

クエン酸による細胞機能の調節機構： 美容および美白、老化における役割

国立研究開発法人国立成育医療研究センター

宮戸 健二

Citric acid is a substance produced naturally in citrus fruits, such as grapefruits, oranges and lemons, and makes an addition of sour taste to foods and drinks. Citrate synthase (CS) produces citric acid and initiates citric acid cycle (also known as tricarboxylic acid cycle [TCA] and the Krebs's cycle) that assumes respiratory activity in mitochondria of all types of cells. In general, chemical properties of CS are beneficial for skin care and often contained in skin care products; however, its cosmetic effect is still unproven scientifically. To address this issue, we studied a physiological role of citric acid by producing mice lacking a gene encoding extra-mitochondrial citrate synthase (hereafter, eCS). eCS proteins are expressed in several types of cells such as neurons, sperm and hair sheath cells in mice. The eCS proteins are also produced in human cells; nonetheless, its biological role is unclear. From general knowledge about citric acid, we assumed that eCS deficiency might reduce cellular activity, presumably causing metabolic problems. Expectedly, *eCs*-deficient mice exhibited hypopigmented hairs due to the reduction of cellular activity of melanocyte stem cells, regardless of male or female. Furthermore, the frequency of mating behavior of the male mice was low, and their sperm-fertilizing ability decreased age-dependently, resulting in male subfertility. Moreover, graying hairs went age-dependently forward to white hairs in addition to hair loss. Interestingly, the supplementation of cyclic AMP (cAMP) improved lower cellular activities in sperm and melanocytes isolated from *eCs*-deficient mice under the in vitro condition, although the supplementation of citric acid was unaffected. We discovered the role of eCS in pigmentation and reproduction. We further propose that enhancement of eCS activity (or local application of cAMP) not only suppresses hair graying, but also improve male sexual dysfunction.

1. 緒言

クエン酸は、細胞内小器官であるミトコンドリアで働くクエン酸回路（TCA回路またはKrebs回路）を動かす8種類の酸のうちの1つである。酵母からヒトまで、真核生物のあらゆる細胞がミトコンドリアをもっており、クエン酸合成から始まるクエン酸回路によって細胞のエネルギー源であるアデノシン三リン酸（ATP）が産生される。一方、細胞質にはクエン酸回路の前段階にあたる解糖系が存在し、クエン酸回路に比べて効率が悪いもののATPを産生することができる。

多くの細胞では、好氣的条件下ではクエン酸回路を使ったATP産生が行われる。一方、癌細胞では好氣的な環境下であっても解糖系を使ってATPが産生されることが知られており、Warburg効果（ワールブルク効果、または好氣的解糖）と呼ばれ^{1, 2)}。癌細胞においてWarburg効果が生じるメカニズムは未だに不明であるものの、解糖系からクエン酸回路への切り替えにはクエン酸合成が必須であることから、クエン酸合成酵素の何らかの機能異常または機能獲得がWarburg効果を引き起こしている可能性が考え

られる。

クエン酸は柑橘系果物の果汁の主成分だけでなく、補助食品（サプリメント）としても販売されており、容易に体内に摂取することができる。さらに、クエン酸には様々な効能があることが知られている。最も知られているのは疲労回復効果であり、クエン酸には筋肉における乳酸の濃度を低くする作用が知られている。また美容に関しても、皮膚の弾力性を高める作用が知られている。一方、クエン酸摂取によって癌細胞が形成されにくくなるといった作用が知られている。それ以外にも、骨粗鬆症の予防効果、高血圧の予防効果、通風や結石の改善効果などが知られている。しかしながら、実はクエン酸の効能については実際に証明された例は少なく、科学的根拠が乏しいのが現状である。例えば、クエン酸の作用として知られる「疲労回復」、「筋肉や神経の疲労予防」について、科学的に検証を試みたものの証明に至らず、最近では否定的な見方もされている。さらに、クエン酸を主成分とする医薬品がないことも、クエン酸の健康への効果が疑問視される一因となっている。

