

研究テーマ：メラニン合成抑制物質の簡易検出法における有用性の検証

研究代表者： 人間文化学部 健康科学科
助教 増山 悦子

連絡先： masuyama@pu-hiroshima.ac.jp

共同研究者：

【研究概要】

メラニン合成抑制物質を多検体から探索する目的で、メラニン合成の key enzyme であるチロシナーゼ活性の阻害成分が検出できる簡易スクリーニング法を開発した。さらに、廃棄される食品製造副産物をスクリーニングした結果、芋焼酎製造後の残渣ろ液からチロシナーゼ活性を阻害する有効な成分を見出すことができた。開発したスクリーニング法は、簡単に多検体を同時検出できるだけでなく、阻害成分特性の解析や既知の阻害物質との成分比較ができるなどの優れた機能をもつことを明らかにした。

【研究背景・目的】

高齢化社会を迎えて、加齢などで引き起こされる肌へのメラニン色素沈着（シミ）を防御するための研究要請が高まっている。また、食品の褐変も同様にメラニン色素沈着が主原因であることから、食品の品質保持の目的で、メラニン色素の合成阻止剤の開発が求められている現状である。

メラニン色素は、アミノ酸のチロシンを原材料として、酸化酵素チロシナーゼによって反応が進行し、続けて自動酸化を繰り返して合成される（図1）。したがって、メラニン色素沈着を抑えるためには、初期反応のチロシナーゼ活性を阻害することが有効であると考えられる。しかも、安全で高効率な阻害剤が求められていることから、多数の天然素材の検体から阻害物質を探索するためのスクリーニング法の確立が急務となっている。

現在までのところ、チロシナーゼ活性阻害を確認するスクリーニング法が確立されていないため、混合液そのものを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析を行う必要がある。天然試料の中にはメラニン合成の阻害成分だけでなく促進成分も含んでいる場合が多いことから、強力な阻害効果をもつかどうか判別を行うのが難しいなど、阻害剤の検出に非常に多くの時間や労力、コストがかかっている。

本研究では、多種検体からチロシナーゼ活性を強力に阻害する成分を即時にスクリーニングできる方法の確立をめざして、様々な試行を繰

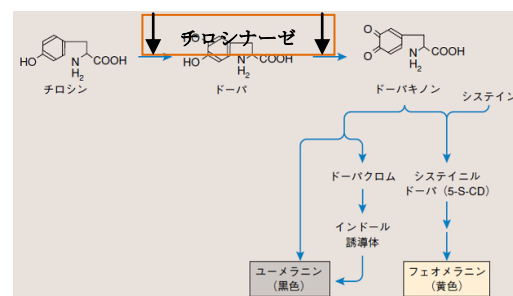


図1 メラニン合成経路

り返した。その結果、阻害成分の検出だけでなく、成分特性も解析できる簡易定性分析法を見出すことができた。さらに、開発したチロシナーゼ阻害剤の検出法を用いて、廃棄物として処分されている焼酎残渣ろ液から、メラニン色素合成抑制物質を同定することができ、廃棄物の有効利用を図ることが可能となった。

【研究成果】

1. チロシナーゼ活性阻害成分検出のためのスクリーニング法の開発

チロシナーゼ活性阻害成分は低分子であることが予想されるため、薄層クロマトグラフィー（TLC）による成分分析法に注目した。阻害剤の種々の使用法（水溶性、油性）に対応できるように、順相と逆相タイプのシリカゲル担体を各々塗布した薄層板を用いて、全成分の分離を行った。TLC 展開後は、常法による紫外吸収成分や炭素化合物の検出を行ったところ、多くの成分を分離できることが判明した。さらに、各種試料からチロシナーゼ活性の阻害成分を簡単に検出できる方法について、種々の検討を行っ

た中で、チロシナーゼ活性染色法が、阻害成分の検出に有効であることがわかった。TLC 展開後、薄層板にチロシナーゼ反応液を噴霧後、1時間反応させると、褐色のメラニン色素を合成する。さらに1日放置し自動酸化を進めると、黒色メラニン色素を合成するようになる。阻害成分は白色のスポットのままであることから、この検出法は複雑な装置を必要としないで、短時間でチロシナーゼ活性阻害成分を可視化できるメリットがある (図2)。

