Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Melanin monomers within coated vesicles and premelanosomes in melanin synthesizing cells

八田, 晋

(Degree)
博士 (医学)
(Date of Degree)
1988-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲0758
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000758

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・(本籍)　八田　晋（はった すすむ）（兵庫県）

学位の種類　医学博士

学位記番号　医博い第598号

学位授与の要件　学位規則第5条第1項該当

学位授与の日付　昭和63年3月31日

学位論文題目　Melanin Monomers within Coated Vesicles and Premelanosomes in Melanin Synthesizing Cells

（メラニン生成細胞における coated vesicle および premelanosome 内 melanin monomer の存在と役割）

審査委員　主査 教授　三島　豊

教授　田中千賀子　教授　河野通雄

論文内容の要旨

<序　文>

最近にいたりホ乳色素細胞は黒色の eumelanin のみならず黄赤色の pheomelanin をも同時的に生成し（mixed melanogenesis），皮膚および毛髪の色調はその両者の量ならびに存在比に依存していることが見いだされた。細胞内レベルでのメラニン生成（polymer 形成）は Golgi 装置ないしは滑面小胞体由来の特異的細胞内小器官プレメラノソーム内のみにおいて，その出現が認められる。すなわち滑面小胞体もしくは Golgi 領域から生じた空胞が第Ⅰ期メラノソームとなり，これとは別個に Golgi associated endoplasmic reticulum of lysosome (GERL) から生じた coated vesicle が第Ⅰ期メラノソームに融合し，第Ⅱ期メラノソームとなる。その後メラノソームの成熟とともにメラニン沈着が進行し，第Ⅲ期メラノソーム→第Ⅳメラノソームへと移行しメラニン生成が完成するとされている。一方メラニン生成に不可欠な酸素チロシナーゼはリボソームより形成され Golgi 装置の GERL に集積し coated vesicle によりメラノソームに運ばれる。このようにメラニン生成な基質となるチロシンおよびチロシナーゼがメラノソームに供給され，もっぱらメラノソーム内でのみ行われているとされていたが今回我々は新たな所見を見い出した。色素細胞のメラニン生成関連小器官である coated vesicle の fraction を分離し，同 fraction の高いチロシナーゼ活性を得ると同時にメラニン polymer の前駆単量体である5，6－dihydroxyindole (5，6－DHI) ならびに5，6－dihydroxy indole－2－carboxylic acid (5，6－DHI 2 C) の存在が明らかになった。

<方　法>

メラノーマ組織

継代移植を行っているハムスター Greene's melanoma ならびに Duroc 種ブタの自然発生のメラノーマを用いた。

細胞内小器官分画の分離および同定

coated vesicle は Kadota らのショ糖濃度勾配法により，プレメラノソーム及びメラノソーム分画は Mishima のショ糖濃度勾配により分画した。マーカー酸素であるチロシナーゼ活性の測定，および電顕所見（negative 染色）により各分画を同定した。

eumelanin, pheomelanin の定量

伊藤の PTCA－AHP 法により eumelanin は過マンガン酸酸化で得た pyrrole－tricarboxylic acid を，pheomelanin はヨウ化水素水解で得た 3－amino－4－hydroxyph enylalanine を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で測定した。

5，6－DHI，5，6－DHI 2 C の定量

化学的に合成した5，6—DHI，5，6－DHI 2 C を standard として螢光検出器（UV298nm）を用い，HPLC で測定した。

<結　果>

ハムスター Greene's melanoma から分離した coated vesicle 分画はプレメラノソームおよびメラノソーム分画に比して，高いチロシナーゼ活性を有すると同時に，かなりの量のPTCA（eumelanin の定量的指標）と AHP （pheomelanin の定量的指標）を測定し得た。

次に，ハムスター Greene's melanoma ならびに自然発生のブタ melanoma から得た coated vesicle 分画内にメラニン単量体である5，6－DHI および5，6－DHI 2 Cがそれぞれ6.6～143μg/mg・protein, 0.5～13μg/mg・protein 存在していた。

さらに5.6－DHI 2 C は coated vesicle→プレメラノソーム→メラノソームへと成熟ならびにメラニン沈着するに従って減少していくことがわかった。

<考　察>

我々の行った eumelanin 定量法，すなわち PTCA 法は eumelanin polymer だけでなく，前駆物質である5，6－DHI 2 C 等の indole 化合物も eumelanin 量として測定するため，メラニン monomer だけしか存在していない coated vesicle faction でも，みかけ上 eumelanin 量として検出している。そのため，さらに詳しく分布を調べるために化学的に合成した5，6—DHI，5，6－DHI 2 C のstandard を用いて，メラニン前駆物質の細胞内分布の解析を試みた。

