

論文内容要旨

マウスの毛色に関する遺伝学的研究は、古くから行われており、特に、アグチ遺伝子座は、野生型でアグチと呼ばれる縞模様の毛を形成する遺伝子として知られている。ほ乳類の色素細胞（メラノサイト）は、一般に黒い色素であるユウメラニンと、黄色い色素であるフェオメラニンの2種類のメラニンを形成することができる。アグチ遺伝子座に関して野生型のマウスでは、新生児の毛の成長初期において、毛包内部に存在するメラノサイトがユウメラニンのみを生産する。やがて、生後3-4日の時期に同じメラノサイトにおいてフェオメラニン産生へのシフトが起こり、フェオメラニン産生を行った後、再び、ユウメラニン産生へとシフトすることが知られている。高等動物において、色素の形成は、一般にメラノソームと呼ばれる細胞内小器官において行われる。ユウメラニン、フェオメラニンの合成は、共通の鍵酵素チロシナーゼ (E. C. 1, 14, 18, 1) によってチロシンから始まる合成経路によって行われ、フェオメラニン合成経路はユウメラニン合成経路と途中で別れ、その後、SH化合物が加わると考えられている。しかし、メラニンは高度に重合した化合物であるため、完全に分解することは難しく、その生合成の詳細はよく理解されていない。

メラノソームで生産された色素は、メラノサイトによって、毛を構成する細胞であるケラチノサイトにメラノソームの状態で送りこまれる。そのため、成長した野生型マウスでは、メラノサイトでの色素形成の転換の結果、一本の毛の先端が黒、中央部が黄色、根元が黒というパターンが生じる。これが、アグチパターンと呼ばれるものである。アグチパターンの毛は、全体として見ると、黄色と黒色が混じり合った結果、灰色に見える。

このようなパターンを形成するアグチ遺伝子座には、黄色の毛色のみを形成する A^y 、黒の毛色のみを形成する a などの17種類の突然変異が存在することが知られている。特に、 A^y は、その全てに対して超優性の突然変異であり、種々の特異な性質を持つ突然変異でもある。 A^y は、ヘテロの状態で存在したときに毛色を黄色に変え、ホモの状態では致死遺伝子として作用する。さらに A^y 遺伝子は、ヘテロの状態で肥満、糖尿病、発ガン率の増加など種々の多面発現を示す。多面発現は、遺伝学の研究の上で、発生、分化および進化とも関連した大きなテーマの一つであり、現在その機構の解明が待たれている。そのため、分子遺伝学の手法により A^y の作用機序を解明することは、多面発現機構に関するモデルを構築する上で特に興味深いと思われる。

さらに、 A^y 突然変異体を用いた移植実験、および、器官培養系による実験から、アグチ遺伝子はメラノサイトでは発現しておらず、メラノサイトを取り囲む微小細胞環境で発現していることが示された。即ち、組織における微小環境での細胞間情報伝達系を介して作用する遺伝子であると考えられる。よって、多細胞生物において広く存在すると考えられる微小環境における細胞間情報伝達系のモデルを作成し、その遺伝子がどのような進化経路をたどって形成されたかを推論する上で、アグチ遺伝子は興味深い遺伝子とおもわれる。ここでは、アグチ遺伝子から発した情報が、どのような細胞間、細胞内の情報伝達系を用いて最終的な色素形成の転換

を行っているかを調べ、微小環境における情報伝達系のモデルを作成することを目指した。

マウスにおいて、アグチ遺伝子座の産物アグチ因子，in vivo，および，in vitro における研究から，メラノサイト表面のリセプターへの作用をめぐって α -MSH と競合すると考えられている。そこで，そのエピトープ（反応部位）が，マウス皮膚中にどの様に存在しているかを調べた。ここでは， α -MSH 抗体に代わり， α -MSH の配列をその内部に含む ACTH に対するポリクローナル抗体を用いた。免疫組織学的反応の結果，生後3.5日の C57BL/6J (A^y/a) マウス皮膚における反応部位は，表皮にではなく真皮に存在するのが観察された。ACTH は体内において分単位の半減期を持つ。そのため，脳下垂体で作られた ACTH がこの領域に特に集中しているとは考えにくい。さらに，ここで見られる反応部位は細胞の形態を保っており，真皮中でも，主に毛包下部，脂肪細胞などに近い領域に散在していた。その中には，毛包に張り付く様にしているものが頻繁にみられた。アグチ遺伝子に関する対立遺伝子 a は，突然変異によりアグチ産物が生産されていないと考えられている劣性の対立遺伝子であり，その遺伝子をホモに持つコンジェニックな a/a マウスは，ユーメラニンのみを生産する。 a/a マウスの皮膚では，このようなエピトープは観察されなかった。

