

米タンパク質由来チロシナーゼ阻害ペプチドの 精製と同定およびその美白効果

新潟大学工学部機能材料工学科

谷 口 正 之

Rice bran, which is the residue from brown rice in the production of white rice, is one of the most abundant agricultural by-products in Japan. After squeezing rice oil, the residual defatted rice bran powder contains a lot of proteinaceous fractions as well as starchy and cellulosic polysaccharides. In this study, we investigated the purification and identification of tyrosinase-inhibitory peptides obtained by hydrolyzing enzymatically the protein of rice bran. The tyrosinase-inhibitory peptides were purified from the enzymatic hydrolyzate by size-exclusion and hydrophobic chromatography. Three kinds of tyrosinase-inhibitory peptide were identified by MALDI TOF-MS analysis. The peptides showed the same monophenolase-inhibitory activity as that of arbutin as a control. In future, the tyrosinase-inhibitory peptides obtained from rice bran are expected to be utilized as a cosmetic material.

1. 緒 言

大豆、小麦などの穀類のタンパク質やその分解物中には、タンパク質分解酵素阻害作用、アンジオテンシン変換酵素阻害作用（血圧降下作用）、コレステロール低下作用、抗菌作用などの生理活性成分が存在することが報告されている。精白米や米糠のタンパク質中には、タンパク質分解酵素阻害作用を示すオリザシスタチンが存在することが報告されているが、一般的な酵素やアンジオテンシン変換酵素阻害剤以外の生理活性を示すタンパク質やペプチドに関する報告はほとんどない。

一方、チロシナーゼは、メラニン合成経路における律速酵素であり、L-チロシンからL-ドーパ、さらにはL-ドーパキノンへの2段階の反応を触媒する。メラニンの過剰生産は色素増加症を招くため、チロシナーゼ阻害剤は美白効果をもたらす化粧品などに利用されている。既存のチロシナーゼ阻害剤として、ハイドロキノン、コウジ酸、アルブチン、グルタチオンなどが一部実用化されている。これらの低分子化合物は、顕著なチロシナーゼ阻害活性を示すが、それらが有する強い細胞毒性や水分存在下での酸化による活性低下に起因する問題点が指摘されている。近年、天然物である植物、真菌、海藻由来の低分子有機化合物やペプチドがチロシナーゼ阻害活性を有することが、国内外において報告されている¹⁻⁶⁾。これらの新しい化合物は、上記の多くの問題点を解決する候補として期待されているが、研究段階であり、さらに、細胞毒性の有無と程度およびメ

ラニン形成阻害機構に関する研究を継続する必要がある。

我々は最近、米糠タンパク質の酵素加水分解物から得たペプチドに、チロシナーゼ阻害活性を見出した。本阻害成分は、鎖長10残基程度のペプチドと推定され、粗精製物のサンプルはタンパク質量として2 μ g当たり約10 %のチロシナーゼ活性を阻害した。一般によく利用されるチロシナーゼ阻害剤であるコウジ酸は、1 μ g当たり10 %のチロシナーゼ活性を阻害する。したがって、米糠タンパク質由来のチロシナーゼ阻害ペプチドは、現段階の粗精製物でも十分に商品化が可能な活性を有していると考えられる。

そこで本研究では、米糠タンパク質由来チロシナーゼ阻害ペプチドを化粧品素材として実用化することを目指した基礎研究として、次の2点についてさらに検討した⁷⁻⁹⁾。すなわち、1) 本チロシナーゼ阻害ペプチドの精製法を実験室規模で確立した。より効率的な手法を確立するために、特に、プロテアーゼを用いた加水分解反応条件を最適化した。また、チロシナーゼを阻害するペプチドを精製し、質量分析計 (MALDI TOF-MS) を用いて同定した。2) 本チロシナーゼ阻害ペプチドのチロシナーゼ阻害活性を明らかにした。また、本チロシナーゼ阻害ペプチドをマウス由来メラニン形成細胞 (B16およびB16F10) などに添加し、細胞毒性とメラニン形成量について検討した。

2. 実 験

2.1 米タンパク質の酵素加水分解

酵素を用いた米糠タンパク質の加水分解条件を、酵素の種類と濃度、反応時間、可溶化・分解の程度などについて検討した。

2.2 チロシナーゼ阻害ペプチドの精製とその同定

米糠タンパク質を、図1に示すようにキモトリプシンとトリプシンを用いて加水分解した後、遠心分離によって上澄液を得た。この上澄液を凍結乾燥して得られたサンプル



Purification and Identification of Tyrosinase-inhibitory Peptides from Rice Proteins and Their Whitening Effects

