

黒色鶏やカラスはなぜ黒い？ ～下垂体中葉を欠く鳥類に体色制御の α -MSH 調節系は存在するか～

竹内 栄

岡山大学大学院自然科学研究科 准教授

1. はじめに

α -メラノサイト刺激ホルモン (α -MSH) は、プロホルモンであるプロオピオメラノコルチン (POMC) の限定切断によってつくられる一群のペプチドホルモンに属する。脊椎動物におけるその主要な内分泌腺は下垂体中葉であるが、哺乳類では、視床下部や様々な末梢組織でも産生され、内分泌ホルモンとして、あるいは神経伝達物質、局所調節因子として、多彩な生体機能制御に関与する。 α -MSH の作用は、cAMP 経路を活性化する G タンパク共役型受容体のメラノコルチン受容体 (MCR) により仲介されている。MCR には、組織分布と薬理学的性質を異にする 5 種類のサブタイプ (MC1R~MC5R) が存在するが、 α -MSH は MC2R を除く 4 種の MCR に対して主要な生理的アゴニストとして作用し、個体や種の維持に不可欠な基本的生体機能 (摂食、生殖、免疫など) や、体色発現、外分泌などを制御している。近年、これらの制御系において、 α -MSH の作用を抑制する内在性制御因子として、2 種類の局所性 MCR アンタゴニスト (インバースアゴニスト) が同定された。アグチングナルタンパク (ASIP) とアグチ関連タンパク (AGRP) である。前者は主に皮膚に発現して体色制御にはたらき、後者は主に視床下部に発現して摂食行動、生殖機能の制御に関与している。

哺乳類の α -MSH 調節系に関する研究はめざましい発展を遂げ、その分子機構に関する知見が急速に蓄積されつつある。しかし、鳥類の α -MSH 調節系に関してはほとんど分かっていない。鳥類は α -MSH の主要な内分泌腺である下垂体中葉をもたない“特異な”生物種である。鳥類はその進化の過程で、下垂体中葉の消失とともに α -MSH 調節系を失ってしまったのであろうか。我々はこれまで、その存在が否定されてきた鳥類 α -MSH 調節系について、その全貌解明に向けてニワトリを対象とした分子生物学的解析を世界に先駆けて進めてきた [1-6]。その結果、鳥類の α -MSH は内分泌ホルモンとしての機能こそ失ったが、局所調節因子として多様な生体機能制御に関与している可能性が示唆された [7-12]。本稿では、 α -MSH 体色制御系が下垂体中葉を欠く鳥類にも存在するか否かについて、黒色鶏やカラスを用いた研究から得られた知見

を中心に紹介する。

2. 動物の体色と α -MSH 調節系

動物の体色は、捕食者や被食者に対するカムフラージュ、紫外線からの防御、個体識別、性的なディスプレイなど、多様な生物学的意義をもつ。両生類や爬虫類は、環境に応じて体色を変化させる。これを生理的体色変化という。生理的体色変化は、下垂体中葉から分泌される α -MSH が皮膚に存在するメラニン細胞に作用し、メラニン色素顆粒 (メラノソーム) を細胞質全体に拡散させることによって起こる現象である。生理的体色変化を示さない毛で覆われた哺乳類では、毛色で体色が表現されるが、その色は毛包のメラニン細胞が合成する黒~褐色を呈するユーメラニン (eumelanin) と赤~淡黄色を呈するフェオメラニン (pheomelanin) の 2 種類のメラニン色素によるものである。 α -MSH 調節系によるメラニン細胞の機能調節はこのような哺乳類でも保存されており、メラニン細胞が合成するメラニンの種類を調節している。その分子機構はマウスの毛色変異体の解析から解明された。

野生色マウスの体色は背側が茶色、腹側が淡黄色の逆影 (counter shading) と呼ばれる典型的保護色パターンを示す。これは腹側の毛がフェオメラニンの単一色 (薄黄色) であるのに対して、背側の毛 1 本 1 本が先端から基部にかけて黒・黄・黒の縞模様になっていることによる。この縞模様はアグチパターン (agouti pattern) と呼ばれ、毛包のメラニン細胞が毛の成長に伴いユーメラニンとフェオメラニンを交互に産生し、合成したメラニン色素を含むメラノソームを順次、毛幹細胞に移送することで形成される。このメラニン合成のスイッチングは、メラニン細胞の細胞膜上に存在する MC1R での、 α -MSH と ASIP との競合によって制御されている。すなわち、 α -MSH は MC1R を活性化させ、メラニン細胞内の cAMP レベルを上昇させることでユーメラニン合成を促進する。一方、ASIP は MC1R の活性を抑え、cAMP レベルを低下させることでフェオメラニン合成を誘導する。ASIP は毛包内部でつくられるが、その発現は毛の成長の一時期にすべての毛包ではたらくプロモーター (毛周期特異的プロモーター) と、腹の毛包のみで構成的にはたらくプロモーター (腹側特異的プロモーター) の 2 つのプ