A^y 遺伝子の産物の cDNA をクローニングするために，ここでは，抗 ACTH 抗体の他に，さらに，もう 1 種類の抗体を作製した。C57BL/6J (A^y/a) マウスは，C57BL/6J (a/a) マウスと遺伝的背景が同じである。このことを利用し， A^y/a マウスの皮膚のホモジネートを a/a マウスに注射し，その血清から抗 A^y 抗体を作製した。また，その脾臓細胞を PEG 法によって P6 マウスミエローマ細胞と融合させることによって 2 種類のモノクローナル抗体を得た。以上の抗体を用いて， A^y 皮膚 mRNA から作製した λ gt11 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果，十分な長さを有する cDNA クローンとして，抗 A^y 抗体に弱く反応し，抗 ACTH 抗体に強く反応する A^y11 ，抗 A^y 抗体のみに反応する A^y9 が得られた。各クローンの cDNA インサートの大きさは， A^y11 で約 2.8 bp， A^y9 で約 750 bp であった。

この A^y11 cDNA インサートをプローブとして，生後3.5日のマウス皮膚における A^y11 mRNA の分布を調べたところ， A^y11 を発現している細胞は抗 ACTH 抗体で検出される細胞と同様の存在パターンを示す事がわかった。真皮内にこの様に散在する細胞の候補として，ランゲルハンス細胞，及び，マスト細胞などの造血系由来の細胞などが考えられる。

次に， A^y11 の mRNA の全鎖長をノーザンハイブリダイゼーションを行い調べた。その結果， A^y/a マウス皮膚中の mRNA は，約 3.6 Kb であった。よって，この A^y11 cDNA は約 0.8 kb の欠失を持つと思われる。さらに，C57BL/6J (a/a) のマウス皮膚の mRNA を A^y11 cDNA をプローブにして調べた。その結果， A^y/a の場合より短い約 2.9 kb の位置にバンドが検出された。この結果は，劣性の対立遺伝子 a が欠失突然変異によってできた可能性を示唆する。欠失の結果， a はアグチ因子を生産できる他のアグチ遺伝子の対して劣性になったと考えられる。ここで，野生型のアグチ遺伝子を持つアルビノマウス BALB/c (A/A) の場合，あまり鮮明なバンドは見られなかった。しかし，その位置は a/a と異なり A^y とはあまり変わらないと思われる。

よって、 A^y という突然変異は、発現調節に何らかの変異が起こり、アグチ因子を常に発現するようになったものと考えられる。

つぎに、 A^y11 DNA の塩基配列の決定を行った。その塩基配列は 2809 bp よりなり、3'末端にはポリ A は存在せず、ポリアデニレーションシグナルも、また見付からなかった。得られた塩基配列より、 A^y11 DNA は 2085 bp のオープンリーディングフレームを持ち、5'末端に 22 bp、3'末端に 703 bp のノンコーディングな領域を持つと思われる。次に、このオープンリーディングフレームの塩基配列から予想されるタンパク質のアミノ酸配列を推定した。その中には、連続して ACTH ときわめて似ている領域はなかった。しかし、ACTH の配列の内、 α -MSH と共通な部分は C 末端の 13 アミノ酸であり、その中でも MSH の活性に必要なのは N-HFRW-C のテトラペプチドであることが知られている。この部分と逆の配列として、 A^y11 のコードするタンパク質は WRSH の配列を持ち、MSH でフェニルアラニン (F) である部分がセリン (S) に置き変わっている。この配列が、 A^y11 のコードするタンパク質が MSH としての作用をもつことを阻害しているとも思われる。

ACTH は、副腎皮質刺激ホルモンとして、副腎の糖質コルチコイドの分泌を促進し、細胞内におけるタンパク質の分解を促す。ここでの結果は、 A^y の産物が、副腎皮質の細胞上の ACTH リセプターをめぐる、ACTH と競合している可能性を提示する。 A^y 産物は、ACTH と競合することにより、副腎皮質からの糖質コルチコイドの分泌を阻害し、そのため、 A^y マウスはより空腹を感じる機会が多く、食飼量も増え、肥満という多面発現が起こるのではないだろうか。さらに、糖尿病に関しても、過食に加え、ACTH による血糖値の緩やかなコントロールが阻害されるため、血糖値の変動が激しくなり、老齢マウスでは糖尿になり易くなると考えられる。

この A^y11 は、これまでに塩基配列が決定された遺伝子とあまり類似性を持たない。その中で、唯一 50% を越える相同性を示したのはショウジョウバエの *engrailed locus* の第 3 exon であった。さらに、ACTH をコードする POMC の DNA とは、その塩基配列において、ほとんど類似性を示さない。よって、この遺伝子は、POMC の遺伝子から生じたのではなく、独自の進化を歩んだものと思われる。

