

皮膚の健康・老化状態の非侵襲的解析法： 質量分析法を基盤としたケラチン上の化学修飾スクリーニング法の開発

東北大学大学院薬学研究科 臨床分析化学分野

大江 知行、李 宣和、後藤 貴章、宮本 浩平

Purpose: Human skin is one of the major barriers of our body against environmental stimuli such as UV and chemical exposures. Therefore, as the main constituent of the skin, keratins have recently been recognized as the major target proteins to various chemical modifications. However, because of the difficulties associated with their insolubility and handling, there have been lack of studies to identify the sites of chemical modification in keratins. Here, we introduce a combination of non-invasive sampling, simple clean-up, efficient digestion method, and MS analysis to screen keratin modifications. This approach would provide significant information of the chemical modifications including oxidative modifications on keratins that could be useful as biomarkers of the skin damage.

Experimental: The analytical methodology to detect chemical modifications on skin keratins were optimized using tape stripping, filter-aided sample preparation, tryptic digestion, MALDI-TOF/MS *etc.* The tryptic keratins in human skin with/without H₂O₂ treatment were analyzed by MALDI-TOF/MS to confirm the oxidative modification sites.

Results and Discussion: We have developed the methodology to identify chemical modifications in human skin keratins. Using the methodology, we have identified that Met^{259, 262, 295, 469}, located in the α -helical rod domain of K1, were the most susceptible sites to oxidation induced by H₂O₂ in vitro and in vivo.

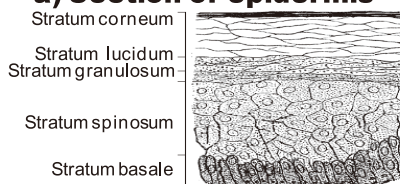
1. 緒 言

1-1 目的

表皮で作られるケラチンは、皮膚の最外側の角質層として28日程度のサイクルで剥離、脱落する疎水性蛋白質である (Fig. 1)¹⁾。即ち、このものは、酸化やUV照射に対する防護壁として常に外部からの刺激に直接晒されており、他の生体構成蛋白質とは極めて異なる環境にある。それ故、ケラチン上の状態変化を分別し情報源として活用することは、皮膚の健康・老化状態を知る上で極めて有用な方法論となると思われる。

蛋白質上の微小な状態変化を明らかにする手段としては、その蛋白質上の化学修飾 (酸化修飾など) を精査することが有効である。例えば、ケラチン上の化学修飾としては、活性酸素種^{2,3)}、UV照射⁴⁾によるカルボニル化、更には脂質過酸化を介した脂質化修飾など、数多くの可能性が考えられる。しかしながら、このような微小な変化を分別するには、抗体やプローブを用いたイメージングでは不十分であり、他の精緻な分析基盤が必要となる。

a) Section of epidermis



◆Barrier of our body

Skin is continuously exposed to external stimuli such as UV, chemicals.

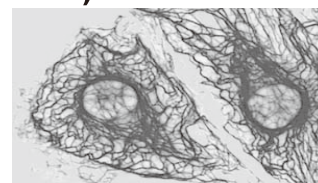
◆Short turn over

The most exterior layer of the skin (stratum corneum; SC) is replaced in 28 days.

◆Cells of the SC contain keratins

Keratin (K) base/acid pairs K1/K10, K2/K9 are mainly in the SC.

b) Keratins



◆Intermediate filament proteins

Keratins are members of a family composing important structures of cells.

◆High proportion of Gly and Ala

Sterically-unhindered hydrogen bonding facilitate to form helical filaments.

◆Cys-Cys

Disulfide bonds confer additional strength rigidity and insolubility.

