植物由来環状ペプチド類のチロシナーゼ阻害活性に関する研究

東京薬科大学 薬学部

竹 谷 孝 -

We have focused our attention on various naturally occurring cyclic peptides with unique structures and biological activities, especially tyrosinase inhibitors, from higher plants. As a part of our continuing studies in search of new bioactive cyclic peptides from higher plants, we have isolated 26 novel cyclic peptides, named pseudostellarins A - H from the roots of Pseudostellaria heterophylla, dichotomins A - I from the roots of Stellaria dichotoma var. lanceolata, yunnanins A - F from the roots of Stellaria yunnanensis, and delavayin from the roots of Stellaria delavayi, all of them belonging to Caryophyllaceae family. Some of them showed tyrosinase inhibitory and cell growth inhibitory activities. These structures were elucidated by extensive 2D NMR such as COSY, HOHAHA, HMBC, HMQC, phase sensitive NOESY and ROESY spectra, chemical degradation and ESI MS / MS methods. Also, in order to determine the importance of the relationships between chemical composition and three-dimensional structure, conformational analyses of cyclic peptides, pseudostellarin D (4), yunnanins A (18) and C (20) using X-ray crystallography, high field NMR and MD calculations employing distance constraints were homologous to those observed in the solid state.

1 緒 言

環状ペプチドは抗腫瘍活性,抗菌活性,免疫抑 制活性などの多用な生理活性作用が報告されてお り,医薬品開発の重要な化合物群の一群を築きつ つある。これら環状ペプチド類は海洋生物・菌類 の二次代謝産物の生理活性物質として単離,構造 決定されていることが多いのに対して,高等植物 由来環状ペプチド類の報告例が希であったので, 高等植物由来の環状ペプチド類に的を絞り,活性 物質の単離・構造決定を行ってきている^{1,2)}。こ の研究過程において,ナデシコ科の漢方生薬であ る太子参 (*Pseudostellaria heterophylla*の根)より チロシナーゼ阻害活性作用を有する環状ペプチド pseudostellarin 類を単離・構造決定することがで きた。このチロシナーゼ阻害活性は,メラニンの 生成を抑制して皮膚の美白を保持するので,本活



Studies on the tyrosinase inhibitors of cyclic compounds from higher plants Koichi Takeva

School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy & Life Science 性を有するアルブチン、コウジ酸などが化粧品な どに利用されている。しかしながら、従来知られ ているチロシナーゼ阻害剤の作用は、十分に満足 されるものではなく、新規構造のチロシナーゼ阻 害剤が求められているにもかかわらず、その新素 材に関する研究は、国内外を問わず非常に少ない のが現状でり、我々は太子参3~7)を含め、銀柴 胡 Stellaria dichotoma var. lanceolata^{8~11)}, 千針 万線草 Stellaria yunnanensis^{12~15)} および Stellaria delavayi¹⁶⁾ 中の環状ペプチド類の探索研究を行い, それぞれより新規環状ペプチドを単離・構造決定 L, pseudostellarins A - H(1 - 8), dichotomins A-I (9 - 17), vunnanins A-F (18-23) および delavayin A-C (24-26) と命名した。これらの構 造は1.2次元 NMR および ESI MS/MS により決 定した。また、これらのコンホメーション解析お よび生理活性についても検討した。

2 実験・結果

太子参 (10kg) を 90% メタノールで加温抽出 し,得られた抽出物を n-ブタノール/水で分配 した。次いで n-ブタノール画分 (167.3g) をドラ ーゲンドルフ試薬,硫酸試薬を指標に分離・精製 を行った。まず, n-ブタノール可溶画分を Diaion HP-20を用い, 溶媒系として水-メタノールのグ ラジエント系で分離し, 引き続き 80%, 100%メタ ノール画分をシリカゲルカラムクロマト, ODS カ ラムを用いた逆相 HPLC で順次, 分離・精製した 結果, 8種類の環状ペプチド pseudostellarins A-H (1-8)を単離した。銀柴胡 (8.5kg), 千針万線 草 (7.0kg) および *Stellaria delavayi* (10kg) につい ても同様の分離・精製手法を用い, メタノール抽 出物を順次, 分離・精製することにより, それぞ れ dichotomins A-I (9-17), yunnanins A-F (18-23) および delavayins A-C (24-26) と命名した環 状ペプチドを得た。