次に、抗 A^y ポリクローナル抗体のみに反応する A^y9 の mRNA の分布を、*in situ* ハイブリダイゼーションによって調べた。mRNA の存在位置は、主に毛乳頭上部ら集中し、メラノサイトの存在位置と一致した。また、ノーザンハイブリダイゼーションの結果から、 A^y/a の mRNA の大きさは約 3.1 kb と思われる。この結果から、 A^y9 DNA も約 2.4 kb の欠失を持つと考えられる。さらに、このバンドは、ユーメラニンを生産する C57BL/6J (*a/a*) マウス、アルビノである BALB/c (*A/A*) マウスでは観察されなかった。よって、 A^y9 の mRNA はメラノサイト、それも、フェオメラニン生産細胞でのみ生産されると考えられる。

次に、 A^y9 の塩基配列を決定した。 A^y9 は全長 733 bp の塩基配列を持ち、その 3'末端にはポリ A が存在し、その 31 bp 上流にはポリアデニレーションシグナルが存在する。そのオープンリーディングフレームは 5'側の 195 bp と考えられ、65 個のアミノ酸配列に相当する。このアミ

ノ酸配列には、開始コドンに相当するメチオニンが存在せず、N末端が欠けていると思われる。また、このアミノ酸配列は、疎水性を示す部分が極めてわずかしか存在しない。

A^y11での結果は、マウスのようなコンジュニックな系統が得られている生物において、この抗体を用い遺伝的な差異を検出する方法が、突然変異を起こした遺伝子のcDNAのクローニングに有効であることを示している。さらに、A^y9での結果は、この方法が突然変異の結果2次的に発現してくるタンパク質のcDNAのクローニングにも有効であることを示している。

では、アグチ遺伝子からの情報を受け取った後、メラノサイト内のどのような変化が、色素形成の転換を引き起こすのだろうか。ほ乳類の色素形成において、ユウメラニンを形成するユウメラノソームは紡錘形であり、その内部に格子状構造を有する。これに対して、フェオメラノソームは球形であり、その内部に multivesicular 構造を持つ。よって、色素形成の転換は、生産されるメラノソームがユウメラノソームからフェオメラノソームへ変わるという、細胞内小器官の変化を伴う非常にダイナミックな現象である。これまで、A^yを用いた研究から、アグチ遺伝子の情報は、cAMPの濃度変化によって細胞内に伝えられると考えられている。しかし、最終的に、どの様な変化が色素形成の転換を引き起こしているかは、未だにわかっていない。研究における最大の障害として、情報を受容し、色素形成の転換を行うメラノサイトの全細胞に占める割合の低さと、その純粋培養が困難であったことが挙げられる。そこで、ここでは、メラニン合成に関する情報伝達機構を調べる目的で、培養液に10 nMのコレラトキシン、16 nMのPMA (phorbol-12-myristate-13-acetate)を加え、マウスメラノサイトの純粋培養を行った。この培養条件における継代培養によって細胞株の樹立に成功し、得られた細胞株をTM (Transformed melanocyte)と名付けた。これらの細胞株の一つ、TM10は、ユウメラニンとフェオメラニンを同時に産生するという特徴を持つ。これは、初めてのフェオメラニン産生培養細胞株の樹立を意味する。この培養細胞株に、様々な試薬を加えて実験を行った結果、0.2 mMのL-DOPAを培養液に加えた場合、フェオメラニン産生が3.7倍に増加するのが観察された。この時、細胞質におけるメラノソームの表面密度も約2.7倍に増加していることが、電子顕微鏡によって観察された。では、この時、メラニン生産の鍵酵素であるチロシナーゼ活性は、どの様に変化しているのだろうか。チロシナーゼは、チロシンからL-DOPAからDOPA-quinoneへの反応を触媒すると言われている。細胞当たりのチロシナーゼ活性は、このL-DOPAによって、メラノソーム数が増加している条件でも、有意に変化していなかった。よって、メラノソーム一個あたりのチロシナーゼ活性は、低下していると考えられる。このメラノソームあたりのチロシナーゼの活性が低下するとフェオメラニンが形成されるという考えは、チロシナーゼの活性阻害剤PTU (phenylthiourea)の添加によって、フェオメラニンの全メラニン生産に占める割合が増大するという結果によって支持される。

では、アグチ遺伝子に突然変異を持つマウス皮膚での、L-DOPA量ではどうなっているのだろうか。C57BL/6J (A^y/a)と、C57BL/6J (a/a)との生後3.5日のnew born mouseでの結果の比較から、皮膚におけるL-DOPAの総量は、フェオメラニンを産生するA^y/aのほうが多

