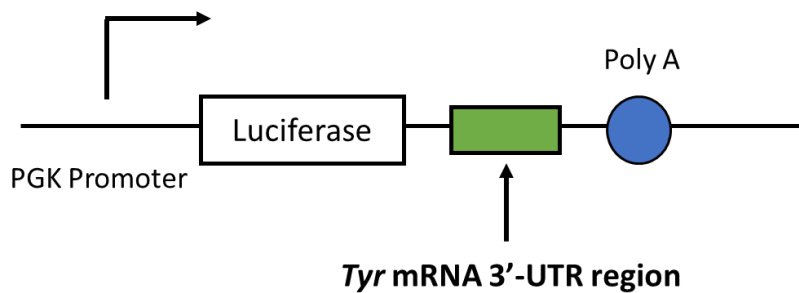


Figure 1-6. A schematic representation of the sensor vector used in the luciferase reporter assay. (A) PmirGLO vector is designed to quantitatively evaluate miRNA activity by the insertion of miRNA target sites 3'-UTR of the firefly luciferase gene (*luc2*)³⁷⁾. Firefly luciferase is the primary reporter gene; reduced firefly luciferase expression indicates the binding of endogenous or introduced miRNAs to the cloned miRNA target sequence³⁷⁾. PmirGLO vector's multi cloning site sequence is shown. (B) Schematic of the pmirGLO-*Tyr*-miR-122b-3p sensor vector used in the luciferase reporter assay.

Table 1-7. Primers sequences for PCR, cloning *Tyr*-3'-UTR

Primer	Primer sequences
<i>Tyr WT</i>	Forward: 5'-GTTTAAACGCGCGGCCGCAGGAAACAGAGTGGGACTGA-3'
	Reverse: 5'-GCTCTAGAGCCCAAACAGCTATGGTCTATG-3'
<i>Tyr MUT</i>	Forward: 5'-TGTTGGGCGCGCTACAAATTTAAACTAG-3'
	Reverse: 5'-TTGTAGCGCGCCCAAACAATAGGTCGAGT-3'

(A)

```
1   gaaaggagaa aatgttcttg gctgttttgt attgccttct gtggagtttc cagatctctg
61  atggccattt tctcagagcc tgtgcctcct ctaagaactt gttggcaaaa gaatgctgcc
121 caccatggat gggatgatggg agtccctgcg gccagctttc aggcagaggt tctgcccagg
181 atatccttct gtccagtgca ccatctggac ctccagtccc cttcaaaggg gtggatgacc
241 gtgagtctctg gccctctgtg ttttataata ggacctgcca gtgctcaggc aacttcatgg
301 gtttcaactg cggaaactct aagtttggat ttgggggccc aaattgtaca gagaagcgag
361 tcttgattag aagaaacatt tttgatttga gtgtctccga aaagaataag ttcttttctt
421 acctcacttc agcaaaacat actatcagct cagtctatgt catccccaca ggcacctatg
481 gccaaatgaa caatgggtca acacccatgt ttaatgatat caacatctac gacctctttg
541 tatggatgca ttactatgtg tcaagggaca cactgcttgg gggctctgaa atatggaggg
601 acattgattt tgcccatgaa gcaccagggg ttctgccttg gcacagactt ttcttgttat
661 tgtgggaaca agaaattcga gaactaactg gggatgagaa cttcactggt ccatactggg
721 attggagaga tgcagaaaac tgtgacattt gcacagatga gtacttggga ggtcgtcacc
781 ctgaaaatcc taacttactc agcccagcat ccttcttctc ctccctggcag atcatttgta
841 gcagatcaga agagtataat agccatcagg ttttatgcca tggaaacacct gagggaccac
901 tattacgtaa tcttgaaaac catgacaaag ccaaaacccc caggctccca tcttcagcag
961 atgtggaatt ttgtctgagt ttgaccaggt atgaatctgg atcaatggat agaactgcc
1021 atttcagctt tagaaacaca ctggaaggat ttgccagtcc actcacaggg atagcagatc
1081 cttctcaaag tagcatgcac aatgccttac atatctttat gaatggaaca atgtcccaag
1141 tacagggatc ggccaacgat cccatttttc ttcttcacca tgcttttgtg gacagtattt
1201 ttgaaacaatg gctgccaagg caccgcctc ttttggagt ttaccagaa gccaatgcac
1261 ctatcggcca taacagagac tcttacctg ttcctttcat accgctctat agaaatgggtg
1321 atttcttcat aacatccaag gatctgggat atgactacag ctacctcaa gagtcagatc
1381 caggctttta cagaaattat attgagcctt acttggaaaca agccagtcgt atctggccat
1441 ggcttcttgg ggcagcactg gtgggagctg ttattgctgc agctctctct gggcttagca
1501 gtaggctatg ctttcagaag aagaagaaga agaagcaacc ccagaaggaa aggcagccac
1561 Tyr WT tctcatgga caaagacgac taccacagct tgctgtatca gagccatctg tgaacatcct
F primer → 1621 aggaaacaga gtgggactga aaggttttac ctactcgac ctattgttg gtgtttctac
1681 aaatttaaac tagtataaaa catagaccat agctgtttgg Tyr WT cttttttca gacctatgtt
← R primer 1741 ttttcctaag tcttagtttc taagaaatga ctgggatttg ctaaaatata tatatatata
1801 aataataact tactaatagc taaataaaat ttctctttac aactaattga gctggttttt
1861 atgaatgtgt cttaattatt taaacttgag gcacattttt gttttctta cttcattgtg
1921 aatttccaag aaaaatattc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc
1981 tctctctctc tctctcgtgt gtttgtgtgt gtgtgtgtgt taactgattc aaacaatttt
2041 gaaaatcttg gattgataga aatgattcat taatttatga aattatttca ttaatgatta
2101 ggaaagacga ataattacta aattagtaac agaggagaac atctgccagc ttttattaat
```

次ページへ続く

2161 tgtcatttaa gttaccttat ctaccttctg tgactggtgg aaaaatatca ggcaagagat
2221 gggaatgcac tgcctaagag gatagtggtc cctggaagga gtgggttatt actagagatt
2281 attacctgaa gtttaccata gccagaaaat taatcaaac agatgactca gtaacatctg
2341 aagcttcaag tgggcttgac tgcaatctga aatcatcaag cccaagagcc aaaggaatgg
2401 gaacagcgat gggaaactat ctgaatcaga ttctagtgtg atagtgtcag gggcacatgg
2461 gtcacatcttg agaccttcac acctgttgag tcacccaaaat ttgctgtgaa ggtaaatttt
2521 tactgtaaat taattttttc ttttcttttt aaaaagattt atttattatt atacataagt
2581 acactgtagc tgtcttcaga cacaccagaa gaggggtgtca gatctcatta cagatggttg
2641 tgagccacca tgtggttgct gggatttgaa ctgaggacct ctggaagaac agtcagtgtc
2701 cttaccgct gagccatctc gccagcccag taaattttta ctttagtgaa agtaaaattt
2761 aagttttagt ttttagttta gtaaaatttt aggaagcaaa ttttagttt tctaaccgaa
2821 ttgttttttc tagtactgga catcaacca gtgccttgta tatgcaatgc aagcattttc
2881 ttgtactctg ctacctagca tgtatatata aatctacca acaaagtgtc attacagctg
2941 acaagggctt ttataaactc ggtgtttccc tttatcaca tacaattccc tcctttgcca
3001 cttcatgtca tcatagaata ttgttttttt ctctagcggg tcaaggtatg tatttgtata
3061 gcagtcacac ctttgataaa agttaccatc tctttgatta tatattctca ttatggtaac
3121 aaaattatat tatgactatt tcaatatatc tgaaagtttc attaaattct cattaacttt
3181 gtatatattca gtcttgctta ttgtgaagct tttataaatt gcttcacttt tttctgaaat
3241 tgtcctggtg ctacatcatt ctgttaagaa ataagtaagt ggcaatattt tcccccttc
3301 ttcttctctt aggcctttta aattaatttt agtattcata ttttttatc aaatcaaca
3361 tgcaattctc tatctgtaga gattaacctg tgatcgatac aagtcatttt aactagtgtc
3421 cttatgaggc tgacagcaag cataaatcat tgatgttcag ctttatata agctttcatt
3481 tatgagtaga gtttgtcagt ttatacaata gaatataaat tataaacaag ctattaatac
3541 cacaaaagcc ttaacattat ttagctgttg caaactacat atgaacaact ttagtaattt
3601 tcatgttcta ttttaagttt atatgcttca aatttattat ttggggcctc ttattgtttt
3661 tttatatggc agcattctag gatggagtgt gaagagattt cttagcctca atccccatct
3721 gatgccctat gggcagtgat ggcttctggt tgaggacac tcagttttct attcgagtcc
3781 tggtagagtt atcatgttct ggtagaagga ttcaagcca gtagtatagg tacaccatgc
3841 cttataatga ctgagctatt acatttaaaa agaataaaa gcatgaagct gaggaggcag
3901 tgagggtggg gtggatctgc ggagagtcac atggagaagt ggagggcaga ttacattat
3961 atcaaaatttt caaaaaataa taaaatattt ataaaatgta attgaacgaa caatatgtgg
4021 gttggaatca aaactcatgt agaactttct tcagtcacta gatctgattg attgtgaatt
4081 gattattagc catttaaaact agtagattcg agacttacct taattattta gttgccaaat
4141 ttgggatcac aattgaatat gtctcctcaa aaaatatctt aaaaattcat agtaatcact
4201 ttcactttcc ttttgctat tttaaaatat atgcattctc ttaattaa cagctctgca
4261 tcctgtttgt ccataggta aataaaatgt tgagtgtg

(B)

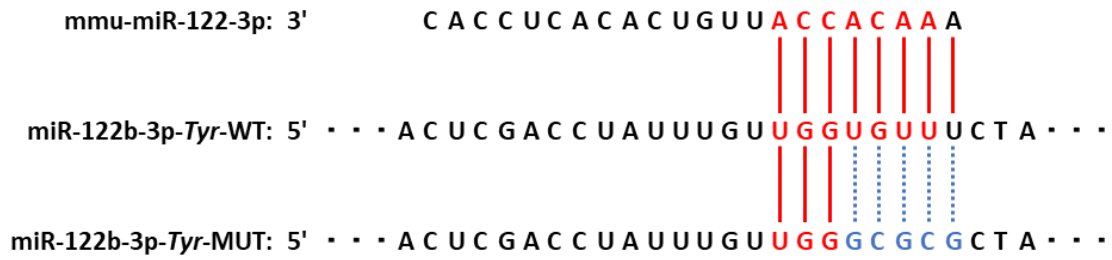


Figure 1-7. Micro RNA-122b-3p target *tyrosinase (Tyr)* directly in the mouse melanocyte cell line. (A) Each region of *Tyr*-3'-UTR to be incorporated into the multicloning site downstream of luciferase. ■ : coding region, ■ : binding sites of primers (Forward, Reverse) used for cloning *Tyr*-3'-UTR, ■ : binding site with miR-122b-3p seed sequence. (B) The miR-122b-3p seed sequence and the complementary sequence on the *Tyr*-3'-UTR are shown in red, and the miR-122b-3p seed sequence and the complementary sequence on the *Tyr*-3'-UTR with a 5-base mutation are shown in blue.

Table 1-8. Composition of PCR cloning reaction solution

Reagent	Volume (μL)
10×Buffer	5.00
dNTP mix	4.00
Nuclease free water	39.25
0.1 μM Forward-primer	0.25
0.1 μM Reverse-primer	0.25
cDNA template	1.00
<i>Taq</i> polymerase	0.25
Total	50.00

Table 1-9. Composition of restriction enzyme solution

Reagent	Volume (μ L)
dH ₂ O	35.0
10×Reaction Buffer	5.0
<i>Pme</i> I	5.0
<i>Xba</i> I	5.0
Total	50.0

Table 1-10. Composition of cutting buffer

Reagent	Volume (mL)
50mM Tris-HCl (pH 8.0)	5.0
0.5mM EDTA	0.1
Mess up with dH ₂ O to	100.0

Table 1-11. Composition of restriction enzyme solution

Reagent	Volume (μ L)
dH ₂ O	13.0
10×Cut Buffer	2.0
<i>Pme</i> I	0.2
<i>Xba</i> I	0.125
DNA fragments	5.0
Total	20.325

1. 3. 結果

1. 3. 1. Small RNA シーケンス解析

α -MSH で刺激誘導したマウス色素産生細胞 B16-F10 におけるメラニン生合成過程にて変動する miRNA の発現量を解析するため、総 RNA を抽出後、次世代シーケンサーによる Small RNA シーケンス解析を行った。その結果、 α -MSH 刺激により発現が増加した miRNA を 2 つ、減少した miRNA, 9 つをそれぞれ確認し、3 つのクラスターに分類された (Fig. 1-8, Table 1-12)。 α -MSH 刺激により発現量が減少した 9 つの miRNA のうち、本研究では、2 倍以上または 2 倍以下に発現が変化した miR-1a-3p, miR-1b-5p, miR-122b-3p, miR-133a-3p および miR-499-5p に着目した。

1. 3. 2. メラニン生合成過程で発現が変動した miRNAs の標的遺伝子探索 (*in silico*解析)

miRNA 発現比較解析により、 α -MSH 刺激した細胞内にて発現が変動した miR-1a-3p, miR-1b-5p, miR-122b-3p, miR-133a-3p および miR-499-5p のメラニン生合成に関与する標的遺伝子を、Target Scan7.2 および miRDB のデータベースにてそれぞれ解析した。*in silico* 解析の結果から、miR-1a-3p は *Trp1* および *Dct* を含む 731 種類、miR-1b-5p は *Tyr* を含む 4336 種類、miR-122b-3p は *Tyr* を含む 494 種類、miR-133a-3p は *Trp1* を含む 589 種類、miR-499-5p は *Mitf* および *Tyr* を含む 346 種類の標的遺伝子がそれぞれ存在した (Fig. 1-9)。これら 5 つの miRNA はいずれもメラニン生合成に関与する *Mitf* や *Tyr*, *Trp1*, *Dct* を標的とすることが推測された。

