栄養補助食品として使用されるレスベラトロールならびに エクオールのチロシナーゼ酸化物による pro-oxidant 活性

藤田医科大学医療科学部

若松 一雅

trans-Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene, RES), a naturally occurring polyphenol, is well known for its antioxidant, anti-platelet, anti-inflammatory, anti-aging, cardioprotective and cancer chemopreventive properties and has recently attracted increased interest as a health-beneficial agent. However, the recent incidence of rhododendrol-induced leukoderma highlights the risk of using compounds having p-substituted phenols because of their rapid conversion to toxic o-quinones. Based on its p-substituted phenol structure, RES is also expected to be a substrate for tyrosinase and to produce a toxic o-quinone metabolite. In fact, RES was found to be a good substrate for tyrosinase. The results of this study demonstrate that the oxidation of RES by tyrosinase produces 4-(3',5'-dihydroxy-trans-styrenyl)-1,2-benzoquinone (RES-quinone), which decays rapidly to an oligomeric product (RES-oligomer). RES-quinone was identified after reduction to its corresponding catechol, known as piceatannol. RES-quinone reacts with N-acetylcysteine, a small thiol, to form a diadduct and a triadduct, which were identified by NMR and MS analyses. The production of a triadduct is not common for o-quinones, suggesting a high reactivity of RES-quinone. RES-quinone also binds to bovine serum albumin through its cysteine residue. RES-oligomer can oxidize GSH to GSSG, indicating its pro-oxidant activity. These results suggest that RES could be cytotoxic to melanocytes due to the binding of RES-quinone to thiol proteins and the cosmetic use of RES should be considered with caution. Equal (7,4-dihydroxy-isoflavan) is one of the end products of the intestinal bacterial biotransformation of the isoflavone daidzein which is phytoestrogen found in soy and soy-derived products, and a nonsteroidal estrogen of the isoflavone family. Equol is not a natural constituent of plants, but established as a bacterial metabolite of daidzein. Since equal has the p-substituted phenol structure as well as RD and RES, it is expected to be a substrate for tyrosinase and to produce a toxic o-quinone metabolite. In order to examine whether equal produces the o-quinone, we performed the tyrosinase-catalyzed oxidation of equol. UV/visible spectra showed the unstable quinone absorption at 420 nm within 15 min. Converting the o-quinones produced by tyrosinase oxidation of equal in the presence of ascorbic acid to more stable catechols, we could obtain three compounds by preparative HPLC at UV detection. Although these compounds have been known to be metabolized from equal using human liver microsomes, it is the first time that these compounds are formed by tyrosinase-catalyzed oxidation of equal.

1. 緒 言

trans-Resveratrol(レスベラトロール、3,5,4'-トリヒドロキシ-trans-スチルベン、以下RESと略す、図1の(1)は、ブドウ、ベリー、ピーナッツなどの植物中から得られる天然のポリフェノールである(Baur and Sinclair et al., 2006)。RES(1)は、その抗酸化、抗血小板、抗炎症、抗老化、心臓保護および癌の予防特性により、健康に有益な薬剤として最近関心が高まっている(Baur et al., 2006;Jang et al., 1997)。RES(1)は、皮膚を光保護し、光発がんを抑制することも示されている(Afaq and Katiyar, 2011)。特に多機能性色素沈着低下剤として皮膚化粧品に使用する目的でRES(1)を使用することへの関心が、近年大幅に高まっている(Na et al., 2019)。

チロシナーゼは、L-チロシンのドーパキノンへの酸化



Tyrosinase-catalyzed oxidation of resveratrol produces a highly reactive *ortho*-quinone: implications for melanocyte toxicity

Kazumasa Wakamatsu

Department of Chemistry, Fujita Health University School of Medical Sciences

を触媒する重要な酵素であり、メラノサイト中のメラノソ ームと呼ばれる特殊なオルガネラ内で、メラニン色素であ るユーメラニンおよびフェオメラニンの産生をもたらす (Ramsden and Riley, 2014)。チロシナーゼは、天然の基 質であるL-チロシンだけでなく、多数のp-置換フェノー ルおよびカテコールを酸化して、オルトキノンを生成す ることができる。o-キノンは非常に反応性の高い化合物 で、チオール酵素と結合し、活性酸素種(ROS)を生成する ことにより細胞毒性を発揮する (Bolton et al., 2000)。 ま た, o-キノンは、メラノソーム内のタンパク質と共有結 合してネオ抗原を生成するハプテンとしても作用し、免 疫反応を引き起こすことが知られている (Westerhof et al., 2011)。実際, 多くのフェノール化合物が, o-キノンへの 活性化を通じて、ヒトの皮膚に白皮症を誘発することが知 られている。これらのフェノールのうち、4-メトキシフ ェノール (Rilev. 1969). モノベンゾン (4-ベンジルオキシ フェノール) (Manini et al., 2009)、4-tert-ブチルフェノ ール (James et al., 1977), ロドデンドロール [4-(4-ヒド ロキシフェニル) -2-ブタノール, 以下RDと略す](Ito et al., 2018; Sasaki et al., 2014) およびラズベリーケトン[4-ヒドロキシフェニル]-2-ブタノン] (Ito et al., 2017a) が 知られている。

