

## コーヒーシルバースキンに含まれる 3-ピリジノールの単離精製とメラニン産生に及ぼす影響

Purification of 3-pyridinol from coffee silver-skin and effect on melanogenesis

渡辺 章夫<sup>1)</sup>

WATANABE Akio

加藤 毅<sup>2)</sup>

KATO Tsuyoshi

衛藤 未侑<sup>1)</sup>

ETO Miyu

小林 亘<sup>3)</sup>

KOBAYASHI Wataru

倉若 美咲樹<sup>1)</sup>

KURAWAKA Misaki

三嶋 隆<sup>2)</sup>

MISHIMA Takashi

仲川 清隆<sup>4)</sup>

NAKAGAWA Kiyotaka

### 要 旨

コーヒーシルバースキンはコーヒー生豆を覆う薄皮であり、焙煎過程で生じる主要な副産物である。しかし、有効な利用方法が確立されておらず、コーヒー豆店などでは廃棄物として大量に処分されている。一方、3-ピリジノールはコーヒー豆の焙煎により生成する化合物であり、抗酸化作用や肝臓保護作用などの機能が報告されている。3-ピリジノールはコーヒー豆中だけでなく、コーヒーシルバースキンにも多く含有しており、単離・精製することができれば有効な廃棄物利用となる。本研究では、まず3-ピリジノールの定量的なHPLC分析法を確立し、コーヒーシルバースキン中に含有する3-ピリジノールの含量を調べた。次に、シルバースキンから3-ピリジノールを単離する手法を開発した。最後に、3-ピリジノールがメラニン産生に及ぼす影響を調べるためにマウスB16メラノーマ細胞、ヒトHMV-IIメラノーマ細胞および正常ヒト皮膚メラノモデルを用いて検討した。その結果、シルバースキンから単離した3-ピリジノールは動物細胞においてメラノサイトを活性化し、メラニン産生を促進する効果が認められた。これらのことから、3-ピリジノールは新たな白斑改善剤や白髪予防剤、日焼け促進剤、そして有効な廃棄物利用に繋がることが期待される。

<sup>1)</sup> 十文字学園女子大学 人間生活学部 食品開発学科

Department of Food Science, Faculty of Human Life, Jumonji University

<sup>2)</sup> 一般財団法人 日本食品分析センター

Japan Food Research Laboratories

<sup>3)</sup> 十文字学園女子大学 人間生活学部 健康栄養学科

Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life, Jumonji University

<sup>4)</sup> 東北大学大学院農学研究科・食品機能分析学

Laboratory of Food Function Analysis, Tohoku University

キーワード：コーヒーシルバースキン、3-ピリジノール、メラニン産生促進

## 1. 緒言

皮膚および毛髪の色を決定する因子はメラニンと呼ばれる色素性の物質である<sup>1)</sup>。メラニンは、表皮基底層や毛根に存在するメラノサイトより産生される<sup>2)</sup>。メラノサイトの増殖促進やチロシナーゼを活性化する因子として、ケラチノサイトまたはメラノサイトから分泌される $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) およびEndothelin-1 (ET-1) の二つが知られている<sup>3)</sup>。生成したメラニンが皮膚中で沈着が進むとシミやソバカスの原因になる<sup>4)</sup>。そのため予防する為に種々の美白剤が開発され、それらを配合した化粧品が市販されている。一方、メラニン産生能の先天的な不全または後天的な産生能の低下の結果、白毛症及び白斑症が起こる<sup>5)</sup>。また、加齢に伴って起こる白髪も毛根におけるメラニン産生能の減退によるものと考えられている。白髪改善剤として胡椒の葉に含まれるCubebinやフラボノイドである4'-O-methylfisetinなどが報告されているが、白髪に対する対策としては染料で染めるのが一般的である<sup>6, 7)</sup>。より効果的で、安全性にも優れた美白剤または白髪改善剤が求められている。

