

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510252

研究課題名(和文)食品成分のインバース分析法を核とする生理活性物質創製スキームの構築

研究課題名(英文) Novel approaches for finding bioactive compounds with the assistance of the inverse analysis of food constituents

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：チロシナーゼは自然界に広く分布する酸化還元酵素である。本酵素により、多くのモノフェノールはo-キノンへと酸化される。不安定なo-キノンは直ちに、メラニンなどのバイオポリマーへと変換される。このポリマーは皮膚の色素沈着に関与するため、本酵素阻害の研究は、機能性化粧品、抗酸化剤や殺虫剤の開発に結びつく。一方、o-キノンはVCやNADPHなどの還元剤の働きでジフェノールへと還元される。即ち、本酵素と還元剤により、植物モノフェノールから新奇ジフェノールが生み出されている可能性が高い。そこで、チロシナーゼの阻害剤、基質と生成物に関する化学的・生物学的な研究を行い、複数の新規生理活性物質の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Tyrosinase (polyphenol oxidase) is a copper-containing oxidoreductase, which is widely distributed in nature. Many monophenols are oxidized to corresponding o-quinones through this enzymatic reaction. Generated o-quinones are usually unstable and readily transformed into polymers including melanin. This polymer results in significant deposition of pigments on the skin. Accordingly, the study of tyrosinase inhibition is clearly important for the development of functional cosmetics as well as antioxidants and insecticides. On the other hand, reactive o-quinones are reduced to o-diphenols with the aid of reducing agents such as L-ascorbic acid and/or NADPH. Thus, unique o-diphenols could be generated from plant monophenols by tyrosinase-catalyzed oxidation coupled with in vivo reductants. To perform chemical and biological studies of inhibitors, substrates and products for tyrosinase, we have discovered a number of novel bioactive compounds.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：酵素阻害剤 配糖体 ポリフェノール 酸化生成物

1. 研究開始当初の背景

チロシナーゼは、モノフェノールの *o*-ヒドロキシ化とジフェノールの *o*-キノンへの酸化を触媒する酸化還元酵素である。この連続した2つの反応は、メラニン色素形成やクテクラ形成などの自然界で観察される褐変・重合現象の初期段階に相当する。従って、この酵素の触媒サイクルの制御により、機能性化粧品、褐変防止剤や殺虫剤などの開発が期待できる。

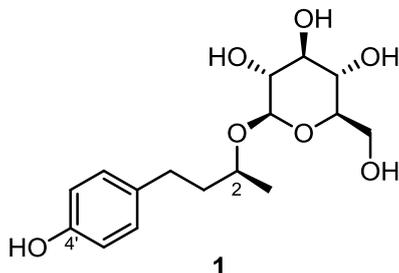
研究代表者は現在まで、天然有機化合物およびその誘導体のチロシナーゼに対する阻害活性評価を行ってきた。その過程で、阻害剤として作用するはずのいくつかのモノフェノールが、チロシナーゼの基質として酸化されることが分かってきた。この結果は、阻害剤開発研究上ではネガティブである。しかしながら、チロシナーゼ反応を物質生産の一過程として捉えると、本反応でモノフェノールから、新しい生理活性分子が次々と生み出されていることが予測できる。

2. 研究の目的

チロシナーゼ反応で生成した *o*-キノンは、ビタミンCなどの還元剤の働きにより、安定なジフェノールへと変換される。この酸化・還元過程は、植物を素材とする食品などで常に起こっている可能性が高い。そこで、モノフェノールを基質とした酵素反応の解析、酵素による酸化生成物の単離・構造決定・生理活性評価および酸化生成物の天然物としての検証を行うインバース分析法を確立し、生理活性物質の創製スキームの新規構築を目指した。

3. 研究の方法

天然モノフェノールとして、エピロドデンドリン(**1**)に着目した。この配糖体は、日本で民間薬として古くから用いられてきたメグスリノキ(*Acer nikoense*)に含まれている。



