

氏名・(本籍)	たま 玉	て 手	ひで 英	とし 利
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理	博	第	8
	3	1	号	
学位授与年月日	昭和 58 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻			
学位論文題目	ハツカネズミにおけるフェオメラニン形成の遺伝子支配に関する研究			
論文審査委員	(主査)			
	教	授	樋	渡
	宏	一	教	授
			小	西
			和	彦
			教	授
			竹	内
			拓	司
			助	教
			井	出
			宏	之

論 文 目 次

- I. 序 説
- II. 第一部：毛球内色素細胞における A^y 及び e 遺伝子の働き
- III. 第二部：表皮色素細胞における A^y 及び e 遺伝子の働き
- IV. 総合論議
- V. 要 約

論文内容要旨

I. 序説

多細胞生物では、組織間相互作用を介して働く遺伝子が多く知られている。これらの遺伝子は、発生、分化の過程で重要な役割を果たしていると考えられるが、その機能については未知の点が多い。本研究はそのような遺伝子の作用機構を明らかにする事を目的として、ハツカネズミ (*Mus musculus*) のメラニン形成に関与する2種類の遺伝子座；*a*(agouti)遺伝子座と *e*(*e*-*extension*)遺伝子座の作用機序を解析したものである。

哺乳類では、毛色を構成する色素として黒色メラニン(ユウメラニン)と黄色メラニン(フェオメラニン)の2種類が存在する。これらは、いずれも皮膚の毛球内に存在する色素細胞(毛球内色素細胞)によって産生される。色素細胞で、いずれのメラニンが産生されるかに関しては、*a*遺伝子座と *e*遺伝子座が決定している。

従来の知見から、*a*遺伝子座は色素細胞自体で発現するのではなく、色素細胞をとりまく組織環境中で発現し、間接的に色素細胞の形質発現を支配する事が示されている。したがって、*a*遺伝子座は、組織間相互作用を介して働く遺伝子のひとつと考えられる。本研究では、*a*遺伝子座の対立遺伝子として、優性対立遺伝子でフェオラミン形成をおこなう *A^y* (*lethal yellow*)、劣性対立遺伝子でユウメラニン形成をおこなう *a*(*non-agouti*)の2者を取りあげ、その機能を解析した。また、*e*遺伝子座は色素細胞自体で発現すると考えられているので、その劣性対立遺伝子でフェオメラニン形成をおこなう *e*(*recessive yellow*)を取りあげ、同様の解析をおこなった。

第一部では、*a*遺伝子座の情報を色素細胞に伝える因子を明らかにする目的で、*A^y*遺伝子及び *e*遺伝子の働きを人為的に変更する事を試みた。

さらに、第二部では、*a*遺伝子座の組織特異的発現について、組織化学的手法により、検討を加えた。

II. 第一部：毛球内色素細胞における *A^y* 及び *e* 遺伝子の働き

(序論) *A^y* 遺伝子及び *e* 遺伝子の発現は、毛球内色素細胞ではフェオメラニン産生を指標として認識される。これらの遺伝子の作用機序を解析する目的で、フェオメラニン産生に影響を及ぼす諸要素が調べられてきた。Geschwind et al は *A^y/a* マウスに α -MSH (α -色素細胞刺激ホルモン)を注射しユウメラニン産生がおこる事も見いだした。また、Ikejima & Takeuchi は紫外線照射が同様の結果をもたらす事を報告している。しかし、これらの研究は、個体を対象としたために体液環境や神経調節等の影響を除外できなかった。

本研究では、この点を解決するために、皮膚の器官培養をおこない、直接、毛球内色素細胞でのフェオメラニン合成に対する α MSH, DbcAMP 等の効果を検討した。

(材料及び方法) 実験動物として、フェオメラニン産生をおこなっている、C57BL16J-*A^y* (遺伝子型 *A^y/a*, *E/E*)と C57BL16J-*e*(遺伝子型 *a/a*, *e/e*)の新生児を用いた。

