味噌中のメラニン生成抑制物質の同定

間 和彦*・新本洋士**・小堀真珠子**・津志田藤二郎**

Purification and Identification of Melanogenesis Inhibitory Factors in Miso

Kazuhiko AIDA*, Hiroshi SHINMOTO**, Masuko KOBORI** and Tojiro TSUSHIDA**

* Central Laboratory, Nippon Flour Mills Co., Ltd., 2114-2 Nurumizu, Atsugi-shi, Kanagawa 243-0033

** National Food Research Institute, the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
2-1-2, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8642

In the previous paper, we reported that an extract from miso strongly suppressed melanogenesis of B16C7 melanoma cells. In this paper, we purified two melanogenesis suppressing materials. The materials were identified to be linoleic acid and ethyl linoleate by mass spectrometric analysis. Synthesis of tyrosinase, a key enzyme on melanogenesis, of B16C7 melanoma cells was strongly suppressed by addition of linoleic acid to a culture medium, whereas linoleic acid did not inhibit the activity of partially purified tyrosinase from B16C7 melanoma cells.

(Received Jun. 11, 1997 ; Accepted Dec. 1, 1997)

近年食品には栄養素としての働きのみならず、発癌や老化を防止したり、血圧を調節するような生体調節機能を持った成分が含まれていることが明らかにされている¹⁾。このような食品の機能は3次機能と呼ばれている。日本の伝統的発酵食品である味噌についても、新しい生体調節機能が明らかにされつつあり、味噌成分による放射線傷害の防止作用、血圧降下作用、変異原性物質の不活性化作用、コレステロール低下作用などの報告がある²⁾。

筆者らは味噌が有する高度の生体調節機能を解明する一環として、マウスメラノーマ細胞を用い、味噌のメラニン生成抑制作用について検討を行ってきた。メラニンは生体内にみられる褐色ないし黒色の色素の総称で、皮膚の色、毛髪の色を決定する色素である。メラニンの生合成経路は詳しく研究されており、メラノサイトと呼ばれる色素細胞中のメラノソーム顆粒中で、チロシンがチロシナーゼによって酸化され、何段階もの酸化重合過程を経て合成される。

筆者らは、これまでに味噌の熱水抽出画分およびエタノール抽出画分に、強いメラニン生成抑制作用があるこ

とを報告してきた³⁾⁴⁾。そこで本研究では、味噌に含まれるメラニン生成抑制物質を単離精製し、味噌中の遊離リノール酸が有効成分であることを見いだしたので報告する。

実験方法

1. 味噌抽出物の調製

中央味噌研究所より提供された麦味噌を試料として用いた。味噌1重量に対し、エタノール4容量を加え、よく攪拌後、4℃で16時間静置して抽出を行った。混合液を10000 rpm, 30分間遠心し上清を得た。上清を純水に対して4℃で48時間透析し、透析チューブ内に析出した浮遊性不溶物を濾過(東洋濾紙 No. 2)により分離し、エタノールに再溶解して回収した。

2. 高速液体クロマトグラフィーによる味噌エタノール抽出物の分画

エタノール抽出物をヘキサン:エタノール(90:10)混液に溶解し、Intersil PREP-SIL カラム(10×250 mm, ジーエルサイエンス)に注入した。ヘキサン:エタノール(90:10)混液、流速2 ml/minで溶出し、示差屈

* 日本製粉株式会社中央研究所(〒243-0033 神奈川県厚木市温水 2114-2)

** 農林水産省食品総合研究所(〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

折検出器で溶出物のモニターを行った。溶出画分は濃縮後、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解してメラニン生成抑制試験に用いた。

3. 活性画分の質量分析

クロマトグラフィーによって得た活性画分をグリセロールと混合し、日本電子 SX-101 型質量分析機を用いて FAB-MS 分析を行った。これによって得られたマスフラグメントイオンを解析し、分子量ならびに化学構造を推定した。

4. マウスメラノーマによるメラニン生成抑制試験

マウス由来のメラニン高生産性 B 16 C 7 メラノーマ細胞を用いた。細胞は 10% 牛胎児血清 (FCS) を添加したダルベッコ変法最小必須培地 (DMEM) で継代培養した。5×10⁴ 個/ml の細胞懸濁液 5 ml を 6 cm シャーレにまきこみ、24 時間前培養した。前培養後、培地を新鮮培地に交換し、試料を添加した。48 時間培養後培地交換および試料添加を行い、さらに 24 時間培養した。