ただし、クエン酸による細胞毒性は報告されておらず³⁾、クエン酸が細胞の呼吸活性の制御に必須であるという事実については疑う余地がない。そのため、クエン酸を効率よく細胞に摂取する方法、または、細胞内におけるクエン酸合成酵素の活性を上昇させる方法（例えば、食材や飲料成分）が明らかになれば、クエン酸は「若さの持続」のカギを握る物質として再認識されるかもしれない。そこで本研究では、クエン酸の健康や美容における効果を科学的に検証するとともに、クエン酸の摂取方法およびクエン酸合成酵



Regulation of cell function by citric acid:
Roles in beauty care, skin whitening and
anti-aging

Kenji Miyado

National Research Institute for Child
Health and Development

素を活性化させる物質の同定についても検討した。

2. 方法

2.1. 遺伝子改変マウスの作製

クエン酸合成酵素 (citrate synthase, 以下CS) は、ミトコンドリア内に存在する酵素であるが、一方ではミトコンドリア外の細胞質にも存在する。しかしながら、このことはあまり知られていない。我々は、ミトコンドリア外に存在するCS (extra-mitochondrial CS, 以下eCS) をコードする遺伝子を欠損させたマウス (*eCs* 遺伝子欠損マウス) を作製して解析を行った。*eCs* 遺伝子欠損マウスは米国の Knockout Mouse Project (KOMP) Repository に作製を依頼した。作製されたヘテロ欠損マウスの交配によってホモ欠損マウスを作製した。マウスの飼育および関連するすべての実験は国立成育医療研究センター研究所・動物実験規則に基づいて行った(機関内承認番号#2004-04)。

2.2. 色素細胞(メラノサイト)の体外培養

eCs 遺伝子欠損マウスの胎仔から皮膚を分離した後、コラゲナーゼ処理によって組織片からメラノサイトを単離した後、培養シャーレに播種した。細胞が増殖するまで培養し、カルシウム波の測定および免疫染色を行った。野生型細胞のコントロールとしてC57BL/6Jマウスの胎仔からもメラノサイトを単離、培養した。

2.3. 細胞内のカルシウム波の測定

培地中にカルシウム結合性の蛍光試薬 (Oregon Green BAPTA-1 AM) (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR) を最終濃度 2 μ M になるように添加し、細胞に取り込ませた後、培地を交換して高感度 CCD カメラ (Andor Technology, Belfast, UK) を用いて経時的に観察を行った。

2.4. 免疫染色

新生仔の皮膚から分離したメラノサイトを培養した後、2%ホルムアルデヒド溶液で固定し、1%スキムミルク溶液でブロッキングした後、1次抗体(抗eCS抗体、抗c-kit抗体、抗TRP2抗体)を含む1%スキムミルク溶液中で室温2時間振盪させ、さらに蛍光物質 (Alexa488 または Alexa564) と結合させた2次抗体を含む1%スキムミルク溶液中で室温1時間振盪させた。ハンクス溶液で洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Zeiss) を用いて蛍光像を撮影した。また、対比染色としてヘキスト 33324 によって染色体DNAを染色した。

2.5. ウェスタンブロット解析

皮膚組織の抽出物を SDS 電気泳動によって分離した後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜にタンパク質を転写した。

PVDF膜を1次抗体(抗eCS抗体、抗DCT抗体、抗 β -アクチン抗体)を含む1%スキムミルク溶液中で室温2時間振盪させ、セイヨウワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) を結合させた2次抗体を含む1%スキムミルク溶液中で室温2時間振盪させた。1%Tween 20 溶液によって洗浄した後、Enhanced ChemiLuminescence (ECL) Plus 検出試薬を用いて目的のタンパク質を検出した。