図 1 チオールの存在下、または非存在下における RES (1) のチロシナーゼ酸化の反応経路

本研究では、RESキノン(2)をまず同定し、チオールタン パク質であるウシ血清アルブミン(BSA)を含むチオール 化合物との反応を調べることを目的とした。続いて、RES の酸化生成物 (RESオリゴマー) の pro-oxidant 活性 (酸化 促進活性)を調べた。

エクオール (EQ, 7,4-ジヒドロキシ-イソフラバン, 図 2 の6))は、大豆および大豆由来製品に含まれる植物エスト ロゲンであるイソフラボンダイゼインの腸内細菌の生体内 変換の最終産物の1つであり、イソフラボンファミリーの非 ステロイド性エストロゲンである (Lephart, 2017)。エク オールは植物の天然成分ではなく、ダイゼインの細菌代謝 産物であることが知られている (Setchell, and Clerici, 2010: Lephart, 2016)。 EQ(6)は、RDとRESと同じように、 b-置換フェノール構造を持っているため、チロシナーゼ の基質となり、毒性のあるo-キノン代謝物を生成し、酸 化促進作用を示すことが推測される。天然のEQ(6)は、S-(-)-体と*R*-(+)-体の二種類のエナンチオマーが存在する。 そこで、エクオールがo-キノン体を生成するかどうかを 調べるために、今回は、S-(-)-EQ(6)のチロシナーゼ触媒 酸化反応を行い、次に酸化促進活性も同様に調べた。

2. 方 法

2.1. L-アスコルビン酸またはN-アセチルシステイン (NAC)の非存在下または存在下でのチロシナーゼに よる RES (1) または RES-カテコール (3) の酸化

100 μM RES(1)またはRES-カテコール(3)の溶液(2 mL) を50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8 または5.3) 中,37℃

でチロシナーゼ (50 U/mL) により酸化し、吸収スペクトル の変化を定期的に 60 分間追跡した。酸化は、1000 µM アス コルビン酸または 200 μM または 300 μM NAC の存在下で も行った。反応を還元的に終結させるために、200 µLの 一定量を 20 μLの 10 % NaBH₄ と混合し、続いて 180 μL の0.4Mギ酸を混合した。アスコルビン酸、CySHまたは GSHの存在下での実験では、NaBH₄の添加は省略した。

2.2. DiNAC-RES-カテコール(4)および TriNAC-RES-カテコール (5) の分離

RES $(1, 20.5 \,\text{mg}, 0.09 \,\text{mmol})$, RES- $\beta = 1.5 \,\text{mg}$ mg, 0.01 mmol), NAC (163 mg, 0.4 mmol) のエタノール 2mL溶液を 98mL 50mM リン酸ナトリウム (pH 6.8) と混 合した。混合物を37℃で激しく振盪し、それに1 mLの緩 衝液中のチロシナーゼ (20,000 U) を加えた。酸化の 30 分 後、2mLの6M HClを添加して酸化を停止し、混合物を 100mLの1-ブタノールで2回抽出した。減圧下で1-ブ タノールを蒸発させた後, 残渣をHPLC溶出緩衝液に溶 解し、分取HPLCにかけた。分取した画分の凍結乾燥によ り、DiNAC-RES-カテコール (4, HPLC 純度 97%) として 13.6 mg (22%収率). およびTriNAC-RES-カテコール(5. HPLC純度99%)として18.3 mg (24%)が得られた。

2. 3. 2.5-ジ-S-[(N-アセチル) システイニル] -3,4,3',5'-テトラヒドロキシトランススチルベン (DiNAC-RES-カテコール,4)

DiNAC-RES-カテコール(4)は、1H NMRスペクトルと

¹³C NMRスペクトルおよび高解像度LC-MSより構造を確認した。

TriNAC-RES-catechol (5) は、¹H NMRスペクトルと ¹³C NMRスペクトル, 高解像度LC-MSより構造を確認した。

2.5. RES キノン(2) とシステイン(CySH) およびグルタチオン(GSH) との付加反応

RESカテコール (3, 2.5 mg, 0.01 mmol) および CySH (4.9 mg, 0.04 mmol) の 10 mL 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.8)溶液を 37 $\mathbb C$ で激しく振盪した。その中に 1 mLのバッファーに溶かしたチロシナーゼ(2,000 U)を加えた。 10 分の酸化後,0.2 mLの6 M ギ酸を添加して酸化を停止し,混合物を減圧下で蒸発乾固させた。残渣をHPLC で使用する緩衝液に溶解し,分取用 HPLC カラムで分取した。最も早く溶出した画分,次に溶出した画分,最後に溶出した画分を凍結乾燥して,それぞれ,DiCyS-RES-カテコール(0.8 mg,17 % 収率),MonoCyS-RES- なtechol-B(1.3 mg,36 %),および MonoCyS-RES-カテコール-A(0.6 mg,17 %)を得た。CySH 置換の数は,高解像度 LC-MS分析によって確認した。