器官培養は、生後7日令個体の背側皮膚を材料として Takeuchi et al の方法でおこなった。培養液として、F12 に牛胎児血清を10%加えたものを用いた。37°Cで48時間培養した後、組織を固定し、光学顕微鏡及び電子顕微鏡によって色素細胞中のメラニンの種類を同定した。

(結果) 結果は以下のとおりとした。

1. 培養液のみで培養した場合には、 A^y/a , e/e いずれも毛球内色素細胞中にも、フェオメラニンのみが認められた。
2. α MSH 存在下で培養した場合には、 A^y/a 毛球内ではユウメラニン産生が認められた。ユウメラニンは、 α MSH 処理後12時間以内に出現する事が確認された。
3. α MSH 存在下で培養した場合には、 e/e 毛球内ではフェオメラニンのみが認められた。
4. DbcAMP 存在下で培養した場合には、 A^y/a , e/e のいずれの毛球内でもユウメラニンが認められた。
5. 電子顕微鏡による観察で、ユウメラニンが出現した毛球内色素細胞はユウメラニンが特徴的な細胞内構造(ユウメラノソーム)を持つ事が確認された。
6. A^y/a 毛球を α MSH 存在下で培養し、同時に、actinomycin D または cycloheximide を加えたところ、ユウメラニン産生は認められなかった。

(考察)

本研究の結果により、皮膚のみをとりだした in vitro の系において α MSH によって A^y/a 毛球でのユウメラニン合成が誘導される事が確認された。したがって、 α MSH は A^y/a のユウメラニン合成に関しては、皮膚に直接作用すると考えられる。また、従来の知見では、cAMP が、ユウメラニン産生を誘導するか、明らかでなかった。本研究では、cAMP もユウメラニン産生を誘導する結果が得られた。したがって α -MSH は色素細胞の cAMP レベルを上昇させる形でユウメラニン産生を誘導している事が考えられる。

従来の知見では e/e 毛球においてユウメラニン産生が誘導された例はない。したがって、 e/e 色素細胞が、ユウメラニン産生能を保持しているかについては不明であった。本研究の結果から、 e/e 色素細胞もユウメラニン産生能を持つ事が明らかとなった。また、 e/e 色素細胞は、 α MSH に対しては反応を示さなかった事から、 α MSH の受容部位に、何らかの異常を生じる可能性も示唆される。

以上の事から、毛球内色素細胞における A^y 遺伝子と e 遺伝子の機能については、以下のような仮説が考えられる。 A^y 遺伝子は、毛球内で、 α MSH と拮抗する因子を産生しており、 A^y/a 個体は α MSH がこの因子と競合するために、色素細胞の cAMP レベルが上昇せず、ユウメラニンが産生されない。過剰の α MSH を加えることによって、はじめて、ユウメラニンが産生される。一方、 e/e 個体では、 e 遺伝子の効果により、色素細胞の α MSH に対する感受性が低下している。そのため、cAMP レベルが上昇せず、ユウメラニンが産生されない。cAMP を直接加えることによってのみ、ユウメラニン産生が開始される。以上の仮説を想定すると、従来の知見の統一的な解釈が可能である。

III. 第二部：表皮色素細胞における A^y 及び e 遺伝子の働き

(序論) 従来の研究では、 A^y 遺伝子、 e 遺伝子のいずれも毛球構造内でのみ発現する事が示されてきた。しかし、毛球のような特殊な組織構造が形質発現に必須であるのかについては不明である。したがって、この点を検討する目的で、毛球以外の部域における両遺伝子の効果を検討した。特に、毛球と同種の細胞集団で構成される表皮に注目し、表皮色素細胞に対する A^y 及び e 遺伝子の影響を調査した。

