

コラゲナーゼ抑制作用をもつ天然物の探索

千葉大学大学院 薬学研究院

石 橋 正 己

In order to maintain the elasticity of the skin it is important to prevent reduction of collagen with collagen decomposition enzyme (collagenase). Search and development of a compound with collagenase inhibitory activity is therefore one effective method for aging prevention of the skin. During our studies on search for new biologically active natural products from unexploited tropical plants, marine algae, and nudibranchs, here we investigated a search for collagenase-inhibitory substances from natural resources. As a result of our screening program against collagenase inhibitory activity using extracts of 92 medicinal tropical plants, 100 marine algae, and 27 nudibranchs, we selected 7 plants, 6 algae, and 3 nudibranchs as active samples. The leaves of *Melastoma polyanthum* (Melastomataceae), collected in Thailand, were extracted methanol, and the methanol extract was successively partitioned with ethyl acetate and water. The ethyl acetate soluble fraction, which was found to be active against collagenase inhibitory test, was subjected to repeated chromatographies on silica gel column and reverse-phase HPLC to isolate four flavonoids, kaempferol 2,4-di-*O*-(*trans*-p-coumaroyl)- β -D-galactopyranoside, 3-*O*-kaempferol 2-*cis*-p-coumaroyl-6-*trans*-p-coumaroyl- β -D-galactopyranoside, 3-*O*-kaempferol 2-*trans*-p-coumaroyl-6-*cis*-p-coumaroyl- β -D-galactopyranoside, and 3-*O*-kaempferol 6-galloyl- β -D-galactopyranoside, and these compounds exhibited collagenase inhibitory activity. From a brown alga *Ishige okamurai* (Ishigeaceae), collected at Boso Peninsula, a phlorotannin, diploretol, was first isolated as a naturally occurring form and was fully characterized here, while from another brown alga *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae), two sterols, 24-methylenecholesterol and fucosterol, were isolated. From a nudibranch *Pleurobranchus hirasei* (Pleurobranchidae) collected also at Boso Peninsula, a sterol peroxide, 5,8 α -epidioxy-5 α -cholest-6-en-3 β -ol, was obtained and identified on the basis of spectral data. While extracts of these algae and nudibranchs showed collagenase inhibitory activity, isolated sterols did not show the inhibitory activity and active components of these extracts have not been isolated yet.

1. 緒 言

皮膚は表皮と真皮から構成されており、中でも、表皮の内側で皮膚の構造の大部分を占める真皮が、皮膚の弾力性やハリを保つ役割を担っている。真皮の約9割は膠原線維からなり、その主要成分はコラーゲンである。シワやタルミ、シミなどの皮膚の老化現象は、この真皮の主要成分であるコラーゲンの減少・変性に起因することが多いと考えられる。従って、皮膚の弾力性やハリを保つためには、コラーゲンの減少を防ぐことが重要であり、また一方、コラーゲンの分解はコラーゲン分解酵素（コラゲナーゼ）によって引き起こされる。以上のことから、コラゲナーゼの作用を抑制することは皮膚の老化防止のための一つの有効な方法であると考えられる。従って、コラーゲンを分解するコラーゲン分解酵素（コラゲナーゼ）を抑制する作用をもつ化合物の探索および開発が強くのぞまれる。本研究では、コラゲナーゼ抑制作用を示す低分子化合物を、とくに天然物を素材として探索し、皮膚老化防止に役立つ物質を発見

することを第一の目的とする。

一方、コラーゲンは、いわゆる細胞外マトリックスの一種である。ここ十数年程の細胞生物学、分子生物学の飛躍的な進歩により、細胞間の接着あるいは細胞内外でのシグナル伝達等多様な生物現象において、細胞外マトリックスがきわめて重要な役割を果たしていることが次第に明らかとなり、今後、最も注目される分子の一つとも考えられている。従って、細胞外マトリックス分解酵素（別名、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP））の一つとして位置付けられるコラゲナーゼの作用を抑制する低分子化合物を発見できれば、コスメトロジーへの貢献はもちろんであるが、それに加えて、コラーゲンが関わる多様な生理現象の分子機構の解明等に寄与することも大いに期待される。

