

# 新規ライブイメージング法を用いたメラニン色素輸送の解析

京都大学理学研究科生物科学専攻動物学系

田所 竜介

Our skin and hair have various colors, which are established by melanin pigment. Melanin pigmentation in the skin is physiologically important to protect our body from UV irradiation. Melanocytes are known as melanin-producing cells in which melanin is synthesized in melanosomes. In the tanning processes, melanocytes extend numerous dendrites that are attached to surrounding keratinocytes, and subsequently melanin granules are transferred through melanocyte dendrites to keratinocytes. Although several different models for intercellular melanin-transfer have been proposed by *in vitro* experiments and electron microscopic observations, the mechanisms of melanin-transfer *in vivo* remain controversial<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>. So far, we developed an imaging technique, and visualized behavior of melanocyte during skin pigmentation in chicken embryo. We found that melanocytes release vesicles. In this study, first, we statistically showed the difference of vesicle size between the tissues. Second, to analyze molecular mechanism underlying the difference, we established a gene transfer technique to manipulate melanocytes and keratinocytes by other genes respectively *in vivo*.

## 1. 緒言

ヒトの皮膚や毛髪は、白色から黒褐色といった様々な色のバリエーションをもっている。この体の色を作り出しているのがメラニン色素であり、有害な紫外線から身を守るといって重要な役割を担っている。この一方で、メラニン色素はシミやソバカスなど美容上の問題を引き起こす厄介者として嫌悪される。また、白斑などの色素疾患が社会生活上の心の負担を招くなど、メラニン色素は生活の質 (QOL) と密接に関係している。メラニン色素は、表皮や毛組織に散在する色素細胞によって合成され、のちに表皮や毛のケラチノサイトに輸送されることで、表皮と毛を着色して紫外線防御などの生理機能を発揮する。つまり、メラニン色素の細胞間輸送を理解することは、色素生物学の本質的な課題の一つであり、美容分野および臨床においても極めて重要な課題である。我々は、これまでに自身が確立したトリ胚の表皮および毛の培養法と、色素細胞への蛍光標識法を組み合わせることで、メラニン輸送期における色素細胞の振る舞いを観察してきた。また、これらの観察から色素細胞が異なるサイズの小胞を放出する可能性を見出した。本研究は、この過程を包括的に理解することを目指すものである。

## 2. 実験

### 実験1 表皮と毛組織において小胞放出機構が異なるのか？

前述の通り我々は、色素輸送期の表皮および毛組織において、色素細胞が小胞を放出することを見出しつつある。小胞の大きさにはバリエーションがあり、1 $\mu\text{m}$ 程度の小型小胞と2–5 $\mu\text{m}$ 程度の大型の膜小胞に大別できる。また、小型と大型の膜小胞はそれぞれ含有しているメラニン顆粒の量が異なる。興味深いことに、大型の膜小胞は色素輸送が盛んな毛組織において多く見られるという可能性も見出した。これらの結果を受けて我々は「要求される色素の量に応じて輸送法が使い分けられる」という仮説を立てるに至った。本研究では、この仮説を検証するにあたり、のちの遺伝子解析などを見据えて正常表皮および毛組織における膜小胞の大きさを測定して統計的な評価基準の作製を行った。

### 実験2 輸送法の違いを生み出す分子機構の解明を目指した表皮遺伝子操作法の確立

本研究により膜小胞は大型と小型の2サイズに大別されることを見出した。これまでの細胞生物学的な知見から、膜小胞には小型小胞 (100nm以下) と大型小胞 (0.2–1.5 $\mu\text{m}$ ) が報告されており、これらの生成過程は全く異なることが明らかにされている (参)。つまり、膜小胞のサイズは膜小胞を分類する上で最も重要な指標の一つとされている。我々がみいだした大型の膜小胞 (2–5 $\mu\text{m}$ ) は細胞生物学的には稀なサイズの膜小胞であり、通常の膜小胞 (0.2–1.5 $\mu\text{m}$ ) とは異なる過程を経て形成されることも見出した。本研究において、この膜小胞の生成過程の違いを生み出す分子メカニズムを調べるにあたり、色素細胞およ



Live-imaging technique to visualize behavior of melanocytes in the skin of chicken embryo

