

植物ミネラルのメラニン抑制効果の検討

Investigation on Melanogenesis Inhibitory Effects of Plant Minerals.

中村（杉本）優子*、羽野紗希*、田中俊行**、飯塚貴仁***

Yuko Nakamura-Sugimoto, Saki Hano, Toshiyuki Tanaka and Takahito Iitsuka

*食品開発研究所 バイオ技術科、**機械素材研究所 無機材料科、***株式会社植物力研究所

植物の燃焼灰より生成された植物ミネラル製品の利用特性を探索するため、皮膚細胞のメラニン産生に関与する酵素であるチロシナーゼ活性に対する影響を調査した。その結果、試験管内試験においてメラニンの合成を有意に抑制すること、ならびに、合成直後のメラニンの無色化においても効果を有することが分かった。植物ミネラルの解析により、これらの作用は、植物ミネラルを構成するイオンの組み合わせにより生じている事が示唆された。

To explore the utilization of plant mineral products produced from burned ashes of plants, their effect on tyrosinase activity, which is an enzyme involved in melanogenesis in skin cells, was investigated. An *in vitro* test revealed that they significantly suppressed melanogenesis and that they were effective in the depigmentation of melanin immediately after melanogenesis. The analysis of plant minerals suggested that these effects are attributable to a combination of ions constituting plant minerals.

1. はじめに

本研究は、植物より生成されたミネラルをどのような製品に応用するかを探索することを目的としている。ミネラルを製品化したものは、サプリメント等の食品、飲料、農業用など様々な製品に応用されているが、本研究の対象とした植物ミネラル製品は非常に精製度が高く、植物のみを原料としている製品イメージ等から、化粧品素材への応用が適すと考え、以下の実験を行った。

メラニンはフェノール類物質が高分化して色素となったものの総称であり、ヒトの皮膚に存在するメラニンは、チロシンから合成され、様々な反応を経て重合し、ポリマーを形成した形態を取っている¹⁾²⁾。この合成に関わる酵素がチロシナーゼであり、皮膚中の色素細胞（メラノサイト）に多く含まれている（図 1）。皮膚上でメラニンが生成されることで、紫外線からの日光障害や悪性腫瘍の発生を予防しているため、メラニン生成は生体に必須の生理作

用である。しかしながら、ストレスや酸化等による連続的なメラニン産生は、しみやそばかすなどの色素沈着を招くことから、その予防や改善に関わる成分が化粧品のターゲットとなっている。化粧品素材のうち美白作用を持つ化合物のスクリーニングにおいて、チロシナーゼの抑制効果が素材選抜の指標の一つとして用いられている。本研究では、植物ミネラルの化粧品特性を調べるため、チロシナーゼ活性やメラニン生成における植物ミネラルの効果を検討した。

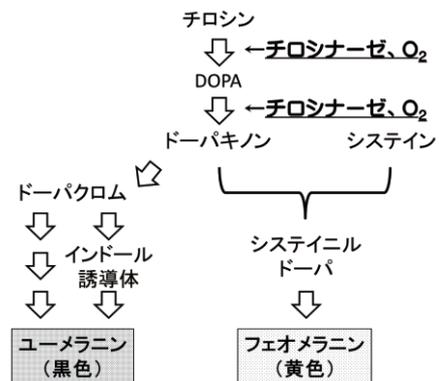


図 1 メラニン合成経路

2. 実験方法

2.1 植物ミネラルの調製

植物ミネラルは、株式会社植物力研究所「BIE ミネラル」を使用した。原料に木、海草、草を使用し、その焼却物を数段階に分け精製したものを、製品としている（特許出願準備中のため、製法の詳細は非公開）。製品の99.9%が無機質であるが、その構成は企業秘密である。

水溶液は、BIE 粉末を超純水に溶解後、超音波処理を5分間行い調製した。この水溶液のpHが約11であったことから、以下の試験の測定環境に合わせて緩衝液を添加し、至適pHであることをpH試験紙等で確認してから使用した。