コラゲナーゼ群には、4種のMMP（すなわち、MMP-1, MMP-8, MMP-13, およびMMP-18）が属することが知られている。これまでにMMP阻害物質の天然物からの探索に関しては、伏谷、清木らによるマトリックスプロテアーゼ（＝コラゲナーゼ）阻害剤を海綿動物から探索したという報告はあるものの、まだそれほど研究例は多くない。合成化合物に関してもMMP阻害作用を示すいくつかのペプチド性合成化合物が知られているものの、コラゲナーゼに特異的に結合する有効な低分子化合物の開発のためにさらに異なったタイプの基本構造をもつ低分子リード化合物の出現がのぞまれている。



Search for Natural Products with Collagenase Inhibitory Activity

Masami Ishibashi

Chiba University

2. 実験

2.1. スクリーニング

実験試料として、熱帯薬用植物 92 種、千葉県房総半島産海藻 100 種、千葉県房総半島産ウミウシ 27 種を用いて、コラゲナーゼ阻害作用に関するスクリーニングを行った。コラゲナーゼ阻害活性試験は、96 穴プレートを用い、次のような方法で行った。

- ① サンプル溶液 (1% MeOH 水溶液) を 1 穴あたり 50 L 分注する。
- ② 酵素溶液 (10 g/mL, pH7.4, 50 mM Tris-HCl 溶液) を 1 穴あたり 100 L 分注する。
- ③ 37℃にて、10 分間プレインキュベーション後、基質溶液 (5 M, pH7.4, 50 mM Tris-HCl 溶液) を 50 L 分注する。
- ④ 37℃にて、60 分間インキュベーション後、励起波長 320nm, 検出波長 405nm で測定する。
- ⑤ 60 分間の MOCAC 遊離量をコントロール (サンプル 0 μg/mL) と比較し、MOCAC 遊離率とする。遊離率が低いほど酵素が阻害されている [遊離率 (%) = 100 - 阻害率 (%)]。

ここで、基質としては、MOCAC-Pro-Leu-Gly-Leu-A2pr (Dnp) -Ala-Arg-NH₂ (MOCAC : (7-Methoxycoumarin-4-yl) acetyl, Dnp : Nε - (2,4-Dinitrophenyl)) を用いる。また、Phosphoramidon (N- (α-Rhamnopyranosyloxyhydroxy phosphinyl)-Leucyl-Tryptophan) を陽性対照として用いた。

スクリーニングの結果、熱帯薬用植物 7 種、海藻 6 種、ウミウシ 3 種を活性サンプルとして選別した (表 1)。

2.2. 活性成分の分離・精製

2.1. で選別した活性サンプルをメタノールで抽出し、続いて溶媒分画により数種の画分に分配した。得られた画分について、各種分離用担体を用いたカラムクロマトグラフィーを行い、化学成分を単離した。

2.3. 単離された成分の化学構造の決定

2.2. で分離された成分に対して、核磁気共鳴法や高分解能質量分析法などの最新の各種機器分析法を駆使することにより、化学構造の解明を行った。

2.4. 単離された成分の生物活性の測定

2.2. で分離された成分に対して、コラゲナーゼ抑制活性に関する再測定を行った。以下、これらの実験の結果について、その概要を記す。

3. 結果

3.1. 植物成分の研究

コラゲナーゼ抑制活性を示した熱帯薬用植物 7 種のう

表 1 コラゲナーゼ抑制活性を示したサンプル

学名	科	遊離率 (%) (100 μg/mL)
熱帯薬用植物		
<i>Bridelia siamensis</i>	Euphorbiaceae	38.4
<i>Pluchea indica</i>	Compositae	25.5
<i>Ehretia microphylla</i>	Boraginaceae	39.3
<i>Ipomoea pescaprae</i>	Convolvulaceae	26.3
<i>Melastoma polyanthum</i>	Melastomataceae	17.6
<i>Curcuma domestica</i>	Zingiberaceae	12.6
<i>Emilia sonchifolia</i>	Compositae	33.6
海藻		
<i>Ishige okamurae</i>	Ishigeaceae	49.6
<i>Sargassum ringgoldianum</i>	Sargassaceae	46.6
<i>Undaria pinnatifida</i>	Phaeophyceae	40.3
<i>Cladophora wrightiana</i>	Cladophoraceae	19.1
<i>Chaetomorpha spiralis</i>	Cladophoraceae	34.8
<i>Padina japonica</i>	Dictyotaceae	36.7
ウミウシ		
<i>Elysia abei</i>	Elysiidae	59.0
<i>Pleurobranchus hirasei</i>	Pleurobranchidae	54.0
<i>Doriopsilla miniata</i>	Dendrodorididae	58.0

