

カンキツ精油の有する生体作用の生化学的解析

高知大学 農学部

受 田 浩 之

Citrus peel essential oils are natural flavoring materials of commercial importance. The peel oil from each citrus variety not only adds much of the characteristic aroma and flavor to juice products made from that fruit but also has a physiological activity such as antioxidative action and inhibition of carcinogen formation. In order to elucidate the potential of citrus peel essential oils as a functional biomaterial, in the present investigation, I examined several in vitro biochemical activities of essential oils from 13 kinds of citrus fruits. Although yuzu essential oil did not covalently bind to human serum albumin (HSA), the presence clearly promoted the modification of glucose into HSA. The effect of the essential oil on the Maillard reaction partly resulted from the micro-environmental change around Trp-214 of HSA. The enzyme tyrosinase was significantly inhibited by some essential oils such as Eureka lemon, Lisbon and Kiyookadaidai. The comparison of the composition with others suggested the involvement of sabinene, neral, geranial, neryl acetate and geranyl acetate. Interestingly, these essential oils showed the remarkable superoxide anion-scavenging activity. The intensity of those activities showed no significant relationship with DPPH radical-scavenging activity. As the tyrosinase involves in melanin production, the result obtained by the present investigation indicates that some citrus peel essential oils might be applicable to the field of cosmetology.

1 緒 言

カンキツ果皮の最も外側の黄橙色組織には無数の小さい油胞が存在しており、その中にフレーバー成分、すなわち精油が蓄積されている。この精油はカンキツ特有の爽快な香りの源であるが、最近では精油の有する多様な薬理学的作用、生理的・心理的效果が注目を集め、「アロマセラピー」、「アロマコロジー」の中心的な役割を担っている¹⁾。しかしながら、実用面での華やかさとは対照的に、精油の有する多彩な機能の発現メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

一方、最近、生活習慣病や老化の原因として、活性酸素や生体内メイラード反応の関与が指摘されている^{2,3)}。従って、反応性の高い活性酸素の消去作用を有する物質⁴⁾、またメイラード反応の阻害活性を示す物質群⁵⁾が、それらの予防に有効であると期待される。これまでにカンキツ精油には高い抗酸化能が認められていることから⁶⁾、活性酸素に対して消去活性を示す精油成分が存在している可能性は高いと考えられる。また精油成分の中には、タンパク質への高い吸着能を示す成分や、カルボニル基を有する成分も含まれていることから⁷⁾、皮膚や組織のタンパク質をクロスリンクすることで老化へと導いている生体内メイラード反応に対して、阻害効果を発揮することも期待される。

そこで本研究では、カンキツ精油が有する新しい機能として、皮膚や組織の老化、並びに疾病の予防効果を系統的に、かつ成分化学的に追求することを目的として、生体内タンパク質、酵素並びに活性酸素を中心としたフリーラジカルに対する精油成分の作用を詳細に解析することを目的とした。

2 実 験

2.1 実験試料

実験材料として、レモン・ライム類、ブンタン類、ダイダイ類、ユズ類、ミカン類などのカンキツを含む13品種を用いた。各品種名、学術名、並びに略号は以下の通りである：①ユーレカレモン, *Citrus limon* Burm. f., cv Lisbon, EUR, ②トサブンタン, *C. grandis* Osbeck forma Tosa-buntan, TOS, ③ナオシチ, *C. taguma-sudachi* Hort. Ex Y. Tanaka, NAO, ④ユズ, *C. junos* Sieb. Ex Tanaka, YUZ, ⑤ケラジ, *C. keraji* Hort. Ex Tanaka, KER, ⑥ダイダイ, *C. aurantium* Linn. Var. *Cyathifera* Y. Tanaka, DAI, ⑦リスボン, *C. limon* Burm. f., cv Lisbon, LIS, ⑧キミカン, *C. flavicarpus* Hort. Ex Tanaka, KIM, ⑨イーチャンレモン, *C. wilsonii* Tanaka, ICH, ⑩キヨオカダイダイ, *C. sp.*, KIY, ⑪カボス, *C. sphaerocarpa* Hort. Ex Tanaka, KAB, ⑫ポンカン, *C. reticulata* Blanco, PON, ⑬モチユ, *C. inflata* Hort. ex Tanaka, MOC. 実験材料は2001年10月から12月に高知県果樹試験場、愛媛県果樹試験場、愛媛県果樹試験場岩城分場、静岡県柑橘試験場、静岡県柑橘試験場伊豆分場、鹿児島県果樹試験場、大分県柑橘試験場津久見分場、広島県工業技術センター果樹研究所、農林水産省果樹試験場興津支場などで収穫したものを、収穫直後に入手した。



