Angelica acutiloba* Root Extract Improves Hyperpigmentation via the Mechanism of Digestion of Melanosome Complexes

Akinori Kiso **, Hai Feng Zeng ***, Kazuhisa Maeda ***

** Research Center, Maruzen Pharmaceuticals, Co., Ltd.

*** School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology

Melanosomes (MSs) are transferred to surrounding keratinocytes (KCs) to form melanin caps above their nuclei, where this process affects skin color. In normal KCs, MS complexes incorporated into lysosomes are degraded by lysosomal enzymes when KCs move to the skin surface through turnover. On the other hand, it has been reported that abnormal accumulation of large MS complexes in basal KCs is observed in senile lentigo. In studies on racial or skin color differences, it has been reported that MSs in KCs from light skin are more rapidly degraded than those from dark skin, and that the activity of cathepsin L2, one of the lysosomal enzymes, is higher in KCs from lightly pigmented, relative to darkly pigmented skins. Based on these reports, we hypothesized that enhancement of lysosome function as the digestive system in highly pigmented KCs could promote the digestion of MS complexes and the dispersion of melanin granules in KCs, leading to improved hyperpigmentation. As a result, we found that *Angelica acutiloba* root extract could be expected to improve hyperpigmentation via the mechanism of digestion of large melanosome complexes by promoting cathepsin activities.

Key words : *Angelica acutiloba* root extract, hyperpigmentation, senile lentigo, melanosome complexes, lysosomes, cysteine proteases, cathepsin K, cathepsin L2, digestion, melanin dispersion

* Received, July 29, 2016; Accepted, October 19, 2016

** 1089-8, Sagata, Shinnichi-cho, Fukuyama 729-3102, Japan

*** 1404-1, Katakura-machi, Hachioji 192-0982, Japan

メラノソーム複合体の消化を作用メカニズムとした トウキエキスの色素沈着改善効果*

木曾昭典**, 曾 海峰***, 前田憲寿***

丸善製薬株式会社 総合研究所, *東京工科大学 応用生物学部

シミの代表例である老人性色素斑においては、表皮基底細胞にメラノサイトから転送されたメラノソームが過剰に蓄積し、複数のメラノソームが結合した大きなメラノソーム複合体を形成していることが報告されている。一方、シミのない皮膚においては分化の過程でメラノソームは細胞内小器官であるライソソームと融合し、ライソソームに存在する酵素によって分解され、メラニンが分散・希釈されることにより、皮膚色を均一な状態に保っていると考えられる。本研究では、シミ部位に存在する大きなメラノソーム複合体の膜構造を崩壊させることにより、シミを薄くすることが可能であると考え、ライソソームに存在するタンパク質分解酵素であるカテプシン (cathepsin) に着目し、その活性を制御することによる色素沈着への影響を検討したところ、トウキエキスにカテプシンの活性促進作用をメカニズムとしたメラノソームの消化による色素沈着改善作用が認められたので、報告する。

1. 緒 言

メラニンは皮膚の基底層に存在するメラノサイト内のメラノソームで合成され、樹枝状突起の先端まで運ばれた後、表皮基底層の角化細胞がメラノソームを含む樹枝状突起を貪食することによって、細胞内に取り込まれる。取り込まれたメラノソームが核周囲に集積・分配されることによって、皮膚色として認識される。通常、角化細胞内では個々のメラノソームとライソソームが融合してメラノソーム複合体を形成し、ターンオーバーとともに、そのタンパク質部分がライソソーム酵素によって分解され、より小さいメラニンとなり、希釈され酸化還元反応を受けやすくなり、淡色化していくと考えられる。一方、シミの一種である老人性色素斑では、基底層の角化細胞内に polymelanosomes と呼ばれる複数のメラノソームからなる集塊が蓄積されること¹⁾が報告されており、この集塊がターンオーバーによっても希釈されることなく、色素が沈着した状態が続き、シミとしていつまでも黒褐色に見えると考えられる。また、肌色の異なる皮膚由来の角化細胞を用いた研究において、明るい皮膚由来の角化細胞においては暗い皮膚由来の角化細胞と比較して、細胞内に取り込まれたメラノソームが迅速に分解されること²⁾、メラノソームの消

化に関わる酵素の一つでライソソームに存在するカテプシン L2/V の酵素活性が高いこと³⁾が報告されている。これらの背景より、シミを薄くみせるためにはメラノサイトにおけるメラニン合成を抑制するだけではなく、角化細胞内のライソソームの機能を高め、大きなメラノソーム複合体の膜構造を消化してメラニンを細胞内に分散させることもターゲットになり得ると考えられる。

