

# カダヤシ黒色素胞における色素顆粒移動と微小管との関連性

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	中村, 直志 池田, 弥生
巻/号	52巻3号
掲載ページ	p. 447-451
発行年月	1986年3月

## カダヤシ黒色素胞における色素顆粒移動と微小管との関連性

中村直志, 池田弥生

(1985年7月29日受理)

## Relationship between Pigment Granules Translocation and Microtubules in Mosquitofish Melanophores

Naoshi Nakamura\* and Yayoi Ikeda\*

Isolated scale melanophores of mosquitofish *Gambusia affinis* were examined to confirm whether microtubules were concerned with pigment granule transport.

Single treatment of melanophores with keeping at room temperature after low temperature ( $-3 \sim -5^\circ\text{C}$ ) or with colchicine elicited rapid aggregation and dispersion in responses to epinephrine and theophylline, respectively. The treatment of melanophores with low temperature blocked incompletely both melanosome aggregation and dispersion. Furthermore, these responses were completely blocked by the combined treatment of the melanophores with low temperature-plus-colchicine. Under this combined treatment, the melanosomes remained in the fully dispersed state during the pretreatment. On the other hand, the same treatment to aggregated melanophores elicited incomplete dispersion of melanosomes during the pretreatment, indicating a dynamic function of microtubules in melanosome aggregation.

These results suggest that microtubules are essential to the transport of pigment granules also in mosquitofish melanophores.

近年、色素細胞の色素顆粒移動メカニズムに関しては数多くの研究報告があるが、依然としてそのメカニズムは十分には解明されていない。現在、顆粒移動メカニズムに関する仮説は actin 系によるもの<sup>1-3)</sup>と微小管系によるもの<sup>4-7)</sup>との2つに大別されている。

本研究では特に微小管系に着目した。微小管を人為的に脱重合させる方法としては、黒色素胞を低温処理 ( $0 \sim -7^\circ\text{C}$ ) すると細胞質微小管は解離すること<sup>5)</sup>また植物アルカロイドのコルヒチン処理は微小管の解離及び重合を特異的に阻害すること<sup>4,8)</sup>などが報告されている。本研究では鱗黒色素胞にこれらの処理を施し、色素顆粒の凝集および拡散反応を調べ、色素顆粒移動と微小管との関連性を検討した。

## 材料及び方法

体長 3~4 cm のカダヤシ *Gambusia affinis* の背部頭側域より摘出した鱗黒色素胞を実験に用いた。さらに黒色素胞の薬剤に対する感受性を高め、また刺激効果からの回復を促進する意味から表皮剝離標本として使用した。表皮剝離には Stone and Chavin<sup>9)</sup>の報告を参考にして EDTA を使用した。Table 1 に示したように 1~10 mM の EDTA (和光純薬工業 K.K. 製) を含むメ

**Table 1.** Comparison of EDTA method for the removal of scales from mosquitofish epidermis. The effects of the removal were graded. Poor: <50%, Fair: 50~80%, and Good: 80% in scale removal. Temperature during treatments was 18~22°C. Shake frequency was 180~200 times/min

EDTA concentration (mM)	Treatment duration (min)		
	30	60	90
1	Poor	Poor	Poor
2	Poor	Poor	Poor
3	Poor	Poor	Poor
5	Poor	Fair	Fair
10	Good	Good	—

ダカリンガー液 (NaCl; 128 mM, KCl; 2.7 mM, CaCl<sub>2</sub>; 1.8 mM, 0.1 N NaHCO<sub>3</sub> により pH 7.3 に調整) 10 ml の入ったヴァイアルに鱗を入れ、振盪器で 30, 60, 90 分間メカニカルに振盪した (180~200 回/min, 18~22°C)。表皮剝離の確認は実体顕微鏡下で行った。Table 1 から明らかなように EDTA 濃度 10 mM, 処理時間 30 min で良好な表皮剝離標本が得られたので、以下に述べる黒色素胞の凝集、拡散に関する実

\* 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato, Tokyo 108, Japan).

