

Title	ウコッケイのhyper melanizationにおけるエンドセリン・ エンドセリン受容体の関与
Sub Title	Involvement of endothelin and its receptor in hyper melanization of black silky chicken
Author	萱嶋, 泰成(Kayashima, Yasunari) 秋山, 豊子(Akiyama, Toyoko)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2005
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 No.37 (2005. ) ,p.61- 72
JaLC DOI	
Abstract	Silky is known as a unique chicken expressing heavy melanization in almost all internal organs, but the mechanisms of the hyper pigmentation have not been clearly understood. Previous studies have shown that endothelin 3 ( ET3 ) , one of endothelins ( ETs ) , plays an important role for proliferation and differentiation of cultured chicken melanocytes. We investigated the amounts and expressions of transcripts in both ET3 and its receptor EDNRB2 in several chicken lines including Black Silky. Consequently, the ET3 and EDNRB2 transcripts were specifically expressed in cultured fibroblasts and melanocytes, respectively. The amounts of both ET3 and EDNRB2 transcripts in the cultured cells and tissues from Silky were slightly higher than other lines. These results suggest that upregulated ET3 and EDNRB2 possibly effect to internal hyper pigmentation in the early embryonic phase of Silky.
Notes	
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20050000-0061">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20050000-0061</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## ウコッケイの hyper melanization における エンドセリン・エンドセリン受容体の関与

萱嶋泰成・秋山豊子

Involvement of Endothelin and its Receptor in Hyper Melanization of BLACK SILKY Chicken

Yasunari KAYASHIMA and Toyoko AKIYAMA

Summary—Silky is known as a unique chicken expressing heavy melanization in almost all internal organs, but the mechanisms of the hyper pigmentation have not been clearly understood. Previous studies have shown that endothelin 3 (ET3), one of endothelins (ETs), plays an important role for proliferation and differentiation of cultured chicken melanocytes. We investigated the amounts and expressions of transcripts in both ET3 and its receptor EDNRB2 in several chicken lines including Black Silky. Consequently, the ET3 and EDNRB2 transcripts were specifically expressed in cultured fibroblasts and melanocytes, respectively. The amounts of both ET3 and EDNRB2 transcripts in the cultured cells and tissues from Silky were slightly higher than other lines. These results suggest that up regulated ET3 and EDNRB2 possibly effect to internal hyper pigmentation in the early embryonic phase of Silky.

Key words: Silky Chicken, melanization, pigment cell, endothelin 3, endothelin receptor B2

### 序論

ニワトリの一系統であるウコッケイには、顕著なメラニン産生が表皮組織だけでなく筋肉組織や血管、及び腹腔膜等体内の各臓器とその間充織にもみられる (Kuklenski, 1915)。このような現象は他のニワトリ系統やほ乳類では報告されておらず、その原因機構については不明で

ある。これまでの解析から、ウコッケイの神経胚では、色素芽細胞（メラノブラスト）の通常の移動経路である神経冠から背側路に沿った移動の他に、背腹路に沿った移動が顕著にみられること、これらメラノブラストは、背側路に沿って移動するメラノブラストと同様、増殖及びメラノソーム形成は正常であることが知られていた (Faraco et al., 2001; Kayashima et al., 2003)。このメラノブラスト／色素細胞（メラノサイト）の体内への移動様式は、間充織維芽細胞の挙動と酷似しており、組織培養実験では、繊維芽細胞様細胞と共に生育した (Akiyama et al., 2001)。更に、ウコッケイの神経冠細胞を白色レグホンに移植する実験 (Hallet and Ferrand, 1984) や、ウコッケイ胚の抽出液は、白色レグホンのそれよりもウズラ神経冠における細胞分裂を促進させる (Lecoin et al., 1994) といった実験から、ウコッケイと白色レグホンでは、胚の環境が両者間で異なる可能性が示唆されていた。これらの実験や観察結果より、ウコッケイ体内の各臓器において顕著なメラニン産生をもたらす原因としては、メラニンを産生するメラノサイトとその近傍を取り巻く環境にウコッケイと他系統間で違いがあり、この違いがメラノブラスト／メラノサイトの挙動に影響を与え、顕著なメラニン産生を引き起こす可能性が示唆されている。

ヒトのメラノブラスト／メラノサイトを生体組織より単離して培養するにあたり、いくつかの成長因子の供給が培養条件下における正常な生育にとって必要であることが知られている (Halaban, 2000)。生理活性物質の1つであるエンドセリンファミリーは、当初、ブタ大動脈の血管内皮細胞培養上清から強力な血管収縮作用をもつ物質として発見された生理活性物質であり (Yanagisawa et al., 1998)、その後の解析でエンドセリンには1, 2, 3の3つが存在し (Inoue, et al., 1989)、それぞれのエンドセリンに対する受容体（レセプター）も存在することが明らかとなった (Huggins, et al., 1993)。そのエンドセリンファミリーの1つであるエンドセリン3 (ET3) は、ニワトリ神経冠細胞の培養条件下において、メラノブラスト／メラノサイトの成長・分化・増殖を劇的に亢進させる作用があることが判明していた (Lahav et al., 1996, 1998)。この事実より、生体内においてもET3はメラノブラスト／メラノサイトの生育に関与することが考えられ、特にウコッケイにみられる盛んな色素細胞の成長・分化・増殖にとっては、ET3の多大な関与が予想される。

