

グルタチオンのメラニン合成阻害機構

松木光雄, 渡部俊彦,* 小笠原綾子, 三上 健, 松本達二

Inhibitory Mechanism of Melanin Synthesis by Glutathione

Mitsuo MATSUKI, Toshihiko WATANABE,* Ayako OGASAWARA,
Takeshi MIKAMI, and Tatsuji MATSUMOTODepartment of Microbiology, Tohoku Pharmaceutical University,
4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan

(Received January 11, 2008; Accepted May 2, 2008)

Glutathione dose dependently inhibited melanin synthesis in the reaction of tyrosinase and L-DOPA. The inhibition of melanin synthesis was recovered by increasing the concentration of L-DOPA, but not recovered by increasing tyrosinase. Glutathione inhibited the binding between tyrosinase and L-DOPA. Although the synthesized melanin was aggregated within 1 h, the aggregation was inhibited by the addition of glutathione. These results indicate that glutathione inhibits the synthesis and agglutination of melanin by interrupting the function of L-DOPA.

Key words—glutathione; melanin; tyrosinase; 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine

緒 言

グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンからなるアミノ酸の一種で人間を含む動植物や微生物の組織内に含まれている物質である。グルタチオンは、生体内で有害物質の解毒,¹⁾ 老化防止、過酸化物の生成抑制²⁾などを行っていることが知られており、現在多くのサプリメントや基礎化粧品成分として取り入れられている。

メラニンは、紫外線から皮膚を守る防御因子として重要な役割を示す一方、しみ、そばかす、黒ずみの原因となることが知られている。生体内でのメラニンの生成は、血中から供給されたチロシンがチロシナーゼによって酸化されることから始まる。チロシンは酸化されL-DOPAとなり、さらにDOPAキノンへと代謝される。チロシナーゼはこの2つの反応を触媒する酵素であり、この代謝はメラニン生成における律速反応として働く。DOPAキノンはその後、自動酸化によりメラニンとなる。³⁾ グルタチオンがメラニン合成を阻害することは知られているが、⁴⁾ そのメカニズムについては明らかにされていない。われわれは、グルタチオンのメラニン合成阻

害メカニズムについて解析を行ったので報告する。

方 法

1. メラニン合成反応 リン酸緩衝液 (8.0 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 2.9 g/l Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.2 g/l KH₂PO₄, pH 7.2) を用いて各種試薬を溶解し、L-DOPA (SIGMA-ALDRICH, 5,4-Dihydroxy-L-phenylalanine) 及びチロシナーゼ (SIGMA-ALDRICH, 5370 units/mg) 溶液を調整した。L-DOPA 溶液 (final 0.5 mM) とチロシナーゼ溶液 (final 53.7 units/ml) を、96 穴プラスチックプレート (Nunc Delta Surface, Nunc) 内で混和後、37°C で30分間静置した。反応終了後、ImmunoMini NJ-2300 (Inter Med, USA) を用いて OD490 nm 値を測定し、これをメラニン生成量とした。

2. グルタチオンによるメラニン合成阻害効果 グルタチオン (還元型, Nacalai tesque) は、リン酸緩衝液に溶解し実験に使用した。グルタチオン溶液の段階希釈液を、L-DOPA 溶液 (final 0.5 mM) とチロシナーゼ溶液 (final 53.7 unit/ml) の混液に加え、前述と同様の方法でメラニン生成量を測定した。

グルタチオンによるメラニン合成阻害に対するL-DOPAの関与を検討するために、グルタチオン

溶液 (final 0.8 mM) とチロシナーゼ溶液 (final 53.7 unit/ml) の混液に、濃度の異なる L-DOPA 溶液を加えかく拌後、前述と同様の方法でメラニン生成量を測定した。

また、グルタチオンによるメラニン合成阻害に対するチロシナーゼの関与を検討するために、グルタチオン溶液 (final 0.8 mM) と L-DOPA 溶液 (final 0.5 mM) の混液に、濃度の異なるチロシナーゼ溶液を加え、前述と同様の方法を用いてメラニン生成量を測定した。

3. グルタチオンによるチロシナーゼ-L-DOPA 結合阻害 グルタチオンの、チロシナーゼと L-DOPA に対する結合阻害効果を、水晶共振子マイクロバランス (QCM) 生体分子間相互作用解析装置 Affinix Q (Initium) を用いて検討した。すなわち、チロシナーゼ溶液 (0.1 mg/ml) 2 μ l をセンサーチップ表面に固定化し、このセンサーチップを Affinix Q 本体に取り付けたのち、10 ml のリン酸緩衝液中で周波数が安定するまで放置した。センサーチップの周波数が安定したのち、「0.5 mM L-DOPA 10 μ l」又は「0.5 mM L-DOPA 10 μ l 及び 0.3 mM グルタチオン 10 μ l」をリン酸緩衝液中に滴下し、センサーチップに固定化されたチロシナーゼとの反応性を、周波数の変化から測定した。