Fig. 1 Section of epidermis (a) and Keratins (b)

以上の事を鑑み申請者は、化粧品の抗酸化・UVカット作用による皮膚の保護効果をも解析し得る非侵襲的かつ簡便な皮膚状態評価法を開発するため、質量分析法を基盤としたケラチン上の化学修飾、取り分け酸化修飾スクリーニングの方法論を確立することを目的とする。

1-2 背景

皮膚状態評価法の現状：非侵襲的な皮膚状態評価法の試みとして、筑波大とカネボウのグループによる皮膚内コラーゲン構造の3次元画像化が報告されている⁵⁾。しかし、特殊な分析機器を必要とすること、データから皮膚状態の質的变化の原因を直接フィードバック出来ないこと、などの制限もある。

化学修飾研究の現状：生体高分子上の化学修飾を情報源と

* Non-invasive analysis to monitor skin aging conditions: screening of chemical modifications on keratin proteins by mass spectrometry

Tomoyuki Oe*, Seon Hwa Lee, Takaaki Goto, Kohei Miyamoto

Department of Bio-analytical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University



する dosimetry 研究は、化学物質の曝露・毒性評価などで広く行われており、生体内のアルブミン、DNA の修飾体が広く用いられてきた。しかしながら、皮膚の健康・老化状態を評価する研究例は皆無である。

研究対象としてのケラチン：ケラチンは、皮膚に多量に局在し、非侵襲的に採取可能である一方、疎水性で取り扱い困難な蛋白質である。更に生理活性が無い事も相まって研究対象としての例も乏しかった。しかし最近、化学工場労働者皮膚から、環境被曝としてのナフタレン修飾ケラチンが示されるなど⁶⁾、ケラチンを用いた興味深い研究が報告され始めている。

2. 実験

2-1 試薬・基材類

テープはアサヒバイオメッド社 (東京) 製の角質チェッカー用 (25×25mm) を用いた。超純水は大和薬品社 (仙台) 製を、更に Millipore 社 (Billerica, MA, USA) 製 Milli-Q でろ過した物を、LC 用アセトニトリルは関東化学社 (東京) 製を用いた。2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) は東京化成社 (東京) 製、dithiothreitol (DTT)、iodoacetamide (IAA)、mercaptoethanol、H₂O₂、sodium dodecyl sulfate (SDS)、重炭酸水素ナトリウム、塩酸、尿素、リン酸、リン酸二ナトリウム (12 水和物)、リン酸一ナトリウム (無水物)、NaCl はナカライテスク社 (京都) 製、2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris)、2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenol (butylated hydroxytoluene; BHT) は和光純薬社 (大阪) 製、トリプシンは Promega 社 (Madison, WI, USA) 製の物を用いた。ヒト angiotensin (Ang) II は Calbiochem 社 (San Diego, CA, USA) 製、ACTH (18-39) は Bachem 社 (Budendorf, Switzerland) 製、insuline chain B (酸化体) は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) 製を用いた。Amicon Ultra molecular cut off filter (0.5mL, <30K) は Millipore 社 (Billerica, MA, USA) 製を、ZipTipC18 カートリッジは Waters 社 (Bedford, MA, USA) 製を用いた。また、ヒト表皮ケラチンは、実験者 (K.M.) の上腕部より採取した。ホモジナイザーはフナコシ社 (東京) 製グラインダーに Scientist Specialities 社 (Omaha, NE, USA) 製を用いた。

2-2 分析機器

MALDI-TOF/MS (Voyager-DE STR, Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) を以下の条件で用いた: mode: positive reflectron, mass range: m/z 500–5000; extraction delay time: 100 sec; accelerating voltage: 20kV; spectra: average of 100–150 laser shots. カリブレーションは、Ang II (m/z 1046.5418)、Ang I (m/z 1296.6800)、ACTH (m/z 2465.1989)、insuline chain B (oxidized) (m/z

3494.6513) を用いて行った。蛋白質同定の peptide mass fingerprinting (PMF) 法は、MS-Fit (ProteinProspector Version 5.2.1 Basic, UCSF Mass Spectrometry Facility) を以下の検索条件で用いた: データベース, SwissProt. 2008. 12. 16; 消化酵素, トリプシン; maximum number of missed cleavages, 2; constant modifications, carbamidomethyl (C), minimum matches, 4; sort type, score sort; considered modifications, oxidation of M; min precursor ion matches, 1; MOWSE On, 1; MOWSE P factor, 0.4; masses, monoisotopic; mass tolerance, 0.2Da。検索にはシグナル/ノイズ比が 14.0 以上のピークを用いた。サンプル調製は、試料 (0.5μL) 及び 150mM DHB 溶液 (0.1%v/v リン酸を含む 50%v/v アセトニトリル溶液) (0.5μL) をステンレス製 MALDI プレート上に順次滴下し、室温で乾燥させて用いた。

