

マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) 子実体 (鹿角霊芝) 由来 メラニン合成抑制物質

畠 恵司^a, 堀 一之^{*a}, 三浦 直子^b, 坂本 賢二^b, 高橋 砂織^a

^a秋田県総合食品研究所、^b坂本バイオ

Inhibitor of Melanin Synthesis from the Fruiting Bodies of *Ganoderma lucidum* (Rokkaku-Reishi)

Keishi Hata^a, Kazuyuki Hori^{*a}, Naoko Miura^b, Kenji Sakamoto^b and Saori Takahashi^a

^aAkita Research Institute of Food & Brewing (ARIF), 4-26 Sanuki, Araya-machi, Akita 010-1623, Japan

^bSakamoto-Bio, 25 Kourokuzawa, Memeki, Yuwa-machi, Kawabe-gun, Akita 010-1233, Japan

(Received August 27, 2001)

MeOH extracts of *Ganoderma lucidum* showed the inhibitory effect on melanin biosynthesis of a mouse melanoma cell line, B16 10F7. We isolated an active compound from the extract. Physical and chemical data of the active compound were identical with those of ergosterol peroxide (**1**). Compound **1** suppressed the melanin pigment accumulation of B16 10F7 cells over 1 µg/ml. However, ergosterol, one of the typical steroids in mushrooms, did not show a marked inhibitory effect on the B16 10F7 cell melanogenesis at the same concentrations.

Key words: *Ganoderma lucidum*, Ergosterol peroxide, Whiteness, B16 cells

霊芝 (=マンネンタケ, *Ganoderma lucidum*) の生理機能に関する研究例は多く、これまで免疫賦活作用、抗癌作用、血圧降下作用等報告されている¹⁾。また霊芝はその条件により種々の形態のものが栽培でき、その形態が“鹿の角”に似ているものは鹿角霊芝と呼ばれ、販売されている。我々は鹿角霊芝に関する種々の生理活性について研究を行っており、霊芝同様に抗腫瘍作用或いは高血圧抑制作用について *in vitro* 及び *in vivo* の試験により、その効果を確認している^{2,3)}。また、この他の生理活性としてマウスメラノーマ細胞のメラニン合成抑制活性が、鹿角霊芝 MeOH 抽出液に認められたことを既に報告した⁴⁾。

肌の日焼け、シミの原因となるメラニン色素沈着は、紫外線照射により肌の基底膜に存在するメラノサイトからメラニン色素が放出され、沈着することで生じる。

メラニン合成酵素のひとつである tyrosinase が関与する L-tyrosine から DOPA chrome への変換はメラニン合成経路の律速段階と考えられ、これまで本酵素の阻害剤の探索研究が多くなされている^{5,6)}。一方、動物細胞を用いたメラニン産生抑制のモデルとしてはマウスメラノーマ細胞株 B16 が一般的に使用されている。B16 メラノーマ細胞を用いた評価系はメラニン合成酵素群に対する阻害活性とこれら酵素群発現抑制活性を総合的に判断できる利点がある⁷⁾。我々は既報において B16 細胞より高メラニン色素産生株 (B16 10F7) を選抜し、メラニン合成抑制能について秋田県産山菜についてスクリーニングを行い、数種の山菜抽出液にその効果を認めてきた⁸⁾。本研究では先に活性を認めた鹿角霊芝 MeOH 抽出物より、メラニン合成抑制活性を指標に活性物質の単離を行った。構造解析の結

果、活性物質は ergosterol peroxide (**1**)であることが判明した。

実験材料及び方法

1. 材料及び使用細胞株実験

鹿角霊芝子実体は坂本バイオ社 (株)で栽培したものを用いた。

マウス B16 メラノーマ細胞由来高メラニン生産株 B16 10F7⁸⁾は 10%牛胎児血清を添加したダルベッコ変法イーグル培地で培養した。B16 10F7 細胞のメラニン含量は、24 穴培養ウエルに 1N NaOH 溶液 (300 μ l)を加え 60 分間室温放置することで、細胞内メラニン色素を溶解させ、470 nm の吸収を測定することにより定量した。