本研究では、ウコッケイの顕著なメラニン産生の原因を解明するため、培養条件におけるメラノサイトの成長・分化・増殖に関与する因子の1つであるET3と、鳥類においてET3の主要なレセプターと考えられているエンドセリンレセプターB2 (EDNRB2) (Lecoin et al., 1998) に着目し、これら転写産物について細胞種での発現パターンやウコッケイと他の系統間で発現量に違いが見られるか比較解析を行った。

## 材料と方法

### ニワトリ系統

本研究には、黒ウコッケイ、白ウコッケイ、名古屋コーチン、白色レグホン、横斑プリマス

ロック, 及び  $c^d/c^d$  常染色体アルビノ (Brumbaugh et al., 1983) のニワトリ系統を用いた。神奈川県海老名市にある神奈川県畜産研究所において黒ウコッケイは7世代以上, 白ウコッケイ, 名古屋コーチン, 白色レグホンは, それ以上の期間閉鎖系で飼育され, 系統として隔離されている個体由来の胚を使用した。横斑プリマスロック,  $c^d/c^d$  常染色体アルビノは, それぞれ兵庫県龍野市の独立行政法人家畜改良センター兵庫牧場, 神奈川県平塚市にある横浜国立大学教育人間科学部付属平塚教場にて原種が飼育されており, これらの系統に由来する胚を使用した。

### 細胞培養

メラノサイトの単離については, 最初に各系統の孵卵後3日及び4日胚の神経冠を含む領域を顕微鏡下にて培養液 (F-12 Nutrient Mixture (Gibco 21700-026, Grand Island, NY, USA) + 10% calf serum + 10ng/ml ET3) 中に摘出した。組織片は更に細切し, CMF-PBS (137mM NaCl, 2.68mM KCl, 1.47mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.06mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) で洗浄した後に, 0.02% Ethylenediamine-N, N, N', N' -tetraacetic acid (EDTA) を含む CMF-PBS で15分, 37°C でカルシウム除去処理の後, 0.25% トリプシン, 0.02% EDTA を含む CMF-PBS で10分間, 37°C で酵素処理を行った。続いて酵素消化後の細胞塊をガラスシリンジで10~15回吸排出処理して単一細胞に分離し, 直径60mm シャーレに  $3.0 \times 10^5$  の密度で播種して細胞培養を開始した。その後, 1~2日毎に培養液を交換して培養を続けることでメラノサイトが選択的に増殖し, 約2週間でほぼ純粋なメラノサイトとなる細胞集団を得た。繊維芽細胞様細胞については, 各系統の孵卵後10日胚胴体部の内蔵を除去した部分から摘出し, 繊維芽細胞用培養液 (LM medium: 0.88% LEIBOVITZ'S L-15 MEDIUM (Gibco 430-1300EA, Grand Island, NY, USA), 0.5% McCoy's 5A MEDIUM (Gibco 430-1500EA, Grand Island, NY, USA), 0.1%  $\text{NaHCO}_3$  + 100units/ml Penicillin/streptomycin, 10% calf serum, 2% Typtose Phosphate Broth, 0.04% Gentamycin sulfate, 0.88% Fungizone) で同様の方法を行って単一細胞に分離し, 直径60mm シャーレに  $4.0 \times 10^6$  の密度で播種して細胞培養を開始した。培養後2日~3日でほぼ均一な繊維芽細胞様細胞となる細胞集団を得た。

### 組織・培養細胞からの全RNA抽出

全RNAの抽出には, RNeasy Mini kit (QIAGEN 74104, Tokyo, Japan) を用いた。抽出法はメーカーが指定するキットの取扱法に従った。抽出は培養細胞, 孵卵後3日, 4日及び5日胚の全胚, 胚を摘出後に顕微鏡下で背側と腹側に分けた5日胚と9日胚の各領域, 背側表皮, 大腿部筋肉及び小腸に分けた10日胚の各組織から行った。

### RT-PCR

メラノサイトと繊維芽細胞様細胞より抽出した1 $\mu$ g全RNAを鋳型とし, SuperScript<sup>TM</sup> II Rnase H<sup>-</sup> reverse transcriptase (Invitrogen Corp. 18064-014, Carlsbad, CA, USA), と Oligo (dT) 12-18 primer (Invitrogen Corp. 18418-012, Carlsbad, CA, USA) を用いた逆転写反応で

cDNAを合成した。このcDNAを鋳型として、ET3もしくはEDNRB2転写産物中にある塩基配列を特異的に認識するプライマー(図1 AとB)を用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。対照として $\beta$ -actinを用いることとし、 $\beta$ -actin転写産物中にある塩基配列を特異的に認識するプライマー(図1 C)を使用した。PCR施行後、各標本由来のPCR産物を0.8%TBEアガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでゲルを染色し、UVを照射して、AE-6905H Image Saver HR (ATTO, Tokyo, Japan) で検出した。