2-3 ケラチンの皮膚からの採取、回収、精製、酵素消化 (Fig.2)

表皮蛋白質の採取と回収：表皮上の脂質等を除くため、上腕部皮膚を予めエタノールで清拭し、テープを張り 3 回押しつけ、一回目のテープは廃棄した。次いで 2 回目のテープを同様に 3 回押しつけ、この物を分析に用いた。テープの 1/4 (6.25×25mm) を 0.1%SDS/PBS 緩衝液 (50mM sodium phosphate buffer, 0.15M NaCl, 2mM BHT, pH7.0, 200μL) 中、handy pestle でそぎ落とし、11,300g、4℃、10 分間遠心し、その上清を 0.65mL の遠心チューブに移した。

酵素消化と精製：常法に従い、20mM DTT/RCM 緩衝液 (8mM 尿素、50mM Tris, 0.1M mercaptoethanol, 2mM BHT, pH8.6) 中 54℃、1 時間の還元反応に付し、110mM iodoacetamide/RCM 緩衝液中、室温、暗所で 45 分間アルキル化に付した。還元アルキル化後の試料は、molecular cut off filter (<30K) に付し、11,300g、

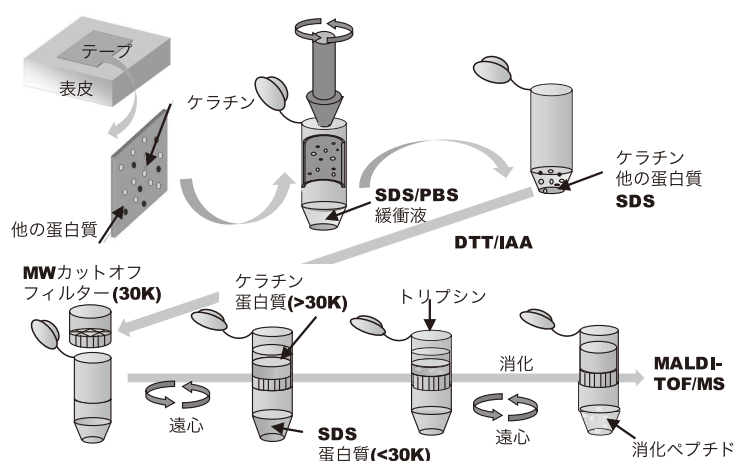


Fig. 2 Sample preparation for non-invasive skin keratin analysis

4℃、12分間遠心し、分析の妨害となるSDS及び共存する小蛋白質を濾液として除去した。フィルター上の残渣を100mM 重炭酸アンモニア水溶液 (100μL, 2mM BHTを含む) に溶解し、トリプシン (0.75μg) 存在下、37℃、オーバーナイトでインキュベートした。消化ペプチドは、11,300g、12分間遠心し濾液として回収、フィルター上に残った溶液もフィルターユニットを逆さまにし1,000g、3分間遠心する事により回収した。消化ペプチド溶液は窒素気流下で乾固させ0.1%TFAを含む5%(v/v) アセトニトリル水溶液50μLに再溶解した。

脱塩操作：再溶解後の試料の脱塩精製は、予めアセトニトリル (10μL×3)、次いで0.1% TFA水溶液 (10μL×3) で平衡化したZipTipC18カートリッジに数回通導する事により保持、0.1%TFA水溶液 (10μL×3) で洗浄、0.1%TFAを含む75%(v/v) アセトニトリル水溶液 (10μL×5) で溶出し、溶出液を窒素気流下で乾固させた。残渣は50%アセトニトリル水溶液 (40μL) で再溶解後、その一部 (0.5μL) をMALDI-TOF/MS分析に付した。

