

委託研究報告書

テーマ名：

白色化 B-16 メラノーマ 細胞のメラニン再生促進系への天然素材混成物の抑制効果とその作用メカニズムの解析

● 委託研究依頼者：

株式会社ルバンシユ

● 報告書作成責任者：

東京工科大学応用生物学部

教授・医学博士・芋川玄爾

平成22年3月31日

芋川玄爾印

B-16 細胞色素再生系を用いた
天然素材混成物の美白メカニズムの解析

東京工科大学応用生物学部
教授・医学博士・芋川玄爾

要旨

従来美白剤にはメラニン合成主要酵素のチロシナーゼ阻害活性を有する物質を利用しているが、実際にメラニン合成が起きる唯一の細胞内器官であるメラノソーム内でチロシナーゼが阻害を受け、メラニン合成が抑制されているという証拠は少ない。本研究では増殖能の高い Mouse B-16 メラノーマ色素細胞 (B-16 細胞) を使用し、B-16 細胞を糖合成阻害により白色化を誘導した後の糖合成阻害解除によって生じる同調した色素回復過程を利用して、新規の天然素材混成物（以後白金ナノコロイド混成液(Pt)と記載する）の美白作用の程度を解析しまたその美白メカニズムを、主にチロシナーゼ蛋白及び酵素活性の細胞内分布挙動及びメラニン合成関連遺伝子への影響を調べることにより解析した。糖合成阻害誘導白色化 B-16 細胞の色素回復過程において、最適美白濃度と判定した 7.6ppm 濃度の Pt 添加(1mM Tp+)2 日目の白色化細胞ペレットから、細胞分画法によりメラノソームリッチ(Large granule fraction : LGF)分画、小顆粒リッチ(Small granule fraction : SGF)分画、サイトゾルリッチ(Supernatant : Sup)分画に分けた後、チロシナーゼ酵素活性測定、SDS-PAGE-Dopa 反応、Western Blotting 法によりチロシナーゼ酵素の細胞内分布を解析した。その結果、Pt において LGF でチロシナーゼ酵素活性、T3 及びチロシナーゼ蛋白は Control に対し有意に低下した。0.1%グルコサミン処理により作成した白色化 B-16 細胞に Pt を添加し、24 h 後までのメラニン合成関連蛋白 (Tyrosinase、TRP-1、2、Pmel17、ETAR, ETBR) 遺伝子の発現量を real-time RT-PCR 法により解析した結果、Pt では 6 種すべての遺伝子発現への大きな影響は認められなかった。以上の結果 Pt ではチロシナーゼ蛋白の減少が遺伝子発現の抑制を伴わずに生じていることからチロシナーゼのプロテオソーム上での分解促進がその美白メカニズムに関与している可能性が示唆された。

緒言

皮膚の肌の色を決め、シミの本体でもあるメラニン色素は、皮膚の表皮最下層（基底層）にある色素細胞のメラノサイトで生成される。メラノサイト内の小顆粒メラノソームにおいて、チロシナーゼ酵素の働きでチロシンを基質として種々中間体を経て高分子重合体のメラニンが作られる。メラニン化メラノソームはメラノサイトへの樹枝上突起からケラチノサイトに転送され、メラノソームコンプレックスとして角化過程においてケラチノサイト内で分解を受けながら、最終的には角層として排泄される。細胞内でのメラニン生成メカニズムは、核でチロシナーゼの遺伝情報が mRNA に転写され、その mRNA をもとにリボソームでチロシナーゼ蛋白が合成される。その後、ゴルジ体で糖の付加を受け、被膜小胞によってメラノソームへと輸送されメラニン合成が開始される。その様子を以下の図-1 に示す。本研究では糖合成阻害剤であるグルコサミンによりゴルジ体でのチロシナーゼ酵素への糖合成阻害を行うことで白色化細胞を誘導し、グルコサミン除去によってメラノソームへのチロシナーゼ酵素の転送が再開されることによりメラニン初期合成過程が観察できる。グルコサミンによる糖合成阻害メカニズムを以下の図-2 に示す。この過程に美白剤の候補となるメラニン抑制剤を添加し、回復色素への効果を評価することにより、効率的に美白剤の候補選別ができる。また、従来の美白剤はメラニン合成主要酵素のチロシナーゼ阻害活性をその根拠にしているが、実際にメラニンの生成されるメラノソームで阻害効果が生じているという証拠はない。これに対し、本研究ではメラノーマ細胞を細胞分画により細胞小器官に分けてチロシナーゼ酵素の働きを検証するため、美白剤添加によりメラノソームでの抑制がどの程度あるのか、またどのようなメカニズムでメラニン生成抑制がされているのかを解析することができる。この方法を用いて、新規の美白用処方候補である天然素材混成物（以後白金ナノコロイド混成液(Pt)と記載する）の美白効果メカニズムを解析した。

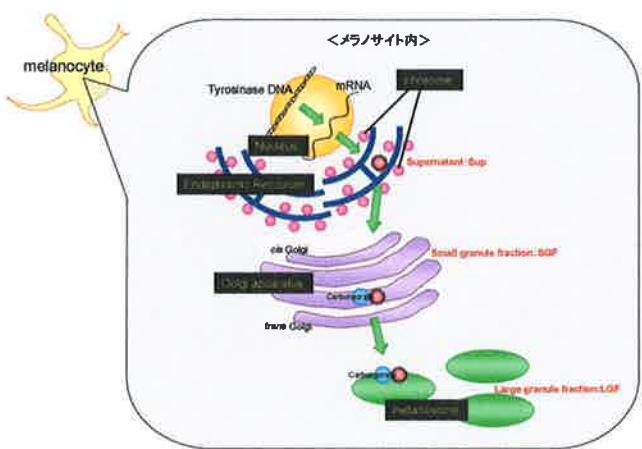


図-1 メラニン合成メカニズム

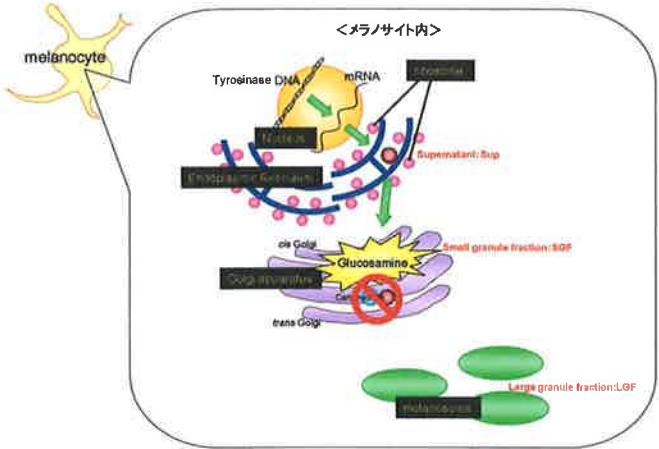
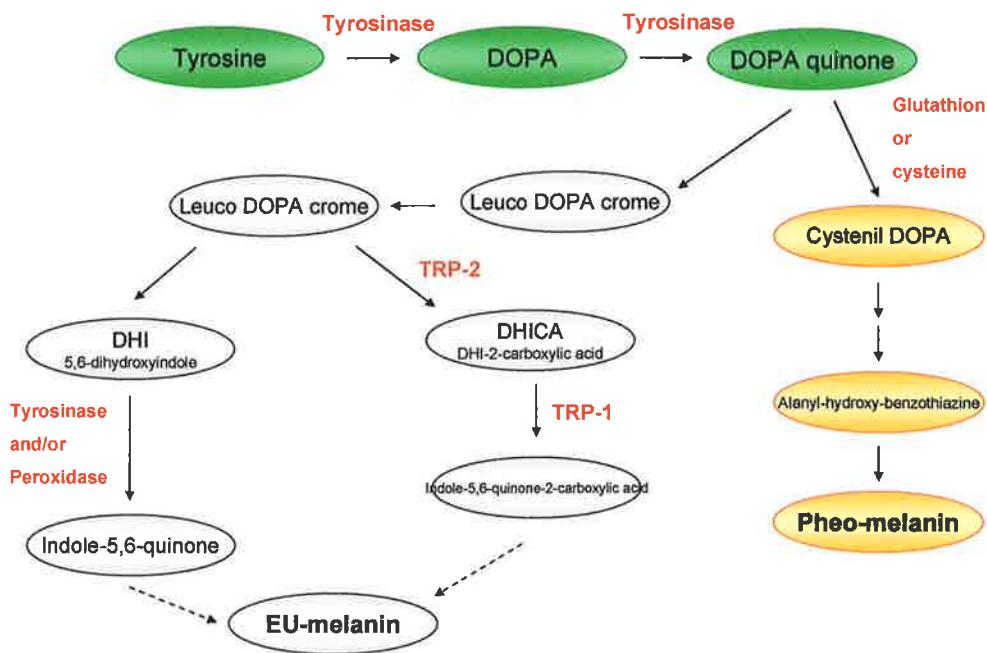


図-2 Glcによる糖合成阻害メカニズム

メラニン生合成経路

図-3に示す如く、メラニン合成は、アミノ酸の一つであるチロシンを基質としてチロシナーゼにより、ドーパ (tyrosin hydroxylase 活性)、ドーパキノン (Dopa oxidase 活性) へと代謝される。この最初の反応がメラニン合成の律速段階といわれている。チロシナーゼにはさらに第三の作用点である DHI オキシダーゼ活性も認められている。

ドーパキノン以降の反応は大きく 2 つの経路に分かれる。ドーパキノンにシステイン (あるいはグルタチオン) が結合し、システィルドーパへと代謝され、さらに数段階の反応を経てフェオメラニンが生成する。一方、ユウメラニン経路では、ドーパキノンが leuco ドーパクロムを経てドーパクロムに酸化された後、さらに 2 つの経路に分岐する。一つは、ドーパクロムトートメラーゼ (tyrosinase-related protein 2, TRP-2) により DHICA (5,6-dihydroxy-indole-2-carboxylic acid) に変換され、さらに DHICA オキシダーゼ (tyrosinase-related protein 1, TRP-1) による DHICA の酸化後、最終的に重合反応によってユウメラニンが生成する経路である。もう一方は、ドーパクロムから自動酸化で DHI (5,6-dihydroxy-indole) を経由した後、さらにチロシナーゼの作用によりインドール-5,6-キノンに変換され、重合反応によりユウメラニンが生成する経路である。



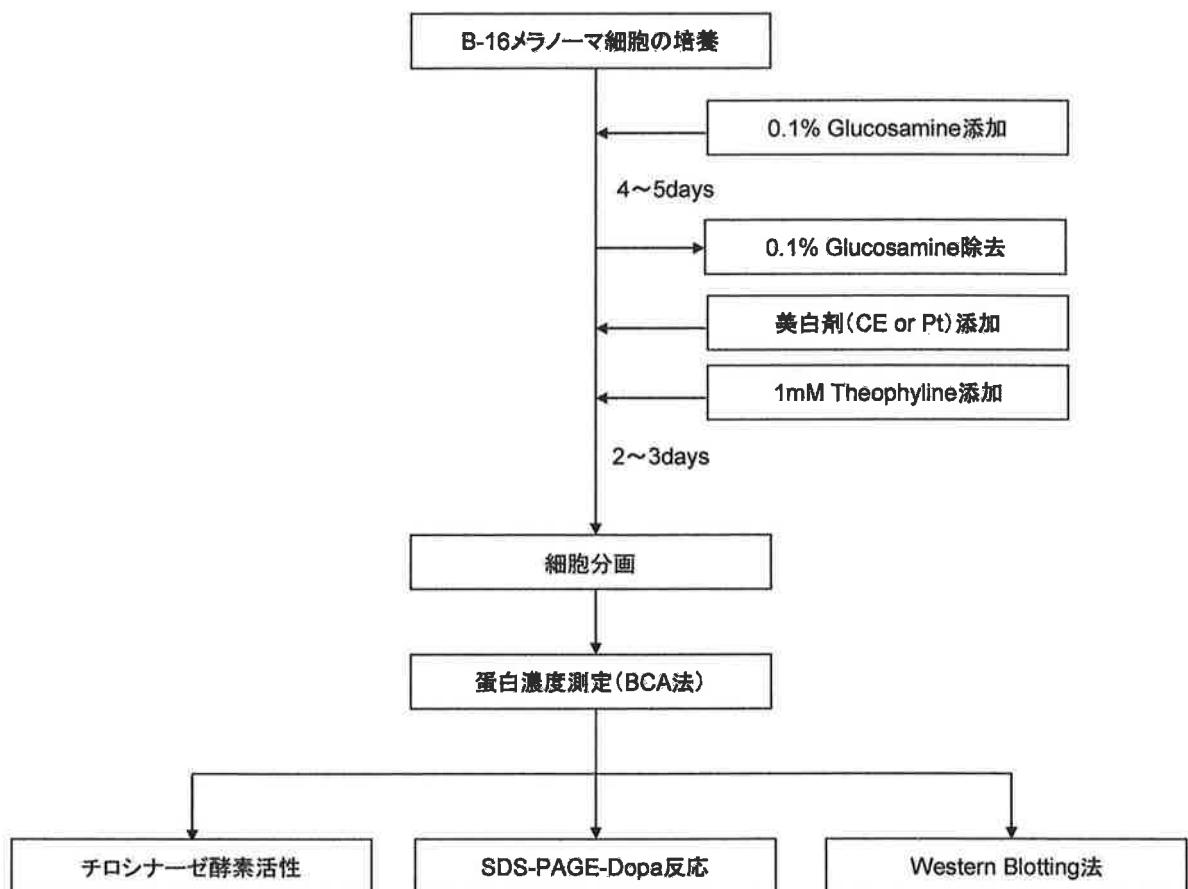
図・3 メラニン生合成経路

メラニン輸送

成熟したメラノソーム上には膜輸送の制御に関わる低分子量 G タンパク質 Rab27A が特異的に存在し、ここにエフェクターと呼ばれる結合分子 Slac2-a 及びモーター蛋白質ミオシン Va が結合し、Rab27A・Slac2-a・ミオシン Va の三者複合体が微小管からアクチン線維へのメラノソームの受け渡し、さらにはアクチン線維上のメラノソーム輸送に大きく関わっている。その後、Rab27A は次のエフェクター分子 Slp2-a の機能により輸送されてきたメラノソームを細胞膜につなぎ止め、隣接する皮膚や髪の毛の細胞にメラノソームを受け渡しやすくする機能も有している。つまり、Rab27A は Slac2-a、Slp2-a という二種類のエフェクター分子を連続的に用い、メラノソームをメラノサイトの核周辺から細胞膜まで輸送している。

