

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770217

研究課題名（和文） 新規の表皮内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

研究課題名（英文） Analysis of the melanin-transfer by ex vivo live imaging in a skin of chicken embryo.

研究代表者 田所竜介（TADOKORO RYOSUKE）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50425633

研究成果の概要（和文）：表皮の色素細胞で産生されたメラニン色素は、のちに隣接する角化細胞へと輸送されることで表皮に沈着して全身を紫外線から守る。本研究では、新規表皮ライブイメージング法により見出した“メラニン色素が色素細胞の細胞膜に包まれて放出されたのち角化細胞に輸送される”という観察結果に基づいて、メラニン色素輸送の3過程：1）膜小胞出芽、2）放出そして3）膜小胞が角化細胞に取り込まれる過程について理解を深めた。

研究成果の概要（英文）：Melanin granules are produced in melanocytes, and are eventually transferred to the neighboring keratinocytes during skin pigmentation. So far we have succeeded in direct visualization of melanin-transfer by live imaging analyses using a skin tissue of chicken embryos cultured *ex vivo*. Melanin granules are transferred to the keratinocytes via the membrane vesicles. In this study, we understood the mechanisms underlying processes of the melanin-transfer: 1) vesicle budding (membrane blebbing), 2) vesicle release from the melanocytes, and 3) uptake of membrane vesicles by the keratinocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学・発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：色素細胞・角化細胞・メラニン顆粒（メラノソーム）・色素沈着・細胞間輸送

1. 研究開始当初の背景

表皮の色素細胞で産生されたメラニン色素は、のちに隣接する角化細胞へと輸送されることで表皮に沈着して全身を紫外線から守る。メラニン色素の細胞間輸送メカニズムを解明することは、基礎生物学のみならず色素疾患

などの臨床の面でも極めて重要であるが、分子機構はおろかどのようにメラニン顆粒が表皮細胞に輸送されるかすら明らかにされていなかった。申請者は、トリ胚での色素細胞の長期標識法（所属研究室で開発したTo12 トランスポゾン法による）とライブイメージング

法を新規に確立し、メラニン顆粒が色素細胞の細胞膜に包まれて角化細胞に輸送されることを初めて明らかにした。また経時的な観察から1) 色素細胞が膜ブレップ (小胞出芽) を起こす、2) メラニン顆粒が色素細胞の細胞膜に包まれて放出される、3) 膜小胞が角化細胞に取り込まれるという一連の輸送過程を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究はこれらの観察結果に基づいて、メラニン色素輸送の分子機構の解明を目指し、「背景」で述べたメラニン輸送の3過程について以下の点を明らかにする。

1) 色素細胞から出芽するメカニズム (膜ブレップ): 色素細胞内のメラニン顆粒の細胞内輸送と膜ブレップの関係を探るとともに、種々の分子に注目し膜ブレップの分子機構を探索する。

2) 色素細胞から膜小胞が放出される機構: 主に膜小胞の放出と周囲の角化細胞の關係に注目して探索する。

3) 膜小胞が角化細胞により取り込まれる機構: 主に取り込み様式を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 色素細胞から出芽するメカニズム (膜ブレップ): およそメラニン顆粒が色素細胞内に形成される時期に膜ブレップが起こることからメラニン顆粒が膜ブレップを誘導する可能性を検証し、そして他の細胞種において膜ブレップに関わるとの報告がある分子を中心として色素細胞の膜ブレップに関与する分子の探索を試みた。前者については、メラニン顆粒の形成や細胞膜への接触などを遺伝子操作により阻害することで検証を試みた。後者についてはTo12 Tet-ONシステムを用いて膜ブレップが起こる時期に時期特異的に候補分子の機能阻害を行い、膜ブレップに与える影響を調べた。

2) 色素細胞から膜小胞が放出される機構: 主に周囲の角化細胞との相互作用に注目して解析を進めた。当初、レーザー照射により周囲の角化細胞を除去することにより膜小胞の放出における角化細胞の必要性を検査する予定であったが、技術的な問題により色素細胞をトリ胚表皮に移植することにより同様のことを検証した。加えて、候補分子の絞り込みを行い、これらの分子を角化細胞において過剰発現させることにより膜小胞の