1. 3. 3. 発現が減少した各種 miRNA を導入した B16-4A5 細胞における α -MSH 刺激後のメラニン生成への影響

メラニン生成関連酵素群を標的遺伝子とすると予測された miR-1a-3p, miR-1b-5p, miR-122b-3p, miR-133a-3p および miR-499-5p をそれぞれリポフェクション法により B16-4A5 細胞に導入し、 α -MSH 刺激後 (72 時間) の、メラニンの生成量を測定した。miR-NC 導入細胞と比較して、miR-1a-3p 導入細胞では 0.86 倍、miR-1b-5p 導入細胞では 1.06 倍、miR-122b-3p 導入細胞では 0.67 倍、miR-133a-3p 導入細胞では 0.99 倍、miR-499-5p 導入細胞では 0.59 倍となった (Fig. 1-10)。

1. 3. 4. miR-122b-3p および miR-122b-3p inhibitor を導入した B16-4A5 細胞における α -MSH 刺激後のメラニン生成への影響

メラニン生成を抑制した miR-122b-3p と miR-499-5p のうち、本研究では *Tyr* を標的遺伝子とすることが予測された miR-122b-3p の作用機序解明に取り組むこととした。miR-122b-3p と miR-122b-3p の機能を阻害する miR-122b-3p のアンチセンスインヒビターをリポフェクション法により導入した後、B16-4A5 細胞に α -MSH 刺

激を加え、メラニンの生合成を誘導した。miR-NC細胞と比較してmiR-122b-3p導入細胞では0.47倍に減少したメラニン生成量は、miR-122b-3p inhibitor導入細胞では大幅に増加し、miR-122b-3p導入細胞と比較して2.39倍に増加した (Fig. 1-11)。また、明視野位相差観察においても、miR-122b-3p導入細胞と比較して、miR-122b-3p inhibitor導入細胞ではメラニン生成量が増加していた (Fig.1-12)。

1. 3. 5. B16-4A5 細胞における α -MSH 刺激後の miR-122b-3p の発現変化

Small RNA シーケンス解析により、 α -MSH 処理 24 時間後の miR-122b-3p の発現の低下が観察されたことから、ダブルチェックを目的に、 α -MSH 刺激した B16-4A5 細胞を 0, 1, 3, 6, 12 および 24 時間後の RNA を回収し、TaqMan リアルタイム PCR 法によって miR-122b-3p の発現の経時的な発現変化を解析した。その結果、0 時間後の miR-122b-3p 発現と比較して 1 時間後の発現量は 0.92 倍、3 時間後の発現量は 0.85 倍、6 時間後の発現量は 0.88 倍、12 時間後の発現量は 0.86 倍、24 時間後の発現量は 0.62 倍に減少し (Fig. 1-13) , α -MSH 刺激により miR-122b-3p の経時的な発現の減少を確認した。

1. 3. 6. miR-122b-3p を導入した B16-4A5 細胞におけるチロシナーゼ活性評価

miR-122b-3p 導入細胞を用いたメラニン生成試験からメラニン生合成の抑制効果が確認できたため、この miR-122b-3p による、メラニン生成抑制がどのような作用機序によって引き起こされているか、次に検証することとした。

前項 1. 3. 2. 項の *in silico* 解析により miR-122b-3p の標的遺伝子としてチロシナーゼが予測されたため、まず初めに miR-122b-3p 導入細胞におけるチロシナーゼの活性評価を行った。その結果、miR-NC 導入細胞と比較し、miR-122b-3p 導入細胞ではチロシナーゼ活性が 0.54 倍となった。一方、miR-122b-3p inhibitor を導入した細胞では miR-122b-3p 導入細胞の 1.29 倍となった (Fig. 1-14)。

1. 3. 7. miR-122b-3p を導入した B16-4A5 細胞における α -MSH 刺激後のメラニン生合成に関与するチロシナーゼのタンパク質および遺伝子発現への影響

miR-122b-3p の標的遺伝子が前項 1. 3. 2. 項の *in silico* 解析から Tyr と推測され、前項 1. 3. 6. 項では miR-122b-3p 導入メラノサイトにおける α -MSH 刺激後のチロシナーゼ活性は低下した。miR-122b-3p が *in silico* 解析で示された Tyr を標的としていれば、miR-122b-3p 導入細胞におけるチロシナーゼの活性阻害は、miR-122b-3p 導入により、 α -MSH 刺激後の Tyr のタンパク質の発現量が抑制されたためと推測できる。この理由から、ウエスタンブロット法により Tyr タンパク質の発現量について解析した。また、メラニン合成関連酵素群の発現を制御する転写因子である Mitf についても同様に検証を行った。その結果、miR-NC 導入細胞と比較して miR-122b-3p 導入細胞における Tyr タンパク質の発現量は 0.42 倍

に低下した。一方、*Mitf* のタンパク質の発現量については miR-NC 導入細胞と比較して 1.27 倍に増加した (Fig. 1-15)。

miR-NC 導入細胞と比較して、 α -MSH 刺激後の miR-122b-3p 導入細胞では *Tyr* のタンパク質発現が減少したため、*Tyr* mRNA の発現量をリアルタイム PCR にて解析した。 α -MSH 刺激後の miR-NC 導入細胞と比較して miR-122b-3p 導入細胞では、*Tyr* mRNA の発現量が 0.56 倍に減少した。また、*Mitf* mRNA についても同様に測定したところ、 α -MSH 刺激後の miR-122b-3p 導入細胞での *Mitf* mRNA の発現は miR-NC 導入細胞と比較して 1.02 倍になり、ほとんど変化がなかった (Fig. 1-16)。

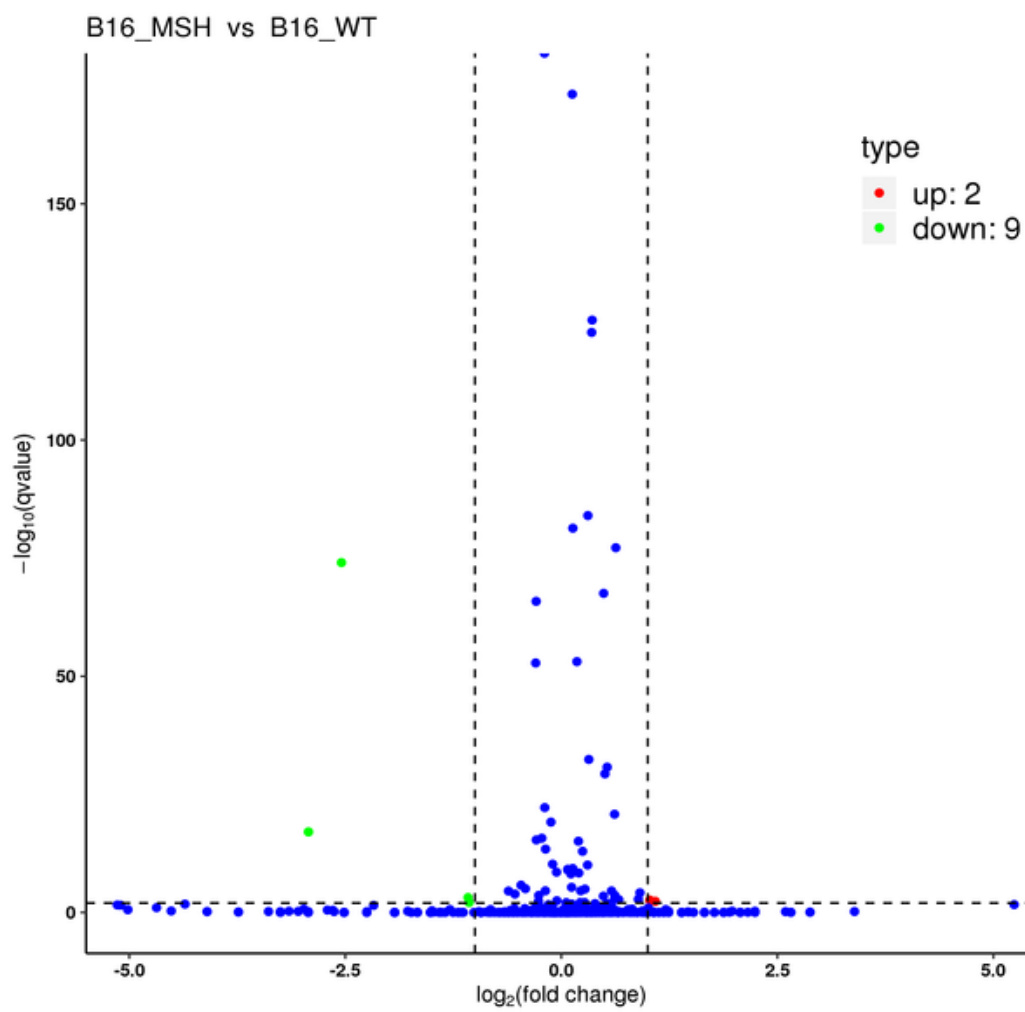
1. 3. 8. miR-122b-3p 結合領域の作製

ルシフェラーゼレポーターベクターを作製するため、*Tyr*-3'-UTR上に存在する miR-122b-3p との結合部位を含むようにプライマーを設計し、126塩基対の DNA 断片を作製した (Table 1-7, Fig. 1-7)。その後、作製した DNA 断片に各種 PCR を行い、クローニングを行った。クローニングができているか確認するため、2% アガロースゲル電気泳動に供した。その結果、120塩基対付近にバンドが確認できた (Fig.1-17 (A))。次に、結合部位を pmirGLOベクターにライゲーションし、*E. coli* DH5 α を用いて、形質転換を行った。miR-122b-3p-*Tyr*-WT または、miR-122b-3p-*Tyr*-MUT を組み込んだベクターが導入されているか確認するため、ベクターを組み込んだ *E. coli* DH5 α から DNA を抽出し、Table 1-11 に従って酵素処理を行い、2% アガロースゲル電気泳動に供した (Fig.1-17 (B))。

1. 3. 9. レポーターアッセイによる miR-122b-3p の標的遺伝子の同定

Tyr が miR-122b-3p の標的遺伝子であること同定するために、*Tyr*-3'-UTR の結合部位を含む領域および結合部位の 5塩基対を点変異処理した結合領域を組み込んだセンサーベクターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイをそれぞれ行った。その結果、miR-122b-3p-*Tyr*-WTベクター+miR-NCを導入した細胞と比較して、miR-122b-3p-*Tyr*-WTベクター+miR-122b-3pを導入した細胞では発光値が0.54倍に低下した。一方、miR-122b-3p-*Tyr*-MUTベクター+miR-122b-3pを導入した細胞は、miR-122b-3p-*Tyr*-WTベクター+miR-122b-3pを導入した細胞と比較して発光値が1.73倍上昇した。また、miR-122b-3p-*Tyr*-WTベクター+miR-122b-3p inhibitorを導入した細胞では、miR-122b-3p-*Tyr*-WTベクター+miR-NC導入細胞と比較した場合の発光値は0.99倍になり、miR-122b-3p-*Tyr*-MUTベクター+miR-122b-3p inhibitorを導入した細胞では、miR-122b-3p-*Tyr*-MUTベクター+miR-NC導入細胞と比較した場合の発光値は1.21倍になった。これらの結果から、miR-122b-3pが*Tyr*-3'-UTRに存在する結合領域に結合し、*Tyr*のタンパク質の発現を制御することが確認でき、*in silico*解析にて推測された*Tyr*が、miR-122b-3pの標的遺伝子として同定することができた (Fig.1-18)。

(A) Volcano plot



次ページへ続く

(B) Cluster analysis

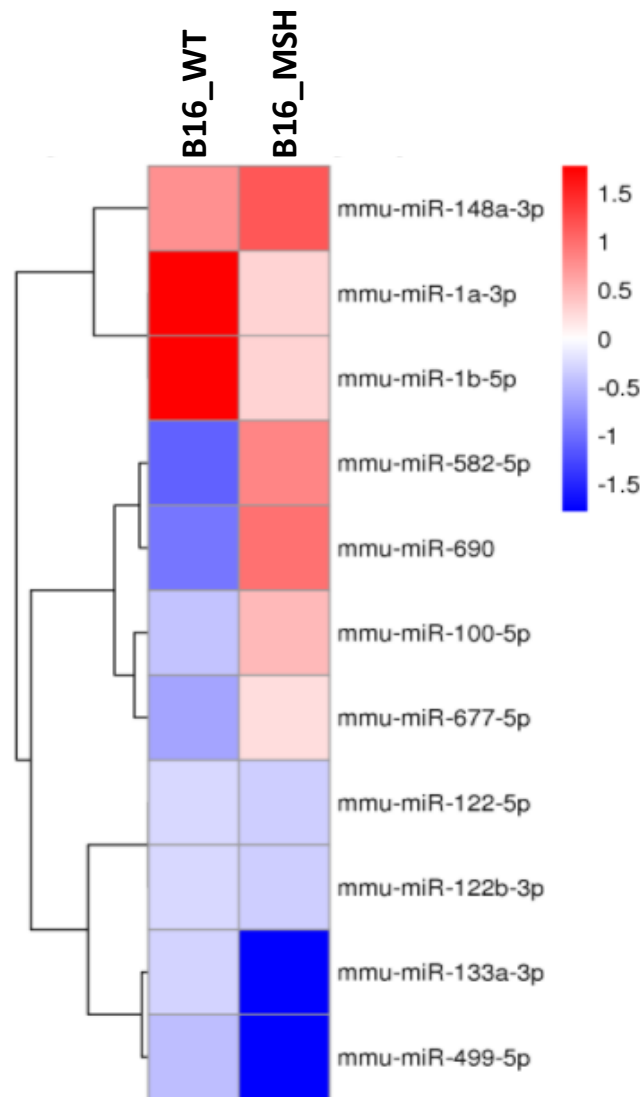


Figure 1-8. Altered expression of miRNAs in α -MSH-stimulated B16-F10 cells. (A) Volcano plot of miRNAs altered in the process of melanin biosynthesis. The x-axis shows the fold change in miRNA expression between different samples, and the y-axis shows the statistical significance of the differences. Statistically significant differences are represented by red dots ($\log_2(\text{Fold Change}) > 1$ and $\log_{10}(\text{qvalue}) > 0$) and green dots ($\log_2(\text{Fold Change}) > -1$ and $\log_{10}(\text{qvalue}) > 0$). (B) The overall TPM cluster analysis result is clustered by $\log_{10}(\text{TPM}+1)$ value, red represents miRNAs with high expression level, blue represents miRNAs with low expression level. The color from red to blue represents the $\log_{10}(\text{TPM}+1)$ value from large to small.

