

京野菜を中心とした野菜類の機能性：ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、コラゲナーゼ阻害活性

渡辺 克美*・佐藤 庸平**

*近畿大学農学部食品栄養学科

**京都府立桂高等学校

Functional properties of vegetables: hyaluronidase, elastase and collagenase inhibitory activity

Katsumi WATANABE* and Youhei SATO**

* *Department of Food and Nutrition, Faculty of Agriculture, Kindai University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan*

** *Kyoto prefectural Katsura senior high school, 27 Matsunokihonmachi, Kawashima, Kyoto 615-8102, Japan*

Synopsis

The hyaluronidase, elastase and collagenase inhibitory activities of twenty species of vegetables were measured to evaluate their anti-wrinkle and anti-inflammatory capabilities. Among the tested vegetables, Manganji pepper, Takagamine pepper and kohirabi had the high elastase inhibitory activity although high hyaluronidase and collagenase inhibitory activities were not detected. Manganji and Takagamine peppers are classified into the same genus (*Capsicum*). It suggested that Manganji pepper, Takagamine pepper and kohirabi had the high anti-wrinkle capability and that the capability might be species-specific.

Keywords: collagenase inhibition, elastase inhibition, hyaluronidase inhibition

1. はじめに

加齢などに伴い、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、コラゲナーゼなどの酵素活性が増すと、皮下組織に存在するヒアルロン酸、エラスチン、コラーゲンの分解が進み、それらの量が減少する。この減少が皮膚のしわやたるみを引き起こす要因となる¹⁾。また、ヒアルロニダーゼは炎症時に活性化され、クロモグリク酸などの抗アレルギー剤によって、その活性が阻害される。

これらのことから、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、コラゲナーゼの酵素活性を阻害

することにより抗老化、抗炎症作用が期待できる。そこで、我々は今回、京都府立桂高等学校で栽培された地域特産としてブランド力の高い京野菜などを中心に、野菜類の持つ抗老化、抗炎症作用に着目し、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、コラゲナーゼに対する阻害活性を測定することにより、その評価を行った。これまでの3年間に得た結果をまとめ、報告する。

2. 材料および方法

材料

京都府立桂高等学校農場で栽培収穫された野菜類を実験材料として用いた。以下の20種類を用いた：黒トマト、賀茂ナス、四川きゅうり、黄金マスク、バナナピーマン、バナナマスク、モロヘイヤ、トマテーヨ、茎ブロッコリー、丸オクラ、万願寺とうがらし、ズイキ、コーララビ、モギナス、赤オクラ、鷹峰とうがらし、山科ナス、黒もちとうもろこし、ビーツ、ソウメンカボチャ。

測定用サンプルの準備

収穫された野菜の可食部を凍結乾燥した後、市販の電動ミルを用いて粉末状にした。粉末試料 50mg に対して 1mL の割合で抽出溶液を加え、3時間振とう機を用いて振とう抽出した。その後、4500g、5℃、30分間の遠心分離を行い、得られた上清を酵素阻害活性測定用サンプルとして用いた。抽出溶液としてはヒアルロニダーゼの場合は 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 3.5) を、エラスターゼの場合は 0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を、コラゲナーゼには 20mM CaCl₂ を含む 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.1) を用いた。

ヒアルロニダーゼ阻害活性

・試薬調製

酵素溶液：ヒアルロニダーゼ Type IV-S (Hyaluronidase from bovine testes (Sigma)) を 400 units/mL となるように D 液 (20mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 90 mL にアルブミンが全体の 0.01% になるように加え、77mM NaCl で 100 mL とした溶液) に溶解した。

活性化剤溶液：Compound 48/80 (Sigma) 2 mg を 25mM CaCl₂ 4 mL に溶解した。

基質溶液：鶏冠製ヒアルロン酸カリウム塩 (和光純薬) を 0.4 mg/mL となるように 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 3.5) に溶解した。

・阻害活性測定

試験管にサンプル溶液 100 μ L、酵素溶液 50 μ L を取り、37℃で 20 分間反応させた。その後、活性化剤溶液 100 μ L を加え、さらに 37℃

で 20 分間反応させた。次に、基質溶液 250 μ L を加えて 37℃で 40 分間の反応を行った。その後、0.4N NaOH 100 μ L を加えて反応を停止した。そして、Morgan-Elson 法²⁾に従い阻害活性を測定した。サンプル溶液無添加のものには同量の 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 3.5) を、酵素溶液無添加のものには同量の D 液を加えた。

