

メラニン生合成阻害作用を示す海洋天然物の探索

北海道大学大学院薬学研究科

小林 淳 一

Tyrosinase inhibitors may control over production of the dermal melanin pigment since tyrosinase, which is a bifunctional copper protein widely distributed in animals and plants, plays an important role in the process of melanin biosynthesis. In our going investigation of bioactive substances from marine organisms, we have isolated novel cyclic peptides, showing tyrosinase inhibitory activity, from a marine sponge *Hymeniacidon* sp. and novel alkaloids possessing inhibitory activity of melanin synthesis from a marine sponge *Amphimedon* sp.

1 緒 言

近年、紫外線の増加といった原因からシミ・ソバカスや日焼けといった肌の色素沈着に関する関心が、確実に増加している。こういった皮膚の色素沈着の主な要因は、紫外線による日焼け、ホルモン分泌異常によるメラニンの生産と排泄のバランスが崩れることによると考えられており、スキンケアにおける重要な問題となっている。皮膚色素のメラニン是非溶解性の巨大分子で、チロシンを出発物質として生合成される。その初期段階を触媒する酵素チロシナーゼが皮膚色素の形成に重要な役割を担っていることが明らかになっており、チロシナーゼによるメラニンの過剰生産を効率的に抑制することができれば、こういった色素沈着異常の予防や治療が可能になるものと期待される。

これまでにメラニンの合成阻害物質としては、こうじ酸やメルカプトプロピオニルグリシンが知られている。これらの化合物は、チロシナーゼから銅イオンを除去することにより作用発現することから、重篤な副作用を持つ点で注意が必要とな

る。また合成ヒドロキノン類（ヒドロキノン、ヒドロキシモノベンジルエーテル）にもチロシナーゼ阻害作用が認められるが、皮膚の脱色による白斑を生じるなどの副作用が報告されている。天然物由来のチロシナーゼ阻害作用としては、コケモモから得られたヒドロキノン化合物アルブチンがあり、現在化粧品添加物として広く用いられている。これらのことからチロシナーゼ阻害作用は、チロシン類似の構造を持つ化合物に特異的であると考えられてきたが、最近、構造的に類似性のない環状ペプチド化合物にチロシナーゼ阻害作用あるいはメラニン合成阻害作用が見い出されている。乳酸菌から単離された環状テトラペプチドや、ナデシコ科植物から得られた環状オクタペプチド・シュードステラリン類は、アルブチンと同等、あるいはそれ以上に強い阻害活性を示すことが知られている。しかしながら、海洋生物由来のメラニン合成阻害物質は、これまでに報告されてこなかった。

本研究では、これまでこの分野において未開拓の状況にある海洋生物を素材として、チロシナーゼ阻害活性を主な指標としたメラニン合成阻害物質を探索することを目的とする。

2 実験・結果

沖縄で採取した海綿動物、原索動物、腔腸動物などをメタノールを用いて抽出し、有機溶媒で分配した。得られた抽出物に対してチロシナーゼ阻



Search for new marine natural products inhibiting melanin biosynthesis

Jun'ichi Kobayashi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

害作用を指標としたスクリーニングを行い、顕著な活性を示す抽出物を選別した。

沖縄産海綿 *Hymeniacidon* sp. の抽出について、上記の活性を指標にしてシリカゲルカラム、ゲルろ過、ならびに逆相 HPLC などの種々のクロマトグラフィーにより精製し、新規環状ペプチド Hymenamide A～E, G～H および J～K を、既知環状ペプチドとともに単離した (Fig. 1, 2) ¹⁻³⁾。

これらの環状ペプチドの 1 次構造は、各種 2 次元 NMR データの解析、部分加水分解反応で生成したペプチドのエドマン分解、あるいは FAB MS/MS のデータに基づいて帰属した。たとえば、Hymenamide B の構造解析については、本化合物の ¹H NMR データならびに酸加水分解物のアミノ酸分析により、2 モルの Pro および Phe、1 モルの Glu、Val、および Asn の存在が示唆された。各アミノ酸残基のつながりについては、HMBC ならびに FAB MS/MS (Fig. 3) に基づいて帰属した。各アミノ酸残基の絶対立体配置は、Marfey 法によりいずれも L 体であることがわかった。さらに NOE データおよび分子力場計算に基づいて、Hymenamide B の溶液中でのコンホメーションを推定した (Fig. 4)。同様の手法により、他の環

