

# 天然物特異的モノクローナル抗体を用いた 甘草エキス成分の作用機構に関する研究

長崎国際大学薬学部薬品資源学研究室

宇都 拓洋

Licorice (*Glycyrrhiza* spp.) is the most important ingredient for the Japanese Kampo medicine and the traditional Chinese medicine, and has been reported to show various pharmaceutical functions. Liquiritin (LQ) and its aglycon liquiritigenin (LQG) are major licorice flavonoids classified as a phloroglucinol. Our screening of components of licorice extract revealed that LQ and LQG activate melanin synthesis in melanoma cells. In this study, we elucidated the molecular mechanism of melanin synthesis activated by LQ and LQG. In addition, we investigated the intracellular accumulation and target protein of LQ and LQG using anti-LQ/LQG monoclonal antibody (anti-LQ/LQG mAb). LQ and LQG activated melanin synthesis in mouse (B16-F1 and B16-4A5) and human (HMV-II) melanoma cell lines. LQ and LQG enhanced the expression of tyrosinase (Tyr), TRP-1, and TRP-2. Molecular analysis suggests that LQ and LQG activate the p38 and PKA signaling pathways leading to the MITF expression. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-LQ/LQG mAb indicated that LQ and LQG cannot be detected in cellular lysate, and Western blotting using anti-LQ/LQG mAb as the primary antibody demonstrated that LQ binds to an approximately 35-38 kDa protein. These results suggest that LQ and LQG enhance melanin synthesis via the activation of p38 and PKA signaling pathways by binding to an approximately 35-38 kDa protein.

## 1. 緒言

メラニンメラノサイトより合成され、紫外線や活性酸素種の刺激から皮膚を保護する役割を持つとともに、メラニン合成の減少が白髪や白斑の原因になることが知られている<sup>1,2)</sup>。メラニンは、メラノサイト内のメラノソームにおいてL-チロシンを出発物質として生合成されており、一連の合成反応は、チロシナーゼ (Tyr)、Tyrosinase-related Protein-1 (TRP-1) および TRP-2 により調節されている<sup>3)</sup>。またこれらメラニン合成因子の発現は、Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF) がプロモーター領域のM-boxに結合することで誘導され、MITFの活性化は複雑なシグナル伝達系により制御されている<sup>4,5)</sup>。これまでメラニン合成を抑制する天然化合物の探索およびその作用機序解明に関する報告は数多いが、メラニン合成を誘導する天然化合物に関する報告は少なく、メラニン合成を促進することで皮膚がんや白髪予防、白斑治療などが期待されることから、これらの研究が望まれている。

甘草は全漢方処方約7割に配合される重要な生薬で、抗炎症、抗アレルギー、抗潰瘍など多くの薬効が知られている<sup>6)</sup>。また甘草は、味噌や醤油などに甘味料と用いら

る他、健康食品にも利用されている。さらに最近では、甘草エキスや甘草フラボノイドが配合されている化粧品、育毛剤、染毛剤などが多く市販され、甘草の持つ美容効果への関心が高まっており、甘草エキス成分の機能解析や作用機序に関する科学的エビデンスが求められている。

我々は、これまでに約30種類の活性天然物に対する特異的モノクローナル抗体 (mAb) の作製に成功しており、それらを用いたアッセイ系の開発を中心に研究を行ってきた<sup>7-10)</sup>。さらに、これら抗天然化合物特異的mAbをツールとして、高感度ELISAやドットプロットによる生薬成分定量法の開発、免疫染色による植物組織中の活性成分局在分布解明、主有効成分のみをアフィニティーカラムで除去し、主要成分除去エキスを用いた生薬成分の相乗効果解明などの応用研究を展開してきた<sup>11-12)</sup>。そこで本研究は、甘草エキス成分に対する特異的mAbを作製し、細胞内での挙動や分子標的を解明し、甘草エキスのメラニン合成制御機構に関する新たな知見を見出すことを目的とした。

甘草成分の解析は国内外で盛んに行われてきており、約500種の成分がこれまでに同定されている。主要生理活性成分はグリチルリチン (GC) であることが知られているが、フラボノイド類 (甘草フラボノイド) をはじめとするGC以外の成分も、抗炎症、抗がん、抗菌作用など多彩な機能を持つことが報告されている<sup>6,13)</sup>。しかしながら、甘草エキス成分のメラニン合成への影響に関する報告はほとんどない。本研究の初期実験として、甘草エキス成分のメラニン合成に与える影響をスクリーニングしたところ、代表的な甘草フラボノイドであるリクイリチン (LQ) とそのアグリコンであるリクイリチゲニン (LQG) (図1) が、B16メラノーマ細胞においてメラニン合成誘導活性を持つことを見出し



