

天然スキンケア原料としてのマイコスポリン様アミノ酸： 生産基盤開発と機能解明

名城大学理工学部

景山 伯春

Mycosporine-like amino acids (MAAs) are a group of water-soluble, low-molecular-weight secondary metabolites known as a natural biological sunscreen. Since it has been suggested that MAAs possessed multiple bioactivities for health and beauty, a universal production process of MAAs from biomass is an important subject. Here, we developed a broadly applicable and cost-effective method for the purification of MAAs from cyanobacterial cells. Because of their photoautotrophic property, the cyanobacteria, which are photosynthetic microorganisms, are of interest as a natural source of useful compound production. The purification method presented here was designed and developed by using a halotolerant cyanobacterium *Halothece* sp. PCC7418, which could produce a rare MAA, mycosporine-2-glycine (M2G). A three-step separation process using low pressure liquid chromatography yielded high-purity M2G. Moreover, the most common MAAs, shinorine (SHI) and porphyra-334 (P334) could also be successfully purified from commercialized sunscreen reagent Helioguard®365 by utilizing this method. The experimental parameters obtained in this study might allow for a scale-up of the MAA production process for future commercialisation. From the viewpoint of application as skin care ingredient, antioxidative activities of purified MAAs were evaluated by the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay. Inhibitory activities of these MAAs toward tyrosinase, which is known to be an enzyme involved in melanin biosynthesis, was also investigated.

1. 緒言

シアノバクテリアは光合成によって光エネルギーと二酸化炭素を様々な有機化合物に変換することができる。その光合成能、増殖力および遺伝子操作の容易さから、シアノバクテリアは有用物質の工業生産への応用が期待されている。本研究で着目するマイコスポリン様アミノ酸 (Mycosporine-like amino acid, MAA) は水溶性の二次代謝産物であり、シアノバクテリア、海洋性紅藻、サンゴや陸棲地衣類などの多様な生物において合成されることが知られている¹⁾。これまでに30種を超えるMAAが報告されており、これらの吸収極大は紫外線 (UV) 領域である268～362nmの範囲に存在する¹⁾。この特性を利用して、MAAはUV-A吸収剤Helioguard 365などとして既に製品化されている。Helioguard 365にはリポソーム化された紅藻由来のshinorine (SHI) およびporphyra-334 (P334) が含まれている。シアノバクテリアにおけるMAAの生理的な役割はまだ完全には明らかにされていないが、UV防御や細胞内の浸透圧調節を担うと考えられている²⁾。さらに、近年になってMAAの様々な生物学的活性が報告されている。例えば、耐塩性シアノバクテリアから単離したmycosporine-2-glycine (M2G) は、フリーラジカル消去

活性³⁾、酸化ストレスによる細胞死の抑制³⁾、コラゲナーゼ活性阻害^{4,5)}や蛋白質の糖化抑制⁵⁾といった活性を示すことが報告されている。図1にM2G、SHIおよびP334の分子構造を示す。

将来的に、さらなるMAAの機能評価を行う際には、高純度の標品が必須である。これまでに、シアノバクテリア細胞に存在するMAAについて、汎用性の高い抽出手法および同定方法の提案があった⁶⁾が、広範囲のシアノバクテリア種に適用可能な単離精製手法については報告されていなかった。そこで、本研究では株種に関わらずシアノバクテリアから効率よく高純度でMAAを獲得するためのプロセス開発を目指した。その結果、コストメリットの高い低圧クロマトグラフィーを適用し、耐塩性シアノバクテリアからM2Gを高純度で獲得する手法を確立した。この手法は、Helioguard 365に含まれるリポソーム化されたSHIおよびP334の単離精製にも適用可能だった。また、精製MAAを用いて皮膚のアンチエイジングに関わる生理活性である抗酸化活性およびチロシナーゼ阻害活性の評価を行った。

