

メラニン色素細胞の分布と機能分化 Melanin Pigment Cells: Their Localization and Functional Divergence

築地 長治^{a, b}, 上原 重之^a, 西原 大輔^a,
石黒 誠一^c, 山本 博章^a

Nagaharu Tsukiji, Shigeyuki Uehara, Daisuke Nishihara,
Sei-ichi Ishiguro and Hiroaki Yamamoto

^a 東北大学大学院生命科学研究所

^b 現所属 国立遺伝学研究所系統生物研究センター

^c 弘前大学農学生命科学部

要旨 メラニン色素細胞は単に紫外線防御や皮膚また毛色を決めるだけでなく、我々の視聴覚等に必須であるが、これらの機能を可能にする分子機構にはまだ不明な点が多く、なかにはメラニン合成を必須としない機能もある。当該研究には細胞の構造解析が必須であるが、一般的にはまだ緒にもついていない状況である。ここではメラニン色素細胞の発生とそれらが果たす機能（分化）について、我々が関わっている研究内容を顕微鏡的形態観察にふれながら紹介したい。

キーワード: 毛色遺伝子, メラノサイト, 網膜色素上皮, 発生系譜, 視聴覚

1. はじめに

我々は、メラニン合成を行うメラニン色素細胞の発生と機能発現機構およびその進化に興味を持ってきた。ここでは恒温動物のメラニン色素細胞の発生系譜と組織科学的な特徴の一端を紹介し、我々が現在着目している現象についても併せてご覧頂きたい。

2. メラニン色素細胞の発生系譜

我々恒温脊椎動物のメラニン色素細胞の発生経路には2通りあり(図1)、一方は発生中の胚の背側に脊椎動物特異的に形成される神経冠(堤)に由来するメラニン色素細胞(メラノサイトと呼ばれる)である。この細胞は高い移動能を持ち全身に分布する。皮膚の毛包(毛穴の中に形成される構造)の基部に定着すれば、合成したメラニン顆粒をケラチノサイト(毛になる細胞)に移送し、毛色を決める。マウスでは、皮膚メラノサイトのほとんどは毛包に局限するが、ヒトでは

毛包間の上皮にも分布する。皮膚は体を覆う大きな器官であるため、皮膚メラノサイトも個体の恒常性維持に寄与するところ大である。その最たるものは紫外線防御機能であるが、内耳に移動するメラノサイトが聴覚に必須である等、多機能である¹⁾。他方は、発生中の脳胞に由来する眼胞から眼杯を経て形成される一層のメラニン色素細胞で、網膜色素上皮(RPE: Retinal Pigment Epithelium)と呼ばれる。この細胞群は神経網膜の外側に接してこれを覆い、神経網膜の多層構造の形成等、その発生や機能維持に必須である。RPEは血管系と網膜との隔壁であるばかりでなく、視細胞外節を概日リズムをもって貪食する。この機能は視覚の維持に必須であり、その欠損を示す変異体は網膜変性症を引き起こし、失明にいたることなど、メラノサイト同様多機能である²⁾。

3. 毛色とメラニン色素細胞の構造について

このメラニン色素細胞の組織像を少し紹介する。図2AとBは毛包とその周辺の組織像である。両者は黒毛色(C57BL/6J-*aa*)および黄毛色C57BL/6J-*A^a*)それぞれの生後4.5日目のマウス(挿入図)の毛の根元を観察したものであるが、この差はわずかに一遺伝子座(アグチ遺伝子座)の対立遺伝子の違いである。この遺伝子座は古くから記載され、ホモ接合体で致死の黄色(lethal yellow)として高校の教科書にも広く

