

皮膚のキラルアミノ酸メタボロミクス

東條 洋介^{1*}・中根 舞子¹・三田 真史¹・浜瀬 健司²

はじめに

近年の質量分析技術とインフォマティクスの進展に伴うプロテオミクス・メタボロミクスの台頭は目覚ましいものがあるが、原則的にいずれの手法も対象とする物質の光学異性体を識別しない。筆者らは代謝物質の中心的存在ともいえるアミノ酸に焦点を当て、液体クロマトグラフィーの逆相・キラル分離モードを新規のマルチループ機構とアルゴリズムでつなぐ2次元-HPLCを開発し、タンパク質構成アミノ酸20種の光学異性体すべて(allo体を含め43種)を網羅的に識別して検出することに成功した¹⁾。この技術は生体試料(血液・尿・組織など)において、オリゴペプチドのような類似物質が多様に含まれる複雑なマトリクス中からfmolオーダー以下のアミノ酸光学異性体を分離・定量する能力を有しており、その情報を用いた解析手法を‘キラルアミノ酸メタボロミクス’と呼んでいる。これまで、D-セリン(D-Ser)、D-アスパラギン酸(D-Asp)を中心としたD-アミノ酸の哺乳類における分布や機能が明らかになり²⁻⁶⁾、哺乳類皮膚においては細胞外マトリクスとして存在するタンパク質中のL-アミノ酸残基の一部が光老化とともにD-体に異性化することが報告されているが^{2,7)}、遊離D-アミノ酸に関する検討はほとんど行われてこなかった。その一因として、皮膚に天然保湿因子として存在する膨大な遊離L-アミノ酸の存在が分析上の夾雑成分となり、D-体の解析を困難にしていたことがあげられる。

そこで本稿では、キラルアミノ酸メタボロミクスにより皮膚組織で明らかになった遊離D-アミノ酸含量や生理機能について概説する。

皮膚のキラルアミノ酸メタボロミクス

皮膚は遊離アミノ酸を天然保湿因子の一要素として利用しており、そのアミノ酸は表皮角化細胞で産生されるフィラグリンの代謝(酵素的加水分解)により恒常的に供給されると考えられている^{8,9)}。その結果として皮膚は遊離アミノ酸含量の高い組織の一つであり、キラルアミノ酸メタボロミクスを適用した。

健常なボランティアより提供された皮膚(頭皮)を表皮と真皮に分離し、それぞれ液体窒素温度において凍結粉碎した。粉碎物に蒸留水を加えて攪拌した後、20倍量のメタノール(MeOH)を加えて上清を得た。また、角層は健常なボランティアの上腕屈側より粘着テープを用いて所定回数剝離し、95% MeOH水溶液中でアミノ酸を抽出した。以上の方法で抽出したアミノ酸をホウ酸塩緩衝液(pH 8.0)中で4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole(NBD-F)により蛍光誘導体化し、二次元ミクロHPLC(資生堂)に供した¹⁰⁾。

ヒト真皮・表皮・角層において検出された遊離D-アミノ酸を図1に示した。真皮と表皮にはD-Asp, D-Glu, D-Ala, D-Ser, D-Proが存在し、角層においてはD-Proを除く4種が見いだされた。表皮中D-Serは他のD-アミノ酸4種に比べて含量が高く、その傾向は角層において

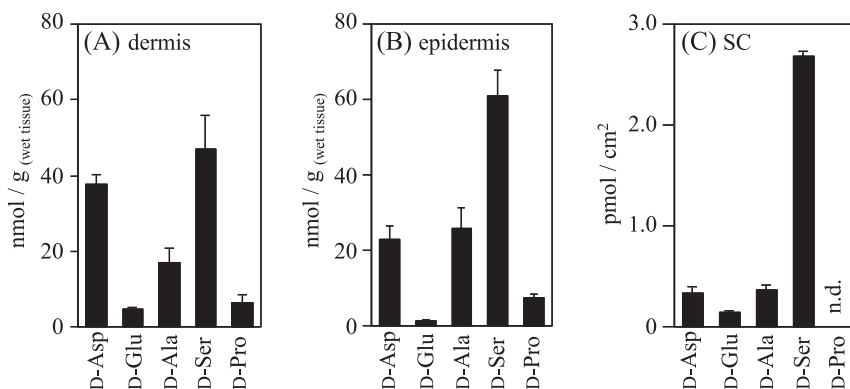


図1. キラルアミノ酸メタボロミクスを用いたヒト皮膚における遊離D-アミノ酸含量解析：A：真皮，B：表皮，C：角層(SC: stratum corneum)。平均±S.E. (n=5 or 6)。n.d.: 検出限界未満。

