

GPR143 在绵羊皮肤组织中的表达及定位分析

陈天直¹, 赵兵令¹, 刘宇², 赵园园³, 王海东¹, 范瑞文¹, 王鹏超¹, 董常生¹

1. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801;
2. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030;
3. 铜仁学院乌江农林经济学院, 铜仁 554300

摘要: G 蛋白偶联受体 143(G-protein coupled receptor143, GPR143)在黑素体的生物合成中起重要作用, 本文旨在研究 *GPR143* 基因在不同毛色绵羊皮肤组织中的差异表达及定位, 探索 *GPR143* 基因与毛色形成的相关性。通过 qRT-PCR 方法和免疫印迹方法分别检测不同毛色绵羊皮肤组织中 *GPR143* 基因 mRNA 水平和蛋白水平的表达差异; 运用免疫荧光法对不同毛色绵羊皮肤组织中的 *GPR143* 基因进行定位并对结果进行光密度值分析。qRT-PCR 结果显示, *GPR143* 基因在黑色绵羊皮肤组织中 mRNA 相对表达量为白色绵羊的 7.84 倍, 二者差异极显著($P < 0.01$); 免疫印迹结果显示, 黑色绵羊皮肤组织中 GPR143 蛋白表达量是白色绵羊的 1.3 倍, 二者差异显著($P < 0.05$)。免疫荧光结果显示, GPR143 蛋白的主要表达部位为绵羊皮肤组织毛囊外根鞘和表皮层, 经光密度值分析后发现, GPR143 在黑色绵羊皮肤毛囊外根鞘和表皮层的表达量显著高于白色绵羊。本研究结果表明不同毛色绵羊皮肤组织均能表达 *GPR143* 基因, 但黑色绵羊皮肤组织中该基因的 mRNA 和蛋白水平都显著高于白色绵羊, 说明 *GPR143* 的 mRNA 和蛋白在黑色绵羊皮肤组织中表达上调, 在白色绵羊皮肤组织中表达下调。*GPR143* 基因可能通过调控 *MITF* 水平和黑素体的数量、大小、运动和成熟进而参与绵羊毛色的形成过程。

关键词: 绵羊; 毛色; *GPR143*; qRT-PCR; 免疫印迹; 免疫荧光

Expression and localization of *GPR143* in sheep skin

Tianzhi Chen¹, Bingling Zhao¹, Yu Liu², Yuanyuan Zhao³, Haidong Wang¹, Ruiwen Fan¹, Pengchao Wang¹, Changsheng Dong¹

1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;
2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
3. Wujiang River Institute of Agriculture and Forestry Economics, Tongren University, Tongren 554300, China

Abstract: G-protein coupled receptor143 (GPR143) plays an important role in melanogenesis. In this study, we investigated the expression pattern and localization of *GPR143* in skin of sheep with different coat colors and explored the correla-

收稿日期: 2016-02-26; 修回日期: 2016-04-18

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(“863”计划)(编号: 2013AA102506)和国家公益性行业(农业)科研专项(编号: 201303119)资助[Supported by the High Technology Research and Development Program of China (863 Program)(No.2013AA102506) and the Special Foundation for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201303119)]

作者简介: 陈天直, 硕士研究生, 专业方向: 基础兽医学。E-mail: chentianzhi15@163.com

通讯作者: 董常生, 博士生导师, 研究方向: 羊驼生物学。E-mail: csdong18@163.com

DOI: 10.16288/j.yczz.16-068

网络出版时间: 2016/3/24 14:11:44

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160324.1411.002.html>

tion between *GPR143* gene and coat color. The mRNA level and protein level of *GPR143* in skin of sheep with different coat colors were detected by qRT-PCR and immunoblotting separately while the localization of *GPR143* in sheep skin was detected by immunofluorescence assay following optical density analysis. The qRT-PCR results showed that the relative expression level of *GPR143* mRNA in black sheep skin was 7.84 times of that in white sheep skin ($P<0.01$). Immunoblotting results demonstrated that the expression level of GPR143 protein in black sheep skin was 1.30 times of that in white sheep skin ($P<0.05$). Immunofluorescence assay revealed that GPR143 was primarily expressed in the outer root sheath of hair follicles and epidermal skin tissue. Optical density analysis showed that expression levels of GPR143 in the outer root sheath and epidermis of black sheep skin were significantly higher than that of white sheep skin. Our studies demonstrated that *GPR143* is expressed in skin of sheep with different coat colors. However, the mRNA and protein levels of *GPR143* in black sheep skin are significantly higher than that in white sheep skin, indicating that *GPR143* mRNA and protein levels are upregulated in skin of black sheep while downregulated in skin of white sheep. *GPR143* may participate in the formation of coat color by regulating the level of *MITF* and the number, size, motility and maturation of the melanosome.