Biochemical Analysis of Physiological Activity of Citrus Peel Oil

Hiroyuki Ukeda

Department of Bioresources Science,
Faculty of Agriculture, Kochi University

2.2 カンキツ精油の調製

精油抽出法としては冷圧油 (Cold-pressed oil: CPO) 法を用いた。これはフラベド (外果皮) の油胞中に存在する精油を、フラベドを圧搾して抽出する方法である。この方法は溶媒抽出法などの他の精油抽出法と比較して、最も天然のフレーバー組成に近い精油が得られる方法である⁷⁾。まず果皮を剥皮し、果皮からアルベド (内果皮) を取り除いてフラベドのみとした。フラベドを折り曲げて圧搾し、得られた粗精油を集めて飽和食塩水で塩析後、遠心分離 (4000 rpm×15 min, 4℃) して油層と水層に分離した。上部油層を取り出し、無水硫酸ナトリウムを少量加えて冷蔵庫内 (5℃) で一晩放置した。生じた沈殿及び無水硫酸ナトリウムを除去したものを精油試料とした。

2.3 DPPH ラジカル消去活性

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性の測定は常法⁸⁾を一部変更して行った。すなわち精油試料 10 μ L に 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を 900 μ L, エタノール 40 μ L, 並びに 0.5% (w/w) Tween 20 水溶液 50 μ L を添加して十分混和した。ここにエタノールで調製した 0.5mM DPPH 溶液を 1 mL 添加して、暗所、室温にて 30 分間反応させ、DPPH ラジカルの吸収に基づく 517nm の吸光度を測定した。試料の代わりに水を添加した際に観察される吸光度をコントロールとして、試料添加による吸光度の減少を DPPH ラジカル消去能とした。標準物質としては水溶性ビタミン E 誘導体 Trolox を用いた。

2.4 O₂⁻ (スーパーオキシドアニオン) 消去活性

著者の開発した WST-1 アッセイ法を用いた⁹⁾。本法はキサンチンオキシダーゼ (XOD) の反応で生成させた O₂⁻ を WST-1 と試料中の O₂ 消去物質との間で競合させる間接法である。本測定原理に基づいてマイクロプレートでの多検体測定を可能とした SOD assay kit-WST (同仁化学研究所製) を本実験では使用した。WST-1 ホルマザンの生成に基づく 440 nm の吸光度変化はマイクロプレートリーダー (Immuno Mini NJ-2300, ナルジェンインターナショナル製) を用いて測定した。試料の代わりに水を添加した際の吸光度変化を Ac, 試料添加での吸光度変化を As, さらに試料に由来する 440nm の吸光度の影響を除くために XOD 溶液の代わりに緩衝液を添加した際の吸光度 Ab を測定して、阻害率 I (%) を

$$I = [Ac - (As - Ab) / Ac] \times 100$$

で計算した。

2.5 チロシナーゼ阻害活性

Kubo らの方法に従ってチロシナーゼ阻害活性を測定した¹⁰⁾。すなわち 1mL の 2.5 mM L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine)