Analysis of the mechanism of action of constituents from licorice root using monoclonal antibody against natural compounds

Takuhiro Uto

Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University

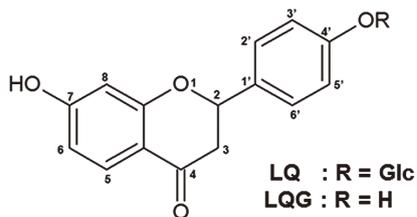


図1 LQ および LQG の化学構造

た。そこで本研究は、はじめにLQおよびLQGのメラニン合成に関与する酵素群、さらにそれらを制御する転写因子やシグナル伝達分子への影響を解析し、さらにLQおよびLQGに対するmAb (抗LQ/LQG-mAb)を作製することで、LQおよびLQGの細胞内挙動と分子標的の解析を行った。

## 2. 実験

### 2.1. 細胞培養

B16-F1 および HMV-II は ECACC、B16-4A5 は RIKEN Cell Bank より入手した。B16-F1 および B16-4A5 は 10% FBS 含有 DMEM 培地、HMV-II は 10% FBS 含有 RPMI1640 培地で培養した。

### 2.2. メラニン産生量測定

細胞を 24-well plate に  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、1 日培養後、LQ もしくは LQG を添加した。3 日培養後、細胞を 120  $\mu$ L の 1N NaOH で溶解し、415 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、メラニン産生量を測定した。

### 2.3. 細胞増殖抑制能測定

細胞生存率は 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromide (MTT) 法を用いた。B16-F1 細胞を 96well plate に  $0.2 \times 10^4$  cells/well で一晩培養し、LQ もしくは LQG を添加した。3 日間培養後、MTT (5 mg/mL) を 10  $\mu$ L ずつ各ウェルに添加し、さらに 4 時間培養した。沈殿した MTT-formazan を 100  $\mu$ L の 0.04N HCl-Isopropanol にて溶解し、マイクロプレートリーダーで吸光度 (595 nm) を測定した。

### 2.4. Western Blotting

B16-F1 細胞 ( $3 \times 10^5$  cells) を 6cm ディッシュに播種し一晩培養し、LQ もしくは LQG で処理した。培養後、RIPA buffer で細胞溶解後、Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) にてタンパク量を定量した。SDS-PAGE は Laemmli 法を用い、等量のセルライゼータンパクを Polyacrylamide Gel にて分離し、PVDF メンブランに転写した。ブロッキング後、各種一次抗体中で 4℃ 下一晩処理し、HRP 結合二次抗体で 1 時間反応させた。検出は ECL Prime (GE Healthcare) を用いて LAS-1000 (GE

Healthcare) にて行った。

## 2.5. 抗LQ/LQG-mAbの作製

LQ-MeOH 溶液に、NaIO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O 溶液を滴下し、室温で 30 分間攪拌した。この反応液に 50 mM Carbonate Buffer (pH 9.6) で溶解した Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を滴下し、室温で 6 時間攪拌した。反応生成物を精製水に対して透析し、凍結乾燥後、LQ-KLH コンジュゲートを得た。また同様の手法で LQ-Human Serum Albumin (HSA) コンジュゲートも作製した。これらの免疫複合体中の LQ の結合数を MALDI-TOF MS で確認後、マウスへ免疫感作し、抗体価が上昇した時点でマウスの脾臓細胞を単離した。得られた脾臓細胞とミエローマ細胞の細胞融合を行い、HAT セレクションによりハイブリドーマを選抜し mAb の作製を行った。

## 2.6. 競合的ELISAの確立

50 mM Carbonate Buffer で溶解した LQ-HSA を 96-well plate に 100  $\mu$ L ずつ分注し、抗原を固相化した。0.05% Tween-PBS (T-PBS) で洗浄後、300  $\mu$ L の 5% Skim Milk-PBS) を加え、1 時間ブロッキングした。T-PBS で洗浄後、LQ もしくはセルライゼートを 50  $\mu$ L を加え、さらに抗 LQ/LQG-mAb 溶液を 50  $\mu$ L を分注した。1 時間の競合反応後、T-PBS で洗浄し、100  $\mu$ L の Horseradish Peroxidase (HRP) -labeled Anti-mouse IgG (Fc specific) Solution を加えさらに 1 時間インキュベートした。洗浄後、100  $\mu$ L の 2,2-Azino-di (3-ethylbenzthiazoline) Sulfonic Acid (ABTS) を加え十分に発色したのち、405 nm における吸光度を測定した。

