Report (報告)

カラスを用いた羽色制御局所ホルモン調節系の解析

田代雄一¹⁾・吉原千尋¹⁾・竹内 栄^{1), 2)}

A Possible Involvement of ASIP in the Regulation of Feather Pigmentation in Birds

Yuichi Tashiro¹⁾, Chihiro Yoshihara¹⁾ and Sakae Takeuchi^{1), 2)}

はじめに

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 -メラニン細胞刺激ホルモン (α -MSH) が皮膚のメラニン細胞に作用し、メラニン色素顆粒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。 α -MSHによるメラニン細胞の機能調節は、生理的体色変化を示さない毛で覆われた哺乳類にも保存されており、メラニン細胞が合成するメラニンの種類や合成量を調節している。ところが、華やかな色や模様を持つ鳥類では下垂体中葉が分化しない。多様性こそあれ進化的に保存された α -MSHによる体色調節系は、鳥類の羽色制御には関与していないのであろうか。我々はこれまで、生理的意義が否定されてきた鳥類の α -MSH調節系について、おもにニワトリ *Gallus gallus domesticus* を対象とした網羅的解析を進めてきた。その結果、鳥類では α -MSHが局所ホルモンとして、中枢や皮膚を含む様々な末梢組織でつくられ、多様な生理機能制御に働いている可能性が示唆された (Takeuchi *et al.* 2003, Boswell & Takeuchi 2005)。本研究は、現在進行中の研究プロジェクト「羽色を制御する局所性 α -MSH調節系の分子機構の解明」の一端を担うものであり、カラスの羽色黒化の原因究明を通して、哺乳類において α -MSHの体色黒化作用を阻害することが知られるアグチングナルタンパク (ASIP) の羽色制御への関与を明らかにすることを目的とした。本稿では、研究の背景と、これまでに得られている成果の概要を述べる。

研究の背景

鳥類の羽色は、食餌に由来するカロチノイド系色素、メラニン細胞により合成されるメラニ

Received 9 March 2006.

¹⁾ 岡山大学理学部生物学科, 〒700-8530 岡山市津島中 3-1-1.

²⁾ 岡山大学大学院自然科学研究科, 〒700-8530 岡山市津島中 3-1-1.

¹⁾ Faculty of Science, Okayama University, 3-1-1 Tsushimanaka, Okayama 700-8530, Japan.

²⁾ Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, 3-1-1 Tsushimanaka, Okayama 700-8530, Japan.

図1. ニワトリの正羽（同一個体）.

図2. 哺乳類の毛色発現調節機構.

ン色素，およびケラチンの規則正しい配向に起因する構造色により表現される。これら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，一般に観察される黒や茶はメラニン色素によるものである。羽のメラニン色素には異なる色彩を呈する2種類の色素が存在する。黒～茶色を呈するユーメラニンと黄～赤色を呈するフェオメラニンである（図1参照）。

哺乳類の場合，腹側の毛はフェオメラニンの単一色（薄黄色）であるが，背側の毛は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。この縞模様は，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メラノコルチン1受容体（MC1R）での， α -MSH（アゴニスト）とASIP（アンタゴニスト）との競合によって調節されている（図2参照）。すなわち，アゴニストである α -MSHはMC1Rを活性化させ，メラニン細胞内のcAMP濃度を上昇させることでユーメラニン合成を促進する。一方，アンタゴニストであるASIPはMC1Rの活性を抑え，cAMP濃度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局所性のペプチドホルモンであり，その産生（遺伝子発現）は，毛の成長の一時期に毛包で働くプロモーターと，腹側の毛包で常に働くプロモーターの2つのプロモーターにより制御されている。このASIPの時期，および部位特異的な発現が，背腹の毛色の違いや背側の毛の縞

