

[研究論文] 単一細胞操作技術を用いた B16 メラノーマ細胞の選別と単一細胞における遺伝子配列解析

宮田翔子¹・栗原誠²・平藤衛³・飯田泰広²

1 博士前期課程応用化学・バイオサイエンスコース専攻

2 応用バイオ科学科

3 アルテア技研株式会社

Selection of the B16 melanoma cells with use of single cell manipulation technique and sequence analysis of the DNA in the single cell

Yoko MIYATA¹, Makoto KURIHARA², Mamoru HIRAFUJI³, Yasuhiro IIDA²

Abstract

Epigenetics is study about regulation of gene expression without changing DNA sequence. This means that difference in gene expression occur between cells due to modification state of promoter region in this gene if those have same gene. Melanin which is known as the cause of the stain is produced when tyrosine was oxidized by tyrosinase. Melanin is remains on the skin after the turnover of the skin cells. In our laboratory, we observed that tyrosinase may be affected by an epigenetics in melanin production.

In this study, we investigated basic experiment of epigenetic analysis by using Pico-Pipet which capable of single cell manipulation. Single cell was selected by Pico-Pipet after cultivation of B16 melanoma cells. Expression of tyrosinase in extracted DNA from the single melanoma cell was evaluated. And the sequence of tyrosinase gene was analyzed. In the results, the expression of tyrosinase gene in a single cell was confirmed. Analysis sequence of tyrosinase gene was compared with database and the concordance rate of the sequence of tyrosinase was 100 %.

Keywords: Epigenetics, Methylation, Single cell manipulation, Tyrosinase, Gene expression

1. まえがき

近年、高齢化に伴い、女性の美容に対する関心がより一層高まっている。シミは、シワ、たるみと並ぶ女性の三大悩みの一つであり^[1]、このシミ形成を抑制するための美白剤の開発が進んでいる。

メラニン色素は皮膚の色を決定する因子であるとともに、紫外線から皮膚を保護する重要な役割を担っている^[2]。シミができる原因は諸説あるが、紫外線による刺激はその一因であることが知られている^[3]。この、メラニンを産生する細胞がメラノサイトであり、表皮基底層と毛母に定着した後、メラノサイトが有するメラノソーム中でメラニンの産生を行う。メラニンには黒色から褐色のユーメラニンと黄色から赤色のフェオメラニンの2種類があり、この2種が混ざり合った混合メラニンとして存在することで、皮膚や毛の色が形成されている。このメラニン産生にかかわ

る酵素はチロシナーゼおよびチロシナーゼ遺伝子ファミリーに属する2種の酵素のみであることが知られている^[2]。

紫外線による色素沈着には、UVAによりプレメラニンが光酸化され重合して黒化する^[3]即時型と、UVBによる遅延型が存在している。UVBによる遅延型では、UVBを受けたケラチノサイトが、エンドセリンや melanin stimulate hormone (MSH)などを分泌し、メラノサイト上にある受容体に結合、シグナルが伝達され、メラノサイトにおけるチロシナーゼ発現を誘導することが知られている。

いずれにせよ、紫外線の刺激によって、色素細胞であるメラノサイト内でアミノ酸の一種であるチロシンが酸化酵素チロシナーゼによってメラニンが形成されることが原因である^[4]。そのため、メラニン形成における律速酵素であるチロシナーゼを抑制することができれば、シミ形成を抑制すること可能であり、美白剤として期待できる^[5]。

既にアルブチンやコウジ酸は、チロシナーゼ抑制、メラニン生成の抑制をすることは知られており^[6]、化粧品の成分として用いられている。しかし、細胞毒性や発癌の限界量が含まれているため、安全かつ効果的な美白剤の開発が望まれている^[7]。現在、天然物からの抽出物によるメラニン形成の抑制やチロシナーゼ活性の抑制の研究が行われている^{[8][9]}。また、対処治療として、レーザー治療^[10]、光治療など外科的治療を行うことでシミを薄くしたりすることは可能である。しかし、メラニン形成の原因は、解明されていない。

皮膚細胞は、約1ヶ月で新しい細胞にかわる(ターンオーバー)^[11]。通常の細胞においてもメラニンは産生しているが、ターンオーバーで角質となって剥がれ落ちる。しかし、過剰にメラニンを産生した細胞は、ターンオーバーのサイクルが遅くなり、蓄積していきシミとなってしまう。細胞はクローンであるため、通常の細胞と色素沈着をおこした細胞は、同じ遺伝子を有しているが、表現型に違いが生じている。これは、メラニン産生における律速酵素であるチロシナーゼがエピジェネティクスな影響を受けていると考えている。本研究室ではこれまでに、メラニン産生において、チロシナーゼがエピジェネティクスな影響を受けている可能性のある知見を得ている。

エピジェネティクスとは、遺伝子配列に変化を伴わず、DNAへの後天的な修飾によって遺伝子発現が変化する仕組みのことである。エピジェネティクスな異常は、癌や自己免疫疾患の原因とされている。これは、同一遺伝子を有していても、ヒストンや遺伝子のプロモーター領域の後天的な修飾(メチル化、アセチル化)によって変化が起き、細胞間で違いを生じることを意味している。従来行われている培養細胞を用いた方法では、細胞集団に対して評価を行っているため、細胞間での違いは評価されていない。