## 2.7. 交差反応性の算出

LQ およびその類縁化合物に対する交差反応性を調べるために、各種化合物を用いて競合的 ELISA を行った。各種化合物の交差反応性は、サンプル非存在下での吸光度を 100% とし、吸光度が 50% 阻害される濃度 (IC<sub>50</sub>) で算出した。

## 2.8. LQ および LQG の細胞内蓄積量測定

B16-F1 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) を 10 cm プレートに播種し、一晩培養後、経時的に LQ もしくは LQG で処理した。細胞回収は PBS で細胞を十分洗浄し、Proteinase Inhibitors Cocktail を含む PBS で回収した。超音波破断機で細胞を粉碎後、タンパク量を定量し、抗 LQ/LQG-mAb を用いた競合的 ELISA にて LQ および LQG の細胞内蓄積量を測定した。

## 3. 結果

### 3.1. LQ および LQG のメラニン合成誘導能

マウスメラノーマ細胞 B16-F1 細胞における LQ ま

たはLQGのメラニン合成能の結果を図2Aに示す。 $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone ( $\alpha$ -MSH)はポジティブコントロールとして用いた。コントロール(未処理)と比較してLQまたはLQGで処理した細胞ではメラニン合成が誘導されており、その効果はLQよりLQGが強かった。また同様の結果がB16-4A5細胞やヒトメラノーマ細胞HMV-IIにおいても確認された(data not shown)。さらに、LQおよびLQGの細胞毒性は認められなかったことから(図2B)、LQおよびLQGはメラニン合成促進能を有することが示唆された。

### 3. 2. LQまたはLQGのTyr、TRP-1およびTRP-2のタンパク質発現への影響

*in vitro*チロシナーゼ活性解析の結果、LQおよびLQGは、直接的にチロシナーゼ活性を誘導しなかった(図3A)。そこで、メラニン合成に関与する酵素群の発現を解析したところ、LQおよびLQGは共にTyr、TRP-1、TRP-2の発現を誘導した(図3B)。この結果より、LQおよびLQGのメラニン合成促進能は、Tyr、TRP-1、TRP-2のタンパ

ク質発現上昇に起因することが示唆された。

### 3. 3. LQまたはLQGの転写因子およびシグナル伝達因子への影響

MITFは活性化されると核内へ移行し、Tyr、TRP-1、TRP-2遺伝子のプロモーター領域のM-Boxに結合することにより転写活性を高める<sup>14)</sup>。CREBはMITF遺伝子の転写調節を担い、Akt、ERK、p38により制御されている<sup>14)</sup>。また、p38とERKは直接的にMITFを誘導することも報告されている<sup>15)</sup>。そこで、LQおよびLQGのこれら転写因子およびシグナル伝達因子への影響を調べた。LQまたはLQGはMITFタンパク質発現を誘導した(図4A)。さらに図4Bに示すように、LQまたはLQG処理後5分よりCREB、ERK、p38のリン酸化が誘導され、時間経過とともにリン酸化が消失した。一方、PI3K-Akt経路は、 $\alpha$ -MSHの刺激により逆に不活性化されメラニン産生を誘導することが知られているが<sup>15)</sup>、LQおよびLQGによるAktリン酸化の抑制能は強くなかった。

