



### 第三章 結 果

第一節 アフリカツメガエル成体における色素パターン

第二節 皮膚におけるメラノブラストの存在

第三節 皮膚に存在するメラノブラストの分化能

第四節 皮膚に存在するメラノブラストの分化に対する，背側と腹側の皮膚因子の影響  
——皮膚黒色素胞前駆体を用いた検定 ——

第五節 黒色素胞の分化に対する，チロシンとウシ胎児血清（FCS）の影響

第六節 背側と腹側の皮膚に含まれる，黒色素胞の分化を調節する因子の検定  
——神経管を用いた検定 ——

第七節 背側と腹側の皮膚に含まれる，黒色素胞の分化を調節する因子の検定  
——神経褶を用いた検定 ——

### 第四章 議 論

第一節 ドーパ反応陽性細胞とメラノブラスト

第二節 黒色素胞の分化を調節する因子

第三節 色素パターン形成機構の考察

### 第五章 要 約

謝 辞

引用文献

図 表

## 論文内容要旨

パターン形成の問題は、生物学の中でも重要な問題の一つである。発生に伴い動物の体表にさまざまな模様が形成されることは、特に色素パターン形成と呼ばれている。しかし、色素パターン形成の分子機構は、ほとんど解明されていないのが現状である。本研究では、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を用いて色素パターン形成機構の解析を行なった。

アフリカツメガエルの皮膚には、(A) 背腹軸に沿った色彩の極性と、(B) 背側における斑紋 (斑点模様) が存在する。これらの色素パターン形成には、黒色素胞の皮膚空間における発現と分布が重要な役割を果たしている。具体的には、黒色素胞の発現が背側皮膚のみで起こり腹側皮膚では起こらないことが (A) に相当し、背側皮膚の特定領域に黒色素胞が密に存在することが (B) に相当する。

パターン形成機構 (A) に関しては、以下に述べることが明らかにされた。

(i) 腹側皮膚には、分化した黒色素胞はほとんど存在しないが、ドーパ反応で検出できる未分化なメラノブラスト (黒色素胞に分化する前駆細胞) が存在した。

(ii) ドーパ反応陽性細胞は、表皮に存在し、大きさと形の点において表皮性黒色素胞と類似していた。従って、ドーパ反応陽性細胞は、表皮性メラノブラストと推定された。

(iii) 腹側皮膚に存在する未分化なメラノブラストは、黒色素胞に分化する能力を保持していた。これは、腹側皮膚を *in vitro* の適当な条件下で培養すると黒色素胞が分化してきたことから証明された。

(iv) 腹側皮膚には、黒色素胞の分化を抑制するか、あるいはメラニン形成を抑制する物質 (MIF: Melanization Inhibiting Factor) が含まれていた。

(v) MIF は、熱とトリプシン処理により失活し、分子量が 15.8 万~44.0 万の物質 (タンパク様の物質) であった。

(vi) (i)~(v) から、腹側皮膚にはメラノブラストが存在するが、その発現は、腹側皮膚に存在する MIF によって抑制されていることが示唆された。

パターン形成機構 (B) に関しては、以下のことが明らかにされた。

(i) 斑点模様部分における真皮性黒色素胞と表皮性黒色素胞の密度は、他の部分のそれよりも高かった。

(ii) 斑点模様以外の部分において、ドーパ陽性の未分化な表皮性メラノブラストが存在した。

(iii) 背側皮膚にも MIF が含まれていることが推定された。

(iv) (i)~(iii) から、斑点模様部分の皮膚では、黒色素胞の分化・増殖が促進されている可能性と斑点模様以外の部分では黒色素胞の分化・増殖が抑制されている可能性が示唆された。後者の場合には、MIF が関与している可能性が示唆された。

黒色素胞の分化に対する、チロシン、ウシ胎児血清 (FCS)、および MIF の効果も調べた。

チロシンの効果は、次の通りであった。

(i) チロシンを含まない培地 (Steinberg 液) で培養した神経冠細胞は、メラノブラストの状態に止まっていた。

(ii) (i)のメラノブラストの内部には、多数の空胞 (Vesicle) , およびアモルファス構造・フィブラス構造・ラメラ構造で特徴づけられるプレメラノソームが存在した。