2. 鹿角霊芝由来メラニン合成抑制物質の単離

鹿角霊芝乾燥品 (350 g)をメタノール (5 L)とともに破碎し、濾過後抽出液を得る。この操作を計 5 回繰り返して、得た抽出液を減圧乾固した (15.7 g)。この MeOH 抽出物について CHCl₃-MeOH-H₂O (4: 4: 3)の溶媒系で分液処理を行ったところ、CHCl₃ 抽出物 (下層)に活性が検出された。この画分を減圧乾固 (10.8 g)し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。CHCl₃-MeOH (20:1)で溶出された 5 画分について活性測定を行った結果、fraction 2 に活性が検出された。この画分を減圧乾固させ (3.2 g)さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、*n*-hexane-AcOEt (10:1), (5:1), CHCl₃-MeOH (20:1)で順次溶出した。メラニン合成抑制活性は CHCl₃-MeOH で溶出される画分に検出された。また、*n*-hexane-AcOEt (5:1)溶出画分からは ergosterol (**2**)が濃縮後 MeOH による結晶化により得られた (380.7 mg)。活性画分を回収し、減圧乾固後 (610.0 mg)、Cosmosil 75C₁₈ (Nakali tasque)による逆層カラムクロマトグラフィーでさらに分離を行い、MeOH で溶出された画分から活性物質として **1** を得た (57.6 mg)。

3. 各種データ及びスペクトル測定条件

データ及びスペクトル取得に関しては以下の装置を用いた。旋光度: 日本分光 DIP-1000 型デジタル旋光計 (セル長 5 cm の円筒型, 石英セル使用)。NMR: Varian Unity 400 型スペクトロメーター [¹H: 400 MHz, ¹³C: 100

MHz, tetramethylsilane (TMS)を内部標準として化学シフトを δ 値として示した]。IR: 日本分光 FT-IR 300 型フーリエ変換赤外分光計 (KBr 粉末上での拡散反射法)。EI-MS: 日本電子 JMS-BU 20 型高分解能ガスクロマト質量分析装置。

4. 活性物質 **1** のメラニン合成抑制作用

予め MeOH に溶解させた **1** あるいは **2** を 1~10 μ g/ml になるよう B16 10 F7 細胞 (1×10^5 cells/ml, 1 ml) の培養液に添加し 72 時間培養後、細胞数及びメラニン含量を測定した。

結果

1. 鹿角霊芝由来メラニン合成抑制物質 **1** の化学構造

得られた化合物 **1** の物理データスペクトルは以下の通りであった。Amorphous powder. $[\alpha]_D^{26} -21.6^\circ$ (*c* 0.10, EtOH)。IR λ_{\max} および (KBr) cm^{-1} : 3500- 3200, 2954, 2871, 1710, 1454, 1376, 1074, 1043, 1026, 967。High resolution EI-MS *m/z*: 428.3303 (Calcd for C₂₈H₄₄O₃: 428.3290)。EI-MS *m/z*: 428 (M^+), 410, 396, 376, 363, 250。¹H NMR (CDCl₃) δ : 0.81- 0.84 (9H, m, methyls), 0.89 (3H, s, 19-H₃), 0.92 (3H, d, *J*=5.2 Hz, 28-H₃), 1.01 (3H, d, *J*=6.5 Hz, 21-H₃), 3.97 (1H, m, 3 α -H), 5.15 (1H, dd, *J*=15.2, 8.0 Hz, 23-H), 5.23 (1H, dd, *J*=15.2, 7.2 Hz, 22-H), 6.25 (1H, d, *J*=8.8 Hz, 6-H), 6.54 (1H, d, *J*=8.8 Hz, 7-H)。¹³C NMR (CDCl₃) δ : 12.86 (q, C-18), 17.54 (q, C-28), 18.45 (q, C-19), 19.61 (q, C-27), 19.92 (q, C-26), 20.62 (t, C-11), 20.87 (q, C-21), 23.39 (t, C-15), 28.61 (t, C-12), 30.12 (t, C-2), 33.06 (d, C-25), 34.70 (t, C-1), 36.94 (t, C-4), 36.97 (s, C-10), 39.35 (t, C-12), 39.68 (d, C-20), 42.77 (d, C-24), 44.56 (s, C-13), 51.12 (d, C-9), 51.69 (d, C-14), 56.22 (d, C-17), 66.43 (d, C-3), 79.41 (s, C-5), 82.14 (s, C-8), 130.73 (d, C-7), 132.32 (d, C-23), 135.19 (d, C-22), 135.41 (d, C-6)。

1 は Liebermann-Buchard 反応及び TLC での加熱呈色反応などからステロイド化合物であることが示唆され、UV 吸収は認められなかった。そこで、鹿角霊芝より単離し、その化学構造を確認した **2** と **1** を比較したところ、EI-MS から求められる分子式は、**2** の分子式 (C₂₈H₄₄O) より酸素原子 2 分子多い結果が得られた。IR スペクトルでは、新たに 967 cm^{-1} にペルオキシド由来