状ペプチドの構造を解析した。Hymenamide A～E は蛋白性アミノ酸から構成される環状ヘプタペプチドであり、Hymenamide G, H, J および K は環状オクタペプチドである。これらの環状ペプチドは、いずれも芳香族アミノ酸を含む点、ならびに Hymenamide J, K を除いて複数のプロリン残基を有している点が特徴である。

一方、別種の沖縄産海綿 *Theonella* sp. からは、新規環状ペプチド Keramamide B および F を単離した (Fig. 2) ^{4, 5)}。Keramamide B は、酸加水分解物のアミノ酸分析により、Pro, Orn, Ile, n-Val, α -aminobutyric acid (Aba) が各 1 残基ずつ存在することが明らかとなった。2 次元 NMR を詳細に解析することにより、異常アミノ酸として 2-bromo-5-hydroxytryptophan (BhTrp) の存在が判明し、他に α -ケト- β -アミノ酸、オキサゾール環に共役したアクリル酸の存在も示唆された。各アミノ酸残基のつながりについては HMBC および NOESY 等の 2 次元 NMR ならびに FAB MS/MS により帰属した。各アミノ酸残基の絶対立体配置は、分解生成物のキラル GC 分析により決定した。Keramamide F も Keramamide B とほぼ同様の手法で構造解析を行った。酸加

