

沖縄県産植物のチロシナーゼ阻害活性

豊川哲也、与那嶺都乃^{*1}

沖縄県産植物のエキスについて、メラニン合成に関与するチロシナーゼ阻害活性を検討した。約50試料が顕著な活性を示した。試料溶液は熱に安定であり、限外ろ過により比活性は向上した。

1 はじめに

工業技術センターでは、これまでに県産生物資源や伝統食材について、糖尿病改善の指標となる二糖類分解酵素阻害活性¹⁾、血圧上昇抑制の指標となるアンジオテンシン変換酵素阻害活性²⁾、抗肥満の指標となるリパーゼ阻害活性³⁾等を測定しており、これらの結果を活用して事業化や商品開発につなげてきた。

本年度は、近年注目を集めている琉球コスメ産業への支援を目的に、県産資源のチロシナーゼ阻害活性を検索した。

2 実験方法

2-1 試料

工業技術センター亜熱帯生物資源ライブラリに保存されているサンプルから、既報¹⁾のとおり50%エタノールで抽出した植物エキスを、イオン交換水で10倍希釈（以下、試料溶液）しチロシナーゼ阻害活性試験に供した。

2-2 チロシナーゼ阻害試験

チロシナーゼ（マッシュルーム由来、Sigma社製）をイオン交換水で40U/mLに調製し酵素溶液とした。3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine（以下DOPA, Sigma社製）をイオン交換水で2.5mMに調製し基質溶液とした。また、1/15Mリン酸バッファー（pH6.8）を緩衝液として用いた。

酵素反応は、96穴マイクロプレートにて行った。マイクロプレートの各ウェルに緩衝液 100 μl、酵素溶液 40 μl、試料溶液 20 μlを加え充分混合攪拌し23℃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、直ちに490nmにおける吸光度（As0）を測定した。23℃で10分間酵素反応を行い、反応10分後の吸光度（As10）を測定した。さらに、試料溶液20 μlの代わりに5%エタノール溶液20 μlを加えた系、及び酵素溶液40 μlの代わりに緩衝液40 μlを加えた系において同様に反応させ、それぞれの場合における反応開始直後および10分後の吸光度（Ac0、Ac10及びAb0、Ab10）を測定した。チロシナーゼ阻害活性は以下の式に

より算出した。

チロシナーゼ阻害率（%）＝

$$100 - \left[\frac{(As10 - Ab10) - (As0 - Ab0)}{(Ac10 - Ac0)} \times 100 \right]$$

また、試料溶液の濃度を段階的に減少させて上記チロシナーゼ阻害活性試験を行い、チロシナーゼ阻害活性が50%になる濃度、すなわちチロシナーゼの50%阻害濃度（IC₅₀、mg/ml）を内挿法により求めた

2-3 熱安定性試験

試料溶液を、100℃で30分間加熱保持した。加熱後の試料溶液のチロシナーゼ活性値を加熱前の活性値で除して残存活性を求めた。

2-4 抽出溶媒の検討

蒸留水、50%エタノール、エタノールを用いて抽出溶媒の検討を行った。各植物の乾燥粉末を、抽出溶媒 4mlと共に、10ml容のスクリュウキャップ試験管に封入し、超音波抽出（4kw, 30min）後、遠心分離、ろ過を行って上清を得た。残渣に同様の処理を再度行い得られた上清をあわせて抽出液とした。抽出液を減圧乾固後、5%エタノールに1mg/mlとなるように再溶解しチロシナーゼ阻害活性を測定した。

2-5 限外ろ過

分画分子量、3, 5, 10, 30, 100k Daの限外ろ過膜（ミリポア社製、アミコン）を用いて限外ろ過を行い、通過画分のチロシナーゼ阻害活性を測定した。また、通過画分を減圧乾固し固形物の重量を求め、重量あたりの活性である比活性（%/mg）を算出した。

3 実験結果および考察

3-1 測定方法の信頼性について

図1に、コウジ酸を用いた場合の用量応答曲線を示す。用量応答曲線は、典型的なシグモイド型を示し、阻害率が83.7 - 2.6%（コウジ酸濃度160 - 3 μg/ml）の範囲では重相関係数 R = 0.998で、阻害率94.2 - 2.6%では R = 0.926となり良好な直線性を示した。また、1mg/mlのコウジ酸を試料としたとき、併行精度は変動係数（CV）