Masayuki Taniguchi

Department of Materials Science and Technology, Faculty of Engineering, Niigata University

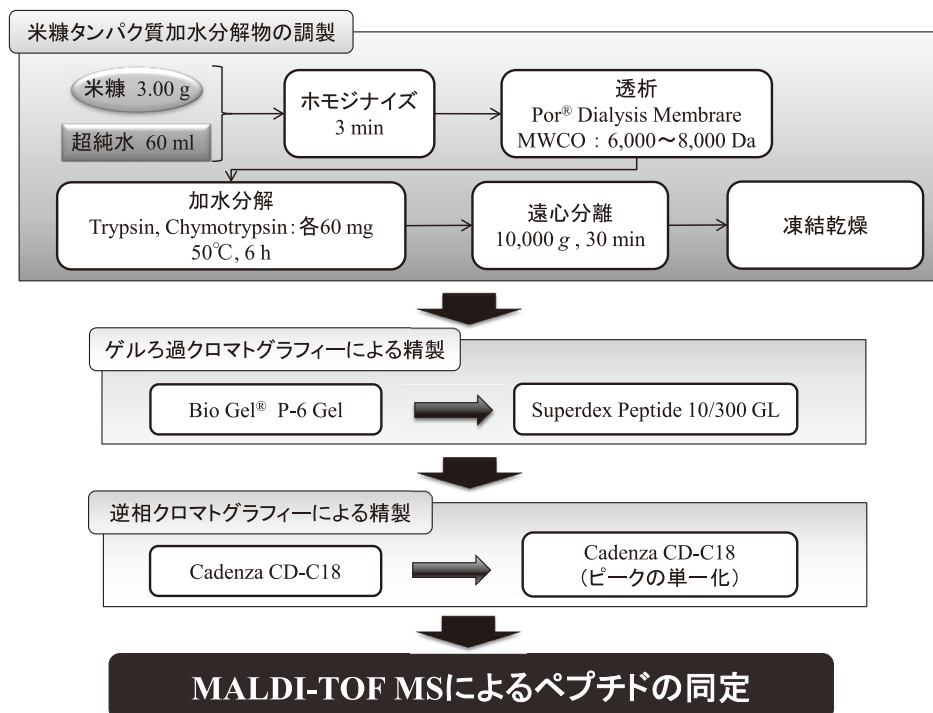


図1 米糠タンパク質の酵素加水分解とペプチドの精製の方法

を米糠タンパク質酵素加水分解物とした。

次に、米糠タンパク質酵素加水分解物からチロシナーゼ阻害ペプチドを、図1に示すように精製した。最初に酵素加水分解物をBioGel P-6 GelカラムとSuperdex Peptide 10/300 GLカラムを用いたサイズ排除（ゲル濾過）クロマトグラフィーによって粗精製し、次にCadenza CD-C18カラムを用いた逆相クロマトグラフィーによって精密に精製した。逆相クロマトグラフィーによって得られた各ピークを分取し、同一のカラムを用いて再度精製し、それぞれほぼ単一のピークを得た。各ピークに含まれる阻害ペプチドを、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（MALDI TOF-MS）を用いて同定した。

2.3 チロシナーゼ阻害活性の測定

モノフェノラーゼ活性は、酵素としてマッシュルームチロシナーゼ、基質としてL-チロシンを用いて、次のようにして測定した。図2に示す反応溶液を調製し、チロシナーゼ溶液を最後に添加することによって酵素反応を開始した。反応開始後、L-ドーパキノンが形成し475nmにおける吸光度が図2のように上昇するが、モノフェノラーゼが阻害された場合には、吸光度の上昇が遅れた。この遅延時間をラグタイムとして図2に示すように求めた。阻害剤を添加しない場合のラグタイムの逆数をモノフェノラーゼ活性として定義し、阻害剤のモノフェノラーゼ活性に及ぼす影響を、図2中の式で示す残存活性として表した。

次にジフェノラーゼ活性は、モノフェノラーゼの場合と

同じように、酵素としてマッシュルームチロシナーゼ、基質としてL-ドーパを用いて、次のようにして測定した。図3に示す反応溶液を調製し、チロシナーゼ溶液を最後に添加することによって酵素反応を開始した。反応開始後、L-ドーパキノンが生成するに伴って475nmにおける吸光度が、図3に示すようにほぼ直線的に上昇した。この際に得られる直線の傾きをジフェノラーゼ活性と定義した。また、阻害剤のジフェノラーゼ活性に及ぼす影響は、図3中の式で示すように残存活性として表した。