2. 方法

2.1. MAAの抽出

耐塩性シアノバクテリア *Halothece* sp. PCC7418 の培養液から細胞を回収し、適量のメタノールを加えた後に超音波処理を施すことで細胞を破砕した。遠心分離によって得られた上清をメタノール抽出液とした。メタノール抽出液を減圧遠心乾燥した後、乾燥物に純水を加えて溶解した。遠心分離によって不溶性物質を除いた後に得られた上清に対してクロロホルムを若干量加えた。懸濁後、遠心分離によって得られた上層 (水層) を回収した。クロロホルム



Mycosporine-like amino acids as natural skin care ingredients: Production development and investigation of biological functions

Hakuto Kageyama

Faculty of Science and Technology, Meijo University

中に色素が溶解するため、この操作を行うことで水層の色は濃緑色から無色に近くなる。続いて、限外ろ過によって3,000Da以上の溶解物を除き、これを低圧クロマトグラフィーに供するM2Gの抽出液とした。

SHIおよびP334については、Helioguard 365より抽出した。Helioguard 365はエイチ・ホルスタイン社より提供いただいたサンプルを用いた。まず、Helioguard 365を減圧遠心濃縮し、適量の純水と混合した。遠心分離によって不溶性物質を除いた後に得られた上清に対して、上清と等量程度のクロロホルムを加えた。懸濁後、遠心分離によって得られた上層(水層)を低圧クロマトグラフィーに供するSHIおよびP334の混合抽出液とした。

2.2. MAAの分離

2.2.1. 溶離液として1%酢酸水溶液を用いた逆相クロマトグラフィー

Cosmosil 40C₁₈-PREP(ナカライテスク社製)をポリカーボネート製の空カラム(18×300mm)に充填したカラムを用いた。溶離液として1%酢酸水溶液を使用して、流速3.0mL/minでMAA抽出液を分画した。各画分の吸光度(330nm)を分析し、MAAが含まれる画分を回収した後に凍結乾燥した。

2.2.2. 溶離液として0.1 M 酢酸アンモニウム水溶液を用いた逆相クロマトグラフィー

2.2.1.において凍結乾燥した試料を適量の0.1 M 酢酸アンモニウム水溶液に溶解し、2.2.1.と同様のカラムを用いて分離した。溶離液として1%酢酸水溶液を使用して、流速3.0mL/minで対象のMAAを分画した。各画分の吸光度(330nm)を分析し、MAAが含まれる画分を回収した後に凍結乾燥した。

2.2.3. ゲルろ過クロマトグラフィー

2.2.2.において凍結乾燥した試料を適量の純水に溶解し、ゲルろ過クロマトグラフィーに供した。Sephadex G-10(GEヘルスケア社製)をポリカーボネート製の空カラム(14×500mm)に充填したカラムを用いた。溶離液として純水を使用して、流速2.0mL/minでMAA抽出液を分画した。各画分の吸光度(330nm)を分析し、MAAが含ま

れる画分を回収した後に凍結乾燥したサンプルを最終精製物とした。

2.3. 精製MAAの同定

精製したMAAは、吸収スペクトル解析および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)解析によって標準物質と比較した。HPLC分析においては、ShimPack FC-ODS column(3μm; 150×4.6mm)をメインカラムとし、ガードカラムとしてShimPack FC-ODS column(3μm; 30×4.6mm)を接続した。カラムを35℃に保ち、移動相として1%酢酸水溶液を用いて流速0.4mL/minで分離した。検出波長は330nmとした。また、LC/MS解析によって各MAAの分子量を測定すると共に、AVANCE III HDによる核磁気共鳴(NMR)解析によってMAAの分子構造を確認した。

2.4. 精製MAAの抗酸化活性測定

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)法を利用した。ABTSをペルオキシ二硫酸カリウムと反応させて、ABTSラジカルカチオンを調製し、これをMAA試料と反応させた。MAAの抗酸化力によって消失したABTSラジカルカチオン量を吸光度(413nm)により定量し、陽性対照として用いたTroloxの抗酸化力と比較した。