4. グルタチオンによるメラニン凝集阻害効果 L-DOPA 溶液 (final 0.5 mM) とチロシナーゼ溶液 (final 53.7 units/ml) をエッペンチューブ内で混和し、37°C で 30 分間静置した。その後、グルタチオン溶液 (final 0.8 mM) を添加、37°C で反応させ、30 分毎に、この反応液の遠心上清中を回収した。上清中の OD490 nm 値を測定し、OD490 nm 値の減少から、メラニン凝集物の生成量を算出した。

5. 統計処理 実験結果は、Student's *t*-検定による統計処理を行った。

結 果

1. グルタチオンによるメラニン合成阻害効果 チロシナーゼと L-DOPA を混合したメラニン合成反応液に、グルタチオンを加え、メラニン合成に及ぼす影響を検討した。その結果、グルタチオン添加濃度依存的にメラニン生成量が減少し、グルタチオン最終濃度が 0.8 mM 以上では、メラニン合成が完全に抑制された (Fig. 1)。この結果から、グル

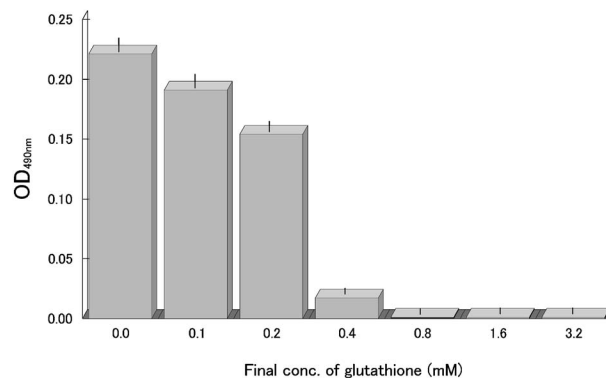


Fig. 1. Effect of Glutathione on Melanin Synthesis

Glutathione was mixed with tyrosinase (final 53.7 units/ml) and L-DOPA (final 0.8 mM), and incubated at 37°C for 30 min. After incubation, the amount of melanin was measured as described in Materials and Methods. These results were shown as mean \pm S.E. ($n=4$).

タチオンには、メラニン合成を阻害する効果のあることが明らかになった。

2. グルタチオンによるメラニン合成阻害機構の解析 グルタチオンのメラニン合成阻害効果に、グルタチオンによる L-DOPA の不活性化が関与しているか検討を行った。グルタチオン (最終濃度 0.8 mM) を含むメラニン合成反応液に L-DOPA を過剰に添加し、グルタチオンによるメラニン合成阻害が回復するか否かを検討したところ、グルタチオンを含まない反応系では、メラニンの合成が認められたが (Fig. 2, Positive control), グルタチオン添加群では、メラニン合成が抑制された (Fig. 2, L-DOPA 最終濃度 0.8 mM)。しかし、この抑制状態は、反応液中の L-DOPA 濃度を増加させることで回復し、L-DOPA の最終濃度が 3.2 mM 以上で、メラニン生成能が完全に回復した。また、グルタチオンによるメラニン合成阻害がチロシナーゼの過剰添加でも回復できるか否かについて検討を行ったが、反応液中のチロシナーゼ濃度を通常の実験濃度 (final 53.7 units/ml) の 10 倍量 (final 537.0 units/ml) に増加させても、グルタチオンによるメラニン合成抑制状態は回復しなかった (data not shown)。

さらに、メラニンと L-DOPA の結合に及ぼすグルタチオンの影響を Affinix Q を用いて検討したところ、チロシナーゼを固定化させたセンサーチップに対し、グルタチオン非存在下では、 1.61 ± 0.25 ng の L-DOPA が結合したが、グルタチオン存在下では、チロシナーゼ固定化センサーチップに対する

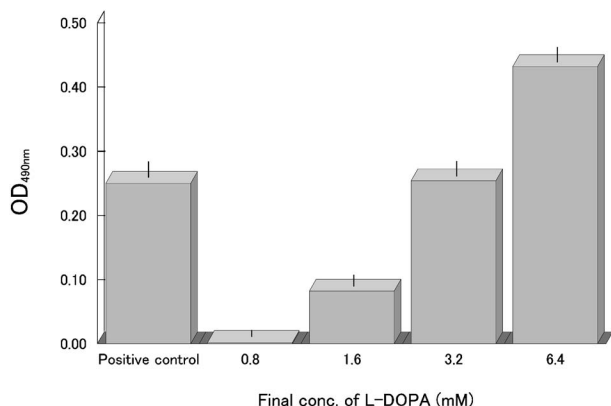


Fig. 2. Effect of L-DOPA on Inhibition of Melanin Synthesis by Glutathione

L-DOPA was mixed with glutathione (final 0.8 mM) and tyrosinase (final 53.7 units/ml), and incubated at 37°C for 30 min. After incubation, the amount of melanin was measured as described in Materials and Methods. These results were shown as mean \pm S.E. ($n=4$). Positive control: The melanin synthesis by the reaction of tyrosinase (final 53.7 units/ml) and L-DOPA (final 0.8 mM) without glutathione.