Keywords: sheep; coat color; *GPR143*; qRT-PCR; immunoblotting; immunofluorescence

1995 年, Bassi 等^[1]首次从人的 X 染色体远端短臂上定位克隆出眼白化病 I 型(Ocular albinism type 1, *OAI*)基因, 也被称为 G 蛋白偶联受体 143(G-protein coupled receptor 143, *GPR143*)。Fukuda 等^[2]构建 *GPR143* 敲除鼠, 通过免疫组织化学分析发现 *GPR143* 除在端脑、僵核、下丘脑、黑质和延髓中表达外, 还表达于心、肝、脾、肺、肾等非神经组织, 其中在肾小管和脾被膜中大量表达。*GPR143* 基因的蛋白产物 GPR143 编码色素细胞特有的糖蛋白, 由 404 个氨基酸残基组成^[3]。*GPR143* 是一种不规则的 G 蛋白偶联受体^[4], 不同于其他 G 蛋白偶联受体, 它主要与细胞内前溶酶体和黑素体有关联, 其 N 端朝向黑素体内腔, C 端朝向细胞质侧^[5]。*GPR143* 基因的调控与黑素生成酶相似, 在发育过程中它们有相同的时空布局, 且其表达量能被 α -促黑素细胞刺激素(α -Melanocyte-stimulating hormone, α -MSH)和小眼畸形相关转录因子(Microphthalmia-associated transcription factor, *MITF*)上调, 被刺鼠信号蛋白基因(*Agouti* signaling protein gene, *Agouti*)下调^[6-8]。此外, *GPR143* 基因还同黑素皮质素受体 1(Melanocortin 1 receptor, *MC1R*)系统和黑素体蛋白类似, 在脊椎动物中高度保守, 而在非脊椎动物中则没有同源物或同系物^[9]。

GPR143 基因突变是最常见 I 型眼白化病产生的原因, 它以 X 染色体隐性方式和特点进行遗传, 病人表现为视力严重降低、屈光不正、眼球震颤、

虹膜半透明、眼底色素沉着减退及视网膜中央凹发育不全等^[10]。*GPR143* 患者以及该病症小鼠模型的视网膜色素上皮细胞和皮肤黑色素细胞镜检发现存在巨型黑素体^[11,12]。巨型黑素体表型表明黑素体生物合成中存在缺陷, 但是它在体内^[13,14]和体外显示出不一致的表现度, 这也许是因为 *GPR143* 在不同病理学条件下的缺陷所表现出来的另一种表型^[15,16]。*GPR143* 患者除了黑素体变大, 还表现出 II 期黑素体的数量严重减少^[15]。对 *GPR143* 敲除鼠进行分析时发现, 从胚胎到成年, 巨型黑素体的大小和数量逐渐增加。当大多数黑素体表现出巨大表型时, 成熟黑素体的数量减少了 50%^[17]。尽管主要在体内检测到成熟黑素体大小和数量的异常情况, 但是通过调节晚期黑素体标志物转运到发展中的细胞器, *GPR143* 实际上可能在黑素体的早期阶段中起主要作用^[18]。*GPR143* 能否在绵羊这一毛肉兼用的经济动物皮肤中表达, 以及 *GPR143* 与绵羊毛色形成有无关系? 这些问题尚未被研究。本研究通过对不同毛色绵羊皮肤中 *GPR143* 基因进行组织定位并对其表达情况进行检测, 从而探索 *GPR143* 与绵羊毛色之间的相互关系, 以期进一步明确其与哺乳动物毛色形成的相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

在山西农业大学羊场随机挑选 1 岁左右、体况

良好的白色和黑色小尾寒羊各 3 只。于 9 月初,对每只绵羊臀部皮肤组织净毛后,用取皮器采集 1 cm² 的皮肤组织 3 块,将其中 2 块快速置于液氮或-80℃ 中冻存,用于总 RNA 和总蛋白提取;另 1 块置于 Bouins 液中固定,用于绵羊皮肤毛囊生长期组织切片制作。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

