

ヒジキ (*Sargassum fusiforme*) 煮汁中のチロシナーゼ阻害活性成分

花ヶ崎敬資、荻貴之、市場俊雄、丸山進*

ヒジキ (*Sargassum fusiforme*) の煮汁を化粧品素材として有効利用するため、美白作用の一つであるチロシナーゼ阻害を指標に分画を行った。煮汁のチロシナーゼ阻害活性は、51 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50} 値) を示した。また、煮汁を合成吸着樹脂で処理したメタノール溶出画分は3.1 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50} 値)、メタノール溶出画分を分液した酢酸エチル画分は0.75 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50} 値)と強い阻害活性を示した。この酢酸エチル画分を逆相HPLCにより分取したところチロシナーゼ阻害活性とポリフェノール含量に相関が認められた。また、煮汁メタノール溶出画分は、ヒト皮膚三次元モデルにおいて有意にメラニン量を減少させた。

1 はじめに

ヒジキ (*Sargassum fusiforme*) は褐藻類に分類され、古くから食用に用いられてきた。沖縄県においても与那原町などで収穫され島ひじきとして親しまれている。与那原・西原町漁業協同組合においてはヒジキを食用として加工する際、煮沸の工程を経る。この工程において年間約15トンにも及ぶ煮汁が産出され、現状では全て廃棄されていることから有効利用が望まれる。ヒジキと同じ褐藻類である*Sargassum*属は、海藻ポリフェノールであるフロロタンニンを含むことが報告されており¹⁾、ヒジキ煮汁中にもこれらの機能性成分が溶出していることが期待される。実際に海藻エキスを配合した化粧品は市場に多く出回っており、フロロタンニンの抗酸化活性や美白作用など多くの機能性も知られている²⁾³⁾⁴⁾。そこで本研究では、ヒジキ煮汁から化粧品素材として有用な成分を単離することを目的として美白作用の一つであるチロシナーゼ阻害を指標に各種クロマトグラフィーによる分画を行った。

2 実験方法

2-1 試料

与那原・西原町漁業協同組合においてヒジキを煮沸して得られる残り液を煮汁サンプルとして用いた。ヒジキは中城湾沿岸域に生育している天然物であり、2010年4月15日に刈り取り、水洗いした後、1時間煮沸した。

2-2 チロシナーゼ阻害試験

チロシナーゼ阻害試験は既報⁵⁾に従い、酵素としてマッシュルーム由来チロシナーゼ (Sigma-Aldrich, 40 U/mL)、基質として3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (以下DOPA, Sigma-Aldrich, 2.5 mM)、緩衝液として1/15 Mリン酸バッファー (pH 6.8) を用いて、96穴マイクロプレートにて行った。各ウェルに緩衝液90 μL 、酵素溶液40

μL 、試料溶液20 μL を加え攪拌し、23°Cで3分間プレインキュベートした。プレインキュベート後に基質溶液50 μL を添加し、490 nmにおける吸光度を測定した。23°Cで10分間酵素反応後、490 nmにおける吸光度を測定し、吸光度の増加量 (ΔA_{sample}) を求めた。さらに、試料溶液の代わりに超純水を加えた系および酵素溶液の代わりに超純水を加えた系で同様に反応させ、それぞれの場合における反応開始から10分後の吸光度増加量 (ΔA_{blank} および $\Delta A_{\text{control}}$) を求めた。チロシナーゼ阻害活性は、以下の式により算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = [1 - (\Delta A_{\text{sample}} - \Delta A_{\text{blank}}) / \Delta A_{\text{control}}] \times 100$$

また、試料溶液の濃度を段階的に減少させてチロシナーゼ阻害試験を行い、チロシナーゼ阻害率が50%になる濃度 (IC_{50}) を内挿法により求めた。

2-3 試料液の調製

試料を合成吸着樹脂DIAION HP20 (三菱化学) を充填したオープンカラム (8 cm i.d. \times 30 cm) に通液し、等量の水で洗浄した後、メタノール (MeOH) で溶出した。MeOH溶出画分は濃縮乾固後、水に溶解させた。分液は酢酸エチル (和光純薬工業) を用いた。HPLC分取は、送液システム (Alliance 2690 Separations Module, Waters)、逆相カラム (SymmetryPrep C18 Column, 7 μm , 7.8 mm i.d. \times 300 mm, Waters) フォトダイオードアレイ検出器 (996 Photodiode Array Detector, Waters) を用いた。