2.4 メラニン形成抑制効果の評価

メラニン形成細胞（B16およびB16F10）への細胞毒性とそのメラニン形成量に及ぼすチロシナーゼ阻害ペプチドの影響を評価した。細胞毒性を検討するために、最初にメラノーマ細胞を96ウェルプレートに 1.0×10^4 cells/wellとなるように播種した。培養には10%のFBSを加えたDMEM培地を用いた。培養は、メラニン含量の測定の場合と同じように行い、72時間目にcell counting kit-8を用いて、450nmにおける吸光度を測定することによって生細胞数を測定した。メラニン含量の測定では、最初にメラノーマ細胞を12ウェルプレートに 1.0×10^4 cells/wellとなるように播種した。培養には10%のFBSと $2 \mu\text{M}$ の α -Melanocyte stimulation hormone (α -MSH)を加えたDMEM培地を用いた。24時間、培養を行った後に培地交換し、サンプルを添加した。さらに72時間培養した後、細胞を回収してNaOHで細胞を溶解し、405nmにおける

吸光度を測定することによってメラニン含量を測定した。

3. 結果

3.1 米タンパク質加水分解物の調製

各種プロテアーゼを用いて米糠タンパク質を加水分解した結果、サーモライシン単独およびキモトリプシンとトリ

プシンを組み合わせた場合に、チロシナーゼ阻害活性が高い加水分解物が得られた。本研究では、図1に示すように各60mgのキモトリプシンとトリプシンを組み合わせ、3.0 gの米糠タンパク質を50℃で6時間加水分解したサンプルを調製し、以下の実験に用いた。