実験方法

<実験の流れ>



1. 細胞培養

本実験では Mouse 黒色 B16 F10 メラノーマ細胞 (B-16 細胞) を使用した。この B-16 メラノーマ細胞を L-グルタミンおよび Sodium Bicarbonate を含む Eagle's MEM に仔牛血清を加えた培地(medium)にて継代培養した。

<美白効果の確認>

ペレット化した B-16 細胞に medium 10ml を添加しよくピペッティングし細胞溶液を作成した。10cm シャーレ約 30-50 個に medium 9ml、1% Glucosamine 1ml、細胞溶液 40 μ l を添加し、4 日間培養した (ゴルジ装置における糖合成阻害)。細胞がシャーレ内で 50 ~60%程度育ち次第 medium 及び 1% Glucosamine を除去した。その後、以下の培地を添加し 37°C CO₂ インキュベーター内で 2~3 日間培養した。培養後、細胞を pellet 化し細胞の色を確認した。

- medium 10ml : 糖合成回復 2 日目 Control とした。
- 3% CE+ medium 10ml : 糖合成回復 2 日目 CE+とした。
- medium 10ml : 糖合成回復 3 日目 Control とした。
- medium 8ml、45.4ppm Pt 溶液 2ml : 糖合成回復 3 日目 Pt+とした。

<有効濃度の決定>

上記と同様に Glucosamine によって白色化を誘導した細胞がシャーレ内で 50~60%程度育ち次第 medium 及び 1% Glucosamine を除去した。その後、以下の培地を添加し 37°C CO₂ インキュベーター内で 2~3 日間培養した。培養後、細胞を pellet 化し細胞の色を確認した。

白金ナノコロイド混成液【Pt】:

BG 及びエタノール無添加液を用いた。

<糖合成回復 3 日目>

- medium 8ml、滅菌水 2ml : Control とした。
- medium 8ml、45.4ppm Pt 溶液 2ml : 9.1ppm Pt+とした。
- medium 8.7ml、45.4ppm Pt 溶液 1.3ml : 6.1ppm Pt+とした。
- medium 9ml、45.4ppm Pt 溶液 1ml : 3.0ppm Pt+とした。
- medium 7.5ml、滅菌水 2ml、20mM Theophyline 0.5ml : Control(1mM Tp+)とした。
- medium 7.5ml、45.4ppm Pt 溶液 2ml、20mM Theophyline 0.5ml : 9.1ppm Pt+(1mM Tp+)とした。
- medium 8.33ml、45.4ppm Pt 溶液 0.67ml、20mM Theophyline 0.5ml : 3.0ppm Pt+(1mM Tp+)とした。

2. 細胞分画法

Pt は有効濃度を 7.6ppm 添加に決定後、糖合成回復 2 日目 Control(1mM Tp+)、7.6ppm Pt+の各サンプルを 30・50 シャーレずつ用意し、細胞を回収後以下の方針を用いて細胞分画を行った。

<培地組成>

- Control(1mM Tp+) : medium 7.83ml、滅菌水 1.67ml、20mM Theophyline 0.5ml
- 7.6ppm Pt+(1mM Tp+) : medium 7.83ml、45.4ppm Pt 溶液 1.67ml、20mM Theophyline 0.5ml

細胞分画法の実験手順を以下の図-4 に示す。

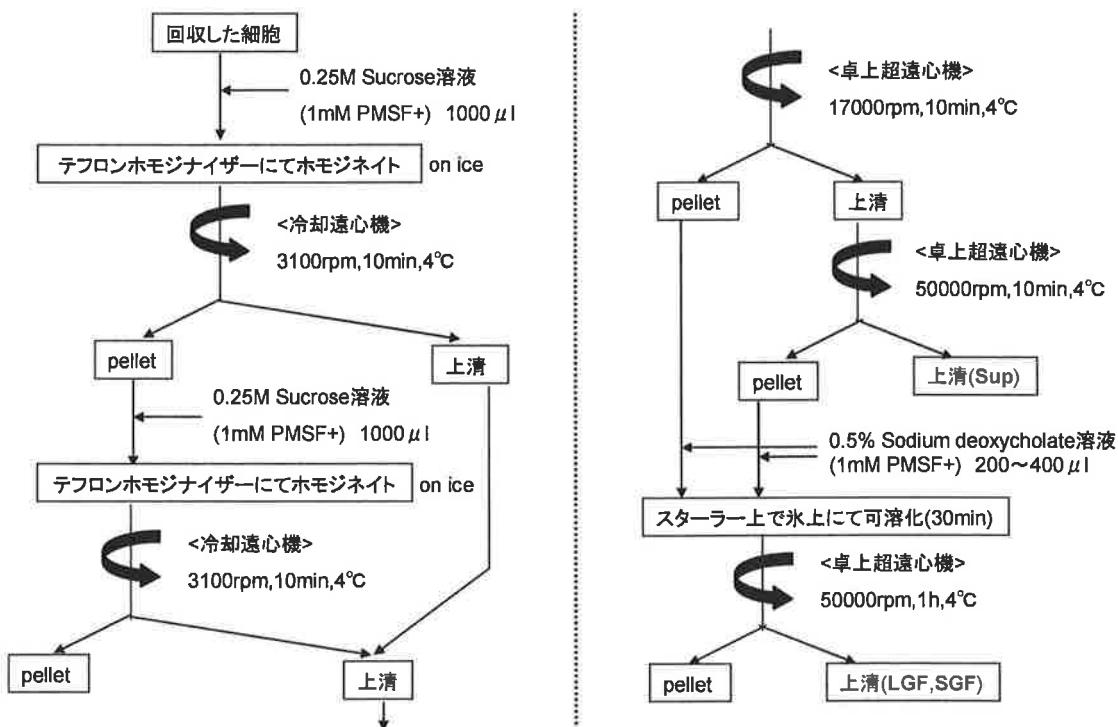


図-4 細胞分画法

3. 蛋白濃度測定 (BCA 法)

細胞分画で得た通常 B-16、0day、Control、Pt の各 LGF、SGF、Sup の計 12 サンプルを氷上で解凍後、各サンプル 10 μ l に各溶媒 (0.25M Sucrose(1mM PMSF+) または 0.5% Sodium Deoxycholate(1mM PMSF+)) 90 μ l を添加し 10 倍希釈する。96 穴マイクロプレートに各濃度の BSA 溶液 (0 μ g/ml、100 μ g/ml、200 μ g/ml、500 μ g/ml、1000 μ g/ml) と 10 倍希釈した各サンプルを 25 μ l \times 3 ウエルずつアプライし、それぞれに BCA 溶液 200 μ l を素早く加えた。その後 インキュベーターで 37°C、30 分間反応させた。マイクロプレートリーダーにより 562nm で吸光度を測定し、得られた BSA 溶液のデータより検量線を作成し 検量線をもとに各サンプルの LGF、SGF、Sup の蛋白濃度を決定。

4. チロシナーゼ酵素活性測定法

4-1. チロシナーゼ酵素活性測定の原理

メラノソーム内のチロシンはチロシナーゼ酵素により酸化されドーパになり、ドーパはさらに酸化されてドーパキノンになり、その後酸化・重合され種々中間体を経て高分子重合体のメラニンが作られる。このように、チロシナーゼはチロシン及びドーパを酸化する 2 つの作用がある。今回ドーパを基質としたドーパオキシダーゼ活性を指標とし、チロシナーゼの酵素活性を測定する。ドーパオキシダーゼにより酸化された基質のドーパは MITF (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrozone) との反応により赤色を呈することから、505nm の吸光度を測定することにより活性を測定できる。活性が高いほど反応は進み赤色は強くなる。

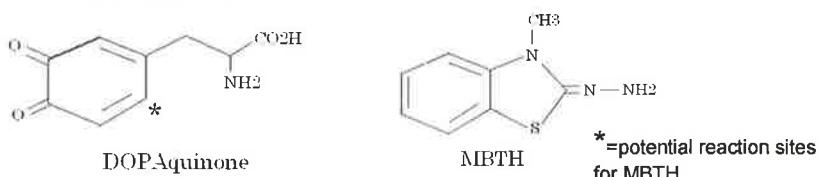
吸光度：特定の波長の光は、ある物質の溶解している溶液中を通過しているとき吸収されることが知られている。入射光の強度を I_0 として、ある物質の溶解している溶液中を通過したときにその強さが 1 に変化した場合、 $1/I_0$ を透過度 t という。吸光度 A は $A = -\log t$, $t = \log I_0$ である。

4-2. チロシナーゼ酵素活性測定法

以下の図-5にチロシナーゼ酵素活性測定法の概要を示す。

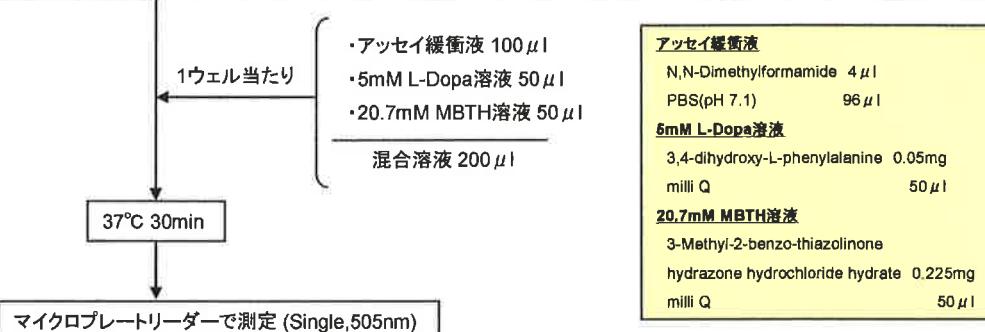
<原理>

チロシナーゼはチロシンとドーパを酸化する2つの作用を有している。今回はドーパを酸化する作用の活性を指標としてチロシナーゼ活性を測定する。**ドーパキノン**はMBTHと反応し赤色を呈するので、505nmで吸光度を測定することでチロシナーゼ酵素活性が測定できる。



<実験方法>

96ウェルマイクロプレートにSample及びプランク(0.5% Sodium deoxycholate, 0.25M Sucrose)を20μlずつアプライ(n=3)



<解析方法>

吸光度からプランクの値を引き、20μl中のタンパク濃度で割る

図-5 チロシナーゼ酵素活性測定法の概要

各サンプルの LGF 及び SGF を溶媒である 0.5% Sodium Deoxycholate(1mM PMSF+)で 2 倍希釈する。その後、96 穴マイクロプレートに各サンプルの LGF、SGF、Sup を 20 μl×3 ウェルずつアプライし、アッセイ緩衝液 6000 μl、5mM L-Dopa 溶液 3000 μl、20.7mM MBTH 溶液 3000 μl の順に混合した混合溶液を 200 μlずつアプライした。また、プランクとして 0.25M Sucrose 溶液 (1mM PMSF+) および 0.5% Sodium Deoxycholate 溶液 (1mM PMSF+) を 20 μl×3 ウェルずつアプライし、同様に混合溶液を 200 μl ずつアプライした。その後インキュベーターで 37°C、30 分間反応させた。マイクロプレートリーダーにより 505nm で吸光度を測定した。吸光度からプランク値を引き蛋白濃度で割ったものをチロシナーゼ酵素活性とした。

5. SDS-PAGE-Dopa 反応

5-1. SDS-PAGE-Dopa 反応の原理

蛋白質は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかけることで安定化され、分子量に従って分離させることができる。0.1%Dopa を含むリン酸緩衝液にゲルを浸し、反応させる。ここでゲル中のチロシナーゼ蛋白質と Dopa が反応し黒色に見える。

一般に蛋白質は負に帯電しており、電場に入るとプラスに引きつけられる。ポリアクリルアミドは一定の網目状の支持体であり、蛋白質は網目の通りやすいものほど移動する。負の荷電を持つ界面活性剤 SDS (Sodium dodecyl sulfate) を蛋白質に作用させると、SDS は蛋白質に結合し、蛋白質の立体構造を破壊して直鎖状の状態にする。従って、SDS 存在下では蛋白質の移動度はほぼ分子量にのみ依存し、分離することができる。

