

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 藤田医科大学医療科学部 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。エクオール(EQ)は健康、美容によいとされ、広範に摂取されている。しかし、EQ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、EQ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、一付加体、二付加体を形成した。一方、EQのチロシナーゼ酸化により調製したEQオリゴマーはGSHをGSSGに酸化し、またH₂O₂を産生する、プロオキダント活性をもつことが示された。これらの結果から、EQ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。前年度は、健康によいとされるレスベラトエオール(RES)がチロシナーゼの良好な基質となり、美白剤としては適切ではない可能性を報告した(PCMR, 2019)。エクオール(EQ)は、大豆イソフラボンであるダイゼニンから腸内細菌の作用により生成するが、健康、美容によいとされ、サプリメントとして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、シミに対する効果が期待されている。しかし、EQ(7,4'-ジヒドロキシイソフラボン)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発揮する可能性が懸念される。また、EQには2個のフェノール性OH基があり、両者の反応性の違いにも興味を持たれる。そこで今年度は、EQ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

EQ100 μMをpH 6.8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)などSH化合物を加えた。

C. 研究結果

EQ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において400 nmに吸収極大をもつオルトキノンの生成が確認された。オルトキノンは還元してカテコール体として、HPLCにより精製した。NMRおよびMS分析により、2種類のモノカテコール体(6-hydroxy-EQ, 3'-hydroxy-EQ)および1種類のジカテコール体(6,3'-dihydroxy-EQ)が同定された。

オルトキノンは、SH化合物であるNACあるいはグルタチオン(GSH)と反応して、一付加体および二付加体を生成した。これらの付

加体の構造は、NMR および MS により確認され、結合位置は 5 位と 5' 位であった。システインの付加体は酸化されやすく、単離には至らなかった。

なお、EQ 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 を用いて調べることが計画している。

次に、EQ 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 EQ 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 60% 減少し、その大部分は GSSG に酸化された。また、EQ オリゴマーは、 H_2O_2 の産生を有意に促進した。

D. 考察

EQ 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、グルタチオンなどの非タンパク性 SH 化合物と反応し、付加体を形成する。EQ の 2 個の OH 基がいずれも酸化され、ジカテコール体が生成することは興味深い。また、生成したカテコール基のうちの 1 つが、RD の酸化により生成するクロマン骨格(RD-環状カテコール)を持つことから、RD と同様に細胞毒性をもたらす可能性が示唆される。

また、EQ オリゴマーは RD オリゴマーほどではないが、RES オリゴマーよりも高いプロオキシダント活性をもつことも興味深い。

E. 結論

EQ のチロシナーゼ酸化は EQ-キノン、次いで EQ-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, 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.* 32, 766-776, 2019. DOI: 10.1111/pcmr.12808.

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