L-DOPA 付着量は、 0.10 ± 0.08 ng で、チロシナーゼへの L-DOPA 親和性が有意に減少していた ($p < 0.001$, $n=3$).

3. グルタチオンによるメラニン凝集阻害効果

本実験で行ったメラニン合成反応では、反応開始直後から上清中の OD490 nm 値は上昇し、反応開始 30 分後で、その値はピークに達するが、その後、反応生成物であるメラニンが凝集・沈降するため、上清中の OD490 nm 値は、徐々に低下する (data not shown). 反応生成物の凝集・沈降と上清中の OD490 nm 値の低下は相関することから、遠心上清中の OD490 nm 値を測定することで、メラニン凝集物の生成速度を測定した。メラニン合成反応開始 30 分後にグルタチオンを添加し、添加後から経時的に遠心上清中の OD490 nm 値を測定したところ、グルタチオン未添加群では、遠心上清中の OD490 nm 値は経時的に減少していたが、グルタチオン添加群では、遠心上清中の OD490 nm 値の減少は認められなかった (Fig. 3). この結果から、グルタチオン添加群では、メラニン凝集物の生成が抑制されていることが明らかになった。

考 察

メラニンは、皮膚を構成する細胞内で形成される色素であり、黒褐色のユーメラニン(真性メラニン)と、橙赤色のフェオメラニン(亜メラニン)の2種

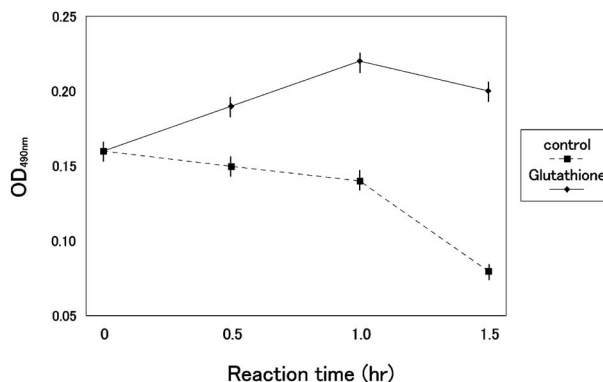


Fig. 3. Effect of Glutathione on Melanin Aggregation

L-DOPA (final 0.5 mM) and tyrosinase (final 53.7 units/ml) were mixed and reacted at 37°C for 30 min. Then, glutathione (final 0.8 mM) was added to the mixture, and reacted at 37°C for the indicated time. After reaction, the supernatant was collected by centrifugation. The amount of melanin in the supernatant was measured as described in Materials and Methods. These results were shown as mean \pm S.E. ($n=4$).

類があり、皮膚の表皮最下層の基底層や毛髪の毛母などにあるメラノサイト(色素細胞)で生成される。メラニンは本来、紫外線による障害から皮膚を守る役割をしているが、多量の紫外線を浴びるとメラニンが過剰産生され、同時にメラノサイトの数も増加する。高齢化などによる新陳代謝の低下で表皮のメラニン排出能力が低下すると、メラニンが皮膚に沈着し、しみ、そばかすを発生すると考えられている。

現在メラニン合成阻害作用を持つものとして、いくつかのモノテルペノイドやグルコシド,^{5,6)} アルブチン⁷⁾などが知られており、グルタチオンもメラニン合成阻害効果のある物質の1つである。

生体内におけるグルタチオンの生理活性は、グルタチオン抱合として知られる解毒機構や抗酸化物質としての作用などが知られているが、グルタチオンがメラニン合成阻害を引き起こすメカニズムについては、明らかにされていない。本研究では、グルタチオンがメラニン合成を阻害するメカニズムについて解析を行った。