2.2 チロシナーゼ活性の測定

酵素液として、マッシュルーム由来チロシナーゼ (Sigma) を50mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に溶解し、135U/mL に調整した。基質にはL-DOPA (和光純薬) を同緩衝液で0.03%に調整したものをを用いた。測定用の試料は全て最終濃度50mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に溶解した。96穴マイクロプレートに試料溶液を50 μ L、酵素液を50 μ L、基質を50 μ L加え、室温 (25 $^{\circ}$ C程度) で30分間反応させた。反応後は速やかにプレートリーダー (Tecan) を用いて、450nmの吸光度を測定した。酵素活性は以下の式にて算出した。

$$\text{酵素活性 (\%)} = \frac{(\text{sample} - \text{blank})}{(\text{control} - \text{blank})} \times 100$$

sample: 試料を加えた際の吸光度

control: 試料の代わりに緩衝液を加えた際の
吸光度

blank: 試料と基質を加えた際の吸光度

2.3 DPPH 法による抗酸化性測定

食品機能性評価マニュアル集 (日本食品科学工学会発行) に従って測定した。即ち、96穴マイクロプレートに50%エタノールで0~0.1%に調整した試料を100 μ L、0.2mM MES (2-morpholino ethane-sulphonic acid) 緩衝液 (pH6.0) 50 μ L、400 μ M DPPH

(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 50 μ Lを加え、室温 (25 $^{\circ}$ C程度) で20分間反応後、プレートリーダーで520nmの吸光度を測定した。この時の標準物質として、ビタミンEの水溶性類縁体であるTroloxを50%エタノールで0~1000 μ Mに調整して用いた。DPPHラジカル消去活性は、試料の測定値から導き出された一次回帰直線の傾きを、標準での回帰直線の傾きで除して算出した。

2.4 チロシナーゼ反応物のMALDI-TOF-MS解析

2.2に従って酵素反応を行った産物を、除タンパク操作により酵素を除き、C18 Zip-Tip (Millipore) で精製したものを、AutoFlex T2 MALDI-TOF-MS system (マトリックス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時間型質量分析計、Bruker) による解析に供した。ターゲットとなる化合物が低分子の場合、イオン化のために用いるマトリックスのイオン化ピークが試料のピークと重なり検出できない恐れがあるが、今回もその懸念があったため、マトリックスを用いずイオン化が可能なNALDI-MTSターゲットプレート (Bruker) を用いた。

2.5 イオン交換による植物ミネラルの精製

PCX (強陽イオン交換)、PWCX (弱陽イオン交換)、PAX (強陰イオン交換)、PWAX (弱陰イオン交換、以上ジャスコエンジニアリング)、DEAEセルロース (弱陰イオン交換、和光純薬) のポリマーベースが充填されたオープンカラムを用いて、製品の推奨法に従いイオン交換を行った。即ち、メタノールでコンディショニング後、各イオンと逆または同じ液性の水溶液で洗浄し、0.1%に調整した植物ミネラルを通した。この通過画分を用いて、2.2の方法でチロシナーゼ活性の測定を行った。

3. 結果と考察

3.1 植物ミネラル水溶液のチロシナーゼ活性への影響調査

植物ミネラルを試料とした時の、チロシナーゼ酵素活性の変化の様子を調べた(図2)。植物ミネラル水溶液を最大濃度1%に調整し、段階的に5倍希釈を行った試料でチロシナーゼ活性を調べたところ、0.008%というかなり低濃度で有意にチロシナーゼ活性を抑制した。陽性対照として用いたコウジ酸は、チロシナーゼ抑制阻害効果が知られる化粧品素材であるが、それと同程度の強い阻害効果が見られている。植物ミネラルの製法上、水溶液が強いアルカリ性を示す傾向があるが、試料は全てリン酸緩衝液で溶解し、チロシナーゼの至適pHの範囲での測定であることから、植物ミネラル水溶液に含まれる物質が、チロシナーゼ活性を阻害することが示唆された。

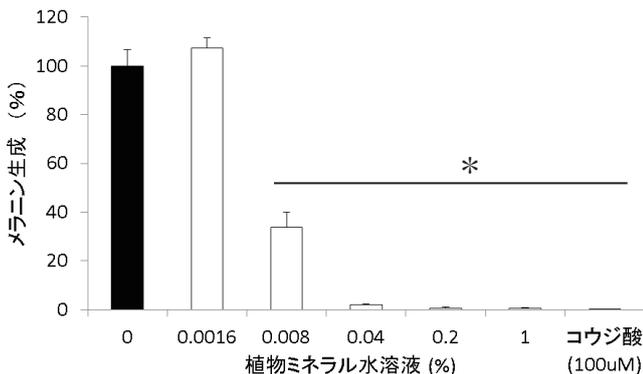


図2 植物ミネラルによるチロシナーゼ阻害活性

*: コントロールに対して $p < 0.05$ で有意差あり

チロシナーゼ活性の測定においては、反応で生じたメラニンを比色により評価しているため、酵素反応以外の要素によりメラニンの増減が加速される場合も同時に評価してしまう場合がある。チロシナーゼによるメラニン産生反応には酸化も大きく関わるため²⁾、植物ミネラルに酸化を抑制する作用、即ち抗酸化活性があるかどうかを、DPPHラジカル消去法で調査した(図3)。本法はDPPHが持つ不対電子を消去する能力を測定する試験であるが、調査の結果、植物ミネラルの量依存的にラジカルを消去していることが分かった。このときのDPPHラジカル