いと思われる。ここで、 A^y/a において多く検出された L-DOPA は、どの様にして生産されたのであろうか。チロシナーゼの活性の内、チロシンから L-DOPA への活性がそのまま、L-DOPA から DOPA-quinone への活性 (DOPAoxidase 活性) のみが減少すれば、L-DOPA の蓄積が起こると考えられる。チロシナーゼに関するこれまでの研究から、 A^y/a マウスでは野生型と isozyme のパターンが異なり、isozyme の一つである T2 が消失してしまっていることが知られている。さらに、 A^y/a マウス皮膚中の DOPAoxidase 活性は、 a/a マウスでの値よりも低いと報告されている。よって、チロシナーゼの isozyme を変化させることによって、その二段階の代謝活性のバランスを変化させ、L-DOPA 濃度を上昇させている可能性が考えられる。

ここまでの結果から推定される微小環境における情報伝達系は、以下のように考えられる。毛包周辺で生産された A^y 遺伝子産物は、色素細胞表面において MSH レセプターを塞ぎ、その結果、 α -MSH の作用が阻害され、細胞内の cAMP 濃度が低下する。cAMP 濃度の低下は、何等かの過程を経てチロシナーゼの isozyme パターンを変化させ、チロシナーゼの DOPAoxidase 活性のみを低下させ、細胞内の L-DOPA 濃度の上昇を引き起こす。L-DOPA 濃度の上昇はメラノソーム数のみを増加させ、相対的なメラノソーム内のチロシナーゼ活性を減少させる。チロシナーゼの最終産物である DOPA-quinone 濃度が低下し、SH 化合物の相対的な比率が大きくなるため、SH 化合物の規則的な重合が起こり易くなり、最終的にフェオメラニン生産を引き起こしていると思われる。

論文審査の結果の要旨

多細胞生物における遺伝子発現の特徴の一つは、その調節が細胞内のみで行われるのではなく、細胞間の相互作用を介して行われることである。マウスの毛包色素細胞（メラノサイト）は神経冠に由来し、真皮・表皮を移動し、最終的な形質発現の場である毛球に達してメラニンを産生する。しかし、そこで生成されるメラニンの種類（黒色メラニン、あるいは黄色メラニン）はメラノサイトの周囲にある細胞で働く遺伝子（アグチ遺伝子）の働きによって決定されることが知られている。これまでにアグチ遺伝子の産物（A 因子）はメラノサイトの膜表面にあるメラノサイト刺激ホルモン（MSH）の受容体において MSH と競合し、MSH によるメラノサイトの活性化を阻害するものであり、その結果としてメラニン生成酵素チロシナーゼの活性が低下し黄色メラニンが生成されるという仮説が提唱されていた。

この論文では A 因子の cDNA をクローニングすることを目的として、先ず A 因子を常に産生している C57BL/6J 系の遺伝子型 A^y/a のマウスの皮膚ホモジエネートを C57BL/6J 系遺伝子型 a/a のマウスに注射して免疫し、モノクローナル抗体を得た。又、MSH のアミノ酸配列を含む副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）に対する抗体を準備した。一方、遺伝子型 A^y/a の皮膚から抽出した mRNA をもとに cDNA ライブラリーを作製し、上記の抗体を用いてスクリーニングを行ったところ、2 種類の cDNA クローン (A^y11 , 2.8 kbp ; A^y9 , 750 bp) を得ることが出来た。このうち A^y11 をプローブとして皮膚における発現の分布をしらべると、抗 ACTH を用いた結果と一致して、真皮に散在するランゲルハンス様細胞、マスト細胞と思われる細胞にシグナルが観察された。 A^y11 cDNA の塩基配列の決定により、その配列が 2085 bp のオープンリーディングフレームを持ち、695 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするものと推定された。このタンパク質には他の既報のタンパク質と有意の相同性は認められなかったが、一部に MSH と類似および逆の配列が存在していた。このことは A 因子が MSH 受容体において MSH と競合的に作用することを示唆するものである。

一方、この論文では C57BL/6J 系マウスからメラノサイトを分離培養することによって培養メラノサイトの株を樹立した。いくつかの株の中に黒色メラニンと黄色メラニンを等量生成するものがあり、その株細胞を用いて両色素生成の転換機構を解析した。培養液中に L-ドーパを加えると、黄色メラニン生成へと転換が起こるが、この時メラニン生成の場であるメラノソーム当たりのチロシナーゼ活性が低下していることを見出した。この結果はチロシナーゼ活性の量と生成されるメラニンの質が密接に関連していることを示したものである。

これらの成果はマウスメラノサイトにおけるメラニン生成の遺伝子支配に関する新しい知見であり、哺乳動物の分子遺伝学研究に大きな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、よって佐藤主税提出の論文は理学博士の論文として認める。