5-2. SDS-PAGE-Dopa 反応の測定法

以下の図-6 に SDS-PAGE-Dopa 反応の概要を示す。

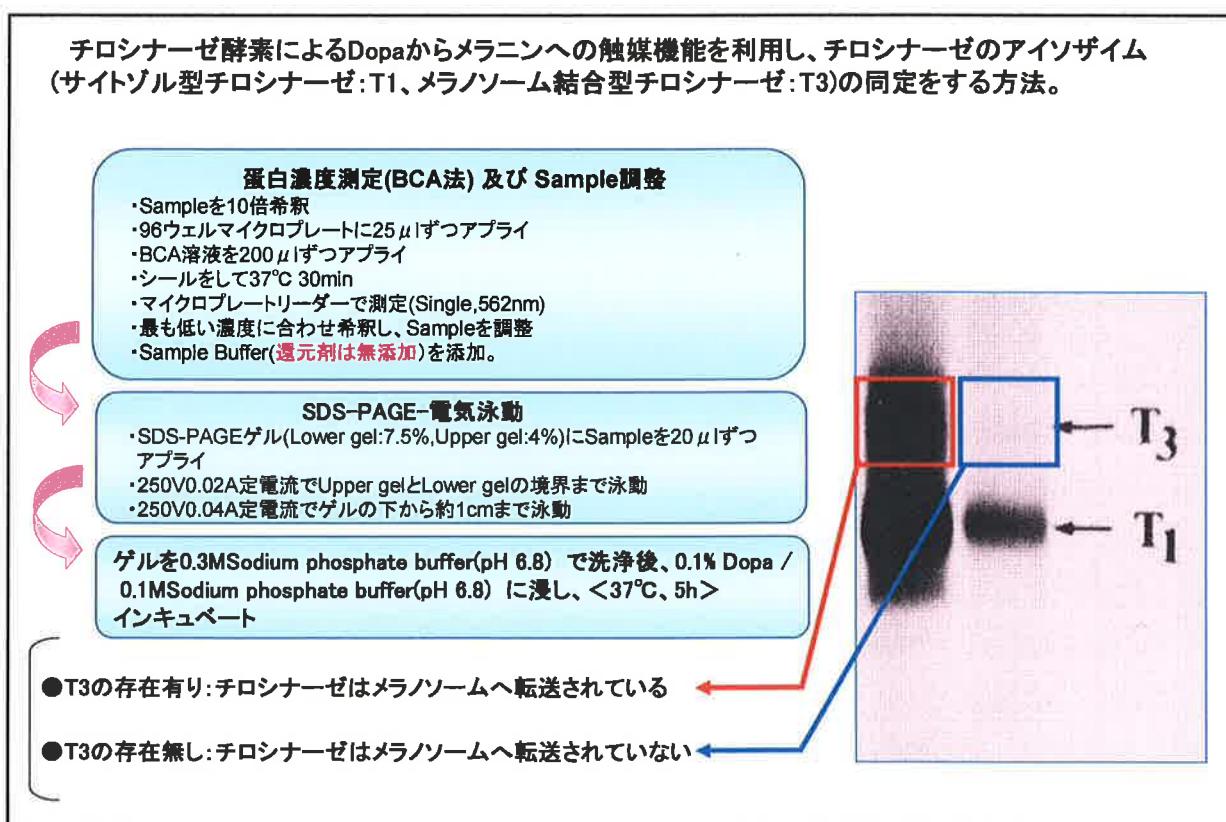


図-6 SDS-PAGE-Dopa 反応の概要

5 – 1. 7.5% SDS-PAGE ゲル及びサンプル作成

表 1 分離ゲル (Lower gel) の濃度と試薬添加量 (2 枚分)

ゲル濃度	6%	7.5%	8%	10%
milliQ	8.05ml	7.3ml	7.05ml	6.05ml
1.5M Tris-HCl(pH8.8)	3.75ml	3.75ml	3.75ml	3.75ml
30% Acrylamide	3ml	3.75ml	4ml	5ml
10% SDS	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l
TEMED	12 μ l	12 μ l	12 μ l	12 μ l
25% APS	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l

表 2 濃縮ゲル (Upper gel) の試薬添加量 (2 枚分)

ゲル濃度	4%
milliQ	4.55ml
0.5M Tris-HCl(pH8.8)	1.875ml
30% Acrylamide	1ml
10% SDS	7.5 μ l
TEMED	6 μ l
25% APS	25 μ l

表 1 に記した 7.5%用の分量により、分離ゲル溶液をスターラーで攪拌しながら作成した。作成したゲルを、あらかじめ設置しておいた 2 枚のガラス板の隙間に上部 3cm のところまでピペットを使用し流し込んだ。ゲルを平行にするため milliQ 200 μ l をガラス中央部より注入。分離ゲルが固まったら milliQ を取り除き、表 2 の分量で作成した濃縮ゲル溶液をガラス板の隅から分離ゲルの上にピペットを使って流し込む。このとき濃縮ゲルはガラス板から溢れるまで入れ、気泡がないように 10 ウェルのコームを静かに差し込む。その後、ゲルが固まるまで静置した。

分画した各サンプルの蛋白濃度を最低濃度のサンプルの蛋白濃度に合わせた。その後、各サンプル 25 μ l に Dopa 反応用 5×Sample buffer(0.125M Tris-HCl, 50% glycerol, 10% SDS, 0.01% bromophenol blue)を 6.25 μ l ずつ添加した。

5 – 2. SDS 電気泳動

作成したゲルからコームを抜き、電機泳動槽に設置した。1×泳動 buffer を泳動槽に注いだ。その後、各ウェルに分子量マーカー $12\mu\text{l}$ 、各サンプル $12\mu\text{l}$ アプライし、空きのウェルには Dopa 用 1×Sample buffer をアプライし、 $<100\text{V}, 0.01\text{A}>$ 定電流で 1 時間泳動した。

5 – 3. Dopa 反応

電気泳動後終了後、濃縮ゲルを切り捨て、分離ゲルを 0.3M Sodium phosphate buffer で 2 回洗浄。洗浄後、0.1% Dopa 溶液にゲルを浸し、 37°C の乾燥機で 5 ~7 時間反応させた。

5 – 4. 取り込み

反応終了後、ゲルを透明なフィルムに挟み、スキャナで画像を取り込んだ。

6. Western Blotting 法

6 – 1. Western Blotting 法の原理

ウェスタンプロッティング法は、電気泳動の優れた分離能と抗原抗体反応の高い特異性を組み合わせて、タンパク質混合物から特定のタンパク質を検出する手法。細胞の全タンパク質を SDS を含む緩衝液で溶解抽出した後、SDS-PAGE 電気泳動にかけ、分子量に従って分離展開する。つぎにゲル面に直接電圧をかけてゲル中のタンパク質のバンドをメンブレンに転写する (blotting) する。メンブレンには、タンパク質が結合しやすい疎水性の高いニトロセルロースやさらに疎水性に優れた PVDF (Polyvinylidene difluoride) が用いられる。わざわざメンブレンに移すのは、抗原抗体反応等を利用して特異的検出（目的のタンパク質だけを検出）を行う為。ゲルのままではせっかく分離したタンパク質が検出反応中に拡散したり、抗体がゲルの中に入り込んで反応するのに時間を要したり、その溶液容量も多量に必要となってしまう。メンブレン上ならタンパク質は固定され、抗体はメンブレン表面のタンパク質と反応でき、その溶液容量も少量で済むという利点がある。メンブレンへの抗体の非特異的結合を防ぐためにスキムミルクなどでブロッキングを行った後、目的とするタンパク質に対する抗体（一次抗体）を接触させ膜上で抗原抗体複合体を形成させる。これをアルカリフォスファターゼなどの酵素で標識した二次抗体で検出する。

6 – 2 . Western Blotting 法の概要

以下の図-7 に Western Blotting 法の概要を示す。

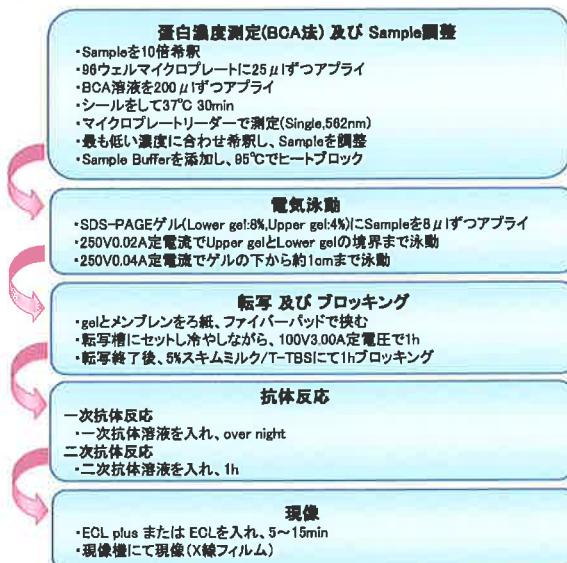


図-7 : Western Blotting の実験手順

6 – 2 – 1 . 8%ゲル及びサンプル作成

表1、表2を参考にして 15 ウェルの 8%ゲルを作成した。分画した各サンプルの蛋白濃度を最低濃度のサンプルの蛋白濃度に合わせた。その後、各サンプル 50 μl に Western Blotting 用 5×Sample buffer 12.5 μl ずつ添加し、95°C 5 分間ヒートブロックを行った。

6 – 2 – 2 . SDS 電気泳動

各ウェルに分子量マーカー 8 μl、各サンプル 8 μl をアプライし、空きのウェルには 1×Sample buffer を 8 μl ずつアプライし、電気泳動を行った。サンプルが分離ゲルと濃縮ゲルの境界までは<250V, 0.02A>定電流、その後は電流 <250V, 0.04A>定電流で泳動した。

6 – 2 – 3 . 転写

ファイバーパッド、ろ紙を 1×転写バッファーに 30 分以上浸けた。メンブレンをメタノールに数分浸けた後、1×転写バッファーに交換した。その後、ファイバーパッド、ろ紙、電気泳動したゲル、メンブレン、ろ紙、ファイバーパッドの順にカセットにセットする。転写槽に 1×転写バッファーを入れ、カセット

をセットして転写槽を冷やしながら<100V, 3.00A>定電圧で1時間転写した。

6-2-4. ブロッキング

転写したメンブレンを Ponceau S に1分間浸し染色し、必要な部分を切り取った。その後、メンブレンの赤色が出なくなるまで、T-TBS で洗浄。T-TBS を捨て、5%スキムミルク/T-TBS にメンブレンを浸し、シーソーシェイカーで1時間振盪しブロッキングを行った。

6-2-5. 1次抗体反応

5% スキムミルク/T-TBS を捨て、1×T-TBS で洗浄した(1min-15min-5min-5min)。

Can Get Signal Solution 1(TOYOBONKB-201)で1次抗体を希釈し、2000 μlずつメンブレンに添加して一晩振盪反応させた。

- Tyrosinase <3000倍希釈>
- Rab27<1000倍希釈>
- TRP-1<5000倍希釈>
- TRP-2<5000倍希釈>

※使用1次抗体

Tyrosinase : Mouse anti-Tyrosinase (invitrogen)

Rab27 : Rabbit anti-Rab27

TRP-1 : Goat anti-TRP-1

TRP-2 : Goat anti-TRP-2

6-2-6 次抗体反応

1次抗体を取り除き、1×T-TBS で洗浄した(1min-15min-5min-5min)。

Can Get Signal Solution 2(TOYOBONKB-301)で2次抗体を希釈し、2000 μlずつメンブレンに添加して1時間振盪反応させた。

- ECL anti-Mouse IgG (Tyrosinase) <30000倍希釈>
- ECL anti-Rabbit IgG (Rab27) <10000倍希釈>
- ECL anti-Goat IgG (TRP-1) <50000倍希釈>
- ECL anti-Goat IgG (TRP-2) <50000倍希釈>

6-2-7. 検出反応

ECL または ECL plus をメンブレンの蛋白が転写されている面に添加し、5分から15分振盪反応させた。

- ECL…A液とB液を1:1の割合で混合 (GE Healthcare 2106)

○ ECL plus…A 液と B 液を 40: 1 の割合で混合 (GE Healthcare 2132)
その後、適当な大きさにカットした透明フィルムに水気を取ったメンブレンを挟み、現像用カセットにセロハンテープで貼り付けた。現像機の中にカセットを入れ、現像機の中で X 線フィルム(GE Healthcare 200-10)を取り出し、カセットに合わせて適度な時間露光させ、X 線フィルムを現像した。

7. 試薬調整

7-1. 細胞培養・細胞分画

MEM (10%FBS) 500ml×2 本

Eagle MEM (Nissui 05900) 9.4g を milliQ で溶解し 10 にメスアップし、500ml ビン 2 本に分けた。その後オートクレーブにかけ、グルタミン (Nissui 05908) 1 本にオートクレーブ済みの MEM を 5ml×2 本分 = 10ml 入れ、よく溶解させ、5ml ずつ戻す。Sodium Bicarbonate を 500ml に対して 10ml 入れた後、FBS (仔牛血清) を 500ml に対して 56.2ml 入れて 4°C で保存。

1% CE+ MEM (10%FBS) 500ml×1 本

Eagle MEM (Nissui 05900) 4.7g、珊瑚エキス (CE) 5g を milliQ で溶解し 500ml にメスアップし、500ml ビン 1 本に移した。その後オートクレーブにかけ、グルタミン (Nissui 05908) 1/2 本にオートクレーブ済みの MEM を 5ml 入れ、よく溶解させ 5ml 戻す。Sodium Bicarbonate を 10ml 入れた後、FBS (仔牛血清) を 56.2ml 入れて 4°C で保存。

Sodium Bicarbonate 100ml

NaHCO₃ (WAKO 191-01305) 7.5g を milliQ で溶解し 100ml にメスアップした後オートクレーブにかけ、常温で保存。

細胞凍結液 100ml

MEM (10%FBS) 90ml に Dimethyl Sulfoxide(DMSO)(WAKO 046-21981) を 10ml 入れピッティング。4°C で保存。

Trypsin/EDTA 100ml

Trypsin(GIBCO 27250-018) を 0.25g 、 4NaEDTA(DOJINDO 343-01883) 0.02g を 1×PBS で溶解し 100ml にメスアップ。ろ過滅菌した後に -20°C で保存。

10×PBS 1000ml

NaCl(WAKO 191-0665)	80g
KCl(WAKO 169-03542)	2g
Na ₂ HPO ₄ (WAKO 196-02835)	14.4g
KH ₂ PO ₄ (WAKO 169-04245)	2.4g

milliQ で溶解し 1000ml にメスアップ。常温保存。

1×PBS 1000ml

10×PBS100mlをmilliQで溶解し1000mlにメスアップし、常温保存。

20mM Theophyline 溶液 100ml

Theophyline(SIGMA T1633-50G)0.36gをmilliQ100mlに溶解し、ろ過滅菌した後4°C保存。

1% Glucosamine 溶液 100ml

D-(+)-Glucosamine hydrochloride(SIGMA G4875-100G)1gをmilliQ100mlに溶解し、ろ過滅菌した後4°C保存。

0.2M PMSF 溶液(Roche 10 837 091 001) 1ml

エッペンチューブにPMSF0.034gを計量し、1mlのDMSOで溶解した後一20°C保存。

0.5M Sucrose 溶液 100ml

Sucrose SigmaUltra>99.5%GC(SIGMA S7903-250G)17gをmilliQに溶解、100mlにメスアップ。4°C保存。

1% Sodium Deoxycholate 溶液 100ml

Sodium Deoxycholate(WAKO 192-08312)1gをmilliQに溶解、100mlにメスアップ。4°C保存。

0.25M Sucrose 溶液(1mM PMSF+) 10ml

0.5M Sucrose 溶液 5ml

milliQ 4.9ml

0.2M PMSF 100 μ l

0.5% Sodium Deoxycholate 溶液(1mM PMSF+) 100ml

1% Sodium Deoxycholate 溶液 5ml

milliQ 4.9ml

0.2M PMSF 100 μ l

7-2. 蛋白濃度測定 (BCA法)

