

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06252

研究課題名(和文) 体表呈色の濃淡を制御するメガ小胞の形成メカニズムを解明する

研究課題名(英文) Exploring a formation mechanism underlying melanin-transport vesicles, large vesicles, during body pigmentation

研究代表者

田所 竜介 (Tadokoro, Ryosuke)

岡山理科大学・工学部・准教授

研究者番号：50425633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々の肌や毛はメラニン色素により彩られる。このメラニン色素は皮膚にあるメラノサイトの中のメラノソーム(色素産生オルガネラ)により産生されたのち、周囲の表皮細胞へと輸送される。この現象は色素輸送と呼ばれ、体表の呈色に不可欠なプロセスである。本研究では、研究代表者がニワトリ胚表皮をモデルとした解析により、これまでに見出した3通りの輸送法のうち、細胞膜からできた大型の輸送小胞(メガ小胞)の形成メカニズムを、独自の視点で調査した。皮膚内及び培養系などを用いて、形成過程のイメージングや表皮構造及びメラノソームなどに関して調査を行い、形成メカニズムの解析の糸口となる多くの情報を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、体表のメラニン色素呈色の理解に向けた多くのデータが得られた。本研究の成果を発展させ体表の呈色機構を全解明することにより、基礎生物学的な発展を生むことは言うまでもない。加えて、ドラッグデリバリーなどの創薬や、美白化粧品開発などへの応用が期待される。とりわけ国民の皮膚や毛髪に関する悩みや関心は高く、将来的に国民の生活の質を向上させることに一躍かうと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our skin and hair are colored by melanin pigment. The melanin pigment is synthesized in melanosomes (pigment-producing organelles) in melanocytes in the skin tissue and finally transferred to surrounding keratinocytes, epidermal cells. This phenomenon, called melanin transfer, is an essential for the pigmentation of body surface. In this study, we investigated the formation mechanism of the large vesicles generated from the plasma membrane of melanocytes, one of the three methods of transport we previous found so far in chicken embryonic skin. Using the analyses in the skin tissue of chicken embryos as a model system and some in vitro culture systems, we investigated the formation process of large vesicles and their mechanisms from view point of epidermal structure, melanosomes, etc., and obtained a great deal of information that provided clues to the analysis of the formation mechanism.

研究分野：発生生物学

キーワード：メラニン色素 オルガネラ メラノソーム 色素沈着 メラノサイト 表皮細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物の皮膚や毛はメラニン色素により彩られている。メラニン色素呈色は、紫外線防御、婚姻色や保護色などをはじめとして、動物の生存戦略に深く関わっている。体表が呈色する際、メラニン色素はメラノサイト内の色素産生オルガネラ“メラノソーム”において産生され、この色素を含むメラノソームが表皮細胞へと細胞間輸送されることで、表皮に色を与えられる。研究代表者は、これまでにニワトリ胚の表皮をモデルとした遺伝子操作技術や皮膚内ライブイメージング法などを確立し、メラノサイトから発せられる細胞膜小胞(マイクロ小胞)を介して色素が輸送されることを示した^{1,2}。この輸送に加えて、糸状仮足や大型の小胞(メガ小胞)を介して色素が輸送される可能性も見出してきた³。とりわけメガ小胞は大量のメラノソームを含むことから、体表呈色や体表の濃淡が作られる上で極めて重要であると考えられるが、その形成メカニズムについては解析の糸口となる情報がなく、まったく不明な状態であった。

2. 研究の目的

本研究は、これまでに研究代表者がトリ胚表皮において見出した3種類の輸送のうちメガ小胞に焦点を絞り、表皮細胞の構造やメラノサイト及びメラノソームなどに注目して、メガ小胞に関する情報収集と、その形成メカニズムの探索に努めた。