消去活性の結果から、植物ミネラル1gあたりの抗酸化能は、標準であるTroloxの約1.7gに相当すると求められ、非常に高い抗酸化性を持つことが分かった。

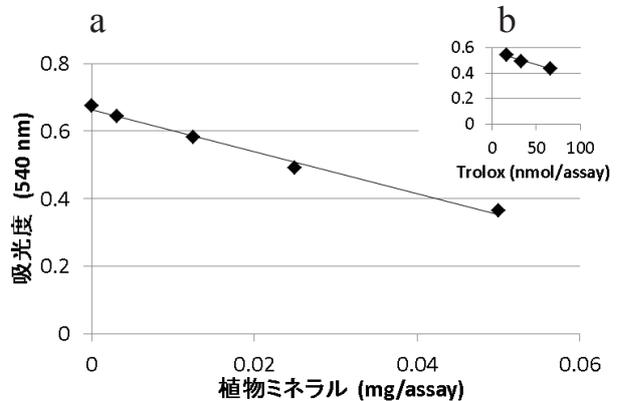


図3 DPPHラジカル消去活性

a: 植物ミネラルのDPPHラジカル消去、b: 標準として用いたビタミンE類縁体であるTroloxのDPPHラジカル消去。DPPHはラジカル消去に伴い脱色されるため、OD540nmの吸光度が下がるほどラジカル消去能が高い。

3.2 植物ミネラルのメラニン分解作用の検討

植物ミネラルによるメラニン産生阻害メカニズムの解明のため、生成したメラニンに対して植物ミネラルが作用を及ぼすかを調査した。その結果、先に生成したメラニンに対して植物ミネラル水溶液を添加すると有意に減少し、植物ミネラルがメラニンを無色の物質に変化させている可能性が示唆された(図4aおよびb)。

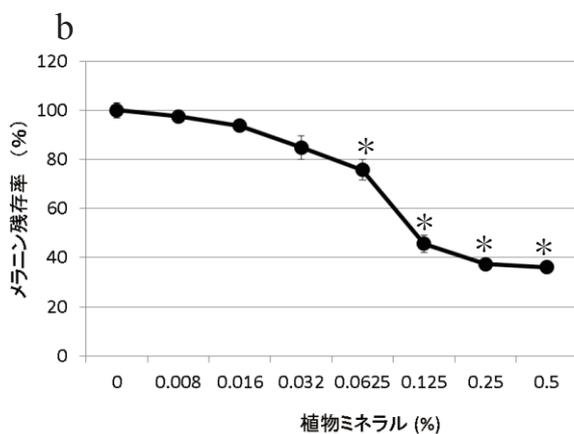
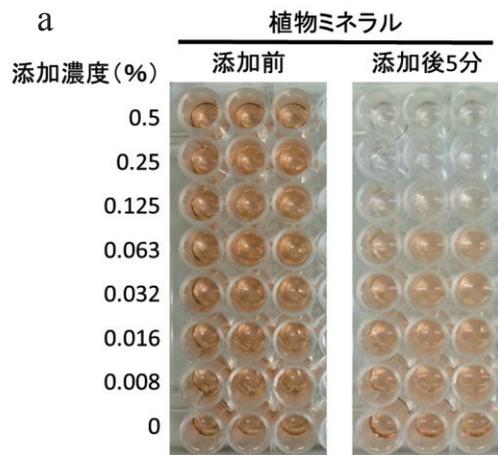


図4 生成メラニンに対する植物ミネラルの効果

a: 酵素と基質の反応で生成したメラニンに対して、指示濃度の植物ミネラルを添加した際の変化を画像で示した。b: aの画像のメラニンの変化を450nmの吸収で数値化したもの。

*: コントロールに対して $p < 0.05$ で有意差あり

この時の吸収波長の変化を調べたところ、通常のコロシナーゼ酵素反応を行った場合は300nmと470nm付近に吸収ピークが見られたが、植物ミネラルを添加すると、どちらのピークも消失し、340nm付近にシフトしていることが分かった。基質のみのスペクトルで見られる280nmのピークはDOPAであるため、340nm付近のピークは植物ミネラルにより変化したメラニンを示すものと考えられた(図5)。

