

令和元年6月11日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01797

研究課題名(和文)メラニン形成を制御するジヒドロレスベラトロール配糖体の分子ロジック解析

研究課題名(英文)Molecular logic analysis of dihydroresveratrol glycosides as melanogenesis-controlled agents

研究代表者

二瓶 賢一(Nihei, Ken-ichi)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：10307209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：天然配糖体のジヒドロレスベラトロールグルコシドは、メラノーマ細胞に対して、強いメラニン形成阻害活性を示す。一方、合成配糖体のジヒドロレスベラトロールキシロシドは、メラノーマ細胞内のメラニン形成を著しく促進する。このように、ジヒドロレスベラトロール配糖体の構造を変化させることで、メラニン形成の阻害と促進を制御する有用分子をつくり出すことができる。そこで本研究では、新しいメラニン形成調節剤の開発を目指し、ジヒドロレスベラトロール関連分子の化学合成を行った。特に、メラニン形成の鍵となるチロシナーゼに対する阻害活性の評価を行うことで、ジヒドロレスベラトロールの分子ロジックの解明に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

紫外線などの刺激により、メラニン色素の形成が進むことで、皮膚の褐変が生じる。このような着色現象には、酵素であるチロシナーゼが関係している。本研究では、天然に存在するジヒドロレスベラトロールに着目し、メラニン色素の形成を調節する分子、特にチロシナーゼ阻害剤の開発を行った。その結果、33種類のフェノール配糖体やニトリルなどを新規阻害剤として見出した。また、11種類のアルデヒドを用いてチロシナーゼ阻害様式の解析を行った。さらに、2種類のフェノール配糖体がメラニン形成促進剤として働くことを突き止めた。これらの開発された分子は、光によるエイジングなどを防ぐツールとして、今後の活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：A natural product, dihydroresveratrol glucoside, possesses potent melanogenesis-inhibitory activity against melanoma cells. On the other hand, a synthetic compound, dihydroresveratrol xyloside, strongly stimulates melanogenesis in melanoma cells. Hence, the structural modification of dihydroresveratrol glycoside derives useful molecules which can control the inhibition or stimulation on melanogenesis. In this study, dihydroresveratrol-related molecules were synthesized due to develop novel melanogenesis-controlled agents. In particular, their inhibitory activity was evaluated by using tyrosinase, a key enzyme on melanogenesis, for the purpose of the investigation of the molecular logic analysis of dihydroresveratrols.

研究分野：天然物有機化学

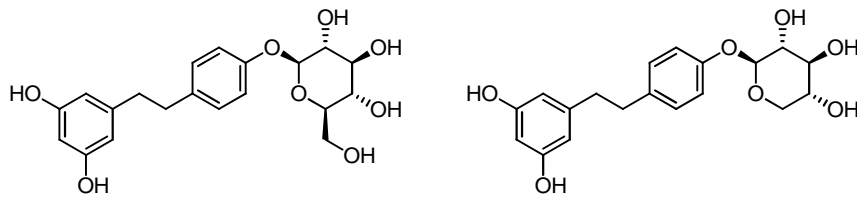
キーワード：チロシナーゼ ジヒドロオキシレスベラトロール ジヒドロレスベラトロール イソタチオシド ベンズアルデヒド ソンネルフェノリックC ベンゾニトリル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚への色素沈着は、紫外線や物理的な刺激などによる過剰なメラニン形成が原因である。チロシナーゼは、このメラニン形成の初期段階に相当するフェノール類からキノン類への反応を触媒する。この酸化により生成したキノン類は、皮膚の色素沈着以外にも、食品の褐変や昆虫の外皮硬化などの自然界における様々な着色・ポリマー化現象の起点となる。したがって、チロシナーゼを阻害することは、それらの生命現象の効果的な制御に結びつく。