模様をつくる原因になっている (Cone *et al.* 1996)。MC1R と ASIP は、それぞれ体色遺伝子座 *Extension (E)* と *Agouti (A)* とにコードされており、それらの複対立遺伝子の組合せにより、多彩な体色が表現される。黒猫や黒豚、黒毛牛、黒ヒョウなど様々な生物種の黒色系統は、この *E* 遺伝子座の優性対立遺伝子と *A* 遺伝子座の劣性対立遺伝子の、いずれかをもつことが最近の研究で明らかになった。前者は主に α -MSH に依存しない活性（構成的活性）をもつ MC1R をコードし、後者は発現欠損または機能欠損の ASIP 遺伝子をコードしている。ところが鳥類では、遺伝解析が進んでいるニワトリでも、羽色黒化を引き起こす遺伝子座は黒色拡張遺伝子座のひとつだけしか記載されていない (Ling *et al.* 2004)。

近年、我々はこの黒色拡張遺伝子座が哺乳類の *E* 遺伝子座と同様に MC1R をコードすること、その優性対立遺伝子が構成的活性をもつ MC1R をコードし羽毛を黒化させることなどを報告した (Takeuchi *et al.* 1996, Ling *et al.* 2003)。その後、家禽や様々な野鳥において黒色種の原因解析がなされてきたが、いずれも MC1R の変異に起因するものばかりであり、哺乳類のような ASIP の変異に起因するものは見出されていない。これは、羽色調節に ASIP が関与しない可能性を示唆する。一方、我々はニワトリを用いた研究において、 α -MSH の前駆体タンパクであるプロオピオメラノコルチン (POMC)、POMC を限定切断して α -MSH をつくるプロセッシング酵素であるプロホルモン変換酵素 1 (PC1) と PC2, ASIP, および MC1R が羽軸基部（カラムス）で共発現していること、背が濃く腹が薄いという体色の背腹差が顕著な雛の皮膚において、背側で POMC の発現レベルが高く、腹側で ASIP の発現レベルが高いこと、皮膚やカラムスでの POMC と ASIP の発現がそれぞれ複数種のプロモーターにより制御されていること、などを見出した (Takeuchi *et al.* 未発表)。これらの結果は、 α -MSH と ASIP が、ともに皮膚や羽で産生され、局所ホルモンとして羽色制御に深く関与していることを示唆する。このように、ASIP の羽色制御への関与の有無は今までのところ決着がついていない。

ASIP の羽色制御への関与を調べる手段として、トランスジェニック動物やノックアウト動物の作出が困難な鳥類では、ASIP の変異に起因する黒色種を探索するのが妥当であると考えられる。鳥類におけるこれまでの黒色種の解析では MC1R の変異体のみが見出されてきたが、これは、研究対象が羽色において多型を生じる種の黒色系統に限られてきたことに原因すると考えられる。ASIP 遺伝子の体色黒化遺伝子が劣性遺伝子であることを考慮すると、ASIP 変異黒色種をみつけるには黒色以外の羽色をもたない種について解析する必要があると考えられる。そこで、本研究ではカラスを研究対象に選択し、その羽色黒化原因が、MC1R の構成的活性化変異によるのか、ASIP の機能欠損変異や発現欠損変異によるのかを検討した。

方法および結果

1) カラムス全 RNA およびゲノム DNA の調製

山階鳥類研究所より提供されたカラス 10 個体分の凍結サンプル（ハシブトガラス *Corvus macrorhynchos* とハシボソガラス *C. corone*、それぞれ 5 個体の羽）からゲノム DNA の調製を行った。その結果、解析するに十分な DNA が得られたのはハシブトガラスの 2 個体 (1997-0249, 1998-0171) のみであった。ただし、1998-0171 は口之永良部島で捕獲されたもので、亜種の可能性がある（山階鳥類研究所・浦野栄一郎 私信）個体である。岡山市（岡山県猟友会）に依頼して捕獲した 3 個体のカラスもハシブトガラスであったため、本研究ではハシブトガラス

表 1. 本研究に用いたハシブトガラスサンプル.