細胞はトリプシン処理により回収した。培地を吸引除去し、トリプシン溶液 (200 IU/ml) 0.5 ml を加えて細胞を剥離させた。直ちにトリプシンインヒビター液 (50 µg/ml) 0.5 ml でトリプシンを不活性化させ、これに 4 ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加えて細胞を懸濁し、試験管に回収した。細胞を 1500 rpm で 10 分間遠心沈殿させ、沈殿の色調を観察することによってメラニン生成を判定した。また、細胞あたりのメラニン生成量算出のため、細胞数とメラニン含量を測定した。回収した細胞懸濁液のうち 1 ml を用いて Sysmex セルカウンター (東亜医用電子) で細胞数を測定した。残りの細胞を遠心沈殿させ、1 規定水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解後、475 nm の吸光度を測定し、あらかじめ作成した標準メラニン (Sigma) の検量線からメラノーマのメラニン生成量を算出した^{3)~4)}。

水溶性試料は PBS に溶解し、フィルター滅菌 (0.45 µm) して培地に添加した。脂溶性試料は DMSO に溶解し、そのまま添加した。培養液 5 ml あたり 20 µl までの DMSO の添加は細胞増殖、メラニン生成のいずれにも影響を与えなかったため、DMSO に溶解した試料の添加量は 20 µl 以下とした。また 20 µl の DMSO のみを添加した培養区を陰性対照とした。陽性対照としては、アルブチンおよびコウジ酸を用いた⁵⁾。

5. チロシナーゼ活性直接阻害作用の測定

10% FCS を含む DMEM で継代培養した B 16 C 7 細胞 5×10⁷ 個を、0.1% Triton X 100 を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 10 ml に懸濁し、氷冷下で超音波破碎し

た。破碎液を 15 000 rpm で 20 分間遠心し、上清をチロシナーゼ粗酵素液とした。

試料を加えた 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 0.3 ml に粗酵素液 0.3 ml を加えて 37°C で 10 分間プレインキュベーション後、基質として 0.15% L-DOPA 溶液を 0.3 ml 加えた。37°C で 20 分間インキュベーションし、475 nm の吸光度変化をチロシナーゼ活性とした⁴⁾。被検物質の終濃度は 33 µM とした。

6. メラノーマ細胞内チロシナーゼ誘導抑制作用の測定

メラニン生成抑制試験と同様に B 16 C 7 細胞に試料 (終濃度 100 µM) を加えて 4 日間培養し、ハーベストした細胞を、チロシナーゼ活性直接阻害作用の測定の項と同様に破碎して粗酵素液とし、チロシナーゼ活性を測定した。

実験結果

1. 味噌抽出物のメラニン生成抑制作用

味噌からのメラニン生成抑制物質の抽出にはエタノールを用いた。得られた抽出液から味噌に含まれる食塩を除く目的で透析を行ったところ、浮遊性の不溶物が析出した。不溶物を濾過して除去したところ、メラニン生成抑制作用が完全に消失したことから、メラニン生成抑制活性はこの不溶物中に存在すると考えられた。

マウスメラノーマ B 16 C 7 細胞を味噌エタノール抽出非透析性不溶画分とともに培養し、細胞を回収して沈殿させた。図 1 に示したように、1 のコントロールでは細胞内に黒いメラニンが生成していた。これに対し、28 µg/ml の味噌抽出画分を添加した 2 では、細胞の明らかな淡色化が観察された。メラニン生成抑制物質として知られているアルブチンを 50 µM 添加して培養した 3 よりも、味噌抽出物添加の方が、淡色化が著しかった。

図 1 味噌エタノール抽出物とともに培養した B 16 C 7 細胞の淡色化

- 1, コントロール (添加物なし)
- 2, 味噌エタノール抽出物 (28 µg/ml)
- 3, アルブチン (50 µM)

2. 高速液体クロマトグラフィーによる活性成分の分画と同定

味噌抽出物（上記の浮遊性不溶物）を高速液体クロマトグラフィーで分画した。図2に示した5つの分画を集め、B16C7細胞に添加して培養したところ、ピーク2およびピーク4に強いメラニン生成抑制活性が認められた。いずれの分画も、薄層クロマトグラフィーでシングルスポットを与えた（データ省略）。