3. 結果

3.1. *eCs* 遺伝子欠損マウスにおけるメラニン色素産生異常

CSは、ミトコンドリア内に存在する酵素である一方、ミトコンドリア外の細胞質にも存在するが、このことはあまり知られていない⁴⁾。CSはすべての細胞の呼吸系を司る酵素であるため、CS変異マウスは発生初期の段階で致死になるはずである。そのため、*Cs* 欠損マウスを用いて成体におけるクエン酸の役割を解析することは困難である。ただし、マウスでは、CS以外に、ミトコンドリア外CS (*eCs*) をコードするもう1つの遺伝子 (*eCs*) が存在する。そこで、常法に従って胚性幹細胞を用いて *eCs* 遺伝子欠損マウスを作製した。

マウスの遺伝的背景を黒色系統のC57BL/6にしたところ、*eCs* 遺伝子欠損マウス (以下、KOマウス) は灰色を呈した (図1A)。1990年代までに毛色を決定する遺伝子はすべて同定されたはずであるが、*eCS* は色素形成を調節しているタンパク質として働いている可能性が出てきた。そこで、マウスの背中中の4種類の毛のうち2種類 (Awl と Zigzag) を比較したところ、KOマウスでは明らかに含有されるメラニン色素の量が少なかった (図1B)。そこで毛を回収し、抽出液中に含まれるメラニン色素の量を吸光度

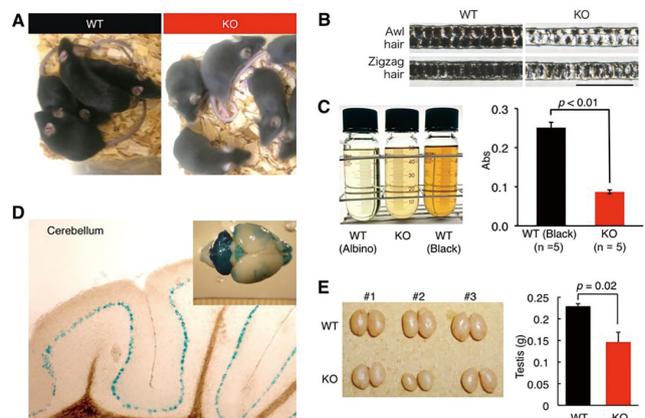


図1 *eCs* 欠損マウスにおけるメラニン色素形成異常および生殖能低下

A, 色素形成異常. B, マウス体毛のメラニン色素沈着. C, 毛から抽出したメラニン色素含量の定量化. D, 小脳での *eCs* の発現 (LacZ 染色). E, 精巣重量の低下. WT, 野生型マウス; KO, *eCs* 欠損マウス.

で測定したところ、有意な差が認められた (図 1C, D)。また、*eCs* 遺伝子を欠損させた領域には β -ガラクトシダーゼ (*LacZ*) 遺伝子を挿入していたため、*LacZ* 染色によって *eCs* 遺伝子の発現領域を調べたところ、小脳の特定の神経細胞層に *eCs* の発現が認められた (図 1D)。

一方、精巣にも発現が認められ、さらに精巣の重量が KO マウスでは有意に低下していることもわかった (図 1E)。メラニン色素の量が低下した原因として、(1)メラニン色素の合成量の低下、(2)メラノサイトの細胞数の低下、が推測された。そこでこれらの点について検討を行ったところ、メラノサイトの細胞数が KO マウスでは有意に低下していることが明らかになった (図 2A, B)。

続いて、*eCS* が関与するメラニン色素の産生過程を明らかにすることを試みた⁵⁾。メラニン産生にはメラノサイト刺激ホルモン (α -MSH) を介したシグナル伝達系によってチロシンがドーパミンに変換され、さらに、2種類のメラニン色素 (フェオメラニンおよびユーメラニン) がチロシナーゼ関連タンパク質 (Tyrosinase-related protein-1, -2, 以下 TRP1, 2) によって生成される。そこでまずメラノサイトにおける *eCS* の発現の有無と、メラノサイトにおける TRP1, 2 の発現量を比較した。