放出を誘導する分子を探索する。

3) 膜小胞が角化細胞により取り込まれる機構: 申請者の観察により、メラノソームを含んだ膜小胞が角化細胞に取り込まれることが明らかになった。そこで角化細胞による膜小胞の取り込みが貪食によるものなのか、それとも膜小胞と角化細胞の膜融合を介したエキソサイトーシスなのかを明らかにする。具体的には、膜小胞を緑蛍光 (膜局在型 EGFP) によって、そして表皮細胞を赤色蛍光により染色して膜小胞の取り込みを観察した。

4. 研究成果

1) 色素細胞の膜ブレップには低分子量 Gタンパク質 “RhoA” が重要である。

解析を行うにあたり、はじめに正常な色素細胞における膜小胞の出芽頻度を統計的に解析し、機能解析を行うための基盤を整えた (図 1 A)。次に、研究実施計画に則り、色素細胞内におけるメラニン顆粒の輸送と出芽の関係を探るために、細胞内輸送を停止させるなどの操作を行い、膜小胞の出芽に及ぼす影響を調べた。この結果、メラニン顆粒の細胞内輸送を抑制する Rab27 dominant negative により操作した場合においても、膜ブレップが抑制されないことが分かった。

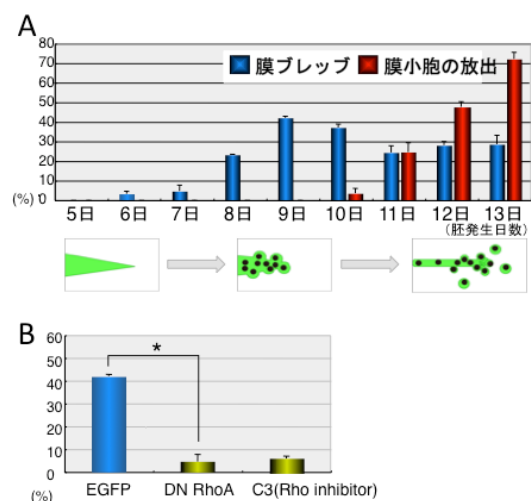


図 1. 膜ブレップには RhoA の活性が必要である。A. 正常胚の表における膜ブレップと膜小胞の放出頻度の推移。B. RhoA の活性を阻害したときの膜ブレップ頻度 (胚発生 9 日目において観察した)。

そこで次に、細胞骨格を制御する因子に注目して出芽メカニズムの探索を行った。これ

までに他の細胞種において膜ブレップに関係が認められる RhoA, Arf6, PKC, Src, Erk などについて検証を行った。この結果、RhoA dominant negative や Rho 阻害酵素 (C3) を色素細胞に発現させることにより、膜ブレップを起こす色素細胞の割合が統計的に有意に減少することが明らかとなった (図 1 B)。加えて、RhoA の下流分子である Rock (Rho キナーゼ) の阻害においても同様の結果が観察された。さらに膜ブレップを起こしている色素細胞に Rock 阻害剤を滴下した場合、数秒で完全に膜ブレップが停止する。以上の結果から、色素細胞の膜小胞放出に先立って起こる出芽 (膜ブレップ) に RhoA の活性が必要であることを明らかにした。

2) 膜小胞の放出膜される機構について；小胞の放出機構を明らかにするため、周囲の角化細胞との相互作用に注目して解析を進めた。初めに移植などの手法を用いて、色素細胞の成熟度合やメラニン合成量に関わらず、膜小胞の放出タイミングが周囲の環境に依存する可能性を見出した。表皮に発現する遺伝子を探索した結果、ヒトの日焼け時の表皮にお

