

論文内容要旨

第一章 序 論

哺乳類の色素細胞であるメラノサイトには、メラノソームと呼ばれる色素顆粒が含まれている。下等脊椎動物ではメラノソームを始め何種類かの色素顆粒が、様々な刺激に反応して細胞内を移動することが知られており、それに関する報告は多い(Bagrara and Hadley, '73)。しかし哺乳類のメラノサイトについては、メラノソームの移動に関する報告は少ない。Jimbowら('76)はヒト皮膚に紫外線を照射してメラノソームの挙動を観察し、樹状突起(デンドライト)の形成と、メラノソームの移送に10 nmフィラメント(いわゆる intermediate filament)が関与していると報告している。またハツカネズミ表皮メラノサイト(Hirobe, '78)や培養ヒト表皮メラノサイト(喜多野, '74)に色素細胞刺激ホルモンやテオフィリンなどの処理を行った実験では、デンドライトの伸長とメラノソームの遠心的移動が平行して観察されており、両者が密接に関連していると考えられている。

一方ハツカネズミには多くの突然変異が知られており、種々の形質の遺伝子支配を調べるのに利用されている。色素形成に関係する遺伝子の中にはメラノサイトの形態とメラノソームの細胞内分布に異常を生ずるものがある(Silvers, '79)。そのうち最もよく調べられているのは、d遺伝子座である。d/dホモ接合体メラノサイトでは、メラノソームは核付近に凝集し、デンドライトは細く少数であるため、毛色に対し希釈効果を示す(Markert and Silvers, '56)。d遺伝子座はメラノサイト内で発現していると考えられているが(Gerson and Szabó, '68; Reed, '88; Reed and Henderson, '40)、神経系でも何か機能を持っている可能性がある(Kelton and Rauch, '62)。d/dホモ接合体メラノサイトの形態的観察からは、メラノソームの凝集の原因として、メラノソームどおしやメラノソームと核の付着(Moyer, '66)や、デンドライトの不十分な発達による空間的制約(Rittenhouse, '68)などが考えられている。

このように哺乳類のメラノサイトでは、細胞内でのメラノソームの挙動に関する報告は少なく、その理解は不十分である。またd遺伝子座とメラノサイトの形態、メラノソームの挙動との関係も十分明らかではない。本研究は、メラノソームの細胞内移動を支配する機構と、その機構の中でのd遺伝子座の役割を明らかにすることを目的として行われた。

第二章 メラノソームの移送、分布を観察するための細胞培養

メラノソームの挙動を観察するためには、細胞を培養し、二次元に広げて観察する方法が有用である。そこでハツカネズミ新生児の背皮膚より初代培養されたメラノサイトと、培養細胞として確立されたメラノーマ細胞を培養し使用した。背皮膚よりの初代培養は、背皮膚小片をトリプシン処理により表皮と真皮に分離し、更に表皮のみをトリプシン処理後、解離する方法により成功した。

第三章 細胞培養における d 突然変異体メラノサイトの観察

ハツカネズミの系統のうち、C57BL/6J (遺伝子型 a/a ; B/B ; D/D) と DBA/2J (a/a ; b/b ; d/d)、および両系統の F1 に DBA/2J をくり返し、もどし交配して得た N6 (a/a ; b/b ; D/d および a/a ; b/b ; d/d) を使用した。これらハツカネズミの新生児背皮膚よりメラノサイトを初代培養し、各遺伝子型と微細構造の関係を調べたところ、 D/D ホモ接合体メラノサイトおよび D/d ヘテロ接合体メラノサイトでは、メラノソームは細胞周辺に局在し、ミトコンドリアや小胞体は、内側寄りに分布することが多かった。デンドライト内には、微小管や 10 nm フィラメントが比較的分散して含まれていた。これに対し d/d ホモ接合体メラノサイトでは、メラノソームの大部分は核付近に凝集していた。細いデンドライト内には、メラノソームはほとんど含まれず、小胞体、ミトコンドリアそれに多数の微小管と 10 nm フィラメントが含まれていた。デンドライト内にメラノソームを含まない空間が見られることは、メラノソームの凝集が単にデンドライトの不十分な発達による空間的制約によるのではないことを示していると同時に、デンドライトの伸長とメラノソームの移送とが独立の現象である可能性を示している。

第四章 メラノーマ細胞を用いたメラノソーム移送の誘導

培養メラノーマ細胞内でメラノソームが細胞周辺に局在することは、以前から知られており (Hu et al., '64)、その様子は、皮膚から初代培養されたメラノサイト内でのメラノソームの分布に類似している。そこで実験が容易な培養メラノーマ細胞にサイトカラシン B (CB) と dimethylformamide (DMF) 処理を行ってメラノソーム移送を誘導し、メラノソームが局在化する過程を観察した。

B16 マウスメラノーマの *subline* NC では、デンドライトの形成と、メラノソームの細胞周辺への局在が顕著である。2 μ g/ml CB で処理すると 30 分以内にメラノソームが局所的に凝集し、更に求心的移動を開始した。その結果メラノソームは核付近に凝集するが、この際ミトコンドリアや小胞体の分布には大きな変化は無かった。対照区 (0.2% dimethylsulfoxide 処理) では、メラノソームの凝集は全く見られなかった。CB で 24 時間処理後、正常な培養液に移すと、核付近に凝集していたメラノソームは遠心的移動を開始した。この際、メラノソームは細胞周辺に位置していた。また個々のメラノソームは、微小管や 10 nm フィラメントと直接に接しており、これらを囲むように断片様の小胞体が見られた。微小管とメラノソームの間にはひげ状構造が見られることがある。