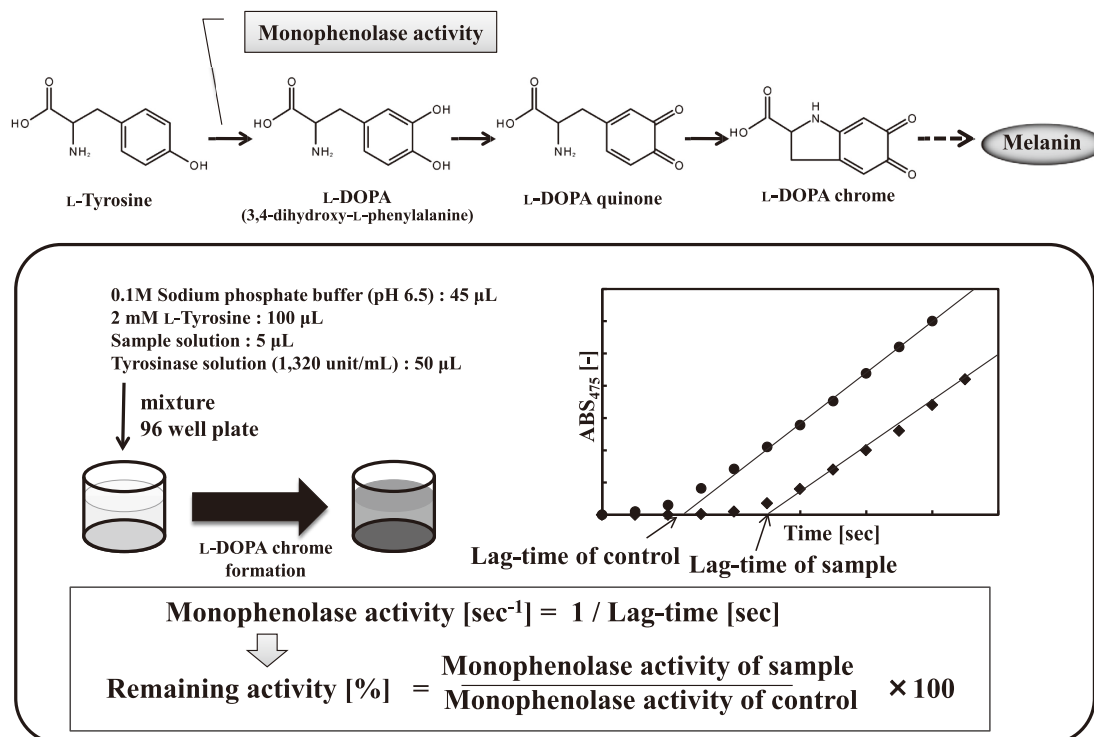


図2 モノフェノラーゼ阻害活性の測定方法

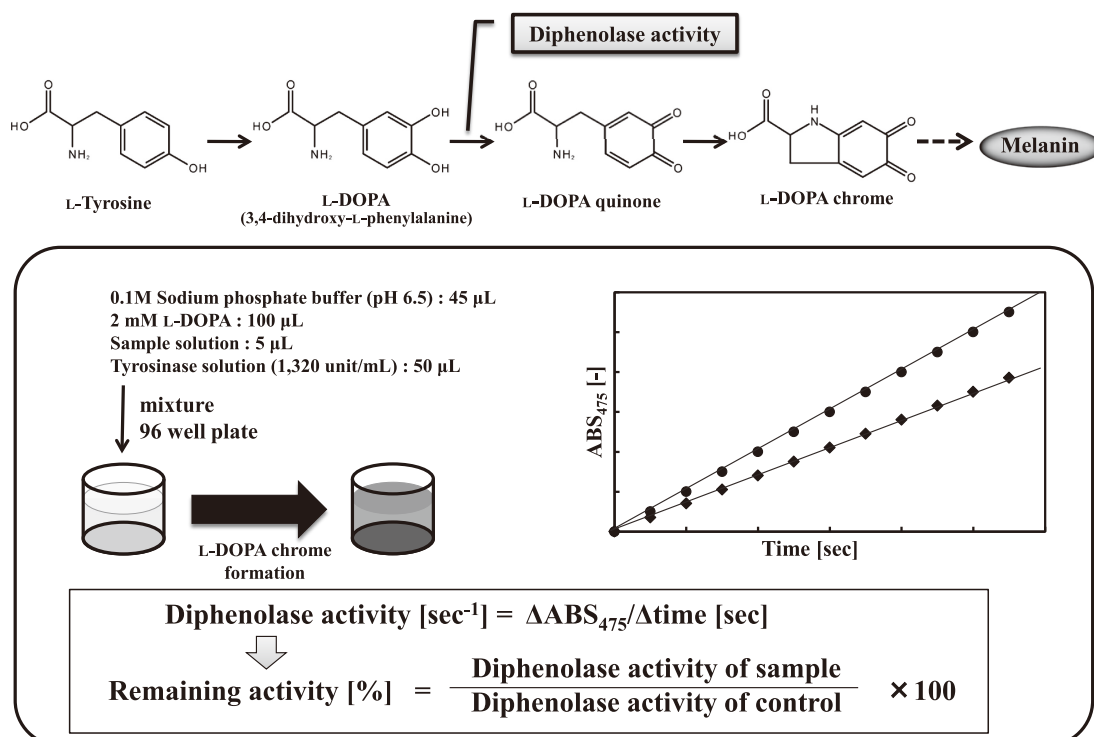


図3 ジフェノラーゼ阻害活性の測定方法

3.2 チロシナーゼ阻害ペプチドの精製と同定

BioGel P-6Gel カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーによって、米糠タンパク質加水分解物を精製した結果を図4に示す。得られたNo.60からNo.100の画分のチロシナーゼ阻害活性をモノフェノラーゼとジフェノラーゼ阻害活性に分けて測定した。その結果、各画分にモノ

フェノラーゼ阻害活性が検出されたが、No.72からNo.83の画分に比較的強いジフェノラーゼ阻害活性が検出できた。そこで、No.72からNo.83の画分をプールして、次のSuperdex Peptide 10/300GL カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーによって、さらに精製した結果を図5に示す。得られた各ピークを11の画分に分け、それぞれの