3. 研究の方法

(1) メガ小胞の形成過程を精査する

①ニワトリ受精卵ヒペコ種は霜島鶏園から購入した。受精卵を38.5°Cで2日間孵卵したのち、胚発生2日目胚の神経管背側(メラノサイトが生まれる領域)に細胞膜結合型EGFP(pT2A CAGGS GapEGFP)とTol2トランスポゼーゼの遺伝子溶液を注入し⁴、7Vの電圧を5回かけて遺伝子導入した¹。皮膚内解析:色素沈着期(胚発生10~12日目)の胚を取り出し、皮膚を単離して共焦点レーザー顕微鏡及び蛍光顕微鏡を用いてメラノサイトの皮膚内解析をおこなった¹。培養解析:ニワトリ由来のメラノサイトの単離にあたり、まず前述の手法によりネオマイシン耐性遺伝子をニワトリ胚のメラノサイトに導入し、胚発生9日目まで発生を進めたのち、皮膚をトリプシンにより細胞分散させた⁵。この細胞をMelmix培地(G418含)で薬剤選択培養して、メラノサイトを単離した。ヒトメラノサイトは新生児初代培養メラノサイトを用いた。これらの細胞をそれぞれ多孔膜上で培養して、共焦点レーザー顕微鏡及び蛍光顕微鏡により観察した。

②力学的な解析:メラノサイトに掛かる力

マイクロマニピュレーターはナリシゲのM152とMM0220Aを用い、ガラスキャピラリー(ナリシゲGD1)は同社PC-100により加工して作成した。シリコンディッシュはビーエム機器のSTB-CH-04を使用した。顕微鏡下でイメージングをしながら、ガラスキャピラリーによる操作をおこなった。マグネットを用いた装置は、電磁石(φ5鉄心にφ0.8エナメル線を300巻き)を作成し、これをリレー回路(SRD-12VDC-SL-C)を組み込んだマイコン制御式回路に取り付けて、力の調整ができるようにした。組織に超小型のネオジウム磁石を取り付けて、顕微鏡下で蛍光標識したメラノサイトをイメージングしながら組織に力を加えた。

(2) メラノソームの光遺伝学操作

光結合タンパク質(LOVpep/ePDZ)をコードする遺伝子はAddgeneから入手した。メラノソーム結合タンパク質-LOVpep及びePDZ-モータータンパク質を発現させるためのプラスミドを構築した(論文発表などの都合上詳細は割愛する)。これらのプラスミドをマウスのメラノーマ細胞に導入してメラノソーム操作の解析をおこなった。加えて(1)の①に記載した方法でトリ胚メラノサイトにも導入した。これらのサンプルは顕微鏡観察の直前まで暗所で培養保管し、光結合に必要となる488nmのレーザー光を照射しつつ、ライブイメージングをおこなった。

(3) メラノソームとメガ小胞の関係を探る

白色レグホンは竹内孵卵場から購入した。ヒペコ種(黒色)と白色レグホン(白色)のメラノサイトに、それぞれの前述の方法を用いて、細胞膜結合型のEGFPを導入した。色素沈着が生じる時期に胚から体表を単離し、(1)の①と同様の手法で比較解析をおこなった。

(4) 皮膚組織に発現する分子からメガ小胞の形成機構に迫る

皮膚組織に発現する遺伝子を組み込んだ発現プラスミド(ドキシサイクリンにより遺伝子発現を誘導できるもの)を構築した。これらの遺伝子をリポフェクションもしくは引用文献5に記載したウイルス法により、胚発生2日目のトリ胚表皮に導入した⁵。加えて、メラノサイトの形状を可視化するため、(1)の①と同様の手法でメラノサイトに細胞膜結合型のEGFPを導入した。色素沈着が生じる時期に胚から体表を単離し、共焦点顕微鏡及び蛍光顕微鏡で観察をおこなった。

4. 研究成果

(1) メガ小胞の形成過程の調査

①皮膚内：研究の方法に記した手法により、ニワトリ胚（ヒペコ種）のメラノサイトの細胞膜を蛍光標識し、皮膚内でメラノサイトの動態を調べた。以前の予備実験の通り、樹状突起が切断されてメガ小胞ができる際、突起が退縮する様子が確認された。メガ小胞の形成は確率論的に生じ、くびれきれそうになっても切れずに退縮する突起も存在することが確認された。またメガ小胞の形成を精査するために、アクチン可視化などをはじめとしたプローブを作成し、メガ小胞の形成を解析してきた。突起のくびれ切れ時に、細胞分裂の時に見られるようなアクチンの収縮環が見られるかを調査したが、いまのところそのような明瞭な構造を見出すことはできていない。培養：ヒペコ種から単離した黒色のメラノサイトやヒトメラノサイトを多孔膜上で培養して顕微鏡観察を行い、多孔膜の穴に入り込んだ突起が切れること、そしてその過程を調査することができた。以上、メガ小胞の形成過程及びメラノサイトを取り巻く環境がメガ小胞の形成に関与する可能性が見出された。

