

100 mg/L streptomycin sulfate in a 10% CO<sub>2</sub> atmosphere. Transfection was performed by using FuGENE6 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's protocol. Cells grown on round coverslips coated with 1% porcine skin gelatin (Sigma-Aldrich) were transfected with 0.5 µg of plasmid DNA and cultured for 24 or 48 h according to the examination. When proteasome inhibitor was necessary, cells were incubated with 10 µmol/L MG132 (Sigma-Aldrich) for 5 h prior to the fixation.

#### Immunofluorescent staining and confocal laser scanning microscopy

Anti-PEP7, a rabbit polyclonal antiserum against tyrosinase, was kindly provided by Dr Vincent J. Hearing, USA. HMSA5, a mouse monoclonal antibody against Tyrp1, was developed previously.<sup>35</sup> HMB45, a mouse monoclonal antibody against gp100 was purchased from DAKO (Glostrup, Denmark). An anti-flag mouse monoclonal antibody (clone M2) and a rabbit anti-flag polyclonal antibody were purchased from Sigma. Goat antimouse and antirabbit immunoglobulin G antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 were products of Invitrogen. Immunofluorescent staining was performed as described previously with a slight modification.<sup>31</sup> Cells were fixed in a mixture of acetone and methanol (1:1) at -20°C for 5 min. After a brief wash with phosphate buffered saline containing 0.5% (w/v) bovine serum albumin, a pair of monoclonal and polyclonal primary antibodies was used simultaneously for double staining. The antibody dilution was as follows: HMSA5, 1:1000; anti-flag M2, 1:1000; and polyclonal anti-flag, 1:2000. The secondary fluorescent-labeled antibodies were used at a dilution of 1:600. The coverslips were mounted with Permafluor (Beckmann Coulter Immunotech, Marseille, France) on glass slides. Immunofluorescent images were obtained by confocal laser scanning microscopy using an Axiovert 100M (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) equipped with LSM510 V2.5 (Carl Zeiss). Transfected and untransfected cells were simultaneously included in every recorded image.

#### Fluorometric analysis and statistics

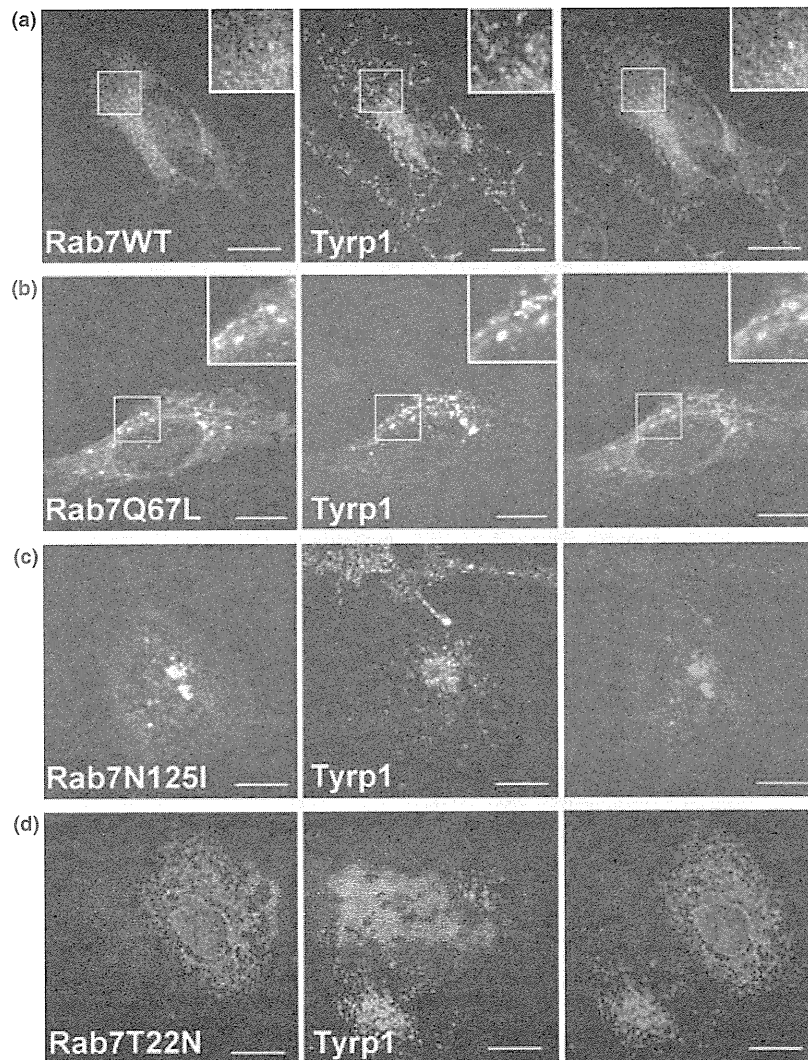
Confocal images were collected and fluorometric analysis was carried out with ImageJ 1.36b (National

Institute of Health, Bethesda, MD, USA). From each confocal image, the relative fluorescence in transfected cells to that in untransfected cells was calculated and categorized into four groups depending on the value: 0–0.1, 0.1–0.5, 0.5–2 and more than 2. The proportion of each group was statistically analyzed using Pearson's  $\chi^2$ -test (5% significance level).

## RESULTS

### Subcellular localization of wild-type and mutant Rab7

To observe the effect of Rab7 mutants directly and to compare the distribution of Tyrp1 in transfected and untransfected cells, the plasmids carrying wild-type *Rab7* (*Rab7WT*), a constitutively active mutant (*RabQ67L*) and dominant-negative mutants (*Rab7N125I* and *Rab7T22N*) were transfected to Melan-A melanocytes. The addition of the tag sequences to Rab proteins does not appear to alter their function or subcellular localization.<sup>17</sup> Twenty-four hours after the transfection, the cells were doubly immunostained with the anti-flag antibody and anti-Tyrp1 antibody. *Rab7WT* distributed on fine granules mostly in the perinuclear area (Fig. 1a). The granules were not well-demarcated, which suggested that *Rab7WT* existed as membrane-free molecules as well as membrane-bound ones. Tyrp1 was partly co-localized with the *Rab7WT*-positive granules in the perinuclear area (Fig. 1a, inset), but most Tyrp1-positive granules in the peripheral area or in dendrites were Rab7 negative. In *Rab7Q67L*-expressing cells, Tyrp1 was localized in perinuclear, enlarged granules and co-localized with *Rab7Q67L* (Fig. 1b). In the cells expressing *Rab7N125I* (Fig. 1c) or *Rab7T22N* (Fig. 1d), mutant Rab7 were distributed throughout the cytoplasm without showing localization to a particular organelle, though *Rab7N125I* was also detected in conglomerated structures in the juxtannuclear area. Because these structures did not show any co-localization with early or late endosomal markers, or with a Golgi marker (data not shown), we concluded that they were excess *Rab7N125I* molecules and were being degraded. Interestingly, only a small number of Tyrp1-positive granules were detected in the perinuclear area in the cells expressing *Rab7N125I* or *Rab7T22N* (Fig. 1c,d).



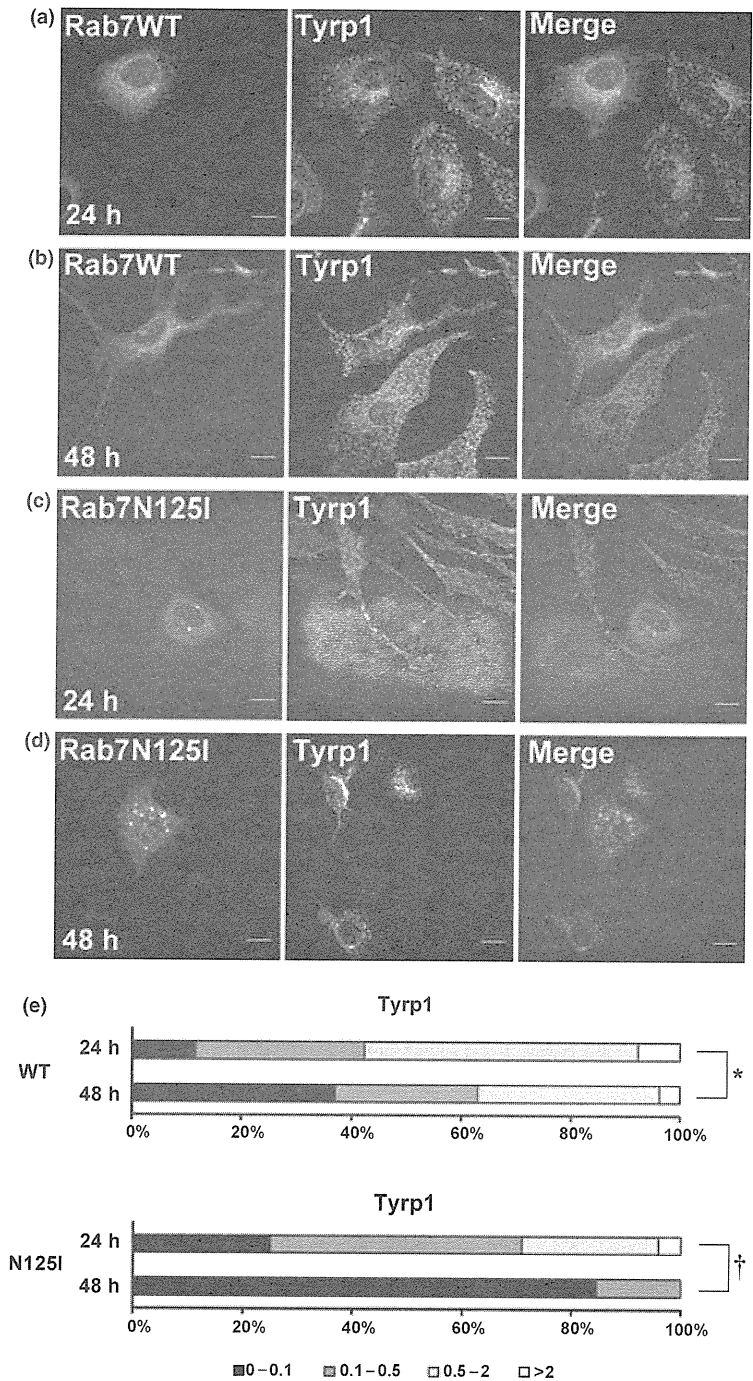
**Figure 1.** Tyrp1 was less prominent in the cells expressing dominant negative Rab7 24 h after the transfection. Melan-A cells were transfected with the plasmids encoding Rab7WT (a), Rab7Q67L (b), Rab7N125I (c) and Rab7T22N (d). Twenty-four hours later, they were immunostained with the anti-flag antibody (a–d, left) and anti-Tyrp1 antibody (a–d, middle). Merged images are shown on the right. Scale bars = 10  $\mu$ m.

