

# 食用きのこ成分のメラノーマ細胞活性に及ぼす影響

東京海洋大学大学院 海洋科学技術研究科 食品生産科学科部門

長 阪 玲 子

Commercial mushrooms processing can produce about 100 kg of trimmings waste in Japan daily. Make use of such materials for applications could alleviate concerns on agricultural waste disposal. We already revealed that edible mushroom (*Flammulina velutipes*) extract inhibited melanosis in commercially raw fish, shellfish, and meat. We conducted to find the whitening activity compounds in edible mushrooms used for skin-whitening purpose and considered their mechanisms in melanin biosynthesis. In humans, skin pigmentation results from the synthesis and distribution of melanin, besides tyrosinase is a key enzyme for melanin biosynthesis. These days many cosmetics of skin-whitening are popular among women. This study demonstrated that melanin synthesis and tyrosinase content of B16/BL6 melanoma cells suppressed by mushroom extract. These results suggested that mushroom extract could be considered an alternative therapeutic agent for treating hyperpigmentation and an effective component in whitening cosmetics.

## 1. 緒 言

我が国の食用きのこ生産量は約48万トンであり、平成20年の林業総産出額4,449億円の内2,324億円、52.5%を占めている。中でもエノキタケは古くから食習慣がある上、年間10数トン規模の生産があり、安価で大量に手に入れることが出来る。これまでに共同研究者である大島らによって、エノキタケを始めとする食用きのこにおいて子実体や菌糸体並びに廃棄菌床中に抗酸化性を持つ成分が多く含まれることを見出した。この成分は抗酸化成分として知られるビタミンEの約7,000倍の抗酸化能を有することを明らかにした。また、エノキタケなど数種の食用キノコ可食部およびその栽培に用いられる水溶性抽出物は、抗酸化物質やポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 前駆体のタンパク質発現抑制作用をもち、この作用によってカニやエビなどの褐変防止作用を発揮することが明らかになっている<sup>1-3)</sup>。

PPO活性の抑制はメラニン色素の生産を抑制することが知られ、PPO活性阻害作用を有する化粧品は美白作用を有する。また、メラニン原因症予防治療剤としても有効であることが知られている。従来から市場にある美白化粧品の多くは、表皮メラニン細胞においてメラニンの生成に働くPPOの活性を阻害するなどの働きを持つ。PPO阻害活性のある物質としては、コウジ酸<sup>4)</sup>やアルブチン<sup>5)</sup>がよく知られている。このほかにも、トウモロコシふすま<sup>6)</sup>や小麦ふすま<sup>7)</sup>の成分にチロシナーゼ阻害活性、B16メラノ

ーマ細胞でのメラニン生成阻害活性が報告されている。また、バナナ種子から分離された成分によるB16メラノーマ細胞でのメラニン生成阻害活性も報告されている<sup>8)</sup>。このように近年食物由来のPPO活性抑制作用を持つ成分について注目が集まっており、国内だけでなく海外においても安全な成分による美白作用のある化粧品が切望されると言える。しかし、PPO活性抑制作用を持つ物質は高価なものが多く、それ故に美白作用のある化粧品は比較的高価な傾向にある。

図1に示すように生体内のメラニンの生成は、血中から供給されたチロシンがPPOによって酸化されることから始まる(図1)。チロシンは酸化されL-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) となり、さらにDOPAキノンへと代謝される。PPOの一種の酵素であるチロシナーゼは

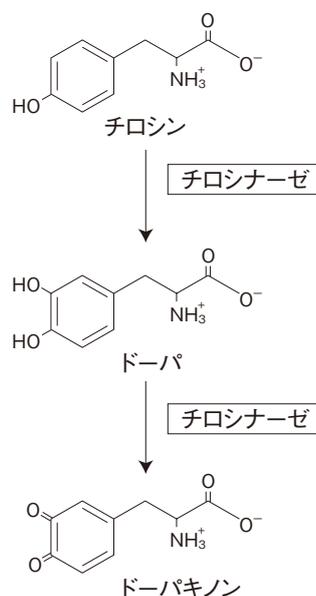


図1



Effect of edible mushroom on melanoma cells

Reiko Nagasaka

Food Chemistry and Functional Nutrition,  
Department of Food Science and  
Technology, Graduate School of Marine  
Science and Technology