②力学的な解析：メラノサイトに掛かる力

力学的な解析を行うために、研究期間を通して試行錯誤を繰り返して、解析系の確立を行ってきた。具体的には、伸縮性に富むシリコンディッシュやマイクロマニピュレーターによる操作法、マグネットを用いた装置の開発とそれによる操作法などを確立した（図1）。マイクロマニピュレーターに微細なガラスキャピラリーを取り付けて、培養メラノサイトの細胞突起に直接力をかけた。その結果、ある程度の力以上をかけると物理的に突起がちぎれるなどの結果を得た。マグネットを用いた装置は、研究の方法に記した通りに作成した。この装置を顕微鏡のステージに取り付け、一方組織に微細なネオジウムマグネットを取り付けて、段階的にメラノサイトを含む組織に力をかけると、くびれるような振る舞いを示す突起もみられた（図1下図）。これらの結果はまだ未熟で不確定なものであるが、本研究の目的を達成するための大きな一歩となった。今後この成果と作成した装置を活かして、引き続き調査を続ける予定である。

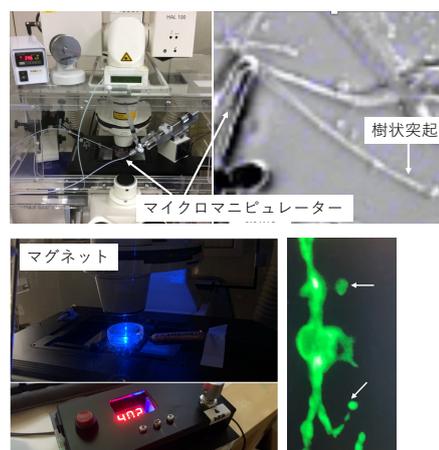


図1. 力学的な解析

上段はマイクロマニピュレーター、下段はマグネットを用いて力をかける装置

(2) メラノソームの光遺伝学操作

メラノソームの蓄積とメガ小胞の形成の関係を精査するためのツール作成に挑戦した。研究代表者は本研究を計画する時点で、オルガネラの光遺伝学的な操作法を確立していたが、研究期間内にメラノソームの光操作法をより実用レベルに改良し活用することを目指した。具体的には、メラノソームとモータータンパク質に光結合タンパク質を付けることによって光操作する。本研究では、これまで既に単離していたモータータンパク質に加えて、複数のキネシン・ダイニン・ミオシンを単離して、複数のプラスミドを構築した。これにより培養細胞およびトリ胚メラノサイトにおいて、一定の頻度でメラノソームを操作することを可能にしたが、思い通りに操作できる頻度はまだ高くない状態である（図2）。この点、研究期間内に当初計画ほど本手法を用いた解析を展開することはできなかったが（他の代替実験でも解析）、技術的な改善を行い実用段階に近づけることができた。以上、問題点と今後の改善点も浮き彫りになった。

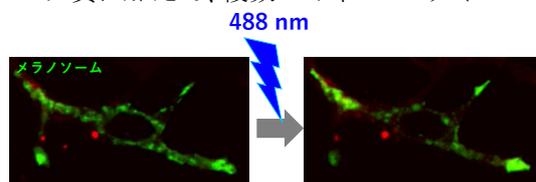


図2. トリメラノサイト内のメラノソーム光操作

(3) メラノソームとメガ小胞の関係を探る

当初の予定通り、培養細胞レベルでメラノソームの光操作による解析にも挑戦しつつ、この光操作の問題点を補うべく、より直接的な以下の解析も実施してメラノソームとメガ小胞の関係を探った（複数種の解析を遂行したが以下を抜粋して報告する）。具体的には、真黒なメラノソームを大量にもつメラノサイト（ヒペコネラ種由来）とメラノソームをもたないメラノサイト（白色レグホン）の振る舞いを、組織内で比較調査した。ちなみに白色レグホンはメラノソーム

