

安全性評価法の構築 (II)

研究分担者 伊藤 祥輔 藤田保健衛生大学医療科学部 名誉教授

研究要旨:

ロドデノール(RD)はチロシナーゼの基質となり毒性代謝物オルトキノンを生産するが、その後のオルトキノン酸化物(メラニン)の代謝は不明であった。今年度は、RD-ユーマラニンおよび RD-フェオメラニンを合成し、細胞内抗酸化物質の酸化促進作用を通常のメラニンと比較検討した。その結果、RD-ユーマラニンはフェオメラニンに匹敵する強い酸化促進作用を示すことを明らかにした。グルタチオン、システイン、アスコルビン酸、およびNADHはRD-ユーマラニンにより酸化され、同時に H_2O_2 を産生した。これがRDによるメラノサイトに対する細胞傷害の機序の一つと考えられる。

A. 研究目的

ロドデノール(RD)はチロシナーゼ活性に依存して細胞傷害性を示すが、その機序の全貌は未だ解明されていない。そこで今年度は、RDに由来するメラニンによる細胞内抗酸化剤の酸化的枯渇を通常のメラニンと比較検討した。

B. 研究方法

RD-ユーマラニン(RD-EM)、RD-フェオメラニン(RD-PM)、Dopa-ユーマラニン(Dopa-EM)、Dopa-フェオメラニン(Dopa-PM)は、1 mMのRDあるいはDopaにフェオメラニンの場合は1 mMのシステインを添加し、チロシナーゼで4時間酸化して調製した。これに1 mMのグルタチオン、システイン、アスコルビン酸、あるいはNADHを加え、1時間反応した。抗酸化物質の残存量はHPLC法にて定量した。また、酸化により生成した酸化型グルタチオンおよびシスチンも合わせて定量した。

C. 研究結果

RD-EMはDopa-PMとほぼ同速度でグルタチ

オンおよびシステインを酸化した。生成物の大半は酸化型グルタチオンおよびシスチンであった。また、同時に H_2O_2 の産生が確認された。RD-PMおよびDopa-EMの酸化活性は、RD-EM、Dopa-PMの2分の1程度であった(図1)。RD-EMは、アスコルビン酸およびNADHについても効率よく酸化した。

D. 考察

RDはチロシナーゼにより酸化されて、細胞傷害性の高いオルトキノンを生産する。オルトキノンは極めて高い反応性を持ち、グルタチオン、システインなどの非タンパク性SH化合物のみならず、タンパク中のシステイン残基とも反応し、付加体を形成する。これがRDによるメラノサイト傷害性の主要な機序と考えられる。しかし、B16メラノーマを用いた実験では、上記の代謝に加え、RD由来のメラニンが産生することが確認されている。一方、天然のフェオメラニンは強い酸化促進作用を持つことが近年明らかにされた。そこで今回、RD-EMおよびRD-PMを調製し、その酸化促進作用を調べた。そ

の結果、RD-EM の酸化促進作用は、フェオメラニンに匹敵することが分かった。

E. 結論

RDのチロシナーゼ酸化はRD-キノンおよびRD-メラニンを産生し、前者は細胞内タンパクと結合することにより、また後者は細胞内抗酸化物質を酸化して同時に活性酸素を産生することにより細胞傷害性を惹起しているものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito S., Okura M, Wakamatsu K, Yamashita T. The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin induces cysteine depletion in B16 melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 30, 63-67, 2016.

Ito S., Hinoshita M, Suzuki E, Ojika M, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of the leukoderma-inducing raspberry ketone produces (E)-4-(3-oxo-1-butenyl)-1,2-benzoquinone: Implications for melanocyte toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 859-868, 2017.

2. 学会発表

伊藤祥輔, 黄倉真恵, 若松一雅, 山下利春. ロドデノールユーメラニンは強い酸化促進作用をもつ. 第27回日本色素細胞学会. 平成28年11月12日. 岐阜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

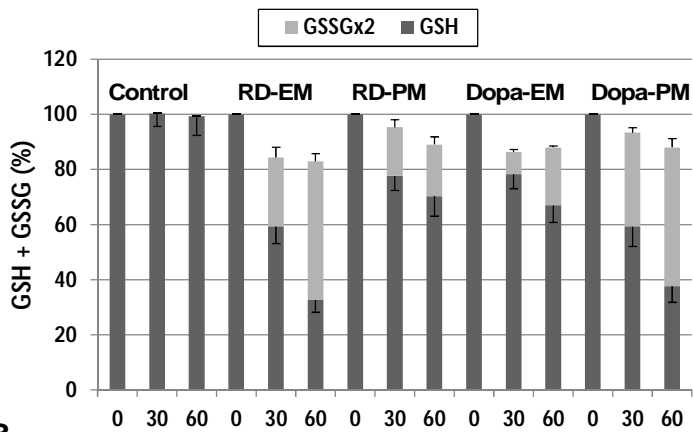
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

A



B

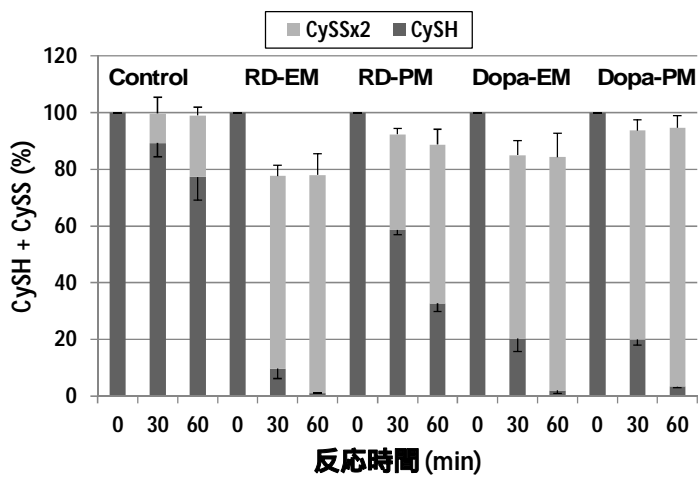


図1. 合成メラニンによるグルタチオン (GSH)およびシステイン(CySH)の酸化。(A) 1モル等量のGSHからのGSHおよびGSSG量の変化。(B) 1モル等量のCySHからのCySHおよびCySS量の変化。コントロールはチロシナーゼのみを含む緩衝液。データは3回の実験の平均値 ± SEM。