

島根県ブドウ品種「神紅」の副梢エキスが有する肌に対する機能性評価

室田佳恵子^{1*}, Rahman Mohammad Shahidur¹, 多田明弘², 宮崎博隆²

Potentials of agricultural wastes of ‘Shinku,’ a new red grapes cultivar in Shimane Prefecture utilizing in skin care cosmetics

Kaeko Murota¹, Rahman Mohammad Shahidur¹, Akihiro Tada² and Hiroataka Miyazaki²

Abstract Effective utilization of agricultural wastes derived from local products is an important issue. In this study, we evaluated the potential activities of the lateral shoot extract of ‘Shinku,’ a new red grapes cultivar in Shimane Prefecture, which are discarded during cultivation. To utilize the extract in skin care cosmetics, DPPH radical scavenging activity and the inhibition of tyrosinase activity were determined. The relative DPPH radical scavenging activity to total polyphenol concentration of the lateral shoot extract were higher than those of the pruned cane and the fruit extracts. There were little differences among different grape cultivars, Shinku, Shine Muscat and Delaware, in the radical scavenging activity of their lateral shoot extracts. The extracts also showed the inhibitory effect against mushroom-derived tyrosinase activity with L-tyrosine and L-DOPA as substrates. The extract of Shinku showed the highest inhibitory effects among three cultivars. Quercetin was detected as its glycosides in the extracts and assumed as active antioxidant compounds. These results indicate that the lateral shoot extracts of Shinku and other grape cultivars are promising antioxidant materials.

Keywords: agricultural wastes, polyphenols, radical scavenging activity, Shinku, tyrosinase

はじめに

植物は多様な機能性化合物（フィトケミカル）を含み、これらは機能性食品や化粧品などの活性成分として様々なところで利用されている。「神紅」はベニバラードとシャインマスカットを交配して島根県が開発した大粒・赤色系ブドウの新品種である（坂本ら 2020）。ブドウの生産過程においては、剪定枝、副梢、摘果などが廃棄されるが、このような農作物生産過程での廃棄物を未利用資源と捉え、有効成分を探索することはSDGsの観点から重要である。

我々は、島根県農業技術センターの協力のもと、産学官共同研究として地域資源の有効利用を目指した。ヒトは日常的に太陽光線を浴びており、特に肌は紫外線に由来する酸化ストレスに曝露されている。紫外線曝露によって生じる一重項酸素やその他の様々な活性酸素種（ROS）はマトリックスメタロプロテイナーゼを活性化させ、その結果コラーゲンの分解が亢進することが肌のシワ・たるみなどの光老化の原因となる（寺尾 2016）。また皮膚に局在するメラノサイトは、酸化ストレスに対する生体防御反応としてメラニンを生合成するため日焼けやシミが生じる。メラニンはポリフェノールオキシダーゼであるチロシナーゼによりチロシンが酸化される反応を起点として生合成される。すなわち過度のメラニン合成を抑制する美白作用もまた、抗酸化作用の一種である。

¹ 島根大学生物資源科学部生命科学科

² POLA イノベーションセンター

* Corresponding author: murota@life.shimane-u.ac.jp

本研究においては、「神紅」の栽培過程で廃棄される未利用資源の有効活用を目指し、肌に対する機能性に関連した指標として抗酸化作用に着目した。未利用資源の中でも副梢から得られる抽出液に注目し、ラジカル捕捉活性およびメラニン合成を引き起こすチロシナーゼ活性に対する阻害作用を評価して、抗酸化成分素材としての有用性を見出したので報告する。

材料と方法

ブドウ未利用資源由来抽出液

神紅由来の剪定枝、副梢、果実の乾燥細片を 50%エタノールに重量比 30%で浸漬し 20~25°C で 1 ヶ月抽出したものを抽出液として用いた。また、シャインマスカット、デラウェアの副梢についても同様に抽出液を調製した（いずれもアルデバラン株式会社）。神紅由来の副梢抽出液については、その他の抽出液を入手する際にその都度新しいロットを入手したため、以降は入手順に抽出液に Lot 1~3 を付記した。総ポリフェノール (total polyphenol, TPP) 濃度は Folin-Ciocalteu 法 (Singleton *et al.* 1999) を用いて定量した。標準物質には没食子酸を用いた。