マウスの背側の皮膚から凍結切片を作製して抗 *eCS* 抗体で免疫染色したところ、*eCS* はメラノサイトが存在する毛包の基部ではなく、毛幹に沿って存在する上皮細胞層に広く発現していることがわかった (図 3A, B)。この領域はバルジ領域に存在する幹細胞がメラノサイトへと分化する過程で通過する領域である。さらに KO マウスの凍結切片について TRP1, 2 に対する抗体で免疫染色を行ったところ (図 3C)、TRP1 について KO マウスでは有意に発現が低下しており、TRP2 についても低下する傾向が認められた (図 3D)。一方、KO マウスに対して飲用水に混ぜることで α -MSH を投与したものの、KO マウスの毛に含まれるメラニン色素の蓄積量を増やすことはできなかった (図 4A)。さらに、チロシンについても同様の方法で KO マウスに投与したものの、KO マウスの毛に含まれるメラニン色素の蓄積量には影響を与えなかった (図 4B)。

次に、図 2C の模式図でチロシナーゼの活性を制御するサイクリック AMP (cAMP) によって KO マウスから単離したメラノサイトを処理したところ、メラニン色素の産生量が上昇することがわかった。すなわち、毛幹の上皮細胞層から分泌される cAMP が幹細胞からメラノサイトへの分化を制御していることが推測された。さらに、*eCS* は cAMP の毛幹の上皮細胞層における産生および分泌に重要な役割を果たしていることが考えられた。

3. 2. *eCS* による雄の生殖能力の制御

図 1E に示したように *eCS* は雄の生殖能力にも関与して

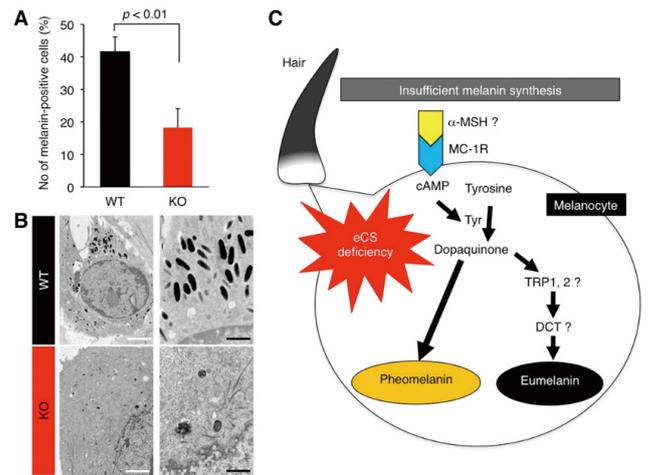


図 2 *eCs* 欠損マウスにおけるメラノサイト数の低下
A, メラノサイト数の低下. B, メラノサイトの透過型電子顕微鏡画像. C, メラノサイトにおけるメラニン色素形成と *eCS* の役割の模式図. WT, 野生型マウス; KO, *eCs* 欠損マウス.

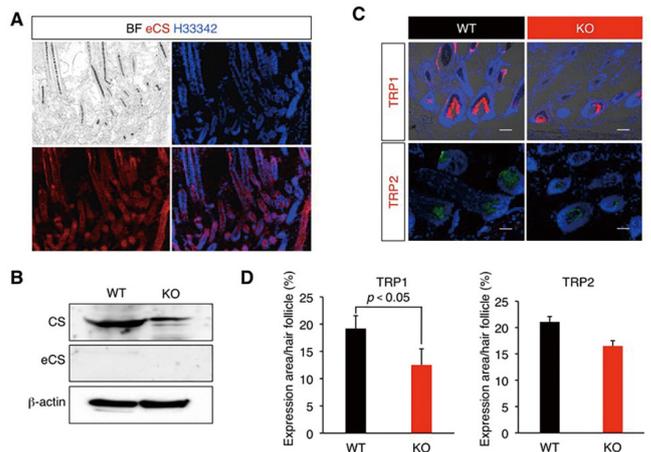


図 3 *eCS* 発現部位およびメラニン色素生成への関与
A, *eCS* 発現組織. Red, *eCS*; blue, ヘキスト 33342. B, ウエスタンブロット解析. C, メラノサイトにおける TRP1, 2 の発現. D, メラノサイトにおける TRP1, 2 の発現. WT, 野生型マウス; KO, *eCs* 欠損マウス.