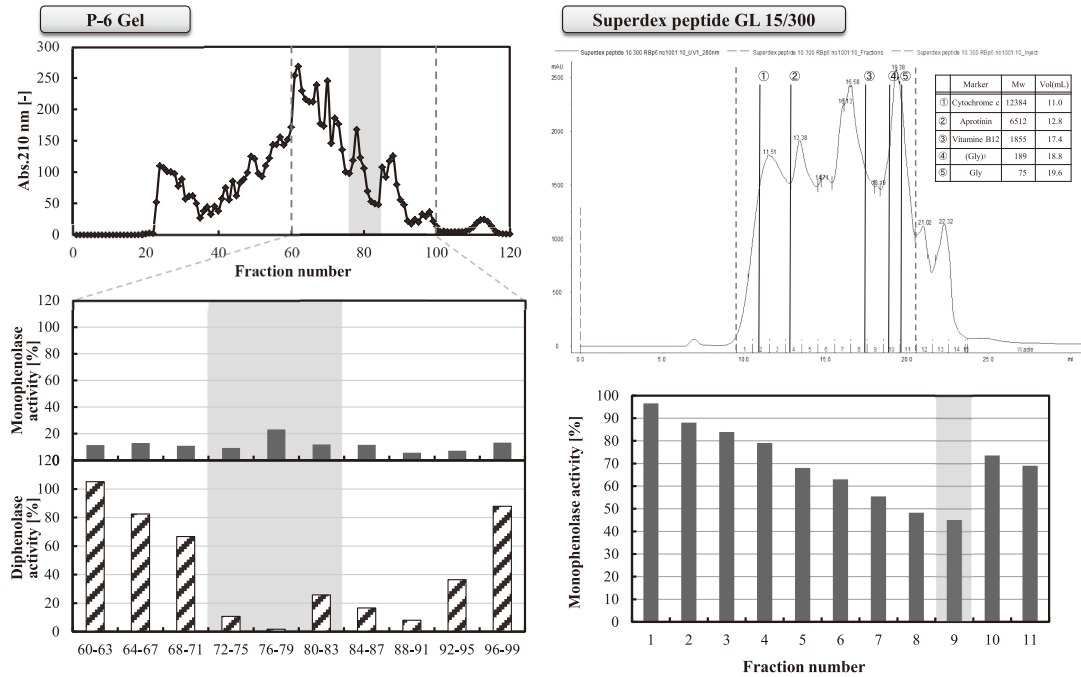


図4 サイズ排除クロマトグラフィーによるペプチドの精製

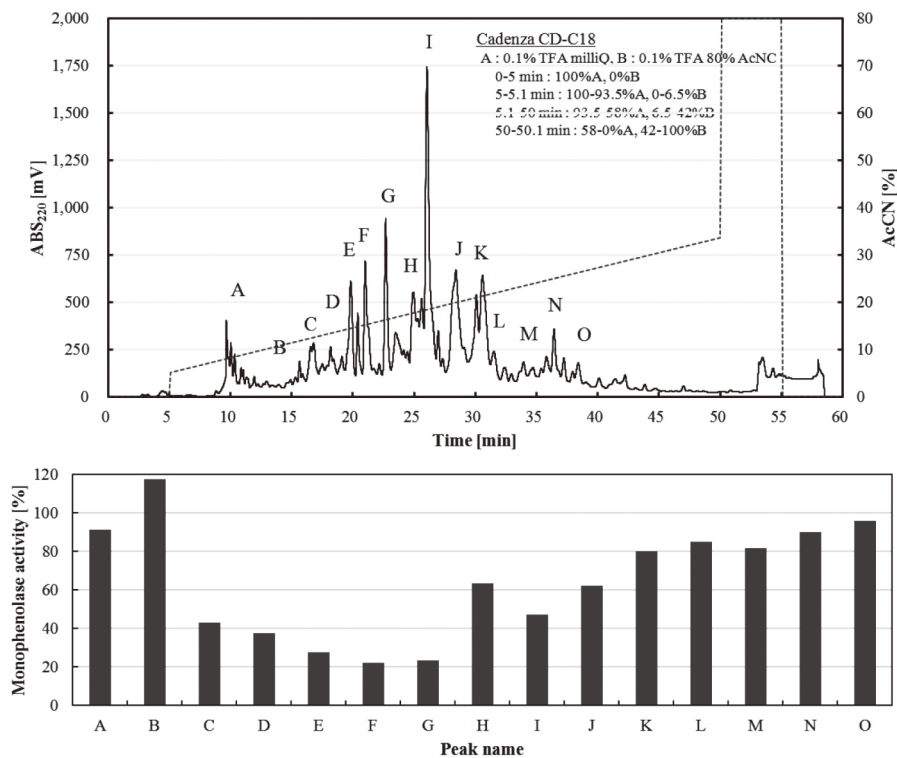


図5 疎水性クロマトグラフィーによるペプチドの精製

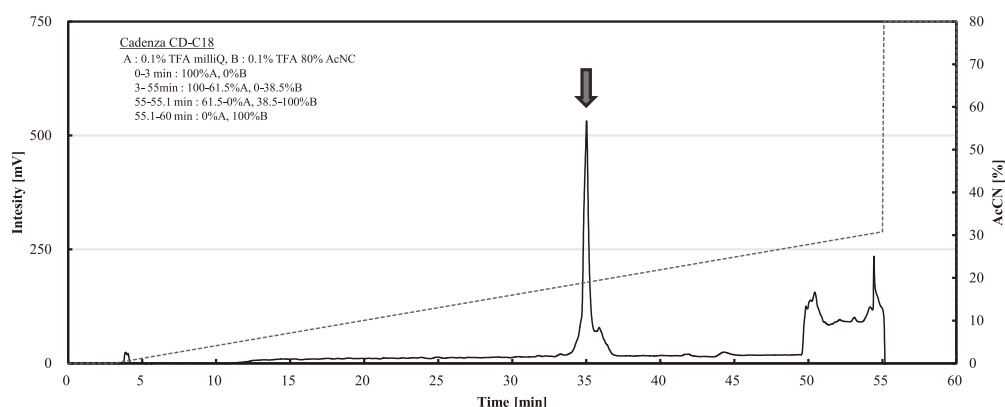
画分のモノフェノラーゼ阻害活性を測定した結果、No.9の画分に強い阻害活性が検出された。この画分は、分子量マーカーであるビタミンB₁₂ (MW 1855Da) とグリシン三量体 (MW 189Da) の溶出位置から、およそその分子量が200 – 2000Daであると推定された。

次に、Cazenda CD-C18カラムを用いた逆相クロマトグラフィーによって、得られたNo.9の画分を精密に精製した結果を図5に示す。この逆相クロマトグラフィーにおいて、AからOまでの15のピークが得られた。そこで、各ピーク画分のモノフェノラーゼ阻害活性を測定した結果、E、F、G、H、およびJの画分に強い阻害活性が検出された。それぞれのピーク画分を分取して、再度Cazenda CD-C18カラムを用いた逆相クロマトグラフィーによって精製した。図6と図7はそれぞれピークEとFの精製結果の例