ブドウ未利用資源由来抽出液の有する抗酸化活性評価

抽出液が有する抗酸化性の指標の 1 つとして、DPPH ラジカル捕捉活性 (Blois 1958) を測定した。神紅由来の剪定枝、副梢、果実、シャインマスカットおよびデラウェア由来副梢を用いた抽出液について、標準物質として用いたアスコルビン酸当量に換算したラジカル捕捉活性を算出した。

チロシナーゼ活性阻害作用は、酵素としてチロシナーゼ (マッシュルーム由来) を、基質として L-チロシンおよび L-DOPA を用いて実施した (豊川ら 2008 の方法を改変)。神紅、シャインマスカット、デラウェアの副梢抽出液を 50%エタノールで 10 倍以上希釈して TPP 濃度を一定にした。最も濃度が低かったデラウェア抽出液の 10 倍希釈液 (TPP 0.74 mg/ml) に揃え、他 2 種の抽出液は総ポリフェノール濃度が同じになるように 15 倍程度希釈した。基質である L-チロシンあるいは L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (L-DOPA) に対してチロシナーゼ酵素を添加する直前に、これらの希釈液を添加して 10 min 反応後、直ちに 475 nm の吸光度を測定した。メラニン生成が抑制

されたかどうかは吸光度の変化により評価した。ポジティブコントロールとしてアスコルビン酸溶液を使用し、同様の実験を行った。

副梢抽出液に含まれるポリフェノール化合物の推定

副梢抽出液中のポリフェノール化合物は HPLC-ダイオードアレイ検出器 (SPD-M40 Diode array detector, SHIMADZU) を用いて定性分析した。10 倍程度に希釈した抽出液を methanol/acetic acid 混合液 (100:5, v/v) と等量で混合した後、15,000 rpm で 10 min 遠心した上清を分析用サンプルとした。また、抽出液の 10 倍希釈液を 1 mL 採取し、1 N 塩酸を 1 mL 加えた後、フタ付耐熱試験管とヒートブロックを用いて約 100°C で 1 時間加熱して酸加水分解を実施した。その後 1 N 水酸化ナトリウム溶液を 1 mL 加えて中和した。加水分解液を methanol/acetic acid 混合液と等量混合した後遠心して不溶物を除去し分析用サンプルとした。また加水分解前の原液を生理食塩水を用いて加水分解液と同等に希釈したものについても同様に行い、プロファイルの比較を行った。HPLC 分析は Sakakibara ら (2003) の方法を一部改変して実施した。逆相カラム (TSK gel ODS-80Ts (4.6×150 mm) (東ソー)) を用いて移動相 A (methanol/H₂O/acetic acid (10:88:2, v/v/v)) と移動相 B (methanol/H₂O/acetic acid (70:28:2, v/v/v)) によるグラジエント溶出系 (流速 1.0 ml/min) にて実施した。溶出プログラムは以下の通りである: 0-5 min (A 100%), 20 min (A 70%), 50 min (A 65%), 70 min (A 60%), 95 min (A 0%), 95.1-105 min (A 100%)。

統計処理

定量データは平均値±標準偏差として示した。部位の異なる抽出液間、また品種の異なる抽出液間の統計処理は ystat2002 (医学図書出版株式会社) を用いて non-repeated ANOVA ならびに post hoc test (Student-Newman-Keuls test) により実施した。P<0.05 以下を有意差とみなした。

結果と考察

ブドウ未利用資源由来抽出液の DPPH ラジカル捕捉活性の比較

神紅の副梢、剪定枝、乾燥果実の抽出液について、TPP 濃度と DPPH ラジカル捕捉活性を測定した結果を表 1 に

示した。TPP 濃度とラジカル捕捉活性はいずれも副梢で最も高く、これに対して、剪定枝は約 1/2、果実は約 1/8 の TPP 値を示した。抗酸化力の強弱は含有するポリフェノール総量に依存することが示唆された。副梢抽出液（以下副梢エキスとする）の Lot 1 および 2 の差は見られなかった。DPPH ラジカル捕捉活性はポリフェノール濃度と同様の順に活性が高いことが確認され、抽出液のラジカル捕捉活性は部位に関わらず TPP 濃度に依存することが示された。これらの結果を元に TPP に対するラジカル捕捉活性（比活性）を算出したところ、副梢からの抽出物は、剪定枝や果実の抽出液よりもポリフェノール濃度、ラジカル捕捉活性が高いたく、比活性の高いポリフェノールを多く含むと考えられた。

