

ごあいさつ

日本経済は低迷を続け、デフレという戦後はじめての経験の中、その脱出法を模索する状況にあります。このような環境下、世界に伍して戦える力量を回復するには、大学等が持つ知識を産業界に移管する社会システム構築に向けた構造改革が必要であると言われています。科学技術会議は、「21世紀初頭科学技術政策の指針」を提言し、わが国の目標として「知の創造と活用により世界に貢献できる国」「国際競争力があり持続的発展ができる国」「安心、安全で快適な生活のできる国」という3つの国家像を目指すべきであり、その為の社会構造の改革を提案しています。そして文部科学省は「大学（国立）の構造改革の方針」の中で、21世紀を「知の時代」と定め、大学の再編・統合を推進し、①教育研究体制の充実強化 ②地域貢献、社会貢献の機能強化 ③経営基盤の強化を挙げ、大学の個性化、統合による学際的領域研究の促進などを目指しています。

これらの方向は当財団が研究助成を通じて目指す方向と一致しており、特に学際領域の研究がより促進されることは喜ばしい方向付けであり、期待を持ちつつ今後も「化粧品学」の体系化に向けた助成活動を堅持していく努力をしていきたいと考えております。

今後とも皆様方の益々のご協力とご支援をお願い申し上げます。

平成 14 年 8 月

財団法人 コスメトロジー研究振興財団

理事長 小林 禮次郎

目 次

■ ごあいさつ

■ 研究報告

I. 素材、物性に関する分野

- ・ 植物由来のクロロゲン酸代謝産物を用いた化粧品素材としての配糖体の合成と
その美白効果に関する研究 2
近畿大学工学部 野村 正人
- ・ 化粧品素材としての含硫化合物の生産に関する研究 8
早稲田大学理工学部 木野 邦器
- ・ 微生物代謝工学に基づく必須および新規脂肪酸の大量生産 12
筑波大学応用生物化学系 小林 達彦
- ・ 酸化セリウム系紫外線遮断剤の開発 16
大阪大学大学院工学研究科 増井 敏行
- ・ 化粧品素材としての合成スメクタイトの高機能化 20
東北大学多元物質科学研究所 白井 誠之

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・ 高発現型メラニン色素産生遺伝子のコスメトロジーへの応用 26
広島大学医学部 杉山 政則
- ・ 糖転移酵素の関与するメラニン産生制御の解析 30
大阪大学大学院医学系研究科 谷口 直之
- ・ ゼラチンによるアレルギー反応のエピトープ解析と安全なゼラチンの開発 36
東京医科歯科大学難治疾患研究所 堀 久枝
- ・ 皮膚色素性病変の新しい診断法の開発 42
北海道大学大学院医学研究科 松村 哲理
- ・ A、B 領域紫外線の直接照射により SCID マウス移植ヒト皮膚に誘発される遺伝子変異とその予防 46
大阪大学医学部 本行 忠志
- ・ ヒト皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲン遺伝子の個人依存性発現制御機構 51
神奈川歯科大学歯学部 畑 隆一郎
- ・ 皮膚保護作用を有するセラミドの生理作用発現機構に関する研究 56
東北大学大学院薬学研究科 中畑 則道
- ・ 爪の形状に対する VII 型コラーゲンの変異がかかわる影響について 62
北海道大学医学部附属病院 松村 和子
- ・ 上皮型脂肪酸結合タンパク遺伝子欠損マウスにおける表皮水バリアー機能の変化 66
東北大学大学院医学系研究科 大和田 祐二

Ⅱ. 精神、文化に関する分野*

■ 記念講演

平成 13 年度記念講演 『美人研究』	73
国際日本文化研究センター 井 上 章一	

■ コスメトロジー研究雑感	83
---------------------	----

■ 付 録

平成 13 年度事業報告	95
役員一覧	98

(*本号にはこの分野の報告はありません)

研究報告

- I. 素材、物性に関する分野
- II. 生体作用、安全性に関する分野
- III. 精神、文化に関する分野

I. 素材、物性に関する分野

植物由来のクロロゲン酸代謝産物を用いた化粧品素材としての配糖体の合成とその美白効果に関する研究

近畿大学 工学部化学環境工学科、近畿大学 農学部農芸化学科*

野村 正人、澤 辺 昭 義[#]、藤 原 義 人

Research in the areas of medical and cosmetic treatments has progressed rapidly though the use of plants and herbs. As soon as an evident biological activation substance is extracted independently from a natural ingredient, research of all its chemical synthesis of similar compounds, exchange of microorganisms, and biological metabolism is also studied, for research and development in hope of a stronger biological activation. On the other hand, because of environmental destruction on a global scale is a problem with the effect on the human body. The ubiquitous use of fluorine gas and the resulting destruction of the ozone layer was led to increasing ultraviolet radiation reaching the surface of the earth and the consequential thus led to an increase to melanin which causes the formation of stains and freckles.

The investigation of natural products have been increased expecting the effectiveness and safety. Caffeic acid (3,4-dihydroxy cinnamic acid)(2), ferulic acid (trans-4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid)(3) and isoferulic acid (trans-3-hydroxy-4-methoxy cinnamic acid)(4) may be readily obtained by hydrolysis of chlorogenic acid (1). (1) was isolated from green coffee beans. In this report, we synthesized three compounds (2) - (4) from 3, 4-dihydroxy benzoic acid (5), 4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid (6) and 3-hydroxy-4-methoxy benzoic acid (7) by reduction (LiAlH_4), Jones oxidation and condensation with malonic acid.

We conducted tests targeted at the tyrosinase activity, superoxide scavenging activity and hyaluronidase activity inhibitor for compounds and made evaluation in the direction of practical use. Of the compounds (3) and (4) showed strong tyrosinase inhibitory activity and superoxide scavenging activity. Some of these compounds are only effective in the tyrosinase stage, while the compounds (3) and (4) in this report are show a high inhibition effect in both the tyrosine and DOPA stage. We found favorable results differing from cosmetic whiteners that originate from natural ingredients that have been reported in the past.

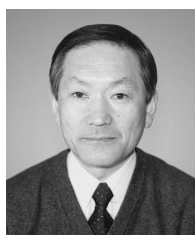
1. 緒 言

古来から、人間が病気にかかったときに、それを治そうとして昔から頼ってきたものに、日常ごく身近な植物があった。植物を用いる治療方法が人類の歴史の古い時期から自然に行われてきたことは、今日病気にかかった野生動物が特定の植物を食する行動によってもおしはかることができる。世界各地に文明が栄え始めた頃から、薬用植物に関する知識も芽生え、その後、数多くの薬物書が生まれ、今日の生薬学に至っている。現在、天然有機物質が医薬品ならびに化粧品開発の分野における宝庫であることは、今も昔も変わらず、これらに関する研究が盛んに行われている。ひとたび天然有機物質から顕著な生物活性物質が単離されれば、その化学的全合成、化学構造の修飾、類似化合物の合成、微生物変換、生化学的代謝の研究が行われるなど、より強い生物活性を期待した研究開発が実施されている^{1, 2)}。

近年地球規模での環境破壊問題の一つとして、冷蔵庫、エアコンなどの冷媒として使用されているフロンガスの大

気中への放出により、オゾン層の破壊が起こり、地表に届く紫外線が増加し、シミおよびソバカスの生成をもたらす原因であるメラニンの生成が増加するなど紫外線の人体へ及ぼす影響が問題となっている³⁾。こうした現状から、美白化粧品に対する消費者の要求はその機能と効果に注がれている。そこで、自然界に広く分布している植物性食品中に含有されるクロロゲン酸(1)の生物活性に注目した。すなわち、活性酸素抑制効果および人体での変異性病原性物質の生成を阻害するなどの薬理効果がある(1)を含有する植物の摂取により、生体内で分解され最終代謝物としてカフェ酸(2)、フェルラ酸(3)、イソフェルラ酸(4)およびバニリン酸(4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸)(6)などになることが知られている⁴⁾。

本研究では(2)、(3)および(4)を基質にとり、アセトブロモ- α -D-グルコースなどの多糖類との縮合反応により、水溶性配糖体を効率的かつ経済的に合成する手法を確立した。得られた配糖体については、酵素レベルでの美白効果試験とB-16細胞に対する毒性試験を実施し、機能性化粧品材料化学への展開について検討する。また、植物性食品中に広く含有し活性酸素抑制効果ならびに人体での変異性病原性物質の生成を阻害するなどの薬理効果がある(1)からの代謝物であり、生体内で分離される最終代謝物の(2)、(3)および(4)を、それぞれ4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸(バニリン酸)(6)、3-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアルデヒド(7)および3,4-ジヒドロキシ安息香酸(5)から効率よく合成する手法の確立と同時に、これらを含む数種の関連化



Studies on the Synthesis of the Glycoside and Whitening Effects as a Cosmetics Material Using the Chlorogenic acid its Metabolite Contained in the Plants.

Masato Nomura, Akiyoshi Sawabe[#], and Yoshihito Fujihara^{*}

Department of Chemistry and Environmental Technology, Faculty of Engineering, Kinki University, Department of Agricultural Chemistry Faculty of Agriculture, Kinki University[#]

合物(6), (8)および(9)についての美白効果ならびに任意の割合で混合した試料(A)～(J)についても美白効果を検討し, 個々の化合物間での相乗効果による美白効果向上についても明らかにした。

2. 実 験

2. 1 試薬

出発原料である4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸(6), 3-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアルデヒド(7)および3,4-ジヒドロキシ安息香酸(5)は, 市販品(和光純薬製および東京化成工業製)を使用した。

2. 2 機器分析

各縮合生成物の構造については, 既報⁵⁾に記載した方法により確認した。

2. 3 合成方法

2. 3. 1 フェルラ酸(4-ヒドロキシ-3-メトキシケイ皮酸)(3)およびイソフェルラ酸(3-ヒドロキシ-4-メトキシケイ皮酸)(4)の合成

水素化アルミニウムリチウム(LiAlH_4) 0.4g (1.05×10^{-2} mol) をテトラヒドロフラン (THF) 30mL に懸濁し, 4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸(6) 1.0g (5.95×10^{-3} mol) を溶解した THF 溶液 15mL を1時間を要して滴下した。その後, 室温で4時間攪拌した。反応終了後, 油分をエーテル抽出し水洗したのち, 無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し4-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアルコールを収率 86.5% で得た。ついで, このアルコール 1.0g (6.49×10^{-3} mol) をジクロロメタン 30mL に溶解したのち, PDC 試薬 ($\text{CrO}_3 : \text{H}_2\text{O} : \text{Pyridine} : \text{Acetone} = 4\text{g} : 4\text{mL} : 3.2\text{g} : 16\text{g}$) 2.3g を溶解したジクロロメタン混合溶液 15mL を冷却下に1時間を要して滴下した。その後, 室温で48時間攪拌した。反応終了後, 油分をエーテル抽出し水洗した後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥, 溶媒を留去し, 4-ヒドロキシ-3-メトキシベンズアルデヒドを収率 72.2% で得た。次にマロン酸 1.25g (1.20×10^{-2} mol) を溶解したピリジン溶液 10mL に, このアルデヒド 1.5g (9.87×10^{-3} mol) を加え, 油浴上 (70 ~ 75°C) で2日間加熱攪拌した。反応終了後, 油分を常法通り後処理を行い4-ヒドロキシ-3-メトキシケイ皮酸(3)を収率 62.4% で得た。また, 3-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアルデヒド(7)についても同様な操作を行い3-ヒドロキシ-4-メトキシケイ皮酸(4)を収率 60.8% で得た。

2. 3. 2 カフェ酸(3,4-ジヒドロキシケイ皮酸)(2)の合成

3,4-ジヒドロキシケイ皮酸(5) 1.0g (6.49×10^{-3} mol) を用いて, 2. 3. 1の項に示した LAH 還元, PDC 酸化およびマロン酸縮合の操作方法に従って順次行い, 3,4-ジヒ

ドロキシケイ皮酸(2)を収率 58.2% で得た。

2. 3. 3 グリコシド体(配糖体)の合成

脱水ジクロロメタン 5mL にアセトブロモ- α -D グルコース 0.617g (1.5×10^{-3} mol), トリフルオロメタン酸スズ (II) 0.625g (1.5×10^{-3} mol) を入れ, 室温下で攪拌した後, この混合溶液に常法どおりの操作により誘導したフェルラ酸メチル 0.208g (1.0×10^{-3} mol) の脱水ジクロロメタン溶液 5mL と, 1,1,3,3-テトラメチル尿素 0.2g (1.7×10^{-3} mol) を加え, 18時間攪拌した。反応終了後, 炭酸水素ナトリウム水溶液 100mL を加え, ジクロロメタンで抽出 (100mL $\times$ 2) した。ジクロロメタン層を飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥, 溶媒を留去し, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 n-ヘキサン: 酢酸エチル = 1:1) により精製し, フェルラ酸メチルテトラアセチルグリコシドを収率 79.5% で得た。ついで, フェルラ酸メチルテトラアセチルグリコシド 0.271g (5×10^{-4} mol) をナトリウムメトキシドを用いて, 脱アセチル化した後, イオン交換樹脂 (DOWEX-50W) を用いて中和した。イオン交換樹脂をろ別した後, 減圧下に溶媒を留去し, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム: メタノール = 5:1) により精製し, フェルラ酸メチルグリコシド (3-Glc) を 0.122g (収率 65.9%) で得た。同様の操作をイソフェルラ酸(4)について行い, イソフェルラ酸メチルグリコシド (4-Glc) 0.097g (収率 52.6%) を得た。

2. 4 生物活性試験

2. 4. 1 チロシンを基質としたチロシナーゼ阻害活性試験

それぞれの化合物を所定の濃度 (0.1mM) に調製したのち, チロシナーゼ (Sigma chemical 社製, EC1.14.18.1) を用いて, 前報⁶⁾に従って操作し 475nm に設定した分光光度計で測定した。

2. 4. 2 DOPA を基質としたチロシナーゼ阻害活性試験

3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン (DOPA) (和光純薬社製) を所定の濃度 (1.66mM) に調製したのち, 2. 4. 1 項に示した前報⁶⁾に準じて行った。

2. 4. 3 活性酸素消去効果試験

それぞれの化合物を所定の濃度 (0.714mM) に調製した後, Superoxide dismutase (SOD), ワコーテスト試薬 (和光純薬社製) を用いて前報⁶⁾に従って操作し, 生成するジホルマザンを 560nm に設定した分光光度計で測定した。

2. 4. 4 ヒアルロニダーゼ阻害活性試験

0.4% のヒアルロン酸を含むリン酸緩衝液 (pH 6.0) を調製したのち, ヒアルロニダーゼ (Sigma chemical 社製,

EC3.2.1.35) を用いて前報⁶⁾に従って Ostwald 粘度計 (No.4) で測定した。

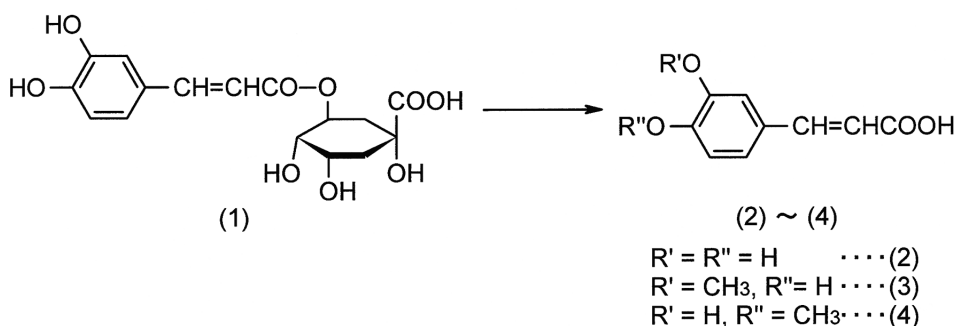
3. 結果および考察

クロロゲン酸(1)は植物性の食品原料中に存在するが、とくに嗜好品の一つであるコーヒー中には比較的多量に存在し、その供給源として重要であり、コーヒー製品が人体に与える生理学的影響についての研究^{7,8)}も盛んに行われている^{7,8)}。たとえば、(1)は胃腸管内に吸収されると血清中や胆汁中には検出されず、キニン酸とカフェ酸(2)に分解され、さらに代謝される。(2)は腸内細菌により m-ヒドロキシプロピオン酸に変換されたのち、脱炭素され、ごく一部は肝臓中でメチル化(3)、(4)および(6)になる (Scheme 1)。そこで、これら化合物を簡便で収率よく得る合成方法の確立とともに高付加価値的利用の一つとして化粧品美白剤への検討を行った。まず、これら化合物の合成方法として、Scheme 2 に示した酸化・還元・マロン酸縮合の組み

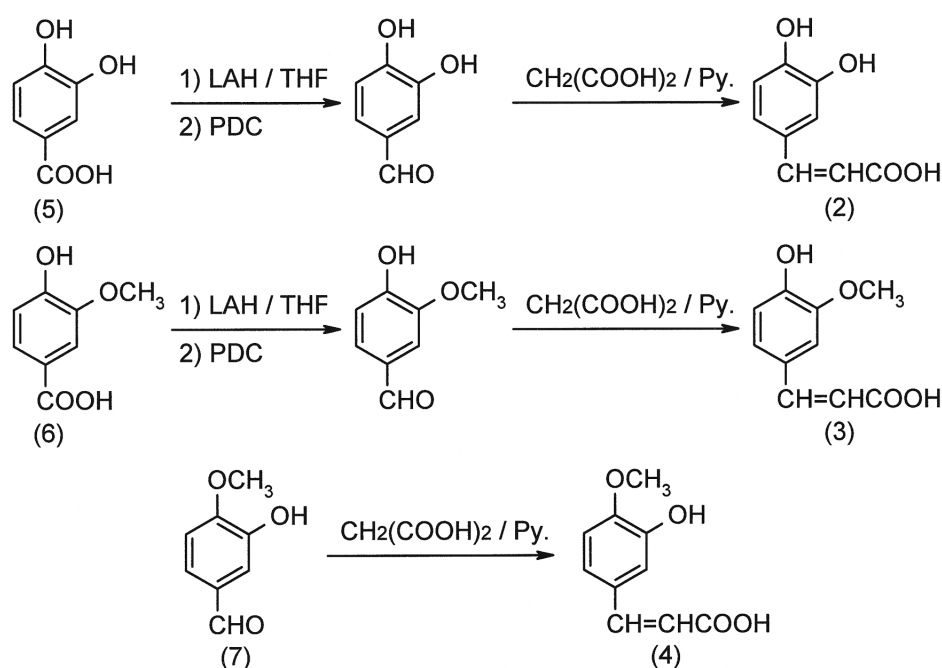
合わせのみで合成可能な出発原料として市販品 (和光純薬製および東京化成工業製) である(5)、(6)および(7)を用いて行った結果、(6)から(3)を 39% の収率で、(7)から(4)を 60.8% の収率で得ることができた。また、(5)から(2)を 25.5% の収率で得ることができた。

つぎに、これら合成した化合物(2)、(3)および(4)と(1)からの分解生成物として可能性のある化合物(8)および(9)について、化粧品配合剤の美白効果を期待し、チロシナーゼ阻害活性、活性酸素消去効果ならびにヒアルロニダーゼ阻害活性試験を検討した結果を表 1 に示す。また、比較物質として用いた(10)~(12)についても表 1 に示す。

シミおよびソバカスの生成原因であるメラニンの生合成経路における酵素チロシナーゼはチロシンをヒドロキシ化して DOPA に変化し、さらに DOPA を酸化してドーパキノンに変化する段階で触媒として作用するため、チロシナーゼを阻害することでこれらを抑制することが可能とされている。このことをふまえて、チロシナーゼ阻害活性を



Scheme 1



Scheme 2

検討したところ、とくに、(1)および(1)の分解生成物である(3)および(4)はチロシン基質と DOPA 基質において、いずれも良好な阻害を示す数値が得られ、美白効果が期待される。つぎに、DNA の攻撃、皮膚老化の促進あるいはメラニン生成に影響を及ぼすなどの有害作用がある活性酸 (O_2^- , 1O_2 , H_2O_2 , $LOOH$, $\cdot OH$) に対する消去効果について検討したところ、(1), (2)および(4)に良好な消去効果を示す数値 (いずれも 70%以上) が認められ、これらの症状に対する働きのある化粧品配合剤としての利用も可能であるものと思われる。

一方、動物の様々な組織、間接液あるいは皮膚などに存在するヒアルロン酸の分解酵素として考えられているヒアルロニダーゼの働きとしては、細胞間隙の水分保持、細菌感染の防止あるいは皮膚の潤滑化と柔軟性の保持な

どがある。このようなことから、その活性を抑制することで、小じわやかサツキなどの老化を防ぐことができ、機能的化粧品の特徴の一つとして重要であることから、今回の化合物についても検討したところ、いずれも著しい阻害活性を示す数値は得られなかった。

以上、3つの阻害活性試験の結果から、それぞれの化合物を単独で使用するよりも混合物として使用する方が、生薬あるいは漢方に見られるような相乗効果が生じて、より良い阻害効果が期待できるものと考え、表 1 に示した結果から(1)~(4), (6), (8)および(9)の化合物を表 2 に示したそれぞれの任意の割合で調合し、美白効果 (チロシナーゼ阻害活性試験および活性酸素消去効果) を検討した。その結果を表 3 に示す。チロシナーゼ阻害活性試験では化合

表 1 化合物(1)~(12)の美白効果試験結果

化合物 ^{a)}	チロシナーゼ阻害活性		活性酸素消去効果	ヒアルロニダーゼ阻害活性
	チロシン基質	DOPA 基質		
クロロゲン酸 (1)	47.55 ^{b)}	29.60	74.39	1.98
カフェ酸 (2)	5.71	-14.02	75.24	-0.31
フェルラ酸 (3)	36.03	24.62	45.85	1.81
イソフェルラ酸 (4)	48.99	37.12	71.12	1.11
3,4-ジヒドロキシ安息香酸 (5)	4.92	-6.20	38.21	-1.27
4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸 (6)	7.60	-1.89	30.14	-1.06
3-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアルデヒド (7)	32.15	3.50	23.04	-1.98
4-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアルコール (8)	3.34	-16.29	56.32	-0.58
4-ヒドロキシ-3-メトキシケイ皮アルデヒド (9)	32.61	-8.71	36.46	-1.25
オイゲノール (10)	34.31	15.75	43.48	3.92
イソオイゲノール (11)	29.50	-0.16	57.92	7.62
1,2-ジメトキシ-4-プロペニルベンゼン (12)	3.45	4.23	0.47	-0.13

a) Concentration: 0.1mM b) Inhibitory rate (%)

表 2 化合物(1)~(9)試料の混合割合

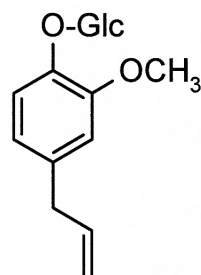
化合物 試料番号	(1)	(2)	(3)	(4)	(6)	(8)	(9)
(A)	50	10	10	10	10	10	10
(B)	40	10	20	10	10	10	10
(C)	40	10	10	20	10	10	10
(D)	30	10	20	20	10	10	10
(E)	20	10	30	30	10	10	30
(F)	10	5	30	30	5	5	30
(G)	10	10	40	10	10	10	10
(H)	10	10	10	40	10	10	10
(I)	10	10	10	10	10	10	40
(J)	10	30	5	5	30	30	5

(単位 : mg)

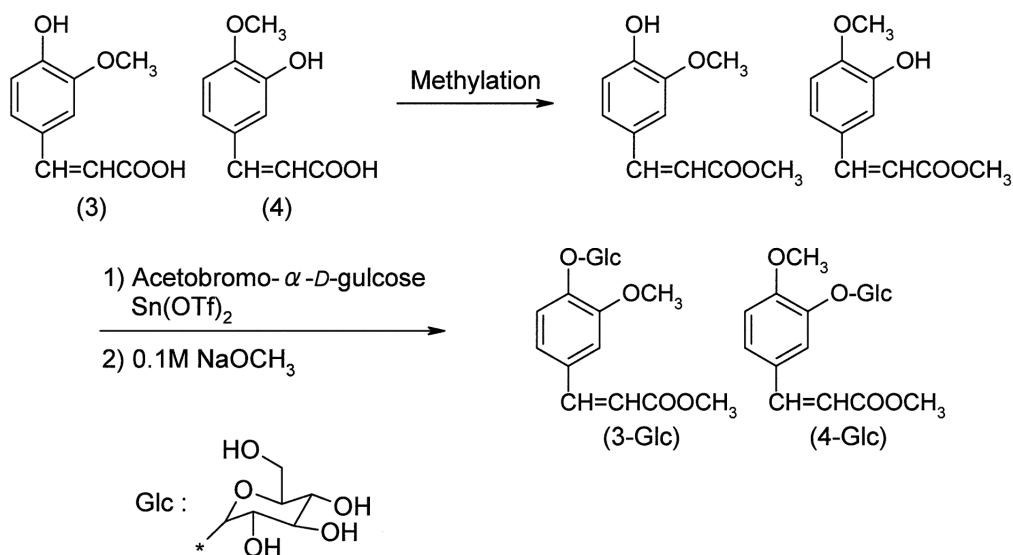
表3 混合試料(A)～(J) 美白効果試験結果

試料番号	チロシナーゼ阻害活性*		活性酸素消去効果	
	チロシン基質	DOPA 基質	濃度 1.0%	濃度 0.1%
(A)	30.1	33.5	78.8	50.6
(B)	29.5	42.0	88.8	60.8
(C)	42.7	42.5	88.8	53.3
(D)	23.1	42.5	92.6	56.0
(E)	6.8	37.5	97.7	69.6
(F)	14.8	42.5	94.6	64.7
(G)	3.9	33.5	91.6	65.9
(H)	15.7	40.5	90.1	53.5
(I)	3.8	24.9	95.2	65.1
(J)	22.9	16.8	90.1	24.8

*Concentration 1.0%



Scheme 3



Scheme 4

物(3)および(4)の調合割合が阻害活性に大きな影響を及ぼすことが認められ、いずれも DOPA 基質において、その阻害活性が向上 (40% 以上の数値) した。その中でもとくに、試料番号 (B) および (C) ではチロシンを基質とした場合においても、良好な阻害活性が認められた。また、活性酸素消去効果試験においても著しい抑制効果を示す数値 (90% 前後) が得られたことから、さらに測定濃度を希釈 (0.1%) した場合にも、良好な消去効果を示す数値が得られた。

つぎに、著者らはチロシナーゼ阻害活性および活性酸素消去効果試験でそれぞれ高い阻害効果が認められた化合物(3)および(4)について、実用的使用を考慮し水に可溶な化合物に誘導することにより、皮膚浸透性を高め、同時に美白効果も保持されるものと思い、グルコースを導

入した化合物 (3-Glc) および (4-Glc) の合成を行ったところ、収率よく合成 (Scheme 4) することができた。これら 2 種類のグリコシド体の美白効果試験を実施した結果を表 4 に示す。それぞれの阻害活性は測定する試料濃度にも依存することが明らかであり、しかもこれら化合物はいずれも高い水溶性を持たせることができたことから、今回の測定実験においても同様に、最終濃度を 0.1mM で行った。その結果、とくに前駆体である化合物(3)および(4)のチロシナーゼ阻害活性が比較的高い値を示したのに対して、誘導したグリコシド体 (3-Glc) および (4-Glc) では、いずれも阻害活性値が小さくアルブチンと同等の値を示すことがわかった。また、著者らもこれらマッシュルーム由来のチロシナーゼに対する阻害活性機序は、拮抗阻害があ

表 4 配糖体 (3-Glc) および (4-Glc) の美白効果試験結

化合物 ^{a)}	チロシナーゼ阻害活性		活性酸素 消去効果	ヒアルロニダーゼ 阻害活性
	チロシン基質	DOPA 基質		
(3-Glc)	7.45 ^{b)}	10.36	1.54	-2.03
(4-Glc)	10.92	12.30	0.24	13.10
Citrusin C	47.20	87.93	4.35	7.32
Arbutin	7.5	14.9	0.5	-30.20

a) Concentration: 0.1mM b) Inhibitory rate (%)

ることを明らかにしており、今回の測定濃度は細胞増殖に影響のない濃度であると思われることから、フェニルプロパノイドがメラノサイトに作用することなくメラノサイトに対するチロシナーゼ阻害または、整合性阻害が生起しているものと考えている。

このようなことから母格のフェニルプロパノイドのベンゼン環にヒドロキシル基とメトキシ基が存在し、側鎖に α , β -不飽和カルボン酸が存在しているそれぞれの化合物を任意の割合で混合することにより、相乗効果が著しく発現し、美白剤として重要であるチロシナーゼ阻害活性および活性酸素消去効果を期待どおり向上させることができた。また、著者らは比較物質として用いたオイゲノールのグルコース配糖体としてアフリカ産食用葉のノゲイトウ (*Celosia Argentea* L.) に含まれるシトラシン C (Scheme 3) の合成に成功するとともに、非常に高い美白効果があることについても明らかにすることができたことから、クロロゲン酸分解生成物である(3)および(4)の配糖体合成を行い美白効果を検討したが、シトラシン C よりも高い阻害活性

値は得られなかった。しかし、市販品であるアルブチンと同等の値を示すことを明らかにすることができた。

(参考文献)

- 1) C. H. Muller, W. H. Muller, B. L. Haines, *Science*, **143**, 471 (1964).
- 2) H. Okudaira, *Medicam News*, **1323**, 20 (1991).
- 3) W. H. Eaglstein, *Cosmetic and Perfumery*, **90**, 25 (1975).
- 4) A. N. Booth, O. H. Emerson, F. T. Jones, *J. Biol. Chem.*, **229**, 51 (1957).
- 5) 野村正人, 立花伸哉, 山田康裕, 藤原義人, *農化*, **73**, 605 (1999).
- 6) 野村正人, 西村和彦, 藤原義人, 多田貴広, 服部文弘, 下村健次, *油化学*, **49**, 143 (2000).
- 7) M. P. Lachance, *J. Food Safety*, **4**, 71 (1982).
- 8) P. W. Curatolo, D. Robertson, *Ann. Int. Med.*, **98**, 641 (1982).

化粧品素材としての含硫化合物の生産に関する研究

早稲田大学 理工学部

木 野 邦 器、桐 村 光 太 郎

In generally microorganisms, L-cysteine is synthesized from sulfide and O-acetyl-L-serine (OAS) by O-acetylserine sulphydrylase (OASS). On the other hand, tryptophan synthase (TS) consist of α -subunit and β -subunit forming $\alpha_2\beta_2$ complex. An α -subunit and β -subunit can exist as α monomer and β_2 homodimer in cell, respectively. It is known three-dimensional structure of TS β is similar to that of OASS-A which is an isozyme of OASS, although nucleotide sequences are identified only 20%. And TS β can recognize not only OAS but also L-serine as substrate and synthesize L-cysteine from L-serine and sulfide. β_2 complex has the activity of β -replacement and β -elimination reaction, and it catalyzes β -elimination reaction more than the other one. However $\alpha_2\beta_2$ complex catalyzes β -replacement reaction more.

We attempt to synthesize L-cysteine from L-serine and sulfide by using the enzyme reaction of TS overexpression organism. At first trpB and trpA gene were cloned into an expression vector pTrc99A and the constructed plasmid designated pTTS. We identified that L-cysteine was synthesized from L-serine and sulfide by enzyme reaction of cell-free extract of Escherichia coli JM109 carrying plasmid pTTS. And L-methionine was detected in this reaction mixture.

1. 緒 言

含硫化合物は生体において重要な機能を持つことが多く、化粧品・医薬品・食品などの原料として広く用いられている。特にL-システインは化粧品原料として用いられているが、その製法は専ら毛髪等タンパク質からの抽出法に依存しており、発酵法による工業的製法が確立されていないアミノ酸の一つである。また、最近はその需要増や環境問題から従来の主製法である抽出法からの脱却も望まれている。

一般的な微生物においてL-システインは、硫酸還元経路の最終産物のスルフィドとO-アセチルセリン（以下OAS）からO-アセチルセリンスルフィドリアーゼ（以下OASS）の触媒する反応によって合成される¹⁾。この生合成経路は複雑な制御を受けており²⁾、またL-システインは多くの含硫化合物の生合成中間体であるため代謝されやすく、高収率の発酵生産プロセスを構築することは極めて難しい。このような背景を踏まえ、我々はビタミンB₆依存性酵素トリプトファンシンターゼ（以下TS）の特性に着目した³⁾。TSは α サブユニットと β サブユニットの2種類から成り、 $\alpha_2\beta_2$ 複合体としてL-トリプトファン生合成の最終段階を触媒する多機能酵素であり、それぞれ α 単体、 β_2 複合体としても存在する。また、 β サブユニットの遺伝子配列は、OASSのアイソザイムで主活性体であるOASS-A

の遺伝子配列と20%程度しか一致していないにも関わらず、お互いの立体構造は酷似している^{4,5)}。また、TS β はOASだけでなく、L-セリンも基質とすることが報告されている⁶⁾。しかし、TS β だけでは β 置換反応よりも β 脱離反応をより強く触媒するため、 β 置換反応を必要とするL-システイン合成を行うには、TSは $\alpha_2\beta_2$ 四量体の状態で用いることが望ましいと考えられる。

本研究では、TSの β 置換反応によってL-セリンとスルフィドからL-システインを合成する効率的な生産系の確立を目的とした。そこでTS α 、TS β をコードする大腸菌由来の遺伝子 trpA と trpB を高発現プラスミドにクローニングしてプラスミド pTTS を構築した。まず、トリプトファン要求性 (trpBA 欠損変異) 大腸菌を pTTS で形質転換した時のL-トリプトファン要求性相補の可否を確認し、次にL-システイン要求性 (cysE 欠損変異) 大腸菌を当該プラスミドで形質転換した時、L-システインの代わりにL-セリンとスルフィドを添加した培地で生育するかどうかを確認した。さらに、pTTS で形質転換した大腸菌の粗酵素抽出液を用いてL-セリンとNa₂SからのL-システイン合成を試みた。

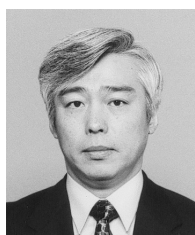
2. 実 験

2.1 試薬

本研究で使用した制限酵素は全て日本ジーン社製であり、プラスミド pTrc99A はアマシャムファルマシアバイオテック社製である。Polymerase Chain Reaction (PCR) で用いたDNA Polymerase には TaKaRa 社製 Ex Taq を用い、その他の試薬は全て関東化学社製のものを使用した。

2.2 使用菌株

本研究では、DNA 供試菌および宿主として *Escherichia coli* JM109 を用いた。L-トリプトファン要求性大腸菌は



Development of Novel Process for Producing Sulfur-containing Compound as Cosmetics Material
Kuniki Kino, Kohtaro Kirimura

*
School of Science and Engineering Waseda University

E. coli CAG12202 (trpB::Tn10Kan, thi-1, relA1) を、L-システイン要求性大腸菌は *E. coli* KY14182 を用いた。なお、CAG12202 株は国立遺伝学研究所より分譲され、KY14182 は協和発酵工業株式会社より分譲された株である。

2.3 実験方法

2.3.1 trpA、trpB のクローニング

trpA、trpB のクローニングは PCR 法にて実施した。既に報告されている大腸菌由来の trpA、trpB の塩基配列から、2 種のオリゴヌクレオチドプライマー、5'-CGCCATGGAAGGAAAGGAACAATGAC-3' と 5'-GGCTGCAGTTAACTGCGCGTCGCCGC-3' を設計した。*E. coli* JM109 の染色体 DNA を鋳型として PCR 法にて trpA、trpB を含む DNA 断片を増幅した。PCR の条件は、95℃ 60 秒 (1 サイクル)、95℃ 60 秒、56℃ 60 秒、72℃ 120 秒 (30 サイクル)、72℃ 300 秒 (1 サイクル) で行った。その後、得られた DNA 断片 (約 2.1kb) とプラスミドベクター pTrc99A を NcoI と PstI で制限消化し、両者を連結してプラスミド pTTS を構築した。

2.3.2 形質転換

形質転換はバイオラッド社製ジーンパルサーを用いたエレクトロポレーション法 (初期電圧 25V、抵抗 400Ω、キャパシタンス 25FD) にて実施した。

2.3.3 菌体の培養

菌体の培養は、500mL 容三角フラスコに LB 培地 (バクトトリプトン 10 g/L、イーストエキストラクト 5 g/L、NaCl 10 g/L) を 200mL 入れたものに接種し、37℃ で 18 時間液体振とう培養した。

2.3.4 組換え TS の活性確認

pTTS を導入した L-トリプトファン要求性大腸菌 *E. coli* CAG12202 を最少平板培地に接種し、その生育の可否で pTTS による L-トリプトファン要求性の相補を確認した。

また、組換えトリプトファンシンターゼを用いて L-トリプトファン合成を検討した。pTTS を導入した *E. coli* JM109 を 200mL の LB 培地で 18 時間培養し、集菌した菌体に 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20mL を加え、さらに L-セリン 50 mM、インドール 10mM、ピリドキサルリン酸 0.1 mM になるように添加した溶液で、37℃、24 時間反応を実施した。分析は薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて行い、展開溶媒は 99.5% エタノール : H₂O = 63 : 37 とした。

2.3.5 組換え TS による L-システインの合成

最少培地に L-システイン合成における基質となる L-セリン 50mM、Na₂S 30mM を含み、さらに補酵素である

ピリドキサルリン酸 0.1 mM、誘導物質であるイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) 0.1mM を含んだ平板培地上に、pTTS を導入した L-システイン要求性大腸菌 *E. coli* KY14182 を接種し、L-システイン要求性の回復をその生育の可否で判断した。

また、pTTS を導入した *E. coli* JM109 を 200mL の LB 培地で 18 時間培養し、集菌した菌体を 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 20mL で懸濁し、ホモジナイザーにより細胞膜を破碎、その後遠心分離により細胞膜を除去して粗酵素抽出液を調製した。L-セリン 50 mM、Na₂S 30 mM、ピリドキサルリン酸 0.1 mM、さらに L-システインの収率が上がると報告されている SDS を 1 g/L になるように添加した溶液を用い、37℃、24 時間反応を行った。分析は TLC により実施した。展開溶媒は前述と同様である。

3. 結果

3.1 trpBA のクローニング

E. coli JM109 の染色体 DNA から単離、増幅した trpBA (2.1 kb) を高発現ベクター pTrc99A (4.6 kb) の NcoI-PstI サイトにクローニングし、目的プラスミド pTTS (6.7 kb) を得た (Fig. 1)。

3.2 SDS-PAGE による TS α 、TS β の発現の確認

pTTS を導入した *E. coli* JM109 において、pTTS の持つ trpA と trpB の発現の程度を調べるため、*E. coli* JM109/pTTS の粗酵素抽出液に対して SDS-PAGE を行った。29kDa の TS α の大きさ一致する強いバンドが 30 kDa 付近に、45kDa の TS β の大きさと一致する強いバンドが 45 kDa 付近に認められ、TS α 、TS β 両遺伝子の高発現が各々確認できた (Fig. 2)。

3.3 TS の活性確認

組換え TS が活性を保持しているか確認するために、pTTS を導入した TS 欠損株 *E. coli* CAG12202 (CAG12202 / pTTS) を L-トリプトファンを含まない最少平板培地に接種し、その生育の可否により L-トリプトファン要求性の相補を観察した。期待通り宿主の L-トリプトファン

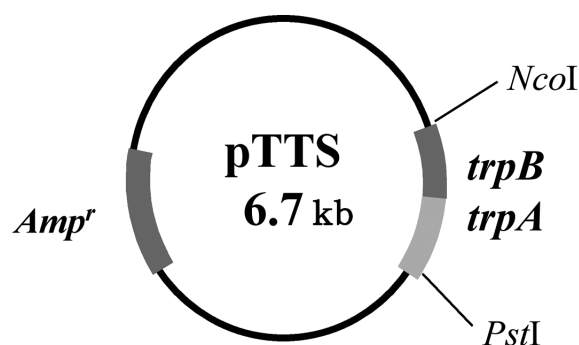


Fig.1 Physical map of constructed plasmid pTTS carrying trpB and trpA gene.

要求性は相補され、*E.coli* CAG12202 / pTTS は生育した。

さらに、休止菌体反応による L-トリプトファンの合成活性も検討した。その結果、収率は低いものの L-トリプトファンの合成が TLC により確認でき (Fig. 3)、組換え TS が活性を保持していることが示された。

3.4 L-システイン要求性の相補

pTTS のコードする TS が活性を維持していることを確認したので、続いてこれを用いて L-システインの合成を試みた。pTTS を導入した L-システイン要求性大腸菌 *E.coli* KY14182 (KY14182 / pTTS) を、L-セリン、Na₂S、ピリドキサルリン酸、IPTG を添加した L-システインを含まない最少平板培地に接種した。その結果、*E.coli* KY14182 / pTTS は生育し、L-セリンと Na₂S から L-システインが合成されていることが示された。また、そのコロニーの大きさは L-システインを含んだ最少平板培地に接種した宿主が形成するコロニーと同程度かそれ以上の大きさであった。

3.5 粗酵素抽出液による L-システインの合成

L-トリプトファン合成反応は休止菌体反応で行ったが、L-システイン合成反応は粗酵素抽出液により実施した。この理由は 2 点あり、1 点目は L-システインが酸化により容易に二量体 (L-シスチン) となり沈殿を生じるため、あらかじめ細胞膜を除去し反応後に遠心分離することで簡便に L-シスチンの回収が可能であると考えたからである。2 点目は大腸菌の細胞膜には粘着性があり、休止菌体反応では菌体同士の接着により収率が低下する可能性があり、それを回避するためである。そこで粗酵素抽出液を用い、基質となる L-セリンと Na₂S の最適条件を検討した。

Na₂S は高濃度では酵素活性を阻害する。検討の結果、酵素活性を保持することができる上限はおよそ 30mM であることがわかった。そこで、L-セリン 50mM、Na₂S 30mM、ピリドキサルリン酸 0.1mM、SDS 1 g/L を粗酵素抽出液を用いる場合の最適条件とし、L-システイン合成反応を実施した。反応液の TLC 分析では、収率が低いものの L-システイン生成を確認できた。ところが、他にも生成物が検出され、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析の結果、L-メチオニンの位置にピークが見られた。再度 TLC により検討したところ、L-システインと L-メチオニンの位置にスポットが確認でき (Fig. 4)、L-システインと L-メチオニンが上記反応系において生成していることが明らかになった。

4. 考 察

TS を用いた L-セリンと Na₂S からの L-システインの合成が確認できた。しかし、収率は低かった。これは、反応条件の最適化がなされていないことと、含硫アミノ酸の

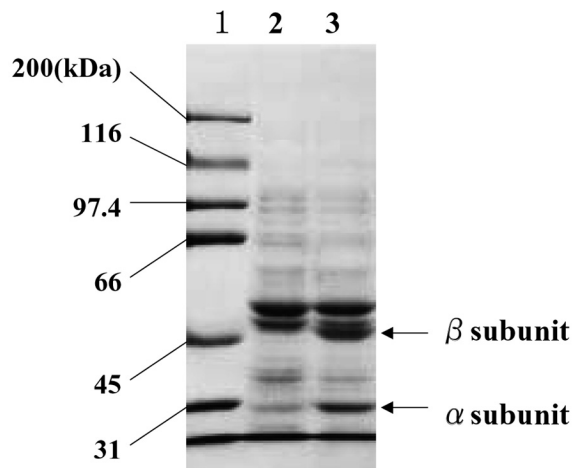


Fig.2 SDS-PAGE analysis of the cell-free extracts of each strain. Lane1, Protein size marker ; lane2, cell extract of *E.coli* JM109; lane3, cell extract of *E.coli* CAG12202/pTTS.

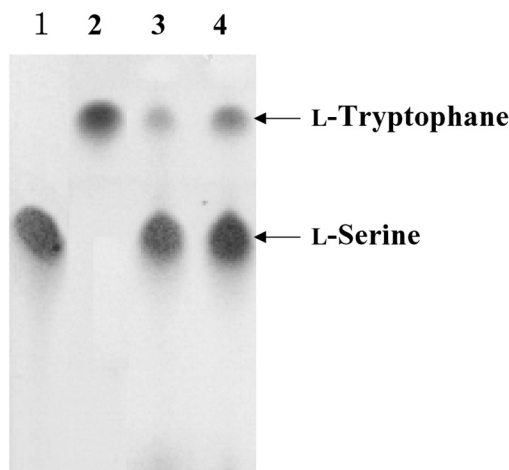


Fig.3 Thin-layer chromatogram of L-tryptophan synthesis reaction products using TS.

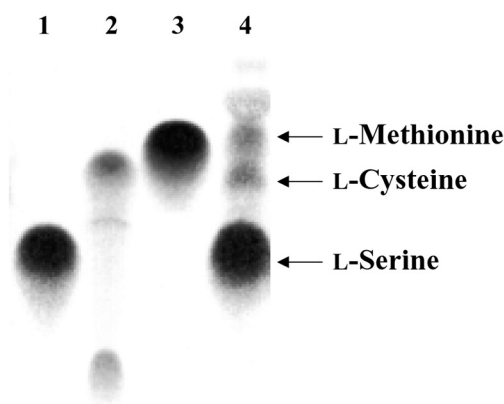


Fig.4 Thin-layer chromatogram of L-tryptophan synthesis reaction products using TS. Lane1, L-serine ; lane2, L-cysteine ; lane3, L-methionine ; lane4, reaction product by enzyme reaction of cell-free extract of *E.coli* JM109/pTTS.

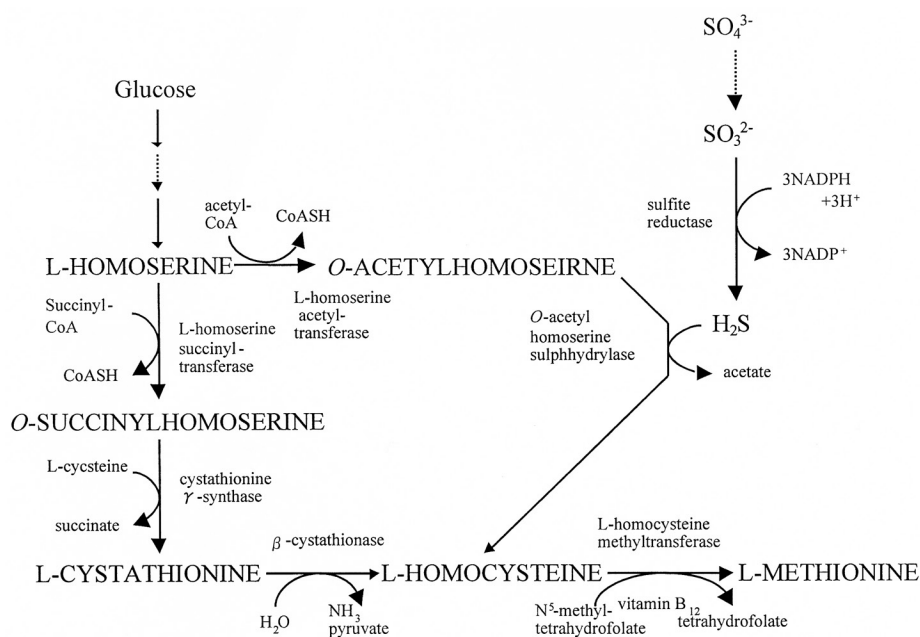


Fig.5. Biosynthesis pathway of L-methionine

代謝中間体である L-システインは分解代謝されやすく、安定に保持されなかったからではないかと考えられる。この場合、L-システインから分解代謝系を抑える必要があるが、その主分解産物として L-メチオニンを検出したことは極めて興味深い。

また、スルフィドとして加える Na_2S は不安定な物質で、簡単に H_2S になり気中に放出されてしまう。例えば反応溶液の pH を調整するときはこの傾向が激しく、かなりの量の Na_2S が H_2S になり気中に放出される。また、培養中は 37°C と比較的高温状態であるのでこの傾向は益々増大する。したがって反応溶液内ではスルフィド量が律速となり、十分な反応を行なうためにはその不足分を逐次補う必要があると考えられる。しかし、反応溶液中の残存硫黄イオン濃度を計測することはできないので、 Na_2S の最適添加量を判断するのは難しい。

L-メチオニンは微生物では Fig. 5 に示す経路により合成されている。今回の研究では、L-セリンに対する L-メチオニンの収率は約 20 ~ 30 % であった。仮に L-メチオニンへの代謝経路を遮断した菌体で L-システインの合成反応を行うと、40 ~ 50 % 以上の高収率で L-システインを得ることができると期待される。L-メチオニンはもっぱら化学合成法から得られるメチオニンラセミ体からの分割法で生産されているが、安価な L-メチオニン供給の可能な発酵生産プロセスは未だ確立されていない。今回、L-システインだけでなく L-メチオニンの生成も確認することができた。L-セリンからの L-メチオニン合成に關す

る報告は従来なく、L-メチオニンの新たな酵素合成法を提示するものとして今後詳細に検討する価値があると考える。

(引用文献)

- 1) Kredich N.M. : Biosynthesis of cysteine, In :Nidifardt FC, Ingraham JL, Magasanik B. (eds) : Escherichia coli and Salmonella typhimurium, : Cellular and Molecular Biology, 1, American Society for Microbiology, 1987, 419-428.
- 2) Kredich N.M. : Regulation of cysteine biosynthesis in Escherichia coli and Salmonella typhimurium, 115-132. In K.M.Herrmann, R.L.Somerville (eds), Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation. Addison-Wesley Publishing Company, 1983
- 3) Miles E.W. : Tryptophan synthase : Structure, function, and subunit interaction, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 49, 127-186, 1979.
- 4) Hyde C.C., Ahmed S.A., and Davies D.R., : Three-dimensional structure of the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ multienzyme complex from Salmonella typhimurium, J. Biol. Chem., 263, 17857-17871, 1988.
- 5) Burkhard P., Rao G.S., and Hohenester E. : Three-dimensional structure of O-acetylserine sulfhydrylase from Salmonella typhimurium, J. Mol. Biol., 283, 121-133, 1998.
- 6) 嶋田正雄, 中村武史, 石渡健一, ほか 1 名, : 特開昭 61-242589

微生物代謝工学に基づく必須および新規脂肪酸の大量生産

筑波大学 応用生物化学系

小林 達彦

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) play important roles as structural components of membrane phospholipids, and as precursors of the eicosanoids of signaling molecules including prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes. The principal PUFAs are dihomo- γ -linolenic acid (n-6 PUFA; $\Delta 8$, $\Delta 11$, $\Delta 14$ -20:3), arachidonic acid (n-6 PUFA; $\Delta 5$, $\Delta 8$, $\Delta 11$, $\Delta 14$ -20:4), and eicosapentaenoic acid (n-3 PUFA; $\Delta 5$, $\Delta 8$, $\Delta 11$, $\Delta 14$, $\Delta 17$ -20:5). All mammals synthesize eicosanoids which are involved in the inflammatory response, reproductive function and so on. Therefore, studies on PUFAs are important in both the medical and pharmaceutical fields. We have studied the fatty acid metabolism in the filamentous fungus, *Mortierella*, which produces some C-20 PUFAs (e.g., dihomo- γ -linolenic acid, arachidonic acid and eicosapentaenoic acid). In this study, at the gene level, we investigated desaturase and elongase involved in PUFA metabolism of this strain. We cloned $\Delta 9$ -desaturase b gene from the gene library of this *Mortierella* strain. The predicted amino acid sequence showed similarity to those of other $\Delta 9$ -desaturases including stearoyl-CoA desaturase from several living organisms including yeast, rat and so on. This sequence also contained a cytochrome b5-like domain at the C-terminus, being different from the *Mortierella* $\Delta 6$ -desaturase which has the corresponding domain at the N-terminus. This finding suggests that this domain in the desaturase would play the role of a unique electron transport system, binding a heme group. We also cloned a part of the elongase gene from the *Mortierella* strain for the first time. Further works would lead to the overproduction of various PUFA through gene manipulation in the *Mortierella* strain.