RES-カテコール (**3**, 2.5 mg, 0.01 mmol) とGSHの溶液 (12.4 mg, 0.04 mmol) を同様に処理し、分取用HPLC カラムで分取した。最も早く溶出した画分, 次に溶出した画分, 最後に溶出した画分を凍結乾燥して, それぞれ, DiGS-RES-カテコール (2.8 mg, 33 % 収率), MonoGS-

RES-カテコールB (1.7mg, 31%), および MonoGS-RES-カテコールA (それぞれ 1.0mg, 18%)を得た。GSH 置換の数は、高解像度LC-MS分析によって確認した。

2.6. RES酸化生成物, RES-オリゴマーの酸化促進活性

過去に報告したように (Ito, Hinoshita et al., 2017; Ito, Okura et al., 2017). RESオリゴマーとRDオリゴマーは. 前駆体RES (1.1mM) およびRD (1mM) から50mMナト リウムリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で調製した。チロシナー ゼ(200U)を各前駆体溶液2mLに加え、反応混合物を37 ℃で 120 分間インキュベートした。対照としてチロシナー ゼのみ (100 U/mL) も使用した。メラニン溶液 (2,000 μL) を 10 mM GSH (200 µL、1 mol 当量) と混合し、37℃でイ ンキュベートした。0,30および60分の反応時間で,反 応混合物を100 µL取り出し、0.4M HClO4(800 µL)と 混合して酸化を停止した。酸化反応物中のGSHとGSSG は、我々のHPLC法を使用して分析した (Imai et al., 1987: Ito, Hinoshita et al., 2017; Ito, Okura et al., 2017)。酸化 反応物 (20 μL) 中の過酸化水素を pH 7.4 緩衝液 (180 μL) で 希釈した後、分光測光法で分析した。希釈した混合物を Ampliflu™Red 試薬 (200 µL) と反応させ、568 nm の吸収 極大を持つ赤色色素を生成させた(Zhou et al., 1997)。

3. 結果

3. 1. RES (1) のチロシナーゼ触媒による酸化は RES-キノン(2) を生成する

チロシナーゼ ($50\,\mathrm{U/mL}$) による RES ($1,100\,\mu\mathrm{M}$) の酸化は、 $p\mathrm{H}6.8\,\mathrm{O}\,50\,\mathrm{mM}$ リン酸ナトリウム緩衝液中、 $37\,\mathrm{C}\,\mathrm{C}$ で

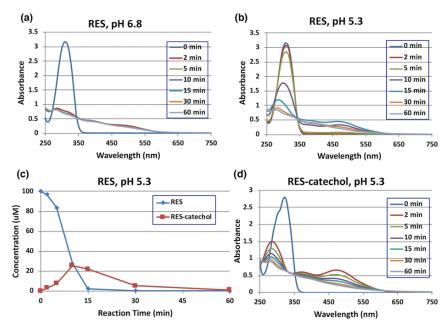


図3 RES (1) およびRES-カテコール (3) のチロシナーゼ酸化反応と生成物のHPLC分析

実施した。UV/可視スペクトルの変化を60分間追跡した ところ、単調な吸収を持つオリゴマーの迅速な生成が示さ れ(図3a), o-キノン酸化生成物の非常に速い二次反応が 示されたので、pH5.3で酸化を行うことで反応を遅くした。 図3bに示すように、実際に反応は遅くなった。UV/可視 スペクトルの変化が複雑に現れたので、次に、pH5.3で の酸化を310nmでのUV検出器を使用してHPLCで追跡 した。図3cに示すように、RES(1)は、15分以内に消費 され、HPLCでの保持時間 5.5 分 (RES は 6.9 分に現れた) を持つ新しい化合物が現れた。その構造はRES-カテコー ル(ピセアタンノール, 3)と推定された。RES-カテコール (3) の構造は、HPLCによる市販のピセアタンノールとの 同時注入により確認された。このRES-カテコール(3)の 同定により、4-(3'.5'-ジヒドロキシ-トランス-スチレ (RES + 1) - 1, 2 - ベンゾ + 1 > (RES + 1) > 2 として 485 nm で吸収極大を示す直後の生成物の構造が確認された。図 3cに示すように、RESキノン(2)は非常に反応性の高い化 合物であると思われ、RESキノンから可能なオリゴマー 生成物を分離する試みはうまくいかなかった。図3dに示 すように、その酸化により、2分以内に485 nmに吸収ピ ークを持つ化合物が急速に生成した。