### Northern blot法

各標本として3  $\mu$ gの全RNAを使用し、基本的にSambrook et al., (1989) の方法に従って行った。ET3, EDNRB2 転写産物の検出には、4日胚名古屋コーチン全胚由来のcDNAを鋳型とし、ET3 primersとEDNRB2 primers (図1 AとB) を用いて行ったPCRよりそれぞれ得られる755bp, 1360bpのPCR産物に対してRediprime II DNA Labelling System (Amersham Biosciences Corp. RPN1633, Piscataway, NJ, USA) を用いてアイソトープラベルし、これらをプローブとして用いた。同様の方法で $\beta$ -actin primers (図1 C) を用いて427bpから成る $\beta$ -actinに対するプローブも作製した。撮影にはBAS5000 Bio-Image Analyzer (FUJIFILM, Tokyo, Japan) を使用した。

### 定量的RT-PCR法

ET3もしくはEDNRB2 転写産物の定量には、LightCycler<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics Corp., Idaho Falls, ID, USA) を用いた。解析には、各細胞種、全胚及び組織から合成したcDNAを鋳型とし、ET3もしくはEDNRB2 転写産物中にある塩基配列を特異的に認識する定量解析用

- A** 5'-AGCAGCTTTAGAGGCAAAGATCTACGGG-3'  
5'-ACAGAGTTACAATATGATGATTCAGG-3'
- B** 5'-ATGGCAAGAATCCCAGTCTCCACCAC-3'  
5'-TTAGGAAGAGCTGTACTTGTTGCTCAAG-3'
- C** 5'-AGCAGCTTTAGAGGCAAAGATCTACGGG-3'  
5'-ACAGAGTTACAATATGATGATTCAGG-3'
- D** 5'-TCAGTCTGATGCCAGTGGAG-3'  
5'-TGCCGGGTTAGGTGATAAAG-3'
- E** 5'-GCTCAGTTTCCTCCTCGTC-3'  
5'-TCTGGCACCAGCAGCATAG-3'
- F** 5'-AATGTACCCTGGCATTGCTGA-3'  
5'-ATAGAGCCTCCAATCCAGAC-3'

図1 各種プライマーセットとその塩基配列

A : ET3 primers, B : EDNRB2 primers, C :  $\beta$ -actin primers, D : ET3LC primers, E : EDNRB2LC primers, F :  $\beta$ -actinLC primers.

プライマー (図 1 D と E) を使用した。各 cDNA については、 $\beta$ -actin 転写産物中にある塩基配列を特異的に認識する定量解析用プライマー (図 1F) を作製し、これを用いて各 cDNA における  $\beta$ -actin の転写産物量も求めた。

## 結果

メラノblast及びメラノサイトの分化・増殖に関与する ET3 は、生体内においてどの細胞が供給しているのか手がかりを得るために、黒ウコッケイと横斑プリマスロックに由来する培養繊維芽細胞様細胞及びメラノサイトの各細胞集団からそれぞれ全 RNA を抽出し、ET3 もしくは EDNRB2 転写産物中にある塩基配列を特異的に認識するプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、繊維芽細胞様細胞に ET3 が、メラノサイトに EDNRB2 がそれぞれ特異的に発現していることが判明した。また、これら細胞種特異的な発現は、黒ウコッケイ、横斑プリマスロック由来の間で違いがみられないことから、ニワトリで一般的にみられることであると考えられた (図 2)。この結果から、メラノblast/メラノサイトは、生体内において