绵羊皮肤总 RNA 使用 Trizol 法(宝生物工程(大连)有限公司)提取,然后检测样本浓度及纯度并经电泳鉴定其完整性,-80℃ 保存。绵羊皮肤 cDNA 合成采用 PrimeScriptTMRT reagent Kit(宝生物工程(大连)有限公司)进行,体系为 2 Ml 5×PrimeScript Buffer, 0.5 μL PrimeScript RT Enzyme MixI, 0.5 μL OligdT Primer, 0.5 μL Random 6 mers,总 RNA 浓度<0.5 μg,加水至 10 μL。反应条件:37℃ 15 min;85℃ 5 s。cDNA 样品于-20℃ 保存。

1.2.2 引物设计及 PCR 反应

从 GenBank 上获取绵羊 *GPR143* 序列,并进行 Blast 比对,得到保守序列 CDS 区,然后利用 NCBI 上在线引物设计软件设计跨外显子的长度为 113 bp 的荧光定量 PCR 引物。引物由华大基因公司合成,序列信息见表 1。

取适量引物,以反转录产物为模板进行 PCR 扩增,对 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,然后将目的条带割下纯化后送华大基因公司测序。

1.2.3 qRT-PCR 的扩增

荧光定量 PCR 采用 SYBR[®]Premix Ex Taq Kit(宝生物工程(大连)有限公司)进行,体系为 SYBR[®]Premix Ex Taq II (TliRNaseH Plus)(2×)5 μL;模板<100 ng;

表 1 目的基因 *GPR143* 引物序列

Table 1 The sequence of primer for *GPR143*

目的基因	引物序列(5'→3')	PCR 产物(bp)
<i>GPR143</i>	F: TGGGTATCGTGGTCCGATCT R: TGCACCTCCCATGCAGAAAA	113
18S rRNA	F: GAAGGGCACCACCAGGAGT R: CAGACAAATCACTCCACCAA	158

上下游引物各 0.4 μL;ROX Reference Dye (50×) 0.2 μL;加水至 10 μL。反应条件:95℃ 预变性 30 s;95℃ 5 s, 60℃ 30 s,72℃ 5 s,40 个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min, 95℃ 15 s。每个样本重复数为 4,内参扩增条件同上。反应结束后,定量结果由扩增曲线 CT 值计算。*GPR143* 基因在白色和黑色绵羊皮肤中 mRNA 的相对表达量采用 2^{-ΔΔCT} 法计算。运算公式为:ΔCT(不同分组基因)=ΔCT(目的基因)-ΔCT(内参基因),ΔΔCT=ΔCT(黑色绵羊组)-ΔCT(白色绵羊组)。

1.2.4 皮肤组织的免疫印迹分析

绵羊皮肤组织总蛋白使用碧云天总蛋白提取试剂盒提取。ND1000 核酸蛋白测定仪(Thermo Fisher Scientific)测定蛋白浓度后,按照每孔上样 200 μg 浓度总蛋白进行 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE);将目的蛋白电泳转移至 NC 膜(武汉博士德生物工程有限公司);5%脱脂奶粉封闭液室温封闭 NC 膜 80r 1 h;将 NC 膜放入孵育盒内,加入兔抗 *GPR143* 多克隆抗体(TBST 1:500)(Santa Cruz Biotechnology),室温放置 30 min,4℃ 过夜,37℃ 复温 30 min;TBST 洗膜 10 min×3 次,将膜放入孵育盒内,加入 HRP-山羊抗兔 IgG(TBST 1:6000)(北京康为世纪公司),37℃ 孵育 1 h;TBST 洗膜 6 min×5 次;最后加入 ECL 发光液,获取图像。内参蛋白抗体用兔抗 β-actin 多克隆抗体(北京康为世纪公司),以 1:1000 比例稀释使用。

1.2.5 皮肤组织的免疫荧光分析

将绵羊皮肤组织石蜡切片脱蜡至水,PBS 缓冲溶液洗 2 min×3 次;滴加适量 10%正常羊血清工作液用于封闭非特异性抗原,室温放置 30 min;甩去多余液体,并滴加兔抗 *GPR143* 多克隆抗体(PBS 1:100),4℃ 孵育过夜;PBS 缓冲溶液洗 2 min×3 次,滴加 FITC 标记羊抗兔 IgG(PBS 1:200)(Santa Cruz Biotechnology),37℃ 培养箱反应 30 min;PBS 缓冲溶液洗 5 min×4 次,蒸馏水冲洗 1 次,水溶性封片剂封片、荧光显微镜观察。

1.2.6 数据分析

所有数据均用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析,所有结果均用“平均值±标准误(Mean±SE)”表示。