BCA 溶液

BCA Protein Assay Reagent A : BCA Protein Assay Reagent B=50:1の割合で混合。

7-3. チロシナーゼ酵素活性測定

アッセイ緩衝液 10ml

N,N-Dimethylformamide·,for molecular biology,minimum99% 0.4ml

100mM Sodium phosphate buffer(pH7.1) 9.6ml

100mM Sodium phosphate buffer(pH7.1)

A : 100mM Na₂HPO₄ 溶液 <Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.58g+milliQ 100ml>

B : 100mM NaH₂PO₄ 溶液 <NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.56g+milliQ 100ml>

A に B を足していき pH7.1 に調整する

5mM L-Dopa 溶液 1ml

3,4-Dihidroxy-L-phenylalanine(SIGMA D9628-25G)1mg を milliQ 1ml に溶解。

20.7mM MBTH 溶液 1ml

3-methyl-2-benzothiazolinone hydrozone:MBTH 4.5mg を milliQ 1ml に溶解。

7-4. SDS-PAGE-Dopa 反応

1.5M Tris-HCl 溶液(pH8.8) 100ml (Lower gel 用)

Tris(WAKO 207-06275) 18.15g を milliQ で約 70ml に溶解し、塩酸(WAKO 080-01066)で pH8.8 に合わせ、milliQ で 100ml にメスアップ。4°C保存。

0.5M Tris-HCl 溶液(pH8.8) 100ml (Upper gel 用)

Tris (WAKO 207-06275) 6.05g を milliQ で約 70ml に溶解し、塩酸(WAKO 080-01066)で pH8.8 に合わせ、milliQ で 100ml にメスアップ。4°C保存。

30% ビスアクリルアミド溶液 100ml

Acrylamide(WAKO 011-08015) 29.2g

N-N'Methylenebisacrylamide(WAKO 138-06032) 0.8g

milliQ で溶解し 100ml にメスアップ。4°C保存。

10% SDS 溶液 100ml

Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)(WAKO 191-07145) 10g を milliQ で溶解し 100ml にメスアップ。常温保存。

TEMED

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine(WAKO 205-06313)

25% APS

Ammonium Peroxodisulfate(WAKO 012-08023) 50mg を milliQ 150 μl に溶解。

10×泳動バッファー 1000ml

Tris 30.3g

Glycine(WAKO 077-00735) 144.0g

SDS 10.0g

milliQ で溶解し 1000ml にメスアップ。常温保存。

1×泳動バッファー 1000ml

10×泳動バッファー100mlをmilliQで溶解し1000mlにメスアップ。常温保存。

5×Sample buffer (Dopa反応用 Sample buffer) 20ml

0.125M Tris-HCl(WAKO 010-17451) 2.423g

Glycerin 4ml

SDS 0.83g

Bromophenol Blue(WAKO 021-02911) 適量

milliQ20mlにメスアップ。

0.1% Dopa 溶液 100ml

3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine 0.1g

100mM Sodium phosphate buffer(pH6.8) 100ml

7-5. Western blotting 法

5×Sample buffer (Western blotting 用) 20ml

1M Tris-HCl 溶液(pH 6.8) 3.125ml

Glycerine 10ml

2-mercaptoethanol(WAKO 137-06862) 5ml

SDS 2.5g

Bromophenol Blue(WAKO 021-02911) 適量

milliQで溶解し20mlにメスアップ。-20°C保存

転写バッファー 1000ml

Tris 3.03g

Glycine 14.4g

メタノール 200ml

milliQで溶解し1000mlにメスアップ。常温保存。

10×T-TBS 1000ml

Tris 12.4g

Tris-HCl(WAKO 012-17455) 62.7g

NaCl 87.7g

milliQ約800mlに溶解し、塩酸でpH7.6に合わせmilliQで1000mlにメスアップ。常温保存。

1×T-TBS 1000ml

Tween20[Polyoxyethylene(20)SorbitanMonolaurate](WAKO 162-21112)

1g

10

×

T-TBS

100ml

milliQ

約

700ml

milliQ で 1000ml にメスアップ。常温保存。

5% スキムミルク／TBS-T 100ml

スキムミルク(GE Healthcare RPN2125)or(WAKO 190-12865) 5g を 1×T-TBS で 100ml にメスアップ。4℃保存。

10×Ponceau S 50ml

100% TCA(WAKO 206-08082)	15ml
--------------------------	------

5-Sulfosalicylic Acid Dihydrate(WAKO 192-04571)	15g
---	-----

Ponceau S(Fluka 81460)	1g
------------------------	----

milliQ で溶解し 50ml にメスアップ。常温保存。

1×Ponceau S 100ml

10×Ponceau S 10ml

milliQ で溶解し 100ml にメスアップ。常温保存。

6 . PCR (Polymerase Chain Reaction) 法

- ・ QIAGEN 社製 RNeasy Mini Kit
- ・ TOYOBO 社製 ReverTra Ace qPCR RT Kit
- ・ 99.8%エタノール
- ・ GIBCO 社製 ultra PURE Distilled Water DNase,RNase Free
- ・ Amersham Bioscience 社製 分光光度計 Ultrospec 2100 pro
- ・ TAKARA バイオ社製 サーマルサイクラー TP600

7 . Real-time RT PCR 法

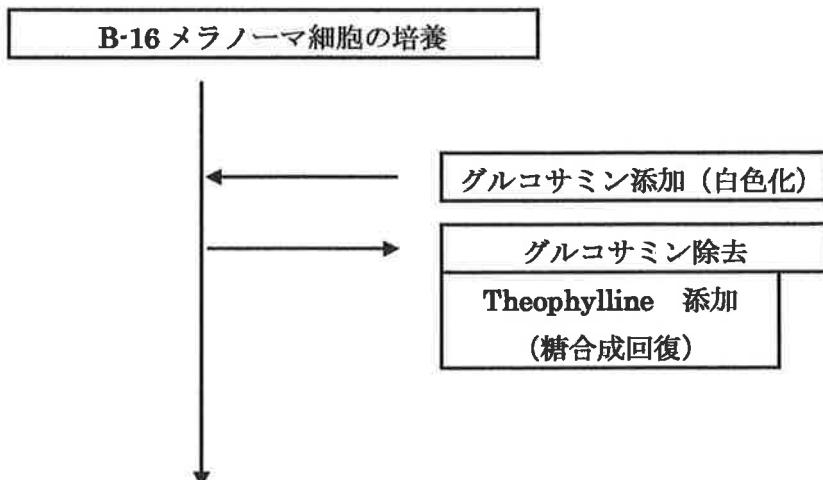
- ・ Applied Biosystems 社製 Power SYBR Green PCR Master Mix
- ・ Invitrogen 社製 プライマー

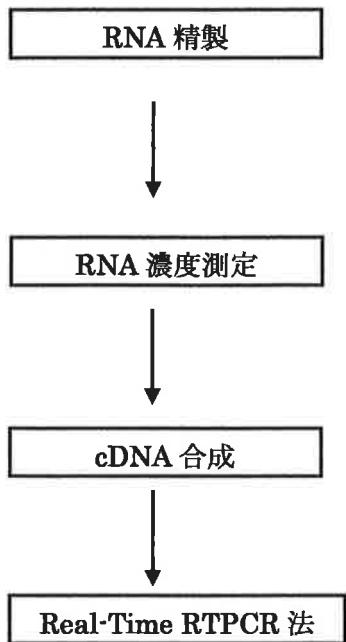
今回用いたプライマーのシークエンスは下記のとおりである。

●MITF (152bp)	Forward	GGACCTTGAAAACCGACAGA
	Reverse	TGATGATCCGATTCAACCAGA
●Tyrosinase (131bp)	Forward	GCATCCTTCTTCTCCTCCTG
	Reverse	GGTTTGGCTTGTATGGTTT
●TRP-1 (103bp)	Forward	GGTGGACCAATCAGGAGAAA
	Reverse	ATACACGGACCTCCAAGCAC
●TRP-2 (100bp)	Forward	CTTCTGCTGGGTTGTCTGG
	Reverse	CAGCATTCTGTTCAGCACG
●Pme117 (251bp)	Forward	ATAGGTGCTTGCTGGCTGT
	Reverse	TGGCAATACCTTGGCTTC
●ETAR (105bp)	Forward	AGGCGTAATGGCTGACAATC
	Reverse	GTGGTGCCCAGAAAGTTGAT

Real-Time RT-PCR の実験方法

1. 実験の流れ





2. RNA 精製 (QIAGEN 社 RNeasy Mini Kit)

- ① BufferRLT350 μ l 1 添加し、セルスクレーパーで細胞をチューブに回収
- ② 70%エタノール 350 μ l 1 添加し、30 秒間しっかりとボルテックス
- ③ RNA 縦濁液をカラムに移し、室温で 1400rpm・3 分間遠心する（以下、遠心回転数は同じ）
- ④ 廃液を捨て、カラムに BufferRW700 μ l 1 添加し、1 分間遠心する。
- ⑤ 2ml の Collection Tube を新しいものと交換し、BufferRPE500 μ l 1 添加して 1 分間遠心する。
- ⑥ 廃液を捨て、再度 BufferRPE500 μ l 1 添加し、3 分間遠心する。
- ⑦ カラムを 1.5ml の Collection Tube に移し、フィルターに直接 RNase free water 40 μ l を添加する。
- ⑧ ふたを開けたまま 3 分間静置し、静かにふたを閉め遠心した
- ⑨ RNA を−80°Cで保存した

3. RNA 濃度測定

回収した RNA サンプル濃度を希釈し一定にするため、RNA 濃度を分光光度計により測定を行った。水 693 μ l : RNA サンプル 7 μ l を石英セルに分注し、各

サンプルを測定した。

4. cDNA 逆転写合成 Reverse Transcription

RNA 濃度測定結果を元に、精製した RNA サンプルのそれぞれの濃度が 100ng/ μ l になるように希釈する。

ReverTra Ace qPCR RT Kit(TOYOBO)の溶液調整は以下の通り示す。

反応液調整法 (1 サンプルあたり)

5×RT Buffer	2 μ l
Primer mix	0.5 μ l
Enzyme mix	0.5 μ l
<u>RNase Free water</u>	<u>2 μl</u>
Total	5 μ l

反応液を入れる前に、RNA サンプルを 65°C・5 分間で熱変性させた後、氷上で急冷させた。RNA サンプルを調整した反応溶液 5 μ l と混合し、サーマルサイクラーで 37°C・15 分間逆転写反応させ、その後 98°C・5 分間で酵素を失活させた

5. Real Time PCR

合成した cDNA サンプルを Real Time PCR で解析した。Real Time PCR で用いる反応液は以下の通り示す。

Real Time PCR 溶液の調整 (1 サンプルあたり)

Power SYBR Green PCR Master Mix(ABI)	12.5 μ l
DPEC 水	10 μ l
10 μ M Primer F	0.75 μ l
10 μ M Primer R	0.75 μ l
<u>Total</u>	<u>24 μl</u>

以前に記載したプライマーをそれぞれ必要分使用し、1.5ml チューブに個数分の PCR 溶液を調整して、Real Time PCR 用 96 穴プレートに 24 μ l ずつ分注した。これに合成した cDNA を 1 μ l 分注し、合計 25 μ l とした。また、濃度がわかっている cDNA コントロールサンプルを検量線作成用に 3 倍・5 段階希釈し、それぞれのプライマーの PCR 溶液 24 μ l と、スタンダードサンプル 1 μ l を分注し、

Applied Biosystems 7900HT にて Real Time PCR を行った。

6. 実験原理

6-1. PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) 法とは、試験管内で DNA にポリメラーゼを作用されることにより、連鎖反応的に DNA 量を増幅する方法である。2本鎖の DNA は、水溶液中で高温になると変性し 1 本鎖 DNA に分かれる。変性が起る温度は、DNA の塩基構造および長さ（塩基数）によって異なり、長い DNA ほど高い温度が必要になる。1 本鎖 DNA となった溶液を冷却していくと、相補的な DNA が互いに結合し合い

再び 2 本鎖となる（アニーリング）。急速に冷却することで長い DNA 同士は 2 本鎖に再結合しにいくが、短い DNA 断片（オリゴヌクレオチド）は結合できる。

PCR 法では、増幅対象（テンプレート）の DNA、DNA 合成酵素（DNA ポリメラーゼ）および

大量のプライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドを混合し、熱変性・アニーリングを行うので、長い対象 1 本鎖 DNA の一部にプライマーが結合した形ができる。プライマー

が DNA よりも圧倒的に多い状況にしておくことで、DNA・プライマーの結合が DNA-DNA の結合により、さらに優先的となる。この状態で DNA ポリメラーゼが働くと、プライマーが結合した部分を起点として 1 本鎖部分と相補的な DNA が合成される。DNA が合成された後、再び高温にして DNA 変性から繰り返す。一般的に、PCR 処理を n 回のサイクルを行うと、1 つの 2 本鎖 DNA から目的部分を 2^n 倍に増幅すると言われている。しかし、特定部分だけが抽出されるまでには少なくとも必要であり、長い DNA 鎖も最後まで残ってしまうため、厳密に言えば正確でない。RT-PCR 法から細胞から抽出した mRNA に対して reverse transcriptase(RT) を作用させて相補鎖を合成した後、直ちに PCR をかける方法である。これによって 2 本鎖の cDNA を得ることができる。