一方 *subline* N では、メラノソームは核付近に片寄って分布している。1% DMF で処理すると 3~4 日でメラノソームが周辺に局在するようになり、この効果は 6~9 日の処理で顕著となった。DMF 処理後の細胞内には、微小管や 10 nm フィラメントが多数見られるようになり、これらの構造とメラノソームの間にはひげ状構造や網目状構造が見られた。

以上、CBとDMF処理による実験から、メラノーマ細胞内には、求心および遠心方向にメラノソームの移送機構があること、およびその移送は、ミトコンドリアや小胞体の分布とは独立して働きの意味で、メラノソーム特異的であることが示唆される。特に遠心的移送については、微小管や10 nmフィラメントの関与が示唆される。

第五章 メラノーマ細胞における d 類似突然変異株の観察

培養メラノーマ細胞の subline agm (aggregated melanosomes) はメラニン合成が盛んでありながらメラノソームは核付近に凝集しており、デンドライトは細長く、メラノソームを含まないという変異株である。これらの形質は d/d ホモ接合体メラノサイトに類似している。そこで agm の細胞を観察し、d/d ホモ接合体メラノサイトと対比、検討した。

agm の細胞では、メラノソームが核付近に凝集するのみでなく、ミトコンドリアと小胞体も核付近に片寄る傾向があった。特に凝集が顕著な細胞では、微小管や10 nmフィラメントも核を取巻くように分布していた。一方デンドライト内にはミトコンドリアと小胞体が見られ、多数の微小管や10 nmフィラメントが束を形成していた。特に、微小管の多いデンドライトは、d/d ホモ接合体メラノサイトのそれに類似しており、断片様の小胞体や外側に押出されたミトコンドリアが見られた。

以上の観察は、微小管と10 nmフィラメントの伸展と方向性は、三次元的配置とは別に調節されることを示している。すなわちデンドライトのような非対称性突起を形成する細胞では、デンドライトが形成されること自体は、その細胞の微小管と10 nmフィラメントの系が正常であることを必ずしも意味しない。むしろその三次元的配置に注目する必要があると思われる。

第六章 論 議

今回の実験により、メラノーマ細胞内でメラノソームが遠心的および求心的移動を行うこと、更にその移動がメラノソーム特異的であることが示唆された。特に遠心的移動には、微小管と10 nmフィラメントが密接に関連していると思われる。一方 agm 変異細胞では、微小管と10 nmフィラメントの三次元的配置に異常がありながら細長いデンドライトが形成される。その微細構造は d/d ホモ接合体メラノサイトのデンドライトに類似していることから、d/d ホモ接合体メラノサイトの異常も、これら細胞骨格に関連した異常であると推定される。

論文審査の結果の要旨

小山洋一提出の学位論文はハッカネズミの色素細胞(メラノサイト)における色素顆粒(メラノソーム)の移送機構に関する研究である。両生類や魚類においてはメラノソームの細胞内移動は顕著な現象であり、その機構に関する解析も進んでいるが、哺乳類においてはメラノソームの移動は人為的に誘導できず、その機構を論ずることは困難であった。この論文では、まず培養条件においてメラノソームの細胞内移動を観察するための、色素細胞培養法を開発し、解離された色素細胞の細胞培養を行った。次にd(dilution)遺伝子をもち、淡色となるハッカネズミの新生児皮膚と野生型のハッカネズミ皮膚からメラノサイトを解離培養し、電子顕微鏡観察を行った。その結果、d/dホモ接合体では樹枝状突起が形成されているにも拘らず、樹枝状突起にメラノソームが移動せず核付近に凝集していることが観察された。この結果は樹枝状突起の形成とメラノソームの移送とが独立であることを示している。

一方、がん化した色素細胞であるメラノーマ細胞においてメラノソームの移動を人為的に誘導する試みを行い、メラノソームが核付近に集合している細胞においてはdimethylformamide(DMF)による拡散が、又メラノソームが細胞縁辺に局在している細胞においてはcytochalasin B(CB)によって凝集が誘導されることを明らかにした。この際、遠心的移動を行っている細胞ではメラノソームが微小管や10nm-フィラメントと接しており、メラノソームと微小管の間にはひげ状構造が観察された。このことからメラノソームの移送には微小管と10nm-フィラメントの関与が示唆された。また、メラノソームの移動とミトコンドリアや小胞体など他の細胞内器官の移動には直接の関係のないことが明らかになった。

また、培養メラノーマ細胞において、メラノソームが核付近に凝集している変異体(agm)を分離し、この細胞がd/dホモ接合体のメラノサイトに類似することを認めた。この場合も細胞骨格をもつ樹枝状突起は観察されたが、その微小管や10nm-フィラメントの配置には異常があった。

以上、小山洋一提出の論文は哺乳類の色素細胞にもメラノソーム移送の機構があり、その機構には微小管と10nm-フィラメントが関与し、遺伝子の支配下にあることを明らかにしたものであり、色素細胞の機能に関する新しい知見である。また本論文は小山洋一が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。

よって、小山洋一提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。