さらにLQおよびLQGのメラニン合成への各シグナル

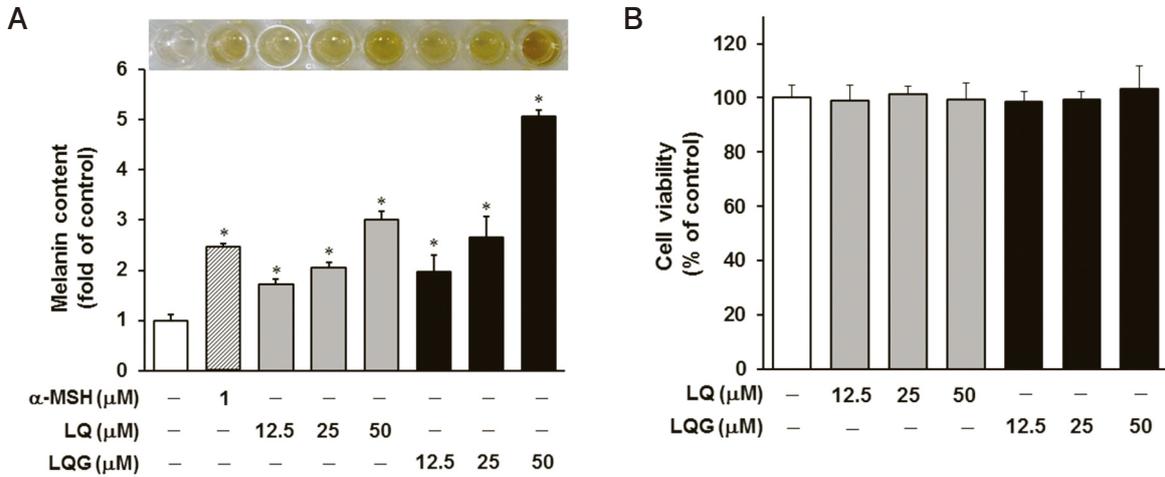


図2 B16-F1細胞におけるLQおよびLQGのメラニン合成誘導能(A)、細胞生存率への影響(B)  
\* $p < 0.01$  vs control

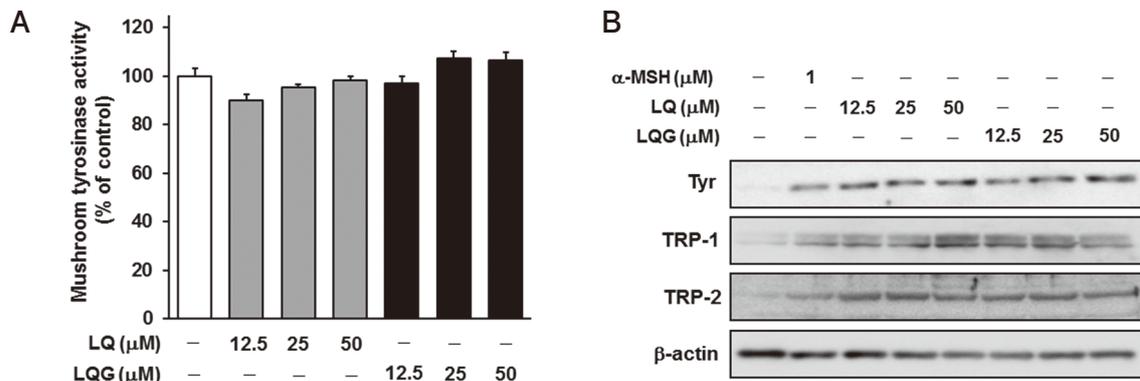


図3 LQおよびLQGの*in vitro*チロシナーゼ活性(A)、Tyr、TRP-1、TRP-2発現への影響(B)

伝達系の関与を調べるために、PI3K 阻害剤 (LY294002)、p38 阻害剤 (SB203580)、MEK 阻害剤 (U0126)、PKA 阻害剤 (H-89) による LQ または LQG 誘導性メラニン合成へ与える影響を解析した。図 5 に示すように、LQ または LQG 誘導性メラニン合成は、SB203580 と H-89 で抑制されたことから、LQ および LQG のメラニン合成には p38 および PKA が関与していることが示唆された。

### 3. 4. 抗 LQ/LQG-mAb の作製

さらなる LQ および LQG の作用機序解析を目的として抗 LQ/LQG-mAb の作製を行った。今回我々は、LQ をハプテンとし KLH をキャリアタンパク質とした免疫原 (LQ-KLH コンジュゲート) の調製を行った。LQ-KLH コンジュゲートの調製は、LQ の糖部を NaIO<sub>4</sub> で開環し、開環した糖部のアルデヒドを KLH のリジン残基とアルカリ条件下での縮合によりシッフベース形成することで作製した。LQ-KLH コンジュゲートを免疫原としてマウスに免疫し、