1. 緒言

必須脂肪酸である γ -リノレン酸はアトピー性皮膚炎等アレルギーの軽減作用があり、また、アラキドン酸は皮膚の乾燥抑制効果がある。これらの高度不飽和脂肪酸 (PUFA) は、これらの作用だけでなくコスメトロジーにおける重要な素材である。近年、これらの PUFA を化粧品分野で利用せんとする試みが世界的規模で進行しているが、これらの油脂類の供給源に目を向けると、魚介類以外には有効な供給源すら知られていない。また、我が国では有効な生産手段を持たず、海外からの供給に対する依存度が高く、気候などの変動による供給量、品質などの変動を受けやすいこと、また、海洋汚染による資源自体の汚染も問題となりつつある。

Mortierella 属糸状菌はアラキドン酸などの炭素鎖が 20 の PUFA を生産することができる¹⁾。本研究者らは現在、糸状菌 *Mortierella* における PUFA 生合成に関わる酵素・タンパク質を分子レベルで検討しつつある²⁻⁷⁾。本研究では、脂肪酸の $\Delta 9$ の位置に二重結合を導入する $\Delta 9$ 不飽和化酵素、および、炭素鎖が 20 以上の PUFA の生合成において、C18 脂肪酸生産微生物の C20 脂肪酸生産株への変換に必

須のステップを担う(炭素鎖 18 から 20 へ鎖長を延長する)鎖長延長酵素を対象とし、分子レベルでの検討を行った。これらの PUFA の生合成に関わる酵素・タンパク質遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて親株の *Mortierella* で特異的に発現させることや遺伝子破壊などの方法を組み合わせることによって、様々な PUFA を選択的に生産あるいは新規な PUFA を代謝工学的に生産できる可能性がある。

2. 実験・結果・考察

3.1 不飽和化酵素遺伝子の解析

SuperCos 1 cosmid vector を用いて作製した糸状菌 *Mortierella* のゲノムライブラリーに由来する大腸菌ライブラリーに対して、(本研究者らによって)既にクローン化している $\Delta 9$ -Desaturase cDNA a をプローブとした指標によってポジティブクローンを取得した。本クローンに対して、上記のプローブを用いて切り縮めを行った結果、4,988 bp から成る一つのオープンリーディングフレームを認めた(図1)。また、真核生物に一般的な転写開始部位の近傍によく見られ、RNA ポリメラーゼの転写効率を上昇させると考えられる特異配列である CAAT box と TATA box を検索した結果、TATA box は認められなかったが、CAAT box に類似の配列 (ATCCAAT) が開始コドン ATG の 359 bp 上流に存在することが判明した。

得られた遺伝子から推定されるアミノ酸配列は、 $\Delta 9$ -Desaturase a や (ラットや *Saccharomyces* などの) の真核生物由来の Stearoyl-CoA desaturase と高い相同性を示し(図2)、従って、 $\Delta 9$ -Desaturase b 遺伝子と命名した。他の生物由来の Stearoyl-CoA desaturase とは相同性は低



Overproduction of essential and new fatty acids through microbial metabolic engineering

Michihiko Kobayashi

University of Tsukuba

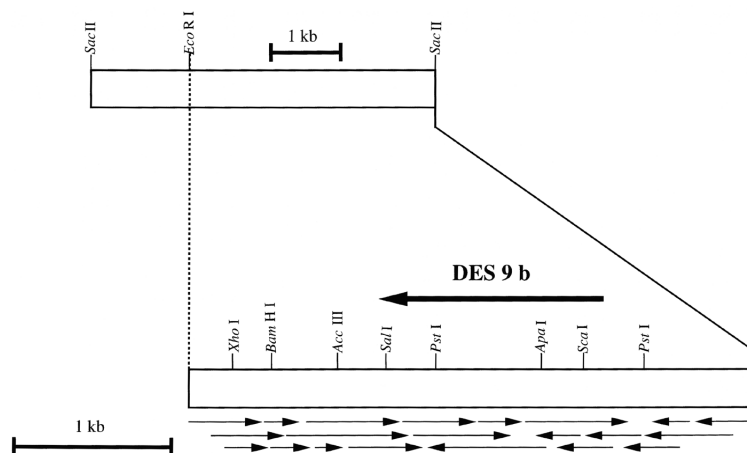


図1 ポジティブクローンの制限酵素地図
矢印は、 $\Delta 9$ -Desaturase b ゲノム遺伝子

YEAST	MPTSGTTIELIDDQFPKDDSSASSGIVDEVDLTEANILATGLNKKAPRIVNGFGLSMGSKE	60
MOUSE	MPAHLQEISSYTTTTTI	19
RAT	MPAHLQEISSYTTTTTTEP	22
DES9b	MATPLPPTFTVPASSTETTRDPLRHEVLPLPFNNKVNILNIWKYLDWKHVIGLV	56
DES9a	MATPLPPTFTVPATQETTRDPLQHEELPLF-PEKTIYNIWRVLDYKHVVGGL	55
YEAST	MVSVEFDKKGNEKSNLDRLEKDNQEKKEAKTKIHISEQPTLNNWHQHLNWLMMVVC	120
MOUSE	TAPPSGNEREKVKTVPLHLEDIRPEMKEDIHDETYQDEE--GPPPKLEYVWRNII-IMV	76
RAT	PSGNLQNGREKMKVPLYLEDIRPEMRREDIHDPSYQDEE--GPPPKLEYVWRNII-IMA	79
DES9b	T-PLVALY-G-IFTTELQTKTLVWSIIYYEATGLGITAGYHRLWAHRAVAGPAMSMALA	113
DES9a	T-PLIALY-G-LLTTELQTKTLIWSIIYYEATGLGITAGYHRLWAHRAVAGPAMSVLA	112
YEAST	GMPMIGWYFALSGKVPHLNVFLSVFYAVGCVSITAGYHRLWSHRSYSAHWPLRLFYA	180
MOUSE	LLHLGGLY-GITLVPSCKLYTALFCIFYMTSALGITAGAHRLWSHRTYKARLPLRIFLI	135
RAT	LLHVGLY-GITLIPSSKVYLLWGLIFYLISALGITAGAHRLWSHRTYKARLPLRIFLI	138
DES9b	LFGAGAVEGSIKWSRGHRAHHRWTDTEKDPYSAHRCIFYSHLGWLL-IKRPGWKIGHA-	171
DES9a	LLGAGAVEGSIKWSRGHRAHHRWTDTEKDPYSAHRCIFFSHIGWML-IKRPGWKIGHA-	170
YEAST	IFGCASVEGSAKWWGSHRIHHRVTDTLRDPYDARRGLWYSHMGWML-LKPNPKYKARA-	238
MOUSE	IANTMAFQNDVYDWARDHRAHHRKFSETHADPHNSRRGFFFSHVGLVVRKHPAVKEKGGK	195
RAT	IANTMAFQNDVYDWARDHRAHHRKFSETHADPHNSRRGFFFSHVGLVVRKHPAVKEKGGK	198
DES9b	-DMEDLNKNALVQWQHKHYPILVLLMGLVFPTAVAGLGWDWRGGYFY-AAILRLIFVHH	229
DES9a	-DVDLNLKSKLVQWQHKNYLPLVLIMGVVFPTAVAGLGWDWRGGYFY-AAILRLVFEVHH	228
YEAST	-DITDMDTDWTIRFOHRYIILMLLTAFVPTLICGYFFNDYMGGLIY-AGFIRVVFVQQ	296
MOUSE	LDMSDLKAEKLVMFORRYYPGLLLMCFILPTLVPWYCWGETFVNSLFSVSTFLRYTLVLN	255
RAT	LDMSDLKAEKLVMFORRYYPGLLLMCFILPTLVPWYCWGETFLHSLFSVSTFLRYTLVLN	258
DES9b	ATFCVNSLAHWLGDGPFDDRRHTPRDHFITAFVTLGEGYHNFHHQFPQDYRNAIRFYQYDP	289
DES9a	ATFCVNSLAHWLGDGPFDDRRHSPRDHFITAFVTLGEGYHNFHHQFPQDYRNAIRFYQYDP	288
YEAST	ATFCVNSLAHYITQFPDDRRHTPRDNWITAFVTLGEGYHNFHHQFPQDYRNAIKWYQYDP	356
MOUSE	ATWLVNSAAHLYGVRPYDKNIQSRENILVSLGAVGEGPHNHHHTFPDYASAEYRWHINF	315
RAT	ATWLVNSAAHLYGVRPYDKNIQSRENILVSLGSGVGEAPHNHHHTFPDYASAEYRWHINF	318
DES9b	TKWLATCAFFGASHLKTFFPENEIRKGLQMIKKVLDKKTQLQWGTPIADLPILSFED	349
DES9a	TKWIALCAFFGLASHLKTFFPENEVRKGLQMIKKVLEKKTQLQWGTPIADLPILSPED	348
YEAST	TKVITLYTSLVGLAYDLKKFSQNAIEEALIQEOKKINKKKAKINWGPVLTDLPMWDRQT	416
MOUSE	TTFFDCAALGLAYDRKKVSKATVLARIKRTGDGSHKSS	355
RAT	TTFFDCAALGLAYDRKKVSKAAVLARIKRTGDGSHKSS	358
DES9b	FQHACKNDSKQWILLEGVVYDVADFVEHPGGEKYIKMGVGKDMTAAFNGGMYDHSNAAR	409
DES9a	YQHACKNDNKKWILLEGVVYDVADFMEHPGGEKYIKMGVGKDMTAAFNGGMYDHSNAAR	408
YEAST	FLAKSR-ENKGLVVISGIVHDVSGYISEHPGGETLIKALGKDATAFSGGVYRHSNAAQ	475
DES9b	NLLSLMRVAVVEFGGEVEAQSRSPVVPYC-EHSKEE	445
DES9a	NLLSLMRVAVVEFGGEVEAQKNPSMPIYCTDHAKAE	445
YEAST	NVLADMRVAVIKESKNSAIRMASKRGEIYETGKFF	510

図2 $\Delta 9$ -Desaturase b と各生物由来の不飽和化酵素のアミノ酸配列上の比較
DES9b, *Mortierella* sp. の $\Delta 9$ -Desaturase b
DES9a, *Mortierella* sp. の $\Delta 9$ -Desaturase a
YEAST, *Saccharomyces cerevisiae* の Stearoyl-CoA desaturase
MOUSE, マウスの Stearoyl-CoA desaturase
RAT, ラットの Stearoyl-CoA desaturase

DES9b	336	GTPIADLPILSFEDFQHACKNDKQWILLGCVVYDVADFAVEHPGGEKYIKMGVCKDM	393
Cb5M	1	MALKSFTLADLSQHTTKDSLYLAHKGKVDCTCFIDEHPGGEEVLIDEACRDA	54
Cb5R	1	AEQSDKDVKIYTLLEIQKHRSKSTWVILHHKVYDLTKFLEHHPGGEEVLREQAGDA	59
Cb5S	1	MPKVYSYQVEAEHNGPQNFVIIIDDKVYDVSQKDEHPGGEDEIMDLGCQDA	52

DES9b	394	TAAENGGMVDHSNAA-RNLLS-LMRVAVVEFGGEVEAQSRPSVPVYGEHSKEE	445
Cb5M	55	TESFE--DVCHSDEA-ROIMSKILVGEFKTDSSKPKAKSPSSSTRPIPAESDSG	108
Cb5R	60	TENFE--DVCHSTDA-RE-LSKTYIIGELHPDDRSKIAPSETLITVESNSSWW	110
Cb5S	53	TESF--VDICHSDEALR-LLKCLYIGDVKTSEKVSSTENQSKGS	99

図3 Δ9-Desaturase b のアミノ末端領域と各生物由来の Cytochrome b5 の部分アミノ酸配列の比較

DES9, *Mortierella* sp. の Δ9-Desaturase b

Cb5M, *Mortierella* sp. の Cytochrome b5

Cb5M, ラットの Cytochrome b5

Cb5M, *Saccharomyces cerevisiae* の Cytochrome b5

矢印は、高度に保存されているヒスチジン残基

いものの、ヘム鉄が配位結合すると考えられる2ヶ所のヒスチジン残基とヘム鉄を包み込む領域はよく保存されていた。本 Δ9-Desaturase b のアミノ酸配列は、植物の脂肪酸不飽和化酵素と相同性がなく、ラットや *Saccharomyces* の Stearoyl-CoA desaturase と相同性を示したことから、Δ9-Desaturase b はアシル-ACP やリン脂質ではなくアシル-CoA を基質とすることが推測された。

さらに、Δ9-Desaturase b は、Δ9-Desaturase a や酵母の Stearoyl-CoA desaturase と同様に、カルボキシル末端領域はラットや *Saccharomyces* の Stearoyl-CoA desaturase より110 アミノ酸残基ほど長く、また、互いによく保存されており、他生物由来の Cytochrome b5 の一部と相同性を示した。ラットや *Saccharomyces* の Cytochrome b5 と、Δ9-Desaturase b のカルボキシル末端領域とは約30%の低い相同性であったが、ヘム鉄が配位結合すると考えられる2ヶ所のヒスチジン残基と、ヘム鉄を包み込む領域はよく保存されていた(図3)。さらに、Cytochrome b5 family に属する Nitrate reductase とも相同性を示したが、Δ9-Desaturase b が Cytochrome b5 様ドメインを含んでいることも鑑みると、脂肪酸不飽和化の際に独自の電子伝達を行っている可能性が示唆された。続いて、Hydropathy プロット解析を行った結果、上記のいずれのタンパク質を比較しても疎水パターンの形状は似通っており、特に、Stearoyl-CoA desaturase に関しては、小胞体膜に結合していると考えられる疎水性の高い領域もよく保存されていた(図4)。

また、Δ9-Desaturase b の遺伝子には5'末端がGTで3'末端がAGの94 bp から成るイントロンが一つ存在することが推察された。Δ9-Desaturase a は Δ9-Desaturase b と同様に唯一つのイントロンを持つが、イントロンの塩基配列は互いに相同性が低く、Δ9-Desaturase b のイントロンが94 bp であるのに対し、Δ9-Desaturase a のイントロンは153 bp であり塩基数も異なっていた。しかしながら、興味深いことに、イントロンの挿入部位は、ラ

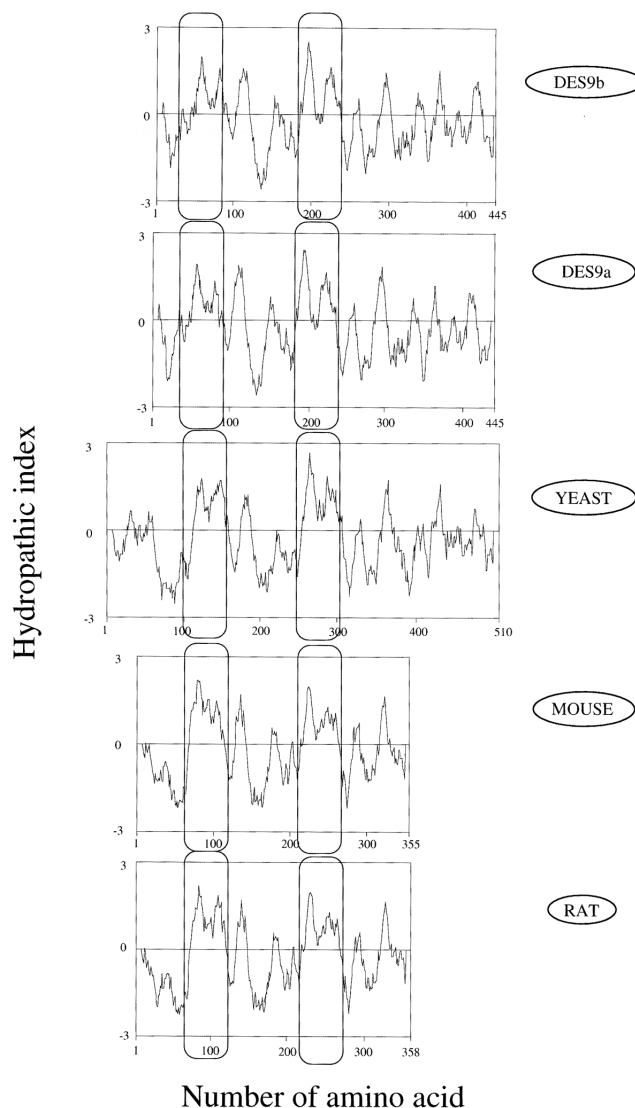


図4 各生物由来の Δ9 不飽和化酵素のアミノ酸配列の Hydropathy プロットの比較

DES9b, *Mortierella* sp. の Δ9-Desaturase b

DES9a, *Mortierella* sp. の Δ9-Desaturase a

YEAST, *Saccharomyces cerevisiae* の Stearoyl-CoA desaturase

MOUSE, マウスの Stearoyl-CoA desaturase

RAT, ラットの Stearoyl-CoA desaturase

丸囲みは、小胞体膜に結合していると考えられる領域

ットや *Saccharomyces* の Stearoyl-CoA desaturase でよく保存されている最も N 末端側のヒスチジンに富む領域の同じ部位に挿入されており、これらを鑑みるに、2 つの $\Delta 9$ -Desaturase の起源は同じであるが進化の過程で非翻訳部位であるイントロンの修飾が独自に行われたのではないかと推察された。

3.2 鎖長延長酵素遺伝子の解析

(炭素鎖 18 から 20 へ鎖長を延長する) 鎖長延長酵素の遺伝子クローニング実験に関しては、まず、鎖長延長酵素欠損変異 *Mortierella* 株の変異の相補性を指標とし、本酵素遺伝子のクローン化を目指したが、うまくいかなかった。従って、以下のように戦略を変えた実験を行い、本酵素遺伝子の一部のクローン化に成功した。一般に脂肪酸の C 鎖長延長反応は、アシル-CoA とマロニル-CoA から 3-オキソアシル-CoA を生成する 3-Oxoacyl-CoA 合成酵素、3-オキソアシル-CoA を D-3-ヒドロキシアシル-CoA に変換する 3-Oxoacyl-CoA 還元酵素、D-3-ヒドロキシアシル-CoA をエノイル-CoA に変換する 3-Hydroxyacyl-CoA 脱水酵素、エノイル-CoA をアシル-CoA に変換する Enoyl-CoA 還元酵素から成る。初発酵素である 3-Oxoacyl-CoA 合成酵素の一部を、他生物の脂肪酸合成に関わる本酵素のアミノ酸配列の情報を基に合成オリゴヌクレオチドプライマー(センスプライマーおよびアンチセンスプライマー)を作製し、*Mortierella* のゲノム DNA を鋳型として Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて、本酵素遺伝子のクローニングを試みた。増幅した DNA 断片を電気泳動ゲルから回収し、ベクターにサブクローニングし、DNA シークエンサーで本 DNA 配列を決定した結果、大腸菌などの他生物由来の 3-Oxoacyl-CoA 合成酵素遺伝子と高い相同性を示し、本遺伝子の一部がクローン化できたことが示唆された。しかしながら現在のところ、完全長の遺伝子クローニングには至っていない。

一方、以下の実験を併せて行ったが、成果を挙げる事ができなかった。

(iA) $\Delta 6$ -Desaturase 遺伝子を導入した *Mortierella* 株は本酵素を発現することができず、 γ -リノレン酸 ($\Delta 6, \Delta 9, \Delta 12-18:3$) 生産が増強されなかった。

(iA) *Mortierella* 株から既に本研究者が取得している各不飽和化酵素遺伝子に対して亜硝酸法によってランダム変異を行い、(産業的に重要な微生物である) *Aspergillus oryzae* 産に導入し、得られた形質転換体とコントロールに対して各 PUFA の含量の変化を検討したが、特に生産量の変化は見られず、また、新規な脂肪酸と思われる物質は検出されなかった。変化を与える変異に至らなかったことが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援をいただきました(財)コスメトロジー研究振興財団および共同研究者に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Shimizu, S., Ogawa, J., Kataoka, M. and Kobayashi, M. : Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds, In : Scheper, T. (ed): *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol.58, Springer-Verlag, Berlin, 45-87, 1997.
- 2) Kobayashi, M., Sakuradani, E. and Shimizu, S. : Genetic analysis of cytochrome b5 from arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4: Cloning, RNA editing and expression of the gene in *Escherichia coli*, and purification and characterization of the gene product. *J. Biochem.*, **125**: 1094-1103, 1999.
- 3) Sakuradani, E., Kobayashi, M. and Shimizu, S. : $\Delta 6$ -Fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus: Gene cloning and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. *Gene*, **238**: 445-453, 1999.
- 4) Sakuradani, E., Kobayashi, M. and Shimizu, S. : $\Delta 9$ -Fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing fungus: Unique gene sequence and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. *Eur. J. Biochem.*, **260**: 208-216, 1999.
- 5) Sakuradani, E., Kobayashi, M., Ashikari, T. and Shimizu, S. : Identification of $\Delta 12$ -fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.*, **261**: 812-820, 1999.
- 6) Sakuradani, E., Kobayashi, M. and Shimizu, S. : Identification of an NADH-cytochrome b5 reductase gene from an arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, by sequencing of the encoding cDNA and heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 3873-3879, 1999.
- 7) Certik, M., Sakuradani, E., Kobayashi, M. and Shimizu, S. : Characterization of the second form of NADH-cytochrome b5 reductase gene from arachidonic acid-producing fungus *Mortierella alpina* 1S-4. *J. Biosci. Bioeng.*, **88**: 667-671, 1999.

酸化セリウム系紫外線遮断剤の開発

大阪大学大学院 工学研究科

増 井 敏 行

A reaction using condensation between boric acid and 2,2'-iminodiethanol (diethanolamine) has been applied to cover the surface of CeO_2 particles. A mixture of cerium oxide particles and the condensed viscous polymer was heated in an ammonia flow at 1073 K followed by calcination at 923 K in air. Formation of turbostratic boron nitride (tBN) layer was identified with an electron microscopy, infrared spectra, and x-ray photoelectron spectra measurements. The new coating process was more effective in reducing catalytic activities of cerium oxide than the conventional one using urea instead of 2,2'-iminodiethanol. The new tBN-coated CeO_2 particles showed good UV blocking properties and more natural white color than those of the conventional tBN- CeO_2 . The feature of the new material will be preferable for new UV blocking materials especially for cosmetics.

1 緒 言

近年、紫外線の害が一般に広く認知されるようになり、またその害が皮膚がんを誘起したり人体の免疫システムに障害を起こしたりなどの深刻なものであることから、紫外線から皮膚を防御するための紫外線防御剤に対する高機能化の要望は強いものとなっている¹⁾。特に最近では、短波長紫外線 (280 ~ 320nm) に加え、比較的線量が多く、皮膚透過力が大きい長波長紫外線 (320 ~ 400nm) についても同時に防御効果を示す新しい材料が求められているが、現在紫外線防御剤として用いられている有機系紫外線遮断剤は、その安全性から高濃度の使用には問題があり、一方、酸化チタン、酸化亜鉛などの無機系紫外線遮断剤では、紫外線の防御作用や化粧品としての適性において一長一短であり、新しい高性能紫外線防御剤の開発が求められている。

ルチル型酸化チタンと酸化亜鉛のバンドギャップエネルギーはそれぞれ 3.0 eV^{2), 3)}、3.2 eV⁴⁾ である。希土類酸化物のひとつである酸化セリウムは、バンドギャップエネルギーが 3.1 eV⁵⁾ であり、酸化チタンや酸化亜鉛と同様に比較的長波長 (400nm 付近) から吸収が始まることが知られている。さらに屈折率が 2.1 程度⁶⁾ であるので酸化チタンの屈折率 2.6 よりも小さく⁷⁾、また酸化亜鉛の 2.0 とほぼ同じ値⁸⁾ を示すことから、化粧仕上がりも自然なものとなることが期待できる。しかしながら、酸化セリウムは淡黄色であり、また高い触媒作用のために配合されている他の成分を分解してしまい、そのままでの実用化は困難

であった。このため酸化セリウムを紫外線遮断剤として化粧品に応用した例は数少ない^{9) - 13)}。

そこで本研究では、ホウ酸とジエタノールアミンの縮合反応により得られる高分子状の前駆体を経由する方法により、酸化セリウム微粒子表面を滑沢性 (すべり性) に優れ、しかも化学的に安定である窒化ホウ素 (白色) で被覆し、触媒活性ならびに淡黄色の着色を抑制し、紫外線遮断効果が高く、安全性、透明性に優れた紫外線遮断剤の合成を目指した。

2 実 験

2.1 合 成

0.1 mol·dm⁻³ の塩化セリウム水溶液を 3 mol·dm⁻³ のアンモニア水に加え、得られた沈殿物に対し窒化ホウ素に換算して 50 mol% になるように計算した量のジエタノールアミン、ホウ酸を加えた。よく攪拌して完全に溶解した後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去し、乾燥させ前駆体を得た。その後、前駆体をまずアンモニア流通下、773K で 6 時間、次いで空气中 923K で 6 時間、それぞれ加熱処理することにより窒化ホウ素を形成させた。得られた試料は脱イオン水によって十分に洗浄した後、エタノールで洗浄、乾燥した。

2.2 キャラクタリゼーション

得られた試料について、赤外吸収スペクトル測定、X 線光電子分光 (XPS) 測定、高分解能透過型電子顕微鏡観察、ならびに紫外可視反射スペクトル測定を行った。粉体の色は色彩色差計を用いて $L^*a^*b^*$ 表色法により評価した。触媒活性の評価は CDM (Conductmetric Determination Method) 法¹⁴⁾ により行った。即ち、ひまし油 5.0 g 中に試料 0.3 g を分散させ、16 dm³·h⁻¹ の空気流通下 403K で 3 時間加熱した。流通後の空気を 50 cm³ の脱イオン水中へ導き、捕集した揮発性の分解生成物による水の導電率変化を測定し、その大きさを触媒活性の大きさとするこ



Development of a New UV Filter Based on Cerium Oxide.

Toshiyuki Masui

Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Osaka University

評価した。また光触媒活性の測定は 403K で加熱する代わりに太陽光シミュレーターで 9 時間照射し、同様に水の導電率変化を測定して評価した。

3 結果と考察

3.1 合成粒子のキャラクタリゼーション

窒化ホウ素被膜が形成されているかどうか、赤外吸収スペクトル測定により検討したところ、Fig. 1 に示すように酸化セリウムにおいては見られない吸収ピークが新たに出現した。これらのピークは市販の六方晶型窒化ホウ素において観測される吸収とその位置が一致したことから、合成した試料にはホウ素-窒素結合が存在することが明らかとなった。

次に得られた被覆試料の表面を XPS により検討したところ、Fig. 2 に示すように、ホウ素、窒素の双方の領域において被覆処理前に存在しないピークが被覆後に新たに出現したことがわかった。また、ホウ素のピークは 190.6 eV 付近、窒素のピークは 397.6 eV 付近にあり、これらは窒化ホウ素のホウ素ピーク 190.3 eV、窒素ピーク 397.9 eV に極めて近く¹⁵⁾、試料において観測されたピークは原料のホウ酸や酸化ホウ素ではなく窒化ホウ素に由来するものであると考えられる。

Fig. 3 に得られた試料の高分解能透過電子顕微鏡観察像を示す。酸化セリウム超微粒子の 1 次粒子径はおよそ 50nm であり、0.3nm 間隔の規則正しい干渉縞を示す粒子内部と、その表面に粒子内部と明らかにコントラストの異なる層が形成されていることがわかった。この相の結晶性は低く、赤外吸収スペクトル測定、XPS 測定の結果と合わせて考察すると、被膜を形成している物質は非晶質の乱層構造窒化ホウ素 (turbostratic boron nitride; tBN) と考えられる^{16,17)}。また、被覆処理により形成された被膜は 1 ~ 2 nm 程度の厚みで均一に存在していることがわかった。

3.2 光学特性及び色彩の評価

次に色彩色差計によって得られた試料の色彩を Table 1 に $L^*a^*b^*$ 表色法で示す。すべての色はこの三つの値によって定義される三次元座標によって表現可能で (L^*, a^*, b^*) = (100,0,0) が理想的な白色を示し、 $L^*a^*b^*$ 表色系において測定された色を色座標として表わした時の座標と理想的な白色を表わす座標との座標空間における距離が色差となる。したがって白色との色差が小さいほど白色化されていると言える。表 1 に本研究によって得られた試料、及び参照試料について色彩色差計で測定した結果、および白色からの色差 ΔE を示す。色差は試料の色彩測定結果が $L^*a^*b^*$ 表色系において (L^*, a^*, b^*) = (x,y,z) という座標で表わされるとき、次式で与えられる量である。

$$\Delta E = ((100 - x)^2 + (0 - y)^2 + (0 - z)^2)^{1/2} \quad (1)$$

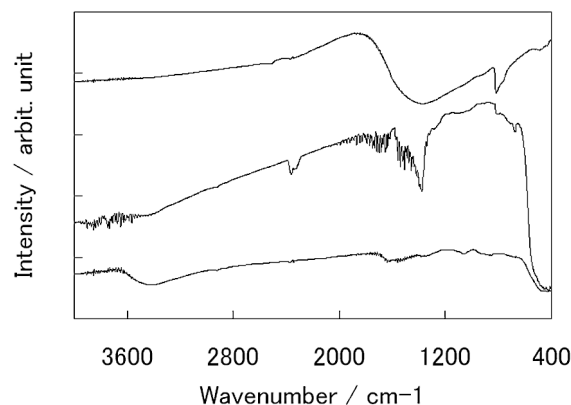


Fig.1 FTIR spectra of the samples: (a) boron nitride, (b) tBN-coated CeO₂, and (c) CeO₂.

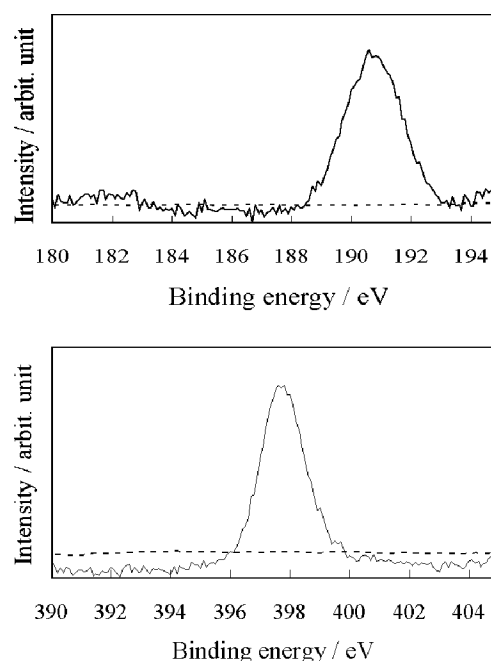


Fig.2 XPS spectra of the tBN-coated CeO₂ particles: (a) B1s and (b) N1s.

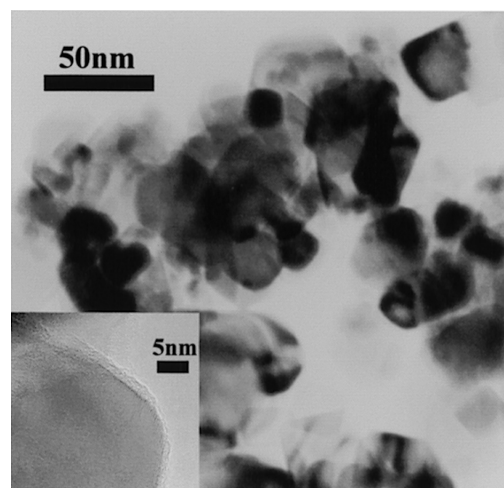


Fig.3 High-resolution electron micrograph of the tBN-coated CeO₂ particles.

Table 1 Actual color of the samples measured in the $L^* a^* b^*$ system

Sample	(L^*, a^*, b^*)	ΔE
tBN-CeO ₂	(97.4, -1.24, 4.62)	5.44
CeO ₂	(96.4, -4.42, 13.3)	19.2

表より、本研究によって得られた試料の黄色度を市販酸化セリウムと比較すると黄色度 b^* は三分の一程度に減少していることがわかった。また、色差 ΔE を比較しても本研究によって得られた試料はその値が小さく、白色により近いことが明らかとなった。

また、得られた試料の紫外可視反射スペクトルを測定したところ、Fig.4のような反射率曲線が得られた。ここから、酸化セリウムを窒化ホウ素によって被覆処理することによって、わずかではあるが紫外線防御能の低下が観測されることがわかった。これは窒化ホウ素自身に紫外線吸収能力がないためであり、被覆層を新たに導入したことで紫外線防御に有効な成分である酸化セリウムの希釈が生じたものと考えられる。

3.3 触媒活性の評価

2.1で示した方法で、試料とひまし油を加熱し、生成した分解生成物による脱イオン水の導電率変化 σ_{Sample} を測定した。ここから、ひまし油自身の加熱による自発的な分解の影響を除くため、ひまし油のみで同様の実験を行なった際の脱イオン水の導電率変化値 $\sigma_{\text{ひまし油}}$ を元に次式を用いて指数化し、触媒活性指数 I_{ca} として Table 2 に表わした。

$$I_{ca} = (\sigma_{\text{Sample}} - \sigma_{\text{ひまし油}}) / \sigma_{\text{ひまし油}} \quad (2)$$

この方法ではひまし油の分解とともに導電率が上昇するので、指数が小さいほど触媒活性は抑制されていると考えてよい。今回新たにエタノールアミンを用いて被覆した試料では酸化セリウムに比べて20分の1以下に触媒活性が抑制されており、また市販酸化チタン、市販酸化亜鉛と比較してもその触媒活性は低いものであった。同様に光照射時の触媒活性についても評価したが、本研究による試料はもともと光照射時の触媒活性のない材料の組み合わせであるため、予測されたように光触媒活性はほとんど観測されなかった。

4 総括

ジエタノールアミンとホウ酸の縮合反応を利用し、酸化セリウム粒子表面を非晶質の乱層構造窒化ホウ素で被覆できることを明らかにした。酸化セリウムに比較して、より白色、低酸化触媒活性であり、また酸化セリウムと同程度

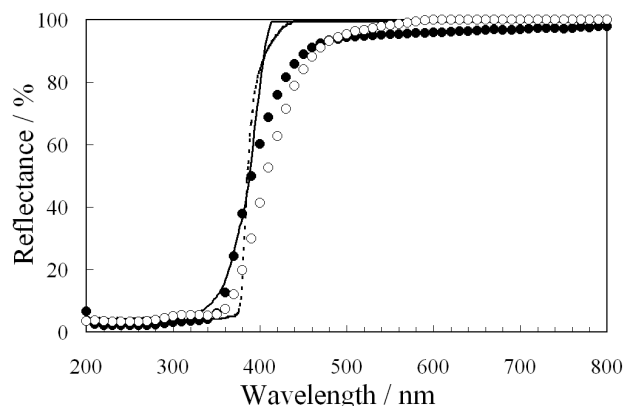


Fig.4 Reflectance spectra of the UV blocking powders: (●) tBN-coated CeO₂, (○) CeO₂, (·····) ZnO, and (—) TiO₂ (rutile)

Table 2 Comparison of thermal and photocatalyses of the samples

Sample	I_{ca} (thermal)	I_{ca} (photo)
tBN-CeO ₂	0.42	0.10
TiO ₂	4.22	1.66
ZnO	11.4	0.27
CeO ₂	19.9	0.21

の紫外線防御能を有していた。また、窒化ホウ素で被覆することにより、粒子の色は白色に近づき、酸化触媒活性が抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、本研究で得られた窒化ホウ素被覆酸化セリウム超微粒子は新規な化粧用紫外線遮断剤として期待できる。

5 謝辞

本助成金によって得られた研究成果に関する学術論文は以下の3報である。ここに謹んで御礼申し上げる。

- 1) T. Masui, R. Hamada, G. Adachi, T. Sakata, and H. Mori: A New Method to Synthesize BN-coated Cerium Oxide Using Condensation of boric Acid and 2,2'-Iminodiethanol, J. Alloys. Compd., in press.
- 2) T. Masui, H. Hirai, N. Imanaka, G. Adachi, T. Sakata, and H. Mori: Synthesis of Cerium Oxide Nanoparticles by Hydrothermal Crystallization with Citric Acid, J. Mater. Sci. Lett., 21, 489-491 (2002).
- 3) T. Masui, K. Fukuhara, N. Imanaka, T. Sakata, H. Mori, and G. Adachi: Effects of Titanium Oxide on the Optical Properties of Cerium Oxide, Chem. Lett., 474-475 (2002).

(参考文献)

- 1) N. J. Lowe, N. A. Shaath, and M. A. Pathak eds.: "Sunscreens - Development, Evaluation, and Regulatory

- Aspects 2nd Edition," Marcel Dekker (New York), (1997).
- 2) J. Pascual, J. Camassel, and H. Mathieu: Fine Structure in the Intrinsic Absorption Edge of TiO_2 , *Phys. Rev. B*, 18, 5606-5614 (1978).
- 3) M. Anpo, T. Shima, S. Kodama, and Y. Kubokawa: Photocatalytic Hydrogenation of CH_3CCH with H_2O on Small-Particle TiO_2 : Size Quantization Effects and Reaction Intermediates, *J. Phys. Chem.*, 91, 4305 (1987).
- 4) CRC Handbook of Chemistry and Physics 75th Ed., 12-92, CRC Press (1994-1995).
- 5) C. A. Hogarth and Z. T. Al-Dhhan: Optical Absorption in Thin-Film of Cerium Dioxide and Cerium Dioxide Containing Silicon Monoxide, *Phys. Stat. Sol. (B)*, 137, K157-K160 (1986).
- 6) G. Hass, J. B. Ramsey, and R. Thun: *J. Opt. Soc. Am.*, 48, 324-327 (1958).
- 7) J. R. DeVore: Refractive Indices of Rutile and Sphalerite, *J. Opt. Soc. Am.*, 41, 416-419 (1951).
- 8) W. L. Bond: Measurement of the Refractive Indices of Several Crystals, *J. Appl. Phys.*, 36, 1674-1677 (1965).
- 9) T. Masui, M. Yamamoto, T. Sakata, H. Mori, and G. Adachi: Synthesis of BN-Coated CeO_2 Fine Powder as a New UV Blocking Material, *J. Mater. Chem.*, 10, 353-357 (2000).
- 10) 増井敏行, 足立吟也: 紫外線防御剤の開発動向, 色材, 73, 350-356 (2000).
- 11) 矢部信良, 百瀬重禎: 新規紫外線遮断剤—酸化セリウム-シリカ複合体—の開発と化粧品への応用, 粧技誌, 32, 372-378 (1998).
- 12) 矢部信良: 酸化セリウム系紫外線遮断剤とその応用, 希土類, 35, 47-58 (1999).
- 13) 矢部信良, 佐藤次雄: 酸化セリウム系紫外線遮断剤の開発, 色材, 73, 615-623 (2000).
- 14) 町野泰久, 亀山浩一: CDM 試験法による顔料の油脂酸化活性, 粧技誌, 31, 329-332 (1997).
- 15) Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy, ed. C. D. Wagner, W. M. Riggs, L. E. Davis, J. F. Moulder, and G. E. Muilenberg, Perkin-Elmer (Minnesota), p. 37 and 40 (1978).
- 16) J. Thomas, N. E. Weston, and T. E. O'Connor: Turbostratic Boron Nitride, Thermal Transformation to Ordered-layer-lattice Boron Nitride, *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 4619-4622 (1963).
- 17) M. Hubacek, S. Sato, and T. Ishii: A Coexistence of Boron Nitride and Boric Oxide, *J. Solid State Chem.*, 109, 384-390 (1994).

化粧品素材としての合成スメクタイトの高機能化

東北大学 多元物質科学研究所

白 井 誠 之

Micro-mesoporous smectite-type materials containing magnesium cations in octahedral sheets were prepared from water glass and magnesium chloride by a hydrothermal treatment and calcination at 873 K without template materials. The pore structure (surface area, pore volume and pore diameter) can be controlled by the hydrothermal conditions (temperature, time and pH). The pore structure was also changed by additives. The mesopore size of smectite-type materials is enlarged by adding dialkyldimethyl ammonium chloride after the hydrothermal synthesis.

1. 緒 言

スメクタイトは4面体構造をもつ4価のシリコンイオンからなる層（4面体層）と8面体構造をもつ2価と3価のカチオンからなる層（8面体層）が、4面体層－8面体層－4面体層という3層を基本結晶構造とする板状鉱物の総称である。スメクタイト層間にはイオン吸着サイトが存在し、種々の化合物を電気的に吸着する特長をもつ。またスメクタイト層間には水が入り込み、自分の体積の十数倍に膨れあがる特長（膨潤性）を持つ。

スメクタイトは工業的に多岐に用いられている。化粧品関係として、板状構造とイオン交換能を利用した洗浄剤（石鹸、練り歯磨き、シャンプー、シェービングクリーム等）、膨潤作用とイオン交換能を利用した保湿剤（泥パック、ボディクレイ、ローション、スキนครリーム等）に使われている。

天然の岩石であるベントナイトにはスメクタイト系鉱物の一種であるモンモリロナイトを主成分としている。しかしながらベントナイトには石英、カルサイト、石膏、有機腐植などの不純物を含む。このため化粧品としての天然のベントナイトを直接用いることはできず、天然物を生成して用いたり、合成のスメクタイトを用いたりなどしている。

合成スメクタイトは水ガラスと種々の金属塩化物を前駆体として水熱法により合成できる¹⁻¹⁵⁾。水熱法で合成したスメクタイトは出発原料を変えることで化学組成を大きく変えることができる。また出発原料を有さないことから化粧品として使用するのに優れている。

合成のスメクタイトのイオン交換能、膨潤性、結晶サイ

ズはその合成条件（沈殿 pH、成 pH、合成温度、金属塩化物カチオン種とその量）と深く関わっている、合成条件のパラメータが多いため、現在のところ、スメクタイトの合成条件と機能との関係が十分に理解されるにはいたっていないのが現状である。本研究では合成条件と物性との関係を明らかにし、化粧品としての付加価値の高いスメクタイトを開発することを目的としている。

2. 実 験

2.1. スメクタイトの調製

本研究ではマグネシウムカチオンを八面体層内に含むスメクタイトを水熱法により合成した。

水ガラス（日本化学工業3号、 SiO_2 29.04%、 Na_2O 9.4%）を蒸留水に溶かし、25%アンモニア水を加えた（A液）。塩化マグネシウム（和光純薬）を蒸留水に溶かした（B液）。A液にB液を5分ほどかけて滴下し、沈殿物を得た。このときシリコン原子とマグネシウム原子の比は8:6とした。沈殿物を濾過し蒸留水で洗浄した。得られた沈殿物に蒸留水を加え、25%アンモニア水と蒸留水を加えた（このスラリーをスラリーCとする）。スラリーCのpHを合成pHとする。スラリーCをオートクレーブ（内容積100mL）で、窒素雰囲気下、水熱処理（473～523K）した。水熱処理により得られた前駆体を濾過し、蒸留水で洗浄し、重量変化が無くなるまで乾燥し、873Kで2時間焼成した（以後この試料をMST(Mg)と名付ける）。

調製の際ジアルキルジメチルアンモニウムクロライド（C18d）を添加する試料も調製した。添加は以下の二通りを行った。一つはアルキルアンモニウムクロライドを水熱合成時にスラリー内に添加する方法である。スラリーCにC18dを添加し水熱合成後、十分に濾過し、357Kで重量変化が無くなるまで乾燥した。C18dを除くために873Kで2時間焼成した（これにより得られた試料を以後MST(Mg+C18d)とする）。もう一つの方法は、水熱合成後にスラリーにアルキルアンモニウムクロライドを添加する方法である。スラリーCを水熱処理後、そのスラリーへの



The enhancement of the cosmetic functions of trioctahedral magnesium-smectite materials

Masayuki Shirai

Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University

アルキルアンモニウムクロライドを添加し攪拌後、濾過し十分に洗浄し、重量変化がなくなるまで乾燥した。その後 C18d を除くために 873 K で 2 時間焼成した（これにより得られた試料を以後 MST (Mg) +C18d とする）。上記のどちらの方法もアルキルアンモニウムクロライド添加量はシリコン原子と C18d 分子の比が 8 : 0.7 とした。

2.2. ス멕タイトのキャラクタリゼーション

調製した試料の構造は X 線回折法（Shimadzu XD-D1）により調べた。細孔構造（表面積、細孔容積、細孔径）は窒素吸着法（ユアサイオニクス, Autosorb 1）で調べた。試料のイオン交換サイトはメチレンブルー吸着法により行った。

3. 結 果

523K, 4h で水熱合成した調製した試料の XRD パターンを示す（図 1）。19.7, 35.2, 60.6° 付近にス멕タイト構造の (02, 11), (13, 20), (06, 33) に由来するピークが 8° 付近に (001), 28° 付近に (003) に帰属されるピークが観測された。このス멕タイト構造に起因する XRD パターンは合成温度、アルキルアンモニウムクロライドの添加の有無に関わらず観測された。本研究で調製した試料は全てス멕タイト構造をもつことが分かる。

調製した試料の比表面積、細孔容積を表 1 に、脱離等温線、細孔径分布を図 2 に示す。調製した試料では高温で

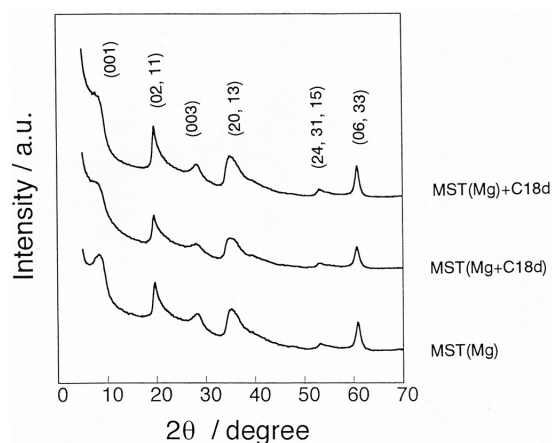


図 1 合成ス멕タイトの XRD パターン（水熱合成温度 523K）

も安定な高表面積、大細孔容量の多孔体となった。細孔径が調製条件により大きく変化した。MST (Mg) では 20 Å 以下のマイクロ細孔と約 40 Å のメソ細孔を持つマイクロメソ多孔体となっていることが分かった。523K, 4h で合成した MST (Mg) にアルキルアンモニウム塩を添加した MST (Mg) +C18d では MST (Mg) に比較して、比表面積、細孔容積が共に増大した。細孔径分布も大きく変化した。マイクロ細孔は消失し 20 ~ 80° のメソ細孔を持つ多孔体ができた。合成の際にスラリー C にアルキルアンモニウムクロライドを添加した MST (Mg+C18d) では MST (Mg) に比較して、比表面積はそれほど増加せず、細孔容積は増大した。細孔径分布も大きく変化した。マイクロ細孔は消失し、20 ~ 100° のメソ細孔をもつ多孔体となった。

水熱温度が高く、水熱時間が長い試料ほどメチレンブルー吸着量が増加し、イオン交換容量が増加した。

4. 考 察

水熱合成時に生成するシリケート結晶子が縮合する時にその隙間に細孔が形成されるものと考えられる。合成後スラリー中にあるス멕タイトのシリケート片は、乾燥、焼成により脱水縮合する。調製した試料は 873 K 焼成後も高表面積、高細孔容積を示すこと、XRD パターンでは 001 面はそれほど発達していないことから、basal 面が積み重なっているのではなく比較的ランダムに集合し、シリケート片の重なり隙間に細孔ができると考えられる。

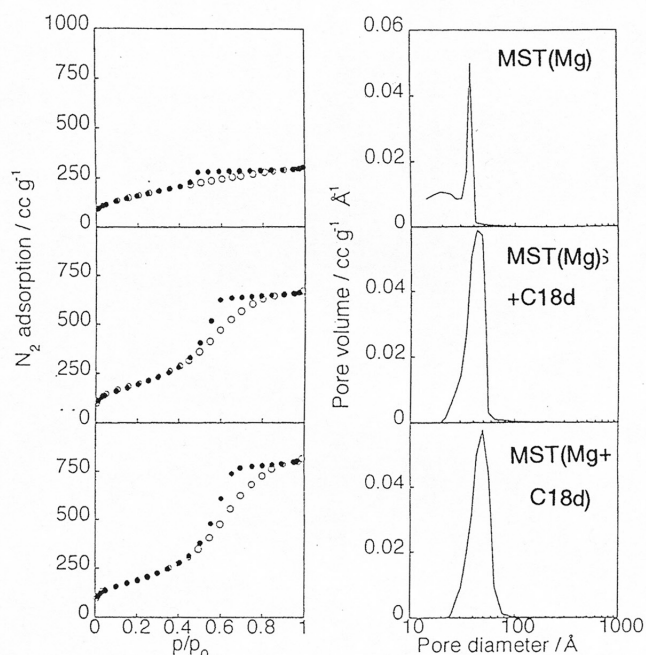
またシリケート片の大きさは水熱合成条件に依存するものと考えられる。合成温度が高いほど、合成時間が長いほど大きなシリケート片の生成する割合が大きくなると考えられること、473 K, 2 h 調製の試料の方が 573 K, 4 h 合成に比較して、マイクロ細孔が多いことは、比較的小さなシリケート片同士の隙間にマイクロ細孔ができるものと考えられる。また、生成する細孔はシリケート片の隙間に形成するために周期性はなく、細孔に由来するピークは XRD では観測されなかった。

MST (Mg) +C18d は MST (Mg) と水熱処理条件が同じなので、焼成前の個々のシリケート片の大きさはより MST (Mg) と同じと考えられる。均一な細孔構造を有する MCM-41¹⁶⁾ や FSM-16¹⁷⁾ では合成時に存在するアルキル

表 1 合成ス멕タイトの合成条件と比表面積、細孔容積

試 料	合成温度/K	合成時間/h	合成pH	比表面積/m ² g ⁻¹	細孔容積/ccg ⁻¹
MST (Mg)	473	2	9.92	575	0.47
MST (Mg)	523	4	10.0	401	0.39
HTT (Mg+S)	473	2	8.47	718	1.26
HTT (Mg+S)	523	4	8.64	414	0.88
MST (Mg)+C18d	473	2	9.92	741	1.04
MST (Mg)+C18d	523	4	10.0	516	0.94

(a) 合成温度 473K



(b) 合成温度 523K

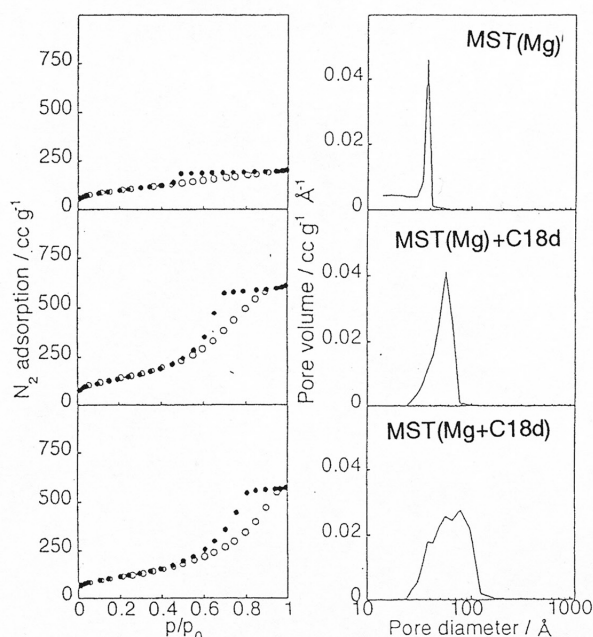


図2 合成スメクタイトの窒素吸着等温線と細孔径分布

アンモニウムクロライドのミセルの大きさによりメソ細孔のサイズが変化することが報告されている。本研究で調製した合成スメクタイト試料ではアルキルアンモニウムクロライドを使用しなくてもメソ細孔が形成されたこと、アルキルアンモニウムクロライドの添加順序により細孔径が制御できることから細孔はアンモニウム塩のミセルを鋳型と

して形成されたものではない。ジメチルジステアリルアンモニウムクロライド分子はアンモニア分子よりもかさ高く、乾燥時のシリケート片の分散状態は両系で異なっていると考えられる。アルキルアンモニウムクロライドよりも大きなメソ細孔が形成されることを考慮すると、シリケート片が大きさのかさ高さにより、シリケート片の配向状態がよりランダムになると考えられる。873Kで焼成した際には、乾燥時のシリケート片のランダムな配向状態が維持されてシリケート片の配向が変わり、より高いピラーとして働くため、隙間が大きくなりメソ細孔ができたものと考えられる。

MST (Mg+C18d) では MST (Mg) +C18d よりも大きなメソ細孔が形成されたこと、水熱合成中にアルキルアンモニウムクロライドが添加されると個々のシリケート片のまわりにアルキルアンモニウム塩が吸着することでシリケートの分散性が良くなり、水熱処理でできるシリケート片の大きさが MST (Mg) や MST (Mg) +C18d よりも大きくなること、また乾燥焼成の際にもアンモニウムクロライドは共存するために、大きなシリケート片がランダムに配向し、ピラーとして働くシリケート片のサイズも大きくなり、より大きなメソ細孔が形成するものと考えられる。

本粘土の研究では水熱温度、時間、ジステアリルアンモニウムクロライドの添加およびその順序により合成スメクタイトの細孔構造が制御できることが分かった。これらの調製パラメータがスメクタイトの膨潤性に与える効果について今後調べる予定である。

(参考文献)

- 1) Arai M., Guo S., Shirai M., 他 2 名, The Catalytic Activity of Platinum-Loaded Porous Smectite-like Clay Minerals Containing Different Divalent Cations for Butane Hydrogenolysis and Ethylene Hydrogenation", Journal of Catalysis, 161, 704-712, 1996.
- 2) Shirai M., Suzuki N., Nishiyama N., 他 2 名, Size-selective Hydrogenation of NBR Polymers Catalyzed by Pore-size Controlled Smectites Loaded with Palladium, Applied Catalysis A: General, 177, 219-225, 1999.
- 3) Shirai M., Torii K., and M.Arai, XAFS Study on Metal Particle Formation in Noble Metal Cation Loaded Synthesized Smectite Containing Several Divalent Cations during Hydrogen Reduction, Japanese Journal of Applied Physics, 38, 69-72 1999.
- 4) Shirai M., Aoki K., Torii K., 他 1 名, Acidity and 1-Butene Isomerization of Synthesized Smectite-type Catalysts Containing Different Divalent Cations, Catalysis A: General, 187, 141-146, 1999.
- 5) 荒井正彦, 白井誠之, 合成スメクタイト系メソポア多孔体の触媒への応用, 表, 37, 223-231, 1999.

