

天然由来の美白性ペプチド素材の探索とその作用機序の解明

新潟大学工学部機能材料工学科

落 合 秋 人

Tyrosinase is a rate-limiting enzyme in melanin biosynthesis. Thus, many inhibitors against tyrosinase have been proposed to be skin-lightening agents. However, many of the existing inhibitors cannot be widely used in the cosmetic industry owing to their high cytotoxicity and low activity. In this study, we isolated new naturally derived peptides from the enzymatic hydrolysate of rice bran protein that exhibited inhibitory activity against tyrosinase. Furthermore, mutational and structural analyses were tried for elucidating the structure-function relationship of these peptides.

1. 緒 言

紫外線から皮膚を保護する生体防御反応として、我々の身体はメラニンと呼ばれる褐色色素を生産する。通常、皮膚のターンオーバー（皮膚細胞の新陳代謝）によってメラニンは自然に肌から排出されるが、色素の過剰生産もしくはターンオーバーの低下などの理由で“しみ”や“そばかす”などの色素沈着を起こす¹⁾。ターンオーバーが乱れる要因として、過度な紫外線の暴露、栄養バランスの崩れ、疲労、ストレス、ホルモンバランスの崩れなどが挙げられるが、一般的には加齢に伴う新陳代謝の衰えが原因である。また、最近の研究では、お年寄りが継続的にスキンケアと化粧を行うことで日常生活動作（ADL）が向上することが明らかになっている。これらのことから、若い世代においてもみならず、10年後には65歳以上の高齢者が30%近くに達するとされる超高齢化社会を迎える中で、生活の質を高めるためのスキンケア、特に美白については多くの人々が望む皮膚ケアであり、生き生きとした生活を支えるためにますます重要な課題であると言える。

メラニン色素の沈着は、主にメラニン形成の出発段階に関わるチロシナーゼ酵素の働きによる²⁾。チロシナーゼは、図1に示すように、メラニン形成の出発段階に関わる中核酵素である^{2,3)}。そのため、これまでに多くのチロシナーゼ阻害成分が色素沈着防止剤や美白剤として提案されている⁴⁾。現在、色素沈着防止剤や美白剤として、様々な化学合成品や天然物成分が用いられているが、近年の白斑問題に象徴されるように、コウジ酸やハイドロキノンなどの既存物質はアレルギー性や毒性が強く、その安全性が問題視

されている⁴⁾。また、チロシナーゼ阻害活性を持つアルブチン、グルタチオン、アスコルビン酸は、比較的安全ではあるものの、その活性が相対的に低く、化粧品向けの有用な美白素材にはなっていない。申請者は、過去に合成ペプチドTH10がチロシナーゼ阻害活性を有することを見出し、C末端のチロシン（Y）残基がこの阻害活性に必須であることを明らかにした⁵⁾。そこで、芳香族アミノ酸のカルボキシル基側のペプチド結合を切断するキモトリプシンで米糠タンパク質を消化した結果、消化産物中には多数のチロシナーゼ阻害成分が派生することを見出した。また、この酵素消化産物からチロシナーゼ阻害ペプチドCT-1, CT-2を単離同定した。これらは、それぞれ9残基もしくは6残基のペプチドであり、共通してC末端にチロシン残基を含む。一方で、これらのペプチドの阻害の強さ（IC₅₀）には大きな相違が確認され、阻害活性の発現には様々な要因を考慮する必要があることがわかった⁶⁾。

これらの背景を踏まえ、本研究では、チロシナーゼを阻害するペプチドのさらなる網羅的な単離・同定を行い、構造生物学的手法や阻害ペプチドの派生ペプチドを用いてチロシナーゼ阻害活性を与える構造要因を明らかにする。これらの結果と合わせて、ペプチドの一次構造とチロシナーゼ阻害活性との相関解析を行い、チロシナーゼ阻害ペプチドの高い活性の発現に必要な構造要因を明らかにする。