ハイブリドーマを樹立し mAb を調製した。精製した mAb のアイソタイプのタイピングを行った結果、サブクラスは IgG2a で軽鎖が κ の mAb であることを確認した。次に抗 LQ/LQG-mAb を用いて競合的 ELISA の確立を行った。プレートに固相化した LQ-HSA と遊離の LQ との競合によるアッセイ系を検討した結果、0.39 ~ 25 μg/mL (0.93 ~ 59.75 μM) の濃度範囲内で吸光度との間に良好な直線関係が得られた (data not shown)<sup>16)</sup>。

### 3. 5. 抗 LQ/LQG-mAb の交差反応性試験および構造活性相関

抗 LQ/LQG-mAb の特異性を調べるために、構造類似化合物および各種天然化合物に対する交差反応性を競合的 ELISA により測定し、IC<sub>50</sub> を算出した。その結果、本 mAb は、LQG (IC<sub>50</sub> = 33.09 μM)、Hesperetin (IC<sub>50</sub> = 17.83 μM)、Naringenin (IC<sub>50</sub> = 79.41 μM) に対して交差反応は示したものの、その他の Flavone 類および構造類似

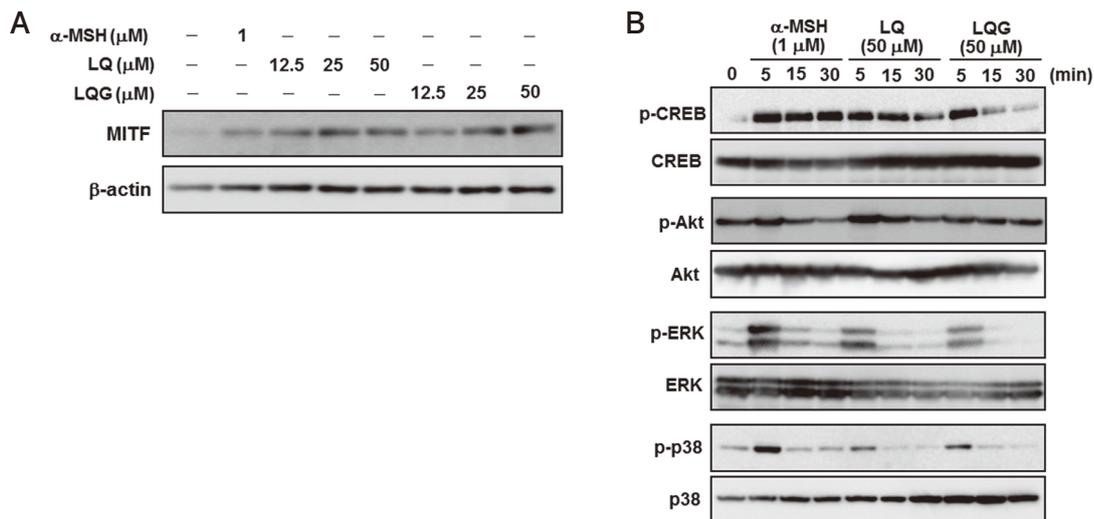


図 4 LQ および LQG の MITF 発現 (A)、CREB、Akt、ERK、p38 リン酸化 (B) への影響

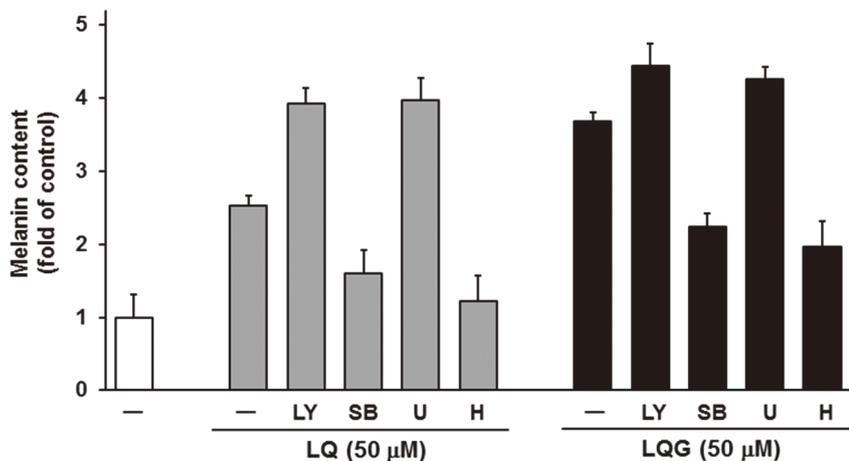


図 5 LQ および LQG 誘導性メラニン合成への各種阻害剤の影響  
LY294002 (LY):10 μM、SB203580 (SB):10 μM、U0126 (U): 5 μM、H-89 (H): 2.5 μM