#### **Tyrp1 was gradually eliminated from dominant-negative Rab7 expressing cells**

To investigate if the reduced Tyrp1 immunostaining in the cells expressing mutant Rab7 reflected the static state of Tyrp1 localization, we observed transfected cells at two time points: 24 h and 48 h after the transfection. In Rab7WT-expressing cells, the amount and distribution of Tyrp1-positive granules were comparable with those in surrounding non-transfected cells at both time points (Fig. 2a,b). In contrast,

Rab7N125I-expressing cells showed reduced Tyrp1 immunostaining in the perinuclear area at 24 h (Fig. 2c) and, surprisingly, no Tyrp1 immunostaining was detected in the cells at 48 h (Fig. 2d). The Tyrp1 elimination at the later time point after the transfection was also observed in Rab7T22N-expressing cells (data not shown).

To verify this phenomenon, 30 transfected melanocytes were randomly selected from each sample and were categorized into four groups according to their



**Figure 2.** Tyrp1-positive granules were eliminated 48 h after the transfection of Rab7N125I. Melan-A cells were transfected with the plasmids encoding Rab7WT (a,b) or Rab7N125I (c,d), and incubated for 24 h (a,c) or 48 h (b,d) before fixation. Cells were immunostained with the anti-flag antibody (a-d, left) and anti-Tyrp1 antibody (a-d, middle). Merged images are shown on the right. Scale bars = 10 μm. (e) Tyrp1-elimination was statistically verified. Thirty cells expressing Rab7WT or Rab7N125I for 24 h and the same number of the cells expressing it for 48 h were categorized into four types according to the relative intensity of Tyrp1 immunostaining to that in surrounding control cells: 0–0.1, 0.1–0.5, 0.5–2 and >2. Bars show the percentage of each cell pattern. \* $P = 0.18$ . † $P = 0.00023$ . WT, Rab7WT-expressing cells; N125I, Rab7N125I-expressing cells.

Tyrp1-signal intensities relative to that of surrounding control cells: 0–0.1, 0.1–0.5, 0.5–2.0 and more than 2 (Fig. 2e). In Rab7WT-expressing cells, the proportion of the groups at 24 h and 48 h were not significantly different ( $P = 0.181$ ). On the other hand, in Rab7N125I-expressing cells, it was quite different at 48 h ( $P = 0.00023$ ) when the relative Tyrp1 intensity was less than 0.1 in 85% of the cells. These results suggested that the reduction or elimination of Tyrp1 occurred in the vast majority of the Rab7N125I-expressing cells.

#### **Rab7N125I specifically eliminated Tyrp1, but not tyrosinase or gp100**

We further investigated if inhibition of Rab7 led to elimination of other major melanosomal proteins. The distribution of Tyrp1, tyrosinase and gp100 was examined 48 h after the transfection of Rab7WT or Rab7N125I. Tyrp1-positive granules in Rab7WT-expressing and untransfected cells were similarly distributed in the perinuclear and peripheral areas (Fig. 3a). Tyrp1 was not detected in the Rab7N125I-expressing cells. Tyrosinase-positive granules in Rab7WT-expressing cells, as well as control cells, were also distributed similarly (Fig. 3b). Unlike Tyrp1, tyrosinase-positive granules were observed in the Rab7N125I-expressing cells. In Rab7WT-expressing cells and control cells, gp100-positive granules were distributed in both the perinuclear and peripheral areas (Fig. 3c). The amount of gp100-positive granules in Rab7N125I-expressing cells was comparable to those in control cells. Interestingly, gp100-positive granules in the Rab7N125I-expressing cells were distributed mainly in the peripheral area. These results suggested that inhibition of Rab7 led to elimination of Tyrp1 but did not affect tyrosinase or gp100.

To support these results, the immunostaining results were statistically analyzed (Fig. 3d). Approximately 68 digital images (ranging 55–75 images) of the cells expressing Rab7WT or Rab7N125I were categorized into four groups as described in the previous paragraph. The intensity of Tyrp1 immunostaining in Rab7N125I-expressing cells was clearly different from that of Rab7WT-expressing cells ( $P < 0.00001$ ). In 84% of Rab7N125I-expressing cells, the intensity was less than 0.1. In contrast, the difference in the intensity between Rab7WT- and Rab7N125I-

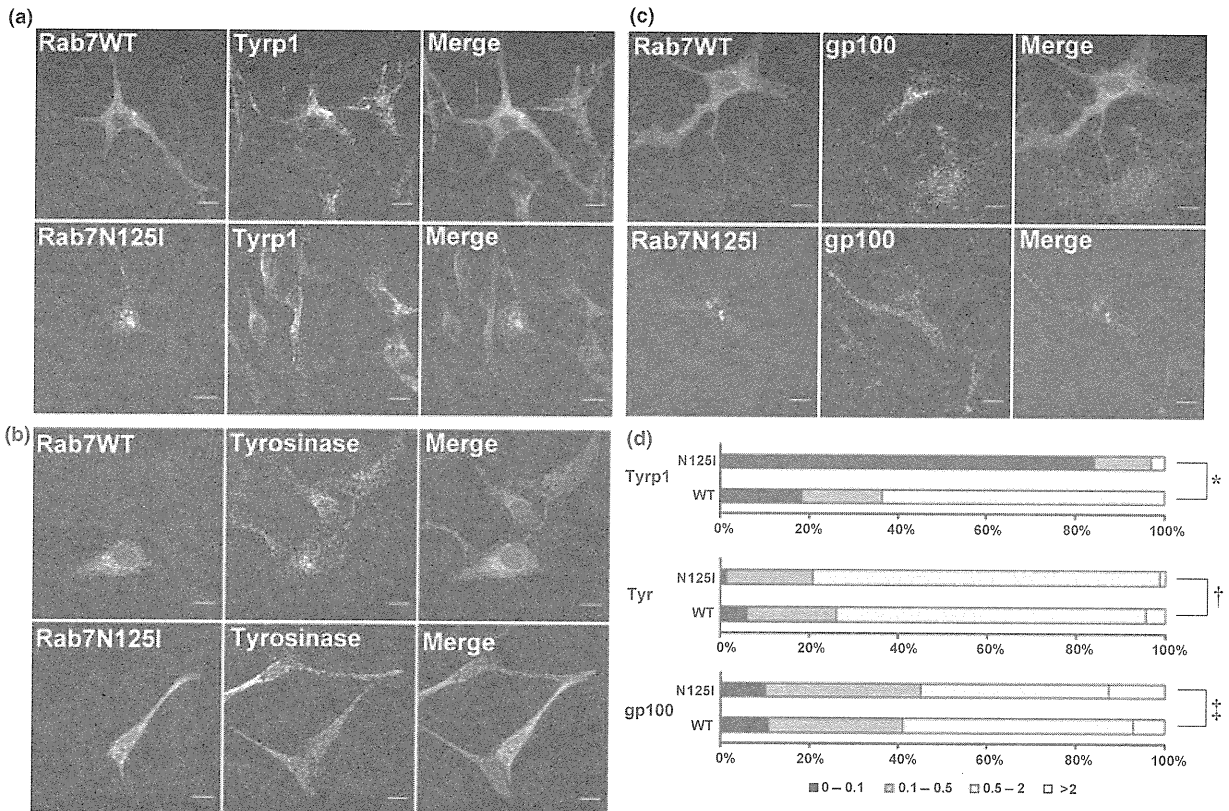
expressing cells was not statistically significant in the cases of tyrosinase and gp100 ( $P = 0.291$  and  $0.729$ , respectively).

#### **Proteasome inhibitor partially rescued the Tyrp1 elimination by Rab7 mutants**

We hypothesized that Tyrp1 failed to be sorted properly in endosomal compartments, was mislocalized to lysosomes and then quickly degraded under the inhibition of Rab7. Proteasomal activities are necessary for some membrane proteins to translocate from the limited membrane to inner vesicles of multivesicular bodies.<sup>36–38</sup> We examined if Tyrp1 elimination could be rescued by proteasomal inhibitor MG132. Melan-A cells were transfected with the plasmid encoding Rab7N125I or Rab7T22N and incubated for 43 h with growth medium, followed by 5 h incubation with the medium containing MG132. Tyrp1-positive granules were detected in the perinuclear areas of the cells incubated with MG132 whereas they were not in the cells without MG132 (Fig. 4a–d).

To confirm the results, 30 cells incubated with MG132 and the same number of cells incubated without MG132 were randomly selected, and categorized into four groups as described in the previous paragraph (Fig. 4e). Nearly 90% of the mutant Rab7-expressing cells (either Rab7N125I or Rab7T22N) showed low relative signal intensity (0–0.1). In contrast, when the cells were treated with MG132, cells with the relative signal intensity of more than 0.1 clearly increased. Furthermore, 20% and 33% of the cells expressing Rab7N125I and Rab7T22N, respectively, showed amounts of Tyrp1 comparable to control cells (relative intensity of 0.5–2).

To exclude the possibility that the increase of Tyrp1 was simply caused by MG132 regardless of mutant Rab7 expression, Melan-A cells without mutant Rab7 expression were incubated as described above and immunostained with the anti-Tyrp1 antibody. Tyrp1-positive granules were similarly distributed in both MG132-treated and -untreated cells: concentrated in the perinuclear area and scattered in the cytoplasm (Fig. 4f). Fluorescent intensity of Tyrp1 in MG132-treated cells was comparable to that in MG132-untreated cells (Fig. 4g). These results suggest that Tyrp1 elimination in the cells expressing mutant Rab7 was partially rescued by the proteasomal inhibitor.