Table 1-12. Differentially expressed levels altered-miRNAs by next generation sequencing analyze in α -MSH-stimulated B16-F10 cell

sRNA	MSH (-)	MSH (+)	log2 (Fold change)	p. value
up				
miR-690	3.07×10	7.54×10	1.03	2.42×10^{-3}
miR-582-5p	2.93×10	6.24×10	1.09	4.42×10^{-3}
down				
miR-1a-3p	2.60×10^3	3.26×10	-6.31	0.00
miR-1b-5p	2.59×10^3	3.26×10	-6.31	0.00
miR-148a-3p	5.41×10^2	9.27×10	-2.54	1.33×10^{-76}
miR-133a-3p	1.02×10^2	1.67	-5.94	8.49×10^{-26}
miR-499-5p	7.96×10	1.67	-5.57	2.29×10^{-20}
miR-122-5p	1.09×10^2	1.43×10	-2.93	3.28×10^{-19}
miR-122b-3p	1.09×10^2	1.43×10	-2.93	3.28×10^{-19}
miR-100-5p	8.76×10	4.15×10	-1.08	5.47×10^{-5}
miR-677-5p	6.26×10	2.89×10	-1.07	7.32×10^{-4}

miR-1a-3p vs *Trp1*

```
                2826                                2848
    Trp1-3'-UTR:5' . . . UCUGUGUGUUC CUUU ACAUUCCU . . .
mmu-miR-1a-3p:3'      UAUGUAUGAAGAAA UGUAAGGU
```

miR-1a-3p vs *Dct*

```
                2114                                2136
    Dct-3'-UTR:5' . . . GACUUCACGAGGCUG ACAUUCCA . . .
mmu-miR-1a-3p:3'      UAUGUAUGAAGAAA UGUAAGGU
```

miR-1b-5p vs *Tyr*

```
                243                                265
    Tyr-3'-UTR:5' . . . CUCUAGCGGUUCAAG GUAUGUAU . . .
mmu-miR-1b-5p:3'      ACCUUACAUUUCUU CAUACAU
```

```
                1382                                1404
    Tyr-3'-UTR:5' . . . AAACCCUAUUAAAUU GUAUGUAU . . .
mmu-miR-1b-5p:3'      ACCUUACAUUUCUU CAUACAU
```

miR-122b-3p vs *Tyr*

```
                1654                                1677
    Tyr-3'-UTR: 5' . . . ACUCGACCUAUUUGU UGGUGUUU . . .
mmu-miR-122-3p: 3'    CACCUCACACUGUU ACCACAAA
```

miR-133a-3p vs *Trp1*

```
                2304                                2326
    Trp1-3'-UTR:5' . . . AC AAAAUGAAGGAGA GGACCA . . .
mmu-miR-133a-3p:3'  GUCGACCAACUUC C --- CUGGU
```

次ページへ続く

miR-499-5p vs *Mitf*



miR-499a-5p vs *Tyr*

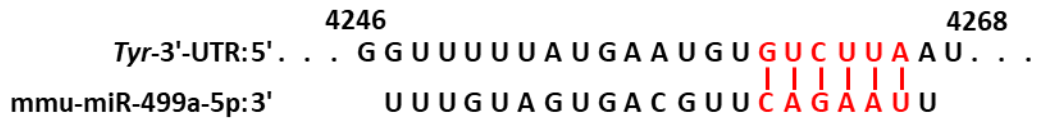


Figure 1-9. Schematic diagram of putative miRNAs binding sites within the melanin synthesis-related genes 3'-UTR are shown in mouse melanoma cell. The red-colored areas indicated a seed sequence position of miR-1a-3p, miR-1b-5p, miR-122b-3p, miR-133a-3p, and miR-499-5p to the *Mitf*-3'-UTR, *Tyr*-3'-UTR, *Trp1*-3'-UTR, and *Dct*-3'-UTR. Binding site positions are numbered relative to the first nucleotide in mRNAs sequence.

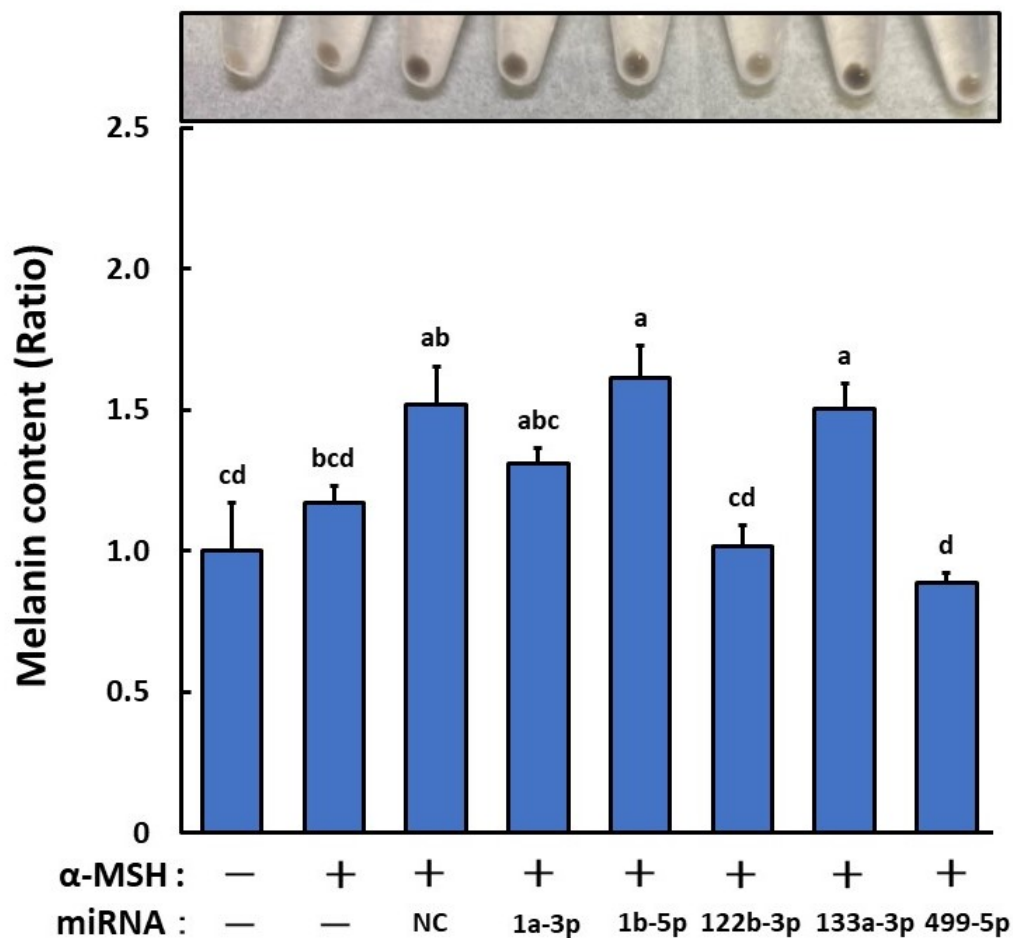


Figure 1-10. Effects of melanogenesis-related miRNAs in α -MSH-stimulated B16-4A5 cells. Colorimetric measurement of the melanin content of B16-4A5 cells (panel) and images of one representative assay (upper panel). Precursor miRNAs were used at a concentration of 40 nM. Cells were treated with α -MSH (1 μ M) for 72h. Relative ratios are shown with the value cells without α -MSH treatment as 1. Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's new multiple range test (n=3, $p < 0.05$).

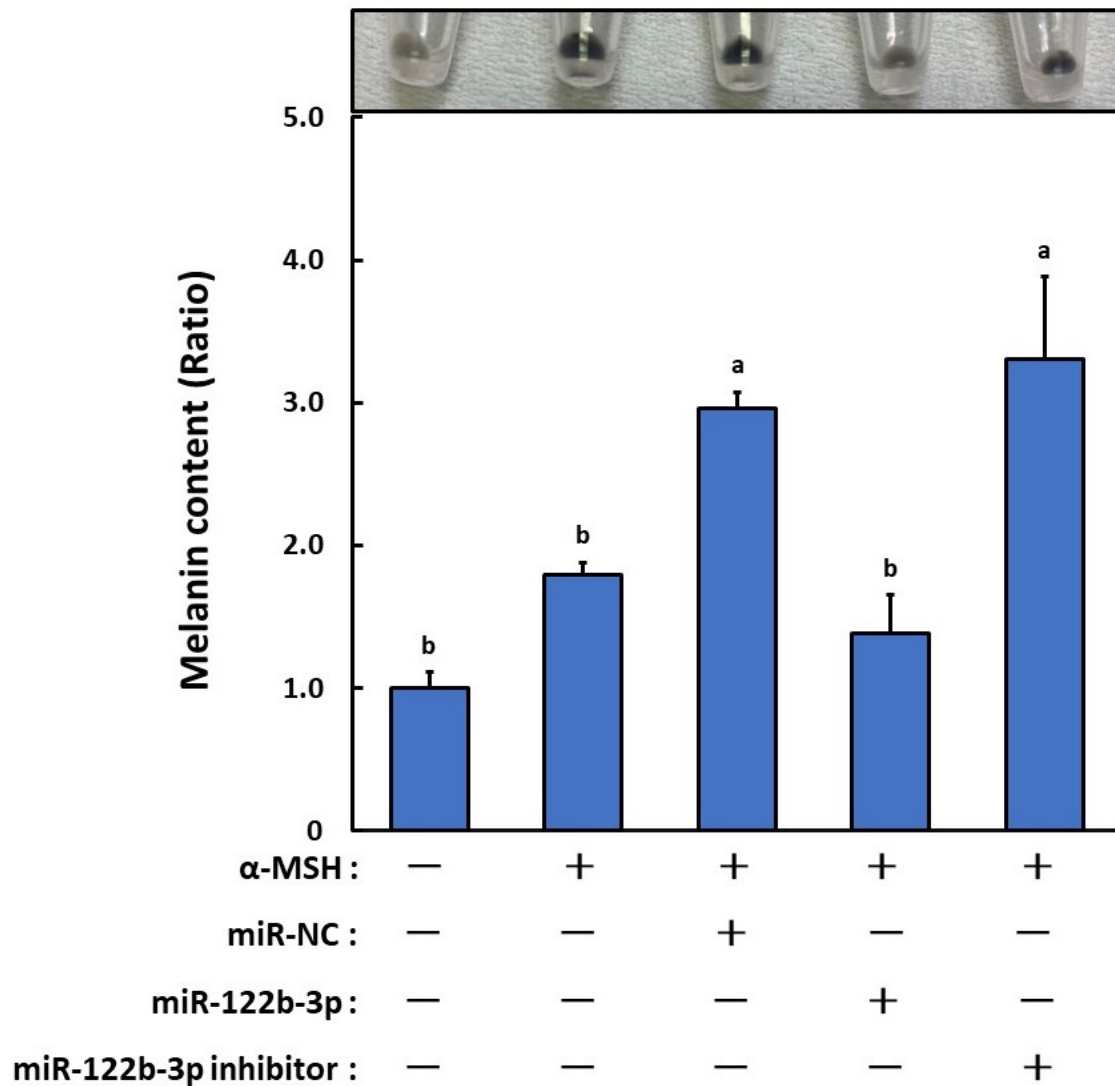


Figure 1-11. Effects of miR-122b-3p and miR-122b-3p inhibitor in α -MSH-stimulated B16-4A5 cells. Colorimetric measurement of the melanin content of B16-4A5 cells (panel) and images of one representative assay (upper panel). Precursor miRNAs were used at a concentration of 20 nM. Cells were treated with α -MSH (1 μ M) for 72h. Relative ratios are shown with the value cells without α -MSH treatment as 1. Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's new multiple range test ($n=6$, $p < 0.05$).