そこで、本研究ではライソソーム由来の酵素カテプシンの活性化によるメラノソーム複合体の消化を介した色素沈着改善作用に着眼し、トウキエキスに有効な作用が認められたため、報告する。

2. 実 験

2.1. 細胞培養

ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT) および B16 メラノーマ細胞 (ともに Cell Lines Service GmbH, Eppelheim) は、10% Fetal bovine serum (FBS; Biowest) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific) を用いて培養した。

2.2. 被験試料

トウキエキスとして、トウキ抽出液 BG (丸善製薬社製) を用いた。実験は本被験試料に含まれる固形分を基に、固形分相当で濃度を設定して実施した。

2.3. カテプシン活性促進作用の評価

2.3.1. HaCaT を用いた評価

HaCaT (1×10^4 cells/well) を 96 well プレートに播種し、

* 2016.7.29 受付, 2016.10.19 採用

** 〒729-3102 福山市新市町相方 1089-8

*** 〒192-0982 八王子市片倉町 1404-1

1 日培養後、培地を 2% FBS 含有 DMEM で溶解した被験試料に交換し、3 日間培養した。PBS で洗浄したプレートを凍結解凍後に、20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解したトータルカテプシン測定用の合成基質^{3),4)} Z-Phe-Arg-AMC・HCl (BACHEM) またはカテプシン K 測定用の合成基質⁵⁾ Z-Gly-Pro-Arg-4MβNA acetate salt (BACHEM) 0.1 mmol/L を各ウェルに添加し、それぞれ添加直後と 60 分または 180 分後に蛍光強度 (Ex. 360 nm, Em. 460 nm) を測定した。同時に培養後の各ウェルのタンパク量を Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、タンパクあたりの蛍光強度の増加 (RF/Protein) を基に酵素活性を評価した。

2.3.2. メラノソーム含有 HaCaT を用いた評価

HaCaT (6×10^4 cells/well) を 24 well プレートに播種し、1 日培養した。別途、75 cm² フラスコで培養した B16 メラノーマ細胞を 0.05% トリプシン-EDTA 溶液 (Thermo Fisher Scientific) で剥がし、遠心して回収した後、滅菌 PBS を添加し、滅菌したホモジナイザーを用いて氷冷下でホモジナイズした。12000 rpm で遠心して上澄みを捨て、さらに滅菌したホモジナイザーを用いて氷冷下でホモジナイズした。1 mL の滅菌 PBS を添加し、500 rpm で遠心して境界部の混濁部分をメラノソーム画分とした。このメラノソーム画分を含む培地で HaCaT を 1 晩培養し、メラノソームを貪食させた。2% FBS 含有 DMEM で溶解した被験試料で 4 日間培養した後、PBS で洗浄した。プレートを凍結解凍後に、20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した 0.1 mmol/L Z-Gly-Pro-Arg-4MβNA acetate salt を各ウェルに添加した。添加直後と 60 分後に蛍光強度 (Ex. 360 nm, Em. 460 nm) を測定し、同様にタンパクあたりの蛍光強度の増加 (RF/Protein) を基に酵素活性を評価した。また、被験試料の細胞への影響を確認するために、被験試料を含む培地で同様に 24 well プレートにて培養した HaCaT の生細胞数を Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて測定した。

2.4. カテプシン遺伝子発現促進作用の評価

HaCaT (2.5×10^5 cells/dish) を 35 mm ディッシュに播種し、1 日培養後、培地を 2% FBS 含有 DMEM で溶解した被験試料に交換し、24 時間培養した。その後、以下に示す方法で mRNA 発現量を測定した。

ISOGEN II (NIPPON GENE) を用いて、細胞から総 RNA を抽出し、分光光度計を用いて 260 nm における吸光値から総 RNA 量を求めた。総 RNA を基に、リアルタイム RT-PCR 法により、mRNA の発現量の測定を行った。すなわち、500 ng の総 RNA を PrimeScript™ RT Master Mix (TAKARA BIO) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成し

た。この cDNA を鋳型として、カテプシン K、カテプシン L2 および内部標準であるグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の mRNA 発現量を測定した。カテプシン K および GAPDH のプライマーは、以下に示すものを用い、カテプシン L2 のプライマーは RT² qPCR Primer Assay for Human CTSL2 (QIAGEN) を用いた。検出はリアルタイム PCR 装置 Smart Cycler® (Cepheid), SYBR® Premix Ex Taq™ (TAKARA BIO) を用いた。また、操作は定められた方法に従い、各 mRNA の発現量を GAPDH mRNA の発現量に対する割合として求めた。