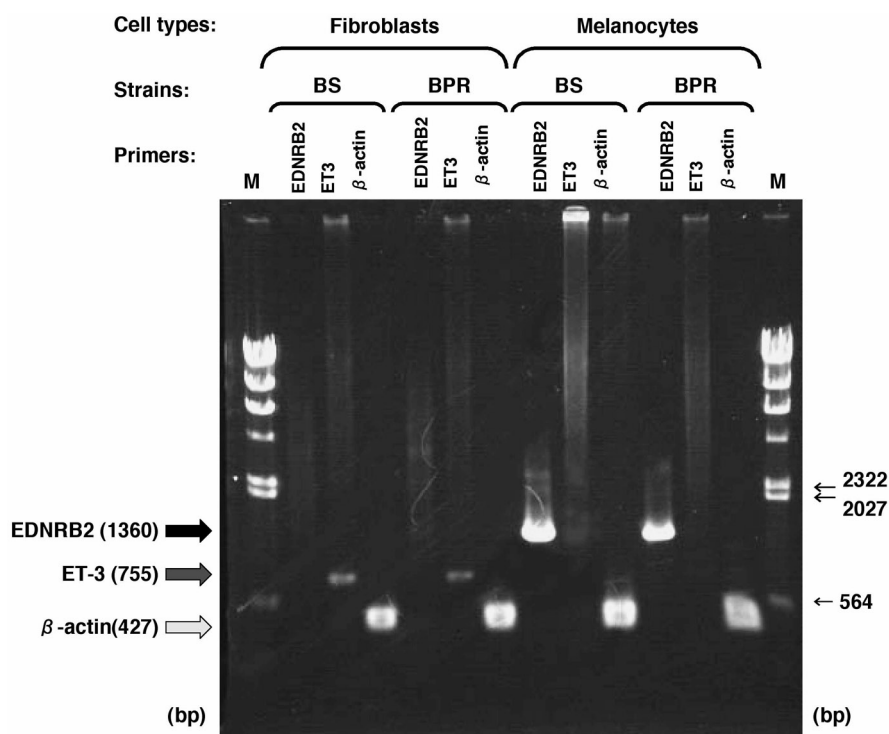


図 2 培養細胞における ET3 と EDNRB2 転写産物の発現

BS: 黒ウコッケイ, BPR: 横斑プリマスロック, M: DNA 分子量マーカー。右の数字は DNA 分子量マーカーの大きさ。左側の EDNRB2, ET3,  $\beta$ -actin にある括弧内の各数字は、各転写産物中にある塩基配列を特異的に認識するプライマーである EDNRB2 primers, ET3 primers,  $\beta$ -actin primers で PCR を行った場合に増幅が期待される PCR 産物の大きさ。

自らET3を発現する可能性は低く、近隣に存在する繊維芽細胞あるいは他の細胞種よりET3が産生され、自らはEDNRB2を発現してET3を受け取り、成長・分化・増殖する可能性が判明した。

生体内におけるET3、EDNRB2の発現量にウコッケイと他系統間で差異があるのか調べる目的で、黒ウコッケイ、白ウコッケイ及び名古屋コーチンの各系統における孵卵後3日、5日、および9日の胚及び領域のそれぞれから全RNAを抽出し、Northern blot法を行って調べた。その結果、ET3転写産物の発現量については、各系統間、各発生段階において明確な差はみられなかった(図3上段)。一方、EDNRB2については、3日胚ではEDNRB2転写産物に差は認められないものの、5日胚及び9日胚では、系統間、または同一系統における領域間においても僅かな差が認められた(図3下段)。特に腹側領域における5日胚名古屋コーチンと白ウコッケイ間において(図3 aとb)、9日胚名古屋コーチンと黒/白ウコッケイ間(図3 cとd・e)でウコッケイの発現量がやや多いことが判明した。この結果より、ウコッケイにおける腹側領域にメラノサイトが多く存在し、EDNRB2をより多く発現している可能性が考えられた。

このウコッケイにみられるET3やEDNRB2の高発現をより正確に明らかにし、その発現量の違いがメラノブラストの背腹路に沿った移動と成長・分化・増殖に関与するの否かを検索する目的で定量的RT-PCR法を行った。定量に際しては、発現量の詳細な把握を目的とするこ

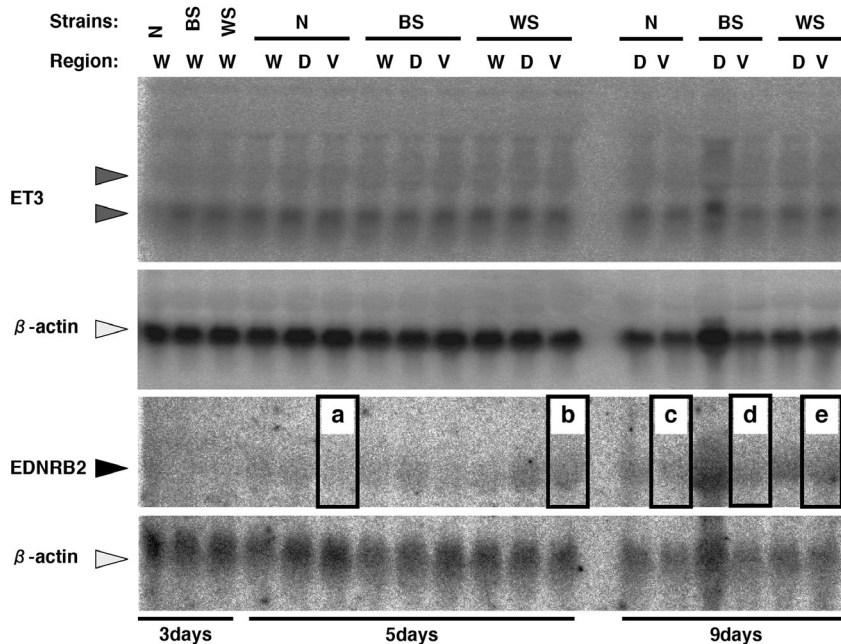


図3 発生時期や領域間でみたウコッケイと名古屋コーチンにおけるET3とEDNRB2転写産物発現量の比較

N：名古屋コーチン，BS：黒ウコッケイ，WS：白ウコッケイ，W：胚全体，D：背側領域，V：腹側領域。ET3、EDNRB2のそれぞれはβ-actinプローブともハイブリダイズさせた場合と比較し、各レーンの全RNA量を確認した。