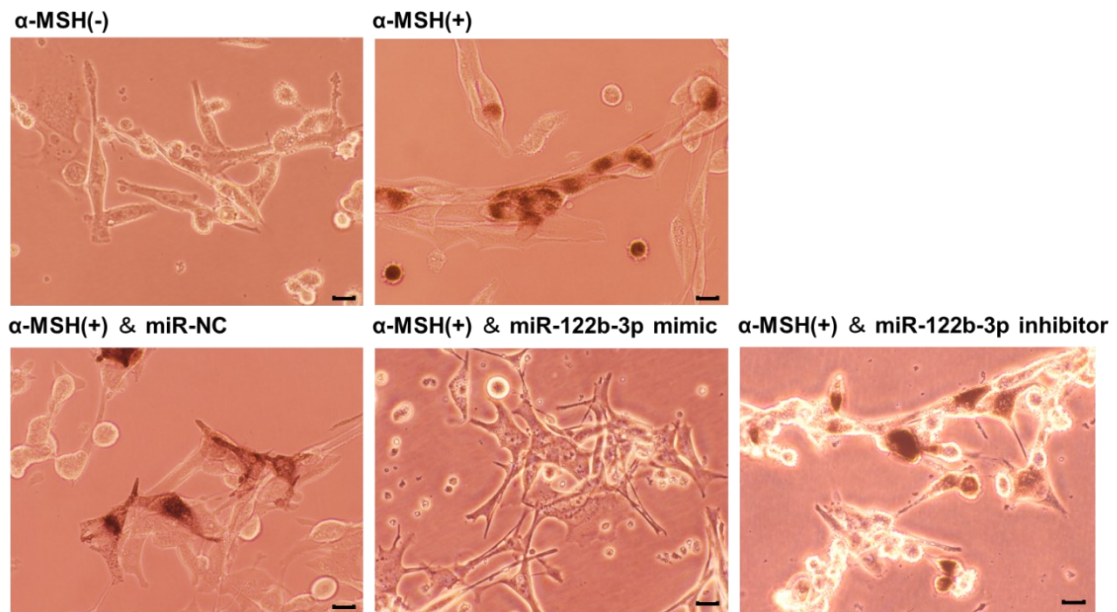


Figure1-12. Microscopic observation of α -MSH-stimulated B16-4A5 cells after treatment with or without miR-122b-3p and miR-122b-3p inhibitor. Cells transfected with each precursor miRNA at a concentration of 20 nM were stimulated with α -MSH (1 μ M) for 48h. Scale bar: 20 μ m.

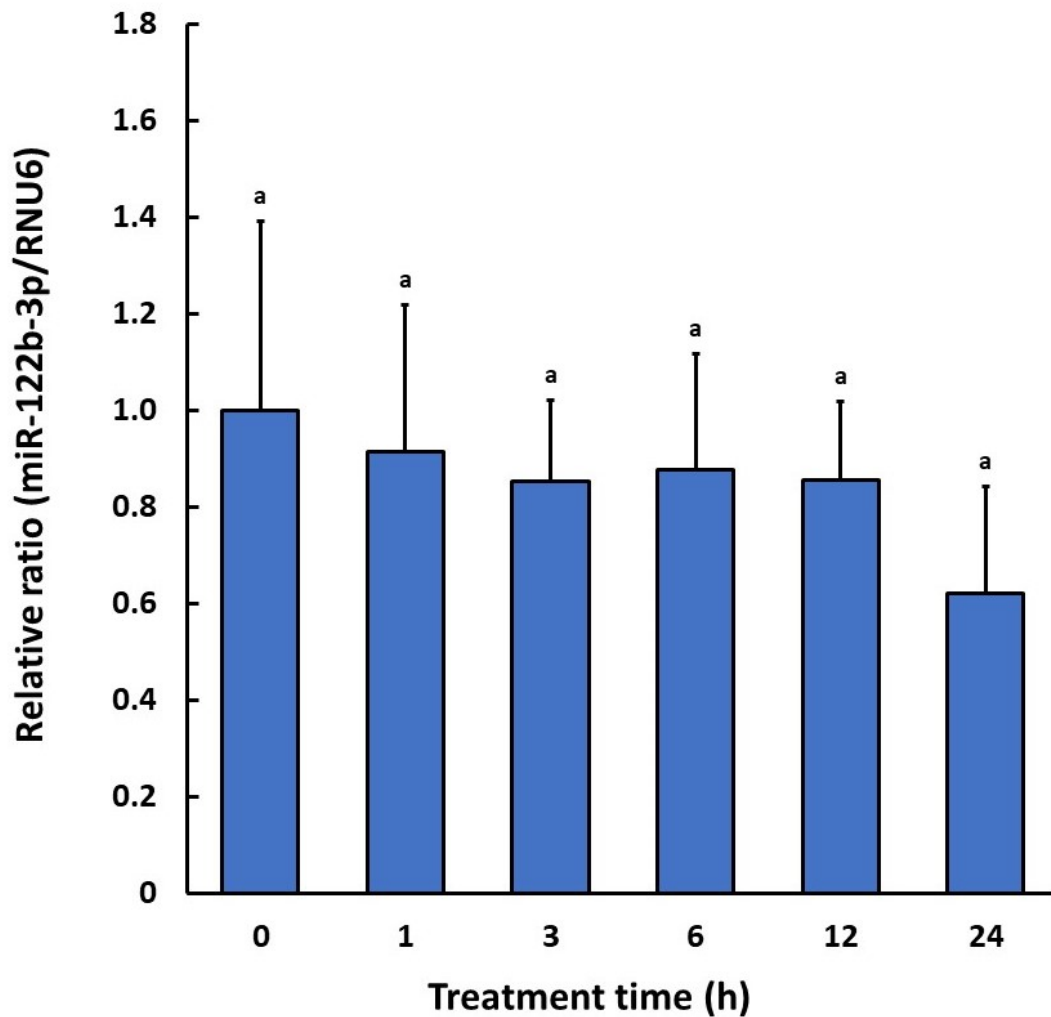


Figure 1-13. Down regulation of miR-122b-3p in α -MSH-stimulated B16-4A5 cells. Cells were treated with α -MSH (1 μ M) for 0, 1, 3, 6, 12, 24h, then total RNA was extracted by TRIzol with DNase I treatment. Expression level of miR-122b-3p in α -MSH-stimulated cells were examined by the TaqMan[®] miRNA assay using the real-time PCR. Relative ratios are shown with the value cells 0h after α -MSH treatment as 1. Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's new multiple range test (n=6, $p < 0.05$).

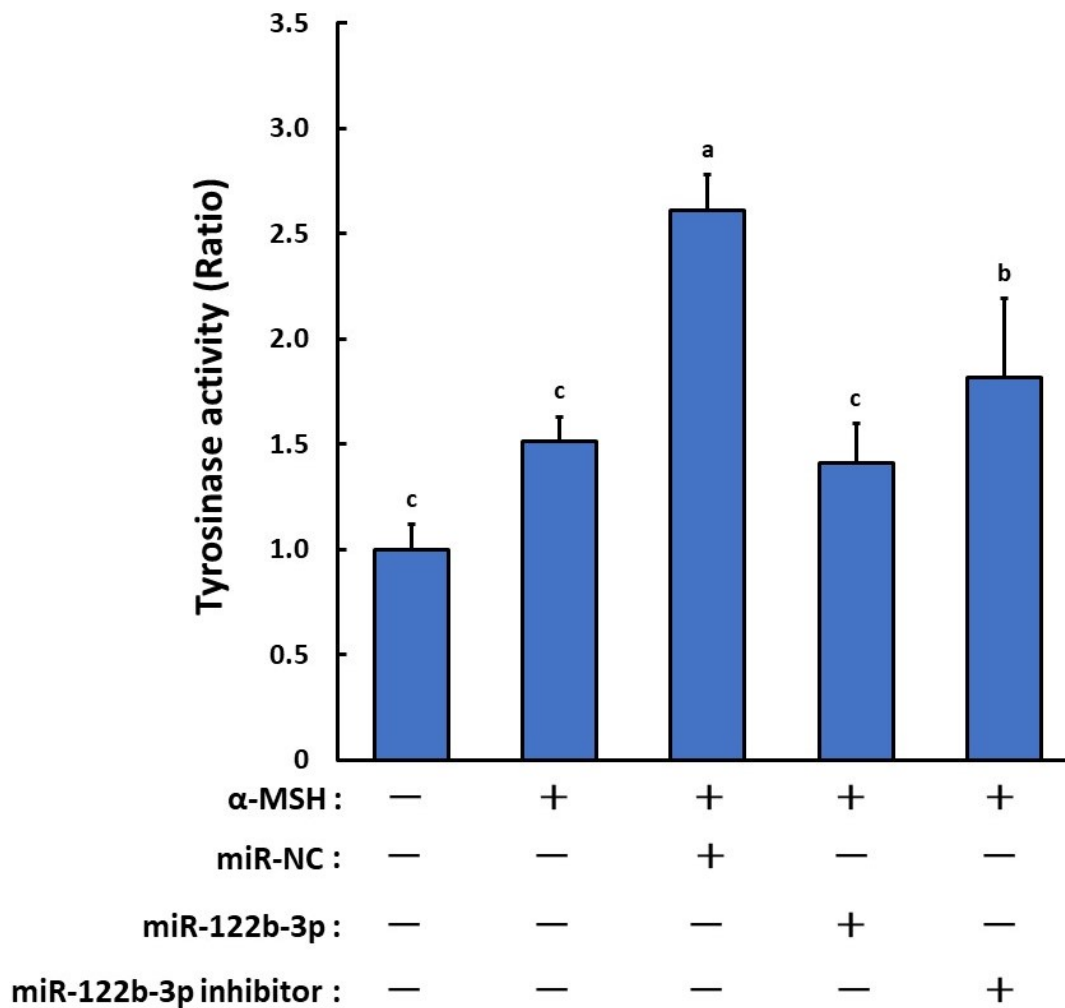


Figure 1-14. Effect of miR-122b-3p and miR-122b-3p inhibitor on tyrosinase activity in α -MSH-stimulated B16-4A5 cells. Each precursor miRNA was used at a concentration of 20 nM. Cells were treated with α -MSH (1 μ M) for 48h. Relative ratios are shown with the value cells without α -MSH treatment as 1. Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's new multiple range test (n=6, p < 0.05).

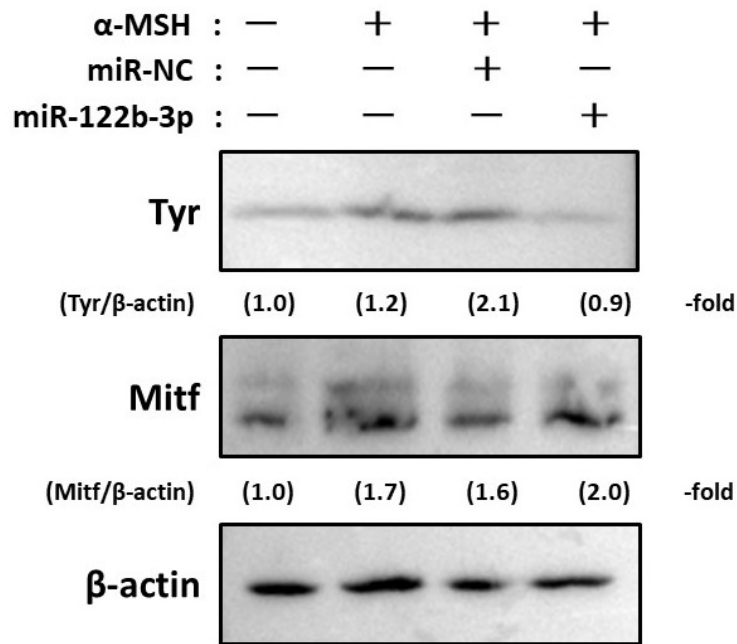
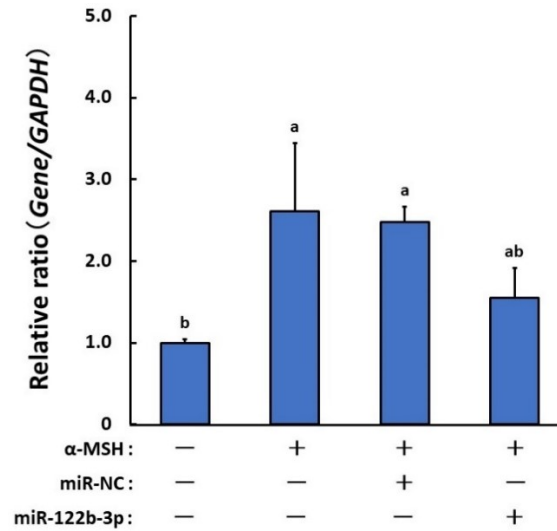


Fig 1-15. Effect of miR-122b-3p on tyrosinase and mitf protein expression in α -MSH-stimulated B16-4A5 cells. Western blotting performed with 50 μ g of protein per lane. β -actin was used as an internal control. Each precursor miRNA was treated at a concentration of 40 nM. Cells were treated with α -MSH (1 μ M) for 48h. Relative ratios are shown with the value cells without α -MSH treatment as 1. Protein expression levels of Tyr and Mitf were quantified by β -actin. Values in brackets means the relative density of image.

(A) *Tyr* mRNA



(B) *Mitf* mRNA

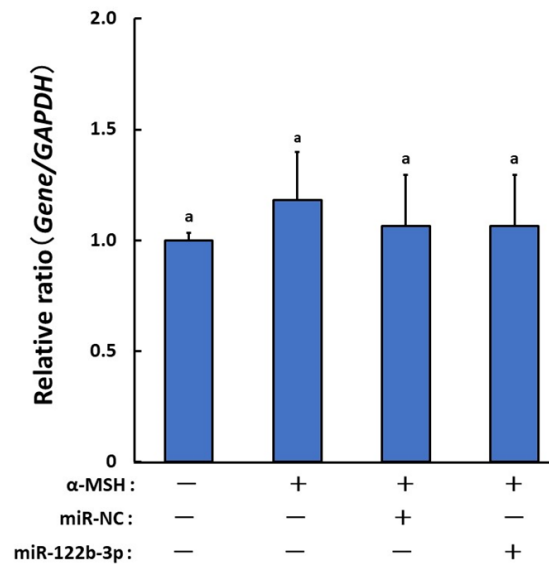
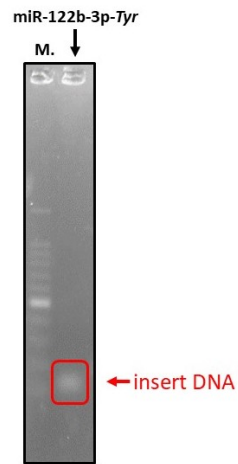


Figure 1-16. Effect of miR-122b-3p on *Tyr* and *Mitf* expression in α -MSH-stimulated B16-4A5 cells. Cells were treated with α -MSH (1 μ M) for 24h, then total RNA was extracted by TRIzol with DNase I treatment. Each precursor miRNA was used at a concentration of 40 nM. Cells were treated with α -MSH (1 μ M) for 24h. Relative ratios are shown with the value cells without α -MSH treatment as 1. Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's new multiple range test ($n=6$, $p < 0.05$).