験ではこの方法を採用した。

アドレナリン刺激に対する凝集反応 表皮剥離した鱗はリンガー液で軽くすすいだ後, 次の5区に分け前処理を施した。(a) リンガー液中で室温 (18~22°C) に2時

間置いたもの (対照), (b) 1 mM コルヒチン (和光純薬工業 K.K. 製) を含むリンガー液中で室温に2時間置いたもの, (c) リンガー液中で1時間の低温 (-3~-5°C) 処理後, 室温に1時間置いたもの, (d) リンガー液中で

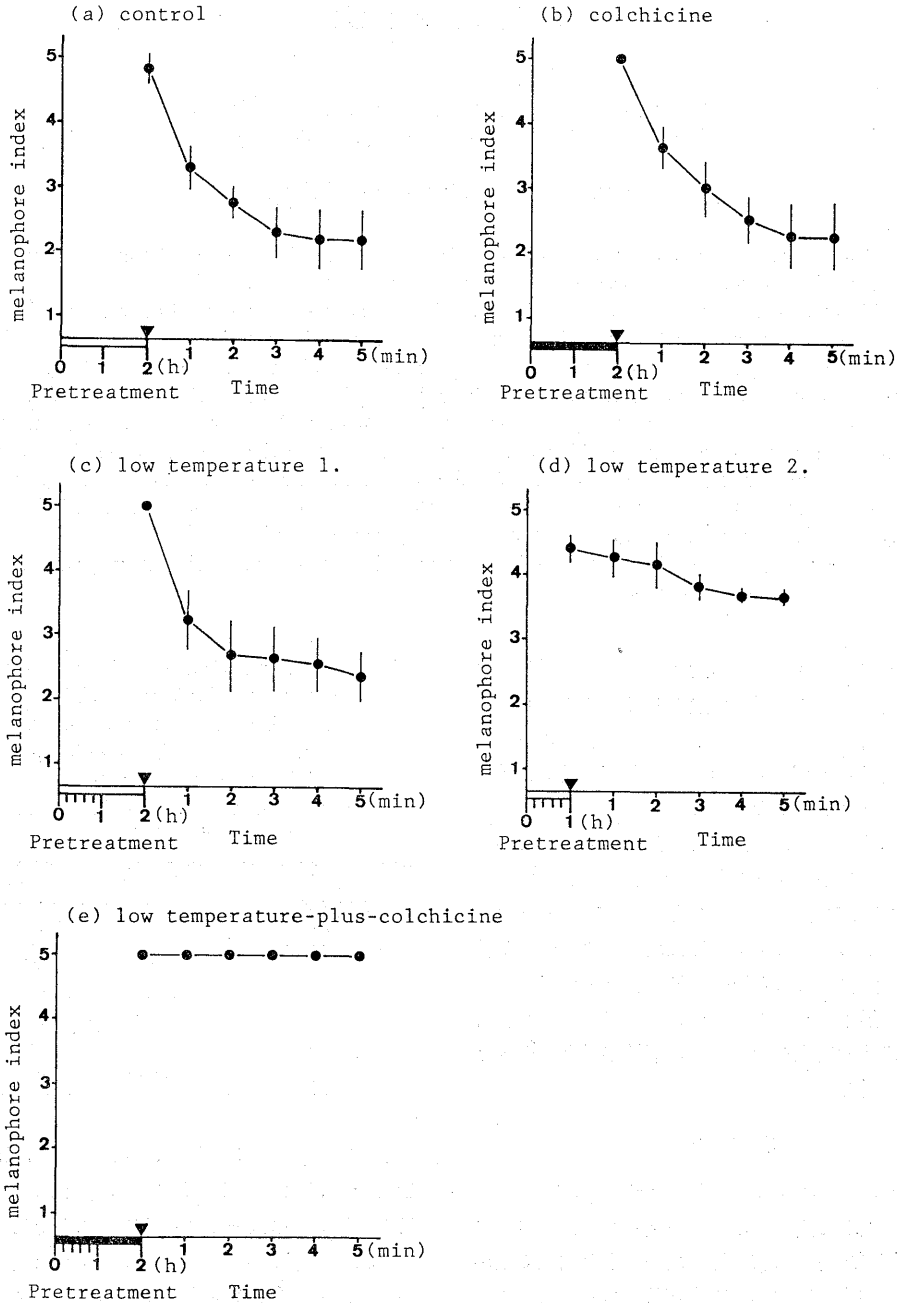


Fig. 1. Response of scale melanophores without epidermis (removed with EDTA treatment) to  $10 \mu\text{M}$  adrenaline. Melanophores were applied for 5 min in the adrenaline solution at room temperature (18~22°C) after each pretreatment. Pretreatments were expressed,  $\square$ : in Ringer's solution,  $\blacksquare$ : with 1 mM colchicine in Ringer's solution,  $\text{||||}$ : low temperature (-3~-5°C) treatment,  $\blacktriangledown$ : perfusion of the adrenaline solution. The results were presented as mean  $\pm$  SD (n=10).

1時間の低温処理のみを施したもの、(e) 1 mM コルヒチンを含むリンガー液中で1時間の低温処理後、室温に1時間置いたもの。これらの前処理後鱗を処理液と共に、それぞれカバースリップによって間隙を作ったスラ

イドグラス上に移した。色素顆粒凝集刺激はこの間隙の一端から  $10 \mu\text{M}$  アドレナリン (第一製薬 K.K. 製) を注入し、処理液を他端からろ紙で吸い取ることによって行った。色素顆粒分布はアドレナリン注入前、注入後