2 结果与分析

2.1 绵羊皮肤总 RNA 提取、PCR 扩增及测序结果

经 1% 琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白测定仪检测, 发现绵羊皮肤总 RNA 完整性和纯化效果较好, 表明 RNA 样品合格, 可以用于后续实验。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示有且只有大小为 113 bp 左右的条带(图 1), 且该条带清晰, 无二聚体或非特异性条带。测序结果经 Blast 比对正确, 说明 *GPR143* 可在绵羊体内正常表达。

2.2 皮肤组织的 qRT-PCR 扩增结果

不同毛色绵羊皮肤 *GPR143* 基因 qRT-PCR 扩增曲线符合“S”型标准, 溶解曲线上有且只有一个明显的峰, 表明在 qRT-PCR 反应过程中收集的荧光信号都来自特异性引物扩增。

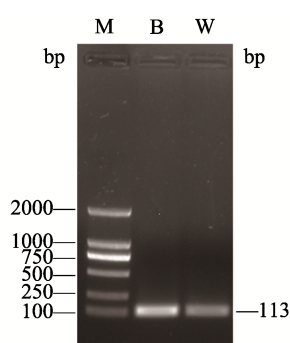


图 1 *GPR143* PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of *GPR143* PCR amplification product

M: DL2000 DNA 相对分子质量标准; W: 白色绵羊皮肤; B: 黑色绵羊皮肤。下同。

对绵羊皮肤组织 qRT-PCR 数据进行分析, 相对定量结果表明黑色绵羊皮肤组织中 *GPR143* 基因 mRNA 的相对表达量为 $7.97 \pm 1.09^{**}$, 而白色皮肤组织中其相对表达量为 1.02 ± 0.15 , *GPR143* 基因在黑色绵羊皮肤组织中 mRNA 的相对表达量是白色绵羊皮肤的 7.84 倍, 二者表达差异极显著 ($P < 0.01$) (图 2)。

2.3 皮肤组织的免疫印迹检测结果

免疫印迹结果显示, 白色和黑色绵羊皮肤组织总蛋白中均存在能与兔抗 *GPR143* 多克隆抗体发生免疫阳性反应的条带, 条带大小为 60 kDa 左右(图 3A)。对绵羊 *GPR143* 和 β -actin 免疫印迹结果进行分析, 黑色绵羊皮肤组织中 *GPR143* 基因的相对蛋白含量为 $1.3 \pm 0.07^*$, 而白色皮肤组织中其相对蛋白含量为 1 ± 0.07 , *GPR143* 蛋白在黑色绵羊皮肤组织中的相对表达量是白色皮肤组织的 1.3 倍, 两者表达

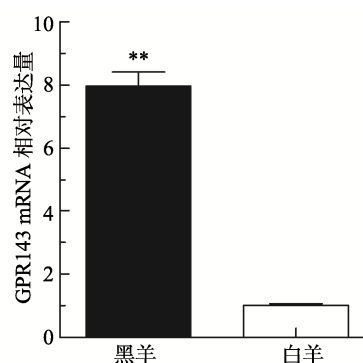


图 2 绵羊皮肤组织中 *GPR143* mRNA 表达的 qRT-PCR 分析

Fig. 2 qRT-PCR analysis of *GPR143* mRNA expression in sheep skin

** : $P < 0.01$ 。

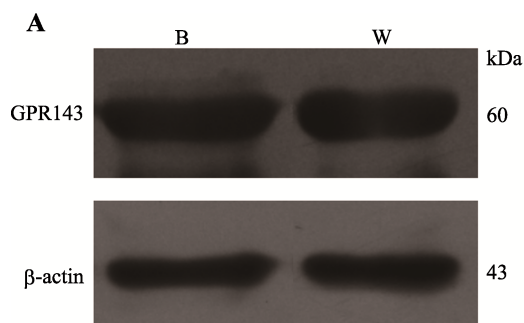


图 3 绵羊皮肤组织中 *GPR143* 蛋白表达的免疫印迹分析

Fig. 3 Immunoblotting analysis of *GPR143* protein expression in sheep skin

A: 60 kDa 和 43 kDa 分别是 *GPR143* 多克隆抗体和 β -actin 多克隆抗体印迹; B: 绵羊皮肤中 *GPR143* 蛋白的相对表达量。* : $P < 0.05$ 。