本研究では、単一細胞におけるDNAの発現量や表現型の違いによる修飾状態の違いを評価するために、単一細胞操作が行えるPico-Pipetを用いて、細胞分離後、単一細胞でのチロシナーゼ遺伝子発現、配列解析を行い、エピジェネティクス解析を行うための基礎的研究を行った。具体的には、1.メラノーマ細胞集団に対するチロシナーゼ発現の確認、2.白色、黒色細胞を選別した細胞集団における当該遺伝子の発現量の比較、3.エピジェネティックな制御を検討するための脱メチル化処理によるメラニン量およびチロシナーゼ発現量の評価、4.白色細胞集団および黒色細胞集団におけるメチル化の有無の評価、5.個々の細胞におけるエピジェネティック評価のための基礎研究(単一細胞でのチロシナーゼ発現評価と単一細胞でのチロシナーゼ遺伝子の配列評価)を行った。

2. 実験装置および測定方法

2-1 試薬及び装置

当該実験での細胞は、理化学研究所から購入したマウスB16メラノーマ細胞を使用した。培地はDulbecco's

Modified Eagle Medium (D-MEM)をGibcoより購入して用いた。血清(Fetal Bovine Serum(FBS))は、MP Bio Japanから購入したものを用いた。Antibiotic-Antimycotic (Anti-Anti)とDulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS)はInvitrogenから、0.25% Trypsin-EDTA(Trypsin)とTRIzolはLife technologiesから購入した。その他の試薬は、特級及び生化学グレードで精製をせずにそのまま用いた。

細胞培養に使用したCO₂インキュベーター(MODEL370)は、Thermoのものを使用した。クリーンベンチ(MCV-161 BNF)は、SANYOのものを使用した。DNAシークエンサー(19349-035)は、Applied Biosystemsのものを、細胞分取に使用したPico-Pipetは、アルテア株式会社のものを使用した。Pico-Pipetで用いた細胞操作用のキャピラリーは、ガラスキャピラリー(1-GTB50-10)を加工して使用した。単一細胞からのRNA、DNAの抽出は、NucleoSpin® TriPrep (TaKaRa, 740966.10)を使用して行った。

2-2 細胞培養

超低温フリーザー(MDF-393, SANYO)から細胞を取り出し、37℃の温水で解凍させた。D-MEM培地(10% FBS、1% Anti-Anti)を予め10mLくわえておいた15mL遠沈管に、解凍した細胞1mLを加えた後、遠心した(20℃, 190×g, 3min)。ペレットを取らないように上清みの培地をアスピレーター付随のパスツールピペットにより吸引した後、D-MEM培地5mLを加え、ペレットを崩しながらピペッティングした。セルカウントを行った後、60mm dishにD-MEM培地5mLずつ加えた。細胞数を、 1.0×10^5 cells/dishに合わせて細胞懸濁液をディッシュに加えた。細胞が均等になるように前後左右に揺らしたのち、37℃、CO₂5%のインキュベーターに入れ、2日間培養した。培養3日後に、インキュベーターからディッシュを取り出し、ディッシュ内の培地を吸引した後、新しい培地を5mLずつ加え、インキュベーターに戻し1日間培養した(培地交換)。培養4日目に、ディッシュ内の培地を吸引した後、D-PBS 3mL加えたのち、吸引した。Trypsin 1mLを加え、ディッシュ内の細胞を剥がした。細胞が剥がれたのを顕微鏡で確認したら、培地3mL加えピペッティングを行った(Trypsin処理)。遠沈管に全量移し遠心(4℃, 12,000×g, 10min)させた。遠心後、ペレットを吸わないように培地を吸引後、新しい培地を5mL加えピペッティングを行った。セルカウントを行った後、細胞数を 2.0×10^5 cells/dishに合わせて、予め培地を2mL加えておいた35mm dishに細胞懸濁液を加えた(継代)。培養5日目に培地を吸引後、TRIzol 1mLをシリンジと注射器を用いてとり、ディッシュに加えピペッティングを行った。その後、1.5mLチューブに全量移した。