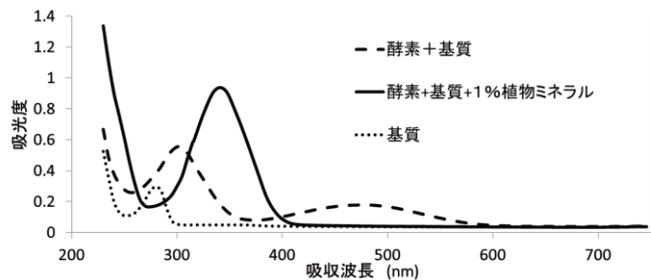


図5 チロシナーゼ反応物の紫外可視光吸収スペクトル解析
各酵素反応を行ったものを、バンド幅5nmで吸収波長の解析を行った。

340nm付近のピークがどのような物質由来のものかを調べるため、これらの反応物を精製し、MALDI-TOF-MSによる代謝物の解析を行った(図6)。酵素反応を行った反応物と、酵素反応時に植物ミネラルを添加した反応物をイオン化し、後者にのみ見られたピークをデータベース解析したところ(Mass Bank)、インドール環を持つ化合物であると推測された。確認のためには更なる試験を要するが、植物ミネラルにより酵素反応で生じたメラニンが、反応中間体やそれに類似した構造に変化したことが示唆された。

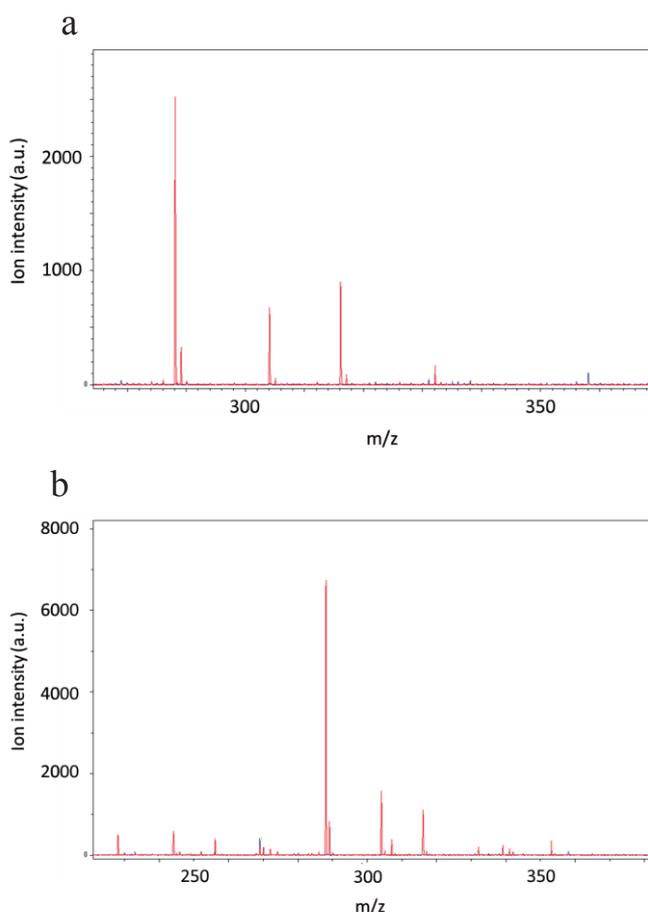


図6 MALDI-TOF-MSによるチロシナーゼ反応物の解析

チロシナーゼと基質で反応を行ったもの (a)、反応に1%植物ミネラル水溶液を添加したもの (b) を調整し、質量分析の前処理を行ったものをMALDI-TOF-MS解析に供した。

3.3 植物ミネラルのメラニン抑制関与物質の検索

次に、植物ミネラル中のメラニンの生成を抑制する成分の探索を行った。植物ミネラルは99.9%無機物で構成されるため、それらを分画する手法としてイオン交換を用いた。イオン交換樹脂は、陽イオン・陰イオン交換と各強・弱の違いにより主に4種類の樹脂からなる。それらの全種類を用いて植物ミネラル水溶液を処理し、溶出液のメラニン生成度を調べたところ、全てのイオン交換樹脂で溶出液のメラニン生成度が上がり、メラニン抑制に関与する物質が捕捉されていると予想された (データ非公開)。しかしながら、イオンによる選択性や植物ミネラルの濃度依存性が無かったことから、イオン交換基に共通して用いられているマトリックスに関与物質が吸着して選択性を失わせている可能性が考えられた。