- 6) 鳥居一雄, 白井誠之, 荒井正彦, スメクタイト系メソポア多孔体の合成と機能, *Materials Integration*, 13, 57-61, 2000.
- 7) Shirai M., Aoki K., Miura T. 他 2 名, Control of Pore Structure of Trioctahedral Magnesium- Smectite Materials, *Chemistry Letters*, 36-37, 2000.
- 8) Shirai M., Aoki K., Minato Y., 他 2 名, Porous Smectite-type Materials Containing Catalytically Active Divalent Cations in Octahedral Sheets, *Studies in Surface Science and Catalysis*, 129, 435-442, 2000.
- 9) Shirai M., Torii K., and Arai M., Hydrogenation of Acrylonitrile-Butadiene Rubbers with Palladium Loaded Mesopore-size Controlled Clay Materials, *Studies in Surface Science and Catalysis*, 130, 2105-2110, 2000.
- 10) Shirai M., Torii K., Arai M., Synthesis and Size-selective Application of Palladium Metal Particles Intercalated in Mesopore-size Controlled Smectite, *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 341, 321-326, 2000.
- 11) Shirai M., Aoki K., Guo S., 他 2 名, Preparation and CO Hydrogenation Activities of Smectite-type Catalysts Containing Cobalt Divalent Cations in Octahedral Sheets, *Studies in Surface Science and Catalysis*, 132, 789-792, 2001.
- 12) Shirai M., Aoki K., Torii K., 他 1 名, In situ EXAFS Study on the Formation of Smectite-type Clays Containing Cobalt Cations in Lattice, *Journal of Synchrotron Radiation*, 8, 743-745, 2001.
- 13) Aoki K., Minato Y., Torii K., 他 2 名, Hydrodesulfurization of Thiophene over Synthetic Cobalt-containing Smectite-like Mesoporous Materials, *Applied Catalysis A: General*, 215, 47-53, 2001.
- 14) Shirai M., Aoki K., Guo S. 他 2 名, Structure and CO Hydrogenation Activity of a Mesoporous Smectite-Type Catalyst Containing Iron Cations in Octahedral Sheets, *Analytical Sciences*, accepted.
- 15) Shirai M., Aoki K., Torii K., 他 1 名, Control of Mesopore Structure of Smectite Type Materials Synthesized with a Hydrothermal Method, *Studies in Surface Science and Catalysis*, accepted.
- 16) Yanagisawa T., Shimizu T., Kuroda K., 他 1 名, The Preparation of Alkyltrimethylammonium-Kanemite Complexes and Their Conversion to Microporous Materials, *Bulletin of Chemical Society of Japan*, 63, 988-992, 1990.
- 17) Cresge C.T., Leonowics M.E., Roth W.J., 他 2 名, Ordered Mesoporous Molecular Sieves Synthesized by a Liquidcrystal Templated mechanism, *Nature*, 359, 710-712, 1999.

Ⅱ. 生体作用、安全性に関する分野

高発現型メラニン色素産生遺伝子のコスメトロジーへの応用

広島大学 医学部総合薬学科¹、広島大学附属病院 皮膚科²

杉山 政則¹、熊谷 孝則¹、森田 栄伸²

Streptomyces (S.) *castaneoglobisporus* HUT6202 produces a large amount of diffusible melanin-like pigment. We have cloned an operon, designated *mel*, which is responsible for the synthesis of melanin pigment, from the chromosomal DNA of *S. castaneoglobisporus*. The sequence analysis revealed that the *mel* operon consists of two genes: the tyrosinase gene (*tyrC*) consisting of 819 bp and a gene, designated *orf378*, consisting of 378 bp. The *orf378* was located just upstream of the *tyrC* gene. Although the precise function of the *orf378* product remains unclear, its function is thought to be involved in the transfer of copper ion which is essential for tyrosinase.

The present study has the following aims: the first is to express the microbial *mel* operon in human epidermis or in albino mouse hair follicle cells. This approach will be applicable for the gene therapy of pigment disorders. The second is to establish a cell line that expresses *mel* constitutively. The cell line can be used to screen inhibitors of melanin-synthesis, which will be applicable for the cosmetology.

In the present study, we tested whether the microbial *mel* operon is expressed in mammalian cells using COS-7 cells as host cells. The *orf378* and *tyrC* genes, contained in the operon, were PCR-amplified and independently inserted into downstream of the cytomegalovirus promoter, respectively. When COS-7 cells were co-transfected with the mammalian expression vectors, the transfectants expressed tyrosinase activity, suggesting that the microbial *mel* is expressed in mammalian cells. A human keratinocyte A431 cell was also used for constitutive expression of the *mel* operon.

1. 緒言

筆者らは200種以上の放線菌を検索した成果として、*Streptomyces* (S.) *castaneoglobisporus* HUT6202が、既にメラニン色素を産生することが知られている他の放線菌 *S. antibioticus* に比べ、100倍以上高いメラニン色素産生能を有することを見出した。そこで、ショットガンクローニング法を用いて、本菌の染色体DNAからメラニン色素産生遺伝子 (*mel*) をクローニングした。*mel* 遺伝子の構造を調べた結果、*S. castaneoglobisporus* の *mel* 遺伝子は、チロシナーゼをコードする819 bpから成る遺伝子 (*tyrC*) とそのすぐ上流に存在する378 bpから成る遺伝子 (*orf378*) とでオペロンを形成していることが明らかになった¹⁻³⁾。*orf378* によってコードされるタンパク質の機能については、未だ不明な点が多いが、チロシナーゼ活性に必須な銅イオンの輸送に関与しているものと考えられている。

本研究は、以下に述べる2つを最終目標としている。そのひとつは、ヒトケラチノサイトおよびアルビノマウス毛穴細胞 (albino mouse hair follicle cells) において、*S. castaneoglobisporus* 由来 *mel* 遺伝子の発現系を構築することである。この系は、将来的に白斑病の遺伝子治療や白

髪を黒髪に再生するための遺伝子治療へ応用できるものと考えられる。もうひとつは、*mel* 遺伝子を恒常的に発現する細胞株を樹立することである。樹立した細胞株はチロシナーゼ活性を阻害する物質を検定する細胞として利用することから、美白成分を検索するための新規スクリーニング系が構築可能になると考えられる。

上記に掲げた最終目標を達成するためには、微生物由来の *mel* 遺伝子が真核細胞で発現可能か否か調査する必要がある。そこで、本研究では、COS-7細胞およびヒト角化細胞 (keratinocyte) A431株を用いて *mel* 遺伝子の発現を検討した成果について報告する。

2. 実験

2.1 使用細胞と培養条件

COS-7細胞は、10% fetal bovine serum (FBS, PAA laboratories) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco BRL) を用いて、37℃、5% CO₂-95% air の条件下にて培養した。ヒト角化細胞 (keratinocyte) として A431細胞を用いた。

2.2 *mel* 遺伝子発現用ベクターの構築

orf378 発現用ベクターは、PCR法により増幅した *orf378* 遺伝子を真核細胞用ベクター pcDNA3.1/Hygro (-) (Invitrogen) に挿入することにより作製した。修飾を加えない *orf378* 遺伝子は、sense primer 5'-CACGGATCCATGCCGAGATCAC CCGCCGC-3' (イタリックは *Bam*HI サイトを示す) および anti-sense primer 5'-CACAAGCTTTTCAGTTGGCGGGGAA CGGCAG-3' (イタリックは *Hind*III サイトを示す) を



Application to cosmetology of the highly expressed melanin-synthesizing gene operon from a microbial source

Masanori Sugiyama¹, Takanori Kumagai¹, Eishin Morita²

Institute of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Medicine, Hiroshima University¹ and Department of Dermatology, Hiroshima University Hospital²

用いて増幅した。*orf378* の4番目の塩基をCからGに変異させた遺伝子 (*orf378G*) は、sense primer 5'-CACCTCGAGATGGCCGAGATCACCCGCCGC-3' (イタリックは *XhoI* サイトを示す) および anti-sense primer 5'-CACAAAGCTTTCAGTTGGCGGGGA-ACGGCAG-3' (イタリックは *HindIII* サイトを示す) を用いて増幅した。*orf378* のスタートコドンのすぐ上流にコザック配列⁴⁾ を挿入した遺伝子 (*orf378K*) は、sense primer 5'-CACCTCGAGGCGCCGCCACCATGCCCCGAGATCACCCGCCGC-3' (イタリックは *XhoI* サイトをアンダーラインはコザック配列をそれぞれ示す) および anti-sense primer 5'-CACGGATCCTTAGTTGGCG-GGGAACGGCAG-3' (イタリックは *BamHI* サイトを示す) を用いて増幅した。*orf378* のスタートコドンのすぐ上流にコザック配列を挿入し、さらに4番目の塩基をCからGに変異させた遺伝子 (*orf378KG*) は、sense primer 5'-CACCTCGAGGCGCCGCCACCATGCCCCGAGATCACCCGCCGC-3' (イタリックは *XhoI* サイトをアンダーラインはコザック配列をそれぞれ示す) および anti-sense primer 5'-CACGGATCCTTAGTTGGCGGGGAACGGCAG-3' (イタリックは *BamHI* サイトを示す) を用いて増幅した。なお、上記に述べた4種の遺伝子のPCR反応は全て、1サイクル目は96°C 4 min、65°C 1 min、72°C 1 min の条件で行い、その後、96°C 1 min、65°C 1 min、72°C 1 min の条件で30サイクル行った。また、鋳型DNAとしては、プラスミド pUCM1¹⁾ の *mel* 遺伝子を含む約2.3 kb の *KpnI* フラグメントを用いた。

tyrC 用発現ベクターは、PCR法により増幅した *tyrC* 遺伝子を真核細胞用ベクター pcDNA3.1 (-) (Invitrogen) に挿入することにより作製した。修飾を加えない *tyrC* 遺伝子は、sense primer 5'-CACGGATCCATGACCGTACGCAAGAACCA G-3' (イタリックは *BamHI* サイトを示す) および anti-sense primer 5'-CACAAAGCTTTCAGGCGTCGAACGTGTAGTAG-3' (イタリックは *HindIII* サイトを示す) を用いて増幅した。*tyrC* 遺伝子の4番目の塩基をAからGに変異させた遺伝子 (*tyrCG*) は、sense primer 5'-CACCTCGAGATGGCCGTACGCAAGAACCAG-3' (イタリックは *XhoI* サイトを示す) および anti-sense primer 5'-CACGGATCCTCAGGCGTCGAACGTGTAGTAG-3' (イタリックは *BamHI* サイトを示す) を用いて増幅した。*tyrC* 遺伝子のスタートコドンのすぐ上流にコザック配列を挿入した遺伝子 (*tyrCK*) は、sense primer 5'-CACGGATCCGCCGCCACCATGACCGTACGCAAGAACCAG-3' (イタリックは *BamHI* サイトをアンダーラインはコザック配列をそれぞれ示す) および anti-sense primer 5'-CACAAAGCTTTTAGGCGTCGAACGTGTAGTA-3' (イタリックは *HindIII* サイトを示す) を用いて増幅した。*tyrC* 遺伝子のスタートコドンのすぐ上流にコザック配列を挿入し、さらに4番目の塩基をAからGに変異させ

た遺伝子 (*tyrCKG*) は、sense primer 5'-CACGGATCCGCCGCCACCATGCGCGTACGCAAG AACCAAG-3' (イタリックは *BamHI* サイトをアンダーラインはコザック配列をそれぞれ示す) および anti-sense primer 5'-CACAAAGCTTTTAGGCGTCGAACGTGTAGTA-3' (イタリックは *HindIII* サイトを示す) を用いて増幅した。なお、上記に述べた4種の遺伝子のPCR反応は全て、1サイクル目は96°C 4 min、65°C 1 min、72°C 2 min の条件で行い、その後、96°C 1 min、62°C 1 min、72°C 2 min の条件で30サイクル行った。また、鋳型DNAとしては、*orf378* の増幅に用いたものと同様のフラグメントを使用した。

2.3 COS-7 細胞への遺伝子導入

COS-7 細胞への遺伝子導入は、Lipofectamine (GIBCO BRL) を用いたリポフェクション法により行った。 $\phi 9$ cm のディッシュ当たり、Lipofectamine 試薬は80 μ L、COS-7 細胞は 1×10^6 細胞となるように調整した。また、遺伝子導入は37°Cにて5時間行った。

2.4 チロシナーゼ活性測定

mel 遺伝子を導入した COS-7 細胞を37°Cにて66時間培養した後、0.1M phosphate buffer (pH 6.2) を用いて洗浄した。洗浄後、細胞を同 buffer 中に懸濁し、超音波破碎を行った後、15,000 $\times$ g、20 min、4°C の遠心により得た上清をチロシナーゼ活性測定用の試料として用いた。チロシナーゼ活性測定は、Horowitz らの方法⁵⁾ に基づいて行った。すなわち、10 mM の L-DOPA および 5 M の CuSO_4 を含む 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2) 1.5 mL に 100 μ L のタンパク質試料を加えた後、475 nm の吸光度を10分間測定し、その初速度よりチロシナーゼ活性を求めた。なお、1分間に1 nmol の dopaquinone を生成させる酵素量を1 U (unit) と定義した。

2.5 mel 遺伝子の安定形質発現株の作成

orf378 および *tyrC* を保有するベクターをそれぞれ8 μ g ずつ、リポフェクション法により表皮細胞である A431 に co-transfect した。この際、A431 は $\phi 9$ cm のディッシュ当たり、 1×10^6 細胞になるように調整した。遺伝子導入後、geneticin 500 μ g/ μ L および hygromycin 50 μ g/ μ L にて二重選択を行った。

3. 結果と考察

3.1 COS-7 細胞における mel 遺伝子の発現性

まず、*mel* 遺伝子の真核細胞での発現性を COS-7 細胞を用いて調査した。*mel* 遺伝子に含まれる *tyrC* および *orf378* をそれぞれ PCR で増幅した後、真核細胞用ベクター pcDNA 3.1 (-) および pcDNA 3.1/Hygro (-) にそれぞれ挿入し、それらの発現ベクターを構築した。構築した

ベクターを用いて COS-7 細胞への遺伝子導入実験を行った結果、*orf378* を保有するベクターのみ、あるいは、*tyrC* を保有するベクターのみを transfect した COS-7 細胞においては、チロシナーゼ活性は全く認められなかった。一方、*tyrC* を保有するベクターと *orf378* を保有するベクターを co-transfect した COS-7 細胞においては、チロシナーゼ活性が認められた。以上の結果から、*S. castaneoglobisporus* 由来の *mel* 遺伝子は真核細胞において発現可能であることが明らかになるとともに、チロシナーゼの活性発現には *tyrC* のみでは不十分であり、*orf378* の存在が必須であることがわかった。

3.2 *mel* 遺伝子の発現量の検討

COS-7 細胞におけるチロシナーゼ活性は、*tyrC* および *orf378* の発現量に依存するものと考えられる。本研究の最終目標を達成するためには、発現するチロシナーゼ活性は高ければ高いほどよい。Kozak は、真核細胞内において、遺伝子からタンパク質への翻訳効率を網羅的に調べた結果⁴⁾、遺伝子配列に以下のような特徴がある場合、効率的にタンパク質に翻訳されることを明らかにしている。(1)スタートコドン (ATG) の直前に 5'-GCCGCCACC-3' (コザック配列) が存在する。(2)スタートコドン直後の塩基が G である。

そこで、このような特徴を導入した *orf378* および *tyrC* 遺伝子を PCR 法により増幅し (図 1 および実験の項を参照)、*orf378* 系については pcDNA 3.1/Hygro (-)、*tyrC* 系については pcDNA 3.1 (-) に挿入し、発現ベクターを構築した。構築後、それらを以下の組み合わせにしたがって COS-7 細胞に導入し、導入細胞におけるチロシナーゼ活性を比較した: A) *orf378*/*tyrC* B) *orf378G*/*tyrCG* C) *orf378K*/*tyrCK* D) *orf378KG*/*tyrCKG*。B および D の

□ <i>orf378</i> □	5'	---	---	---	ATG	CCC	GAG	---	---	3'
					Met	Pro	Glu			
□ <i>orf378G</i> □	5'	---	---	---	ATG	GCC	GAG	---	---	3'
					Met	Ala	Glu			
□ <i>orf378K</i> □	5'	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>ACC</u>	ATG	CCC	GAG	---	---	3'
		Kozak			Met	Pro	Glu			
□ <i>orf378KG</i> □	5'	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>ACC</u>	ATG	GCC	GAG	---	---	3'
		Kozak			Met	Ala	Glu			
□ <i>tyrC</i> □	5'	---	---	---	ATG	ACC	GTA	---	---	3'
					Met	Thr	Val			
□ <i>tyrCG</i> □	5'	---	---	---	ATG	GCC	GTA	---	---	3'
					Met	Ala	Val			
□ <i>tyrCK</i> □	5'	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>ACC</u>	ATG	ACC	GTA	---	---	3'
		Kozak			Met	Thr	Val			
□ <i>tyrCKG</i> □	5'	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>ACC</u>	ATG	GCC	GTA	---	---	3'
		Kozak			Met	Ala	Val			

図 1 PCR で増幅した *mel* 遺伝子の 5' 末端配列

下線部はコザック配列を示す。塩基配列中の太字 G は、置換した塩基を示す。この塩基置換により、*orf378* によりコードされるタンパク質の 2 番目のアミノ酸は Pro から Ala に変異し、*tyrC* によりコードされるタンパク質では Thr から Ala に変異する。

組み合わせにおいては、それぞれの遺伝子の 4 番目の塩基が G に置換されているため、本来の遺伝子によってコードされるタンパク質と比較すると、2 番目のアミノ酸が置換することになる (図 1)。しかしながら、これらの組み合わせを導入した COS-7 細胞においてもチロシナーゼ活性が認められたことから、このアミノ酸置換がチロシナーゼ活性に影響を及ぼす可能性は否定できないものの、活性自体を失わせることはないものと考えられた。A ~ D の組み合わせについて、それぞれの遺伝子を保有するベクターを 16μg ずつ用いて COS-7 細胞に導入した際、それらの導入細胞で発現したチロシナーゼ活性を図 2 に示す。各々のチロシナーゼ活性を比較すると D の組み合わせが最も高く、コザック配列の挿入と 4 番目の塩基を G に置換することが、チロシナーゼ活性を上昇させるのに有効に働いているものと考えられた。ただし、コザック配列のみを挿入した C の組み合わせの場合、本来の遺伝子の組み合わせである A と比較して活性が減少していること、および、4 番目の塩基を G に置換したのみの B の組み合わせでは、A と比較して活性が若干高いことを考慮すると、4 番目の塩基置換のほうがチロシナーゼ活性の上昇に有効に働くものと考えられる。次に、導入するベクター量のチロシナーゼ活性への影響を調べるため、A ~ D の組み合わせについて、それぞれの遺伝子を保有するベクターを 8μg ずつ用いて同様の実験を行った。その結果、A ~ D の組み合わせ全てにおいて、16μg ずつ用いた場合に比べ活性が上昇した。また、A ~ D の組み合わせ間の比較では、16μg ずつ用いた場合と同様に、D の組み合わせがもっとも活性

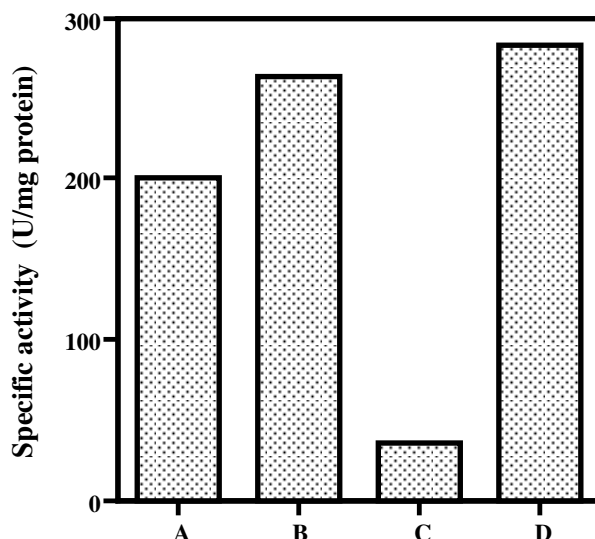


図 2 各種組み合わせの *mel* 遺伝子を導入した COS-7 細胞におけるチロシナーゼ活性

各種 *orf378* および *tyrC* 遺伝子を保有するベクターを 16μg ずつ、A ~ D の組み合わせにしたがって COS-7 細胞に導入し、チロシナーゼ活性を測定した。

A : *orf378*/*tyrC* B : *orf378G*/*tyrCG* C : *orf378K*/*tyrCK*
D : *orf378KG*/*tyrCKG*

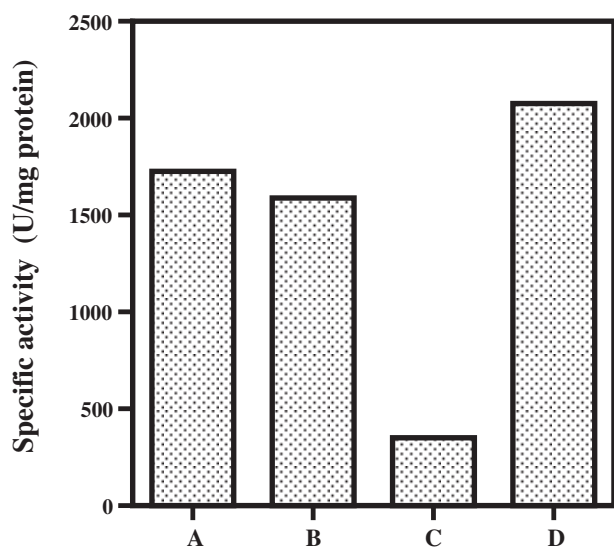


図3 各種組み合わせの *mel* 遺伝子を導入した COS-7 細胞におけるチロシナーゼ活性

各種 *orf378* および *tyrC* 遺伝子を保有するベクターを 8μg ずつ、A～D の組み合わせにしたがって COS-7 細胞に導入し、チロシナーゼ活性を測定した。

A : *orf378*/*tyrC* B : *orf378G*/*tyrCG* C : *orf378K*/*tyrCK*
D : *orf378KG*/*tyrCKG*

が高く、コザック配列の挿入と 4 番目の塩基を G に置換することが、チロシナーゼ活性を上昇させるのに有効であることが改めて確認された。本研究では、導入するベクター量のチロシナーゼ活性に及ぼす影響を調べたのみであるが、遺伝子導入に使用する細胞数や遺伝子導入時間を至適化することにより、さらにチロシナーゼ活性を上昇させることが可能であると考えられる。

3.3 *mel* 遺伝子の安定形質発現株の樹立

mel 遺伝子を構成的に発現する細胞株は、チロシナーゼ活性を阻害する物質を検索するための検定細胞として利用可能である。本研究では、Keratinocyte A431 細胞を用いて *mel* 遺伝子の安定形質発現株の樹立を試みた。*orf378* 用発現ベクターは hygromycin 耐性遺伝子を、*tyrC* 用発現ベクターは geneticin 耐性遺伝子を有することから、それぞれのベクターを A431 細胞に導入した後、2つの薬剤を用いて二重選択を行った。その結果、1つのクローンを得ることができた。現在、このクローンを増殖中であり、今後、本クローンのチロシナーゼ活性を測定する予定である。

4. 総括

本研究において、放線菌 *S. castaneoglobisporus* 由来のメラニン色素産生遺伝子 *mel* は真核細胞内で発現できることを示した。この成果は、微生物由来のメラニン産生遺伝子が白斑病の遺伝子治療や白髪を黒髪にするための遺伝

子治療に応用可能であることを示唆する。さらに、本研究において、*mel* 遺伝子を構成的に発現する候補細胞が1株取得できた可能性がある。この株が実際にメラニン色素を産生することが視覚的に判別できれば、チロシナーゼ活性の阻害物質をスクリーニングするための検定細胞となり得るとともに、その阻害剤が美白剤として利用できることを示唆するものである。

(引用文献)

- 1) Ikeda, K., Masujima, T., Suzuki, K. and Sugiyama, M.: Cloning and sequence analysis of the highly expressed melanin-synthesizing gene operon from *Streptomyces castaneoglobisporus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 45, 80-85, 1996.
- 2) Ikeda, K., Masujima, T. and Sugiyama, M.: Effects of methionine and Cu²⁺ on the expression of tyrosinase activity in *Streptomyces castaneoglobisporus*. J. Biochem., 120, 1141-1145, 1996.
- 3) Ikeda, K., Suzuki, K., Yoshioka, H., Miyamoto, K., Masujima, T. and Sugiyama, M.: Construction of a new cloning vector utilizing a cryptic plasmid and the highly expressed melanin-synthesizing gene operon from *Streptomyces castaneoglobisporus*. FEMS Microbiol Lett., 168, 195-199, 1998.
- 4) Kozak, M.: The scanning model for translation: an update. J. Cell Biol., 108, 229-241, 1989.
- 5) Horowitz, N.H., Fling, M. and Horn, J.: Tyrosinase (*Neurospora crassa*). Methods Enzymol., 17, 615-620, 1970.

糖転移酵素の関与するメラニン産生制御の解析

大阪大学大学院 医学系研究科

谷 口 直 之

The biological roles of asparagine-linked oligosaccharides (*N*-glycans) on glycoproteins are thought to be played through the interaction of terminal glycan structures and their receptors. The diversity and avidity of the terminal structures are, however, regulated by the core structure of *N*-glycans. In vertebrates, six different *N*-acetylglucosaminyltransferases (GnT-I through GnT-VI) are involved in initiating the synthesis of highly branched *N*-glycan core structure. Among them, we have purified and cloned four GnTs (GnT-III, IV, V, VI) for the first time. GnT-VI catalyzes the transfer of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) to position 4 of the Man α 1,6 arm of the core structure of *N*-glycan, forming the most highly branched pentaantennary glycans with a bisecting GlcNAc. The human GnT-VI-homolog (hGnT-VIh) gene was originally identified in the region commonly deleted in pancreatic cancer, but its function is unknown. hGnT-VIh shows no GnT-VI activity, although its primary structure is very similar to that of chicken GnT-VI (galGnT-VI) (50% identity). In order to elucidate the biological role of chicken GnT-VI and human GnT-VIh, the *galGnT-VI* and *hGnT-VIh* genes were introduced into a mouse melanoma cell line B16F1. Melanin production was enhanced in *hGnT-VIh* gene-introduced cells, accompanied by increased tyrosinase activity. In contrast, it was reduced in *galGnT-VI* transfectants, accompanied by a decrease of tyrosinase activity level. To investigate the molecular mechanism of these phenomena, tyrosinase mRNA levels in the cells were examined. The mRNA level in *hGnT-VIh* transfectants was elevated, while that in *galGnT-VI* transfectants was reduced compared to control cells. To study alterations in carbohydrate chains induced by the expression of *hGnT-VIh* and *galGnT-VI* genes, oligosaccharides on cell-surface were examined by flowcytometry using DSA and L-PHA lectins, which recognize poly *N*-acetylglucosamine and β 1,6GlcNAc branch, respectively. The reactivity against DSA and L-PHA was increased in hGnT-VIh-transfectants but decreased in *galGnT-VI*-transfectants. Taken together, it is suggested that the expression of the *hGnT-VIh* and *galGnT-VI* genes regulates melanin production via the regulation of tyrosinase expression accompanied by alterations in carbohydrate chain structures.

1. 緒 言

タンパク質に付加された糖鎖は、様々なタンパク質の機能を調節することにより、細胞の分化と増殖を制御することが知られている。糖タンパク質糖鎖には、アスパラギン結合型 (*N* 型) 糖鎖とムチン型 (*O* 型) 糖鎖があり、*N* 型糖鎖をもつものが多い。*N* 型糖鎖は、タンパク質のアスパラギン (Asn) 残基に結合しており、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) とマンノース (Man) より成る特徴的な分岐コア構造を有する (Fig. 1)。この糖鎖付加によりタンパク質が機能分子として成熟するようになる。糖鎖は、単糖が非還元末端側に一つずつ付加して伸長するが、この反応は糖転移酵素で触媒される。*N* 型糖鎖のコア分岐構造は6つの *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (GnT- I ~ VI) によって合成される (Fig. 1)。

われわれはこれまで、GnT- III、- IV、- V、- VIについて精製を行い^{1~4)}、精製酵素のアミノ酸配列に基づいて

cDNA クローニングを行ってきた^{1, 5~7)}。GnT- I ~ V はヒトに存在し、ヒト遺伝子が同定されているが^{6, 8~12)}、GnT- VI は魚類や鳥類では見つかったが、哺乳動物ではまだ見つかっていない^{4, 7)}。トリ GnT- VI の cDNA クローニングにより、従来 GnT- IV の相同遺伝子として知られていたヒト GnT- IV ホモログ (hGnT-IVh)¹³⁾ が、実は GnT- IV よりも GnT- VI により相同性が高いことがわかり⁷⁾、以降 hGnT- VI h と改名した。hGnT- VI h は、GnT- VI および GnT- IV とアミノ酸配列でそれぞれ 50% および 27% 一致しているが、hGnT- VI h には GnT- VI 活性も GnT- IV 活性もみられなかった⁷⁾。

GnT- IV あるいは GnT- V で合成される高分岐糖鎖構造

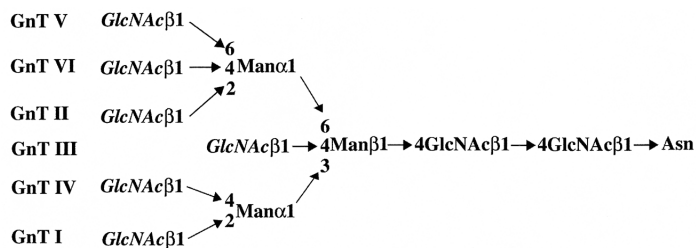


Fig. 1. Structure of the pentaantennary N-linked core oligosaccharide containing the bisecting GlcNAc residue. Location at which the GlcNAc transferases (GnT-I through VI) are involved in the branch formation.



Regulation of Melanin Production by Glycosyltransferases.

Naoyuki Taniguchi

Department of Biochemistry, Osaka University Medical School

は、癌細胞の転移¹⁴⁾や受精¹⁵⁾、受容体機能¹⁶⁾、免疫反応¹⁷⁾などに関係している。GnT-VIは、GnT-Vの産物である β 1,6GlcNAc分岐構造を認識して⁴⁾、さらに β 1,4結合でGlcNAcを転移してより複雑な分岐構造を形成する(Fig. 1)。糖鎖が高分岐化すると、多価性が付与されて糖鎖受容体との親和性が非常に高まることから¹⁸⁾、GnT-VIの導入によりさまざまな生物作用が生じることが予想された。また、hGnT-VIhに関しては、試験管内で糖転移酵素活性はみられていないが、未知の糖鎖修飾反応を触媒する可能性が考えられた。

メラニン細胞のメラニン産生のキー酵素であるチロシナーゼは、チロシン加水分解活性とドーパ酸化活性を同時にもつが、その活性にはN型糖鎖が必須であることが知られている^{19~21)}。また、 α -MSH等によるcAMP産生刺激によってメラノーマ細胞のメラニン産生が増加する際、さまざまなタンパク質のN型糖鎖の合成が促進される²²⁾。このように、メラニン細胞におけるメラニン産生にはN型糖鎖が深く関わっていることがわかっているが、実際どのような糖鎖構造が関与しているのか、また、どのような糖転移酵素が関与しているのかは不明である。われわれは、最近、GnT-III遺伝子をマウスメラノーマ細胞B16細胞に発現させると、チロシナーゼの糖鎖構造が変化するとともに、その活性が上昇して、メラニン産生が増大することを見出した²³⁾。そこで他の糖転移酵素の影響を調べるために、トリGnT-VIとhGnT-VIhのcDNAをマウスメラノーマ細胞B16F1に導入してその効果を調べた。

2. 実験

2.1 材料

哺乳動物用発現ベクターpcDNA3.1/Zeo(+)は、Invitrogen社より購入した。ジオチンで標識されたDatura stramonium agglutinin(DSA)、leucoagglutinating Phaseolus vulgaris agglutinin(L-PHA)は、EY laboratories社より購入した。RNA抽出試薬Trizol、Superscript II、LipofectAmineはGIBCOBRL社より購入した。抗生物質ZeocellはInvivoGen社より購入した。BCAプロテインアッセイキットはPierce社より購入した。マウスメラノーマ細胞B16F1は、10%牛胎児血清を加えたダルベッコ改変イーグル基礎培地を用いて、5% CO₂下、37℃で培養を行った。

2.2 ヒトGnT-VIホモログ(hGnT-VIh)遺伝子導入メラノーマ細胞の作成

pSV-hGnT-VIh¹³⁾からhGnT-VIhのopen reading frame(ORF)をpcDNA3.1ベクターに挿入し、pcDNA-hGnT-VIhを作製した。B16F1細胞に、LipofectAminを用いてメーカーのマニュアルに従い、pcDNA-hGnT-VIhをトランスフェクトし、100 μ g/mLのzeocellを添加してスクリーニングし、限界希釈法により細胞をクローン化した。

2.3 ニワトリGnT-VI(galGnT-VI)遺伝子導入メラノーマ細胞の作成

pSV-GnT-VI⁷⁾からgalGnT-VIのORFを、pcDNA3.1に挿入し、pcDNA-galGnT-VIを作製した。トランスフェクション、スクリーニング、クローン化の方法はhGnT-VIhと同様である。

2.4 ノーザンブロットティング

各細胞からtotal RNAをTrisolを用いて抽出した。得られたtotal RNA 10 μ gをホルムアルデヒド変性ゲルで電気泳動し、陽性荷電ナイロンメンブレン(Roche)にブロットティングした。galGnT-VI遺伝子のmRNAレベルの発現を見る場合には、GnT-VI遺伝子の後半部分の配列を元にして作ったジゴキシン標識RNAプローブを、チロシナーゼ遺伝子のmRNAレベルでの発現をみる場合には、チロシナーゼ遺伝子の配列全長を元に作成したジゴキシン標識DNAプローブをハイブリダイズさせ、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシン抗体(Roche)にて検出した。

2.5 RT-PCR

total RNA 1 μ gを用いて、random primerと逆転写酵素Superscript IIによって逆転写反応(RT)を行った。PCRは、変性を94℃で30秒、アニーリングを55℃で30秒、伸長反応を72℃で1分間の条件で、hGnT-VIh遺伝子の場合には、Gn4H5S: 5'-AACGTTCTACAGTGTCATTC-3'とGnT4H5A: 5'-GGATGCAATGACTTCTTGA-3'を用いて28サイクル、チロシナーゼ遺伝子の場合には、TYRinB F: 5'-GAGTATA-ATAGCCATCAGGT-3'、とTYRinB R: 5'-CTTGGGACATT-GTTCCATTC-3'を用いて29サイクル、コントロールの β -アクトチン遺伝子の場合には、 β actinF: 5'-TTACCAACTGGGAC-GACATG-3'とreverse primer β actinR: 5'-AGGAGCCAGAG-CAGTAATCT-3'を用いて21サイクル増幅させた。

2.6 チロシナーゼ活性測定、タンパク定

チロシナーゼの活性測定は、細胞溶解液50 μ Lに1 mMの β -L-dehydroxyphenylalanine(L-DOPA)を950 μ Lずつ加えて、37℃で30分間反応させた後、475nmでDOPA-chromeの吸光度を測定した²⁰⁾。タンパク質定は牛血清アルブミンを標準として用いて、BCAプロテインアッセイキットによって行った。

2.7 フローサイトメトリー

各細胞を0.25% EDTAを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で剥がし、20 μ g/mLのジオチン化レクチンと氷上で30分間反応させた後、PBSで洗い、さらにFITC標識アビジンを氷上で30分間反応させ、PBSで洗った後、FACScan(Beckton Dickinson社製)にて解析した。

3. 結 果

ニワトリ *GnT-VI* 遺伝子 *galGnT-VI* をマウスメラノーマ細胞 B16F1 にトランスフェクトして、zeocell 耐性株を得た。これらの Zeocell 耐性株における導入 *GnT-VI* 遺伝子の発現を、ノーザンブロットングで解析したところ、転写物が確かに発現していた (data not shown)。

同様に、ヒト *GnT-VI* ホモログ遺伝子 *hGnT-VI h* についても B16F1 細胞にトランスフェクトして Zeocell 耐性株を得た。*hGnT-VI h* 遺伝子の発現は、転写物量が非常に少くノーザンブロットングでは検出できなかったが、RT-PCR で転写物を確認した (data not shown)。

galGnT-VI および *hGnT-VI h* 遺伝子導入メラノーマ細胞は、親株や Mock トランスフェクトと比べて、特に目立った増殖速度の変化はみられなかった (data not shown) が、*galGnT-VI* 遺伝子導入細胞は、対照細胞より白くなり、反対に *hGnT-VI h* 遺伝子導入細胞は黒くなった (Fig. 2)。光学顕微鏡で観察すると、*hGnT-VI h* 遺伝子導入細胞は、細胞間あるいは細胞-基質間の接着が増強したためと思われるが突起を出して伸展した細胞形態をとるとともに、メラニン色素を多量に含有している細胞が多数みられた (Fig. 3)。一方、*galGnT-VI* 遺伝子導入細胞は明らかな形態学的な差異はみられなかった。

次にメラニン産生のキー酵素であるチロシナーゼの発現を調べた。*hGnT-VI h* 遺伝子導入細胞のチロシナーゼ活性は、対照細胞と比べて約 2 倍高く、一方 *galGnT-VI* 遺伝子導入細胞は約 4 分の 1 に低下していた (Fig. 4)。この結果から、*hGnT-VI h* 遺伝子導入メラノーマ細胞および *galGnT-VI* 遺伝子導入メラノーマ細胞におけるメラニン産生の変化は、チロシナーゼ活性で制御されていると思われる。

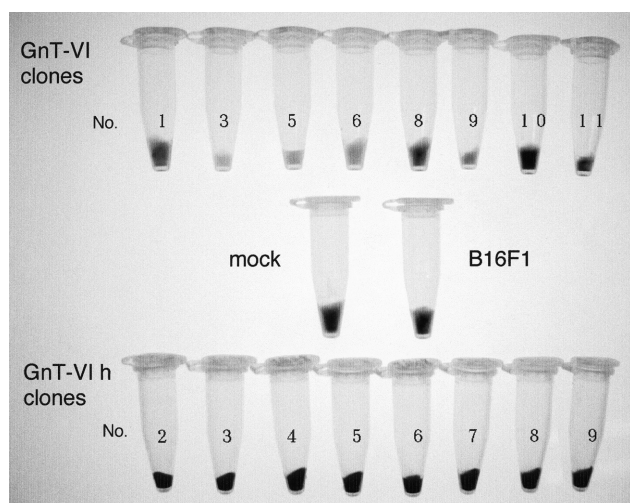


Fig. 2. Comparison of cell-pellet color between parent B16F1 cells, mock transfectants, *galGnT-VI* transfectants, and *hGnT-VIh* transfectants.

チロシナーゼ活性変化のメカニズムを明らかにするため、まず、mRNA レベルの発現をノーザンブロットングで解析した。*hGnT-VI h* 遺伝子導入細胞ではチロシナーゼの転写物が検出されたが、親株、Mock トランスフェクタント、*galGnT-VI* 遺伝子導入細胞では検出されなかった (Fig. 5)。次に、親株、Mock トランスフェクタント、*galGnT-VI* 遺伝子導入細胞におけるチロシナーゼ mRNA の発現をより高感度の RT-PCR で解析したところ、*galGnT-VI* 遺伝子導入細胞では、親株、Mock トランスフェクタントと比べて発現が低下していた。

チロシナーゼは糖タンパク質であり、糖鎖の付加が酵素活性の発現に必要であることが報告されている^{19~21)} ので、*hGnT-VI h* 遺伝子あるいは *galGnT-VI* 遺伝子の強制発現によりチロシナーゼの糖鎖が改変されて酵素活性を変化させる可能性が考えられた。そこで、まず、*hGnT-VI h* 遺伝子導入細胞および *galGnT-VI* 遺伝子導入細胞における *GnT-VI* 活

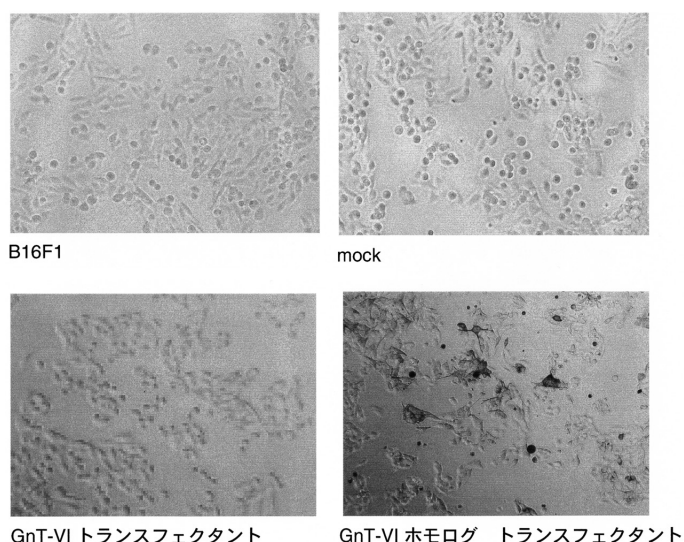


Fig. 3. Microscopic observation of parent B16F1 cells, mock transfectants, *galGnT-VI* transfectants, and *hGnT-VIh* transfectants.

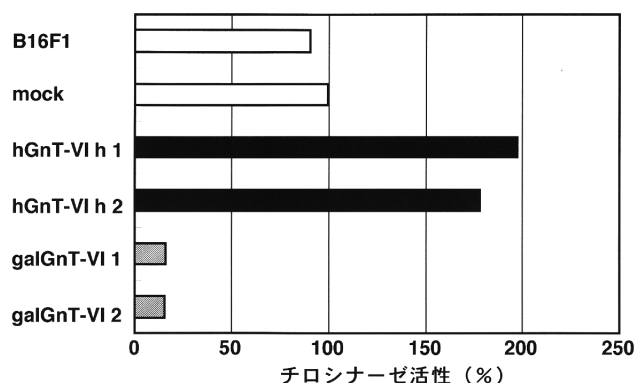


Fig. 4. Tyrosinase activity levels in parent B16F1 cells, mock transfectants, *galGnT-VI* transfectants, and *hGnT-VIh* transfectants.