2-4 酸化実験

in vitroでの酸化実験：2-3で得られた2回目のテープの1/4 (6.25×25mm) を、1.8mLのH₂O₂溶液 (0, 2, 5, 10, 40mM) と37℃、30分間インキュベーションした。反応後、テープを水 (1mL×2) で洗浄し、以下の操作は、2-3と同様に行い、試料とした。

in vivoでの酸化実験：エタノールで清浄したヒト上腕部に、3%H₂O₂溶液で湿潤した脱脂綿 (30mm×30mm) を軽く押し当て、一定時間後、水に浸した脱脂綿 (30mm×30mm) で酸化部位を洗浄した。乾燥後、テープを張り3回押しつけ、その1/4 (6.25×25mm) を試料とし、以下の操作は2-3と同様に行った。

3. 結果

3-1 ケラチンの回収実験

皮膚角質層蛋白質の非侵襲的採取には、表皮中薬物の抽出等に用いられるテープストリッピング法⁷⁾を、試料の精製にはプロテオミクスで多用されるfilter-aided sample preparation (FASP) 法⁸⁾を検討した。最適条件を用いた時のトリプシン消化後のMALDI-TOF/MSスペクトルをFig.3

に示した。その結果、角質層蛋白質由来の75のペプチドピークの内、61ピーク (K1:15; K2:11; K9:21; K10:14. Total81%) がケラチンに帰属された。この事は、極めて難溶性で取扱いの困難なケラチンを、テープストリッピング法による採取およびFASP法のみで、ほぼ選択的に精製・回収可能である事が示された。

3-2 酸化修飾位置の同定

次いで、3%H₂O₂で30min処理したヒト上腕部から試料を得、ケラチン酸化修飾を精査した。その結果、主要な酸化修飾ターゲットはK1とK10であり、とりわけK1のα-ヘリックスドメイン上のMet^{259, 262, 296, 469}が濃度依存的に酸化を受け、MALDI-TOF/MSにより容易に分別可能であった (Fig.4)。ちなみに、操作中の酸化はBHT添加により抑制された。また、修飾アミノ酸は、MS/MS解析により別途確認した。

3-3 反応時間と酸化修飾の関係

ついで、これらのMet上の酸化修飾が、酸化ストレスを量的に反映するマーカーとなるか否かを判断する目的で、上記Metの酸化を、H₂O₂との処理時間との関連でも精査した。その結果、いずれも酸化修飾の割合は、処置時間を