コーヒーシルバースキンとはコーヒー生豆を覆う薄皮であり、焙煎過程で生じる主要な副産物である (Fig. 1)。しかし、有効な利用方法が確立されておらず、コーヒー豆店などでは廃棄物として処分されている。一方、3-ピリジノール (Fig. 2)

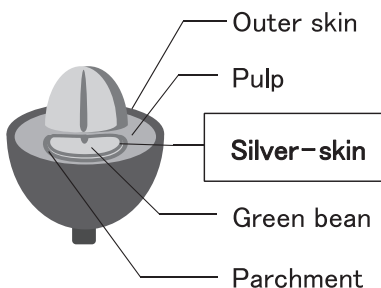


Fig. 1 Coffee silver-skin

はコーヒー豆の焙煎により生成する化合物であり、抗酸化作用や肝臓保護作用などの機能が報告されている<sup>8)</sup>。3-ピリジノールはコーヒー豆中だけでなく、コーヒーシルバースキンにも多く含有しており、単離・精製することができれば有効な廃棄物利用となる。本研究では、まず3-ピリジノールの定量的なHPLC分析法を確立し、コーヒーシルバースキン中に含有する3-ピリジノールの含量を調べた。次に、シルバースキンから3-ピリジノールを単離する手法を開発した。最後に、3-ピリジノールがメラニン産生に及ぼす影響を調べるためにマウスB16メラノーマ細胞、ヒトHMV-IIメラノーマ細胞および正常ヒト皮膚メラノモデルを用いて検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1. シルバースキンから化合物の単離及び同定

シルバースキンは川崎市内のコーヒー豆店よりブラジルサントス産のコーヒー豆由来のものを入手した。粉碎したシルバースキン500 gを超純水105°Cで5分間の熱水抽出を実施し、熱水抽出液をエバポレーターで濃縮乾固し、熱水抽出物を得た。熱水抽出物をヘキサン-水 (50:50, v/v) で液-液分配することで脱脂を行った。水画分を酢酸エチル-水 (50:50, v/v) で液-液分配を行い、酢酸エチル画分を濃縮乾固することで、酢酸エチル濃縮物を得た。酢酸エチル濃縮物を50%

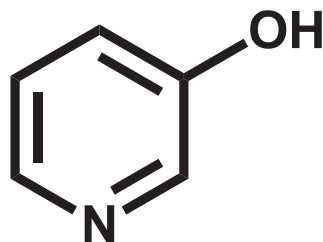


Fig. 2 The chemical structure of 3-pyridinol

メタノールに溶解し、Bond Elut PSA（アジレントテクノロジー）カラムに負荷し、夾雑物を除去した。通過溶液をBond Elut SCX（アジレントテクノロジー）カラムに供して吸着させ、5%アンモニア含有メタノールで溶出し、粗精製した溶出液を得た。溶出液を全量乾固し、1 mLの5%メタノールに溶解後、分取HPLC（LC-6AD, 島津製作所）を用いて、次の条件で分取した。カラム；Wakosil-II 5C18 RS-Prep（5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  20 mm I.D., 和光純薬工業）、流速；12 mL/min, 検出波長；260 nm。移動相条件；水：メタノール（95：5）

溶出した分画物は凍結乾燥し、最終精製物とした。最終精製物と市販の3-ピリジノール（シグマアルドリッチジャパン）を、核磁気共鳴装置（Varian NMR System 500, バリアン）を用いて測定し、<sup>1</sup>H-NMRのスペクトルを比較することで最終精製物を同定した。

## 2.2. 3-ピリジノールの定量

3-ピリジノールはHPLCにより測定した。装置は（LC-10ADシリーズ, 島津製作所）を用い、下記に示す条件で分析した。カラム；CAPCELL PAK C18AQ（5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm I.D., 資生堂）、移動相；A液：0.1% ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有8.5 mmol/Lリン酸、B液：メタノール、流速；0.7 mL/min, 検出波長；260 nm。移動相条件；水：メタノール（95：5）。7点検量線（0.01~1  $\mu$ g/mL）。