カテプシン K F: 5'-GCTACATGACCAATGCCTTCC-3'
R: 5'-TCTTCAGGGCTTTCTCATTC-3'
GAPDH F: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
R: 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'

2.5. メラノソーム消化促進作用の評価

2.5.1. メラノソーム含有角化細胞に対する淡色化作用の評価 (細胞観察)

100 mm ディッシュで培養した HaCaT に、2.3.2. と同様の方法で調製したメラノソームを貪食させた。メラノソーム貪食 HaCaT に 2% FBS 含有 DMEM で溶解した被験試料を添加し、3 日間培養した。培養後の細胞を常法により剥がして、遠心した後、写真撮影した。

2.5.2. メラノソーム含有角化細胞に対するメラノソーム消化作用の評価 (免疫組織化学染色)

チャンバースライドで培養した HaCaT に、2.3.2. と同様の方法で調製したメラノソームを貪食させた。メラノソーム貪食 HaCaT に、2% FBS 含有 DMEM で溶解した被験試料を添加し、5 日間培養した。免疫組織染色は 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定後に一次抗体として、抗チロシナーゼ関連タンパク 1 (TRP-1) 抗体 (clone TMH2, $\times 500$ 希釈)、二次抗体として Goat anti-Rat IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate (Thermo Fisher Scientific, $\times 2000$ 希釈) を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus) で観察した。

2.5.3. メラノソーム含有角化細胞に対するメラノソーム消化作用の評価 (電子顕微鏡学検査)

同様に調製したメラノソーム貪食 HaCaT に、2% FBS 含有 DMEM で溶解した被験試料を添加し、5 日間培養した。培養した細胞の後固定、切片作製および透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察はボゾリサーチセンターに依頼した。培養した細胞を 1.5% パラホルムアルデヒド・0.5% グルタルアルデヒド/PBS で 4℃, 1 時間前固定後、リン酸緩衝液にて攪拌洗浄し、遠心分離して細胞を集めた。ついで 1% 四酸化オスミウムで後固定し、同様に遠心分離して細胞を集め、寒天にて固めてから細切した。アルコールの

上昇系列で脱水・置換し、Epon 樹脂に包埋して、電顕ブロックを作製した後、トルイジンブルー染色標本を作製した。電顕ブロックから超薄切片を作製後、TEM (JEM-1400, 日本電子) によってライソソームを中心に電子顕微鏡学検査を実施した。

2.6. 統計学的検定

値は平均値±標準誤差で表した。統計学的有意差検定は一元配置分散分析により水準間の差を認めた後、Williams法を用いて多重比較検定をし、 $p<0.05$ の場合を有意差ありと判断した。

3. 結 果

3.1. カテプシン活性促進作用の評価

ライソソームに局在し、タンパク質分解酵素として知られているカテプシンが角化細胞内に取り込まれたメラノ

Fig.-1 Effect of *Angelica acutiloba* root extract on cathepsin activities.

HaCaT cells were treated with *Angelica acutiloba* root extract for 3 days. Enzymatic activities of total cathepsins (a) and cathepsin K (b) were measured. Values are the Mean±S.E., $n=6$, * $p<0.05$, compared with the control.

ソームの膜構造の消化に関与していると考え、まずトウキエキスのトータルカテプシン活性に及ぼす影響について検討した。その結果、トウキエキスには濃度依存的なトータルカテプシンの活性促進作用が認められた。次に、カテプシン K に着目して検討した結果、同様に濃度依存的なカテプシン K の活性促進作用が認められた (Fig.-1)。トウキエキスにカテプシン K 活性促進作用が認められたため、実際の色素沈着部位に認められるメラノソームを含有した角化細胞でも同様の作用を有することを確認するために、メラノソームを含有した HaCaT を用いて同様に検討した。その結果、メラノソームを含有した細胞においてもトウキエキスには細胞毒性を示さない濃度でカテプシン K 活性促進作用が認められた (Fig.-2)。

3.2. カテプシン遺伝子発現促進作用の評価

トウキエキスのカテプシン活性促進作用のメカニズムを検討するために、カテプシン K およびカテプシン L2 の mRNA 発現量を調べた。その結果、トウキエキスにより、カテプシン K およびカテプシン L2 の mRNA 発現量が有意に増加した (Fig.-3)。

3.3. メラノソーム消化促進作用の評価

カテプシン活性促進作用を有するトウキエキスをメラノソームを含む角化細胞培養系に添加することにより、実際に色素が薄く見えるかどうかを検討した。その結果、トウキエキスにより、メラノソーム含有角化細胞が淡色化する

Fig.-2 Effect of *Angelica acutiloba* root extract on cathepsin K activity in keratinocytes containing melanosomes.