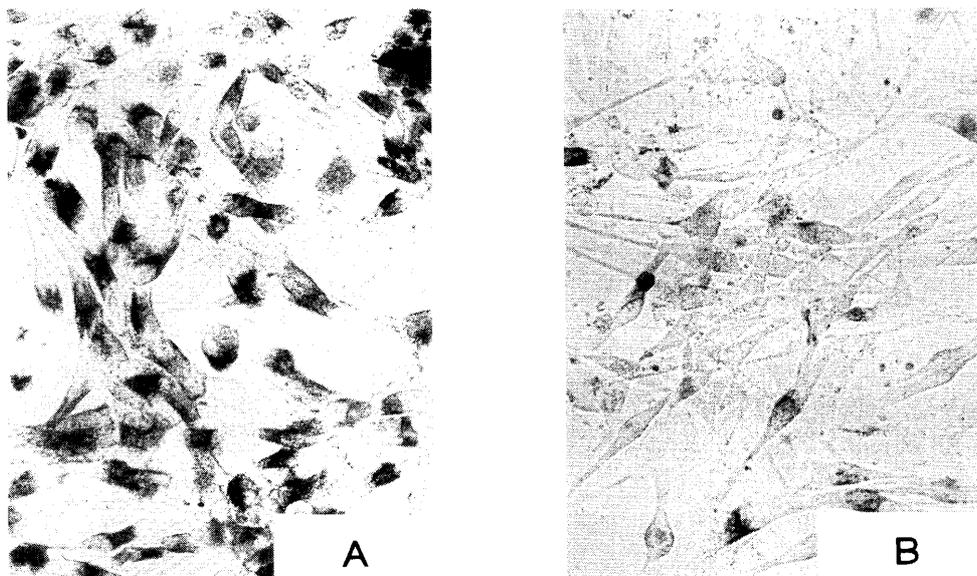


Fig. 1 Photomicrographs of B16 10F7 Cells Treated without (A) or with (B) 2 µg/ml of **1** for 72 h.

と推定される吸収が現れ、また ^1H , ^{13}C NMR スペクトルで、**2**における5-8位部分のシス共役ジエン構造部分に代わって δ 6.25, 6.54 ppm (^1H), δ 130.73, 135.41 (^{13}C) にZ体の幾何異性を有する二重結合由来のシグナルがそれぞれ認められた。以上から、**1**は**2**の5,8位間にペルオキシ構造を、また6,7位間に二重結合を有する ergosterol peroxide [= 5 α ,8 α -epidioxy-(22E,24R)-ergosta-6,22,-diene-3 β -ol]と推定されたので、文献記載値との比較^{9,10}およびH-H COSY, C-H COSYならびに HMBCの各 NMR スペクトルの詳細な検討を行い、**1**が ergosterol peroxideであることを確認した。

2. **1**による B16 10F7細胞メラニン合成抑制能

B16 10F7細胞はメラニン色素の沈着が顕微鏡下で容易に検出可能な細胞株である (Fig 1 A)。この細胞に **1** (2 µg/ml)を添加し72時間培養することにより、メラニン色素沈着の抑制が観察された (Fig.1 B)。そこで、メラニン色素合成に有効な**1**の濃度を調べるため、各濃度の**1**と共にB16 10F7細胞を72時間培養し、細胞内メラニン含量を定量した。無添加の区と比較して、1 µg/mlの**1**によりB16 10F7細胞のメラニン合成能は40.6%、2 µg/ml添加により9.2%まで減少した (Fig. 2 A)。しかし、5 µg/ml以上の濃度ではB16 10F7細胞の増殖阻害が認められた。

本研究において**1**についてメラニン合成抑制作用が認められたため、**1**の類似化合物で同時に単離した**2**

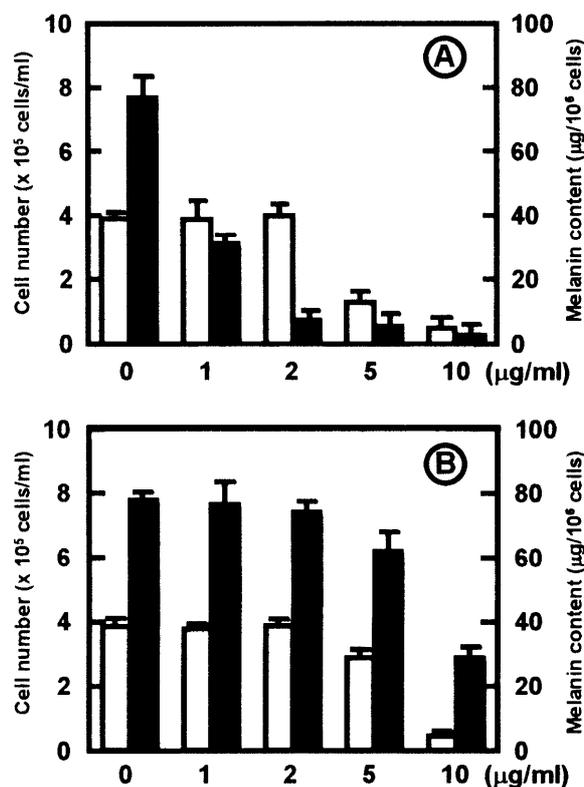


Fig.2 Effects of **1** (A) and **2** (B) on the Melanin Synthesis of B16 10F7 Cells
Following treatment with each steroidal compounds for 72 h, the cell growth (□) and melanin content (■) were measured.