ち、まず、ノボタン科 *Melastoma polyanthum* の成分研究を行った。

今回入手した *Melastoma polyanthum* の葉のメタノール抽出物 6.9 g を用いて、まず、溶媒分配により、酢酸エチル可溶部 1.94g, ブタノール可溶部 2.07g, 水可溶部 2.7g を得た。各画分のコラゲナーゼ抑制活性は 100 g/mL で、各々、15.6, 38.0, および 33.9% であった。従ってまず、最も顕著な活性が認められた酢酸エチル可溶部について、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル系およびクロロホルム/メタノール系) を行った後、最も顕著な活性を示したフラクションを最終的に逆相 HPLC (Develosil RPAQUEOUS-AR-5, 10×250 mm; 70% MeOH; UV 220 nm) にて精製し、4 種のフラボノイド配糖体 MP1 ~ MP4 を各々 19.5, 3.0, 1.0, および 1.1 mg 単離した。MP1 ~ MP4 は各種スペクトルデータの文献値¹⁾ との比較により、3-*O*-kaempferol 2,4-di-*O*-(*trans*-p-coumaroyl)-β-D-galactopyranoside, 3-*O*-kaempferol 2-*cis*-p-coumaroyl-6-*trans*-p-coumaroyl-β-D-galactopyranoside, 3-*O*-kaempferol 2-*trans*-p-coumaroyl-6-*cis*-p-coumaroyl-β-D-galactopyranoside, および 3-*O*-kaempferol 6-galloyl-β-D-galactopyranoside と同定した (図 1)。これらのうち、MP2 と MP3 は新規化合物であった。

MP1 ~ MP4 の他にも、同抽出物から 4 種以上の類縁化合物を単離しており、それらの化学構造の決定について検討している。

単離した MP1 ~ MP4 についてコラゲナーゼ抑制活性を調べたところ、MP1 に最も強い活性が認められた (表 2)。しかしながら、MP1 ~ MP4 だけでは粗抽出物の活性の強さを説明できなかった。

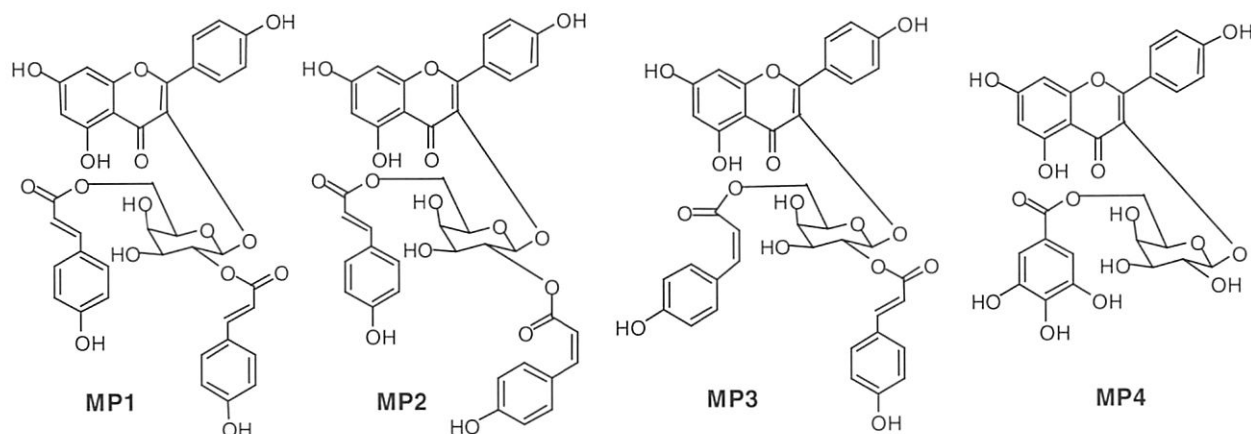
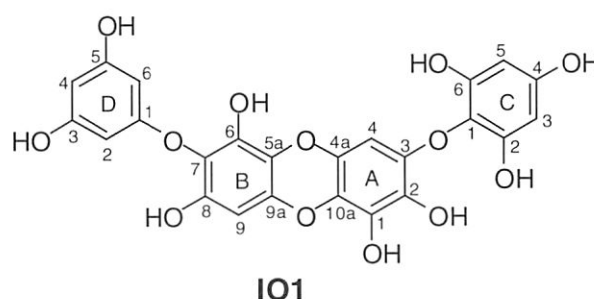