ブドウの品種の違いによる副梢抽出液の抗酸化活性の比較

次にブドウ品種による影響を比較するため、シャインマスカットとデラウェアから得られた副梢エキスについて、同様に総ポリフェノール量、ラジカル捕捉活性を測定した（表 2）。

神紅サンプルについては、これ以前に用いた 2 ロット

よりもポリフェノール濃度、ラジカル捕捉活性ともに低かったが、比活性については同等以上の結果となった。シャインマスカット抽出液中の濃度と活性は、神紅抽出液よりやや低い程度であったが、デラウェアサンプルでは、いずれも有意に低い値となった。一方で、比活性については、いずれも同程度の値が得られた。

副梢エキスの抗酸化性が他の部位よりも高いことが示されたため、次にチロシナーゼ活性阻害作用を評価した。チロシナーゼは L-チロシンから L-DOPA への酸化反応を触媒するモノフェノラーゼ活性（クレソラーゼ活性ともいう）と、L-DOPA を酸化して L-DOPA キノンを生成するジフェノラーゼ活性（カテコラーゼ活性）を示すことが知られている。本研究では L-チロシンと L-DOPA をそれぞれ基質としたときの着色を測定し、副梢エキスのチロシナーゼ活性への影響を検討した。

図 1 には L-チロシンを基質とするモノフェノラーゼ反応における着色の比較を、図 2 には L-DOPA を基質とするジフェノラーゼ反応による着色の比較を示した。モノフェノラーゼ反応に対して副梢エキスはいずれも著しい阻害作用を示した。ジフェノラーゼ反応は酵素添加直後より着色が進行するため、10 min の反応後の着色の抑制

表1 神紅由来未利用資源抽出液の総ポリフェノール濃度とDPPHラジカル捕捉活性

	総ポリフェノール濃度 (没食子酸当量, mg/ml)	DPPHラジカル捕捉活性 (アスコルビン酸当量, mg/ml)	総ポリフェノール量あたり の比活性 (mg/mg)
副梢 (Lot 1)	15.9 ± 0.8 ^a	16.9 ± 0.9 ^a	1.06
(Lot 2)	16.1 ± 0.6 ^a	16.4 ± 0.5 ^a	1.02
剪定枝 (Lot 1)	2.19 ± 0.17 ^b	0.47 ± 0.03 ^b	0.216
果実 (Lot 2)	1.60 ± 0.11 ^b	0.56 ± 0.01 ^b	0.350

データは平均値±SDで示した（n=4-6, 異なる文字間に有意差あり, P<0.05）。

表2 3種のブドウ由来副梢エキスの総ポリフェノール濃度とDPPHラジカル捕捉活性

	総ポリフェノール濃度 (没食子酸当量, mg/ml)	DPPHラジカル捕捉活性 (アスコルビン酸当量, mg/ml)	総ポリフェノール量 あたりの比活性 (mg/mg)
神紅 (Lot 3)	10.4 ± 0.51 ^a	12.1 ± 1.23 ^a	1.16
シャイン マスカット (Lot 3)	9.65 ± 0.52 ^a	11.9 ± 1.47 ^a	1.23
デラウェア (Lot 3)	7.36 ± 0.52 ^b	8.77 ± 2.31 ^b	1.19

データは平均値±SDで示した（n=4-6, 異なる文字間に有意差あり, P<0.05）。

率はモノフェノラーゼの時よりも弱かったが、反応を観察したところ着色の開始が抑制されたものと考えられた。コントロール（抽出液添加なし）に比較して、副梢エキスの添加はいずれの品種においても有意な吸光度の低下を示し、チロシナーゼ活性に対する阻害作用を有することが示された。L-チロシンを基質とする場合とL-DOPAを基質とする場合では、着色の程度は吸光度で2倍程度であり、ジフェノラーゼ反応がより速やかに進行した。