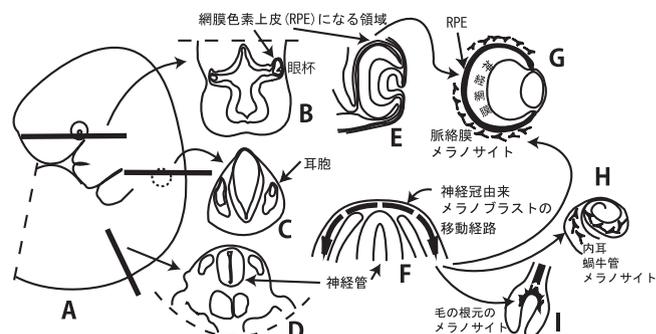


図1 哺乳動物メラニン色素細胞の細胞系譜。

受精後10.5日のマウス胚(部分, A)と、胚に示されたそれぞれの線分に対応する切断面を示した(B-D)。網膜色素上皮(RPE)が分化する眼杯(B), 耳胞(C)の領域, また胚の背側に形成される神経冠からメラノサイト前駆細胞(メラノプラスト)が移動する様子を模式化するための腹部横断面(D)である。網膜色素上皮(RPE)は、眼胞から眼杯(B, E)を経て神経網膜の外側に一層の細胞層として形成される(G)。メラノプラストは神経冠から全身に移動し(F), 毛の根元(毛包, I)や内耳(H)にも定着する。神経冠からのメラノサイト分化に関わる遺伝子はいくつか知られているが、*Sox10*, *Pax3*, *Mitf*, *Snai2*は転写因子を、*Kitl*と*Kit*, *Edn3*と*Ednrb*はそれぞれリガンド・リセプターの関係にあるタンパク質をコードする。ヒトにおいては、これら遺伝子座のほとんどは、色素形成が重篤な影響を受けた難聴を伴うワールデンブルグ症候群の責任遺伝子座である。これらの機能欠損はメラノサイトが分化できなくなり、毛の根元の当該細胞も失われるため、形成される毛は白くなる(図2D-F)。これらの因子の中でRPEの発生にも大きな影響を与えるのは*Mitf*のみである。A-Cは文献11を、Dは文献12を元に作製、F-Iは「生物の科学 遺伝」(エス・ティー・エス社)³⁾の承諾を得て改変後掲載。

^a 〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉6-3
TEL: 022-795-6692; FAX: 022-795-6692
2009年2月17日受付