とから、10日胚の背側表皮・大腿部筋肉・小腸と領域を細分し、対照標準として名古屋コーチン、白色レグホン、 $c^a/c^a$ 常染色体アルビノ系統、培養細胞については上記に加えて横斑プリマスロックについて解析を行った。その結果、第一にET3に関しては、解析を行った4日胚全胚、10日胚背側表皮組織、10日胚小腸組織のいずれにおいても、黒ウコッケイで他系統よりもET3転写産物の高い発現が見られた(図4)。特に10日胚小腸組織において黒ウコッケイで高い発現がみられた(図4C)ことから、体内に侵入したメラノサイトの増殖やメラニン産生にET3の高発現が関与している可能性が考えられた。第二にEDNRB2転写産物の発現量について調べたところ、4日胚全胚については、黒ウコッケイは $c^a/c^a$ と比較して大差は見られなかったが、名古屋コーチンや白色レグホンよりも高い発現が見られた(図5A)。同様の結果が10日胚背側表皮組織においてもみられ、黒ウコッケイは $c^a/c^a$ との間で発現量に大差は見られないものの、名古屋コーチンや白色レグホンより高い発現が見られた(図5B)。しかしながら10日胚小腸組織において、黒ウコッケイにおける発現量は、名古屋コーチンよりやや低下していた(図5C)。10日胚大腿部筋肉組織での結果は、10日胚背側表皮組織での結果と類似しており、黒ウコッケイは $c^a/c^a$ との間で発現量に大差は見られないものの、名古屋コーチンや白色レグホンより高い発現が見られた(図5D)。また、黒ウコッケイ大腿部筋肉組織に由来する独立し

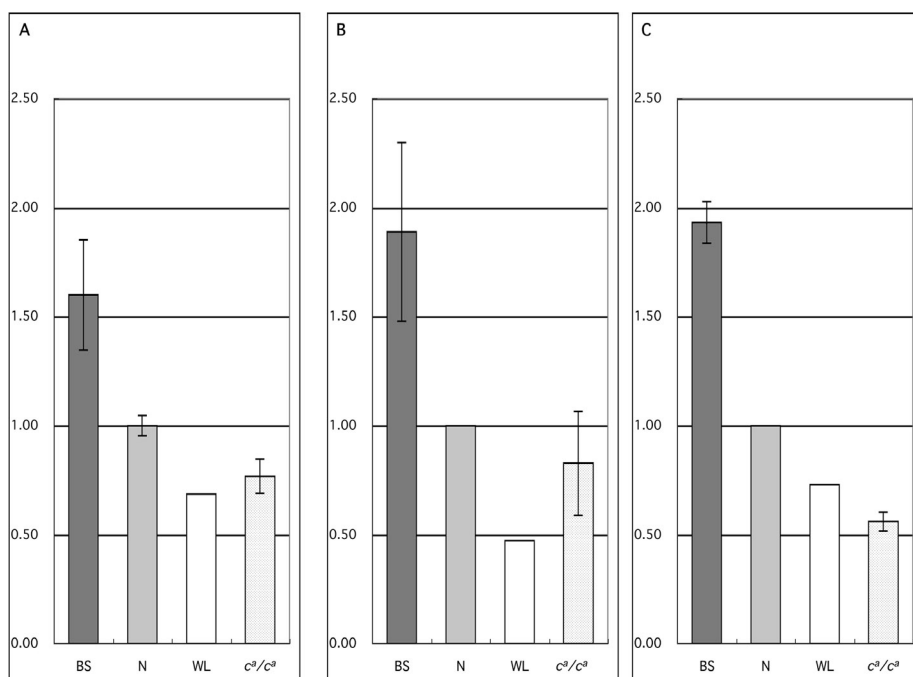


図4 発生時期や組織別にみた4種類のニワトリ系統間におけるET3転写産物の発現量

BS:黒ウコッケイ, N:名古屋コーチン, WL:白色レグホン,  $c^a/c^a$ : $c^a/c^a$ 常染色体アルビノ。各系統におけるET3転写産物量は $\beta$ -actin転写産物量との相対量として求め、縦軸は名古屋コーチンにおけるこの相対量を1としたときの相対値。(A)4日胚全胚。Mean  $\pm$  SE; n=3(BS), 2(N,  $c^a/c^a$ )。 (B)10日胚大腿部筋肉組織。Mean  $\pm$  SE; n=3(BS), 2( $c^a/c^a$ )。 (C)10日胚小腸。Mean  $\pm$  SE; n=2(BS,  $c^a/c^a$ )。