## 2.3. マウスB16メラノーマ細胞を用いたメラニン産生試験

マウスB16メラノーマ細胞（理化学研究所バイオリソースセンター）を24ウェルプレートに $2.5 \times 10^4$  cells/wellで播種し、24時間培養後、10%ウシ胎児血清（ライフテクノロジーズジャパン）含有したダルベッコのMEM培地（シグマアルドリッチジャパン）に単離精製した3-ピリジノールを添加し3日間培養した。メラニンを含有した細

胞を1 mol/L NaOHに溶解し405 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー（SpectraMax M5, モレキュラーデバイスジャパン）で測定し、メラニン産生量を測定した<sup>8)</sup>。

## 2.4. マウスB16メラノーマ細胞を用いた細胞内チロシナーゼ活性試験

マウスB16メラノーマ培養細胞を60 mmシャーレに $2.5 \times 10^5$  cells /シャーレの濃度で播種し、市販の3-ピリジノールを使用し、2.3.と同条件で培養後、0.1% TritonX-100及び0.1 mmol/L Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 含有0.1 mol/Lリン酸カリウム緩衝液（0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05 mol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.8）で細胞を溶解させた後、遠心分離（18,000 g, 30分間）し、上清を分取したものをチロシナーゼ溶液とした。96ウェルプレートに500  $\mu$ mol/Lに調整したL-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)（和光純薬工業）を含む緩衝溶液を加え、37°Cで10分間反応後、チロシナーゼ溶液を加え、37°Cで60分間反応させた。マイクロプレートリーダー（SpectraMax M5, モレキュラーデバイスジャパン）を用い、反応により生じた吸光度を475 nmにて測定した<sup>7)</sup>。

## 2.5. ヒトHMV-IIメラノーマ細胞を用いた細胞内チロシナーゼ活性試験

ヒトHMV-IIメラノーマ細胞（理化学研究所バイオリソースセンター）を96ウェルプレートに $2.0 \times 10^4$  cells /wellの濃度で播種し、24時間培養後、10%牛胎児血清（ライフテクノロジーズジャパン）含有Ham's F12培地（和光純薬工業）に市販の3-ピリジノールを添加し3日間培養した後、培養上清を除去し、細胞溶解液（1 mM PMSF, 0.1% sodium deoxycholate, 0.5% TritonX-100）で溶解させたものをチロシナーゼ溶液とした。チロシナーゼ溶液に発色液（0.2% N,N-dimethylformamide, 1.25 mM L-DOPA, 5.175 mM 3-Methyl-2-benzothiazolinone-hydrazonehydrochloride）を加え、37°Cで60分間反応させた。マイクロプレート

リーダー (VARIOSKAN LUX, サーモフィッシュャーサイエンティフィック) を用い、反応により生じた吸光度を505 nmにて測定した。

## 2.6. 正常ヒト皮膚メラノモデルを用いたメラニン産生試験

LabCyte MELANO-MODEL24 ( ジャパン ティッシュエンジニアリング) を寒天培地から取り出し、LabCyte MELANO-MODEL取扱説明書に従い培養した。各培養カップ内に市販の3-ピリジノール 4 mmol/L を添加し、14日間培養を行った。培養期間中は培地交換とカップ内の検体交換を3日毎に行った。14日間培養後、LabCyte MELANO-MODEL取扱説明書に従って、メラニン量の定量を行った。

## 2.7. 統計処理

結果は全て平均値±標準誤差で示した。統計解析には一元配置分散分析を用いたDunnett post-hoc testを使用し、 $P < 0.05$  のとき有意差ありとした。計算にはGraphPad Prism7ソフトウェアを用いた。

