カダヤシ黒色素胞のアドレナリン性受容体の特性

八木田健司・池田 弥生・尾崎 久雄

(1984 年 7 月 19 日受理)

Nature of Adrenoceptors in the Melanophores of Mosquitofish

Kenji YAGITA,* Yayoi IKEDA,* and Hisao OZAKI*

The effects of catecholamines on the melanophores of isolated scale of *Gambusia affinis affinis* were investigated microscopically.

In higher concentrations, catecholamines induced melanosome aggregation. Noradrenaline was most effective. Their effects were inhibited by phentolamine, an adrenergic α -blocking agent. On the other hand, catecholamines in lower concentrations induced melanosome dispersion on the melanophores of white-adapting fish. Adrenaline was most effective. Each catecholamine gave its maximum effect at the concentration of 10^{-10} M. Propranolol, an adrenergic β -blocking agent, inhibited the dispersing effects of catecholamines. Isoproterenol, which is known to be a beta agonist, was less effective in both aggregating and dispersing melanosomes than other amines.

In present study, the effect of K^+ was also investigated. Melanosomes were aggregated by the application of isotonic KCl solution, and its effect was inhibited by phentolamine. 10^{-10} M adrenaline was found to be able to disperse the melanosomes aggregated by isotonic KCl solution, but 10^{-10} M noradrenaline was not.

These results show that aggregation of melanosomes is mediated by α -adrenergic receptors and dispersion of those by β -adrenergic receptors, suggesting that α -receptors may be related to nervous control system of melanophores, and β -receptors to humoral one.

近年、水産業においては、ヒラメの体色白化現象などに見られる魚類の体色異常、または体色変化に関する問題が重要視されてきている。この魚類の体色変化とは基本的な生理反応でありながら、これを演ずる色素細胞に関する研究は現在のところ、やや遅れている感がある。一般に硬骨魚類では生理的体色変化は主に明暗変化であるが、これは魚のもつ黒色素胞中の黒色素顆粒が凝集・拡散することによって起こる。このような黒色素胞の反応は神経やホルモンによって支配されており、これらの伝達系からの伝達物質を黒色素胞は種々の受容体で情報として受け取り、その内容に応じて顆粒の運動を引き起こす。

今回の研究ではカダヤシの黒色素胞を用いて、その黒色素胞がもつアドレナリン性受容体の性質を調べることにより、伝達系から黒色素胞までの情報伝達メカニズムについての考察を試みた。

材料及び方法

試料 供試魚は体長 3~4 cm のカダヤシ *Gambusia affinis affinis* で、その胴背部より剝離した鱗上の黒色素

胞を実験に用いた。黒色素胞は鱗上の存在部位によって反応性に若干差があるため、鱗の辺縁部の黒色素胞を用いた。

試薬 実験にはノルアドレナリン(ノルアドレナリン; 三共株式会社製)、アドレナリン(ボスミン液; 第一製薬株式会社製)、 β 受容体に主に作用するイソプロテレンオール(プロタノール-L 注; 日研化学株式会社製)、また α 遮断剤としてフェントラミン(レギチーン注射液; チバ・ガイギー社製)、 β 遮断剤としてプロプラノロール(インデラル注射液; 住友化学工業株式会社製)、さらに $3',5'$ -cAMP $\cdot$ Na 塩(ヤマサ醤油株式会社製)及び KCl(国産化学株式会社製)を用いた。これらの薬品は使用直前にメダカ用リンゲル液(NaCl; 128 mM, KCl; 2.7 mM, $CaCl_2$; 1.8 mM, 0.1 N $NaHCO_3$ により pH 7.2 に調整した)を用い、必要濃度に調整した。

次に黒色素胞の凝集、拡散の各実験における方法の概要を述べる。

カテコールアミンの凝集効果 鱗を魚体から剝離後、直ちにリンゲル液中に移し、10分ほど放置して十分拡散させた黒色素胞を用い、これに 10^{-5} ~ 10^{-8} M のノルア

* 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, 5-7, Konan 4, Minato, Tokyo 108, Japan).