を示す。それぞれの画分がほぼ単一ピークになったことがわかった。そこで、各単一ピークに含まれる阻害ペプチドを、MALDI TOF-MSを用いて同定した結果、6種類のペプチド (E、F、G、H1、H2およびJ) を同定することができた。それぞれのペプチドは7～9残基のアミノ酸から構成されるペプチドであった。

3.3 米糠由来ペプチドのチロシナーゼ活性

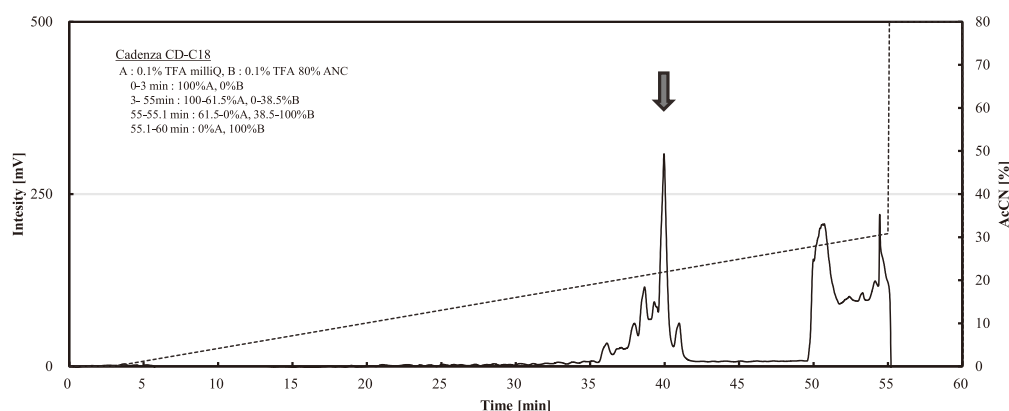
同定した6種類のペプチドを化学合成し、チロシナーゼ阻害活性を測定した。コントロールとしてチロシナーゼ活性を阻害することが既に報告されているコウジ酸、アルブチン、およびTH10を用い、それらの阻害活性と比較した。我々が報告したTH10は、Abu Ubeidらによって報告された10残基のアミノ酸から構成されるペプチド



Match to: **Os03t0793700-01** Score: 44
RmlC-like jelly roll fold domain containing protein.

Peptide E (7 amino acid residues)

図6 画分Eの疎水性クロマトグラフィーによる精製



Match to: **Os03t0793700-01** Score: 60
RmlC-like jelly roll fold domain containing protein.