*著者紹介 ¹資生堂リサーチセンター(副主任研究員) E-mail: yousuke.toujo@to.shiseido.co.jp

²九州大学大学院薬学研究院

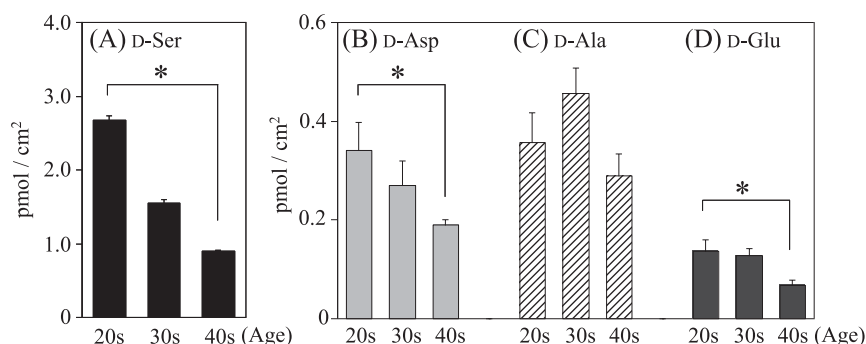


図2. ヒト角層における内在性遊離D-アミノ酸含量の加齢に伴う変化. 平均±S.E. ($n=5$), *: $p < 0.05$ (Student's t-test).

より一層顕著であった。今回の検討で明らかになったヒト表皮におけるD-Ser含量は、マウスの中樞以外の組織で報告されている含量（脾臓、肝臓、腎臓において最大約40 nmol/g）と比べ高いことが分かった¹¹⁾。また表皮においてD-Serに次いで含量が高かったD-Alaについては、マウスで報告のある下垂体、肝臓中含量（約20 nmol/g）と同等の水準であることが示された¹¹⁾。角層における各遊離アミノ酸の%D（L-体とD-体の総量に占めるD-体の割合）は高くても0.2%程度であり、マウスで報告されている種々の組織における%Dと比べても低い水準であった。この理由は、角層では天然保湿因子として産生された多量の遊離L-アミノ酸が存在するためであると考えられる。一方、真皮では遊離アスパラギン酸の%Dが2%を超え、皮膚組織においてもっとも高い値であった。

角層におけるアミノ酸含量は加齢に伴い変化することが知られていることから、今回見いだされた角層中遊離D-アミノ酸4種についても加齢による含量変化を検証した（図2）。その結果、検討した20代から40代にかけて遊離D-Ser、D-Asp、D-Gluが減少することが明らかになった。本検討の年齢範囲では有意な変化が認められなかったD-Alaについては、2-4歳児から成人にかけては1/2程度に減少することが示され、L-体が幼児から成人にかけて増加することとは対照的であった（データ省略）。その他の遊離D-アミノ酸含量の加齢変化もL-体とは異なる挙動を示しており、D-体とL-体が独立の由来や代謝機構を有することが示唆された。

遊離D-アミノ酸の皮膚における生理機能

D-Asp 真皮におけるAspの%Dは2%を超え、皮膚における%Dでもっとも高値であった。そこで真皮線維芽細胞に対するD-Aspの機能を*in vitro*で検証した結果、ラジカル産生源の添加により惹起される酸化毒性を軽減する作用が認められた。図3にはヒト培養繊維芽細胞にラジカル源として過酸化水素を所定濃度で添加した時の細胞生存率をalar blue法で評価した結果を示した。過酸化水素を培地中に4 mM含有する条件において、D-Asp濃度依存的に細胞生存率が改善することが示された。この作用はL-Aspでは認められなかった。過酸化水素がヒドロキシラジカル源であるのに対し、過酸化ラジカル源として知られる2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorideにより酸化毒性を惹起する評価系においてもD-Aspの抗酸化作用が認められた。D-体とL-体で抗酸化作用に違いが生じたことは、この抗酸化機能がAspの化学的な性質に起因するのではなく、内因性の抗酸化物質の産生調節などに関与するためであると考えられた。