化粧品や食品に利用されるツバキ油は、ツバキ科植物の *Camellia oleifera* から搾取される。近年、この植物からジヒドロレスベラトロールグルコシド(1)が単離・構造決定された(下図)。この天然物の構造中には、既存の強力なチロシナーゼ阻害剤に必須なレゾルシノール部分が含まれている。もし、1 がメラニン形成阻害活性を示すならば、それは化粧品や食品の原料となるツバキ科植物の成分であるため、応用範囲が広い。したがって、1 の化学合成とメラノーマ細胞培養系を用いた生理活性の評価を行った。



グルコシド1(天然物)

キシロシド2(誘導体)

その結果、1 は代表的なチロシナーゼ阻害剤であるコウジ酸の約 40 倍のメラニン形成阻害活性を示すことが明らかになった。また、1 は阻害活性を示す濃度において、細胞生存率と細胞内タンパク質量に影響を与えなかった。すなわち、1 の安全性についても確認できた。

以前、申請者らは、1 と類似の構造を持つビベンジル型のチロシナーゼ阻害剤を開発した。それらの構造-活性相関解析の結果、グルコシドよりもキシロシドの方が強いチロシナーゼ阻害活性を示すことが分かった。そこで同様の活性向上を期待して、1 のグルコース部分をキシロースに変更したジヒドロレスベラトロールキシロシド(2)を化学合成し、生理活性を評価した。

ところが、2 は、細胞生存率と細胞内タンパク質量に影響を与えない濃度で、1 とは逆のメラニン形成促進活性を示すことが明らかになった。

2. 研究の目的

以上のことは、ジヒドロレスベラトロールグルコシドからそのキシロシドへの変化、すなわち配糖体の糖付近の構造に依存し、メラノーマ細胞のメラニン形成スイッチが負から正へと切り替わることを意味している。しかしながら、現在まで化学合成したジヒドロレスベラトロール誘導体は、1 と 2 の二種類に限られている。したがって、糖部分を改変した様々な誘導体を化学合成し、さらに詳細な構造-活性相関解析を行う必要がある。そこでジヒドロレスベラトロール配糖体が制御するメラニン形成の阻害と促進の分子ロジックを解き明かすことを最終目的として、様々な誘導体の化学合成と生理活性評価を行った。

3. 研究の方法

【ジヒドロレスベラトロール骨格を基盤とした様々な誘導体の化学合成】

Wittig 反応を鍵反応として、ジヒドロレスベラトロール骨格を構築し、トリクロロアセトイミデート法により、そのセロビオシル化およびキシロビオシル化を行った。また、ジヒドロレスベラトロールにさらに水酸基が付与されたジヒドロオキシレスベラトロールを、Wittig 反応で構築し、そのグルコシル化を行い、種々の新規配糖体を化学合成した。

ジヒドロレスベラトロール中のレゾルシノール構造に着目し、アルドール縮合でレゾルシノール型ロドデンドリン骨格を構築した後、そのキシロシル化、グルコシル化、セロピオシル化およびマルトシル化を行った。同様の合成経路を用いて、ロドデンドリン配糖体の仮想酸化体を化学合成した。また、Baeyer-Villiger 酸化とトリクロロアセトイミデート法を用いて、レゾルシノール構造を有するイソタチオシド配糖体を数種合成した。

さらに、ロドデンドリン配糖体とイソタチオシド配糖体の構造からヒントを得たレゾルシノールアルキルグルコシド型誘導体を、Horner-Wadsworth-Emmons 反応と Koenigs-Knorr 反応を鍵段階として化学合成した。

【メラニン形成阻害・促進活性の評価】

ジヒドロレスベラトロールセロピオシドとジヒドロレスベラトロールキシロピオシドを添加して、メラノーマ細胞を培養した。後に細胞を集め、その破砕物のメラニン量を定量した。同時に、MTT 法や BCA 法などを用いて、メラノーマ細胞の生存率とタンパク質量の変化を追跡した。他の誘導体については、市販のチロシナーゼに対する阻害を指標に、50%阻害濃度を算出し、生理活性評価を行った。