2-4 ポリフェノール含量の測定

ポリフェノール含量はFolin-ciocalteu法⁶⁾で測定した。適宜希釈した試料溶液に10% Folin-ciocalteu試薬 (Merck)、10% 炭酸ナトリウム (和光純薬工業) を同量加え、1時間室温放置後、マイクロプレートリーダー (Multiskan FC, Thermo) で750 nmの吸光度を測定した。検量線はフロログルシノール (和光純薬工業) を用いて作成し、ポリフェノール含量は溶液 1 mLあたりのフロログルシノール相当量 (μg phloroglucinol eq./mL) として

* 産業技術総合研究所

算出した。

2-5 ヒト皮膚三次元モデルの培養

MEL-300-Bキット（クラボウ）を用いて試験を行った。LLMM培地を0.9 mLずつ添加した6穴プレートにヒト皮膚三次元モデルの入ったカップを移し、炭酸ガスインキュベーターにて5% CO₂存在下の加湿状態で37℃、1時間培養した。培養後のカップを5 mL/wellのLLMM培地を入れた別の6穴プレートへ移し、サンプル（MeOH画分5、10、20 mg/mL）とポジティブコントロール（アルブチン 1 mg/mL）、対照として超純水をそれぞれ 100 μLずつ添加し、炭酸ガスインキュベーターにて5% CO₂存在下の加湿状態で37℃、15日間培養した。培養期間中、試料溶液およびLLMM培地は、2または3日ごとに交換した。培養終了後、モデルカップの写真および顕微鏡写真を撮影し、メラニン定量と細胞毒性検査に供した。

2-6 ヒト皮膚三次元モデルのメラニン定量

ヒト皮膚モデルを24穴のプレートに移し、それぞれ1% SDS、0.05 mM EDTAを含む10 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 6.8）を0.45 mL添加し、これに5 mg/mL proteinase Kを20 μL添加、密閉して室温で3時間反応させた。溶液と細胞の全てを1.5 mLのチューブに回収し、45℃で一晩反応させた。次に、試料溶液に微量に含まれている色素を洗浄、除去する目的で、対照区を含めすべての1.5 mLチューブを20000 gで15分間遠心し上清を捨てた。このチューブに0.05 mM EDTAを含む10 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 6.8）を0.45 mL添加、攪拌した後、再度同じ条件で遠心、上清を捨てた。このチューブに、1% SDS、0.05 mM EDTAを含む10 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 6.8）を0.45 mL添加し、さらに5 mg/mLのproteinase Kを20 μL添加し、45℃、4時間反応させた。次に、500 mM 炭酸ナトリウムを50 μL添加し、次いで30% 過酸化水素水を10 μL添加、80℃、30分間反応させた後、冷却した。次に、クロロホルム：メタノール（2:1）を100 μL添加、10000 gで10分間遠心した。上清100 μLを回収し96穴のプレートに移し、マイクロプレートリーダー（model 680、Bio-Rad）で405 nmの吸光度を測定した。メラニン量は対照区（水）のメラニン量を100%とした相対値（平均値±標準偏差）で示した。

2-7 ヒト皮膚三次元モデルの細胞毒性検査

メラニンの抽出定量に供していない皮膚モデルについて、MTT assayを行った。24穴プレートの各穴に300 μLのMTT溶液（クラボウ）を入れ、これにDulbecco-PBS溶液で3回洗浄したヒト皮膚モデルを移し、炭酸ガスインキュベーターにて5% CO₂存在下の加湿状態で、37℃、3時間静置した。次に、ヒト皮膚モデルをPBS溶液で軽

く洗浄したのち、別の24穴プレートに移した。この各穴に、2 mLのMTT抽出液（クラボウ）を入れ、振とうしながら室温で2時間抽出した。この抽出液を96穴プレートの各穴にそれぞれ200 μLずつ入れ、マイクロプレートリーダー（model 680）で570 nmの吸光度を測定した。