2. 実 験

2. 1. チロシナーゼ活性の測定

チロシナーゼの酵素活性は、L-チロシンまたはL-DOPAを基質として、チロシナーゼのモノフェノラーゼ反応またはジフェノラーゼ反応を波長475 nmにおける光吸収を測定することにより測定した。酵素阻害は、モノフェノラーゼ反応に対する各ペプチドの50%阻害濃度（IC₅₀）を求めることにより評価した。また、本研究においては、マッシュルーム由来のチロシナーゼ（Tyrosinase from *Agaricus bisporus*, AbTyr, Sigma）を使用した。AbTyrは真核生物のモデル系として、チロシナーゼ阻害試験に一般的に使用



Searching for the naturally derived peptides having a skin whitening effect and elucidation of its action mechanism

Akihito Ochiai

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

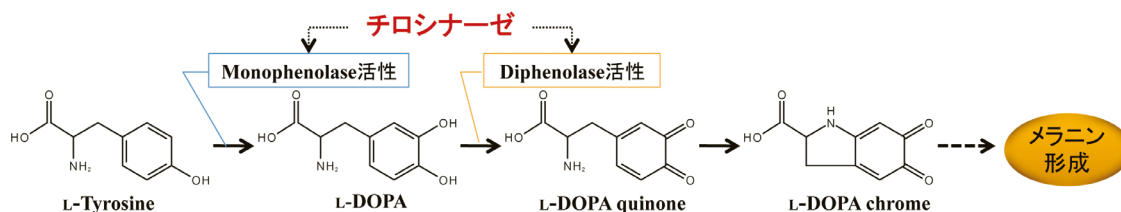


図1 ヒト細胞におけるメラニン形成機構

されている。

2. 2. 新規チロシナーゼ阻害ペプチドの単離と同定

新規のチロシナーゼ阻害ペプチドは、米糠タンパク質の酵素加水分解物から単離・同定した。

まず、3.0 gの米糠タンパク質 (RBP55, 築野食品工業株式会社) を秤量して超純水中に懸濁した。ホモジナイザーを用いて米糠タンパク質を均一に攪拌した後、透析により低分子物質を除去し、Trypsinと Chymotrypsinをそれぞれ60 mg加えて50℃, 6時間インキュベートすることにより加水分解反応を行った。得られた加水分解物から、チロシナーゼ阻害活性を有する画分を2種類のゲルろ過クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーを使用して分離し、均一なペプチド成分を単離した。単離したペプチドのMS/MSスペクトルをMALDI-TOF MS (Auto Flex-III, BRUKER DALTONICS) を用いた質量分析により収集し、Mascot プログラム (マトリクスサイエンス株式会社) を利用してイネゲノムデータベースと照合することによりその配列を同定した。

また、これらペプチドの派生ペプチドは、ペプチド合成装置 (PSSM-8, 島津株式会社) を用いてFmoc固相法により化学合成し、逆相クロマトグラフィーによって高純度化して使用した。

2. 3. B16 マウスメラノーマ細胞を用いたメラニン合成抑制試験

チロシナーゼ阻害ペプチドによるメラニン合成抑制試験はマウスB16メラノーマ細胞を使用して以下のように行った。5% FBSを含むE-MEM培地を用いて 1×10^4 cells/mLの培養細胞溶液を調製し、6wellマイクロプレートに1.5 mL/wellずつ分注して37℃, 5% CO₂ 雰囲気下で24時間培養した。その後、上清培地を各種濃度のペプチドを含む5% FBS含有E-MEM培地と交換し、さらに3日間培養した。培養後の細胞を0.25%トリプシンおよび1 N NaOHにより剥離・溶解させ、420 nmにおける吸光度を測定することにより細胞内に蓄積したメラニン量を定量した。

また、96 wellマイクロプレートにおいて、同様の条件にてペプチド処理および培養を行った。その後、生細胞測定キット (Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System,

タカラバイオ株式会社) を用いて生存細胞数を測定し、ペプチド添加後の3日目までに細胞増殖に与える影響を観察した。

2. 4. AbTyrの結晶化とX線回折実験

結晶化には高純度のタンパク質が必要であるため、AbTyrの市販品 (Sigma社) をゲルろ過クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを用いてさらに高純度化した。AbTyrとCT-2との複合体の結晶は、過去に報告されているAbTyrの結晶化条件⁷⁾を参考にして、9% PEG 4000, 0.1 M NaAc (pH 4.5), 5 mM HoCl, 1.56 mM CT-2を含む条件において、蒸気拡散法を用いて調製した。X線回折実験は、高エネルギー研究機構 (つくば市) の放射光を利用した。