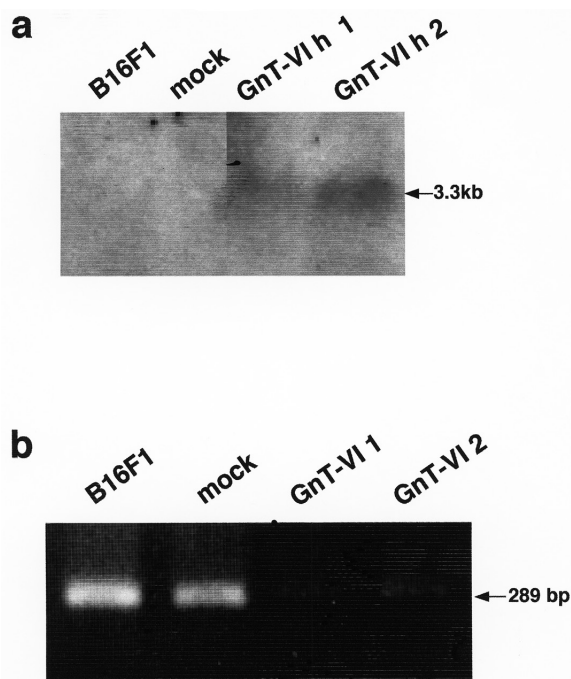


Fig. 5. Tyrosinase mRNA levels in parent B16F1 cells, mock transfectants, *galGnT-VI* transfectants, and *hGnT-VIh* transfectants.

Tyrosinase mRNA expression levels were examined by Northern blotting (panel a) and RT-PCR (panel b).

性を測定したが、親株同様のいずれも活性が検出されなかった (data not shown)。何らかの阻害物質の混入による活性抑制も考えられたので、次に、細胞内における糖鎖変化をレクチンを用いて調べた。直接に *GnT-VI* 産物である $\text{GlcNAc}\beta 1-4 (\text{GlcNAc}\beta 1-6) \text{Man}\alpha$ 構造を認識するレクチンは知られていないので、*GnT-V* 産物である $\beta 1,6\text{GlcNAc}$ ブランチ構造を認識するとされる DSA レクチン²⁴⁾ と L-PHA レクチン²⁵⁾ を用いて、フローサイトメトリーで細胞表面の糖鎖構造との反応性について調べた。DSA に対する反応性は、対照として用いた mock トランスフェクタントと比べて、*hGnT-VI h* 遺伝子導入細胞では増加し、*galGnT-VI* 遺伝子導入細胞では不変あるいは若干低下した (Fig. 6a)。L-PHA の反応性も DSA レクチンの反応性と一部異なるものの、mock トランスフェクタントと比べて、*hGnT-VI h* 遺伝子導入細胞では増加し、*galGnT-VI* 遺伝子導入細胞では不変あるいは若干低下した (Fig. 6b)。したがって、*hGnT-VI h* 遺伝子と *galGnT-VI* 遺伝子の導入は細胞表面の *N* 型糖鎖の構造を変化させ得ることがわかった。

4. 考 察

チロシナーゼの活性を規定する因子は複数あり、糖鎖もその一因と考えられる^{19, 20)}。実際、チロシナーゼについて *N* 型糖鎖は分子シャペロンとの結合に関わり、酵素活性の発現に必要であることが証明されている²¹⁾。以前、

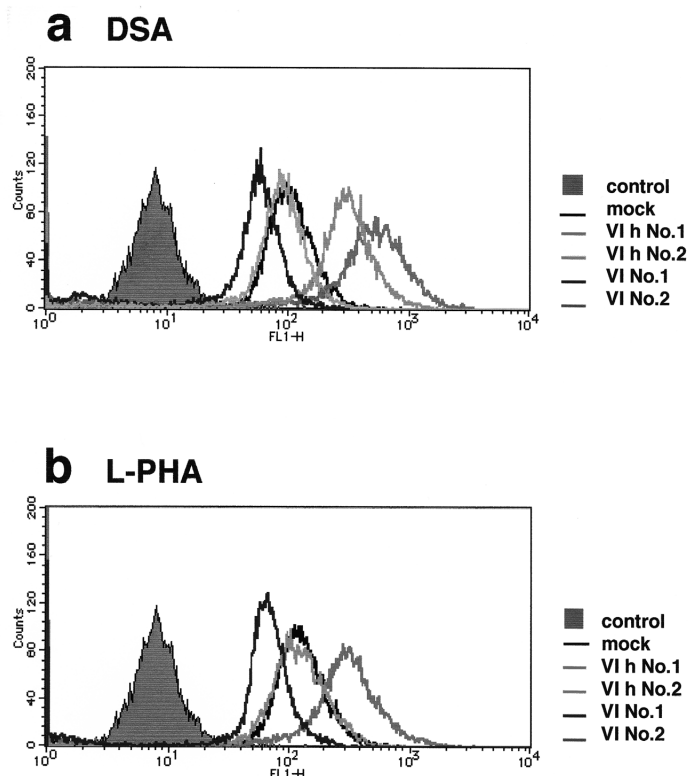


Fig. 6. Reactivities of cell surface glycoproteins to DSA and L-PHA lectins.

Mock transfectants, *galGnT-VI* transfectants, and *hGnT-VI* transfectants were examined by flow cytometry analysis using DSA (panel a) and L-PHA (panel b) lectins.

我々は *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 *GnT-III* (図1参照) 遺伝子をマウスメラノーマ B16 細胞に導入するとチロシナーゼ活性の上昇に伴いメラニン産生が増加することを見出した²³⁾。本研究では、*galGnT-VI* 遺伝子導入細胞ではチロシナーゼ活性の低下に伴ってメラニン産生が抑制され、一方、*hGnT-VI h* 遺伝子導入細胞では逆にチロシナーゼ活性の上昇に伴いメラニン産生が亢進することを見出した。*Gn-VI* は *N* 型糖鎖の分岐形成に与り、また、*hGnT-VI h* も未知ではあるが糖転移酵素である可能性が高いので、これらの遺伝子導入は、チロシナーゼを含む糖タンパク質糖鎖の構造を改変し、活性に影響を及ぼすことが予想された。しかし両者のトランスフェクタントにおいて、導入した遺伝子が発現していることを mRNA レベルでは確認できるものの、*GnT-VI* の活性は検出できなかった。何か試験管内における *GnT-VI* 活性を阻害する細胞内物質が混入したのかもしれない。糖転移酵素は、発現量が非常に少なく試験管内で活性が検出されなくても、実際に細胞内では糖鎖の生合成を行う場合があるので、導入遺伝子が細胞内で糖転移酵素として働いているかもしれない。

一方、ポリ *N*-アセチラクトサミンと $\beta 1,6\text{GlcNAc}$ 分岐部を認識する植物レクチン DSA と L-PHA を用いたフローサイトメトリーにより細胞表面の糖鎖構造の変化を調べた

ところ、*galGnT*-VI 遺伝子導入細胞と *hGnT*-VI *h* 遺伝子導入細胞における細胞表面の糖鎖変化は逆に動いた。このレクチンとの反応性が、導入遺伝子産物の直接的な糖転移酵素活性に基づくものであるか、それとも他の糖転移酵素群の攪乱に基づくものであるかは不明である。いずれにしてもチロシナーゼの糖鎖自体も変化している可能性も高い。

チロシナーゼの活性変化とチロシナーゼの mRNA の発現が関連していたことから、本研究で観察された *galGnT*-VI あるいは *hGnT*-VI *h* 遺伝子導入によるメラニン産生量の変化は、一つにはチロシナーゼ遺伝子の発現が変化したためと思われる。この原因としては、*galGnT*-VI と *hGnT*-VI *h* の mRNA が直接チロシナーゼ遺伝子の転写あるいはチロシナーゼ mRNA の安定性に干渉した可能性が考えられる。別の可能性としては、細胞表面の糖鎖変化が、チロシナーゼ遺伝子の発現に影響を及ぼしたか、あるいは別の分子を介してチロシナーゼ mRNA の安定性を調節していることが考えられる。

以上をまとめると、トリ *GnT*-VI 遺伝子およびヒト *GnT*-VI *h* 遺伝子のマウスメラノーマ細胞における発現は、チロシナーゼの発現変化を介して、メラニン産生を制御することが明らかとなった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご支援いただきましたコスメトロロジー研究振興財団に深謝いたします。

(参考文献)

- 1) Nishikawa A, Ihara Y, Hatakeyama M, Kangawa K, Taniguchi N: Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-N-acetylglucosamine : β -D-mannoside β -1,4N-acetylglucosaminyltransferase III from rat kidney. *J. Biol. Chem.* **267** : 18199-18204, 1992
- 2) Oguri S, Minowa MT, Ihara Y, Taniguchi N, Ikenaga H, Takeuchi M: Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine : α 1,3-D-mannoside β 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase (*N*-acetylglucosaminyltransferase - IV) from bovine small intestine. *J. Biol. Chem.* **272**:272 : 22721-22727, 1997
- 3) Gu J, Nishikawa A, Tsuruoka N, Ohno M, Yamaguchi N, Kangawa K, Taniguchi N: Purification and characterization of UDP-N -acetylglucosamine: α -6-D-mannoside β 1-6N-acetylglucosaminyltransferase (*N*-acetylglucosaminyltransferase V) from a human lung cancer cell line. *J. Biochem.* **113** : 614-619, 1993
- 4) Taguchi T, Ogawa T, Inoue S, Inoue Y, Sakamoto Y, Korekane H, Taniguchi N: Purification and characterization of UDP-GlcNAc:GlcNAc β 1-6 (GlcNAc β 1-2) Man α 1-R [GlcNAc to Man] β 1,4-*N*-acetylglucosaminyltransferase VI from hen oviduct. *J. Biol. Chem.* **275** : 32598-32602, 2000
- 5) Minowa MT, Oguri S, Yoshida A, Hara T, Iwamatsu A, Ikenaga H, Takeuchi M: cDNA cloning and expression of bovine UDP-N-acetylglucosamine : β 1,3-D-mannoside α 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase IV. *J. Biol. Chem.* **273** : 11556-11562, 1998
- 6) Saito H, Nishikawa A, Gu J, Ihara Y, Soejima H, Wada Y, Sekiya C, Niikawa N, Taniguchi N: cDNA cloning and chromosomal mapping of human *N*-acetylglucosaminyltransferase V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198** : 318-327, 1994
- 7) Sakamoto Y, Taguchi T, Honke K, Korekane H, Watanabe H, Tano Y, Dohmae N, Takio K, Horii A, Taniguchi N: Molecular cloning and expression of cDNA encoding chicken UDP- *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) : GlcNAc β 1-6 (GlcNAc β 1-2) -Man α 1-R [GlcNAc to Man] β 1,4N -acetylglucosaminyltransferase VI. *J. Biol. Chem.* **275** : 36029-36034, 2000
- 8) Kumar R, Yang J, Eddy RL, Byers MG, Show TB, Stanley P: Cloning and expression of the murine gene and chromosomal location of the human gene encoding *N*-acetylglucosaminyltransferase I. *Glycobiology* **2**:383-393, 1992
- 9) Tan J, D'Agostaro AF, Bendiak B, Reck F, Sarkar M, Squire JA, Leong P, Schachter, H.: The human UDP-*N*-acetylglucosamine : α -6-D-mannoside β -1, 2-*N*-acetyltransferase II gene (MGAT2) -cloning of genomic DNA, localization to chromosome 14q21, expression in insect cells and purification of the recombinant protein. *Eur. J. Biochem.* **231** : 317-328, 1995
- 10) Yip B, Chen SH, Mulder H, Hoppener J, Schachter H : Organization of the human β -1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I gene (*MGAT1*) , which controls complex and hybrid N-glycan synthesis. *Biochem. J.* **321** : 465-474, 1997
- 11) Ihara Y, Nishikawa A, Tohma T, Soejima H, Niikawa N, Taniguchi N: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of human *N*-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) . *J. Biochem.* **113** : 692-698, 1993
- 12) Yoshida A, Minowa MT, Takamatsu S, Hara T, Oguri S, Ikenaga H, Takeuchi M: Tissue-specific expression and chromosomal mapping of a human UDP-*N*-acetylglucosamine : α 1,3-D-mannoside β 1,4-*N*-acetylglucosaminyltransferase. *Glycobiology* **9** : 303-310, 1999
- 13) Furukawa T, Youssef EM, Yatsuoka T, Yokoyama

- T, Makino N, Inoue H, Fukushige S, Hoshi M, Hayashi Y, Sunamura M, Horii A: Cloning and characterization of the human UDP-N-acetylglucosamine: α -1,3-D-mannoside β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase IV-homologue (hGnT-IV-H) gene. *J. Hum. Genet.* **44** : 397-401, 1999
- 14) Murata K, Miyoshi E, Kameyama M, Ishikawa O, Kabuto T, Sasaki Y, Hiratsuka M, Ohigashi H, Ishiguro S, Ito S, Honda H., Takemura F, Taniguchi N, Imaoka S: Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis. *Clin. Cancer Res.* **6** : 1772-1777, 2000
- 15) Kitajima K, Inoue S, Inoue Y : 61 : Isolation and characterization of a novel type of sialoglycoproteins (hyosporin) from the eggs of medaka, *Oryzias latipes*: nonapeptide with a large N-linked glycan chain as a tandem repeat unit. *Dev. Biol.* **132** : 544-553, 1989
- 16) Ihara Y, Sakamoto Y, Mihara M, Shimizu K, Taniguchi N.: Overexpression of N-acetylglucosaminyltransferase III disrupts the tyrosine phosphorylation of Trk with resultant signaling dysfunction in PC12 cells treated with nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **272** : 9629-9634, 1997
- 17) Buckhaults P, Chen L, Fregien N, Pierce M: Transcriptional regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V by the src oncogene. *J. Biol. Chem.* **272** : 19575-19581, 1997
- 18) Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA: Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.* **57** : 785-838, 1988
- 19) Imokawa, G, Mishima Y: Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res.* **42** : 1994-2002, 1982
- 20) Petrescu SM, Petrescu AJ, Titu HN, Dwek RA, Platt FM: Inhibition of N-glycan processing in B16 melanoma cells results in inactivation of tyrosinase but does not prevent its transport to the melanosome. *J. Biol. Chem.* **272** : 15796-15803, 1997
- 21) Branza-Nichita N, Negroiu G, Petrescu AJ, Garman EF, Platt FM, Wormald MR, Dwek RA, Petrescu SM: Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J. Biol. Chem.* **275** : 8169-8175, 2000
- 22) Sodi SA, Chakraborty AK, Platt JT, Kolesnikova N, Rosemblatt S, Keh-Yen A, Bolognia JL, Rachkovsky ML, Orlow SJ, Pawelek JM: Melanoma x macrophage fusion hybrids acquire increased melanogenesis and metastatic potential: altered N-glycosylation as an underlying mechanism. *Pigment Cell Res.* **11** : 299-309, 1998
- 23) Taniguchi N, Jain SK, Takahashi M, Ko JH, Sasai K, Miyoshi E, Ikeda Y: Glycosyltransferases: cell surface remodeling and regulation of receptor tyrosinase kinases-induced signaling. *Pure. Appl. Chem.* **71** : 719-728, 1999
- 24) Yamashita K, Totani K, Ohkura T, Takasaki S, Goldstein IJ, Kobata A: Carbohydrate binding properties of complex-type oligosaccharides on immobilized Datura stramonium lectin. *J. Biol. Chem.* **262** : 1602-1607, 1987
- 25) Cummings RD, Kornfeld S: Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. *J. Biol. Chem.* **257** : 11230-11234, 1982

ゼラチンによるアレルギー反応のエピトープ解析と安全なゼラチンの開発

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 成人疾患研究部門 分子病態分野

堀 久 枝

Anaphylactic reactions to measles, mumps and rubella vaccines and the combined measles-mumps-rubella (MMR) vaccines have been suggested to be caused by allergy containing bovine gelatin in the vaccines as a stabilizer. Since gelatin can be derived from collagen molecules present in all multicellular animals, it has long been believed to be nonimmunogenic and thought to be weakly allergic in human. Therefore, gelatin has been widely used as a stabilizer in vaccines. The present study was designed to investigate the reactivity of IgE in bovine gelatin-sensitive children to gelatins from various animals by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The IgE in the children reacted to mammalian gelatins including kangaroo and mouse gelatins, to which they had little or no exposure as a food or a vaccine stabilizer. Most of the children who displayed sensitivity may be due primarily to the antigenic cross-reactivity between mammalian gelatins.

Gelatin, obtained from bone and skin, consists mainly of denatured type I collagen, which is composed of two $\alpha 1$ and one $\alpha 2$ chains. Furthermore, the study was designed to elucidate the IgE reactivity to $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of bovine type I collagen in gelatin-sensitive children. Purified $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of bovine type I collagen were obtained by separation of column chromatography. All serum samples which were reacted with bovine type I collagen showed positive reaction to $\alpha 2$ chain. In our previous study, we reported that homology (98%) between $\alpha 1$ chains of human and bovine type I collagen is higher than homology (93%) between $\alpha 2$ chains of them. These homology data might suggest that the $\alpha 2$ chain has higher allergenicity than the $\alpha 1$ chain. To analyze IgE-binding sites of $\alpha 2$ chain, recombinant proteins covering 100 kDa collagenous domain of $\alpha 2$ chain were expressed by pRSET vector. One of five recombinant proteins located in central portion of collagenous domain showed strong reactivity for patients sera. To further determine epitope, several small recombinant proteins covering the central collagenous domain were prepared. The 4 kDa recombinant protein spanning from ⁴⁶¹Pro to ⁵⁰⁰Glu was shown cross-reactivity to patients sera but the protein from ⁴³¹Ala to ⁴⁷⁵Gly was not shown. Taken together these data, a major epitope in the $\alpha 2$ chain of bovine type I collagen was suggested to locate in 25 amino acid residues with ⁴⁷⁵Gly to ⁵⁰⁰Glu.

In the future, our analyzed data of IgE-binding epitope in the $\alpha 2$ chain of bovine type I collagen may become tool for developing a gelatin which has no or low allergenicity to humans

1. 緒 言

近年小児において麻疹、ムンプス、風疹ワクチン接種後、副反応としてアナフィラキシーを起こす例があり、卵成分がアレルギーの原因と考えられてきた。これまでこのアナフィラキシーの原因アレルゲンがワクチン添加物として含まれるゼラチンであることを明かにしてきた^{1, 2)}。このゼラチンはコラーゲンの変性物であり、主にウシコラーゲンがその由来となっている。コラーゲンは現在ワクチンの添加剤みならず、他の薬剤の安定化剤および止血用膜などの医薬品、美容形成用剤および化粧品、またゼリーとしての食料品など、生活密着した用途に広がっている。一方コラーゲンは人体の全タンパク量の1/3を占め、特徴的な(Gly-Pro-X)の繰り返し配列をしており、3本の α 鎖が3重ヘリックスを構成している。これらの構造は動物種を

こえて広く保存されていることから、これまで、コラーゲンの免疫原性は非常に低いと考えられてきた。しかしワクチン添加剤中のウシゼラチンがアレルギー原因物質であることが明らかとなったことから、本研究はウシコラーゲンに代わる種特異性の低いコラーゲンの開発を目的とし、種々の動物由来コラーゲンとの反応性を検討した。さらにI型コラーゲンの抗原性の検索を行うため、構成鎖 $\alpha 1$ 鎖および $\alpha 2$ 鎖を単離精製し、また $\alpha 2$ 鎖をカバーする組み換えタンパクを作成し、抗原部位の局在を明らかにした。ゼラチンは優れた安定性と安価で多量供給できることから、さらに需要は拡大するものと推測される。今後安全なゼラチンを開発するために、エピトープ分解除去の方法の確立を予定している。

2. 実 験

2.1 試 料

安定剤としてゼラチンを含んでいるワクチン接種後、アナフィラキシーを含む即時型アレルギー反応を惹起した小児15例から得られた血清およびゼラチン含有の菓子(グミ)を食べた後即時型アレルギー反応を惹起した小児1例から得られた血清。



Epitope analysis of gelatin allergy and development of low-allergic gelatin

Hisae Hori

Department of Molecular Pathogenesis,
Division of Adult Diseases, Medical
Research Institute, Tokyo Medical and
Dental University

2.2 ウシ I 型コラーゲンおよび各種動物由来コラーゲンの作成

I 型コラーゲンはウシ皮膚真皮層を細切後 0.5M 酢酸で抽出し、食塩沈殿法にて精製した。各種動物由来コラーゲンも同様に皮膚組織から 0.5M 酢酸またはペプシン消化で抽出後上記と同様に単離精製した³⁾。

2.3 ウシ I 型 $\alpha 1$ 鎖および $\alpha 2$ 鎖の調製

ウシ皮膚よりペプシン消化で可溶化し、食塩分別法で精製した I 型コラーゲンから、Piez らの CM (カルボキシメチル) クロマトグラフィー分離法にて各鎖を単離した⁴⁾。 $\alpha 2$ 鎖はさらにアミノ酸特異的な分解 (CNBr によるメチオニンの分解、リジルエンドペプチダーゼ) を行い、抗原性の変化を検討した。

2.4 ウシ I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の組み換えタンパクの作製

アレルギー患者血清中のエピトープを系統的に分析するためにウシ I 型 $\alpha 2$ 鎖 cDNA⁵⁾ より、Fig. 3 に示した数種の組み換えタンパクに対応する cDNA フラグメント (200 アミノ酸残基) を作製した。バクテリア発現ベクター (pRSET, His-Tag) に組み込み、融合タンパクを作製し、ニッケル吸着カラムで精製した。

2.5 ゼラチン特異的 IgE 抗体との反応

上記ウシおよび各種動物由来コラーゲン、ウシ $\alpha 2$ 鎖、組み換えタンパクに対する IgE 抗体の測定はマイクロプレートに抗原 (10 μ g/mL) をコートし、アレルギー患者血清 (1:10 希釈) と蛍光 ELISA にて行った。

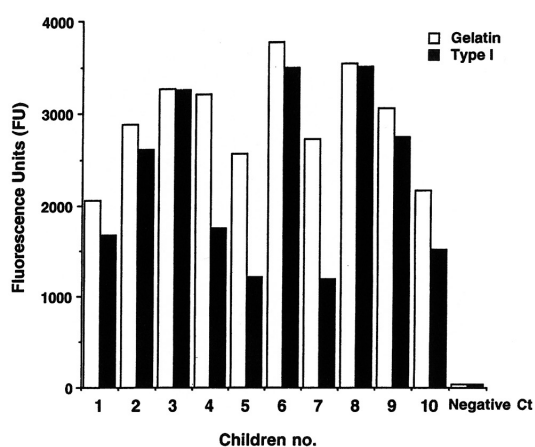


Fig.1 IgE reactivity to bovine gelatin and denatured type I collagen. Each child's serum was diluted to approximately 1 Ua/mL as level of specific IgE to gelatin.

3. 結果

3.1 ゼラチン中のアレルギーの同定

ゼラチン特異的 IgE 抗体の測定は共同研究者阪口雅弘博士の開発した蛍光 ELISA を用い¹⁾、ワクチン接種後アナフィラキシーを起こした患者血清と熱変性コラーゲンをを用い反応性を調べた。

3.1.1 市販ゼラチンと精製コラーゲンに対する反応性の検討

ワクチンに添加されている市販ゼラチンのアレルギー性の有無を確認する目的で精製コラーゲンとの反応性を比較検討した。ウシ皮膚由来精製コラーゲンを加熱変性後 ELISA にて反応性を調べた。10 例の患者血清 IgE はワクチン含有のゼラチンと同様ウシ I 型コラーゲンに強い反応性を示した (Fig. 1)。

3.1.2 ゼラチンアレルギー反応の種特異性の検索

ゼラチンによるアレルギー性の種特異性について検索する目的で 6 種の哺乳動物、鳥類、両生類、魚類、頭足類などの皮膚よりコラーゲンを抽出精製し、上記と同様各種動物コラーゲンを熱変性後 ELISA にて反応性を調べた (Table 1)。ウシコラーゲンに対する反応性と比較するとブタ等の哺乳類由来のコラーゲンに幅広い交差反応性を認めたが、これまで摂取されたことの無いマウス、カンガルーのコラーゲンにも反応することから、ウシコラーゲンによるアレルギー反応は動物種を越えて共通の抗原決定基に由来することが推測された。一方、これまでに多く摂取されているニワトリのコラーゲンとは低い反応性を示し種特異性反応が認められた。またサカナコラーゲン単独で陽性

Table 1 Reactivity of anti-gelatin IgE to gelatin from various animals.

Gelatin	Child no.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bovine	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Porcine	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	±	-
Kangaroo	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	±	-
Guinea-pig	+++	++	+++	++	++	+	±	-	++	+
Rat	+++	++	+++	++	+	±	±	±	±	-
Mouse	+++	+++	+++	++	+	±	±	±	-	-
Chick	±	+	-	-	-	-	±	-	+	-
Tadpole	+	±	-	-	+	±	±	-	±	±
Codfish	+++	+	-	-	+	±	±	-	±	-
Salmon	+++	±	±	-	-	+	±	-	+	-
Shark	±	±	-	±	-	-	-	-	+	-
Octopus	±	±	-	+	±	-	±	-	-	-
Ascaris	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-

The results are expressed as a percentage of the binding of IgE to each recombinant proteins compared with that to bovine type I collagen: , +++ $\geq$ 75%, 75%> ++ $\geq$ 50%, 50%> + $\geq$ 25%, 25%> ± $\geq$ 5%, - <5%

を示す例も認められたが、その後の研究の結果、いわゆるサカナアレルギーの患者血清では類似のサカナコラーゲンと反応するもののウシゼラチンとは反応しないことが明らかとなった⁶⁾。

3.1.3 I型コラーゲン構成鎖のアレルゲン性について

コラーゲンは十数種の型が知られているが、抽出時に混入する可能性のあるII型コラーゲンからV型コラーゲンに対する反応性を調べたところ、I型コラーゲンに特異的であった。したがってこのアレルギー反応がII型からV型コラーゲンの混在に由る可能性は低いと考えられた。そこでI型コラーゲン構成鎖の $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖を単離精製し、それぞれの反応性を調べたところ、ヒトとのホモロジーが98%の $\alpha 1$ 鎖とは全く交差性は認められず、 $\alpha 2$ 鎖（ホモロジー93%）に特異的であることが明らかになった（Fig. 2）。エピトープはウシ $\alpha 2$ 鎖の特定部位に局在すると考えられ、さらに詳細な抗原部位を特定するために、組み換えタンパ

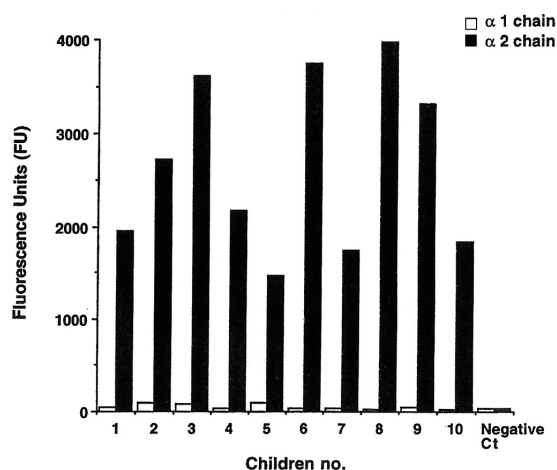


Fig.2 IgE reactivity to $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of bovine type I collagen. Each child's serum was diluted to approximately 1 Ua/mL as level of specific IgE to gelatin.

クを作成し同定を行った。

3.2 ウシI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖組み換えタンパクによる抗原性部位の検出

ウシI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖のアミノ酸配列はこれまで部分配列の報告であったため、ウシ大動脈由来のcDNAライブラリーより全cDNAをクローニングし、全アミノ酸配列を明かにした⁵⁾。そのウシI型 $\alpha 2$ 鎖cDNAを鋳型として200アミノ酸配列に相当するcDNAフラグメントを作製し、発現ベクターに組み込み融合タンパクを作製した（Fig. 3）。

3.2.1 ウシ $\alpha 2$ 鎖をカバーする5個の組み換えタンパクとの反応性

$\alpha 2$ 鎖のヘリックス構造部位に相当する100kDa（約1000アミノ酸残基）に対応する5個の組み換えタンパク、I（^{1N}Gln - ^{9N}Pro / ¹Gly - ²²⁴Leu）、II（²¹³Asn - ⁴¹⁷Ala）、III（⁴¹⁸Gly - ⁶⁶²Pro）、IV（⁶⁶³Val - ⁸⁸⁰Glu）、V（⁸⁷⁹Val - ¹⁰¹⁴Ser / ^{1C}Gly - ^{15C}Ala）を用いて患者血清との反応性を検索した（Table 2）。患者血清16例中14例がIIIに、6例がIIに、3例がIV、1例がVに陽性反応を示し、抗原部位は複数あることが示唆されたが、主要なエピトープはヘリックス構造中央部III（⁴¹⁸Gly - ⁶⁶²Pro）にあると判明した。

3.2.2 主要エピトープの局在部位の解明

さらに組み換えタンパクIII（⁴¹⁸Gly - ⁶⁶²Pro）について3つの部位、III a（⁴¹⁸Gly - ⁵¹⁰Ala）、III b（⁴⁹¹Leu - ⁵⁸⁸Pro）、III c（⁵⁷²Leu - ⁶⁷⁵Ser）に対応するcDNAフラグメントを作成し、融合蛋白を発現、精製した。これら組み換えたんぱくに対する反応性を調べたところ、III（⁴¹⁸Gly - ⁶⁶²Pro）に陽性の14検体はすべてIII aに反応し、抗原部位は⁴¹⁸Gly - ⁵¹⁰Alaの93残基に局在することが明らかになった（Fig. 4）。ただし1症例no.4においてIII bにも反応性

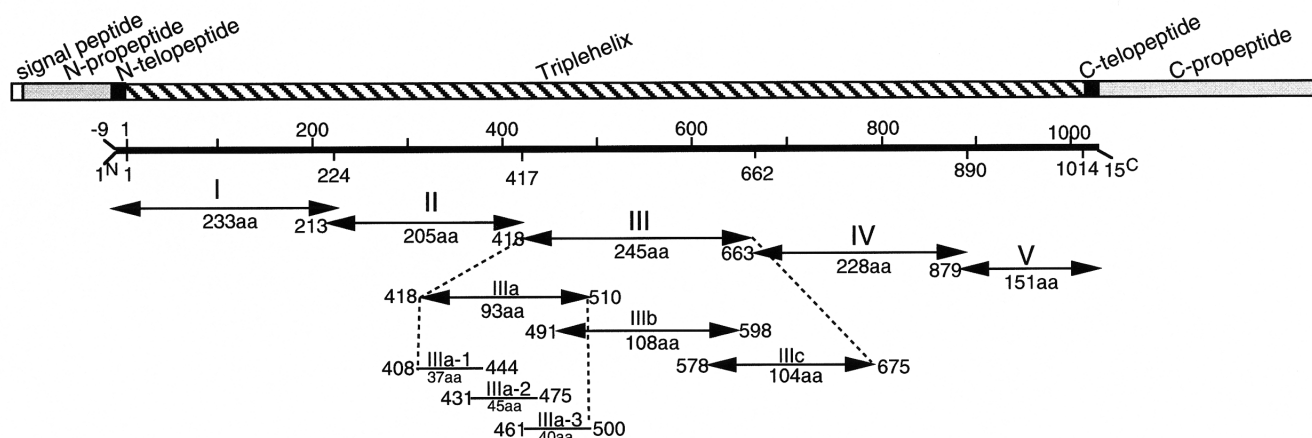


Fig.3 A schematic representation of the collagen $\alpha 2(I)$ chain and its recombinant proteins. Recombinant proteins I, II, III, IV, III a, III b, III c and III a-1 to a-3 are prepared from bacterial expression vector pRSET.

がみとめられた。さらにⅢ a 中の抗原の局在を検索するためにⅢ a-1 ($^{408}\text{Lys} - ^{444}\text{Gly}$)、Ⅲ a-2 ($^{431}\text{Ala} - ^{475}\text{Gly}$) およびⅢ a-3 ($^{461}\text{Pro} - ^{500}\text{Glu}$) を作成し、その反応性を調べたところ、Ⅲ a-3 に明らかな反応性が認められた (Fig. 5)。これらのタンパクを CNBr 分解、lysylendopeptidase 処理しても抗原性に変化は認められないことから、メチオニンおよびリジン残基は抗原部位に含まれないと推測された。

4. 考 察

I 型コラーゲンは特徴的な (Gly-Pro-X) の繰り返し配列をしている分子量 100kDa の $\alpha 1$ 鎖 2 本と $\alpha 2$ 鎖 1 本が

三重ヘリックスを構成しており、コラーゲンに特異的なアミノ酸である Hydroxyproline, Hydroxylysine は、コラーゲンの高次構造の安定化に寄与している。これらの構造は動物種をこえて広く保存されており、ウシとヒトとの相同性は $\alpha 1$ 鎖で 98%、 $\alpha 2$ 鎖で 93% と高く、コラーゲンの免疫原性は非常に低いと考えられてきた。しかし、近年コラーゲンのヘリックス構造を認識し、種特異性を示すモノクローナル抗体のエピトープが明らかとなり、コラーゲンも免疫原性は高いことがわかった⁷⁾。今回ゼラチンアレルギーの抗原物質がウシ I 型コラーゲンであり哺乳動物のコラーゲンと共通の抗原性を保持していること、さらに I 型コラ

Table 2 Reactivity of anti-gelatin IgE to recombinant proteins for $\alpha 2$ chain of bovine type I collagen.

Child no.	Type I collagen (FU)	Recombinant proteins of $\alpha 2$ chain				
		I 1N-224	II 213-417	III 418-662	IV 663-890	V 879-15C
1	2600	-	-	+	++	-
2	1019	-	+++	++	-	-
3	2800	-	-	+++	-	±
4	1773	-	±	+++	-	±
5	868	-	±	+++	-	±
6	2116	-	-	+++	±	±
7	772	-	+++	±	+	+++
8	1494	-	-	+++	-	-
9	814	-	+	+	-	-
10	2179	-	++	-	-	-
11	834	-	-	+++	+	-
12	1947	-	-	+	±	-
13	1833	-	-	+++	-	-
14	1152	-	+	+	±	±
15	2455	-	±	+++	-	-
16	1820	-	+	+	+	±

The results are expressed as a percentage of the binding of IgE to each recombinant proteins compared with that to bovine type I collagen: +++ $\geq$ 75%, 75% $>$ ++ $\geq$ 50%, 50% $>$ + $\geq$ 25%, 25% $>$ ± $\geq$ 5%, - $<$ 5%

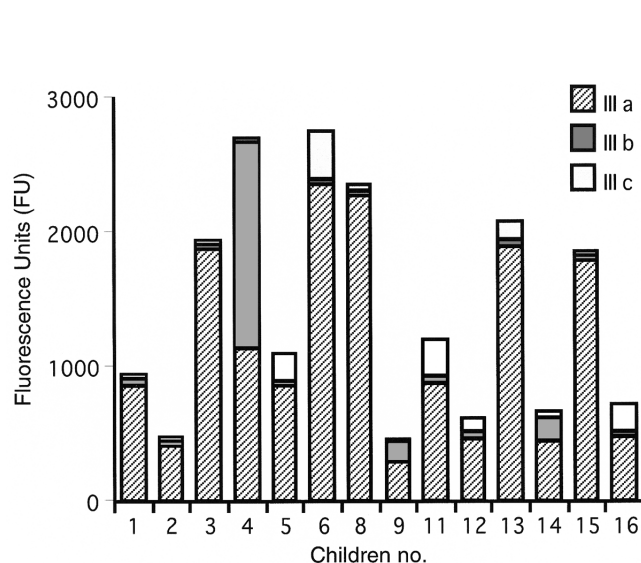


Fig.4 Reactivity of the sera from children with systemic allergic reaction to recombinant proteins of ^{418}Gly to ^{675}Ser in bovine $\alpha 2$ (I) chain. III a, $^{418}\text{Gly} - ^{510}\text{Ala}$; III b, $^{491}\text{Leu} - ^{598}\text{Pro}$; III c, $^{578}\text{Leu} - ^{675}\text{Ser}$

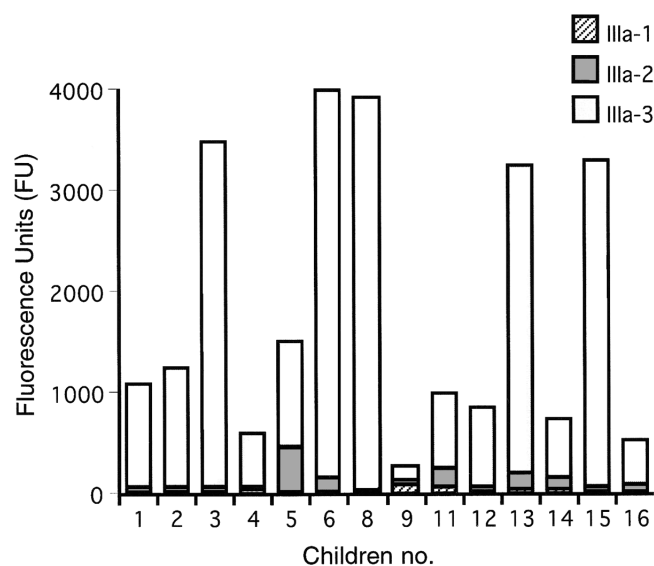


Fig.5 Reactivity of the sera from children with systemic allergic reaction to recombinant proteins of ^{408}Leu to ^{500}Glu in bovine $\alpha 2$ (I) chain. III a-1, $^{408}\text{Lys} - ^{444}\text{Gly}$; III a-2, $^{431}\text{Ala} - ^{475}\text{Gly}$; III c, $^{461}\text{Pro} - ^{500}\text{Glu}$

ーゲンの2本の分子鎖 ($\alpha 1$ 鎖および $\alpha 2$ 鎖) のうち $\alpha 2$ 鎖に特異性があり、一次構造を認識していることが判明した^{8), 9)}。さらに $\alpha 2$ 鎖の部分組み換えタンパクを作成し、その抗原性を調べたところ、すくなくとも4個所の抗原性部位がみとめられた。さらにエピトープは主要な反応性を示すⅢ (⁴¹⁸Gly - ⁶⁶²Pro) のうちⅢ a-3 (⁴⁶¹Pro-⁵⁰⁰Glu) の40残基にあり、さらにオーバーラップしているアミノ酸配列を除くと⁴⁷⁵Gly-⁵⁰⁰Gluの25アミノ酸残基配列中に局在することを明かにした (Fig. 6)。またヒトと異なるアミノ酸配列部位を考慮すると、Ⅱでは²⁷¹Gly-³⁰⁰Ala近傍に、Ⅲ aでは⁴⁶⁷Leu-⁵⁰⁰Glu近傍にウシゼラチンアレルギー抗体IgEの結合部位が局在すると推測され (Fig. 6)、上記の組み換えタンパクを用いた抗原部位の検索結果と一致した。本実験はバクテリアでの発現系であることから、前述のコラーゲン特異的なアミノ酸 (Hydroxyproline, Hydroxylysine) の水酸化とその糖付加修飾は行なわれていないにもかかわらず、組み換えタンパクとの反応性が認められた。したがって、コラーゲン特異的なアミノ酸は抗原決定部位には関与していないことを示唆しているが、詳細は動物細胞培養系にて修飾された融合タンパクを作製し、アレルギー患者血清中IgEのエピトープを系統的に分析する系を確立する必要がある。今後アレルギー性のないコラーゲンの開発には本研究により特定されたエピトープのアミノ酸配列を参考にし、感受性の高いプロテアーゼ処理によりアレルギー性

を減弱させる方法を検討中である。

(参考文献)

- 1) Sakaguchi M., Ogura H., and Inoue S.: IgE antibody to gelatin in children with immediate-type reactions to measles and mumps vaccines. J. Allergy and Clinical Immunology. 96, 563-565, 1995.
- 2) Kelso J.M., Jones R.T. and Yunginger J.W. Anaphylaxis to measles, mumps and rubella vaccine mediated by IgE to gelatin. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 91, 867-872, 1993.
- 3) Miller E.J. and Rhodes R.K., Preparation and characterization of the different types of collagen. Methods Enzymol., 82, 33-64, 1982.
- 4) Piez K.A., Eigner E.A., Lewis M.S., The chromatographic separation and amino acid composition of the subunits of several collagens. Biochemistry, 2, 58-66, 1963.
- 5) Shirai T., Hattori S., Sakaguchi M., et al: The complete cDNA coding sequence for the bovine pro $\alpha 2$ (I) chain of type I procollagen. Matrix Biology, 17, 85-88, 1998.
- 6) Sakaguchi M., Toda M., Ebihara T., Irie S., Hori H., Imai A., Yanagida M., Miyazawa H., Ohsuna H.,

Bovine	SGPVGPPGNP	II	GANGLPGAKG	AAGLPGVAGA	PGLPGPRGIP	GPVGAAGATG	250
Human			T			P T	
Bovine	ARGLVGEPGP		AGSKGESGNK	GEPGA	VGQPG	PPGPSGEEGK	RGSTGEIGPA 300
Human				SA PQ		PN A S	
Bovine	GPPGPPGLRG		NPGSRGLPGA	DGRAGVMGPA	GSRGATGPAG	VRGPNGDSGR	350
Human			S		S	A	
Bovine	PGEPLMGPR		GFPGSPGNIG	PAGKEGPVGL	PGIDGRPGPI	GPAGARGE	EPG 400
Human			L			V	
Bovine	NIGFPGPKGP		SGDPGKAGEK	GHAGLAGARG	APGPDGNGA	QGPPGLQGVQ	450
Human			T			P	
Bovine	GGKGEQGPAG		PPGFQGLPGP	AGTAGEAGKP	GERGIPGEFG	LPGPAGARGE	500
Human				S P V	LH	P	
Bovine	RGPPGESGAA		GPTGPIGSRG	PSGPPGPDGN	KGEPGVVGAP	GTAGPSGPSG	550
Human					V		
Bovine	LPGERGAAGI		PGGKGEKGET	GLRGDIGSPG	RDGARGAPGA	IGAPGPAGAN	600
Human				P E N	H V	T	
Bovine	GDRGEAGPAG		PAGPAGPRGS	PGERGEVGPA	GPNGFAGPAG	AAGQPGA	KGE 650
Human			A				
Bovine	RGTKGPKGEN		GPVGPTGPVG	AAGPSGPNGP	PGPAGSRGDG	GPPGATGFPG	700
Human			G V	A		M	

 Putative amino acid sequence of epitope

Fig.6 Amino acid sequence in bovine $\alpha 2$ chain of putative epitope for specific IgE antibody from children with anaphylaxis to vaccines.

- Ikezawa Z, Inouye S.: IgE antibody to fish gelatin (type I collagen) in patients with fish allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106, 579-584, 2000
- 7) Hori H., Keene D. R., Sakai L. Y., et al: Repeated helical epitopes of defined amino acid sequence in human type III collagen identified by monoclonal antibodies. *Molecular Immunology*, 29, 759-770, 1992.
- 8) Sakaguchi M., Hori H., Ebihara T., et al: Reactivity of the IgE in bovine gelatin-sensitive children to gelatins from various animals. *Immunology* 96, 286-290, 1999.
- 9) Sakaguchi M., Hori H., Hattori S., et al: IgE reactivity to $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of bovine type I collagen in children with bovine gelatin allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104, 695-699, 1999.

皮膚色素性病変の新しい診断法の開発

北海道大学大学院 医学研究科皮膚粘膜病学分野

松 村 哲 理

The management of skin pigmentation is an important field in cosmetology. Usually, management of pigmentation in cosmetology deals with benign skin conditions like lentigines, freckles, and post-lesional pigmentation. Among these benign pigmentary conditions, one must differentiate malignant lesions such as melanomas. Early diagnosis of melanoma is important because advanced melanoma has poor prognosis. Recently, our group developed a personal computer-based three-dimensional (3D) reconstruction system, which can visualize 3D structure of dermatopathological specimens. In this report, I employed this method to a pigmentary skin lesion, nevus pigmentosus, combined with clinical detailed observation of the lesion by digital microscopy, to investigate if this method is useful in the diagnosis of pigmentary lesions. Thirty serial sections from each block were stained with H&E. Serial images were registered using a graphics program Photoshop. After extracting the region of interest, three-dimensional images were projected using NIH-Image program. Biopsy specimens obtained from normal shoulder skin showed net-like structure of rete ridges and dermal papillae fit to each opening of the net, and biopsy specimens from normal palmar skin showed wide incurved structure of epidermis, which corresponded to the skin surface creases. In nevus pigmentosus of the sole, dermoepidermal junction area was irregularly depicted corresponding to the presence of junctional nevus cell nests. Relationship between the distribution of nevus nests and surface structure of the epidermis was also visualized. Further study is now under investigation to show the relationship between detailed clinical observation with digital microscopy and the histological three-dimensional structures of nevus pigmentosus.

1. 緒 言

コスメトロジー分野において、いわゆる「シミ・そばかす」などの皮膚色素性病変への対応は大きなテーマの一つである。しかし、一口に色素性病変といっても、その中には色素性母斑、肝斑や老人性色素斑などの良性病変に混じって、皮膚メラノーマという悪性病変があることを忘れてはならない。

皮膚メラノーマは、最も悪性度の高い悪性腫瘍の一つである。オゾン層の破壊などに伴う紫外線量の増加がメラノーマの発生頻度を高める可能性が指摘されており、実際、近年増加傾向にある。進行したメラノーマは外科的切除・化学療法・放射線療法などあらゆる治療を尽くしても治癒させることは困難であり、現在のところ、早期発見・早期治療が最善の治療手段である。早期メラノーマであれば、十分な外科的切除により治癒させることが可能であり、実際当施設では5年生存率は100%となっている。

メラノーマの早期診断のためには、臨床的像と病理組織学的所見を加味して総合的に診断することが必要であるが、病理組織標本は臨床像の一部分の断面を見るという性格上、臨床像との関連が十分検討できず、臨床像へのフィ

ードバックが十分に得られていなかったという問題があった。

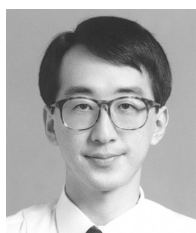
発疹の臨床像については、近年デルマトスコプやデジタルマイクロスコープなど、病変をより詳細に観察できる手段が得られるようになってきており、その有用性も報告されてきている^{1) 2)}。

病理組織学的手法については、臨床像の一部分の断面しか見られないという点を克服するためのひとつの試みとして、我々はコンピューターを用いた三次元再構築法を開発した³。これまでも三次元再構築の試みはあったが、これらの報告では専用の三次元再構築システムを用いており、どこの施設でも手軽に行えるものではなかった^{4) - 6)}。そこで、我々は一般的に手に入るパーソナルコンピューターおよび汎用グラフィックソフトを用いて三次元再構築を行った。この方法を用いると、通常の病理組織では二次元の断面としてしかとらえられない病変を、比較的容易な手順で三次元的にとらえることができる。

そこで、メラノーマの診断にこの方法を応用し、デジタルマイクロスコープにより詳細に記録された臨床像と対応させることにより、臨床像と病理組織像のギャップを埋め、より正確な早期メラノーマの診断法を確立しようと考えた。本研究では、足底の色素性母斑の病変について、病理組織学的にみられる母斑細胞巣と、肉眼的に見られる皮膚表面の皮溝との関連を、三次元的に画像化した。

2. 実 験

材料として正常皮膚を含めて切除された色素性母斑の手術標本を用いた。切除前に病変を10～50倍の倍率でデジ



A new method for diagnosis of pigmentary skin lesions.