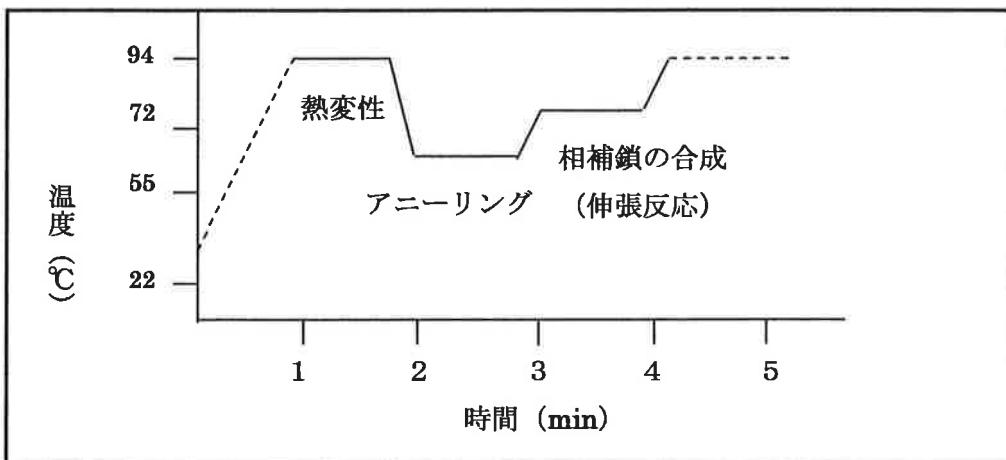


図-8 PCR サイクル

2. Real time RT-PCR

リアルタイム PCR では、PCR 増幅産物をリアルタイムでモニタリングするため、指數関数的増幅域で正確な定量を行うことができる。これは、エンドポイントで解析する従来の RT-PCR 法などとは大きく異なる点である。PCR では、1 サイクルごとに DNA が 2 倍、 2^2 倍・・・と指數関数的に増幅し、やがてプラトーに達する。この増幅の様子をリアルタイムモニタリングした図が増幅曲線である。PCR 増幅産物量が蛍光検出できる量に達すると増幅曲線が立ち上がり始め、指數関数的にシグナルが上昇した後、

プラトーに達する。初発の DNA 量が多いほど、増幅産物量は早く検出可能な量に達するので、増幅曲線が早いサイクルで立ち上がる。よって、段階希釈したスタンダードサンプルを用いてリアルタイム PCR を行うと、初発の DNA 量が多い順に等間隔で並んだ増幅曲線が得られる。ここで、適当なところに閾値 (Threshold) を設定すると、閾値と増幅曲線が交わる点 : Ct 値 (Threshold Cycle) が算出される。Ct 値と初期鑄型量の間には直接関係がある。

未知サンプルについてもスタンダードサンプルと同様に Ct 値を算出し、この検量線に当てはめれば、初期鑄型量を求めることができる。スタンダードサンプルを用いて検量線を作成し、未知サンプルを定量する。Ct 値とは、PCR 増幅産物がある一定量に達した時のサイクル数である。

リアルタイム PCR では、PCR 増幅産物を蛍光により検出するが、蛍光検出方法には、インターラーカレーターを用いる方法と蛍光標識プローブを用いる方法の 2 種類がある。今回の実験ではインターラーカレーター法 (SYBR Green I) を用いた。

インターラーカレーター法とは、一般的に SYBR Green I を使用する。インターラーカレーターは PCR によって合成された二本鎖 DNA に結合し、励起光の照射によ

り蛍光を発する。この蛍光強度を測定することにより、増幅産物の生成量をモニターできる。

統計解析手法

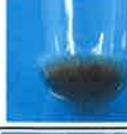
3群以上の比較には one-way ANOVA with Tukey's post-hoc multiple comparison test および2群間の比較は Student's t test をもちい JSTAT 8.2 software for Windows にて計算した。ANOVA での有意水準は ##: p < 0.01, #: p < 0.05 で表示し Student's t test での一対比較においては **: p < 0.01, *: p < 0.05 で表示した。図にこれらの有意水準が示されないものは有意水準が 5 %を超える有意差が認められていないことを示す。

実験結果

1. 白金ナノコロイド混成液(Pt)添加による B-16 細胞のメラニン合成阻害効果

糖合成阻害により白色化を誘導した細胞から Glc を除去後、Control、9.1ppm Pt+、6.1ppm Pt+、3.0ppm Pt+、Control(1mM Tp+)、9.1ppm Pt+(1mM Tp+)、3.0ppm Pt+(1mM Tp+)培地に交換し、糖合成回復 3 日目のペレット写真を表 1 に示した。9.1ppm 添加においてわずかにメラニン合成阻害効果が確認できた。

表 1 各濃度におけるペレット写真（糖合成回復 3 日目）

希釈倍率	control	Pt	Tp	効果	毒性
×5 (9.1ppm)			—	△	○
×5 (9.1ppm)			1mM	△	○
×7.5 (6.1ppm)			—	×	×
×10 (4.5ppm)			—	×	×
×15 (3.0ppm)			1mM	×	×

2. 有効濃度の決定

表1の結果より、6.1ppm～9.1ppmの濃度で有効であると考えられた。9.1ppmでは毒性が強いため、美白効果があり毒性が少ない7.6ppmを有効濃度に設定した。Control(1mM Tp+)及び7.6ppm Pt+(1mM Tp+)を同様の方法で10シャーレ培養し、糖合成回復2日目で細胞を回収した。以下の図2-1と図2-2に回収した細胞のペレット写真を示した。これらを細胞分画法にてLGF、SGF、Supに分画しサンプルを作成した。



図2-1 糖合成回復2日目 Control(1mM Tp+)



図2-2 糖合成回復2日目
7.6ppm Pt+(1mM Tp+)

3. チロシナーゼ酵素活性の細胞内分布への効果

各分画におけるチロシナーゼ酵素活性に対する白金ナノコロイド混成液(Pt)の効果を以下の図3に示した。LGF、SGF、Sup全てにおいて、Pt添加でControlに比べてチロシナーゼ酵素活性の有意な低下が見られた。

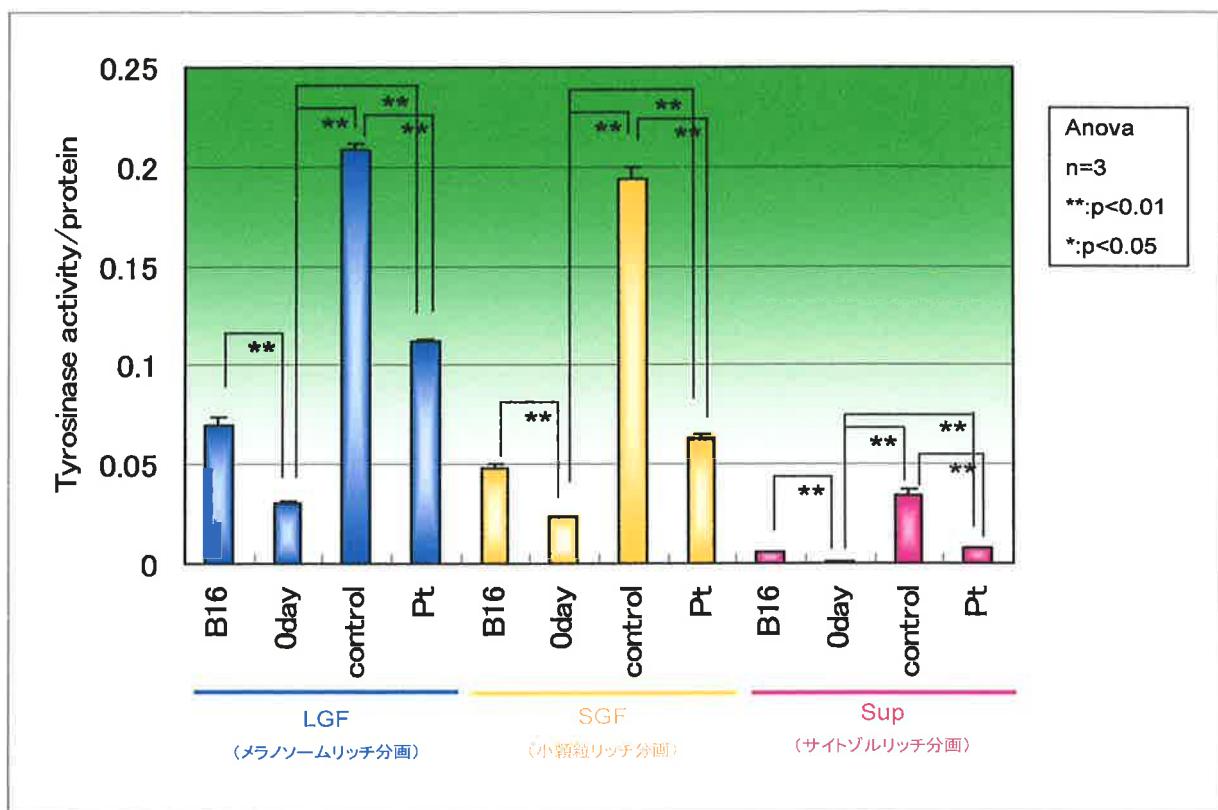


図-3 チロシナーゼ酵素活性の細胞内分布への効果

4. SDS-PAGE-Dopa 反応

以下の図-4にSDS-PAGE-Dopa反応の結果を示した。LGFにおいてPt添加はControlと同様にメラノソーム結合型チロシナーゼ(T3)の回復を認めた。また、LGF及びSGFにおいてサイトゾル結合型チロシナーゼ(T1)はControlに対し減少傾向を示した。

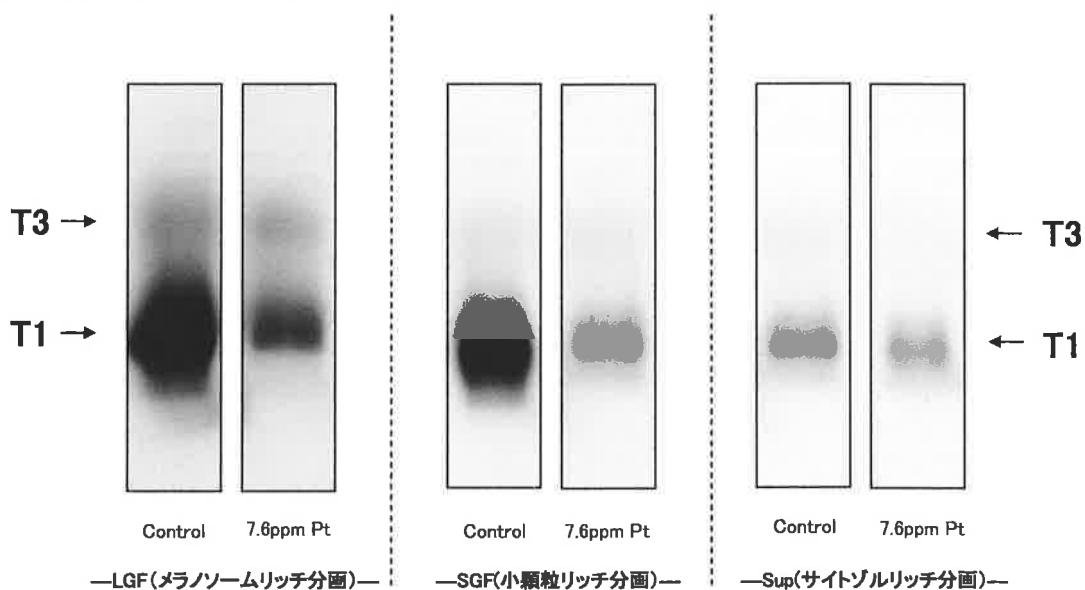


図-4 SDS-PAGE-Dopa 反応

5. 各メラニン合成関連蛋白の細胞内分布への影響

5.-1. Tyrosinase 蛋白の細胞内分布の変化

Tyrosinase蛋白の細胞内分布の解析結果を以下の図-5に示した。LGF及びSGFにおいてPt添加はControlと比べ減少傾向を示した。

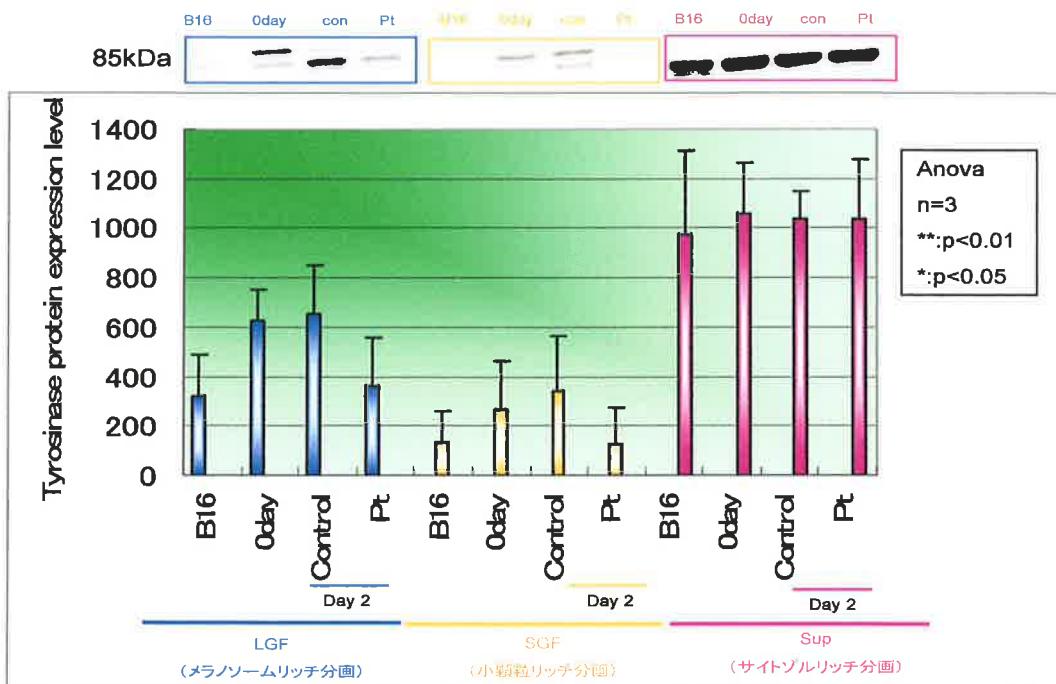


図-5 Tyrosinase 蛋白の細胞内分布への Pt の影響

5.-2. Rab27 蛋白の細胞内分布の変化

メラノソームの輸送をつかさどる Rab27 蛋白の細胞内分布の解析結果を以下の図-6 に示した。SGFにおいて Pt 添加は Control に対し有意に低下し、LGF 及び Sup においても Control に対し低下傾向を示した。