の構成分子に変異があるため、メラノソームがうまくできない（その他、表皮環境などに異常はないとされる）。メラノサイトを可視化するにあたり、両者のメラノサイトを細胞膜結合型 EGFP で標識した（研究の方法（1）①）。現段階の調査結果では、ヒペコネラ種のメラノサイトは全体的に丸みを帯びており、メガ小胞が形成される際に特有の突起がくびれきれの形態およびメガ小胞が多く観察された（図3）。一方、白色レグホンのメラノサイトは、比較的尖った形態のものが多くメガ小胞の形成も少ないことがわかった（図3）。以上、メラノソームの有無がメガ小胞形成に影響することが示唆された。今回の調査結果を踏まえ、今後はさらにより高精度の解析法を確立しつつ、メラノソームとメガ小胞の関係について調査を続ける必要があると考えられる。

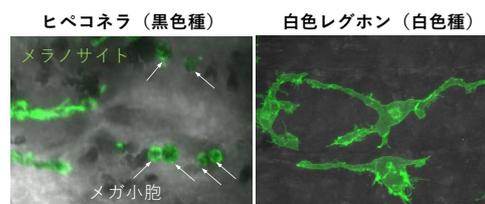


図3. メラノソームの有無とメガ小胞形成

（4）皮膚組織に発現する分子からメガ小胞の形成機構に迫る

研究代表者が作成した網羅的な遺伝子発現解析データ（色素沈着時と未色素沈着時）から色素沈着時に発現上昇する複数の遺伝子をピックアップした（内訳は非公表とする）。これらの遺伝子をトリ胚の表皮に遺伝子導入して、メラノソームの形成とメガ小胞の形成について観察を行った。以前の研究費報告書でも報告した SCF を導入した際に、最も過剰にメラノソームの形成と色素合成が亢進するという結果を得た。この分子によりメラノサイトに及ぶ影響を精査した結果、メラノサイトのメラノソーム量の増加に伴い、メガ小胞の形成も亢進する可能性が再確認された。以上の結果から、メラノソームとメガ小胞の形成の関連が示唆された。

本研究を通して、メガ小胞の形成メカニズムを探るために必要不可欠な多くの情報を収集することができた。本研究成果を基盤として、これからメガ小胞の形成メカニズムの核心を解明したいと考える。本研究は、コロナウイルスによる影響に直撃されつつ、所属機関を移動して研究室を立ち上げ運営するという状況のなかで遂行したものである。このような困難な局面のなか、私は本研究費の助成があったからこそ研究を続けることができました。ここで国民に広く感謝の意を述べたい。