## 3. 結果及び考察

### 3.1. HPLC分析条件及び含有量の検討

3-ピリジノールは極性が高く、通常の逆相系のカラムでは保持されにくいいため、高極性でも使用できるカラムとイオンペア剤の検討を実施した。その結果、CAPCELL PAK C18AQ (資生堂) のODSカラムとヘプタンスルホン酸のイオンペア剤を組み合わせたところ、17分に良好なピーク形状の3-ピリジノールを検出したため、定量分析法として採用した (Fig. 3)。検量線は0.01~100  $\mu\text{g/mL}$  の13点検量線の範囲で $R^2 = 0.9998$ と良好な直線性を示した。

本法における検出限界は0.5 mg/100gであった。添加濃度5  $\mu\text{g/g}$  の回収試験における平均回収率は $102.7 \pm 10.5\%$  ( $n=10$ ) であった。また、併行精度 (RSD<sub>r</sub>) を求めたところ、10.5%という結果が得られた。2.2の分析条件でシルバースキンの熱水中抽出液に含まれる3-ピリジノールを定量したところ、シルバースキンには70 mg/100gの濃度で含有していることが分かった。

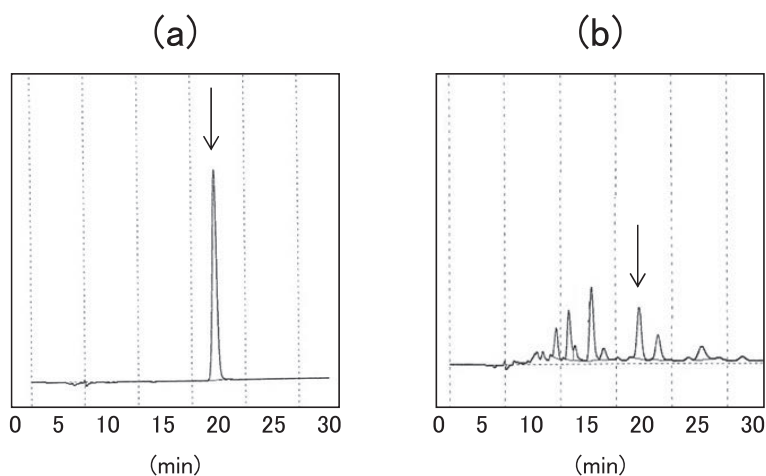


Fig. 3 3-Pyridinol was analyzed by LC-UV at 260 nm, and typical chromatograms were shown in (a) 3-pyridinol standard and (b) 3-pyridinol in coffee silver-skin.

### 3.2. シルバースキンから3-ピリジノールの単離・精製

シルバースキン500 gから酢酸エチルエキスを3.2 g得た。この酢酸エチルエキス2.5 gを50%メタノール100 mLに溶解し、Bond Elut PSAに通過させ、通過溶液を1 mol/L塩酸で酸性にし、Bond Elut SCXに負荷させ吸着させることで夾雑物を除去することができた。その後、分取HPLCを用いて最終精製を行い、24.5 mgの白色粉末を得た。これらの精製手法をFig. 4に示した。最終精製物

と市販の3-ピリジノール標準品（シグマアルドリッチジャパン）と比較したところ、 $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルが一致したため3-ピリジノールであると同一した。

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  H: 11.3 (OH), 8.12 ( $^1\text{H}$ ,  $J=3.0$  Hz, H-2), 8.01 ( $^1\text{H}$ , dd,  $J=4.3$  and 1.3 Hz, H-6), 7.19 ( $^1\text{H}$ , ddd,  $J=8.4$ , 4.4 and 0.6 Hz, H-5) and 7.14 ( $^1\text{H}$ , ddd,  $J=8.3$ , 2.8 and 1.5 Hz, H-4) ppm.