*1 株式会社トロピカルテクノセンター 非常勤職員

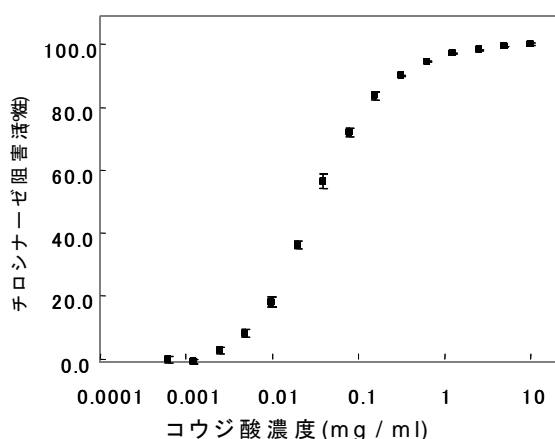


図1 コウジ酸濃度と阻害活性の関係

が4.3%、室内再現精度はCV=3.2%となり良好な再現性を示した。以上の結果より、本測定法はクロシナーゼ阻害活性の迅速測定法として充分耐えられるものと判断した。

3-2 チロシナーゼ阻害活性

約 1300 サンプルの試料溶液について、チロシナーゼ阻害活性を検討した。試料溶液の阻害率が 40%以上を有望素材として判断し、さらに希釈系列を設け IC50 を測定した。各試料溶液の IC50 を表 1 に示す。コウジ酸の IC50 は、0.05mg/ml であった。ポチョウジ、リュウキュウツチトリモチ、ウスジロイソマツは、精製前の段階であるがコウジ酸の IC50 と比較して、1/3 - 1/4 の活性を示した。

3-3 熱安定性

表 1 の試料について、100℃で 30 分間加熱保持したところ、いずれの試料溶液でも活性値の顕著な変化は認められず、活性成分が熱に安定であることが示唆された。

3-4 限外ろ過

リュウキュウツチトリモチとマヤブシキの限外ろ過膜通過画分について比活性を求めた。その結果を表 2 に示す。比活性は単位重量あたりの阻害活性値であり、純度の指標ととらえることができる。すなわち、比活性の高い試料ほど精製度が高いといえる。リュウキュウツチトリモチは排除分子量 100kDa - 10kDa の膜を通過した画分では比活性が増加したのに対し、排除分子量 5kDa の膜の通過画分では比活性の低下が認められたことから、その阻害成分の分子量は 5kDa 以上 10kDa 以下であると推察された。同様に、マヤブシキでは 30kDa - 100kDa の範囲だと推察される。

謝辞

本研究は、平成 19 年度亜熱帯生物資源活用システム高度化事業により実施しました。

表1 各試料溶液のIC50値

和名・部位	IC50 (mg/ml)
リュウキュウツチトリモチ・葉	0.11
モクセンナ・葉	0.15
ポチョウジ・葉	0.16
ウスジロイソマツ・茎	0.18
モクセンナ・花	0.20
シマグワ・葉	0.26
アカギ・実	0.31
パラミツ・葉	0.39
オオフトモモ・葉	0.41
ウコンイソマツ・根茎	0.42
アカバナヒルギ・実	0.42
メドハギ・全草	0.44
ジュンケイボク・葉	0.46
マヤブシキ・葉	0.47
ヒルギモドキ・葉	0.57
レモンユウカリ・葉	0.59
オオゴチョウ・葉	0.60
ウコンイソマツ・根茎	0.61
リュウキュウハギ・茎葉	0.63
シマグワ・葉	0.65
ソウシジュ・葉	0.66
イワンモクゲンジ・葉	0.76
アカバナヒルギ・花	0.82
ベニデマリ・葉	0.85
カニステル・葉	0.85
モクマオウ・葉	0.89
アデク・葉	1.01
オオゴチョウ・葉	1.05
ハマボッス・全草	1.35
サボジラ・実	1.67
ハマサルトリイバラ・地上部	1.69
オオゴチョウ・花	1.70
ゲットウ・花	2.28
メヒルギ・葉	2.47
リュウキュウナガエヒサカキ・葉	3.07
ハマセンナ・葉	3.30
ベニデマリ・花	3.87
ハマユウ・葉	6.09
リュウキュウコクタン・葉	6.11

表2 限外ろ過膜通過画分の比活性 (% / mg)

	3kDa	5kDa	10kDa	30kDa	100kDa	原液
リュウキュウツチトリモチ	6.9	10.4	40.1	54.9	44.0	35.1
マヤブシキ	-*	2.3	1.4	4.6	31.2	36.8

*測定せず。

参考文献

- 1) 二糖類分解酵素阻害物質の製造方法、特願2004-023594
- 2) 豊川哲也、鎌田靖弘、与座江利子、県産資源を活用した機能性食品素材の開発、工技センター研究報告第2号(2000)
- 3) 豊川哲也、鎌田靖弘、照屋正映、上地美香、新垣美香、市場俊雄、沖縄県産植物抽出物のリパーゼ阻害活性、工業技術センター研究報告第5号(2003)

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。