

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生産する。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について、昨年度に引き続き調べてきた。今年度は、ヒトチロシナーゼを強制発現したT293細胞を用いてEQの代謝を解析した。その結果、EQは細胞内でヒトチロシナーゼの良好な基質となり、濃度依存的にシステインおよびグルタチオンの二付加体を形成した。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。また、白斑形成能を持つラズベリーケトンについて、その活性代謝物であるDBL-カテコールの代謝を調べ、Diels-Alder型反応による二量体、三量体の生成を証明した。

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。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。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体に酸化され、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。そこで、前年度は、EQの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、オルトキノン体を生成し、*N*-アセチルシステインと反応して、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、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。そこ

で今年度は、ヒトチロシナーゼを強制発現させたT293細胞を用いて、チロシナーゼ依存性の代謝が細胞内で起こるかどうかを調べた。なお、この研究は、研究分担者最上知子博士との共同研究による。

また、RDのケトン体であるラズベリーケトン(RK)は、チロシナーゼにより酸化されて(*E*)-4-(3-オキソ-1-ブテニル)-1,2-ベンゾキノン(DBL-キノン)を生成する(Itoら、Chem. Res. Toxicol., 2017)。このキノンは構造的に高い反応性を持ち、RKによる白斑形成能の原因物質と考えられる。今年度は、その代謝物の構造を調べた。この研究は、ボストン大学 Sugumaran 教授との国際共同研究により達成された。(Sugumaranら、IJMS, 2020)。

B. 研究方法

ヒトチロシナーゼを強制発現させた293T細胞にEQ50, 100, 200 μ Mを2時間作用させ、細胞中および培地中の代謝物をHPLC-電気化学検

出法により解析した。

DBL-キノンの代謝物は、LC-MS により解析した。

C. 研究結果

EQ の細胞内代謝については、システインおよびグルタチオンの二付加体 DiCys-EQ-ジカテコール(diC)およびDiGS-EQ-ジカテコールがEQ濃度依存的に細胞中で生成し、培地に放出されることが示された。100 μ M EQ のうち 30 μ M が消費され、0.60 μ M の DiCys-EQ-diC と 0.66 μ M の DiGS-EQ-diC が培地中に検出されたことから、約 4%が代謝されて付加体を形成したことになる。この代謝率は他の白斑形成フェノール体に比べてやや高値であった。

DBL-キノンの試験管内での代謝については、反応は極めて速く進行するが、LC-MS により解析し、二量体、三量体の生成が示された。

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、di-キノン体を経て二付加体が生成することは、EQ オルトキノンの高い反応性を示している。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。

DBL-キノンの二量体、三量体の形成は、オルトキノンと共役二重結合との間のイオン型 Diels-Alder 反応によるものと考えられる。

E. 結論

EQ が細胞内でチロシナーゼにより酸化され、

EQ-di-キノンを生成し、チオール類と結合することが示された。これにより EQ は細胞内タンパクと結合して細胞傷害性を惹起する可能性が示唆された。

RK のチロシナーゼによる活性代謝物である DBL-キノンは速やか二量体、三量体を形成することから、RK による白斑形成の原因物質であ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, Sugumaran M, Wakamatsu K. Chemical reactivities of *ortho*-quinones produced in living organisms: fate of quinoid products formed by tyrosinase and phenoloxidase action on phenols and catechols. *Int J Mol Sci.* 21: E6080 (36 pages), 2020.

Sugumaran M, Umit K, Evans J, Muriph R, Ito S, Wakamatsu K. Oxidative oligomerization of DBL catechol, a potential cytotoxic compound for melanocytes, reveals the occurrence of novel ionic Diels-Alder type additions. *Int J Mol Sci* 21: E6774 (11 pages), 2020.

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