2.5. 精製MAAのチロシナーゼ阻害活性測定

メラニン生成における中間体物質のL-DOPAを基質として用い、マッシュルーム由来のチロシナーゼの触媒作用によって酸化されたDOPAキノンを経て生成したDOPAクローム量を吸光度(492nm)により定量した。陽性対照としてコウジ酸を使用し、MAAのチロシナーゼ阻害活性を評価した。

3. 結果

3.1. M2Gの単離

本研究で確立した手法を用いることで、湿重量1.0gの*Halotheca* sp. PCC7418細胞あたり87~140μgの精製M2Gが得られた。HPLC分析におけるM2Gのピーク面積

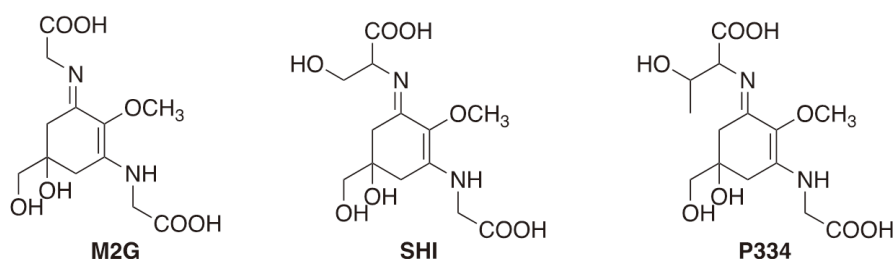


図1 本研究において用いたMAAの分子構造M2G、SHIおよびP334の分子構造を示す。

は99.8%以上となった(図2)。また、¹Hおよび¹³C NMRスペクトル解析によっても精製M2Gが高純度であることが示された。

3. 1. 1. M2Gの各抽出処理

まずメタノール抽出液の吸収スペクトルを確認したところ、330nm付近にM2Gと推定される吸収極大が検出された(図3A)。また、クロロフィルやカロテノイドなどの光合成色素類の吸収極大が400~700nmの範囲に検出された(図3A)。次に、抽出物を乾燥させて純水に溶解させた後に得られた上清では400nm以上の吸光が著しく低下しており、色素類化合物の大半が除去されていることが分かった(図3B)。さらにクロロホルムを添加した後に得られた上層(図3C)では、400nm以上の波長の吸収はほとんど検出されなくなった。一方、限外ろ過処理をした試料では、処理前と比較して吸収スペクトルに顕著な違いは見出せなかった(図3D)。

3. 1. 2. 低圧液体クロマトグラフィーによるM2Gの精製

1%酢酸水溶液を用いた逆相モードによる一段階目の精製処理では、260nm付近の大きな吸収極大が残存した(図3E)。その吸収波長から、核酸系の不純物が混入していると推定された。その後、溶離液として0.1M酢酸アンモニウム水溶液を用いた逆相モードによって処理することで、これらの不純物とM2Gを分離することができた(図3F)。最後にゲルろ過クロマトグラフィーによって溶解液を純水に置換して最終産物を得た(図3G)。

3. 2. SHIおよびP334の単離

本研究で確立した手法を用いることで、上述したM2Gと同レベルの純度でSHIおよびP334を精製することができた。1.0mLのHelioguard 365からそれぞれ110μg(SHI)および160μg(P334)を取得することができた。

3. 3. 精製MAAの抗酸化活性

本研究で精製したMAAを用いてABTSラジカルカチオンの消去能を調査したところ、IC₅₀値はそれぞれ40μM(M2G)、94μM(SHI)および133μM(P334)と求められた。一方で、陽性対照であるTroloxのIC₅₀値は10μMだった。これらの結果から、本研究で確立した手法で精製したMAAが抗酸化活性を保持しているが明らかになった。

3. 4. 精製MAAのチロシナーゼ阻害活性

精製MAAを用いてチロシナーゼ活性への阻害効果を調査したところ、最終濃度6.4mM(M2G)、8.4mM(SHI)および7.5mM(P334)で各MAAをアッセイ系に添加しても阻害活性は検出できなかった。一方で、陽性対照のコウジ酸は60μMでチロシナーゼ活性を50%以下まで低下させた。これらの結果から、今回の調査に用いたMAAはチ