(材料と方法) 実験動物として、フェオメラニン産生をおこなっている C57BL16st- A^y 系の A^y/a 個体、C57BL16J- e 系の e/e 個体、ユウメラニン産生をおこなっている C57BL16st- A^y 系の a/a 個体を用いた。

色素細胞を検出する手段として、Dopa 反応及び、Dopa premelanin 反応を用い、新生児及び胎児の背側皮膚を材料として、組織化学をほどこした。

器官培養、電子顕微鏡と光学顕微鏡による観察は、第一部と同様の方法でおこなった。

(結果) 結果は以下のとおりである。

1. A^y/a 新生児表皮では、Dopa 反応陽性細胞はほとんど検出されなかった。一方、 a/a 及び e/e の表皮では多数の Dopa 反応陽性細胞が観察された。
2. A^y/a 新生児真皮では、 a/a 真皮と同様の Dopa 反応陽性細胞が検出された。
3. A^y/a 新生児表皮では、Dopa-premelanin 反応陽性細胞が検出されたが、細胞数は a/a 表皮に対し、有意に低い値を示した。
4. A^y/a 個体と a/a 個体の交配により生じた胎児集団は表皮の Dopa-premelanin 反応陽性細胞数に関して、 $200\sim 300\text{cell}/\text{mm}^2$ を中心とする集団と、 $500\sim 600\text{cell}/\text{mm}^2$ を中心とする集団の、2 集団から構成されていた。
5. A^y/a 皮膚を αMSH または DbcAMP 存在下で器官培養し、Dopa 反応陽性細胞数の変化を検討したが、有意な増加は認められなかった。
6. A^y/a 表皮を電子顕微鏡で観察した結果、多数の clear cell が認められた。

(考察)

これまで、 A^y 遺伝子は毛球内でのみ発現していると考えられてきたが、本研究の結果より、表皮色素細胞においてもその効果が認められる事が示された。したがって、 A^y 遺伝子の発現によって、毛球構造は必ずしも不可欠の要素ではない事が明らかである。

A^y/a 表皮では、Dopa 反応陽性細胞は認められないが、Dopa-premelanin 反応陽性細胞は観察された。Dopa 反応は、チロシナーゼ活性化以降の色素細胞、Dopa-premelanin 反応は、メラノソーム形成以降の色素細胞を検出するものと考えられる。したがって、 A^y/a 表皮では、大部分の色素細胞がチロシナーゼ活性化以前の段階にとどまっている事が示唆される。この点を明らかにする目的で、電子顕微鏡による観察をおこなったところ、未分化な色素細胞と思われる clear cell が A^y/a 表皮では多数認められた。

また、未分化な色素細胞の分化を促進させる目的で、器官培養で、 A^y/a 皮膚に α MSH または DbcAMP を加えたが、Dopa 反応陽性細胞数に変化はなかった。

真皮においては、 A^y/a 、 a/a ともに Dopa 反応陽性細胞が認められた。したがって、 A^y 遺伝子の効果は表皮に限定される事が考えられる。

以上から、 A^y 遺伝子は表皮でも働き、表皮色素細胞を、チロシナーゼの活性化以前の段階にとどめておく事が考えられる。一方、 e 遺伝子は表皮においては、その影響が認められなかった。したがって、 e 遺伝子の場合、毛球内で特異的に発現している事が示唆される。

IV. 総合論議

本研究の結果より、 A^y 遺伝子は、色素細胞の α MSH-cAMP 系情報受容機構に介入する形で機能している可能性が示唆された。 A^y 遺伝子が働いた場合には、結果として、色素細胞内の cAMP レベルが低下する事が推察される。一方、 e 遺伝子は、色素細胞の α MSH 受容機構自体に何らかの異常をもたらしている事が示唆された。 e 遺伝子は A^y 遺伝子や a 遺伝子に対し上位であるが、この事は、 e 遺伝子が色素細胞の感受性自体を低下させていると仮定すれば、説明が可能である。