ドレナリン、アドレナリン、イソプロテノール液をそれぞれ3分間作用させた。次に 10^{-4} M フェントラミン液で3分間前処理した拡散黒色素胞に対し、 10^{-5} ~ 10^{-6} M のノルアドレナリンとアドレナリン液を3分間作用させた。

カテコールアミンの拡散効果 魚体から剝離した黒色素胞はリンゲル液中では拡散を維持するため、黒色素胞の拡散反応を調べるには何らかの方法でこれを凝集させる必要がある。本実験では次の方法により、体色の明化した魚体からの試料を用いた。照明下で白いバットに30分ほど放置し体色を明化させた個体の凝集黒色素胞(以下これを白背地凝集黒色素胞とする)を取り出し、直ちに 10^{-8} ~ 10^{-12} M のノルアドレナリン、アドレナリン及びイソプロテノール液をそれぞれ5分間作用させた。次に白背地凝集黒色素胞を 10^{-6} M または 10^{-8} M のプロプラノロール液で2分間前処理し、その後 10^{-10} M ノルアドレナリンとアドレナリン液を5分間作用させた。なお試験薬物の効果を判断するために、各実験ごとに凝集黒色素胞のリンゲル液拡散度を対照として測定し、比較の材料とした。

K⁺凝集効果とカテコールアミン拡散効果 リンゲル液で拡散した黒色素胞に等調 KCl 液を作用させた。また 10^{-4} M フェントラミン液で3分間前処理した拡散黒色素胞に対し、等調 KCl 液を3分間作用させた。次に等調 KCl 液で3分間凝集させた黒色素胞に対し、 10^{-10} M のノルアドレナリンとアドレナリン液を5分間作用させた。また 10^{-8} M プロプラノロール液で3分間前処理後、等調 KCl 液で3分間凝集させた黒色素胞に対する 10^{-10} M ノルアドレナリンとアドレナリン液の5分間の効果も調べた。

反応の測定と結果の表示 上記の各実験において得られる黒色素胞の薬物に対する反応を、接眼マイクロメータを用いて以下の方法により定量的に測定した。

凝集実験では、リンゲル液中で多数の枝を伸ばして十分拡散している黒色素胞において、2本の対称的な枝を選びそれらの両先端を結ぶ長さを径とした。その完全伸長時の径(R)を測定した後、試薬を作用させ変化するその径(r)を経時的に測定した。引き続き 10^{-5} M ノルアドレナリン液を作用させてその完全凝集時の径(R')も測定し、次式より各測定時における収縮率を求めた。

$$\text{径の収縮率 (\%)} = \frac{R-r}{R-R'} \times 100$$

次に拡散実験では、完全凝集している黒色素胞に対し試薬を作用させた後、少しでも伸長し始めた部分を選び、黒色素胞の完全凝集時における径(R')を素早く測定し、試薬の作用で変化していく径(r)を経時的に測定した。その後 10^{-3} M cAMP 液を作用させてその完全伸

Fig. 1. The effects of 5×10^{-6} M catecholamines on the melanophores of *Gambusia affinis affinis*. Ten melanophores from 2-3 fish were tested for each amine, and were treated for 3 min at room temperature ($18-30^{\circ}\text{C}$). The results were presented as means $\pm$ S.D.

長時の径(R)も測定し、次式より各測定時における伸長率を求めた。

$$\text{径の伸長率 (\%)} = \frac{r-R'}{R-R'} \times 100$$

以上の方法で求めた収縮率、伸長率をそれぞれ黒色素胞の凝集度、拡散度とし、薬物に対する反応の強さを表わす尺度とした。

なお各試液あたり供試魚数は2~3尾とし、各個体から3~5枚、合計10枚の鱗を採って実験に供した。そして鱗1枚につき1個の黒色素胞を調べ、結果を平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。実験は室温 ($18-30^{\circ}\text{C}$) で行った。