2-3 チロシナーゼ遺伝子発現評価

細胞集団に対してチロシナーゼ遺伝子発現解析を行う

ために、RNA抽出を行った。RNA抽出のために、2-2のように細胞培養を行い、培養5日目に培地を吸引後、TRIzol 1 mLをシリンジと注射器を用いてとり、ディッシュに加えピペッティングを行った。その後、1.5 mLチューブに移した。室温で5分間静置させたのち、クロロホルム 0.2 mL加え、激しく攪拌させた。5分間静置させ、遠心(4 °C、12,000×g、10 min)させた。遠心後、有機層を新しい1.5 mLチューブに移した。水層と中間層は廃棄した。有機層に2-プロパノール 0.5 mL加え、激しく攪拌させた。10分間静置させた後、遠心(4 °C、12,000×g、10 min)、上清を除去し、75 %エタノール 1 mL加え、再度遠心(4 °C、14,000×g、5 min)を行った。その後、上清を取り除き、DEPC-Waterを50 µL加えた。分光光度計(ナノドロップ: ND-1000)で核酸濃度ををはかり、濃度が50 ng/µLになるようにDEPC-Waterを加え調製した。得られたtotal RNAに、DNase処理を行った。その後、逆転写反応させてcDNAを作成した。作成後、遺伝子発現の確認を行った。PCRチューブに、10×Ex Taq Buffer 2 µL、dNTP Mixture 1.6 µL、Fw Primer 1 µL、Re Primer 1 µL、TaKaRa Ex Taq 0.1 µL、滅菌水 12.3 µLを分注し、反応させた。プライマーは、β-アクチン(Fw: 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3、Re: 5'-TAAAAC GCA GCT CAGA CAG TCC G-3)、チロシナーゼ(Fw: 5'-GGC CA CTT TCA GGC AGA GGT-3、Re: 5'-TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC-3)を使用した。反応条件は、94 °C 1 min、94 °C 30 sec、55 °C(β-アクチン) 57 °C(チロシナーゼ) 30 sec、72 °C 1min、72 °C 2 min、4 °Cを35サイクル行った。反応後、1.0 % アガロースゲルで確認を行った。

2-4 単一細胞におけるチロシナーゼ遺伝子発現評価

2-2同様に細胞培養後、Trypsin処理を行い、D-PBSで2回洗浄した後、Pico-Pipetを用いて白色細胞、黒色細胞を選別し、RNA抽出を行った。細胞選別は、細胞培養後、培地吸引し、D-PBS 3 mLをディッシュに加え吸引を行った。Trypsin 1 mLを加え、細胞を剥がし、50 mL遠沈管に回収し、遠心(20 °C、190×g、3 min)を行った。遠心後、培地を吸引し、D-PBS 5 mL加えピペッティングを行った。この操作を2回行い、予め35 mm dishにD-PBS 2 mL加えておき、遠沈管からマイクロピペットで100 µL取りディッシュに入れた後、Pico-Pipetで分取した。RNAの抽出は、NucleoSpin® TriPrepを用いて行い、付属のプロトコールに従い行った。抽出したRNAは使用するまで、-80 °Cの超低温フリーザーで保存した。

2-5 脱メチル化剤処理のメラニン産生量およびチロシナーゼ発現量に及ぼす影響の評価

エピジェネティクスな影響を受けているのかを調べるために、脱メチル化剤(5-Azacytidine)を細胞に添加し、メラニン量やチロシナーゼ発現量への影響を評価した。脱メチル化剤の調製は、酢酸と滅菌水を1:1で作成した。

そのうち半分を脱メチル化剤に加えた(50 mg/mL)。これをストックソリューションとして-80 °Cで保存した。10 % DMSO 2M NaOHは、200 mLのビーカーにNaOH 16 g、DMSO 2 mL、純水 100 mLを入れ攪拌させた。その後、200 mLメスフラスコに移し、メスアップさせ、フィルター滅菌を行ったものを使用した。

2-2のように細胞培養、培地交換、継代を行い、24時間後、50 µg/mL、5 µg/mLの濃度に調製した脱メチル化剤を細胞に添加した。添加後、24時間後にメラニン量、チロシナーゼ発現量の評価を行った。チロシナーゼ発現量は、2-3のようにRNA抽出を行い、遺伝子発現評価を行った。メラニン量の評価は、細胞培養、培地交換、継代を行い、培養5日目に培地を吸引後、D-PBS 3 mL加え吸引し、Trypsin処理を行った後、遠心(20 °C、190×g、3 min)させた。培地吸引したのち、D-PBS 3 mL加え、ピペッティング後、セルカウントを行った。再度、遠心(20 °C、190×g、3 min)させ、D-PBS吸引後、D-PBS 3 mL加え、遠心(20 °C、190×g、3 min)した。D-PBSを吸引した後、10 % DMSO 2M NaOH 200 µL加え、ヒートブロック(100 °C、10 min)に入れた。反応後、放冷させ、ナノドロップ(400 nm)で測定した後、検量線よりメラニン量を算出した。