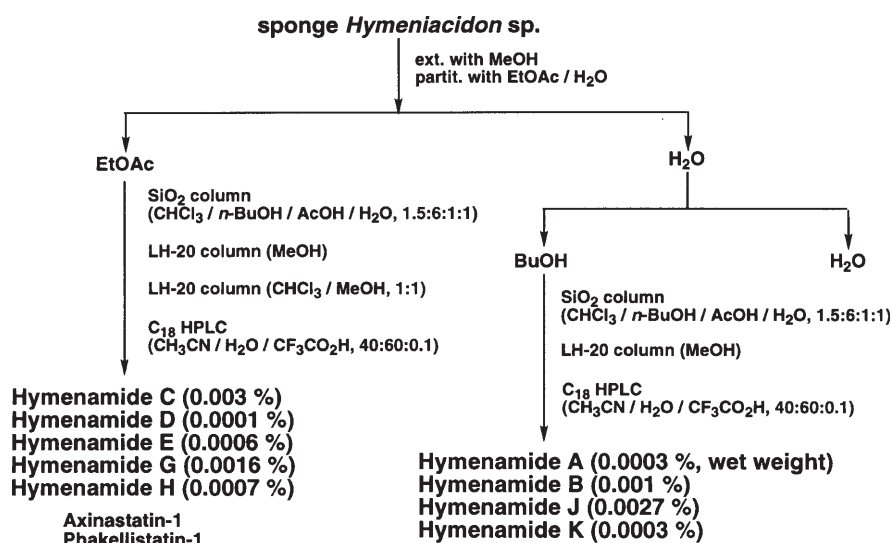


Fig.1

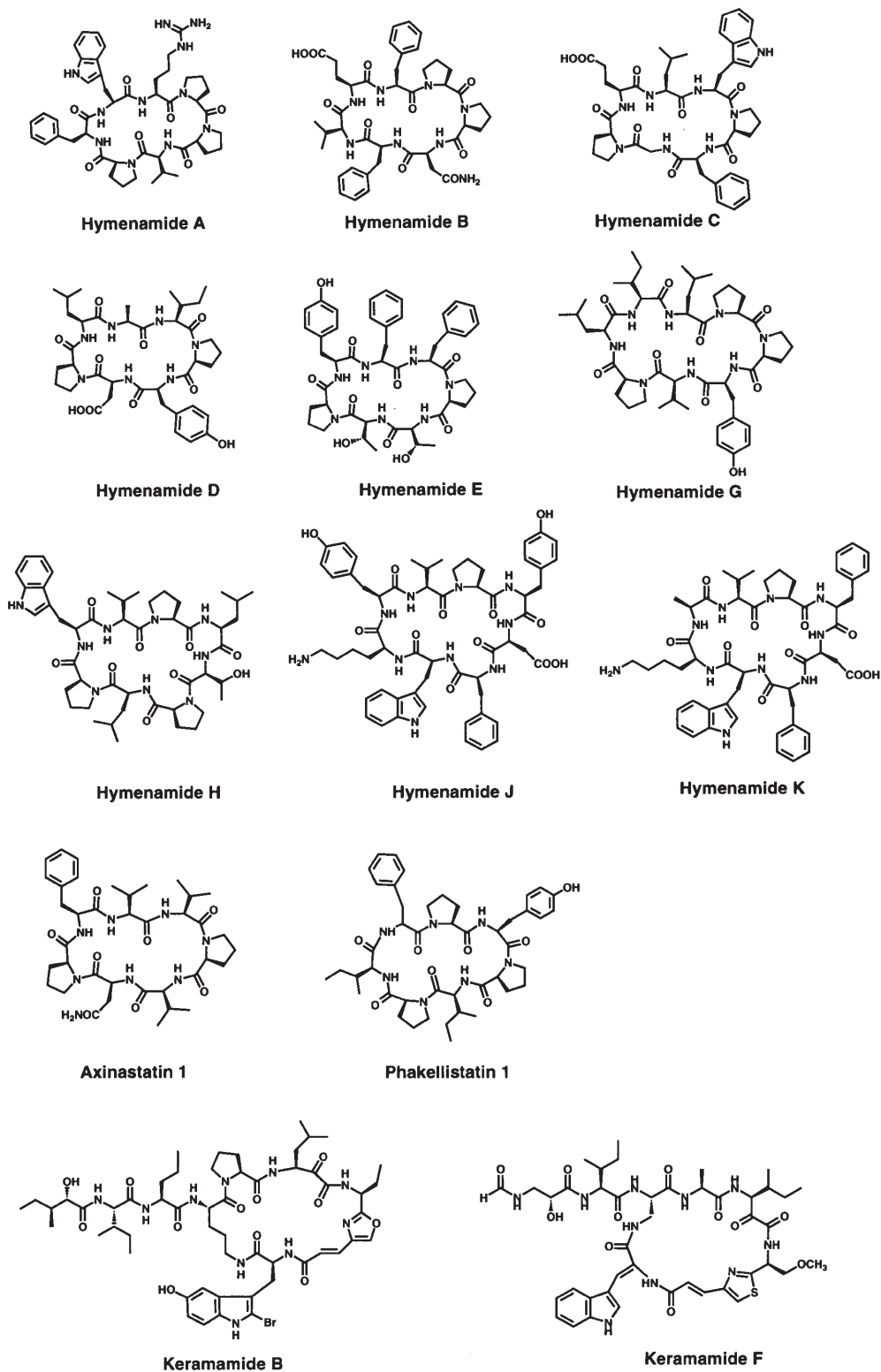


Fig.2

水分解物のアミノ酸分析により、Ala、Ile、Ise、diaminopropionic acid (Dpr) が各1残基ずつ存在することが明らかとなった。2次元NMRを詳細に解析することにより、異常アミノ酸として α, β

-dehydrotryptophan (Δ -Trp) の存在が判明し、他に α -ケト- β -アミノ酸、チアゾール環に共役したアクリル酸の存在も示唆された。各アミノ酸残基のつながりについては2次元NMRならびに