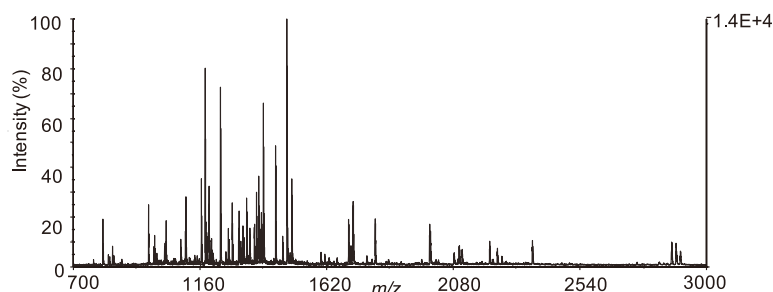


Fig. 3 MALDI-TOF/MS spectrum of human skin proteins after tryptic digestion

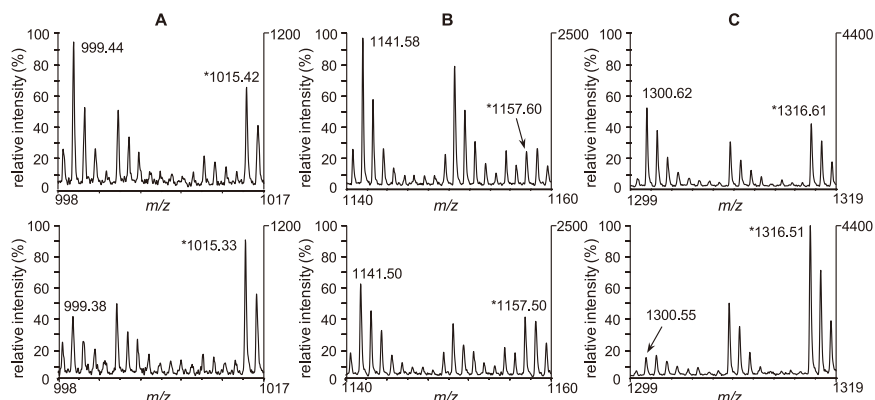


Fig. 4 MALDI-TOF/MS spectra of keratins from human skin (A) D²⁹⁰VDGAYMTK²⁹⁸ (K1, MH⁺; m/z 999.44), (B) D⁴⁶⁴YQELMNTK⁴⁷² (K1, MH⁺; m/z 1141.52), and (C) N²⁵⁸MQDMVEDYR²⁶⁷ (K1, MH⁺; m/z 1300.40) after treatment with 3% H₂O₂ for 0 min (upper) and 30 min (bottom). * represents an oxidized peptide (+ 16 Da).

反映しており、酸化ストレスの指標となると考えられた (Fig.5)。

4. 考 察

今回、皮膚の健康・老化状態の非侵襲的解析法開発を目的として、皮膚角質層ケラチンの採取を粘着テープによるテープストリッピング法、クリーンアップをmolecular cut off filterによるFASP法により行い、トリプシン消化とMALDI-TOF/MSの利用により、ケラチン上の化学修飾を簡便に分別出来る方法論の開発を試みた。

その結果、極めて疎水性で取扱い困難なケラチン上の化学修飾を簡便に評価する系を確立し、ケラチンが皮膚の健康・老化状態を知る情報源となり得る事、Metの酸化が酸化ストレスの指標となり得る事を確認した。

今後、他の生理的酸化条件 (Cu^{II} /アスコルビン酸、 MnO_2)、UV照射 (254nm)、脂質化条件 (過酸化脂質 13-HPODE、分解物 4-hydroxy-2 (E)-nonenal) でも検討し、これら修飾体の表皮での存在を確認する。また、ベースラインレベルの酸化修飾を市販抗酸化クリーム継続的塗布で減少し得るか否か、多変量解析により皮膚状態を定量的に解析出来るか否かも精査し、本コンセプトの妥当性を検討する予定である。

5. 総 括

『非侵襲的かつ汎用機器で簡便に皮膚状態を評価する方法論』は、現在のところ国内外で見るとべき物がない。それ故、プロテオミクスとdosimetry研究の概念を取り入れた本研究は、通常の分析施設で常備している機器 (MALDI-TOF-MS) でも対応可能であり、国内外に高いインパクトを与える物と期待される。

更に、本法は、皮膚の健康・老化状態、更には皮膚環境のみならず、化粧品抗酸化・UVカット効果をも非侵襲的に評価出来るため、極めて有用な方法論と考えられる。また、角質層でのケラチンのサイクルが28日程度であることを考える時、同一被験者をコントロールとした、より具体的な効能評価を可能とするばかりか、真皮中コラーゲンを指標とした皮膚評価法とは全く異質の情報を得ることも期待される。

一方ケラチンは、非侵襲的に採取可能であるばかりか、室温でも極めて安定な蛋白質である。それ故、被験者自身による試料採取と郵送可能な安定性を考える時、化粧品会社が顧客のアフターサービスの一環としての試料分析も可能と考える。

更に、ケラチンは毛髪中にも多量に含まれていることか

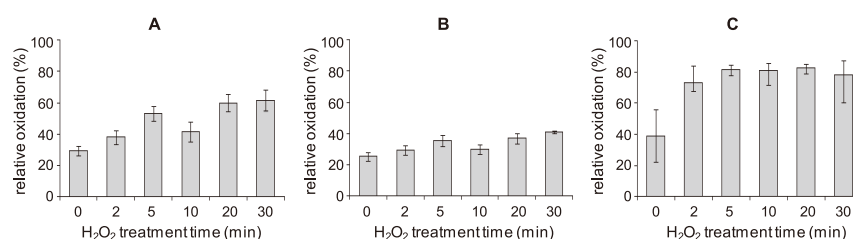


Fig. 5 Time course on *in vivo* keratin oxidation

(A) D²⁹⁰VDGAYMTK²⁹⁸ (K1, MH⁺; *m/z* 999.44), (B) D⁴⁶⁴YQELMNTK⁴⁷² (K1, MH⁺; *m/z* 1141.52), and (C) N²⁵⁸MQDMVEDYR²⁶⁷ (K1, MH⁺; *m/z* 1300.40). Relative oxidation (%) with 3% H₂O₂ for increasing times. Data are presented as means ± SEM (error bars) from quintuplicate samples.