Peptide G (9 amino acid residues)

図7 画分Gの疎水性クロマトグラフィーによる精製

P4 (YRSRKYSWY)¹⁾と7残基が同一であるチロシナーゼ阻害ペプチドである。各成分のモノフェノラーゼとジフェノラーゼに対する阻害活性を、比較した結果を図8に示す。コウジ酸は、低濃度でモノフェノラーゼとジフェノラーゼ活性を阻害した。アルブチンは、モノフェノラーゼ活性を阻害したが、ジフェノラーゼ活性を阻害しなかった。TH10は、モノフェノラーゼ活性をアルブチンと同程度に阻害し、ジフェノラーゼ活性も阻害した。一方、ペプチドE、G、およびH1は、モノフェノラーゼ活性を阻害したが、その阻害活性は、アルブチンやTH10に比べて低かった。また、ペプチドE、G、およびH1は、ジフェノラーゼ活性をアルブチンと同様に阻害しなかった。

3.4 米由来ペプチドのメラニン形成阻害活性

チロシナーゼ活性を阻害することが既に報告されているコウジ酸、アルブチン、およびTH10の細胞毒性を比較した。100 μ M濃度で添加した場合には、コウジ酸によって細胞は、約40%増殖を阻害されたが、アルブチンやTH10は、ほとんど細胞毒性を示さなかった。ペプチドE、G、およびH1のメラニン形成細胞に対する細胞毒性とそのメラニン形成量に及ぼす影響は、現在検討中である。

4. 考 察

米糠は、精米中に派生する資源であり、食用油やイノシ

トール、オリザノール、フィチン酸などの生理活性物質の生産のための原料として利用されているが、大部分は有効に利用されていない。本研究では、米糠タンパク質の有効利用を最終目的として、その酵素加水分解物からチロシナーゼ阻害ペプチドを探索した。

チロシナーゼは、L-チロシンからL-ドーパ、さらにはL-ドーパキノンへの2段階の反応を触媒するメラニン合成経路における律速酵素である。このメラニンの過剰生産は色素増加症を招くため、ハイドロキノン、コウジ酸、アルブチン、グルタチオンなどのチロシナーゼ阻害剤は美白効果をもたらす化粧品素材として利用されている。これらの低分子化合物は、顕著なチロシナーゼ阻害活性を示すが、それらが有する強い細胞毒性や酸化による活性低下などの問題点が指摘されている。そこで、国内外において、新しいチロシナーゼ阻害成分が、天然物である植物、真菌、海藻などから探索されており、いくつかの低分子有機化合物やペプチドがチロシナーゼ阻害活性を有することが報告されている¹⁻⁶⁾。

本研究では、米糠タンパク質由来チロシナーゼ阻害ペプチドを化粧品素材として実用化することを目指した基礎研究として、本チロシナーゼ阻害ペプチドの調製法を実験室規模で確立した。また、チロシナーゼを阻害するペプチドをクロマトグラフィーなどの手法を用いて精製し、MALDI TOF-MSを用いて同定した。同定したアミノ酸配