さらに、 A^y 遺伝子は表皮色素細胞に対しても影響を及ぼしている事が示された。したがって、 A^y 遺伝子は、毛球だけでなく、表皮全体で発現している事が考えられる。表皮は、大部分がケラチン産生細胞と、その派生物で構成されている。そのため、 A^y 遺伝子の解析は表皮を材料とした方が、より単純化されると思われる。今後は、表皮を用いて、 α MSH-cAMP系に介入するような因子が、組織中のいかなる要素に由来するのかを明らかにしていく事が望まれる。

V. 要 約

1. A^y/a 毛球内色素細胞は α -MSH または DbcAMP で処理した場合、ユウメラニンを産生する。したがって A^y 遺伝子は α -MSH-cAMP 系に介入する形で色素細胞の形質発現に関与していると考えられる。
2. e/e 毛球内色素細胞は α -MSH 処理ではユウメラニンを産生しないが、DbcAMP 処理ではユウメラニンを産生する。したがって e 遺伝子は色素細胞の α -MSH 受容機構に直接影響を及ぼしていると考えられる。
3. A^y 遺伝子は、毛球内だけでなく表皮でも発現し、表皮色素細胞を最終分化以前の段階にとどめておく事が明らかとなった。したがって、 A^y 遺伝子の発現にとって、毛球構造は必須の要素とならない事が示唆される。
4. e 遺伝子は、表皮色素細胞に対しては、明確な影響を与えない事が示された。したがって、 e 遺伝子の発現は、毛球内に限定される事が示唆される。

論文審査の結果の要旨

ハツカネズミの毛球内色素細胞は2種類のメラニン(黒色のユウメラニンと黄色のフェオメラニン)を産生することができるが、いずれのメラニンを生成するかはその毛包組織環境を規定する *a* 遺伝子座の遺伝子によって決められる。この論文はハツカネズミの皮膚において働く *a* 遺伝子座の作用を明きらかにするために、フェオメラニンのみを生成する遺伝子型 (A^y/a) の皮膚を培養し、ユウメラニン生成への誘導を試みた。先ず α -MSH(色素細胞刺激ホルモン) 処理によって培養開始後12時間内にユウメラニンが出現することを明らかにし、さらに cAMP(サイクリックアデノシン一リン酸) 処理によっても同様の変化がおこることを認めた。この結果は細胞内の cAMP 濃度が上昇するとユウメラニン生成が行われること、および A^y 遺伝子の産物が色素細胞の表面において MSH と相互作用する物質であることを示している。また、同様にフェオメラニンのみを生成する別の遺伝子座の突然変異体 (*e/e*) の皮膚を用いて同様の実験を行った。その結果、*e/e* 遺伝子型においては cAMP によってユウメラニン生成が誘導されるが、 α -MSH によっては誘導されないことを認めた。この結果は *e* 遺伝子座が α -MSH 受容体の機能の一部を支配している可能性を示唆している。一方、表皮の色素細胞に *a* 遺伝子座および *e* 遺伝子座の突然変異がどのように影響するかを検索したところ、野生型 (*a/a*) においては新生児の表皮に多数のチロシナーゼ活性をもつ色素細胞が認められたが、 A^y/a 遺伝子型の個体においては表皮にチロシナーゼ活性をもつ細胞は殆ど認められなかった。従来 A^y 遺伝子は毛球の色素細胞にのみ影響を与えられて来たが、この事実から表皮においても色素細胞に対して抑制的に働いていることが明きらかになった。しかし、*e/e* 遺伝子型の表皮における活性色素細胞の数は野生型と差がなく、この遺伝子が表皮では働いていないことが示唆された。

これらの成果はハツカネズミ色素細胞における遺伝子発現に関する新しい知見であり、高等動物における遺伝子発現調節の研究に大きい寄与をなすものである。したがってこの論文は著者がこの分野において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おり、よって玉手英利提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。