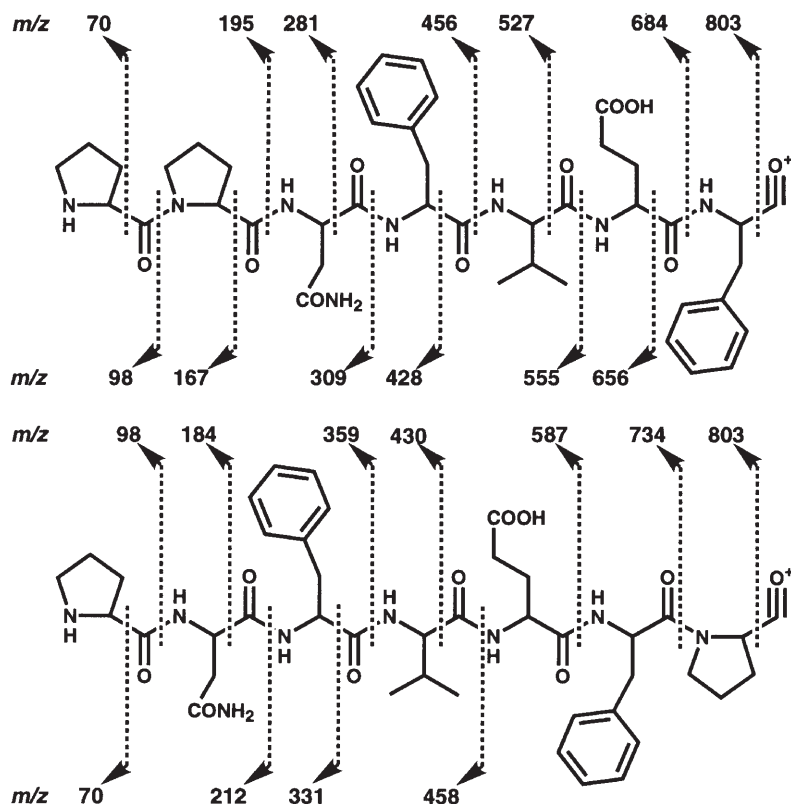


Fig.3 FAB MS/MS Fragmentations of Hymenamide B

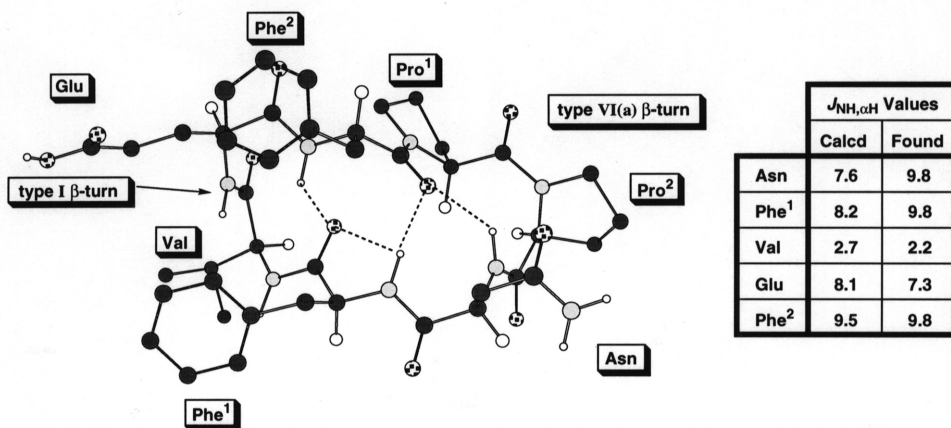


Fig.4 Three-Dimensional Structure of the Lowest-Energy Conformer of Hymenamide B Evaluated by Molecular Mechanics Calculation

FAB MS/MSにより帰属し、各アミノ酸残基の絶対立体配置は、分解生成物のキラル GC 分析により決定した。

上記の環状ペプチドについてチロシナーゼ阻害活性を調べたところ、Hymenamide E および K ならびに Keramamide F に活性が認められた(表 1)。これらの結果から、活性発現には、環状部分の大きさにはあまり関係なく、芳香族アミノ酸部分が活性に影響を及ぼしているのではないかと考えられる。

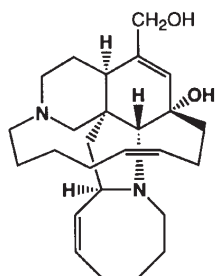
沖縄産海綿 *Amphimedon* sp. より新規アルカロイド Ircinol A、Keramaphidin B、および Keramamine C を、既知インドールアルカロイド Manzamine A とともに単離した^{6~8)}。Keramaphidin B は、高分解能 EIMS より得られた分子式から 5 環性化合物と推定された。HMQC-HOHAHA ならびに HMBC 等の 2 次元 NMR データに基づいて Keramaphidin B の構造を帰属した。相対立体配置については、NOESY スペクトルと X 線結晶解析により明らかにした。Keramaphidin B は全体として光学活性体であるにもかかわらず、X 線結晶解析に用いられた結晶はラセミ体であった

ことから、Keramaphidin B はエナンチオ混合物であることが推定された。キラルカラムを用いた HPLC 分析の結果、(+)-体および(-)-体の比率は約 20 : 1 であることがわかった。Ircinol A は、高分解能 EIMS より、既知の Ircinal A よりも水素原子が 2 個多いことが明らかとなり、Ircinal A のアルデヒド部分がアルコールに還元された化合物と推定された。このことは Ircinal A の DIBAL による還元生成物のスペクトルデータが、Ircinol A のそれらと一致したことからも確認された。Keramamine C の NMR データは既知の Manzamine C と類似しており、高分解能 EIMS より、Manzamine C よりも 4 Dalton 大きいことがわかった。NMR データの比較により、Keramamine C は Manzamine C の β -carboline 環が tetrahydro- β -carboline 環に置き換わった構造であると帰属した (Fig. 5)。

