

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05723

研究課題名(和文) 酵素的酸化を活用した機能性ペプチドマイニング

研究課題名(英文) Bioactive peptide mining by enzymatic oxidation

研究代表者

二瓶 賢一 (Nihei, Ken-ichi)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10307209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヤナギ科植物から得られたフロレチン配糖体の構造訂正とそのチロシナーゼ阻害活性の評価、ムクロジ科植物から単離されたポリフェノール配糖体をリード化合物に用いたチロシナーゼ阻害剤の開発および、スグリ科植物中の対称性の高いポリフェノールの化学合成と構造訂正を達成した。また、ミソハギ科植物などより得られたフェノール配糖体を化学合成し、チロシナーゼとビタミンCを用いたレドックス反応により、それがジフェノール配糖体へと変換できることを確認した。さらに、そのジフェノール配糖体が強い抗酸化性を持つ天然物として、植物抽出物中に存在していることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チロシナーゼの働きにより、モノフェノールはジフェノールを経由して、キノンへと酸化される。その過程に還元剤を添加することで、レドックス反応が進行し、ジフェノールが蓄積する。本研究では、このチロシナーゼと還元剤によるレドックス反応をモノフェノールからジフェノールへの変換に利用し、新しい機能性分子を開発することを目的とした。当初目的の生理活性ペプチドのレドックス反応においては、酸化生成物の構造を決定することはできなかった。しかしながら、天然フェノール類のレドックス反応を達成し、その生成物が天然物であることを突き止めた。以上の成果は、新たな生理活性天然物の研究に応用できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Structural revision of a phloretin glycoside isolated from the Salicaceae plant and its evaluation for tyrosinase inhibitory activity, development of tyrosinase inhibitors based on a natural polyphenol glycoside as the lead compound isolated from the Sapindaceae plant, and chemical synthesis and structural revision of a high symmetric polyphenol isolated from the Grossulariaceae plant were achieved. Moreover, a phenol glycoside isolated from the Lythraceae plant was synthesized and conformed that it can be converted into corresponding diphenol glycoside through the redox reaction using tyrosinase and vitamin C. In addition, the diphenol glycoside acting as an effective antioxidant, was identified as a natural product in the plant extract.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：チロシナーゼ 阻害剤 フロレチングルコシド レゾルシノールアルキルグルコシド リベシンB 構造訂正 ソネルフェノリックC レドックス反応

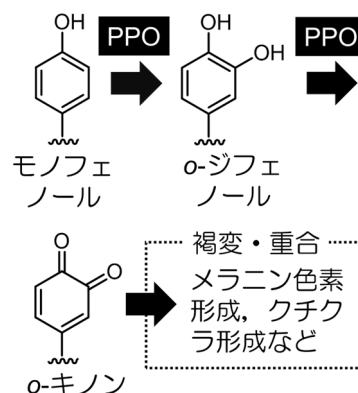
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

チロシナーゼ(ポリフェノールオキシダーゼ, PPO)は, モノフェノールから *o*-ジフェノール経路で *o*-キノンに至る反応を触媒する酸化酵素である(図1)。この酸化段階は, 自然界におけるメラニン色素形成やクチクラ形成などの初期に相当する。したがって, それらの褐変・重合の効率的な制御を目指し, 多くの研究者がチロシナーゼ阻害剤の開発に取り組んできた。

その過程で, チロシナーゼ阻害剤と考えられてきた天然フェノール類, 例えばアルブチンやケルセチンなどが, チロシナーゼの基質として働くことが明らかになった。これらの知見から, チロシナーゼは, 糖, クロモン環や分岐アルキル鎖などの複雑な構造が近傍にあるモノフェノールでも, 基質として認識することが分かった。現在まで複数のグループが, チロシナーゼを用いたフェノール類の分解について報告しているが, このような酵素的酸化を生理活性分子の生産に利用する例は希少である。



(図1) PPOによる酸化反応

2. 研究の目的

チロシナーゼの基質特異性の広さを考慮すると, ペプチド中のチロシン残基なども酸化される可能性が高い。しかしながら, チロシン残基の直接的な *o*-ヒドロキシ化による生理活性ペプチドの合成研究は, 申請者の知る限り行われていない。そこで, チロシナーゼによる酵素的酸化を活用し, 機能性ペプチドのマイニングを行うことを当初計画として設定した。