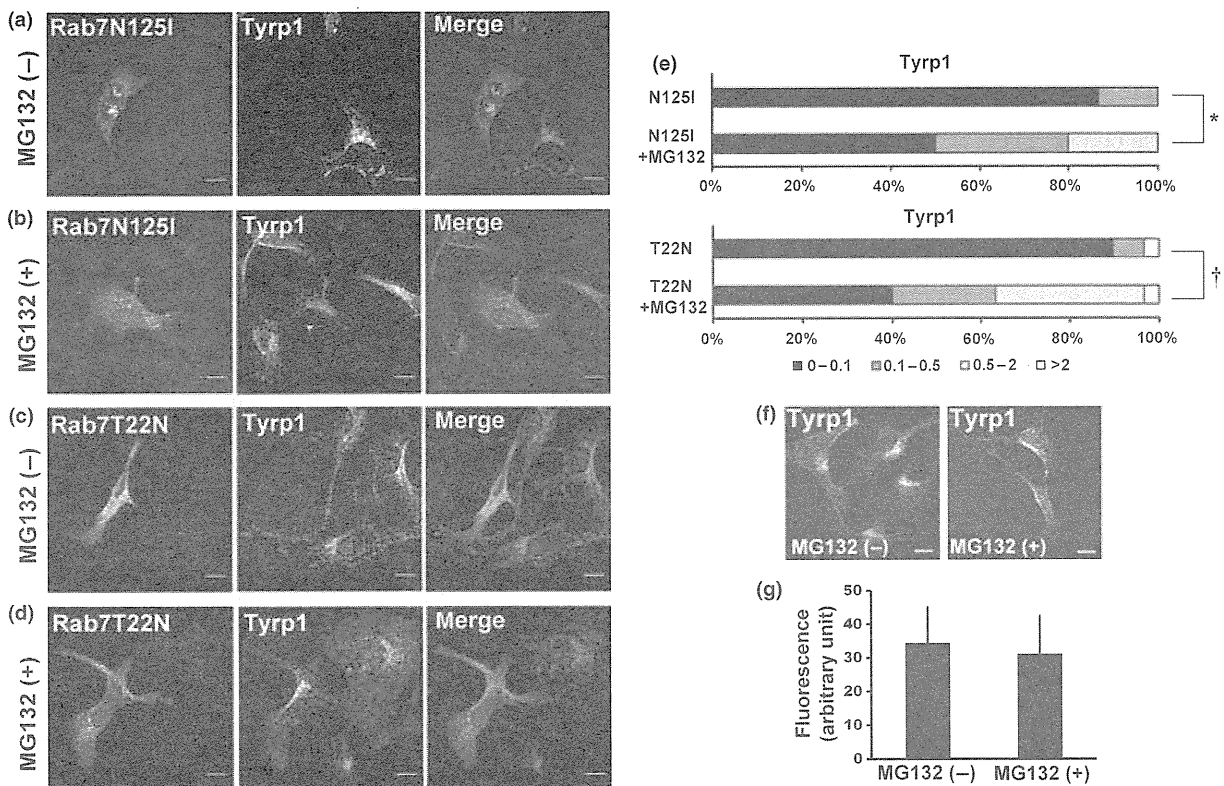


**Figure 3.** Rab7N125I eliminated Tyrp1, but not tyrosinase or gp100. Melan-A cells transfected with the plasmid encoding Rab7WT (a–c, upper panels) or Rab7N125I (a–c, lower panels) were immunostained with the anti-flag antibody (a–c, left) and antibody against melanosomal proteins, anti-Tyrp1 (a, middle), anti-tyrosinase (b, middle) or anti-gp100 (c, middle) antibodies. Merged images are shown on the right. Scale bars = 10  $\mu$ m. (d) Tyrp1-specific elimination was statistically verified. Fifty-five to seventy-five images of Rab7WT- or Rab7N125I-expressing cells were randomly collected from each immunostaining experiment and were categorized into four types according to the relative intensity of Tyrp1, tyrosinase or gp100 immunostaining against that in surrounding control cells: 0–0.1, 0.1–0.5, 0.5–2 and >2. Bars are percentages of the cells in each category. \* $P < 0.0001$ ; † $P = 0.29$ ; ‡ $P = 0.73$ . WT, Rab7WT-expressing cells; N125I, Rab7N125I-expressing cells.

## DISCUSSION

In this study, we found that: (i) endogenous Tyrp1 was co-localized with Rab7 in the perinuclear areas in Rab7WT-expressing non-tumorigenic melanocytes; (ii) Tyrp1 was, in the dominant-negative Rab7-expressing cell, gradually eliminated by 48 h after transfection while tyrosinase and gp100 were not; and (iii) the elimination of Tyrp1 was partially rescued in the presence of proteasome inhibitor MG132. Importantly, only a small number of Tyrp1-positive vesicles were detected in the perinuclear area at 24 h after the transfection of mutant Rab7. Further 24 h incubation led to the complete elimination of Tyrp1.

On the other hand, the signal intensities of tyrosinase and gp100 were not altered. These results suggest that Rab7 is more significantly involved in the trafficking of Tyrp1 to melanosomes than that of tyrosinase and gp100. It is conceivable that Tyrp1 traffics through endosomal compartments because Rab7 regulates maturation of early endosomes. The perinuclear Tyrp1-positive granules observed 24 h after the transfection of Rab7 mutants seemed to be endosomal structures. Similar Tyrp1 mislocalization was also observed in the earlier report by Hirosaki *et al.*<sup>31</sup> However, the reduction or elimination of Tyrp1 had never been observed. This discrepancy seems to derive from the different experimental approaches.



**Figure 4.** Proteasomal inhibitor MG132 partially rescued the Tyrp1 in mutant Rab7-expressing cells. Melan-A melanocytes were transfected with the plasmids encoding Rab7N125I (a,b) or Rab7T22N (c,d), and incubated for 48 h. Before fixation, cells were incubated in the absence (a,c) or presence (b,d) of 10  $\mu\text{mol/L}$  MG132 for 5 h. Cells were immunostained with anti-flag and anti-Tyrp1 antibodies. Scale bars = 10  $\mu\text{m}$ . (e) The rescue of Tyrp1 was statistically verified. Thirty cells expressing Rab7N125I and 30 cells expressing Rab7T22N in the presence of MG132 were compared with the same number of the cells expressing Rab7N125I and Rab7T22N in the absence of MG132, respectively. They were categorized into four types according to the relative intensity of Tyrp1 immunostaining to that in surrounding control cells: 0–0.1, 0.1–0.5, 0.5–2 and >2. Bars are the percentages of each cell pattern. \* $P = 0.0043$ , † $P = 0.00046$ . (f) Melan-A cells incubated with or without 10  $\mu\text{mol/L}$  MG132 for 5 h were immunostained with anti-Tyrp1 antibody. Scale bars = 10  $\mu\text{m}$ . (g) Graph shows fluorescence intensity of Tyrp1 in Melan-A cells measured from confocal images. Data are reported as means  $\pm$  standard deviation.

Our results reflect a more physiological state than the previous ones: we observed endogenous Tyrp1 in non-tumorigenic melanocytes (not melanoma or non-melanocytic cells into which exogenous Tyrp1 was introduced). This also enabled us to examine the fate of endogenous Tyrp1 at the different time points after the Rab7 inhibition.

The differential sorting of melanosomal proteins and the Tyrp1-specific mislocalization/degradation have recently been studied. Biogenesis of lysosome-related organelles complex (BLOC)-1 and BLOC-2 play important roles in the transport of Tyrp1 from early endosomal structures to melanosomes. In melanocytes that lack one of the subunits of BLOC-1,

Tyrp1 is mislocalized to early endosomes and the cell surface membrane, whereas the transport of tyrosinase and gp100 is not disrupted.<sup>39</sup> Tyrp1 is also reduced in BLOC-2-deficient melanocytes in mice and humans.<sup>39,40</sup> BLOC-1 appears to promote the exit of Tyrp1 from early endosomal membranes to another intermediate organelle from which BLOC-2 facilitates fusion with melanosomes.<sup>41</sup> On the other hand, AP also have important roles in the sorting of tyrosinase and Tyrp1. While AP-1 and AP-3 have some redundancy in the transport of tyrosinase, AP-1 seems to have a critical role in sorting Tyrp1.<sup>2,16,42</sup> Considering these reports, AP-1, BLOC-1 and BLOC-2 seem to be involved in Tyrp1-specific

transport. The similar outcome caused by dysfunction of Rab7, AP-1 or BLOC suggests a close relationship of Rab7 with these complexes, though our results cannot specify whether Rab7 directly interacts with these complexes.

How was Tyrp1 eliminated after the Rab7 inhibition? MG132 partially rescued the Tyrp1 elimination, which suggests that Tyrp1 was eliminated by protein degradation machinery. MG132 inhibits not only proteasomal activities but lysosomal enzymes such as cathepsin B.<sup>38</sup> The dysfunction of BLOC results in Tyrp1 retention in the endosomal pathway and subsequent degradation in lysosomes.<sup>39</sup> Rab7 dysfunction may also result in the mislocalization and degradation of Tyrp1 in lysosomes. Another possibility is that Tyrp1 is directly degraded by the proteasomal pathway as suggested in growth hormone receptor degradation,<sup>43</sup> but the details of this degradation pathway remain unclear. These hypotheses need further examination in studies using lysosomal protease inhibitors. Furthermore, additional studies are needed to clarify how Tyrp1 promotes melanogenesis in the presence of Rab7 through the interaction with tyrosinase and gp100. Our previous studies indicated that the GTP-bound form of Rab7 promotes melanogenesis through the regulation of gp100 maturation in human melanoma cells.<sup>34</sup>

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dorothy C. Bennett for providing the Melan-A cells and to Vincent J. Hearing for providing the PEP7.