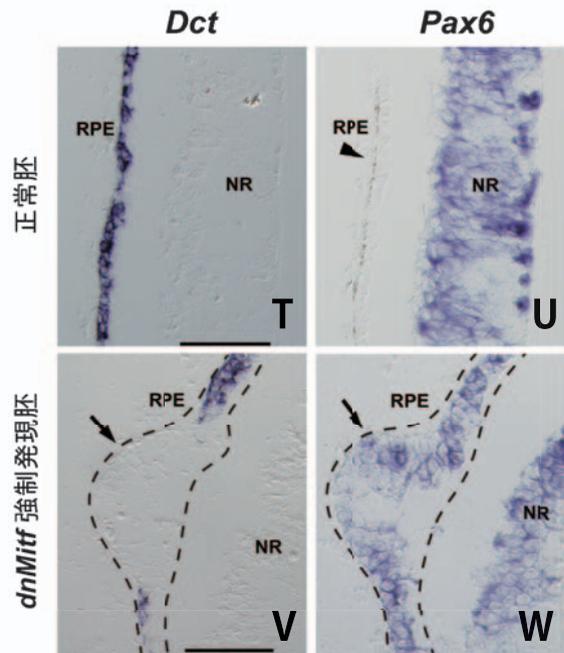
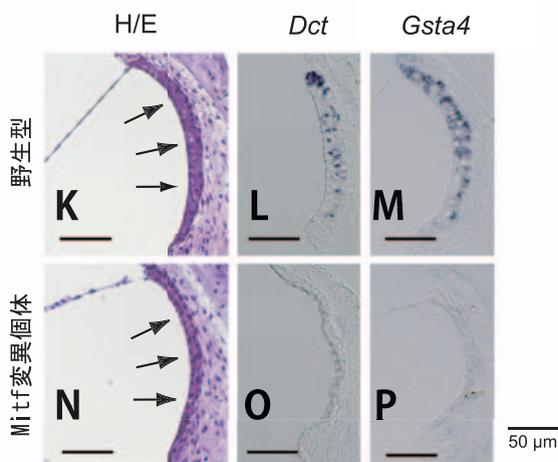
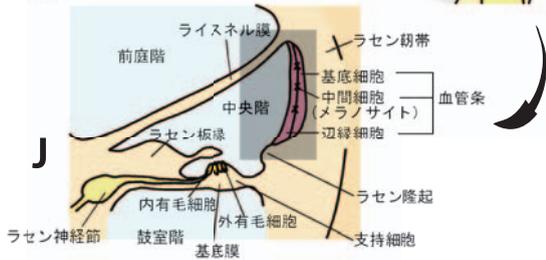
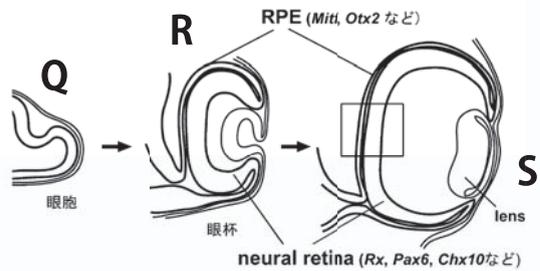
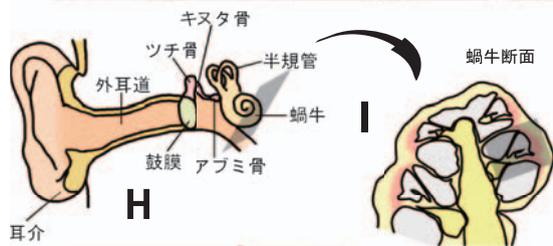
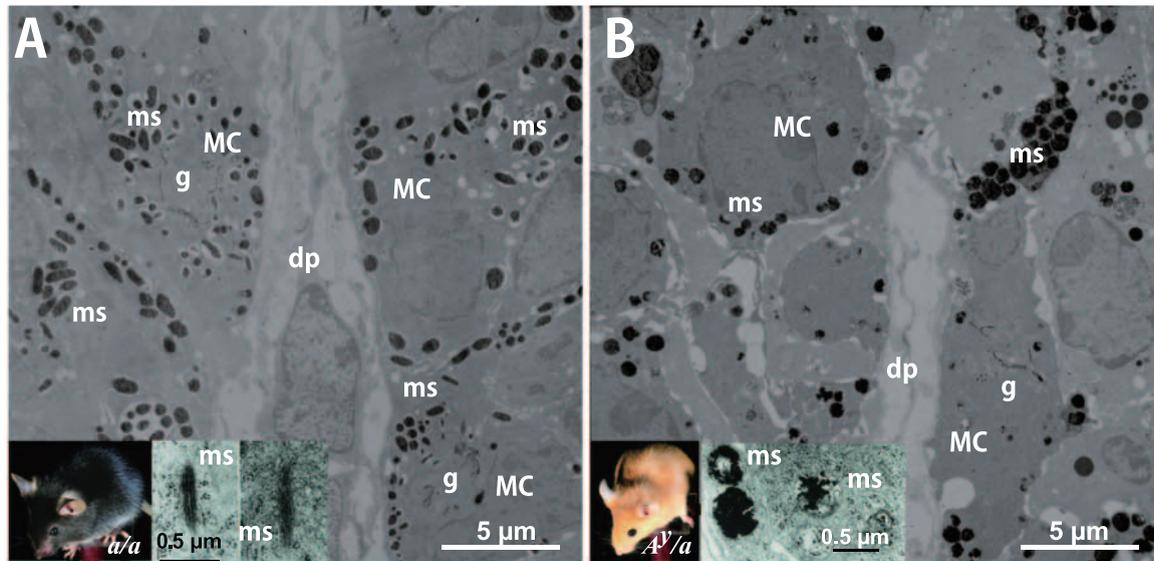
紹介されている。その表現型は毛色に関しては他の対立遺伝子に対して超優性であるが、致死については劣性、という不思議なものである。その詳しい実態は著者らの概説を見て頂くとして³⁾、今回注目して頂きたいのは、メラニン色素細胞の中でメラニンを蓄積するメラノソームと呼ばれるオルガネラの構造が、黒毛と黄色のマウスでは異なる点である。黒いメラニンを合成するメラノサイトでは、紡錘体型を、黄色のメラニンを合成する場合は球状を呈する。この毛包像は、メラニン合成に必須の酵素であるチロシナーゼの活性を検出すべく、その基質である DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) とともに固定組織をインキュベーションして得られたものである。ゴルジ野や小胞の一部、また若いメラノソームに酵素活性のあることがわかるが、黒毛と黄色のマウスでは、先述のメラノソームの構造に加え細胞質自体の染色性も異なり、さらには周囲の細胞との接着性が異なるせいであろうか、細胞間隙が黄色マウスにおいて顕著である。これらの違いを生み出す分子機構はまだよく解明されていない。当該遺伝子座はアグチグナルタンパク質と呼ばれるリガンドをコードし、その受容体はメラノサイト細胞膜上の Mc1r 受容体である。A' は恒常的にこのリガンドを発現し、a はそれを発現できない対立遺伝子である。先述の表現型は、リガンドの有無によって細胞の性質が大きく変わる一例である。