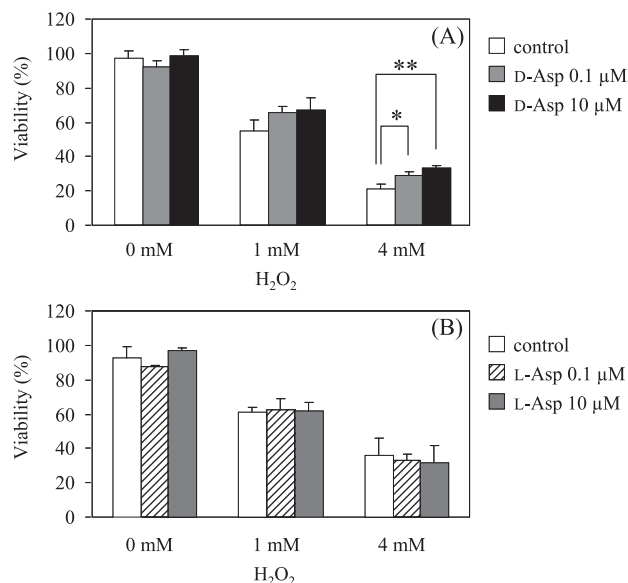


図3. 過酸化水素により惹起される酸化毒性に対して遊離アスパラギン酸光学異性体が及ぼす影響（ヒト真皮繊維芽細胞）。平均±標準偏差 ($n=3$), *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (Bonferroni/Dunn)。

胞にラジカル源として過酸化水素を所定濃度で添加した時の細胞生存率をalar blue法で評価した結果を示した。過酸化水素を培地中に4 mM含有する条件において、D-Asp濃度依存的に細胞生存率が改善することが示された。この作用はL-Aspでは認められなかった。過酸化水素がヒドロキシラジカル源であるのに対し、過酸化ラジカル源として知られる2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorideにより酸化毒性を惹起する評価系においてもD-Aspの抗酸化作用が認められた。D-体とL-体で抗酸化作用に違いが生じたことは、この抗酸化機能がAspの化学的な性質に起因するのではなく、内因性の抗酸化物質の産生調節などに関与するためであると考えられた。

D-Ala 表皮において比較的含有の高いD-Alaは、表皮角化細胞のラミニン332産生を促進することが正常

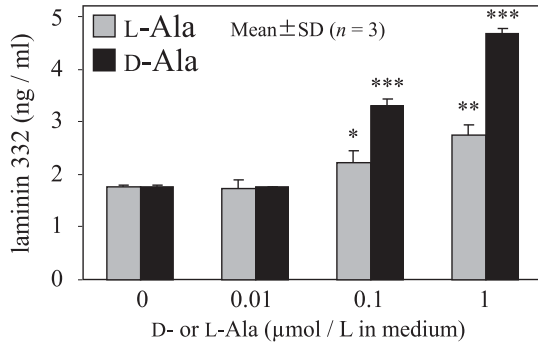


図4. 表皮角化細胞 (HaCaT) が産生するラミニン 332 量に対して D- または L-Ala が及ぼす影響. 平均 ± S.D. ($n = 3$), *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (Tukey Kramer's test).

表皮角化細胞 (hKC) および株化された角化細胞である HaCaT の双方で見いだされた. ラミニン 332 は表皮と真皮の境界にある基底膜の表皮側に存在し, 基底膜を hKC にアンカリングするタンパク質であるインテグリンと基底膜側で結合すると考えられている¹²⁾. ラミニン 332 は基底膜の修復を促進する機能も有しているが, 紫外線暴露で減少することが報告されている¹²⁾. 図4には HaCaT が産生するラミニン 332 (ELISA により検出) に及ぼす D/L-Ala の影響を示した. D-Asp, D-Ser, D-Pro およびそれらの L-体はラミニン 332 の産生量に影響を及ぼさなかったのに対し (データ省略), D/L-Ala は濃度依存的にラミニン 332 産生を促進し, D-Ala は L-Ala に比べて約 4 倍高い産生促進機能を有することが示された. ラミニン産生能が HaCaT に比べて低いことが知られている hKC を用いた系においては, D-Ala のみ検討した n 数において有意な産生促進が認められた. この hKC を表皮として用いる三次元培養皮膚モデルにおいても, D-Ala が基底膜におけるラミニン 332 含量を増加させることを免疫化学染色により確認した (データ省略). 以上のことから, D-Ala は基底膜の修復や維持を通じて角化細胞の正常なターンオーバーに関与する可能性が示された.