2-6 COBRA法によるメチル化の確認

2-2同様に細胞培養、培地交換、継代を行い、DNA抽出を行った。DNA抽出は、培養5日目に培地吸引後、TRIzol 1 mLをシリンジと注射器で加え、ピペッティングを行った。1.5 mLチューブに回収し、室温で5分間静置させた。クロロホルム 0.2 µL加え激しく攪拌させた。3分静置した後、遠心(4 °C、12,000×g、15 min)させた。有機層を廃棄した後、100 % エタノール 300 µL加え緩やかに攪拌した。室温で30分静置した後、遠心(4 °C 12,000×g、15 min)させた。フェノール/エタノール層を廃棄し、0.1 Mクエン酸ナトリウム 1 mL加え緩やかに攪拌させ、30分静置させた。静置後、遠心(25 °C、12,000×g、10 min)させ、ペレットを吸わないように全量取り除いた。再度、0.1 Mクエン酸ナトリウム 1 mL加え、遠心させた。その後、75 %エタノール 1 mL加え、遠心(25 °C、7,500×g、5 min)させた。ペレットを吸わないように全量取り除き、冷75 %エタノール 1 mL加え、遠心(25 °C、7,500×g、5 min)させた。減圧遠心を行い、滅菌水を10 µL加え、ナノドロップで核酸濃度を測定した。測定後、2-3同様にPCR用試薬を分注し、遺伝子発現を確認した。確認後、バイサルファイト処理を行った。バイサルファイト処理は、kit付属のプロトコールに従い行った。バイサルファイト処理が行っているかPCRと電気泳動で確認した。PCR反応液は、2-3の組成で反応させた。PCR条件は、94 °C 1 min、94 °C 30 sec、54 °C 30 sec、72 °C 1min、72 °C 2 min、4 °Cを40サイクル行った。使用したプライマーは、Fw: ①5'-GTT ACC TCA CTA TGG GCT ATG TAC AAA C-3'、②5'-GTT ATT TTA TTA TGG GTT ATG TAT AAA T-3'を使用し、Re: ①5'-CAT

TCT TTT ACC AAC AAA TTC TTA AA -3'、②5'-CAT TCT TTT GCC AAC AAG TTC TTA GA -3'を使用した。目的分子量は、332 bp である。メチル化の確認を行うために、バイサルファイト処理を行った DNA を用いて、制限酵素処理を行った。1.5 mL チューブに Taq I 1 μ L、10 \times Taq I Buffer 5 μ L、0.1 % BSA 5 μ L、滅菌水 19 μ L、DNA 20 μ L 分注し、ヒートブロック(65 $^{\circ}$ C、1 時間)で反応させた後、電気泳動で確認した。今回使用した Taq I は TCGA 配列を認識し切断するものであり、メチル化を受けていれば切断され、目的分子量は、291 bp と 41 bp となり、メチル化を受けていなければ切断されず、目的分子量は、332bp である。

2-7 単一細胞におけるチロシナーゼ遺伝子発現評価

細胞培養、Trypsin 処理後、D-PBS で 2 回洗浄した後、Pico-Pipet を用いて白色細胞、黒色細胞を一つずつ分取した。2-4 同様に RNA 抽出を行い、2-3 のように DNase 処理、cDNA 作成、遺伝子発現評価を行った。反応条件は、94 $^{\circ}$ C 1 min、94 $^{\circ}$ C 30 sec、55 $^{\circ}$ C(β -アクチン) 63 $^{\circ}$ C(チロシナーゼ) 30 sec、72 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 2 min、4 $^{\circ}$ C を 40 サイクル行った。使用したプライマーは、2-3 と同じものを使用した。

2-8 単一メラノーマ細胞における DNA 配列の解析

単一細胞での DNA 配列解析を行うために、2-2 同様に細胞培養を行い、2-4 同様に白色細胞、黒色細胞を分取し、2-3 の PCR 反応液に選別した細胞を加え、反応させた。反応後、遺伝子保持を電気泳動で確認を行った。反応条件は、2-6 と同様である。使用したプライマーは 2-3 と同じものを使用した。また、DNA シークエンサーで得られたチロシナーゼ遺伝子の配列解析を行った。サンプルの作成は、PCR 産物を SUPREC-02 に全量に移し、TE Buffer を 20 μ L 加え、遠心した。この操作を数回繰り返した。最後は、TE Buffer 20 μ L で回収し、ナンドロップで核酸濃度を測った。濃度を 1.5 ng/ μ L になるように TE Buffer で希釈した。プライマーの濃度は 1.6 pmol/ μ L になるように TE Buffer で希釈した。PCR チューブに Ready Reaction Premix 2 μ L、BigDye Sequencing Buffer 1 μ L、プライマー(1.6 pmol/ μ L) 1 μ L、サンプル(15 ng/ μ L) 1 μ L、滅菌水 5 μ L を分注した。反応条件は、96 $^{\circ}$ C 1 min、96 $^{\circ}$ C 10sec、50 $^{\circ}$ C 5 sec、60 $^{\circ}$ C 4 min、4 $^{\circ}$ C を 25 サイクル行った。反応後、精製を行った。精製は、PCR チューブに Clean SEQ 10 μ L、85 % エタノール 42 μ L を加えよく攪拌させた。その後、全量を磁気プレートにのせてある 96 well plate に移した。30 秒静置させたのち、磁気ビーズを吸わないように全量吸い上げ、再度 85 % エタノールを 100 μ L 加えた。30 秒静置させたのち、磁気ビーズを吸わないように全量吸い上げ、10 分間乾燥させた。乾燥後、滅菌水 40 μ L 加え、5 分間静置させ、磁気ビーズを吸わないように 30 μ L 取り、新しい 96 well plate に移し、DNA シークエンサーにかけた。