個体	使用用途		抽出部位
	RNA 抽出	DNA 抽出	
岡山①	○		カラマス
1997-0249		○	カラマス
1998-0171		○	カラマス
岡山②		○	舌
	○		カラマス
岡山③		○	舌
	○		カラマス

を研究対象とすることにした。本実験で用いたサンプルと使用用途を表 1 にまとめた。2005 年 7 月 9 日に捕獲した 1 個体(岡山①)からは RNA を, 2005 年 12 月 20 日に捕獲した 2 個体(岡山②, 岡山③)からは DNA と RNA を抽出した。なお, RNA の抽出に関しては, 死亡直後のサンプルを用いた。

2) ハシブトガラス MC1R cDNA の構造解析

岡山①から抽出した全 RNA を用いて RT-PCR, 5'RACE, 3'RACE 解析を行い, ハシブトガラスの MC1R cDNA の全長配列を決定した(図 3)。また, 残りの 4 個体のゲノム DNA を用い, PCR 法による MC1R 遺伝子の増幅を行い, その塩基配列を決定した。

以上により得られた全 5 個体の MC1R 遺伝子の塩基配列を比較し(表 2), ハシブトガラスの MC1R 構造を確定した。表 2 に示すように, SNP (single nucleotide polymorphism) が 3 箇所観察されたが, それらはいずれもコドンの 3 番目の塩基に相当し, アミノ酸置換を起こすものではなかった。また, 亜種の可能性があると考えられた 1998-0171 であるが, MC1R 遺伝子に関しては特異的な変異(多型)が見出されなかった。

今回調べた 5 個体のハシブトガラスでは MC1R のアミノ酸レベルでの多型は観察されなかったことから, 図 3 に示した MC1R のアミノ酸配列をハシブトガラスの野生型配列と結論付けて問題ないと考えられる。このアミノ酸配列を哺乳類や鳥類の黒色系統の MC1R 配列と比較したところ, 受容体の構成的活性化に関与する領域については, ハシブトガラスの MC1R に変異がみつからなかった。この受容体の活性を薬理的に解析する必要はあるが, この結果により, カラスの羽色黒化に MC1R の変異は関与していない可能性が示唆された。

3) ハシブトガラス ASIP cDNA の構造解析

岡山①, ③から抽出した全 RNA を用いて RT-PCR, 5'RACE, 3'RACE 解析を行い, ハシブトガラスの ASIP cDNA の全配列を決定した(図 4A)。ASIP cDNA から推定される ASIP タンパクは 128 アミノ酸残基からなり, 分泌タンパクに特徴的な N 末端シグナルペプチドを含み, MC1R に対するアンタゴニスト活性に必須な 10 個のシステイン残基 (McNulty *et al.* 2005) が保存されていた(図 4B)。

