

4置換レゾルシノール誘導体のメラニン生成抑制効

九州大学農学研究院 森林資源科学部門森林圏環境資源科学講座

清水 邦義、安武 政司、近藤 隆一郎

The color of mammalian skin and hair is determined by a number of factors. The most important factor is the degree and distribution of melanin pigmentation. Melanin synthesis inhibitory compounds are useful not only for the material used in cosmetics as skin-whitening agents but also as a remedy for disturbances in pigmentation. Tyrosinase (phenol oxidase) is known to be a key enzyme for melanin biosynthesis in plants, microorganism and mammalian cells. Therefore, many tyrosinase inhibitors have been tested in cosmetics and pharmaceuticals as a way of preventing overproduction of melanin in epidermal layers. Also, various types of stimulation, including exposure to ultraviolet (UV) radiation, induce lipid peroxidation in the skin, which might in turn cause damage to epidermal cells, leading to postinflammatory hyperpigmentation. Considering the importance of counteracting oxidative stress caused by UV to prevent harmful skin damage, it is important to design the multifunctional skin whitening agent with both antioxidant and anti-tyrosinase abilities.

A novel vitamin E derivative, (6''-hydroxy-2'',5'',7'',8''-tetramethylchroman-2''-yl)methyl 3-(2,4-dihydroxyphenyl)propionate (TM4R) which has chromanoxyl ring and 4-substituted resorcinol moieties, was synthesized and its inhibitory effect on tyrosinase, antioxidant ability and lightening effect of ultraviolet B (UVB)-induced hyperpigmentation were estimated. TM4R showed potent inhibitory activity on tyrosinase, which is the rate-limiting enzyme in the melanogenesis. The scavenging activities of TM4R on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl radicals were found to be nearly the same as those of α -tocopherol. Furthermore, an efficient lightening effect was observed following topical application of TM4R to UVB-stimulated hyperpigmented dorsal skin of brownish guinea pigs. These results suggest that TM4R may be a candidate for an efficient whitening agent, possibly by inhibiting tyrosinase activity and biological reactions caused by reactive oxygen species.

1. 緒言

紫外線から誘起される色素沈着メカニズムは、多岐に渡っている。少なくとも、紫外線照射における活性酸素種の生成¹⁾、ケラチノサイトでの各種炎症性シグナル物質の産生、それに引き続くメラノサイトの活性化、メラニン生合成酵素であるチロシナーゼなど一連の酵素活性の亢進、さらには、生成したメラニンのケラチノサイトへの受け渡しなどが、色素沈着メカニズムに関与していると考えられる。したがって、色素沈着を抑える物質（美白剤や色素沈着症治療薬）の開発には、上記メカニズムの数段階を抑制する多機能性美白剤のドラッグデザインが有効であろう。

筆者らは、これまでに未だ不明な点の多く残されている熱帯産樹木心材成分に、美白剤原料を求め、パプアニューギニア産樹木であるクワ科の *Artocarpus incisus* (パンノキ) の心材抽出物が強力なチロシナーゼ阻害活性を有することを見出した²⁾。さらに、7種の活性成分を単離、同定した^{2,3)}。これらの活性成分の構造的共通は、Fig. 1のボックス部分で示した4位置換レゾルシノール構造である。さら

に、4位アルキル置換レゾルシノール類が強力なチロシナーゼ阻害効果を有することが知られている^{4,5)}ことから、*A. incisus* より見出された阻害物質の活性発現には、4位置換レゾルシノール構造が大きく関与していると予想した。そこで、本研究ではチロシナーゼ阻害活性に関する上記知見を基に、チロシナーゼ阻害活性とともに、美白剤として求められている主要な生理活性の一つである抗酸化活性を有する多機能性分子の創出及びその美白効果（茶色モルモット背部皮膚を用いた UVB-誘導色素沈着抑制効果）について検討した。