2. 5. AbTyrとチロシナーゼ阻害ペプチドとのドッキングシミュレーション解析

AutoDock Vina (version 1. 5. 4) ソフトウェアを使用して、AbTyrと各チロシナーゼ阻害ペプチドとの結合をシミュレーション解析した。解析には短鎖ペプチドSWY, SWW, もしくはYWSを使用した。AbTyrの立体構造は既に報告されているものを使用した (PDB ID: 2y9w)⁷⁾。それぞれのシミュレーション解析において、AbTyrの活性中心を構成する3つのアミノ酸残基 (Asn-260, His-244, Glu-322) を柔軟性を持つ残基として指定し、グリッドマップサイズは $16 \times 18 \times 18$ 、グリッドセンターを $x=7, y=27, z=99$ に設定した。

3. 結果

3. 1. 新規チロシナーゼ阻害ペプチドの探索

米糠タンパク質加水分解物を2種類のゲルろ過クロマトグラフィーによって分離し、各画分のチロシナーゼ阻害活性を測定した。高い阻害活性を有するピーク画分を回収し、逆相クロマトグラフィーによってさらに精製を行った。得られた複数の主要ピークをそれぞれ分取し、同一のカラムを用いた再クロマトグラフィーによって、それぞれのピークに含まれるチロシナーゼ阻害ペプチドを単離した。質量分析とイネゲノムデータベースにおける照合検索を行い、2種類のチロシナーゼ阻害ペプチドCT-3, CT-4を同定し

た。CT-3およびCT-4は、それぞれ7残基と9残基のアミノ酸から構成されており、CT-3はC末端にチロシン残基を有している一方で、CT-4はチロシン残基を有していなかった。これらのペプチドを化学合成してチロシナーゼ阻害活性を測定した結果、CT-3は400 μ Mの濃度でモノフェノラーゼの活性を35%程度抑制することがわかった(図2)。この阻害活性は、過去に同定した阻害ペプチドCT-1と同等であった。一方で、CT-4はCT-1~CT-3のペプチドと比較してやや低い阻害活性(400 μ Mの濃度でモノフェノラーゼの活性を10%程度抑制)を示した(図2)。

阻害活性の強い3種類のペプチド(CT-1~CT-3)を使用

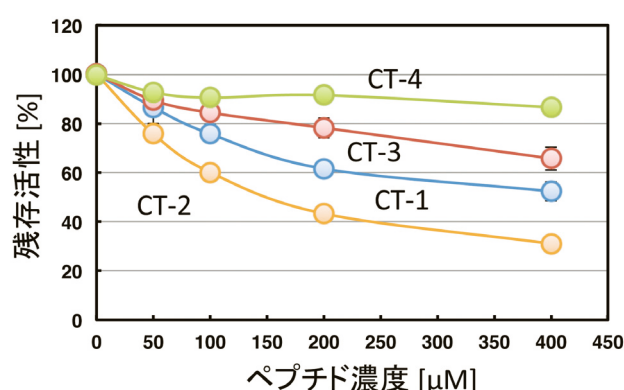


図2 米糠加水分解物から見出したチロシナーゼ阻害ペプチド

して、マウスB16メラノーマ細胞におけるメラニン合成抑制試験を行った(図3)。CT-1とCT-3では、むしろメラニン合成量を増大させる結果となった。一方で、最も強いチロシナーゼ活性阻害を示したCT-2は、0.5mMで60%程度のメラニン合成抑制効果を示した。既存のメラニン合成抑制剤であるアルブチンを濃度0.5mMで処理した場合は約70%程度の抑制効果を示すことから、CT-2はアルブチンと同等の効果が期待できると考えられた。また、これらのペプチドは全て、1mMの濃度範囲において全く細胞毒性を示さなかった。