【チロシナーゼ阻害反応の解析】

チロシナーゼの酵素活性は、一般的な基質であるドーパの酸化過程の追跡により測定した。高度に精製したチロシナーゼを用いて、様々なベンゾニトリルの阻害定数および阻害様式の解析を行った。同様に、天然物であるベンズアルデヒド類の阻害様式の解析を行ったが、その際はアルデヒド基とドーパの相互作用を考慮し、*t*-ブチルカテコールを基質として実験を行った。

4. 研究成果

これらの研究を推進した結果、立体構造の差異により、チロシナーゼ阻害活性が変化するロドデンドロール配糖体の開発(論文 8)、ジヒドロレスベラトロール骨格にセロピオースとキシロピオースが導入されたメラニン形成促進剤の開発(論文 7)、チロシナーゼ阻害活性を示すベンズアルデヒド類の酵素阻害様式の決定(論文 6)、チロシナーゼとビタミン C とのレドックス反応を用いた抗酸化性ポリフェノールの生産とその天然物として証明(論文 5)、ジヒドロレスベラトロール骨格を単純化したイソタチオシド関連配糖体の化学合成とそれらのチロシナーゼ阻害活性の解明(論文 4)、ジヒドロレスベラトロール骨格に水酸基が一つ結合したジヒドロオキシレスベラトロール配糖体の化学合成とそれらのチロシナーゼ阻害活性の解明(論文 3)、ジヒドロレスベラトロール骨格の一方のベンゼン環をアルキルグルコシド構造に置き換えたチロシナーゼ阻害剤の開発(論文 2)および、ベンゾニトリルのチロシナーゼ阻害効果の解析(論文 1)の複数の成果が得られた。これらの成果に基づいて、メラニン形成阻害剤のコウジ酸と同様のピロン環を持つ天然物の全合成およびレゾルシノール型イソフラボン類の化学合成へと、さらに、研究を展開させている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- 1) Nihei, K.; Kubo, I. Benzonitriles as tyrosinase inhibitors with hyperbolic inhibition manner. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *133*, 929-932. (査読有)
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.156>

- 2) Ishioka, W.; Oonuki, S.; Iwadate, T.; Nihei, K. Resorcinol alkyl glucosides as potent tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 313-316. (査読有)
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.029>
- 3) Tanaka, Y.; Suzuki, M.; Kodachi, Y.; Nihei, K. Molecular design of potent, hydrophilic tyrosinase inhibitors based on the natural dihydroxyresveratrol skeleton. *Carbohydr. Res.* **2019**, *472*, 42-49. (査読有)
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.11.006>
- 4) Matsumoto, T.; Nakajima, T.; Iwadate, T.; Nihei, K. Chemical synthesis and tyrosinase-inhibitory activity of isotachioside and its related glycosides. *Carbohydr. Res.* **2018**, *465*, 22-28. (査読有)
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.06.004>
- 5) Iwadate, T.; Nihei, K. Chemical synthesis, redox transformation, and identification of sonnerphenolic C, an antioxidant in *Acer nikoense*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1799-1802. (査読有)
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.054>
- 6) Nihei, K.; Kubo, I. Substituent effect of benzaldehydes on tyrosinase inhibition. *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *112*, 278-282. (査読有)
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.009>
- 7) Oode, C.; Shimada, W.; Yokota, M.; Yamada, Y.; Nihei, K. Dihydroresveratrol cellobioside and xylobioside as effective melanogenesis activators. *Carbohydr. Res.* **2016**, *436*, 45-49. (査読有)
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.11.004>
- 8) Iwadate, T.; Nihei, K. Rhododendrol glycosides as stereospecific tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 6650-6658. (査読有)
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.09.014>

〔学会発表〕(計 14 件)