に 1.8 mL のリン酸緩衝液 (0.1 mM, pH6.8) を添加し、25℃で 10 分間インキュベートした。その後、0.1mL の試料溶液、0.1mL のチロシナーゼ溶液 (mushroom 由来, Sigma 製, 138 units) を添加して反応を開始させた。チロシナーゼの活性は dopachrome の生成を 475nm の吸光度変化速度 (dA/min) としてモニターした。試料濃度は終濃度として 167 μ g/mL になるように DMSO で希釈した。試料の代わりに DMSO のみを用いた際の吸光度変化速度をコントロールとした。

2.6 メイラード反応に対するユズ精油の影響

0.5M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いてヒト血清アルブミン (HSA: Sigma 製) を 30 mg/mL に調製した。これにユズ精油を 0 または 10 μ L/mL になるように添加して 37℃で 3 日間インキュベートした。その後、各溶液にグルコースを 0, 36, 300 mg/mL となるように添加してさらに 15 日間、37℃でインキュベートした。0, 3, 6, 9, 12, 15 日後、それぞれ試料を分取して、MALDI-TOF-MS (Bruker 製 Protein-TOF MALDI-TOF-mass spectrometer) を用いて、各試料の分子量を測定した。なおマトリックスにはシナピン酸を用いた。各試料の分子量はモノマー HSA の分子量分布におけるピークの質量数として表示した。

3 結果

3.1 生体内メイラード反応に対する影響

図 1 に示すように HSA をグルコースとインキュベートすると、インキュベート時間、及びグルコース添加濃度の増加と共に HSA の分子量が増加した。増加した分子量から考えて、36 mg/mL と 300 mg/mL のグルコース濃度において、それぞれ 15 日間で、4 分子と 22 分子のグルコースが HSA 分子に結合していることが明らかとなった。一方、ユズ精油と HSA をインキュベートしても分子量の

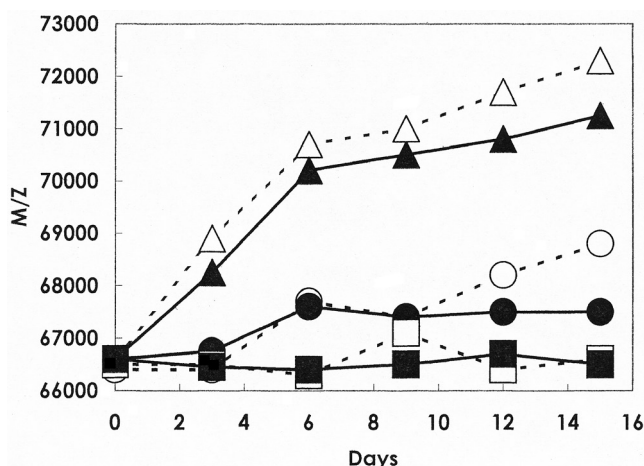


図 1 HSA とグルコースのメイラード反応に及ぼすユズ精油の影響
ユズ精油存在下 (破線) 及び無添加 (実線) において、異なる濃度のグルコース (▲, △; 300 mg/ml, ●, ○; 30 mg/ml, ■, □; 0 mg/ml) とインキュベートした HSA の分子 変化

増加傾向は認められず、ユズ精油中の化合物はHSAと共有的に結合しないことが明らかとなった。ユズ精油と15日間インキュベートした反応液を透析後、Shaklaiらの方法に従って励起波長285nm、蛍光波長240nmから480nmの範囲で蛍光スペクトルを測定した¹¹⁾。観測された極大吸収波長はネイティブHSAと比較して約10nm長波長側にシフトしており、トリプトファン残基(Trp-214)の周辺環境がユズ精油の添加により変化していることが明らかとなった。ユズ精油を添加したHSAにグルコースを添加すると、ユズ精油無添加の試料と比べてHSA分子量の増加幅が明らかに大きくなることが観察された。しかしながらグルコースの濃度に依存した分子量の増加傾向は認められず、両条件で共に4~5分子程度の増加であった。3日間ユズ精油とHSAをインキュベートした反応物から、遊離のユズ精油を透析で取り除いてグルコースを添加した場合には、分子量の増加傾向は認められなかった。