## REFERENCES

- Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. Lysosome-related organelles. *FASEB J* 2000; **14**: 1265–1278.
- Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS. Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol* 2001; **152**: 809–824.
- Theos AC, Truschel ST, Raposo G, Marks MS. The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. *Pigment Cell Res* 2005; **18**: 322–336.
- Ito S, Wakamatsu K. Chemistry of mixed melanogenesis—pivotal roles of dopaquinone. *Photochem Photobiol* 2008; **84**: 582–592.
- Cooksey CJ, Garratt PJ, Land EJ *et al.* Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J Biol Chem* 1997; **272**: 26226–26235.
- Kobayashi T, Urabe K, Winder A *et al.* Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J* 1994; **13**: 5818–5825.
- Kobayashi T, Hearing VJ. Direct interaction of tyrosinase with Tyrp1 to form heterodimeric complexes in vivo. *J Cell Sci* 2007; **120**: 4261–4268.
- Boissy RE, Zhao H, Oetting WS *et al.* Mutation in and lack of expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous albinism: a new subtype of albinism classified as “OCA3”. *Am J Hum Genet* 1996; **58**: 1145–1156.
- Tomita Y, Takeda A, Okinaga S, Tagami H, Shibahara S. Human oculocutaneous albinism caused by single base insertion in the tyrosinase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **164**: 990–996.
- Hoashi T, Muller J, Vieira WD *et al.* The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers. *J Biol Chem* 2006; **281**: 21198–21208.
- Wei ML. Hermansky-Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Res* 2006; **19**: 19–42.
- Raposo G, Marks MS. Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 786–797.
- Calvo PA, Frank DW, Bieler BM, Berson JF, Marks MS. A cytoplasmic sequence in human tyrosinase defines a second class of di-leucine-based sorting signals for late endosomal and lysosomal delivery. *J Biol Chem* 1999; **274**: 12780–12789.
- Huizing M, Sarangarajan R, Strovel E, Zhao Y, Gahl WA, Boissy RE. AP-3 mediates tyrosinase but not TRP-1 trafficking in human melanocytes. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 2075–2085.
- Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS. Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell* 1999; **3**: 11–21.
- Theos AC, Tenza D, Martina JA *et al.* Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 5356–5372.
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 467–480.
- Gutierrez MG, Munafo DB, Beron W, Colombo MI. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci* 2004; **117**: 2687–2697.
- Press B, Feng Y, Hoflack B, Wandinger-Ness A. Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and

- cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J Cell Biol* 1998; **140**: 1075–1089.
- 20 Vieira OV, Bucci C, Harrison RE *et al*. Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 2501–2514.
- 21 Bucci C, Chiariello M, Lattero D, Maiorano M, Bruni CB. Interaction cloning and characterization of the cDNA encoding the human prenylated rab acceptor (PRA1). *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **258**: 657–662.
- 22 Cantalupo G, Alfano P, Roberti V, Bruni CB, Bucci C. Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *EMBO J* 2001; **20**: 683–693.
- 23 Dong J, Chen W, Welford A, Wandinger-Ness A. The proteasome alpha-subunit XAPC7 interacts specifically with Rab7 and late endosomes. *J Biol Chem* 2004; **279**: 21334–22142.
- 24 Johansson M, Olkkonen VM. Assays for interaction between Rab7 and oxysterol binding protein related protein 1L (ORP1L). *Methods Enzymol* 2005; **403**: 743–758.
- 25 Jordens I, Fernandez-Borja M, Marsman M *et al*. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol* 2001; **11**: 1680–1685.
- 26 Mizuno K, Kitamura A, Sasaki T. Rabring7, a novel Rab7 target protein with a RING finger motif. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 3741–3752.
- 27 Nakada-Tsukui K, Saito-Nakano Y, Ali V, Nozaki T. A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 5294–5303.
- 28 Stein MP, Feng Y, Cooper KL, Welford AM, Wandinger-Ness A. Human VPS34 and p150 are Rab7 interacting partners. *Traffic* 2003; **4**: 754–771.
- 29 Sun Y, Buki KG, Ettala O, Vaaraniemi JP, Vaananen HK. Possible role of direct Rac1-Rab7 interaction in ruffled border formation of osteoclasts. *J Biol Chem* 2005; **280**: 32356–32361.
- 30 Gomez PF, Luo D, Hirosaki K *et al*. Identification of rab7 as a melanosome-associated protein involved in the intracellular transport of tyrosinase-related protein 1. *J Invest Dermatol* 2001; **117**: 81–90.
- 31 Hirosaki K, Yamashita T, Wada I, Jin HY, Jimbow K. Tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 require Rab7 for their intracellular transport. *J Invest Dermatol* 2002; **119**: 475–480.
- 32 Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A. Rab7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 1995; **131**: 1435–1452.
- 33 Kammann M, Laufs J, Schell J, Gronenborn B. Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 5404.
- 34 Kawakami A, Sakane F, Imai S *et al*. Rab7 regulates maturation of melanosomal matrix protein gp100/Pmel17/Silv. *J Invest Dermatol* 2007; **128**: 143–150.
- 35 Der JE, Dixon WT, Jimbow K, Horikoshi T. A murine monoclonal antibody, MoAb HMSA-5, against a melanosomal component highly expressed in early stages, and common to normal and neoplastic melanocytes. *Br J Cancer* 1993; **67**: 47–57.
- 36 Alwan HA, van Zoelen EJ, van Leeuwen JE. Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. *J Biol Chem* 2003; **278**: 35781–35790.
- 37 Ettenberg SA, Magnifico A, Cuello M *et al*. Cbl-b-dependent coordinated degradation of the epidermal growth factor receptor signaling complex. *J Biol Chem* 2001; **276**: 27677–27684.
- 38 Longva KE, Blystad FD, Stang E, Larsen AM, Johannesen LE, Madshus IH. Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol* 2002; **156**: 843–854.
- 39 Setty SR, Tenza D, Truschel ST *et al*. BLOC-1 is required for cargo-specific sorting from vacuolar early endosomes toward lysosome-related organelles. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 768–780.
- 40 Helip-Wooley A, Westbroek W, Dorward HM *et al*. Improper trafficking of melanocyte-specific proteins in Hermansky-Pudlak syndrome type-5. *J Invest Dermatol* 2007; **127**: 1471–1478.
- 41 Setty SR, Tenza D, Sviderskaya EV, Bennett DC, Raposo G, Marks MS. Cell-specific ATP7A transport sustains copper-dependent tyrosinase activity in melanosomes. *Nature* 2008; **454**: 1142–1146.
- 42 Huizing M, Anikster Y, Fitzpatrick DL *et al*. Hermansky-Pudlak syndrome type 3 in Ashkenazi Jews and other non-Puerto Rican patients with hypopigmentation and platelet storage-pool deficiency. *Am J Hum Genet* 2001; **69**: 1022–1032.
- 43 Flores-Morales A, Greenhalgh CJ, Norstedt G, Rico-Bautista E. Negative regulation of growth hormone receptor signaling. *Mol Endocrinol* 2006; **20**: 241–253.



# 機能性磁性ナノ粒子の開発と医療への応用

井藤 彰

九州大学大学院工学研究院化学工学部門

akira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

## 1. 緒論

磁性ナノ粒子は磁力に引き寄せられる性質をもつことから、磁性ナノ粒子を結合させて磁気標識した細胞は磁力で遠隔操作することが可能となり、ティッシュエンジニアリングのプロセスにおける細胞操作（「細胞の分離」「細胞の増幅」「三次元組織構築」）に利用可能である。さらに、磁性ナノ粒子は高周波磁場中で発熱する性質をもつことから、ガンの温熱療法（ハイパーサーミア）における発熱体として利用できる。我々は  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  で標記される酸化鉄であるマグネタイトで 10 nm というナノサイズの粒子径に調製した磁性ナノ粒子を、様々なバイオマテリアルで修飾することで、標的細胞に集積させることができる機能を持った磁性ナノ粒子（機能性磁性ナノ粒子）を作製し（図 1）、ティッシュエンジニアリングやガン治療といった医療分野への応用を行ってきた (1)。

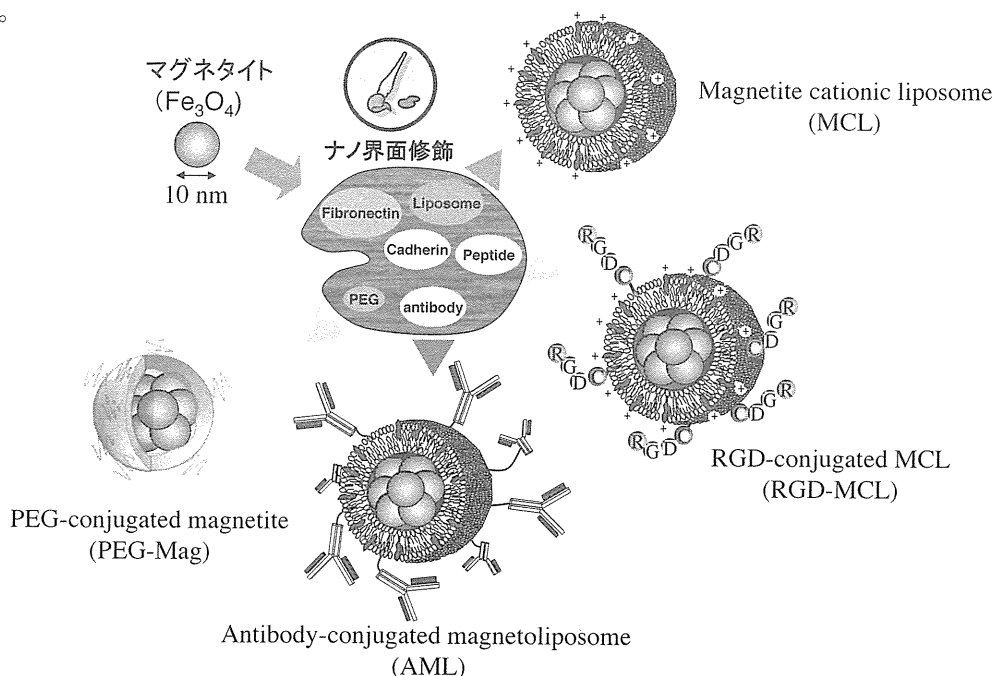


図 1 機能性磁性ナノ粒子の概略

## 2. 実験方法

ティッシュエンジニアリング分野において、細胞を磁力で操作するためには、標的細胞に能動的かつ大量に磁性ナノ粒子を結合する必要がある。そこで、正電荷脂質からなるリポソームに磁性ナノ粒子を包埋することで、正電荷脂質包埋型磁性ナノ粒子（MCL）を作製した。さらに、リポソーム表面に RGD ペプチドが結合した細胞接着性磁性ナノ粒子（RGD-MCL）を作製した。また、全く逆の発想で、細胞が接着しない機能性磁性ナノ粒子を開発すれば、細胞の非接着領域をつくり出すことが可能であり、また、その領域は磁力で制御できる。筆者らは、磁性ナノ粒子をアミノシランで被覆し、その表面に PEG を共有結合することで、細胞非接着性磁性ナノ粒子 (PEG-Mag) を作製した。