3 実験結果および考察

3-1 ヒジキ煮汁分離過程とチロシナーゼIC₅₀

ヒジキ煮汁の分離過程を図1に示した。図のように煮汁60 LのうちHP20に吸着したメタノール（MeOH）画分は乾固物で58 gであった。さらに、MeOH画分を用いて水と酢酸エチル（EtOAc）により分液し、4.0 gのEtOAc画分が得られた。また、チロシナーゼIC₅₀は煮汁では51 μg/mLであったが、MeOH画分では3.1 μg/mL、EtOAc画分では0.75 μg/mLを示し、コウジ酸の5.0 μg/mLより約7倍強い活性が認められた。

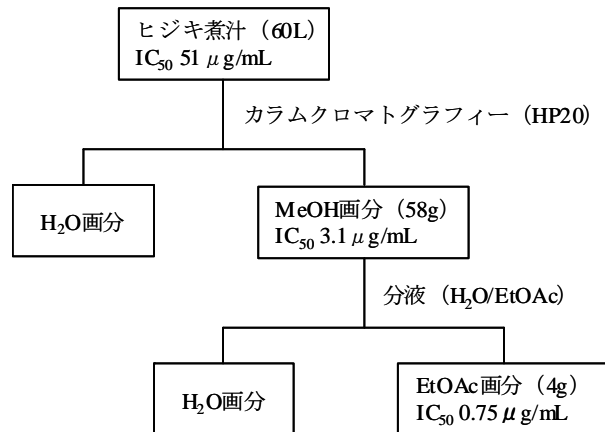


図1 ヒジキ煮汁の分離過程

3-2 EtOAc画分のHPLC

強い活性を示したEtOAc画分を逆相HPLCにより分取した。分取した各画分のチロシナーゼ阻害率とポリフェノール含量を測定した。これらの結果をHPLCのクロマトグラムの結果とともにチロシナーゼ阻害率を棒グラフ、ポリフェノール含量を折れ線グラフとして図2に示した。結果は10分から20分あたりまでの吸光度（264 nm）の増加とともにチロシナーゼ阻害率およびポリフェノール含量が増加する傾向を示し、チロシナーゼ阻害はポリフェノール類が関与していることが示唆された。ヒジキと同じ褐藻類に属する*Ecklonia stolonifera*では、チロシナーゼ阻害を示す化合物としてフロロタンニン類であるDieckolが報告されている⁴⁾。しかし、本研究ではこの分離法と同様の、または、他の様々な方法により化合物の単離を試みたものの、単離には至らなかった。今後、分離条件の更なる検討が必要である。

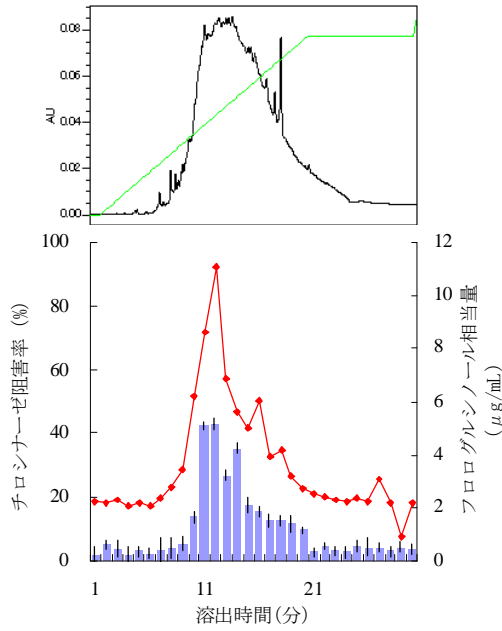


図2 EtoAc画分のHPLCの結果

3-3 ヒト皮膚三次元モデル

ヒト皮膚三次元モデルの写真を図3に示した。1が対照区、2、3、4がそれぞれMeOH画分5、10、20 mg/mL、5がアルブチン1 mg/mL添加区を示している。メラニン量は、1が $100 \pm 6\%$ 、2が $71 \pm 23\%$ 、3が $69 \pm 14\%$ で5%有意に減少、4が $67 \pm 4\%$ で1%有意に減少、また、4はMTT assayでは $142 \pm 4\%$ を示した。ヒト皮膚三次元モデルの結果から、添加したMeOH画分の濃度増加に伴い、メラニン量が有意に減少することが分かった。また、MeOH画分は細胞毒性がないことが分かった。