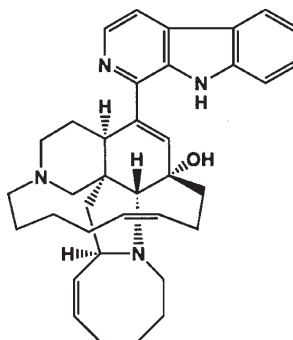
上記のマンザミン関連アルカロイドの他に、海綿 *Theonella* sp. より単離したマクロライド Theonezolid A⁹⁾、Spongidae 科の海綿より分離したセスキテルペノイドキノン Nakijiquinone A¹⁰⁾、ならびにホヤ *Aplidium multiplicatum* より単離

表 1 海綿由来の環状ペプチドのチロシナーゼ阻害活性

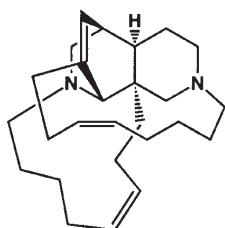
化合物	阻害% (mean $\pm$ S.D., n = 2~4)			
	濃度(μ g/mL)	40	100	200
Hymenamide A		0.65 $\pm$ 3.71	9.80 $\pm$ 6.72	1.37 $\pm$ 4.30
Hymenamide B		5.35 $\pm$ 10.95	11.43 $\pm$ 6.78	9.38 $\pm$ 4.30
Hymenamide C		-1.07 $\pm$ 5.29	1.96 $\pm$ 3.61	9.08 $\pm$ 5.80
Hymenamide D		2.90 $\pm$ 1.27	11.11 $\pm$ 3.28	12.77 $\pm$ 5.43
Hymenamide E		0.67 $\pm$ 3.52	12.86 $\pm$ 2.51	18.16 $\pm$ 4.89
Hymenamide G		-3.73 $\pm$ 5.05	3.93 $\pm$ 2.47	14.31 $\pm$ 3.06
Hymenamide H			1.20 $\pm$ 6.03	-4.83 $\pm$ 0.13
Hymenamide J		0.31 $\pm$ 7.69	13.36 $\pm$ 6.79	15.20 $\pm$ 9.39
Hymenamide K		5.87 $\pm$ 2.43	9.72 $\pm$ 10.64	18.00 $\pm$ 0.22
Axinastatin-1		-1.45 $\pm$ 0.38	7.36 $\pm$ 5.89	11.98 $\pm$ 2.69
Phakelistatin-1		1.18 $\pm$ 1.32	13.77 $\pm$ 4.50	16.58 $\pm$ 0.17
Keramamide B		-5.68 $\pm$ 1.21	1.33 $\pm$ 5.64	8.34 $\pm$ 1.18
Keramamide F		2.06 $\pm$ 0.86	14.88 $\pm$ 5.33	20.19 $\pm$ 1.23



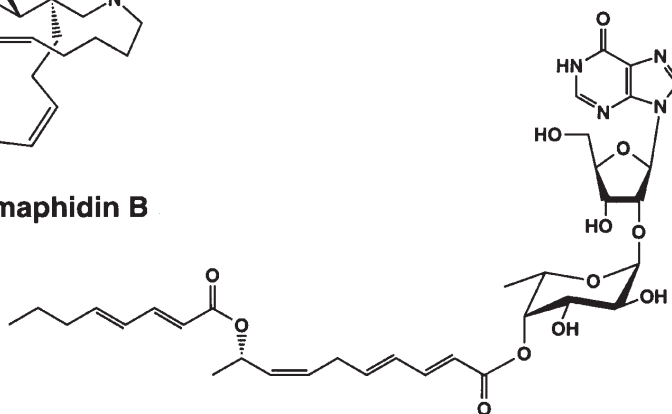
Ircinol A



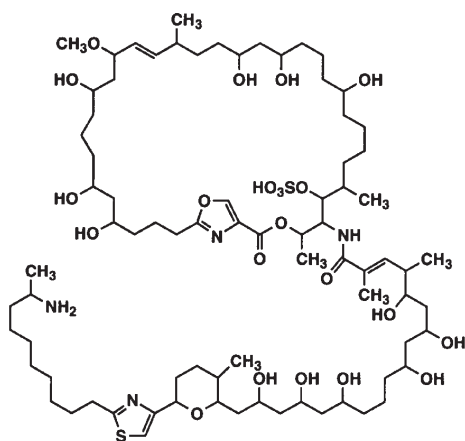
Manzamine A



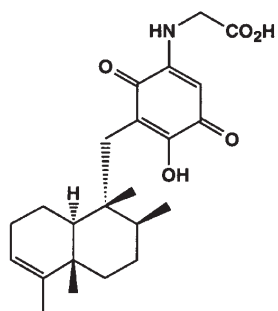
Keramaphidin B



Shimofuridin A



Theonezolid A



Nakijiquinone A

Fig.5

表2 海洋天然物質のメラニン合成阻害活性

化合物	濃度 (μg/mL)					
	17	8	4	2	1	0.5
Keramamide B	-	-				
Keramamide F		+	+			
Shimofuridin A			-	-		
Nakijiquinone A	-	-				
Keramamine C	T	T				
Theonezolid A				T	+	
Keramaphidin B		+	+			
Hymenamide C	+					
Manzamine A					+	+
Ircinol A				+	+	