ロモーターにより制御されている。この ASIP 遺伝子発現の時期及び部位特異的制御が、毛色の背腹差や毛の縞模様をつくる原因になっている [13]。

MC1R と ASIP は、古くから知られる 2 つの毛色遺伝子座 *extension* と *agouti* とにそれぞれコードされており、それらの対立遺伝子の組合せにより、多彩な体色が表現される。たとえばマウス *extension* の優性対立遺伝子 *somber-3J* は、N 末端から 92 番目のグルタミン酸がリジンに置換された変異 (Glu92Lys) によって構成的活性を獲得した MC1R をコードし、毛色を黒色化する。一方、毛色を黄色化する劣性対立遺伝子 *recessive yellow* は、不活性な切断型 (truncated) MC1R をコードしている [14]。構成的活性をもつ MC1R 変異遺伝子が優性で体色の黒色化にはたらき、機能欠損 MC1R 変異遺伝子が劣性で赤や黄の表現型を表すことは、哺乳類一般にみられる現象である [11]。

3. 鳥類の羽装とメラニンによる羽の着色

鳥類の体色は、個々に着色された羽の集合として表現される。これを羽装 (plumage) という。羽装には哺乳類と同様な逆影や、成鳥雄に特徴的な性的提示 (sexual display) などがあり、個体成長や性に応じて適材適所な羽が形成されることで適切な羽装が表現されている。羽色はしくみの異なる 2 種類の「色」に起因する。色素による「色」と、羽の微細構造による光の反射・散乱・干渉がつくりだす「構造色」である。羽色に関わる色素には、メラニン、カロチノイド、ポルフィリンがあり、メラニン色素には哺乳類と同様に、ユーメラニンとフェオメラニンとがある。カロチノイドは鮮やかな黄、ポルフィリンはピンク、茶、赤、緑などの色彩を表す。一方、構造色にはハチドリ等の喉の羽色に代表される玉虫色、オオルリやルリビタキなどにみられる青、公園のハトの首にみられる緑や紫などがあり、それらはそれぞれ異なるしくみでつくられている。これらの「色」が単独で、あるいは組合わされることで多様な羽色がつくり出される。これらの「色」の羽色への寄与の度合いは種や羽の種類などにより様々であるが、ニワトリの羽の色や模様は主として 2 種類のメラニン色素の分布により表現されている。

ニワトリの正羽は、羽鞘で包まれた羽包 (feather follicle) と呼ばれるチューブ状構造の中で形成されるが、その過程で羽包メラニン細胞が細胞突起を長く伸ばし、羽枝軸と小羽枝とになる羽枝隆起の一つひとつの細胞にメラノソームを移送することで羽が着色される。哺乳類の毛の着色では、一本の毛の全ての細胞が毛包内の同じメラノサイト群によって着色されるのに対し、羽の着色では、羽枝軸、小羽枝のそれぞれの細胞がその位置に応

じて異なるメラノサイト群によって着色される。羽におけるこの丹念な着色法が、哺乳類の毛にはみられない精巧で複雑な色模様形成を可能にしていると考えられる。メラニンによる羽の着色は、このように哺乳類の毛の着色と相違点こそあれ類似した仕組みによってなされているが、 α -MSH の主要内分泌腺である下垂体中葉が存在しないため、羽色制御への α -MSH 調節系の関与は疑問視され続けてきた。