この2つの反応を触媒する酵素である。DOPAキノンはその後自動的に酸化しユーメラニンやフェオメラニンが合成される。これらが代謝される時に活性酸素種が生成されるが、キノコ抽出物に抗酸化性があることから、キノコ抽出物中がこの代謝経路そのものを制御する可能性がある。したがってキノコ抽出物のメラニン産生への抑制効果およびそのメカニズムを検討することとした。特に、エノキタケ子実体抽出液がPPO活性抑制効果やPPOの前駆タンパク質の発現抑制効果を持つことから、メラニン産生に与える影響を検討することで、将来的に美白化粧品といった製品への応用のための知見を蓄積することを目的とした。本研究によりエノキタケ抽出物による美白作用およびそのメカニズムを明らかにし、安価でより効果的な安全性の高い美白化粧品の開発を目指した。

## 2. 実験

### 2.1 B16/BL6 マウスメラノーマ細胞の細胞活性に及ぼす食用キノコ抽出成分の影響

#### 2.1.1 エノキタケ抽出物の調製

細胞活性に及ぼす影響を検討するために、まずエノキタケ抽出物の調製を行った。エノキタケの部位による差異を検討するために、食用で用いられる子実体部分、廃菌床部分それぞれについて検討した。エノキタケ100gに蒸留水200gを加え、90℃にて30分間熱した後、4℃、5000rpmの条件下で15分間遠心分離を行った。得られた上清に蒸留水を加え、それぞれ1mlあたりエノキタケ500mg含有するように調製した。

#### 2.1.2 細胞毒性試験

96wellマイクロプレートにB16/BL6マウスメラノーマ細胞を $2.5 \times 10^3$  cell/wellになるよう播種し、インキュベート後、2.1.1で調製したそれぞれの抽出物を種々の濃度になるよう培地に添加した。72時間培養後、Cell Counting Kit-8 (CCK-8; 同仁化学研究所)を用いて細胞増殖測定を行った。具体的にはCCK-8溶液を各ウェルに10 $\mu$ lずつ添加後、2時間インキュベートし呈色反応を行った。マイクロプレートリーダーで450nmの吸光度を測定し、得られた数値により各抽出物の細胞増殖への影響について評価した。また同時に細胞形態を観察した。

### 2.2 B16/BL6 マウスメラノーマ細胞のメラニン産生量に及ぼす食用キノコ抽出成分の影響

24wellマイクロプレートにB16/BL6マウスメラノーマ細胞を播種し、インキュベート後、2.1.1で調製した子実体抽出液を終濃度エノキタケ湿潤重量0, 12.5, 25, 50 (mg/ml)となるよう培地に添加し24時間培養後、アルカリ条件下でメラニンを抽出した。

### 2.3 食用キノコ抽出成分がB16/BL6 マウスメラノーマ細胞のチロシナーゼ活性に及ぼす影響

#### 2.3.1 分光光度計を用いた評価

チロシナーゼは、チロシンとDOPAを基質にすることが分かっているが、本研究ではL-DOPAを基質とし、チロシナーゼDOPAオキシダーゼとしての活性を調べた。2.2と同様の条件でB16/BL6マウスメラノーマ細胞を培養した。細胞を集めた後1% Triton-X100および1mM PMSFを加えて4℃で30分インキュベートしたのちホモジナイズし、遠心分離により上清を得た。酵素試料として用いる上清のタンパク定量をLowry法<sup>9)</sup>を用いて行った。5mMのL-DOPA溶液にタンパク量として100 $\mu$ gの酵素試料を加え、37℃で60分インキュベートしたのち、分光光度計をもちいて492nmの吸光度を測定した。

#### 2.3.2 酵素電気泳動法による評価

酵素電気泳動法によりチロシナーゼ活性を測定した。具体的には前述の酵素試料を10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、5mMのL-DOPAにより染色し、37℃で15分間インキュベートを行った。得られたバンドをImage J (National Institute of Health)にて取り込み、数値化した。