Tetsuri Matsumura

Department of Dermatology, Hokkaido University
Graduate School of Medicine

タルマイクロスコープ（キーエンス社 VH-6300）に記録した。切除標本は型通りホルマリン固定、パラフィン包埋し、厚さ 6 μm の連続切片を 24 ～ 40 枚作成し、H E 染色した。

染色標本の画像をそれぞれデジタルマイクロスコープを用いて JPEG 画像に変換し、パーソナルコンピュータ（アップル社 Power Macintosh G3）に取り込んだ（図 1a）。取り込まれた画像をフォトタッチソフトウェア（アドビ社 Photoshop）の各レイヤーに配置した。隣り合うレイヤーの画像を不透明度 50% で合成し、それぞれの画像の主な部分（画像により表皮真皮境界部、毛包、比較的大きな血管、母斑細胞巣等）が最も一致するように画像を動かして位置あわせ（registration）を行った（図 1b→c）。この方法では Z 方向の完全な alignment は保証されないが、様々な方向に変化する主な部分を最も一致するように registration するため、Z 方向が大きくずれる可能性は低い。さらに、各画像を自動レベル調整した後に一定量のぼかしを入れ、自動選択ツールを用いて表皮を選択し切り出した（図 1d）。切り出した表皮を白に、その他の部分を黒に塗り、画像をモノクロ 2 階調に変換した（図 1e）。次に、それぞれの画像をパブリックドメインの画像解析ソフトウェア（NIH-Image : developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>）に読み込み、projection により三次元画像を作成した（図 1f）。パラメーターとしては以下のものを用いた

; slice spacing, 2.0; initial angle, 0; rotation angle increment, 5; lower transparency bound, 0; upper transparency bound, 254; surface opacity, 0; surface depth-cueing, 100; interior depth-cueing, 50; axis of rotation, x-axis; projection method, nearest point。

また、凍結標本から連続切片を作成し、その連続切片に対して S-100, HMB45, PCNA, Ki-67, CD34, CD35 に対する免疫染色および TUNEL 法によるアポトーシスの検出を試み、陽性細胞分布の三次元再構築を試みた。

3. 結 果

まず、正常皮膚の表皮真皮境界部の三次元画像化を行った。肩の正常部では、網状の形態をとる表皮突起と、その網の孔の部分に一致する真皮乳頭の形態を三次元的に画像化することができた（図 2a）。一方、手掌の皮膚では、表皮側が溝になっている部分では表皮真皮境界部も真皮側に凹になっており、表皮真皮境界部の形態が表皮の表面側の皮野・皮溝の構造と対応する様子が画像化できた（図 2b）。

次に、同様の方法を用いて、足底の色素性母斑の三次元再構築を行った。この方法では、表皮のコントラスト差を用いて表皮を切り出すため、色素性母斑の母斑細胞巣は真皮側として認識される（図 3a）。表皮側を真皮側から見ると、母斑細胞巣が入り込んでいるため、真皮表皮境界部は不規則になっている（図 3b）。真皮側を見ると、この部分で

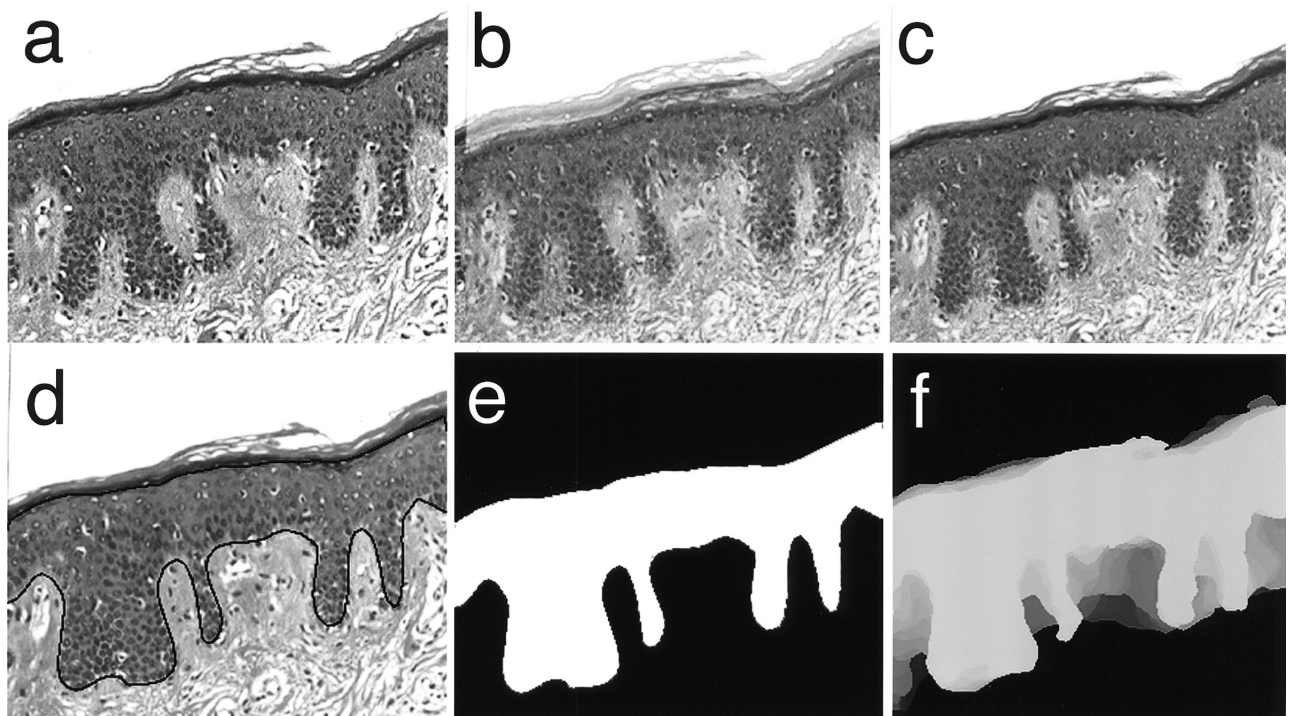


図 1 三次元再構築の方法

連続切片の画像をそれぞれコンピュータに取り込む（a）。隣り合う画像を不透明度 50% で合成し、それぞれの画像の主な部分が最も一致するように画像を動かして 置あわせを行う（b→c）。さらに、自動選択ツールを用いて表皮を選択し切り出す（d）。切り出した表皮を白に、その他の部分を黒に塗り、画像をモノクロ 2 階調に変換する（e）。最後に、それぞれの画像を NIH-Image に読み込み、三次元画像を作成する（f）。

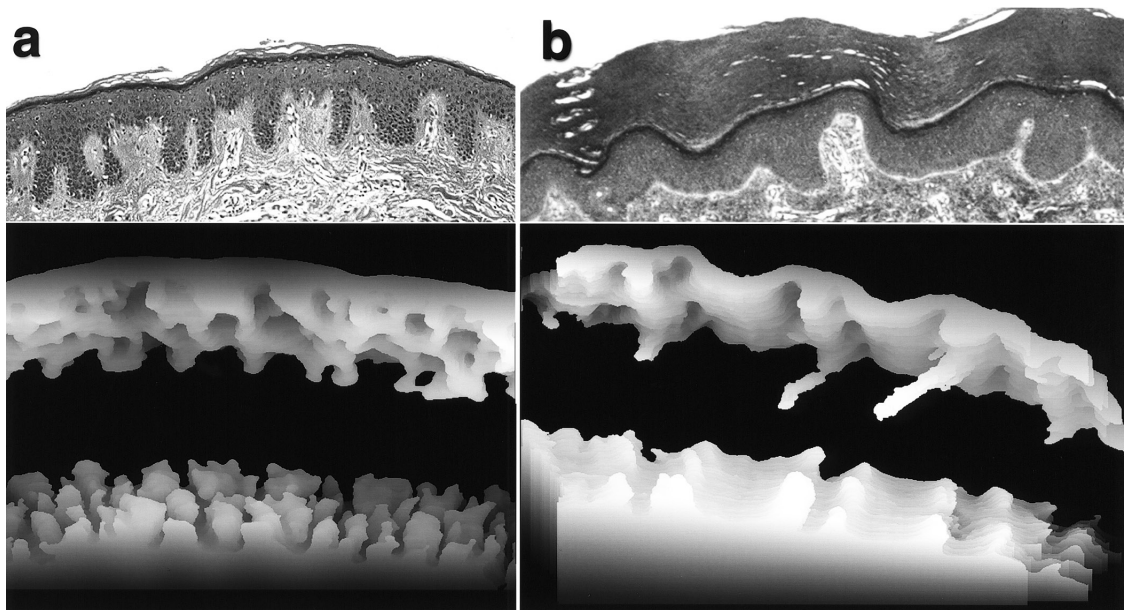


図2 三次元再構築の例

a) 肩の正常皮膚。網状の形態をとる表皮突起と、その網の孔の部分に一致する真皮乳頭の形態が三次元的に示されている。b) 手掌の皮膚。表皮真皮境界部の形態が表皮の表側の皮野・皮溝の構造と対応している様子が画像化されている。

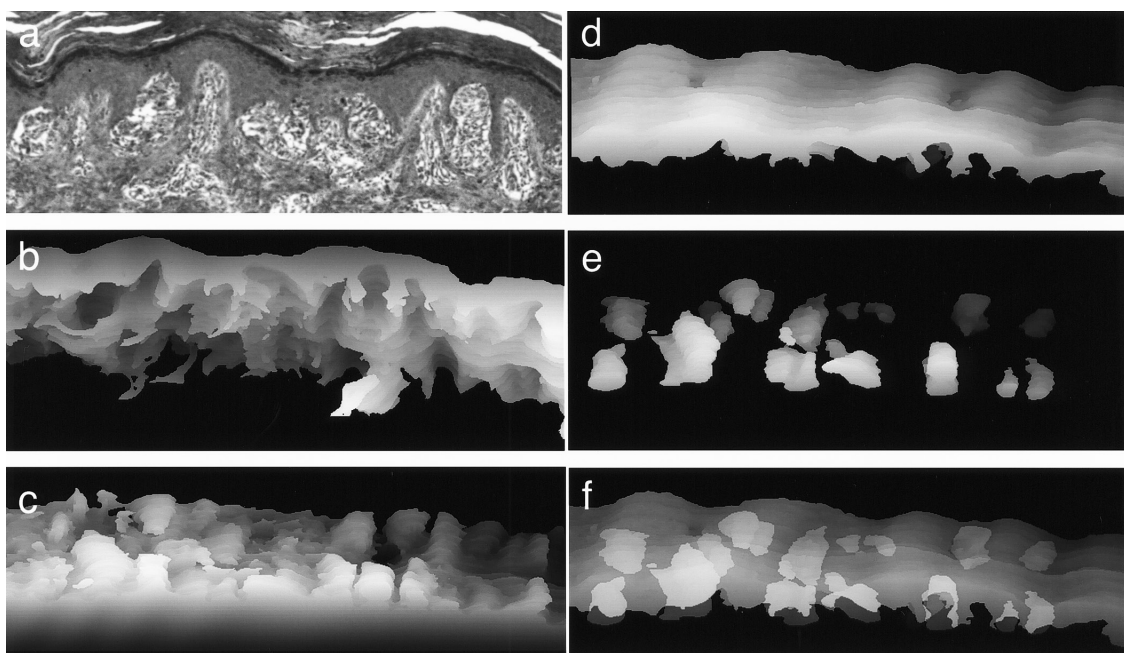


図3 色素性母斑の三次元再構築像

再構築した色素性母斑のH E像 (a)。表皮を真皮側から見た画像 (b) および真皮側の画像 (c) のみでは、母斑細胞巢の分布にははっきりとした規則性を見ることは難しい。しかし、表皮側を上から見た画像 (d) に、母斑細胞巢だけを切り出した画像 (e) を重ねると、主に皮溝の部分に沿って母斑細胞の細胞巢が分布していることがわかる (f)。



図4 色素性母斑のデジタルマイクロスコープ像

は母斑細胞巢の分布にははっきりとした規則性を見ることは難しかった(図3c)。そこで、表皮側を上から見た画像(図3d)に、母斑細胞巢だけを切り出した画像(図3e)を重ねてみたところ、表皮を表面から見た皮野・皮溝の状態と母斑細胞巢分布の関連がわかるようになった(図3f)。この方法により、部分的に例外はあるものの、主に皮溝の部分に沿って母斑細胞の細胞巢が分布していることがわかり、皮膚の表面構造と母斑細胞巢の分布に関連を見ることができた。

免疫染色標本については、多くの正確な連続切片を得ることが難しく、現在までのところ満足のいく画像は得られていない。切片の変形が少なく、脱落しにくく、染色が一定の条件で行えるような技術的な問題の解決が必要と考えられた。

4. 考 案

本研究では、病理組織の三次元再構築という方法を用いた。本法を用いると、通常は二次元の断面でしか見られない病理組織切片を、連続切片からの画像をコンピューター処理することにより、三次元形態として観察することができる。例えば、通常の二次元の切片では、表皮突起は真皮乳頭と同様に「突起」として捕らえられるが、三次元再構築することにより表皮突起は「突起」ではなく、網状の「稜」であり、表皮稜という言葉が正しいことを画像として示すことができる。

今回は、この方法を色素性母斑に応用した。色素性母斑はメラノーマとの鑑別が問題になることがあり、臨床所見上の鑑別点として、対称性、境界、色調、大きさ等が参考になるとされているが、中には肉眼的な臨床所見だけでは鑑別の難しい症例もあり、非侵襲的でより精度の高い鑑別法が必要とされている。最近では、色素性病変の臨床的な鑑別に、デルマトスコープやデジタルマイクロスコープなどの機器が応用されるようになってきており、その有用性が報告されている^{1) 2)}。将来的にこれらの方法が一般的に臨床に応用されるようになれば、色素性病変の鑑別はより精度の高いものになることが期待される。その際には、臨床的な所見と、病理学的所見の相関関係を明らかにすることが必要不可欠である。

本研究では、病理組織の三次元再構築法を色素性病変に応用することにより、色素性母斑の母斑細胞巢が、主に皮溝の部分に存在することを示すことができた。デジタルマ

イクロスコープで色々な色素性母斑を観察すると、色の付いた部位が皮膚表面構造と関連している様子がしばしば観察される(図4)。このような関連性が色素性母斑とメラノーマの鑑別に有用であるという報告があり⁷⁾、デジタルマイクロスコープで観察した臨床上的特徴が、組織学的にどのように関連しているかをとらえることは、興味のある研究テーマであると考えられる。今後は症例を増やし、デジタルマイクロスコープによる画像と、組織学的三次元再構築法を組み合わせ、病理と臨床のギャップを埋め、色素性病変の診断への応用へと発展させたいと考えている。

(文献)

- 1) Kittler H, Selteneim M, Dawid M et al. Morphologic changes of pigmented skin lesions: a useful extension of the ABCD rule for dermatoscopy. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 558-62.
- 2) Carli P, de Giorgi V, Palli D et al. Preoperative assessment of melanoma thickness by ABCD score of dermatoscopy. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 459-66.
- 3) Matsumura T, Sato-Matsumura KC, Yokota T et al. Three-dimensional reconstruction in dermatopathology - A personal computer-based system. *J Cutan Pathol* 1999; 26: 197-200.
- 4) Nakayama M, Takahashi H, Okamoto M et al. Three-dimensional computer-reconstructed image for studying cancer extension within the hypopharynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 117: 764-8.
- 5) Griffini P, Smorenburg SM, Verbeek FJ et al. Three-dimensional reconstruction of colon carcinoma metastases in liver. *J Microsc* 1997; 187: 12-21.
- 6) Bacharach-Buhles M, el Gammal S, Panz B et al. In psoriasis the epidermis, including the subepidermal vascular plexus, grows downwards into the dermis. *Br J Dermatol* 1997; 136: 97-101.
- 7) Oguchi S, Saida T, Koganehira Y et al. Characteristic epiluminescent microscopic features of early malignant melanoma on glabrous skin. A videomicroscopic analysis. *Arch Dermatol* 1998; 134: 563-8.

A、B 領域紫外線の直接照射により SCID マウス移植ヒト皮膚に誘発される遺伝子変異とその予防

大阪大学 医学部

本 行 忠 志

To study the mechanism and risk of human skin cancer from solar light, we exposed human skin transplanted to severe combined immunodeficient mice to daily doses of UVA and UVB (dose rate of 2.8 J/m²/sec) for period of approximately 2 years and investigated morphological and genetic changes of human skin tissues. Of 18 normal skins, 14 actinic keratoses (77.8%) and 4 skin cancers (3 squamous cell carcinomas and 1 undifferentiated carcinoma) developed, whereas neither actinic keratosis nor cancer was observed in 15 human skins not exposed to UVA and B. This is the first success in inducing cancer and solar (actinic) keratosis in human skin by UVA, B.

Among p53 mutations at various sites, mutation at codon 242 (cTGC → cCGC; Cys → Arg) was specifically observed in both skin cancers and actinic keratoses. Furthermore, double or triple mutations were induced in all UVA, B-induced skin cancers and in three of eight actinic keratoses. As well as p53 mutations, 2 of 3 squamous cell carcinomas had also K-ras and c-kit mutations. So far as we know, c-kit mutation has not been reported in the skin cancer except melanoma. Mutations of β-catenin gene occurred in 7 human skins, but these were non-specific mutations.

1 緒 言

ヒト発がんの実験的研究は、限られた、あるいは不自然な条件下（ヒト培養細胞、動物実験など）でしか成され得なかった。現在米国で使われている T 細胞、B 細胞の欠損した SCID (Severe Combined Immunodeficiency) マウスは、若年で白血病を多発し（約 30%）、また、T、B 両細胞ともに一部正常に戻ってしまうため（約 30%）、マウス皮膚の allograft すら生着しにくいことがわかっている。野村らは、1986 年より IgG、IgM が検出限界以下の C.B17-scld マウスを 20 代以上 Selective Inbreeding (ホモ交配) した改良 SCID マウスに、最も観察の容易なヒト正常皮膚を移植し、長期間にわたり太陽紫外線類似の A、B 領域紫外線 (UVA, UVB) を連日照射したところ、ケラトーシスが高率にヒト皮膚に発生し、1～2 年間の連日照射により、ヒト皮膚がんを世界で初めて実験的に誘発するのに成功した¹⁾。

また、本行らは、放射性同位元素を使わず、従来の方法に比べ、迅速・簡便・高感度・安価に遺伝子変異を検出し得る独創的な Cold SSCP 法を開発しており²⁾、キャピラリーシーケンサーと共に普通の実験室で容易に遺伝子変異解析が可能となっている。

本研究では、ヒト皮膚組織移植 SCID マウスを用い、UVA, B によりヒト皮膚に誘発された全ての突然変異のシーケンシングを行い、UV 照射、時間的変化、病理組織学的経過

との相関を解析することにより太陽紫外線によるヒト皮膚に実際に誘発される障害を確証した。また、これまで考えられなかった新しい観点からヒトの前癌病変から癌に至る特性とその悪性化機構を明らかにすることを目的とした。

2 実 験

2.1 ヒト正常皮膚の継代・維持

ヒト正常皮膚は、大阪大学附属病院およびその関連病院の外科、皮膚科、泌尿器科および神戸大学大学附属病院皮膚科において、乳がん患者、包茎患者および老人性角化症患者の手術切除片で廃棄されるものを了解を得て用いた。ヒト正常皮膚は、我々の改良 C.B17/N-scld に加え、我々の作成した C3H/HeJ/N-scld を用い、ヒト正常皮膚のより健全な継代・維持を行った。

2.2 A、B 領域紫外線 (UVA, B) 照射

TOSHIBA 健康ランプ FL-20 S.E (20W) 4 本を用い、Kodacel TA407 (Eastman 社) にて 290nm 以下の波長の紫外線を全面的にカットし、地上に到達する太陽光と類似させた。月、水、土曜日に 8000 J/m²、火、木、金、日曜日に 2000 J/m² を線量率約 2.8 J/m²/sec で照射した。

2.3 病理組織学的検索

ヒト正常皮膚を改良 SCID マウスに移植し、UVA, B 照射を行い、継代移植時に biopsy をとり、パラフィン包埋切片の H-E 染色にて病理組織学的検索を行った (Fig. 1 参照)。

2.4 遺伝子変異検索

パラフィン包埋切片あるいは凍結保存サンプルより DNA 抽出を行い PCR-Cold-SSCP 法^{2) 3)} (Fig. 2 参照)、Direct sequence 法により、p53, K-ras および c-kit 遺伝子



Gene mutations induced by UVA, B light in human skin maintained in severe combined immunodeficient mice

Tadashi Hongyo

Department of Medical Genetics and Radiation Biology, Osaka University, Graduate School of Medicine.

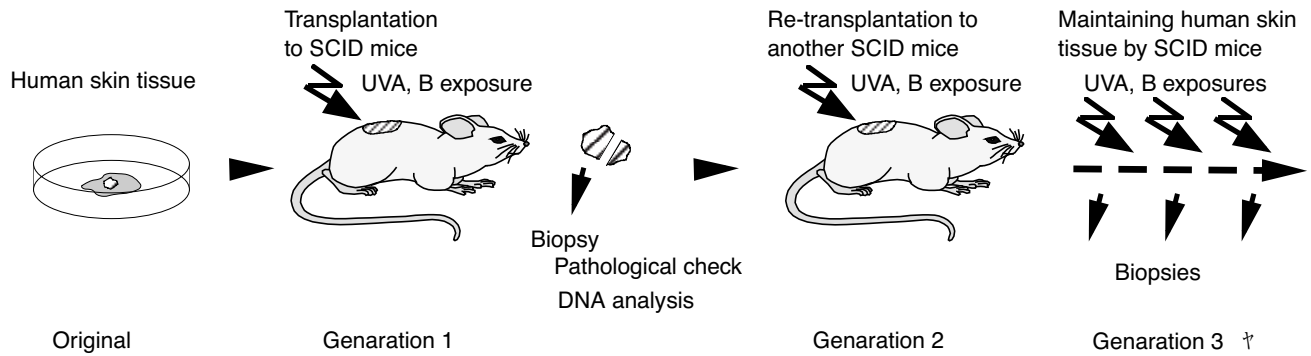
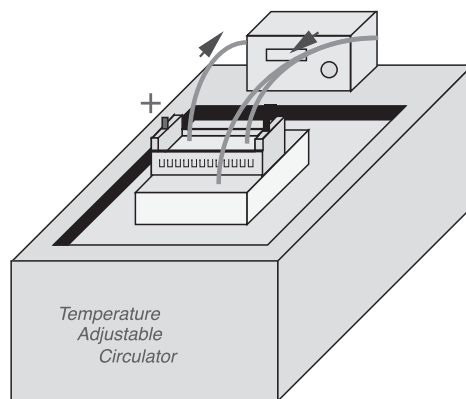


Fig. 1 Human skin transplantation to SCID mice and UVA, B exposure



PCR product	5.0 μ L
15% Ficoll	3.0 μ L
1 M MMH (CH_3HgOH)	0.2 μ L
1X TBE	11.8 μ L
Total	20.0 μ L

18% gradient TBE mini-gels
300 V for 1-2 hrs.
Ethidium bromide staining 20 min,
destaining for 5 min.

Fig. 2 Cold-SSCP Method

の変異を経時的に検出し、紫外線によるヒト皮膚のケラトーシス、皮膚がんへの進行過程での関与を調べた。*p53*, *K-ras*, *c-kit* および β -*catenin* 遺伝子増幅に用いたプライマーを Table 1 に示した。

2.5 皮膚がん高発疾患患者の皮膚の継代・維持

各種皮膚がん高発疾患患者の皮膚（ケラトーシス、色素性乾皮症他）の継代・維持を行い、UVA、B によるヒト皮膚の DNA 損傷と修復をマウスの身体をかりて明らかにし、ケラトーシス、皮膚がんの誘発状況と遺伝子変異を調べた。

3 結果と考察

3.1 ヒト正常皮膚の継代・維持と UVA, B 照射によるヒト皮膚ケラトーシス、皮膚がんの誘発

改良 SCID マウスへのヒト正常皮膚移植組織の継代・維持は 2 年以上にわたり可能で、ヒト正常皮膚 110 例中 110 例（100%）が改良 SCID マウスに生着した。

UVA, B 照射により、18 例中 14 例に光線角化症（actinic keratosis）が見られ、ケラトーシスを経由して皮膚がんへ進展が 4 例に見られた（扁平上皮がん 3 例、未分化がん 1 例）。

また、ワイルドタイプ CB17+/+ マウスに UVA, B 照射しても皮膚がんは発生しなかったこと、および、ヒト遺伝子プライマーにより PCR 産物がえられたことより、がんはマウス皮膚ではなくヒト皮膚より発生したと考えられる。

3.2 *p53* がん抑制遺伝子の特異的変異

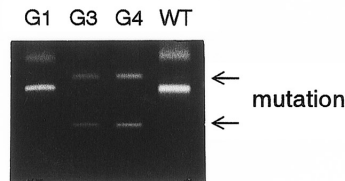
UVA, B 照射により誘発された突然変異の例（Case 5）を Fig. 3 に示した。また、皮膚移植組織の継代移植時の組織および遺伝子変異の経時的变化の一部を Table 2 に示した。誘発されたケラトーシス、皮膚がんでは、*p53* 遺伝子に種々の突然変異が検出されており、そのスペクトラムを Fig. 4 に示した。特に、codon242 に cTGC $\rightarrow$ cCGC transition (Cys $\rightarrow$ Arg) が特異的に誘発されていた。ヒト Psoriasis 皮膚に PUVA 療法 (Psoralen + UVA) を行った際に発生した皮膚がんを高率に *p53* 遺伝子の codon242 に全く同じ突然変異が誘発されていることが報告されており (Nataraj, et al., Invest. Dermatol., 1997)、本実験とよく一致している。codon273 にも変異が多く見られたが UV 照射とは無関係に発生しており、非特異的と思われる。

Table 1 The PCR primer pairs for the amplification of *p53*, *K-ras*, *c-kit* and β -catenin genes.

Genes	Oligonucleotide		Annealing temperature of PCR (°C)	Temperature of SSCP (°C)	Size(base pair)
<i>p53</i>					
exon 5a	5'-TCTGTCTCCTTCCTCTTCCTA-3'	upstream	57	35	155
	5'-CATGTGCTGTGACTGCTTGT-3'	downstream			
exon 5b	5'-TGTGCAGCTGTGGGTTGATTC-3'	upstream	62	25	167
	5'-CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG-3'	downstream			
exon 6	5'-TTGCTCTTAGGTCTGGCCCCCT-3'	upstream	60	35	241
	5'-TAGGGAGGTCAAATAAGCAG-3'	downstream			
exon 7	5'-TGCCACAGGTCTCCCCAAGG-3'	upstream	60	25	234
	5'-AGGGGTCAGCGGCAAGCAGA-3'	downstream			
exon 8	5'-TCTTGCTTCTCTTTTCCTAT-3'	upstream	56	10	188
	5'-CGCTTCTTGTCTGCTTGCT-3'	downstream			
<i>K-ras</i>					
exon 1	5'-CATGTTCTAATATAGTCACA-3'	upstream	48	25	164
	5'-CTCTATTGTTGGATCATATTCGTCC-3'	downstream			
exon 2	5'-ACTGTGTTTCTCCCTTCTCA-3'	upstream	48	5	151
	5'-CACAAAGAAAGCCCTCCCCA-3'	downstream			
<i>c-kit</i>					
exon 11	5'-GATCTATTTTTCCCTTTCTC-3'	upstream	56	20	175
	5'-AGCCCCTGTTTCATACTGAC-3'	downstream			
exon 17	5'-CATGGTCGGATCACAAAGAT-3'	upstream	58	15	167
	5'-ATTATGAAAGTCACGGAAAC-3'	downstream			
<i>β-catenin</i>					
exon 3	5'-GCTGATTTGATGGAGTTGGA-3'	upstream	56	25	227
	5'-GCTACTTGTTCTTGAGTGAA-3'	downstream			

Cold SSCP

p53 Exon 7



G : Generation
WT : Wild Type



Direct Sequencing

G3

p53

Codon 242

TGC→CGC

T G T G T A A C A G T T C C C G C A T G G G C G G C A T G A A C C

20

30

40

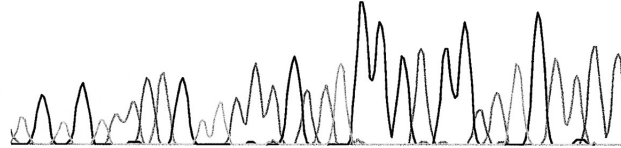


Fig. 3 Cold SSCP and Direct Sequencing of human skin tissue in SCID mouse by UVA,B exposure.

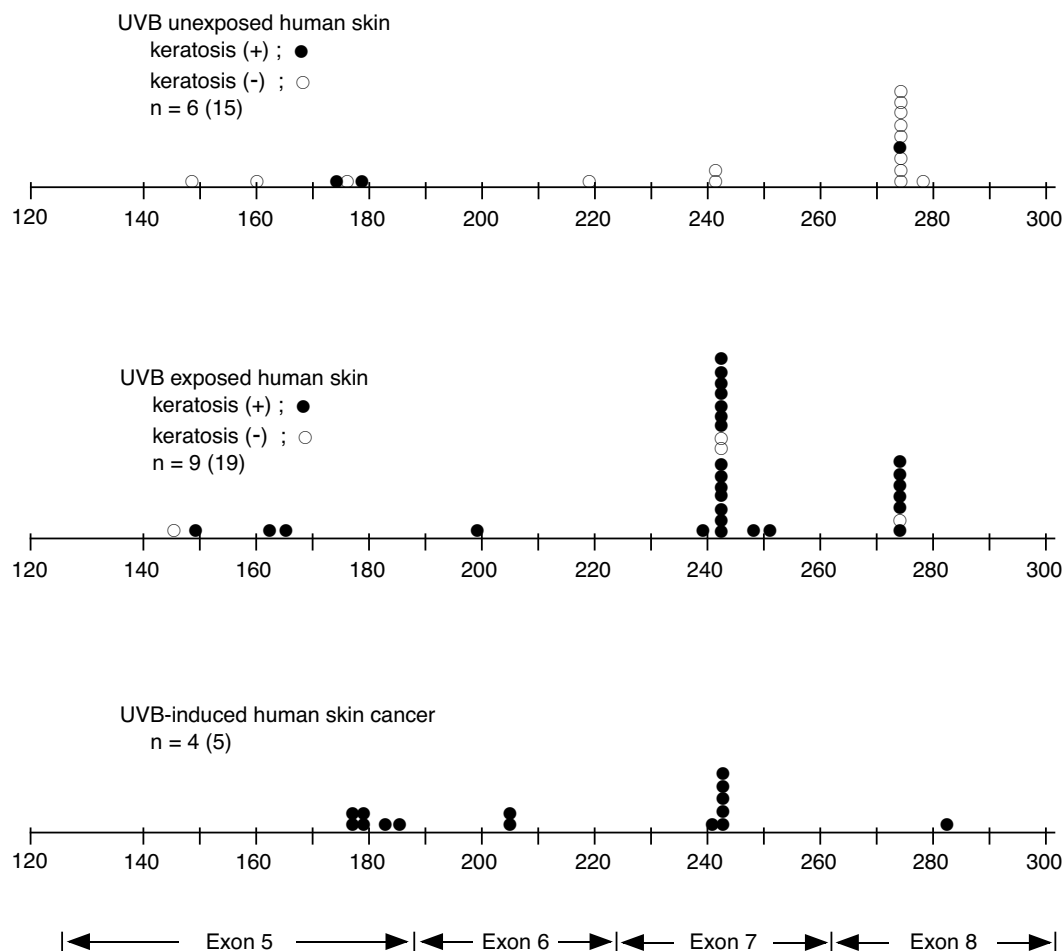


Fig. 4 *p53* mutation spectra of human skin tissue in SCID mice

3.3 UVA, B 照射によるヒト皮膚での *K-ras*, *c-kit* および β -*catenin* 遺伝子の変異

上記 UVA, B 照射ヒト皮膚の凍結サンプルを用い、*K-ras*, *c-kit* および β -*catenin* の変異を調べたところ、*K-ras* codon12 に GGT → GCT transversion が 2 例に起こっており、いずれも UVA, B で誘発した扁平上皮癌であった。*c-kit* codon 561 に GAG → GAA transition が 2 例に誘発されており、これも UVA, B 誘発扁平上皮癌であった。更に、codon559 に GTT → ATT transition が 1 例に認められたが、これは UVA, B 誘発ケラトシス皮膚であった。*c-kit* 遺伝子の変異は間質系、生殖系や血液系の腫瘍で報告されている⁴⁾が、メラノーマを除いた皮膚がんでは見られていない。

従って、UVA, B にて SCID マウスに移植したヒト正常皮膚に誘発したヒト皮膚がんには、*p53* 癌抑制遺伝子の突然変異 (codon242 に加え 2～3 重の変異) に加え、*K-ras*, *c-kit* の突然変異も重複して誘発されていることが新たにわかった。 β -*catenin* の変異も 7 例に見られたが非特異的であった。

3.4 基底細胞癌におけるヘッジホッグシグナルの特異的異常

基底細胞母班症候群の原因遺伝子 PTCH はヘッジホッグ蛋白のリセプターであり、一般人に生じる基底細胞癌においても PTCH の変異が報告されている⁵⁾。PTCH 変異を代表とするヘッジホッグシグナルの異常が PTCH の発現亢進を伴うことを利用して、神戸大学皮膚科で得られた各種のヒト皮膚腫瘍における PTCHmRNA の発現を RT-PCR 法により解析し、その異常の特異性を検討した。その結果 12 例の基底細胞癌全てに高発現を認めたのに対し、他の 24 例の腫瘍 (有棘細胞癌、メラノーマ、ボーエン病、日光角化症など) では 1 例のボーエン病を除いて、発現は低く、ヘッジホッグシグナルの異常は基底細胞癌特異的に生じている可能性が強く示唆された。

3.5 今後の方針

正常 *p53* 遺伝子導入によるヒト皮膚がん遺伝子治療モデルの作成を目的に、紫外線誘発ヒト皮膚がんの培養細胞系

を樹立しおり、皮膚がんの治療のみならず皮膚全体の研究にも役立てたい。

(引用文献)

- 1) Nomura T., Nakajima H., Hongyo T., et al. Induction of cancer, acnetic keratosis, and specific p53 mutations by UVB light in human skin maintained in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.*, 57: 2081-2084, 1997.
- 2) Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, et al. 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single strand conformation polymorphism analyses. *Nucl Acid Res* 21:3637-3642, 1993.
- 3) Hongyo T, Buzard GS, Palli D, et al. Mutations of the K-ras and p53 gene in gastric adenocarcinoma from a high incidence region around Florence, Italy. *Cancer Res* 55:2665-2672, 1995.
- 4) Hongyo T., Li T., Syaifudin M., et al. Specific c-kit Mutations in Sinonasal NK/T-Cell Lymphoma in China and Japan. *Cancer Res.*, 60: 2345-2347, 2000.
- 5) Ahmed, N.U., Ueda, M., Nikaido, O., et al. High level of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine appear in normal human epidermis after a single dose of ultraviolet radiation. *Brit J Dermatol.*, 140:226-231, 1999.

ヒト皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲン遺伝子の 個人依存性発現制御機構

神奈川歯科大学 歯学部口腔生化学

畑 隆 一 郎

Previously we have shown the presence of two polymorphic dinucleotide repeats in the human type I collagen $\alpha 2$ (*COL1A2*) gene, one in the 5' flanking region (upstream repeat) and the other in the 1st intron (1st intron repeat) and that the co-presence of these two repeats stimulates expression of the gene, and a specific haplotype of the two microsatellites of the human *COL1A2* gene correlates with susceptibility to systemic sclerosis.

A major part of the DNA double helix within cells exists in the right-handed B-form conformation. Structural transition from the B-form to the left-handed Z-form DNA at dinucleotide repeats is proposed to play an important role in the transcriptional regulation of various genes.

To investigate the association of the change of higher-order structure such as the transition from the B- to Z-form DNA (*B-Z transition*) with the two repeat regions and its role in transcriptional regulation, we performed two-dimensional (2D) gel electrophoretic analyses of constructs containing or not containing the repeat regions. The results indicated that constructs containing both of the repeats led to a structural transition from B- to Z-form but that the construct lacking either of them did not. Additional 2D gel analyses using several constructs containing either of the two repeats showed that this structural transition occurred only in the upstream repeat, but not in the 1st intron repeat. Total number of supercoil relaxation was measured among the constructs with different combinations of several repetitions of the two repeats. The result supported the idea that B-Z transitions occurred only in the upstream repeat regions. Our findings therefore indicate that the upstream repeat region has the ability to convert its conformation from B- to Z-DNA but that the 1st intron repeats did not, although both of the dinucleotide repeats are indispensable for enhancing transcriptional activity of the *COL1A2* gene.

1 緒 言

我々は先に I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖 (*COL1A2*) 遺伝子の転写性制御領域である遺伝子の 5' 上流及び第一イントロンに 2 つの反復配列を見出し¹⁾、この反復配列の組み合わせにより、*COL1A2* 遺伝子の転写活性が制御されていること²⁾、及び、高い転写促進活性を示す反復配列の組み合わせ (ハプロタイプ) が全身に I 型コラーゲンが異常に蓄積する疾患である強皮症に対する感受性に関与していること³⁾を報告した。本研究ではこの転写制御機構を明らかにするために各種コンストラクトのトポアイソマーを二次元電気泳動法で分離し、転写制御領域の高次構造、特に右巻きの B 型構造から左巻きの Z 型ラセンへの転移を解析した。

2 実 験

2.1 コンストラクトとトポアイソマーの作製

COL1A2 遺伝子の 5' 上流の反復配列 (上流反復配列) 及び第一イントロンの反復配列 (イントロン反復配列) の 2 つの反復配列を含む各種の *COL1A2* 遺伝子コンストラク

トを PCR 法で作製し、塩基配列を確認した (Fig. 1)。これらのコンストラクトの溶液に種々の濃度 (0 ~ 7 μ M) のエチジウムブロミドを添加して負の超ラセンをリラックスした条件でトポイソメラーゼ I で 25°C、16 時間処理した⁴⁾。

2.2 二次元電気泳動によるトポアイソマーの分離

上記の各種コンストラクトのトポアイソマー混合物を精製後、0.7% アガロースゲル、トリス / ホウ酸緩衝液 (TBE) 中で一次元目の電気泳動を 110V で 16 時間行い、ついで 1 μ M のクロロキンで処理しラセンをリラックスさせた後、1 μ M のクロロキン存在下で二次元目の泳動を 100V で 18 時間行った。クロロキンを除いた後、エチジウムブロミドで染色し、写真撮影を行い、二次元電気泳動後のトポアイソマーの移動距離から超ラセン構造を解析した⁴⁾。

2.3 B 型ラセンから Z 型ラセンへの転移の測定⁵⁻⁸⁾

DNA ラセンの B-Z 転移に伴う超ラセンのリラクセーションは以下の式により計算した。

$$i/10.4 + i/12$$

この式で i は反復配列の塩基数、10.4、12 は各々右巻きおよび左巻きラセンの一回転当たりの塩基数を示す。また、B-Z 転移における超ラセン密度は以下の式で算出した。

$$-10.4y/z$$

この式で y は二次元電気泳動の一次元目の泳動で泳動距離のシフトを示したトポアイソマーの番号、 z は用いたコンストラクト (プラスミド) の総塩基数を示す。



Topological analysis of the transcriptional regulatory regions of the human type I collagen $\alpha 2$ chain (*COL1A2*) gene

Ryu-ichiro Hata

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kanagawa Dental College

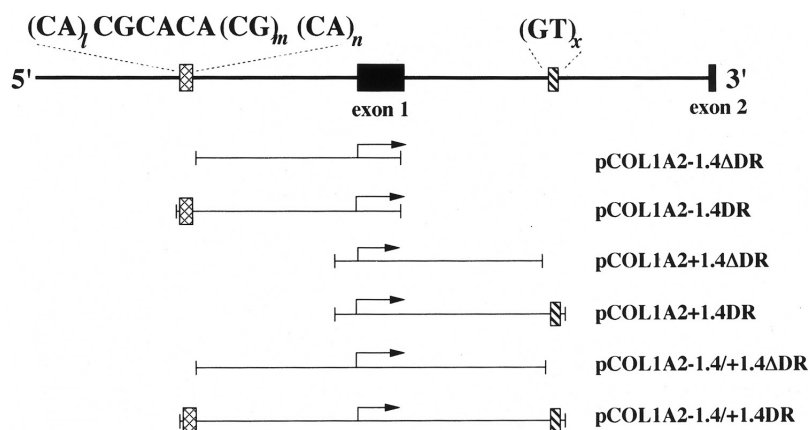


Fig. 1 Schematic diagrams of the 5' region of the *COL1A2* gene (uppermost) and gene fragments (lower diagrams) that were contained in the plasmid clones used for the study. Arrows indicate the transcriptional start site of the gene. Crosshatched and hatched boxes indicate the dinucleotide repeat in the upstream and in the 1st intron of the gene, respectively. Names of plasmid clones containing the DNA fragments are indicated on the right side.

3 結果

3.1 二つの2塩基反復配列を持つコンストラクトの高次構造解析

溶液中で遺伝子 DNA は一般に右巻きラセンの B 型構造をとっている。今回のアガロースゲル二次元電気泳動の解析結果では *COL1A2* 遺伝子の二つの2塩基反復配列を持つコンストラクトでは一次元目の泳動で泳動距離が負に変化する点が検出され (Fig.2A)、反復配列を持たないコンストラクトではこの変化が検出されなかった (Fig.2B)。この結果は少なくとも二つの反復配列を持つコンストラクトには高次構造の異なる (Z 型構造) 領域が存在していることが示された。

3.2 Z 型構造の局在部位の解析

ついで上流反復配列とイントロン反復配列の両者が Z 型構造を形成しているのか、あるいは反復配列のどちらか片方が Z 型構造を形成しているのか、または、Z 型構造の形成に二つの反復配列の共存が必要かを調べるために、各々の反復配列を持つコンストラクト (Fig.3A and 3B)、および反復配列を含まないコンストラクト (Fig.3C and 3D) を作成し、上記と同様に二次元ゲル電気泳動法で高次構造を解析した。その結果、上流の反復配列を含むコンストラクトは一次元目の泳動で泳動距離が負に変化する点が存在し、上流反復配列を含まないコンストラクトではトポアイソマーが連続して分離され、泳動距離の負に変化する点が存在しなかった (Fig.3A and 3C)。これらの結果から上流反復配列が Z 型構造を形成していることが示された。さらに、Z 型構造の形成に二つの反復配列の共存は

必要無いことが判明した。一方、イントロン反復配列を含むコンストラクト及び同様のコンストラクトで反復配列を持たないものは共に泳動距離の負に変化する点が存在せず (Fig.3B and 3D)、イントロン反復配列は同じ条件で Z 型構造を形成しないことが判明した。

3.3 反復配列の長さとの Z 型構造の存在量との関係の解析

さらに、上流反復配列の長さとの Z 型構造の形成能との関係を調べるために、種々の長さの上流反復配列を含むコンストラクトを作成し、上記と同様に二次元電気泳動法で Z 型構造の形成量を調べた。その結果、Z 型構造の形成量は上流反復配列の反復数の総和にのみ比例すること (Fig.4A, 4B and 4C)、また、上流反復配列とイントロンの組み合わせによっては影響されることが判明した (Fig.4C and 4D)。

4 考察

最近 DNA の高次構造が DNA の一次構造 (塩基配列) と同様に生物情報を持っていることが明らかになってきた⁹⁾。我々は先に *COL1A2* 遺伝子上流と第一イントロンに二つの2塩基反復配列が存在し、この二つの反復配列の組み合わせにより *COL1A2* 遺伝子の転写活性が促進されること²⁾、及びこの配列の組み合わせのうち (13,6,8) -12 の組み合わせをホモに持つものは I 型コラーゲン遺伝子の転写活性が促進されている強皮症患者ゲノムにのみ存在し、対照の正常な個体由来のゲノムでは存在しないことを報告した³⁾。そこでこれらの反復配列による *COL1A2* 遺伝子の転写促進機構を明らかにするために二つの反復配列

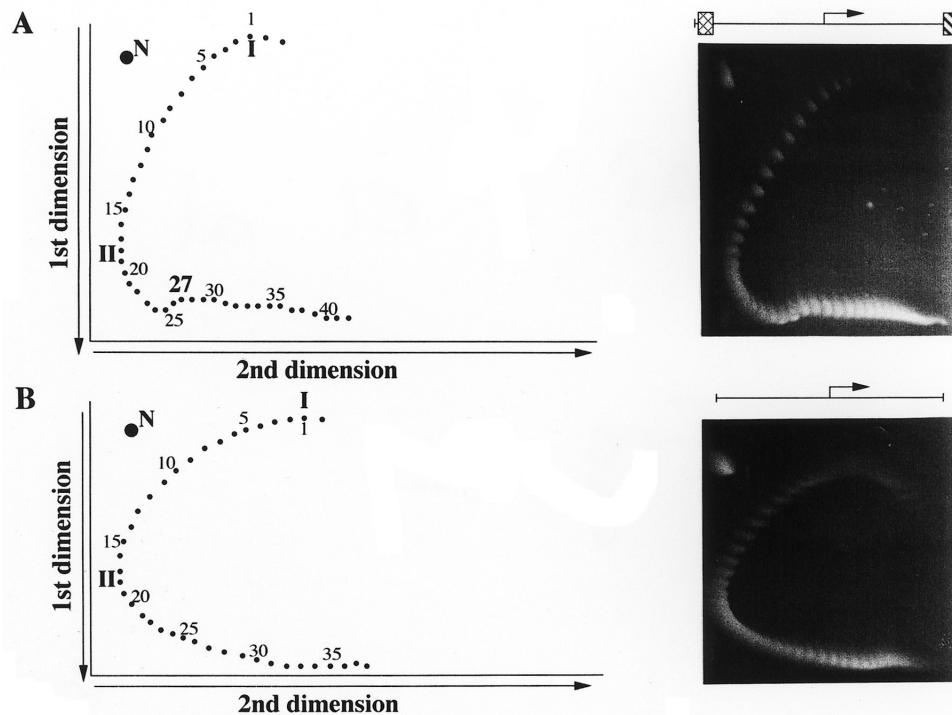


Fig. 2 Two-dimensional gel electrophoresis of topoisomers of pCOL1A2-1.4/+1.4DR, containing (19, 7, 8) of the upstream repeat and $x=12$ of the 1st intron repeat (A), and pCOL1A2-1.4/+1.4 Δ DR, which does not contain either repeat (B). Electrophoretic patterns of the respective plasmids are shown on the right side of the figure, and schematic diagrams of the results, on the left side. The directions of each dimension of electrophoresis are indicated in the figure. Positions I and II correspond to the minima in electrophoretic mobility in the 1st and 2nd dimension, respectively, and relative topoisomer numbers counted from the minima in the first dimension are indicated. N indicates the position of nicked DNA.

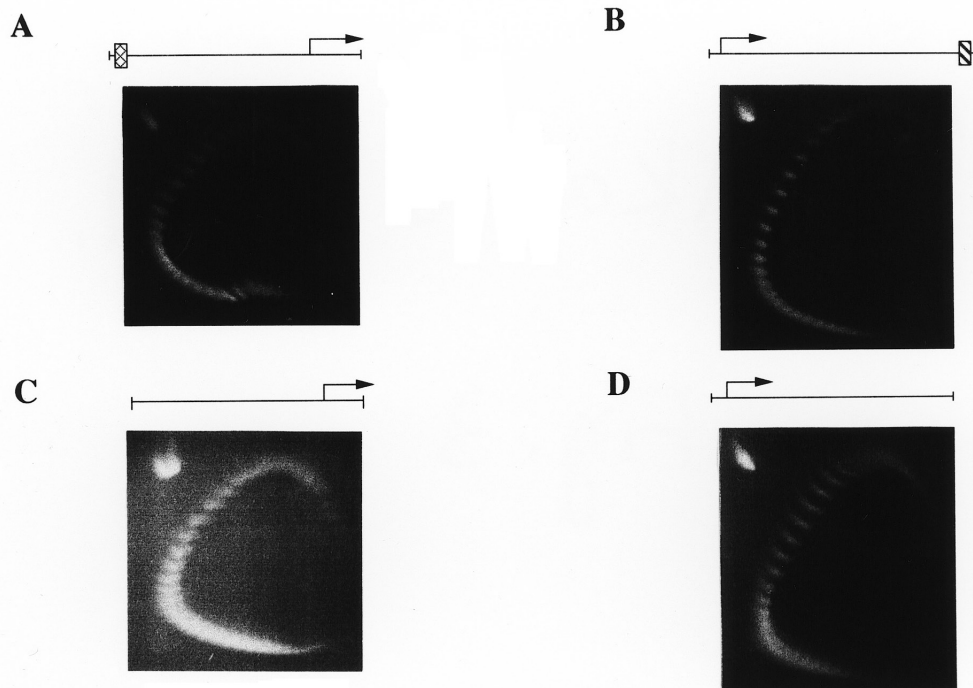


Fig. 3 Two-dimensional gel electrophoresis of topoisomers of pCOL1A2+1.4DR, containing (19, 7, 8) of the upstream repeat (A), pCOL1A2+1.4DR, containing $x=12$ of the 1st intron repeat (B), and those not containing either dinucleotide repeat, pCOL1A2+1.4 Δ DR (C), and pCOL1A2+1.4 Δ DR (D), respectively.

Diagrams shown at the upper part of the respective figures indicate gross structures of *COL1A2* gene segments contained in these constructs. Arrows indicate the transcriptional start site of the gene.