の B16 10F7 細胞メラニン合成抑制能についても併せて検討した。Fig. 2 B に種々の濃度の **2** を B16 10F7 細胞培養液に添加し、メラニン含量及び細胞増殖に対する影響を調べた結果を示す。**2** は 2 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度域で B16 10F7 細胞の増殖及びメラニン合成のいずれも阻害しない結果が得られた。また、5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度ではメラニン合成抑制活性が認められたが、**1** と比較してその活性は低く、細胞増殖抑制も認められた。

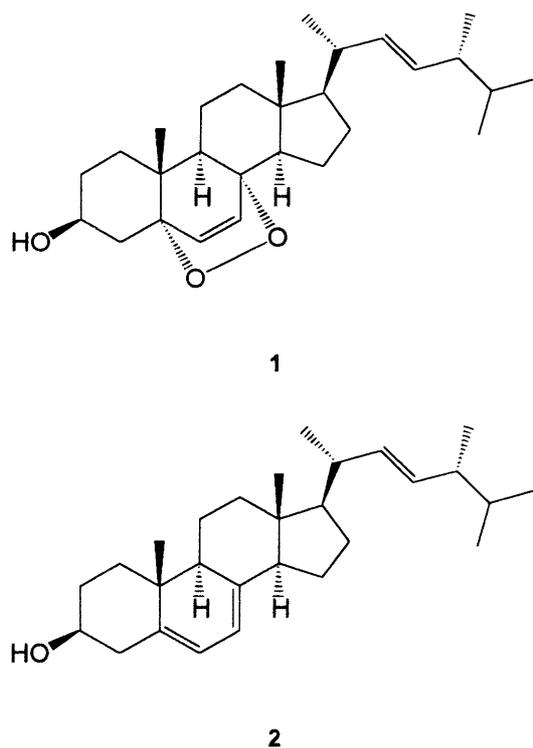


Chart 1

考察及び結論

既報において、B16 10F7 細胞を用いた *in vitro* の評価で鹿角霊芝 MeOH 抽出物にメラニン合成抑制活性を見出している⁴⁾。本研究においては鹿角霊芝の MeOH 抽出物より、B16 10F7 細胞のメラニン合成抑制能を指標に主たる活性物質である **1** を単離した。**1** の単離に関しては、マイタケ (*Grifola frondosa*) 子実体等から報告があるが¹¹⁾、生理活性に関する研究例はない。**1** は 1 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度域で同細胞のメラニン合成抑制活性を示し、これは市販の美白剤であるアルブチンと比較しても、より低濃度で活性を示すものであ

る⁸⁾。

類似の構造を有する **2** と比較した結果、**2** は **1** に比べ、ほとんど B16 10F7 細胞のメラニン合成抑制活性を示さなかった。この結果より、活性発現には B 環 5 位と 8 位の間のペルオキシ構造が重要な役割を担っていると推察される (Chart 1)。

今後は *in vivo* での **1** の美白効果を検討する予定である。

引用文献

- Mizuno T., Kawai M. (eds.), "Kinoko no Kagaku Seikagaku" Gakkai Syuppan Center, 211-221 (1992)
- Miura N., Hatakeyama S., Tsujimura N., Sakamoto K., *Res. Commun. Pharmacol. Toxicol.*, **5**, 191-194 (2000)
- Kagaya Y., Hatakeyama S., Goto T., Miura N., Tsujimura N., Sakamoto K., *Res. Commun. Pharmacol. Toxicol.*, **6**, 135-138 (2001)
- Miura N., Hata K., Hatakeyama S., Tsujimura N., Sakamoto K., *Res. Commun. Pharmacol. Toxicol.*, **5**, 175-178 (2000)
- Matsuda H., Higashino M., Nakai Y., Inuma M., Kubo M., Lang F. A., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 153-156 (1996)
- Tazawa S., Tateshina R., Noro T., *Nat. Med.* **55**, 111-118 (2001)
- Matsukami M., *Kousyou Kaishi* **19**, 14-19 (1995)
- Hata K., Iwahori Y., Hori K., Okada Y., Okuyama T., *Nat. Med.*, **54**, 144-147 (2000)
- Voigt B., Schmidt J., Adam G., *Z. Chem.*, **25**, 405-406 (1985)
- Sheffer M., Fried A., Gottlieb H. E., Tets A., Avron M., *Biochim. Biophys. Acta.*, 857, 165-172 (1986)
- Ishizuka T., Yaoita Y., Kikuchi M., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1756-1760 (1997)