単離された26種の化合物は、赤外吸収スペク トルにおけるアミドカルボニルの吸収や pvridine -d 5. DMSO-d6 による¹H. ¹³C NMR の測定から 得られたスペクトルデータより、ペプチド性化合 物であることが示唆されたため、まず各サンプル を常法に従い 6N HCl, 110℃で加水分解した後, アミノ酸分析を行い.含有アミノ酸の組成を決定 した。次いで2次元NMRを用いて各アミノ酸の ¹H, ¹³C NMR シグナルを帰属した後, HMBC スペ クトルによるロングレンジ相関および NOESY. ROESY スペクトルによる NOE 相関を解析する ことにより1次構造を決定した。また、各アミ ノ酸の絶対立体配置の決定には、Marfey法¹⁷⁾を 適用して分析したところ、2種類の異常アミノ 酸 (γ -hydroxy Ile, δ -hydroxy Ile) を除いて, pseudostellarin 類, dichotomin 類, yunnanin 類, delavayin 類の構成アミノ酸のいずれもL体である ことが判明した。また、この際アミド結合(CO-NH) との HMBC スペクトルにおけるロングレン ジ相関、あるいは連続した異種アミノ酸間におけ る NOE, ROE 相関の観察, 高分解能 FABMS か ら決定された分子式などから、同じアミノ酸組成 の直鎖ペプチドに比べ, H2Oが1分子少ないこと などから、すべて環状ペプチドであると決定した。 なお, Table 1 に P. heterophylla, S. dichotoma var lanceolata, S. yunnanensis, S. delavay から得られた

環状ペプチドの全構造を示し、その構造決定の代表 的なものとして,dichotomin A (9), Yunnanin B (19), Pseudostellarin E (5) について説明する。

Dichotomin A (9) は無色針状晶 (mp 179~ 180℃) として得られ,高分解能 FABMS (m/z681.3652 (M+H)⁺)により,分子式はC₃₅H₄₈N₆O₈ と決定した。Pyridine - d 5中における¹H NMR に おいて,6個のアミドプロトン(δ : 8.35, 8.60, 8.79, 9.07, 9.21, 9.97) が,また¹³C NMR に おいて,6個のアミドカルボニル(δ : 170.69, 171.29, 172.33, 172.39, 172.72×2) 由来のシグ ナルが観測されたこと,さらに HMBC スペクト ルにおいて、すべてのアミド結合に²J_{H-C} カップ リングが観測されたことより、9は Fig. 1 に示す ような環状ペプチドであることが判明し、ROESY によりその構造を確認した。

Yunnanin B (19) は白色粉末として得られ、高 分解能 FABMS (m/z 639.3114(M+H)+)により、 分子式は C32H42N 6O 8と決定した。Pyridine-d 5 中における¹H NMR において、6個のアミドプロ トン (δ : 8.51, 9.04, 9.11, 9.32, 9.34, 9.95) が, また¹³C NMR において、6個のアミドカルボニ \mathcal{W} (δ : 170.28, 171.44, 171.60, 172.21, 172.75, 173.80) 由来のシグナルが観測されたこと、さら に HMBC スペクトルにおいて、すべてのアミド 結合に²J_{H-C}カップリングが観測されたことよ り.19はFig.1に示すような環状へキサペプチド であることが判明した。しかしアミノ酸分析の結 果, Gly, Ala, Ser, Phe×2の5個のアミノ酸の 存在しか確認されなかったため,残る1残基は異 常アミノ酸であることが示唆された。残る1残基 の構造はH-H COSY により、NH (δ: 9.04.1H. d) / aH (δ : 4.81, 1H, dd) / β H (δ : 2.60, 1H, m)のカップリングシークエンスが観測され、さ らに βHは, メチルプロトン γ H(δ : 0.91, 3H, d) と2組の連続したメチレンプロトン γ H(δ : 1.49, 1.95, each 1H, m), $\delta H (\delta: 3.80, 3.87,$ each 1H, m) とカップリングしていることが明ら かとなった。また、δHが3.80, 3.87 ppm で共鳴