4. 白毛色の哺乳類について

体毛は白く眼も赤い、いわゆるアルビノの表現型を示すマウスが多く記載されている。彼らは野生型同様にメラノサイトや RPE を発生させるが、チロシナーゼ活性の欠損により色素合成が行われない個体である。この表現型は、野生型がもつ系譜の異なるメラニン色素細胞（メラノサイトと RPE）において、メラニン合成機構は、少なくともこの酵素を鍵として利用する点については共通であることを示している。一方で、白毛色で眼の黒い哺乳類もいる。この表現型は、RPE は発生するものの、メラノサイトの発生が見られない場合である。また全てではないが、青眼で白毛色のネコの多くについても同様である。これら動物を伴侶とする人々は、ダーウィンの指摘⁴⁾ を待つまでもなく、当該の個体が難聴であることを古くから知っていたはずである。このメラノサイトを欠く白毛色原因遺伝子座はいくつかあり、それらは全てメラノサイトの初期分化に関わる遺伝子座である（図 1 とその説明を参照）。しかしこれら遺伝子座は、*Mitf* 遺伝子座の変異体を除いて、眼の表現型にはその異常を導かない、というのが現在までの報告である。*Mitf* がメラニン色素細胞のマスター遺伝子（座）と言われる所以である。これら遺伝子座の変異アレルは皮膚に関しては斑を形成するのが特徴で、その重篤なタイプが全身白毛色、と言える。従って見かけの全身白毛色には、メラノサイトがあるのにメラニンが合成できないアルビノ、メラノサイトがない斑遺伝子（座）によるものの二通りあることになる。それらの表現型を図 2D-G に示す（2C は野生型）。

5. 内耳メラニン色素細胞と聴覚

さて内耳のメラニン色素細胞はメラノサイトである。従って、メラノサイトの欠損により引き起こされる大規模な白斑を持つ個体は、同じく神経冠に由来する内耳メラノサイトの欠損も伴うことになるので、全て難聴となる。この原因遺伝子座には *Mitf* だけではなく *Pax3*, *Sox10*, *Ednrb*, *Edn3*, *Kit*, *Kitl* などがあり、ヒトではこれら関連する遺伝子座の多くが、皮膚白斑や感音難聴を伴うワールデンブルグ症候群の原因遺伝子座でもある。これら遺伝子座の対立遺伝子（変異遺伝子）が原因で感音難聴の表現型をとる個体は、全て内耳のメラノサイトが分化できないことが分かっている。しかし不思議なことに、この聴覚を保障する内耳メラノサイトの機能にはメラニン産生は必須ではない。なぜなら、前述のアルビノは聴覚を持つからである。アルビノが示す白毛は、メラニン合成ができないだけで、メラノサイトは正常に発生し、野生型マウスが示す本来のメラニン色素細胞分布をとるからである（メラノサイトは勿論、RPE も、チロシナーゼ活性欠損等によるメラニン合成はできないものの正常に発生する。他のメラニン色素細胞のマーカー遺伝子群は正常に発現する）。では内耳におけるメラノサイトの機能は何か？現在のところはカリウムイオンの恒常性維持への関与が報告されている。それは、コルチ器官が露出する内リンパの高い当該イオン濃度を維持するために重要な KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel が、メラニン色素細胞でも発現していることによる⁵⁾、とされている。しかしこの遺伝子座が毛色に関係するか否か、その詳細な報告は見つけられない。ではメラニン合成は全く意味がないのであろうか。チンチラネズミに雑音を聞かせると内耳が真っ黒くなる現象を機械的難聴と関係づける報告があること⁶⁾、アルビノが雑音に感受性が高いとの報告⁷⁾ などとも考慮すると、見かけ上メラニンは聴覚を守っているように思える。最近我々は内耳メラノサイトの遺伝子発現プロファイルの解析中に、この細胞が高いストレス応答ネットワークを持っているのではないかと気づいたところである⁸⁾。一例として *Gsta4* の発現を挙げる（図 2-M & P）。このタンパク質は酸化ストレス防御に重要な役割を担っている。この遺伝子の内耳での発現は、メラノサイトを欠損する前述の白斑変異体では大きく低下し、また野生型ではメラノサイトマーカーである *Dct* 遺伝子と同一の細胞で共発現することから（図 2-L & M）、メラノサイトが当該の機能を持つことは確かそうである。現在ストレス応答関連の遺伝子発現を解析中であり、メラニン色素細胞の新しい機能が抽出できるのではないかと期待している。ところで、未知のメラノサイト機能としては、眼の外側に位置する脈絡膜のメラノサイト（図 1 および 3）の機能にも興味を持ちはじめたところである。メラノサイトの広い分布を見るにつけ、それぞれの組織、器官でのこの細胞の機能でまだ未知のものがたくさんあるのではないかと推察せざるを得ない。