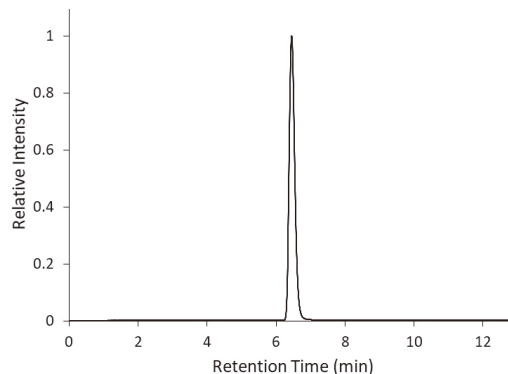


図2 最終M2G精製産物のHPLCクロマトグラム
M2Gのピーク強度を1.0とした相対値を用いたクロマトグラムを示す。

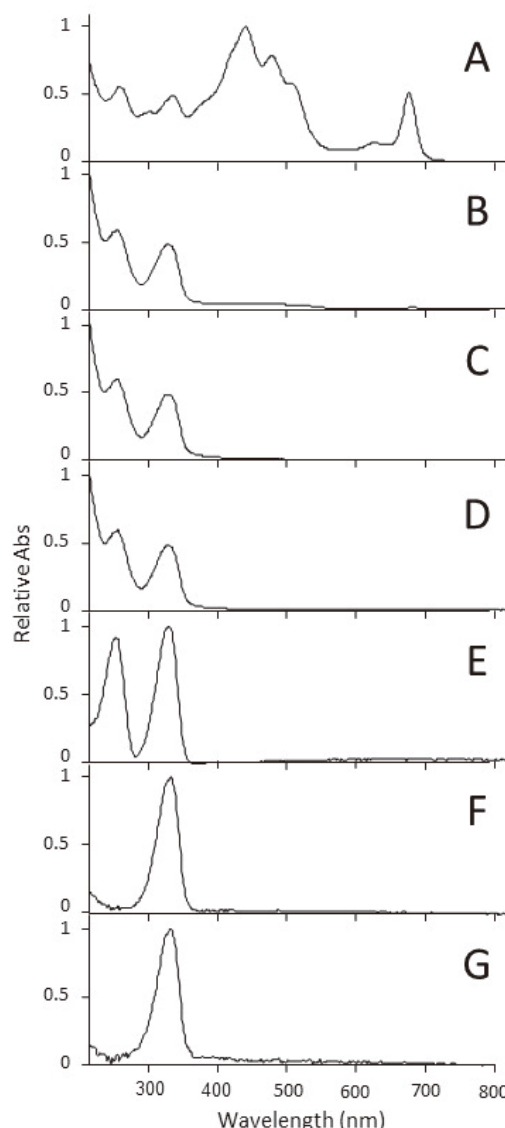


図3 M2Gの各抽出および精製ステップにおける試料の吸収スペクトル
各パネルはそれぞれ A: メタノール抽出液、B: メタノール抽出液の乾燥物を水に溶解した後の上清、C: クロロホルム処理後の上清、D: 限外ろ過後の試料、E: 一段階目の逆相分離後の試料、F: 二段階目の逆相分離後の試料、G: ゲルろ過分離後の試料を示す。スペクトルは、220~800nmの範囲で最も吸光度の大きい値を1.0とした相対値で示してある。

ロシナーゼ阻害活性を有しないことが示唆された。

4. 考 察

本研究で提案した精製手法は、MAAの抽出液を二段階の逆相クロマトグラフィーに供すものである。逆相クロマトグラフィーはその分離特性、理論段数および再現性の高さから広く物質の分取精製に用いられている。しかしながら、分取カラムおよび分取HPLCシステムはスケールが大きくなる程に高価となるため、より低コストの手法が望ましい。本研究においては、コストメリットの大きい粒子径40 μm の汎用型オクタデシルシリル担体をポリカーボネート製カラムに充填し、低圧システムによって分離操作を行うこととした。酸性溶離液(1%酢酸水溶液)および中性溶離液(0.1M酢酸アンモニウム水溶液)を用いた二段階の分離処理により、不純物を効率よく除去することができた(図3)。同一のカラムを用いた二段階の処理は、低コスト化に貢献できると考えられる。逆相分離に続いて行うゲルろ過クロマトグラフィーにおいては溶離液として純水を用いており、凍結乾燥した最終産物には溶離液に由来する化合物は含まれない。それ故に、本手法によって精製したMAAは多様な評価試験に適用可能である。