3. 2. チロシナーゼ阻害活性に関わるペプチド中の各アミノ酸残基の役割の解明

強いチロシナーゼ阻害活性を示したCT-1~CT-3およびTH10は、その配列のC末端に共通してチロシン残基を有することがわかった。過去の研究においても、TH10のC末端チロシン残基がそのチロシナーゼ阻害活性に必須であることを明らかにしている。これらのペプチドは、L-チロシンのアナログ基質としてチロシナーゼの酵素反応を阻害していると推測された。そこで我々は、過去に報告されているチロシナーゼ阻害ペプチドのなかから、TH10の10残基の配列のうち7残基が一致し、かつ同等のチロシナーゼ阻害活性を示すペプチドP4⁸⁾に着目した(表1)。P4

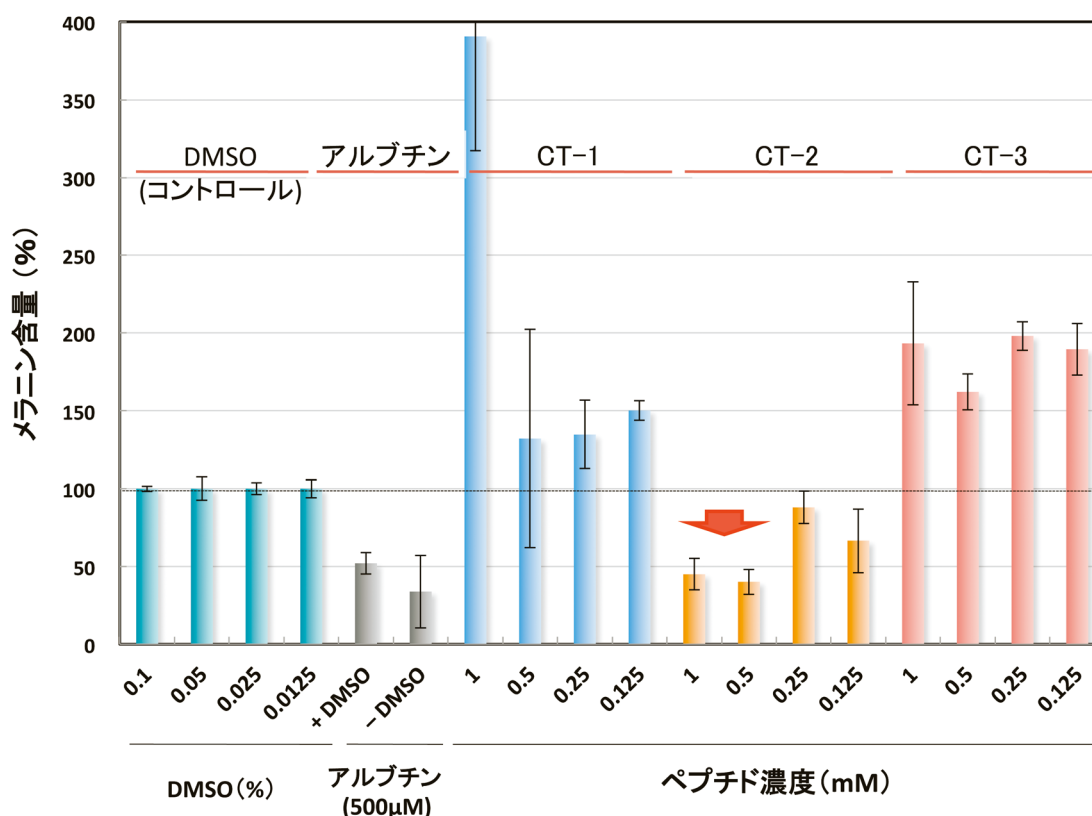


図3 マウス B16 メラノーマ細胞におけるメラニン形成抑制試験

とTH10は、配列中にそれぞれ3残基と1残基のチロシンを有している。これらのチロシン残基を中心に変異を導入し、合計12種類の派生ペプチドを設計して（表1）、配列と阻害活性との相関を解析した。