HaCaT cells containing melanosomes were treated with *Angelica acutiloba* root extract for 4 days. The cathepsin K activity (bar) and viable cells (line) were measured. Values are the Mean±S.E., $n=3$, * $p<0.05$, compared with the control.

Fig.-3 Effect of *Angelica acutiloba* root extract on cathepsin mRNA expressions. HaCaT cells were treated with *Angelica acutiloba* root extract for 24 h. Cathepsin K (a) and cathepsin L2 (b) mRNA expressions were determined by real-time RT-PCR. Values are the Mean $\pm$ S.E., $n = 3$, * $p < 0.05$, compared with the control.

Fig.-4 Lightening effect of *Angelica acutiloba* root extract in keratinocytes containing melanosomes. HaCaT cells containing melanosomes were treated with *Angelica acutiloba* root extract for 3 days. Lightening effect was evaluated by comparison with the control.

ことが観察された (Fig.-4)。また、メラノソーム膜の構成成分である TRP-1⁶⁾の発現を指標とした免疫染色解析の結果においても、メラノソームの消化に伴う TRP-1 の染色強度の低下が認められた (Fig.-5)。さらに、メラノソーム含有角化細胞に対するトウキエキスの作用に関して、細胞の内部構造をライソソームを中心に TEM によって観察した。メラノソームを取り込ませた角化細胞では、未処理の角化細胞と比較し、含まれているライソソームは不整形な形状のものが多く、より大型であり、内部はメラニン顆粒と考えられる顆粒状成分が多く凝集して電子密度がかなり高い部分が認められた。一方、トウキエキスを処理したメラノソーム含有角化細胞においては、メラニン顆粒と考えられる顆粒状成分が多く凝集したライソソームは認められなかった。一部にかなり小型な小胞の凝集がみられた大型ライソソームをもつ細胞が存在し、内部の小胞の電子密度は低いものから高いものまでさまざまであった。これはメラニン顆粒と考えられる顆粒状成分が消化された、あるいは消化される過程の像と考えられた (Fig.-6)。

4. 考 察

皮膚に生じるメラニン色素の沈着現象である「シミ」は加齢や紫外線により増加するが、その要因としては主として角化細胞における種々のサイトカイン、ホルモン、ケミカルメディエーター等のメラノサイト刺激物質の産生亢進やメラノサイト内のチロシナーゼ活性化によるメラニン産生亢進など、メラニン量の過剰な増加によるものがあげられる。一方、角化細胞へのメラニンの過剰な蓄積、表皮ターンオーバーの遅延など、メラニンの長期的な滞留も色素沈着の要因となり得る。これらの要因の対処法としてメラノサイト刺激物質の制御、メラニンの合成阻害、メラニンの角化細胞への受け渡し阻害、表皮ターンオーバーの促進によるメラニン排出の促進などが知られている。今回われわれは老人性色素斑において、基底層の角化細胞内に大きなメラノソーム複合体が観察されるとの報告¹⁾から、メラノソームの消化機能を担うライソソームの働きを高めることによって、メラノソーム複合体を構成するメラノソームの膜構造を壊し、メラニンを細胞内に分散させることで、メラニン量を減らすことなく色素沈着を改善できるのではないかと考えた。

ライソソームの内腔には多くの加水分解酵素が含まれており、この酵素の働きにより、細胞内外の不要な生体高分子が分解される。分解物のうち有用な物質は細胞質に吸収後、再利用され、不要な物質はエキソサイトーシスによって細胞外に排出されるか、残余小体 (residual body) として細胞内に留まる⁷⁾。ライソソームには 20 種類以上のタ

ンパク質分解酵素「カテプシン」が局在しており、角化細胞内に取り込まれたメラノソームはライソソームと融合後、カテプシンによって消化されることから、ライソソームの消化機能活性化の指標としてカテプシン活性に着目した。