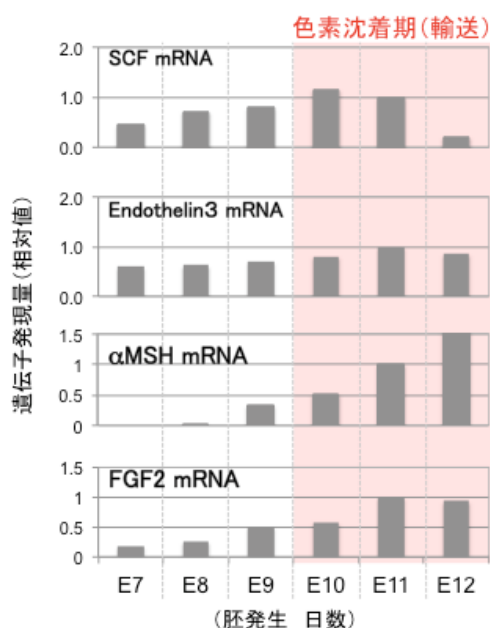


図 2. 色素沈着過程における角化細胞での遺伝子発現変化 (定量的 RT-PCR 法)。

いて発現する分子群が、トリ胚表皮においても発現することが明らかになった。さらにこれらの遺伝子の発現は、色素輸送が開始する胚発生10日目に向けて上昇することが示されるなど、膜小胞の放出に関わる分子の実態が徐々に明らかになりつつある (図 2)。これらの分子により角化細胞を遺伝子操作するた

めに、これまでに開発した角化細胞への遺伝子導入法の導入効率を大幅に改善し、解析可能な段階となった。現在、これら全ての分子について観察を行っているが膜小胞の放出量の測定はこれからである。

3) 角化細胞による膜小胞の取り込みについて；膜小胞が貪食および膜融合のどちらによって取り込まれるのかを明らかにするために、膜小胞を緑蛍光 (膜局在型 EGFP) によって、そして表皮細胞を赤色蛍光により染色して膜小胞の取り込みを観察した (図 3)。もしも、膜融合の場合は両蛍光が混ざり、貪食の場合は緑色の膜小胞が角化細胞の中に観察されると予想される。共焦点顕微鏡により光学断層撮影を行った結果から、膜小胞が貪食により取り込まれることを明らかにした (図 3)。

以上、本研究から色素輸送の3過程について理解を深めることができた。これらの研究成果は基礎生物学のみならず化粧品開発などの応用分野においても意義深い。

4) 今後は本研究の研究成果を活かして、引き続き膜小胞の放出の引き金を引く角化細胞からの因子を同定に努める。加えて、角化細胞が膜小胞をどのように認識して貪食するのかを明らかにする。近い将来、膜小胞による色素輸送の分子機構の全貌を明らかにする。さらに紫外線を受けたとき、トリの羽と表皮、そしてトリとヒトなど、異なる状況下において色素輸送が違うのかを検証することにより、細胞間輸送について理解を深めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Yokota, Y., Saito, D., Tadokoro, R., Takahashi, Y., Genomically integrated

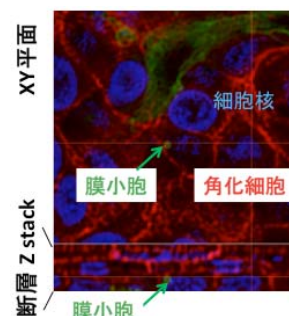


図 3. 膜小胞は貪食により角化細胞内に取り込まれる。膜小胞 (緑 EGFP)、角化細胞 (赤ファロイジン)、核 (青 DAPI)

transgenes are stably and conditionally expressed in neural crest cell-specific lineages., *Dev. Biol.*, 353: 382-395, 2011, 査読あり

2. Yoshino, T., Saito, D., Tadokoro, R., Takahashi, Y., EMT, In vivo gene manipulations of epithelial cell sheets: a novel model to study epithelial-to-mesenchymal transition., *Dev. Growth Differ.*, 53:378-388, 2011, 査読あり

[学会発表] (計 15 件)

1. Tadokoro, R., Ex vivo live-imaging to directly visualize melanin transfer from melanocytes to keratinocytes in the skin., Top Runners: -Women's Life in science-, 2012. 1. 19, 奈良 (国際シンポジウム) (招待講演)

2. Takahashi, Y., Murai, H., Sakai, K., Tadokoro, R., Live imaging of melanosome transfer in the developing skin., 21th International Pigment Cell Conference, 2011. 9. 21, フランス・ボルドー (国際シンポジウム) (招待講演)