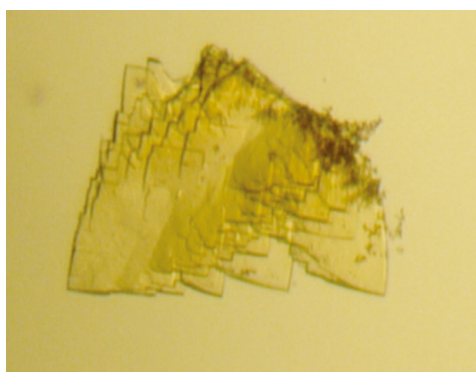
その結果、チロシン残基を欠失させた派生ペプチド（TH10-1, TH10-2, TH10-3）において完全にチロシナーゼ阻害活性が喪失したことから、チロシナーゼ阻害活性の発現にはチロシン残基が必須であることが立証された。興味深いことに、P4のC末端以外に配置されたチロシン残基の欠失（P4-1, P4-2, P4-3）は、その阻害活性に影響を及ぼさなかった。また、C末端のチロシン残基のみを欠失させた派生ペプチド（P4-4）においては完全に阻害活性が喪失したことから、C末端に配置されたチロシン残基のみがチロシナーゼの阻害に関与することが明らかになった。一方で、C末端から2番目に配置されたトリプトファン残基に変異を導入すると、その阻害活性は顕著に低下した。従って、チロシン残基周辺のアミノ酸配列も阻害活性の強弱に影響することが示唆された。

表1 TH10 および P4 と設計したそれらの派生ペプチドのチロシナーゼ阻害活性

ペプチド	アミノ酸配列	IC ₅₀ ^a
TH10	MRSRERSSWY	102 μM
P4	YRSRKYSWY	123 μM
TH10-1	MRSRERSSW ₋	₋ ^b
TH10-2	MRSRERSSW _F	₋ ^b
TH10-3	MRSRERSSW _W	₋ ^b
TH10-4	<u>Y</u> WSSRERSRM	₋ ^b
P4-1	<u>-</u> RSRKYSWY	123 μM
P4-2	<u>-</u> RSRK _R SSWY	133 μM
P4-3	YRSRK _R SSWY	122 μM
P4-4	YRSRKYSW ₋	₋ ^b
P4-5	YRSRK _R SSW ₋	₋ ^b
P4-6	<u>-</u> RSRKYSW ₋	₋ ^b
P4-7	<u>-</u> RSRKSSRY	400 μM
P4-8	<u>Y</u> WSRK _R SSW ₋	₋ ^b

^a チロシナーゼのモノフェノラーゼ活性に対する 50% 阻害濃度

^b 決定不能 (IC₅₀ > 400 μM)



3. 3. AbTyrの結晶化とX線回折実験

チロシナーゼ活性阻害に関わるペプチドの詳細な阻害機構を明らかにするため、X線結晶構造解析によりAbTyrとその阻害ペプチドとの複合体立体構造の解明を試みた。阻害ペプチドとして、CT-1, CT-2, CT-3, TH10, およびP4を使用した。1.56 mM のCT-2を含む9% PEG4000, 0.1 M NaAc (pH 4.5), 5 mM HoClの組成から成る結晶化条件において、AbTyr/CT-2複合体の結晶を得た（図4左）。得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構のPhoton Factoryの放射光を使用して回折実験を行った。その結果、最大分解能2.4 Å程度の回折像を得ることができた（図4右）。しかしながら、結晶の重なりが原因とみられる回折像の光量が特定の振り角において生じ、立体構造の決定には至らなかった。TH10およびP4との複合体結晶も得られたが、同様に構造決定には至らなかった。

3. 4. ドッキングシミュレーション解析を用いたAbTyrと阻害ペプチドとの結合様式の解明

前述の「3. 2.」の結果から、C末端に配置されたチロシン残基のみがチロシナーゼの阻害に関与することを明らかにした。AbTyrとその阻害ペプチドとの複合体立体構造の解析が不調に終わったため、シミュレーションソフトウェアAutoDock Vinaを用いてAbTyrと阻害ペプチドとの結合様式の解明を試みた。計算を容易にするため、TH10のC末端側3残基と一致するSWY、そのC末端のチロシン残基をトリプトファン残基に置換したSWW、およびSWYの配列を逆順に配列したYWSの3種類のペプチドを使用した。

シミュレーション解析を行った結果、3つの短鎖ペプチドはいずれもAbTyrの活性クレフトに結合していた。触媒残基および銅イオンが近接するBinding Pocket 1 (BP1)