3.2 精油のDPPHラジカル消去能

常法に従い種々の精油についてDPPHラジカルの消去活性を測定したところ、反応液に濁りが生じ、通常の分光学的な測定が困難であることが判明した。そこで標準物質としてTroloxを用いて、各精油のラジカル消去活性を目視によりTrolox等価濃度として表示した(表1)。測定に供した13種類のDPPHラジカル消去活性はEUR=YUZ=ICH>TOS=LIS=KIM>NAO=KER=KIYの順であった。

3.3 精油のO₂⁻消去活性

WST-1法を用いてO₂⁻の消去活性を測定した。本法はO₂⁻によるWST-1の還元を阻害する活性として評価するもので、WST-1ホルマザンの生成を440nmの吸光度変化としてモニターする。今回用いた精油試料の中には、カロテノイドに起因すると考えられる強い黄橙色を呈するものが含まれていた。そこで、試料の色に基づく着色の影響を差し引くために、各試料のブランク吸光度(A_b)を測定し、アッセイ溶液の示す吸光度(A_s)との差を求めた。使用した13種類の精油が示したコントロールに対する阻害活性を表1に示した。なおこの表において、阻害率が高い程、O₂⁻の消去能が強いことを示す。消去能は精油の種類に依存して大きな差が認められた。特にKIY, LIS, KAB, KERで消去能は強く、次にKIM, EUR, TOS, NAO, DAIにも活性が認められた。カロテノイド含量と関連があると推測されるA_bの値とO₂⁻消去能との間には相関は認められず、精油中のカロテノイド以外の成分が活性に寄与していることが示唆された。

3.4 精油のチロシナーゼ阻害活性

Kuboらの方法に従い、DOPAからのdopachromeの生成をモニターすることでチロシナーゼの阻害を調べた。各

表1 各種カンキツ精油の示すDPPHラジカル消去能、及びスーパーオキシドアニオン消去活性

	DPPHラジカル消去能	スーパーオキシドアニオン消去活性(阻害率:%)
EUR	+++	65.5
TOS	++	64.3
NAO	+	62.9
YUZ	+++	21.2
KER	+	72.2
DAI	---	61.5
LIS	++	75.6
KIM	++	67.6
ICH	+++	41.5
KIY	+	96.3
KAB	±	72.9
PON	---	49.7
MOC	---	54.2

DPPHラジカル消去能はTrolox等価濃度として表示された。各記号が示す等価濃度: +++, 15mM; ++, 10mM; +, 5mM; ±, 2.5mM; ---, 0mM

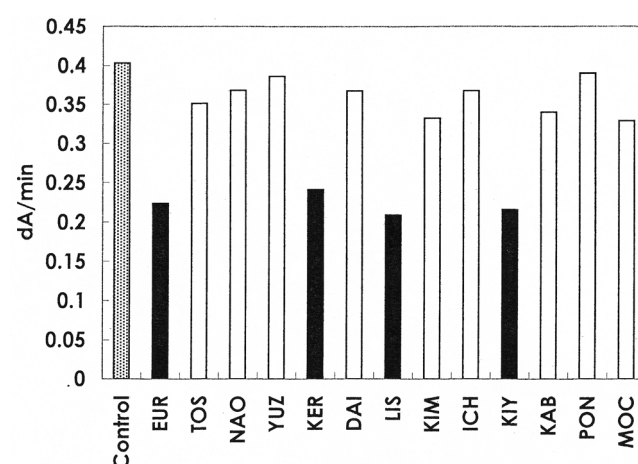


図2 各種カンキツ精油が示すチロシナーゼ阻害活性

精油のチロシナーゼ阻害活性を図2に示す。13種類の精油のうち、LIS, KIY, EUR, KERの4種類の精油で顕著な阻害活性が認められた。

4 考察

生体内メイラード反応は糖尿病合併症の原因であるばかりでなく、アルツハイマー病や動脈硬化症を含めて、様々な生活習慣病や老化の原因であることが知られている。精油成分にはシトラールをはじめ生体内メイラード反応に関与するグルコースと同様に、カルボニル基を有する化合物が多数存在していることから、生体内メイラード反応に対して影響を与える可能性が高いと考えられた。さらにタンパク質のアミノ基に直接作用して、そのタンパク質の機能を変化させる可能性もあると予想された。そこで本研究ではまず、HSAをモデルタンパク質に選び、グルコースと