カテプシンは活性中心のアミノ酸残基の違いから、シス

テインプロテアーゼ (cathepsin B, C, F, H, L, K, O, S, V, W, X), アスパラギン酸プロテアーゼ (cathepsin D, E) およびセリンプロテアーゼ (cathepsin A, G) に分類される。多数のカテプシンが属するシステインプロテアーゼの中から、カテプシン K に着目した。カテプシン K は破骨細胞で産生・分泌され、主要な骨基質である I 型コラーゲンを

(a) Microscopical observation

(b) Immunofluorescence analysis of TRP-1

Fig.-5 Effect of *Angelica acutiloba* root extract on melanosome digestion. HaCaT cells containing melanosomes were incubated with *Angelica acutiloba* root extract for 5 days. The degree of melanosome digestion in each cell was observed (a). TRP-1 protein level was evaluated by immunofluorescence (b).

Fig.-6 Effect of *Angelica acutiloba* root extract on melanosome digestion in lysosomes by ultra-structural analysis. HaCaT cells containing melanosomes were incubated with *Angelica acutiloba* root extract for 5 days. The cells were stained with toluidine blue-stain and semi-thin sections were observed by TEM. (a) HaCaT cells without melanosomes, (b) HaCaT cells with melanosomes, (c) the extract treated HaCaT cells with melanosomes.

分解することから^{8),9)}, 骨粗鬆症や関節リウマチの要因となり, その阻害剤は治療薬としてよく知られている。近年, 骨粗鬆症薬(カテプシン K 阻害剤)の副作用として, 骨粗鬆症患者の皮膚が硬くなる症状が認められること¹⁰⁾, 皮膚線維芽細胞のライソソームにおいて発現しているカテプシン K の活性が加齢により低下し, 細胞内でのエラスチン分解活性が低下することにより, 細胞外の異常なエラスチンの代謝が滞り, actinic elastosis の形成が促進されること¹¹⁾, またエンドサイトーシスを介して internalize された I 型および IV 型コラーゲン等の細胞外マトリックスがカテプシン K によってリモデリングされること^{12),13)}が報告されていることから, 線維芽細胞におけるカテプシン K の活性が細胞外マトリックスのホメオスタシスに重要な役割を果たしていると考えられる。一方, 高齢者由来の表皮では若年者由来のそれと比較して, システインカテプシン活性の低下ならびにシステインカテプシンのうち, カテプシン K, S, V のタンパク量の減少⁴⁾が報告されていることから, 表皮においても加齢に伴うカテプシン K 等の質的・量的変化が不要な物質の分解低下・蓄積の一因となり, 老化プロセスに関与していると考えられる。また, 老人性色素斑部位において観察されるメラニンを多量に含有した表皮基底細胞では細胞分裂能力が低下していることも報告されている¹⁴⁾。つまり, シミ部位に認められる表皮基底細胞に取り込まれたメラノソームの過剰な蓄積は, カテプシンの活性化を介したライソソームの消化機能向上によって軽減され, その結果, 表皮のターンオーバーが正常化し, 色素沈着を改善する可能性も考えられる。

そこで, 角化細胞を用いたカテプシン活性に関する検討を行ったところ, トウキエキスにより, トータルカテプシンならびにカテプシン K の活性が促進されることを確認した。また, 遺伝子レベルの検討ではトウキエキスにより, カテプシン K mRNA 発現量が有意に増加した。以上のことから, トウキエキスは遺伝子レベルでカテプシン K の発現を上昇させ, カテプシン K の量を高めることで, その活性を促進させる可能性が示唆された。また, カテプシン L2/V mRNA 発現量に関しても有意に増加したことから, トータルカテプシンの活性促進作用はカテプシン K, L2/V 以外のカテプシンの寄与も考えられ, 今後の検討課題である。

次に, メラノソームの消化に関するトウキエキスの影響について, メラノソーム含有角化細胞を用いてマクロおよびミクロ的な視点で検討を行った。その結果, トウキエキスによる顕著なメラノソームの消化作用および淡色化が確認された。一方でまた, トウキエキスには B16 メラノーマ細胞を用いたメラニン産生抑制作用に関しては認められ

ていない(データ未表示)。

トウキ(当帰)はセリ科の多年草であり, 冷え, 貧血, 月経不順などに悩む女性とその症状の改善を目的に, 薬用部位である根を漢方薬における婦人病薬の主薬として多くの処方に配合されている。また, 中国の古い物語に, 妻が婦人病を患ったがトウキにより回復し, 家に寄り付かなくなっていた夫が「夫よ, まさに我が家に帰るべし」と言ったことから, 「当(まさ)に帰る」という意味で, 「当帰」と名付けられたといわれている^{15)~17)}。