これを検討するために、マトリックスにセルロースを用いた弱陰イオン交換カラムであるDEAE-セルロースを用いて植物ミネラル水溶液を処理したところ、カラム充填量に応じてメラニン生成率が増加した (図7)。このとき、マトリックスであるセルロース単体で同様の試験を行ったが、メラニン抑制効果は見られなかった (データ非公開)。このことから、植物ミネラルのうち弱陰イオン交換カラムに吸着できる物質、すなわち、水溶液中で陰イオンを持つ物質がメラニン抑制効果を持つと予想された。

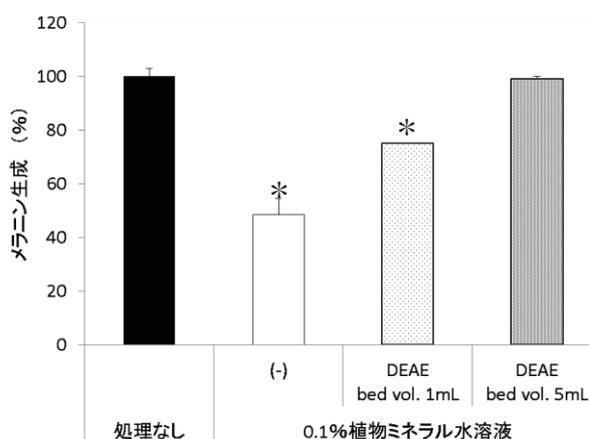


図7 DEAEセルロースによる植物ミネラルの分画

1mL、5mLのDEAEセルロースを充填したカラムに、0.1%植物ミネラル水溶液を処理し、通過画分を用いてチロシナーゼ酵素によるメラニン産生を評価した。

*: コントロールに対して $p < 0.05$ で有意差あり

そこで、DEAEセルロース処理後の植物ミネラル水溶液中で、処理前より減少している陰イオン物質をイオンクロマトグラフィーにより解析したところ、DEAE-セルロース塩化物イオン (Cl^-)、臭化物イオン (Br^-)、硫酸イオン (SO_4^{2-}) がこれに該当した。そこで、各カリウム塩またはナトリウム塩の10000ppm水溶液でメラニン抑制効果を調べたところ、メラニン抑制効果は見られなかった (図8)。このことから、メラニン抑制の関与物質は単体のイオンで構成するものというより、水溶液中で陰イオン化する複数のイオンが関与する事が推測された。

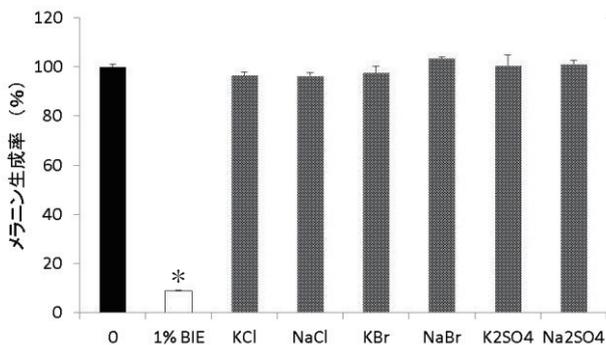


図8 DEAE-セルロース通過分画で減少していたイオンのメラニン生成に対する効果

塩化物、臭化物、硫酸のカリウム塩、ナトリウム塩の10,000ppm水溶液を調整し、チロシナーゼ反応に供し、1%植物ミネラル水溶液(BIE)と反応の違いを調べた。

*:コントロールに対して $p < 0.05$ で有意差あり

また、植物ミネラル中の陽イオンがメラニン抑制に関与するかどうかを検討するため、金属キレート剤により陽イオンに対して抑制がかかるかどうかを調査した(図9)。チロシナーゼは銅イオンを含む酵素であり、金属キレート剤であるEDTAやEGTAにより阻害されることが知られている⁴⁾。植物ミネラル水溶液とこれらのキレート剤を混和し、室温で反応後にチロシナーゼ反応を行うと、高濃度のキレート剤で逆に酵素反応を促進することが分かった。このことは、陽イオンのキレートが、植物ミネラルのメラニン抑制効果を打ち消す作用があることを示唆している。