のメイラード反応を分子量変化でモニターすることにより、精油の生体内メイラード反応に対する影響を調べた。

図1に示したように、ユズ精油はHSAに対するグルコースの修飾を加速させることが明らかとなった。反応の機構については今後の検討課題であるが、蛍光スペクトルによると、ユズ精油の添加がHSAのTrp-214周辺の構造を変化させていることから、精油のHSAへの吸着がその立体構造を変化させ、グルコースに対する反応性に影響を与えたと推察された。透析によって遊離のユズ精油を除去した際には無添加のHSAと差が認められなかったことから、精油成分のHSAに対する作用は可逆的な吸着によるものと推測される。

結果的にユズ精油はメイラード反応の予防効果を示さなかったが、タンパク質の立体構造を変化させ、メイラード反応の進行に影響を与えることが明らかとなった。今後他の精油と様々なタンパク質との相互作用を詳細に調べること、メイラード反応の阻害作用を示す精油を開発することも可能であると考えられる。

次に、精油成分のタンパク質に対する直接的な影響を調べるために、モデルタンパク質として酵素チロシナーゼを用いて、その触媒作用に対する精油の影響を調べた。顕著な阻害活性が認められたLIS, EUR, KIYは他の精油に比べてsabinene, neral, geranial, neryl acetate, geranyl acetateを多く含有している(図3)。このうちneralとgeranialはすでにチロシナーゼのアミノ基とシッフ塩基を形成することでチロシナーゼを阻害することが報告されているが、今回これらの成分を多く含むカンキツ精油においても、チロシナーゼの阻害活性が認められることが初めて明らかとなった。チロシナーゼはメラニン色素の生成に関与していることから、その阻害活性を示すカンキツ精油がメラニンの生成を抑制する可能性もあり今後の実用的な利用が期待される。

メイラード反応と並んで、老化や生活習慣病の大きな要因として活性酸素をはじめとするフリーラジカルの関与が指摘されている。そこで本研究では、カンキツ精油が有する O_2^- とDPPHラジカルに対する消去能を測定した。 O_2^- の消去活性はKER, LIS, KIYに特に強いことが明らかとなった。注目すべきはこれらが同時にチロシナーゼ阻害活性を示している点である。チロシナーゼはDOPAの酸化で O_2^- を生成することが報告されているが、dopachromeの生成に O_2^- は関与していないことから¹²⁾、カンキツ精油が有する O_2^- の消去活性により、見掛け上チロシナーゼ阻害活性が認められたとは考え難い。従って、現時点ではチロシナーゼ阻害に関与していると推察されるsabinene, neral, geranial, neryl acetate, geranyl acetateなどの成分が同時に O_2^- の消去能を有する、あるいは他の成分で O_2^- の消去活性を有する物質が偶然それらのカンキツ精油に含まれて