ら、シャンプー・リンス・ヘアトニック等のヘアケア製品の評価、また未だ例は無いが裁判科学分野で規制薬物の長期使用履歴の評価にも応用できるものと思われる。

以上、本研究は非侵襲的かつ汎用機器で簡便に皮膚状態を客観的に数値化、評価できるという独創的なものであり、コスメトロジー分野の製品開発における効能評価・安全性評価の迅速化、コストの低減、更には顧客サービスの向上等にも幅広く寄与するものと期待される。

6. 謝 辞

本研究は、平成21年度コスメトロジー研究振興財団の研究助成を受けて行ったものである⁹⁻¹³⁾。同助成会に心より感謝致します。また、MALDI-TOF/MS装置は本学医学研究科共通機器室の物であり、ここに感謝致します。

(引用文献)

- 1) Plowman JE: The proteomics of keratin proteins. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **849**, 181-189 (2007).
- 2) Thiele JJ, Hsieh SN, Briviba K, Sies H: Protein oxidation in human stratum corneum: susceptibility of keratins to oxidation in vitro and presence of a keratin oxidation gradient *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, **113**, 335-339 (1999).
- 3) Hirao T, Takahashi M: Carbonylation of cornified envelopes in the stratum corneum. *FEBS Lett.*, **579**, 6870-6874 (2005).
- 4) Sander CS, Chang H, Salzmann S, Muller CS, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P, Thiele JJ: Photoaging is associated with protein oxidation in human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 618-625 (2002).
- 5) Sakai S, Yamanari M, Miyazawa A, Matsumoto M, Nakagawa N, Sugawara T, Kawabata K, Yatagai T, Yasuno Y: In vivo three-dimensional birefringence

analysis shows collagen differences between young and old photo-aged human skin. *J. Invest. Dermatol.*, **128**, 1641-1647 (2008).

- 6) Kang-Sickel JC, Fox DD, Nam TG, Jayaraj K, Ball LM, French JE, Klapper DG, Gold A, Nylander-French LA: S-arylcysteine-keratin adducts as biomarkers of human dermal exposure to aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 852-858 (2008).
- 7) Chao YC, Nylander-French LA: Determination of keratin protein in a tape-stripped skin sample from jet fuel exposed skin. *Ann. Occup. Hyg.*, **48**, 65-73 (2004).
- 8) Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M: Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods*, **6**, 359-362 (2009).

(本助成金による業績)

- 9) 宮本浩平、李 宣和、後藤貴章、大江知行："非侵襲的サンプリングによる表皮ケラチン分析と酸化修飾解析への応用". 日本分析化学会第59年会、2010年9月15～

17日、仙台

- 10) 宮本浩平、李 宣和、後藤貴章、大江知行："非侵襲的な表皮ケラチン分析法の開発と酸化修飾解析への応用". *みちのく分析科学シンポジウム2011*、2011年7月23日、米沢
- 11) 宮本浩平、李 宣和、後藤貴章、大江知行："Development of non-invasive proteomic analysis to monitor skin conditions by mass spectrometry". 第50回日本薬学会東北支部大会、2011年10月29日～30日、仙台
- 12) Lee SH, Miyamoto K, Goto T, Oe T: "Non-invasive proteomic analysis of human skin keratins: screening of methionine oxidation in keratins by mass spectrometry". *J. Proteomics*, **75**, 435-449 (2011).
- 13) Lee SH, Miyamoto K, Goto T, Oe T: "Non-invasive analysis to evaluate skin conditions : screening of chemical modifications in human skin keratins by mass spectrometry" 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, may 20-24, 2012, Vancouver, Canada.