

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591357

研究課題名(和文) メラニン生成関連遺伝子及び紫外線によるメラニン生成の制御機構

研究課題名(英文) Control mechanism of melanogenesis by pigmentation-related genes and ultraviolet radiation

研究代表者

伊藤 祥輔 (ITO SHOSUKE)

藤田保健衛生大学・名誉教授

研究者番号：70121431

研究成果の概要(和文)：

本研究は、従来メラノソームの形成、黒色メラニン・黄色メラニンの産生転換、メラノソームの細胞内分布、ケラチノサイトへの輸送等に働いていることが知られていた、アグチ (*A*)、ブラウン (*Tyrp1^{b/b}*)、アルビノ (*Tyr^{c/c}*)、ダイリュート (*Myo5a^{d/d}*)、リセッシブイエロー (*Mcl1^{e/e}*)、ピンクアイドダイリューション (*Oca2^{p/p}*)、スレーティアー (*Dct^{slt/slt}*)、ルビーアイ 2^d (*ru2^d/Hps5^{ru2-d}*)等の毛色遺伝子がメラノブラスト・メラノサイトの増殖やメラノサイトの分化を発生に伴って時間的に制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Our present results suggest that melanoblast/melanocyte proliferation and melanocyte differentiation are regulated in a time- and development-dependent manner by many coat color genes, especially Agouti (*A*), brown (*Tyrp1^{b/b}*), albino (*Tyr^{c/c}*), dilute (*Myo5a^{d/d}*), recessive yellow (*Mcl1^{e/e}*), pink-eyed dilution (*Oca2^{p/p}*), slaty (*Dct^{slt/slt}*) and ruby-eye 2^d (*ru2^d/Hps5^{ru2-d}*) otherwise known for their ability to regulate melanosome formation and maturation, pigment switching, melanosome distribution and transfer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究代表者の専門分野：有機化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：メラニン、遺伝子、紫外線

1. 研究開始当初の背景

メラニン色素はメラノサイトにおいて生成され、ケラチノサイトに受け渡され、皮膚や毛の色が決まる。哺乳類のメラニンには黒

色のユーメラニンと赤褐色のフェオメラニンの2型があり、前者は紫外線に対して細胞防御に働くが、後者は光発がんをもたらすとされている。マウスのメラニン生成に関し

では、約 130 種類のメラニン生成関連遺伝子が知られているが、それら遺伝子のメラニン生成における役割については未だ不明な点が多い。また、紫外線がマウスの毛色発現に拘る遺伝子の発現をどのように制御しているかについては、ほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では C57BL/10Hir(black)系統を基本とし、メラニン生成関連遺伝子(Agouti, brown, albino, dilute, pink-eyed dilution, recessive yellow, slaty, ruby-eye)を導入したコンジェニックマウス(C57BL/10Hir-*A/A*, -*b/b*, -*c/c*, -*d/d*, -*p/p*, -*e/e*, -*slt/slt*, -*ru/ru*)を用いて、それらの遺伝子によるメラニン生成の制御機構を明らかにする。さらに、マウス及びヒト培養メラノサイトを用いて、紫外線及びメラニン生成を調節する諸因子の影響を調べる。

3. 研究の方法

コンジェニックマウスの新生児の表皮から、広部が開発した方法でメラノサイトを単離・培養し、その増殖・分化の特徴を調べる。純粋培養した表皮メラノサイトおよび培養上清中のユーメラニン、フェオメラニン量を測定し、black と比較することにより、特定遺伝子の機能解析を行う。メラニン定量には、伊藤らの開発した微量化学低療法を用いる。

4. 研究成果

(1) recessive yellow 遺伝子 (論文7)

Recessive yellow (*e/e*)マウスの新生児の表皮・真皮におけるユーメラニン量はblack(*E/E*)に比べて著しく少なかった。一方、フェオメラニン量は逆であった。雌の*e/e*マウスの毛のメラニン量は雄に比べて多かった。このような雌雄差は*E/E*マウスでは見られなかった。その原因を調べるため、*e/e*マウスに性ホルモンを注射したところ、エストロンは雌で、テストステロンは雄でメラニン量を増加させた。これらの結果は、recessive yellow 遺伝子が性ホルモンに関与したメラニン生成調節機構に関与している可能性を示唆した。

(2) pink-eyed dilution 遺伝子 (論文3)

メラニン形成への*p*遺伝子の影響を調べるため、二重変異マウスを作成し、体毛中のメラニンを分析した。pink-eyed black と pink-eyed agouti ではユーメラニン量は野生型(*P/-*)に比べて1/20以下に減少したが、pink-eyed recessive yellow と pink-eyed agouti ではフェオメラニン量は減少しなかった。これらの結果は、pink-eyed dilution 変異はユーメラニン合成を抑制するが、フェオ

メラニン合成には影響しないことを示唆した。

(3) *ru*^{2d}遺伝子 (論文2)