#### 2.3.3 ウェスタンブロッティングによる評価

2.3.2同様10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で酵素試料を分離したのち、セミドライブロッティング装置を用いてメンブレン (MILLPORE Immobilon P<sup>®</sup>)に転写した。メンブレンは3%BSA溶液でブロッキングを行い、60分のインキュベート後0.5%のTween20を含んだTBSで洗浄した。1次抗体はTyrosinase (H-109): sc-15341 (SANTA CRUZ Biotechnology, INC.)を用いた。2次抗体はAnti-IgG (H+L), Rabbit, Alexa680を用い、Odyssey (LI-COR)で目的タンパク質の検出を行った。

## 3. 結果

### 3.1 B16/BL6 マウスメラノーマ細胞の細胞活性に及ぼす食用キノコ抽出成分の影響

エノキタケ子実体部分抽出物、廃菌床部分抽出物それぞれのB16/BL6マウスメラノーマ細胞に対する細胞毒性試験を行った。その結果、子実体部分抽出物では若干の細胞数の増減はみられるものの(図2)、細胞に対する毒性はほぼ見られなかった。しかし、図3に示すように、廃菌床部分抽出物において、高濃度で有意に細胞増殖が抑えられた。また、子実体部分抽出物の投与による細胞形態への影響は見られなかったが、廃菌床部分抽出物の投与により細胞が膨らみ、先端が枝状になるなど細胞形態が変化した。

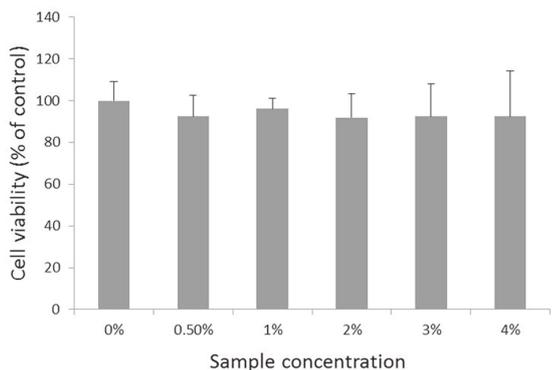


図2 エノキタケ子実体部分における細胞毒性試験

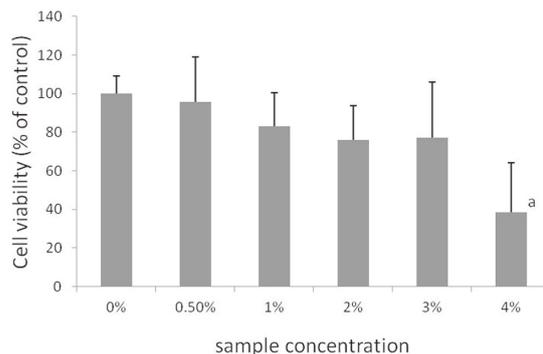
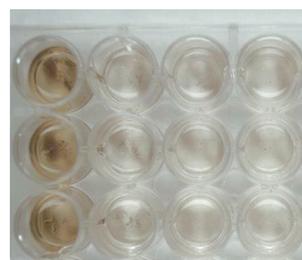


図3 エノキタケ廃菌床部分における細胞毒性試験

### 3.2 B16/BL6 マウスメラノーマ細胞のメラニン産生量に及ぼす食用キノコ抽出成分の影響

B16/BL6マウスメラノーマ細胞に子実体部分抽出物を異なる濃度で投与した際の細胞の様子を図4に示す。また、メラニン産生量を図5に示す。図5に示した通り、メラニン産生量は子実体部分抽出物の濃度依存的に減少した。



0 12.5 25 50  
Enokitake wet weight (mg/ml)

図4 B16/BL6 マウスメラノーマ細胞にエノキタケ子実体部分抽出物を種々の濃度で投与した際の細胞の様子

### 3.3 食用キノコ抽出成分が B16/BL6 マウスメラノーマ細胞のチロシナーゼ活性に及ぼす影響

#### 3.3.1 分光光度計を用いた評価

L-DOPAを基質としたときのB16/BL6マウスメラノーマ細胞のチロシナーゼ活性を測定した結果を図6に示した。図6に示す通り、子実体部分抽出物の濃度に依存してチロシナーゼ活性が低下したことが分かった。