4. ニワトリの羽色を制御する黒色拡張遺伝子座

哺乳類の *extension* に類似した遺伝子座がニワトリでは古くから知られていた。黒色拡張 (*extended black*) 遺伝子座である。 *extended black* には 8 つの対立遺伝子が存在し、その優性順位は *extended black* (E) > *birchen* (E^R) > *dominant wheaten* (e^W) > *wild-type* (e^+) > *partridge* (e^b) > *speckled* (e^s) > *buttercup* (e^{bc}) > *recessive wheaten* (e^r) である [15]。この遺伝子座の分子レベルの解析は、鳥類の MCR としてはじめてクローニングした MC1R の 92 番目のアミノ酸が、マウスの *somber-3J* と同じくリジンであるという予期せぬ発見から始まった [3]。MC1R は優性白 (*dominant white*) 遺伝子座の優性対立遺伝子をもつ白色鶏 (チャンキー) からクローニングされたが、この系統は全身を黒色化する *extended black* の優性対立遺伝子 E を背景としてもっていたのである。その後の RFLP 解析の結果、ニワトリの Glu92Lys が E と関連する可能性が示唆され [16]、さらに *extended black* 遺伝子座の他の対立遺伝子にも固有のアミノ酸置換 (MC1R 多型) が同定された [16,17]。交雑実験でも遺伝子型と MC1R 多型がみごとに一致したことから [17]、*extended black* 遺伝子座が MC1R をコードする可能性が強く示唆された。

体色の黒色化を引き起こす 2 つの優性対立遺伝子 E と E^R は Glu92Lys を共有し、全身を完全に黒色化する E は更に Met71Thr をもつ [16,17]。この変異は、ヒツジを黒色化する原因変異と同じアミノ酸 (メチオニン) の変異であることから [18]、ニワトリではこれら 2 つの変異が揃うことで完全な黒色化が起こるものと推察された。*birchen* には同じ表現型を表す E^R と $E^{R-fayoumi}$ が存在するが、後者は Glu92Lys の代わりに Leu133Gln をもつ。興味深いことに、Glu92Lys と Met71Thr は e^b にも存在するが、 e^b には第 3 の変異として His215Pro が観察された。この変異が Glu92Lys, Met71Thr の 2 つの変異をもつ MC1R の羽色黒色化活性を抑える可能性が示唆された [16,17]。各 MC1R 遺伝子を HEK293EBNA 細胞で発現させ、受容体活性を調べたところ、 e^+ は α -MSH の用量依存的に細胞内 cAMP レベルを上昇させたが、 E と E^R は予想通り α -MSH とは結合せず、 α -MSH に

非依存的な構成的活性を示した [19]。これらの結果もまた、*extended black* が MC1R をコードする可能性を強く示唆した。さらに、*extended black* 遺伝子座は、豆冠 (*Pea Comb*) 遺伝子座に対して組換え率 45.5% の第 1 染色体上に位置するとされてきたが、FISH では MC1R 遺伝子は第 1 染色体ではなく、微小染色体のテロメア付近にマップされた [20]。また、交雑実験では MC1R 多型、*extended black* の表現型は、ともに第 1 染色体上遺伝子 MSU34, ADL19, ADL234 ではなく、第 11 染色体上遺伝子 ADL33 と連鎖し [17]、FISH の二重染色により、MC1R 遺伝子が第 11 染色体上遺伝子 ADL02232, MCW0097 と同じ染色体上にマップされた [21]。これらの解析から、MC1R の変異がニワトリの羽色を支配する遺伝子座遺伝子であることが確立した [9]。MC1R 変異と羽色バリエーションとの相関に関する研究は、その後ウズラや野鳥にまで広がりを見せ、羽色の暗化もしくは黒化 (メラニズム) に MC1R 変異が関与していることが示された。キジ目に加え、スズメ目、カモ目、コウノトリ目という幅広い系譜で MC1R 変異とメラニズムの相関が解明されたことで、MC1R 変異が鳥類一般の羽色バリエーション形成に重要な役割をはたしていること、MC1R シグナル系が羽色制御に関与していることが確定した [10-12]。