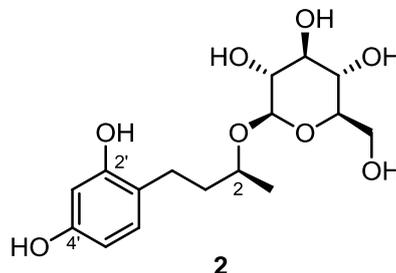
水酸基を、**1**の芳香環に導入することで、レゾルシノールやカテコールなどの様々なジフェノールを合成することができる。それらは、チロシナーゼ反応の阻害剤および生成物である可能性が高い。

そこで、アルドール縮合を主反応として、様々なフェノール骨格を持つアグリコン部分を合成し、次にトリクロロアセトイミデート法を用いて配糖体化を行う反応工程により、**1**およびその誘導体の化学合成を行った。また、得られた化合物群の生理活性を、チロ

シナーゼ、DPPA ラジカルおよび細胞培養系を用いて評価した。

4. 研究成果

市販の2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドを出発物質として、初めにレゾルシノール型のエピロドデンドリン誘導体**2**を化学合成した。



チロシナーゼを用いた生理活性評価試験の結果、天然物**1**は阻害活性をほとんど示さないのに対して、**2**は代表的なチロシナーゼ阻害剤であるコウジ酸に匹敵する阻害活性を示すことが明らかになった。

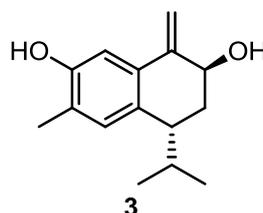
そこで、**2**の化学合成の際に得られる2位が*R*型のエピマーを、HPLCで精製し、チロシナーゼ阻害活性を測定した。その結果、この*R*型エピマーは、*S*型である**2**の二倍程度の強い阻害活性を持つことが分かった。

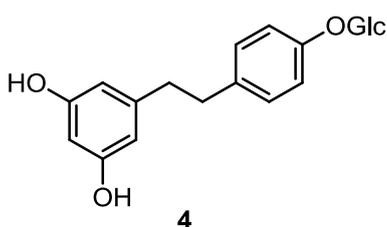
チロシナーゼ阻害剤のエピマー間で、活性が異なることは極めてめずらしい。そこでアグリコン部分のエナンチオマーと2位に様々な糖構造を有するエピマーの化学合成、キラルHPLCを用いた光学分割および生理活性評価を行った。

その結果、アグリコン部分のエナンチオマー間では、チロシナーゼ阻害活性の強さにほとんど差異が観察されなかったのに対し、糖部分をグルコースから、キシロース、セロビオースおよびマルトースなどに置き換えた誘導体では、いずれも*S*型が*R*型の二倍程度の強い活性を示すことが明らかになった。

このように本研究では、チロシナーゼの立体構造を認識する可能性のある新規阻害剤の開発に成功した。また、チロシナーゼ阻害活性を持たない天然物**1**は、チロシナーゼの基質となり、抗酸化性を持つ新しい生理活性物質に変換されることを、有機化学的および酵素化学的な観点から突き止めた。

さらに、天然モノフェノールであるイヌロイジン(**3**)の化学合成とツバキ科植物由来のジヒドロレスベラトロールグルコシド(**4**)の化学合成、誘導体合成および生理活性評価を行い、複数の新規チロシナーゼ活性調節剤の開発を達成した。





5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Iwadate, T.; Kashiwakura, Y.; Masuoka, N.; Yamada, Y.; Nihei, K. Chemical Synthesis and Tyrosinase Inhibitory Activity of Rhododendrol Glycoside. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 122-125.

Kamatani, J.; Iwadate, T.; Tajima, R.; Kimoto, H.; Yamada, Y.; Masuoka, N.; Kubo, I.; Nihei, K. Stereochemical Investigation and Total Synthesis of Inuloidin, a Biologically Active Sesquiterpenoid from *Heterotheca inuloides*. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 3141-3145.