ピーク2およびピーク4の質量分析の結果を図3に示した。ピーク4では、 m/z 281に親分子由来と考えられるシグナルが検出された。したがって、この分画に含まれる物質の分子量は280と考えられた。また、 m/z 41, 55, 67, 81, 95および109にフラグメントが得られ、さらに親分子から水分子が引き抜かれた m/z 263のフラ

グメントもみられた。この質量分析パターンは、リノール酸標品の分析結果（図3下）とよく一致した。したがって、図2のピーク4はリノール酸であると推定された¹²⁾。一方ピーク2に含まれる成分の分子量は、質量分析により308 (m/z 309)と推定された。さらに、低分子領域のフラグメントパターンがリノール酸とよく一致したことから、この分画に溶出された物質はリノール酸エチルエステルであると推定された。ピーク2の質量分析においては、 m/z 285のフラグメントも検出された。これは上記 m/z 263にナトリウムが結合したイオン ($263 + 23 - 1$) であると推定された。

以上の結果より、高速液体クロマトグラフィーによって得られたメラニン生成抑制成分のうち、ピーク4はリノール酸、ピーク2はリノール酸エチルと同定された。

3. リノール酸のメラニン生成抑制作用

リノール酸のB16C7細胞の増殖およびメラニン生成に対する作用、および比較のためにアルブチンを添加した結果を図4に示した。リノール酸100 μ M添加において、細胞のメラニン生成は非添加の2割程度にまでに抑制された。しかし、細胞増殖には影響がほとんどなく、リノール酸がメラニン生成を特異的に抑制していると考えられた。アルブチンでも同様の作用が見られた。リノール酸とアルブチンは同じ程度のメラニン生成抑制作用を有していた。

4. チロシナーゼ活性に対するリノール酸の作用

B16C7細胞から抽出したメラニン合成の鍵酵素であるチロシナーゼの粗酵素の活性を、アルブチン、コウジ酸、およびリノール酸存在下で測定した。図5に示したように、コウジ酸はチロシナーゼ活性を強く阻害した。また、アルブチンはわずかにチロシナーゼ活性を阻害したのみであった。これに対して、リノール酸はチロシナーゼ活性をまったく阻害しなかった。

B16C7細胞をアルブチン、コウジ酸、およびリノール酸存在下で培養し、それぞれの細胞中のチロシナーゼ活性を測定した。図6に結果を示した。アルブチンとともに培養した細胞では、細胞内のチロシナーゼ活性が著しく低く、コントロールの10分の1まで低下していた。同様にリノール酸にも強い作用が見られ、リノール酸とともに培養したB16C7細胞内のチロシナーゼ活性は、コントロールの4分の1以下に低下していた。

考 察

味噌のエタノール抽出物に、マウスメラノーマB16C7細胞に対する強いメラニン生成抑制作用があり、この

図2 味噌エタノール抽出画分的高速液体クロマトグラフィーによる分離

味噌エタノール抽出物を Intersil PREP-SIL カラムに注入し、ヘキサン：エタノール（90：10）混液で溶出させた。

図3 味噌中のメラニン生成抑制成分の質量分析

図4 リノール酸およびアルブチンのB16C7細胞のメラニン生成抑制作用

■, 細胞数; ●, メラニン含量

図5 B16C7細胞から調製したチロシナーゼ粗酵素標品に対するリノール酸の作用

- 1, コントロール
- 2, アルブチン (33 μM)
- 3, コウジ酸 (33 μM)
- 4, リノール酸 (33 μM)

図6 リノール酸とともに培養したB16C7細胞内のチロシナーゼ活性

- 1, コントロール
- 2, アルブチン (100 μM)
- 3, コウジ酸 (100 μM)
- 4, リノール酸 (100 μM)

物質は非透析性で水に溶解しにくい性質を持っていた。高速液体クロマトグラフィーによる分画と分画画分の質量分析により、味噌抽出物中のメラニン生成抑制物質として、リノール酸およびリノール酸エチルが同定された。

リノール酸はC18:2で表される不飽和脂肪酸である。油脂中ではグリセリンと結合したトリグリセリドの形で存在する。木内らは味噌熟成中の脂質の変化について詳しく検討し、大豆に含まれるトリグリセリドがリパーゼにより分解され、遊離脂肪酸が生成することを報告している⁷⁾。木内らによれば、大豆中では遊離脂肪酸は全脂質中のわずか2.3%であるが、熟成した味噌に