このような「あるべき状態に戻す」といわれるトウキのエキスにはカテプシンのうち, 特にシステインプロテアーゼに分類されるカテプシン K の活性化作用を介してライソソームの消化機能を向上させることにより, メラノソーム複合体の構造を壊し, メラニンを分散させることで, メラニンの合成を阻害することなく, 色素沈着を改善させることが示唆された。

5. 結 論

本研究においては, シミのある皮膚の表皮基底細胞内に大きなメラノソーム複合体が形成されていることに着目し, ライソソームに局在するカテプシンの活性制御を介して, その消化を促進することでメラニンを分散させ, シミを薄く見せることが可能であると考え, 検討を行った。その結果, トウキエキスにより, トータルカテプシンの活性が促進すること, カテプシンのうちカテプシン K の活性およびその遺伝子発現量が増加すること, さらにメラノソーム含有角化細胞においてメラノソームが顕著に消化されることを確認した。以上の結果から, トウキエキスはシミ部位に認められるメラノソーム含有角化細胞においてカテプシンの活性を促進することにより, メラニンを分散させ, 色素沈着改善作用を発揮することができる有用な素材であると考えられた。

引用文献

- 1) E. Noblesse, C. Nizard, M. Cario-André, S. Lepreux, C. Pain, S. Schnebert, A. Taïeb, R. Kurfurst, *Skin Pharmacol. Physiol.*, 19, 95-100 (2006)
- 2) J. P. Ebanks, A. Koshoffer, R. R. Wickett, S. Schwemberger, G. Babcock, T. Hakozaiki, R. E. Boissy, *J. Invest. Dermatol.*, 131, 1226-1233 (2011)
- 3) N. Chen, M. Seiberg, C. B. Lin, *J. Invest. Dermatol.*, 126, 2345-2347 (2006)
- 4) J. Sage, D. D. Queral, E. Leblanc-Noblesse, R. Kurfurst, S. Schnebert, E. Perrier, C. Nizard, G. Lalmanach, F. Lecaillon, *Matrix Biol.*, 33, 41-46 (2014)
- 5) C. Tepel, D. Brömme, V. Herzog, K. Brix, *J. Cell. Sci.*, 113,

- 4487-4498 (2000)
- 6) S. Vijayasradhi, P. M. Doskoch, A. N. Houghton, *Exp. Cell Res.*, 196, 233-240 (1991)
 - 7) P. Saftig, J. Klumperman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 623-635 (2009)
 - 8) F. H. Drake, R. A. Dodds, I. E. James, J. R. Connor, C. De-bouck, S. Richardson, E. Lee-Rykaczewski, L. Coleman, D. Rieman, R. Barthlow, G. Hastings, M. Gowen, *J. Biol. Chem.*, 271, 12511-12516 (1996)
 - 9) P. Garnero, O. Borel, I. Byrjalsen, M. Ferreras, F. H. Drake, M. S. McQueney, N. T. Foged, P. D. Delmas, J. -M. Delais-sé, *J. Biol. Chem.*, 273, 32347-32352 (1998)
 - 10) T. M. Rünger, S. Adami, C. -L. Benhamou, E. Czerwiński, J. Farrerons, D. L. Kendler, L. Mindeholm, G. Realdi, C. Roux, V. Smith, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 66, e89-e96 (2012)
 - 11) K. A. Codriansky, M. J. Quintanilla-Dieck, S. Gan, M. Keady, J. Bhawan, T. M. Rünger, *Photochem. Photobiol.*, 85, 1356-1363 (2009)
 - 12) M. J. Quintanilla-Dieck, K. Codriansky, M. Keady, J. Bhawan, T. M. Rünger, *Exp. Dermatol.*, 18, 596-602 (2009)
 - 13) M. Fonović, B. Turk, *Biochim. Biophys. Acta*, 1840, 2560-2570 (2014)
 - 14) H. Aoki, O. Moro, H. Tagami, J. Kishimoto, *Br. J. Dermatol.*, 156, 1214-1223 (2007)
 - 15) 井沢凡人, 庭先に植える薬草・薬木の作り方・使い方, 家の光協会, 1978, p.259
 - 16) 岡田 稔, 牧野和漢薬草大図鑑, 北隆館, 2002, p.347
 - 17) 野沢 敦, 朝日園芸百科 21, 朝日新聞社, 1985, p.37