

氏名(本籍)	マイラ オリナ ブリリアル (フィリピン)			
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博甲第 5738 号			
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	<b>Mechanism of Melanogenesis Regulation by Daphnane Diterpenes from <i>Thymelaea hirsuta</i> L. in Pigment Cells</b> ( <i>Thymelaea hirsuta</i> L. 由来 Daphnane 化合物によるメラニン産生調節機構の解明)			
主査	筑波大学教授	博士(農学)	磯田博子	
副査	筑波大学教授	農学博士	弦間洋	
副査	筑波大学教授	理学博士	繁森英幸	
副査	筑波大学准教授(連携大学院)	博士(農学)	渡辺純	

### 論文の内容の要旨

皮膚や毛髪に含まれるメラニン色素は紫外線を吸収する機能を持つ。細胞や遺伝子は紫外線により損傷を受けるため、メラニンは紫外線による障害を回避するという重要な役割を果たしている。メラニンは表皮基底層に分布するメラノサイトと呼ばれるメラニン産生細胞において合成される。メラニン産生は酵素の一つであるチロシナーゼの働きにより、アミノ酸の一つであるチロシンがドーパに酸化されることから始まり、チロシナーゼの働きにより合成されたドーパが酸化・重合し最終的にメラニンが産生される。メラノサイトにおいて合成されたメラニンはメラノソームと呼ばれる粒子に蓄積し、メラノサイトから伸びる樹状突起を介して周辺のケラチノサイトへと移行し、皮膚に沈着することが知られている。メラニンは皮膚組織において紫外線による細胞や遺伝子の損傷を回避するといった重要な役割を果たしている。

近年、天然物由来成分からの皮膚恒常性維持を目的としたメラニン産生制御に関する様々な研究が行われている。本研究では環地中海乾燥地域である地中海アロマ植物を探索源とした。乾燥地に成育する植物は温度・塩度・湿度・光・風など、成育環境における劣悪環境因子から個体を防御するため、有用な物質を多く蓄積すると考えられる。環地中海乾燥地域に成育する植物のうち、北アフリカ研究センターの調査より、民間伝承的に薬用植物として用いられてきた地中海アロマ植物 *Thymelaea hirsuta* を探索源とし、メラニン産生制御活性についての探索を行った。マウス由来の悪性黒色腫細胞株である B16 メラノーマ細胞はメラニン産生による黒色化が顕著であり影響評価が簡便なため、メラニン産生系のモデルとして汎用される。従って B16 メラノーマ細胞を用い、*T. hirsuta* がメラニン産生制御物質を有するか検討した。*T. hirsuta* の抽出物は、B16 メラノーマ細胞において細胞生存率及び総タンパク質量に影響を及ぼすことなくメラニン産生を阻害し、その活性はチロシナーゼの発現阻害に起因することが示された。メラニン産生阻害活性が示された *T. hirsuta* から、メラニン産生阻害物質の探索を行ったところ、*T. hirsuta* のメタノール抽出物を分配・分離した画分にメラニン産生阻害活性が示され、さらにメラニン産生阻害物質は daphnane 型ジテルペン gnidilatin、gniditrin、gnidicin、genkwadaphnin、gnidilatidin、synaptolepis factor K4、hirsein A (HA)、と hirsein B (HB)

であると同定された。このうち gnidilatin、gniditrin、synaptolepis factor K4、HA と HB に対し、メラニンアッセイを行ったところ、すべての分画にメラニン産生の抑制効果が認められ、とくに HA と HB に有為な抑制が実証された。また、この5つの分画に、細胞毒性は認められなかった。Daphnane 型ジテルペン gnidilatin 及び hirsein A によるメラニン産生阻害メカニズムを明らかにするためにウェスタンブロッティング手法を用いて、メラニン合成経路において多くの反応を触媒する酵素であるチロシナーゼタンパク質の発現に与える影響について検討した。

メラニン産生阻害メカニズムを明らかにするために *T. hirsuta* 由来メラニン産生阻害物質の機能解析を行った。ウェスタンブロッティングの手法を用いて、チロシナーゼタンパク質の発現に与える影響について検討した。さらに網羅的な遺伝子発現解析手法である DNA マイクロアレイと定量 Real-time PCR の手法を用いてメラニン産生阻害メカニズムについて遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析の結果からは、daphnane 型ジテルペン HA と HB は B16 メラノーマ細胞においてメラニン産生を阻害するだけでなく、分化を誘導することが示唆された。メラニン生成関連遺伝子の発現量が顕著に減少した遺伝子は *Mitf*、*Mcl1*、*Rab27a*、*Mlph*、*Myo5a*、*Myo7* であった。一方上昇した遺伝子は、*Ppap2b*、*Gadd45b*、*Pxn*、*Map2k3*、*Wisp1*、*Prkx* と *Met* であった。これらの解析により、Daphnane 型ジテルペンによるメラニン産生抑制、さらにはメラノソーム不活化のメカニズムが解明された。

## 審査の結果の要旨

申請論文は、民間伝承的に薬用植物として用いられてきた地中海アロマ植物 *Thymelaea hirsuta* を探索源とし、皮膚や毛髪に含まれるメラニン色素産生抑制物質として2種の新規化合物を含む Daphnane 型ジテルペン9種を見出した。Daphnane 型ジテルペン類のメラニン産生抑制作用は新規機能性であり、そのメカニズムについてウェスタンブロッティングによるメラニン産生に関連するマーカータンパク質の発現、マイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析を行い、細胞情報伝達系を明らかにした。

メラニンは皮膚組織において紫外線による細胞や遺伝子の損傷を回避するといった重要な役割を果たしており、本研究において見出された Daphnane 型ジテルペン類による皮膚組織におけるメラニン産生の制御のメカニズムは、皮膚がんの危険性回避や白斑症状の改善効果、美白効果などの様々な応用研究に発展するものと期待できる。

論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。