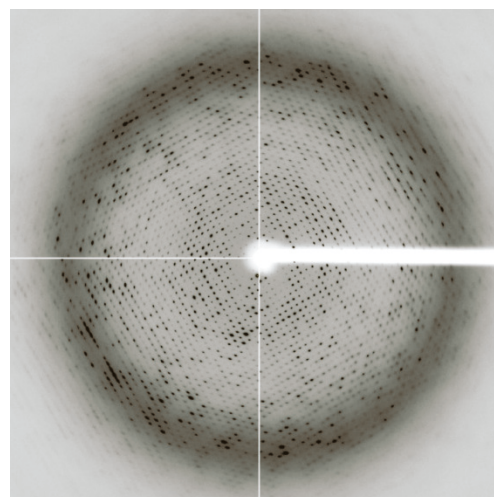


図4 調製したAbTyr/CT-2複合体の結晶(左)とX線回折像(右)

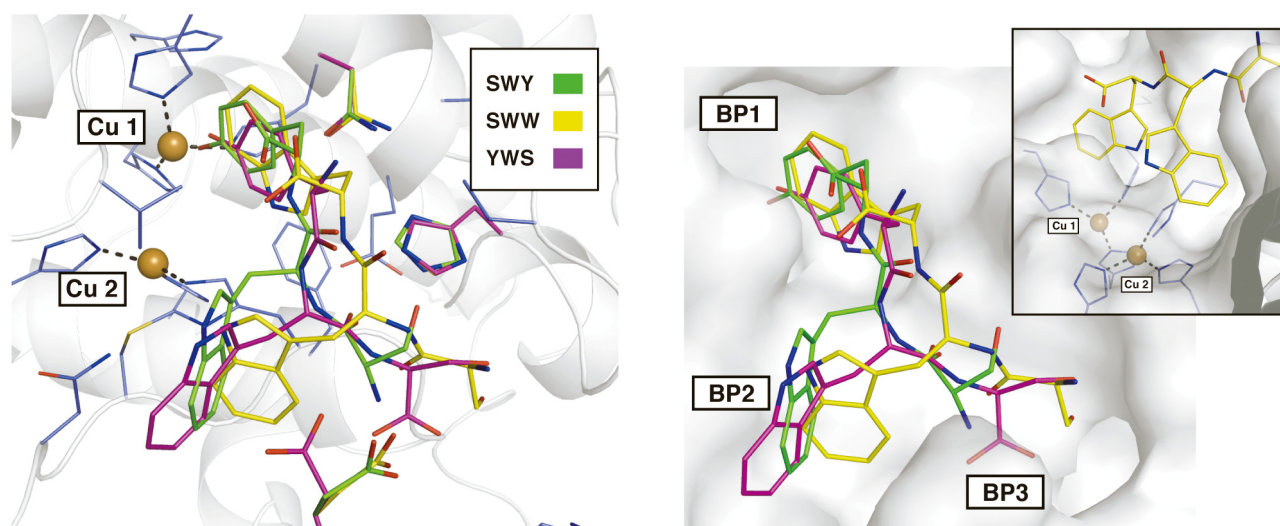


図5 AbTyrと3種類の短鎖ペプチドとの相互作用(左:リボンモデル, 右:分子表面モデル)

にはSWYのC末端チロシン残基、SWWのC末端トリプトファン残基、YWSのN末端チロシン残基がそれぞれ結合していた(図5左)。SWYペプチドのC末端チロシン残基はBP1に結合しており、TH10およびP4のC末端チロシン残基がAbTyrのアナログ基質として機能している可能性を強く支持した。また、SWW配列をもつTH10-2ペプチドはチロシナーゼ阻害活性を持たない(表1)。この理由は、SWWのC末端トリプトファン残基と触媒銅イオンとの間には6 Å程度の距離があることから(図5右)、基質(チロシン)の接近を妨げることができず、活性を抑えられないからと考えられる。また、YWS配列をもつTH10-4ペプチドもチロシナーゼ阻害活性を持たない(表1)。シミュレーション解析の結果は、YWSのN末端チロシン残基がBP1を塞ぐことが可能であることを示している。一方で、このチロシン残基にはN末端アミノ基が残っていることから図1に示す反応が進み、結果としてYWSペプチドからメラニン様物質が生成してしまう可能性を示した。