2. 実験⁶⁾

2・1 チロシナーゼ活性測定法

チロシナーゼは、マッシュルーム由来チロシナーゼ [EC

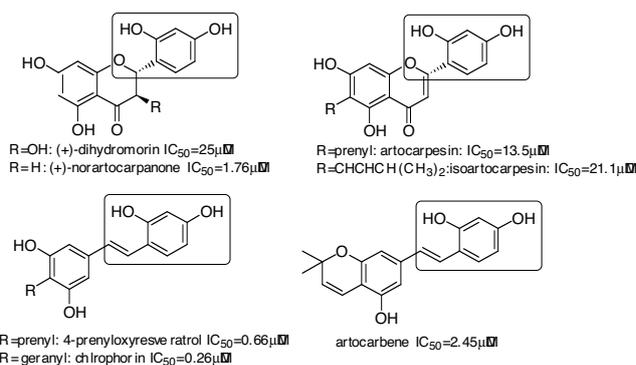


Fig.1 The chemical structures and IC₅₀ of active components from *A. incisus*. The boxed part:4-substituted resorcinol skeleton.(substrate:L-tyrosine)



The inhibitory effects of 4-substituted resorcinol derivatives on melanin biosynthesis

Kuniyoshi Shimizu, Seiji Yasutake, Ryuichiro Kondo *

Laboratory of Systematic Forest and Forest Products Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University

1.14.18.1] (シグマ) を用い、前報に従い、それぞれ基質としてL-チロシン²⁾もしくはDL-DOPA⁷⁾を用いて、反応により生じるドーパクロムの極大吸収波長である475nmの吸光度を測定し、活性を算出した。ポジティブコントロールとしては、強力なチロシナーゼ阻害物質として知られているコウジ酸⁸⁾を用いた。

2・2 ヒドロキシラジカル捕捉活性測定

既報⁹⁾に従い、ESRスピントラッピング法により算出した。

2・3 UV-B誘導色素沈着抑制活性試験

既報¹⁰⁾に従い、茶色モルモット背部に、UV-Bを照射後の色素沈着を色彩色度計にて評価した。

3. 結果及び考察

Fig. 1に示すように、*A. incisus*の心材抽出物から単離されたチロシナーゼ阻害活性物質の構造を比較することにより、チロシナーゼ阻害活性発現には、ボックスで囲んだ4位置換レゾルシノール構造が活性発現に重要であること

が示唆された。しかしながら、同樹木より単離された化合物であるartocarpin (16)は4位置換レゾルシノール構造をB環に有しているにも関わらず、チロシナーゼ阻害活性を示さなかった (Fig. 2)。したがって、4位置換レゾルシノール構造だけでなく、他の構造的特徴も活性発現に重要な役割を果たしていることが予想された。4位置換レゾルシノール構造に起因したチロシナーゼ阻害活性をベースとした多機能性分子を設計するためには、4位置換側鎖の構造に着目した、詳細な構造活性相関の知見が必要である。まず、Fig.1に示した化合物群がフラボノイド及びビスチルベンに属することから、当該グループに属する25種の化合物に対して、チロシナーゼ阻害活性を検討した (Table 1, Fig. 3)。

5種のスチルベン (21-25) で検討したところ4位置換

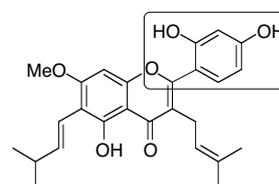


Fig. 2 The chemical structure of artocarpin (16) isolated from *A. incisus*. The boxed part: 4-substituted resorcinol skeleton

Table 1 Inhibitory activity of flavonoids and stilbenes on tyrosinase (substrate: L-tyrosine)