チロシナーゼ酸化中、RESカテコール(3)の生成は、pH 5.3での10 mol 当量のアスコルビン酸(1,000 μ M)存在下で、100 μ M RES(1)を酸化することによりさらに確認された。図4aに示すように、RES(1)のUVスペクトルは、 $2\sim5$ 分でRES-catechol(3)のUVスペクトルに置き換えられた。反応混合物のHPLC分析により、RESカテコール(3)が5分間で高収率(80%)に急速に生成し、RESカテコールは、RESキノン(2)に酸化された。その後、アスコルビン酸はすべてRESキノンとの酸化還元交換により消費された(図4b)。

3.2. RES キノン (**2**) と NAC との 反応は、 二付加体 と三付加体を生成する

次に、RESキノン (2) がチオール化合物と結合するかどうかを調べた。RES (1) $(100\,\mu\text{M})$ が、pH5.3 で $2\,\text{mol}$ 当量のNAC $(200\,\mu\text{M})$ の存在下で、チロシナーゼ $(50\,\text{U/mL})$

により酸化された時、酸化は5分以内に急速に進み、450 nm付近に最大吸収波長を持つo-キノン色素が生成した ($\boxtimes 5a$)。これはかなり驚くべきことである。なぜなら、2mol 当量のチオールの存在下でのフェノール(およびカテ コール) のチロシナーゼ酸化は、通常、主な生成物とし て無色のモノチオール付加物を生成するからである(Ito, Hinoshita et al., 2017; Ito and Prota, 1975)。したがって、 NAC濃度を3mol 当量(300 uM) に増やしたところ. 450 nmでの吸収は3分の1に減少し、2mol当量のNACを使 用した場合よりも318および282nmでの2つの吸収極大 はより明確になった(図5b)。2当量のNACを使用した場 合,5分間の反応時間でのHPLC分析により,3付加体と 2付加体の保持時間がそれぞれ4.8分と9.6分である2つ の主要な化合物の生成が示された(RES(1)は11.7分に出 現した(図5c)。しかし、ほとんどの生成物は、キノン型への 酸化により15分以内に消失した。3当量のNACが使用された 場合,これら2つの生成物は,安定した状態であった(図5d)。

これらの付加物の構造を同定するために、4mol 当量のNAC (4mM)の存在下、RES (1、1mM)の酸化を行ったが、十分速く進行しなかったので、生成物を取り出すことはできなかったので、RES-カテコール (3、0.1mM)を触媒として添加した。その後、急速に反応は進行して2つの主生成物を生成し、それらを分取 HPLC で分離した。これらの化合物の構造は、 1 H-NMR、2D-NMR、 13 C-NMR、高分解能 MS分析により同定した。これらにより、このTriNAC付加物の構造(7)を同定した。

3.3. RES-キノン(**2**) とBSAを含む他のチオールとの反応

次に、CySHまたはGSHとの反応性を調べた。3mol当量のCySHまたはGSHの存在下、RES (1) (100 μ M) の反応は、フェノールの酸化におけるチオールの阻害作用により非常にゆっくりと進行することがわかった(Naish-Byfield et al., 1994)。RESカテコール (3) (100 μ M) は、pH5.3で3mol当量 (300 μ M) のチオール存在下で、チロシナーゼ (50 μ M)により酸化した。図 6a, bに示すように、CySH