3品種のブドウ抽出液の中では、神紅抽出液を添加した時に反応が最も抑制されていた ($P<0.05$)。副梢エキスは10-15倍希釈したものを使用したが、このときの最終TPP濃度は0.74 mg/ml (没食子酸当量)であった。これはDPPHラジカル捕捉活性に換算すると0.9 mg アスコルビン酸当量/mlとなることから、0.9 mg/ml アスコルビン酸溶液によるチロシナーゼ活性に対する阻害効果を比較として測定した。その結果、アスコルビン酸溶液はいずれの抽出液よりもさらに強い阻害作用（モノフェノラーゼ阻害率94%、ジフェノラーゼ阻害率66%）を示した。このことから、チロシナーゼに対する作用はラジカル捕捉活性とは異なる作用機序で発揮されていると考えられた。

副梢抽出液に含まれるポリフェノール化合物の推定

植物中でポリフェノールは主に配糖体として存在しており、その種類は多様のため化合物の同定は非常に困難である。そこで抽出液に対して塩酸加水分解を実施することで、グリコシド結合を切断し出現するアグリコンのピークを元に含有するポリフェノール分子の推定を試みた。神紅副梢エキスを未処理で分析したところ、低分子ポリフェノールやフラボノイド配糖体と推定される複数のピークと合わせて61 min付近にケルセチンアグリコンと推定される小ピークが検出された（図3）。抽出液を酸加水分解した結果、40 minにみられるピークなどいくつかのピークは減少あるいは消失し、ケルセチンと推定されるピークは増大した。このことから、神紅副梢エキスにはケルセチンが何らかの配糖体の形で含まれていることが示唆された。なお、今回の分析からはブドウに含まれる代表的な機能性成分であるレスベラトロールと推定されるピークは検出されなかった。

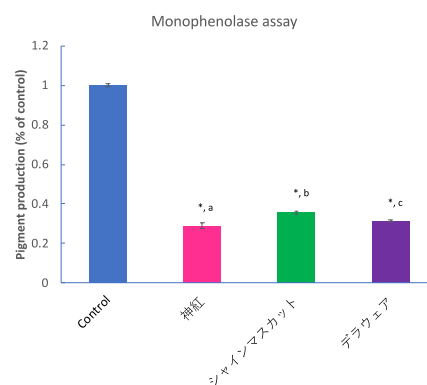


図1 チロシナーゼ活性に対する抽出液添加の影響

L-チロシンを基質としたモノフェノラーゼ反応により生じる着色をコントロールに対する相対値で示した。(n=3, *Controlに対して有意差あり, $P<0.05$ 。ブドウ品種間の異なる文字間に有意差あり, $P<0.05$)

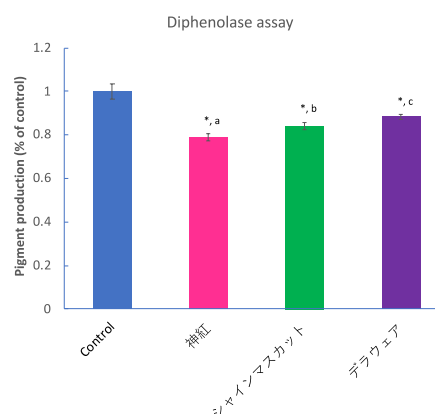


図2 チロシナーゼ活性に対する抽出液添加の影響

L-DOPAを基質としたジフェノラーゼ反応により生じる着色をコントロールに対する相対値で示した (n=3, *Controlに対して有意差あり, $P<0.05$ 。ブドウ品種間の異なる文字間に有意差あり, $P<0.05$)

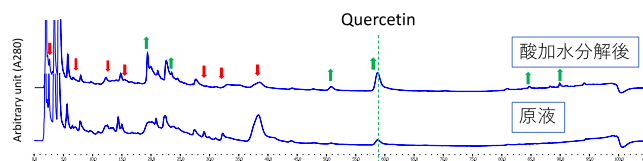


図3 神紅副梢エキスのHPLCクロマトグラム

Lot 1の抽出液に対する塩酸加水分解後と原液との比較を示した。ポリフェノール検出に一般的に利用される280 nmでのクロマトグラムを示している。酸加水分解で減少したピークを赤矢印で、増加したピークを緑矢印で示した。