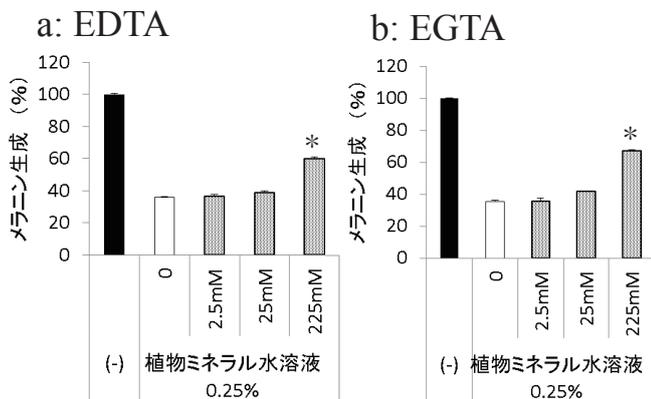


図9 植物ミネラルのメラニン抑制作用に対する金属キレートの効果

各濃度のEDTA(a)、EGTA(b)と植物ミネラルを混和し、室温で5分処理したものを用いてチロシナーゼのメラニン生成を評価した。

*:植物ミネラル投与群に対して $p < 0.05$ で有意差あり

これらの結果から、植物ミネラル水溶液中の陰イオン、陽イオンの組み合わせにより、メラニン抑制効果が発揮されていることが示唆された。試験管内でこれらの組み合わせを再現することは容易ではないが、植物ミネラルの無機物を構成する陽イオン、陰イオンを同定し、その組み合わせや濃度比を検討することで、メラニン抑制効果を持つ無機物の決定を今後も継続する予定である。

4. おわりに

本研究では、植物ミネラルの化粧品特性を探索するため、肌の色素沈着に関与する酵素であるチロシナーゼに対して、植物ミネラルがどのような効果を持つかを探索した。その結果、非常に低濃度でメラニン合成率を低下させたが(図2)、植物ミネラルが高い抗酸化性を持つことから(図3)、メラニン重合時の酸化反応を抑制する可能性が示唆された。また、生成したメラニンに植物ミネラルを処理することで、メラニン色素が減弱することがわかったが、メラニン生成時のスペクトル解析から、植物ミネラルによりメラニンが他の吸収波長を持つ物質に変化したことが示唆された(図4)。植物ミネラル中のどの無機成分がミネラル抑制効果を持つかについても、検討を行った。陰イオンについてはイオン交換による分画法で(図5)、陽イオンについては金属キレート剤の添加により検討を行ったが(図9)、共にメラニンを抑制する要素が見られた。このことから、植物ミネラル水溶液中のイオンの組み合わせにより、メラニン抑制効果を発揮する可能性が示唆された。

これまでの研究で、植物ミネラルが美白素材として活用できる可能性が高いことが示唆されたが、水溶性中のミネラルが皮膚に浸透し、メラノサイト中で効果を発揮するとは考えにくい。実際にマウス黒色細胞株であるB16に植物ミネラルを投与した際の効果を調べたが、細胞を白色化する活性は見られなかった(データ非公開)。そのため、植物ミネラルは、脂溶性成分等と組み合わせて吸収効率を向上させる工夫を行うことでの利用や、抗酸化性が高い素材で

あることを期待した化粧品素材としての活用が可能であると考えられる。

化粧品分野以外にも、食品分野においても植物ミネラルの応用が期待される。チロシナーゼはモノフェノールモノオキシゲナーゼとも呼ばれ、フェノールを酸化させる酵素に分類されるが、この酵素は野菜や果物等の食品の褐変にも関与することが知られている。このため、植物ミネラルは、フェノールの酸化が関与する反応系を抑制する、あるいはフェノール酸化物を生成直後から他の無色の物質に変化させる活性を期待して、様々な場面に応用可能な素材であると言える。

謝 辞

MALDI-TOF-MS システムによる解析は、鳥取大学生命機能研究支援センター機器分析分野の設備利用により実施しました。関係者の皆様に、ここに深く感謝を申し上げます。

文 献

- 1) 清水宏；あたらしい皮膚科学 第2版（2011），中山書店
- 2) 伊藤ら；色素細胞～基礎から臨床へ～，慶應義塾大学出版会、第二版（2015）。
- 3) Wang GH. *et.al.* ; Evaluation of tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of Angelica dahurica root extracts for four different probiotic bacteria fermentations. *J Biosci Bioeng.* 123 (6), p.679-684 (2017) .
- 4) 中川眸；牛肝臓中のチロシナーゼ阻害物質の部分精製，*栄養と食料*、27 (4) ,p163-173 (1974) .