<引用文献>

- ① Tadokoro, R., Murai, H., Sakai, K., Okui, T, Yokota, Y., Takahashi, Y. Melanosome transfer to keratinocyte in the chicken embryonic skin is mediated by vesicle release associated with Rho-regulated membrane blebbing. *Scientific Reports*, 6: 38277 (2016)
- ② 田所竜介, 村井英隆, 酒井謙一郎, 高橋淑子, ライブイメージング法を用いた表皮内メラノサイトの可視化, 小児皮膚科学会誌, 32:5-9 (2013)
- ③ Tadokoro, R. & Takahashi, Y. Intercellular transfer of organelles during body pigmentation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 45:132-138 (2017)
- ④ Sato, Y., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Kawakami, K., Takahashi, Y. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Dev. Biol.* 305: 616-624 (2007)
- ⑤ Murai, H., Tadokoro, R. (共筆頭著者), Sakai, K., Takahashi, Y. In ovo gene manipulation of melanocytes and their adjacent keratinocytes during skin pigmentation of chicken embryos. *Dev. Growth Differ.* 57: 232-242 (2015)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawachi Teruaki, Tadokoro Ryosuke, Takahashi Yoshiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Cell Lineage, Self-Renewal, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition during Secondary Neurulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Korean Neurosurgical Society	6. 最初と最後の頁 367 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3340/jkns.2021.0054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shikaya Yuuki, Takase Yuta, Tadokoro Ryosuke, Nakamura Ryo, Inaba Masafumi, Takahashi Yoshiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Distribution Map of Peristaltic Waves in the Chicken Embryonic Gut Reveals Importance of Enteric Nervous System and Inter-Region Cross Talks Along the Gut Axis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 827079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.827079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawachi Teruaki, Shimokita Eisuke, Kudo Ryo, Tadokoro Ryosuke, Takahashi Yoshiko	4. 巻 461
2. 論文標題 Neural-fated self-renewing cells regulated by Sox2 during secondary neurulation in chicken tail bud	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 160 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2020.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ando Hideya, Yoshimoto Satoshi, Yoshida Moemi, Shimoda Nene, Tadokoro Ryosuke, Kohda Haruka, Ishikawa Mami, Nishikata Takahito, Katayama Bunpei, Ozawa Toshiyuki, Tsuruta Daisuke, Mizutani Ken-ichi, Yagi Masayuki, Ichihashi Masamitsu	4. 巻 21
2. 論文標題 Dermal Fibroblasts Internalize Phosphatidylserine-Exposed Secretory Melanosome Clusters and Apoptotic Melanocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5789 ~ 5789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21165789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawachi Teruaki, Tadokoro Ryosuke, Takahashi Yoshiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Cell Lineage, Self-Renewal, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition during Secondary Neurulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Korean Neurosurgical Society	6. 最初と最後の頁 367 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3340/jkns.2021.0054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawachi T, Shimokita E, Kudo R, Tadokoro R, Takahashi Y.	4. 巻 461
2. 論文標題 Neural-fated self-renewing cells regulated by Sox2 during secondary neurulation in chicken tail bud.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 160-171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2020.02.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tadokoro R, Shikaya Y, Takahashi Y.	4. 巻 57
2. 論文標題 Wide coverage of the body surface by melanocyte-mediated skin pigmentation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 232-241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2018.04.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 8件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田所竜介
2. 発表標題 トリ胚をモデルとした色素沈着の解析
3. 学会等名 第30回日本色素細胞学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 光延恭兵 川地輝明 田所竜介
2. 発表標題 トリ胚のメラニン色素呈色：糸状仮足を介した色素輸送の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saeki, H., Shigematsu, R., Tadokoro, R.
2. 発表標題 皮膚呈色時にみられる色素輸送の解析
3. 学会等名 OUSフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadokoro, R.
2. 発表標題 ニワトリ胚表皮の呈色における色素輸送と色素細胞の細胞膜動態
3. 学会等名 日本色素細胞学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadokoro, R.
2. 発表標題 ニワトリ胚表皮の呈色における色素輸送と色素細胞の細胞膜動態
3. 学会等名 コスメティックサイエンスシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadokoro, R.
2. 発表標題 体表を彩るメラニン呈色：色素の細胞間輸送
3. 学会等名 神戸大学公開セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadokoro, R.
2. 発表標題 皮膚を彩るメラニン呈色：色素の細胞間輸送
3. 学会等名 皮膚科学と数理の接点を探索する会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadokoro, R.
2. 発表標題 ニワトリ胚表皮の呈色における色素輸送と色素細胞の細胞膜動態
3. 学会等名 第5回幹細胞・細胞分化に関する合同リトリート
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadokoro, R.
2. 発表標題 Melanosome transfer and plasma membrane dynamics of melanocytes during skin pigmentation in the chicken embryonic skin
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadokoro, R., Kousaka, K., Takahashi, Y.
2. 発表標題 Melanosome transfer and dynamics of plasma membrane of melanocytes during skin pigmentation in the chicken embryonic skin.
3. 学会等名 日本発生生物学会・日本細胞生物学会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadokoro, R.
2. 発表標題 Organelle transport during pigmentation.
3. 学会等名 Frontline of developmental biology（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 椛島健治ほか61名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 426
3. 書名 進化する皮膚科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------