結 果

カテコールアミンの凝集効果 魚体から剝離した直後の黒色素胞はやや凝集した状態にあるが、リンゲル液中に移すと次第に拡散を起こし、完全拡散状態を維持する。この拡散黒色素胞に対するノルアドレナリン、アドレナリン及びイソプロテノールの効果を Fig. 1 に示した。何れのカテコールアミンも 5×10^{-6} M で明らかな凝集反応を引き起こした。ノルアドレナリンとアドレナリンは黒色素胞の急激な反応を引き起こしているが、イソプロテノールに対する黒色素胞の反応は前2者に比べ緩慢である。Fig. 2 には各カテコールアミンの濃度と反応の強さとの関係を示した。これを見ると各カテコールアミンの凝集効果は濃度依存的であり、それらの強さはノルアドレナリン > アドレナリン > イソプロテノールの順であった。一般に黒色素胞においては、カテコ

Fig. 2. Relationship between the concentrations of catecholamines and the aggregation responses of melanophores. Their solutions of various concentrations were applied for 3 min.

Fig. 3. The effects of noradrenaline and adrenaline of 5×10^{-6} M (●—●) or 10^{-6} M (Δ—Δ) on the melanophores pretreated with 10^{-4} M phentoramine for 3 min. Their effects of 5×10^{-6} M (○—○) on the untreated melanophores were added, too.

ルアミンの凝集効果はアドレナリン性受容体の一つである α 受容体を介して発現されるが、 α 遮断剤の一つであるフェントラミンを用いて黒色素胞を前処理したところ、Fig. 3 に見られるように、Fig. 2 で見られたノルアドレナリン、及びアドレナリンの効果は明らかに抑制された。両者の抑制度を比較すると、アドレナリンの方がノルアドレナリンよりも強い。この結果から、カダヤシ黒色素胞においてカテコールアミンの示す凝集効果は α 受容体を介したものであり、その作用強度はノルアドレナリン > アドレナリン > イソプロテレンールの順であることがわかった。

Fig. 4. The effects of noradrenaline, adrenaline and isoproterenol of various concentrations on the melanophores of white-adapting fish. Their solutions were applied for 5 min. The responses of melanophores in physiological saline were also measured for control.

カテコールアミンの拡散効果 Fig. 4 には白背地凝集黒色素胞の $10^{-8} \sim 10^{-12}$ M のノルアドレナリン、アドレナリン及びイソプロテレンール液に対する拡散反応を示した。それぞれの対照からわかるように、実験に用いた黒色素胞はリンゲル液中では5分間でおおよそ5~10%の拡散度を示す程度で、拡散実験用の黒色素胞として利用可能であると言える。この凝集黒色素胞はカテコールアミンに対し徐々に反応を進め、どのカテコールアミンも 10^{-10} M で最大の効果を示した。またどのカテコールアミンも 10^{-12} M と 10^{-8} M とでは、黒色素胞の反応は対照と大差ないという結果が得られた。Fig. 5 にはこの結果をもとにして、カテコールアミンの濃度と反応の強さとの関係を示した。結果は対照が5%の拡散度を示した時間における、それぞれのカテコールアミンの拡散度で示した。拡散効果がその種類にかかわらず 10^{-10} M をピークに上昇、あるいは低下を示したことは興味深い結果である。拡散効果の強さを比べると、アドレナリン > ノ

Fig. 5. Relationship between the concentrations of catecholamines and the dispersing responses of melanophores of white-adapting fish. Their solutions were applied for 5 min. The three data of right side are showing the control values of the melanophores to each amine.

Fig. 6. The effects of 10^{-10} M adrenaline on the melanophores pretreated with propranolol of 10^{-8} M or 10^{-6} M for 2 min.

ルアドレナリン>イソプロテレンールの順となった。一般に、黒色素胞においてカテコールアミンの拡散効果はもう一つのアドレナリン性受容体である β 受容体を介して発現するとされているので、 β 遮断剤の一つであるプロプラノロールを用いて白背地凝集黒色素胞を前処理したところ、Fig. 4に見られた 10^{-10} M アドレナリン液の効果は、Fig. 6に見られるように、プロプラノロール濃度が高くなるにつれて強く抑制された。ノルアドレナリンについても同様の結果であった。以上のことから、カダヤン黒色素胞においてカテコールアミンの示す拡散効

Fig. 7. The effect of isotonic KCl solution ($\Delta-\Delta$) on the melanophores (for 3 min), and following effects of 10^{-10} M noradrenaline and 10^{-10} M adrenaline on the melanophores aggregated by isotonic KCl solution. The dispersing responses of KCl-aggregated melanophores in physiological saline were also measured for control.