(A)



(B)

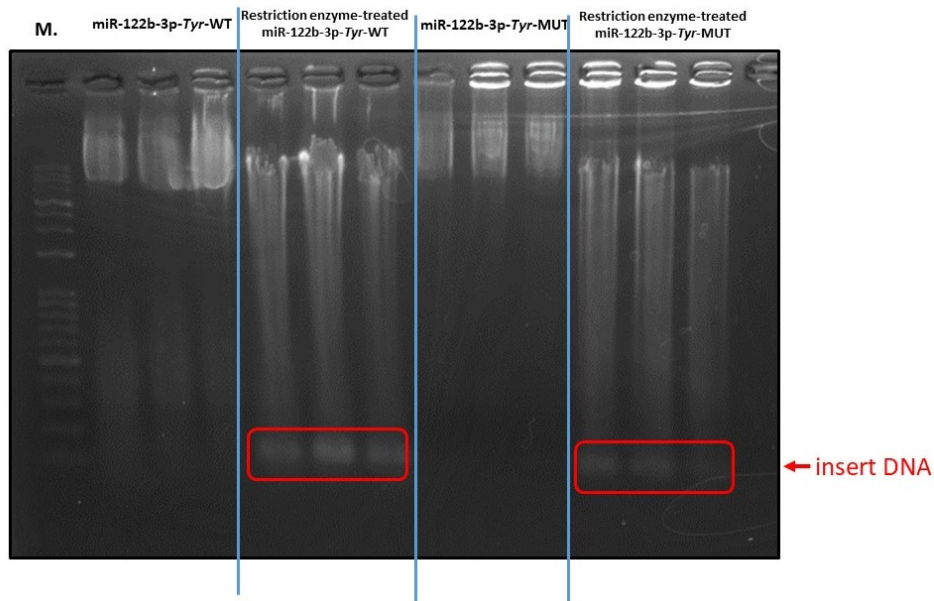


Figure 1-17. Cloning *Tyr*-3'-UTR binding region with miR-122b-3p. (A) From left to right: the marker, 126 base pairs DNA fragments containing the binding site (miR-122b-3p-Tyr). (B) From left to right: the marker, region containing the binding site between miR-122b-3p and the *Tyr*-3'-UTR (line 3), restriction enzyme-treated binding site (line 3), mutated region of 5 base pairs at the binding site between miR-122b-3p and the *Tyr*-3'-UTR (line 3), and the restriction enzyme-treated containing the binding site (line 3), region with a 5 base pair mutation in the binding site between miR-122b-3p and *Tyr*-3'-UTR (line 3), and region with a 5 base pair mutation in the restriction enzyme-treated binding site (line 3).

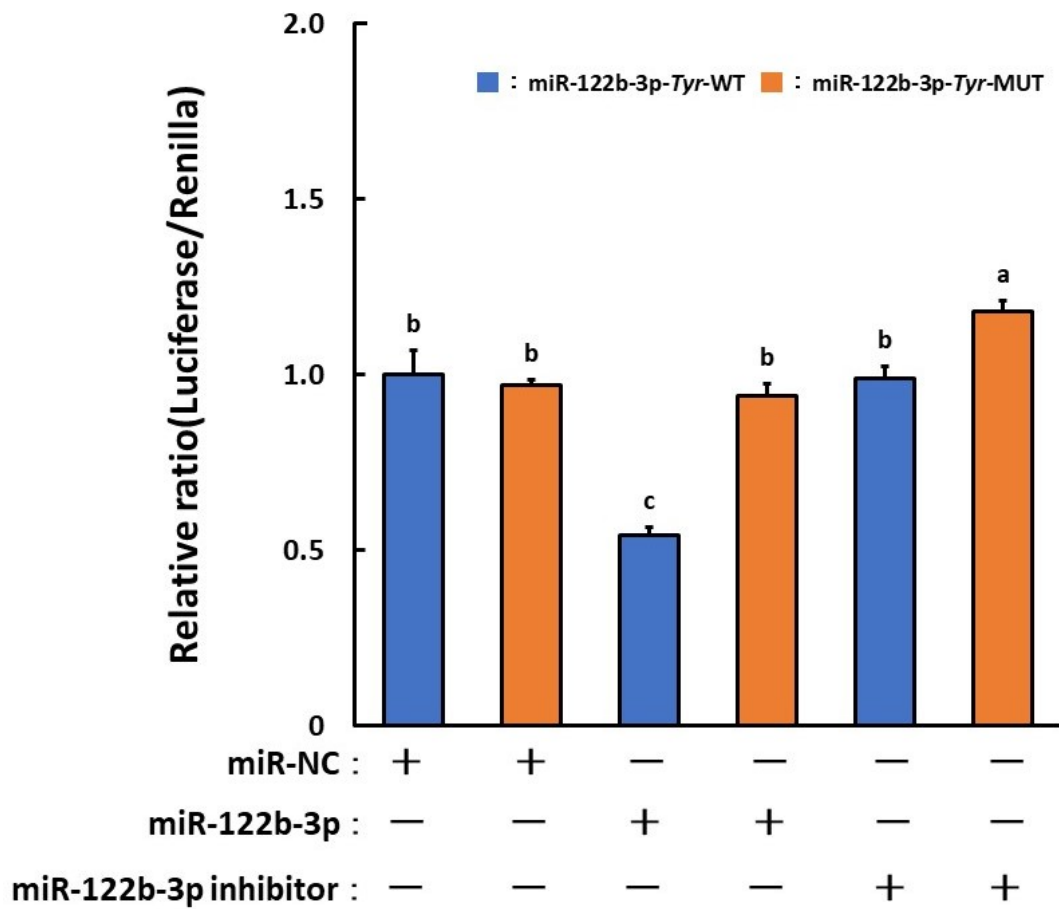


Figure 1-18. Identification of miR-122b-3p target gene *Tyr* by the luciferase reporter assay. Each precursor miRNA was used at a concentration of 40 nM. Relative ratios are shown with the value cells with miR-NC + pmirGLO-miR-122b-3p-*Tyr*-WT as 1. Blue bars indicate pmirGLO-miR-122b-3p-*Tyr*-WT and orange bars indicate pmirGLO-miR-122b-3p-*Tyr*-MUT. ■ : miR-122b-3p-*Tyr*-WT, ■ : miR-122b-3p-*Tyr*-MUT. Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's new multiple range test ($n=3$, $p < 0.05$).

1. 4. 考 察

miRNA は細胞内のみならず血清や血漿, 唾液, 尿および母乳内にも検出され, 無細胞状態でも安定して体内を循環しており³⁸⁾, ヒトや他の哺乳類の遺伝子の約 60%を標的にしていると推測されている³⁹⁾。miRNA は皮膚疾患にも関与することが報告されており, 紫外線照射により miR-214 は発現が増加し, 皮膚の細胞老化を誘導することが報告されている⁴⁰⁾。したがって, メラニン生成を誘導する外的刺激により, 発現が変動する miRNA を同定できれば, この miRNA を活用したシミやそばかすを防ぐ美白剤開発のための核酸医薬だけでなく, 新しいスクリーニング法の構築ができる。そこで, α -MSH 刺激を与えたことにより誘導されるメラニン生合成過程に関与する遺伝子を標的とする miRNA を次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果, α -MSH 刺激を与えた細胞と未刺激の細胞間で, 発現量が顕著に増加した 2 つの miRNA と, 顕著に減少した 9 つの miRNA ($\log \text{ratio} > 2$ または < -2) を同定した (Fig. 1-8, Table 1-12)。これら発現量が変動した miRNAs のうち, 特に発現が顕著に減少した 5 つの miRNA (miR-1a-3p, miR-1b-5p, miR-122b-3p, miR-133a-3p および miR-499-5p) の, スクリーニングマーカーとしての可能性について検証を行った。まず初めに, 各 miRNA の標的遺伝子の探索のために *in silico* 解析を行ったところ, 各 miRNAs は, メラニン合成に関わる酵素群の発現を制御する転写因子である *Mitf* やメラニン合成酵素群である *Tyr*, *Trp1*, *Dct* をそれぞれ標的遺伝子とすることが判明した (Fig. 1-9)。次に, これら miRNA のメラニン生合成への機能確認をするため, これら miRNAs の前駆体である precursor miRNA を人工的に模倣した mimic miRNA をそれぞれマウスメラノーマ細胞に導入することで, メラニン生合成の抑制を導くか検証した。細胞に 5 つの miRNA (miR-1a-3p, miR-1b-5p, miR-122b-3p, miR-133a-3p および miR-499-5p) を導入し, α -MSH 刺激後の細胞内のメラニン生成量を測定したところ, miR-122b-3p および miR-499-5p 導入細胞で, miR-NC 導入細胞と比較して, 有意にメラニン量が減少した (Fig. 1-10)。今回の研究では, メラニンの生合成過程において, 律速酵素として働く *Tyr* を標的遺伝子とすると予測された miR-122b-3p の作用機序の解明に取り組んだ。miR-122b-3p の導入細胞で, メラニン生合成を抑制することを確認したことから, miR-122b-3p の機能を阻害する miR-122b-3p inhibitor を細胞に導入し, α -MSH 刺激後の細胞内のメラニン生成量の低下が回復するのかを次に検証した。miR-122b-3p inhibitor 導入細胞では, メラニン生成量が miR-122b-3p 導入細胞と比較して増加し, miR-122b-3p によってメラニン生合成が調節されていることが示唆された (Fig. 1-11)。この結果は, *Mitf* を標的遺伝子としてメラニン生成を抑制することが知られている miR-218 の Ant-miR-218 がメラニン形成を促進させた報告と一致した⁴¹⁾。

また, miR-122b-3p が標的遺伝子とするチロシナーゼはチロシンからメラニンを生合成する際に働く律速酵素であり⁴²⁾, メラノサイト内で合成され, その活

性を上方制御する物質は白斑といった低色素性疾患の治療に有効であると考えられている⁴³⁾。B16-4A5 細胞における miR-122b-3p を導入した α -MSH 刺激後のチロシナーゼの酵素活性は、miR-NC 導入細胞と比較し、有意に低下した (Fig. 1-14)。miRNA の機能は、標的遺伝子の mRNA からのタンパク質合成 (翻訳) を抑制する²²⁾。in silico 解析で予測されたように、miR-122b-3p が *Tyr* を標的遺伝子とするならば、miR-122b-3p 導入細胞では *Tyr* のタンパク質発現が抑制されることから、ウエスタンブロット法により解析した。その結果、miR-122b-3p 導入細胞では miR-NC 導入細胞と比較して、*Tyr* のタンパク質発現の低下を確認した (Fig. 1-15)。mRNA の発現量についても、定量的リアルタイム PCR 法の結果から、miR-122b-3p 導入細胞では *Tyr* の mRNA の発現量が低下した (Fig. 1-16)。miRNA によるタンパク質発現阻害機構として、タンパク質の翻訳阻害の他に、標的 mRNA の分解を促進することが知られている⁴⁴⁾。miRNA により、タンパク質の翻訳阻害を受けるか、標的 mRNA が分解されるかは mRNA 上の miRNA 応答要素と miRNA 鎖上シード配列との相補性に大きく依存し⁴⁴⁾、十分な相補性が mRNA 分解をもたらし、相補性が低いと翻訳阻害につながると考えられている^{45,46)}。本研究の結果より、*Tyr* の mRNA 量が低下したことは、miR-122b-3p のシード配列と、*Tyr* mRNA の 3'-UTR との結合部位の相補性が高いことが示唆された。また、*Tyr* のタンパク質および mRNA の発現が減少したのは、 α -MSH 誘導メラニン合成経路における *Tyr* の上流因子であり、メラニン生合成酵素群の発現を調節する転写因子である *Mitf*^{47, 48)} の発現抑制によるものではないか検証した。しかし、*Mitf* のタンパク質および mRNA 発現は miR-122b-3p 導入細胞では、miR-NC 導入細胞と比較し大きく変化しなかった。以上の結果から、miR-122b-3p は *Tyr* を直接的な標的遺伝子とし、*Tyr* mRNA の分解を促進することで、タンパク質発現が低下すると考えられ、miR-122b-3p 導入細胞でチロシナーゼの酵素活性も低かったことを説明付けることができた。

最終的に miR-122b-3p の標的遺伝子が *Tyr* であることを同定するため、*Tyr* mRNA の 3'-UTR 上に存在すると予測された結合領域と miR-122b-3p の結合をルシフェラーゼレポーターアッセイにて検証した。miR-122b-3p+miR-122b-3p-*Tyr*-WT ベクターを導入した細胞での発光値は、miR-NC+miR-122b-3p-*Tyr*-WT ベクターを導入した細胞のルシフェラーゼ発光値と比較して、大きく低下した (Fig. 1-18)。また、miR-122b-3p+miR-122b-3p-*Tyr*-MUT ベクターを導入した細胞での発光値は miR-NC+miR-122b-3p-*Tyr*-WT ベクターを導入した細胞のルシフェラーゼ発光値と比較して、変化はなかった。これらの結果は、miR-122b-3p が *Tyr* mRNA の 3'-UTR 上の結合領域と結合し、*Tyr* タンパク質の発現が抑制されたためであり、miR-122b-3p が *Tyr* を標的遺伝子とすることを支持する結果であった。