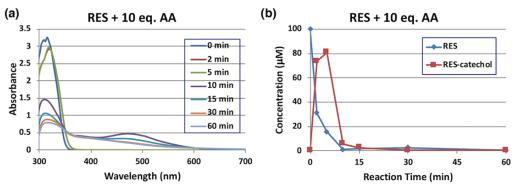


図 4 アスコルビン酸存在下、RES (1) のチロシナーゼ酸化反応と HPLC 分析

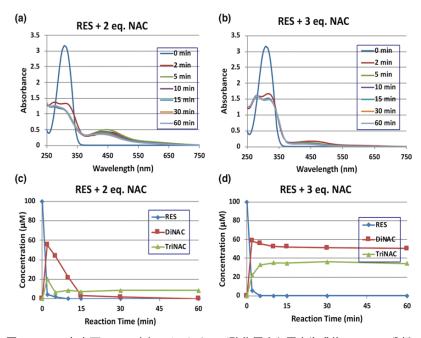


図 5 NAC 存在下, RES (1)のチロシナーゼ酸化反応と反応生成物の HPLC 分析

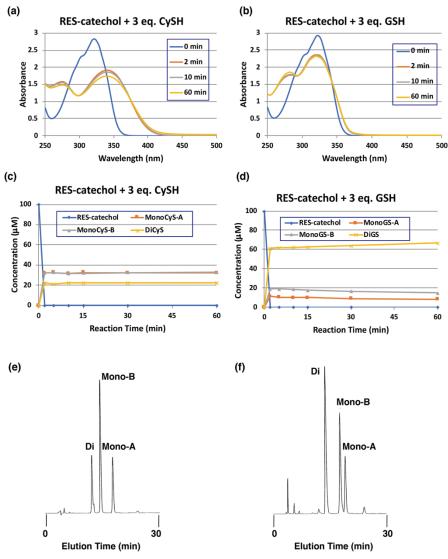


図 6 チオール存在下, RES-カテコール(3)のチロシナーゼ酸化反応とHPLC分析

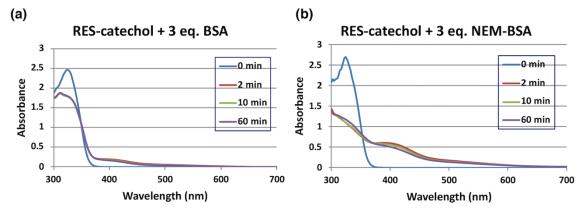


図7 ウシ血清アルブミン (BSA) 存在下, RES-カテコール (3) のチロシナーゼ酸化

とGSHは急速に反応して無色で比較的安定なチオール付加物を生成した。HPLC分析は、3つの主生成物の生成を示した。その収率は、60分の酸化中ほぼ一定であった(図6c,d)。Cys-付加物とGSH-付加物のHPLC分析は、3つのピークを示し、それらは質量分析により構造決定した(図6e,f)。

次に、BSAとRESキノン (2) の反応性を調べた。BSA には、17個のシスチン残基に加えて1個のシステイン残 基が含まれている。BSAは、そのシステイン残基の反応 性が広く研究されており、o-キノンの反応に敏感である ことが判明したため、代表的なチオールタンパク質とし て使用した(Ito, Hinoshita et al., 2017; Manini et al., 2009)。 BSA付加物は314nmで大きな吸収極大を持つが、300nm 未満のBSAによる大きな吸収は、小さなチオールからの 吸収よりも明確ではなかった(図7a)。314nmでの吸収は、 BSAのシステイン残基を経由して生成した付加物と帰結 できる。それは、モノチオール付加物のスペクトルとの類 似性に基づいている(図6e、f)。400nm付近に生成した弱 い吸収は、おそらくキノン型に起因するものと推測される。 RESキノン(2)への結合にシステイン残基が関与している 可能性を確認するために、システイン残基をN-エチルマ レイミド (NEM) で修飾したBSAとRESキノン (2) を反応 させたところ(図7b), RESキノン(2)の390nmでの0.60 の吸光度は、天然のBSA (400nmで0.20) の吸光度と比 べて約3倍大きかった。NEM修飾BSAからのこの大きな 吸収は、NEM-BSAとRES-キノン(2)のアミノ基間のキ ノイド発色団の生成に起因する可能性がある。これらの結 果から,RESキノン(2)の大部分がシステイン残基を介し てBSAに結合することを示している。

3. 4. RESオリゴマーはGSHをGSSGに酸化し、pro-oxidant活性(酸化促進活性)を有する

合成フェオメラニンと同様に天然のフェオメラニンは、 強力な酸化促進活性を持つことが知られている(Panzella et al., 2014)。我々は、以前、RDのチロシナーゼ触媒で酸 化されたRDオリゴマー(またはRDユーメラニン)が、合成フェオメラニンと同じくらい強力な酸化促進活性を持っていることを示した(Ito, Hinoshita et al., 2017)。したがって、RES(1)のオリゴマー酸化生成物であるRESオリゴマーが酸化促進活性を有するかどうかを調べた。 RESオリゴマーとRDオリゴマー(陽性対照として使用)は、それぞれ 1 mM RES(1)またはRDをpH 7.4で120分間、チロシナーゼ(100 U/mL)で酸化することにより調製した。

各オリゴマーは、1 mol 当量のGSH と 60 分間反応し、 GSHと酸化型グルタチオン (GSSG) の残量は、GSH量を 測定するためのDBBQを使用する我々の特別なHPLC法 によって分析された (Imai et al., 1987; Ito, Okura et al., 2017)。図8aに示すように、GSH量は時間依存的に、そ して、RESオリゴマーおよびRDオリゴマーとの60分間 のインキュベーションで、それぞれ約50%および90%ま で減少した。GSHの減少の大部分は、GSSGへの酸化に起 因するが、減少の一部は、GSHの酸化生成物とキノンと の結合を経由して進行しているように見える。次に、これ らのオリゴマーによりGSHの酸化中に過酸化水素が生成 されるかどうかを調べた。図8bに示すように、26uM過 酸化水素がGSHとの30分間の反応中にRDオリゴマーか ら生成したが、RESオリゴマーからはわずか6μM過酸化 水素(コントロールと同じ量)が生成した。ただし、この RESオリゴマーからの過酸化水素の生成の減少が、過酸 化水素を生成できないことによるのか、RESオリゴマー自 体による過酸化水素の除去によるのかは、現在不明である。