No.	name	R3	R5	R6	R7	R2'	R3'	R4'	R5'	(C2, C3)	IC ₅₀ (μ M)
1	(±)-flavanone	H	H	H	H	H	H	H	H	2S, 2R	>200
2	(-)-pinoembrin	H	OH	H	OH	H	H	H	H	2S	>200
3	(±)-naringenin	H	OH	H	OH	H	H	OH	H	2S, 2R	>200
4	(+)-aromadendrin	OH	OH	H	OH	H	H	OH	H	(2R, 3R)	lag time decrease ^a
5	(±)-fustin	OH	H	H	OH	H	OH	OH	H	(2R, 3R), (2S, 3S)	lag time decrease ^a
6	(±)-taxifolin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H	(2R, 3R), (2S, 3S)	lag time decrease ^a
7	(+)-dihydromyricetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	OH	(2R, 3R)	lag time decrease ^a
8	(+)-dihydromorin	OH	OH	H	OH	OH	H	OH	H	(2R, 3R)	25
9	(+)-norartocarpinone	H	OH	H	OH	OH	H	OH	H	2S	1.76
10	flavone	H	H	H	H	H	H	H	H		>200
11	chrysin	OH	OH	H	H	H	H	H	H		>200
12	apigenin	H	OH	H	OH	H	H	OH	H		>185
13	kaempferol	OH	OH	H	OH	H	H	OH	H		103
14	quercetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H		lag time decrease ^a
15	myricetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	OH		lag time decrease ^a
16	artocarpin	Pr	OH	CHCHCH(CH ₃) ₂	OCH ₃	OH	H	OH	H		>228
17	morin	OH	OH	H	OH	OH	H	OH	H		>330
18	artocarpesin	H	OH	Pr	OH	OH	H	OH	H		13.5
19	isoartocarpesin	H	OH	CHCHCH(CH ₃) ₂	OH	OH	H	OH	H		21.1
20	(-)-angolensin										>200
21	pinosylvin	R3	R4	R5	R2'	R4'					>46
22	oxyresveratrol	OH	H	OH	OH	OH					0.98
23	4-prenyloxyresveratrol	OH	Pr	OH	OH	OH					0.66
24	chlorophorin	OH	Ger	OH	OH	OH					0.26
25	artocarbene ^c										2.45

^a means promotion effect which could act as cofactor like diphenol

^c See Fig. 3.

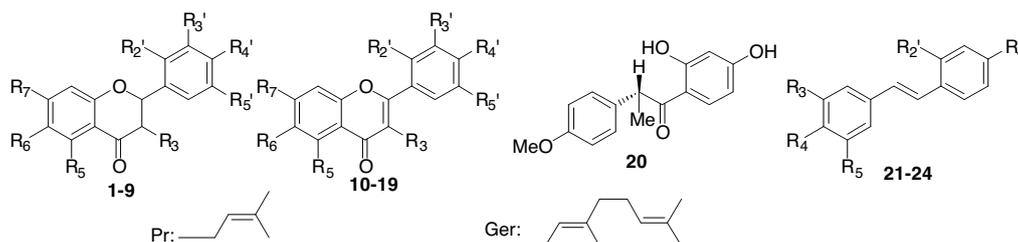


Fig.3 The chemical structures of 1-24

レゾルシノール構造を有する4種のスチルベン類 (22-25) に強力なチロシナーゼ阻害活性が観察されたが4位置換レゾルシノール構造を有さない pinosylvin (21) は、強力な阻害活性を示さなかった。したがって、スチルベンに関しては、4位置換レゾルシノール構造が活性発現に極めて重要であることが示唆された。

続いて、20種のフラボノイド (1-20) について検討した。その結果、B環に4位置換レゾルシノール構造を有する4種のフラボノイドのみ (8, 9, 18 及び 19) に高いチロシナーゼ阻害活性が観察された。しかしながら、16, 17 及び 20 はB環に4位置換レゾルシノール構造を有するにも関わらず、高い阻害活性を示さなかった。これらの結果からフラボノイド類に関しては、4位置換レゾルシノール構造だけでなく、さらに他の構造的特徴が活性発現には、必要であることが示唆された。

4位置換レゾルシノール構造を有するフラバノン及びフラボン型フラボノイドの場合には、3位に置換基を有する場合に、チロシナーゼ阻害活性が激減することが判明した (9 → 8, 18 及び 19 → 16 及び 17)。つまり、Fig. 4 に示すようにB環に4位置換レゾルシノール構造を有したとしても、3位になんらかの側鎖置換基を有する場合には、その立体障害のために、4位置換レゾルシノール構造部分がチロシナーゼに結合できず阻害活性が低減したことが考えられる。