6. RPE の発生機構について

次に発生系譜の異なる眼のメラニン色素細胞である RPE について見て頂きたい。これまでのマウス遺伝学は、*Mitf* 遺伝子座が我々哺乳動物が持つ全てのメラニン色素細胞の発生を遺伝学的に「統御」できることを示している。つまりこの遺伝子座以外で、メラノサイトと RPE 両方の発生を決めている遺伝子座は他に見つかっていない。

さてそれでは RPE 細胞の発生についてこの *Mitf* 遺伝子がどのように関わっているのでしょうか。RPE 細胞周辺の像を図 3 に示す。RPE の特徴の一つは、初期の発生系譜を同じくする神経網膜の多層構造と異なり、一層の細胞層をとることである。その機能は先述の通りであるが、この一層の構造は、受動的に多層化できないことを示しているのではなさそう。先に述べた *Mitf* 遺伝子座の、これまで知られている多数のマウス変異体には、不思議なことに機能獲得型の対立遺伝子はなく、全て機能喪失型で、その多くで RPE の部分的な多層化が認められる。またその機構はまだよくわかっていないが、重篤なものは眼が開かないほどである(図 2-E)。ではこの遺伝子の RPE 発生における機能は何か？マウスの多数の対立遺伝子の利用は重要な解析手法であるが、ここではこれまで記載のない機能獲得型の表現型をも確

認すべく、眼胞に野生型 *Mitf* を導入してみた。胎生の哺乳類では胚操作が困難であるため、発生中の鶏胚眼胞にエレクトロポレーションによって *Mitf* を導入した(図 4)。その結果、野生型の *Mitf* 強制発現では、神経網膜が(メラニン色素細胞様に)メラニン合成を始めた。またマウスの機能喪失型アレルが示すように、機能喪失型(dn: dominant negative) *Mitf* の過剰発現では、RPE の多層化が観察された(図 2-V & W)。さらに、*Mitf* が当該領域の細胞分裂に強く関わっていることを発見し、それはサイクリン依存性のキナーゼインヒビターである *p27^{kip1}* 遺伝子に直接相互作用することを強く示唆する結果を得た⁹⁾。これらに連携する遺伝子群を推察し、解明が待たれる RPE の発生機構をより詳細に明らかにしようと計画しているところである。

7. 最後に

現在毛色に関わる遺伝子座として 300 近くが記載されている¹⁰⁾。これは全遺伝子座を約 20000 とするとほぼ 1.5% にもなる。個人が持つアレルの組み合わせ(個性と考えます)が、我々が気づかないだけで、またはその差を認識(計測)できないだけで、かなりの確率で皮膚や毛の色に現れていることが予想される。この関連遺伝子座数は、ポストシークエンシングの時代においてその解析の進展とともに年々増えてい