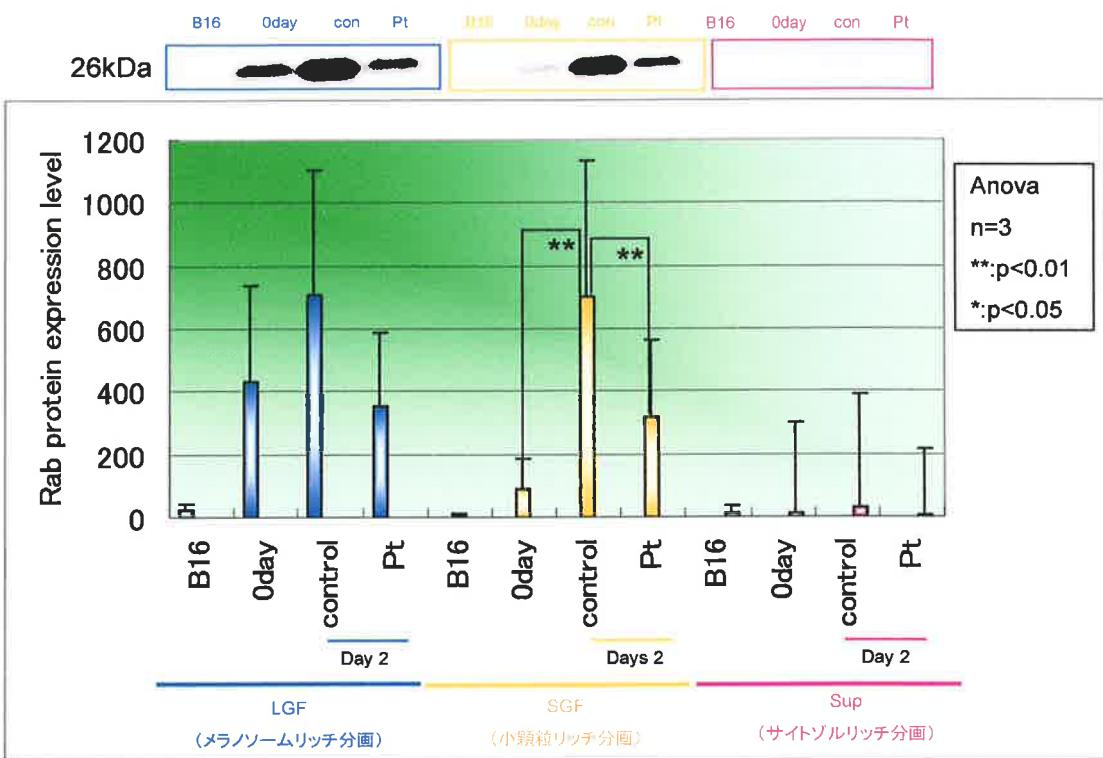


図-6 Rab27 蛋白の細胞内分布への Pt の影響

5.-3. TRP-1(75kDa)蛋白の細胞内分布の変化

TRP-1(75kDa)蛋白の細胞内分布の解析結果を以下の図-7に示した。LGF及びSGFにおいてPt添加はControlに対し有意に低下した。

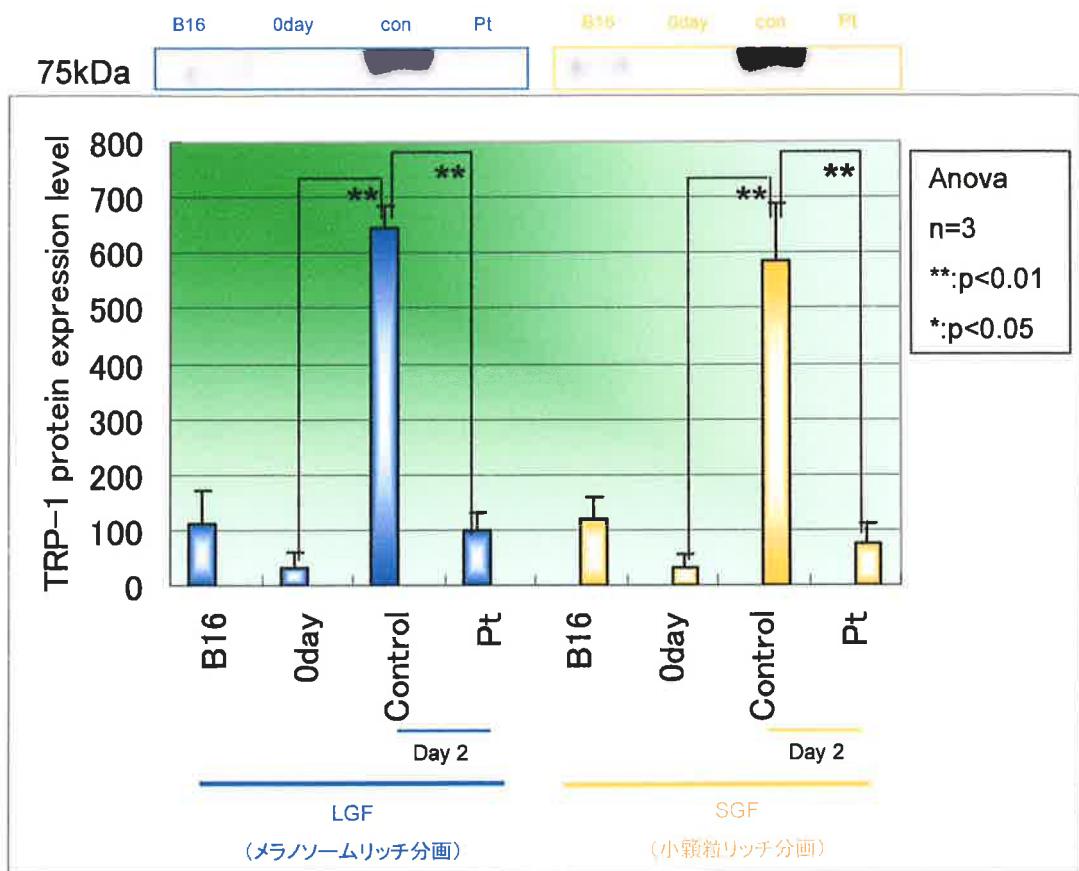


図-7 TRP-1(75kDa)蛋白の細胞内分布への Pt の影響

5.-4. TRP-1(80kDa)蛋白の細胞内分布の変化

TRP-1(80kDa)蛋白の細胞内分布の解析結果を以下の図-8に示した。LGF 及び SGFにおいて Pt 添加は Control に対し有意に低下した。

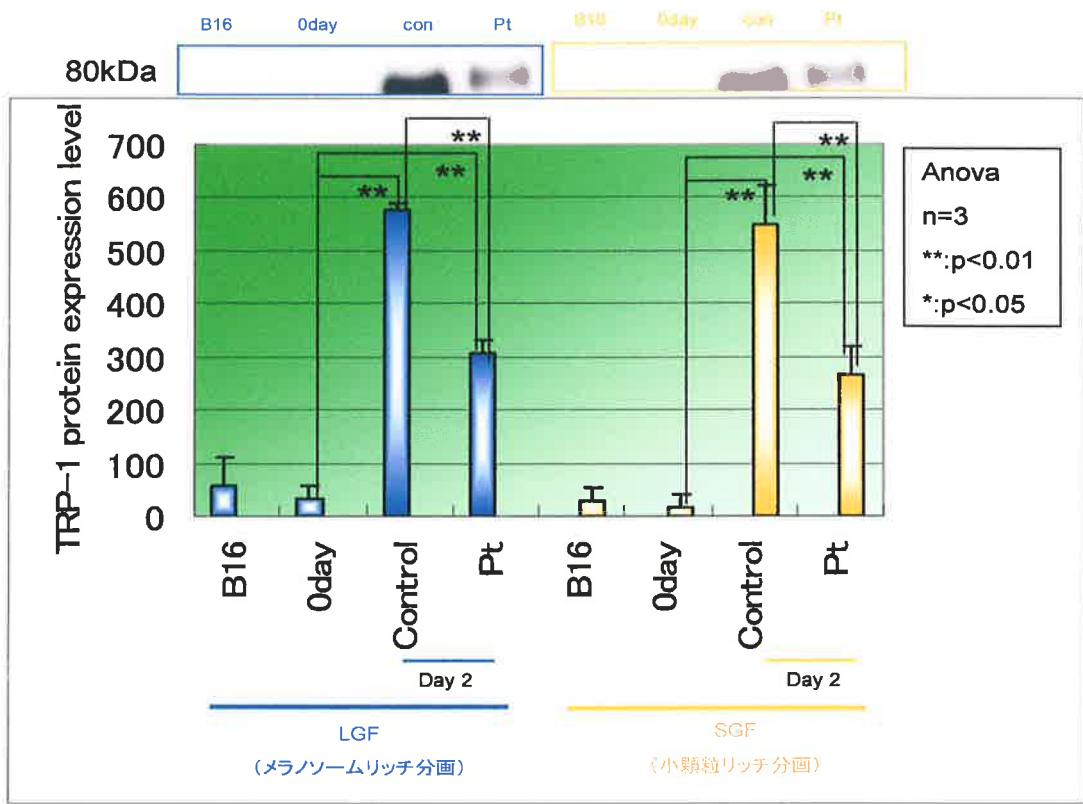


図-8 TRP-1(80kDa)蛋白の細胞内分布への Pt の影響

5.-5. TRP-2 蛋白の細胞内分布の変化

TRP-2 蛋白の細胞内分布の解析結果を以下の図-9 に示した。LGF 及び SGFにおいて Pt 添加は Control に対し低下傾向を示した。

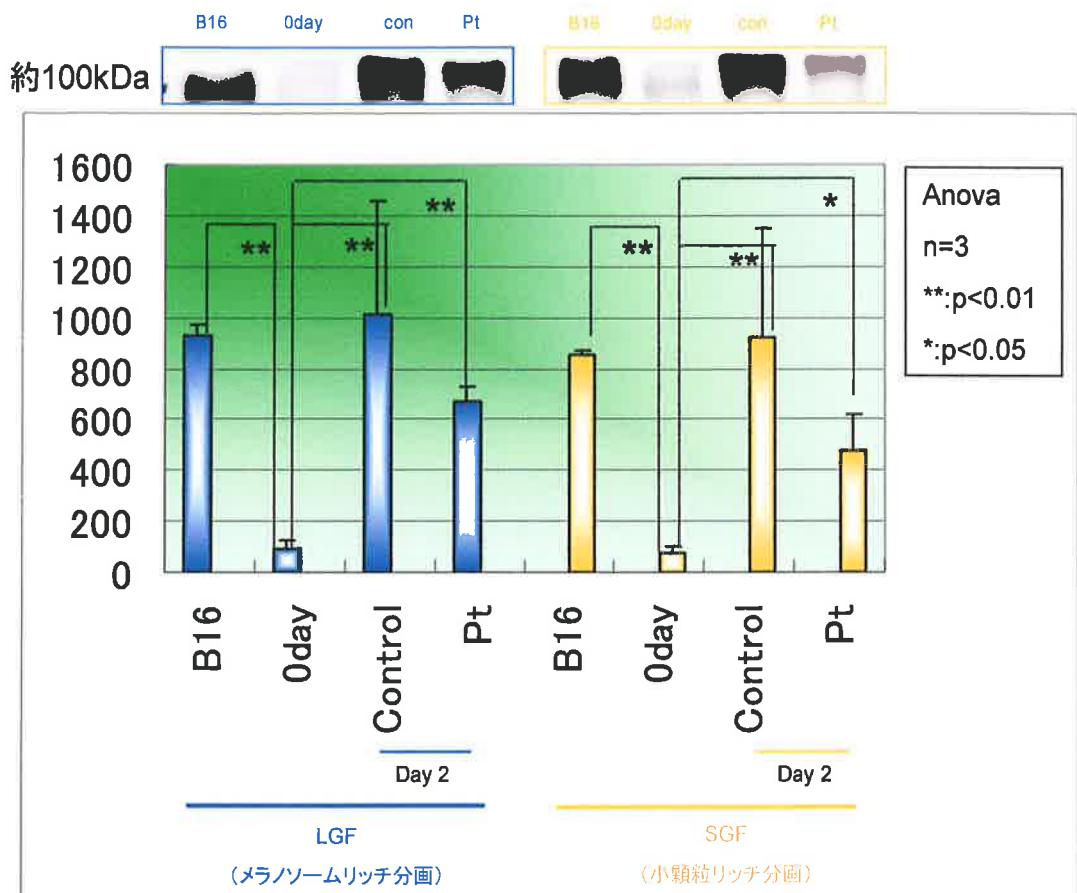


図-9 TRP-2 蛋白の細胞内分布への Pt の影響

6. 白金ナノコロイド混成液 (Pt) 添加における色素回復過程におけるメラニン合成関連遺伝子の変動

6-1. MITF 遺伝子発現量への影響

メラノサイト内でのメラニン合成関連遺伝子の大部分の転写因子である MITF の遺伝子発現量は図-10に示すとく無添加コントロールでは4時間後まで上昇し、その後8~24時間後では減少し元のレベルに戻った。一方 Pt 添加ではコントロールに比べて8と24時間後で有意な遺伝子発現量の抑制効果が認められた。