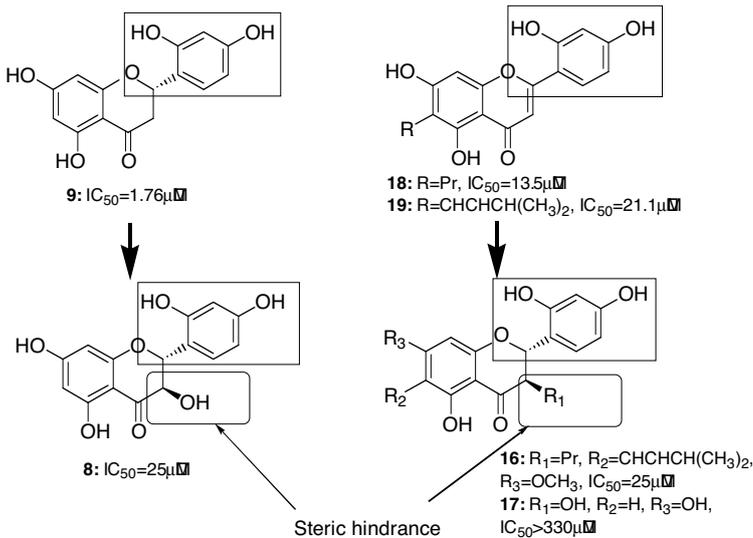
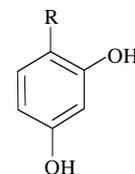
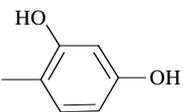


Fig.4 The effect of the introduction of C3 substituent of flavonoids which have 4-substituted resorcinol skeleton tyrosinase (substrate: L-tyrosine)



また、一方、(-)-angolensin (20) (Fig. 3) も4位置換レゾルシノール構造を有するにも関わらず、阻害活性を示さなかった。しかし、上述のような立体障害による活性の低減効果は、考えにくい。したがって、阻害活性低減要因を明らかにするために、4位置換レゾルシノール類の特に側鎖に着目した構造活性相関検討を行った。Table 2 に示すように、4位置換基の構造によって、大きく活性が変動することが判明した。特に、カルボニル基 (26-30) を有する場合、阻害活性が消失した。また、アゾ基 (31, 33) を有する場合にも阻害活性が著しく減少した。カルボニル基及びアゾ基は、両置換基ともに、オルソ位の水酸基と水素結合を形成可能である。この分子内水素結合が存在することによって、活性発現に必須なレゾルシノール部分がチロシナーゼに強固に結合できず、阻害活性が著しく減弱したと考えられる。さらに、側鎖の極性のチロシナーゼ阻害活性に及ぼす影響について検討した。Fig. 5 に示すように、側鎖に水酸基やカルボニル基などの極性基が存在すると活性が弱く、逆に疎水性が高いと強力な阻害活性を示すことが判明した。これらの結果を Fig. 6 にまとめた。これらの知見を基に、筆者らは、4位置換レゾルシノール構造に由来する強力なチロシナーゼ阻害活性を有し、かつ抗酸化活性を有する化合物の設計を試みた。抗酸化活性発現構造として α

Table 2 Inhibitory activity of 4-substituted resorcinols on tyrosinase (substrate: L-tyrosine)

No.	Substituent (R)	IC ₅₀ (μM)
26	CHO	>200
27	COCH ₃	>200
28	COOH	>200
29	CONHCH ₂ CH ₂ OH	>200
30	COC ₆ H ₅	>200
31	N=N- 	436
32	H	227
33	N=N- 	185
34		58.0
35	Cl	13.0
36	CH ₃	12.0
37	CH ₂ C ₆ H ₅	2.80
38	CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	1.98
39	CH ₂ (CH ₂) ₁₀ CH ₃	1.63
40	CH ₂ CH ₃	1.10
41	CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.91