一方、ガン治療においては、ガン細胞特異的なターゲティングが必要である。我々は、磁性ナノ粒子を封入したリポソームにガン細胞に特異的な抗体を結合させ、抗体固定化磁性ナノ粒子 (AML) を作製した。また、DDS として、メラニン形成酵素チロシナーゼの基質である NPrCAP を磁性ナノ粒子表面に結合させた NPrCAP 結合型磁性ナノ粒子 (NPrCAP/M) を合成し、皮膚がん（メラノーマ）への標的指向性を調べた。

### 3. 結果

図2に示す磁力を用いたティッシュエンジニアリング技術“Mag-TE”法の開発を行った。AMLを用いた骨髄液からの間葉系幹細胞の分離法を開発した。目的細胞の培養プロセスにおいて、MCLを用いた共培養法の開発やRGD-MCLおよびPEG-Magを用いた細胞のパターニング法を開発を行った。さらに磁力を用いた多孔体足場担体への細胞播種法および細胞を磁力で積み上げていくことによる三次元組織構築法を開発を行った。

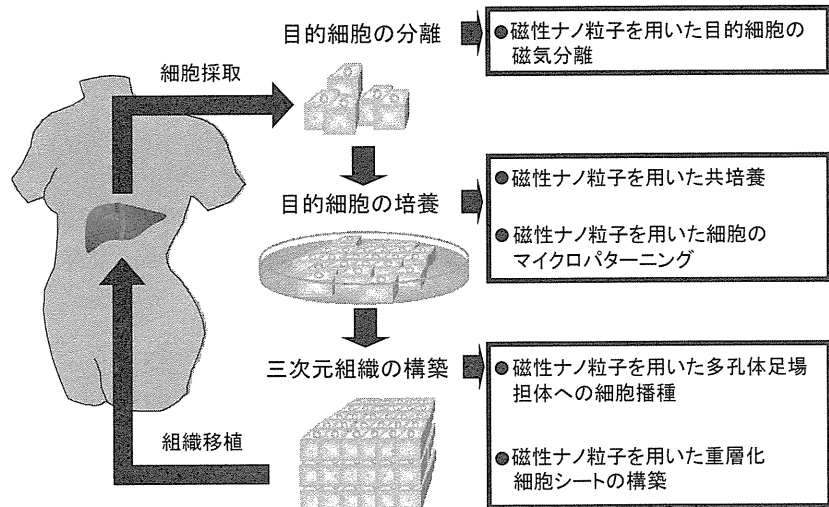


図2 磁性ナノ粒子を用いたティッシュエンジニアリング

図3に示す磁性ナノ粒子を発熱体としたガン温熱療法の開発を行った。MCLを腫瘍に直接投与して、磁場照射を行ったところ、腫瘍特異的に発熱し、高い治療効果が得られた。この治療効果には腫瘍免疫が活性化されることを示した(2)。また、NPrCAP/Mを用いたマウスメラノーマに対する温熱療法において、メラノーマ特異的な磁性ナノ粒子の取り込みと、高い治療効果がみられた。

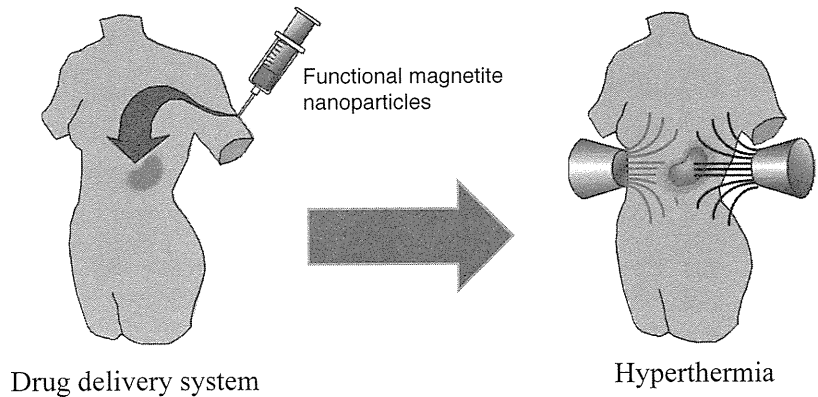


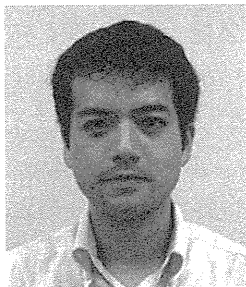
図3 磁性ナノ粒子を用いたハイパーサーミア

### 4. 結論

磁性ナノ粒子は他の物質では得難い特長を備えており、それらの特長を利用した医療技術の開発は有用であると考えられる。一日でも早く患者さんのお役にたてるように、努力している。

### 5. 参考文献

- (1) Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J Biosci Bioeng.* 2005, 100(1):1-11. Review.
- (2) Ito A, Honda H, Kobayashi T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression. *Cancer Immunol Immunother.* 2006, 55(3):320-8. Review.



### 略歴

2006.3- 九州大学大学院工学研究院 准教授  
 2002.2-2006.2 名古屋大学大学院工学研究科 助手  
 2002.1-2002.1 日本学術振興会特別研究員 (PD)  
 2000.4-2001.12 日本学術振興会特別研究員 (DC1)

# メラニン・メラノサイトの選択的臓器分布と 生体の生命活動、恒常性の維持及び加齢への調節機構

神保 孝一<sup>1</sup>、山本 博章<sup>2</sup>、若松 一雅<sup>3</sup>、伊藤 祥輔<sup>3</sup>

<sup>1</sup>皮膚病総合医学研究所, 札幌医科大学

<sup>2</sup>長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部 環境生命科学

<sup>3</sup>藤田保健衛生大学医療科学部 化学

著者連絡先

皮膚病総合医学研究所 〒060-0042 札幌市中央区大通西17丁目1-27

TEL: 011-887-8266 FAX: 011-618-1213

E-mail: jimbow@sapmed.ac.jp

## 要 旨

神経冠細胞から分化するメラノブラスト、メラノサイトは皮膚を含む多くの臓器に移動し、増殖・成熟を遂げるには多くの遺伝子、転写関連因子が働いており、その欠損により多くの疾患が発生する。実験動物を用いた研究ではメラノサイトは皮膚、毛髪、眼、内耳、軟脳膜以外に多くの臓器に存在する事が分かりつつある。これら神経冠からメラノブラスト・メラノサイトへと分化する細胞は① Classical cutaneous melanocyte migrating pathway と② Non-classical non-cutaneous migrating pathway のいずれかの経路をとる。前者は皮膚・毛髪を標的とするメラノサイトのためのものであり、Kit 遺伝子（転写因子）とそのリガンドである Kitl, SCF が関与している。後者は内耳、眼、軟脳膜、また実験動物では肺、心臓、脂肪組織などへと移動するメラノサイトのためのものである。標的組織、臓器に達したメラノサイトは分化・増殖を遂げメラニン色素を産生する。これらメラノサイトの分化には SOX10, PAX3, MITF 等の転写因子や、KIT, KITL, ET3 (EDN3)、EDNRB 等のリガンド・リセプター系の因子が深く関わっている。最近の知見では、これら因子の関与の軽重は、それぞれのメラノサイト集団で異なるようである。

このようにメラノサイトの機能と密接に関係している細胞分化はメラニン産生であるが、メラニンは皮膚・毛髪に分布するメラニンであるユーメラニン、フェオメラニンと神経組織であるニューロンに分布する神経メラニン（ニューロメラニン）に大別される。皮膚メラニンとニューロメラニンの化学的構造、産生顆粒、臓器分類、と生命維持恒常性との相関について最近の知見を紹介した。メラニンは pro-oxidant と anti-oxidant としての相反する2つの機能を持っているので、今後は各種臓器におけるメラニンの生合成機序と生物学的機能を比較検討する研究を通じ、新たな加齢皮膚医学の研究への展開を図ることが期待される。

はじめに

メラニンの語源はギリシャ語のメラノス melanos (dark, 暗黒色) から由来する。物質的には大きく分けて4群のメラニンが存在する。1つはユーメラニン (eumelanin; 真正メラニン) と訳され tyrosine, dopa, dopaquinone から形成されるもの、その2はフェオメラニン (pheomelanin, 偽メラニン) である。フェオは元来ギリシャ語で『似非』あるいは『偽』という意味であるが、偽メラニンは tyrosine, dopa から形成されるが、途中から cysteinyl 基が結合し 5-S, 2-S cysteinyl dopa となり、自動酸化により形成

されるもの、さらにその3は最近、脚光を浴びているニューロメラニン (neuromelanin; 神経メラニン) と呼ばれるもので、これは dopamine と noradrenalin の酸化重合体でこれに cysteinyl 基が関与し形成することが報告されている。その4はアロメラニン (allomelanin; 変態メラニン) と呼ばれるもので、これは通常のメラニンと異なり catechol や polyphenol の酸化物で、植物界に広く分布し、しばしば窒素を欠く。従い、人を含む動物界において重要なメラニンとしては前3者のユーメラニン、フェオメラニン、ニューロメラニンが問題となる。一般にユーメラニンとフェオメラニンは皮膚メラニンとして、総括される。従い、ヒト、動物のメラニンは皮膚メラニンと神経メラニンの2群に大別される (図1)。