差异显著($P < 0.05$)(图 3B)。

2.4 皮肤组织的免疫荧光结果

免疫荧光结果显示,白色和黑色绵羊皮肤中均有 GPR143 蛋白的表达,且其主要表达部位为表皮层和毛囊外根鞘,但表达程度深浅不一(图 4);而阴性对照组均无表达。通过光密度值分析比较不同毛色绵羊皮肤中 GPR143 蛋白的表达水平,阳性实验组结果显示,GPR143 在黑色绵羊皮肤纵切毛囊部分的平均光密度值为 $1.62 \pm 0.16^{**}$,在白色绵羊皮肤纵切毛囊部分的平均光密度值为 1 ± 0.14 ,而在黑色绵羊皮肤横切毛囊部分的平均光密度值为 $4.49 \pm 0.17^{**}$,在白色绵羊皮肤横切毛囊部分的平均光密度值为 1 ± 0.2 ;此外,GPR143 在黑色绵羊皮肤表皮部分的平均光密度值为 $1.18 \pm 0.07^{*}$,在白色绵羊皮肤表皮部分的平均光密度值为 1 ± 0.1 。结果表明 GPR143 在黑色绵羊皮肤中的表达量高于白色绵羊,差异显著($P < 0.05$)(图 5)。

3 讨论

最初对黑色素细胞中 GPR143 基因精确的亚细胞定位有一些争议,是主要存在于溶酶体或晚期胞内体还是黑素体^[9]?然而,Piccirillo 等^[19]通过免疫电子显微镜技术和免疫荧光法对 MNT1 细胞(人类黑素瘤细胞系)进行定量研究表明 GPR143 沿着溶酶体和黑素体途径均匀分布。且 GPR143 在含有前黑素体蛋白(Premelanosome protein, PMEL, 也称 PMEL17、SILV 或 gp100)的未成熟黑素体(I 期、II 期黑素体)中异常丰富^[18]。与此一致的是,对来自于 MNT1 细胞的前期黑素体碎片进行蛋白质组学研究,证实 GPR143 的确属于这些细胞器^[20]。黑素体是黑色素细胞中合成、储存和运输黑色素的细胞器。黑素体的成熟依赖于结构蛋白和参与黑色素合成酶的联合作用。只有这两种蛋白质被协调一致时,同时黑素体已经装配适量的纤维支架时(III 期黑素体),黑色素才开始合成,而当黑素体达到完全成熟时(IV 期黑素体)终止^[21]。表皮层中的黑色素细胞主要位于基底层,通过树突能与大约 30~40 个角化细胞联系,构成一个表皮黑色素单位。黑色素细胞中的黑素体合成黑色素,然后转运到邻近的角化细胞中以保护它们免于紫外线辐射^[22]。研究表明,按形态和功能

进行分类,毛囊黑色素细胞分为两种不同的类型:有色素的黑色素细胞存在于毛囊漏斗部和毛球;无色素的黑色素细胞位于毛囊中部和下部的外根鞘^[23]。这些外根鞘的黑色素细胞负责毛发色素沉着。此外,表皮缺失再形成和白癜风的色素再沉着中,外根鞘黑色素细胞能作为表皮黑色素细胞再引种的储层^[24]。与前人研究结果一致,本研究免疫荧光结果显示,GPR143 基因主要在白色和黑色绵羊皮肤表皮层和毛囊外根鞘中表达。

本研究对不同毛色绵羊皮肤中 GPR143 的 mRNA 水平和蛋白水平进行方差显著性分析后发现,黑色绵羊皮肤中的表达水平显著高于白色绵羊皮肤,对免疫荧光图片进行光密度值分析后发现,GPR143 在黑色绵羊皮肤表皮层和毛囊外根鞘的表达量均高于白色绵羊,该结果与免疫印迹结果一致。以上均说明 GPR143 的转录和翻译水平在黑色绵羊的皮肤中被上调,在白色绵羊皮肤中被下调。GPR143 蛋白在黑素体生物合成中有关键的调节作用,其功能缺失会导致早期黑素体数量减少并形成巨型黑素体^[25],除此之外,还会引起黑色素含量减少^[18]。GPR143 能充当一个生物传感器通过调控转录因子 MITF 的表达来调节细胞器生产速率,MITF 是已知能调节黑素体支架蛋白以及参与黑色素合成酶表达的一种转录因子,同时也是黑色素细胞发育、功能、存活和细胞进程的主要调节器^[26]。GPR143 缺失时,虽然 MITF 的水平仍足以维持色素细胞的存活和分化状态,但它的数量显著减少^[27]。MITF 水平的降低会导致黑素体结构蛋白 PMEL 表达量选择性降低,进而引起新生的黑素体数量减少^[21]。显微镜延时摄影和细胞器示踪分析揭示出当 GPR143 功能缺失时会导致黑素体沿着微管的频繁的移动显著减少;然而,该现象只在一个完整的肌动蛋白细胞骨架存在时才能被观察到^[16]。这说明细胞骨架代表着 GPR143 的一个下游效应分子,该受体通过支持基于微管(Microtubules, MT)或基于肌动蛋白微丝(Actin filaments, AF)的转运从而在黑素体的能动性中发挥调控作用。多囊胞内体是黑素体的前体,Burgoyne 等^[28]利用非黑素源性海拉细胞证实了 GPR143 的表达增加了多囊胞内体的数量,它通过影响多囊胞内体或溶酶体的能动性,以及影响多囊胞内体腔内 PH