これら本章における結果から、miR-122b-3p は *Tyr* を直接標的遺伝子とすることでマウスメラノーマ細胞におけるメラニン生合成を抑制することが確認できた。現在、Fig. 1-10 で miR-122b-3p 導入細胞と同様に、miR-NC 導入細胞と比較

してメラニン生成量を減少させた **miR-499-5p** が、メラニン生合成を抑制する作用機序について検証を行っている。

第2章 miRNAの美白素材のスクリーニングマーカー適性について検証

2. 1. 緒 論

第1章では、miR-122b-3pがメラニン生合成の律速酵素であるチロシナーゼのmRNAを標的とすることで、 α -MSH誘導のメラニン生合成を下方制御することを明らかにした。

このように α -MSHにより刺激したB16メラノーマ細胞において、発現が変動するmiRNAの変動パターンを活用して、美白効果をもつ成分をスクリーニングすることができるのか、既にメラニン生成を下方制御すると報告されているmiR-148a-3pを用いて検証した²⁹⁻³¹⁾。

2. 2. 実験材料および実験方法

2. 2. 1. 細胞培養

マウスメラノーマ B16-F10 細胞は 1. 2. 1. 項に準じ、培養を行った。

2. 2. 2. 細胞内メラニン量の定量

12 ウェルマルチプレートに、B16-F10 細胞を 5.0×10^4 cells/mL となるように播種し、37°C、95%空気-5 %CO₂ 環境に設定した CO₂ インキュベーター内で 24 時間、接着させた。接着確認後、植物または海藻エキスを 50 μ g/mL となるように添加した。添加から 2 時間後、 α -MSH を終濃度 1 μ M となるように加え、24 時間処理した。細胞内メラニン量および、タンパク質量は 1. 2. 4. 項に準じて定量した。

2. 2. 3. 細胞内 miRNA の定量

2. 2. 3. 1. 全 RNA 抽出

植物および、海藻エキスのうち、メラニン生成抑制効果を示した上位 14 種類のエキスを 50 μ g/mL になるように添加し、 α -MSH を終濃度 1 μ M となるように加え、24 時間処理後、1. 2. 2. 1. 項に準じて全 RNA を抽出した。

2. 2. 3. 2. miR-148a-3p の定量

2. 2. 3. 1. 項の手順に準じて抽出した全 RNA を 25.0 ng/ μ L に調製し、逆転写反応のテンプレートとした。逆転写反応およびリアルタイム PCR は、TaqMan[®] MicroRNA Assays mmu-miR-148a-3p を用いて 1. 2. 5. 項に準じて行った。

2. 2. 4. 統計処理

測定値は、平均±標準誤差で示した。多群間の処理はDuncan法 ($p < 0.05$) により、それぞれ有意差の検定を行った。

2. 3. 結 果

2. 3. 1. 植物・海藻由来のエキスのメラニン生成抑制効果

119 種類の植物や海藻由来のエキスを用いてメラニン生成抑制効果を示すエキスを探索した。 α -MSH 刺激、72 時間後のメラニン生成量を測定し、陽性コントロールである α -MSH 処理におけるメラニン生成量と比較してメラニン生成抑制率を算出した (Table 2-1)。測定の結果、30%以上のメラニン生成抑制率を示した 14 種類のサンプルを Table 2-2 に示した。

2. 3. 2. メラニン生成抑制効果を示す植物エキス処理した際の色素細胞における miR-148a-3p の発現変動

miR-148a-3p は *Mitf* を標的遺伝子とし、メラニン生合成量を抑制することが、複数の論文で報告されている²⁹⁻³¹⁾。さらに、第 1 章で行った Small RNA シーケンス解析にて、我々も B16-F10 細胞での miR-148a-3p の発現が α -MSH 刺激前と比較して α -MSH 刺激後に大きく減少することを確認している。そこで、 α -MSH 刺激によるメラニン生合成時に発現量が大きく減少する miR-148a-3p は、メラニン生合成が天然植物エキスにより阻害されると、miR-148a-3p の発現量の減少が緩和されると作業仮説を立て、B16-F10 細胞に、2. 3. 1. 項でメラニン生成抑制率を高く示した 14 種類の植物エキスサンプルを添加し、 α -MSH 刺激した際の 24 時間後の miR-148a-3p の発現量の変動を測定した。B16-F10 細胞における α -MSH 刺激後の miR-148a-3p の発現量を 1 とした場合、「メラニン生成抑制効果があるエキスでは miR-148a-3p の発現量は 1 以上 (= α -MSH 刺激のみの場合の miR-148a-3p の発現量)」である。解析の結果、選抜した 14 種類のうち、No.1 カワラヨモギ、No.8 ローマカミツレを除く 12 種類のエキス処理では miR-148a-3p の発現量が 1 を上回ったことが確認された (Fig. 2-1)。これらの結果より、メラニン生成抑制効果が高いエキスでは、miR-148-3p 発現量が α -MSH 刺激時の miR-148-3p 発現量と比較して増加する傾向があることが示され (Fig. 2-2)、miR-148a-3p が美白素材のスクリーニングマーカーとしての機能を発揮する適性があることが分かった。

Table 2-1. Effects of treatment with 119 different natural extracts on melanogenesis in α -MSH-stimulated B16-F10 cells.

Material	Derived raw material	Part	Melanogenesis (%)
海藻	スギノリ, ミツイシコンブ, ウスバアオノリ	全藻	49.9
海藻	トゲキリンサイ, ミツイシコンブ, ウスバアオノリ	全藻	82.4
ヒオウギ (ヤカン)	ヒオウギ	根茎	55.7
オクラ	オクラ	果実 (生)	58.9
牛乳	ウシ	乳	73.9
チャ (紅茶)	アッサムチャ	葉	75.8
チャ (緑茶)	チャノキ	葉	59.6
ヨモギ	ヨモギ	葉	85.0
クチナシ	クチナシ	果実	82.6
レンゲソウ	レンゲソウ	全草および種子	57.4
セイヨウシロヤナギ	セイヨウシロヤナギ	樹皮	97.9
トウヒ (ダイダイ)	<i>Citrus aurantium</i> Linne	成熟した果皮	94.4
ユキノシタ	ユキノシタ	全草	125.3
海藻	紅藻類 (スサビノリ <i>Porphyra yezoensis</i>)	全藻	68.5
海藻	褐藻類	全藻	79.1
コタラヒムブツ (サラシアレチクラタ)	<i>Salacia reticulata</i> (Celastraceae)	材	75.6
絹 (セリシン)	カイコ	繭	55.7
タイソウ	ナツメ	果実	94.0
アロエ (アロエベラ)	<i>Aloe barbadensis</i> Miller (<i>Aloe vera</i> Linne)	葉	58.8
ブドウ	<i>Vitis vinifera</i> Linne	果実より得られた果汁	
セイヨウナシ	セイヨウナシ <i>Pyrus communis</i> Linne	果実 (果汁)	
アボカド	アボカド	果実	87.0
アマチャ	アマチャ	葉および枝先	53.1
アマチャヅル	アマチャヅル	葉	52.9
エイジツ	ノイバラ	果実	57.5
カワラヨモギ (インテンコウ)	カワラヨモギ	頭花	46.4
サイシン	ウスバサイシン	根および根茎	52.4

次ページへ続く

Material	Derived raw material	Part	Melanogenesis (%)
スイカズラ (キンギンカ)	スイカズラ	花	87.6
スイカズラ	スイカズラ	葉	63.6
センキュウ	センキュウ	根茎	81.7
トウニン	モモ	種子	61.4
トルメンチラ	<i>Potentilla tormentilla</i> Schrk (Rosaceae)	根	78.5
ダイズ	ダイズ	種子	97.6
ホップ	ホップ	雌花穂	89.9
海藻	コトジツノマタ, ミツイシコンブ, ヒトエグサ	全藻	85.4
シコン, 加水分解 ダイズタンパク	ムラサキ, ダイズ	根, タンパク質	90.3
モモ	モモ	葉	91.7
アロエ	キダチアロエ	葉	173.5
ニンジン	オタネニンジン	根	82.6
キューカンバー	キュウリ	果実 (生)	82.0
アルテア	ビロウドアオイ	根	106.7
アルニカ	アルニカ	花	159.2
トウキンセンカ	トウキンセンカ	花	124.8
海藻	ヒバマタ科ヒバマタ属 (褐藻類)	茎	76.2
ボダイジュ	フユボダイジュ	花	114.1
ヘチマ	ヘチマ	地上部	111.4
レモン	レモン	果実	143.8
海藻	トゲキリンサイ, ヒヂリメン, ミツイシコンブ, ウスバアオノリ, ワカメ	全藻	105.3
アロエ	タピオカ (キャッサバ)	澱粉	86.0
オウバク	キハダ	周皮を除いた樹皮	96.5
サクラ	オオシマザクラその他サクラ 亜属	葉	64.4
アシタバ	アシタバ	葉および茎	50.9
イチヨウ	イチヨウ	葉	108.3
キイチゴ	キイチゴ	果実	103.2
グレープフルーツ	グレープフルーツ	果実 (生)	254.9
ゴボウ	ゴボウ	根	90.7
コンフリー	ヒレハリソウ	葉	107.1
ジオウ	アカヤジオウ	根	122.2
シャクヤク	シャクヤク	根	83.4

次ページへ続く

Material	Derived raw material	Part	Melanogenesis (%)
セイヨウサンザシ	セイヨウサンザシ	果実	91.1
トウキ	トウキ	根	79.2
ビワ	ビワ	葉	106.2
ペパーミント	セイヨウハッカ	葉	97.3
オウゴン	コガネバナ ブラッサボラ属植物とカトレヤ属植物の交配種 (<i>Brassocattleya</i> Marcella Koss)	周皮を除いた根	93.1
ラン	レリア属植物とカトレヤ属植物の交配種 (<i>Laelio cattleya</i> Drumbeat) デンドロビウム属植物の交配種 (<i>Dendrobium</i> HYBRID)	葉および茎	175.9
トマト	トマト	果実	120.4
エンメイソウ	ヒキオコシ	地上部	193.4
オウレン	<i>Coptis chinensis</i> Franchet	根茎	125.1
オトギリソウ	オトギリソウ	地上部	53.1
オドリコソウ	オドリコソウ	花, 葉および茎	180.5
オランダカラシ	オランダカラシ	葉茎	32.6
キウイ	キウイ	果実	230.9
クララ (クジン)	クララ	根	61.1
ブドウ	<i>Vitis vinifera</i> Linne	葉	163.8
ゲンチアナ	ゲンチアナ	根および根茎	56.5
コメ	イネ	種子	93.3
サボンソウ	サボンソウ	葉	126.4
サンザシ	サンザシ	果実	133.0
シソ (ソヨウ)	シソ	葉	124.9
シモツケソウ	セイヨウナツユキソウ	花序	158.3
セイヨウキズタ	セイヨウキズタ	葉および茎	157.6
セイヨウニワトコ	セイヨウニワトコ	花	159.2
セイヨウノコギリソウ	セイヨウノコギリソウ	全草	178.5
セージ	セージ	葉	132.4
ゼニアオイ	ウスベニアオイ	花	131.3
ソウハクヒ	マグワ	根皮	176.5
タイム	タチジャコウソウ	地上部	146.2
ドクダミ (ジュウヤク)	ドクダミ	開花期の地上部	94.4
ハマメリス (アメリカマンサク)	ハマメリス	葉	109.0

次ページへ続く

Material	Derived raw material	Part	Melanogenesis (%)
ブクリョウ	マツホド	外層をほとんど除いた菌核	99.5
ベニバナ (コウカ)	ベニバナ	花	86.7
ポタンピ	ポタン	根皮	96.8
マツ	セイヨウアカマツ	球果	86.3
マロニエ	セイヨウトチノキ	種子	77.4
メリッサ (レモンバーム)	コウスイハッカ	葉	75.4
ヤグルマギク	ヤグルマギク	頭花	101.7
ユーカリ	ユーカリ	葉	99.2
ラベンダー	ラベンダー	花	76.7
リンゴ	リンゴ	果実 (生)	126.1
ルイボス	アスパラサスリネアリス	全草	87.0
ローマカミツレ	ローマカミツレ	頭花	55.9
ワイルドタイム	<i>Thymus serpyllum</i> Linne (<i>Labiatae</i>)	地上部	75.1
ヨクイニン	ハトムギ	種皮を除いた種子	63.9
カッコン	クズ	周皮を除いた根	69.7
カミツレ	カミツレ	花	72.3
ユズ	ユズ	果実	192.4
ダイズ (納豆)	ダイズ	種子	115.8
発酵乳	ウシ	乳	
クチナシ (サンシシ)	クチナシ	果実	101.3
発酵乳	ウシ	乳	
アイ	アイ	葉および茎	292.8
ノバラ (ローズヒップ)	<i>Rosa canina</i> Linne (<i>Rosaceae</i>)	果実	78.3
コーヒー	コーヒーノキ	種子	94.0
ウコン	ウコン	根茎	197.7
クレマチス	<i>Clematis vitalba</i> Linne (<i>Ranunculaceae</i>)	葉	101.6
レモングラス	レモングラス	葉および茎	113.9
ローズマリー	マンネンロウ	葉	172.4
ローヤルゼリー	ヨーロッパミツバチ	ミツバチの分泌物	116.5

Table 2-2. Extracts that significantly repressed the melanogenic effects of α -MSH stimulation.