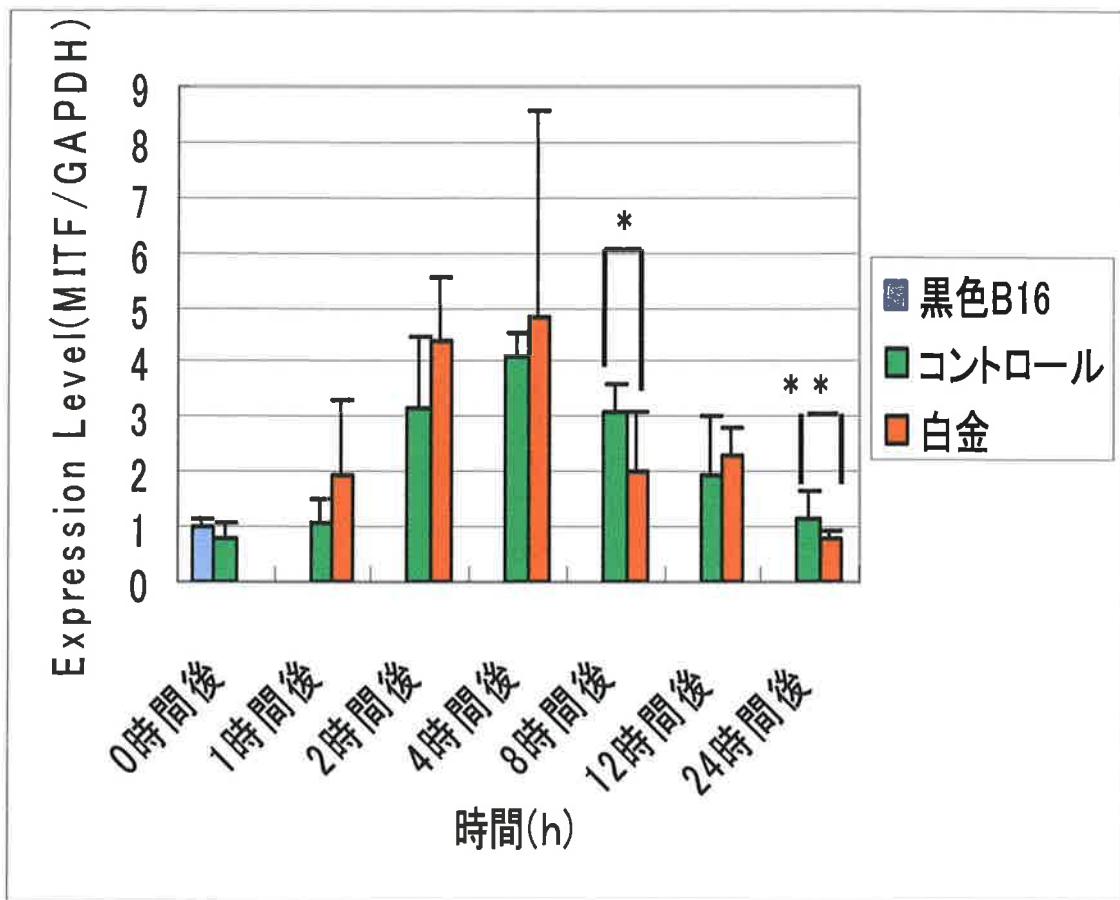


図-10： Pt 添加による MITF 遺伝子発現量への影響

6 – 2. Tyrosinase 遺伝子発現量への影響

メラノサイト内でのメラニン合成酵素である tyrosinase の遺伝子発現量は図-1-1に示すとく無添加コントロールでは 24 時間後まで徐々に上昇した。一方 Pt 添加ではコントロールに比べて有意な遺伝子発現量の変動は認められなかつた。

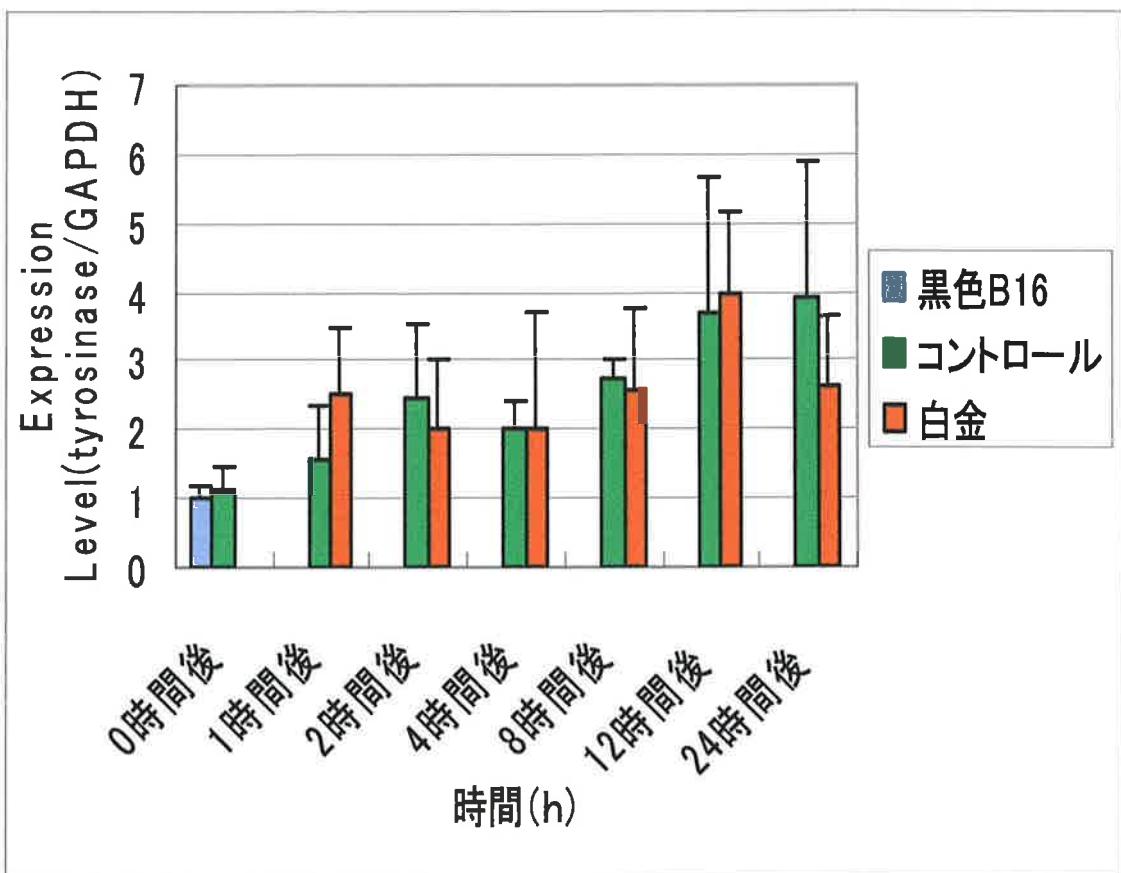
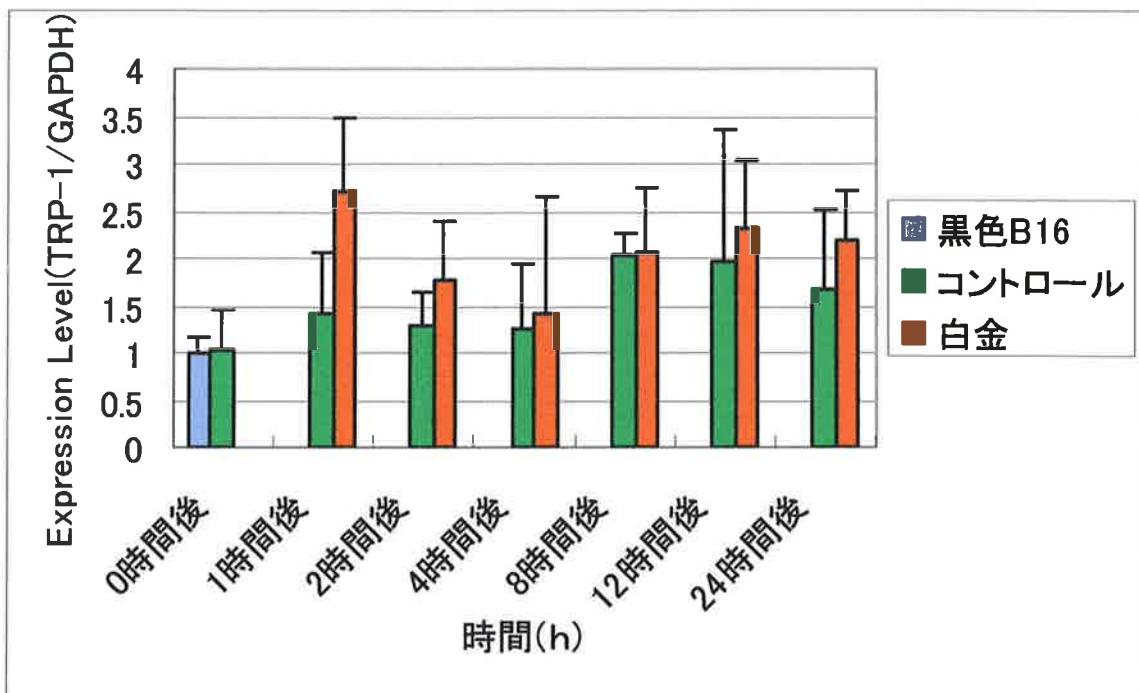


図-11: Pt 添加による tyrosinase 遺伝子発現量への影響

6 – 3. TRP-1 遺伝子発現量への影響

メラノサイト内でのメラニン合成酵素の一つである TRP-1 の遺伝子発現量は図-12 に示すごとく無添加コントロールでは 24 時間後まで徐々に上昇した。一方 Pt 添加ではコントロールに比べて有意な遺伝子発現量の変動は認められなかつた。



図・12 Pt 添加による TRP-1 遺伝子発現量への影響

6－4. TRP-2 遺伝子発現量への影響

メラノサイト内でのメラニン合成酵素の一つである TRP-2 の遺伝子発現量は図・13 に示すごとく無添加コントロールでは 12 時間後まで徐々に上昇し、24 時間後に現象に転じた。一方 Pt 添加ではコントロールに比べて有意な遺伝子発現量の変動は認められなかった。

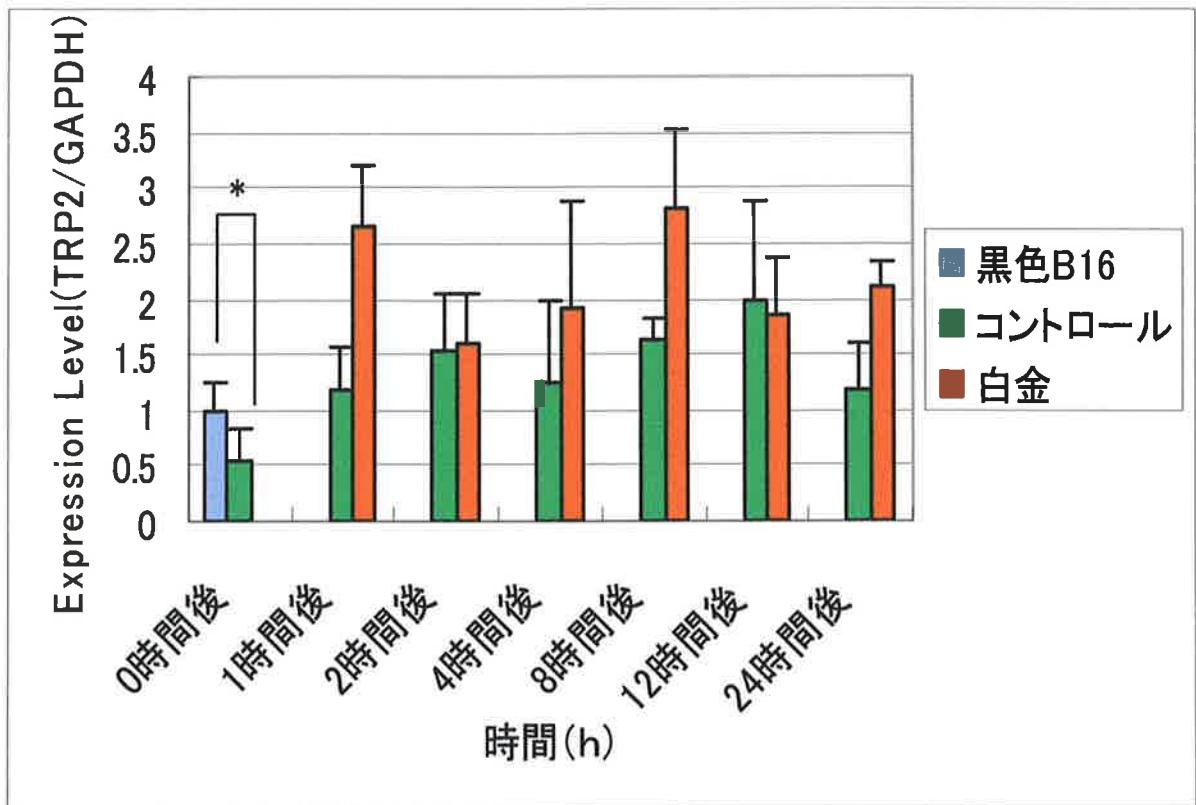


図-13 Pt 添加による TRP-2 遺伝子発現量への影響

6-5. Pmel17 遺伝子発現量への影響

メラノソームのマトリックス蛋白である Pmel17 の遺伝子発現量は図-14に示すごとく無添加コントロールでは 24 時間後まで明瞭に上昇した。一方 Pt 添加ではコントロールに比べて有意な遺伝子発現量の変動は認められなかった。