+: positive, -:negative, T:toxic

したヌクレオシド関連化合物 Shimofuridin A¹¹⁾ (Fig. 5) について、B 16 メラノーマ細胞のメラニン合成阻害作用を調べた (表2)。その結果、Manzamine A および Ircinol A に顕著な活性が認められた。これらの化合物は共通の5環性構造を有しており、これらの部分構造が活性発現に重要であると推測される。

3 考 察

海洋生物から単離した環状ペプチドについて、チロシナーゼ阻害活性を調べた結果、3種のペプチドに活性が認められた。これらのペプチドに含まれる芳香族アミノ酸が活性発現に寄与しているものと推測される。一方、B-16 メラノーマ細胞のメラニン合成阻害活性については、5環性構造を有するアルカロイドに顕著な活性が認められたことから、これらの環構造が活性発現に重要ではないかと考えられる。以上の結果をもとに、構造活性相関を検討することにより、より優れたチロシナーゼ阻害物質ならびにメラニン合成阻害物質の開発を検討する予定である。一方、海洋生物を素材としたメラニン合成阻害剤の研究は緒につい

たばかりであり、今後、さらにスクリーニングを進めることにより、これまでにない新しいタイプのメラニン合成阻害剤の発見が大いに期待される。

引用文献

- 1) Kobayashi J., Tsuda M., Nakamura T. et al. : Hymenamides A and B, new proline-rich cyclic heptapeptides from the Okinawan marine sponge Hymeniacidon sp., Tetrahedron, 49, 2391-2402, 1993.
- 2) Tsuda M., Shigemori H., Mikami Y., et al. : Hymenamides C - E, new cyclic heptapeptides with two proline residues from the Okinawan marine sponge Hymeniacidon sp., Tetrahedron, 49, 6785-6796, 1993.
- 3) Tsuda M., Sasaki T., and Kobayashi J. : Hymenamides G, H, J, and K, four cyclic octapeptides from the Okinawan marine sponge Hymeniacidon sp., Tetrahedron, 50, 4667-4680, 1994.
- 4) Kobayashi J., Itagaki F., Shigemori H., et al.,

- : Keramamides B-D, novel peptides from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp., J. Am. Chem. Soc., 113, 7812-7813, 1991.
- 5) Itagaki F., Shigemori H., Ishibashi M. et al. : Keramide F, a new thiazole-containing peptide from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp., J. Org. Chem., 57, 5540-5542, 1992.
- 6) Tsuda M., Kawasaki N., and Kobayashi J. : Ircinols A and B, first antipodes of manzamine-related alkaloids from an Okinawan marine sponge, Tetrahedron, 50, 7957-7960, 1994.
- 7) Kobayashi J., Tsuda M., Kawasaki N. et al. : Keramaphidin B, a novel pentacyclic alkaloid from a marine sponge *Amphimedon* sp.: a plausible biogenetic precursor of manzamine alkaloids, Tetrahedron Lett., 35, 4383-4386, 1994.
- 8) Tsuda M., Kawasaki N., and Kobayashi J. : Keramaphidin C and keramamine C, plausible biogenetic precursors of manzamine C from an Okinawan marine sponge, Tetrahedron Lett., 35, 4387-4388, 1994.
- 9) Kobayashi J., Kondo K., Ishibashi M. et al. : Theonezolid A, a novel polyketide natural product from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp., J. Am. Chem. Soc., 115, 6661-6665, 1993.
- 10) Shigemori H., Madono T., Sasaki T. et al. : Nakijiquinones A and B, new antifungal sesquiterpenoid quinones with an amino acid residue from an Okinawan marine sponge, Tetrahedron, 50, 8347-8354, 1994.
- 11) Kobayashi J., Doi Y., and Ishibashi M. : Shimofuridin A, a nucleoside derivative isolated from the Okinawan marine tunicate *Aplidium multiplicatum*, J. Org. Chem., 59, 255-257, 1994.