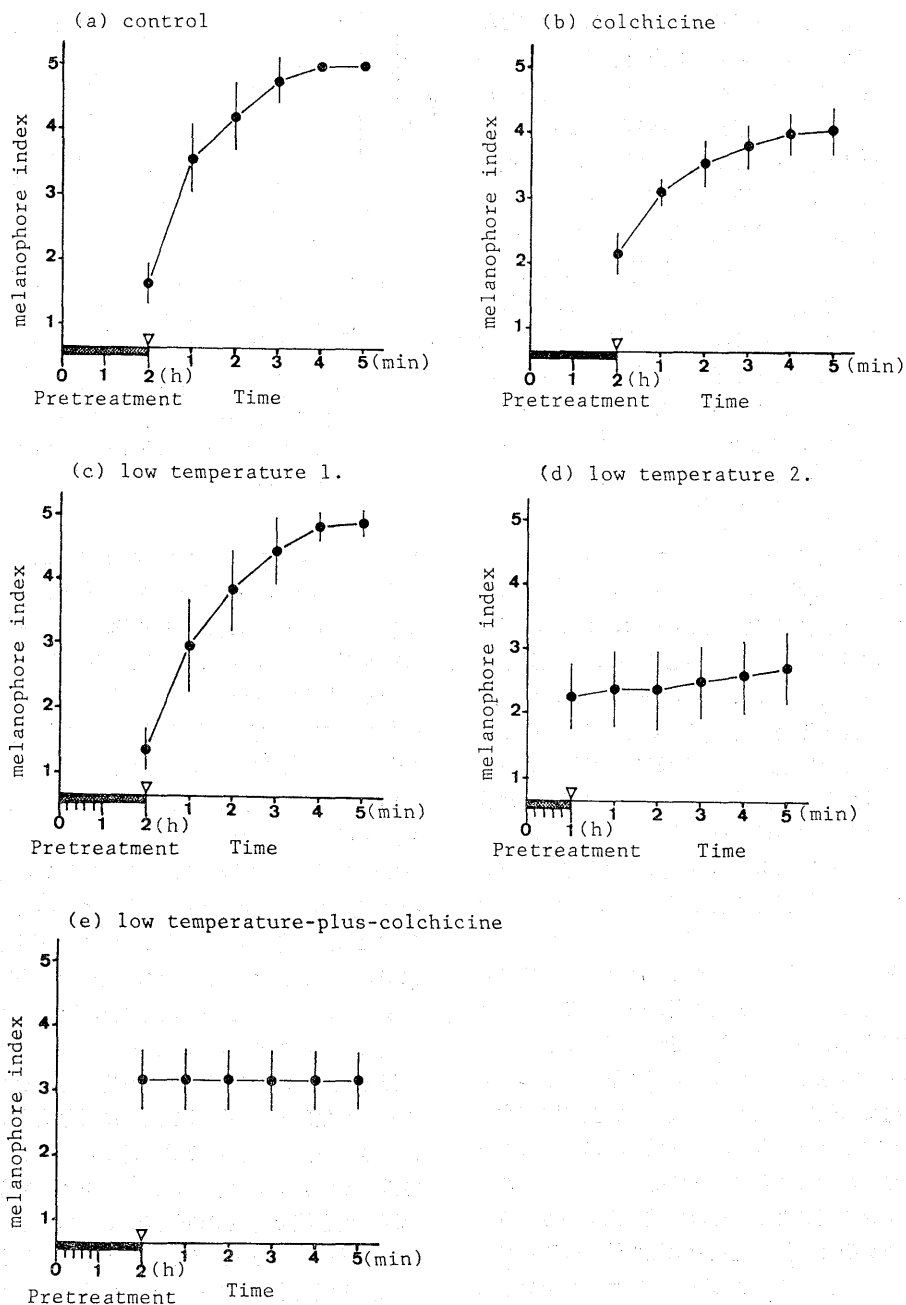


Fig. 2. Response of scale melanophores without epidermis (removed with EDTA treatment) to  $10 \text{ mM}$  theophylline. Melanophores were applied for 5 min in the theophylline solution at room temperature ( $18 \sim 22^\circ\text{C}$ ) after each pretreatment. Pretreatments were expressed,  $\text{▨}$ : in  $10 \mu\text{M}$  adrenaline solution,  $\text{■}$ : with  $1 \text{ mM}$  colchicine in  $10 \mu\text{M}$  adrenaline solution,  $\text{||||}$ : low temperature ( $-3 \sim -5^\circ\text{C}$ ) treatment,  $\nabla$ : perfusion of the theophylline solution. The results were presented as mean  $\pm$  SD ( $n=10$ ).

1, 2, 3, 4 および 5 分の各時点でそれぞれ光学顕微鏡写真によって記録し, それを基に Hogben and Slome<sup>10)</sup> による melanophore index (MI) で表した。黒色素胞は 4~5 枚の鱗から無作為に 10 個を選び測定した。