(iii) 黒色素胞の分化に有効なチロシンの濃度は、0.02 mM以上 (アフリカツメガエル成体血清中の遊離チロシン濃度に匹敵する) であった。

(iv) チロシン存在下で分化した黒色素胞には、多数のメラノソームが存在した。

チロシンの作用機構としては、(a)メラニン合成の基質 (律速因子) として作用している可能性 (b)チロシナーゼを活性化するのに作用している可能性、および (c) 黒色素胞の決定・メラニン形成の誘導に作用している可能性、が考えられる。

ウシ胎児血清 (FCS) の効果は、次の通りであった。

(i) FCSを含まない培地 (Steinberg 液) で培養した神経冠細胞は、メラノブラストの状態に止まっていた。

(ii) 黒色素胞の分化に有効な FCS の濃度は 1 %以上であった。

(iii) 黒色素胞の分化に有効な濃度の FCS に含まれるチロシン濃度は、黒色素胞の分化には無効である。従って、FCS 中の有効因子はチロシンではないことがわかる。

FCS の作用機作としては、(a) 細胞内の代謝を活発化し、例えば卵黄の分解によりエネルギーとチロシンを利用し易くした可能性、(b)チロシナーゼを活性化することに作用した可能性、および (c)黒色素胞の決定・メラニン形成の誘導に作用した可能性が考えられる。

MIF (Melanization Inhibiting Factor) の効果は次の通りであった。

(i) MIF は、チロシンおよび FCS 存在下で黒色素胞の分化の抑制に有効であった。

(ii) MIF により結果として分化を抑制された神経冠細胞は、メラノブラストの状態に止まっていた。

(iii) (ii)のメラノブラストの内部には、多数の空胞 (vesicle) , およびアモルファス構造・フィブラス構造・ラメラ構造で特徴づけられるプレメラノソームが存在した。

MIF の作用機作としては、(a)メラニン形成のための基質の供給に関する調節に作用した可能性、(b)チロシナーゼ活性の調節に作用した可能性、および (c)メラノソーム形成の調節に作用した可能性が考えられる。

黒色素胞の分化を調節する MIF 様の物質は、本研究で初めて報告された。本論文では、MIF 色素パターンの関係をはじめ、脊椎動物一般の色素パターン形成機構も考察した。

## 論文審査の結果の要旨

両生類体表の色素パターン形成の問題は、古くから多くの発生学者によって研究されてきたが形成機構の物質的基礎は殆んど不明のままである。本研究はアフリカツメガエルの背腹軸に沿った色素パターンのうち、特に黒色素胞の分布を調節する因子を解析することを目的としたものである。

アフリカツメガエルの背側皮膚には多数の黒色素胞が存在するが、腹側皮膚には殆んど存在しない。しかし、腹側皮膚には多数のドーパ反応陽性のメラノブラスト（黒色素胞の前駆細胞）が存在しており、この細胞から黒色素胞へ分化する過程が、腹側皮膚環境では阻害されていると推定された。腹側皮膚組織片を培養すると、黒色素胞の出現が実際に見られた。この阻害機構を明らかにするために、変態直後の蛙の腹側皮膚で条件付けした培養液中で幼生の腹側皮膚片、メラノブラストの前駆体である神経冠細胞、さらにその前駆体である神経褶を培養したところ、いずれの場合も黒色素胞の形成は阻害された。背側皮膚で条件付けした培養液中で培養した場合は、形成阻害ははるかに弱かった。従って、腹側皮膚で条件付けした培養液中には黒色素胞形成を阻害する因子（MIFと名づける）が存在していると考えられる。条件付けした培養液を各種処理することにより、MIFの性格を調べたところ、分子量が158k～440kのたん白質と推定された。これらの知見から、生体内では、腹側皮膚環境に存在するMIFがメラノブラストから黒色素胞へ分化する過程のどこかを阻害する為に、腹側には黒色素胞が発現しないものと考えられる。なおMIFは背側皮膚にも少量存在するが、これは背側の斑点模様形成に関係するものと考えた。

これらの成果は、アフリカツメガエル色素パターン形成機構に関する新しい知見であり、脊椎動物のパターン形成の研究に大きな寄与をなすものである。従って、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、よって福澤利彦提出の論文は理学博士の論文として合格と認める。