図 2 (132 頁) マウス毛包メラノサイトの構造と毛色変異体、内耳メラノサイトにおける遺伝子発現、および RPE 発生に関わる *Mitf* の機能。

- A. 生後 4.5 日の黒毛マウス毛包(図 1 の毛の基部周辺、メラノサイトが局在する領域に相当。)の EM 像。アグチ遺伝子座の変異体マウス (*a/a*) で、下記の野生型 (C) が示す 1 本の毛に色素パターンを示さないのがノンアグチと呼ばれる。チロシナーゼ活性検出のため DOPA (基質) とインキュベーション済み。
- B. 同黄色マウス (*lethal yellow, A^y/a*)。それぞれ挿入図はメラノソーム (ms) の拡大図。g: ゴルジ野; dp: dermal papilla (毛乳頭); MC (melanocyte, メラノサイト)。
- C. 野生型マウス (アグチ, *A/A*) それぞれの毛の先端から基部に向かって、黒, 黄, 黒のパターンを示す。
- D. メラノサイトが分化できない領域では白斑となる。このマウスは *Mitf^{mi-bw}* をホモに持つ個体で、F の系統から分離されたものである。
- E. マウス *Mitf^{mi-vgd9}* ホモ個体。Mitf タンパク質が発現しない。白毛であり、目も開かず難聴を示す。
- F. マウス *Mitf^{mi-bw}* ホモ個体。黒眼白毛色となる。難聴を示す。
- G. マウスアルビノ変異体 (*Tyr* ホモ個体)。メラノサイトは分化するがチロシナーゼ活性欠損のためメラニン合成が見られない。赤眼白毛色の表現型となる。難聴は示さない。
- H-J. ヒト内耳の構造。メラノサイトは血管条に定着する。
- K-M. 野生型マウスの血管条。K: HE 染色; L: メラノサイトマーカーである *Dct* の発現が血管条で検出できる; M: 同様に *Gsta4* も血管条で発現する。それぞれ *in situ* ハイブリダイゼーション法による mRNA の検出。
- N-P. マウス *Mitf^{mi-bw}* 黒眼白毛色ホモ個体の血管条。メラノサイト欠損により血管条の厚さが薄い(矢印, K の矢印部分と比較)。 *Dct* や *Gsta4* の発現も認められない。
- Q-S. 眼の発生: 眼は眼胞と呼ばれる袋状の構造から始まり、遠位部の陥入によって眼杯を形成する。眼杯の外側が網膜色素上皮 (RPE) に、内側が神経網膜 (neural retina) に分化する。それぞれの分化には、図に示したような転写因子群を含め多くの遺伝子座が関与する。
- T-W. ニワトリ正常胚と dominant-negative (dn) 型 *Mitf* 強制発現胚の、眼における *Dct* と *Pax6* の遺伝子発現 (各切片像は模式図・S の枠内の領域に相当する。発生 stage 22)。T と U: 正常胚の RPE は本来一層で黒色のメラニン (U 矢印) が見られる。V と W: *dnMitf* 強制発現胚 (手法は図 4 に説明) では部分的に肥厚、多層化している (矢印)。T: メラニン色素細胞のマーカー・*Dct* は RPE 特異的に発現している。V: *dnMitf* 強制発現胚では肥厚した部分で *Dct* の発現が消失しており (矢印)、この領域には合成されたメラニンも見られない。正常胚 RPE の *Dct* の発現領域 (青~紫に染まった領域) では、黒いメラニンも沈着している (シグナルが共存しているのが判別しづらいが、*Pax6* を検出した図 U では、RPE に *Pax6* 遺伝子の発現が見られないので、RPE にメラニンが薄く沈着しているのが判別できる。U: 眼の発生に重要な *Pax6* はこの発生段階では RPE での発現は見られない(より早い時期では発現している)。W: *dnMitf* 胚では RPE での *Pax6* の発現が見られる。全て *in situ* ハイブリダイゼーション法による。RPE: 網膜色素上皮; NR: 神経網膜。
- A と B は「生物の科学 遺伝」(エヌ・ティー・エス社) の承諾を得て改変後掲載。
- H と J は和泉喜子氏の好意による。

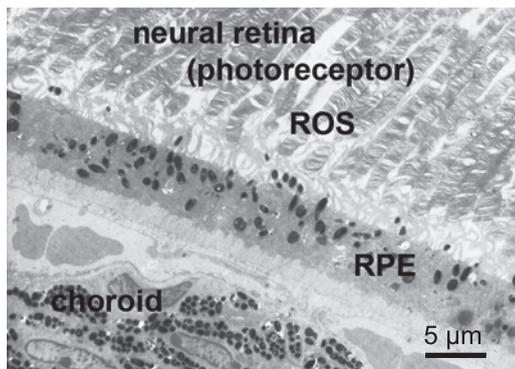


図3 マウス成体のRPEと脈絡膜メラノサイト一層の網膜色素上皮(RPE)を脈絡膜(choroid)メラノサイトが取り囲んで分布する。脈絡膜のメラノサイトはRPEとは異なり一層の構造をとらない。神経網膜の視細胞(photoreceptor)である桿体外節(ROS: rod outer segment)とRPEの間では視物質の代謝サイクルが構築されている。RPEは概日リズムを持って視細胞外節を貪食する。ヒトでもこの機能が失われると網膜変性症にいたる。