今回得た所見より coated vesicle 内に melanin monomer が存在すると同時に高いチロシナーゼ活性を有しているのに，電顕的にはプレメラノソーム，メラノソームにみられるような電子密度の高い melanin polymer が認められないことより coated vesicle 内で何らかの regulatory factor が働いていると考えられる。さらにチロシナーゼは，リボソームで生成され GERL－coated vesicle 系でまず glycosylation を受けT_1－tyrosinase として coated vesicle を介して GERL

からプレメラノソームに運ばれる。プレメラノソーム内でT_1−tyrosinaseは膜結合型のT_3−tyrosinase となり melanin polymer 形成に寄与する。又 in vivo, 細胞培養系で melanin polymer 形成にT_3−tyrosinase が不可欠であることが実証されている。tunicamycin, glucosamine 等の糖鎖阻害剤を用いた実験より，coated vesicle 内にT_3−tyrosinase活性がないことが示されている。最近の文献で tyrosinase もしくはT_3−tyrosinase のisozyme がメラニン monomer から polymer への変換に働くという報告や一方 dopachrome oxidoreductase (DCOR) といわれる新しい酵素が indole からmelanin polymer への変換を阻害するという報告がある。我々が得た所見，すなわち coated vesicle 内に高いチロシナーゼ活性とメラニン monomer が存在するのに polymer 形成が起こらないのはT_3−tryosinase を欠き，高い DCOR 活性をもっているためかもしれない。黒色腫組織中に銅，コバルト，ニッケル等の金属イオンが含まれていることは古くから知られているが，これらの金属イオンの触媒で dopachrome→5，6−DHI よりも dopachrome →5，6−DHI 2 C への変換が促進され，カルボン酸の付いた indole 化合物がメラニン polymer 生成の前駆物質として重要視されている。eumelanin の多くの存在するブタの melanoma で5，6−DHI 2 Cが多量に認められ melanin polymer 形成に従って減少していく我々の所見によく合致している。

以上より melanin polymer 形成は，プレメラノソームで行われるが，その前駆物質である melanin monomer はすでにそれ以前に生成され，coated vesicle にてプレメラノソームに運ばれるという新たな事実をもとにさらにメラニン研究が進められていくべきだと考えている。

論文審査の結果の要旨

色素細胞内におけるメラニン生合成はその特異的細胞内小器官である premelanosome 内のみで行なわれると，1961年 Harvard グループにより報告されて以来，この知見をもとに多くの melanogenesis に関する研究が発展してきた。即ち，リボソームで合成された tyrosinase は，粗面小胞体を経て Golgi 嚢で濃縮され，次いで Golgi vesicle に移行し，それらの増大融合により stage Ⅰ よりⅣに至る melanosome が形成されるとする Golgi-melanosome system 説が提出された。彼等の説は tyrosinase 酵素の濃縮活性化と premelanosome の形成は Golgi 装置の同一部位で行なわれているという一元説であった。しかし，その後我々のグループの研究により tyrosinase 陰性の early premelanosome の存在や tyrosinase 陽性出現部位が Golgi 装置とは異なる GERL—coated vesicle 系にあることが生化学的ならびに電顕的に見ち出され，Golgi -melanosome system 一元説による initial melanogenesis の解釈には矛盾のあることが判明した。さらにメラニン生成初期の tyrosinase 活性化部位は Golgi 嚢ではなく，GERL にあり，ついでその先端部より生ずる coated vesicle により活性化 tyrosinase が premelanosome に転送される特異的輸送機構の存在が明らかにされた。

最近に至り，pyrrole−2，3，5−tricarboxylic acid (PTCA) を用いる eumelanin 定量法な

らびにその前駆単量体として重要な5，6−dihydroxyindole−2−carboxylic acid(5，6−DHI 2 C) の HPLC 定量法が伊藤らにより開発され，melanin polymer 生成過程の詳細が明らかになった。

本研究は，かかる新しい定量法を用いて melanin polymer 生成過程を解析した結果，色素細胞原形質において，coated vesicle はメラニン顆粒の前駆 organelle の premelanosome 内へ T_3−tyrosinase を輸送するのみならず，すでに5，6−DHI 2 C等の melanin monomer を含有しており，これらを premelanosome 内へ転送するという重要な機能を有することをはじめて見い出した。本知見により，tyrosinase活性の存在にもかかわらず，メラニン生成障害をきたす tyrosinase 陽性型 albinism, piebaldism 等の発症機構や新しい非細胞障害型メラニン生成抑制物質の解明につながる研究発展が期待される重要な，価値ある業積であると認める。よって，本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。