

N-17

薄皮丸ナス中の dioscin は CREB のリン酸化を抑制し MITF を減ずることにより B16 メラノーマ細胞の α -MSH 誘導メラニン産生を抑制する

Dioscin from *Solanum melongena* L. 'Usukawamarunasu' attenuates α -MSH-induced melanogenesis
in B16 murine melanoma cells via downregulation of phospho-CREB and MITF

○蝦名宏大¹, 瀬瀬守², 仁科淳良¹

*Kodai Ebina¹, Mamoru Koketsu², Atsuyoshi Nishina

Abstract: Component from *Solanum melongena* L. 'Usukawamarunasu' that attenuates α -MSH-induced melanogenesis in B16 cells were identified and the mechanism of melanogenesis inhibition caused by isolated components was studied. In this study, we found that extracts of *Solanum melongena* L. 'Usukawamarunasu' produced in Yamagata Prefecture in Japan down-regulated melanogenesis in B16 melanoma cells. Furthermore, it was shown that dioscin from Usukawamarunasu is the melanin synthesis inhibitor. Moreover, it was deduced that, melanin synthesis inhibition by dioscin caused by down-regulation of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 by inhibition of phosphorylation of CREB, and MITF expression.

1. 目的

われわれは、日本に現存する農作物の在来品種の用途開発検討の一環として、山形県産業経済部と共同で、山形県置賜地方で多く生産されている薄皮丸ナスの成分探索を行うこととした。本研究で、薄皮丸ナス成分のメラニン産生抑制作用に関する検討を行った。

表皮中のメラニンの生産および分散に起因する皮膚色素沈着は、日照に対する主な生体防御機構である。一方、メラニン産生抑制成分は美白化粧品素材としての有用である。

哺乳類のメラニン産生細胞（メラノサイト）で、メラニンは、小眼球症関連転写因子（MITF）の発現と活性化によって調節される3つの主要な色素酵素、チロシナーゼ、およびチロシナーゼ関連タンパク質-1（TRP-1）、TRP-2を含んでいるメラノソーム内で合成される[1]。また、メラニン産生は様々な細胞内シグナル伝達経路によって制御されていることが明らかになっている。本研究では、メラノサイトのモデルとして B16 メラノーマ細胞を用い、 α -MSH によりメラニンが産生される実験系に薄皮丸ナスの分画物を添加してメラニン産生抑制作用を比較する方法で、薄皮丸ナス中に存在するメラニン産生抑制物質を単離し、化学構造を同定した。また、当該成分の MAP キナーゼ（ERK, p38MAPK, JNK）、MITF、チロシナーゼ、TRP-1,-2 に対する作用を測定して、作用メカニズムの解明を試みた。

2. 実験材料と方法

- ・山形県米沢市内の青果店で薄皮丸ナスを購入して実験に供した。
- ・真空乾燥した薄皮丸ナスを裁断し、粉碎後、粉碎物 100g に対して 500ml のメタノールを加えて、一昼夜抽出した。上澄と残渣をろ別し、上澄はロータリーエバポレーターで乾燥して、メタノール抽出物とした。風乾した残渣に水を 500ml を加えて一昼夜抽出後、上澄と残渣をろ別し、上澄を真空凍結乾燥して水抽出物とした。
- ・メラニン産生抑制物質は、セファデックス LH-20（移動相：メタノール）とカラムとして ODS（移動相：含水メタノール）を用いたクロマトグラフィーで単離し、NMR と MS によって化学構造を同定した。
- ・B16 細胞は DMEM（牛胎児血清 10%）を用いて、CO₂ 5%、37 °C で培養した。
- ・細胞毒性は MTT 法で細胞の生存率を測定して求めた。
- ・メラニン産生抑制作用の測定のため、24 穴マイクロプレートに B16 細胞を播種、培養し、終濃度 100 μ g/ml の生薬および α -MSH(100 nM) を培地に添加し 96 時間培養した。培地を除去し、細胞を 10 % DMSO 含有 2M NaOH 200 μ L で溶解した。メラニン産生量は、マイクロプレートリーダー（405nm）で吸光度を測定して算出した。
- ・MAP キナーゼとメラニン産生関連タンパク質の測定については、細胞ライセートを SDS ページで分離し、タンパク質を PVDF 膜にブロットした後、免疫染色によりリン酸化 MAP キナーゼ（p-ERK, p-p38MAPK, p-JNK）、リン酸化 CREB（p-CREB）、MITF、チロシナーゼ、TRP-1,-2 そして β -actin を検出した。

1:日大理工・応化, Department of Materials and Applied Chemistry, CST, Nihon-U,

2:岐阜大工・機能材料工学, Department of Functional Materials Science, Gifu-U

3. 結果

- 薄皮丸ナス抽出物の収量
乾燥した薄皮丸ナス 100g からメタノール抽出物 27.5g と水抽出物 20.1g が得られた。
- メタノール抽出物と水抽出物の細胞毒性とメラニン産生抑制作用
薄皮丸ナスのメタノール抽出物と水抽出物の細胞毒性とメラニン産生抑制作用を Table 1 に示した。水抽出物の細胞毒性はいずれの濃度においてもメタノール抽出物よりも微弱であり、メラニン産生抑制率は大きかった。そこで、水抽出物から、メラニン産生抑制物質の単離を試みた。

Table 1. The cytotoxicity and melanogenesis inhibitory effects of methanol and water extract from Usukawamarusasu in B16 melanoma 4A4 cells.