エラスターゼ阻害活性

・試薬調製

酵素溶液：エラスターゼ Type III (Elastase pancreatic from porcine pancreas (Sigma)) を 10 μ g/mL となるように 0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に溶解した。

基質溶液：N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (Sigma) を 0.4514 mg/mL となるように 0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に溶解した。

・阻害活性測定

96 well プレートにサンプル溶液 50 μ L、酵素溶液 50 μ L、基質溶液 100 μ L を加え、25℃で 50 分間振とうした。その後、マイクロプレートリーダーを用いて 415nm で吸光度を測定し、阻害活性を求めた。サンプル溶液無添加のもの、酵素溶液無添加のものにはそれぞれ同量の 0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加えた。

コラゲナーゼ阻害活性

・試薬調製

酵素溶液：コラゲナーゼ Type IV (Collagenase from *Clostridium histolyticum* (Sigma)) を 0.1mg/mL となるように 20mM CaCl₂ を含む 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.1) に溶解した。

基質溶液：Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-OH (コスモバイオ) を 0.39 mg/mL となるように 20mM CaCl₂ を含む 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.1) に溶解した。

・阻害活性測定

蓋付き試験管にサンプル溶液 12.5 μ L、酵素溶液 12.5 μ L、基質溶液 100 μ L を加え、37℃で 30 分間反応させた。その後、25mM クエン酸溶液 250 μ L を加えて反応を停止させた。次に、酢酸エチル 1.25mL を加えて激しく振とうし、4000g、5℃、10 分間の遠心分離を行った。

得られた酢酸エチル層の 320nm における吸光度を測定することにより、阻害活性を求めた。サンプル溶液無添加のもの、酵素溶液無添加のものにはそれぞれ同量の 20mM CaCl₂ を含む 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.1) を加えた。

阻害率

それぞれの酵素に対する各サンプルの阻害率は、次の計算式により求めた。阻害率 (%) = (1 - (サンプル溶液と酵素溶液をともに加えたものの吸光度 - 酵素溶液を加えていないものの吸光度) ÷ (サンプル溶液を加えていないものの吸光度 - サンプル溶液と酵素溶液をともに加えていないものの吸光度)) × 100

3. 結果

ヒアルロニダーゼ阻害活性

ヒアルロニダーゼに対する酵素活性の阻害率を表 1 に示す。分析に用いた 20 種類の野菜の中には、高い阻害活性を示すものはみられなかった。黄金マスクで 12.8% であり、またばらつきが大きいものとなった。これらの中には、高活性を期待できるものはないと考える。

エラスターゼ阻害活性

エラスターゼに対する酵素活性の阻害率を表 2 に示す。万願寺とうがらしが 95.9 ± 1.3%、鷹峰とうがらし 93.4 ± 3.9%、コールラビ 89.1 ± 2.4% と高い酵素阻害活性を示した。また、ばらつきは大きいものの、茎ブロッコリーで 56.1%、四川きゅうりで 42.3% の阻害活性がみられた。

コラゲナーゼ阻害活性

コラゲナーゼに対する酵素活性の阻害率を表 3 に示す。トマテヨで 35.9%、黒トマトで 32.1% などの阻害活性がみられたが、エラスターゼに対してみられたほどの高い阻害活性を示すものはみられなかった。

4. 考 察

日常的に食する野菜類の抗老化作用、炎症作用を評価するために、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、コラゲナーゼに対する酵素阻害活性を測定した。今回、阻害活性の測定には粗抽出液をサンプルとして用いた。そのため、発色の度合や吸光度に影響を与える物質が含まれていたため、ばらつきの大きくなったサンプルもあると考えられる。ヒアルロニダーゼとコラゲナーゼに対しては高い阻害活性を示すものはみられなかった。一方、エラスターゼに対しては万願寺とうがらしで 95.9%、鷹峰とうがらしで 93.4%、コールラビで 89.1% と高い阻害活性を示し、ばらつきも小さいものであった (表 2)。これら 3 種類の野菜のうち万願寺とうがらしと鷹峰とうがらしは共にとうがらし属の植物であり、エラスターゼに対しては高い阻害を示すものの、ヒアルロニダーゼとコラゲナーゼに対しては阻害活性を示さない (表 1、表 3) という共通点がみられた。また、コールラビはアブラナ属の植物であり、次に高い阻害活性を示した茎ブロッコリー (表 2) もアブラナ属である。これらのことより、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、コラゲナーゼに対する阻害活性には植物の種による特性がある可能性もあると考えられる。他方、これらの植物に含まれる阻害活性を示す成分はまだ明らかではなく、毎年の気候の変動等による阻害活性の変化も考慮する必要があると考える。