メラニンは L-DOPA とチロシナーゼとの反応によって試験管内で合成することが可能で、メラニン合成反応が進行すると OD490 nm の値が上昇することが知られている。⁸⁾メラニン合成反応液にグルタチオンを加え、OD490 nm の変化を測定したところ、グルタチオン未添加群では、OD490 nm 値が上昇することから、メラニン合成の進行が示唆された (Fig. 1). 一方、グルタチオン添加群では、OD490

nm 値が、グルタチオン濃度依存的に抑制されており、グルタチオンがメラニン合成反応を抑制している事が明らかになった。さらに、グルタチオンによるメラニン合成阻害メカニズムを解析する目的で、グルタチオンによるメラニン合成阻害効果と反応液中の L-DOPA 濃度との関係について検討を行った。その結果、Fig. 2 に示したように、グルタチオンによるメラニン合成阻害効果は、反応液中の L-DOPA 濃度を上昇させることで阻害され、メラニン合成の回復が認められた。また、グルタチオンによるメラニン合成阻害が、反応液中のチロシナーゼ濃度を上昇させることで回復できるか否かの検討を行ったが、メラニン合成反応液に含まれるチロシナーゼ濃度 (53.7 units/ml) を 10 倍増加させても、グルタチオンによるメラニン合成阻害状態は回復できなかった。これらの結果から、グルタチオンは、メラニン合成反応液中の L-DOPA に作用し、L-DOPA とチロシナーゼとの反応を阻害していることが推察された。そこで、L-DOPA とチロシナーゼの結合性に及ぼすグルタチオンの影響を Affinix Q を用いて解析した。その結果、L-DOPA とグルタチオンの結合が、グルタチオンの存在下では 90% 以上阻害されることが明らかとなり、酵素と基質の親和性の低下がメラニン合成阻害の要因であることが示唆された。

L-DOPA とチロシナーゼの反応では、ドーパキノンが生成され、これが酸化・重合することによりメラニンが生成される。本実験で使用したメラニン合成反応でも、L-DOPA とチロシナーゼを混和後、およそ 30 分後に反応液の OD490 nm 値はピークに達し、その後、黒色のメラニン凝集物が形成された (data not shown)。メラニン凝集物は、色素沈着によるしみ、そばかすの原因になることが予想され、メラニン凝集を阻害することは、メラニン生成阻害と同様に、しみ、そばかすの発生を抑制する重要な作用と考えられる。そこで、グルタチオンのメラニン凝集阻害効果についても検討を行った。L-DOPA とチロシナーゼによるメラニン合成反応の開始し、メラニン分子の重合が始まる段階 (反応開始 30 分後) に、グルタチオンを添加し、メラニン凝集物の生成状態を測定した。その結果、グルタチオン非存在下では、反応液を遠心して得られる上清中の OD490 nm 値が経時的に減少しており、反応

液中でメラニン凝集物が生成されていることが明らかになった (Fig. 3)。一方、グルタチオンを添加した反応液の遠心上清では、OD490 nm 値の減少は認められず、メラニン凝集物の生成が、グルタチオンによって阻害されていることが明らかになった。

L-システインやグルタチオンなどの含硫化合物は、チロシナーゼや L-DOPA がチロシナーゼを介して生成される DOPA キノンに化学的に反応することが知られており、⁹⁾ グルタチオンが DOPA キノンに結合することによって、メラニンの生成を阻害している可能性が示唆されるが、本研究では、その詳細を明らかにすることはできなかった。

グルタチオンは、食品中から摂取する以外に、細胞内でも生成される成分であるが、その体内生産量は加齢に伴い低下する。¹⁰⁾ 高齢者では、しみ、そばかすの発生部位が増加する傾向があるが、その原因の 1 つは、グルタチオン産生能の低下が関係していることが推察された。近年、人間の平均寿命が長くなり、若々しい容姿を保つことも健康的な生活を送る上で重要な項目となってきている。これまでは病気を治す医薬品の開発を目的とした研究が中心に行われてきたが、グルタチオン等のアンチエイジングに有効と思われる因子についても、精神衛生面の健康増進を促す薬品として、今後検討されるべきであると考えられる。

REFERENCES

- 1) Fukui S., Uematsu K., Suzuki K., Hirayama A., Ouma M., KANGAERU EISEIKAGAKU, Hirokawa Shoten Co., 2002, pp. 367-414.
- 2) Benathan M., *Arch. Dermatol. Res.*, **289**, 341-346 (1997).
- 3) Shimizu H., ATARASHI HIHUKAGAKU, Nakayama Shoten Co., 2005, pp. 9-11.
- 4) Qiu L., Zhang M., Sturm R. A., Gardiner B., Tonks I., Kay G., Parsons P. G. *J. Invest. Dermatol.*, **114**, 21-27 (2000).
- 5) Kasemura K., Nomura M., Tada T., Fujihara Y., Shimomura K., *J. Oleo Sci.*, **51**, 637-642 (2002).
- 6) Motoki Y., Fujita S., Fujihara Y., Okada O., Nomura M., *J. Oleo Sci.*, **52**, 495-498 (2003).
- 7) Maeda K., Fukuda M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 765-769 (1996).

-
- 8) Sato K., Takahashi H., Iraha R., Toriyama M., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 33–37 (2008).
- 9) Naito K., Hatani T., Okada T., Tehara T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 15–20 (2006).
- 10) Toroser D., Sohal R. S., *Biochem. J.*, **405**, 583–589 (2007).