

安全性評価法(代謝物分析系)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産生する。レスベラトロール(RES)は健康によいとされ、広範に摂取されている。しかし、RESはRDと同様に4-置換フェノール構造を有するので、チロシナーゼによる代謝を調べた。その結果、RESはチロシナーゼの良好な基質となり、オルトキノンを生成した。オルトキノンはN-アセチルシステイン(NAC)と反応して、二付加体、三付加体を形成し、また牛血清アルブミンとSH基を介して結合した。一方、RESのチロシナーゼ酸化により調製したRESオリゴマーはGSHをGSSGに酸化する、プロオキシダント活性をもつことが示された。これらの結果から、RESのチロシナーゼ酸化は細胞障害性をもたらす可能性が示唆された。

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(IJMS, 2018)。レスベラトロール(RES)は、その抗酸化作用、抗炎症作用、抗老化作用などにより健康によいとされ、広範に摂取されている。皮膚におけるその作用についても、一般に美白剤としての効果が期待されている。しかし、RESはRDと同様に4-置換フェノール構造を有し、チロシナーゼにより反応性の高いオルトキノンを酸化され、メラニン産生細胞に対して毒性を發揮する可能性が懸念される。そこで今年度は、RESのチロシナーゼ酸化によるオルトキノンの生成とそのチオール化合物との結合形成などを調べた。

B. 研究方法

RES 100 μ M を pH 6.8 あるいは 5.3 でチロシナーゼにより酸化し、反応を UV-Vis スペクトルあるいは HPLC で追跡した。必要に応じてアスコルビン酸(AA)あるいは N-アセチルシステイン(NAC)を加えた。

C. 研究結果

RESはチロシナーゼの良好な基質となることが分かった。生成物は pH 6.8 では極めて不安定であるが、pH 5.3 においては 485 nm に吸収極大をもつオルトキノンの生成が確認された。オルトキノンは、AA で還元してカテコール体として同定した。オルトキノンの高い反応性は、NAC の存在下で二付加体および三付加体を生成することにより示された。これらの付加体の構造は、NMR および MS による確認された。システイン、グルタチオン(GSH)も二付加体を生成した。

RES キノンがタンパクと SH 基を介して結合するかどうか、牛血清アルブミン(BSA)および SH 基を保護した NEM-BSA を用いて調べた。その結果、BSA は 314 nm に吸収極大をもつ付加体を形成した。一方、NEM-BSA は 390 nm に吸収をもつ付加体を形成した。BSA ではチオール基が NEM-BSA ではアミノ基が反応に寄与したものと推測される。

RES のチロシナーゼによる酸化体がプロオキシダント活性をもつかどうかを調べた。pH 7.4 で 120 分間酸化して RES オリゴマーを調製し、そこへ GSH を加えて GSH の減少と GSSG への酸化を追

跡した。その結果、60分後にはGSHは50%減少し、その大部分はGSSGに酸化された。一方、RDオリゴマーはGSHを90%減少させた。

D. 考察

RESはチロシナーゼにより酸化されてオルトキノンを産生する。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。RESがメラニン産生細胞に対して細胞障害性をもつか否かは明確には示されていないが、我々の先行研究(Okuraら、*J Dermatol Sci*, 2015)では、B16メラノーマ細胞およびヒトメラノサイトに対してIC50値が30 μ M程度の強い増殖抑制を示している。また、RESオリゴマーはRDオリゴマーほどではないが、プロオキシダント活性をもつことも興味深い。

E. 結論

RESのチロシナーゼ酸化はRES-キノン、次いでRES-オリゴマーを産生し、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(枯渇)することにより細胞傷害性を惹起する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito S, Agata M, Okochi K, Wakamatsu K. The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin is enhanced by ultraviolet A radiation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 31, 523-528, 2018. Doi: 10.1111/pcmr.12969.

Ito S, Wakamatsu K. Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. *Int J Mol Sci.* 19, E552, 2018. Doi: 10.3390/ijms19020532.

Goto N, Tsujimoto M, Nagai H, Masaki T, Ito S, Wakamatsu K, Nishigori C. 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol)-induced melanocyte cytotoxicity is enhanced by UVB exposure through generation of oxidative stress. *Exp Dermatol.* 27, 754-762, 2018. Doi: 10.1111/exd.13555.

Ito S, Fujiki Y, Matsui N, Ojika M, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of resveratrol produces a highly reactive ortho-quinone: implications for melanocyte toxicity. *Pigment Cell Melanoma Res.*, in revision.

2. 学会発表

なし

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