Ryosuke Tadokoro

Department of Zoology, Graduate School of Science, Kyoto University

び周囲の表皮細胞を遺伝子操作する必要がある。そこで、本研究では生体内において表皮遺伝子操作法を確立することにした。

### 3. 結果

#### 3.1 表皮と毛組織においてメラニン色素輸送法が異なるのか

色素細胞由来の膜小胞を可視化するため、胚発生期において色素細胞の前駆細胞にGFP遺伝子を導入し色素細胞の蛍光標識をおこなった。胚発生を進め、色素輸送が活発になる時期に胚を単離し、表皮組織および毛組織の観察を行った。観察にはニコン社製共焦点レーザー顕微鏡A1Rを用いた。それぞれの組織において、画像解析ソフト(NIS-elementsおよびImageJ)を用いて膜小胞の数と直径を測定した結果を図1のグラフにまとめた(図1)。表皮組織においては、膜小胞の直径がおおよそ1μm以下(小型膜小胞)のものが多く、それ以上のサイズの膜小胞は全体の1割にみえない(図1)。これに対して、毛組織内の膜小胞は表皮において見られる膜小胞と同程度のサイズも認められるものの、2μm以上の巨大な膜小胞(大型膜小胞)の存在が顕著である(図1)。これら膜小胞の全体数にお

ける大型膜小胞の存在比率を調べたところ、表皮が8%そして毛組織においては43%であった。この評価基準を設定することにより、色素沈着が過剰な系統とそうでない系統間の比較により、例えば色素沈着の過剰な系統(ウコッケイ)において大型膜小胞の存在比率が高くなるなど、色素輸送法と輸送量の関係を調べる事が可能になった。

#### 3.2 輸送法の違いを生み出す分子機構の解明を目指した表皮遺伝子操作法の確立

表皮細胞に遺伝子導入を行うにあたり電気穿孔法、化学的手法およびウイルスによる導入を試みた。化学的手法においては、およそ6種類の試薬を用いたが表皮における試薬の拡散が激しくほとんど遺伝子が導入されず、電気穿孔法においては遺伝子導入されるものの導入効率が低く、導入される部位も限定されることが明らかになった。そこで、ウイルスによる遺伝子導入の条件検討を行った。具体的には、ウイルスに感染しやすいトリ系統を探索するにあたり、ヒベコ種をはじめとして数種類のトリ系統についてウイルス感染効率を測定した。その結果、白色レグホンにおいて写真に示す通り、表皮への遺伝子導入が可能となった。加えて、表皮細胞のみならず色素細胞にもウイルスが感染することが危惧されたが、幸いなことに本実験においては色素細胞へのウイルス感染はほとんど観察されない。次に、表皮細胞を遺伝子操作した状態で色素細胞から放出される膜小胞を観察するために、表皮細胞へ遺伝子導入した胚の色素細胞に対して、電気穿孔法を用いて遺伝子導入を試みた(図2)。これら両手法を同一個体に施すことで死亡率が上がるが、電気穿孔法に用いる電圧を6V程度に抑えることにより全体の約半数が生き残ることを見出した。以上、本研究により表皮細胞および色素細胞を別々の遺伝子により操作する方法を確立した(図2)。