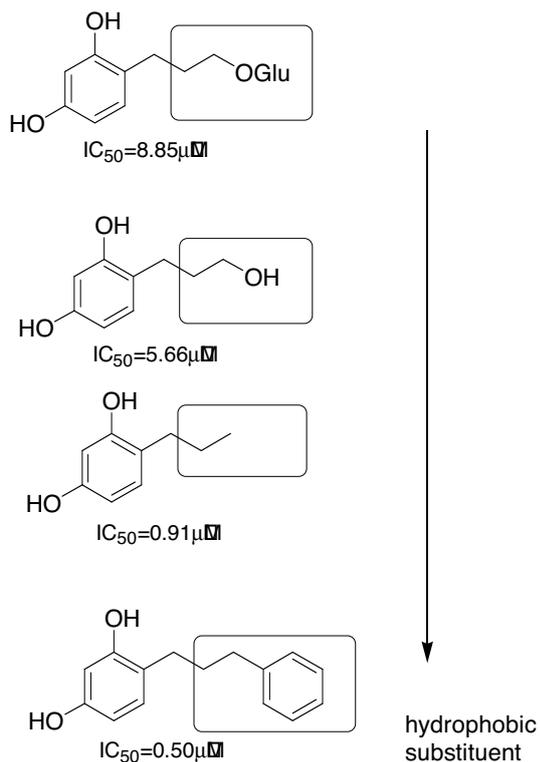


Fig. 5 The chemical structures and IC_{50} of 4-substituted resorcinols. (substrate: L-tyrosine) Glu: glucose moiety.

α -tocopherol のラジカル捕捉活性発現部分構造であるクロマノール環に着目し、(6"-hydroxy-2",5",7",8"-tetramethyl chroman- 2"-yl) methyl 3- (2',4'-dihydroxyphenyl) propionate (TM4R) を分子設計・合成した (Fig. 7)。TM4R は、上記のチロシナーゼ阻害に関する構造活性相関検討により、コウジ酸以上の阻害活性が期待され、また、その抗酸化効果も α -tocopherol (ビタミン E)¹¹⁾ に匹敵するものと予想された。そこで、TM4R のチロシナーゼ阻害活性ならびに抗酸化活性を測定した。また、比較のために 2-carboxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-ol (Trolox)、2-hydroxymethyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol (TM) 及び 3- (2',4'-dihydroxyphenyl) propionic acid (DPPacid) を用いた (Fig. 8)。Table 3 に示すように、4 位置換レゾルシノール構造を有する TM4R 及び DPPacid には高いチロシナーゼ阻害活性が観察されたが、クロマノール環を有する Trolox 及び TM には、阻害活性は観察されなかった。さらに、その阻害機構は、競争型であった (Fig.9)。4 位置換レゾルシノール類によるチロシナーゼの阻害は競争型であることが報告されている^{5,7)} ことから、TM4R の強力なチロシナーゼ阻害活性には、4 位置換レゾルシノール構造が強く関与していることが明らかとなった。また、DPPacid と比較して高い阻害活性が観察されたことから、

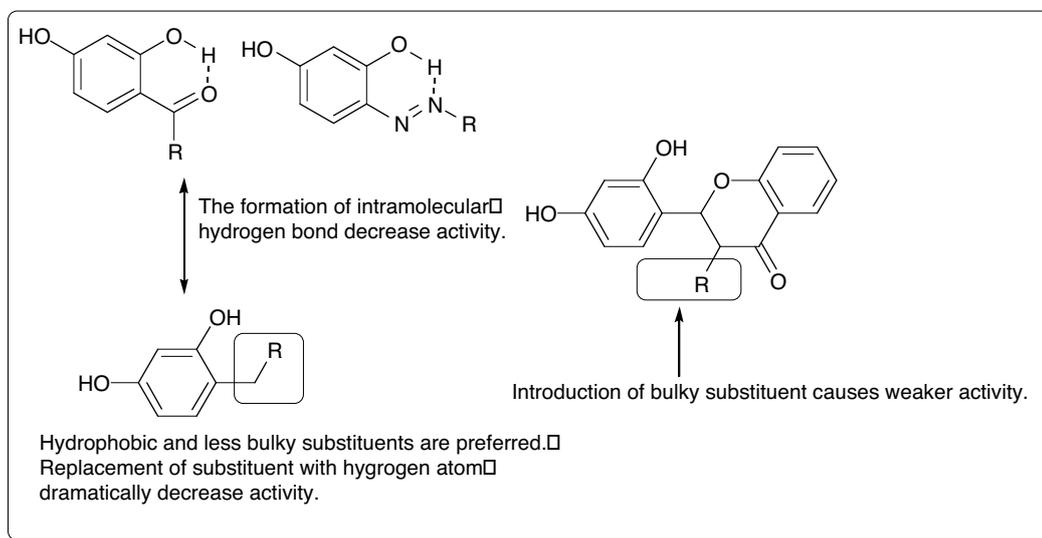


Fig.6 Summarized structure-activity relationship of compounds with 4-substituted resorcinol skeleton