この ASIP のアンタゴニスト活性を調べる必要はあるが, ニワトリの ASIP と高い相同性を示す(図 4B)ことから, カラスの羽色黒化に ASIP の変異は関与していない可能性が示唆された。

```

1 CGACTGGAGCACGAGGACACTGACATGGGCTGAGGAGGGGGCCATGTCGACGCTGGCCTC 60
   M S T L A S
61 CCTGCGTCTGTCGCGAAGCCCTGGAATGCCAGAGGGCAACAGAGTAATGCCACGGT 120
   L R L L L R K P W N A S K G N Q S N A T V
121 CGGGCCAGCAGCGGCTGGTGCAGGGGCTGGACATCCCAATGAGCTGTTCTCTGTGCT 180
   G A S S G W C Q G L D I P N E L F L V L
181 GGGGCTGGTGAAGCTGGTGGAGAACCTGCTGGTGGTGGCCGCTCCTGAAGAACAGGAA 240
   G L V S L V E N L L V V A A I L K N R N
241 CCTGCACTCGCTCACTACTTTATCTGCTGCTGGCTGTGCTGACATGCTGGTGA 300
   L H S P T Y Y F I C C L A V S D M L V S
301 CATCAGCAACCTGGCAGAGATGCTCCTCATGCTGCTGGAGCAGGGGTGCTGGTAT 360
   I S N L A E M L L M L L L E H G V L V M
361 GCGCCCGACATCATCCGCACATGGAGCGTCACTGACATGCTCATCTGACGCTGGT 420
   R P S I I R H M D S V I D M L I C S S V
421 CATGCTTCTCCTCTCTCCCGGGGTCATCGCGTTGACGCTACATCACCATCTTCTA 480
   M S S L S F P G V I A V D R Y I T I F Y
481 TGCCCTGCGTACACAGCATGACACTCCAGCGGGCGTGGTCACTGGTCA 540
   A L R Y H S I M T L Q R A V V T M V S I
541 CTGGCTGGCAGCACTGTCTCAGCACCGTCTTGATCACCTACTACAGCAACACCAT 600
   W L A S T V S S T V L I T Y Y S N T I
601 CCTCTCTGCTCATCGGCTTTTCTCTCATGCTGGTCTCATGCTGGTCTCAT 660
   L L C L I G F F L F M L V L M L V L Y I
661 CCACATGTTACCTGCGCGCCGACACCTCCACAGCATCTCCAGCAGCAGAGCCACC 720
   H M F T L A R H H L H S I S S Q Q K P P
721 CACCACCCACCGTGGTGGAGCCTGAAGGGTGCATCACTCATCTCTCTGGGTGT 780
   T T H R G G S L K G A I T L T I L L G V
781 CTCTTTATCTGCTGGGGCCCTTCTTCTCCACCTCATCTCATGCTACCTGCTCCAC 840
   F F I C W G P F F F H L I L I V T C P T
841 CAACCCCTTCTGCTGCTTCTTCACTTCACTCTCTCTCATCTCATCTG 900
   N P F C I C F F S Y F N L F L I L I I C
901 TAACCTCGTGATTGACCCCTCATCTACGCTTCCGGAGCAGGAGCTCCGGCGACGCT 960
   N S V I D P L I Y A F R S Q E L R R T L
961 GCGGAGGTGGTGAAGTCTCTGGTAGGCAGCAGGACGCTACGAGTACGGCCACCCC 1020
   R E V V T C S W *
1021 TGCCCCAAATGGACAGATGGATGGACTGATGGATGGATGGGAGCGCCGGGGTGCCC 1080
1081 AGTGGGGGAGGGGCTCACGGTCCCAATAAGGCTCTTTCAGTGA(n) 1128

```

図 3. ハシブトガラスの MC1R cDNA の塩基配列と、推測されるアミノ酸配列。矢印は、SNP が観察される塩基を示している。アンダーラインは poly(A) 鎖付加シグナルを、*は終止コドンを、A(n) は poly(A) 鎖をそれぞれ示す。

表 2. ハシブトガラス 5 個体間にみられる MC1R 遺伝子の塩基配列の比較。

個体	250 番塩基	907 番塩基	982 番塩基
岡山①	G	G	G
1997-0249	G	G/A	G
1998-0171	G/A	G	A
岡山②	A	G	G
岡山③	G/A	G/A	G/A

5) ハシブトガラス ASIP mRNA の発現解析

岡山①～③のカラスから抽出した全 RNA を用いて RT-PCR 解析を行った。代表的な結果を図 5 に示す。カラスのカラスにおける ASIP mRNA の発現は、ニワトリのそれよりはるかに低いレベルであることが分かった。A 遺伝子座の劣性対立遺伝子 *a* (*non-agouti*) をホモにもつマウスは黒鼠であるが、これは、 α -MSH のユーメラニン合成促進作用を阻害し、メラニン細胞にフェオメラニン合成を誘導する ASIP の発現欠損によることが知られている。カラスの場合もそれに類似し、ASIP の発現が低下したことにより、メラニン細胞がもっぱらユーメラニンを合成するようになり、結果として羽色が黒色化したものと考えられる。本研究結果は、ハシブトガラスの羽が黒色である原因が ASIP 遺伝子の発現変異（発現低下）に起因する可能性、

図4. ハシブトガラスの ASIP. (A) カラス ASIP cDNA の塩基配列と推測されるアミノ酸配列. 下線部は poly(A) 鎖付加シグナルを, A(n) は poly(A) 鎖を, *は終止コドンを示す. (B) ニワトリとカラスの ASIP のアミノ酸配列の比較. 上段がカラス, 下段がニワトリの配列. ニワトリと同一のアミノ酸は*で示した. 矢印は推定されるシグナルペプチド切断部位を, 黒丸は, ASIP の機能に必須なシステイン残基を示す.