図1 MP1～MP4の化学構造

表2 MP1～MP4のコラゲナーゼ抑制活性

化合物	遊離率 (%)	
	100 μ g/mL	10 μ g/mL
MP1	15.5	76.1
MP2	27.6	83.3
MP3	39.4	87.1
MP4	23.2	85.6



IO1

図2 IO1の化学構造

表3 IO1 (diphlorethohydroxycarmalol) の ^1H および ^{13}C NMRデータ

position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
Ring A		
1		139.5
2		126.3
3		145.9
4	6.05 s	94.1
4a		138.6
10a		124.0
1-OH	9.12 s	
Ring B		
5a		130.6
6		135.0
7		142.8
8		125.4
9	5.69 s	92.2
9a		133.7
6-OH	8.47 br s	
8-OH	8.98 br s	
Ring C		
1		122.8
2, 6		151.2 (2C)
3, 5	5.86 s (2H)	94.9 (2C)
4		154.8
2, 6-OH	9.12 br s (2H)	
4-OH	9.02 br s	
Ring D		
1		160.0
2, 6	5.67 d 1.8 Hz (2H)	93.6 (2C)
3, 5		158.8 (2C)
4	5.77 t 1.8 Hz	96.0
3, 5-OH	9.09 br s (2H)	

3.2. 海藻成分の研究

2.1. で選別した海藻6種のうち、まず、褐藻 *Ishige okamurae* および *Undaria pinnatifida* の成分研究を行った。

房総半島・天津小湊町で採取した褐藻 *Ishige okamurae* (湿重 280 g) のメタノール抽出物 21.7 g に対して、ヘキササンと 90% メタノールで溶媒分配を行った。90% メタノール可溶部 (17.8 g) について、ダイヤイオン HP-20 によるカラムクロマトグラフィーを行って色素を除去した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返して (i) 2.0×18 cm, クロロホルム/メタノール (5:2); (ii) 1.5×22 cm, クロロホルム/メタノール/水 (16:8:1)]、最終的にセファデックス LH-20 カラム (1.0×38 cm, メタノール) にて精製し、1 種のフロロタンニン IO1 を 153 mg 単離した。IO1 は褐色非晶質固体として得られ、高分解能マスペクトルにより分子式 $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{O}_{13}$ をもつことが分かった (m/z 512.0589, Δ -0.2 mmu)。各種スペクトルデータの解析の結果、IO1 は以前、褐藻 *Carpophyllum maschalocarpum* より分離されていた diphlorethohydroxycarmalol²⁾ と同定した (図2)。ただし、diphlorethohydroxycarmalol は以前はノナアセタート体として単離され、ヒドロキシ型では単離された報告はなかったため、今回詳細にスペクトルデータの帰属を行った (表3)。

一方、同様に房総半島・天津小湊町で採取した褐藻 *Undaria pinnatifida* のメタノール抽出物 36.8 g を用いて、まず、溶媒分配により、酢酸エチル可溶部 2.6 g、ブタノ