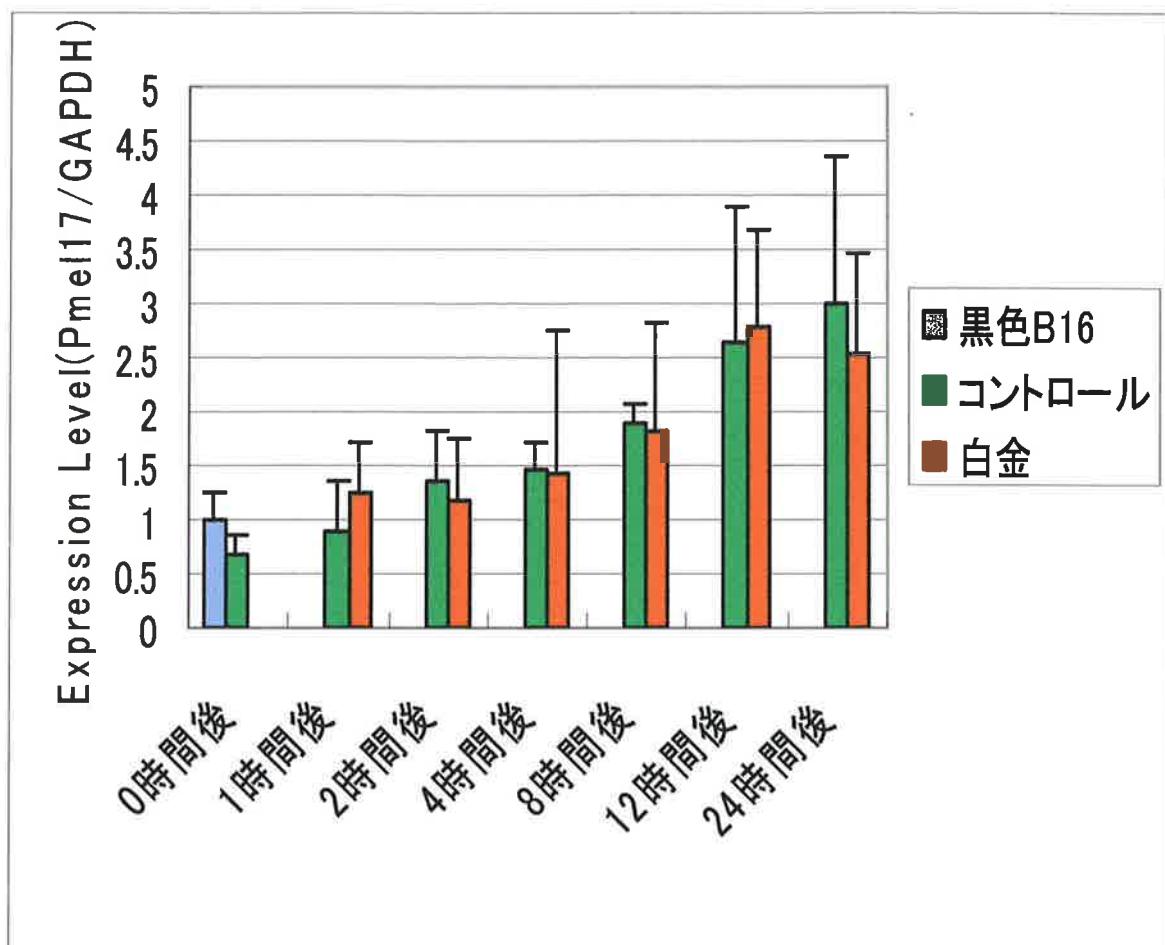


図-14 Pt 添加による Pmel17 遺伝子発現量への影響

6-6. Pmel17 遺伝子発現量への影響

マウスマラノサイトのエンドセリンの受容体である ETAR の遺伝子発現量は図-15に示すとく無添加コントロールでは 2 時間後までに明瞭に増加し、4 時間後には元のレベルに戻った。一方 Pt 添加ではコントロールに比べて有意な遺伝子発現量の変動は認められなかった。

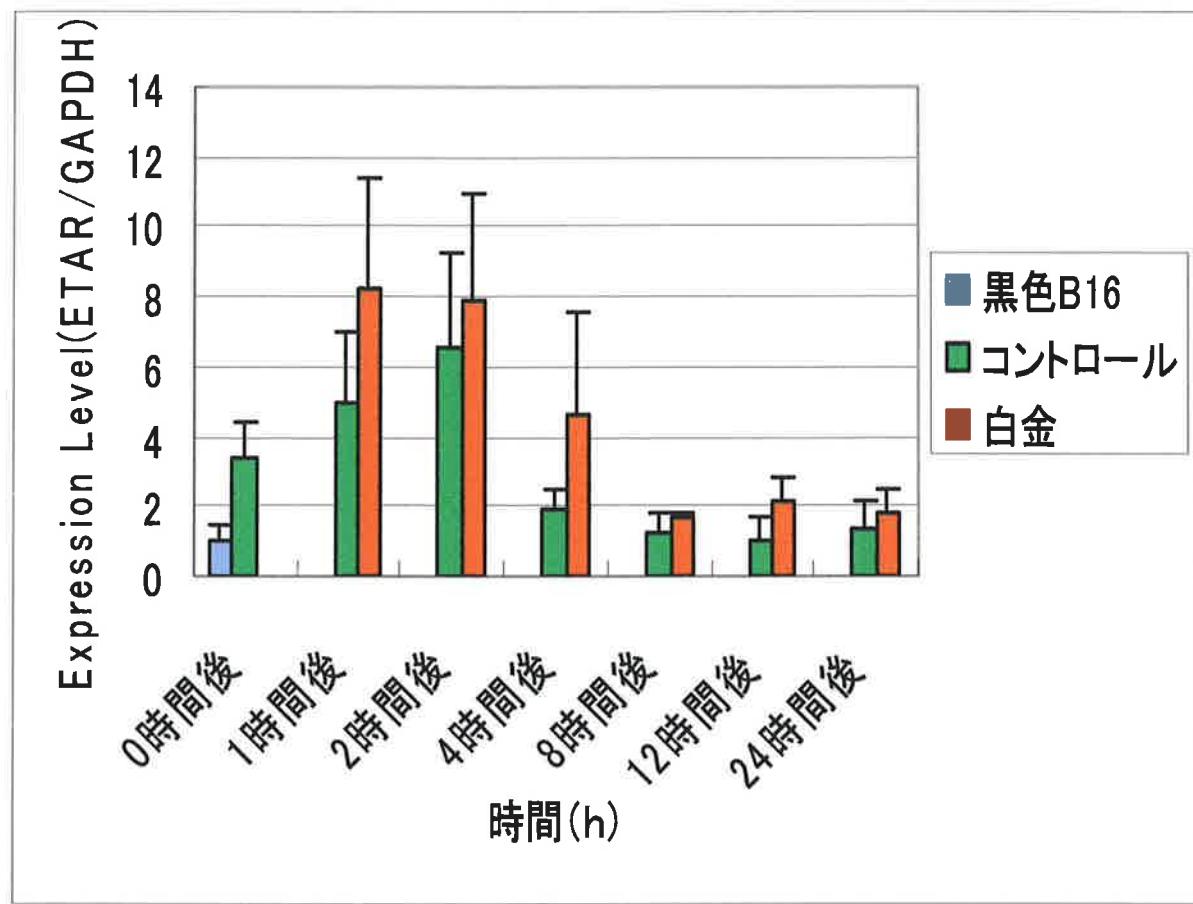


図-15 Pt 添加による ETAR 遺伝子発現量への影響

考察

糖合成阻害剤グルコサミン (Glc) 誘導白色 B16 メラノーマ細胞の色素回復過程に白金ナノコロイド混成液 (Pt) を 7.6ppm の濃度で添加することにより、無添加 Control では糖合成回復 2 日間でメラニン合成が回復し黒色化しているのに対し、白金ナノコロイド混成液(Pt)の添加ではメラニン合成の回復が抑制されており、白金ナノコロイド混成液(Pt)は 7.6ppm 濃度で明瞭な美白効果を有することが明らかとなった。この白金ナノコロイド混成液(Pt)の美白メカニズムを細胞分画法、ウエスタンプロット法、SDS-DOPA 法、real-time RT-PCR 法により酵素活性・蛋白の細胞内分布変化、遺伝子発現への影響を解析した結果、白金ナノコロイド混成液(Pt)添加では、Control と同様にメラノソーム結合型 T3 の回復を認めたことから、チロシナーゼはメラノソームに転送されていると考えられるが、メラノソームリッチ分画である LGF でのチロシナーゼ酵素活性は Control に対し有意に低下し、チロシナーゼ蛋白発現量も減少傾向を示した。また白金ナノコロイド混成液(Pt)添加は MITF の遺伝子発現量でコントロールに対して、8 と 24 時間後で有意な抑制効果を示したが、tyrosinase の遺伝子発現量はむしろ若干の増加傾向を示し、また TRP-1 や TRP-2 の遺伝子発現量にもあまり変化が見られなかった。またメラノソームマトリックス蛋白 Pmel17 や エンドセリン A 受容体 (ETAR) の遺伝子発現量は白金ナノコロイド混成液(Pt)の添加でコントロールに比べての変動は少なく、測定したメラニン合成関連遺伝子発現レベルへの抑制もしくは促進効果は全体的に見られなかった。つまり、Pt 添加においてチロシナーゼはメラノソームに転送され、わずかに活性を有しているが、チロシナーゼ蛋白の減少が遺伝子発現の抑制を伴わずに生じていることからチロシナーゼのプロテオソーム上での分解促進によりメラニン合成回復抑制が生じている可能性が示唆された。また、TRP-2 蛋白発現量は Control と同程度に認められるが、TRP-1 蛋白発現量は Control に対し有意に減少していることから、Pt 添加において TRP-1 のメラノソームへの転送抑制もしくは TRP-1 の分解を引き起こしている可能性も示唆された。つまり、白金ナノコロイド混成液はチロシナーゼの分解及び TRP-1 のメラノソームへの転送抑制、もしくは TRP-1 の分解によりメラニン合成阻害及びメラニンポリマーの重合度の低下を引き起こし、美白効果を示す可能性が示唆された。

結語

白金ナノコロイド混成液(Pt)は 7.6ppm の低濃度で明瞭な美白効果を示し、この美白メカニズムはチロシナーゼの遺伝子や蛋白・酵素活性発現への抑制ではなく、チロシナーゼ蛋白のプロテオソーム上での分解促進による可能性が考えられる。

6. 参考文献

- Imokawa G., Mishima Y.: Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res.* **42**: 1994-2002, 1982.
- Mishima Y., Imokawa G.: Selective aberration and pigment loss in melanosomes of malignant melanoma cells in vitro by glycosylation inhibitors: premelanosomes as glycoprotein. *J. Invest. Dermatol.* **81**: 106-114, 1983.
- Imokawa G., Mishima Y.: Functional analysis of tyrosinase isozymes of cultured melanoma cells during the recovery period following interrupted melanogenesis induced by glycosylation inhibitors. *J. Invest. Dermatol.* **83**: 196-201, 1984.
- Imokawa G., Mishima Y.: Analysis of tyrosinase as asparagine-linked oligosaccharides by Concanavalin-A lectin chromatography: Appearance of new segment of tyrosinases in melanoma cells following interrupted melanogenesis induced by glycosylation inhibitors. *J. Invest. Dermatol.* **85**: 165-168, 1985.
- Mishima Y., Imokawa G.: Role of glycosylation in initial melanogenesis: post-inhibition dynamics. *Pigment Cell* **6**: 17-30, 1985.
- Imokawa G., Mishima Y.: Importance of glycoproteins in the initiation of melanogenesis: An electron microscopic study of B-16 melanoma cells after release from inhibition of glycosylation. *J. Invest. Dermatol.* **87**: 319-324, 1986.
- Imokawa G.: Analysis of initial melanogenesis including tyrosinase transfer and melanosome differentiation through interrupted melanization by glutathione. *J. Invest. Dermatol.* **93**: 100-107, 1989.
- Imokawa G.: Analysis of carbohydrate properties essential for melanogenesis in tyrosinases of cultured melanoma cells by differential carbohydrate processing inhibitions. *J. Invest. Dermatol.* **95**: 39-49, 1990
- Komiya K., Takamatsu S., Takahashi Y., Shinose M., Hayashi M., Tanaka H., Iwai Y., Omura S., Imokawa G.: New inhibitors of melanogenesis, OH-3984 K1 and K2, I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological characteristics. *J. Antibiotics* **46**: 1520-1525, 1993.
- Takamatsu S., Rho MC., Hayashi M., Komiya K., Tanaka H., Omura S., Imokawa G.: New inhibitor of melanogenesis, OH-3984 K1 and K2, II. Physico-chemical properties and structural elucidation. *J. Antibiotics* **46**: 1526-1529, 1993.
- Kabayashi T., Imokawa G., Bennett D.C., Hearing V.J.: Tyrosinase stabilization by Tyrp1 Brown locus (the brown locus protein). *J. Biol. Chem.* **273**: 31801-31805, 1998.

- Mishima Y., Ichihashi M., Hayashibe K., Ueda M., Hatta S., Funasaka Y., Imokawa G.: **Control of melanogenesis and melanoma oncogenesis.** Prog. Clin. Biol. Res. 256:127-141, 1988.
- 芋川玄爾, 木村光利: 美白剤の作用機序とその将来像. 香粧品科学会誌 17: 149-155, 1993.
- 芋川玄爾: メラニン産生抑制効果測定法. Fragrance J. 13: 18-33, 1994.
- 芋川玄爾: メラニン産生抑制効果測定法. Fragrance J. 14: 71-91, 1995.
- 鈴木敏幸、芋川玄爾: これからの中白化粧品. 香粧品科学会誌 19: 183-189, 1996
- 芋川玄爾: 美白剤. 日本皮膚科学会誌 108: 1690-1694, 1998.
- 芋川玄爾: 美白剤研究開発の進歩とその課題. 日本香粧品科学会誌 22: 312-318, 1998.
- 芋川玄爾: 美白剤の種類と皮膚への効果メカニズム. 皮膚と化粧品. Monthly Book Derma デルマ、全日本病院出版会 2000: 11-24
- 川島眞、芋川玄爾: 紫外線色素沈着と老人性色素斑における色素増強メカニズムとカモミラ E T の抗シミ効果. Monthly Book Derma デルマ (MB Derma)、全日本病院出版会 2005: 98: 43-61
- 芋川玄爾: 機能性化粧品の展望. Monthly Book Derma デルマ (MB Derma)、全日本病院出版会 2007: 132: 175-189
- Mishima Y., Ichihashi M., Hayashibe K., Ueda M., Hatta S., Funasaka Y., Imokawa G.: **Control of melanogenesis and melanoma oncogenesis.** ed. By Bagnara, J.T. In: Advance in Pigment Cell Research, Alan R. Liss Inc. 1988: 127- 141
- 芋川玄爾: 美白一しみは消せるか? スキンケアの実際, 皮膚科診療プラクティス, 文光堂., 1999: 42-44
- 芋川玄爾: 色素沈着メカニズム. 皮膚のメカニズムの解明と計測・評価法、技術情報協会、1999 : 55-81
- 芋川玄爾: 表皮性色素沈着症のパラクリンサイトカインメカニズムと細胞内情報伝達機構—美白剤開発の基礎として—。シーエムシー 2004、監修 鈴木正人、シーエムシー出版 pp 26-67、2004
- 芋川玄爾: メラノーマ細胞を用いたメラニン抑制剤の評価法②色素再生モデル。バイオテクノロジーシリーズ機能性化粧品素材開発のための実験法—in vitro/細胞/組織培養— 2007 監修 芋川玄爾 シーエムシー出版 pp 194-206.
- 芋川玄爾ほか, 機能性化粧品素材開発のための実験法, CMC, 167-240 (2007)
- 芋川玄爾, 化粧品・医薬部外品開発のためのヒト皮膚測定評価 試験マニュアル, 技術情報協会, 223-267(2007)