その他, ヤナギ科植物から単離・構造決定されたフロレチン配糖体のチロシナーゼ活性に与える影響, ムクロジ科植物に含まれるポリフェノール配糖体をリード化合物とした新しいチロシナーゼ阻害剤の開発および, スグリ科植物中の対称性の高いポリフェノールの化学合成と構造訂正に取り組んだ。また, ミソハギ科植物などより得られたフェノール配糖体の化学合成およびチロシナーゼとビタミンCを用いたレドックス反応によるその変換に関する研究にも着手した。

3. 研究の方法

ペプチドを基質に用いたレドックス反応に関する研究では, 市販のチロシナーゼとビタミンCをペプチド溶液に加え, インキュベーションし, その反応を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で追跡した。また, HPLC上で分離できたピークを分取し, 核磁気共鳴(NMR)装置などにより, 機器分析を行い, その構造決定を試みた。

ヤナギ科植物由来のフロレチン配糖体に関する研究では, 初めに, アグリコンであるフロレチン部分をアルドール縮合により化学合成し, 次に, Schmidt法などを用いてそのグリコシル化を行った。また, 合成したフロレチン配糖体のチロシナーゼ活性に与える影響を評価した。

新しいチロシナーゼ阻害剤の開発では, 保護されたジヒドロキシベンズアルデヒドを出発物質として, Wittig反応や Horner-Wadsworth-Emmons反応などを用いた増炭を行うことで, さまざまな長さのアルキル鎖を持つレゾルシノール化合物を化学合成した。また, 合成したヒドロキシアルキルレゾルシノールを Koenigs-Knorr反応でグリコシル化し, 得られた化合物群を用い, チロシナーゼ阻害活性を評価した。

対称性の高いポリフェノールに関する研究では、チロシナーゼを用いたレドックス反応の基質になりうる天然物を標的に、それらの化学合成を行った。具体的には、バニリンやイソバニリンなどを出発物質として、連続的 Michael 付加-環化およびアルケンの異性化を経由し、スグリ科植物に含まれるポリフェノールの全合成に取り組んだ。

ミソハギ科植物などに含まれるフェノール配糖体の化学合成とそのレドックス変換に関する研究では、初めに、天然物であるモノフェノール配糖体を、アルドール縮合と Koenigs-Knorr 反応により化学合成した。次に、チロシナーゼとビタミン C の存在下、その酸化を行い、反応の推移を分光光度計および HPLC で追跡した。酸化生成物の抗酸化性を市販のフリーラジカルを用いて評価し、さらに、植物抽出物の HPLC 分析データを比較することにより、その生成物が抗酸化剤として天然に存在しているかを確認した。

4. 研究成果

チロシナーゼとビタミン C の共存によるレドックス反応系中に、ペプチドを基質として添加すると、HPLC 上でその基質以外のピークが出現することが分かった。そのピークを分取し、同定を試みたが、構造決定には至らなかった。系内に大量に存在するビタミン C あるいはその酸化体であるデヒドロビタミン C と求核性のあるペプチドが、付加体を形成してしまったことがその一因と推察される。したがって、今後、チロシン残基のみが選択的に反応するように、還元剤の変更やペプチドの保護などの検討が必要である。

出発物質のアセトフェノン誘導体から、5 段階を経由して、ヤナギ科植物由来のフロレチン配糖体を世界で初めて全合成した。また、その天然物は弱いながらもチロシナーゼに対して阻害活性を有することを明らかにした。

ムクロジ科植物から単離されたポリフェノール配糖体をリード化合物に、16 種類の誘導体を化学合成した。それらのチロシナーゼ阻害活性を一斉に評価した結果、既存の強力な阻害剤であるヘキシルレゾルシノールよりも効果的な 5 種類の阻害剤を選抜することができた。それらの阻害剤は、親水性から疎水性までの幅広い分子特性を有することが特徴である。

スグリ科植物中の対称性の高いポリフェノールの化学合成を行ったところ、その構造は天然物として提唱されているバニリン骨格を含むものではなく、イソバニリン骨格を含むものであることが分かった。以上のように天然物の構造を訂正し、またその不斉全合成を世界で初めて達成した。