3. 結果及び考察

3-1 チロシナーゼ遺伝子発現評価

異なる 5 つの細胞集団(①~⑤)から RNA を抽出し、核酸濃度を測った結果、260/280 値がそれぞれ①1.75、②1.62、③1.74、④1.68、⑤1.67 となり、260/230 の値が、①1.66、②2.21、③2.02、④2.02、⑤2.26 となった。核酸濃度(ng/ μ L)は、①223.15、②136.98、③236.68、④188.49、⑤188.93 と得られた。RNA 濃度を 50 ng/ μ L になるように DEPC-Water で希釈し、RNA 確認の泳動を行い、いずれのサンプルからもバンドが確認できたため、逆転写反応を行い、遺伝子発現の評価を行った。

遺伝子発現評価を行った結果、いずれのサンプルからも、 β -アクチン(目的分子量: 393 bp)とチロシナーゼ(目的分子量: 477 bp)のバンドが目的分子量付近に確認でき(Fig.1、2)、RNA の抽出および cDNA の作製と発現評価が行えることが例証できた。

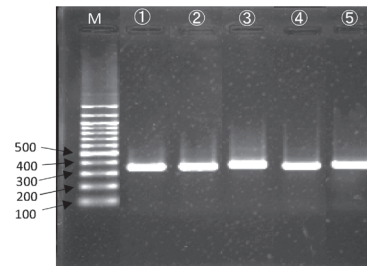


Fig.1 β -アクチン遺伝子発現評価の泳動結果

M:100 bp DNA Ladder one、目的分子量:393 bp、①~⑤:B16メラノーマ細胞から抽出したRNAを用いて遺伝子発現評価を行った結果(n=5)

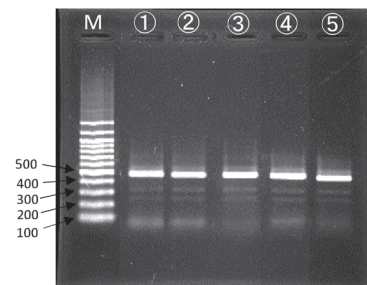


Fig.2 チロシナーゼ遺伝子発現評価の泳動結果

M:100 bp DNA Ladder one、目的分子量:477 bp、①~⑤:B16メラノーマ細胞から抽出したRNAを用いて遺伝子発現評価を行った結果(n=5)

3-2 白色細胞、黒色細胞におけるチロシナーゼ遺伝子発現評価

3-1 において、メラノーマ細胞におけるチロシナーゼ遺伝子の発現評価が行えることが例証されたため、次に、同様の細胞集団に対して、白色細胞を選別した集団および黒色細胞を選別した集団それぞれに対して、同様に発現評価を行った。細胞集団は、それぞれ 20 細胞ずつを分取して実験に用いた。

Fig.3 および Fig.4 に示すように、 β -アクチンおよびチロシナーゼの遺伝子発現をいずれの細胞集団からも評価することができた。 β -アクチンおよびチロシナーゼの電気泳

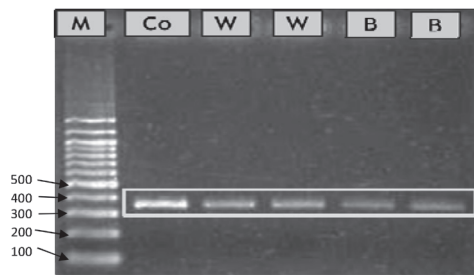


Fig.3 β -アクチン遺伝子発現評価の泳動結果

M:100 bp DNA Ladder one, 目的分子量:393 bp, Co:細胞集団, W:白色細胞, B:黒色細胞, 白色, 黒色細胞は, 細胞培養後, Pico-Pipetを用いて白色・黒色細胞をそれぞれ20個ずつ選別し, RNA抽出を行い遺伝子発現評価を行った。

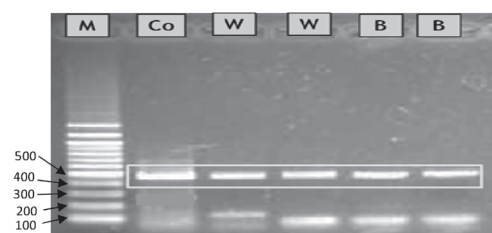


Fig.4 チロシナーゼ遺伝子発現評価の泳動結果

M:100 bp DNA Ladder one, 目的分子量:477 bp, Co:細胞集団, W:白色細胞, B:黒色細胞, 白色, 黒色細胞は, 細胞培養後, Pico-Pipetを用いて白色・黒色細胞をそれぞれ20個ずつ選別し, RNA抽出を行い遺伝子発現評価を行った。

動結果のバンドを画像処理ソフトで取り込み、チロシナーゼの発現量をハウスキーピング遺伝子である β -アクチンの発現量で割ることで補正をかけてチロシナーゼ遺伝子の発現量を半定量的に比較した (Fig.5)。その結果、黒色細胞でのチロシナーゼ発現量が高く、白色および混合細胞集団では発現量が低いことが示された。また、白色細胞においても、一定量のチロシナーゼの発現が行われていることも示唆された。