3.5. EQ(6)のチロシナーゼ酸化

EQ (**6**) のチロシナーゼ酸化を追跡したところ、UV/可視スペクトルで 15 分以内に $420\,\mathrm{nm}$ での不安定なキノン吸収が現れた。アスコルビン酸の存在下、還元してo-キノンをより安定したカテコールに変換後、HPLC分取によって 6-hydroxy-EQ (12%)、3'-hydroxy-EQ (25%)、6,3'-dihydroxy-EQ (25%)のカテコール体が得られた(図

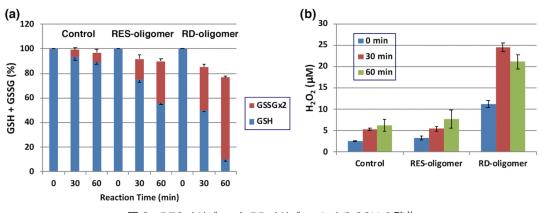


図8 RES オリゴマーと RD オリゴマーによる GSH の酸化

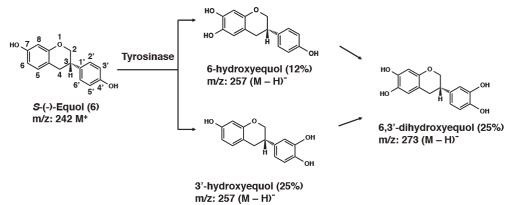


図9 EQ(6)のチロシナーゼ酸化物

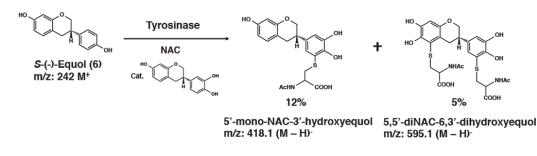


図 10 EQ (6) および 3'-hydroxy-EQ の NAC および GSH 共存下のチロシナーゼ酸化物

9)。生成物の構造は、 1 H-NMR、 13 C-NMRおよび高分解能 ESI-TOF質量スペクトルにより同定した。これらの化合物は、すでにヒト肝ミクロソームを使用した EQ(6)からの代謝により生成することが知られているが、EQ(6)のチロシナーゼ触媒酸化によって生成することがわかったのは最初の実験結果である。以上の結果は、 p -置換フェノール体である EQ(6)が酸化により、細胞毒性を示すのキノンを生成することを示している。

3.6. EQ (**6**)のチロシナーゼ酸化による NAC および GSH との反応

触媒量の3'-hydroxy-EQ (0.01 mmol) 存在下, EQ (6, 0.09 mol) とチロシナーゼを触媒として, NAC (0.4 mmol) と反応させ, 生成物の構造を H-NMR および高分解能 LC-MS質量スペクトルにより同定した。5'-mono-NAC-3'-hydroxy-EQ (12%) と 5,5'-diNAC-6,3'-dihydroxy-EQ (5%) が得られた (図 10)。一方, エクオール (6) と GSH と

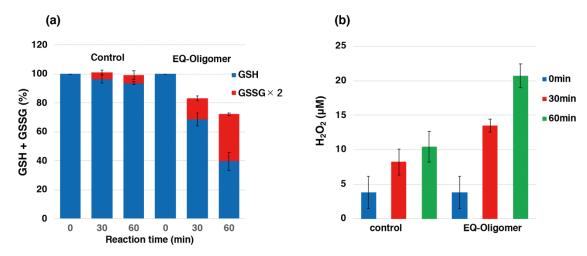


図 11 EQ オリゴマーによる GSH の酸化と過酸化水素量の変化

の反応は、3'-hydroxy-EQ (0.01 mmol) に 4 等量の GSH 存在下、チロシナーゼ酸化したところ、モノ GSH 付加体が 59%、ジ GSH 付加体が 3%の収率で得られた。これらの構造は、NAC体との比較で ¹H-NMR、 ¹³C-NMR および高分解能 ESI-TOF 質量スペクトルから構造決定した。

3.7. EQ(6)の酸化促進活性

EQ (6)の酸化促進活性を測定した(図11)。図8と比較して、酸化促進活性が、RESオリゴマーとRDオリゴマーの中間的な結果が得られた。一方、過酸化水素の産生についてはRDオリゴマーとほぼ同様な結果が得られた(図11b)。この結果は、EQ (6)オリゴマーが、RAオリゴマー、RESオリゴマーと同様に酸化促進活性を有することがわかった。