内在性遊離 D-アミノ酸の由来

哺乳類に内在する遊離 D-アミノ酸の由来は, ①哺乳類が発現するラセマーゼによる生合成 (哺乳類ではセリンラセマーゼ¹³⁾ およびアスパラギン酸ラセマーゼ¹⁴⁾ のみが報告されている), ②腸内細菌が産生する遊離 D-アミノ酸の血中移行¹⁵⁾, ③食品に含まれる遊離 D-アミノ酸の血中移行¹⁶⁾ が報告され, 主要な要素であると考えられる. これらの由来の中で食品の経口摂取については, 適切な食品を選択することにより比較的容易に体内の

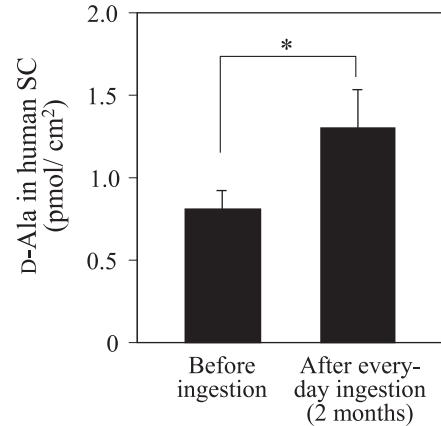


図5. D-アミノ酸含有食品の継続摂取が角層中遊離 D-Ala 含量に及ぼす影響. 平均 ± S.E. ($n = 20$), *: $p < 0.05$ (Student's paired t-test).

D-アミノ酸レベルを調節できる可能性があることから, 経口摂取した遊離 D-アミノ酸が皮膚に到達する可能性を検証した. 遊離 D-Ala, D-Asp, D-Glu など多量に含有する発酵原料を配合した飲料を 2 か月間連用し (125 mL/day), その前後における角層中遊離 D-アミノ酸含量変化を解析した ($n = 20$). その結果, 角層中遊離 D-アミノ酸 4 種の総量は連用前に比べて約 30% 有意に増加することが示された. この時の遊離 D-Ala 含量の変化 (角層 2 層分の合算値) を図5に示した. これらの結果は遊離 D-アミノ酸の生理機能を利用する際に経口摂取が有効であることを示唆しており, 食品中遊離アミノ酸についても光学異性体を識別するキラルアミノ酸メタボロミクスによる成分解析は有用であると考えられる.

食品のキラルアミノ酸メタボロミクス

前項で述べたように, 食品中の遊離 D-アミノ酸は体内に移行して機能を発揮する可能性があることから, 食品に含まれる遊離アミノ酸についてキラルアミノ酸メタボロミクスを適用した. 多くの報告が示すように, 発酵食品は遊離 D-アミノ酸含量がその他の食品に比べて高い傾向にある^{17,18)}. そこで本項では市販のヨーグルト 5 種の解析結果を表1に示した. まず含量の高い D-アミノ酸として D-Ala があげられ, すべての検討対象において Ala の D-体含量が L-体と同等以上のオーダーであることが分かった. 次いで, Asp および Glu がすべてのヨーグルトで 10 nmol/g 程度検出され, 次いで Ser および Arg がすべての検討対象中に数 nmol/g 認められた. 特に興味深いのは Type-E における Ala や, Type-B, C, D, E における Glu のように, L-体を遥かに凌ぐ含量の D-体が存在することである. ヨーグルトのように製品中に生菌を含有

表1. 市販ヨーグルト5種中遊離D/L-アミノ酸含量 (nmol/g)