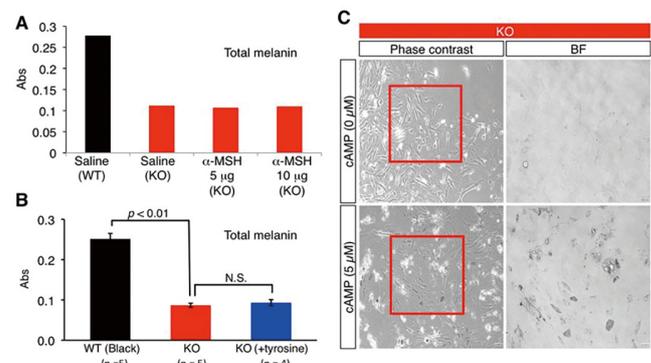


図 4 *eCs* 欠損マウスのメラノサイトへの薬剤投与の効果
A, 飲料水による α -MSH 投与の効果. B, 飲料水によるチロシン投与の効果. C, メラノサイトへの直接投与による cAMP の効果. WT, 野生型マウス; KO, *eCs* 欠損マウス.

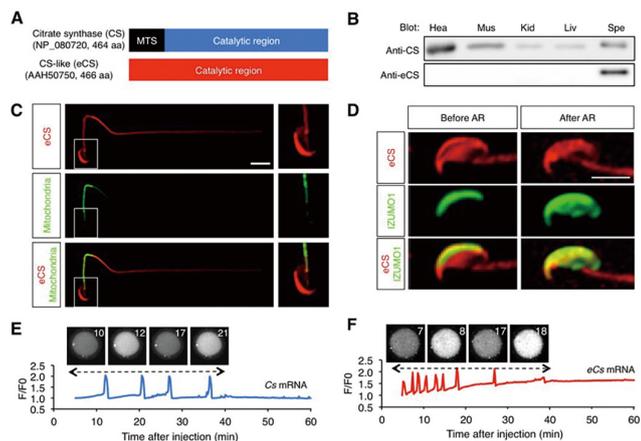


図5 精子におけるeCSの役割

A, CSおよびeCSタンパク質のドメイン比較. B, CSおよびeCSの組織での発現. C, 精子でのeCSの発現部位. D, 先体反応前後での精子頭部におけるeCSの発現. E, マウス未受精卵へのCs mRNAインジェクション後のカルシウムオシレーション. F, マウス未受精卵のeCs mRNAインジェクション後のカルシウムオシレーション.

いる可能性が考えられた。そこで、eCSタンパク質の発現を調べたところ、精子で発現していることがわかった(図5A, B)。さらに野生型精子を抗eCS抗体によって免疫染色したところ、精子頭部に発現量が多いことがわかり、明らかにミトコンドリアの局在とは異なっていた(図5C)。eCSが受精に関与する可能性が考えられたが、精子外膜は卵との融合前に脱落するため、eCSが精子外膜の脱落后に精子頭部に存在するか否かによって関与するステップが異なってくる。そこで、精子外膜の脱落后でのeCSの局在を調べたところ、eCSは精子外膜の脱落后でも精子頭部に留まることがわかった(図5D)。加えて、イモリではCSが受精後の細胞周期の再開(卵活性化)を誘導することが報告されていることから⁶⁾、CSおよびeCSをコードするメッセンジャーRNA(mRNA)を野生型の未受精卵にマイクロインジェクションしたところ、どちらのmRNAでも卵活性化に必要なカルシウム波(カルシウムオシレーション)を誘導することが明らかになった(図5E, F)。同様に、メラノサイトにおいてもカルシウムオシレーションが起こること、さらにKOマウスのメラノサイトにおいては頻度が極めて少なくなることがわかった。