### 神経冠細胞とメラニン産生

ユーメラニン、フェオメラニンは神経冠 (neural crest) 由来の色素細胞・メラノサイトや発生中の脳 (胞) に由来する (眼杯由来の) 網膜色素上皮で、またニューロメラニンは脳の黒質等において合成される。ユーメラニンはメラノサイト内の tyrosine が酵素チロシナーゼ tyrosinase による酸化還元により dopa, dopaquinone へと変化し、さらにこれが dihydroxyindole (DHI) もしくはチロジナーゼ関連タンパク質 (tyrosinase related protein; Tyrp2, Tyrp1) が関与する2経路を経てユーメラニンが形成される。一方、約30%のメラニンは tyrosine から tyrosinase の存在下で dopa が出来た後に cysteine が加わり cycteinyldopa となり、さらに自動酸化を受けフェオメラニン形成に至るものである。もう一つのメラニン群は catecholamine 合成に関与するニューロンから出来るもので、これは tyrosine が dopa へと tyrosine hydroxylase の存在下で変化し、その後 dopa decarboxylase の存在下で dopamine (DA) となり、更に自動酸化により dopaminequinone を経て、その一部が cysteine と結合してニューロメラニンができる経路である (Odh G et al., 1994; Jimbow K et al., 1998)。

catecholamine 合成に関与するニューロンから出来るもので、これは tyrosine が dopa へと tyrosine hydroxylase の存在下で変化し、その後 dopa decarboxylase の存在下で dopamine (DA) となり更に自動酸化により noradrenalin となりその一部が自動酸化により更に norepinephrine (NEP - quinone) を形成する。その後、自動酸化により dihydroxyindole (DHI) となり cysteine が重合しニューロメラニンとなるもの、もう一つはフェオメラニンと同様 cysteine が加わり cycteinyldopa (SCD) ができ、その自動酸化によりニューロメラニンができる経路である (Odh G et al., 1994; Jimbow K et al., 1998)。

従い図2のメラニン合成経路を一見して判断できるように人体で出来るユーメラニン、フェオメラニンおよび catecholamine 形成ニューロンで出来るニューロメラニンは各々特有な顆粒形態、組成を有するが、化学反動的に多くの共通する代謝経路と化学的骨格を有するメラニンを形成するに至るものと考えられる (Simon JD et al., 2009)。

### ニューロメラニンの産生部位の特徴と機能

ニューロメラニンはヒトの脳のニューロン (神経細胞体、樹状突起と軸索からなる神経単位) で最も多く形成されるが3つの主たる産生部位がある。これらは①中脳の黒質、②橋部の青色斑、さらに③網様体形成延髄である (Fedorow H et al., 2005) (図3)。

表1はニューロメラニンの産生部位、発生、化学構造をまとめたものである。ニューロメラニンは光学顕微鏡上、濃褐色、黒色を可視光線下で呈し、紫外線を照射しても蛍光を発しない。電子顕微鏡下で観察すると不規則な外形を呈した顆粒であり、その大きさは0.5から2.5ミクロンでニューロン細胞質内に存在する。メラノサイトにおけるメラノソームと異なり、顆粒を被覆する外膜の存在は明白でない。ニューロン細胞体の中央にある核に向かい樹状突起の先端からチロシン等の基質を含有する小顆粒状の

小空胞輸送が存在する。その分布部位で、最も多いのはヒトの catecholamine 産生ニューロンである。ニューロメラニン産生の開始時期は生後約3年後に始まり終生続き、その数を増加させていく。構造組成として dopamine 由来のメラニン顆粒では15%がタンパク質を基質として有している。また総体積の約1/3が脂質と結合している。さらに多数のイオン物質と結合しており、これ等イオンには鉄や外毒素 exotoxin も含まれる (Fedorow H et al., 2005)。

ニューロメラニンの形成機序に関しては tyrosine が tyrosine hydroxylase の存在下で dopa となり、更に dopa decarboxylase の存在下で dopamine ができる経路で形成されるがこれら2酵素以外特別な酵素が関与するという代謝経路は見つけられていない (Double KL et al., 2000)。一般に死にかけているニューロンから放出され、これら放出されたニューロメラニンは免疫系を介し脳から除去されるようである。細胞内の代謝を不活性化して鉄などのカチオンのスカベンジャー scavenger としても機能している。つまり細胞内の抗酸化剤、鉄代謝経路を制御するという大きな作用を持っていると考えられる (Korytowski W et al., 1995; Snyder AM et al., 2009)。殊にヒトの加齢に伴う疾患の代表例であるパーキンソン病においてはニューロメラニンの変化は本症に罹患した患者の脳組織における細胞死に大きな影響を及ぼしていると考えられている (Forno LS, 1996; Zecca L et al., 2006)。

#### ニューロメラニンの化学的分解産物と形成モデル

ニューロメラニンは一定の化学薬剤と反応させると極めて特徴ある所見を示す。例えばユーメラニンアッセイに用いる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (過酸化水素) でニューロメラニンを処理すると dihydroxyindole (DHI) 由来のユーメラニン分解産物である PTCA、PTDA が PTCA、PTDA が産生される (Wakamatsu K et al., 2003) (図4 a)。

同様にフェオメラニンの処理方法で dopamine 由来のニューロメラニンを処理致すると HI 処理後フェオメラニンに認められる benzothiazole 体が多数抽出される (図4 b) (Wakamatsu K et al., 2003)。この様に従来考えられていたユーメラニン、フェオメラニン、ニューロメラニンは独立した固有の代謝過程で形成されるという概念と異なりユーメラニン形成、フェオメラニン形成とニューロメラニン形成には化学代謝過程で多くの類似点、共通点があることが分かる。しかしながらニューロメラニンの生物学的機能と形成過程には関してはユーメラニン、フェオメラニンと比較し、未解決な問題が多々ある。

図5はニューロメラニンの形成モデルを紹介したものである。tyrosine は tyrosine hydroxylase の存在下で L-dopa に変わり、dopa decarboxylase により dopamine となりさらに鉄イオンの存在下、dopamine quinone へと酸化され、cysteine の取込みを経て、さらにタンパク質、脂質と結合し最終的に dopamine、cysteinyldopamine とタンパク質・脂質の重合体を構成する。これら重合体は多分 autophagic vacuole (自家食空胞) 内に集積しておりニューロメラニンとして認識されることが考えられている (Zucca FA et al., 2004)。

#### ユーメラニン、フェオメラニンとニューロメラニン顆粒の形態的比較

多くの化学的、構造的共通点をユーメラニン、フェオニューロメラニン、ニューロメラニンは幾つかの共通する形成経路を有していると考えられるが、それらの形態はかなり異なっている。典型的なニューロメラニン顆粒はフットボール類似の形をし、しかも外膜を有している。一方ニューロメラニンには明らかな外膜は存在せず脂質滴が散見される (Zecca L et al., 2000; Zucca FA et al., 2006)。一方、フェオメラニンは脂質滴を欠くがニューロメラニンとはかなり多くの構造的共通点を有している (Jimbow K and Fitzpatrick TB, 1973; Jimbow K et al, 1984; Sulzer D et al., 2008) (図6)。

## 皮膚メラニンと神経メラニン（ニューロメラニン）の化学構造・分布と生物学的機能

上述の如く、ユーメラニン、フェオニューロメラニン、ニューロメラニンは本質的に共通する形成機構を有している。しかしニューロメラニンは霊長類に多く存在し、最も多くの量を有するのはヒトである。ユーメラニン、フェオメラニンよりなる皮膚メラニン系は魚類を含めた多くの脊椎動物に存在する。ヒトでは皮膚メラニンは毛髪や皮膚、虹彩、毛様体、網膜、内耳など多くの組織に存在しているがニューロメラニンは通常の実験動物には存在しない。しかも、ニューロメラニンは catecholamine 合成ニューロンに選択的に存在する。一方皮膚メラニンはヒト以外の実験動物では心臓、脂肪組織、更には肺などにも見つけられている。ニューロメラニンにはこの様な事はない (Moses HL et al., 1965) (表2)。

皮膚メラニンはメラノソームに存在し楕円形であり外膜を有している。一方ニューロメラニンは前述の如く明白な外膜を有しておらず、その形態及び大きさも様々であり内部に脂質滴および、蛋白質を含んでいる。皮膚メラニンは4つの成熟段階を確認する事が出来、ユーメラノソーム、フェオメラノソームは独特な顆粒形態を示しているが、ニューロメラニンはそのような形態の一定性を示さない (表3)。

皮膚メラニン形成では約 85 の遺伝子座が関与していると言われているが、ニューロメラニンではその様な遺伝子系は認められていない。皮膚メラニン形成ではメラノコルチン1レセプター (MC1R) を介しメラノサイト刺激ホルモン (MSH; melanocyte stimulating hormone) とアグーチシグナルタンパク (ASP; agouti signal protein) との相互拮抗作用により合成されている (Lin JY and Fisher DE, 2007)。

皮膚メラニン形成に関与する酵素にはチロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク (Tyrp)、ドーパクロムタウトメラーゼ (DCT; dopachrome tautomerase) がある。しかもメラノソーム内の pH がメラニン産生に重要な役割を示す。一方、ニューロメラニン形成初期には tyrosine hydroxylase および dopa decarboxylase が関与するがその後の酵素系の関与に関しては明らかな知見は得られていない。また pH の関与に関しても不明である。ニューロメラニンはパーキンソン病においては死滅しかけているニューロンから大量に放出されるが正常の大脳細胞に於いてどのような異化作用 catabolism を受けるかに関しては現在の所、不明である (Double KL et al, 2008; Simon JD et al., 2008) (表4)。

皮膚メラニンは dihydroxyindole (DHI) 等の indole 環を有するメラニン中間体ポリマーよりなっている。一方ニューロメラニンは多くの異なったポリマーが重合体を形成し、その重合形態は皮膚メラニンと類似している様であるが、その詳細は不明である。問題はヒトにとってメラニンがどのような生物学的活性を有しているかであるが、皮膚メラニン系は従来から知られているように皮膚では紫外線防御や鉄、その他の金属、活性酸素などとの結合、また内耳では内耳中管のイオンの組成の維持、聴力との関係やニューロエンドクライン神経内分泌系では抗酸化剤の吸収やこれら物質のバランス、不安定な活性酵素、細胞障害やイオンからの生体を守る機能などを有することが知られている (Sarna T et al., 2003; Jimbow K et al, 1984; Ito S and Wakamatsu K, 2008)。ニューロメラニンに関しては色々な毒素あるいは神経毒との結合や代謝に関与しているとされているが、詳細は不明である (D' Asmato RJ et al., 1986; Slominski A et al., 2002; Naoi M et al., 2009; Miller ED et al., 2010) (表5)。

## 皮膚以外に存在するメラノサイトの分布・生体の生命活動維持への関与

メラノサイトは実験動物においては肺、心臓さらに脂肪組織などに存在することが報告されている。実験動物のネズミでは皮膚・毛髪以外の部位に存在し、しかも非常に興味を引くことは呼吸機能を制御すること、あるいは胎生期心臓における血液動態の急激な変化に際し生ずるストレス緩和や心室、心房