広部研究室でC57BL/10Hir系統のブラックのマウスに自然突然変異で生じた、チョコレート色の毛色でルビー色の目をしたルビーアイマウスは、ルビーアイ2 (*ru2/Hps5*) 遺伝子の一塩基欠失突然変異体であることがわかった。この新規突然変異遺伝子 *ru*^{2d} は、メラノプラストからメラノサイトへの分化を顕著に抑制した。すなわち、毛や培養細胞中のユーメラニン量はblackよりも顕著に少なかったが、培養液中では逆に多かった。L-チロシン添加によりメラノサイトの分化が顕著に促進され、チロシナーゼ活性やユーメラニン量、第IV期メラノソーム数が著明に増加した。これらの結果は、*ru*^{2d} 遺伝子がL-チロシンの輸送、利用に関係している可能性を示唆した。

(4) その他

① ユーメラニン及びフェオメラニンの微量簡便定量法に改良を加えた (文献1)。

② フェオメラニン生成の後期過程を化学的に解析し、ベンゾチアジン骨格からベンゾチアゾール骨格への変換を示した (文献15)。

③ 培養眼メラノサイトのメラニン量を分析し、色調に関係なくフェオメラニン量は一定であるが、ユーメラニン量は色調が濃くなるとともに増加することを示した。これは、伊藤らの提唱するメラニン生成の「囲い込みモデル」(フェオメラニンが先に生成し、その上にユーメラニンが沈着する)を支持するものである (文献21)。

④ UVA、UVB、UVA+UVB (太陽光模倣)のメラニン生成への効果を比較したところ、同程度の皮膚の黒化を引き起こす照射量では、UVA+UVBはUVB単独よりもメラニン量を増加させた (文献18)。

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21件) (全て査読有)

① Ito S, Nakanishi Y, Valenzuela RK, Brilliant MH, Ludger K, Wakamatsu K. Usefulness of alkaline hydrogen peroxide oxidation to analyze eumelanin and pheomelanin in various tissue samples: Application to chemical analysis of human hair melanins. *Pigment Cell Melanoma Res* 24, in press, 2011.

② Hirobe T, Yoshihara C, Takeuchi S,

- Wakamatsu K, Ito S, Abe H, Kawa Y, Soma Y. A novel deletion mutation of mouse ruby-eye 2 named ru2^d/Hps⁵ru^{2-d} inhibits melanocyte differentiation and its impaired differentiation is rescued by L-tyrosine. *Zool Sci*, 28, in press, 2011.
- ③ Hirobe T, Ito S, Wakamatsu K. The mouse pink-eyed dilution allele of the P-gene greatly inhibits eumelanin, but not pheomelanin synthesis as studied by chemical analysis. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 241-246, 2011.
- ④ Ito S, Wakamatsu K. Human hair melanins: What we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 63-74, 2011. (総説)
- ⑤ Kadekaro AL, Leachman S, Kavanagh RJ, Swope V, Cassidy P, Supp D, Sartor M, Schwemberger S, Babcock G, Wakamatsu K, Ito S, Koshoffer A, Boissy RE, Manga P, Sturm R, Abdel-Malek ZA *Melanocortin 1 receptor* genotype: an important determinant of the damage response of melanocytes to ultraviolet radiation. *FASEB J* 24: 380-390, 2010.
- ⑥ Robinson S, Dixon S, August S, Diffey B, Wakamatsu K, Ito S, Friedmann P, Healy E. Protection against ultraviolet radiation involves MCR1-mediated non-pigmentary and pigmentary mechanisms in vivo. *J Invest Dermatol* 130: 1904-1913, 2010.
- ⑦ Hirobe T, Kiuchi M, Wakamatsu K, Ito S. Estrogen increases hair pigmentation in female recessive yellow mice. *Zool Sci* 27: 470-476, 2010.
- ⑧ Valenzuela RK, Henderson MS, Walch MH, Garrison NA, Kelch JT, Cohen-Barak O, Erickson DT, Meaney FJ, Walsh JB, Cheng KC, Ito S, Wakamatsu K, Frudakis T, Thomas M, Brilliant MH. Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. *J Forensic Sci* 55: 315-322, 2010.
- ⑨ Singaravelan N, Pavlicek T, Beharav A, Wakamatsu K, Ito S, Nevo E. Spiny mice modulate eumelanin to pheomelanin ratio to achieve cryptic coloration in “Evolution Canyon”, Israel. *PLoS One* 5: e8708 (7 pages), 2010.
- ⑩ Simon JD, Peles D, Wakamatsu K, Ito S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 563-579, 2009. (総説)
- ⑪ Coelho SG, Choi W, Brenner M, Miyamura Y, Yamaguchi Y, Wolber R, Smuda C, Kolbe L, Ito S, Wakamatsu K, Zmudzka B, Beer JZ, Miller SA, Hearing VJ. Short- and long-term effects of UV on the pigmentation of human skin. *J Invest Dermatol Symp Proc* 14: 31-35, 2009.
- ⑫ Vanover JC, Spry ML, Hamilton L, Wakamatsu K, Ito S, D’Orazio JA. Stem cell factor rescues tyrosinase expression and pigmentation in discrete anatomic locations in albino mice. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 827-838, 2009.
- ⑬ Van Raamsdonk, CD, Barsh GS, Wakamatsu K, Ito S. Independent regulation of hair and skin color by two G protein-coupled pathways. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 819-826, 2009.
- ⑭ Hida T, Wakamatsu K, Sviderskaya EV, Donkin AJ, Montoliu L, Lamoreux ML, Yu B, Millhauser GL, Ito S, Barsh GS, Jimbow K, Bennett DC. Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes: a cAMP-independent pathway. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 623-634, 2009.
- ⑮ Wakamatsu K, Ohtara K, Ito S. Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 474-486, 2009.
- ⑯ Hu D-N, Wakamatsu K, Ito S, McCormick SA. Comparison of eumelanin and pheomelanin content between cultured uveal melanoma cells and normal uveal melanocytes. *Melanoma Res* 19: 75-79, 2009.
- ⑰ Spry ML, Vanover JC, Scott T, Abona-Ama O,