の高次構造を解析した。上流反復配列、イントロン反復配列の両者が塩基配列からはZ型構造を取りうる事が推定されたが、今回の結果は転写開始点の上流のみに左巻きラセンのZ型構造をとった領域が存在することが明らかになった。Z型構造の存在量は上流反復配列の長さに比例することから、反復配列部分がZ型構造をとっていると思われる。B型ラセンからZ型ラセンへの転移においては超ラセン密度の減少を伴い、これは2次元電気泳動の1次元目におけるトポアイソマーの泳動距離の負への変化によって示される。B型ラセンから十字架型構造への高次構造の変化によっても超ラセン密度の減少を伴う。上流反復配列はCG反復配列を含むので十字架型構造を取りうる。十字架型構造をとった時の超ラセンのリラクセーションの総量は $i/10.4$ (i はCG反復配列の長さ)で示される。(19,7,8)-12の反復配列を持つコンストラクトの上流反復配列が十字架型を取るとすると超ラセンのリラクセーションの総量はCG反復配列を構成する塩基が $2 \times 7 = 14$ なので1.35 ($14/10.4$)となる。一方、上流反復配列のみがB型ラセンからZ型ラセンへの転移に起こす際の超ラセンのリラクセーションの総量は13.28 ($74/10.4 + 74/12$, 74は上流反復配列の総塩基数)である。後者の値は2次元電気泳動による超ラセンのリラクセーションの実測値13 (40-27)と一致する (Fig.2A)。この結果から、用いたコンストラクトは上流反復配列がB型ラセンからZ型ラセンへの転移

を起こしたことを支持している。さらに本研究で用いた反復数の異なるコンストラクトの電気泳動における泳動距離の負へのシフトはトポアイソマー番号27で起こっており (Fig.4)、この値からB型ラセンからZ型ラセンへの転移における超ラセン密度はおよそ-0.036 ($-10.4Y/Z$, 4つのコンストラクトでそれぞれ、27/7742、27/7736、27/7732、27/7740)と算出され、これは過去の反復配列による値と一致する⁵⁻⁷⁾。以上の結果は用いたコンストラクトは上流反復配列のみがZ型構造を取っていることを示す。

しかし、本研究の結果で測定したZ型構造の存在量と転写促進活性は単純な比例関係を示さないので、COL1A2遺伝子の反復配列による転写促進活性を制御する因子はDNAのZ型構造以外にも存在することが示された。これらの結果は遺伝子の転写促進において現在の知見では説明できない新しい制御機構の存在を示唆しており、COL1A2遺伝子の研究はこの転写制御の分子機構の研究に好個の材料となるばかりでなく、遺伝子の転写制御と疾患感受性の解明に重要であると考えられる¹⁰⁻¹¹⁾。

(文献)

- 1) Akai J, Kimura A, Arai K, Uehara K, Hata R: Fine structural analysis of the unique 5' region of the human COL1A2 gene containing two regions of dinucleotide repeats adjacent to the transcriptional

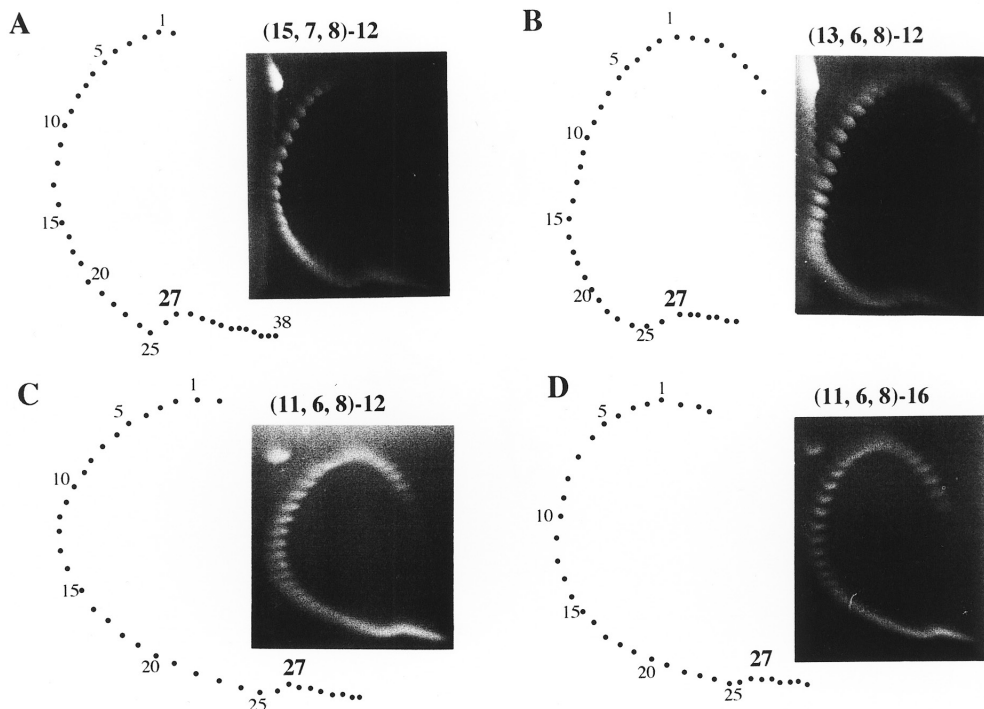


Fig. 4 Two-dimensional gel electrophoresis of topoisomers of pCOL1A2-1.4/+1.4DR, containing the following combination of the repeats: (15, 7, 8)-12 (A), (13, 6, 8)-12 (B), (11, 6, 8)-12 (C), and (11, 6, 8)-16 (D). The left side of each figure shows a schematic diagram, and relative topoisomer numbers from minima of the 1st dimension are also indicated.

- start site. *Connective Tissue* 1998; **30**: 1-6
- 2) Akai J, Kimura A, Hata R: Transcriptional regulation of the human type I collagen $\alpha 2$ (COL1A2) gene by the combination of two dinucleotide repeats. *Gene* 1999; **239**: 65-73.
- 3) Hata R, Akai J, Kimura A, Ishikawa O, Kuwana M, Shinkai H : Association of functional microsatellites in the human collagen $\alpha 2$ chain (COL1A2) gene with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **272**: 36-40.
- 4) Akai J, Kimura A, Hata R: Analysis of the higher-order structure of the two dinucleotide repeat regions that enhance the transcriptional activity of the human type I collagen $\alpha 2$ (COL1A2) gene promoter. *Connective Tissue* 2000; **32**: 259-265.
- 5) Haniford DB, Pulleyblank DE: Facile transition of poly[d(TG)·d(CA)] into a left-handed helix in physiological conditions. *Nature* 1983; **302**: 632-634.
- 6) Rahmouni AR, Wells RD: Stabilization of Z DNA in vivo by localized supercoiling. *Science* 1989; **246**: 358-363
- 7) Peck LJ, Wang JC Energetics of B-to-Z transition in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 6206-6210
- 8) Blaho JA, Larson JE, McLean MJ, Wells RD : Multiple DNA secondary structures in perfect inverted repeat inserts in plasmids. Right-handed B- DNA, cruciforms, and left-handed Z-DNA. *J Biol Chem* 1988; **263**: 14446-14455
- 9) Herbert A, Rich A : The biology of left handed Z-DNA. *J Biol Chem* 1996; **271**: 11595- 11598
- 10) Hata R, Izukuri K, Furue M, Kato Y, Koshika S : Complex gene diseases of the connective tissue. *Connective Tissue* 2001; **33**:9-16
- 11) 畑 隆一郎 I 型コラーゲンの遺伝子多型と結合組織の複合遺伝子病 *細胞工学* 2001; **20**: 592-598

皮膚保護作用を有するセラミドの生理作用発現機構に関する研究

東北大学大学院 薬学研究科

中 畑 則 道、大 久 保 聡 子

It is well known that ceramide forms corneocyte lipid-bound envelop in skin to protect from external stimuli. In order to clarify the other physiological role of ceramide, neurotrophic factor biosynthesis and secretion from Swiss 3T3 fibroblasts were examined. C-2 ceramide and C-6 ceramide potently augmented the secretion of neurotrophic factors from 3T3 cells, determined by the differentiation of PC-12 cells when they were cultured under the conditioned medium of 3T3 cells with the ceramides. Sphingomyelinase and phosphatidylcholine-specific phospholipase C, which produce endogenous ceramides, also elicited the secretion of neurotrophic factors from 3T3 cells. Stimulation of cannabinoid receptors is known to produce ceramide through an activation of sphingomyelinase. 3T3 cells express CB1 and CB2 receptors, and the stimulation of the receptors in the cells by 2-arachidonylglycerol resulted in the secretion of neurotrophic factors. Sphingomyelinase and phosphatidylcholine-specific phospholipase C stimulated the NGF and IL-6 mRNA expressions, which were inhibited by GF109203X, a protein kinase C inhibitor. In addition, C2-ceramide activated the phosphorylation of MAPK/ERK, p38 MAPK and JNK. These results suggest that ceramide may have neurogenerative and/or neuroprotective activity in peripheral tissues including skin by a mediation of the secretion of neurotrophic factors. Therefore, the drugs, which activate ceramide biosynthesis, inhibit ceramide degradation, or activate ceramide-mediated cellular signaling pathway, may be useful for neurotrophic factor secretion. The neurotrophic factor secretion would contribute to the protection of skin from external stimuli by forming the functional systems of the tissues.

1. 緒 言

セラミドはスフィンゴミエリンからスフィンゴミエリナーゼによって生合成される脂質成分であり、皮膚を構成する細胞間脂質の中で最も多く存在することが知られている¹⁾。皮膚は生体を構成する臓器の中で最も大きなものであり、常に変化する外界と接しており、体内の恒常性を維持するためのバリアとして機能している。このバリアの実質的な担い手がセラミドと考えられており、皮膚の表皮細胞を取り囲むようにして存在しラメラ構造という層状の構造をとることが知られている。一方、最近の脂質研究の進展により、セラミドが静的な構造物としてだけでなく、細胞内において、その機能を調節する生理活性を有する物質であることが明らかになってきた²⁾。組織全体のバランスを保持するために特定の細胞が積極的に死を迎えるメカニズムであるアポトーシスや、細胞の分化誘導などに、セラミドが関わるということが明らかにされている³⁾。したがって、皮膚に存在するセラミドも静的なバリア形成能に加えて、皮膚周辺における細胞間情報伝達を介した、ダイナミックな皮膚構造の維持に関与する可能性が考えられる。すなわち、皮膚機能を維持するためには、血管新生やその循環作用や

神経機能の維持も重要な問題となる。そこで本研究では、セラミドの細胞機能に対する作用、とくに神経細胞の機能維持に焦点をあて、神経細胞の再生や機能維持を司る神経栄養因子の生合成および分泌作用について検討を加えるとともに、その生理機構発現のメカニズムの解明を目的とした。

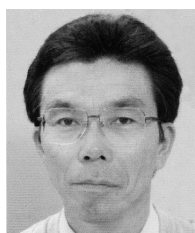
2. 実 験

2.1. 細胞培養

線維芽細胞株 Swiss 3T3 細胞は 5% 牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS)、ペニシリン (50 unit/mL) およびストレプトマイシン (50 μ g/mL) を添加したダルベッコ変法イーグルス媒体 (DMEM) を用い、150mm のディッシュで継代培養した⁴⁾。3T3 細胞は、37°C で、95% air-5% CO₂ で飽和したインキュベーター中で培養し、メディアウムは 3-4 日間隔で交換した。PC-12 細胞は 10% FCS、5% ウマ血清 (horse serum) および上記抗生物質を添加した DMEM 中、150mm のディッシュで継代培養した⁵⁾。PC-12 細胞は、37°C で、95% air-5% CO₂ で飽和したインキュベーター中で培養し、メディアウムは 3-4 日間隔で交換した。

2.2. 神経栄養因子の分泌能の測定

3T3 細胞を 4×10^4 個/mL の濃度で 0.5mL ずつ 24 ウエルプレートに分注し、上記培養液中で 3 日間培養した後、0.5% FCS 含有 DMEM に置換し、薬物を加えて 2 日間培養した。一方、PC-12 細胞は 4×10^4 個/mL の濃度で 0.25mL ずつ 48 ウエルプレートに分注し、2 日間培養した後、メディアウムを薬物処理を行った 3T3 細胞の培養上清 (0.25mL)



Research for the mechanism of cellular response to ceramides that show skin protection

Norimichi Nakahata, Satoko Ohkubo

Graduate School of Pharmaceutical Sciences
Tohoku University

と交換し、さらに2日間培養した。また、薬物を直接PC-12細胞に作用させたものを比較実験として行った。PC-12細胞は顕微鏡（オリンパス IX-70）を用いて形態変化を観察し、3T3細胞から分泌された神経栄養因子による細胞の分化を調べた⁶⁾。

2.3. RT-PCR

3T3細胞 (4×10^5 cells/well) を6-wellのディッシュに播き、通常のメディウムで2日間培養してから、FCSを含まないメディウムで1日間培養した。細胞から総RNA画分を抽出した後、逆転写反応によってcDNAとし、それを水で4倍希釈してPCRのテンプレートとした。PCR反応は94℃で2分間加熱したサンプルを、熱変性を94℃で30秒、アニーリングを56℃で30秒、伸長反応を72℃で20秒行い、このサイクルを16-30回繰り返した。得られたDNA断片は1.5%アガロース電気泳動を行って分離し、エチジウムブロマイドにて染色後、そのバンドの濃淡を撮影装置（FAS-III, Toyobo）によって記録した⁷⁾。Nerve growth factor (NGF) については、センスプライマー（CTTCAACAGGACTCACAGGA）およびアンチセンスプライマー（GTGCAGTATGAGTTCCAGTG）を用いた。インターロイキン-6 (IL-6) については、センスプライマー（GAGGAGACTTCACAGAGGAT）、アンチセンスプライマー（TCCTTAGCCACTCCTTCTGT）を用いた。カンナビノイド受容体（CB）については、CB1（センスプライマー：ATAAGAGGATCGTCACCAGG、アンチセンスプライマー：AGTTCAGCAGGCAGAGCATA）およびCB2（センスプライマー：AAGCCCTCGTACCTGTTTCAT、アンチセンスプライマー：AGGCACAGCATGGAACAGAA）を用いた。なお、比較のために β -アクチンのcDNAもRT-PCRによって測定した（センスプライマー：AGGGAAATCGTGCGTGACAT、アンチセンスプライマー：TCCTGCTTGCTGATCCACAT）。

2.4. ウェスタンブロッティング

細胞 (2×10^5 cells/well) を12-wellのディッシュに播き、通常のメディウムで2日間培養してから、FCSを含まないメディウムで1日間培養した。薬物で刺激した後、500 μ Lのサンプルバッファー（75mM Tris-HCl, 2% SDS, 15% glycerol, 3% 2-mercaptoethanol, pH6.8）で反応を停止した。サンプルを95℃で5分間煮沸し、完全にタンパク質を変性させた後、11%の分離ゲルを用いてSDS-PAGEを行った。泳動終了後、セミドライ・トランスファー装置（ATTO）を用い、ゲルからPVDF膜（Immobilon; polyvinylidene difluoride, Millipore）へタンパク質を転写した。転写終了後、PVDF膜をTBST（Tris-buffered saline; 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH

7.4）に2% BSAを加えたブロッキングバッファーにより室温で2時間処理した。TBSTで洗浄後、ブロッキングバッファーで500倍に希釈した一次抗体とインキュベートした（4℃、overnight）。用いた一次抗体は、抗phospho-p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 抗体、抗phospho-p38 MAPK 抗体、抗phospho-JNK 抗体の三種である。TBSTで洗浄後、ブロッキングバッファーで1000倍に希釈したパーオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体とインキュベートした（室温、2時間）。化学発光検出キットを用いて、パーオキシダーゼと基質により生じた化学発光を化学発光検出フィルム（Hyperfilm ECL, Amersham）に感光させて検出した⁸⁾。

3. 結果

3.1. 外来性セラミドによる3T3細胞からの神経栄養因子分泌による神経細胞の分化誘導

線維芽細胞は皮膚組織に存在することが知られているが、その細胞株である3T3細胞からの神経栄養因子の分泌についてバイオアッセイを行った。すなわち、3T3細胞を薬物存在下に2日間培養し、その培養上清を用いて神経のモデル細胞であるPC-12細胞を培養し、PC-12細胞の形態的な分化を観察した（図1）。3T3細胞から神経栄養因子が分泌されるとすれば、PC-12細胞は形態的な分化を示すことになる。コントロールの実験として、NGFの生合成を促進させることが知られているプロテインキナーゼCの活性化薬PMA⁹⁾について検討を加えた。その結果、3T3細胞の培養時にPMAを加えなかったものと相違し、PMAを加えたものの培養上清はPC-12細胞を強く分化させた（図1）。

本実験系を用いて、セラミドの作用について検討を加えた。その結果、C2-セラミドを3T3細胞とともに培養した培養上清には神経栄養因子が含まれており、PC-12細胞を強く分化させた（図2）。同様な作用がC6-セラミドにも認められることから、セラミドによって線維芽細胞内の情報伝達系が活性化され、神経栄養因子の生合成が促進されることが推定された。なお、C2-セラミドやC6-セラミドを直接PC-12細胞に作用させても、形態的な分化は認められなかった。

3.2. 内因性セラミドによる神経栄養因子分泌による神経細胞の分化誘導

次に、内因性のセラミドの生合成を促進させるスフィンゴミエリナーゼとホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼCを3T3細胞とともに培養し、その培養上清中でPC-12細胞の培養を行った。セラミドの生合成を促進すると考えられる、二つの酵素処理は3T3細胞からの神経栄養因子の分泌を促進し、その結果PC-12細胞の分化誘

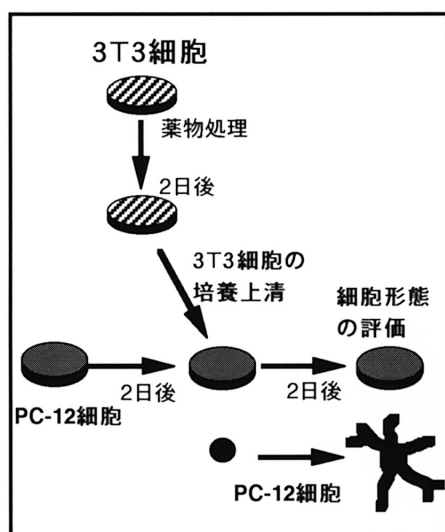
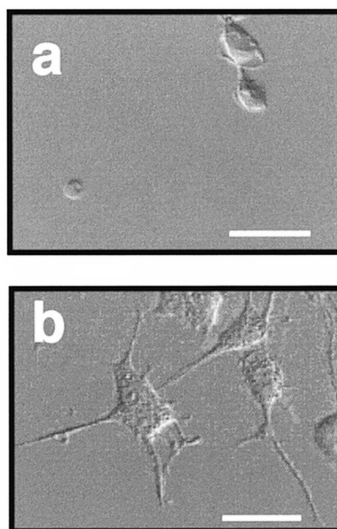
A**B**

図1 神経栄養因子分泌の評価方法 (A) と PC-12 細胞の分化作用 (B)

A: 3T3 細胞を薬物と2日間培養し、その培養上清で PC-12 細胞を培養した。3T3 細胞が神経栄養因子を分泌すると、PC-12 細胞の形態的分化が引き起こされる。B: 3T3 細胞を薬物非存在下 (a) あるいは PMA (100nM) 存在下 (b) で培養した上清を用いた場合の PC-12 細胞の形態。スケール: 50 μm 。

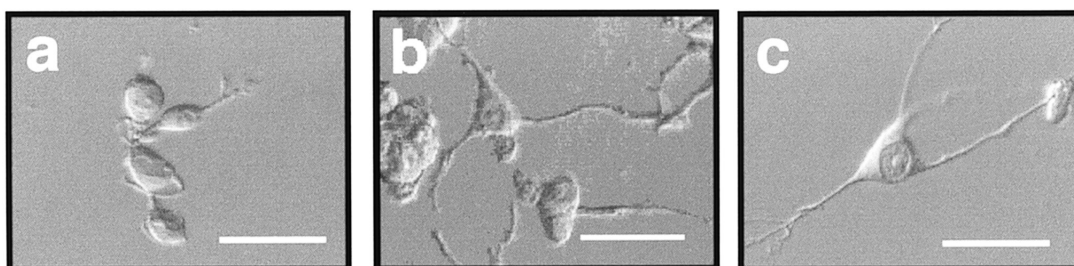


図2 外来性セラミドによる 3T3 細胞からの神経栄養因子分泌による PC-12 細胞の分化

3T3 細胞を薬物非存在下 (a)、C2-セラミド 10 μM 存在下 (b) および C6-セラミド 10 μM 存在下 (c) で培養した上清を用いたときの PC-12 細胞の分化作用。スケール: 50 μm 。

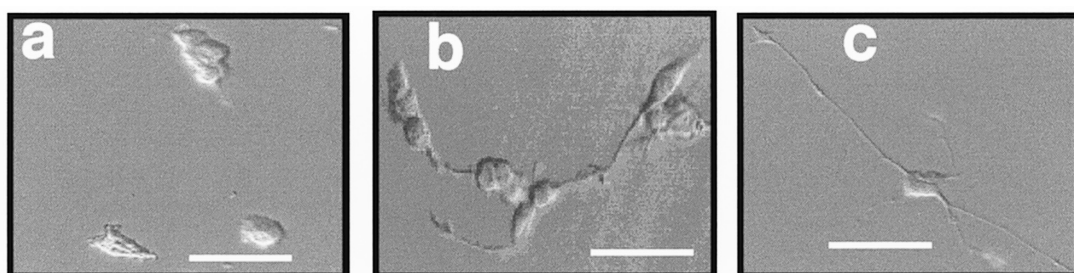


図3 内因性セラミドによる 3T3 細胞からの神経栄養因子分泌による PC-12 細胞の分化

3T3 細胞を薬物非存在下 (a)、スフィンゴミエリナーゼ 0.01 U/mL 存在下 (b) およびホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C 0.01 U/mL 存在下 (c) で培養した上清を用いたときの PC-12 細胞の分化作用。スケール: 50 μm 。

導が強く引き起こされた (図3)。なお、スフィンゴミエリナーゼとホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C を直接 PC-12 細胞に作用させた場合には、PC-12 細胞の分化は引き起こされなかった。

3.3. カンナビノイド受容体刺激による神経細胞の分化誘導

マリファナの成分である Δ^9 -tetrahydrocannabinol はカンナビノイド受容体を介して作用を現し、時間感覚や空間感覚の混乱、記憶の障害、多幸感、幻覚、離人症などの多彩な精

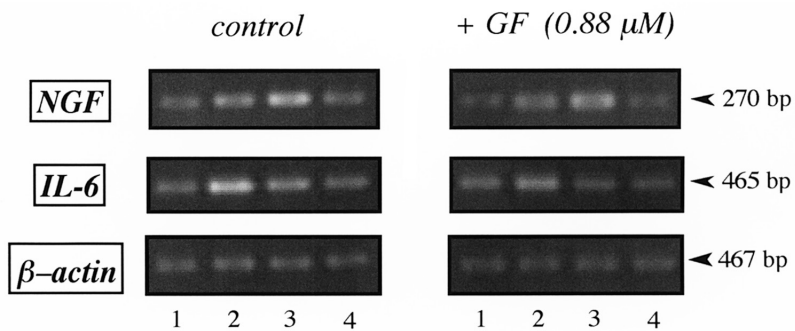
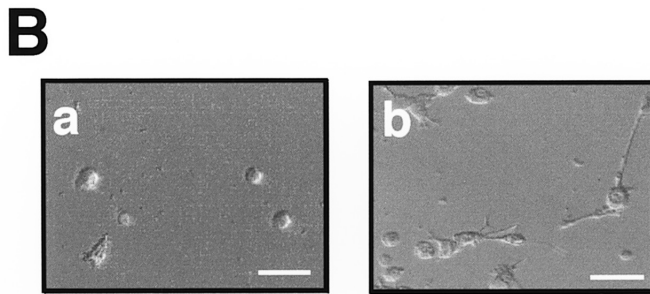
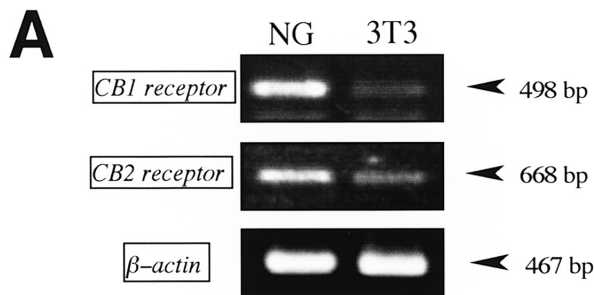


図4 3T3細胞におけるカンナビノイド受容体の発現と2-アラキドニルグリセロールによる3T3細胞からの神経栄養因子分泌によるPC-12細胞の分化

A:3T3細胞のCB1およびCB2受容体の発現をRT-PCRによって調べた。対照として、これらの受容体の発現が知られているNG108-15細胞(NG)を用いた。ハウスキーピング遺伝子として β -アクチンを用いた。B:3T3細胞を薬物非存在下(a)および2-アラキドニルグリセロール10 μ M存在下(b)で培養した上清を用いたときのPC-12細胞の分化作用。スケール:50 μ m。

図5 3T3細胞におけるスフィンゴミエリナーゼおよびホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼCによるNGFおよびIL-6 mRNA遺伝子発現

3T3細胞をGF109203X存在下(右)非存在下(左)の条件で、薬物無添加(lane 1)スフィンゴミエリナーゼ0.5U/mL(lane 2)、ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼC0.2U/mL(lane 3)およびPMA100nM(lane 4)とともに3時間培養し、NGFおよびIL-6 mRNAをRT-PCRで解析した。ハウスキーピング遺伝子として β -アクチンを用いた。

神症状が発現する¹⁰⁾。カンナビノイド受容体にはCB1受容体とCB2の二つが存在し、中枢神経とともに末梢にも存在することが報告されている¹¹⁾。中枢神経系中的作用については多くの研究が為されているが、末梢におけるカンナビノイド受容体の生理的な意義については不明な点が多い。カンナビノイド受容体はGiと共役し、サイクリックAMPを減少させる作用が認められているが¹²⁾、最近、その細胞内情報伝達にスフィンゴミエリナーゼの活性化を介するセラミドの生成が重要な役割を担っていることが報告された¹³⁾。そこで、3T3細胞にカンナビノイド受容体が発現しているか否かをはじめに検討したところ、CB1およびCB2受容体ともに3T3細胞に発現していることが見出された(図4A)。さらに、内因性カンナビノイド受容体刺激薬である2-arachidonylglycerol(2-AG)は、3T3細胞に作用して神経栄養因子の分泌を促進し、その培養上清中で培養したPC-12細胞の形態的分化を強く引き起こした(図4B)。なお、2-AGはPC-12細胞の分化を直接は引き起こさなかった。

3.4. セラミドによる神経栄養因子の遺伝子発現

3T3細胞およびPC-12細胞を用いた神経栄養因子を介

する神経機能変化の検討により、細胞内に増加したセラミドは神経栄養因子の生合成を促進し、神経細胞の機能的活性化を引き起こすことが示唆された。そこで、3T3細胞における神経栄養因子の遺伝子発現について検討を加えた(図5)。内因性のセラミドを増加させることが知られているスフィンゴミエリナーゼおよびホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼCは顕著なNGF mRNAの発現を亢進し、また、インターロイキン-6(IL-6) mRNAの発現誘導も引き起こした。この作用はプロテインキナーゼC阻害薬のGF109203Xによって顕著に抑制された。したがって、セラミドは神経栄養因子の遺伝子発現を介した生合成の促進作用を有するとともに、その経路にPKCの介在することが示唆された。皮膚などの末梢組織において、細胞内セラミドの増加が神経の伸長作用を促し、機能的な組織へと構築する役割を担うものと考えられる。

3.5. セラミドの情報伝達系

そこで、細胞内に増加したセラミドによってどのような細胞内情報伝達系が活性化されるかについて検討を加えた。とくに、mitogen-activated protein kinase (MAPK)

ファミリーのうち、p42/44 MAPK、p38 MAPK および JNK のリン酸化について検討した (図6)。その結果、C2 セラミドは p42/44 MAPK、p38 MAPK および JNK のリン酸化を引き起こすことが明らかになった。

4. 考 察

細胞膜を構成するリン脂質は、その構造体であるばかりではなく、細胞情報伝達系の基質や情報伝達分子として巧みに利用されている。例えば、リン脂質の分解系として、炎症などに関与するアラキドン酸 / プロスタグランジン類の生成を担うホスホリパーゼ A₂⁴⁾、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇を引き起こすイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼ C¹⁵⁾、さらにコリンリン脂質を分解するホスホリパーゼ D¹⁶⁾ やホスホリパーゼ C の活性調節機構¹⁷⁾ などリン脂質を利用する多彩な情報伝達系が知られている。すなわち、生体を形成する物質が、単一な役割を担っているのではなく、複数の機能を有しているものと考えられる。

リン脂質の1つとして知られているスフィンゴミエリンの代謝物であるセラミドの生理的な役割が、皮膚組織の構造維持によって外界の刺激から皮膚を静的に守ることに加えて、細胞内の情報を動的に伝え、細胞機能に変化を与えることが本研究によって明らかになった。すなわち、セラミドには神経栄養因子の生合成・分泌の促進作用があり、このセラミドの作用は、皮膚組織などの末梢における神経機能維持に重要な役割を担っているものと推定される。スフィンゴミエリナーゼやホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C による NGF mRNA 発現作用は PKC の阻害薬である GF109203X で阻害されたことより PKC の介在が考えられるが、この作用はセラミドが PKC アイソフォームのうち PKC- ζ の活性化を引き起こすという報告¹⁸⁾ と一致する。一方、セラミドには積極的に細胞死を惹起するアポトーシスを引き起こし、組織全体としてのバランスを

保持する作用のあることが知られており³⁾、本研究においても、JNK や p38 などの MAPK 活性化作用が示された。これらの結果は、動的な皮膚機能維持においても、セラミドは重要な役割を担っているものを示唆するものである。したがって、セラミドの化粧品としての利用方法あるいはその価値を考える場合、セラミド自身を化粧品中に加える方法とともに、セラミドの生合成を刺激する薬物、分解を阻害する薬物、さらにセラミドの情報伝達系を刺激する薬物を開発し、それらを化粧品として用いると、より生理的な機能性に富む化粧品になる可能性が示唆された。

5. 総 括

皮膚に多量に存在するセラミドがその周辺細胞にて生合成されると、他の細胞機能に影響を与える可能性があることから、特に神経機能に影響を与える神経栄養因子の生合成に対するセラミドの作用について検討を加えた。線維芽細胞株 3T3 細胞に外来性の C2-セラミドおよび C6-セラミドを添加して培養すると、神経モデル細胞である PC-12 を分化させる因子の分泌を促した。スフィンゴミエリナーゼおよびホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C を 3T3 細胞に作用させて細胞内セラミドを増加させると、神経栄養因子の生合成・分泌が促進され、それによって PC-12 は分化した。カンナビノイド (CB) 受容体刺激はセラミドの生合成を引き起こすことが知られているが、3T3 細胞に CB1 および CB2 受容体が発現していることを RT-PCR 法を用いて確認した。内因性 CB 受容体アゴニストである 2-アラキドニルグリセロールは 3T3 細胞に作用して神経栄養因子の合成・分泌を引き起こし、PC-12 細胞を分化させた。スフィンゴミエリナーゼやホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C は NGF および IL-6 mRNA の発現を顕著に増大し、その作用はプロテインキナーゼ C 阻害薬の GF109203X によって減弱された。一方、

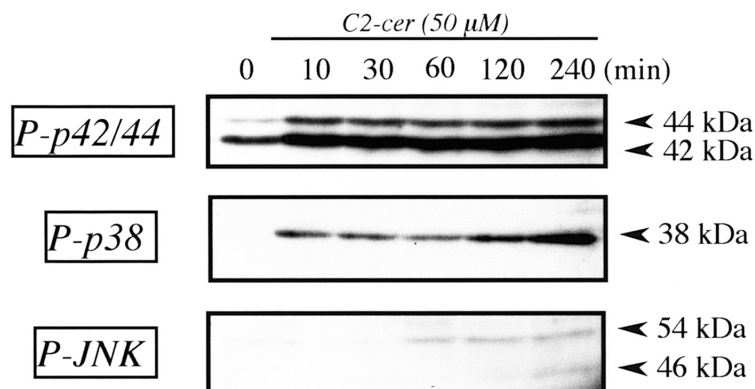


図6 C2-セラミドによる MAPK 群のリン酸化反応

3T3 細胞に C2-セラミド 50μM を添加した後、240 分まで経時的にサンプリングし、そのリン酸化 p42/44 MAPK (P-p42/44)、リン酸化 p38 (P-p38) およびリン酸化 JNK (P-JNK) をウエスタンブロッティングにて測定した。

セラミドの細胞内情報伝達系について MAPK のリン酸化を検討したところ、p42/44 MAPK、p38 MAPK および JNK いずれのリン酸化反応も活性化し、その情報伝達の一部には MAPK カスケードの活性化が考えられる。以上の結果より、セラミドには NGF をはじめとする神経栄養因子の生合成・分泌の促進作用があることが明らかになった。このセラミドの作用は、皮膚組織などの末梢における神経機能維持に重要な役割を担っているものと推定され、セラミドは皮膚表皮角層に形成されるラメラ構造の形成とともに、皮膚の神経機能維持をも制御している可能性が示唆された。

(引用文献)

- 1) 内田良一、原真里子、濱中すみ子：表皮角層におけるセラミドの役割とその起源. 生化学 **73**, 268-270, 2001.
- 2) Hannun YA, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. Trends Cell Biol, **10**, 73-80, 2000.
- 3) De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, et al.: The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. Proc Natl Acad Sci USA **95**, 8375-8380, 1998.
- 4) Nakatani K, Nakahata N, Tsurufuji, S, et al.: Preconditioning of 3T3 cells by fresh edium together with genistein enhances prostaglandin E² release. Eur J Pharmacol **432**, 135-142, 2001.
- 5) Obara Y, Nakahata N, Ohizumi Y. A new factor derived from 1321N1 human astrocytoma cells causes differentiation of PC-12 cells mediated through mitogen-activated protein kinase cascade. Brain Res **806**, 79-88, 1998.
- 6) Obara Y, Nakahata N, Kita T, et al.: Stimulation of neurotrophic factor secretion from 1321N1 human astrocytoma cells by novel diterpenoids, scabronines A and G. Eur J Pharmacol **370**, 79-84, 1999.
- 7) Ohkubo S, Kimura J and Matsuoka I: Ecto-alkaline phosphatase in NG108-15 cells: a key enzyme mediating P1 antagonist sensitive ATP response. Br J Pharmacol **131**, 1667-1672, 2000.
- 8) Ohkubo S, Nakahata N and Ohizumi Y: Thromboxane A² stimulates mitogen-activated protein kinase and arachidonic acid liberation in rabbit platelets. Prostaglandins **52**, 403-413, 1996.
- 9) Obara Y, Kobayashi H, Ohta T, et al.: Scabronine G-methylester enhances secretion of neurotrophic factors mediated by an activation of protein kinase C- ζ . Mol Pharmacol **59**, 1287-1297, 2001.
- 10) Dewey WL: Cannabinoid pharmacology. Pharmacol Rev **38**, 159-178, 1986.
- 11) Felder CC, Glass M: Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. Ann Rev Pharmacol Toxicol **38**, 179-200, 1998.
- 12) Howlett AC: Pharmacology of cannabinoid receptors. Ann Rev Pharmacol Toxicol **35**, 607-634, 1995.
- 13) Guzman M, Galve-Roperh I, Sanchez C: Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. Trend Pharmacol Sci. **22**, 19-22, 2001.
- 14) Nakatani K, Nakahata N, Hamada Y, et al.: Medium change amplifies mitogen-activated protein kinase-mediated prostaglandin E² synthesis in 3T3 fibroblasts. Eur. J. Pharmacol. **356**, 91-100, 1998.
- 15) Rho M-C, Nakahata N, Nakamura H et al.: Involvement of phospholipase C- γ 2 in activation of mitogen-activated protein kinase and phospholipase A² by zooxanthellatoxin-A in rabbit platelets J. Pharmacol. Exp. Ther. **282**, 496-504, 1997.
- 16) Mizuno K, Nakahata N, Ohizumi Y: Mastoparan-induced phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D activation in human astrocytoma cells. Brit. J. Pharmacol. **116**, 2090-2096, 1995.
- 17) Kobayashi H, Honma S, Nakahata N, et al.: Involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in thromboxane A²-induced activation of mitogen-activated protein kinase in human astrocytoma cells J. Neurochem. **74**, 2167-2173, 2000.
- 18) Nakanishi H and Exton JH: Purification and characterization of the zeta isoform of protein kinase C from bovine kidney. J Biol Chem **267**, 16347-16354, 1992.

爪の形状に対する VII 型コラーゲンの変異がかかわる影響について

北海道大学 医学部附属病院

松 村 和 子

Nail cosmetics have recently made remarkable progress. However, the basic study related to the nail shape has not been revealed yet. The etiology of toenail deformity is not fully understood. Shimizu et al and we have previously reported that certain glycine substitutions in the type VII collagen gene (COL7A1) lead to toenail deformity, in 1999. We explored the possibility that other patients exist with toenail deformity but without blister formation and that this is inherited in an autosomal dominant manner.

The eleven pedigrees, which contain more than one dystrophic epidermolysis bullosa patient, were investigated from the clinical point of view and gene mutation. Additionally, five pedigrees of the patient who have familial toe nail deformity were genetically analyzed. Four out of eleven pedigrees had familial nail deformity. The members who had nail deformity within the four pedigrees had glycine substitution within the collagenous domain of COL7A1. The five familial nail deformity pedigrees without dystrophic epidermolysis bullosa familial nail dystrophy were also investigated for COL7A1 mutation. No mutation was detected within COL7A1 except MspI polymorphism was found within one pedigree. The multiple etiology has been suspected with in familial nail dystrophy.

1. 緒 言

化粧品学の発達に伴い、爪の化粧が、近年、注目されるようになった。しかしながら、爪の形状に関する基礎的研究は、あまりなされていない。VII 型コラーゲンの遺伝子変異によって発症する表皮水疱症、皮膚 VII 型コラーゲンに対する自己抗体を形成によって発症する後天性表皮水疱症のいずれもが、爪が脱落したり、萎縮したりすることに注目し、VII 型コラーゲンが爪の形成に深くかかわっている可能性を予測した。

VII 型コラーゲンは、皮膚に於いては、真皮を結びつけるアンカーリング フィブリルの主要成分である。アンカーリング フィブリルは電子顕微鏡を用いた超微構造解析の結果から、表皮からループ状に真皮側に垂れ下がり、そのループには、真皮のコラーゲン線維束が、ちょうどフック状になった留め金にロープでとめつけるようになって表皮と真皮をつなぎ止めていることが明らかになった¹⁾。表皮水疱症のなかでも発症頻度が高く、しばしば、重症化する栄養障害性表皮水疱症は、VII 型コラーゲンをコードする COL7A1 遺伝子の変異によって皮膚の脆弱性がおこることが明らかにされている²⁾。爪母および爪床の真皮接合部においても VII 型コラーゲンが果たす役割は大きいと考え、少数の症例で詳細な観察を行った。その結果、表皮水疱症のキャリアーのなかに、他の症状が全くないにもか

わらず、小さい爪、変形した爪を持つ症例があることがわかった。今回、我々は、小さい爪をもつ表皮水疱症のキャリアー、および、表皮水疱症の家族歴がないが、爪が小さい患者の VII 型コラーゲンを変異を検索し、VII 型コラーゲンの異常が爪の形状に及ぼす影響を分子生物学的手法を用いて遺伝子レベルで検討を行った。

2. 実 験

2.1 対 象

北海道大学医学部附属病院皮膚科の表皮水疱症の患者のうち、遺伝子検索の同意を得られた 11 家系ならびに、家族に表皮水疱症患者は見られないが、幼少時から小さい爪、爪の変形を自覚していた患者のうち、遺伝子検索の同意を得た 5 家系を対象とした。

2.2 倫理的配慮

患者 DNA の解析にあたっては、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会が定めた規定に準じ、被験者の同意を文書にて得たのちに解析した。プライバシーの保護のため、試料と検査結果は匿名化して保管し、また、検索結果を含む個人情報も、全て匿名化し管理した。

2.3 遺伝子検索

EDTA2Na 入り採血管にて採血した患者末梢血由来の単核球から Sambrook ら³⁾ による標準的な方法を用いて、DNA を抽出した。VII 型コラーゲンをコードする COL7A1 の全エクソン 118 を intron-exon border の情報をもとに PCR にて増幅した。増幅条件および、プライマーの設定は、既に報告された条件で行った^{2, 4)}。変異の一次スクリーニングのため、Glycerol-tolerant gel buffer を用いた 6.8% アクリルアミドによる Conformation sensitive gel



Nail deformity and type VII collagen abnormality

Kazuko Matsumura

Department of dermatology, Hokkaido University graduate school of Medicine

electrophoresis heteroduplex analysis を行った^{2,4)}。Heteroduplex バンドを検出し得た増幅断片のみ Big Dye terminator cycle sequence FS (PE applied biosystem) を用いてシーケンス PCR を行い、蛍光色素標識した。解読は、ABI prism 310 (PE applied biosystem) を用いた。変異した allele については、制限酵素切断部位の有無により検証した。

3 結 果

3.1 表皮水疱症家系に見られる爪の臨床症状

栄養障害性表皮水疱症家系の 11 家系について表 1 の通

表 1 表皮水疱症臨床症状のまとめ

症例	臨床症状	患者家系の爪甲変形
1	Dominant	有
2	Dominant	無
3	Dominant	有
4	Resesive 重度	有
5	Resesive 中等度	有
6	Resesive 軽度	無
7	Resesive 中等度	無
8	Resesive 中等度	無
9	Resesive 中等度	無
10	Resesive 中等度	無
11	Resesive 重度	無

り臨床症状をまとめた。臨床的に慢性栄養障害型表皮水疱症を呈する家系は、3 家系、中等度から重度の慢性栄養障害型表皮水疱症を呈する家系は 9 家系あった。そのうち、臨床的に水疱が認められない血族に爪甲形状の異常が認められた家系は、4 家系であった。表皮水疱症 11 家系について共通している所見は、次の通りである。爪の変形は、特に両母趾に強く、遊離縁への伸長が不良で爪襟が消失し、爪床側に埋没した状態になっている。爪甲の厚さは、通常と変わらない症例と軽度肥厚している症例が混在する。後爪郭および爪上皮も萎縮あるいは消失している (Fig. 1a, 1b)。

3.2 血族に表皮水疱症をもたない爪の臨床症状

表皮水疱症患者を家系にもたない症例の爪の変形の臨床症状は様々である。そのうち、2 家系は、詳細な家族歴の検索および全身症状の検索の結果、膝蓋骨の変形が認められ、neil patella 症候群に罹患していることが判明した。これらの家系は、小さい爪であることは、表皮水疱症家系の爪の変化と共通するが、爪床側に埋没した爪の変形ではなく、むしろ、爪甲の分離や、爪の表面に凸凹が形成される変化が認められることが特徴的である (Fig. 2a)。残りの 3 家系は、表皮水疱症患者を血族にもつ症例に認められる爪の

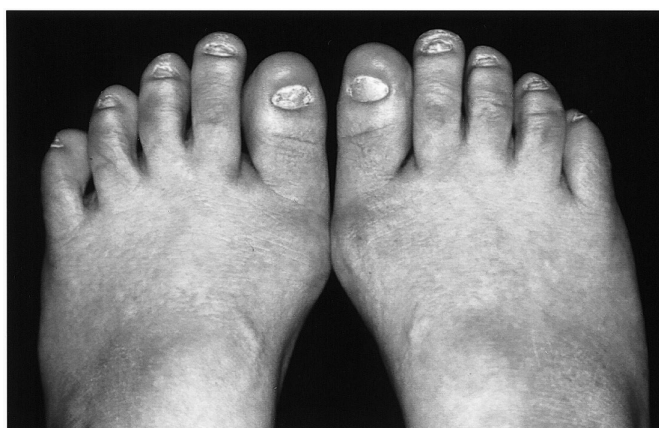


Fig. 1a 血族に栄養障害性表皮水疱症がある遺伝性の足爪の変形

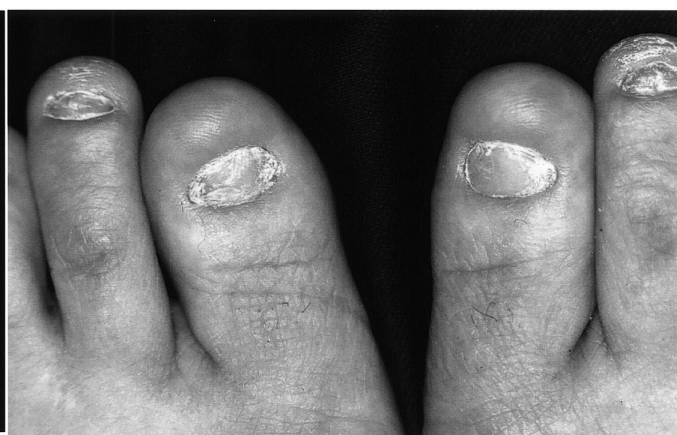


Fig. 1b 血族に栄養障害性表皮水疱症がある遺伝性の足爪の変形。特に第一趾爪に変形が強い。



Fig. 2a 血族に栄養障害性表皮水疱症がない遺伝性の足爪の変形。検索の結果、Nail patella 症候群であった。

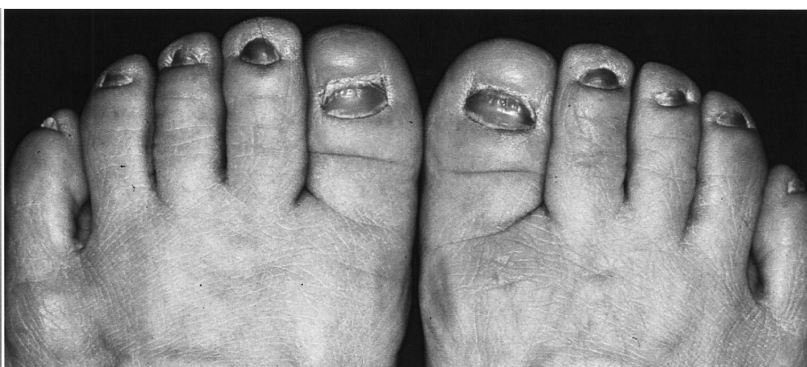


Fig. 2b 血族に栄養障害性表皮水疱症がない遺伝性の足爪の変形。検索の結果、COL7A1 ポリモルフィズムが存在した。

変化と同様に遊離縁への伸長が不良で爪襟が消失し、爪床側に埋没した状態になっている (Fig. 2b)。いずれの症例も爪表在性真菌症の既往はなく、手足の表皮および、爪からの真菌直接鏡検検査で真菌は検出されず、同部位の真菌培養でも真菌は検出されず、爪の変形は、表在性真菌症によるものではないことが確認されている。

3.3 表皮水疱症をもつ家系における Type VII コラーゲン遺伝子検索の結果爪の変形を来す家系のうち解析し得た表皮水疱症の変異を表 2 に示す。表に示した通り、表皮水疱症患者を家系に持ち、かつ爪の変形を来した血族は、全て VII 型コラーゲン遺伝子の collagenous ドメインのグリシンが、他のアミノ酸に置換していた。今回検索した 4 家系のうち爪の変形を来した症例はそれぞれ、G2028E, G2064E, G1549R, G1815R の変異のヘテロであることを確認し得た。代表的な家系の家系図を Fig. 3 に示す⁵⁾。しかし、これらの変異の近傍の Collagenous ドメインのグリシンが他のアミノ酸に置換された変異 G2037E の変異をみとめた症例では、水疱の形成や創傷治癒の遅延など軽症の表皮水疱症としての症状は認められたが、爪の変形は、認められていない。

一方、挿入、欠失に伴うフレームシフトやスプライシング部位の変異、あるいは一塩基置換に伴って、タンパク質への翻訳の途中で停止コドンを生じてしまう変異のみをへ

テロで持っている症例については、いずれの個体においても爪の変形は、認められなかった。

3.4 表皮水疱症をもたない家系における Type VII コラーゲン遺伝子検索の結果 nail patella 症候群であったの 2 家系については、Type VII コラーゲン遺伝子の変異は、認められなかった。nail patella 症候群ではない 3 家系について、検索したところ、2 家系では、特別な変異は認められなかった。1 家系では、アミノ酸の置換を伴わない一塩基置換、すなわち、exon 21 の MspI ポリモルフィズム⁶⁾を検出した。

4 考 察

表皮水疱症をもつ家系の血族における爪の形状異常において COL7A1 の変異が大きな影響を与えていることが明らかになった。今回の検索で、水疱は出現しないが、爪の変形を来した全ての症例で、COL7A1 の collagenous ドメインのグリシンが他のアミノ酸に変異する一塩基置換を見いだした。このうち、グリシンがアルギニンに変異する一塩基置換が 2 例、グリシンがグルタミン酸に変異する一塩基置換が 2 例検出された。グリシンのアミノ酸置換は、従来優性栄養障害型表皮水疱症を来すと知られている。臨床的に全く水疱をつくらず、爪の変形のみが症状である疾患群が存在する可能性を Shimizu ら⁷⁾ が、報告しているが、本研究において複数例の同様の症例を確認することができた。これらの変異は、臨床的に見落としてしまうほどわずかな変化であるため、以前は silent mutation として気づかれずにいた可能性がある。水疱を形成しない優性栄養障害型表皮水疱症とみなすか、VII 型コラーゲン collagenous ドメインにグリシン置換が検出される遺伝性の爪変形症とするかは、まだ議論の余地がある。

さらに VII 型コラーゲン遺伝子 COL7A1 の変異前体においても同じ collagenous ドメインのグリシン置換であっても、出現する症状が違えることが確認された。今回の 11 家系の検索においても、爪を含めて全く症状を示さないいわゆる silent のグリシン置換変異が一家系、機械的刺激で水疱を生じ、容易に潰瘍や瘢痕をつくり皮膚の脆弱性を示す古典的優性栄養障害型表皮水疱症といえる例が 2 例あった。これらの症状の差が遺伝子変異の違いによって簡単には、説明することはできないが、他のアミノ酸へ置換されたグリシンが VII 型コラーゲン全体のどこに位置するか、グリシンがどのようなアミノ酸に置換しているかが症状の差を解明する手がかりになる可能性がある。今回検索した例においては、VII コラーゲンの N 末端に比較的近いところ、あるいは、collagenous ドメインのなかでヒンジ部分に比較的近いところで置換をおこしている症例では、症状を呈しやすく、C 末端に比較的近い部分での変異では silent 変

表 2 COL7A1 遺伝子変異

症例	変異 1	変異 2
1	G2028E	
2	G2037E	
3	G2064E	
4	G1815R	581delC
5	G1549R	E2827X
6	G2204S	S16989X
7	G2366C	8358+1 G->T

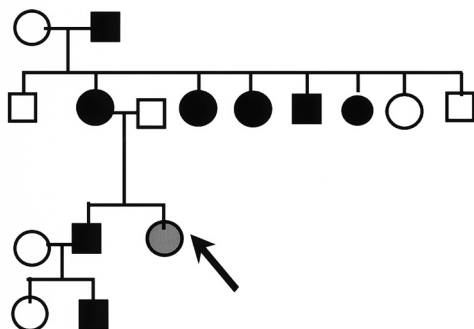


Fig. 3 血族に栄養障害性表皮水疱症患者がいる遺伝性足趾爪変形症の典型的な家系図
○：足趾爪変形無し。●：足趾爪変形有り。矢印：栄養障害性表皮水疱症患者。

異である傾向が認められた。一方、どのようなアミノ酸に置換することで症状が変わるかを検討したところ、今回の検索においては、爪甲異常や、優性栄養障害型表皮水疱症の症状を呈する症例で、グリシンがアルギニンあるいは、グルタミン酸に変化しているのに対して、症状を示さない silent mutation は、グリシンがセリンあるいはシステインに変化していた。しかし、これまでに、グリシンがアルギニンやグルタミン酸以外に変異している優性栄養障害性表皮水疱症が報告されているため、単にアミノ酸の差だけで書状の違いを説明することは難しい。

水疱の生成のみならず、爪甲の形状にまで詳細に検討したうえで silent 変異と結論づけている G1812R というグリシンがアルギニンに変異した報告は⁸⁾、今回検討した爪の変形のみ生じた 4 家系のうち 1 家系 G1815R と極めて近いグリシン置換である。3つのアミノ酸ごとに生じるグリシンが1つ分だけずれただけで、臨床症状が違うという事実は、少なくとも置換されたグリシンが VII 型コラーゲン全体のどこに位置するかということが重要であることを示唆する。

表皮水疱症患者が血族にいない爪変形症の家系の VII 型コラーゲンの検索では原因となるような VII 型コラーゲンの遺伝子変異は見いだせなかった。Nail patella 症候群は、ケラチン群の遺伝子変異であるということが解明されつつあるためここでは詳しい言及は行わないが、ケラチン群の変異が、表皮真皮境界部に発現される VII 型コラーゲンのような蛋白に対しても何らかの作用を及ぼしている可能性は十分考えることができる。Nail patella 症候群をもたない爪変形家系のうち、一例で見いだされた Exon 21 の 1 塩基置換は、アミノ酸変異を伴わず、polymorphism であることが報告されている。しかし、アミノ酸変異は生じなくともポリモルフィズムをもつアレルの転写レートが通常よりも低い可能性は否定できない。また、通常、このポリモルフィズムでは、なにも症状は呈さないが、他の遺伝子変異とあわせもつことで疾病の原因となる可能性は否めない。これらの 3 家系においては、VII 型コラーゲン以外の表皮真皮境界部に存在する蛋白に対する検索を今後行わなければならない。

今回の研究で遺伝性の爪変形症について、VII 型コラーゲンが占める役割の一端を明らかにした。今後さらなる研究で、爪の形状に関わる蛋白について明らかにしたい。

本研究の一部は、Sato-Matsumura et al, Some idiopathic toenail dystrophies are caused by substitution mutations in the type VII collagen gene (COL7A1) Archives of Dermatology in press, にて報告した。

謝辞

本研究全にわたりましてきめ細かいご指導を下さいま

した、北海道大学大学院医学研究科北海道大学大学院医学研究科・病態制御学専攻・感覚器病学講座・皮膚粘膜病学分野 清水 宏教授に感謝申し上げます。また、研究に尽力下さいました、北海道大学大学院医学研究科北海道大学大学院医学研究科・病態制御学専攻・感覚器病学講座・皮膚粘膜病学分野 澤村大輔助教授はじめ、安川香菜先生、中村裕之先生、また実験についてご指導を下さいました、中村秀樹技官に厚く御礼申し上げます。

(文献)

- 1) Shimizu H, Ishiko A, Masunaga T, Kurihara Y, Sato M, Bruckner-Tuderman L, Nishikawa T. Most anchoring fibrils in human skin originate and terminate in the lamina densa. *Laboratory Investigation* 1997;76:753-763.
- 2) Uitto J, Christiano A. Molecular basis for the dystrophic form of epidermolysis bullosa: mutation in the type VII collagen gene. *Arch Dermatol Res* 1994;287:16-22.
- 3) Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- 4) Shimizu H, McGrath J, Christiano A, Nishikawa T, Uitto J. Molecular basis of recessive dystrophic epidermolysis bullosa: genotype/phenotype correlation in a case of moderate clinical severity. *J Invest Dermatol* 1996;106:119-124.
- 5) Sato-Matsumura KC, Yasukawa K, Tomita Y, Shimizu H. Toenail dystrophy with COL7A1 glycine substitution mutations segregates as an autosomal dominant trait in two families with dystrophic epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol* 2001;in submission.
- 6) Christiano A, Chung-Honet L, Hovnanian A, Uitto J. PCR-based detection of two exonic polymorphism in the human type VII collagen (COL7A1) at 3p21.1. *Genomics* 1992;14:827-828.
- 7) Shimizu H, Hammami-Hauasli N, Hatta N, Nishikawa T, Bruckner-Tuderman L. Compound heterozygosity for silent and dominant glycine substitution mutations in COL7A1 leads to a marked transient intracytoplasmic retention of procollagen VII and a moderately severe dystrophic epidermolysis bullosa phenotype. *Journal of Investigative Dermatology* 1999;113:419-421.
- 8) Masunaga T, Shimizu H, Takizawa Y, Uitto J, Nishikawa T. Combination of novel premature termination codon and glycine substitution mutations in COL7A1 leads to moderately severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Journal of Investigative Dermatology* 2000;114:204-205.