本研究では精製したM2G、SHIおよびP334を用いて抗酸化活性をABTS法によって評価し、テストしたMAA全てが活性を示すことを明らかにした。一方で、メラニン合成に関与する酵素であるチロシナーゼに対する阻害活性は検出されなかった。しかしながら、皮膚の弾力性やハリを保つコラーゲンを分解するコラゲナーゼの阻害活性を有することが既に分かっているなど^{4,5)}、スキンアンチエイジング剤応用へのMAAの期待は大きい。今後も、関連する物性の評価を行い、ネガティブな結果を含めて知見を積み上げることが重要である。

本研究助成により得られた成果

- 1) Ngoennet, S.; Nishikawa, Y.; Hibino, T.; Waditee-Sirisattha, R.; Kageyama, H. A method for isolation and characterization of mycosporine-like amino acids from cyanobacteria. *Methods and Protoc.* 1, 46. 2018.
- 2) Kageyama, H.; Waditee-Sirisattha, R. Antioxidative, anti-inflammatory, and anti-aging properties of mycosporine-like amino acids: Molecular and cellular mechanisms in the protection of skin-aging. *Mar Drugs* 17, 222. 2019.
- 3) Patipong, T.; Hibino, T.; Waditee-Sirisattha, R.; Kageyama, H. induction of antioxidative activity and antioxidant molecules in the halotolerant cyanobacterium *Halotheca* sp. PCC7418 by temperature shift. *Nat Prod Commun.* 14, 1-6. 2019.

- 4) Waditee-Sirisattha, R.; Honda, M.; Hibino, T.; Kageyama, H. Potential inhibitory effects of plant and cyanobacteria-derived natural products on advanced glycation end-product formation. In *A Closer Look at Glycation: A Potential Hotspot for Age-Related Complication and Diseases*; Ansari, N.A., Ed.; Nova Science publishers, Inc.: Hauppauge, NY, USA, 2021; pp. 201-224.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団(旧公益財団法人コスメトロジー研究振興財団)よりご助成いただきましたことに心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Wada, N.; Sakamoto, T.; Matsugo, S. Mycosporine-like amino acids and their derivatives as natural antioxidants. *Antioxidant* 4, 603-646. 2015.
- 2) Kageyama, H.; Waditee-Sirisattha, R. Mycosporine-like amino acids as multifunctional secondary metabolites in cyanobacteria: From biochemical to application aspects. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 59, 153-194. 2018.
- 3) Cheewinthamrongrod, V.; Kageyama, H.; Palaga, T.; Takabe, T.; Waditee-Sirisattha, R. DNA damage protecting and free radical scavenging properties of mycosporine-2-glycine from the Dead Sea cyanobacterium in A375 human melanoma cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B* 164, 289-295. 2016.
- 4) Hartmann, A.; Gostner, J.; Fuchs, J.E.; Chaita, E.; Aligiannis, N.; Skaltsounis, L.; Ganzera, M. Inhibition of collagenase by mycosporine-like amino acids from marine sources. *Planta Med.* 81, 813-820. 2015.
- 5) Tarasuntisk, S.; Patipong, T.; Hibino, Y.; Waditee-Sirisattha, R.; Kageyama, H. Inhibitory effects of mycosporine-2-glycine isolated from a halotolerant cyanobacterium on protein glycation and collagenase activity. *Lett. Appl. Microbiol.* 67, 314-320. 2018.
- 6) Volkmann, M.; Gorbushina, A.A. A broadly applicable method for extraction and characterization of mycosporines and mycosporine-like amino acids of terrestrial, marine and freshwater origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 286-295. 2006.