4. 考 察

本研究により、チロシナーゼ阻害活性を示す2種類の新規なペプチド(CT-3, CT-4)を見出した。それらの阻害活性は、過去に見出したCT-2ペプチドに比べてやや低く、それぞれ400 μMの濃度で35%, 10%程度の活性を阻害した。阻害活性の強いCT-1, CT-2, CT-3のペプチド配列を比較すると、共通してC末端にチロシン残基を有することがわかった。TH10と相同性の高いP4の配列をシャッフリングした派生ペプチドの阻害活性を解析することにより、C末端に配置されたチロシン残基の存在が阻害活性に重要であるという共通則を提示することができた。一方で、今回我々が見出したCT-4はその配列中にチロシン残基を有していないものの、弱い阻害活性を示した。チロシン残基

を介さないチロシナーゼ阻害機構が存在することを示した。

今回調製したAbTyrとCT-2の複合体結晶から2.4 Å分解能までのX線回折像を得ることができた。しかしながら、調製した結晶においては結晶性が極端に悪い格子面が存在し、各ペプチドとの複合体立体構造の決定には至らなかった。そこで、AutoDock Vinaソフトウェアを用いたシミュレーション解析によりAbTyrと阻害ペプチドとの結合様式の解明を試みた。解析の結果、ペプチド中のチロシン残基がAbTyrのアナログ基質として機能することにより、チロシナーゼ活性を阻害する可能性を示した。また、そのチロシン残基はペプチド中のC末端に配置される必要があり、同じ芳香族アミノ酸であるトリプトファン残基残基によって代替できないことを示した。

これらの結果は、C末端にチロシン残基をもつペプチドを網羅的にスクリーニングすることにより、高い阻害活性を有するチロシナーゼ阻害ペプチドを設計することが可能になることを示している。一方で、我々はC末端チロシン残基に隣接するアミノ酸残基もチロシナーゼ阻害活性の強弱に影響を与えることを明らかにした。より高い阻害活性を有するチロシナーゼ阻害ペプチドを設計するには、阻害機構のさらなる解明が必要であると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団よりご援助頂きましたことに深く感謝申し上げます。

(発表論文)

- 1) Ochiai A, Tanaka S, Imai Y, Yoshida H, Kanaoka T, Tanaka T, Taniguchi M.: New tyrosinase inhibitory decapeptide: Molecular insights into the role of

tyrosine residues, J. Biosci. Bioeng., 121, 607–613, 2016.

(引用文献)

- 1) Lynde CB, Kraft JN, Lynde CW.: Topical treatments for melasma and postinflammatory hyperpigmentation, *Skin Therapy Lett.*, 11, 1–6, 2006.
- 2) Sánchez-Ferrer Á, Neptuno Rodríguez-López J, García-Cánovas F, *et al.*: Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, 1247, 1–11, 1995.
- 3) Burton SG.: Oxidizing enzymes as biocatalysts, *Trends Biotechnol.* 21, 543–549, 2003.
- 4) Solano F, Briganti S, Picardo M, *et al.*: Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects, *Pigment Cell Res.*, 19, 550–571, 2006.
- 5) 吉田久志, 富谷倫之, 落合秋人, ほか2名: 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: 2011年度日本生物工学会大会要旨集, 148頁, 2011.
- 6) 落合 秋人, 田中 聖也, 吉田 久志, ほか2名: チロシナーゼ阻害作用を示す米糠タンパク質由来新規ペプチドの同定と機能解析: 2013年度日本農芸化学会大会プログラム集, 71頁, 2013.
- 7) Ismaya WT, Rozeboom HJ, Schurink M, *et al.*: Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of tyrosinase from the mushroom *Agaricus bisporus*, *Acta crystallogr.*, F67, 575–578, 2011.
- 8) Abu Ubeid A, Zhao L, Wang Y, *et al.*: Short-sequence oligopeptides with inhibitory activity against mushroom and human tyrosinase, *J. Invest. Dermatol.*, 129, 2242–2249, 2009.