る。それぞれの遺伝子座には多くのアレルがあることを考えると、このように目に見える形質はまさに個人のアイデンティティーであると強く感じる。それらは尊重されるべきものであって、決して悪用されてはいけなと思うのである。そのような目で伴侶動物を見るとよけいとおしくなりませんか？

文 献

- 1) Hill, H.Z.: *BioEssays*, 14, 49-56 (1992)
- 2) Strauss, O.: *Physiol. Rev.*, 85, 845-881 (2005)
- 3) 上原重之, 山本博章: マウスの毛色発現機構と色素細胞の機能, *生物の科学 遺伝*, 62(6), 7-19 (2008)
- 4) Darwin C.: *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*, John Murray, UK (1859)
- 5) Marcus, D.C., Wu, T., Wangemann, P. and Kofuji, P.: *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 282, C403-C407 (2002)
- 6) Gratton M.A. and Wright C.G.: *Pigment Cell Res.*, 5, 30-37 (1992)
- 7) Barrenas, M.L. and Lindgren, F.: *Scand. Audiol.*, 19, 97-102 (1990)
- 8) Uehara, S., Izumi, Y., Kubo, Y., Wang, C-C., Mineta, K., Ikeo, K.,

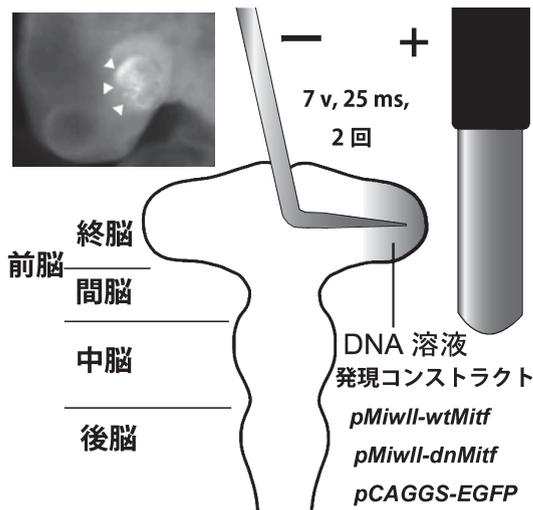


図4 エレクトロポレーション法による遺伝子導入。ニワトリ胚 stage 12 の片側眼胞内部に DNA 溶液を満たし、陰極を眼胞内部に、陽極を外側に設置し、7 V, 25 ms, 2 回通電、その後、二日間 38°C にて再度孵卵し、stage 22 で取り出した。DNA として野生型 (wt) および dnMitf, および EGFP をコードする発現コンストラクトを用いた。挿入の図は pCAGGS-EGFP の強制発現による遺伝子導入効率を検証したもので、ほぼ眼に特異的に GFP の蛍光 (矢尻) が観察される。一例として、図2の T~W に dnMitf 強制発現胚の結果を正常胚と対比させて示す。

- Gojobori, T., Tachibana, M., Kikuchi, T., Kobayashi, T., Shibahara, S., Taya, C., Yonekawa, H., Shiroishi, T. and Yamamoto, H.: *Pigment Cell Melanoma Res.*, 22, 111-119 (2009)
- 9) Tsukiji, N., Nishihara, D., Yajima, I., Takeda, K., Shibahara, S. and Yamamoto, H.: *Dev. Biol.*, 326, 335-346 (2009)
- 10) Oetting, W.S., Montoliu, L. and Bennett, D.C.: *Mouse Coat Color Genes*. (February, 2009). European Society for Pigment Cell Research. World Wide Web (URL: <http://www.espcr.org/micemut>) 本章で挙げる遺伝子座やアレルに関してはこの WEB サイトを参照。
- 11) Kaufman, M.H.: *The Atlas of Mouse Development*, Academic Press, London, 1992
- 12) 近藤俊三, 牛木辰男, 川上速人, 高田邦昭, 花岡和則: *走査電顕アトラスマウスの発生*, 岩波書店, 東京, 2003