compound	structures	yield (mg)
pseudostellarin A (1)	cyclo (-Gly-Pro-Tyr-Leu-Ala-)	250
pseudostellarin B (2)	cyclo (-Gly-Ile-Gly-Gly-Gly-Pro-Pro-Phe-)	600
pseudostellarin C (3)	cyclo (-Gly-Thr-Pro-Ser-Pro-Leu-Phe-Leu-)	450
pseudostellarin D (4)	cyclo (-Gly-Thr-Gly-Pro-Leu-Ile-Leu-)	400
pseudostellarin E (5)	cyclo (-Gly-Pro-Pro-Leu-Gly-Pro-Val-Ile-Phe-)	850
pseudostellarin F (6)	cyclo (-Gly-Gly-Thr-Leu-Pro-Pro-Leu-Ser-)	125
pseudostellarin G (7)	cyclo (-Gly-Pro-Leu-Ala-Pro-Phe-Ser-Phe-)	150
pseudostellarin H (8)	cyclo (-Gly-Thr-Pro-Thr-Pro-Leu-Phe-Phe-)	8
dichotomin A (9)	cyclo (-Gly-Thr-Phe-Leu-Tyr-Val-)	595
dichotomin B (10)	cyclo (-Gly- Thr-Phe-Leu-Tyr-Thr-)	34
dichotomin C (11)	cyclo (-Gly- Thr-Phe-Leu-Tyr-Ala-)	255
dichotomin D (12)	cyclo (-Gly-Val-Gly-Phe-Tyr-Ile-)	102
dichotomin E (13)	cyclo (-Gly-Tyr-Ala-Phe-Ala-)	17
dichotomin F (14)	cyclo (-Val-Leu-Pro-Ser-Val-Tyr-Pro-Tyr-Phe-)	26
dichotomin G (15)	cyclo (-Ser-Pro-Leu-Pro-Ile-Pro-Pro-Phe-Tyr-)	51
dichotomin H (16)	cyclo (-Ala-Pro-Thr-Phe-Tyr-Pro-Leu-Ile-)	85
dichotomin I (17)	cyclo (-Val-Pro-Thr-Phe-Tyr-Pro-Leu-Ile-)	43
yunnanin A (18)	cyclo (-Gly-Tyr-Gly-Gly-Pro-Phe-Pro-)	400
yunnanin B (19)	cyclo (-Gly-Ser-δ-hydroxy Ile-Phe-Phe-Ala-)	210
yunnanin C (20)	cyclo (-Gly-Ile-Gly-Phe-Tyr-Ser-Pro-)	30
yunnanin D (21)	cyclo (-Gly-Ile-Ser-Phe-Arg-Phe-Pro-)	470
yunnanin E (22)	cyclo (-Gly-Ser- δ-hydroxy Ile-Phe-Phe-Ser-)	160
yunnanin F (23)	cyclo (-Gly-Val-Thr-Trp-Tyr-Pro-Ser-Ser-)	16
delavayin A (24)	cyclo (-Gly-Ser- γ-hydroxy Ile-Phe-Phe-Ala-)	11
delavayin B (25)	cyclo (-Gly-Ser-Ile-Phe-Phe-Ala-)	35
delavayin C (26)	cyclo (-Gly-Tyr-Tyr-Tyr-Pro-Val-Pro-)	4

 Table 1
 Structure of Cyclic Peptides from P. heterophylla. S. dichotoma var lanceolata, S. yunnanensis, and S. delavayi





していること、FABMS より得られた分子式より、 残る1残基の構造は、Ileの δ 位に水酸基が置換 した δ - hydroxy Ile であることが判明した (Fig. 1)。最終的には HMBC、ROESY より各アミノ酸 のシークエンスを決定し、**19**の構造は cyclo (Gly - Ser - δ - hydroxy Ile - Phe - Phe - Ala) であること が明らかとなった。

Pseudostellarin E(**5**) (白色粉末, m/z 878.5154 (M+H)⁺, C₄₅H₆₇N₉O₉) はアミノ酸分析の結果, Gly× 2, Val, Ile, Leu, Phe, Pro× 3の存在が 確認され,引き続き¹H NMRを測定したが, CDCl₃, Pyridine-d₅, DMSO-d₆, CD₃OD のいずれの溶 媒においてもブロードシグナルを与えたため, 構 造決定にはイオン化法として ESI を用いたタンデ ムマススペクトロメトリー法を適用した。まず, Pseudostellarin E を a-キモトリプシンで酵素分 解し, そのリニア体とした後, ESI MS/MS を行い, 得られたフラグメントピークを詳細に検討するこ とにより, その構造を cyclo (Gly - Pro - Pro - LeuGly-Pro-Val-Ile-Phe)と決定した (Fig. 2)。

MS/MSを用いた環状ペプチドの構造決定では、 これまでイオン化法としてFABが一般的に用い られてきたが、環状ペプチドをリニア体に変換す ることにより、より緩和なイオン化法であるESI も構造決定に利用できることが示され、その有用 性が認められた。

続いて環状ペプチド Pseudostellarin D(4), Yunnanin A (18), Yunnanin C (20) のコンホメ ーション解析について述べるが,天然物および合 成品由来の環状ペプチド類の中で,ペンタ,ヘ キサ,オクタペプチドなどの例は多数知られて いるが,環状ペプタペプチドの存在は,Ilamycin B1, Evolidine, Hymenamide 類, Phakellistatin 類, Axinastatin 類, Rhizonin A などの十数例しか知 られておらず,詳細なコンホメーションに関する 知見も十分とはいえない。そこで我々は,単離さ れた3種類の環状ペプタペプチド4,18,20 につ いてX線結晶構造解析,NMR および分子動力学