Wakamatsu K, Ito S, D'Orazio JA. Prolonged treatment of fair-skinned mice with topical forskolin causes persistent tanning and UV protection. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 219-229, 2009.

- ⑱ Wolber R, Schlenz K, Wakamatsu K, Smuda C, Nakanishi Y, Hearing VJ, Ito S. Pigmentation effects of solar-simulated radiation as compared with UVA and UVB radiation. *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 487-491, 2008.
- ⑲ Le Pape EL, Wakamatsu K, Ito S, Wolber R, Hearing VJ. Regulation of eumelanin/pheomelanin synthesis and visible pigmentation in melanocytes by ligands of the melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 477-486, 2008.
- ⑳ Wakamatsu K, Hu D-N, McCormick SA, Ito S. Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes from eyes with various colored irides. *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 97-105, 2008.
- ㉑ Ito S, Wakamatsu K. Chemistry of mixed melanogenesis - pivotal roles of dopaquinone. *Photochem Photobiol* 84: 582-592, 2008. (総説)

[学会発表] (計9件)

- ① 広部知久. ルビーアイ2の新規突然遺伝子(ru^{2d}/Hps^{5d})はマウスのメラノサイトの分化を抑制し毛色を薄くするが、L-チロシンはその分化活性を回復させる. 第23回日本色素細胞学会学術大会. 2010年11月27日. 東京, 日本
- ② Ito S. Human hair pigmentation: Lessons from mouse hair pigmentation. 4th Asian Society for Pigment Cell Research. June 14, 2010. Guangzhou, China
- ③ Hirobe T. Estrogen increases the hair pigmentation in female recessive yellow mice. 4th Asian Society for Pigment Cell Research. June 14, 2010. Guangzhou, China.
- ④ Ito S. Chemical and biochemical control of mixed melanogenesis. 3rd Asian Society for Pigment Cell Research. June 11, 2009. Seoul, Korea.
- ⑤ 若松一雅. フェオメラニン生成の後期過程の化学的分析. 第22回日本色素細胞学会学術大会. 2009年12月5日. 福岡
- ⑥ Wakamatsu K. Reexamination of

microanalytical methods for melanin assay. Conjoint Meeting of XXth International Pigment Cell Conference & Vth International Melanoma Research Congress. May 7, 2008. Sapporo, Japan

- ⑦ Niki Y. Comparison of melanogenesis in cultured epidermal melanocytes from wild-type and mutant mice at the slaty locus. Conjoint Meeting of XXth International Pigment Cell Conference & Vth International Melanoma Research Congress. May 7, 2008. Sapporo, Japan
- ⑧ Hida T. Agouti protein modifies melanocyte shape and melanogenesis through cAMP-independent signaling pathway. Conjoint Meeting of XXth International Pigment Cell Conference & Vth International Melanoma Research Congress. May 7, 2008. Sapporo, Japan
- ⑨ LePape E. Regulation of melanocytes fate by an agonist inverse of MC1R and agouti protein. Conjoint Meeting of XXth International Pigment Cell Conference & Vth International Melanoma Research Congress. May 7, 2008. Sapporo, Japan

[図書] (計1件)

- ① Ito S, Wakamatsu K, d'Ischia M, Napolitano A, Pezzella A. Structure of Melanins. In: Riley PA, Borovansky J, Eds. *Melanin and Melanosomes*. Blackwell Publisher, pp. 167-185, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 祥輔 (ITO SHOSUKE)
藤田保健衛生大学・名誉教授
研究者番号: 70121431

(2) 研究分担者

若松 一雅 (WAKAMATSU KAZUMASA)
藤田保健衛生大学・医療科学部・教授
研究者番号: 80131259

(3) 連携研究者

広部 知久 (HIROBE TOMOHISA)
放射線医学総合研究所・生体影響機構研究
グループ・チームリーダー
研究者番号: 10111238