5. 羽包における局所メラノコルチン調節系

ニワトリ MC1R の薬理的解析から、MC1R シグナル系の生理的アゴニストとして、POMC から産生される α -MSH と副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) が考えられた [22]。これらのペプチドホルモンはメラノコルチン (melanocortin) と総称される。げっ歯類では、POMC の下垂体発現を担う転写因子 TPIT のノックアウトマウスの研究から、下垂体由来のメラノコルチン (主として下垂体中葉由来の α -MSH) が毛色調節にはたしていることが示されていた。実際、胎児や新生児マウスの表皮や真皮の RT-PCR 解析を行って見たところ、完全長 POMC mRNA は検出されなかった [23]。ところが、ニワトリの羽包における POMC、POMC を切断してメラノコルチンをつくる酵素群 (PC1, PC2) の発現を RT-PCR 法により調べたところ、いずれの mRNA も検出された。このことは、局所性メラノコルチンによる羽色制御の可能性を示唆する。さらに、5'RACE 解析により羽包における POMC mRNA の発現には複数種の POMC プロモーターが関与することが明らかとなった。局所性メラノコルチンによるメラニン細胞の制御に関しては、鳥類と同様に発達した下垂体中葉をもたないヒトでもみられる。ヒトの体色は主に、皮膚でつくられる α -MSH と ACTH によって制御されている。ケラチノサイト

におけるこれらメラノコルチンの産生は紫外線照射により高められ、それらは傍分泌的にメラニン細胞にはたらきかけてユーメラニン合成を促進する。 α -MSH はメラニン細胞自身でも産生され、自己分泌的にユーメラニン合成や細胞形態を制御することが知られている。このことは局所性メラノコルチン調節系が下垂体中葉を欠く生物種で発達した体色制御系であることを示唆する。

我々はまた、鳥類の ASIP 遺伝子をクローニングし、その構造や発現パターンを明らかにした。ASIP も POMC と同様に羽包に発現する。逆影を示すニワトリの雛やウズラではその発現レベルに背腹差があり、暗色を示す背側より淡色を示す腹側で発現レベルが高い。この発現レベルの背腹差には、マウスの場合と同様に腹部特異的発現を担う ASIP プロモーターが関与する。さらに、全身が黒色の羽で覆われたハシブトカラスでは、ニワトリやウズラに比べ ASIP の発現レベルが極めて低いことが分かった [24]。これらの結果は、羽色制御に ASIP が関与している可能性を強く示唆する。ニワトリ羽包における ASIP 発現には、POMC の場合と同様に複数のプロモーターが関与する。ニワトリの羽は体の部位によって異なった色や模様を表すが、このような領域差を創出するのにメラノコルチンと ASIP の精巧な局所産生制御が必要なのかもしれない。

6. おわりに

夜行性の祖先から進化した哺乳類とは異なり、鳥類は色彩に富んだ環境で進化してきた。その結果として色覚やビジュアルコミュニケーションが発達し、子孫を残す上での体色の重要性が増大したと考えられている。鳥類が下垂体中葉を失った原因は不明である。しかし、下垂体中葉を欠く子孫が繁栄している現状を考えると、局所性メラノコルチン調節系による羽色制御が下垂体中葉由来からの α -MSH による調節系より優れていた、少なくとも捕食者や被食者からの隠遁に適した羽形成、雌鳥に好まれる羽形成に有利であったものと推察される。鳥類と同様に発達した下垂体中葉をもたないヒトでも、前述のような皮膚性メラノコルチン調節系が発達している。紫外線があたった部位だけメラニン合成を促進するという効率的な制御は、下垂体中葉由来の α -MSH による制御では成し得ない事であろう。 α -MSH による体色調節は、すべての脊椎動物に保存された重要な制御系である。しかし、進化に伴って、あるいは生態学的地位が上がるにしたがって、下等脊椎動物に見られるような体色変化の必要性がなくなり、体色制御系の多様性が増大していったのではないだろうか。羽の色模様形成に局所性メラノコルチン調節系がどのように関与するのか、その解明が待たれる。