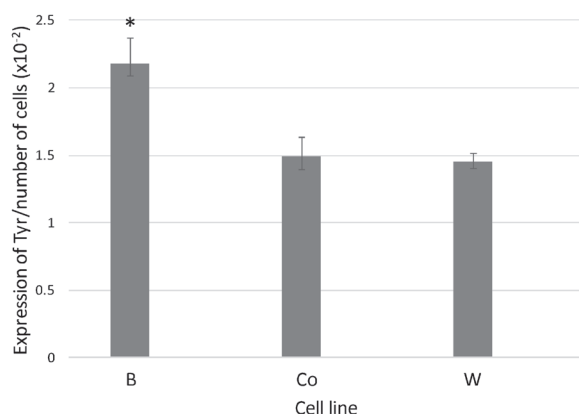


Fig.5 白色, 黒色細胞におけるチロシナーゼ発現量

縦軸はチロシナーゼ発現量, 横軸はCell Lineを示している。Coは細胞集団, Bは黒色細胞, Wは白色細胞を示している。チロシナーゼ発現量は、 β -アクチンの発現量で割った値で示した。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

3-3 脱メチル化剤処理によるメラニン合成とチロシナーゼ発現評価

遺伝子の発現量が、DNAのメチル化に依存することを検討するため(チロシナーゼの発現がエピジェネティックな影響を受けていることを評価するため)、脱メチル化剤を細胞に添加し、メラニン量とチロシナーゼ発現量への影響を評価した。その結果、メラニン産生量においては、5 μ Mの5-aza試薬で処理した際に有意にメラニン産生が多くなることが示された(Fig.6)。また、チロシナーゼ発現においても、メラニン産生量同様に5 μ Mの薬剤濃度で有意に発現量が増加していることが示された(Fig.7)。この結果から、白色細胞ではDNAのメチル化が起こっており、チロシナーゼ遺伝子発現が抑制されており、脱メチル化することにより当該遺伝子の発現が可能となり、細胞が黒色化することが示唆された。

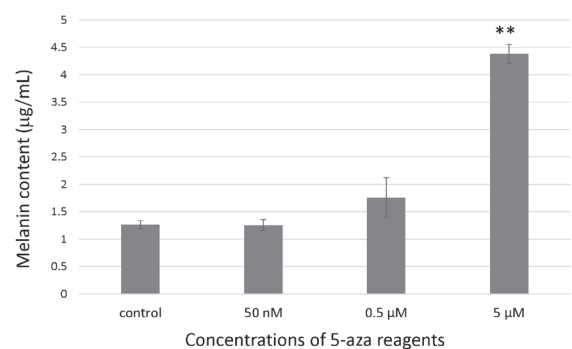


Fig.6 脱メチル化剤によるメラニン量の影響

縦軸は単細胞当たりのメラニン量, 横軸は脱メチル化剤の濃度, 細胞は, 各濃度で脱メチル化剤を添加した後, 1.0 % DMSO 2 M NaOHに溶解させ, 400 nmでメラニン量の測定を行った。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$



Fig.7 脱メチル化剤によるチロシナーゼ発現量の影響

縦軸は単細胞当たりのチロシナーゼ発現量, 横軸は脱メチル化剤の濃度, Coはコントロールを示している。細胞は, 各濃度で脱メチル化剤を添加した後, 遺伝子発現評価後, 半定量を行い β -アクチンの発現量で割った値で示した。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

3-4 COBRA 法によるメチル化の確認

3-3の結果を受け、実際に、DNA上にメチル化がなされているかをCOBRA法により評価した。

細胞培養後、DNAを抽出し濃度を測定した結果、119.1 ng/ μ Lであった。抽出したDNAの遺伝子保持の確認を行った結果、目的分子量付近にバンドが確認できた。遺伝子

保持の確認が行えたため、バイサルファイト処理を行った。

バイサルファイト処理を行うことにより、通常のシトシンはウラシルに変換されるため、PCR 後はチミンとして置き換わることになる。一方、メチル化されたシトシンは影響を受けないため、もとのシトシンのままである。①のプライマーはバイサルファイト処理前の配列が増幅される配列であり、②のプライマーは、バイサルファイト処理後の配列が増幅される配列である。バイサルファイト処理がうまく行われていれば、①のプライマーでは増幅されず、②のプライマーのみで増幅される。また、目的配列がメチル化されていれば、当該制限酵素により切断されるため、291 bp と 41 bp のバンドとして確認される。メチル化されていなければ、切断されないことで、DNA 上のメチル化の有無を評価することが可能である。本実験では、混合細胞集団に対して2回実験を試み (A と B) た。

使用した①のプライマーでは増幅されず、②のプライマーにおいて目的分子量付近にバンドが確認でき、バイサルファイト処理が行えていることが確認できた (Fig.8)。そのため、制限酵素処理を行い、電気泳動により確認を行った。その結果、Fig.9 に示すように、A、B いずれの細胞集団においても、291 bp と 41 bp のバンドが確認され、メチル化されていることが示唆された。白色細胞の方が、黒色細胞よりも圧倒的に多いため、このような結果になった