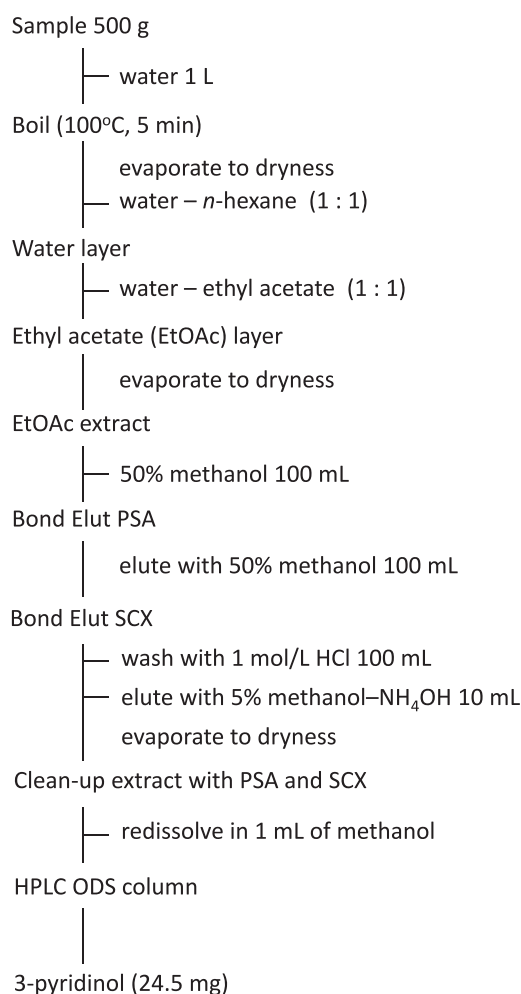


Fig. 4 Scheme for separation of 3-pyridinol from coffee silver-skin

### 3.3. 3-ピリジノールのメラニン産生促進効果

3-ピリジノールには抗酸化作用が報告されているため、メラニン産生抑制効果を有し、新たな美白素材になる可能性があることが期待された<sup>8)</sup>。マウスB16メラノーマ細胞を用い、単離精製した3-ピリジノールを用いてメラニン産生に及ぼす影

響を検討したところ、メラニン産生抑制効果は認められず、メラニン産生促進作用 (Fig. 5, 6) とチロシナーゼ活性の亢進作用 (Fig. 7A) が認められた。その効果は単離精製した3-ピリジノールと市販品の3-ピリジノールの効果は同等であった (Data not shown)。これまでにクベバコシヨウ

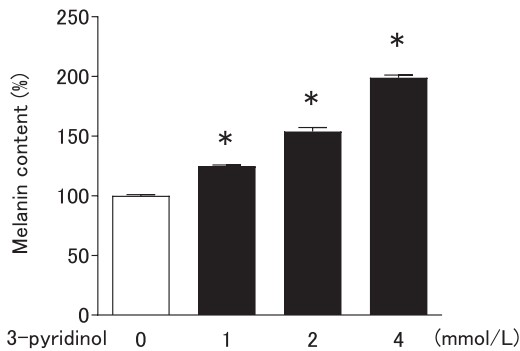


Fig. 5 Effects of 3-pyridinol on melanin content in mouse B16 melanoma cells. The cells were treated with 0 - 4 mmol/L 3-pyridinol for 3 days. Melanin content (%) is the ratio for no sample control. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , \* $P < 0.05$  Dunnett's test.

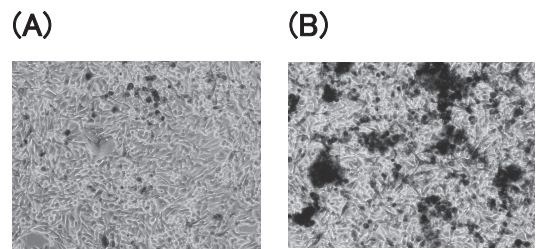


Fig. 6 Microscope images of mouse B16 melanoma treated with 0 (A) or 4 mmol/L 3-pyridinol (B). The images were taken after 3days of 0 or 4 mmol/L 3-pyridinol addition.