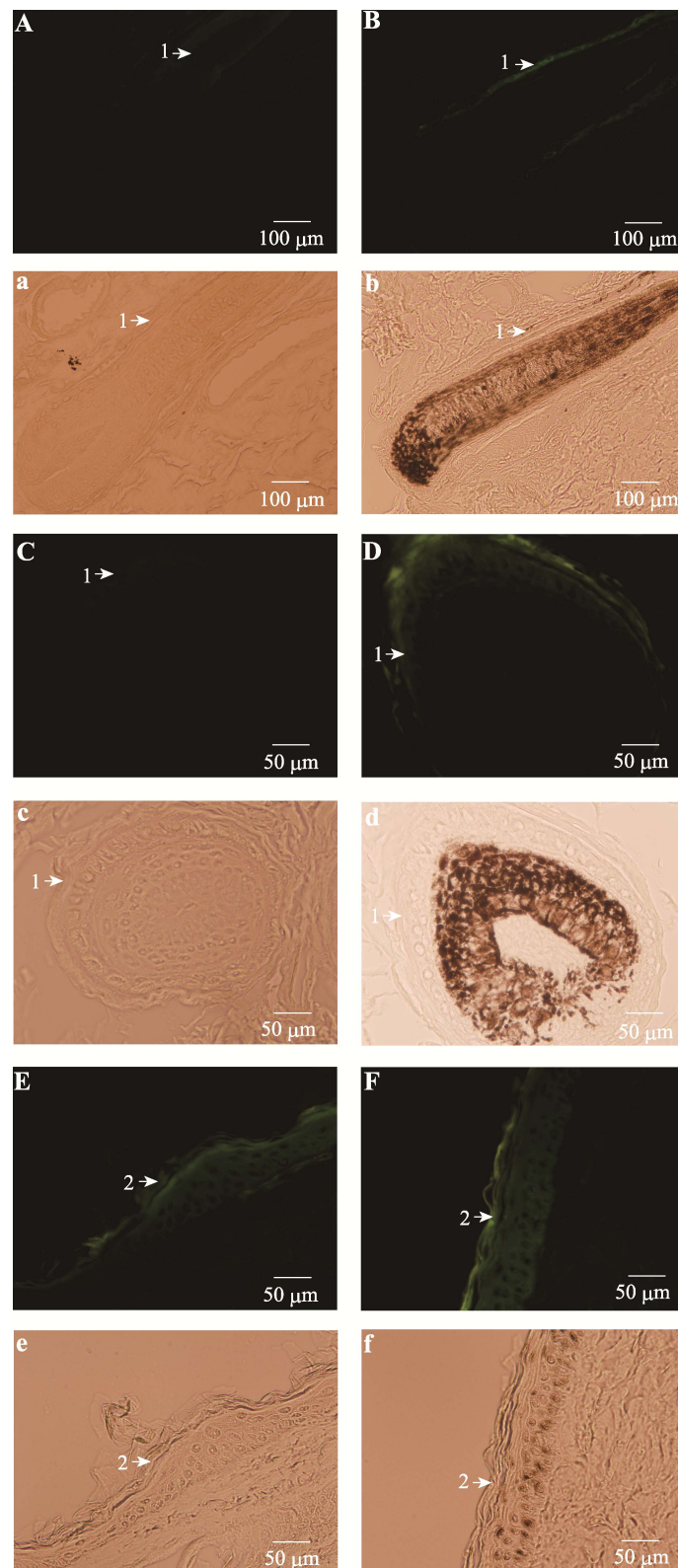


图 4 不同毛色绵羊皮肤组织中 *GPR143* 的免疫荧光图

Fig.4 Immunofluorescence results of *GPR143* in sheep skin tissues with different coat colors