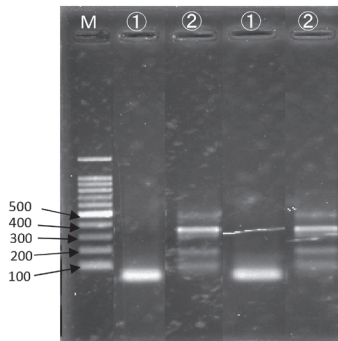


Fig.8 バイサルファイト処理後の確認泳動

M:100 bp DNA Ladder one、目的分子量:332 bp、①、②はそれぞれ2-6に示したプライマーとバイサルファイト処理を行ったサンプルを用いて反応させた。

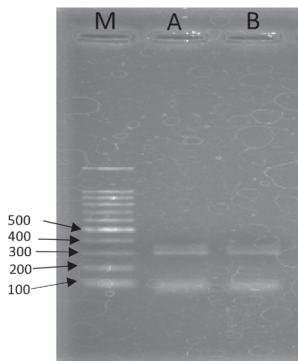


Fig.9 制限酵素処理によるメチル化の確認

M:100 bp DNA Ladder one、目的分子量:291 bp, 41 bp、AおよびBはバイサルファイト処理を行ったDNAサンプルに対して制限酵素処理を行った。

と考えている。

3-5 単一細胞におけるチロシナーゼ遺伝子発現評価

実際のエピジェネティックな評価では、どのシトシンにメチル基が入っているかを解析する必要があるが、細胞集団に対してではなく、個々の細胞に対して行うことにより、より厳密な評価を行えると考えた。そのための、単一細胞での基礎実験を試みた。

細胞培養後、Pico-Pipet を用いて白色細胞、黒色細胞1つずつ分取し、RNA 抽出を行い、cDNA 作成しチロシナーゼ遺伝子発現評価を行った結果、どちらの細胞においても遺伝子発現が確認された。このことから、単一細胞での遺伝子発現の評価を行うことが示された (Fig.10)。

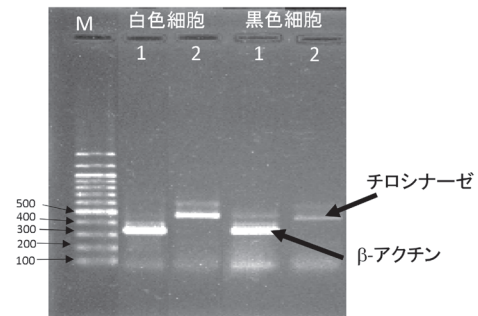


Fig.10 単一細胞における遺伝子発現評価

M:100 bp DNA Ladder one、1はβ-アクチンの遺伝子発現評価、2はチロシナーゼの遺伝子発現評価

3-6 単一メラノーマ細胞における DNA 配列の解析

1つの白色細胞および黒色細胞を直接 PCR 反応させ、遺伝子保持の確認を行った結果、いずれの単一細胞からも目的分子量付近にバンドが確認された (Fig.11)。

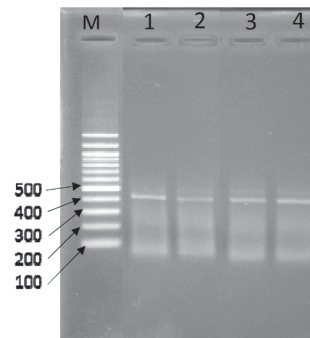


Fig.11 単一細胞における遺伝子保持の泳動結果

M:100 bp DNA Ladder one、目的分子量:477 bp、1、2は単一白色細胞におけるチロシナーゼ遺伝子、3、4は単一黒色細胞におけるチロシナーゼ遺伝子

Fig.11 の遺伝子保持の確認が行えたサンプルを用いて DNA シークエンサーで配列解析を行った。

データベース上のチロシナーゼ配列を Fig.12、シーケンサーで得られた配列を Fig.13 に示した。

Fig.12 と Fig.13 を比較した結果、100%一致した。このことから、単一細胞での配列解析が行えることが示された。

```
GGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCTGCCAGGATATCCTCTGTCCAGTGACCATCTGGACCTCAGTTCCTCCCTTC
AAAGGGGTGGATGACCGTGAGCTGCGCCCTCTGTGTTTTATAATAGGACCTGCCAGTGCTCAGGCACTTCAT
GGGTTTCAACTCGGGAACGTGAAGTTGGATTGGGGGCCAAATGTACAGAGAAGCGAGCTTGATTAGA
AGAAACATTTTGGATTGAGTGTCTCCGAAAAGAATAAGTTCTTTCTTACCTCACTTAGCAAAACATACTATCA
GCTCAGTCTATGTCATCCCAAGGCACCTATGGCCAAATGAACAATGGGTCAACACCCATGTTAATGATATCA
ACATCTACGACCTCTTTGATGGATGCACTTACTATGTCAAGGGACACACTGCTGGGGGCTCTGAAATATGGA
GGGACATTGATTTGCCCATGAAGCACCA
```