テオフィリン刺激に対する拡散反応 表皮剝離した鱗はリンガー液で軽くすすいだ後, 次の 5 区に分け前処理を施した。(a) 10  $\mu$ M アドレナリン溶液中で室温に 2 時間置いたもの (対照), (b) 1 mM コルヒチンを含む 10  $\mu$ M アドレナリン溶液中で室温に 2 時間置いたもの, (c) 10  $\mu$ M アドレナリン溶液中で 1 時間の低温処理後, 室温に 1 時間置いたもの, (d) 10  $\mu$ M アドレナリン溶液中で 1 時間の低温処理のみを施したもの, (e) 1 mM コルヒチンを含むアドレナリン溶液中で 1 時間の低温処理後, 室温に 1 時間置いたもの。これらの前処理後それぞれの鱗に 10 mM テオフィリン (和光純薬工業 K.K. 製) を作用させた。その他は凝集反応の場合と同様である。なお, アドレナリンとテオフィリンの作用濃度については Obika<sup>11)</sup> の報告を参考にした。

## 結 果

アドレナリン刺激に対する凝集反応 得られた結果を Fig. 1 に示した。対照において 10  $\mu$ M アドレナリンは色素顆粒をほぼ完全に凝集させた (MI  $2.2 \pm 0.46$ , Fig. 1-a)。また, 室温でのコルヒチン処理は色素顆粒凝集にほとんど影響を与えなかった (Fig. 1-b)。一方, 低温処理については, 低温処理に引き続いて室温で 1 時間保持した鱗黒色素胞では比較的対照に類似した凝集パターンを示したが (Fig. 1-c), 低温処理直後では凝集反応は著しく低下することが認められた (Fig. 1-d)。更に, コルヒチン存在下で低温処理に引き続いて室温で 1 時間保持した鱗黒色素胞では凝集反応は全く認められなかった (Fig. 1-e)。