果は β 受容体を介し、その作用強度はアドレナリン>ノルアドレナリン>イソプロテレンールの順であることがわかった。

K⁺ 凝集効果とカテコールアミン拡散効果 Fig. 7にはリンゲル液拡散黒色素胞に対する等調 KCl 液の凝集効果と、その凝集黒色素胞に対する 10^{-10} M のノルアドレナリンとアドレナリン液の拡散効果を示した。等調 KCl 液は極めて強い凝集反応を引き起こし、1分間で完全凝集を示す。この効果は 10^{-8} M のノルアドレナリン液の効果とほぼ同じである。また、この KCl 効果はフェントラミン前処理で完全に抑制されたことから、KCl の凝集効果が α 受容体を介していることがわかった。

次に、この KCl 凝集黒色素胞は対照の示すように、リンゲル液中に移されると5分後(図では8分後)にはほぼ拡散し終る程の素早い反応を示す。しかし 10^{-10} M アドレナリン液はこの黒色素胞に対しても明らかな拡散効果を示した。作用後3分時(図では6分後)で比較すると、対照の拡散度が約30%であるのに対し 10^{-10} M アドレナリンのそれは約84%となっている。しかし 10^{-10} M ノルアドレナリン液に対する黒色素胞の反応は対照の場合と大差なく、ここでもカテコールアミンの種類により効果に差のあることが明らかとなった。これらカテコールアミンの拡散効果はプロプラノロール前処理で抑制された。

考 察

これまで多くの硬骨魚類で黒色素胞のもつアドレナリン性受容体について、その性質が調べられてきた。²⁻⁶⁾ その結果、カテコールアミンの凝集効果はアドレナリン性 α 受容体を、一方、その拡散効果は β 受容体を介していることが明らかになってきた。今回のカダヤシの場合も同様の結果を得た。一般に薬理学上言われているカテコールアミンの α 、及び β 受容体に対する作用強度は、 α 受容体に対してはノルアドレナリン、アドレナリン、イソプロテレノールの順に強く、 β 受容体に対してはイソプロテレノール、アドレナリン、ノルアドレナリンの順とされている。⁷⁾ 硬骨魚においても α 受容体に対する作用強度の順は、今回のカダヤシを含め多くの魚種でこれと一致している。しかし β 受容体に対する結果は研究者によって異なっており、明確ではない。^{3,4)} しかしノルアドレナリンとアドレナリンの間では、アドレナリンの方がノルアドレナリンより作用強度は大きいと言われており、本実験のカダヤシでも同様の結果を得た。なおイソプロテレノールが凝集・拡散ともほとんど効果がなかったことは、カダヤシ黒色素胞のアドレナリン性受容体の一つの特性を示す結果である。

以上のように、カテコールアミンの種類により作用強度に違いがあることについては、アドレナリン性受容体がアデニルシクラーゼという酵素であることに起因すると考えられる⁸⁾。アデニルシクラーゼはアロステリック酵素であることから、そのアロステリック変化の程度と酵素活性度が関連しているものと思われる。なお筆者らもこの点に関しては α 、 β 両受容体の機能的差異も含め、さらに検討を進めていく予定である。いずれにせよ、本実験の結果からカダヤシ黒色素胞において、 α 受容体にはノルアドレナリンが、 β 受容体にはアドレナリンがそれぞれ体内で伝達物質として作用している可能性が示された。

本実験の結果から、 α 受容体は凝集伝達系に、 β 受容体は拡散伝達系に関連していると考えられる。しかし、その伝達系については α 受容体は交感神経系に基づくものと考えられている^{5,9,10)}が、 β 受容体については未だ明らかではない。 K^+ による凝集効果は他の魚種でも見られており^{10,11)}、本実験でも同様の結果を得た。これは黒色素胞に達する交感神経の節後繊維が K^+ によって脱分極を起こし、その末端から伝達物質(ノルアドレナリンと考えられる)が放出され、 α 受容体に作用したことによる結果と考えられる。なお K^+ は生体内において様々な作用をもつため、受容体以外の部分でも黒色素胞に作用する可能性があり、 K^+ を含め、黒色素胞反応におけるイオンの関与は十分検討されねばならない。しかし、