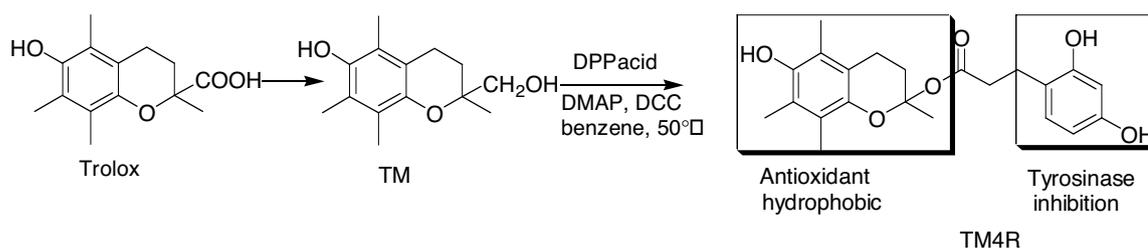


Fig. 7 Structure and synthesis of TM4R

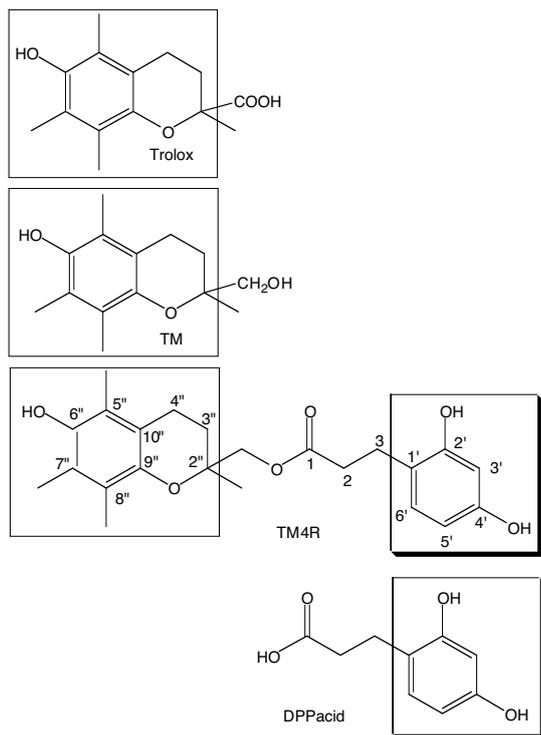


Fig.8 The chemical structures of Trolox, TM, TM4R and DPPacid
 The boxed part with shadow: 4-substituted resorcinol skeleton
 The boxed part without shadow: chromanoxyl ring moiety

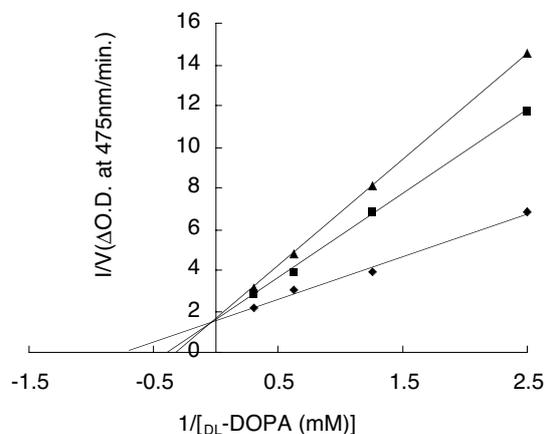


Fig.9 Lineweaver-Burk plots of mushroom tyrosinase and DL-DOPA in the absence or presence of TM4R
 ♦ Control, ■ 1.88μM, ▲ 3.75μM