の弁の形成に関与すると報告されている (Mjaatvedt CH et al., 2005; Han F et al., 2009)。例えばマウスの心臓形成においては胎生 14.5 日ごろから発現し、生後も継続して存在し、成体にも認められる (Brito RC and Kos L, 2008)。しかも興味を引くことは 2 個の心房と 2 個の心室を有する動物のみに認められ、その分化に於いては cKit や Ednrb が関与し、その発現程度において体色の発現と関連しているとなると矢嶋ら (Yajima and Larue L, 2008) により報告されている (図 7)。従いこれら心臓に存在するメラノサイトは皮膚のメラノサイトと類似の分化調節機構を受け、発現するとされている (Brito RC and Kos L, 2008)。更に興味を引くことは睡眠と覚醒のコントロールに関与するという説も武田ら (Takeda K et al., 2007) により提唱されている (図 8)。

それではヒトにおいて皮膚以外の部位・臓器 (器官) に存在するメラノサイト、例えば軟脳膜に存在するメラノサイトはどのような機能と分化を示し、メラニン形成を行っているのだろうか。臨床的に皮膚と軟脳膜にメラノサイト分化とメラニン形成異常を伴う疾患の代表例として神経・皮膚メラノシスがある。本症においてはしばしば水頭症を発生し、後頭部・躯幹に水着様母斑 bathing trunk nevi を生じメラニン色素産生異常が発生する (図 9)。大脳、中脳、小脳、視床下部などではメラニン含有細胞が主として血管周囲性に集積し (図 10)、しかもこれら血管周囲性の組織を電顕下でみると自家貪食空胞を形成し、皮膚おけるメラニン、メラノソームと全く同一の形態を示している (Ikeda S and Jimbow K, 1970)。しかし、軟脳膜に存在するメラニン・メラノサイトの生命維持、恒常性に関する機能については十分分かっていないのが現状であろう。

#### 神経冠からのメラノサイト前駆細胞の移動・分化機転

先述の軟脳膜のメラニン形成細胞及び皮膚メラニン形成細胞はともに神経冠細胞から発生し分化する。神経冠細胞はそれぞれが発生した場所から特定の末梢部位 (器官) へと移動するが、メラノサイトへと分化する神経冠細胞も固有の中枢部位から移動し、末梢へ到達し各器官構成に関与する。図 11 は神経冠細胞が前脳、中脳、後脳の中枢神経系へと、更に末梢の心臓、咽頭弓、脊索神経根、副腎などへと移動する部位を示す。神経冠から発生する多数の細胞種の中にあつて、メラノサイト前駆細胞も皮膚をはじめとして各種組織や器官に移動し定着する (Kelsh RN et al., 2008; Tsukiji N et al., 2009)。

図 12 は神経冠細胞の移動経路の模式図であるが、メラノサイト前駆細胞も末梢臓器・器官への移動には 2 つの大きなルートをもつと考えられている。一つは脊側および側方経路 dorso-lateral pathway で、これらは神経冠から表皮と皮筋節 dermamyotome の間を移動し、終局的には皮膚、表皮へと移行する古典的メラノサイト・classical melanocyte へと移動・分化する際に通るルート、もう一つは腹側経路 dorso - ventral pathway がある。後者の腹側経路を取るメラノサイトは非古典的メラノサイト non-classical melanocyte と呼ばれており、これらメラノサイトは神経冠細胞から内耳、蝸牛管、軟脳膜、眼、心臓などへ移行するメラノサイト前駆細胞 (メラノblast melanoblast) へと分化する経路を示す。従い神経冠由来のメラノサイト前駆細胞であるメラノblastは 2 つの異なった経路、すなわち①皮膚・毛髪へと移動する古典的メラノサイト発生・分化経路と②最終的な目標ターゲット分布臓器を内耳蝸牛管、虹彩・ぶどう膜、軟脳膜、心臓等とする非古典的メラノサイト発生・分化経路をとる (Yajima I and Larue L, 2008; Uehara S et al., 2008) (図 13)。

#### メラノサイト前駆細胞メラノblastからメラノサイトへの分化における遺伝子支配とその変異に基づく疾患

神経冠細胞からメラノblastへ分化し、さらにこれらメラノblastがメラノサイトへと分化し外

胚葉組織へと移動し、増殖・分化するには大きく分けて5つのステップがある。その1つは神経管から神経冠細胞の発生、その2は神経管からの離脱、その3はメラノブラストへの分化、その4はメラノブラストの移動・増殖、その5は最終的なメラノサイトへの分化である(図14)。「メラノブラストの胎生期神経冠細胞から標的組織への移動と定着までには、当該系譜に関わる細胞群の時系列に沿った解剖学的位置により①Premigratory neural crest, ②Dorsal to neural tube, ③Migration staging area, ④Dorsolateral migratory pathway, ⑤Ectoderm、さらには②からの別ルートとして⑥Dorsoventral migratory pathwayの6局面に分けられ、個々の部位への移動は動物の種により異なる遺伝子支配を受けている(Aoki H et al., 2009)。

例えば図16に示すごとく(Kubic JD et al., 2008)、PAX3は胎生期神経冠からメラノブラストへの分化およびメラノサイトへの分化・成長に関与している。これらの機能を十分果たすには機能抑制蛋白質と転写コアクチベーター(transcriptional coactivator)との相互の連携が必要であり、これによりPAX3は①メラノブラストが細胞死に陥ること阻止する(Bcl, PTENが関与)、②胎生期移動を助長(Ret, Wnt1, TGF)、③メラノブラスト分化の促進(Mitf, MyoD, Myf5)、④メラノサイトへの分化調節(Dct, Sostde1)の4つの機能を果たしている

また分化誘導過程においても多くの遺伝子、転写関連因子が働いており、その欠損により多くの先天性疾患が発生する(図17)。代表的な分化誘導因子としてMitf(microphthalmia associated transforming factor; 小眼球転写因子)があり(Tachibana M., 1997)、その遺伝子異常によりワールデンブルグ Waardenburg 症候群が発症する(Waardenburg PJ, 1951; Read AP and Newton VE, 1997)(図18)。本症においてMitfは小眼球症、色素細胞欠損に関与し、SOX10は巨大結腸症、白斑形成を、PAX3は神経冠細胞形成不全を発症させる。ワールデンブルグ症候群(WS)には4型あり、IはPAX3、WS IIはMITF、WS IIIはPAX3、WS IVはSOX10の遺伝子変異に基づくものであるが、これらの遺伝子変異は知覚神経性先天性難聴、虹彩異色症、皮膚毛髪の色素脱失、内眼角・涙点の外側方偏位、鼻根部の肥大等の極めて特異的な臨床像を呈する。

生存移動環境因子に関してはKitとそのリガンドKitl・SCFが関与し、あるいはまたET3(EDN3)とそのレセプターであるところのEDNRBレセプター等のリガンド・レセプター系の因子の関与が大きい。最近の知見では、HGFも加えて、これら因子の関与の軽重は、それぞれのメラノサイト集団で異なるようである(Aoki et al., 2009)。もしKit遺伝子のkinase domainに変異が起こるとメラノサイトは胎生期にて死亡し、まだら症(Piebaldism)を発症させる(図19)。Kit遺伝子の変異はまだら症に加え図20に示す如くGISTsと肥満細胞腫、カフェオレ斑およびその他の消化器症状を併発する事が知られている。

最終的な分化に関与するメラニン産生刺激因子に関してはメラノサイト刺激ホルモン(MSH)があり、このレセプターとしてメラノコルチン1受容体(melanocortin 1 receptor; MC1R)がある。白人においてはMC1Rの変異と皮膚癌の発症との関連が極めて高いとされている。

メラノサイトの分化にはMSHとそれに関連するレセプターであるMC1Rとの関係が重要であるが、ヒトに於いてはPOMC(proopiomelanocortin)と呼ばれる大きな前駆蛋白質として産生され、この中には $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$  MSH、ACTHが含まれており、ACTH、MSH由来のペプチドの総称がメラノコルチン(melanocortin)である(図21)。多くのアンタゴニストとレセプターを介し中枢神経系と多種類の末梢臓器にて異なった病的・生理的作用・病態を発現している。その代表例がMSHとCGRPに代表されるneuropeptideのネットワークである。CGRPは(calcitonin gene-related peptide)の略称であるが、生体内では極めて密なネットワークをMSHと形成し身体内部および外部からのストレスに反



応し、メラニン形成を促進させる (Ito N et al., 2010) (図 22)。

まとめ：メラニン・メラノサイト研究の加齢皮膚医学研究への展開

小眼球転写因子 (Mitf) は神経冠細胞がメラノblast、メラノサイトへと分化し、皮膚などの組織、臓器で機能を発揮するのに必要な転写因子の中で最も重要なものの一つである (Goding CR, 2010)。一方成熟したメラノサイトがメラニン形成を行うにはメラノサイト刺激ホルモン (MSH) とその受容体であるメラノコルチンレセプター (MCR) との相互作用が重要である。

メラノコルチンレセプターには1から5まで存在し、各々特色のある機能を有しておりメラニン形成やメラノーマの発症と関連のみならず皮膚角化細胞の分化、皮膚炎症制御、免疫制御、さらに中枢神経系、末梢神経系組織の再生：脳の成長と発達、脳のメモリー、行動、伝達さらには食事摂取、制御、肥満や脂肪組織、脂肪崩壊、血中の糖、カルシウムレベルの制御、副腎皮質の再生、免疫系として抗炎症作用、外分泌時の機能制御さらに心血管系として尿中ナトリウム、血圧、心拍さらに生殖腺の発達、網膜への刺激、下垂体前葉との協調等の多くの生体の恒常性維持に重要な機能に関係している。これらはいずれも加齢と密接な関連を持っており、今後とも加齢との直接の接点解明の観点から研究を進める必要がある (Bush WD and Simon JD, 2007; Bennett D and Medrano EE, 2002)。