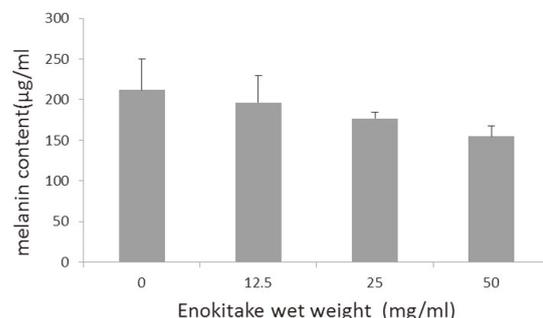


図5 B16/BL6 マウスメラノーマ細胞にエノキタケ子実体部分抽出物を種々の濃度で投与した際のメラニン産生量

#### 3.3.2 酵素電気泳動法による評価

酵素電気泳動法により、B16/BL6マウスメラノーマ細胞におけるチロシナーゼ活性を調べたところ、3.3.1同様に子実体部分抽出物の投与によりチロシナーゼ活性が低下することが明らかになった(図7)。Image Jにて得られたバンドを数値化したところ、子実体部分抽出物の濃度に依存してチロシナーゼ活性が有意に抑制されることが明らかになった(図8)。

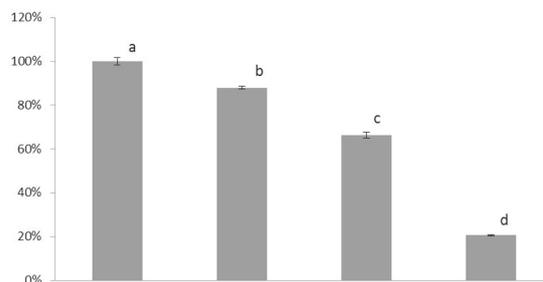


図6 L-DOPAを基質としたB16/BL6マウスメラノーマ細胞のチロシナーゼ活性

#### 3.3.3 ウェスタンブロッティングによる評価

チロシナーゼタンパク発現量を測定したところ、チロシナーゼ発現量は有意ではなかったものの、子実体抽出物の濃度に依存して減少する傾向が見られた。

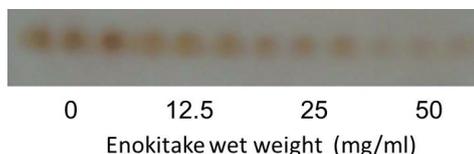


図7 酵素電気泳動法による、子実体抽出物のB16/BL6マウスメラノーマ細胞におけるチロシナーゼ活性への影響

## 4. 考察

美白は女性にとって最も興味のある美容だというだけでなく、近年のオゾン濃度の低下による紫外線照射量の増加による皮膚がんのリスク問題にとっても重要な役割を示すと言える。紫外線から守る働きを持つ褐色色素のメラニンであるが、過剰なメラニン色素の沈着は肌の老化を促進し、

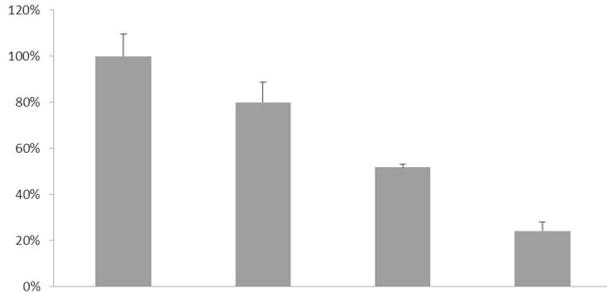


図8 酵素電気泳動法による、子実体抽出物のB16/BL6 マウスメラノーマ細胞におけるチロシナーゼ活性

過剰紫外線による細胞の損傷は皮膚がんの主因ともなっている。本研究では食用キノコ抽出物にメラニン産生を抑える働きがあり、さらにB16/BL6マウスメラノーマ細胞のチロシナーゼ活性を抑制する効果があることを明らかにした。