No.	Name	Repression of melanogenesis (%)
1	カワラヨモギ	53.6
2	アシタバ	49.1
3	サイシン	47.6
4	アマチャヅル	47.1
5	アマチャ	46.9
6	オトギリソウ	46.9
7	ヒオウギ	45.3
8	ローマカミツレ	44.1
9	ゲンチアナ	43.5
10	レンゲソウ	42.6
11	エイジツ	42.5
12	クララ	39.9
13	サクラエキス	35.9
14	ローマカミツレ	30.3

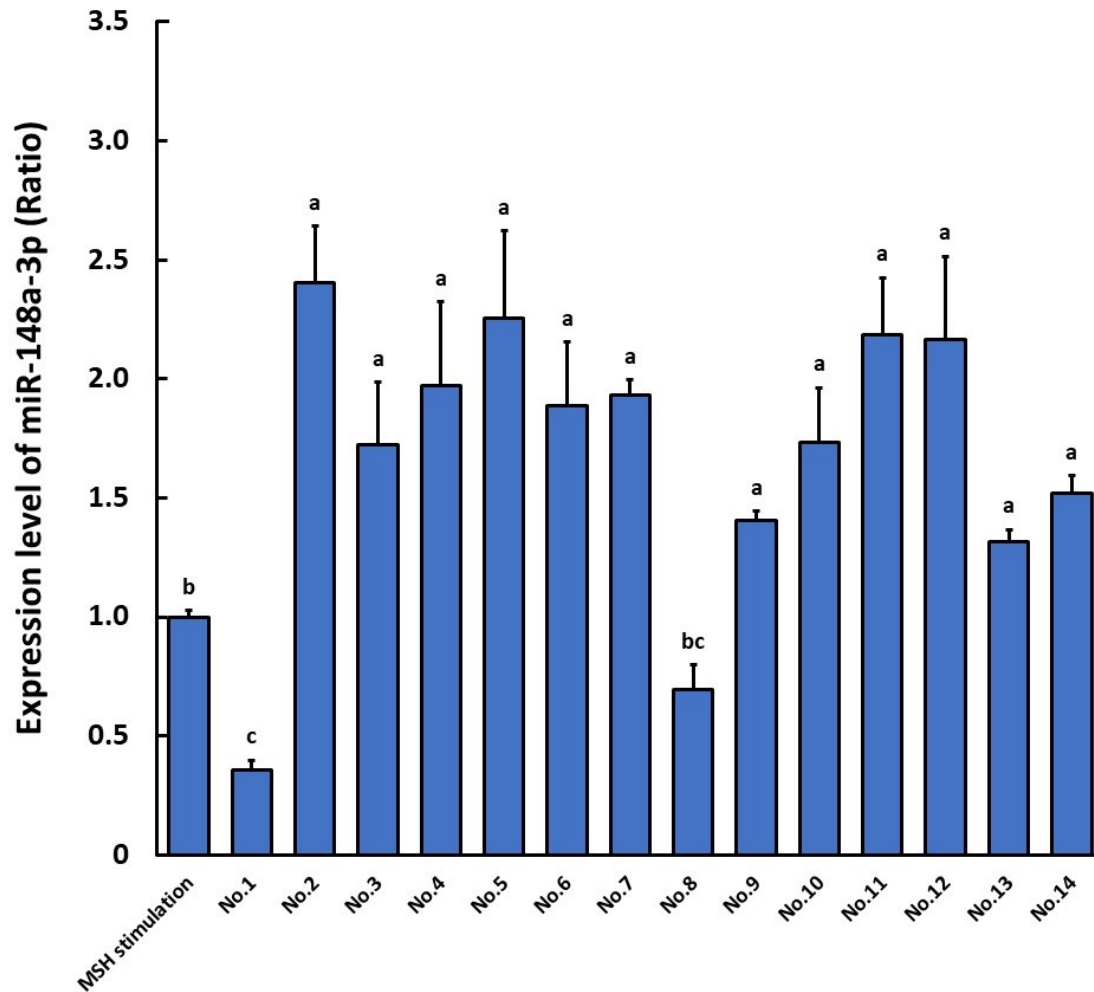


Figure 2-1. Micro RNA-148a-3p expression levels in α -MSH-stimulated B16-F10 cells treated with anti-melanogenesis induced plant extracts. Cells were treated with α -MSH (1 μ M) for 24h, then total RNA was extracted by TRIzol with DNase I treatment. Expression level of miR-148a-3p in α -MSH-stimulated cells were examined by the TaqMan[®] miRNA assay using the real-time PCR. The expression level of miR-148a-3p shown with the value cells on α -MSH stimulated in B16-F10 cell as 1. Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's new multiple range test (n=3, $p < 0.05$).

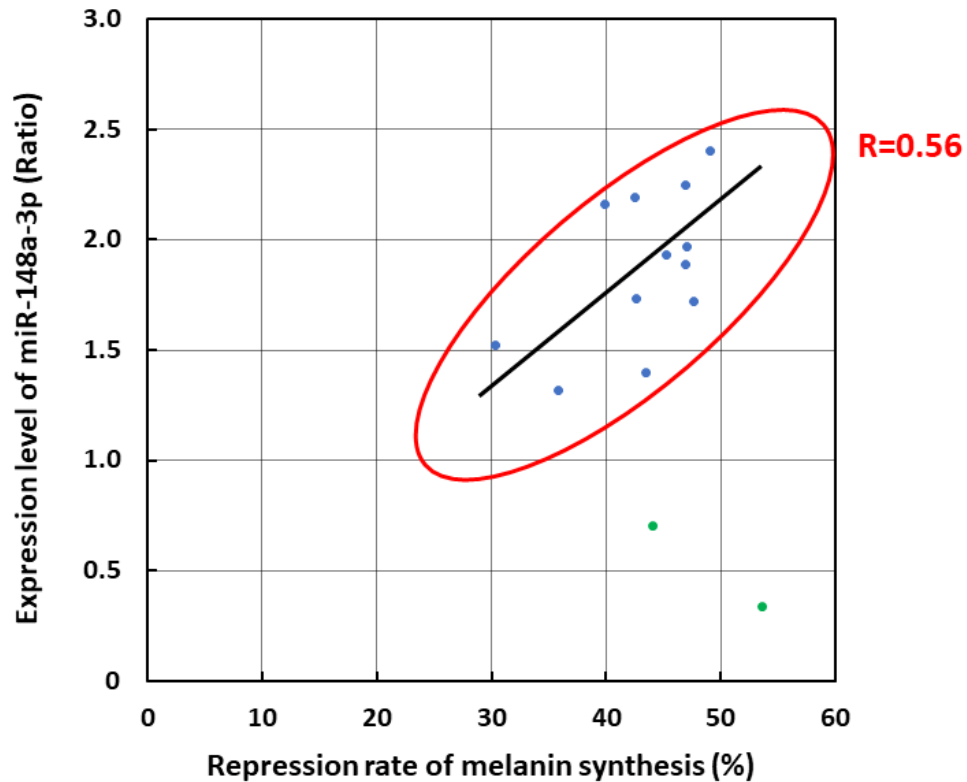


Figure 2-2. Relationship between the rate of repression of melanin production and the expression of miR-148a-3p in α -MSH-stimulated B16-F10 cells treated with anti-melanogenesis induced plant extracts. The vertical axis of the graph shows the ratio of the expression level of miR-148a-3p when the expression level of miR-148a-3p in the cell group 24 hours after α -MSH treatment is set as 1, and the horizontal axis shows the percentage repression of melanin production by each sample treatment when the melanin production in the α -MSH treated cell group is 100%. The correlation coefficient R is the value excluding No.1 and No.8. No. 1 and No. 8 are indicated by green dots, respectively.

2. 4. 考 察

本章では α -MSH にて刺激した際に発現が変動する miRNA が美白素材のスクリーニングマーカーとしての適性を示すかについて検証した。まず、序論にて前述した現在一般的に行われているスクリーニング法を用いて、植物や海藻といった天然物由来のサンプルから抽出したエキスの美白効果を B16-F10 細胞で評価した。エキスを処理し、 α -MSH 刺激のみの B16-F10 細胞でのメラニン生成量と比較した際に、メラニン生成抑制率が 30%以上を示した 14 種類のサンプルを選抜した (Table 2-2)。

miR-148a-3p は第 1 章の次世代シーケンスの結果、B16-F10 細胞において α -MSH 刺激前と比較し、 α -MSH 刺激後に発現量が低下した miRNA である (Table 1-12)。さらに、*Mitf* を標的遺伝子とし、MITF タンパク質の翻訳を阻害し、メラニン生成を抑制することが複数の論文で既に報告されている^{29,30}。そこで、miRNA の美白素材のスクリーニングマーカーとしての適性を評価するため、メラニン抑制効果が高かった 14 種類の植物エキスを B16-F10 細胞に添加し、 α -MSH 刺激後の、miR-148a-3p の発現変動を調査した。その結果、メラニン抑制効果が高いエキスを添加した細胞での miR-148a-3p の発現量は、 α -MSH 刺激のみの細胞の miR-148a-3p 発現量と比較して、増加する傾向があることが示された (Fig.2-1, 2-2)。したがって、miRNA が美白素材のスクリーニングマーカーとしての利用適性があることが示唆された。

本実験で検討したメラニン抑制効果が高いとされた 14 種類のエキスのうち、12 種類のエキスを添加した際には、 α -MSH 刺激のみの miR-148a-3p の発現量と比較して miR-148a-3p の発現量の増加が確認された。つまり、エキス (被検体) が美白効果を有していても、miRNA の発現の変動が全て同じパターンを示すとは限らないことが分かり、スクリーニングマーカーとしての精度を高く保つためには、単一の miRNA で評価するのでは危険性が非常に高い。したがって、MITF を標的とし、メラニン生成を抑制する miR-218⁴²⁾ や miR-340⁴⁹⁾ や、*Mitf* の調節領域に結合する SOX-5 (SRY-box transcription factor 5) の発現を調節する miR-21a-5p⁵⁰⁾、*Mitf* の発現を調節する TGF- β 活性化キナーゼ 1 (TGF- β -activated kinase 1, TAK1) の発現を調節する miR-143-5p⁵¹⁾、cAMP/CREB 経路に関与するインスリン様成長因子 1 (IGF1R) を制御する miR-379⁵²⁾、Wnt/ β -カテニンの働きを制御する機能を持つ SOX-1 を標的とするヒトエクソソーム由来の miR-200c⁵³⁾、第 1 章で同定した miR-122b-3p といった複数のメラニン生合成関連 miRNAs を用いることで精度を上げる必要があると考えられた。スクリーニング手法としては、これら miRNAs をチップ上に搭載したプレートを作製し、調べたいエキスを処理した細胞から抽出した RNA を一気にハイブリダイズすることで、検出、評価できると考える。

総 括

表皮には、紫外線を吸収し、肌を守るためにメラニンが存在しているが、メラニンは肌のターンオーバーサイクルの乱れや紫外線の過剰照射により、過剰蓄積することがあり、シミやそばかすとなる。過剰なメラニン生成を抑制するため、美白化粧品が開発されているが、販売に至るには天然動植物由来の美白成分を探索する必要があるが、一検体あたり 4 日ほどのスクリーニング期間が必要である。そのため、美白素材の迅速なスクリーニング方法の開発が求められており、我々はその新規スクリーニングマーカー候補として、miRNA に注目した。本研究では、美白素材開発のための新しいスクリーニング法の確立を目標に、メラニン生合成関連因子の mRNA と相補的な配列を持つ miRNA の探索とその miRNA のメラニン生合成を調節する作用機序の解明、スクリーニングマーカーとしての適性についてそれぞれ検証した。

第 1 章 メラニン生成に関与する miRNAs の同定と作用機序の解明

美白素材のスクリーニングマーカーとなり得る miRNA を同定するため、メラニン生合成時に発現が変動する miRNAs を探索した。α-MSH 刺激によって発現量が顕著に減少した 5 つの miRNAs のメラニン生合成への影響について検証するため、5 つの miRNAs をマウスメラノーマ B16-4A5 細胞に導入し、メラニン生成量を測定した。ネガティブコントロールである miR-NC 導入細胞と比較して、メラニン生成量が減少した miRNA のうち、本研究では、*Tyr* を標的遺伝子とすると予測された miR-122b-3p の作用機序の解明に取り組んだ。miR-122b-3p のアンチセンスインヒビターを細胞に導入し、miR-122b-3p 導入細胞と比較したところ、メラニン生成量が大幅に増加したため、miR-122b-3p 導入によってメラニン生合成が抑制されることを確認した。

次に、miR-122b-3p の標的遺伝子と予測された *Tyr* について同定を行うため、チロシナーゼの活性評価、遺伝子発現解析をそれぞれ行ったところ、miR-NC 導入細胞と比較して、miR-122b-3p 導入細胞では *Tyr* タンパク質の発現が、*Tyr* の mRNA の分解を介して阻害されることを確認した。さらに、miR-122b-3p が *Tyr* mRNA の 3'-UTR 上に存在する結合部位に結合することも、ルシフェラーゼレポーター解析により確認できた。以上の結果より、miR-122b-3p が *Tyr* を標的遺伝子とし、*Tyr* mRNA の分解を介して、*Tyr* タンパク質の発現を阻害することで、メラニン生合成を抑制する機構を示すことができた。

第 2 章 miRNA の美白素材のスクリーニングマーカーとしての適性について検証

miRNA の美白素材のスクリーニングマーカー適性を検証するために、天然物由来の 119 種類のサンプルから抽出したエキスのメラニン抑制効果を従来のスクリーニング方法で評価した。エキスを添加した場合、 α -MSH 刺激のみの B16-F10 細胞と比較した際にメラニン生成抑制率が 30%以上を示した 14 種類のサンプルを選抜した。