今回、老化や炎症に関係するとされる 3 つの酵素¹⁾に対する *in vitro* での阻害活性の評価を行った。今後、これらの野菜に含まれる阻害活性を示す成分の同定、また、阻害作用機序の解明、*in vivo* での評価などを行うことにより、植物種と酵素阻害能の関係や抗老化能が明らかになると考える。

5. 謝 辞

これまでの 3 年間に行った結果を報告する。本報告をするにあたり、野菜類の栽培に際して多大な協力をいただいた京都府立桂高等学校キヌア研究班の諸氏、また阻害活性の分析

に際して多大な協力をいただいた近畿大学農学部食品化学研究室の学生諸氏に対し、ここに記し、深謝の意を表します。

6. 引用文献

- 1) Maity, N., Nema, N. K., Abedy, M. K., Sarkar, B. K., and Mukherjee, P. K. (2011) Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity. J. Ethnopharmacology, 137:1300-1305.
- 2) Sawabe, Y., Nakagomi, K., Iwagami, S., Suzuki, S., and Nakazaki, H. (1992) Inhibitory effects of pectic substances on activated hyaluronidase and histamine release from mast cells. Biochim. Biophys. Acta. 1137:274-278.

表1 ヒアルロニダーゼ阻害活性

サンプル	阻害率 (%)	サンプル	阻害率 (%)
黒トマト	1.0±1.2	万願寺とうがらし	N.D.
賀茂ナス	2.1±2.0	ズイキ	2.7±2.5
四川きゅうり	1.7±1.4	コールラビ	2.5±3.2
黄金マスク	12.8±18.3	モギナス	1.5±2.3
バナナピーマン	0.3±0.7	赤オクラ	5.4±4.4
バナナマスク	5.9±2.0	鷹峰とうがらし	N.D.
モロヘイヤ	2.3±1.4	山科ナス	3.0±1.2
トマテヨ	5.1±6.8	黒もちとうもろこし	N.D.
茎ブロッコリー	3.2±2.2	ビーツ	9.0±8.1
丸オクラ	9.3±5.5	ソウメンカボチャ	2.5±5.7

平均値±標準偏差 (n=5), N.D.= not detected.

表2 エラスターゼ阻害活性

サンプル	阻害率 (%)	サンプル	阻害率 (%)
黒トマト	7.4±5.7	万願寺とうがらし	95.9±1.3
賀茂ナス	16.8±4.7	ズイキ	0.7±1.0
四川きゅうり	42.3±21.5	コールラビ	89.1±2.4
黄金マスク	7.5±4.6	モギナス	20.1±6.5
バナナピーマン	13.0±8.6	赤オクラ	6.9±6.6
バナナマスク	1.6±1.6	鷹峰とうがらし	93.4±3.9
モロヘイヤ	4.6±2.9	山科ナス	16.5±3.3
トマテヨ	2.2±2.2	黒もちとうもろこし	17.0±5.3
茎ブロッコリー	56.1±21.6	ビーツ	8.7±10.3
丸オクラ	1.3±1.1	ソウメンカボチャ	N.D.

平均値±標準偏差 (n=5), N.D.= not detected.

表3 コラゲナーゼ阻害活性

サンプル	阻害率 (%)	サンプル	阻害率 (%)
黒トマト	32.1±7.6	万願寺とうがらし	N.D.
賀茂ナス	5.0±5.2	ズイキ	24.9±5.3
四川きゅうり	N.D.	コールラビ	6.2±8.6
黄金マスク	0.8±1.2	モギナス	1.4±1.9
バナナピーマン	N.D.	赤オクラ	N.D.
バナナマスク	2.4±4.2	鷹峰とうがらし	N.D.
モロヘイヤ	N.D.	山科ナス	5.8±6.1
トマテヨ	35.9±8.5	黒もちとうもろこし	1.0±1.5
茎ブロッコリー	0.1±0.1	ビーツ	N.D.
丸オクラ	N.D.	ソウメンカボチャ	N.D.

平均値±標準偏差 (n=5), N.D.= not detected.