次に、副梢エキスにはブドウ品種による違いがあるかを検討した。HPLCの分析結果より、いずれのブドウもケルセチン配糖体を含め、類似したポリフェノールを含んでいた(図4)。3品種の違いは分析前半に検出される極性が高い分子種にみられたが、著しい特徴などは示されなかった。

酸加水分解前後のクロマトグラム(図3)より、3品種の分析結果でいずれの品種でも検出されていたピークのうち、33 min 付近と 40 min 付近のピークに着目した。これらは酸加水分解により消失する主要なピークであり、ケルセチン配糖体を含んでいる可能性が高いと考えられた。そこで標準物質と比較したところ、33 min のピークはケルセチンの3位配糖体である quercetin-3-glucoside やルチン(quercetin-3-rutinoside)のピークが検出される保持時間とほぼ一致しており、糖鎖の種類は不明ながらもケルセチンの3位配糖体であると考えられる。3位配糖体は、フラボノイド B 環のカテコール構造が遊離して残されているために強い抗酸化性を示すことが知られており、これが副梢エキスの抗酸化性を担う活性分子の1つであると考えられた。

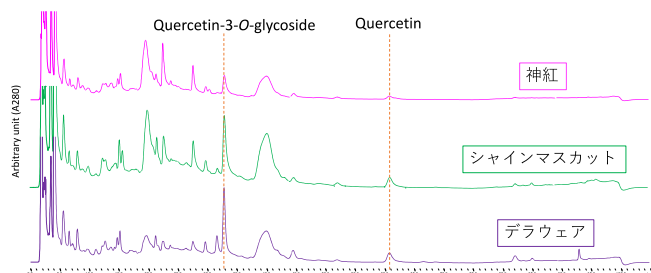


図4 3種のブドウ品種に由来する副梢エキスのHPLCクロマトグラム

ポリフェノール検出に一般的に利用される280 nmでのクロマトグラムを示している。標準物質であるケルセチンおよび、ケルセチン-3-グルコシドやルチン(ケルセチン3位配糖体として表記)が検出される保持時間を点線で示した。

まとめ

神紅副梢エキスは総ポリフェノール濃度、DPPHラジカル捕捉活性、ポリフェノールあたりのラジカル捕捉比活性が剪定枝や果実の抽出液よりも高かった。副梢エキスの総ポリフェノール濃度はブドウ品種により違いがみられたが、ポリフェノールあたりのラジカル捕捉比活性はほぼ同等であった。さらに、副梢エキスはチロシナーゼ

活性に対する阻害作用を有することが示された。チロシナーゼ阻害作用は神紅抽出液で最も強かったが、品種間の差異は小さかった。3品種全てにおいて、ポリフェノールの1つとしてケルセチン配糖体が含まれていることが示唆され、これが抗酸化性を発揮している主要な活性分子の1つであると考えられた。以上のことから、ブドウ副梢エキスは、抗酸化性物質を含む有効な未利用資源であることが示唆された。

謝辞

神紅および他品種ブドウ素材をご提供いただいた島根県農業技術センターの梅野康行様、片寄志帆様に感謝申し上げます。また、本研究成果を製品開発へ応用していただいた株式会社ポーラの重住久美子様ほか開発チームの皆様がこの場を借りて感謝申し上げます。

引用文献

- Blois, M. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**: 1199–1200.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K. (2003) Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 571–581.
- 坂本 太智, 倉橋 孝夫, 内田 吉紀, 安田 雄治, 持田 圭介, 中谷 美里, 梅野 康行, 姫宮 雅美, 杉山 万里 (2020) ブドウ新品種「神紅」の育成とその特性. 島根県農業技術センター研究報告, **47**: 29–38.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999) [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**: 152–178.
- 寺尾 純二 (2016) 生体における一重項酸素の生成と消去—酸化ストレスとの関わりを考える—. *ビタミン*, **90**: 525–536.
- 豊川 哲也, 与那嶺 都乃 (2008) 沖縄県産植物のチロシナーゼ阻害活性. 沖縄県工業技術センター研究報告書, **10**: 61–63.