Table 3 Effects of Compounds on Mushroom Tyrosinase

Compound	Substrate			
	L- Tyrosine		DL-DOPA	
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	Ki (μM)	Type of inhibition
TM4R	0.325	23	2.74	Competitive
DPPacid	3.02	62	11.5	Competitive
TM	>423	n.d.	n.d.	n.d.
Trolox	>400	n.d.	n.d.	n.d.
α-tocopherol	>232	n.d.	n.d.	n.d.
kojic acid	8.66 ^a	17 ^a	11.8 ^a	Mixed ^a
arbutin	306	104000	n.d.	n.d.

n.d.: Not determined. ^a:Obtained from data of Ref. 7.

クロマン環の疎水性が活性増強にも寄与していることが示唆された。また、Table 4 に示すように、クロマンノール環を有する Trolox、TM 及び TM4R には、強力な抗酸化物質として知られる α-tocopherol と同等の抗酸化活性が観察された。このように TM4R は、強力なチロシナーゼ阻害活性ならびに抗酸化活性を有する多機能性分子であることが確認された。チロシナーゼはメラニン生合成の鍵酵素として知られており、事実、コウジ酸のようなチロシナーゼ阻害剤が、美白剤原料として知られている。一方で、紫

外線による皮膚ダメージならびに脂質過酸化により引き起こされる炎症後の色素沈着も知られている。色素沈着の最大の要因として紫外線照射後の酸化ストレスの関与が報告されている¹⁾。したがって、強力なチロシナーゼ阻害活性ならびに抗酸化活性を有する多機能性分子である TM4R は、紫外線により惹起される色素沈着を効果的に抑制し、かつ皮膚の酸化ストレスダメージを防ぐ機能が期待された。そこで、UV-B により誘導される色素沈着に対する TM4R の効果を検討した (Fig. 10)。TM4R は、市販の美

Table 4 Antioxidant Activity of the Compounds

Compound	Hydroxyl radical (%) ^a		DPPH [IC ₅₀ (μ M)] ^b
	1.0 mM	10 mM	
TM4R	91	100	3.9
TM	n.d.	n.d.	3.2
Trolox	n.d.	n.d.	3.3
α -tocopherol	70	93	3.9
DPPacid	n.d.	n.d.	No activity at 50 μ M

n.d.: Not determined.

^aHydroxyl radical scavenging activity was expressed as % inhibition concentration of hydroxyl radicals generated by Fe (II) and H₂O₂ (Fenton reaction).

^bThe IC₅₀ values were calculated from regression lines where the abscissa represented the concentration of tested compound and the ordinate the average percent reduction of DPPH radical from three separate tests.