エノキタケ子実体部分抽出物は細胞毒性がない(図2)が、図3に示すようにエノキタケ廃菌床部分には高濃度帯で細胞毒性が見られた。また細胞形態の観察からも廃菌床部分抽出物には細胞毒性がある可能性が示唆された。したがってエノキタケ廃菌床部分は直接肌に塗布する可能性のある化粧品への展開は適していないと考えられる。しかし、エノキタケ廃菌床部分も多くの廃棄物となりうることから、エノキタケ廃菌床部分の有効利用は今後の課題であるともいえる。今後はエノキタケ廃菌床部分の効果的な利用も展望に入れて研究を進める必要がある。

また、子実体部分抽出物においてメラニン産生抑制作用があることが明らかになった。エノキタケにはPPO活性抑制作用があることを明らかにしていることから、エノキタケ中の成分がPPO活性を阻害し、その結果としてメラニン産生を抑制したと考えられる。また、皮膚における色素沈着の原因となるメラニン色素の合成は紫外線やストレスといった様々な刺激により促進されるといわれている。活性酸素がメラニン産生を促進することが知られていることから、子実体抽出部分におけるメラニン産生抑制効果はエノキタケのもつ抗酸化成分による可能性がある。今後は抗酸化評価試験などと組み合わせてメラニン産生抑制効果の詳細なメカニズムについて検討する必要がある。

チロシナーゼ活性についてはタンパク質発現量で有意な差異は見られなかったものの、L-DOPAを基質とした酵素活性および酵素電気泳動法での検討では子実体抽出部分によってチロシナーゼ活性が有意に低下することが明らかになった。今後はメラニン産生抑制およびチロシナーゼ活性に対するエノキタケ子実体抽出部分の作用機序の詳細な解析とともにPPO前駆タンパク質抑制効果などと併せて作用機序を検討していく予定である。

本研究はPPO抑制作用を食品であるキノコ抽出物から見出すものであり、さらなる検討により美白作用やそのメカニズムが解明され、安全・安心な化粧品が提供できる可能性が広がっていくだろう。美白効果のある安全な化粧品を安価で提供出来ることは、美しく豊かな人間生活の実現に寄与することが出来ると期待している。美容だけでなく、本研究成果により皮膚がんのリスクを減少させることは我が国の保健衛生の向上に貢献できると考えられる。

#### (引用文献)

- 1) Encarnacion AB, Fagutao F, Hirayama J, et al. Edible Mushroom (*Flammulina velutipes*) Extract Inhibits Melanosis in Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). J. Food Sci., 76(1), C52-C58, 2011.
- 2) Bao HND, Ochiai Y, Ohshima T, Antioxidative activities of hydrophilic extract prepared from solid waste medium of mushroom (*Flammulina velutipes*) cultivation. Biores. Technol., 101, 6248-6255, 2010.
- 3) Jang MS, Sanada A, Ushio H, et al. Inhibitory effects of Enokitake mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning. LWT-Food Sci. Technol., 35:697-709, 2002.
- 4) Montero P, Lopez-Caballero ME, Perez-Mateos M. The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). J. Food Sci., 66, 1201-1206, 2001.
- 5) Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, et al. Syntheses of arbutin- $\alpha$ -glycosides and a comparison of their inhibitory effects with those of *a*-arbutin and arbutin on human tyrosinase, Chem. Pharm. Bull. 51, 798-801, 2003.
- 6) Choi SP, Kang MY, Koh HJ, et al. Antiallergic activities of pigmented rice bran extracts in cell assays. J. Food Sci. 72, S719-S726, 2007.
- 7) 樋口誠一, 高橋学, 山路明俊, 小麦由来機能性成分の新規利用技術の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, 5, 71-75, 2007.
- 8) Roh JS, Han JY, Kim JH, et al. Inhibitory Effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius L.*) seeds for melanogenesis. Biol. Pharma. Bull. 27, 1976-1978, 2004.
- 9) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.