化合物に対しては交差反応を示さなかった(表1)。これらの結果より、C-7のhydroxyl基とC-2-C-3間の単結合が本mAbの認識に重要な役割を果たしていることが示唆された。本mAbはLQGも良好に認識することから、LQGを用いて競合的ELISAを行ったところ、1.56~50 µg/mL(6.09~195.12 µM)の濃度範囲内で吸光度との間に良好な直線関係が得られた。よって本mAbはLQとLQGに非常に特異性が高いmAbであり、LQおよびLQGの作用機序解析に有用なツールになりうる可能性が示唆された<sup>16)</sup>。

### 3. 6. LQおよびLQGの細胞内蓄積

LQまたはLQG処理したB16-F1細胞から調整したセルライゼート中のLQおよびLQGの蓄積量を、抗LQ/LQG-mAbを用いた競合的ELISAで測定した。60分以内で経時

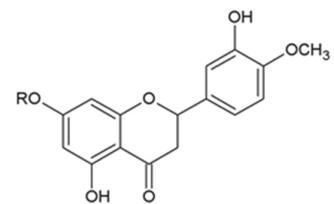
的にLQまたはLQG処理した細胞から得られたセルライゼート中にはLQまたはLQGはほとんど検出されなかった(data not shown)。

### 3. 7. LQの結合タンパク質の検出

LQおよびLQGの標的分子同定を目的として、抗LQ/LQG-mAbを一次抗体としたWestern Blottingを行った。抗LQ/LQG-mAbはLQGよりもLQに対する反応性が強いことから、LQ処理細胞由来のセルライゼートの解析を行った。図6に示すように、コントロールおよびLQ処理由来のセルライゼートにおいて非特異的なバンドがいくつか検出されるが、LQ処理5分において35-38kDa付近にLQ結合タンパク質のバンド(◀)が検出された。

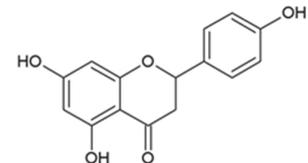
表1 抗LQ/LQG-mAbの交差反応性

Compound	Classification	IC <sub>50</sub> (µM)
<b>LQ</b>	Flavanone glycoside	<b>8.60</b>
<b>LQG</b>	Flavanone	<b>33.09</b>
<b>Hesperetin</b>	Flavanone	<b>17.83</b>
Hesperidin	Flavonoid glycoside	>100
<b>(±)-Naringenin</b>	Flavanone	<b>79.41</b>
(±)-Eriodictyol	Flavanone	>100
Apigenin	Flavone	>100
Luteolin	Flavone	>100
Myricetin	Flavonol	>100
Quercetin	Flavonol	>100
Fisetin	Flavonol	>100
Kaempferol	Flavonol	>100
Isorhamnetin	Flavonol	>100
(-)-Epigallocatechin	Flavanol	>100
(-)-Epicatechin	Flavanol	>100
Daidzein	Isoflavonoid	>100
Rutin	Flavonoid glycoside	>100
Glycyrrhizin	Triterpenoid	>100
3-Monoglucuronyl-glycyrrhetic acid	Triterpenoid	>100
Glycyrrhetic acid	Triterpenoid	>100
Saikosaponin a	Triterpenoid	>100
Ginsenoside Rb1	Triterpenoid	>100
Peoniflorin	Monoterpenoid	>100