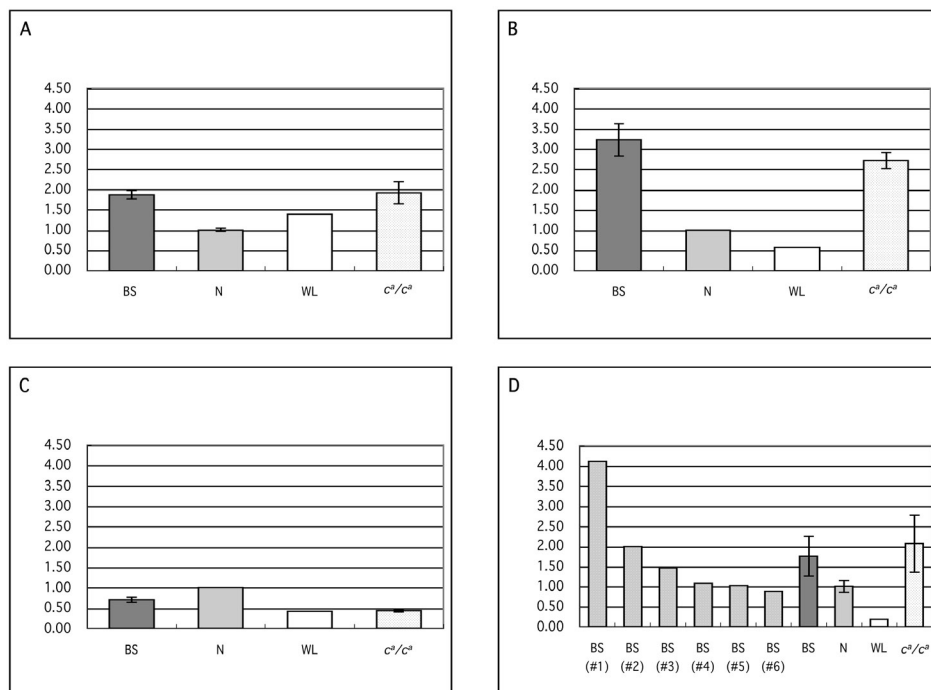


図5 発生時期や組織別にみた4種類のニワトリ系統間におけるEDNRB2転写産物の発現量

BS: 黒ウコッケイ, N: 名古屋コーチン, WL: 白色レグホン, c<sup>a</sup>/c<sup>a</sup>: c<sup>a</sup>/c<sup>a</sup>常染色体アルビノ。各系統におけるEDNRB2転写産物量はβ-actin転写産物量との相対量として求め、縦軸は名古屋コーチンにおけるこの相対量を1としたときの相対値。(A) 4日胚全胚。Mean ± SE; n=3(BS), 2(N, c<sup>a</sup>/c<sup>a</sup>)。 (B) 10日胚背側表皮組織。Mean ± SE; n=3(BS), 2(c<sup>a</sup>/c<sup>a</sup>)。 (C) 10日胚小腸。Mean ± SE; n=2(BS, c<sup>a</sup>/c<sup>a</sup>)。 (D) 10日胚大腿部筋肉組織。Mean ± SE; n=6(BS), 3(N), 2(c<sup>a</sup>/c<sup>a</sup>)。BS(#1)~(#6)は、黒ウコッケイに由来する各標本。

た標本間で相対値の広範囲にわたる分散がみられた(図5DのBS#1~#6)。これらの標本は、大腿部筋肉組織の様々な部位から局所的に得た全RNAをもとに作製したものであることから、EDNRB2の大腿部筋肉組織における発現部位は局在していることが考えられた。最後に、培養繊維芽細胞様細胞におけるET3転写産物の発現量と培養メラノサイトにおけるEDNRB2転写産物の発現量について解析を行った。その結果、黒ウコッケイ由来培養繊維芽細胞様細胞におけるET3転写産物の発現量は他系統と比較して有意に高く(図6A)、黒ウコッケイ由来培養メラノサイトにおけるEDNRB2転写産物も他系統と比較してやや高発現量であった。一方、名古屋コーチン由来の培養メラノサイトでは、EDNRB2転写産物の発現量に大幅な発現低下がみられた(図6B)。

