

## 5. 色素細胞のメラニン生成に及ぼす伊豆赤沢海洋深層水の影響

○山本樹・山田勝久・柴田雄次・野村道康

(株ディーエイチシー)

### 【目的】

日焼けによるシミやソバカスは表皮基底層に存在するメラノサイト（色素細胞）が日光曝露によって活性化された結果、メラニンを過剰生産することに起因した老化の表現形であり、美容上大きな問題の一つとなっている。本研究では、色素細胞のメラニン生成に及ぼす海洋深層水（DSW）の影響について、生化学的および細胞生物学的手法により検討することを目的とした。

### 【方法】

DSW は伊豆赤沢深層水（取水深度 800m）の原水を除菌ろ過（孔径 0.2 μm）したものを用いた。なお、陽性対照としてコウジ酸を用いた。

培養マウスメラノーマ細胞（B16 細胞, 理研 BRC）の培養は全て 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件で実施した。B16 細胞は予め 10%ウシ胎児血清（FBS）を含むイーグル MEM（ナカライ）で 10 日間継代培養したのち、各評価用の培養器に播種した。次にメラニン生成を活性化するために培地を 10%FBS 含ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）に置換するとともに、各評価試料を添加（90mm ディッシュに 10 万個/枚を播種）し 4 日間培養した細胞内のチロシナーゼ活性およびメラニン量を測定した。細胞内チロシナーゼ活性は、評価培養後の B16 細胞をトリプシン-EDTA で剥離しダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）に懸濁後、0.1% TritonX-100 を加えて得た細胞ライセートにチロシナーゼの基質として 2.5mM L-DOPA 溶液を加え酵素反応（37°C, 3 時間）を測定した。また細胞内のメラニン量は、上述のライセートに 1M NaOH により細胞内のメラニンを溶出させて吸光度（492 nm）を測定しメラニン量とした。併せて Bradford 法によりタン

パク質量を求めてタンパク量当りのメラニン量として表した。次にメラニンの重合に関わるチロシナーゼ関連タンパク質（TRP）の mRNA 発現解析は、評価培養（96 ウェルプレートに 2 千個/穴を播種）後に常法に従って抽出した RNA を鋳型に cDNA を合成し、定量ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）によりメラニン合成に関わる酵素である TRP-1 および-2 の遺伝子（*Trp1*, *Trp2*）の発現について、β アクチンを内部標準遺伝子として相対的に定量した。最後に DSW がチロシナーゼ活性に及ぼす因子の検討にあたり、DSW 及びこれに含まれるミネラルの直接的な影響についてマッシュルーム由来のチロシナーゼ（Sigma）溶液を用いて上述の方法によって評価した。

### 【結果】

B16 細胞内のチロシナーゼ活性およびメラニン量は 5% DSW の添加により顕著に低下した。またメラニン重合において重要な酵素である TRP の mRNA である *Trp1* および *Trp2* の発現も顕著に低減した。これらの作用因子を調べるために、5% DSW 及びこれに含まれる各種構成ミネラル（Na, K, Ca, Mg）溶液のチロシナーゼに対する直接的な影響について検討したところ、K にはチロシナーゼ活性に対する抑制作用は見られず、Na > Mg > Ca の順で活性が強く抑制されることがわかった。一方 *Trp1* および *Trp2* の発現に及ぼす影響については、K および Ca には抑制作用は見られず、Na および Mg によって強く発現が抑制されることがわかった。

今後は、Na 及び Mg による *Trp1* 及び *Trp2* の発現抑制機序について詳細に検討を行う予定である。