上皮型脂肪酸結合タンパク遺伝子欠損マウスにおける表皮水バリアー機能の変化

東北大学大学院 医学系研究科細胞生物学講座 細胞組織学分野

大和田 祐二

We have generated mutant mice for epidermal type fatty acid binding protein (E-FABP) by the gene targeting technique and examined in detail the phenotype. In spite of lack in the expression of E-FABP mRNA and its protein in the skin and other tissues of the mutant mice, the animals appeared normal in gross and histological examination. Northern blot analysis of other FABPs revealed a distinct elevated gene expression of heart-type FABP (H-FABP) in the skin of the homozygous mice. In analyses of the skin, differences were not observed in contents of major fatty acids, electron microscopic appearances as well as inflammatory responses in ear skin between the mutant and wild type mice. Basal transepidermal water loss (TEWL) of homozygous mice was lower as compared with that of the wild mice. When acetone was applied to the skin for disruption of the water permeability barrier, the recovery in TEWL was delayed, despite maximum TEWL upon acetone treatment was similar between the homozygous and wild type mice in terms of the size and time course. The molecular mechanism by which E-FABP contributes to the water barrier function of the skin remains to be elucidated.

1 緒言

表皮角層の細胞間脂質（脂肪酸・セラミド・コレステロール）は、表皮の保湿（water barrier function: WBF）に深く関与することが知られている。これらの細胞間脂質は、表皮ケラチノで合成される層板小体（lamellar body）の形で細胞間隙に分泌され、主に表皮顆粒層の表面に分布する脂質層を形成する^{1) 2) 3)}。

脂肪酸結合蛋白（fatty acid binding protein: FABP）は、これまでにげっ歯類で 11 種類のアイソフォームが同定されている。FABP は、脂肪酸、胆汁酸、レチノイドなどに結合能を示す細胞内低分子タンパク（14-15kDa）であり、細胞機能としては、脂肪酸の細胞内担体として脂肪酸の細胞内取り込み、細胞内貯蔵、核の脂肪酸受容体への情報伝達制御、さらにはセラミドやコレステロールなどの代謝制御に関与することが示唆されている^{4) 5)}。このうち上皮型脂肪酸結合タンパク（epidermal-type FABP: E-FABP）は、表皮のみならず脳、肺、消化管、眼球、胸腺などに広く発現することがこれまでの我々の発現解析結果から明らかとなっている^{6) 7) 8) 9)}。今回の解析では、E-FABP の表皮における生理機能を明らかにするために、我々が樹立した E-FABP 遺伝子欠損マウス（E-FABP マウス）の皮膚における表現型を種々の観点から検討を加えた。WBF の測定からは、野生型に比べて著明な transepidermal water loss (TEWL) の低下が観察された。また表皮アセトン処理後の

TEWL の回復が野生型に比して遅延していた。皮膚の超微形態像、構成脂肪酸の測定結果、アラキドン酸に対する炎症反応には野生型と比して大きな差異を認めなかった。本研究結果から、E-FABP 分子の表皮 WBF への関与が示唆された。

2 実験

2.1 E-FABP マウスの作成

Fig. 1 にマウス E-FABP 遺伝子の構造と、E-FABP 遺伝子ターゲティングに用いたベクターおよび recombination 後の変異遺伝子の構造を示す。embryonic stem cell (ES cell) にターゲティングベクターを遺伝子導入後、陽性 ES クローンをサザンブロット法にてスクリーニングした。遺伝子組換え ES cell をマウス blast cyst に注入し、これを偽妊娠マウスの子宮に注入した。得られたオスキメラマウスをメス C57B6 マウスと交配し、得られたマウスの遺伝子型を確認することによりヘテロ接合型マウスを得た。雌雄ヘテロマウスの交配により得られたマウスを PCR 法およびサザンブロット法により遺伝子型を確認した。本研究で使用した野生型および E-FABP ノックアウトマウスはこの雌雄ヘテロマウスの交配により得られたものである。

2.2 サザンブロット、ノザンブロット、ウェスタンブロット

野生型、ヘテロ接合型、ホモ接合型マウスの皮膚を採取し、genomic DNA、total RNA およびタンパクを従って抽出し、それぞれ定法に従って解析した (Fig.1b)。使用したプローブおよび特異抗体の詳細は、発表論文の中で記載済みである¹⁰⁾。

2.3 形態学的解析

野生型および E-FABP マウスの背部皮膚を 4 % パラホルムアルデヒドにて固定し、凍結切片およびパラフィン切



Altered water barrier function in epidermal-type fatty acid binding protein deficient mice.

Yuji Owada, MD, PhD

Division of Histology, Department of Cell Biology, Graduate School of Medical Science, Tohoku University

片を作成した。パラフィン切片は、定法に従って E-FABP 特異抗体による免疫組織化学染色に付し顕微鏡観察を行った。凍結切片はエボン包埋後超薄切片を作成し、電子顕微鏡観察を施行した。

2.4 表皮 WBF の測定

ヘテロマウスの交配により得られたメス生後 10 週齢、野生型マウスおよび E-FABP ノックアウトマウスを使用した。transepidermal water loss (TEWL) の測定は、evaporimeter (ServoMed, Stockholm, Sweden) を用いてマウス背部の剃毛した皮膚で施行した。表皮脂質バリア除去前後の WBF の相違を評価するために、アセトンを綿球に浸して 2 分間皮膚に暴露し、暴露前と暴露後 30 分、2、4、12、36、48、96 時間後に測定を施行した。

2.5 脂肪酸成分測定

野生型および E-FABP マウスの背部皮膚をサンプリングし、クロロホルム・メタノール溶液にて脂質を抽出後、測

定はガスクロマトグラフィー (Hewlett-Packard Model 5890 gas chromatograph, Avondal, PA, USA) を用いて施行した。

2.6 Standard inflammation assay

生後 10 週齢の野生型および E-FABP マウスを使用した。マウス耳介皮膚にアラキドン酸溶液 (1 mg/10ul) を塗布し、塗布 1 時間後に microruler (Mitsutoyo, Kasugai, Japan) を用いて耳介皮膚の厚さを測定した。

3 結果

野生型、ヘテロ型、E-FABP マウスの皮膚におけるサザン、ノザン、ウェスタンプロットの結果を Fig.1b に示す。ヘテロ型では E-FABP mRNA およびタンパクの発現は野生型に比べて 50% に減少していた。E-FABP マウス皮膚では mRNA、タンパクの発現とも完全に消失していた (Fig. 1)。

E-FABP マウスは、肉眼的観察および皮膚を含めた各組織に対する顕微鏡的観察において明らかな発達異常を示さなかった。体重増加や生殖能にも大きな異常を認めなかった。

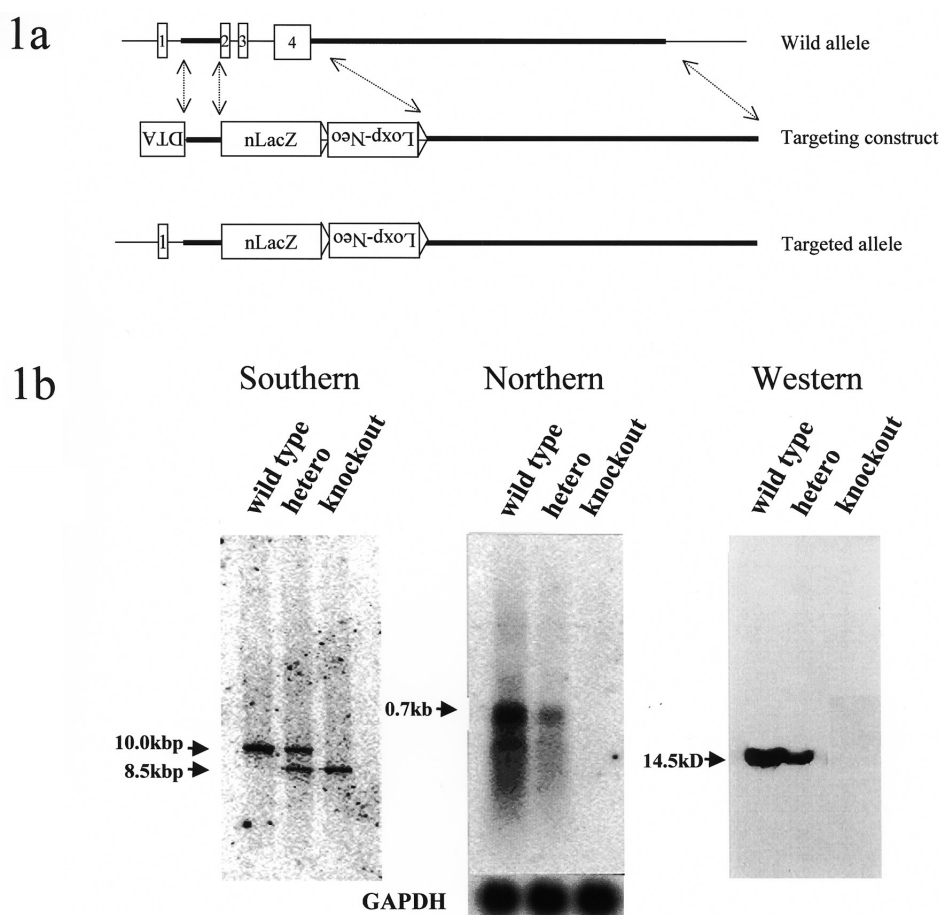


Fig. 1 (a) Intron/exon structure of murine E-FABP gene and representation of target construct. Homologies (bold lines) between targeting construct and genomic DNA, and the probe used for Southern blotting are indicated. (b) Southern blot of BamHI-digested skin DNAs from each genotype mouse. Northern blot of total RNA (30ug) from skins probed with labeled mouse E-FABP cDNA or GAPDH (glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase) cDNA as a loading control. Western blot of skin lysates with anti-rat E-FABP antibody. 10ug of protein from skins of each genotype mice were applied.

3.1 E-FABP マウスにおける表皮水バリアー機能の変化

野生型および E-FABP マウスにおけるアセトン塗布前後の表皮水バリアー機能の時間的変化を Fig. 2 に示す。アセトン塗布以前では、E-FABP マウスの TEWL 値は野生型に比して有意に低下していた。アセトン塗布後は、30 分、2、4、12、36、48 時間後の TEWL 値は有意な差異を認めないものの、36 時間後の TEWL 値は野生型ではほぼ前値に復しているのに対してノックアウトマウスでは回復の遅れが認められた。96 時間後には野生型、E-FABP マウスともほぼ塗布前の TEWL 値に復していた。

3.2 超微形態像

表皮ケラチノサイトの超微形態像をアセトン処理前後で

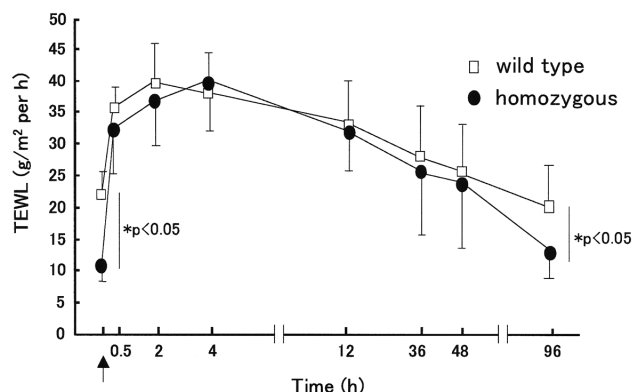


Fig. 2 Chronological changes of TEWL measured in the dorsal skin of wild type and homozygous mice following acetone treatment. The time of acetone application is indicated by an arrow, the values at this point represent pretreatment levels. Closed circles: homozygous mice, open squares: wild type mice. Statistical significance in a two-tailed Student's t test comparing homozygous and wild type mice is indicated by * ($P<0.05$, $n=6$).

Table 1 Constituent fatty acid of mouse skin lipids

fatty acid ^a	wild type	homozygous
	wt % ^b	
14:0	1.9 ± 0.15	1.8 ± 0.33
16:0	29.2 ± 0.17	27.9 ± 1.44
18:0	4.3 ± 0.47	3.4 ± 0.14
18:1	29.7 ± 0.71	29.6 ± 0.33
18:2	26.3 ± 1.16	28.2 ± 1.91
20:4	0.7 ± 0.08	0.8 ± 0.21
22:6	0.5 ± 0.06	0.6 ± 0.20

^anumber of carbons : number of double bonds,
^bmean values ± SD ($n=3$)

Table 2 Thickness of the ear after arachidonic acid treatment

	wild type	homozygous
control	1.1 ± 0.12 mm	1.0 ± 0.09 mm
1h after treatment	1.8 ± 0.16 mm	1.7 ± 0.14 mm

mean ± SD ($n=6$)

電子顕微鏡にて観察した。アセトン処理前の表皮顆粒層の電顕像は、野生型と比して E-FABP マウスとも大きな差異を認めなかった。層板小体の構造、数、分泌像とも明らかな差異は認めなかった。アセトン処理後の層板小体の分泌亢進も野生型との差異は認められなかった (data not shown)。

3.3 脂肪酸成分分析

ガスクロマトグラフを用いた皮膚の脂肪酸測定結果を Table 1 に示す。各種脂肪酸の構成には野生型と E-FABP マウスの間に有意な差異を認めなかった。

3.4 炎症反応

脂肪酸およびその代謝産物であるエンコサノイドは、皮膚の炎症過程に深く関与することが示唆されている。E-FABP 分子の炎症反応に対する関与を明らかにするために、野生型および E-FABP マウスの耳介におけるアラキドン酸誘発炎症反応の測定を施行した。耳介厚の測定結果は、野生型と E-FABP マウスの間に有意な差異を認めなかった (Table 2)。

3.5 心臓型 FABP (heart-type FABP: H-FABP) の発現増強

E-FABP マウスにおける他の FABP アイソフォームの代償的発現増強を評価するために、ノザンブロットを施行した。野生型では、E-FABP のみの発現が皮膚において認められた。

一方野生型では発現を示さない H-FABP 遺伝子は、ヘテロ型および E-FABP マウスの皮膚において発現増強を示すことが明らかとなった (Fig. 3)。

4 考 察

表皮の保湿や WBF については、角質細胞間の脂肪酸、

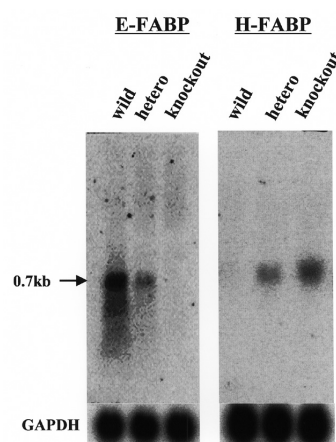


Fig. 3 Northern blot analyses of E- and H-FABP in the skin of each genotype mouse. Note the increased expression of H-FABP in the skin of heterozygous and homozygous mice of 0.7kb. As the internal control, the expression of GAPDH mRNA is shown.

コレステロール、セラミドなどの脂質が重要な役割を担っていることは既に知られているものの、これらの代謝・輸送に関わる分子の生体レベルでの研究は、いまだ数少ない。E-FABP はこれまでに、表皮 WBF 形成への関与のみならず、乾癬をはじめとする炎症性疾患への関与も示唆されている^{11) 12) 13)}。E-FABP の細胞生物学的特性（種々の脂肪酸に対する結合能、脂肪酸の細胞内取り込み、脂肪酸を介した情報伝達制御など）を考えると、我々が世界に先駆けて樹立した E-FABP ノックアウトマウスは、WBF 形成機構の生体レベルでの解明のみならず、炎症や細胞の分裂・分化などの解明に大きな貢献をするものと思われる。

ノックアウトマウスではしばしば欠損蛋白の機能を、他の構造類似蛋白がその機能を補完することが知られている。事実、既報の脂肪細胞型 FABP (A-FABP) ノックアウトマウスでは脂肪細胞において E-FABP の顕著な発現増強が観察されている¹⁴⁾。E-FABP ノックアウトマウスにおいても、皮膚、肝臓、腎臓などにおいて H-FABP の発現が著明に増強していることが確認された（一部未発表データ）。E-FABP と H-FABP は、FABP 分子ファミリーの中でも、蛋白構造や脂肪酸との結合能において高い類似性を有することが知られている⁵⁾。E-FABP ノックアウトマウスは、発達期を通じて明らかな形態学的異常を示さなかったが、この原因として H-FABP が E-FABP の機能を代償した可能性が示唆された。E-FABP の生体機能を解明するため、現在 E-H-FABP ダブルノックアウトマウスの表現型解析を施行中である。

E-FABP ノックアウトマウスで観察された WBF の変化は、1) 野生型に比べて basal TEWL が低値を示す。2) アセトン処理による表皮水分バリアーの破壊後に処理前値に回復する時間が延長する。の 2 点である。これらの原因については、E-FABP ノックアウトマウス皮膚の脂肪酸含有率の測定結果や電子顕微鏡による超微形態観察からはその原因を明らかにすることが出来なかった。詳細な脂質成分解析（リン脂質、セラミド、コレステロールなど）あるいは初代培養ケラチノサイトを用いた脂肪酸の取り込み解析などを現在施行中である。

(参考文献)

- 1) Landmann L: The epidermal permeability barrier. *Anat Embryol* 178: 1-13, 1988
- 2) Elias PM, Feingold KR: Lipid related barriers and gradients in the epidermis. Endocrine, metabolic and immunologic functions of keratinocytes. *Ann NY Acad Sci* 548: 4-13, 1988
- 3) Feingold KR: The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv Lipid Res* 24:57-82, 1991
- 4) Glatz JFC, van der Vusse GJ: Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res* 35: 243- 282, 1996
- 5) Coe NR, Bernlohr DA: Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1391: 287-306, 1998
- 6) Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H: Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brain. *J Chem Neuroanat* 12: 113-122, 1996
- 7) Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H: Increased expression of the mRNA for brain- and skin-type but not heart-type fatty acid binding proteins following kainic acid systemic administration in the hippocampal glia of adult rats. *Mol Brain Res* 42: 156-160, 1996
- 8) Owada Y, Abdelwahab S, Suzuki R, Iwasa H, Sakagami H, Spener F, Kondo H: Localization of epidermal-type fatty acid binding protein (E-FABP) in the alveolar macrophages and some of the alveolar type II epithelial cells in mouse lung. *Histochem J* 33: 453-457, 2002
- 9) Owada Y, Suzuki R, Iwasa H, Spener F, Kondo H: Localization of epidermal-type fatty acid binding protein (E-FABP) in the thymic epithelial cells of mice. *Histochem Cell Biol* 117: 55-60, 2002
- 10) Owada Y, Takano H, Yamanaka H, Kobayashi H, Sugitani Y, Tomioka Y, Suzuki I, Suzuki R, Terui T, Mizugaki M, Tagami H, Noda T, Kondo H: Altered water barrier function in epidermal fatty acid binding protein deficient mice. *J Invest Dermatol* 118 : 430-435, 2002
- 11) Yamaguchi H, Yamamoto A, Watanabe R, Uchiyama N, Fujii H, Ono T, Ito M: High transepidermal water loss induces fatty acid synthesis and cutaneous fatty acid-binding protein expression in rat skin. *J Dermatol Sci* 17: 205-213, 1998
- 12) Masouye I, Saurat JH, Siegenthaler G: Epidermal fatty-acid-binding protein in psoriasis, basal and squamous cell carcinomas: an immunohistochemical study. *Dermatology* 192: 208-213, 1996
- 13) Siegenthaler G, Hotz R, Chatellard-Gruaz D, Didierjean L, Hellman U, Saurat JH: Purification and characterization of the human epidermal fatty acid-binding protein: localization during epidermal cell differentiation in vivo and in vitro. *Biochem J* 302: 363-371, 1994
- 14) Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM: Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 274: 1377-1379, 1996

記念講演

●
平成13年度記念講演 井上章一
●

美人研究

国際日本文化研究センター

井 上 章 一

場所 (株)コーセー2階会議室

日時 平成13年11月19日(月)

I. 明治・大正の出版物に見る女性観

①教科書に見る

暫くお付き合いください。井上と申します。先ほど明治時代の女学校の教科書の話が予めいただいたと伺ったので、そのことを申し上げたいと思いますが、本当に明治時代の道徳の教科書には、美人には勉強ができませんと書いてありました。

驚くべき教科書には、こんなのがありました。「美人には勉強ができません。でも美人もがっかりすることはありません。あなたも心に醜い女の気持ちを持てば、学業はおのずと身につきます。」と書いてあるのです。これは大正時代のはじめ頃になります。そして恐らく、現在では顔の良し悪しによって人生がどのように変わるかという道徳の授業はもう無いと思います。では、何故明治期にあったのでしょうか。私は明治期には本当に美人は勉強ができづらかったと考えています。

一番端的な例を申し上げます。女学校には授業参観という制度がありました。といっても今のPTAの授業参観ではありません。その街の女学校の近隣在郷の有力者が、授業参観にきて、息子の嫁選びをするのです。もちろん当人と話し合ったりはしません。授業参観で決めますから、綺麗なお嬢さんから例えば未来の村長夫人にとか、未来の庄屋の奥様という風選ばれていくわけです。

このような制度の中で、女学校教育の5年間を無事最後まで全うした人はどうだったのでしょうか。明治時代の教育界用語に、無事卒業する人たちのことを、「卒業面」、「卒業するだらう面」という言い方で表現していた記録があります。「卒業面」を経験した人が師範学校へ進学されたわけですから、師範学校はどんな状況だったのだろうなんていう会話を始めると、ひょっとしたら皆様の中で、家の婆さんもそういえば師範出だったから…のような話になる

といけませんので、この話はこの辺りで止めておきます。

②警察出版物に見る

もう一点あります。大正5年に出版された『婦人と犯罪』という警察が出した出版物に興味を持ちました。恐ろしい研究です。大正5年に刑務所に留置されている260人の女の犯罪者を刑務所の取調官が、顔の良し悪しで美人の美・上・中・下・醜の五段階に分類していました。そして、この分類に際しては一人の取調官が行うと、その人の好みが出過ぎるので、複数の取調官で公平かつ科学的に分析したと書いてありました。なんの為にやったのかというと、放火犯は美・上・中・下・醜の中どの辺に多いのか、殺人犯はどうか、詐欺罪はどうか、ということを記録していった、女の人の犯罪の場合に、顔の良し悪しと犯罪の間にどのような因果関係があるか、ということ調べ上げた研究でした。今ではとてもできないし、できても公表はできないと思います。

戦前の刑法に姦通罪という罪があったのをご存じでしょうか。現在では、不倫といいますが、当時は不義密通といい、夫を持った奥さんが別の男と浮気をすれば、当時の刑法ではその人を姦通罪として訴えることができました。この不義密通を犯す姦通罪の女の人が美・上・中・下・醜のどの辺りにいたか、に関しても調べられており、中・下・醜という平均以下に集中していました。この結果に対して、刑務所の取調官は次のようなコメントを添えています。

「美人妻の不義密通に関しては、夫がその妻を失うことを恐れて、訴え出ないのでこういう結果になったものと考えられる。」

私はこの推測が当たっているかどうかは取り敢えず問いません。私にとって興味深かったのは、このような調査を警察が公然と行い、あまつさえ、出版物にしても、誰もなにも違和感を唱えない時代があったのだという事実です。

③表現の自由の流れ

私たちは中学校、高等学校で時代が新しくなるに従って、言論は自由になっていくと習いました。本当に言論は自由になったのでしょうか。先の事例のようなものをあからさまに書くことが良いこととは思いませんが、少なくとも、明治、大正期の文献を読む方が明け透けに好きなことを書



Historical changes of a feminine beauty's worth

Shoichi Inoue

THE INTERNATIONAL RESEARCH
CENTER FOR JAPANESE STUDIES

いています。この問題に関しては、現代の方が活字では自主規制を要請されることが多い。

これらの点から、私は美人、不美人というテーマについて活字で書いてもいいことと、いけないことの範囲は歴史的にどのように移り変わってきたのかを調べるのが、歴史研究になると考えたわけです。当然こういう研究ですから、いわゆる進歩的な女性学の人からは蛇蠍のように嫌われていますが、私自身は自分の興味に従って、そういうことを調べあげました。

宣伝めいて恐縮ですが、朝日新聞の文庫で『美人論』というタイトルで800円で出ています。興味がおありの方はご覧下さい。今日は、堅苦しくなるので、その内容については申し上げません。美人研究にまつわる、他のさまざまなことを申し上げようと思います。

Ⅱ. 美人研究への期待（の目）

①歴史美人の復元

「美人の研究」というと大概の方は時代によって美人の基準がどのように違うのかを調べるような仕事だろうと思われます。平安時代には引目鉤鼻がいいとされていた。江戸時代には細い目、小さいおちょぼ口がいいとされていて、現代とは全然違うといった歴史だと思われる人が多いわけです。

しかし、そういう歴史ではありません。私は、鎌倉期に描かれるような絵巻物の女の人、引目鉤鼻ですが、本当にあんな女の人がいたのだろうかという疑問をもっています。考古学の人に聞いても明らかですが、平安時代・鎌倉時代の人骨が出土します。その人骨を見てもあんなお結びみたいな顔をした人骨はありません。

当時はあれで美人を表現したつもりになっていたと思います。しかし、あれが美人の顔形そのものをストレートに本当に表しているといえるのでしょうか。江戸時代の鳥居清長、鈴木春信の浮世絵、確かにあの絵を皆は美人の絵だと思っていたのだと思いますが、あんな顔の人が本当に江戸時代にいたのでしょうか。あれは異様に長い顔をしています。あんな小さい口は現実にはあり得ないと思います。翻って、こういう風に考えてください。ちょっと古い話で恐縮ですが、僕はあまり漫画を見ることはないのですが、覚えている漫画に美少女戦士セーラームーンという漫画がありました。あれは美少女と謳っています。しかし、あんな顔の少女がどこに居るでしょうか。

もし何かの事情で日本列島が、海底に埋没して500年か600年後の、例えば、中国の図書館に美少女戦士セーラームーンの漫画が残っていたと仮定してください。そして500年か600年後の中国の学者が、5・6世紀前に太平洋に沈んだ日本列島では、20世紀末にこういう人が美少女と持て囃されていたという論文を書いたとしてみてください

い。明らかにこれは間違っています。

あのような非リアリズム絵画からは、美人の図像を復元することはできないと思います。「お互いにこういう人を美しいと思うようにしましょう」という時代の約束事は読み取れます。しかし、美人そのものの図像が、ああいうものから復元できるとは思えません。ですから、私は美人の姿がどのように移り変わってきたのかという研究はしません。

②美人の産地

あと一つ、「秋田美人、新潟美人は本当のところどんな風に綺麗なんでしょうか。」等という話を伺うことがあります。私はその手の問題にもあまり興味は持っていません。以前、私が『美人論』という本を書いた時のことですが、東京のあるテレビ局の方が興味をもたれて、私のところに質問に来られたことがありました。

彼は仙台出身の人だったんですが、「仙台は日本3大不美人の産地だ」といわれている。だが、仙台生まれの自分としては、この評判に納得ができない。仙台出身者でも、これだけ綺麗な人がいるんだ、ということを番組でアピールしたい。ついては、仙台出身の美人についての情報を何か貰えないか。」という取材でした。

私はそもそも、仙台が「日本3大不美人の産地だ」と言われていること自体を知りませんでした。ですから彼にはこういいました。そんな番組は創らないほうが良い。そんな番組を創ったら、視聴者の多くは「仙台は3大不美人の産地だったのか」という方を学習してしまうとアドバイスをしました。しかし、私は仙台のことはどうしても良かったのですが、一つどうしても気になることがあって「あのすいません、他の2つは何処ですか？」という質問を抑えることができませんでした。彼の言うことをそのまま真に受ければ、他の2つは水戸と、もう一つ名古屋だと言われました。

しかし、私が調べたところでは、名古屋は明治時代には美人の産地として大変有名だった場所です。今は週刊誌類によれば、「名古屋を3大不美人の産地に挙げる」という風潮が多いのですが、明治期には名古屋は美人の産地でした。それも、新潟や秋田などを遥かに凌駕する評判を獲得していました。

嘘ではありません。例えば、新橋の芸者の置屋は自分の店に名古屋出身の女の人がどれだけいるかということを自慢していました。名古屋ヘリクルート部隊を派遣している置屋もありました。極端な例になると、お互いの置屋同士「あんたの店に居るのは本当の名古屋女と違う、岡崎の女やないか。名古屋といいくるめるな…」といった批判のしあいもあったようです。

また、永井荷風という作家が、名古屋美人についてのエッセイを書いています。その中で、こんなコメントを残し

ています。「名古屋美人なんか、たいしたことはない。彼女たちはただ顔形が美しいだけだ。」そのこと自体は認定されていたのです。ところが何時の間にか「日本3大不美人の産地」というレッテルが横行するようになりました。

このレッテルの変化をそのまま、真に受ければ、名古屋の女の人はここ100年の間に器量が急降下したことになります。これを真に受けていいのでしょうか。私はそうは思いません。要するに無責任なマスコミのレッテルが時代の風の流れを受けて右往左往しているだけだと、そう考えたほうがいいと思います。こんなものに根拠は全くないと思います。

秋田美人という単語が出現するのは、私の見た範囲では明治20年代です。それ以前に、秋田美人という単語はありません。明治20年代が最初で、言い出したのは秋田の花柳界です。恐らく、私の憶測ですが、国土開発の重点が、どんどん太平洋側に移り、次第に取り残されつつあった日本海側が、起死回生の町興しのイメージ戦略に打って出たときに、「うちには美人がいる」ということをアピールするようになったのだと思います。それが日本海側に点々と続く美人連鎖になったのではないのでしょうか。

もう一つ事例をお話します。1980年代の前半のことですが、女性団体がミス名古屋コンテストの粉砕に乗り出したことがありました。ミス名古屋コンテストを、名古屋市役所が後援という形でバックアップしていたのですが、これに対して地元の女性団体が批判の声を挙げました。税金を使って美人選びをするのは許せないというのが批判の主な論点だったと思います。これに対して、私は本当に感動したのですが、毎日新聞の名古屋版の紙面で、名古屋市役所の担当者が弁明をしていたのです。「ミス名古屋はいわゆる美人選びのコンテストではありません。それは歴代のミス名古屋をご覧になっていただければ判るはずです。」

これを見て、私はちょっと考え過ぎかもしれませんが、個人的な感想として次のように思いました。もし、「いわゆる美人選びではありません」というような美人コンテストで選ばれた方が名古屋代表として各地の見本市、各地の物産展に行って、名古屋の商品をアピールされるとしたら、他の地方の人は、この人が名古屋代表なのかという疑いの目で見るとはならないだろうか。そして、その累積が「名古屋の日本3大不美人産地」説になったのではないか。いずれにせよ、この手の何処そこ美人とかいうようなレッテルに科学的な根拠はないと思います。ですから、私はこういうのも調べようとする気が起こりません。

Ⅲ. 私の美人研究

①法令が示す価値評価

今、調べだしているのは顔の値段です。顔の値段、女の人と男の人が顔に怪我をしたときに、弁償金額にどの位の

違いがあるかご存じでしょうか。自動車損害賠償保障法の条文に、体の各パーツの値段が書いてありますが、それに対比すると同じような顔の怪我で、女の人は約4ないし5倍の弁償金を貰うことができる所にランクされています。基本的人権の平等とか、男女の平等という観念は、何処にいったのだろと思うられる方も多いと思います。しかし、杓子定規な平等論抜きに考えれば、私は実感として、そのぐらいの差があるのは無理もないだろうと思います。

ちなみに、女の人の顔に直径7センチメートル以上に亘る痣が残った時だったと思いますが、弁償してもらえる金額が、男の怪我では何に該当するかという、そんな一覧表があります。7センチメートルの痣に該当する男のパーツとして睾丸が明記されていました。お判りいただけるでしょうか。現行の日本の法律では女の顔と男のなにか同じ値段にカウントされているのです。私は男ですから、あまりに男のなにかに対して気の毒な値段ではないかと思います。「顔は女の命だ」という言い方はあります。しかし、男のなには本当に命に拘わるではありませんか。

これを例えば、世界各国の法律で比較するとしましょう。男の睾丸喪失に該当する弁償金で女の人の顔は世界各国それぞれ何センチだろう。それを比較することによって、日本の法律は男のなにと女の顔を、どのように評価しているのかということがグローバルスタンダードの中で考えられるのではないのでしょうか。ところで、こんな研究をして、この財団から援助金が貰えるのでしょうか。多分笑われるだけでしょうね。私はこういう研究を面白いと思っていますが、さすがにすぐにブラジルの法律書を取り寄せる気になるかどうかは判りません。日頃、法学系の留学生をつかまえては、このような質問をしています。知りませんと答えるのが常で、現実的にはよく判っていません。

②逸失利益訴訟に学ぶもの

②-1 ルックス評価の変遷

次に、逸失利益問題ということに触れたいと思います。逸失利益というのは、例えば交通事故で腕の機能が全く麻痺したとします。「もう右腕が使えなくなった。利き腕が使えなくなった。自分が今している仕事に差し障る。今後自分はまだ30年ほど働くつもりだった。この30年の間に総賃金がこれだけある筈だった。だけど、この右腕の機能障害のお陰で、その期待される筈の総収入が何割か減ってしまっている。その減ってしまった分を保障してくれ。」という訴えを逸失利益訴訟といいます。これを顔で起こされるケースがままあります。

例えば、ものすごく卑近な話ですが、「私は何処そこ大学を出た。あるいは出る予定になっている。だけど、理科の実験で、だれそれ君の失敗で顔に薬品がかかって、ものすごい痣が残ってしまった。就職の面接の印象が悪くなる。

私の学歴なら当然このぐらいの会社に入れた筈なのに、この怪我のお陰でこのぐらいの会社にしか入れなかった。年間これだけ差がある。これが後40年続いたら、これだけの損害になる。これを弁償してくれ」という訴えを顔で起こされるケースがあります。

こういう訴訟は1980年代中頃までは、基本的に却下されていました。裁判所は女の人の顔の良し悪しと労働能力の間には因果関係がないという立場を採っていました。これは70年代より前、60年代位ですとキャバレーのホステスさんでも却下されました。

顔に痣が残ったので、もうホステスとしては働けない。ホステスさんは一般女子事務職員より収入がいいですから、その分保障してくれ、という訴えを起こす側の気持ちは判りますが、それは却下なのです。何故かといえば、顔を怪我しても酒を汲むことはできる、酒を運ぶことはできる、何ら労働に支障はきたさない、だから却下だったので。ファッションモデルの方が顔に怪我をしても却下でした。新しい服を着て舞台を歩くのに、顔の怪我は全然かわらない筈だということです。昔の裁判所はルックスの価値を認めなかったのです。

ところが70年代から顔も値打ちがあるということを認める判例が増えだします。そして、80年代後半に入ってから、女子高校生、女子大学生の就職の面接の印象が悪くなるので、生涯賃金が減るという訴えを認める判例もではじめています。今、法廷は女の人の顔には労働能力と商品価値があるということを認める方向で進んでいます。

これに対し面白いことは、昔の新聞の求人欄には「求む容姿端麗」という広告がたくさんあるということです。私は昔の大正時代の求人欄に、電話交換手の募集欄に「求む容姿端麗」と書いてあったのを見て、「何で電話交換の人に容姿端麗が必要なんだろう」と笑ってしまいましたが、もう容姿端麗というのが紋切り型になっていたのだと思います。

しかし、1970年代になると、「容姿端麗を求む」という言葉は書きづらくなり、男女雇用機会均等法以降は書いてはいけない文句になりました。美人が欲しいなどということを、会社がぬけぬけと言ってはいけないという倫理はどんどん強くなっているのです。にも拘わらず、女の人が顔に怪我をしたら、「それは災難だ」ということを認める判例も増えているのです。美貌は求めるなというプレッシャーと、やっぱり顔には値打ちがあるという判例と、全く相反するかのような事態が、2つ進んでいます。今後は、この2つをどのような対応関係で捕らえればよいのかというテーマを、歴史に即して調べていきたいと思っています。

②-2 ルックス評価の基準（法理と現場）

私が調べている途中で見つけた、面白いと感じた話をさ

せていただきます。昭和48年に新潟地方裁判所でキャバレーのホステスに対する面白い判決がでました。ホステスさんが顔に怪我をして、痣が残ったのです。そこで、私は毎年これだけ稼いでいた。だから生涯賃金これだけ弁償してくれ。という訴えなんです、50、60歳までホステスさんとして働けたらどうかと裁判所も考えないわけです。

そうすると裁判所はキャバレーのホステスさんはその容姿、ルックスを武器にして何歳くらいまでなら、収入があると考えたらいいかという計算しなければならないわけです。この裁判では「キャバレーのホステスさんがその容姿をもって収入の糧とすることができるのは、38歳を以って上限と考えることが妥当だと思われる」という判決がでました。

一体なにを基準にして、この38という中途半端な数字がでるのでしょうか。私には、全く理解できません。翌々年の東京地方裁判所では30歳という判決がでました。そして、昭和58年になってファッションモデルの判決が大阪でありました。

「モデルの容姿のピークは16から25迄で以後漸次減退し、35歳で消滅すると考えられる」これは、判決文そのままです。品が悪い言い方ですが、なんとなく30台半ば辺りが現行社会での平均値なんだとは思いますが、判例によって年齢が違うという事情は私には理解できません。

そこで一寸考えてみました。お互いに裁判の中で、仮にこれだけしか弁償できないという金額がもう予め決まった。だから被告と原告の間で妥協が成立している。しかし、裁判は進行しているので一応判決文は出さねばならない。その払える限界から年齢を逆算しているのではないかと考えたのです。これは法律の専門家に、「違いますか」と聞いたところ、「顔による逸失利益なんて、もともとアバウトなものだから、38とか35とかいう細かい数字に拘わる必要は全くない筈だ」と言われました。では何故そんな数字になったのかということは、いまだに解せません。

あと一つ気になったことがあります。兵庫県の西宮市で、ある家庭の奥さんが、道路工事中のパワーショベルに接触して顔に大怪我をされました。その裁判記録を見ていて愕然としたのですが、原告側弁護士が法廷で、この奥さんは怪我をされる前はすごく綺麗だったということを弁舌しているのです。これが私にはものすごく引っかかりました。いいですか、もし彼女が綺麗だったということが仮に論証されたとして、それで保障金額は違うんでしょうか。確かに綺麗な人だった、だからこれだけ弁償しますとか、あなたは元々たいしたことないから、この程度で辛抱しなさいとか、そんな判決があり得るでしょうか。これこそ基本的人権の平等に悖りますよ。しかし、その弁護士は法廷で綺麗な奥さんだったということを力説しているわけです。

私は伝手を辿ってその弁護士を探し出して、会いに行き

ました。弁護士さんは、その奥さんが怪我をされる前の写真を引き伸ばして、パネルに貼って、法廷に持ち込んだのです。そして、「こんな綺麗な人が怪我をさせられたんですよ」と弁舌したのです。「それで保障金額は違ってきますか」と聞くと、「逸失利益は変わらないと思うが、慰謝料の算定額は若干違って来る筈だ」と言われました。要するに裁判官の心証形成にかなり有力なジャブになると彼は言うのです。本当ですかと聞くと、「いや自分の同業者も同じようなケースを扱うときには自分と同じように振舞う筈だ」と、彼はそう言っていました。それは差別ではありませんかと聞いたら、こう返されました。「確かにやや差別的なところはあるかもしれない。しかし、自分は法廷闘争を戦うために雇われたプロだ。プロは雇い主の利益になることなら何でもやる。それがプロというものではないか」と言われたのです。

奥が深いというか、いろいろな考え方があると思いながら、京都大学の法学部にいる民法の不法行為を専門にしている友達に、どう思うかと聞いたところ、彼は「その弁護士は決定的に間違っている。いまの裁判官はそんなことで心証を左右される筈がない」と怒り出しました。しかし、現場の弁護士は皆そうすると言っているのだが、と言うと「自分が説教してやるからつれて来い」とまで言い出したのです。とにかくアカデミックなフィールドでは、そういう差はないことになっていると思いますが、現場の弁護士の中には綺麗な人はやはり得をすると考えている人もいます。しかし、もし仮に差をつけていたとしても、差をつけているとは言うわけがありませんから実態は判りません。

いずれ「ルックスの商品化」という問題、「ルックスの金銭的な値打ちに関する歴史」はいずれキチンと追いかけていきたいと思っています。さきほど、現行では女の人が約4,5倍になっていると言いましたが、大正時代の工場法を見ると女の人が約2倍です。男女の顔の値打ちの格差は男女平等が喧伝される現代社会の方がむしろ強くなっています。こういう問題はどうか考えたいのではありませんか。恐らく女性史の研究者は、この手の問題を無視すると思いますから、私がしっかり考えてみようと思っています。

③男の本音と建前

私が何故このようなことに拘わるようになったのかと言うと、若い頃に建築の勉強をしていて、建築評論を書いたりすることがままありました。そしてある時、雑誌社から竣工建築の評論を頼まれて建物を見にいきました。出来上がったビル自体は設計した建築家のスタンドブレイが鼻につく建物で、見た瞬間にいやだなと思いました。つまり、竣工写真が建築雑誌に載ったときの見てくれ以外の何も考えていないという様子がありありと伝わってきて、「自分

が目立ちさえすればいいのか」といういやな感じがしたわけです。壁の捻じ曲げ方とか、天井のエッジの切り方とか、いろんな所になんと嫌らしい、という思いがしたのですが、受付のお嬢さんがものすごく素敵な人で、私の好みの人だったのです。

お昼頃にいていたのですが、ガラス窓とかを指しながら、「夕日はどの辺まで見えますか。」などと質問をしました。彼女も自分の勤めているビルの悪口は書かれたくないと思って「この辺までくるんですよ」などと親切に答えてくれました。それで、私は1週間くらいは幸せな気分になっていたのです。

そして、原稿用紙に向かうときに編集部からは「建築空間の味わいを感じたまま素直に書いてください」という注文を受けていました。したがって、私が本当に素直に書けば「つまらない建築だけど、受付のお嬢さんは素晴らしかった」と書くべきだったと思うのですが、なにものか得体の知れない力が私に命令するわけです。「おまえは本当のことを書いたらダメだ、絶対嘘をつけよ」と命令するわけです。そして、わたしは嘘の作文をするわけです。「建築家の斬新な工夫、創意に満ち溢れたなんとか」という嫌らしい作文をするわけです。私はそこで自主規制したわけです。権力の軍門に下ったわけです。

それからです。「一体誰なんだ、私に嘘をつけと命令する、この得体の知れない力は」という疑問から、面喰いを抑圧する倫理の歴史的起源を遡及するという研究テーマに至ったのです。

④ミスコンに見る美人の本音

『美人論』という本は、そのための本でした。これはどういう人が美人なのかをさぐった本ではありません。美人及び美人を取り扱う社会の在り方が歴史によってどのように左右されているかということを研究したものです。そういう仕事に目をつけたのは、私は建物を見に歩く時、横を通っている女の人に目が向かうことがよくありますが、そういうことの積み重ねです。

実を言うと恥ずかしい話ですが、十数年前、『美人論』を出す直前だったと思いますが突然電話をいただきました。「ミス京都の事務局ですが、井上さんは美人の研究をやっておられると聞きましたが、そうですか」と言われたので、「誰から聞かれたのかな」とは思いながら、「ハイそうです」と答えました。すると次に、彼は「まことに僭越ですが学問的なお立場から、私どものコンテストに審査員として参加してはいただけませんか」という依頼をされたわけです。

こんなものに学問があるのでしょうか。そうは言っても、人間には愚かな部分がありますね。正直に言いますが、私はその話を聞いて胸が高鳴りました。しかし、いきなり「ハ

イ受けます」と言うのは恥ずかしかったので、「あまりに突然の申し出で困惑しています。暫く考えさせてください」という嫌らしい答弁をしました。そしてその後、何故あの時、「ハイ判りました」と素直に答えなかったのかと悔やみました。しかし、10日後くらいに「お考えいただけただしょうか」という電話をいただきました。

行かせていただいて感動したのですが、舞台にレオタード姿の30人のお嬢さんが並んでいらっしゃいました。私は、いわゆるエントリーナンバーという8番目の方と20番目の方がカッコいいなと思い、隣にいる審査員の方達に、その話をしました。そして、私、その隣、またその隣の3人くらいで8番、20番という盛上りがありました。

多分下品な会話をしていたのではないかと思います、西陣の和服でサントリーのコマーシャルに出て、あとで有名になられた市田ひろみさんという方がおられて、僕のことを肘でつつかれました。助平親父の会話がたしなめられるのではないかと、思ったら違いました。市田ひろみさんは、こう言われたのです。