## 考察

培養したメラノサイトにはEDNRB2転写産物が、培養繊維芽細胞様細胞にはET3転写産物

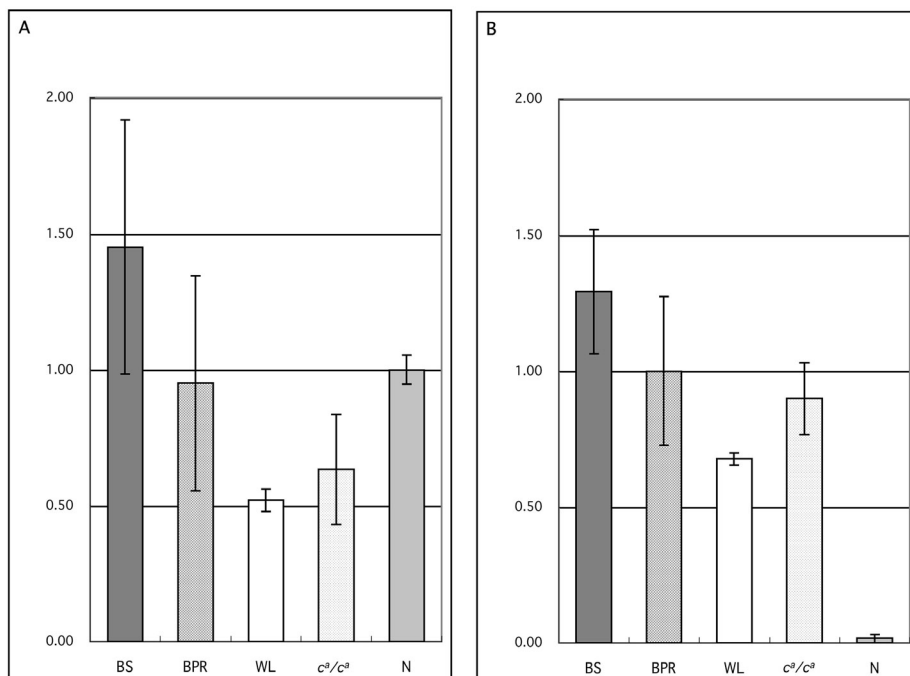


図6 5種類のニワトリ系統それぞれに由来する培養繊維芽細胞様細胞でのET3 転写産物及び培養メラノサイトでのEDNRB2 転写産物の発現量

BS:黒ウコッケイ, BPR:横斑プリマスロック, WL:白色レグホン,  $c^a/c^a$ : $c^a/c^a$ 常染色体アルビノ, N:名古屋コーチン。(A) 培養繊維芽細胞様細胞でのET3転写産物の発現量。Mean  $\pm$  SE; n=2。(B) 培養メラノサイトでのEDNRB2 転写産物の発現量。Mean  $\pm$  SE; n=4(BS), 2(BPR, WL,  $c^a/c^a$ , N)。各系統由来の細胞におけるET3(A), EDNRB2(B)転写産物量は、 $\beta$ -actin転写産物量との相対量として求め、縦軸は名古屋コーチン(A), 横斑プリマスロック(B)におけるこの相対量を1としたときの相対値。

がそれぞれ特異的に発現していることが本研究より明らかとなった。一般的に、細胞種と成長因子の関係については、免疫系細胞の一種であるヘルパーT細胞が産生するインターロイキン2とそのレセプターや、ヒトのケラチノサイトが産生するNGFとそのレセプターのように、自己の細胞の成長に関与する因子とそのレセプターの両方を細胞自ら発現し、受容する場合(オートクライン)がある(Smith, 1988; Pincelli and Marconi, 2000)。今回の解析結果から、メラノblast/メラノサイトにおけるET3に関しては、オートクラインの可能性は低く、培養条件下においてET3がメラノblast/メラノサイトの成長・分化・増殖を劇的に亢進させる作用を有することを考えると、生体内におけるメラノblast/メラノサイトの成長・分化・増殖は、細胞自律的に制御されるというよりもむしろ近隣の外部環境に強く影響されることが考えられた。

定量的RT-PCR法では、黒ウコッケイにおけるET3転写産物発現量の上昇が見られた。検出感度の違いからNorthern blot法による解析では、ウコッケイと名古屋コーチンの間におけるこの差を検出することが困難であったと考えられた。対照的にEDNRB2転写産物の発現量に

関する定量的RT-PCR法の結果では、Northern blot法でみられた程度の差はみられなかった。定量的RT-PCR法では、対象とする体内の領域を狭めた為に、Northern blot法でみられた全体としての差は捉えることが出来なかったのかもしれない。実際に、黒ウコッケイ10日胚大腿部筋肉組織における発現量の値に標本間で広範囲の分散がみられたことから、体内におけるEDNRB2の発現領域は、対象の組織や領域に強く局在している可能性が考えられた。

定量的RT-PCR法による解析では、ウコッケイとの対照標準として体内における顕著なメラニン産生を生じない名古屋コーチンや横斑プリマスロックの他に、白色レグホンと $c^d/c^d$ 常染色体アルビノ系統も用いた。白色レグホンは、胚発生の初期にメラノブラストが完全に分化する前に細胞死を起し、結果として個体は白色の表現型となることが知られている (Jimbow et al., 1974; Bowers et al., 1994)。 $c^d/c^d$ は、色素産生に働くチロシナーゼの遺伝子座に変異を持つアルビノ系統の1つであり、メラノサイトの生育はほぼ正常であるが、チロシナーゼ遺伝子の構造遺伝子内にあるcopper-binding siteに生じた変異が原因で正常なチロシナーゼが形成されず、白色の表現型を呈すると考えられている (Tobita-Teramoto et al., 2000)。これらの性質を持つ両系統において、ET3転写産物の発現量が黒ウコッケイや名古屋コーチンと比較して低かったことは、生体内においてET3がメラノブラスト/メラノサイトの成長・分化・増殖に関与している可能性を支持する結果であると考えられた。白色レグホンにおけるEDNRB2転写産物の発現量が、4日胚全胚では黒ウコッケイや名古屋コーチンの発現量と比べ大差はないものの、10日胚背側表皮組織と大腿部筋肉組織において低下した。この理由としては、培養細胞でみられたメラノサイト特異的なEDNRB2の発現が、生体内においてもメラノブラスト/メラノサイト特異的であり、4日胚までは残存しているメラノブラストのために他系統と大差はみられないが、その後メラノブラストが細胞死を起したために10日胚組織で発現量が減少したと推定された。 $c^d/c^d$ におけるEDNRB2転写産物の発現量が、4日胚全胚や10日胚背側表皮組織、大腿部筋肉組織で黒ウコッケイとほぼ同等であることに関しては、 $c^d/c^d$ ではメラノサイトの形成はほぼ正常であるためと考えられた。

ウコッケイにおけるET3とEDNRB2転写産物の発現量は、他系統と比較してやや高いことが判明した。このことからウコッケイのメラノサイトは、周辺の繊維芽細胞等からET3をEDNRB2で受け取るが、この情報伝達の効率が、他系統メラノサイトよりも亢進されているため、メラノサイトの生存・増殖と体内の顕著なメラニン産生をもたらすのではないかと考えられた。この両者の依存性については、メラノサイトと繊維芽細胞様細胞によるmembrane wellを介した共培養の実験からも示された (Akiyama and Kayashima, 2004)。