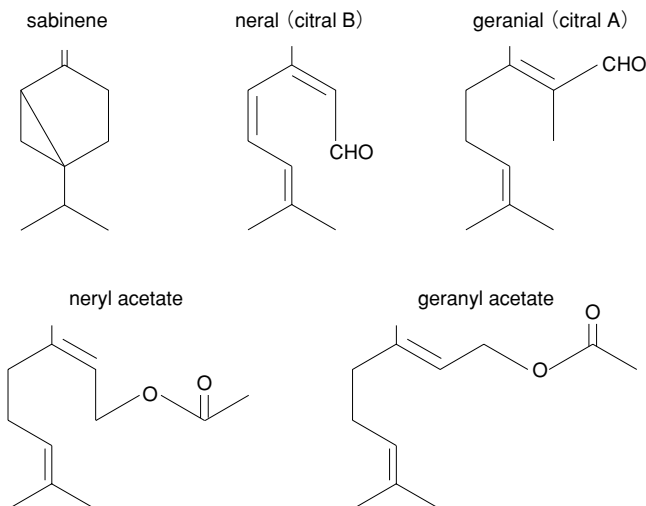


図3 チロシナーゼ阻害に関する精油成分

いる、などいくつかの可能性が考えられる。

一方、DPPHラジカルの消去活性と O_2^- 消去活性、チロシナーゼ阻害活性の間には明確な関連は認められなかった。これまでにChoiらが同様にカンキツ精油のDPPHラジカル消去能について報告しているが⁸⁾、成分的には特にgeraniol, terpinolene, γ -terpineneの寄与が大きいとしている。これらの関与成分は明らかにチロシナーゼの阻害とは異なる物質であり、 O_2^- の消去に関与している物質とも異なるものと推察される。

以上の結果、カンキツ精油はタンパク質、酵素に共有的に、あるいは可逆的に吸着して、それらの分子の生化学的な機能を変化させ得ることが明らかとなった。さらに活性酸素やフリーラジカルの反応性を消去する作用も持ち合わせており、それらの関与成分がお互いに異なる可能性も示唆された。従って、複雑な多成分共存系であるカンキツ精油は複数の生化学的な作用を備えている、言い換えれば多様な機能性スペクトルを示す素材であることが示された。得られた成果の中で、チロシナーゼの阻害活性は美白効につながることから、その実用的な利用に向けて今後詳細な検討を進めていく予定である。

謝辞

本研究をするに当たりご支援をいただきました(株)コスメトロジー研究振興財団、並びにご指導頂きました高知大学農学部・沢村正義教授に感謝申し上げます。

(文献)

- 1) 井上重治：香りの抗菌作用—アロマセラピーへの応用，化学と生物，39，475-481，2001.
- 2) 受田浩之：酵素スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の活性測定法，Dojin News，96，1-6，2000.

- 3) Ukeda, H., Hasegawa, Y., Ishii, T. and Sawamura, M.: Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by intermediates of Maillard reaction and glycolytic pathway and some sugars, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 2039-2042, 1997.
- 4) 森山洋憲, 片山泰幸, 中林錦一, 受田浩之, 沢村正義: 高知県産茶および青物の有するスーパーオキシドアニオン消去能の測定, *食科工*, 49, 679-682, 2002.
- 5) Ukeda, H., Hasegawa, Y., Harada, Y. and Sawamura, M.: Effect of carnosine and related compounds on the inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase by modification of fructose and glycolaldehyde, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 36-43, 2002.
- 6) Song, H.-S., Ukeda, H. and Sawamura, M.: Antioxidative activities of Citrus peel essential oils and their components against linoleic acid oxidation, *Food Sci. Technol. Res.*, 7, 50-56, 2001.
- 7) Sawamura, M., Song, H.-S., Sagawa, K. and Ukeda, H.: Characteristic aroma components of Tosa-buntan (*Citrus grandis* Osbeck forma Tosa) fruit, *Food Sci. Technol. Res.*, 7, 45-49, 2001.
- 8) Choi, H.-S., Song, H.S., Ukeda, H. and Sawamura, M.: Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4156-4161, 2000.
- 9) Ukeda, H., Kawana, D., Maeda, S. and Sawamura, M.: Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 485-488, 1999.
- 10) Kubo, I. And Kinst-Hori, I.: Tyrosinase inhibitory activity of the olive oil flavor compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4574-4578, 1999.
- 11) Shaklai, N., Garlick, R.I. and Bunn, H.F.: Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function, *J. Biol. Chem.*, 25, 3812-3817, 1984.
- 12) Koga, S., Nakano, M. and Tero-Kubota, S.: Generation of superoxide during the enzymatic action of tyrosinase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 292, 570-575, 1992.