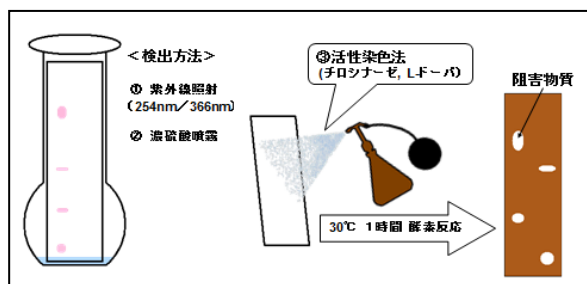


図2 薄層クロマトグラフィーを用いたチロシナーゼ阻害成分の簡易検出法

2. 簡易スクリーニング法を用いたチロシナーゼ活性阻害物質の探索

食品製造中に生じる副産物のうち廃棄される物質の再利用を図る目的で、スクリーニングに用いる試料を選定した。米、そば、芋焼酎の各残渣ろ液や昆布洗液エキスでチロシナーゼ酵素活性を測定したところ、芋焼酎製造後の残渣ろ液に著しい活性阻害が見出された (図3)。さらに、組換え大腸菌を用いたメラニン合成アッセイ法でも、芋焼酎残渣ろ液にメラニン合成阻害物質が含まれていることを確認している。

芋焼酎残渣ろ液の薄層クロマトグラフィー (TLC) による解析では、非常に強いチロシナーゼ活性阻害スポットが観察された。極性が高い成分と低い成分に見出されており、極性が低い成分は、強力なチロシナーゼ活性阻害効果が認められているコウジ酸かその類似成分であると推定される。一方、強力な阻害効果をもつ極性の高い成分は、新規メラニン合成抑制物質として期待がもたれるため、現在、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による阻害成分の精製、同定を進めている。

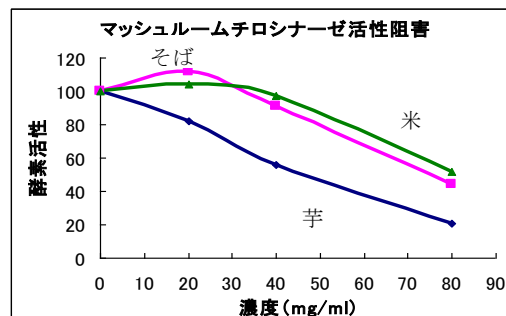


図3 焼酎残渣ろ液のチロシナーゼ活性

3. チロシナーゼ活性阻害成分探索のためのスクリーニング法の有用性

薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離した阻害成分スポットのシリカゲル層を削り取り、吸着した阻害成分を抽出した。その抽出液のチロシナーゼ活性を測定したところ、著しい活性阻害が認められたので、活性染色法検出の有効性を確かめることができた。

本研究では TLC 分析法に注目し、試料を展開後にチロシナーゼ活性染色法を利用した独自の one step 検出法を開発し、チロシナーゼ活性阻害成分を短時間で可視化することに成功した。全成分が分離可能で、活性染色法による検出は阻害程度が目視で確認でき、各スポット成分を削り取って成分解析まで行うことができる。単なる阻害成分のスクリーニングだけでなく、成分特性を明確にすることは、次の精製ステップに移行する際の重要な情報原となるため、優れている方法であると思われる。

本研究で確立したスクリーニング法は、多くの物質の中から簡単にチロシナーゼ活性阻害物質を検出することが可能になった。さらに安全性の確認後、美白素材として、食品素材の褐変化防止剤として応用することができる。また、焼酎残渣ろ液は廃棄物規制強化に伴ってリユース需要が高まってきている。本研究により、廃棄物の有効利用が図られることにより、地場産業の活性化にも繋がることを期待できる。新規チロシナーゼ阻害物質の発見は、チロシナーゼの生物構造学的知見、作用機序の詳細な解明など、学術面にも大きく寄与できると思われる。