以上のことから, 拡散状態の鱗黒色素胞の室温でのコルヒチン処理あるいは低温処理に引き続く室温での保持は色素顆粒凝集を阻害せず, 低温処理直後では色素顆粒凝集を不完全に阻害し, コルヒチン存在下で低温処理に引き続く室温での保持は色素顆粒凝集を完全に阻害すると言える。つまり細胞質微小管は低温処理によって脱重合し, 室温で保持することによってその再重合が起こるが, コルヒチン処理によってその再重合は阻害される。またコルヒチンそれ自体は室温では微小管を脱重合させないことを示している。この実験ではコルヒチンを 1 mM の濃度で作用させたが, 10 倍濃度 (10 mM) でも微小管を脱重合させないという結果を別に得ている。

テオフィリン刺激に対する拡散反応 得られた結果を Fig. 2 に示した。対照において 10 mM テオフィリンは色素顆粒を完全拡散させた (MI  $5.0 \pm 0.00$ , Fig. 2-a)。

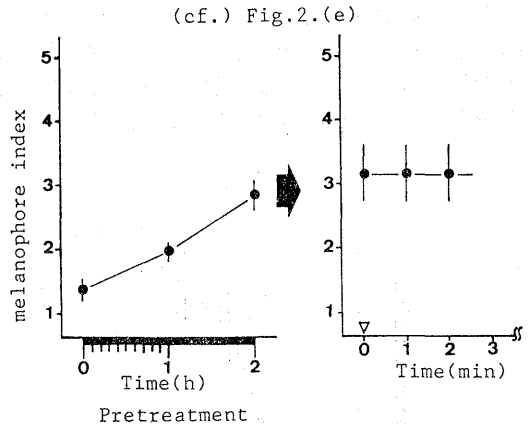


Fig. 3. Distribution of pigment granules at each stage during pretreatment on the group (e) in Fig. 2. Pretreatments were expressed, ●: with 1 mM colchicine in 10  $\mu$ M adrenaline solution, ○: 10  $\mu$ M adrenaline solution, ▽: perfusion of the theophylline solution. The results were presented as mean  $\pm$  SD (n=10).

また, 室温でのコルヒチン処理は対照と比較してやや劣るものの MI でほぼ 2 段階の拡散反応を示した (Fig. 2-b)。一方, 低温処理については, 低温処理に引き続いて室温で 1 時間保持した鱗黒色素胞では対照にきわめて類似した拡散パターンを示したが (Fig. 2-c), 低温処理直後では拡散反応は著しく低下することが認められた (Fig. 2-d)。更に, コルヒチン存在下で低温処理に引き続いて室温で 1 時間保持した鱗黒色素胞ではテオフィリン刺激以前に不完全な拡散状態にあり, またテオフィリン刺激に対する拡散反応は認められなかった (Fig. 2-e)。そこで, この実験区の鱗黒色素胞について前処理中の各段階における色素顆粒分布を調べ, その結果を Fig. 3 に示した。これより明らかに, 凝集惹起物質が存在するにもかかわらず前処理中に既に色素顆粒の不完全な拡散が起こっているのが認められる。

以上のことから, 凝集状態の鱗黒色素胞の室温でのコルヒチン処理あるいは低温処理に引き続く室温での保持は色素顆粒拡散を阻害せず, 低温処理直後では色素顆粒拡散を不完全に阻害する。更にコルヒチン存在下で低温処理に引き続く室温での保持はその処理中に色素顆粒の不完全拡散を招くが, 色素顆粒が樹状部先端域に至る完全拡散を阻害すると言える。この結果は微小管の脱重合および再重合に関して, 凝集反応で得た結果と一致するものである。