さらにメラニン形成はユーメラニン、フェオメラニン、ニューロメラニンの3群に大別されるが、実際は個々のメラニンが単一にモノマーとして存在するのではなくてヘテロポリマー heteropolymer を形成している。メラニン生合成と加齢および抗加齢過程との関連も重要である (Zecca L et al., 2008)。伊藤ら (Ito S et al., 2008) の Casing Model (図 23) によると皮膚、毛髪では tyrosine, dopa から dopaquinone が形成され、脳では同様 tyrosine, dopa から dopamine quinone が形成されるが、これらに cysteine が結合し、いわゆる cysteine 結合受容体を形成している。このようなフェオメラニン core complex は紫外線や多くの細胞ストレスに当たると細胞毒、酸化促進剤 (pro-oxidant) として働くが、実際には更にこのフェオメラニン core complex の表面に更に皮膚では dopaquinone が、ニューロンでは dopamine quinone が集積し、その表面を被覆し、紫外線、ストレス暴露に対し抗細胞毒、抗酸化剤 (anti-oxidant) として作用し得る。問題はこのようなメラニンの持つ化学的、生物学的反応過程をいかに我々の aging, anti-aging process の新規治療法、予防法に応用することができるかである。紫外線照射後のメラニン形成動態に関しては多くの研究がなされているが今後は今一步視野を変え皮膚メラニンと神経メラニンの生物学的、機能的解析の比較検討を行い、得られる所見を加齢の予防、治療法への研究に応用するなどの多角的、多面的研究を展開させる必要があるのではないか。

謝辞

本研究は厚生労働科学研究補助金:低侵襲・非侵襲医療機器 (ナノテクノロジー) 研究事業の補助 (H21-ナノ一般-006) を受けた。

引用文献

1. Aoki H, Yamada Y, Hara A and Kunisada T: Two distinct types of mouse melanocyte: differential signaling requirement for the maintenance of non-cutaneous and dermal versus epidermal melanocytes. *Development* 136:2511-2521, 2009
2. Bennett DC and Medrano EE: Molecular regulation of melanocyte senescence. *Pigment Cell Res* 15:242-250, 2002

3. Brito FC and Kos L: Time line and distribution of melanocyte precursors in the mouse heart. *Pigment Cell Melanoma Res* 21:464-470, 2008
4. Bush WD and Simon JD: Quantitation of Ca<sup>2+</sup> binding to melanin supports the hypothesis that melanosomes serve a functional role in regulating calcium homeostasis. *Pigment Cell Res* 20:134-139, 2007
5. D' Amato RJ, Lipman ZP and Snyder SH: selectivity of the Parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP<sup>+</sup> binds to neuromelanin. *Science* 231:987-989, 1986
6. Double KL, Zecca L, Costi P, Mauer M, Griesinger C, Ito S, Ben-Shachar D, Bringmann G, Fariello RG, Riedere P and Gerlach M: Structural characteristics of human substantia nigra neuromelanin and synthetic dopamine melanins. *J Neurochem* 75:2583-2589, 2000
7. Double KL, Dedov VN, Fedorow H, Kettle E, Halliday GM, Garner B and Brunk UT: The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain. *Cell Mol Life Sci* 65:1669-1682, 2008
8. Fedorow H, Pickford R, Hook JM, Double KL, Halliday GM, Gerlach M, Riedere P and Garner B: Dolichol is the major lipid component of human substantia nigra neuromelanin. *J Neurochem* 92:990-995, 2005
9. Fedorow H, Tribl F, Halliday G, Gerlach M, Riederer P and Double KL: Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Progress in Neurology* 75:109-124, 2005
10. Forno LS: Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:259-272, 1996
11. Goding CR: Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes and Development* 14:1712-1728, 2000
12. Han F, Takeda K, Ishikawa K, Ono M, Date F, Yokoyama S, Furuyama K, Shinozawa Y, Urabe Y and Shibahara S: Induction of lipocalin-type prostaglandin D synthase in mouse heart under hypoxemia. *BBRC* 385:449-453, 2009
13. Ikeda S and Jimbow K: A case of neuro-cutaneous melanosis. *Acta Paed Jap* 12:16-22, 1970
14. Ito S and Wakamatsu: Chemistry of mixed melanogenesis-pipotal roles of dopaquinone. *Photochem Photobiol* 84:582-592, 2008
15. Ito N, Sugawara K, Bodo E, Takigawa M, van Beek N, Ito T and Paus R: Corticotropin-releasing hormone stimulates the in situ generation of mast cells from precursors in the human hair follicle mesenchyme. *J Invest Dermatol* 130:995-1004, 2010
16. Jimbow K and Fitzpatrick TB: Characterization of a new melanosomal structural component- the vesiculoglobular body-by conventional, transmission, high-voltage, and scanning electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 48:269-283, 1973
17. Jimbow K, Prota G, Quevedo WC and Fitzpatrick TB: Biology of melanocytes. In Fitzpatrick's *Dermatology in General Medicine*. Fifth Edition, Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff E, Austin KF, Goldsmith LA, Katz SI and Fitzpatrick TB eds. McGraw-Hill, New York, pp192-220, 1998
18. Kelsh RN, Harris ML, Colanesi S and Erickson CA: Stripes and belly-spots- review of pigment cell morphogenesis in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 20:90-104, 2009
19. Korytowski W, Sarna T and Mareba M: Antioxidant action of neuromelanin: the mechanism of

- inhibitory effect on lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 319:142-148, 1995
20. Kubic JD, Young KP, Plummer RS, Ludvik AE, Lang D: Pigmentation PAX-ways: the role of Pax3 in melanogenesis, melanocyte stem cell maintenance, and disease. *Pigment Cell & Melanoma Res* 21, 627-645, 2008
  21. Lin JY and Fisher DE: Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445:84-850, 2007
  22. Miller ED, fibuch EE and Seidler NW: toxicity of a serotonin-derived neuromelanin. *BBRC*: 391:-1297-1300, 2010
  23. Mjaatvedt CH, Kern CB, Norrsi RA, Fairey S and Cave CL: Normal distribution of melanocytes in the mouse heart. *Anat Rec Part A* 285A:748-757, 2005
  24. Moses HL, Ganote CE, Bevaver DL and Schuffman SS: Light and electron microscopic studies of pigment in human and Rhesus monkey substantia nigra and locus coeruleus. *Anat rec* 155:167-184, 1965
  25. Naoi M, Yi H, Maruyama W, Knaba K, Shamot-Nagai M, Akao Y, Gerlach M and Riederer P: Glutathione redox status in mitochondria and cytoplasm differentially and sequentially activates apoptosis cascade in dopamine-melanin-treated SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 465:118-122, 2009
  26. Odh G, Carstan R, Paulson J, Wittbjør A, Rosengren E and Rorsman J *Neurochem* 62: 2030-2036, 1994
  27. Sarna T, Burke JM, Korytowski W, Rożanowska M, Skumatz CMB, Zareba A and Zareba M: Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation. *Exptl Eye res* 76:89-98, 2003
  28. Read A and Newton VE: Waardenburg syndrome. *J Med Genet* 34:656-665, 1997
  29. Simon JD, Hong L and Peles DN: Insights into melanosomes and melanin from some interesting spatial and temporal properties. *J Phys Chem B* 112: 13201-13217, 2008
  30. Simon, JD, Peles D, Wakamatsu K and Ito S: Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:563-579, 2009
  31. Slominski A, Wortsman J, Kohn L, Ain KB, Venkataraman GM, Pisarchik A, Chung JH, Giuliani C, Thornton M, Slugock G and Tobin DJ: Expression of hypothalamic-pituitary-thyroid axis related genes in the human skin. *J Invest Dermatol* 119:1449-1455, 2002
  32. Snyder AM and Connor JR: Iron, the substantia nigra and related neurological disorders. *BBA* 1790:605-614, 2009
  33. Sulzer D, Mosharov E, Tallozy Z, Zucca FA, Simon JD and Zecca L: Neuronal pigmented autophagic vacuoles: lipofuscin, neuromelanin, and ceroid as macroautophagic responses during aging and disease. *J Neurochem* 106:24-36, 2008
  34. Tachibana M: Evidence to suggest that expression of MITF induces melanocyte differentiation and haploinsufficiency of MITF causes Waardenburg syndrome type 2A. *Pigment Cell Res* 10:25-33, 1997
  35. Takdeda K, Takahashi NH and Shibahara S: Neuroendocrine functions of melanocytes: beyond the skin-deep melanin marker. *Tohoku J Exp Med* 211:201-221, 2007
  36. Tsukiji MJ, Hishihara D, Yajima I, Takeda K, Shibahara S and Yamamoto H: Mitf functions as an

in ovo regulator for cell differentiation and proliferation during development of the chick RPE. *Develop Biol* 325:335-346, 2009

37. Uehara S, Izumi Y, Kubo Y, Wang CC, Mineta K, Ieko K, Gojobori T, Tachibana M, Kikuchi T, Kobayashi T, Shibahara S, Taya C, Yonekawa H, Shiroishi T and Yamamoto H: specific expression of *Gsta4* in mouse cochlear melanocytes: a novel role for hearing and melanocyte differentiation. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:111-119, 2008
38. Waardenburg PJ: A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. *Am J Human Genetics* 3: 195-253, 1951
39. Wakamatsu K, Fujikawa K, Zucca FA, Zecca L and Ito S: The structure of neuromelanin as studied by chemical degradative methods. *J Neurochem* 86:1015-1023, 2003
40. Zecca L, Bellei C, Costi P, Albertini A, Monzani E, Casella L, Gallorini M, Bergamaschi L, Moscatelli A, Turro N, Fisner M, Crippa PR, Ito S, Wakamatsu K, Bush WD, Ward W, Simon JD and Zucca FA: New melanin pigments in the human brain that accumulate in aging and block environmental toxic metals. *PNAS* 105\*17567-17572, 2008
41. Zucca FA, Bellei C, Giannelli S, Terreni MR, Gallorini M, Rizio E, Pezzoli G, Albertini A and Zecca L: Neuromelanin and iron in human locus coeruleus and substantia nigra during aging: consequences for neuronal vulnerability. *J Neural Transm* 113:757-767, 2006
42. Zucca FA, Giaveri G, Gallorini M, Albertini A, Toscani M, Pezzoli G, Lucius R, Wilms H, Sulzer D, Ito S, Wakamatsu K and Zecca L: The neuromelanin of human substantia nigra: physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Res* 17:610-617, 2004