図5. ニワトリとハシブトガラスのカラマスにおける ASIP mRNA 発現. D と V は, それぞれ背側と腹側の羽のカラマスを示す. 29, 32, 35, および 18, 21, 24 は, PCR 反応のサイクル数を表す. GAPDH は, 内部標準のために用いた.

鳥類の羽色制御に ASIP が関与する可能性を示唆する。

結果の概要

ハシブトガラスの羽軸基部(カラマス)における ASIP mRNA の発現を RT-PCR 法により調べたところ, ニワトリのそれと比べて明らかに発現量が少ないことが分かった。5'RACE, 3'RACE 法により MC1R mRNA と ASIP mRNA の全配列を決定したが, 羽色黒化に結びつく可

能性のある構造的変異（機能的ドメインの変異やフレームシフト変異など）は見つからなかった。これらの結果は、ハシブトガラスの羽の黒化原因が **ASIP** の発現変異（発現低下）にある可能性を示唆する。**ASIP** が α -**MSH** と拮抗的にはたらいで羽色を調節している可能性が示唆された。

今後の課題

カラスの羽の黒化原因が **ASIP** の発現変異（発現低下）にある可能性を検証するため、今後以下の実験を計画している。①クローン化したハシブトガラス **MC1R** cDNA を株化培養細胞で発現させ、その受容体が構成的活性をもつか否かを調べる。②ハシブトガラスの組換え体 **ASIP** を作製し、**MC1R** に対するアンタゴニスト活性を調べる。③ハシブトガラスにおける **ASIP** 発現の解析を行い、**ASIP** の発現低下がカラスに共通であるのか否かを調べる。

謝 辞

実験材料のハシブトカラスを提供くださいました山階鳥類研究所と岡山市（岡山県猟友会）、およびカラスの入手に関する情報などをご提供くださいました山階鳥類研究所・浦野栄一郎博士に心より御礼申し上げます。

引用文献

- Boswell, T. & Takeuchi, S. 2005. Recent developments in our understanding of the avian melanocortin system: its involvement in the regulation of pigmentation and energy homeostasis. *Peptides* **26**: 1733–1743.
- Cone, R. D., Lu, D., Koppula, S., Vage, D. I., Klungland, H., Boston, B., Chen, W., Orth, D. N., Pouton, C. & Kesterson, R. A. 1996. The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Progress in Hormone Research* **51**: 287–317.
- Ling, M. K., Hotta, E., Kikianova, Z., Ringholm, A., Johansson, L., Gallo-Payet, N., Takeuchi, S. & Schioth, H. B. 2004. The melanocortin receptor subtypes in chicken have high preference to ACTH derived peptide. *British Journal of Pharmacology* **143**: 626–637.
- Ling, M. K., Lagerstrom, M. C., Fredriksson, R., Okimoto, R., Mundy, N. I., Takeuchi, S. & Schioth, H. B. 2003. Association of feather colour with constitutively active melanocortin 1 receptors in chicken. *European Journal of Biochemistry* **270**: 1441–1449.
- McNulty, J. C., Jackson, P. J., Thompson, D. A., Chai, B., Gantz, I., Barsh, B. S., Dawson, P. E. & Millhauser, G. L. 2005. Structures of the agouti signaling protein. *Journal of Molecular Biology* **346**: 1059–1070.
- Takeuchi, S., Suzuki, H., Yabuuchi, M. & Takahashi, S. 1996. A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochimica et Biophysica Acta* **1308**: 164–168.
- Takeuchi, S., Takahashi, S., Okimoto, R., Schioth, H. B. & Boswell, T. 2003. Avian melanocortin system: α -**MSH** may act as an autocrine/paracrine hormone—a mini review. *Annals New York Academy of Sciences* **994**: 366–372.