A、C、E：白色绵羊皮肤组织 *GPR143* 阳性组；B、D、F：黑色绵羊皮肤组织 *GPR143* 阳性组；a、c、e：白色绵羊皮肤组织明场视野图；b、d、f：黑色绵羊皮肤组织明场视野图。1：外根鞘；2：表皮。

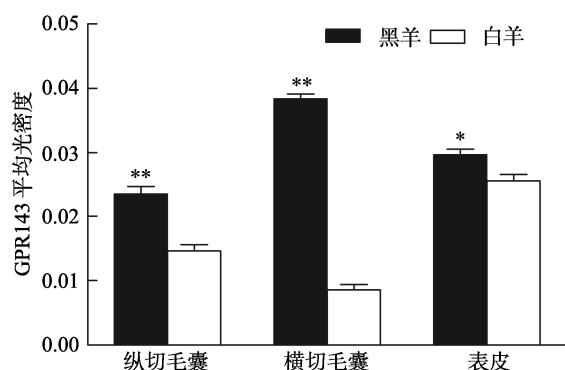


图 5 不同毛色绵羊皮肤组织中 GPR143 的光密度值分析

Fig.5 Average optical density analysis of GPR143 in skin of sheep with different coat colors

* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ 。

值来抑制多囊胞内体与溶酶体的融合, GPR143 延迟多囊胞内体与溶酶体的融合, 从而能给黑色素合成酶和随后的黑色素沉积留出时间。综上所述, GPR143 可能通过调控黑色素细胞中 MITF 的表达水平和黑素体的数量、大小、运动和成熟来影响毛色差异的形成, 已知黑素体生物合成多和黑色素生成相关, 但 GPR143 具体如何通过 MITF 的表达水平影响黑色素生成的作用机制还需进一步研究。

参考文献(References):

- [1] Bassi MT, Schiaffino MV, Renieri A, De Nigris F, Galli L, Bruttini M, Gebbia M, Bergen AAB, Lewis RA, Ballabio A. Cloning of the gene for ocular albinism type 1 from the distal short arm of the X chromosome. *Nat Genet*, 1995, 10(1): 13–19.
- [2] Fukuda N, Naito S, Masukawa D, Kaneda M, Miyamoto H, Abe T, Yamashita Y, Endo I, Nakamura F, Goshima Y. Expression of ocular albinism 1 (OA1), 3, 4- dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA) receptor, in both neuronal and non-neuronal organs. *Brain Res*, 2015, 1602: 62–74.
- [3] Schiaffino MV, Baschiroto C, Pellegrini G, Montalti S, Tacchetti C, De Luca M, Ballabio A. The ocular albinism type 1 gene product is a membrane glycoprotein localized to melanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(17): 9055–9060.
- [4] Schiaffino MV, d'Addio M, Alloni A, Baschiroto C, Valletti C, Cortese K, Puri C, Bassi MT, Colla C, De Luca M, Tacchetti C, Ballabio A. Ocular albinism: evidence for a defect in an intracellular signal transduction system. *Nat Genet*, 1999, 23(1): 108–112.
- [5] Samaraweera P, Shen B, Newton JM, Barsh GS, Orlow SJ. The mouse ocular albinism 1 gene product is an endolysosomal protein. *Exp Eye Res*, 2001, 72(3): 319–329.
- [6] Newton JM, Orlow SJ, Barsh GS. Isolation and characterization of a mouse homolog of the X-linked ocular albinism (OA1) gene. *Genomics*, 1996, 37(2): 219–225.
- [7] Surace EM, Angeletti B, Ballabio A, Marigo V. Expression pattern of the ocular albinism type 1 (Oa1) gene in the murine retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(13): 4333–4337.
- [8] Vetrini F, Auricchio A, Du JY, Angeletti B, Fisher DE, Ballabio A., Marigo V. The microphthalmia transcription factor (Mitf) controls expression of the ocular albinism type 1 gene: link between melanin synthesis and melanosome biogenesis. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(15): 6550–6559.
- [9] Schiaffino MV, Tacchetti C. The ocular albinism type 1 (OA1) protein and the evidence for an intracellular signal transduction system involved in melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res*, 2005, 18(4): 227–233.
- [10] Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B. The metabolic and molecular bases of inherited disease (8th ed). New York, Montreal: McGraw-Hill, 2001.
- [11] Garner A, Jay BS. Macromelanosomes in X-linked ocular albinism. *Histopathology*, 1980, 4(3): 243–254.
- [12] Wong L, O'Donnell FE, Richard Green W. Giant pigment granules in the retinal pigment epithelium of a fetus with X-linked ocular albinism. *Ophthalmic Paediatr Genet*, 1983, 2(1): 47–65.
- [13] O'Donnell Jr FE, Hambrick GW, Richard Green W, Iliff WJ, Stone DL. X-linked ocular albinism: an oculocutaneous macromelanosomal disorder. *Arch Ophthalmol*, 1976, 94(11): 1883–1892.
- [14] Schnur RE, Gao M, Wick PA, Keller M, Benke PJ, Edwards MJ, Grix AW, Hockey A, Jung JH, Kidd KK, Kistenmacher M, Levin AV, Lewis RA, Musarella MA, Nowakowski RW, Orlow SJ, Pagon RS, Pillers DAM, Punnett HH, Quinn GE, Tezcan K, Wagstaff J, Weleber RG. OA1 mutations and deletions in X-linked ocular albinism. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(4): 800–809.
- [15] Schiaffino MV, Dellambra E, Cortese K, Baschiroto C, Bondanza S, Clementi M, Nucci P, Ballabio A, Tacchetti C, De Luca M. Effective retrovirus-mediated gene transfer in normal and mutant human melanocytes. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(8): 947–957.
- [16] Palmisano I, Bagnato P, Palmigiano A, Innamorati G, Rotondo G, Altimare D, Venturi C, Sviderskaya EV, Pic-