Oode, C.; Shimada, W.; Izutsu, Y.; Yokota, M.; Iwadate, T.; Nihei, K. Synthesis of Dihydroresveratrol Glycosides and Their Effects on B16F0 Melanoma Cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 862-867.

[学会発表] (計 11 件)

岩館 丈央, 柏倉 裕, 二瓶 賢一, “ロドデンドロール配糖体の化学合成と生理活性評価”, 日本農芸化学会 2012 年度大会(2012 年 3 月 25 日, 京都女子大学)

大貫 沙弥香, 二瓶 賢一, “天然ビベンジル構造を基盤としたチロシナーゼ阻害剤の分子設計”, 日本農芸化学会 2012 年度大会(2012 年 3 月 25 日, 京都女子大学)

岩館 丈央, 柏倉 裕, 二瓶 賢一, “ロドデンドロール配糖体の化学合成とチロシナーゼ阻害活性”, 第 54 回天然有機化合物討論会(2012 年 9 月 19 日, 東京農業大学)

岩館 丈央, 柏倉 裕, 二瓶 賢一, “ロドデンドロール型チロシナーゼ阻害剤の合成と生理活性評価”, 日本農芸化学会 2013 年度大会(2013 年 3 月 27 日, 東北大学)

岩館 丈央, 二瓶 賢一, “エピロドデンドリン酸化の化学合成と生理活性評価”, 日本農芸化学会 2014 年度大会(2014 年 3 月 30 日, 明治大学)

大出 知里, 小太刀 悠佳, 島田 互, 井筒

ゆき子, 二瓶 賢一, “ツバキ科ビベンジル配糖体の化学合成と生理活性評価”, 日本農芸化学会 2014 年度大会(2014 年 3 月 30 日, 明治大学)

岩館 丈央, 二瓶 賢一, “化学的・酵素的変換を用いた生理活性ロドデンドロール酸化体の創製”, 第 56 回天然有機化合物討論会(2014 年 10 月 15 日, 高知県立県民文化ホール)

大出 知里, 島田 互, 横田 真理子, 二瓶 賢一, “ツバキ科植物由来のジヒドロレスベラトロールクルコシドを基盤とするメラニン生成調節剤の分子設計”, 日本農芸化学会 2015 年度大会(2015 年 3 月 27 日, 岡山大学)

島田 互, 横田 真理子, 二瓶 賢一, “ジヒドロレスベラトロールの化学的配糖体化と生理活性評価”, 日本農芸化学会 2015 年度大会(2015 年 3 月 27 日, 岡山大学)

岩館 丈央, 島田 互, 横田 真理子, 二瓶 賢一, “5-レゾルシノール型ロドデンドロール誘導体の化学合成と生理活性評価”, 日本農芸化学会 2015 年度大会(2015 年 3 月 27 日, 岡山大学)

松本 大志, 中島 拓弥, 二瓶 賢一, “ヤマモガシ科植物由来のレゾルシノール配糖体およびその誘導体の有機合成と生理活性評価”, 日本農芸化学会 2015 年度大会(2015 年 3 月 27 日, 岡山大学)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: ロドデンドロール誘導体
 発明者: 岩館 丈央, 柏倉 裕, 二瓶 賢一
 権利者: 宇都宮大学, 富士鋼業株式会社
 種類: 特許
 番号: 2012-047471
 出願年月日: 2012 年 3 月 4 日
 国内外の別: 国内

名称: レゾルシノール誘導体
 発明者: 二瓶 賢一
 権利者: 宇都宮大学
 種類: 特許
 番号: 2012-047469
 出願年月日: 2012 年 3 月 4 日
 国内外の別: 国内

[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
 天然有機化学研究室
<http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/chemj/npc/index.htm>

6. 研究組織

(1) 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