次に、*Mitf* を標的遺伝子とし、メラニン生成を抑制する miR-148a-3p を用いて miRNA のスクリーニングマーカーとしての適性を評価した。メラニン生成抑制効果が高かった 14 種類のエキスを B16-F10 細胞に添加し、 α -MSH 刺激を行った際の miR-148a-3p 発現は、 α -MSH 刺激のみの細胞と比較して、12/14 種類のエキスを添加した細胞で増加する傾向があった。この結果より、メラニン抑制効果のあるエキスを添加後、 α -MSH 刺激した場合、miR-148a-3p は固有の発現の変動を示す傾向があることを確認できたため、miR-148a-3p は美白素材のスクリーニングマーカーとしての適性は高いと判定した。

本研究より、 α -MSH 刺激によって誘導されたメラニン生成過程で発現が変動する、miRNA が美白素材のスクリーニングのための指標として活用できることを示すことができた。しかし、単一の miRNA のみをスクリーニングのための指標とすることはスクリーニング精度が低くなる危険性が高いため、メラニン合成に関与する複数の miRNA（作用機序が明らかになっているものに限る）を使用する必要がある。

参考文献

- 1) 一般社団法人 日本皮膚悪性腫瘍学会. 「皮膚の構造と皮膚癌の発生」
http://www.skincancer.jp/citizens_skincancer.html (2020.12.17 掲載) .
- 2) 土居 敏明. 皮膚の構造・特性と機能および血管の特性. 日本義肢装具学会誌 **15**, 225-231 (1999).
- 3) 資生堂シミ予防研究所. 「シミ予防辞典 メラニン色素」
<https://www.shiseido.co.jp/haku/laboratory/dictionary/40.html> (2022.4.21 掲載) .
- 4) ハイチオール. 「シミができるメカニズム」
<https://www.ssp.co.jp/hythiol/troublenavi/shimi/mechanism.html#:~:text=%E5%81%A5%E5%BA%B7%E3%81%AA%E8%82%8C%E3%81%A7%E3%81%AF%E3%80%81%E3%82%BF%E3%83%BC%E3%83%B3,%E5%8E%9F%E5%9B%A0%E3%81%AB%E3%81%AA%E3%82%8B%E3%81%AE%E3%81%A7%E3%81%99%E3%80%82> (2022.4.19 掲載) .
- 5) 赤坂 英二郎, 中野 創, 神 可代, 木村 一之, 六戸 大樹, 芋川 玄爾, 澤村 大輔. 紫外線防御機構におけるメラノサイト, ケラチノサイトのエンドセリン-1 / 幹細胞因子を介した相互作用. 弘前医学 **62**, 138-143 (2011).
- 6) Dong, C., Wang, H., Xue, L., Dong, Y., Yang, L., Fan, R., Yu, X., Tian, X., Ma, S., Smith, G.W. Coat color determination by miR-137 mediated down-regulation of microphthalmia-associated transcription factor in a mouse model. *RNA* **18**, 1679-1686 (2012).
- 7) 市来俊弘. Cyclic AMP response element binding protein (CREB) はアンジオテンシン II と TNF α のシグナル伝達に重要な役割を果たす. 脈能学 **47**, 377-381 (2007).
- 8) Pogenberg, V., Ogmundsdóttir, M.H., Bergsteinsdóttir, K., Schepsky, A., Phung, B., Deineko, V., Milewski, M., Steingrímsson, E., Wilmanns, M. Restricted leucine zipper dimerization and specificity of DNA recognition of the melanocyte master regulator MITF. *Genes & Development* **26**, 2647-2658 (2012).
- 9) Wan, P., Hu, Y., He, L. Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors. *Molecular and Cellular Biochemistry* **354**, 241-

- 246 (2011).
- 10) 石田 かおり. 「美白」意識の解釈学的現象学. 駒沢女子大学 研究紀要 **20**, 1-12 (2013).
 - 11) 青木 隆浩. 近現代の日本における美容観の伝統と変容. 国立歴史民俗博物館研究報告 **197**, 321-361 (2016).
 - 12) 長沼雅子. 化粧品の有効性の歴史的変遷. 日本化粧品会雑誌 **39**, 275-285 (2015).
 - 13) 矢野 経済研究所. 「美白化粧品市場に関する調査を実施」
<https://this.kiji.is/694433339586593889?c=388701204576175201> (2020.12.15 掲載).
 - 14) 田中 浩. 美白製品とその作用. 日本化粧品学会誌 **43**, 39-43 (2019).
 - 15) 秋保 暁, 鈴木 裕美子, 浅原 智久, 藤沼 好守, 福田 實. アルブチンのメラニン生成抑制作用—B16 メラノーマ培養細胞による生化学的研究. 日本皮膚科学会雑誌 **101**, 609-613 (1991).
 - 16) 資生堂シミ予防 研究所. 「シミ予防辞典 ルシノール」
<https://www.shiseido.co.jp/haku/laboratory/dictionary/20.html> (2022.4.19 掲載).
 - 17) 箱崎 智洋. ニコチン酸アミドの美白効果とそのメカニズム. フレグランスジャーナル **33**, 55-59 (2005).
 - 18) 川島 眞水, 水野 惇子, 村田 恭子. 表皮ターンオーバーの促進に基づく色素沈着の改善—アデノシン—リン酸二ナトリウムの肝斑に対する臨床効果. 臨床皮膚科 **62**, 250-257 (2008).
 - 19) 長沼 雅子. 化粧品の有効性の歴史的変遷. 日本化粧品学会誌 **39**, 275-285 (2015).
 - 20) 岡田 浩美. 機能性 RNA の世界. 臨床神経学 **53**, 957-961 (2013).
 - 21) 鈴木 洋. マイクロ RNA : 生合成調節機構と遺伝子発現調節ネットワークの理解. 日本生化学学会誌 **87**, 413-421 (2015).

- 22) Fukaya, T., Iwakawa, H., Tomari, Y. MicroRNAs block assembly of eIF4F translation initiation complex in *Drosophila*. *Molecular Cell* **56**, 67-78 (2014).
- 23) Azlan, A., Dzaki, N., Azzam, G. Argonaute: The executor of small RNA function. *Journal of Genetics and Genomics* **43**, 481-494 (2016).
- 24) He, L., He, X., Lim, L. P., Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* **447**, 1130-1134 (2007).
- 25) Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., Nakagama, H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 15472-15477 (2007).
- 26) Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297 (2004).
- 27) Femminella, G. D., Ferrara, N., Rengo, G. The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. *Frontiers in Physiology* **6**, Doi:10.3389/fphys.2015.00040 (2015).
- 28) Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B., Tewari, M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10513-10518 (2008).
- 29) Hallsson, J. H., Haflidadóttir, B. S., Schepsky, A., Arnheiter, H., Steingrímsson, E. Evolutionary sequence comparison of the *Mitf* gene reveals novel conserved domains. *Pigment Cell & Melanoma Research* **20**, 185-200 (2007).
- 30) Benedikta, S. H., Kristín, B., Christian, P., Eiríkur, S. miR-148 Regulates *Mitf* in melanoma cells. *PLOS One* **5**, Doi: 10.1371/journal.pone.0011574 (2010).
- 31) Zhiwei, Z., Yongqiang, C., Yuan, L., Huifeng, L., Lihuan, Z., Dongmei, X., Xiuju, Y., Pengfei, L., Lihua, L. MiR-148a-3p inhibits alpaca melanocyte pigmentation by targeting MITF. *Small Ruminant Research* **177**, 44-49 (2019).

- 32) Sozzi, G., Boeri, M., Rossi, M., Verri, C., Suatoni, P., Bravi, F., Roz, L., Conte, D., Grassi, M., Sverzellati, N., Marchiano, A., Negri, E., La, Vecchia, C., Pastorino, U. Clinical utility of a plasma-based miRNA signature classifier within computed tomography lung cancer screening: a correlative MILD trial study. *Journal of Clinical Oncology* **32**, 768-773 (2014).
- 33) Denk, J., Boelmans, K., Siegismund, C., Lassner, D., Arlt, S., Jahn, H. MicroRNA profiling of CSF reveals potential biomarkers to detect Alzheimer`s disease. *PLoS One* **10**, Doi: 10.1371/journal.pone.0126423 (2015).
- 34) Rao, P., Benito, E., Fischer, A. MicroRNAs as biomarkers for CNS disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **6**, Doi: 10.3389/fnmol.2013.00039 (2013).
- 35) Mihelich, B, L., Maranville, J. C., Nolley, R., Peehl, D. M., Nonn, L. Elevated serum microRNA levels associate with absence of high-grade prostate cancer in a retrospective cohort. *PLoS One* **14**, Doi: 10.1371/journal.pone.0124245 (2015).
- 36) Montani, F., Marzi, M. J., Dezi, F., Dama, E., Carletti, R. M., Bonizzi, G., Bertolotti, R., Bellomi, M., Rampinelli, C., Maisonneuve, P., Spaggiari, L., Veronesi, G., Nicassio, F., Di Fiore, P. P., Bianchi, F. miR-Test: a blood test for lung cancer early detection. *Journal of the National Cancer Institute* **107**, Doi: 10.1093/jnci/djv063 (2015).
- 37) Promega. 「 pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector 」
<https://www.promega.jp/products/luciferase-assays/genetic-reporter-vectors-and-cell-lines/pmirglo-dual-luciferase-mirna-target-expression-vector/?catNum=E1330>
(2023.1.20 掲載) .
- 38) 細野 崇, 増澤 (尾崎) 依, 関 泰一郎. miRNA を介した新しい食品機能の発現機構. *科学と生物* **54**, 909-914 (2016).
- 39) Pradhan, A. K., Bhoopathi, P., Talukdar, S., Scheunemann, D., Sarkar, D., Cavenee, W. K., Das, S. K., Emdad, L., Fisher, P. B. MDA-7/IL-24 Regulates the miRNA processing enzyme DICER through downregulation of MITF. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 5687-5692 (2019).
- 40) 神人 正寿. 皮膚老化におけるエキソソームの働きの解明と治療応用の可能性の検討. *コスメトロジー研究報告* **27**, 98-103 (2019).

- 41) Guo, J., Zhang, J. F., Wang, W. M., Cheung, F. W., Lu, Y. F., Ng, C. F., Kung, H. F., Liu, W. K. MicroRNA-218 inhibits melanogenesis by directly suppressing microphthalmia-associated transcription factor expression. *RNA Biology* **11**, 732-741 (2014).
- 42) Hushcha, Y., Blo, I., Oton-Gonzalez, L., Mauro, G. D., Martini, F., Tognon, M., Mattei, M. MicroRNAs in the regulation of melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, Doi: 10.3390/ijms22116104 (2021).
- 43) Niu, C., Aisa, H. A. Upregulation of melanogenesis and tyrosinase activity: potential agents for vitiligo. *Molecules* **22**, Doi: 10.3390/molecules22081303 (2017).
- 44) Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., Foti, M. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, Doi: 10.3390/ijms20246249 (2019).
- 45) Bhaskaran, M., Mohan, M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary Pathology* **51**, 759-774 (2014).
- 46) Hutvagner, G., Zamore, P. D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**, 2056-2060 (2002).
- 47) Levy, C., Khaled, M., Fisher, D. E. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine* **12**, 406-414 (2006).
- 48) Vachtenheim, J., Borovanský, J. "Transcription physiology" of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Experimental Dermatology* **19**, 617-627 (2010).
- 49) Yang, Y., Wei, X., Bai, J., Huang, M., Hao, T., Hao, Y., Wang, Y., Li, C. MicroRNA-340 is involved in ultraviolet B-induced pigmentation by regulating the MITF/TYRP1 axis. *Journal of International Medical Research* **48**, Doi: 10.1177/0300060520971510 (2020).
- 50) Wang, P., Zhao, Y., Fan, R., Chen, T., Dong, C. MicroRNA-21a-5p functions on the regulation of melanogenesis by targeting sox5 in mouse skin melanocytes. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, Doi: 10.3390/ijms17070959 (2016).

- 51) Ji, K., Zhang, P., Zhang, J., Fan, R., Liu, Y., Yang, S., Hu, S., Liu, X., Dong, C. MicroRNA 143-5p regulates alpaca melanocyte migration, proliferation and melanogenesis. *Experimental Dermatology* **27**, Doi: 10.1111/exd.13480 (2018).
- 52) Liu, B., Zhang, J., Hu, S., Qi, S., Jia, Q., Yang, W., Yang, S., Ji, K., Liu, X., Dong, C., Fan, R. MicroRNA-379 mediates pigmentation, migration and proliferation of melanocytes by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *Experimental Dermatology* **29**, 467-476 (2020).
- 53) Zhao, C., Wang, D., Wang, X., Mao, Y., Xu, Z., Sun, Y., Mei, X., Song, J., Shi, W. Down-regulation of exosomal miR-200c derived from keratinocytes in vitiligo lesions suppresses melanogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **24**,12164-12175 (2020).

謝 辞

陸上植物・海藻サンプルからの抽出およびエキスを提供いただきました，一丸ファルコス株式会社 開発部部長，Iddamalgoda Arunasiri 先生（岐阜薬科大学特任教授）に謹んで厚く御礼申し上げます。

本論文の審査をいただきました海洋生命分子科学教育研究分野の田丸 浩教授ならびに海洋微生物学教育研究分野の福崎 智司教授に御礼申し上げます。

また，本研究を行うにあたり，ご協力いただいた水圏材料分子化学研究室のメンバーならびに先輩方の皆様に深く感謝の意を表します。