K^+ による凝集は黒色素胞に対する神経伝達のモデルとして一応考えることはできよう。このモデルで注目すべき点は、黒色素胞は K^+ による凝集だけでなく、凝集後のリンゲル液中での拡散でも素早い反応を示したことである。これはリンゲル液中では、伝達物質と α 受容体との結合が解離していくために起こったものと考えられ、神経からの情報がなくなると黒色素胞は容易に拡散してしまうことを示している。

本実験では K^+ 凝集黒色素胞、白背地凝集黒色素胞の両者に対して、アドレナリンが最も強い拡散効果を示した。なお2種類の凝集黒色素胞の間でアドレナリンに対し、またリンゲル液に対しそれぞれ拡散性に差があったことは、それら黒色素胞の凝集反応機構に違いがあったものと考えられ、ホルモンの作用を含め、更に検討を要する点である。アドレナリンはいずれの場合も β 受容体を介して拡散を引き起こしており、 β 受容体が拡散伝達系に関連していることは明らかであるが、一般に β 受容体がどのような伝達系からの情報を受けているかについてはほとんどわかっていない。*in vivo*において凝集性神経に対応した拡散性神経の存在を証明するに足る報告は未だなく、 β 受容体と神経系との関連性は低いと考えられる。本実験の K^+ 凝集実験における結果からすれば、黒色素胞を支配する神経は凝集性神経だけでも十分であると予想される。そして、それに対応しているのは α 受容体であろうということは先述した通りである。従って β 受容体は神経系以外の伝達系、おそらく内分泌系に関連しているものと考えられる。アドレナリンはヒトでは副腎髄質から、魚類では頭腎内クロム親和細胞から分泌され、ホルモンとしての機能を果たしていることはよく知られており、 β 受容体と内分泌系が関連している可能性は高いであろう。またアドレナリンが最も強い効果を示した結果からすれば、ストレスと体色変化との関係を検討する上で β 受容体は大きな意味をもつかもしれない。

以上のように、カダヤシ黒色素胞のアドレナリン性受容体に関しては α 受容体が神経系に、 β 受容体が内分泌系にそれぞれ関連しているものと考えられる。さらに今回の実験より、カテコールアミンは濃度によってその効果が変わることが明らかとなった。この効果の違いについては、種々の点からの検討を要すると思われ、現在研究中である。

引 用 文 献

- 1) 藤井良三：色素細胞，東大出版，東京，1976，pp. 81-113.
- 2) R. FUJII and Y. MIYASHITA: *Comp. Biochem. Physiol.*, **51C**, 171-178 (1975).
- 3) Y. MIYASHITA and R. FUJII: *Comp. Biochem.*

- Physiol.*, **51C**, 179-187 (1975).
- 4) M. A. VISCONTI and A. M. DE L. CASTRUCCI: *Comp. Biochem. Physiol.*, **70C**, 293-296 (1981).
 - 5) D. J. GROVE: *Comp. Biochem. Physiol.*, **28**, 37-54 (1969).
 - 6) M. M. FERNANDO and D. J. GROVE: *Comp. Biochem. Physiol.*, **48A**, 711-721 (1974).
 - 7) 安藤襄一: 生化学の薬理学 (吉田博, 田中正三編), 朝倉書店, 東京, 1971, pp. 184-185.
 - 8) 矢後長純: 動物の薬理学 (伊藤隆太, 北川晴雄, 野口照久編), 南江堂, 東京, 1974, pp. 90-100.
 - 9) E. G. HEALEY and D. M. ROSS: *Comp. Biochem. Physiol.*, **19**, 545-580 (1966).
 - 10) 尾崎久雄: 動雑, **65**, 409-414 (1956).
 - 11) A. M. DE L. CASTRUCCI: *Comp. Biochem. Physiol.*, **50A**, 453-456 (1975).