6. 引用文献

- [1] Takeuchi S, Teshigawara K, Takahashi S. Molecular cloning and characterization of the chicken pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1450(3):452-459.
- [2] Takeuchi S, Teshigawara K, Takahashi S. Widespread expression of Agouti-related protein (AGRP) in the chicken: a possible involvement of AGRP in regulating peripheral melanocortin systems in the chicken. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1496(2-3):261-269.
- [3] Takeuchi S, Suzuki S, Hirose S, Yabuuchi M, Sato C, Yamamoto H, Takahashi S. Molecular cloning and sequence analysis of the chick melanocortin 1-receptor gene. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1306(2-3):122-126.
- [4] Takeuchi S, Kudo T, Takahashi S. Molecular cloning of the chicken melanocortin 2 (ACTH)-receptor gene. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1403(1):102-108.
- [5] Takeuchi S, Takahashi S. A possible involvement of melanocortin 3 receptor in the regulation of adrenal gland function in the chicken. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1448(3):512-518.
- [6] Takeuchi S, Takahashi S. Melanocortin receptor genes in the chicken – tissue distributions. *Gen Comp Endocrinol* 1998; 112(2):220-231.
- [7] Teshigawara K, Takahashi S, Boswell T, Li Q, Tanaka S, Takeuchi S. Identification of avian α -melanocyte-stimulating hormone in the eye: temporal and spatial regulation of expression in the developing chicken. *J Endocrinol*. 2001;168(3):527-537.
- [8] Phillips-Singh D, Li Q, Takeuchi S, Ohkubo T, Sharp PJ, Boswell T. Fasting differentially regulates expression of agouti-related peptide, pro-opiomelanocortin, prepro-orexin, and vasoactive intestinal polypeptide mRNAs in the hypothalamus of Japanese quail. *Cell Tissue Res* 2003;313(2):217-225.
- [9] Takeuchi S, Takahashi S, Okimoto R, Schiöth HB, Boswell T. Avian melanocortin system: α -MSH may act as an autocrine/paracrine hormone-A minireview. *Ann NY Acad Sci* 2003; 994:366-372.
- [10] Boswell T, Takeuchi S. Recent developments in our understanding of the avian melanocortin system: its involvement in the regulation of pigmentation and energy homeostasis. *Peptides*. 2005; 26(10):1733-1743.
- [11] 竹内 栄, 鳥類メラノコルチン調節系研究の進展; *JSCE Newsletter*, 2007; 124:19-34
- [12] 吉原千尋, 竹内 栄, 鳥類の羽色発現機構:メラニンによる羽の着色とメラニン形成の制御機構, *生物の科学 遺伝*, 2008; 62(6):45-51
- [13] Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA. The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res* 1996; 51:287-317.
- [14] Robbins LS., Nadeau JH., Johnson KR. Kelly MA, Roselli-Rehffuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD. Pigmentation phenotypes of variant Extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 1993; 72: 827-834.
- [15] Smyth JR. Genetics of plumage, skin and pigmentation in chickens. In: *Poultry Breeding and Genetics* (Ed. by R.D. Crawford), pp. 109-67. Elsevier Science, New York. 1996.
- [16] Takeuchi S, Suzuki H, Yabuuchi M, Takahashi S. A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1308:164-168.
- [17] Okimoto R, Ellet AE, Takeuchi S. Melanocortin 1-receptor (MC1-R) gene polymorphisms associated with the chicken E locus alleles [abstract]. *Poult Sci* 2000; 79: 9.
- [18] Våge DI, Klungland H, Lu D, Cone RD. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mammalian Genome* 1999; 10: 39-41.
- [19] Ling MK, Lagerstrom MC, Fredriksson R, Okimoto R, Mundy NI, Takeuchi S, Schiöth HB. Association of feather colour with constitutively active melanocortin 1 receptors in chicken. *Eur J Biochem*. 2003; 270(7):1441-1449.
- [20] Sazanov A, Masabanda J, Ewald D, Takeuchi S, Tixier-Boichard M, Buitkamp J, Fries R. Evolutionarily conserved telomeric location of BBC1 and MC1R on a microchromosome questions the identity of MC1R and a pigmentation locus on chromosome 1 in chicken. *Chromosome Res*. 1998; 6(8):651-654.
- [21] Schiöth HB, Raudsepp T, Ringholm A, Fredriksson R, Takeuchi S, Larhammar D, Chowdhary BP. Remarkable synteny conservation of melanocortin receptors in chicken, human, and other vertebrates. *Genomics*. 2003; 81(5):504-509.
- [22] Ling, M. K., Hotta, E., Kikianova, Z., Ringholm, A., Johansson, L., Gallo-Payet, N., Takeuchi, S., Schiöth, H. B.: The melanocortin receptor subtypes in chicken have high preference to ACTH derived peptide. *Brit J Pharm*, 2004;143:626-637.
- [23] Hirobe, T., Takeuchi, S., Hotta, E.: The melanocortin receptor-1 gene but not the proopiomelanocortin gene is expressed in melanoblasts and contributes their differentiation in the mouse skin. *Pigment Cell Res*, 2004; 17: 627-635
- [24] Tashiro Y, Yoshihara C, Takeuchi S. A possible involvement of ASIP in the regulation of feather pigmentation in birds. *J Yamashina Inst. Ornithol*. 2006;38:40-46.