- cirillo R, Coppola M, Marigo V, Incerti B, Ballabio A, Surace EM, Tacchetti C, Bennett DC, Schiaffino MV. The ocular albinism type 1 protein, an intracellular G protein-coupled receptor, regulates melanosome transport in pigment cells. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(22): 3487–3501.
- [17] Cortese K, Giordano F, Surace EM, Venturi C, Ballabio A, Tacchetti C, Marigo V. The ocular albinism type 1 (*OAI*) gene controls melanosome maturation and size. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(12): 4358–4364.
- [18] Giordano F, Bonetti C, Surace EM, Marigo V, Raposo G. The ocular albinism type 1 (*OAI*) G-protein-coupled receptor functions with MART-1 at early stages of melanogenesis to control melanosome identity and composition. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(23): 4530–4545.
- [19] Piccirillo R, Palmisano I, Innamorati G, Bagnato P, Altimare D, Schiaffino MV. An unconventional dileucine-based motif and a novel cytosolic motif are required for the lysosomal and melanosomal targeting of *OAI*. *J Cell Sci*, 2006, 119(10): 2003–2014.
- [20] Basrur V, Yang F, Kushimoto T, Higashimoto Y, Yasumoto KI, Valencia J, Muller J, Vieira WD, Watabe H, Shabanowitz J, Hearing VJ, Hunt DF, Appella E. Proteomic analysis of early melanosomes: identification of novel melanosomal proteins. *J Proteome Res*, 2003, 2(1): 69–79.
- [21] Falletta P, Bagnato P, Bono M, Monticone M, Schiaffino MV, Bennett DC, Goding CR, Tacchetti C, Valetti C. Melanosome-autonomous regulation of size and number: the *OAI* receptor sustains PMEL expression. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2014, 27(4): 565–579.
- [22] Fitzpatrick TB, Breathnach AS. The epidermal melanin unit system. *Dermatol Wochenschr*, 1963, 147: 481–489.
- [23] Slominski A, Wortsman J, Plonka PM, Schallreuter KU, Paus R, Tobin DJ. Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(1): 13–21.
- [24] Cui J, Shen LY, Wang GC. Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo. *J Invest Dermatol*, 1991, 97(3): 410–416.
- [25] Schiaffino MV. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(7): 1094–1104.
- [26] Vachtenheim J, Borovanský J. “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Exp Dermatol*, 2010, 19(7): 617–627.
- [27] Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the *Microphthalmia* transcription factor network. *Annu Rev Genet*, 2004, 38(1): 365–411.
- [28] Burgoyne T, Jolly R, Martin-Martin B, Seabra MC, Piccirillo R, Schiaffino MV, Futter CE. Expression of *OAI* limits the fusion of a subset of MVBs with lysosomes—a mechanism potentially involved in the initial biogenesis of melanosomes. *J Cell Sci*, 2013, 126(22): 5143–5152.

(责任编辑: 蒋思文)