## 考 察

これまで数多くの研究者によって色素顆粒移動と微小

管との関連性が示唆されてきたが、<sup>4-7, 12-15)</sup> 微小管が色素顆粒移動の直接の力発生を担っているのか、あるいは単にガイドレールとしての役割を担っているのかという点についての結論には達していない。色素細胞内の微小管は細胞体部から樹状先端部に向かって放射状に配列しているが、低温処理によって微小管のこの放射状の配列が壊れ、チューブリンダイマーとして散在することが Schliwa *et al.*<sup>6)</sup> による間接蛍光抗体法の研究で明らかにされている。

本実験結果からも、色素顆粒の求心方向の移動、色素顆粒凝集状態の維持および遠心方向の移動には微小管が不可欠であることが示唆された。本研究は具体的には微小管のこの放射状の配列が形成されている状態、あるいはチューブリンダイマーとして散在している状態においても色素顆粒移動が起こるか否かを調べたものと言えるが、これらの結果は求心、遠心いずれの方向においても微小管の放射状の配列が形成されている場合のみ色素顆粒移動が起こることを示している。また、凝集反応において色素顆粒は一列に連なって移動することから、微小管は色素顆粒移動のためのガイドレールとしての役割を担っているという示唆に富むが、移動のための直接の力発生を担うものであるか否かという点に関しては、今後研究を要するところである。しかし、微小管の放射状の配列が壊れることによって色素顆粒の高密度凝集状態が崩れたことは、色素顆粒の凝集状態を維持するための微小管の力学的機能を暗示するものと思われる。

また、色素顆粒の求心方向と遠心方向の移動において、顆粒移動形態に相違のあることを光顕的に観察している。求心方向の色素顆粒移動においては個々の顆粒はあたかもレール上を移動するかのように直線的に列を成して移動する。一方、遠心方向の移動においては個々の顆粒は前後に振動を繰り返しながら移動する。このよう

に移動の方向性の違いによる色素顆粒移動形態の相異は、共に微小管依存性でありながらも移動メカニズムが異なることを示唆しているものと思われる。

終わりに、実験方法に関し御指導頂きました慶応大学小比賀正敬教授に深謝致します。

## 文 献

- 1) T. Akiyama and J. Matsumoto: in "Pigment Cell 1981, Phenotypic Expression in Pigment Cells" (ed. by M. Seiji). University of Tokyo Press, Tokyo. 1981, pp. 417-426.
- 2) T. Akiyama and J. Matsumoto: *J. Exp. Zool.*, **227**, 405-411 (1983).
- 3) T. Akiyama: *Zool. Sci.*, **2**, 193-199 (1985).
- 4) D. B. Murphy and L. G. Tilney: *J. Cell Biol.*, **61**, 757-779 (1974).
- 5) M. Obika, W. A. Turner, S. Negishi, D. G. Menter, T. T. Tchen and J. D. Taylor: *J. Exp. Zool.*, **205**, 95-110 (1978).
- 6) M. Schliwa, M. Osborn and K. Weber: *J. Cell Biol.*, **76**, 229-236 (1978).
- 7) M. Schliwa: *Nature*, **273**, 556-558 (1978).
- 8) M. A. Wikswow and R. R. Novales: *J. Ultrastruct. Res.*, **41**, 189-201 (1972).
- 9) J. P. Stone and W. Chavin: *Comp. Biochem. Physiol.*, **49A**, 357-367 (1974).
- 10) L. Hogben and D. Slome: *Proc. Roy. Soc.*, **B**, **108**, 10-53 (1931).
- 11) M. Obika: *Annot. Zool. Japon.*, **49**, 157-163 (1976).
- 12) H. R. Byers and K. R. Porter: *J. Cell Biol.*, **75**, 541-558 (1977).
- 13) K. J. Luby and K. R. Porter: *Cell*, **21**, 13-23 (1980).
- 14) M. Schliwa: *J. Cell Biol.*, **76**, 605-614 (1978).
- 15) M. Schliwa and J. B. Hahn: *Cell Tiss. Res.*, **158**, 61-73 (1975).