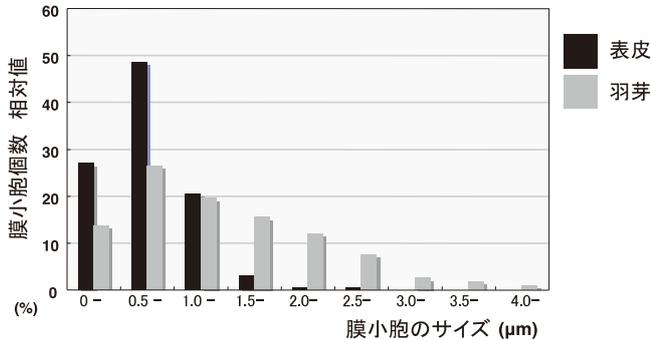


図1 表皮と毛における小胞の大きさ比較

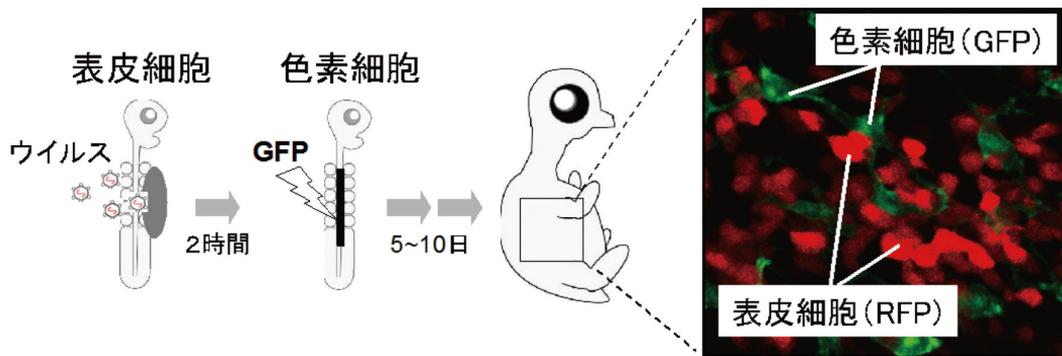


図2 表皮と色素細胞の遺伝子操作

#### 4. 考察・総括

メラニン色素輸送の研究はこれまで主に *in vitro* 共培養や組織の電子顕微鏡観察により解析され、多くの研究者が異なる解析系を用いて様々な説を提唱してきた<sup>1,2,3,4,5,6,7,8)</sup>。現在、実際の組織においてどの輸送法が使われているのかという問いが長らく続いているが未だ決定的な結論に到達していない。我々の研究結果は、実際の組織内においてメラニン色素が2者択一的方法ではなく、複数の方法により表皮に輸送されることを示唆する。また組織などシチュエーションの違いにより輸送方法に違いがあることが想像される。この結果を踏まえて、著者は「どの輸送モデルが正しいのか」という排他的な問いでなく、これまで報告された複数の色素輸送モデルが生体内のどのようなシチュエーションにおいて用いられるのかを正しく理解することが重要であると考えに至った。現在、本研究の趣旨である色素輸送法がどのように使い分けられるのか、そしてその違いがどのような分子メカニズムにより生じるのかという深淵な疑問に答えることはできない。しかしながら、本研究はこれまで困難とされてきた“組織内における色素輸送を高解像度で可視化する手法”に加えて“個体内において色素細胞および表皮細胞を別々に遺伝子操作する方法”を確立するに至った。これらの手法を用いて、近い将来、色素輸送の謎を解き明かせると信じてやまない。

#### (参考文献)

- 1) Swift JA. Transfer of melanin granules from melanocytes to the cortical cells of human hair. *Nature*, 203:976-977 (1964)
- 2) Yamamoto O, Bhawan J. Three modes of melanosome transfers in Caucasian facial skin: hypothesis based on an ultrastructural study. *Pigment Cell Res.*, 7:158-169 (1994)
- 3) Virador VM, Muller J, Wu X, Abdel-Malek ZA, Yu ZX, Ferrans VJ, Kobayashi N, Wakamatsu K, Ito S, Hammer JA, Hearing VJ. Influence of alpha-melanocyte stimulating-hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. *Faseb J.*, 16; 105-107 (2002)
- 4) Scott G, Leopardi S, Printup S, Madden BC. Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *J. Cell Sci.*, 115:1441-1451 (2002)
- 5) Bhawan J. Ultrastructure of melanocyte-keratinocyte interactions in pigmented basal cell carcinoma. *Pigment Cell Res.*, 5:38-47 (1979)
- 6) Garcia RI, Flynn E, Szabo G. Ultrastructure of melanocyte-keratinocyte interactions. *Pigment Cell Res.*, 4; 299-307 (1979)
- 7) Cerdan D, Redziniak G, Bourgeois CA, Monsigny M, Kieda C. C32 human melanoma cell endogenous lectins: characterization and implication in vesicle-mediated melanin transfer to keratinocytes. *Exp Cell Res.*, 203; 164-173 (1992)
- 8) Aspengren S, Hedberg D, Wallin M. Studies of pigment transfer between *Xenopus laevis* melanophores and fibroblasts in vitro and in vivo. *Pigment Cell Res.*, 19;136-145 (2006)