一般的に、精子による卵活性化はホスホリパーゼCzeta(PLCz1)によって誘導されることが知られている⁷⁾。そこで、KOマウスから採取した精子におけるPLCz1の発現を調べたところ、野生型精子と同程度のPLCz1の発現が確認された(図6A)。また、KOマウス由来精子ではCS活性が低下していることがわかった(図6B)。

次にKO精子を用いて体外受精を行ったところ、有意差は認められなかったものの、交配による産仔数は生後6ヶ月(人間では30歳に相当)の雄ではほぼゼロになることが

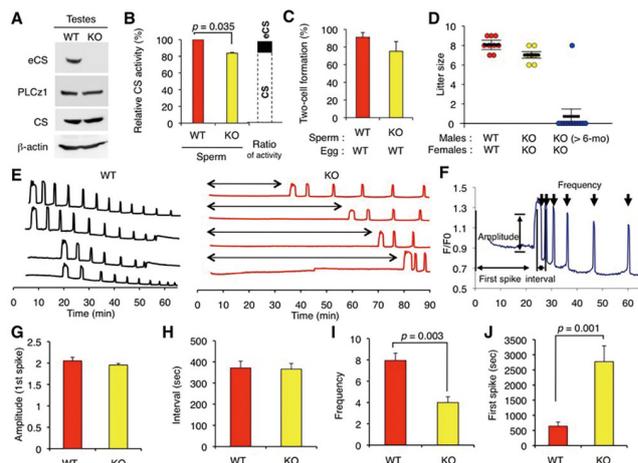


図6 精子におけるeCSの役割

A, ウェスタンブロット解析. PLCz1の発現. B, クエン酸合成活性(WT v.s. KO). C, 体外受精. D, 交配による産仔数. E, カルシウムオシレーション(WT v.s. KO). F, カルシウムオシレーション評価のパラメータ. G, 波形の高さ. H, 間隔. I, 頻度. J, 開始の時間. WT, 野生型マウス; KO, eCs欠損マウス.

わかった(図6D)。さらに体外受精によって融合したKO精子による卵でのカルシウムオシレーションのパターンを調べたところ、開始が極めて遅くなることがわかった。図5Fの結果と合わせて考えると、eCSは卵活性化因子として融合直後から40分までのカルシウムオシレーションを誘導する因子であると推測された。すなわち、卵活性化には2つの因子が関わっており、前半(開始)と後半(持続)で役割を分担している可能性が考えられた。

4. 考察

本研究ではeCSが「メラノサイトによるメラニン色素の生成」および「男性の生殖機能」の両方に必須であることを初めて明らかにした(図7A, B)。さらに、cAMPの塗布によってメラノサイトのメラニン合成系が活性化されることも新しい発見である。本研究の成果は、脱色やカラーリングといった方法ではなく、cAMPとcAMPの競合阻害物質(アンタゴニスト)を用いて、メラノサイトにおけるメラニン色素産生能を可逆的に制御する方法の開発につながる。投与方法については現在検討中であり、近い将来には皮膚への塗布によって簡便に物質をメラノサイトに導入することが可能になる。

メラノサイトはメラニン色素を産生して真皮に紫外線が届かないようにすることで、炎症反応から肌を守ってくれる細胞である。日焼け止めスプレーには物理的・化学的に肌を守るための紫外線保護成分が含まれているが、紫外線を吸収した際に生じる化学反応で、かえって肌にダメージを与えてしまい、かぶれ、湿疹、吹き出物につながってしまう場合があり、シミやシワを防ぐために日焼け止めを塗

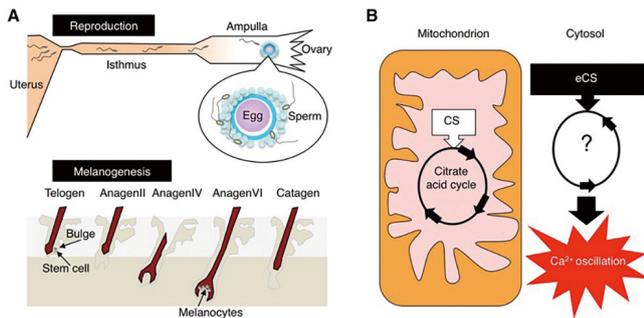


図7 eCsのメラニン色素形成および生殖における役割

A, 生殖および毛髪のリサイクルの模式図。B, 細胞におけるCSおよびeCSの役割分担。

布しているにも関わらず、別の症状で悩まされることになってしまう。一方、cAMPの塗布でメラノサイトが活性化され、メラニン色素が促進されれば、科学的にも根拠が明確であり、日焼け止めの代替法として有用である。