Amino acid	Type-A		Type-B		Type-C		Type-D		Type-E	
	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L
His	0.3	46.0	0.2	8.9	0.3	56.6	0.2	17.2	0.3	36.1
Asn	nd	36.1	nd	20.9	0.3	17.3	0.1	48.9	0.1	59.5
Ser	4.9	159.0	1.4	13.8	1.8	27.4	0.6	0.7	8.5	157.8
Gln	trace	89.0	1.4	4.7	trace	21.7	0.2	17.3	1.8	150.7
Arg	2.7	44.6	3.0	4.1	42.1	28.1	9.4	35.8	2.3	51.3
Asp	20.2	83.1	4.8	2.8	31.2	91.5	3.3	2.7	28.2	66.2
Gly	—	86.0	—	7.2	—	38.1	—	29.6	—	79.1
allo-Thr	nd	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Glu	23.0	118.7	34.6	1.7	26.4	1.9	87.1	0.7	31.5	1.8
Thr	nd	82.0	nd	39.0	nd	22.3	nd	16.0	nd	52.4
Ala	144.4	146.9	33.3	89.6	58.7	33.6	41.4	30.0	174.5	70.7
Pro	trace	397.0	0.3	196.9	0.4	742.9	0.2	166.2	0.3	388.8
Met	nd	7.4	nd	0.4	nd	3.2	nd	0.0	nd	13.8
Val	nd	141.0	nd	26.9	nd	38.3	nd	4.9	nd	112.6
allo-Ile	nd	nd	trace	nd	trace	nd	nd	nd	trace	nd
Ile	nd	24.3	nd	10.0	nd	4.1	nd	6.2	nd	34.3
Leu	trace	57.7	0.1	11.9	0.4	47.3	nd	23.8	nd	111.5
Phe	trace	16.8	0.1	5.0	0.2	71.5	nd	1.4	trace	55.0
Trp	nd	5.7	nd	0.7	nd	9.2	nd	0.3	nd	5.1
Lys	nd	56.8	nd	13.7	nd	116.1	nd	22.9	nd	81.6
Tyr	nd	23.9	nd	21.2	nd	122.5	nd	7.6	nd	31.6

nd：検出限界未満，—：Glyは光学異性体を有さないため，便宜的にL体の欄に含量を示した。

する条件では保管中に%Dが変化していると推察されるが，このようにアミノ酸光学異性体の含量が製法や保存期間により変化に富んでことは，食品中の遊離アミノ酸含量について再評価が必要であることを示唆している。

おわりに

本稿では表皮・真皮には数種の遊離D-アミノ酸が存在し，表皮（角層）においては加齢に伴って減少することを述べた。また，遊離D-アミノ酸が皮膚恒常性維持に関わる生理機能を有していることを例示した。これらの結果は皮膚研究の領域でもL-アミノ酸だけでなく，D-アミノ酸についても研究すべき対象であることを示している。また，D-アミノ酸が皮膚において必要な機能を担っていることが明らかになれば，皮膚にそれらを補う方法として塗布や経口摂取が有効であると考えられる。経口摂取後の動態や塗布時の経皮吸収，さらに食品やその原料自体におけるキラルアミノ酸メタボロミクスにより，D-アミノ酸，L-アミノ酸それぞれの新たな価値が発見され，それを利用する産業応用が一層進展するものと期待される。

文 献

- 1) Miyoshi, Y. *et al.*: *Chromatography*, **35**, 49 (2014).
- 2) Hamase, K. *et al.*: *J. Chromatogr. B*, **781**, 73 (2002).
- 3) Fujii, N.: *Orig. Life Evol. Biosph.*, **32**, 103 (2002).
- 4) Hashimoto, A. *et al.*: *FEBS Lett.*, **296**, 33 (1992).
- 5) Snyder, S. H. and Kim, P. M.: *Neurochem. Res.*, **25**, 553 (2000).
- 6) Nagata, Y. *et al.*: *FEBS Lett.*, **444**, 160 (1999).
- 7) Fujii, N. and Saito, T.: *Chem. Rec.*, **4**, 267 (2004).
- 8) Middleton, J. D.: *Br. J. Dermatol.*, **80**, 437 (1968).
- 9) Kamata, Y. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **284**, 12829 (2009).
- 10) Hamase, K. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **1217**, 1056 (2010).
- 11) Miyoshi, Y. *et al.*: *J. Chromatogr. B*, **877**, 2506 (2009).
- 12) Nishiyama, T. *et al.*: *J. Dermatol. Sci.*, **24**, S51 (2000).
- 13) Wolosker, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13409 (1999).
- 14) Kim, P. M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3175 (2010).
- 15) Karakawa, S. *et al.*: *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 8083 (2013).
- 16) Morikawa, A. *et al.*: *Amino Acids*, **32**, 13 (2007).
- 17) Erbe, T. and Bruckner, H.: *J. Chromatogr. A*, **881**, 81 (2000).
- 18) Gobetti, M. *et al.*: *J. Food Sci.*, **59**, 881 (1994).