3. 村井秀隆, 田所竜介, 酒井謙一郎, 高橋淑子, Melanosome transfer during skin pigmentation: a novel method to study intercellular signaling between melanocytes and keratinocytes *in vivo.*, 日本発生物学会第 44 回大会, 2011. 5. 18, 沖縄 (口頭発表)

4. Tadokoro, R., Sakai, K., Murai, H. and Takahashi, Y.: *Ex vivo* live imaging at high resolution to directly visualize melanin transfer from melanocytes to keratinocytes. 16th International Conference of the International Society of Differentiation "From Stem Cells to Organisms", 2010. 11. 15, 奈良県新公会堂, 奈良 (ポスター)

5. Takahashi, T., Takase, Y., Tadokoro, R. and Takahashi, Y.: Formation of blood vessels is controlled by neural progenitor cells in the central nervous system., 16th International Conference of the International Society of Differentiation

"From Stem Cells to Organisms", 2010. 11. 15, 奈良県新公会堂, 奈良 (ポスター)

6. Murai, H., Tadokoro, R. and Takahashi, Y.: Novel method to investigate the interactions between melanocytes and keratinocytes in developing skin. 16th International Conference of the International Society of Differentiation "From Stem Cells to Organisms", 2010. 11. 15, 奈良県新公会堂, 奈良 (ポスター)

7. Yasue, T., Tadokoro, R. and Takahashi, Y.: Migration of human fibrosarcoma cells toward the blood vessel when transplanted into chicken embryo. 16th International Conference of the International Society of Differentiation "From Stem Cells to Organisms", 2010. 11. 15, 奈良県新公会堂, 奈良 (英語口頭)

8. 田所竜介, 酒井謙一郎, 村井英隆, 高橋淑子, 新規の表皮内ライブイメージング法を用いた色素細胞の挙動とメラニン輸送の可視化, 第22回高遠シンポジウム, 2010. 8. 19, 長野 (国内シンポジウム) (招待発表)

9. Tadokoro, R., Sakai, K., Murai, H., Takahashi Y., Ex vivo live-imaging at high resolution to directly visualize melanin transfer from melanocytes to keratinocytes., Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting Jointly with the Japanese Society of Developmental Biologists, 2010. 8. 7, アルバカーキ, ニューメキシコ, アメリカ (ポスター)

10. Takahashi, T., Tadokoro, R., Takase, Y., Takahashi, Y., Patterning of blood vessels is controlled by neural progenitor cells in the central nervous system., Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting Jointly with the Japanese Society of Developmental Biologists, 2010. 8. 7, アルバカーキ, ニューメキシコ, アメリカ (ポスター)

11. Atsuta, Y., Ohata, E., Tadokoro, R., Saitou, D., Takahashi, Y., Tubular extension and cell epithelialization are coordinately regulated and influenced by

adjacent tissues., Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting Jointly with the Japanese Society of Developmental Biologists, 2010.8.7, アルバカーキ, ニューメキシコ, アメリカ (ポスター) (学生優秀ポスター賞受賞)

12. 田所竜介, 村井秀隆, 酒井謙一郎, 高橋淑子, *Ex vivo* live-imaging at high resolution to directly visualize melanin transfer from melanocytes to keratinocytes., 第 43 回日本発生生物学会, 2010.6.21, 京都国際会館, 京都 (ポスター)

13. 高橋輝明, 田所竜介, 高瀬悠太, 高橋淑子, Formation of blood vessels is controlled by neural progenitor cells in the central nervous system., 第 43 回日本発生生物学会, 2010.6.21 京都国際会館, 京都 (口頭)

14. 熱田勇士, 大畑絵美, 田所竜介, 斎藤大介, 高橋淑子, Epithelialization and extension of tubular structures are regulated by interactions between neighboring tissues., 第 43 回日本発生生物学会, 2010.6.20 京都国際会館, 京都 (口頭)

15. 田所竜介, 村井秀隆, 酒井謙一郎, 高橋淑子, *Ex vivo* live-imaging at high resolution to directly visualize melanin transfer from melanocytes to keratinocytes., 第 62 回日本細胞生物学会, 2010.5.21, 大阪国際会議場, 大阪 (ポスター)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田所竜介 (TADOKORO RYOSUKE)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科

研究者番号 : 50425633