- 1) 大出 知里, 島田 互, 横田 真理子, 岩館 丈央, 二瓶 賢一, “ジヒドロレスベラトロール型メラニン形成調節剤の分子設計”, 第 57 回天然有機化合物討論会, 2015 年
- 2) 島田 互, 横田 真理子, 二瓶 賢一, “ジヒドロレスベラトロールグリコシド類の化学合成とメラニン形成調節活性”, 日本農芸化学会 2106 年度大会, 2016 年
- 3) 大出 知里, 島田 互, 横田 真理子, 二瓶 賢一, “ジヒドロレスベラトロールグルクロニドおよび関連誘導体の化学合成とメラニン形成調節活性”, 日本農芸化学会 2106 年度大会, 2016 年
- 4) 松本 大志, 中島 拓弥, 二瓶 賢一, “イソタチオシドおよびその関連誘導体の化学合成と生理活性評価”, 日本農芸化学会 2106 年度大会, 2016 年
- 5) 岩館 丈央, 二瓶 賢一, “*o*-ジフェノール配糖体類の化学合成, 生理活性評価および探索”, 日本農芸化学会 2106 年度大会, 2016 年
- 6) 田中 優理, 鈴木 茉莉那, 小太刀 悠佳, 二瓶 賢一, “親水性に優れるチロシナーゼ阻害剤, ジヒドロオキシレスベラトロール配糖体の分子デザイン”, 日本農芸化学会 2107 年度大会, 2017 年
- 7) 二瓶 賢一, 久保 伊佐夫, “ベンズアルデヒド類のチロシナーゼ阻害効果”, 第 59 回天然有機化合物討論会, 2017 年
- 8) 田中 優理, 鈴木 茉莉那, 小太刀 悠佳, 二瓶 賢一, “ジヒドロオキシレスベラトロール配

糖体の化学合成とチロシナーゼ阻害活性”，日本農芸化学会 2018 年度大会，2018 年

- 9) 馬酔木 奈々，二瓶 賢一，“アピオスイソフラボン配糖体の全合成とそのチロシナーゼ阻害活性”，日本農芸化学会 2018 年度大会，2018 年
- 10) 石岡 和佳奈，大貫 沙弥香，岩館 丈央，二瓶 賢一，“エピロドデンドリンをリード分子とした新しいチロシナーゼ阻害剤の化学的探索”，日本農芸化学会 2108 年度大会，2018 年
- 11) 馬酔木 奈々，二瓶 賢一，“アピオスイソフラボン誘導体の化学合成とそれらのチロシナーゼ阻害活性”，日本農芸化学会 2019 年度大会，2019 年
- 12) 石岡 和佳奈，二瓶 賢一，“レゾルシノールアルキルグルコシドおよびヒドロキシア ルキルレゾルシノール，それらの強力なチロシナーゼ阻害活性”，日本農芸化学会 2019 年度大会，2019 年
- 13) 関下 帆乃香，李 佳薇，越野 広雪，二瓶 賢一，“構造訂正に向けての天然ビベンジル配糖体の化学合成”，日本農芸化学会 2019 年度大会，2019 年
- 14) 松本 拓也，張間 紗希，クリント チャップル，二瓶 賢一，“アラビドピロン類の化学合成研究”，日本農芸化学会 2019 年度大会，2019 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：レゾルシノール誘導体およびこれを含むチロシナーゼ活性阻害剤

発明者：二瓶 賢一，石岡 和佳奈

権利者：宇都宮大学

種類：特許

番号：特願 2019-009543

出願年：2019 年 1 月 23 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

宇都宮大学農学部応用生命化学科天然物有機化学研究室

<http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/chemj/npc/index.htm>

(1)研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：燕山 由己人

ローマ字氏名：Yukihito Kabuyama

研究協力者氏名：大出 知里

ローマ字氏名：Chisato Oode

研究協力者氏名：岩館 丈央

ローマ字氏名：Takehiro Iwadate

研究協力者氏名：松本 大志

ローマ字氏名：Takashi Matsumoto

研究協力者氏名：島田 互

ローマ字氏名：Wataru Shimada

研究協力者氏名：張間 紗希

ローマ字氏名：Saki Harima

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、研究者個人に帰属されます。