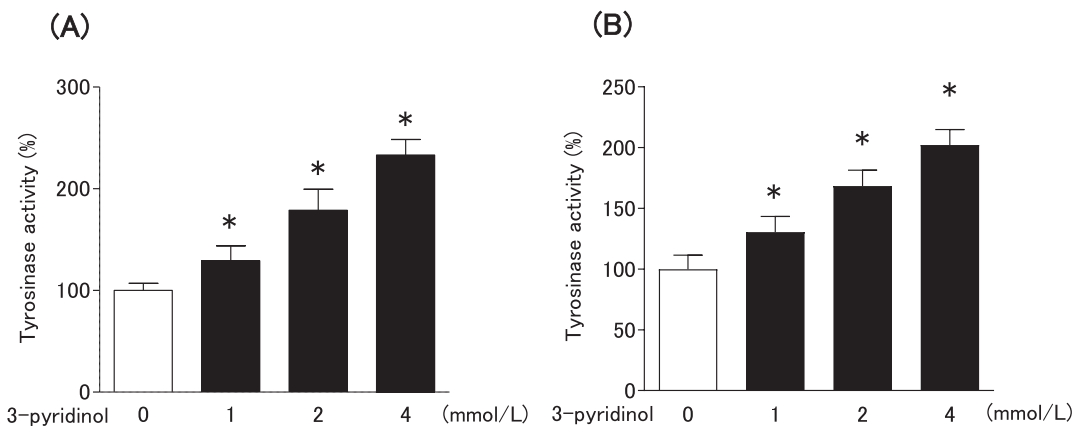


Fig. 7 (A) Tyrosinase activity of 3-pyridinol in mouse B16 melanoma cells. (B) Tyrosinase activity of 3-pyridinol in human HMV-II melanoma cells. The cells were treated with 0 - 4 mmol/L 3-pyridinol for 3 days. Tyrosinase activity (%) is the ratio for no sample control. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 3\sim 6$ , \* $P < 0.05$  Dunnett's test.

の葉に含まれるリグナンであるクベピンや特定の構造を有するフラボノイドであるフラボノイドである4-O-methylfisetinなどにメラニン産生促進作用を有することが報告されているが、美白剤と比較してメラニン産生促進剤の報告は少ない<sup>6, 7)</sup>。そこでヒト細胞における3-ピリジノールの効果を検証するために、ヒトHMV-IIメラノーマ細胞を用いて、3-ピリジノールがチロシナーゼ活性に与える影響を検討したところ、ヒト細胞においてもマウス細胞と同様にチロシナーゼ活性の亢進作用 (Fig. 7B) が認められた。さらに市販のLabCyte MELANO-MODELを使用したところ、正常ヒト皮膚3次元モデルにおいてもメラニン産生を促進する効果が認められた (Fig. 8)。これらの結果から3-ピリジノールは動物細胞においてチロシナーゼ酵素の生合成を誘導することで、メラニン産生を促進する可能性が示唆された。メラノサイトの活性化は、転写因子MITFによって制御されており、その上流にはp38およびERK 1/2などのmitogen-activated protein kinase (MAPK) 活性化機構が知られている<sup>10, 11)</sup>。転写因子MITFや

p38およびERK 1/2などMAPKリン酸化への影響など作用機序の解明は今後の検討課題としたい。

#### 4. 結論

本研究では、廃棄物であるコーヒーのシルバースキンから3-ピリジノールを単離する手法および定量法を確立した。また、3-ピリジノールは*in vitro*でメラノサイトに作用して、メラニン産生を促進することが認められた。

以上のことから、我々はコーヒーやシルバースキンに含まれる3-ピリジノールはメラノサイトを活性化し、メラニン産生を促進する効果を見出した。3-ピリジノールはコーヒー飲料中にも多く含まれていることから日常的に摂取していると考えられるが、安全性に関する情報は不十分であるため、より詳細な検証が必要である。今後の研究によって、新たな白斑改善剤や白髪予防剤、日焼け促進剤、そして有効な廃物利用に繋がることを期待される。