Fig.12 データベース (NCBI) 上のチロシナーゼ配列

```
GGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCTGCCAGGATATCCTCTGTCCAGTGACCATCTGGACCTCAGTTCCTCCCTTC
AAAGGGGTGGATGACCGTGAGCTGCGCCCTCTGTGTTTTATAATAGGACCTGCCAGTGCTCAGGCACTTCAT
GGGTTTCAACTCGGGAACGTGAAGTTGGATTGGGGGCCAAATGTACAGAGAAGCGAGCTTGATTAGA
AGAAACATTTTGGATTGAGTGTCTCCGAAAAGAATAAGTTCTTTCTTACCTCACTTAGCAAAACATACTATCA
GCTCAGTCTATGTCATCCCAAGGCACCTATGGCCAAATGAACAATGGGTCAACACCCATGTTAATGATATCA
ACATCTACGACCTCTTTGATGGATGCACTTACTATGTCAAGGGACACACTGCTGGGGGCTCTGAAATATGGA
GGGACATTGATTTGCCCATGAAGCACCA
```

Fig.13 シークエンサーで得られた配列

4. まとめ

本研究により、メラノーマ細胞において、白色、黒色細胞を選別できること、また、黒色細胞の方がチロシナーゼ遺伝子の発現量が多いことを例証できた。また、細胞の表現型の違いが、エピジェネティックな影響を受けている可能性が示唆された。更に、単一細胞における遺伝子発現、配列解析が行えたことより、本手法が個々の細胞でのエピジェネティクス解析に適用であることが可能であり、細胞の発現状態の差異を評価するための有用な手段になりえることが示唆された。

参考文献

- [1] 八谷輝：エンドセリンと SCF からみたシミの精製メカニズム研究、最新のメラニン研究と美白剤の開発 フレグランスジャーナル 臨時増刊号 No. 18, 9(2003)
- [2] H.-C. Chao, H. Najjaa, M. O. Villareal, R. Ksouri, J. Han, M. Neffati and Hiroko Isoda: *Arthrophytum scoparium* inhibits melanogenesis through the down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expressions in B16 melanoma cells. *Experimental Dermatology*. **22**, 131, (2013)
- [3] P. J. Rochettea, S. Lacoste, J.-P. Therriena, N. Bastien, D. E. Brashc, and R. Drouin: Influence of cytosine methylation on ultraviolet-induced cyclobutane pyrimidine dimer formation in genomic DNA. *Mutation Research*. **7**, 665, (2009)
- [4] V. J. Hearing : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *J Investing Dermatol., Symp. Proc.*, **4**, 24, (1999)
- [5] H. Ou-Yang, G. Stamatias, and N. Kollias : Spectral response of melanin to ultraviolet A irradiation, *J Invest Dermatol.*, **122**, 492, (2004)
- [6] Z. Qiao, Y. Koizumi, M. Zhang, M. Natui, M. J. Flores, L. Gao, K. Yusa, S. Koyoda, and T. Sugiyama: Anti-Melanogenesis Effect of *Glechoma hederacea* L. Extract on B16 Murine Melanoma Cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **76**, **10**, 1877, (2012)

- [7] D. H. Nguyen, D. T. M. Nguyen, L. -H. La, S. -H. Yang, H. -B. Lee, H. -J. Kim, J. -H. Shin, D. M. Kim and E. -K. Kim: Depigmenting effect of *Cinnamomum cassia* Presl in B16F10 melanoma cells. *Korean Journal of Chemical Engineering*. **24**, **5**, 827, (2007)
- [8] K. Sato, K. Sato, H. Takahashi, R. Iraha, and M. Toriyama: Down-Regulation of Tyrosinase Expression by Acetylsalicylic Acid in Murine B16 Melanoma. *Pharmaceutical Society of Japan*. **31**, **1**, 33, (2008)
- [9] Y. -J. Kwak, K. S. Kim, K. M. Kim, H. Y. Yu, E. Chung, S. J. Kim, J. Y. Cha, Y. C. Lee, and J. H. Lee: Fermented *Viola mandshurica* Inhibits Melanogenesis in B16 Melanoma Cells: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **75**, **5**, 841, (2011)
- [10] J. -H. Koo, I. Lee, S. -K. Yun, H. -U. Kim, B. -H. Park, J. -W. Park: Saponified Evening Primrose Oil Reduces Melanogenesis in B16 Melanoma Cells and Reduces UV-Induced Skin Pigmentation in Humans. *Springer Journal Archive*. **45**, 401, (2010)
- [11] M. Masuda, K. Itoh, K. Murata, S. Naruto, A. Uwaya, F. Isami, and H. Matsuda: Inhibitory Effects of *Morinda citrifolia* Extract and Its Constituents on Melanogenesis in Murine B16 Melanoma Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **35**, **1**, 78, (2012)
- [12] F. G. Pérez-Gutiérrez, S. Camacho-López, R. Evans, G. Guillén, B. S. Goldschmidt, J. A. Viator, and G. Aguilar: Plasma Membrane Integrity and Survival of Melanoma Cells After Nanosecond Laser Pulses . *Annals of Biomedical Engineering*. **38**, **11**, 3521, (2012)
- [13] M. Isabelle, G. - F. Yolene, O. Gilles, B. Arlette, C. Karine, D. Nouha: In Vivo Study of Age-Related Skin Changes Using in Vivo Confocal Microscopy. *IFSCC Mag*. **15**, **1**, 15 (2012)