ET3やEDNRB2の発現量の増加が、ウコッケイにみられる体内臓器での顕著なメラニン産生を誘引し得るのか、今後、ET3やEDNRB2の発現阻害やウコッケイ以外の系統を用いた過剰発現などの解析によって検討する計画である。

## 謝辞

本研究に用いたニワトリ種卵は、神奈川県畜産研究所，独立行政法人家畜改良センター兵庫牧場，横浜国立大学教育人間科学部付属平塚教場より分与頂きました。神奈川県畜産研究所の引地宏二氏，明治乳業の橋本光一郎氏，横浜国立大学教育人間科学部付属平塚教場の玉置禎紀先生には，ニワトリ系統の維持，及び本研究に対する助言を賜りました。本研究を遂行するにあたり，主に慶應義塾学事振興資金（個人研究，平成15年度）による研究補助を受けました。また，一部は文部科学省学術フロンティア「超表象デジタル研究センター」色と紋様の総合科学——異分野からのアプローチ——，慶應義塾福澤諭吉研究補助基金，慶應義塾学事振興資金（共同研究，平成15年度）から研究補助を受けました。深く感謝致します。

## 引用文献

- Akiyama, T., Nakamura, M., Kitamura, K., and Hirose, E. (2001). Behavior and ultrafine structure of dermal melanocytes in BLACK SILKY CHICKEN. *Zool. Sci.* *18*, 72.
- Akiyama, T., and Kayashima, Y. (2004). Expression of endothelin and its receptor during developmental process in several color variants of Chickens. *Pigment Cell Res.* *17*, 587.
- Bowers, R. R., Lujan, J., Biboso, A., Kridel, S., and Varkey, C. (1994). Premature avian melanocyte death due to low antioxidant levels of protection: fowl model for vitiligo. *Pigment Cell Res.* *7*, 409–418.
- Brumbaugh, J. A., Bargar, T. W., and Oetting, W. S. (1983). A “new” allele at the C pigment locus in the fowl. *J. Hered.* *74*, 331–336.
- Faraco, C. D., Vaz, S. A., Pastor, M. V., and Erickson, C. A. (2001). Hyperpigmentation in the Silkie fowl correlates with abnormal migration of fate-restricted melanoblasts and loss of environmental barrier molecules. *Dev. Dyn.* *220*, 212–225.
- Halaban, R. (2000). The regulation of normal melanocyte proliferation. *Pigment Cell Res.* *13*, 4–14.
- Hallet, M. M., and Ferrand, R. (1984). Quail melanoblast migration in two breeds of fowl and in their hybrids: evidence for a dominant genic control of the mesodermal pigment cell pattern through the tissue environment. *J. EXP. Zool.* *230*, 229–238.
- Huggins, J. P., Pelton, J. T., and Miller, R. C. (1993). The structure and specificity of endothelin receptors; their importance in physiology and medicine. *Pharmacol. Ther.* *59*, 55–123.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., and Masaki, T. (1989). The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct

- isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2863–2867.
- Jimbow, K., Szabo, G., and Fitzpatrick, T. B. (1974). Ultrastructural investigation of autophagocytosis of melanosomes and programmed death of melanocytes in White Leghorn feathers: a study of morphogenetic events leading to hypomelanosis. *Dev. Biol.* **36**, 8–23.
- Kayashima, Y., Kurabayashi, A., Hase, S., Teramoto-Tobita, T., Hashimoto, K., and Akiyama, T. (2003). Involvement of endothelin and its receptor in hyper melanization of Black Silky Chicken. *Pigment Cell Res.* **16**, 711.
- Kuklenski, J. (1915). Über das Vorkommen und die Verteilung des Pigmentes in den Organen und Geweben bei japanischen seiden Huhnern. *Arch Micro Anat Entwickl* **87**, 1–37.
- Lahav, R., Ziller, C., Dupin, E., and Le Douarin, N. M. (1996). Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3892–3897.
- Lahav, R., Dupin, E., Lecoin, L., Glavieux, C., Champeval, D., Ziller, C., and Le Douarin, N. M. (1998). Endothelin 3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocytic precursors *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14214–14219.
- Lecoin, L., Mercier P., and Le Douarin, N. M. (1994). Growth of neural crest cells in vitro is enhanced by extracts from Silky Fowl embryonic tissues. *Pigment Cell Res.* **7**, 210–216.
- Lecoin, L., Sakurai, T., Ngo, M. T., Abe, Y., Yanagisawa, M., and Le Douarin, N. M. (1998). Cloning and characterization of a novel endothelin receptor subtype in the avian class. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3024–3029.
- Pincelli, C., and Marconi, A. (2000). Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* **22**, 71–79.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Smith, K. A. (1988) Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* **240**, 1169–1176.
- Tobita-Teramoto, T., Jang, G. Y., Kino, K., Salter, D. W., Brumbaugh, J., and Akiyama, T. (2000). Autosomal albino chicken mutation ( $c^a/c^a$ ) deletes hexanucleotide ( $-\Delta$  GACTGG817) at a copper-binding site of the tyrosinase gene. *Poultry Sci.* **79**, 46–50.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1998). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411–415.