ミソハギ科植物などより得られたモノフェノール配糖体を初めて全合成した。また、それを基質として、チロシナーゼとビタミン C を用いたレドックス反応を行い、酸化生成物であるジフェノール配糖体が系内に蓄積してくることを確認した。さらに、そのジフェノールがビタミン C に匹敵する抗酸化性を有することおよび、天然物として植物抽出物中に存在することを突き止めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishioka Wakana, Nihei Ken-ichi	4. 巻 1268
2. 論文標題 Chemical synthesis and tyrosinase inhibitory activity of resorcinol alkyl glucosides, hydroxyalkyl resorcinols, and alkyl resorcinols	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Structure	6. 最初と最後の頁 133668 ~ 133668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molstruc.2022.133668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horio Kae, Nihei Ken-ichi	4. 巻 114
2. 論文標題 Total synthesis of (-)-ribesin B and its structural revision	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 154285 ~ 154285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2022.154285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimakage Ryo, Nihei Ken-ichi	4. 巻 1-9
2. 論文標題 Synthesis, structural revision, and tyrosinase inhibitory activity of proposed phloretin-4-O-D-glucopyranoside from Homalium stenophyllum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Natural Product Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14786419.2020.1817922	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimakage Ryo, Iwadate Takehiro, Nihei Ken-ichi	4. 巻 158
2. 論文標題 A natural diphenolic glucoside, sonnerphenolic C: Chemical synthesis, structural revision, redox transformation, and identification as an antioxidant	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 134001 ~ 134001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2024.134001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 棚瀬 由希乃, 二瓶 賢一
2. 発表標題 フロログルシノール配糖体の体系的な全合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤 さら, 二瓶 賢一
2. 発表標題 ルイボスに含まれるC-グリコシルポリフェノールの化学合成と誘導体合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井川 奏乃, 伊藤 くる美, 二瓶 賢一
2. 発表標題 チロシナーゼ阻害活性とラジカル消去活性を併せ持つ新しい機能性ハイブリッド分子の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上野 真澄, 西條 祐輝, 二瓶 賢一
2. 発表標題 アサイーに含まれるタキシフォリン配糖体の全合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西條 祐輝、堀 優希、二瓶 賢一
2. 発表標題 タマネギに含まれる蛍光性フラボノイド配糖体の全合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀尾 嘉恵、二瓶 賢一
2. 発表標題 リベシンBの不斉全合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井川 奏乃、石岡 和佳奈、二瓶 賢一
2. 発表標題 レゾルシノールアルキル-L-グルコシドの化学合成とチロシナーゼ阻害活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西條 祐輝、堀 優希、二瓶 賢一
2. 発表標題 タマネギに含まれる蛍光性フラボノイド配糖体の合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥影 凌, 岩館 丈央, 二瓶 賢一
2. 発表標題 ポリフェノール配糖体, ソンネルフェノリックCの化学合成と構造訂正
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 棚瀬 由希乃, 二瓶 賢一
2. 発表標題 ギンバイカに含まれるフロログルシノール配糖体の全合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 蒔田 瑞祈, 二瓶 賢一
2. 発表標題 コギンギンに含まれるナフトレングルコシドの全合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>天然物有機化学 宇都宮大学農学部応用生命化学科 https://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/chemj/npc/index.htm [プレスリリース] 親水性チロシナーゼ阻害剤の開発に成功 酵素的褐変の効率的制御が可能に https://www.utsunomiya-u.ac.jp/topics/research/009898.php [プレスリリース] カシスに含まれる対称性ポリフェノールの全合成に成功 https://www.utsunomiya-u.ac.jp/topics/research/010201.php [プレスリリース] メグスリノキ抽出物に含まれる抗酸化性天然物の構造が明らかに https://www.utsunomiya-u.ac.jp/topics/research/011163.php</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	水重 貴文 (Mizushige Takafumi)		
研究協力者	鈴木 智大 (Suzuki Tomohiro)		
研究協力者	岩館 丈央 (Iwadate Takehiro)		
研究協力者	島影 凌 (Ryo Shimakage)		
研究協力者	石岡 和佳奈 (Ishioka Wakana)		
研究協力者	堀尾 嘉恵 (Horio Kae)		
研究協力者	井川 奏乃 (Igawa Sono)		
研究協力者	西條 祐輝 (Nishi jo Yuki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	棚瀬 由希乃 (Tanase Yukino)		
研究協力者	齋藤 さら (Saito Sara)		
研究協力者	上野 真澄 (Ueno Masumi)		
研究協力者	蒔田 瑞祈 (Makita Mizuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関