よっては、遊離脂肪酸の割合が全脂質の58%にも達する。またこの味噌試料では遊離脂肪酸の6割がリノール酸を含むC18:2の脂肪酸であり、熟成した豆味噌の場合、遊離リノール酸含量は味噌重量の3%に達すると計算される。したがって、味噌は遊離リノール酸の豊富な食品であると言える。

今回、筆者らは味噌に含まれるメラニン生成抑制物質がリノール酸およびリノール酸エチルであることを示した。リノール酸のメラニン生成抑制作用については、すでに安藤らの報告がある^{8)~10)}。安藤らはマウスメラノマおよび茶色モルモット皮膚を用い、リノール酸がメラニン生成を強く抑制することを報告している。本研究で

は、リノール酸は、B 16 C 7 細胞内に存在するチロシナーゼに対して直接酵素活性阻害作用を持つのではなく、細胞内でチロシナーゼが誘導合成されるのを調節していると考えられた。今後、チロシナーゼ mRNA の転写レベルでの検討が必要と考えられる。

リノール酸を含むトリグリセリドの摂取は、血中コレステロールを低下させるなどの有用な作用を持つことから²⁾、一時はリノール酸のリッチな油脂に人気が集まった。しかしながらその後、リノール酸のような n 6 系脂肪酸はアラキドン酸系の炎症メディエータの原料となることから、リノール酸大量摂取はアレルギーなどを増悪させる原因のように考えられるようになった。現在では α リノレン酸のような n 3 系不飽和脂肪酸との摂取バランスが重要であると考えられている¹¹⁾。

安藤らはリノール酸をモルモットの皮膚に塗布することによって、紫外線による日焼けを防ぐことができることを報告している。本報告では味噌中の遊離リノール酸にメラニン生成抑制作用があることを明らかにしたが、これをもって味噌汁を飲むことが美白につながるという直接の証拠にはならない。また、トリグリセリドとして摂取したリノール酸と、遊離リノール酸として摂取したものとの間に、消化吸收過程での差異があるか否かは明らかではない。したがって、味噌中の遊離脂肪酸の消化管内での消長、および経口摂取された遊離リノール酸が美白作用を持つか否かを今後検討する必要がある。

要 約

味噌に含まれるメラニン生成抑制物質として、リノール酸およびリノール酸エチルが同定された。リノール酸は、メラノーマのチロシナーゼに対して直接酵素活性阻害作用を持つのではなく、細胞内でチロシナーゼが誘導されるのを調節していると考えられた。

本研究の遂行にあたり、ご援助いただきました中央味噌研究所に深謝いたします。本研究の概要は第 5 回日本動物細胞工学会大会（平成 7 年 7 月、山形）にて報告した。

文 献

- 1) 津志田藤二郎: *Fragnance Journal*, 1994-7, 14 (1994).
- 2) みそサイエンス最前線, みそ健康づくり委員会編 (1995).
- 3) 實山安英・新本洋士・小堀真珠子・津志田藤二郎・篠原和毅: 味噌の科学と技術, 43, 68 (1995).
- 4) 實山安英・新本洋士・小堀真珠子・津志田藤二郎・篠原和毅: 食工誌, 43, 712 (1996).
- 5) 庄司俊彦・間 和彦・小堀真珠子・新本洋士・津志田藤二郎: 組織培養, 21, 293 (1995).
- 6) MAEDA, K. and FUKUDA, M.: *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 42, 361 (1991).
- 7) KIUCHI, K., OHTA, T. and EBINE, H.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 23, 455 (1976).
- 8) ANDO, H., OKA, M., ICHIHASHI, M. and MISHIMA, Y.: *Pigment Cell Res.*, 3, 200 (1990).
- 9) 安藤秀哉・橋本 晃・政本幸三・市橋正光・三島 豊: *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, 27, 415 (1993).
- 10) ANDO, H., ITOH, A., MISHIMA, Y. and ICHIHASHI, M.: *J. Cell Physiol.*, 163, 608 (1995).
- 11) MAYATEPEK, E., PAUL, K., LEICHSENTRING, M., PFISTERER, M., WAGNER, D., DOMANN, M., SONNATAG, H.G. and BREMER, H.J.: *Infection*, 22, 106 (1994).
- 12) 津志田藤二郎・村井敏信・大森正司・岡本順子: 農化, 61, 817 (1987).

(平成 9 年 6 月 11 日受付, 平成 9 年 12 月 1 日受理)