一方、eCSが男性の生殖機能に関与することは、イモリの研究から予想していたものの、精子でもCSが発現しているため、明確な結果が出ることは予想していなかった。ところが、年齢依存的に(人間では30歳からに相当)、KOマウスの産仔数が激減することから、男性の生殖機能におけるeCSの関与は予想よりも大きいと考えられる。また、女性の生殖機能にも、年齢依存的に(やはり人間の30歳からに相当)、KOマウスの産仔数が激減するといった結果も得られており、今後は男性・女性の両方向からの検討が必要である。

小脳におけるeCSの発現についてはまだ検討段階である。小脳も「うつ病」「自律神経失調症」との関連があることから今後検討する必要がある。一方、動物、植物、微生物に存在するホルモンとして知られるメラトニンは、概日リズムを司り、我々の睡眠を制御する物質であるが、メラトニンの分泌とメラニン色素生成、さらには生殖機能には深い関係があることが報告されている。また、我々の研究からも生殖系に異常を生じるマウスにおいて、神経系にも異常を示すことを報告している^{8, 9)}。神経系、色素形成、生殖系が何らかのメカニズムによってつながっている可能性が考えられる。

5. 総括

本研究から、ミトコンドリア以外に存在するクエン酸合成酵素の重要性が明らかになった。クエン酸は、我々にとって容易に摂取できるものであるため、その生理作用については正確な知識が必要である。本研究から、クエン酸の

役割について科学的根拠が提示され、クエン酸合成酵素の新しい機能の解明につながると考えられる。この成果は、脱色や毛染めといった方法ではなく、ミトコンドリア外のクエン酸合成酵素の活性制御、またはcAMPの投与によって体全体のメラニン色素の量をコントロールできることを示している。すなわち、白髪といった毛色の変化に対して、毛染めではなく、cAMPの塗布によって自然な黒色に戻すことができるかもしれない。皮膚の老化や、小脳の機能へのeCSの関与についても今後検討する必要がある。

(引用文献)

- 1) Vander Heiden, M. G. & DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **168** (4), 657-669 (2017).
- 2) Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324** (5930), 1029-33 (2009).
- 3) Fiume, M. M. *et al.* Safety Assessment of Citric Acid, Inorganic Citrate Salts, and Alkyl Citrate Esters as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol* **33** (2 suppl), 16S-46S (2014).
- 4) Huang, Y. C. *et al.* Disruption of the peroxisomal citrate synthase CshA affects cell growth and multicellular development in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Microbiol* **53** (1), 81-91 (2004).
- 5) Steingrimsson, E., Copeland, N. G. & Jenkins, N. A. Melanocyte stem cell maintenance and hair graying. *Cell* **121** (1), 9-12 (2005).
- 6) Harada, Y., Kawazoe, M., Eto, Y., Ueno, S. & Iwao, Y. The Ca²⁺ increase by the sperm factor in physiologically polyspermic newt fertilization: its signaling mechanism in egg cytoplasm and the species-specificity. *Dev Biol* **351** (2), 266-276 (2011).
- 7) Sanders, J. R. & Swann, K. Molecular triggers of egg activation at fertilization in mammals. *Reproduction* **152** (2), R41-50 (2016).
- 8) Miyado, K. *et al.* Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287** (5451), 321-324 (2000).
- 9) Ishibashi, T. *et al.* Tetraspanin protein CD9 is a novel paranodal component regulating paranodal junctional formation. *J Neurosci* **24** (1), 96-102 (2004).