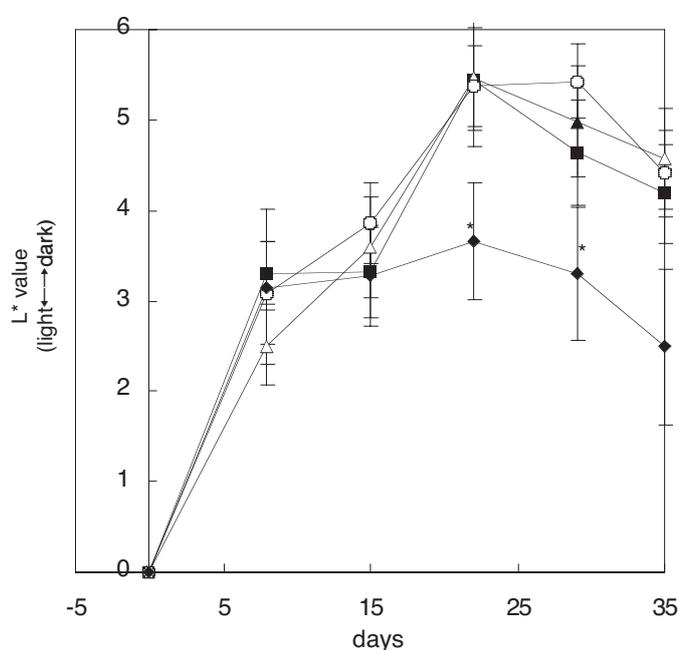


FIG.10 The degree of pigmentation (L* value) before and after daily topical applications (five times per week) of base solution [propylene glycol/ethanol (1/6)](control,○), TM4R (0.25M in base solution,◆), kojic acid (0.25M in base solution,■), or arbutin [0.25M in base solution,▲). The applications were continued for 35 days. Data are expressed as mean L values \pm SEM (n=8). L* value at day 0 are 49.9 \pm 2.7 (control), 48.9 \pm 3.4 (TMR), 50.1 \pm 2.9 (kojic acid) and 49.9 \pm 2.8 (arbutin). Student's t-test was used for the statistical analysis of the data. (* P<0.05, vs control)

白剤原料として知られるコウジ酸やアルブチンと比較して、顕著な色素沈着抑制効果を示した。この色素沈着抑制効果メカニズムには、in vitro の結果を考慮すると、少なくともチロシナーゼ阻害及び酸化ストレス抑制が関与していると考えられる。

4. 総括

A.incisus 樹木心材から強力なチロシナーゼ阻害物質として、分子内に 4 位置換レゾルシノール構造を有する一

連のフラボノイド及びスチルベンを見出した。活性発現には、分子内の 4 位置換レゾルシノール構造が関与していると考え、4 位置換レゾルシノール類の構造活性相関を特に、その側鎖置換基の構造に着目して行い、ある特定の構造的特徴（疎水性・分子内水素結合・立体障害）が阻害活性に大きく影響を与えていることを見出した。さらにその知見を基に、美白剤として求められている主要な生理活性の一つである抗酸化能を分子に付与することを試みた。その結果、抗酸化活性とチロシナーゼ阻害活性を有する多機能

性新規ビタミン E 誘導体 (TM4R: (6"-hydroxy-2",5",7",8"-tetramethylchroman-2"-yl) methyl-3-(2',4'-dihydroxyphenyl) propionate) を合成し、動物実験において、顕著な UV-B 誘導色素沈着抑制効果を有することを見出した。

(引用文献)

- 1) Gilchrest BA, Park HY, Eller MS and Yaar M: Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation, *Photochem. Photobiol.* 63, 1-10, 1996.
- 2) Shimizu K, Kondo R, Sakai K, Lee S.-H. and Sato H: The Inhibitory Components from *Artocarpus incisus* on Melanin Biosynthesis, *Planta Med.*, 64, 408-412, 1998.
- 3) Shimizu K, Kondo R and Sakai K: A Stilbene Derivative from *Artocarpus incisus*., *Phytochemistry* 45, 1297-1298, 1997.
- 4) McEvily AJ, Iyengar R, Gross AT: Inhibition of polyphenol oxidase by phenolic compounds. *ACS Symposium Series.* 506, 318-325, 1992.
- 5) Jimenez M, García-Carmona FJ: 4-Substituted resorcinols (sulfite alternatives) as slow-binding inhibitors of tyrosinase catecholase activity. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2061-2065, 1997.
- 6) Shimizu K, Kondo R, Sakai K, Takeda N, Nagahata T and Oniki T: Novel vitamin E derivative with 4-substituted resorcinol moiety has both antioxidant and tyrosinase inhibitory properties. *Lipids* 36, 1321-1326, 2001.
- 7) Shimizu K, Kondo R, Sakai K: Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: structure-activity investigations. *Planta Med.* 66, 11-15. 2000.
- 8) Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F: Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol.* 46. 982-985, 1994.
- 9) Arroyo CM, Wade JV, Ichimori K and Nakazawa H: The scavenging of hydroxyl radical (\cdot OH) by a prostacyclin analogue, taprostene, *Chem.-Biol. Interact.*, 91,29-38, 1994.
- 10) Yokota T, Nishio H, Kubota Y and Mizoguchi M: The inhibitory effect of grabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation, *Pigment. Cell. Res.*, 11, 355-361, 1998.
- 11) Murase H, Yamauchi R, Kato K, Kunieda T, Terao J: Synthesis of a novel vitamin E derivative, 2-(α -D-glucopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-ol, by α -glucosidase-catalyzed transglycosylation, *Lipids* 32, 73-78, 1997.