

シーケンシャルインジェクション分析を用いた酵素阻害活性の測定 -マッシュルーム由来のチロシナーゼ阻害活性-

高知大学地域連携推進センター 土佐フードビジネスクリエーター人材創出事業

特任講師 中島悦子

キーワード シーケンシャルインジェクション(SI)分析法、分光光度計、チロシナーゼ、阻害活性

1. はじめに

近年、シーケンシャルインジェクション分析(Sequential Injection Analysis: 以下 SI 分析法)を応用し、より省力化した酵素の阻害活性測定方法の開発が進んでいる。今回、メラミン産生酵素であるチロシナーゼの阻害活性の評価方法の開発事例を紹介したい¹⁾。

チロシナーゼはフェノール化合物の酸化を触媒し、果物や野菜の褐変や、肌への色素沈着の原因ともなる。そのため、食品産業、さらには美容・医療分野において、チロシナーゼ阻害の必要性が増している。

手法開発にあたって、チロシナーゼ阻害活性は、マッシュルーム由来物を用い、一般的に知られている抗酸化物質(ケセルチン、コウジ酸等)を用いて、チロシナーゼ阻害活性を測定した。開発した SI 分析法を、従来法(以下バッチ法)と比較し、精度を評価した。

2. 評価方法

チロシナーゼは、3,4-dihydroxyphenylalanine(以下 L-DOPA)の酸化反応を触媒し、*o*-ドーパキノン(波長 475 nm)を分光光度計で定量し、阻害活性の評価とした。用いた SI 分析法の装置の概要を図 1(a)、保持コイル内の溶液のシーケンス例を図 1(b)に示す。*o*-ドーパキノンは、チロシナーゼ阻害活性に対して反比例関係にあり、*o*-ドーパキノンの検出が低いほどチロシナーゼ阻害活性が高い。その阻害割合を式 1 で算出した。

$$\text{阻害割合 (\%)} = 100 \times (A_0 - A) / A_0 \quad (\text{式 1})$$

A_0 : 阻害剤がない場合のピーク高さ、 A : 阻害剤がある場合のピーク高さ

また、抗酸化物質ごとに 50%阻害時の阻害剤濃度を算出した(以下 IC_{50} 値)。7 回の測定により得られた IC_{50} について、SI 分析法とバッチ法で比較した

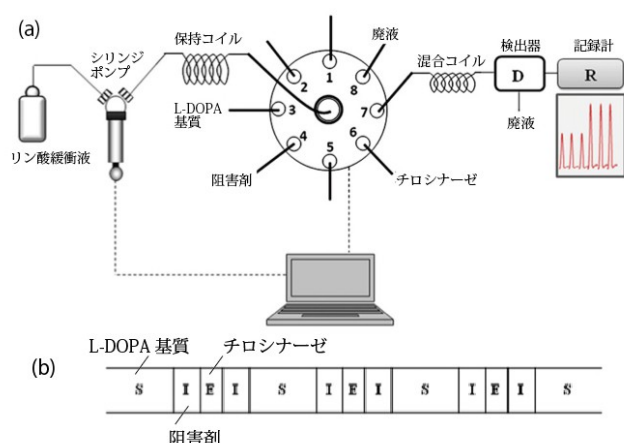


図 1. (a) SI 分析の装置概要 (b) 溶液のシーケンス例

3. 結果と考察

分析手法の開発に取り組んだ結果、表 1 のように、最適条件を決定した。とくに、チロシナーゼ溶液量は、高価な酵素の使用量が少なくても、十分な感度が得られる条件を選択した。また、阻害剤を用いて SI 分析法とバッチ法を比較した結果、得られた IC_{50} 値は互いに良い相関関係にあった(表 2)。よって、今回開発した SI 分析法は操作が簡便で、精度が高く、試薬を節減し、廃液も低減できる画期的な手法といえる。今後さらに農業分野や天然物分野での活用が大きく期待される。

表 1. SI 分析法における最適条件の検討結果

条件	検討範囲	採択条件
L-DOPA 基質濃度 (mM)	0-5.0	2.0
L-DOPA 溶液量 (μL)	60-200	60
チロシナーゼ濃度 (U mL ⁻¹)	0-248	142
チロシナーゼ溶液量 (μL)	15-90	15
反応時間 (秒)	0-40	0

表 2. 抗酸化物質を用いたチロシナーゼ阻害活性の比較

抗酸化物質	IC_{50} 値 (μM)	
	SI 分析法	バッチ法
ケセルチン	74.8 ± 5.1	43.4 ± 1.3
ケンペロール	177.1 ± 2.5	176.9 ± 6.1
エビカテキン没食子酸塩	233.5 ± 12.5	289.6 ± 27.6
エビガラカテキン	85.7 ± 1.6	80.3 ± 2.0
エビガラカテキン没食子酸塩	105.5 ± 0.8	97.2 ± 0.2
アニスアルデヒド	258.1 ± 8.1	279.3 ± 9.0
コウジ酸	10.1 ± 0.1	14.2 ± 0.3
アスコルビン酸	36.1 ± 1.7	34.7 ± 1.4

4. 参考文献

- 1) Moonrungeesee, N., Shimamura, T., Kashiwagi, T., Jakmunee, J., Higuchi, K., Ukeda, H. : Sequential injection spectrophotometric system for evaluation of mushroom tyrosinase-inhibitory activity. *Talanta*, **101**, 233-239(2012). 同様の手法でチアミン酸化酵素阻害活性の評価方法も報告されており、以下もぜひ参照されたい。
Moonrungeesee, N., Shimamura, T., Kashiwagi, T., Jakmunee, J., Higuchi, K., Ukeda, H. : An automated sequential injection spectrophotometric method for evaluation of tyramine oxidase inhibitory activity of some flavonoids. *Talanta*, **122**, 257-263 (2014).