「あなた達は誤魔化されたいけません。あの2人はミスコンあらしです。私はこういうコンテストでしょっちゅう審査をしています、あの娘達は毎回来てますよ」

そういわれて、私は中年男の純情が一寸崩れたような気分が漂ったりもしたのですが、市田さんは質疑応答の時に、ものすごく意地悪な質問をされたのです。

20番の娘にたいして、「あなたは今までに、こういうコンテストに出たことがありますか」。ありますかと聞くまでもありません、知っておられるのですから。聞かれたほうも「知ってるくせに、なにが・・・」と思われた筈なのですが、彼女は全然表情を崩さずに、本当に可愛らしい声で、「ありません」と言い切りました。ここで、「そうです私は常連です」と言ってしまうと、会場中に、なんだという気分が漂うわけです。ここは嘘をついても、白を切ったほうが得だと瞬時に判断されたのだと思います。

私は国会の証人喚問でも、もう一寸おたおたしている議員は居ると思うのです。例えば、自民党の修羅場を潜ってきた宮沢喜一さんでも一寸オロオロしていらっしゃったように思います。ああいう場所で、二十歳過ぎの女の娘に堂々たる白の切り方があるとは思いませんでした。これは社会勉強になりました。その後の審査委員会で、嘘を着いたということを問題にする人はいたのですが、他の娘を選んだら会場が納得しないだろう、ということで、8番と20番の娘がミスと準ミスに輝きました。ミスになった彼女にも、「どうせ私のものだ」という自信もあったのだと思います。

その2、3週間後に京都で出されている、リビング京都という新聞（サンケイグループ）に、ミス京都の話題が載っていました。ミスの賞金は10数年前の当時で50万円とロサンゼルス1週間、スポンサーのコスチューム、その他、

いろいろ貰えるのです。3時間、舞台でニコニコしていたら、50万円がボンと入ってくるわけですから、あの娘達はミスコンあらしを止められないと思います。しかも、さらに推薦制度というのがあって、ご両親でも、友達でも、親戚でも、誰でもいいのですが、1位になった人を推薦した人は5万円、準ミスを推薦した人は3万円貰えるのです。そして、ミスとなった8番の方の「偶然だけれども準ミスに選ばれた誰某さんとお互いに推薦し合っていたので、推薦料まで貰えることができました」という談話が紹介されていました。これは私にとっては社会勉強でした。これはなにも事情を知らない人がそこだけ読むと、「綺麗な娘同士のお友達なんだな」ですみませんが、多分各コンテストをあらしていく間に、お互い顔見知りになって、「私、次はあれに出たいと思うけど、あなた私のこと推薦してくれない?」「じゃ、私も出るから、あなた私のこと推薦しておいて」のようなことが続いたのではないのでしょうか。この8番の方は、翌年「クィーン神戸」に輝かれたのです。

⑤美人の処世術

私は、世の中はそんなものだろうと思う一方で、フェミニズム的な観点ではなしに、なにかやはり、ずるいのではないかという義憤のようなものを抱いて、あるモデルクラブをやっていたら質問をしました。

彼女はミスのタイトルを9つ持っておられ、大変綺麗な方ですが、その方に聞くとこう言われました。「コンテストの会場に行くと、今日のライバルが誰かというのは直ぐ判る。ああ今日はあの娘との戦いだ。舞台が暗転して、準ミスを今から発表しますというアナウンスがあって、その娘にスポットライトが当たった瞬間に、私は勝ったと思う」そして、「企業などが主催するイメージガールですと、割とユニークなところが評価されたりするんですが、地方自治体がやる富士山とか天橋立を選ぶような凡庸な美人コンテストではこの予想は外れません」と言われました。

それだけの自負心を持った彼女に私が初めてあるパーティでお会いした時に、たまたま移動でタクシーと一緒に乗せていただくことになりました。そして、夕日が当たった横顔が本当にクラシックというか、古典彫刻のようなノーブルな感じがして、私は滅多にそんなことを言わないのですが、「やあお綺麗ですね」と申し上げたら、「私は自分のことをそんな風に思ったことはありません、でもありがとうございます」と返事をされて、綺麗だけでなく、謙虚な良い人だと思いました。その人が実はコンテストに行けば、今日は誰が敵か判ると本音で思われる人なんです。

そこから、私はこんな疑問を持つようになりました。美人の方で「お綺麗ですね」と言われて、「ええ、私綺麗でしょ、皆様がそう言われるのです。もう私、聞き飽きてしまいました」と言われる人が、果たしてどれだけいるのでしょうか。

大概の人は「いいえ私なんか」とか、或いは「お世辞でもありがとうございます」とか、できるだけ穏便に処理されるようになります。

⑥フィールド調査と新たな課題

この時、美人の方たちは一体何歳くらいから、なにを切っ掛けに、自分は美人なんだという自覚を持つようになり、私は自分のことを綺麗だと思っているけれど、この自惚れはあまり人前に出さないほうが良いという風に、処世術を学習していくようになるのだろう、という疑問を持ったわけです。

このテーマで以前、大阪にある関西テレビの番組に協力をいただいて、実験というものをしたことがあります。大阪で活躍しておられるモデルのお嬢さん10数名にスタジオに集まっていただき、「あなたは何歳くらいから自分のことを綺麗だと思うようになりましたか」という質問をしたのです。

これは録画でしたからいくらでも時間を使えたのですが、皆が「いいえ、まさか私なんか自分のことを綺麗だと思ったことはことない」と、そういう鉄壁の防御が約2時間続きました。レポーターの方も「そんなに綺麗だと思ったこと

がないのなら、何故モデルになっているんですか」という突っ込みをしそうな状況だったのですが、「まあそんなに性急にならないで…」と、なるべく穏便に聞くのに2時間かかりました。

2時間目に一人の女の娘が、実は中学校の時に皆と一緒にに行った修学旅行で、クラスメートと撮った記念写真を見た私の友達のお母さんが、「この娘ものすごく綺麗ね」と言っていたと、その友達に言われました。私は胸騒ぎがして、家に帰ってその記念写真を改めて見て「うん、確かに皆より勝ってる」と思いました。それが最初ですという、この一言で約2時間守り続けられた他の方の堤防も音を立てて崩れていったのです。後はもう、ほんの10何分も経たない間に美貌自慢の洪水みたいに、私は、私は、私はという状況になりました。

「美人は2時間は嘘をつく」というのが私の社会勉強だったのですが、私はこれにも歴史があると思います。自分の美貌を自覚することが、社会的にどの程度認められるのかというメンタリティの歴史的な推移も、本当に精密には辿れないとしても、いくつかの文献記録から、ちらほら見えてきているような気がしています。いずれ時間があれば、そういうことにも挑んでみたいと思っています。

コスメトロジー研究雑感

平成 11 年度 研究助成

私のコスメトロジーと研究

野村 正人

私が現在の研究テーマに関与するきっかけは、1989 年に米国・カリフォルニア大学バークリー校に留学し、そこで知り合った研究員との交流であった。留学先で何か新しい研究テーマを構築することに重点を置いていたことから、自然界に広く存在する植物から得られる化学物質を化粧品配合剤で、しかも重要なファクターの一つである美白剤としての利用を目的とした研究を始めた次第である。その時期に貴財団の研究助成を頂くことができ、大変感謝しております。私の専門領域は天然物有機化学ですが、ビタミン、ホルモン、抗生物質のような医薬品などの開発で重要なだけでなく、新しい種類の性質や構造を示す化合物の発見あるいは合成可能な情報を提供できる有機化学として意味深いものがあります。また、生物活性物質の化学構造と生理作用の関係を研究する上でも非常に役立つ場合が多い。一方、古くから植物の精油が美容健康などを目的とした化粧品原料として用いられており、最近では薬理効が明らかにされることにより重要性が増大している。また、経皮吸収とその消長ならびに皮膚表における理学作用などにおいても絶対的な安全性が求められている。一

的に皮膚をして吸収される精油はグルクロン酸と複合して排出されるので、体内に蓄積されることはほとんどないものと考えられている。このような観点に立ち、私は現在の日本ではお茶と同様、毎日の食生活に欠かせない存在であるコーヒーの生豆中に含まれており、精神の安定をもたらす原因物質の一つであるクロロゲン酸から得られる数種の分解生成物および合成した化合物にチロシナーゼ阻害活性、活性酸素消去効などが存在するのではないかと思い、本研究を行った。実際に進めると、環境破壊にともなう増加する紫外線の影響を無視することができない現状を再認識することができた。同時に、消費者のニーズの中心はやはりできたシミ・ソバカスを取り除くことができないかという声を聞くことがあり、紫外線に対する意識や美容効に対する期待度が新しい素材開発に大きく反映していることを認識することができた。今後、美白化粧品に対する消費者のニーズは化学物質の安全性はもとより、高い効・効能が求められ、我々としてもより多くの生物実験を行い、それらから得られるデータを評価し新しい美白成分として確立できれば幸いと思っています。（近畿大学工学部）

平成 11 年度 研究助成

美しさの価値観とコスメトロジー

木野 邦器

先日、日本を代表するファッションデザイナー川久保玲を取り上げたテレビ番組を観た。彼女は、世界のファッションの情報発信源であるパリコレでも常に高い評価を受けている注目の人である。番組では彼女のファッションにおける美しさへの限らない探究心と、それを具現化しようとする挑戦的な取り組みを追っていた。

彼女の作品は 常の「美しさの常識」からかけ離れたデザインを基調としており、従来の「美しさの常識」に敢えて反抗しているような気さえた。美しいものに接すると精神的にもそれなりの安らぎを感じるものだが、彼女の提示するアンバランスなデザインに私は安らぎを感じることはなく、むしろ違和感さえ覚えた。しかし、常の美しいと思えるものとのギャップがむしろ観る人にドキッとするような強烈な印象と緊張感を与えているのは事実で、著名な

振付師やデザイナーなどが彼女の作品を絶賛しているのは、そうした彼女の攻撃的な問いかけを評価しているからかもしれない。

美しさを演出する手段としては化粧品も同様である。美しさに対するコンセプトや価値観は、確かに時代や社会を反映して流動的で、一部は意図的に作り出されているものもある。一方で、美しくなりたいとする願望は、見かけの美しさではなくその本質を探り出そうとする観点からの化粧品開発にもつながっている。例えば、肌の老化のメカニズムを生理的な から解析するアプローチがとられたり、癒し効を狙ったり、気持ちを高揚させることで生き生きとした若々しさを内 から滲み出すためにはどうしたら良いかなどが多 的に検討されている。こうした考え方は、今後さらに強くなるであろう。

価値観の一元化がなされようとしている現代において、個性をどのように維持し表現するのかは大きな課題であるように思う。その補助手段としての化粧やファッションの役割はとても大きい。

「もっと美しいものはあるはず」という川久保玲のこだわりが、新しく強い服を創出する原動力になっている。美

しさの本質とは何であるのか、現状を良しとせず異なる観点から常に見直す姿勢の重要性と価値観の多様性を考えさせられる番組であった。

美しさを探求する Cosmetology のさらなる発展・進化を期待してやまない。
(早稲田大学理工学部)

平成 12 年度 研究助成

環境問題と老人介護

小林 達彦

はずかしながら、Cosmetology という言葉をはっきりと意識したのは、貴財団の研究助成公募案内を拝見してからであります。日頃から男性用化粧品など使ったことがない私にとって、身近に感じる唯一の？化粧品は日焼け止めクリームくらいでしょうか。といっても、学生の頃はほとんど1年中、川でカヌーを漕いでいたため、いつも真っ黒で、日焼け止めを塗る必要はほとんどなかったのですが、川では珍しい女性のカヌーイストはやはり日焼け止めをしっかりとされているようでした。最近、環境がキーワードとしてしばしば取り上げられますが、ホテルのプールなどでは、日焼け用オイルや日焼け止め用オイルは前もって落としてから利用して下さい、云々、の掲示が出されております。近い将来、海で泳ぐ場合にも当てはまるようになるかも知れません（最近では川で泳ぐ人はほとんど見かけませんが、流れのままに泳ぐのも気持ちがいいものです）が、環

境に優しい化粧品も既に開発されているのでしょうか？

Cosmetology をもう1つ意識するようになったのは、つい先日、妻からお年寄りの介護の話を聞いてからです。特に女性のお年寄りの方に口紅やマニキュアなどの化粧をしてあげると、とても喜ばれ、生き生きとされるようです。お年寄りの身の世話をするのは周りの人にとって大変なことで、化粧まではなかなかできないのが現状だと思います。また、その後は、化粧品を落としてあげる必要があるのですが、ケアされる方は益々おっくうになりますが、簡単に落とせる化粧などが開発されるようでしたら素晴らしいと思います（もし既に開発されているようでしたら、すみません）。数年前までは我が国で茶髪がここまで広く浸透するとは思いませんでしたが、思いもかけないCosmetology 商品が21世紀には開発されることと思います。

(筑波大学応用生物化学系)

平成 12 年度 研究助成

無邪気でいられない日焼け

増井 敏行

紫外線がシミやしわの原因となる「美容の敵」といわれるようになって久しいが、小生が子供の頃は真っ黒になるまで外でよく遊んだものであった。夏の暑いときには上半身裸などはざらであった。ところが今ではこれはとんでもないことである。

紫外線は放射線と同様に、細胞内のDNAを直接傷つける。ほとんどがすぐに修復するが、日焼けがひどいと修復しきれずに傷ついたままの細胞が残り、その損傷が何十年か後にやがてガンを引き起こす可能性が高くなるのである。さらには、生涯に浴びる紫外線の量が同じ場合、子供

の頃に浴びた量が多いと皮膚ガンになる可能性がより高くなるということも最近わかってきた。

オゾンホール拡大傾向はよく知られた事実であるが、気象庁の発表によると、北半球における有害紫外線も70年代にくらべて4～7%増えており、日本でも紫外線照射は増える傾向にある。黄色人種は白人に比べ皮膚ガンの割合が少ないものの、30年前に比べ皮膚ガン患者が非常に増えているのが実情である。

皮膚科医たちによって現在最も推し進められている予防策は、紫外線が多い時刻はなるべく外に出ず、出来るだ

けつばの長い帽子をかぶり、日焼け止め化粧料をつかうことである。ここ2～3年の間に、子供向けサンケア商品が発売され、市場をのぼしているようであるが、幼稚園や保育園にう子供を持つ母親のなかで日常的なサンケアの必要性を感じている割合はおよそ半分であり、十分に認知されているとは言い難い。たしかにバラエティー番組やCMをみても、成人女性をターゲットとしたものばかりのよう

である。市場規模拡大の意味も含め、化粧品メーカー側も「親子で紫外線予防」のようなキャンペーン展開をはかってみてはいかがだろうか。

無邪気に外で遊べた時代が終わり、うまく太陽とつきあっていかねばならない世の中となった今、紫外線遮断剤の研究はきわめて重要である。心して研究に勤めたい。
(大阪大学大学院工学研究科)

平成 12 年度 研究助成

コスメトロジー雑感 白井 誠之

このたび、コスメトロジー研究振興財団より研究助成をいただきました。本助成金により多くの結を出すことができました。また財団から本研究が選ばれたことが大変な励みとなりました。心からお礼申し上げます。

私は東北大学で合成粘土の研究をしています。粘土は板状の層状化合物で、陽イオン交換能と膨潤能を有しており、これらの性質を利用して、様々な分野で用いられています。例えば、化粧品分野では、板状構造とイオン交換能を利用した洗浄剤（石鹸、練り歯磨き、シャンプー、シェービングクリーム等）、膨潤作用とイオン交換能を利用した保湿剤（泥パック、ボディクレイ、ローション、スキンクリーム等）に使われています。

本研究ではオートクレーブを用い、水熱法により粘土

合成を行いました。出発材料、水、水熱温度、水熱時間、水熱時の pH、乾燥条件など合成パラメータは非常に多く、時間と労力のかかる地味な仕事ですが、合成条件によって性質が大きく変わることが分かりました。

合成粘土は天然品と異なり、不純物を全く有さないという特長があります。しかし実際には、自然から学ぶことが非常に多く、また未だ持って解明されていない部分も多くあります。本研究で天然のものよりも高いイオン交換能や膨潤能の高い粘土がつかれることが分かりましたが、これからの高機能化された粘土合成の研究を続けていきます。

本研究で得られた知見がコスメトロジー研究の一助となり、人々が健康で美しくなるために用いられることを夢見ております。
(東北大学多元物質科学研究所)

平成 11 年度 研究助成

私の研究分野に関連して 杉山 政則

私は、微生物、その中でも特に、抗生物質をつくる放線菌を実験材料としてきました。今から 20 年ほど前、抗生物質をつくる遺伝情報が、染色体以外の遺伝因子、すなわち、プラスミド (plasmid) 上に載っているとの仮説が提唱されたとき、その仮説にとっても興味を抱きました。当時在籍していた広島大学工学部には菌株保存施設がありましたので、大学院生と共に、そこにストックされていたほとんどすべての放線菌について、プラスミドの有無を調査しました。ちなみに、今では、抗生物質生産に関わる遺伝子は、一部の抗生物質生産菌を除いて、染色体に存在することが明らかにされています。200 種ほどの放線菌のプラ

スミドを調べた成として、コピー数の高いプラスミドを保有する放線菌 (*Streptomyces castaneoglobisporus*) を見つけたのですが、その菌株が偶然にも多量のメラニン色素をつくる菌株でもあったわけです。

1990 年に医学部に移籍して間もなく、この放線菌株からメラニン色素産生遺伝子のクローニングに成功しました。これが、今回、貴財団の助成金対象となった『高発現型メラニン色素産生遺伝子のコスメトロジーへの応用』につながったのです。

最近、私の毛髪に白いものが目立つようになりました。年を取ったと言ってしまうとそれまでですが、白髪の占め

る割合が増加するにつれ、次第に黒髪への憧れが強まるようになりました。黒髪は若さの象徴であり、自分をいつまでも若く見せたいのか、それとも、「ストレスなんか受けていないよ」との自己主張が黒髪を保っておきたい要因なのかも知れません。今や、私の周囲の大学生までもが茶色や金髪に染めているのを見るにつけ、「自分の髪をもっと大切にしたいよ」と、嘆き心でつぶやいています。

先日、高3のわが娘に「髪は染めないでね」と言ったところ、即座に「私には似合わない」と、安心の言葉が返ってきました。いずれにしても、メラニン色素産生遺伝子は、必ずや Cosmetology や再生医療分野に貢献できると信じています。
(広島大学医学部)

平成 11 年度 研究助成

糖鎖生物学とコスメロジー

谷口 直之

皮膚は生体と外界の接点です。細胞レベルではこれは細胞膜（あるいは細胞壁）にあたります。皮膚と細胞膜は、外界から身を守り、内容物が漏出しないように一定の強度をもったバリアーとして機能するとともに、外界の情報をいち早く内側に伝えたり、逆に外界に情報を発信する仕組みも備えています。ちょうど中世の城壁と砦のようなものです。この重要な役割の一端を担っているのが糖鎖です。

糖鎖はこれまで核酸、タンパク質の陰に隠れてあまり注目されてきませんでした。これは、糖鎖の構造があまりにも複雑多様で、その機能を調べるのが非常に困難だったからです。我が国の先達たちはこの困難にもめげず、地道に複雑な糖鎖構造を解きほぐし、生命現象との関係付けをしてきました。その甲斐があって、我が国の糖鎖研究は世界を席巻することになりました。糖鎖の生合成に働く酵素をコードする遺伝子を糖鎖遺伝子と呼んでいます。これまで同定された約 120 種類の糖鎖遺伝子の半分以上を我が国の研究者が単離いたしました。これは、ヒトゲノム計画における我が国の貢献度が 6-7% であったのと対照的です。

遺伝子でコードされるタンパク質は裸の未成熟なもの

です。翻訳後、さまざまな修飾を受け服を着せられ成熟した機能分子として生まれ変わります。この翻訳後修飾の中で最も普遍的で重要なものが糖鎖修飾です。皮膚がいくら丈夫といっても、状況に相応しい服装を着ることが必要なと同じです。近年、ヒトゲノム計画の進展により、ヒトの設計図が明らかにされようとしています。これを受けて、遺伝子機能を解析するポストゲノム研究が始まりました。この中心に置かれているのは遺伝子の直接産物であるタンパク質の機能解析ですが、上で述べたようにタンパク質だけでは裸の王様で、機能の鍵を握るのは糖鎖研究といえます。

皮膚を構成する多くの生体物質もこの例外ではありません。糖脂質のグルコシルセラミドも上皮の構成員として、また情報発信分子として重要な働きをしていることが知られています。この糖脂質の機能を調べるのも糖鎖生物学という学問です。糖鎖生物学の重要性は、ごく最近、首相を議長とする総合科学技術会議でも取り上げられ、万人の認知するところとなりつつあります。今後の糖鎖生物学の発展が必ずやコスメロジーの発展に繋がると確信しております。
(大阪大学大学院医学系研究科)

平成 11 年度 研究助成

コスメロジーとの接点の行方

堀 久枝

美容とは全く縁の遠かった私とコスメロジーとの接点となったのはコラーゲンだと思っています。私が結合組織の研究を始めた 30 年前は血清タンパクと酵素の構造機能解析研究が主流で、コラーゲンの研究をしていると言ったら、それは何ですかと聞かれた時代でした。コラーゲンが今日のように広く使用され始めたのは、コラーゲンの優れた保

湿性に注目して化粧品に入れることを考えた製薬会社がコラーージュという名前でコラーゲン入りのクリームを売り出したのが始まりです。そのころ是非試して下さいとのこととで試供品を一瓶全部使用したものの、シミソバカスは全く改善されず、やめてしまいました。今考えると、美白剤は無いので、期待するのが可哀しいということでしょうか。

むしろ、皺の増えた今日この頃使用すると効 があらわれるのでしょう。今では、コラーゲンが成分の主体となり化粧品には欠かせない貴重品となりました。今回貴財団よりいただきました助成金のテーマはこのコラーゲンの変性物であるゼラチンによるアレルギー反応を惹起する抗原性物質の同定でした。お陰様でウシコラーゲン $\alpha 2$ 鎖の特定部に抗原性があることを解明でき、ある種のプロテアーゼ消化でこの抗原性が激減し、低アレルギー性ゼラチンの開発の方向が決まりました。ところが市販のコラーゲン、ゼラチンは主にウシ由来で昨今新聞で話題になっている狂牛病の感染性についてその安全性が問題になっており、美しくありたいと願う気持ちと狂牛病には感染したくないと複雑な気持ちであります。ちなみに、多くのメーカーは5年以

上まえからこの問題を重視し対策を講じているとのこと。すなわち、安全なウシの生産国から、感染性の最も低い部 である皮膚を購入し、真皮層を強アルカリ処理（変異性プリオンの減弱）してコラーゲンを製造しているので安心しました。それにしても草食動物であるウシに栄養価が高いと言う理由で、ウシの脳、脊髄を与えるなど、自然界のルールを無視した生育方法に根本的な問題を感じざるを得ません。現代社会が利便性、生産性を重視し、本来の自然界のルールや環境の破壊、生命にたいする倫理観の喪失の方向へ進んでいるのは非常に残念なことです。しかし、私はコスメトロジーとの接点の行方が必ず安全な方向に発展することと確信し、今後を期待しております。

（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

平成 11 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

松村 哲理

私は化粧に興味がない。化粧はおろか、服装にも興味がない。さすがに服を着ないで外出するのは気がひけるが、毎日同じ服を着ていても全く気にならない。そんな私であるから、自分で化粧をしようとは思わないのはもちろん、他人の化粧にも全く無関心である。

化粧に興味をもてない大きな理由は、その目的と評価方法がわからないからである。いったい化粧は何のためにするのであろうか。例えば、いつも化粧をきちんとしている人たちは、この世に自分の他に人間がいなくてもきちんと化粧をするであろうか。化粧自体が自己完結的な内的な行為となっている一部の少数派を除けば、おそらく多くの人は化粧はしないのではないだろうか。

そう考えると、化粧の評価方法というのがある程度見えてくる。化粧というのは、他人に対して自分を表現するための手段の1つと考えられる。これは人間にとっての基本

的な欲求の1つであり、音楽や絵画などの芸術を行う行為と じるものがある。とすれば、化粧をそのような芸術行為と同じように評価すればよいのではないだろうか。

音楽や絵画における作品を本当に理解し評価しようと思えば、その完成した作品を見たり聞いたりしているだけでは不足で、作品の背景・動機から制作過程を経て完成するまでの時間軸の中でとらえることにより、その作品に作者の訴えたかったものの本質が浮かび上がってくることをしばしば経験する。同じように、化粧というものを、その人の背景・動機から、化粧をし、そして素顔に戻るという時間軸の中でとらえるといいのかもしれない。その時間軸の中で、化粧によってそこに共に表現されているその人の本質が浮かび上がってきたとき、化粧というものを本当に理解し、評価できるようになるのかもしれない。

（北海道大学大学院医学研究科）

日焼けと教育

本行 忠志

本研究では、太陽紫外線類似の紫外線を SCID マウスに移植したヒトの皮膚組織に長期にわたり照射したもので、多くの日光角化症（前がん病変、表皮内がん）とそれに続く少数の皮膚がんが誘発されました。比較的早期に遺伝子変異も見つかっております。

皮膚がんでは p53 遺伝子の変異以外はほとんど報告がありませんが、幾種類かの遺伝子が多段階的に作用していると考えられます。皮膚がんに対する様々な遺伝子の関与を Gine Chip（マイクロアレイ）法等も利用し、追及していく所存です。

皮膚は、体の中で最大の免疫器官として感染、異物等の体外の侵入から体を防護していますが、体内に生じた異物であるがん細胞を排除し、がんの発生を抑制することも知られています。太陽紫外線はこの皮膚の持つ免疫機能をも阻害するため、太陽紫外線は DNA 損傷から、細胞のがん化を誘発するばかりでなく、出現したがん細胞を排除する免疫監視機構を抑制し、よりいっそうがんを発生進展させるものと思われます。

ところで、太陽紫外線による皮膚がんの発生を述べましたが、私たちがより気を付けなければならないのは日光角化症ではないでしょうか（太陽紫外線による他の害は割愛させていただきます）。小児期の強い日焼けが日光角化症と関連するとの疫学調査結果を考え合わせると、小児期から過度の日焼けを避ける努力を続けることが青年、老年期の腫瘍のない若々しい皮膚を保つために重要と考えられます。「日焼けすれば風邪をひかない」、「小麦色の肌は健康的」などといった誤った「定説」を改め、紫外線の人体への影響について正しい知識を幼児期や小児期に徹底的に教え込むことが学校教育と同じくらい、あるいは、より重要と思うのですがいかがでしょうか。

みんなで、この啓蒙の輪をひろげ、小泉首相やマスメディアに働きかけてみませんか。

最後に、本研究にあたり多大な御支援を戴きました Cosmetology 研究振興財団に感謝いたしますとともに貴財団のますますの御発展をお祈り申し上げます。

（大阪大学医学部）

Genetic Cosmetology の時代へ

畑 隆一郎

美しくありたいという考えはヒトに備わった本能と考えられる。心身共に健康であればヒトは美しい。例えば結婚式の花嫁は美しいということがこれを物語っている（見慣れた我が娘であっても結婚式では美しかった）。逆に老人に美しく化粧をすると心身共に若返ると言う事実は、今後の高齢化社会における Cosmetology の たすき役割を示している。

現代医学においては難病の治療に臓器移植、再生医療、遺伝子治療が盛んに行われ、マスコミでも話題になっている。科学技術が進んでこれらの手法が簡単、安全かつ安価に行えるようになれば、Quality of Life の点からヒトは当然美しくなるためにもこのような科学技術を応用するようになり、現在の美容整形よりも簡単にこれらの手段を用いるであろう。

我々が研究対象をしている コラーゲンは我々の身体の中で一番多いタンパク質で全身のタンパク質の 1/3 を占める。皮膚の表皮を裏打ちし、皮膚の機能を制御しているのも真皮の主成分であるコラーゲンである。その保湿性から最近の化粧品にはコラーゲンを添加したものが多く、表皮から与えるよりは真皮の線維芽細胞を活性化してコラーゲンの代謝を活発にした方がより効率的と考えられる。我々の研究はこのコラーゲンの遺伝子の発現機構研究であり、これを明らかにすることにより、将来真皮の線維芽細胞の遺伝子発現を思うように制御し、十分なコラーゲンを合成させ、若々しい肌を作れるのではないかと夢想している。私はこのような方法を Genetic Cosmetology と命名したい。

（神奈川歯科大学歯学部）

平成 12 年度 研究助成

くすりと化粧品 中畑 則道

ヒトは常に外界の危険にさらされており、最近やウイルスなどの微生物による感染や、複雑な人間関係などから与えられるストレスは、時としてヒトを病気に追い込む。こういった病気から健康な身体へ戻す方法の 1 つにくすりがあり、くすりととは病気の治療効を持つもの、あるいは予防効を持つものと定義することができる。くすりを物質的な側からとらえると、現在用いられているものの多くは、単一の化合物であるが、漢方薬や民間薬などのように、植物の抽出物や鉱物をそのまま用いた多種の化合物を含有するくすりもある。

さて、化粧品もヒトに適用する化学物質であり、くすりと類似したところがある。たとえば日焼け止めクリームはその作用として紫外線をカットして、皮膚を守るといった薬理作用を持っている。しかし、概して言うと、くすりと異なり化粧品は基本的な生命の維持機構には直接影響を与えることは少なく、むしろ、基本的な生命機構が維持された

上で、より良い生活を指向したときに使用されるように思われる。たとえば、万人の美しくありたいと願う気持ちや、他人から良く見られたいという願いを表現していく 1 つの手段として化粧品があり、ある種の文化としてとらえることも可能である。

化粧品は以前より生体に対する作用を重要視してきたが、今後、さらに多種の薬効を有する機能性化粧品が、商品開発に新たに道を開いていくように思われる。食品の世界においても機能性を有した食品がブームとなっており、くすりと同様な生体機能に影響を与えるような機能性食品が多く作られ、人々の支持を得ている。若く、そして美しくありたいと願う多くの人々の気持ちに答え、安全でかつ機能的な付加価値を有する化粧品を創り出すコスメトロジーの更なる発展に期待したい。

(東北大学大学院薬学研究科)

平成 12 年度 研究助成

コスメトロジー雑感 松村 和子

遠くクレオパトラの時代から、人間は化粧をしてきました。化粧の役割は時代とともに変わって、身分をあらわすためであったり、魔よけのためであったりしたそうですが、やはり、自分をよりきれいに見せたい、自分のウィークポイントを隠して、できればチャームポイントにしたいという欲求を満たす手段としての役割をいつの時代でも担っていると思います。自分のウィークポイントだと思っていたところを心配する必要がないという気持ちがあるだけで、たとえ客観的にそれほど差が出ていなくとも、その人の表情を生き生きとさせてしまいます。特に、性格や顔立ちと調和した、その人らしい化粧をしておしゃれしている人と話をする機会に恵まれるとうれしい気持ちになります。しかし、このごろ、一様に同じような化粧をした人たちを見かけることが多くなり、どうも気になります。ガングロ、茶髪、美白など、流行とってしまえばそれまでなのですが、皆、同じような姿をしています。他人より

魅力的になるためとも思えませんし、自分の個性を主張しているとも思えません。皆と同じになろうとするために化粧をしているのでしょうか。なんだか表情も同じように思われます。同じような姿かたちの人に会うたびに不思議に思っていておりましたが、最近ふと、安心して頼れる心のよりどころがないために、同じような姿をするのではないかと気づきました。心のよりどころがないウィークポイントを同じように化粧をして連帯感をもつ。そう考えると、化粧は、肉体的、精神的なウィークポイントの他に社会的なひずみに対して、癒しの手段として役立っているように思います。たとえば、茶髪でも、それを自家薬籠中のものとして個性にしているすてきな人たちも沢山いるのですが、あえて、色々な人たちが、安心して、個性的な化粧ができるような、優しい社会が作られていくことを願ってやみません。

(北海道大学医学部附属病院)

コスメトロジー雑感

大和田 祐二

昨年ドイツとの共同研究で 10 ヶ月ほど滞在したドイツ・ミュンスターのラボは、ドイツ人はもちろんタイ人、カメルーン人、フィンランド人など国際色豊かな雰囲気でした。各国の気候の違いが個人の性格はもちろん、身なりや生活様式に大きな影響をもつことは至極当然であることが実感できました。無論、気候や肌の色が違えばコスメティックな嗜好も違ってくることは容易に予想できます。しかし不幸にも生来不精な自分には気の利いたコスメトロジー論をこの場で披露することはできません。

ドイツのミュンスターの緯度は、日本でいえばちょうど樺太の中央にあたります。当然冬ともなれば朝の 9 時前後に日が昇り、午後 4 時半には日が暮れてしまいます。気候も日本に比べれば厳しく、雨や曇りの天気がほとんどで太陽はめったに顔を出しません。小春日和ともなれば、上半身裸で散歩や日光浴をしている風景は北ドイツの典型的な

風物といっても良さそうです。夏の晴天下にスポーツでもすれば彼らの肌はたちどころに火傷してしまいます。

今回の研究で使用したノックアウトマウスを使って、ドイツとの共同研究で紫外線の影響を調べる研究企画が進行中です。デイスカッションをしてみると表皮のメラニンが我々より少ないドイツ人にとっては、紫外線に対する脆弱性と太陽光欲求のパラドクスは結構切実な問題であることが良く理解できます。

今回の研究課題は、これまで神経系の解析を中心に行ってきた自分にとっては全く新しいフィールドであり本当に新鮮な知識と感動を得ることができました。これも貴財団から研究助成を頂いたのが 1 つのきっかけと言えます。今後は、表皮疾患の病態解明に小さな風穴を開けることができれば、と考えております。本当にありがとうございました。
(東北大学大学院医学系研究科)

平成 10 年度 海外派遣助成

慢性疲労症候群における自己抗体の研究 SLE における抗 MAP2 抗体の研究

名古屋大学大学院医学研究科生化学第 2 講座 杉浦 一充

私はコスメトロジー研究振興財団の海外交流助成をいただいて米国スクリプス研究所の分子実験医学の自己免疫センターの Tan 教授の下で慢性疲労症候群患者における自己抗体の研究と SLE における抗 MAP2 抗体の研究を 3 年間おこないました。慢性疲労症候群（CFS）とは、これまで健康に生活していた人に原因不明の強い全身倦怠感、微熱、頭痛、脱力感や、思考力の障害、抑うつ等の精神神経症状などが起こり、この状態が長期にわたって続くため、健全な社会生活が送れなくなるという病態です。慢性疲労症候群では接触性皮膚炎が高頻度に見られます。SLE は膠原病の 1 つで顔に蝶型紅斑という特徴的な皮疹がみられ神経、腎臓、肺等全身の臓器に障害を引き起こします。ワシントン大学、ハーバード大学、ケンブリッジ大学から約 300 人の患者血清をいただき、100 人の健常者血清と比較して既知の自己抗体がどの程度に存在するか、また、慢

性疲労症候群に新規自己抗体はあるか検索しました。ヒストン H 1 に対する抗体とヒストン H 3 に対する自己抗体が 5 割以上の確率で見られました。また神経特異的な蛋白である MAP2 に対する自己抗体を世界で始めて発見し、SLE の 2 割にこの抗体が見られることが分かりました。以上の結 は平成 13 年 1 月にシアトルで行われた第 5 回国際慢性疲労症候群学会にて報告し、論文を投稿中です。

今日、皮膚の病気の原因も多くのもが分子生物学的手法で解明されることが期待されます。自己免疫の関与している皮膚を障害する疾患の病理を分子生物学的手法でひも解いていくことが私のこれからの仕事であると考えています。

今回の留学に際し御助成をいただいたコスメトロジー研究振興財団に感謝いたします。

平成 13 年度 外国人招聘助成

メラノサイトの分化制御機構の解明

招聘研究者：英国 聖ジョージ医科大学病院教授 Dorothy C. Bennett

受入責任者：東北大学大学院医学系研究科教授 柴原 茂樹

去る平成 13 年 12 月 1 日(土)と 2 日(日)の両日にわたり第 15 回日本色素細胞学会年次学術大会を仙台にて開催させていただきました。日本色素細胞学会は会員数約 250 人の小さな学会（会長：溝口昌子・聖マリアンナ医科大学皮膚科教授）ですが、会員の専門は化学、生物学、分子生物学、遺伝学、皮膚科学、眼科学、耳鼻科学など多岐にわたっています。3 年ごとに開催される国際色素細胞学会が日本国内で開催される年を除き、年次学術大会は毎年開催され、色素細胞あるいはメラニン形成に関する最新の研究成果を発表し、活発な議論を展開する場となっています。各分野の研究者が一堂に会し議論するという醍醐味を満喫できる学会です。色素細胞研究は、美白、日焼け、毛包の維持（白髪、脱毛）、網膜変性疾患（先進国における最も多い失明の原因）、老人性難聴などの身近な問題から悪性黒色腫の治療など幅広い領域を包含しています。高齢化社会を迎え、

色素細胞研究は今後益々重要になると考えます。

今大会初日に招待講演として、メラノサイトの分化研究でご活躍の Dorothy C. Bennett 先生（ロンドン、聖ジョージ医科大学病院教授）がお話しされました。彼女は研究の一環として貴重なメラノサイト系の細胞株を多数樹立したことで知られています。特に、マウスメラノサイト株（melan-a や melan-c など）は世界中の研究者に広く利用され、我々の研究の発展に寄与しています。最近では、メラノサイトの細胞内小器官であるメラノソームの形成と輸送に関する研究も展開しており、世界的に注目されています。

Bennett 先生の来日に際し、コスメトロジー研究振興財団には多大なご支援（国際交流助成）を賜り、深く感謝いたしております。雑感文というご要望でしたが、報告書もどきの拙文にて御礼の言葉とさせていただきます。貴財団のさらなるご発展をお祈り申し上げます。

プロスタグランジンおよびロイコトリエン生合成酵素の分子構造と機能 「LTC4 合成酵素 (LTCS)」

招聘研究者：米国 ハーバード大学医学部免疫学部門副教授 Bing K. Lam

受入責任者：昭和大学薬学部教授 工藤 一郎

私が炎症・アレルギーの生化学を専門に研究を始めたのは、厳しかったアメリカ留学から帰国してからなので、すでに 20 年以上前のことである。生体内でアラキドン酸（炭素数 20、不飽和結合 4 の不飽和脂肪酸）を材料として生産される生理活性脂質に注目して研究を続けている。アスピリンの解熱鎮痛作用は、アラキドン酸からプロスタグランジン H2 と呼ばれる、数種の生理活性脂質が生合成されるための共 中間体の合成酵素の抑制で説明できる。この事実から明らかなように、私の専門は、製薬会社が大いに興味を持つ。基礎研究をすぐに実用化できそうな魅力を感じさせる分野である。そのため、幸か不幸か日本国内をはじめとして、世界中に多数の手ごわい研究の競争相手がおられる。それぞれ少しずつ観点を変えて、互いの領分を侵さないように配慮しつつ紳士的にお付き合いをしているつもりであるが、ややもするとニアミスをする。結 として、同一の酵素について全く異なった見解を持つこともある。学会場でやり合うことになる。国内の学会では、それでもなんとかなる。しかし、国際会議の場合、どうしてもオーバーカムできない語学のハンディがゆえに、悔しい思いをする。「データ勝負では勝っているし論文はこちらが先」「我々が数年前から言っていることをやっとなアメリカのグループが最近になって言い出した」などなど、当人以外には言い訳にしか聞こえない愚痴をこぼすことになる。外国人研究者同士でもまた、一見仲がよさそうに見えても、本音ではか

なりシビアにやり合っている。先日、最近まで共同研究をしていたはずの 2 人のアメリカ人教授から、それぞれ 個に、相手方の悪口を言いつつ当方との共同研究を提案された。正直、対応に困った。

LAM 博士は強力な炎症メディエーターであるロイコトリエン C4 の生合成酵素の専門家である。第 74 回日本生化学会大会で講演をしてもらい、広く日本の研究者と交流を深めてもらうために、今回来日を依頼した。現在、ロイコトリエン C4 の受容体拮抗薬が気管支喘息に臨床応用されていることから、彼の専門的知識が皮膚疾患を含めて広くアレルギーに応用可能であると判断し、本財団で招聘していただくこととした。LAM 博士はホンコンのご出身で、アメリカで学 を取った後、免疫アレルギーの大家であるハーバード大学のオースチン教授のグループにポストドクトラルフェローとして参加された。その後、引き続き副教授として、ハーバード大学で一流の研究成 を出し続けている。

LAM 博士は、若い頃の自分自身を含めて多くの日本人研究者ができなかったことをした。つまり、彼は米国への永住を決心した東洋出身の研究者であり、現在まで恵まれた環境で楽しそうに研究を続けておられる。ホンコンと日本の事情の違いが、もちろんあったのかもしれない。いずれにしろ、憧れに似た敬意を彼に感じながら、彼との会話を楽しんだ。

付 録

●
事業報告書（平成13年度）
役 員
●

事業報告書

(自平成 13 年 4 月 1 日 至平成 14 年 3 月 31 日)

《研究助成等の選考関連》

2001	5	7	公募開始	全国 253 ヶ所の大学・病院・研究機関等、関係学術雑誌 8 誌、 当財団 HP、薬学会 HP に掲載
	7	6	公募締切り	応募数 72 件
	9	3	選考委員会（分科会 3）	精神、文化に関する分野の選考
	9	5	選考委員会（分科会 1）	素材、物性に関する分野の選考
	9	14	選考委員会（分科会 2）	生体作用、安全性に関する分野の選考
	9	21	本選考委員会	各分科会の結を総合的に判断して研究助成 21 課題、国際交 流援助 3 課題を選考
	11	19	表彰贈呈式	記念講演：「美人研究」 国際日本文化研究センター 井上章一氏
	11	19 ～	助成課題の公表	関係学術雑誌 7 誌、当財団 HP に掲載
2002	2	中旬	持回り企画委員会	平成 14 年度の研究助成課題選考方針に関して

《理事会関連》

	6	20	常理事会	平成 12 年度事業報告及び収支決算報告、株主としての議決権 行使について、報告事項
	11	19	常理事会	平成 13 年度（第 12 回）研究助成者等の承認、 平成 14 年度事業計画及び予算案、選考委員の選任
2002	1	25	臨時理事会	基本財産の運用（ペイオフ対応）に関して

《評議員会関連》

	6	20	常評議員会	平成 12 年度事業報告及び収支決算報告、報告事項
	11	19	常評議員会	平成 13 年度（第 12 回）研究助成者等の承認、 平成 14 年度事業計画及び予算案

《その他》

2001	9		コスメトロジー研究報告	「コスメトロジー研究報告」の創刊号から 9 号までを、国会 図書館ほか大学図書館数館に寄贈
	11	20	基本財産関連	保有株式が無償分割により 728,353 株から 874,023 株へ
	12		財団活動の情報開示改善	当財団 HP へ会計・事業報告を掲載

第12回 研究助成を受けられたかたがた

(J：一般研究助成 H：国際交流援助)

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J-01-01	日本における「×メイク」*の伝統性に関する研究 一起源と大衆文化への波及— *(極端な化粧、Extreme make-upの意)	視覚と知覚 顔と固有文化 デコレーションとディスプレイ	千歳科学技術大学光科学部助教授 Johnathon John
J-01-02	脂質－高分子界面活性剤混合系による新規分散系 “液晶エマルジョン”の形成	界面化学	京都大学大学院薬学研究科助手 中野実
J-01-03	接着分子シグナルを利用した皮膚老化防止の新戦略	生化学 細胞生物学 皮膚科学	群馬大学生体調節研究所 附属生理活性物質センター教授 的崎尚
J-01-04	発生再生の分子メカニズムを応用した人工皮膚作製	分子生物学	秋田大学医学部教授 杉山俊博
J-01-05	紫外線防御因子メタロチオネインのヒノキチオール による合成誘導とその意義	分子毒性学 生化学	東北大学大学院薬学研究科教授 永沼章
J-01-06	日本の化粧意識の近代化をめぐる比較史的考察	生活文化学	奈良女子大学生生活環境学部 専任講師 鈴木則子
J-01-07	ナノ構造配列制御を基盤とする光学活性材料の開発	高分子化学 有機合成化学	山口大学工学部助手 鬼村謙二郎
J-01-08	接触皮膚炎へのp38mitogen-activated protein kinaseの 関与機構の解明	分子細胞生物学	千葉大学大学院医学研究院 助教授 粕谷善俊
J-01-09	再構築機能を有する新規の粘土材料の作製とその吸 着特性	無機材料化学	東京工業大学大学院 理工学研究科助手 亀島欣一
J-01-10	光で透過制御可能な人工ベシクルを形成する新規多 鎖型両親媒性化合物の開発	有機工業化学 界面化学 有機合成化学	大阪大学大学院工学研究科助教授 中辻洋司
J-01-11	顔の魅力を規定する要因の実験計量心理学的分析	実験計量心理学	東北大学大学院文学研究科助教授 行場次朗
J-01-12	Wntシグナルによるメラニン産生の制御機構の解析	分子生物学	東北大学大学院医学系研究科助手 武田和久
J-01-13	カンキツ精油の有する生体作用の生化学的解析	生化学 食品化学	高知大学農学部助教授 受田浩之
J-01-14	皮膚の老化による型コラーゲンの代謝及び遺伝子 発現調節機構について	皮膚科学 分子生物学	弘前大学医学部附属病院講師 今淳
J-01-15	皮膚の水チャネルの保水性への役割の解明	皮膚の水電解質代謝	自治医科大学講師 石橋賢一

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
J-01-16	皮膚表皮細胞への生理活性タンパク遺伝子のデリバリーと分泌方向性の制御	遺伝子治療 ドラッグデリバリーシステム	京都大学大学院薬学研究科教授 高 倉 喜 信
J-01-17	かみ合わせのずれが大きく笑った顔貌の非対称性に及ぼす影響	審美歯科学 咬合学	大阪大学歯学部附属病院講師 中 村 隆 志
J-01-18	アトピー女性の自尊感情の向上を目指したスキンケアと集団認知行動療法の開発	臨床心理学 健康心理学	宮崎大学教育文化学部専任講師 富 家 直 明
J-01-19	早老性疾患遺伝子による皮膚線維芽細胞の老化とテロメア制御	分子生物学 放射線生物学	広島大学原爆放射能医学研究所 教授 小 松 賢 志
J-01-20	痴呆高齢者の表情分析と主観的Quality of Lifeの評価手法に関する研究	老人看護学 老年学	浜松医科大学医学部助教授 鈴木 みずえ
J-01-21	独自のチタン反応を利用する、ムスク・ジャスミン系高級香料の実用的化学合成	有機合成化学	関西学院大学理学部教授 田 辺 陽
H-01-01	スキンケア製品を目的としたリポソームの調製とその物性評価	薬学	タイ・チェンマイ大学薬学部助教授 Yanee Pongpaibul 受入責任者 東京理科大学理工学部教授 阿 部 正 彦
H-01-02	メラノサイトの分化制御機構の解明	細胞生物学	聖ジョージ医科大学病院教授 Dorothy C. Bennett 受入責任者 東北大学大学院医学系研究科教授 柴 原 茂 樹
H-01-03	プロスタグランジンおよびロイコトリエン生合成酵素の分子構造と機能「LTC ₄ 合成酵素 (LTCS)」	生化学	ハーバード大学医学部免疫学部門助教授 Bing K. Lam 受入責任者 昭和大学薬学部教授 工 藤 一 郎

(敬称略・受付順)

※第1回～11回の研究助成課題はホームページ (<http://www.cosmetology.or.jp/>) でご覧下さい。

役 員

平成 14 年 3 月 31 日現在

理事長	小林禮次郎	(株)コーセー代表取締役会長
専務理事(常勤)	有本 亨	(元厚生省薬務局安全課長)
理 事	磯邊 律男	(株)博報堂相談役(元国税庁長官)
理 事	宇佐美昭次	早稲田大学理工学部教授
理 事	内山 充	(財)日本薬剤師研修センター理事長
理 事	小林 保清	(株)コーセー代表取締役社長
理 事	菅原 正文	高砂香料工業(株)相談役
理 事	高橋 久	帝京大学名誉教授
理 事	西川 武二	慶應義塾大学医学部教授
理 事	花輪 隆昭	昭和館 館長(元厚生省援護局長)
理 事	廣部 雅昭	静岡県立大学学長
理 事	牧野 利孝	日本化粧品工業連合会専務理事 (元厚生省生活衛生局食品化学課長)
監 事	小田倉正典	公認会計士
監 事	黒田 節哉	弁護士
評議員	上野 芳夫	東京理科大学薬学部教授
評議員	緒方 宏泰	明治薬科大学教授
評議員	北原 文雄	東京理科大学名誉教授
評議員	近藤 保	東京理科大学名誉教授
評議員	齊藤 勲	(社)東京医薬品工業協会理事長 (元厚生省大臣官房審議官)
評議員	長野 哲雄	東京大学薬学部教授
評議員	西岡 清	東京医科歯科大学医学部教授
評議員	野田 裕充	(株)コーセー常務取締役
評議員	野呂 影勇	早稲田大学大学院人間科学研究科教授
評議員	福内 靖男	慶應義塾大学医学部教授
評議員	溝口 昌子	聖マリアンナ医科大学教授
評議員	宮崎 榮三	千歳科学技術大学教授
評議員	山崎 幹夫	千葉大学名誉教授
評議員	渡辺 徹	元厚生省薬務局審査第二課長

(専務理事以外は全員非常勤)

*本財団についてのお問い合わせは下記に
お願いいたします。

財団法人 コスメトロジー研究振興財団

〒104-0061 東京都中央区銀座三丁目 5 番12号
電話 03 (3564) 6731

コスメトロジー研究報告 Vol.10／2002

非売品

2002年 9 月 1 日発行

編集責任者 有本 亨

発行 財団法人 コスメトロジー研究振興財団
〒104-0061 東京都中央区銀座三丁目 5 番12号
電話 03 (3564) 6731

制作 エイエム企画
〒170-0013 東京都豊島区東池袋三丁目15番 2 号
電話 03 (3590) 5375

印刷 太陽印刷工業