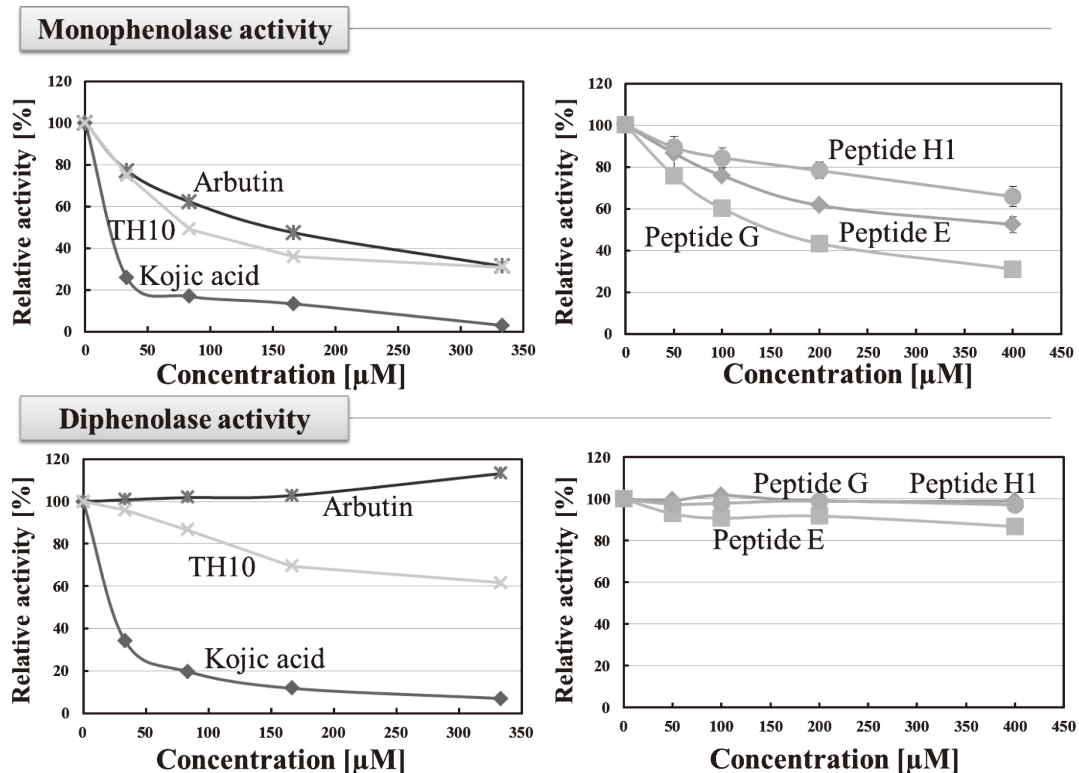


図8 米糠タンパク質由来ペプチドのチロシナーゼ阻害活性

列に基づいて化学合成によって6種類のペプチドサンプルを調製し、それらのチロシナーゼ阻害活性を測定した。その結果、3種類のペプチドがアルブチンやTH10とはほぼ同じ程度にモノフェノラーゼを阻害することが明らかになった⁷⁻⁹⁾。本チロシナーゼ阻害ペプチドのマウス由来メラニン形成細胞 (B16およびB16F10) に対する細胞毒性とメラニン形成阻害効果については現在検討中である。

本研究によって、米糠タンパク質由来チロシナーゼ阻害ペプチドが調製できることが示された。今後、これまでの結果を踏まえて、収率を考慮したペプチドの効率的な調製法や簡便な粗精製法を確立する必要がある。また、チロシナーゼ阻害ペプチドとして、現時点では3種類が同定できているが、これまでに得られた結果から、さらに多くのペプチドが同定できる可能性が高い。米糠タンパク質由来チロシナーゼ阻害ペプチドを網羅的に同定し、それらのチロシナーゼ阻害活性を測定することによって、アミノ酸配列とチロシナーゼ阻害活性の関係を解明できる可能性も高い。これらのチロシナーゼ阻害ペプチドのメラニン形成細胞に対する細胞毒性とメラニン形成阻害効果を明らかにできれば、化粧品素材として有望な候補になると考えられる。

(引用文献)

- 1) Abu Ubeid, A., Wang, Y., Zhao, L., and Hantash, B. M.: Short-sequence oligopeptides with inhibitory activity against mushroom and human tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.*, 129, 2242-2249 (2009).
- 2) Yoon, N. Y., Eom, T. K., Kim, M. M., and Kim, S. W.: Inhibitory effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on mushroom tyrosinase activity and melanin formation in mouse B16F10 melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 4124-4129 (2009).
- 3) Lien, T.-F., Hsu, Y.-L., Lo, D.-Y. and Chiou, R. Y.-Y.: Identification of an alkylhydroquinone from *Rhus succedanea* as an inhibitor of tyrosinase and melanogenesis. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2200-2205 (2009).
- 4) Shirasugi, I., Kamada, M., Matsui, T., Sakakibara, Y., Liu, M-C, and Suiko, M.: Sulforaphane inhibited melanin synthesis by regulating tyrosinase gene expression in B16 mouse melanoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 579-582 (2010).
- 5) Kim, J.-M., Ko, R.-K., Jung, D.-S., Kim, S.-S., Lee, N. H.: Tyrosinase inhibitory constituents from the stems of *Maackia fauriei*. *Phytother. Res.*, 24, 70-75 (2010).
- 6) Liang, C.-H., Chou, T.-H., and Ding, H.-Y.: Inhibition of melanogenesis by a novel origanoside from *Origanum vulgare*. *J. Dermatol. Sci.*, 57, 170-177 (2010).
- 7) 富谷倫之, 池田沙詔子, 阿部貴子, 落合秋人, 田中孝明, 谷口正之: 米タンパク質加水分解物からの酵素阻害成分の精製とその構造解析. 平成22年度日本食品工学会(東京), 講演要旨集p.113 (2010).
- 8) 吉田久志, 富谷倫之, 落合秋人, 田中孝明, 谷口正之: 米由来ペプチドによるチロシナーゼ活性の阻害とメラニン形成の抑制. 平成23年度日本生物工学会(東京), 講演要旨集p.148 (2011).
- 9) 田中聖也, 吉田久志, 落合秋人, 田中孝明, 谷口正之: 米糠タンパク質酵素加水分解物中のチロシナーゼ阻害ペプチドの精製と同定. 2012年度日本生物工学会(神戸), 講演要旨集p.168 (2012).