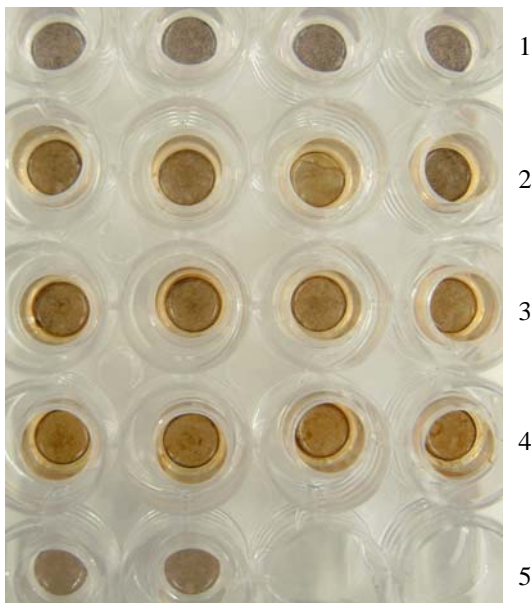


図3 ヒト皮膚三次元モデルの写真

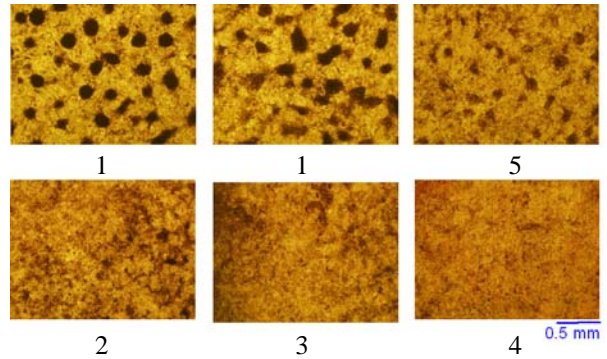


図4 ヒト皮膚三次元モデルの顕微鏡写真

ヒト皮膚三次元モデルの顕微鏡写真を図4に示した。各区は図3の番号と同様である。MeOH画分ではメラニン量が少ないことが確認された。よって、MeOH画分は地域資源活用の観点から、化粧品素材としての産業利用に用いられる可能性が示唆された。

4 まとめ

ヒジキ煮汁を分画したEtOAc画分は、コウジ酸の約7倍強いチロシナーゼ阻害活性を示し、その活性はポリフェノール類が関与していることが示唆された。また、MeOH画分はヒト皮膚三次元モデルにおいてメラニン量を減少させることが確認され、産業利用への可能性が示唆された。

本研究は「ヒジキ煮汁の特性と工業利用に関する研究(2007 技 004)」の一環として行ったものである。

謝辞

本研究は文部科学省都市エリア産学官連携促進事業のマリンバイオ産業創出事業において行った。

参考文献

- 1) Haider, S., Zhen-xing L., Hong L., Jamil K., Yong-chao G., Anti-allergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds, *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, **2009**, 10, 147-153.
- 2) Nakamura, T., Nagayama, K., Uchida, K., Tanaka, R., Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*, *Fisheries Sci.*, **1996**, 62, 923-926.
- 3) Shibata, T., Fujimoto, K., Nagayama, K., Yamaguchi, K., Nakamura, T., Inhibitory activity of brown algal phlorotannins against hyaluronidase, *Int. J. food sci. technol.*, **2002**, 37, 703-709.
- 4) Hye, S. K., Hyung, R. K., Dae, S. B., Byeng, W. S., Taek, J. N., Jae, S. C., Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*, *Arch. Pharm. Res.*, **2004**, 27, 1226-1232.

5) 豊川哲也, 与那嶺都乃, 沖縄県産植物のチロシナーゼ阻害活性, 沖縄県工業技術センター研究報告, **2008**, 10, 61-63.

6) Shibata, T., Ishimaru K., Kawaguchi S., Yoshikawa H., Hama Y., Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae, *J. Appl. Phycol.*, **2008**, 20, 705-711.

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。