	Concentration(μg/ml)		
	10	30	100
Inhibition of melanogenesis (%)			
Methanol extract	3.8±3.2	8.8±4.4	31.7±7.9
H ₂ O-soluble fraction	-0.3±4.4	11.0±9.3	36.4±7.1
Inhibition of proliferation (%)			
Methanol extract	16.6±2.3	15.1±3.7	8.8±1.7
H ₂ O-soluble fraction	1.3±4.4	-1.5±7.5	0.3±4.3

- 薄皮丸ナス中のメラニン産生抑制成分
クロマトグラフィーによる単離操作と NMR, MS による構造解析の結果、薄皮丸ナス中の dioscin が薄皮丸ナス中のメラニン産生抑制成分であることが分かった。

Table 2. The cytotoxicity and melanogenesis inhibitory effects of dioscin in B16 cells.

	Concentration(μM)				
	0.1	0.3	1	3	5
Inhibition of melanogenesis (%)	0.0±0.2	0.0±6.7	0.0±3.9	59.7±4.5	95.6±1.7
Inhibition of proliferation (%)	0.0±1.7	0.0±2.5	22.0±2.8	85.3±6.6	100.0±0.8
	mean±SD				

- dioscin の細胞毒性とメラニン産生抑制作用
dioscin の細胞毒性とメラニン産生抑制作用を Table 2 に示した。dioscin は参照化合物の arbutin (100 μM のメラニン産生抑制率が 71.5 %) よりも低濃度で強力なメラニン産生抑制作用を示すことがわかった。しかし、添加濃度とともに細胞毒性の増加が認められた。

- dioscin のメラニン産生抑制機構

dioscin の p-ERK, p-p38MAPK, p-JNK, p-CREB, MITF, チロシナーゼ, TRP-1,-2 に対する作用の一部を Figure 1 に示した。dioscin の添加により、α-MSH による CREB のリン酸化、チロシナーゼ、TRP-1, -2 の発現が抑制され、MITF が α-MSH 無添加よりも減少した。また、ERK のリン酸化と dioscin は無関係であった。以上の結果から、dioscin は、CREB が MITF の転写因子として働くことを抑制するとともに MITF の量を減らす作用によりチロシナーゼ、TRP-1, -2 の発現を抑制し、結果、メラニン産生が抑制されると推定した。

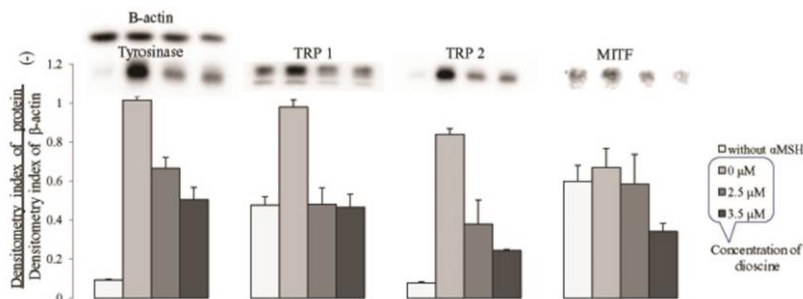


Figure 1. Effects of dioscin on melanogenesis related protein.

4. 考察

日本の山形県の特産物である薄皮丸ナスの食品以外への用途開発を目指して、成分のメラニン産生抑制作用を検討した。比較的強いメラニン産生抑制作用を示した水抽出からクロマトグラフィーにより、メラニン産生抑制作用が強い物質を探索した結果、α-MSH誘導メラノジェネシス抑制物質が dioscin であることを明らかにした。Dioscin の 50%メラニン産生抑制濃度 (IC₅₀) は 2.1 μM で、陽性参照化合物の arbutin の IC₅₀ (116 μM) よりも低く、長期間の食経験のある薄皮丸ナス由来であり、色素異常を引き起こす病気の治療や化粧品素材として実用化される可能性があると考えた。

5. 参考文献

- [1] H. Nakajima, K. Fukazawa, Y. Wakabayashi, K. Wakamatsu, G. Imokawa, Withania somnifera extract attenuates stem cell factor-stimulated pigmentation in human epidermal equivalents through interruption of ERK phosphorylation within melanocytes, J Nat Med 66 (2012) 435-446.