4. 考察と総括

RES(1)は、一般に基質よりもむしろチロシナーゼの優れた阻害剤と考えられている(Na et al., 2019)。例えば、Parkら(2014)は、RES(1)は、マッシュルームチロシナーゼを $1.8\mu M$ の IC 50 で強く阻害することを示した。しかし、本研究は、RES(1)がマッシュルームチロシナーゼの優れた基質であり、反応性o-キノンである RES キノン(2)を生成することを示している。ヒトを含むさまざまなものに存在するチロシナーゼは、さまざまなp-置換フェノールを酸化してo-キノンを形成することができる(Ito et al., 2014; Ramsden and Riley, 2014)。

p-置換フェノールのメラノサイトへの細胞毒性の可能性にもかかわらず、多くの研究がRES (1) の色素沈着低下効果を報告している。たとえば、Leeら(2014)は、RES(1)がメラノーマ細胞におけるメラニン形成関連タンパク質の発現を低下させ、RES (1) の局所適用は、in vivoにおける紫外線Bで刺激されたモルモットの皮膚の色素沈着過剰

を有意に抑制したことを発見した。Lei ら (2017) は,RES (1) がHT-144 ヒトメラノーマ細胞の増殖を $5 \sim 10 \, \mu \text{M}$ の IC 50 で強く阻害したことを発見した。同様に,Okura ら (2015) は,RES (1) がB16F1マウスメラノーマ細胞およ び NHEMb ヒト表皮メラニン細胞の増殖をそれぞれ 27.1 および $38.2 \, \mu \text{M}$ で阻害した。その値は,ハイドロキノン $(28.3 \, \text{および } 9.4 \, \mu \text{M})$ に匹敵する値である。一方,RES (1) の細胞毒性はかなり弱いことがわかり,別の研究では IC 50 は \gg $100 \, \mu \text{M}$ であった (Lee et al., 2014)。

RES (1) の局所適用は、一般に、皮膚に有害というよりも有益であると考えられている(Na et al., 2019)。しかし、我々の研究では、チロシナーゼが効果的にRES (1) を酸化し、反応性の高いRES キノン (2) を生成できることを示している。高い反応性は、その急速な減衰(図 3)と、DiNAC-RES-catechol(4)およびTriNAC-RES-catechol(5)の定量的収率での生成によって示される。ジ付加体の生成もCySHとGSHに対して確認された。これらの結果は、RES (1) がRES キノン (2) のチオールタンパク質への結合によりメラニン細胞に対して細胞毒性を示す可能性があることを示唆している。RD オリゴマーほど強力ではないが、RES オリゴマーの酸化促進活性は細胞毒性に寄与する可能性がある。

EQ (6) は、チロシナーゼの基質となり、のキノンを産生しカテコール体を生成することが今回の実験からわかった。このことは、EQ (6) がメラニン細胞に対して、細胞毒性を示す可能性があることを示している。EQオリゴマーの酸化促進活性は、RESオリゴマーとRDオリゴマーの中間的であり、一方、過酸化水素の産生については、RDオリゴマーとほぼ同様な結果が得られた。EQ (6) は、大豆食品を食べた時に大豆イソフラボン(ダイゼイン)が、おなかの中で腸内のEQ産生菌によって代謝され生成することが知られている(Setchell and Clerici, 2010; Lephart,

2016)。EQ (6) は女性ホルモン(エストロゲン)と構造が似ているため、体内で女性ホルモンと似た働きをする。EQ (6) の効果は、①骨粗鬆症予防、②血管内皮作用、④更年期症状の改善、③目尻のシワが改善するなど、皮膚老化予防、美肌効果、④抗酸化作用などが知られているが、上記に述べたように、RES (1) とEQ (6) の構造は酸化されやすいフェノール骨格を持ち、チロシナーゼ酸化で細胞毒性を示す o-キノン体を生成し、RES (1) およびEQ (6) のチロシナーゼ酸化により生成したオリゴマーが強い酸化促進活性を示すことがわかった。以上の観点から、RES (1) およびEQ (6) を美白剤として皮膚に塗布した場合、これらの化合物がチロシナーゼの基質になり、毒性代謝物を産生する可能性を示唆できた。RES (1) およびEQ (6) を皮膚へ塗布する危険性について注意を喚起する必要がある。

謝辞

本研究を推進する上で、藤田医科大学伊藤祥輔名誉教授、 岐阜医療科学大学田中ひとみ助教、化学教室卒論生の藤木 優衣氏に感謝申し上げます。また、「H-NMR, ¹³C-NMR お よび高分解能 ESI-TOF 質量スペクトルを測定して頂いた 名古屋大学大学院生命農学研究科小鹿一教授に重ねて深謝 申し上げます。

(引用文献)

- Afaq, F., Katiyar, S. K. (2011). Polyphenols: Skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. Mini Review in Medical Chemistry, 11, 1200–1215.
- 2) Baur, J. A., Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Review Drug Discovery*, 5, 493-506.
- 3) Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., ··· Sinclair, D. A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444, 337-342.
- 4) Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000). Role of quinones in biology. *Chemical Research in Toxicology*, 13, 135–160.
- 5) Imai, Y., Ito, S., & Fujita, K. (1987). Determination of natural thiols by liquid chromatography after derivatization with 3,5-di-*tert*-butyl-1,2-benzoquinone. Journal of *Chromatography 420*, 404-410.
- 6) Ito, S., & Prota, G. (1975). A facile one-step synthesis of cysteinyldopas using mushroom tyrosinase. *Experientia*, 33, 1118-1119.
- 7) Ito, S., & Wakamatsu, K. (2018). Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, e552.