Fig. 2 ESI MS/MS fragmentation of m/z 896(M+H)⁺ ion of linear peptide from pseudostellarin E

(MD) 法, モンテカルロ (MC) 法などの計算化学 的手法を用いたコンホメーション解析を行った。

まず, 化合物 4, 18, 20 の単結晶を用いて X 線 結晶解析を行った (Fig. 3)。その結果, X-Pro ペ プチド結合を含め, すべてのペプチド結合が trans ジオメトリーであり, これまでにない特徴的なコ ンホメーションを有していることが判明した。ま た, Table 2, 3に示すように, 分子中に2カ所の β -turn 構造と分子内水素結合の存在が示された。 また, 4, 18 にはそれぞれ Tyr²-Gly¹位に β bulge 構造が存在することが明らかとなり, コン ホメーションの類似性が示された (Fig. 3)。

また,溶液中のコンホメーションは,NMR (in DMSO-d₆) における ROESY 測定,アミドプロ トンの温度依存性実験 (300 - 330K),³J_{NHa} ビシ ナルカップリング定数による二面角 φ の計算など により解析し、さらに得られた ROE を制限項と して MD, MC 計算を行った。その結果、4 およ び 18 では β - turn 構造のサブタイプや β - bulge 構造の存在など、結晶中のコンホメーションと類 似性が示された (Fig. 4)。これに対し、20 は結晶 構造において観測された Tyr 5NH - Ile ²C = O の 分子内水素結合および Gly³ - Phe⁴位の Type II β - turn の存在は示されず、Phe⁴ - Tyr ⁵位に Type I β - turn の存在が示唆されるなど、溶液中のコ ンホメーションは結晶中と大きく異なることが推 測された。

Pseudostellarin 類にはチロシナーゼ阻害活 性が観測され、それぞれのIC₅₀ (mM) 値は、 pseudostellarins A (1:131), B (2:187), C (3 : 63), D (4:100), E (5:175), F (6:50), G (7 : 75) というものであった。また、その他の活性



Fig. 3 Computor-generated Crystal Structures of 4, 18 and 20 Dashed lines show intramolecular hydrogen bonds.

Table 2	β-	Turn	Forms	of	4,	18,	20
---------	----	------	-------	----	----	-----	----

compound	residues	β - turn form
4	Pro ⁴ - Leu ⁵	Type I
	Leu ⁷ - Gly ¹	Type II
18	Gly^4 - Pro^5	Type II'
	$Pro^7 - Gly^1$	Type II
20	Gly^3 - Phe^4	Туре П'
	Pro^{7} - Gly^{1}	Type II

Table 3 Hydrogen Bonds & Intermolecular Very Short Contacts of 4, 18, 20

compound	distance (Å)	angle (°)			
4	O3-N6 3.40	O3-N6H 162			
	O6-N2 2.93	O6-N2H 103			
	O6-N3 3.03	O6-N3H 150			
18	O3-N6 3.01	O3-N6H 159			
	O6-N2 3.19	O6-N2H 141			
	O6-N3 3.02	O6-N3H 165			
20	O6-N2 2.77	O6-N2H 151			
	O2-N5 2.99	O2-N5H 143			
	O2-N6 3.69	O2-N6H 144			



Fig. 4 Superimposed Structures of Crystal State of 14 and Its Energetically Stable Conformers by MD/MM and MC/MM Simulations

として、P388 培養細胞に対する細胞増殖阻害活 性を検討したところ、それぞれの IC₅₀ (mg/mL) 値は、dichotomins A (9: 2.5)、B (10: 3.5)、C (11:5.0)、E (13: 3.0)、yunnanin C (20: 2.2) であり、 dichotomin D (12) にはシクロオキシゲナーゼ阻害 活性が認められた。

3 考 察

高等植物より単離・構造決定した環状ペプチド にチロシナーゼ阻害活性を見出し、漢方生薬の 太子参 (*Pseudostellaria heterophylla*の根)の環状 ペプチド pseudostellaria *A*-G にチロシナーゼ阻 害活性を認めた。近縁植物である銀柴胡 *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata*,千針万線草 *Stellaria yunnanensis* および *Stellaria delavayi* 中にも環状ペ プチド類を見出し、同様のチロシナーゼ阻害活性 を期待している。また、これら環状ペプチド類の 構造とコンホメーションとチロシナーゼ阻害活性 との関連研究を進めているが、結論を得ていない のが現実であるが、環状ペプチド類は、新規タイ プのチロシナーゼ阻害活性物質であり、リード化 合物として今後、期待される化合物であると考え る。