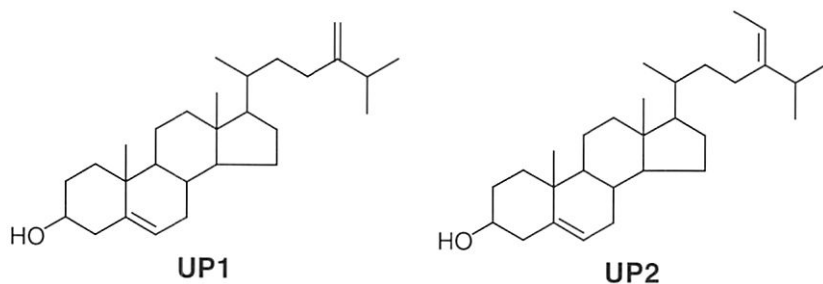


図3 UP1およびUP2の化学構造

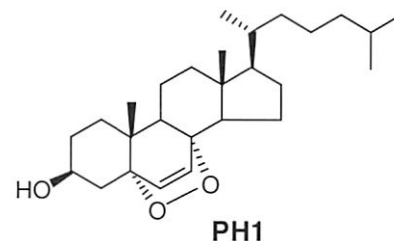


図4 UP1およびUP2の化学構造

ール可溶部 1.7 g, 水可溶部 30.9 g を得た. 各画分のコラゲナーゼ抑制活性は 100 $\mu\text{g/mL}$ において, 各々, 42.8, 93.8, および 100% であった. 従って酢酸エチル可溶部に本活性が集約したため, 酢酸エチル可溶部について, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル系およびクロロホルム/メタノール系) を行った後, ダイヤイオン HP-20 カラムにて色素を除去し, 最終的に逆相 HPLC (Develosil ODS HG-5, 20 x 250 mm; 100% MeOH; UV 220 nm) にて精製し, 2 種のステロール UP1 および UP2 を各々 1.2 および 1.3 mg 単離した. UP1 および UP2 は各種スペクトルデータの解析の結果, 各々 24-methylenecholesterol および fucosterol と同定した (図 3). 単離した UP1 および UP2 についてコラゲナーゼ抑制活性を調べたところ, これらの化合物には活性が認められなかった.

3. 2. ウミウシ成分の研究

2. 1. で選別したウミウシ 3 種のうち, まず, カメノコフシエラガイ *Pleurobranchus hirasei* の成分研究を行った.

房総半島・天津小湊町で採取したカメノコフシエラガイ *Pleurobranchus hirasei* (湿重 25.7 g) のメタノール抽出物 0.97 g に対して, 酢酸エチルと水で溶媒分配を行った. コラゲナーゼ抑制活性が認められた酢酸エチル可溶部について, シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い (1.0 x 35 cm, ヘキサン/酢酸エチル系), つづいて逆相 HPLC (Develosil RPAQUEOUS-AR-5, 10 x 250 mm; 70% MeOH; UV 220 nm) にて精製し, 1 種のステロールパーオキシド PH1 を 0.5 mg 単離した. PH1 は各種スペクトルデータの解析の結果, 5,8 α -epidioxy-5 α -cholest-6-en-3 β -ol と同定した (図 4). 単離した PH1 についてコラゲナーゼ抑制活

性を調べたが, 活性が認められなかった.

4. 考 察

熱帯薬用植物, 海藻, ウミウシを材料として, コラゲナーゼ抑制成分の探索を行った. これまでのところ, 活性成分として, ノボタン科植物 *Melastoma polyanthum* から 3-*O*-kaempferol 2,4-di-*O*-(trans-*p*-coumaroyl)- β -D-galactopyranoside (MP1) を得た. 同時に, MP1 に関連する構造をもつ新規化合物を単離した. 一方, 他の材料からは現在のところ, 明確な活性成分の単離には至っていない. これまでのスクリーニングの結果を概観すると, 植物に含まれるタンニン類等, 高極性のフェノール系化合物にはコラゲナーゼ阻害活性を有する可能性が高いことが示唆された. さらに研究を継続して, 当研究室内でこれまでに構築した未開拓天然物材料ライブラリーを素材として, 総合的かつ系統的な材料の確保およびスクリーニングを行えば, 新しいタイプのコラゲナーゼ抑制物質の発見が可能であると考えられる.

謝 辞

本研究を遂行するに当たり, ご支援をいただきましたコスメトロジー研究振興財団に感謝申し上げます.

(文 献)

- 1) Romussi G, Bignardi G, Pizza C, De Tommasi N.; Constituents of Cupuliferae. XIII. New and revised structures of acylated flavonoids from *Quercus suber* L., *Archiv der Pharmazie*, 324, 519-524, 1991.
- 2) Li SM, Glombitza KW.; Carmalols and phlorethofuhalols from the brown alga *Carpophyllum maschalocarpum*, *Phytochemistry*, 30, 3417-3421, 1991.