Hesperidin : R = Glc-Rha

Hesperetin : R = H



Naringenin

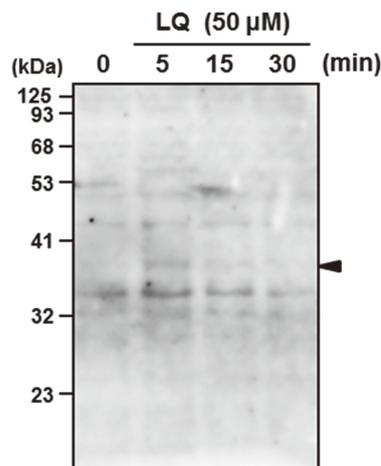


図6 抗LQ/LQG-mAbを用いたWestern BlottingによるLQ結合タンパク質の検出

#### 4. 考 察

本研究は、代表的な甘草フラボノイドであるLQとそのアグリコンのLQGの持つメラニン合成誘導能に注目し研究を行った。近年LQおよびLQGの生物活性に関する報告は多くなっているが、メラニン合成に関する報告は皆無である。LQおよびLQGは、マウスメラノーマ細胞 (B16-F1, B16-4A5) およびヒトメラノーマ細胞 (HMV-II) においてメラニン合成を促進し、その効果はLQよりLQGが強かった。また、LQおよびLQGはチロシナーゼ酵素活性に直接的に影響せず、Tyr、TRP-1、TRP-2の発現を高めることでメラニン合成を促進していることが明らかになった。さらに転写因子・シグナル伝達系の解析や各種阻害剤による解析結果をまとめると、LQとLQGはp38及びPKA活性化を引き起こし、CREBのリン酸化誘導を介する経路もしくは直接的にMITFの発現を誘導することで、Tyr、TRP-1、TRP-2の発現を高めてメラニン合成を促進していることが示唆された(図7)。

さらに我々は、LQおよびLQGの細胞内での挙動・分布、標的分子の同定を目標として、特異的mAbの作製を行った。本研究では、LQ-KLHコンジュゲートを免疫原としてマウスに免疫することでハイブリドーマを樹立し、抗LQ/LQG-mAbの作製に成功した。本mAbは、LQとLQGに加えてHesperetinとNaringeninに対して交差反応は示すが、その他のFlavone類及び構造類似化合物に対しては交差反応を示さないことから、LQおよびLQGの作用機序解析に有用なツールになりうる可能性が示唆された。抗LQ/LQG-mAbを用いた競合的ELISAを用いて、LQおよびLQG処理したB16-F1細胞由来セルライセート中のLQ

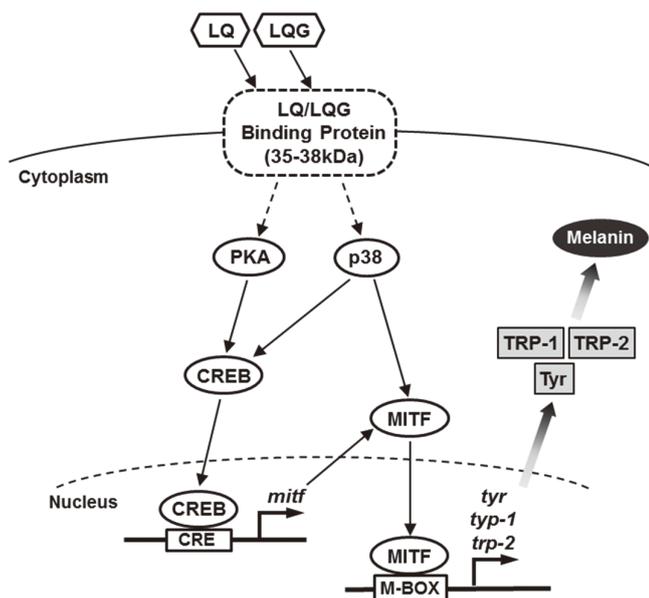


図7 LQ および LQG によるメラニン合成促進の分子機構

およびLQG量を測定したが、LQおよびLQGはほとんど検出されなかった。この結果は、セルライセート中のLQおよびLQG量がELISAの感度の0.39～25μg/mL (0.93～59.75μM)以下であるため検出できなかったと考えられ、LQおよびLQGは細胞内には多く取り込まれずに細胞膜表面のレセプター等に関与していると考えている。さらに抗LQ/LQG-mAbを一次抗体としたWestern Blottingの結果、LQで5分処理した細胞由来のセルライセートにおいて、35-38kDa付近にLQ結合タンパク質のバンドが検出された。これはp38、ERK、CREBがリン酸化された時間とも一致していることから、LQ結合タンパク質のメラニン誘導機構への関与が示唆される。