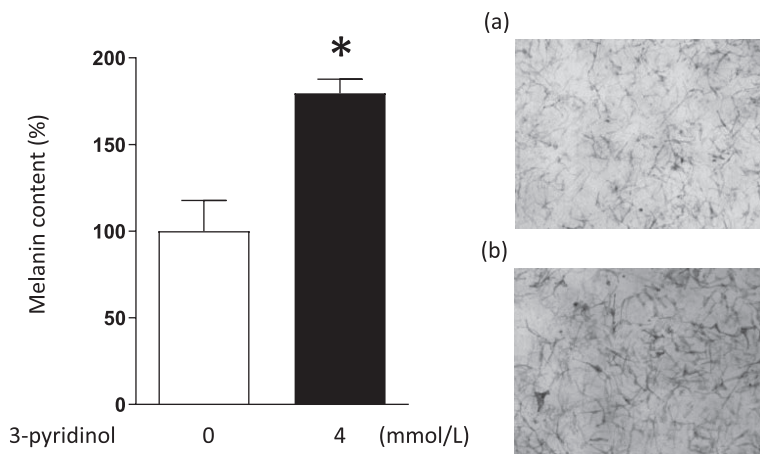


Fig. 8 Effects of 3-pyridinol on melanin content and microscope images of normal melanocytes treated with 0 mmol/L 3-pyridinol (a) and 4 mmol/L 3-pyridinol (b) in 3-D Human melano-model. The cells were treated with 0 or 4 mmol/L 3-pyridinol for 3 days. Melanin Content (%) is the ratio for no sample control. Mean  $\pm$  SEM,  $n=3$ , \* $P < 0.01$  Student's t test

## 5. 謝辞

本研究に際し、実験に協力をいただいた十文字学園女子大学人間生活学部食品開発学科の小山彩華さん、要害心さん、保永陽依さん、前原一葉さん、宮本京香さんに心から感謝いたします。

## 6. 引用文献

- 1) S. Alaluf, D. Atkins, K. Barrett, M. Blount, N. Carter, A. Heath. *Pigment Cell Res.*, 15 (2), 112-118. (2002)
- 2) 杉山義宣, 化学と生物, 46, 153-141 (2008)
- 3) 落合康宣, 鳥居宏右, 岡野由利, 正木仁, 粧技誌, 34, 47-54 (2000)
- 4) W. Choi, L. Yin, C. Smuda, J. Batzer, V. J. Hearing, L. Kolbe, *Exp Dermatol.*, 26 (3), 242-248 (2017)
- 5) 伊藤雅章, 日臨皮医会誌, 24, 221-228 (2007)
- 6) N. Hirata, S. Naruto, K. Ohguchi, Y. Akao, Y. Nozawa, M. Iinuma, H. Matsuda, *Bioorg Med Chem.*, 15, 4897-4902 (2007)
- 7) A. Kumagai, N. Horike, Y. Satoh, T. Uebi, T. Sasaki, Y. Itoh, Y. Hirata, K. Uchio-Yamada, K. Kitagawa, S. Uesato, H. Kawahara, H. Takemori, Y. Nagaoka, *PLoS One.*, 10, e26148 (2011)
- 8) S. Kurakane, K. Igarashi, *Food Sci. Technol. Res.*, 12, 148-151 (2006)
- 9) 津田愛子, 堀籠悟, 吉田泉, 山口昭弘, 木船信行, 神部武重, 渡井正俊, 小澤淳, 久米賢次, 粧技誌, 44, 139-142 (2010)
- 10) M. Tachibana, *Pigment Cell Res.*, 13, 230-240 (2000)
- 11) B. Bellei, V. Maresca, E. Flori, A. Pitisci, L. Larue, *J Biol Chem.*, 10, 7288-7299 (2010)