- 8) Ito, S., Yamashita, T., Ojika, M., & Wakamatsu, K. (2014a). Tyrosinase-catalyzed oxidation of rhododendrol produces 2-methylchromane-6,7-dione, the putative ultimate toxic metabolite: implications for melanocyte toxicity. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 27, 744-753.
- 9) Ito, S., Hinoshita, M., Suzuki, E., Ojika, M., & Wakamatsu,K. (2017a). Tyrosinase-catalyzed oxidation of the leukoderma-inducing agent raspberry ketone produces (*E*)-4- (3-oxo-1-butenyl) -1,2-benzoquinone: Implications for melanocyte toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, *30*, 859-868.
- 10) Ito, S., Okura, M., Wakamatsu, K., & Yamashita, T. (2017b). The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin induces cysteine depletion in B16 melanoma cells. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 30, 63-67.
- 11) Ito, S., Agata, M., Okochi, K., & Wakamatsu, K. (2018). The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin is enhanced by ultraviolet A radiation. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 31, 523-528.
- 12) James, O., Mayes, R. W., & Stevenson, C. J. (1977). Occupational vitiligo induced by *p*-tert-butylphenol: a systemic disease? *The Lancet*, 310, 1217-1219.
- 13) Jang, M., Cai, L, Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., ··· Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-220.
- 14) Lee, T. H., Seo, J. O., Baek, S. H., & Kim, S. Y. (2014). Inhibitory effects of resveratrol on melanin synthesis in ultraviolet B-induced pigmentation in guinea pig skin. *Biomolecules & Therapeutics*, 22, 35-40.
- 15) Lei, M. J., Dong, Y., Sun, C. X., & Zhang, X. H. (2017). Resveratrol inhibits proliferation, promotes differentiation and melanogenesis in HT-144 melanoma cells through inhibition of MEK/ERK kinase pathway. *Microbial Pathogenesis*, 111, 410-413.
- 16) Lephart, E.D. (2016). Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Research Review*. 31, 36-54.
- 17) Lephart, E.D. (2017). Resveratrol, 40 Acetoxy Resveratrol, R-equol, Racemic Equol or S-equol as Cosmeceuticals to Improve Dermal Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1193.
- 18) Manini, P., Napolitano, A., Westerhof, W., Riley,

- P. A., & d' Ischia, M. (2009). A reactive orthoquinone generated by tyrosinase-catalyzed oxidation of the skin depigmenting agent monobenzone: self-coupling and thiol-conjugation reactions and possible implications for melanocyte toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 22, 1398-1405.
- 19) Na, J. I., Shin, J-W., Choi, H. R., Kwon, S-H., & Park, K-C. (2019). Resveratrol as a multifunctional toical hypopigmenting agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, E956.
- 20) Naish-Byfield, S., Cooksely, C. R., & Riley, R.A. (1994). Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase: effect of dithiothreitol on kinetics. *Biochemical Journal*, 384, 155-162.
- 21) Okura, M., Yamashita, T., Ishi-Osai, Y., Yoshikawa, M., Sumikawa, Y., Wakamatsu, K., & Ito, S. (2015). Effects of rhododendrol and its metabolic products on melanocytic cell growth. *Journal of Dermatological Sciences*, 80, 142-149.
- 22) Park, J., Park, J. H., Suh, H-J., Lee, I. C., Koh, J., & Boo, Y. C. (2014). Effects of resveratrol, oxyresveratrol, and their acetylated derivatives on cellular melanogenesis. Archives of Dermatological Research 306, 475-487.
- 23) Ramsden, C. A., & Riley, P. A. (2014). Tyrosinase:

- the four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22, 2388-2395.
- 24) Riley, P. A. (1969). Hydroxyanisole depigmentation: in-vivo studies. *The Journal of Pathology*, 97, 193-206.
- 25) Sasaki, M., Kondo, M., Sato, K., Umeda, M., Kawabata, K., Takahashi, Y., ... Inoue, S. (2014). Rhododendrol, a depigmentation-inducing phenolic compound, exerts melanocyte cytotoxicity via a tyrosinase-dependent mechanism. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 27, 754-763.
- 26) Setchell, K. D. R. & Clerici, C. (2010). Equol: History, chemistry, and formation. *The Journal of Nutrition*, 140, 1355 S-1362 S.
- 27) d' Ischia, M. (2011). The haptenation theory of vitiligo and melanoma rejection: a close-up. *Experimental Dermatology*, 20, 92-96.
- 28) Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., & Haugland, R. P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry*, 253, 162-168.