謝 辞

本研究をご支援いただきましたコスメトロジー 研究振興財団に対しまして,厚く御礼申し上げま すとともに,本研究を遂行するにあたり,ご助力 をいただきました森田博史博士,代田修博士,栢 下隆氏に深謝いたします。

引用文献

- Itokawa, H. and Takeya, K., Antitumor Substances from Higher Plants, Heterocycles 35, 1467 - 1501 (1993).
- 2) Itokawa, H., Takeya, K., Hitotsuyanagi, Y. and Morita, H., Macrocyclic Peptide Alkaloids from Plants, The Alkaloids 49, 301 - 387 (1997).
- 3) Morita, H., Kayashita, T., Kobata, H., Gonda, A., Takeya, K. and Itokawa, H., Pseudostellarins D
 F, New Tyrosinase Inhibitory Cyclic Peptides from Pseudostellaria heterophylla, Tetrahedron 50, 9975-9982 (1994).
- 4) Morita, H., Kayashita, T., Kobata, H., Gonda, A., Takeya, K. and Itokawa, H., Pseudostellarins A
 C, New Tyrosinase Inhibitory Cyclic Peptides from Pseudostellaria heterophylla, Tetrahedron 50, 6797-6804 (1994).
- 5) Morita, H., Kayashita, T., Takeya, K. and Itokawa, H., Conformational Analysis of a Tyrosinase Inhibitory Cyclic Pentapeptide, Pseudostellarin A, from Pseudostellaria heterophylla, Tetrahedron 50, 12599-12608 (1994).
- 6) Morita, H., Kobata, H., Takeya, K. and Itokawa, H., Pseudostellarin G, A New Tyrosinase Inhibitory Cyclic Octapeptide from Pseudostellaria heterophylla, Tetrahedron Lett. 35, 3563-3564 (1994).
- 7) Morita, H., Kayashita, T., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic Peptides from Higher Plants, Part 15. Pseudostellarin H, A New Cyclic Octapeptide from Pseudostellaria heterophylla, J. Nat. Prod. 58, 943 - 947 (1995).

- 8) Morita, H., Kayashita, T., Shishido, A., Takeya, K., Itokawa, H. and Shiro, M., Dichotomin A, A New Cyclic Hexapeptide from Stellaria dichotoma L. var. lanceolata Bge., Bioorg.Med.Chem.Lett. 5, 2353 - 2356 (1995).
- 9) Morita, H., Kayashita, T., Shishido, A., Takeya, K., Itokawa, H. and Shiro, M., Dichotomins A - E, New Cyclic Peptides from Stellaria dichotoma L. var. lanceolata Bge., Tetrahedron 52, 1165-1176 (1996).
- 10) Morita, H., Shishido, A., Kayashita, T., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic peptides from higher plants. 39. Dichotomins F and G, cyclic peptides from Stellaria dichotoma var. lanceolata, J. Nat. Prod. 60, 404 - 407 (1997).
- Morita, H., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic Octapeptides from Stellaria dichotoma var. lanceolata, Phytochemistry 45, 841 - 845 (1997).
- 12) Morita, H., Shishido, A., Kayashita, T., Shimomura, M., Takeya, K. and Itokawa, H., Two Novel Cyclic Peptides, Yunnamins A and B from Stellaria yunnanensis, Chem.Lett. 2415-2418

(1994).

- 13) Morita, H., Kayashita, T., Shimomura, M., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic Peptides from Higher Plants. Part 30. Three Novel Cyclic Peptides, Yunnanins D, E and F from Stellaria yunnanensis, Heterocycles 43, 1279-1286(1996).
- 14) Morita, H., Kayashita, T., Shimomura, M., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic Peptides from Higher Plants. Part 30. Three Novel Cyclic Peptides, Yunnanins D, E and F from Stellaria yunnanensis, Heterocycles 43, 1279-1286(1996).
- 15) Morita, H., Kayashita, T., Shimomura, M., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic Peptides from Higher Plants. 24. Yunnanin C, a Novel Cyclic Heptapeptide from Stellaria yunnanensis, J. Nat. Prod. 59, 280-282 (1996).
- 16) Morita, H., Kayashita, T., Uchida, A., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic peptides from higher plants. 33. Delavayins A-C, three new cyclic peptides from Stellaria delavayi, J. Nat. Prod. 60, 212 - 215 (1997).