ケミカルバイオロジー研究の発展により、天然化合物の標的分子の同定を試みる研究が活発になってきているが、天然由来の生理活性物質の多くは単一ではなく複数の標的をもつことや、標的分子との結合様式やアフィニティーの違いが多様であり解析が困難な点が多い。現在の標的分子解析法として、アフィニティークロマトグラフィー法や分子プローブ法が広く知られているが、これらの手法では限界があるため新しい手法が求められている。我々は抗天然物特異的mAbをツールとして、生薬成分の細胞や組織内の局在解明や標的分子同定に取り組んでいる。本手法は生薬成分の構造を修飾する必要はなく、生細胞や組織での解析が可能という利点がある。しかしながら、目的成分と標的分子の結合部位と、抗体のエピトープが近い位置であれば抗体が結合できずに検出できない可能性がある。また、目的成分と標的分子間の結合様式が弱い場合は、Immunocytochemistry (ICC) やWestern Blottingでは検出できない恐れもある。本研究で用いた抗LQ/LQG-mAbは、Western BlottingではLQ結合タンパク質を検出できたが、ICCでは良好な検出ができなかった (data not shown)。今後、LQ結合タンパク質を抗LQ/LQG-mAbを用いた免疫沈降法により単離し、質量分析法により標的タンパク質を同定する予定である。またエピトープの異なるmAbによるICCやWestern Blottingに加えて、アフィニティークロマトグラフィー法や分子プローブ法も行うことで、LQおよびLQGの細胞内の挙動・局在や標的分子同定を確実なものとしたい。抗天然化合物特異的mAbを用いた解析が、メラニン合成を制御する天然化合物の作用機構に関する新たな知見に繋がることを期待している。

#### (謝 辞)

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご支援いただきましたことに深く感謝申し上げます。また、本研究の共同研究者である長崎国際大学薬学部の正山征洋教授、健康管理学部の藤井俊輔助手のご助言およびご協力の心より御礼申し上げます。

## (引用文献)

- 1) Sturm RA: Skin colour and skin cancer - MC1R, the genetic link, *Melanoma Res.*, 12, 405-416, 2002.
- 2) Goding CR: Melanocytes: the new Black, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 39, 275-279, 2007.
- 3) Yasumoto K, Yokoyama K, Takahashi K, Tomita Y, Shibahara S: Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes, *J. Biol. Chem.*, 272, 503-509, 1997.
- 4) Yamaguchi Y, Hearing VJ: Physiological factors that regulate skin pigmentation, *Biofactors*, 35, 193-199, 2009.
- 5) Suzuki I, Cone RD, Im S, Nordlund J, Abdel-Malek ZA: Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis, *Endocrinology*, 137, 1627-1633, 1996.
- 6) Asl MN, Hosseinzadeh H: Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds, *Phytother. Res.*, 22, 709-724, 2008.
- 7) Xuan L, Tanaka H, Xu Y, Shoyama Y: Preparation of monoclonal antibody against crocin and its characterization, *Cytotechnology*, 29, 65-70, 1999.
- 8) Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y: Formation of monoclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rg1 and its characterization. Monoclonal antibody for a ginseng saponin, *Cytotechnology*, 34, 197-204, 2000.
- 9) Kim JS, Tanaka H, Shoyama Y: Immunoquantitative analysis for berberine and its related compounds using monoclonal antibodies in herbal medicines, *Analyst*, 129, 87-91, 2004.
- 10) Shan SJ, Tanaka H, Shoyama Y: Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and an eastern blotting technique for glucuronides of glycyrrhetic acid, *Anal. Chem.*, 73, 5784-5790, 2001.
- 11) Uto T: Functional analysis of bioactive natural compounds using monoclonal antibodies against natural compounds, *Yakugaku Zasshi*, 134, 1061-1067, 2014.
- 12) Uto T, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y: Analysis of the synergistic effect of glycyrrhizin and other constituents in licorice extract on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production using knock-out extract, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 417, 473-478, 2012.
- 13) Chin YW, Jung HA, Liu Y, Su BN, Castoro JA, Keller WJ, Pereira MA, Kinghorn AD: Anti-oxidant constituents of the roots and stolons of licorice (*Glycyrrhiza glabra*), *J. Agric. Food. Chem.*, 55, 4691-4697, 2007.
- 14) Wan P, Hu Y, He L: Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors, *Mol. Cell. Biochem.*, 354, 241-246, 2011.
- 15) Chan CF, Huang CC, Lee MY, Lin YS: Fermented broth in tyrosinase- and melanogenesis inhibition, *Molecules*, 19, 13122-13135, 2014.
- 16) Fujii S, Morinaga O, Uto T, Nomura S, Shoyama Y: Development of a monoclonal antibody-based immunochemical assay for liquiritin and its application to the quality control of licorice products, *J. Agric. Food Chem.*, 62, 3377-3383, 2014.