

称号及び氏名 博士(応用生命科学) 杉本 和久

学位授与の日付 平成20年2月20日

論文名 「Studies on enzymatic synthesis and characterization of glycosides (微生物由来の酵素を用いた配糖体の合成およびその機能に関する研究)」

論文審査委員 主査 川口 剛司
副査 林 英雄
副査 杉本 憲治

論文要旨

緒論

天然には様々な生理活性を持つ化合物が数多く知られている。しかしながら、生理活性物質のなかには強いにおいや刺激を持つものや、水溶性や安定性に乏しいものが多く存在する。食品や化粧品への有効利用を考えるうえで、そのような性質を改良することは非常に重要である。配糖化は化合物の構造を修飾するための重要な方法のひとつであり、種々の生理活性物質の溶解性、安定性、吸収性および味質などが改良されることが知られている。以上のような観点から、私達は配糖化反応および配糖体の機能に関する研究に取り組み、これまでにヒドロキノンにグルコースが α -結合した配糖体、4-hydroxyphenyl α -D-glucopyranoside (α -アルブチン) の製造プロセスを確立している。

本研究では、第1章～第3章において、 α -アルブチンの応用のための開発研究を詳細に行うと共に、 α -配糖体と β -配糖体の性質の違いについても知見を深めるため、 α -アルブチン及び4-hydroxyphenyl β -D-glucopyranoside (アルブチン) のヒトチロシナーゼに対する阻害効果について検討した。また、 α -アルブチンおよびアルブチン配糖体を酵素合成し、ヒドロキノン配糖体のヒトチロシナーゼ阻害活性と化学構造の関連性について考察した。さらに、ヒトメラノーマ細胞および正常ヒト皮膚3次元モデルを用いて α -アルブチンのメラニン生成抑制効果について検討を行い、 α -アルブチンの化粧品用美白素材としての有効性について検討をおこなった。第4章では、天然には有用な生理活性物質として多く存在するものの、安定性や味質等の面で改善すべき性質を保有しているカルボキシル化合物の性質改良を目標に、これまで報告例のなかったカルボキシル基を有する化合物への糖質関連酵素による糖転移反応について検討し、sucrose

phosphorylase が上記の酵素反応を触媒することを明らかにした。さらに本酵素反応および反応生成物について詳細な検討を行った。

第 1 章 α -アルブチンおよびアルブチンのヒトチロシナーゼに対する阻害効果、並びに酵素合成したアルブチン配糖体との阻害効果の比較

HMV-II ヒトメラノーマ細胞から調製したチロシナーゼに対する α -アルブチンとアルブチンの阻害作用を比較した。 α -アルブチンはアルブチンよりも強力にヒトチロシナーゼを阻害した。ヒトチロシナーゼ阻害における α -アルブチンの IC_{50} 値は 2 mM であったが、アルブチンは 30 mM 以上であった。これ以前に複数の研究グループが α -アルブチンのマッシュルームチロシナーゼに対する阻害作用はアルブチンと同等あるいはそれ以下であると報告しており、今回の結果はそれらと大きく異なるものであった。マッシュルームチロシナーゼは市販で非常に入手しやすい酵素であるので、これまで一次スクリーニングを行ううえで有用であると考えられてきた。しかし、上記の結果より美白成分のスクリーニングにはヒトのチロシナーゼを用いることが非常に重要であることが示唆された。サイクロデキストリン合成酵素を用いてアルブチンの配糖化を試みたところ、反応に供したアルブチンの約 70% が配糖化されることが明らかとなった。反応液からアルブチン- α -グルコシドとアルブチン- α -マルトシドを単離し、ヒトチロシナーゼに対する阻害効果について確認した。これら配糖化物はともにアルブチンよりもヒトチロシナーゼを強力に阻害することがわかり、ハイドロキノン配糖体のヒトチロシナーゼに対する阻害作用にはグルコシド結合の様式の違いが強く影響することが示唆された。

第 2 章 α -アルブチン配糖体の酵素合成およびヒトチロシナーゼに対する阻害効果

α -アルブチンを受容体分子、可溶性デンプンを糖供与体分子とし、サイクロデキストリン合成酵素の糖転移反応による α -アルブチン配糖体の酵素合成を試みた。 α -アルブチンもアルブチンと同様に 70% 以上が配糖化され、非常によい受容体分子であることがわかった。反応液から 2 種の配糖体、 α -アルブチン- α -グルコシドと α -アルブチン- α -マルトシドを精製、単離した。得られた配糖体の阻害効果はともに α -アルブチンよりも弱く、アルブチンよりも強力であった。ハイドロキノン配糖体の構造と阻害作用の関連性を推測するため、密度汎関数法 (DFT) によるエネルギー計算を試みた。DFT プログラムの一つである Dmol³ を用いたエネルギー計算により、それぞれの化合物の最適化構造および静電ポテンシャルを求めた。その結果、ハイドロキノン配糖体のヒトチロシナーゼに対する阻害効果には分子サイズおよび糖鎖部分の結合のしかたに影響されるベンゼン環周辺の静電環境が強く影響している可能性が示唆された。

第 3 章 α -アルブチンのヒトメラノーマ細胞および正常ヒト皮膚 3 次元モデルにおけるメラニン生成抑制効果

α -アルブチンの美白効果について検討するため、HMV-II 培養ヒトメラノーマ細胞のメラニン生成に対する α -アルブチンの効果について調べた。 α -アルブチンは細胞増殖に影響を与えない濃度で、HMV-II 細胞のメラニン生成を抑制した。同じ濃度域におい

て α -アルブチンは細胞内チロシナーゼ活性を濃度依存的に抑制したが、チロシナーゼ mRNA の発現には影響は与えなかった。

より皮膚に近い状態で α -アルブチンの効果を確認するために、メラノサイトとケラチノサイトから構成され表皮を再現した培養ヒト皮膚 3 次元モデルに対する α -アルブチンの作用について調べた。 α -アルブチンは細胞の成育には影響を与えない濃度で、皮膚モデルのメラニン生成を濃度依存的に抑制した。また皮膚モデル実験において皮膚モデル上皮側表面に投与された α -アルブチンの約 70% が 48 時間培養後の培地中から検出された。この際、培地からハイドロキノン検出されなかったことから、 α -アルブチンのメラニン生成抑制効果は α -アルブチンの分解により遊離したハイドロキノンによるものではなく α -アルブチン自身によるものであると判断した。以上の結果から α -アルブチンは安全かつ有効な美白素材となりうることが示唆された。

第 4 章 スクロースホスホリラーゼによるカルボキシル化合物への新規糖転移反応

カルボキシル基に糖転移を行う酵素の開発を目的にスクリーニングを行った。その結果 sucrose phosphorylase が目的にかなう酵素であると考えられた。

糖供与体としてスクロース、受容体として安息香酸を用いて、起源の異なる sucrose phosphorylase による糖転移反応を試みた。*Streptococcus mutans* 由来 sucrose phosphorylase は安息香酸への配糖化反応を酸性条件下で強く触媒した。*Leuconostoc mesenteroides* 由来 sucrose phosphorylase もまた配糖化能は弱いものの安息香酸への配糖化反応を触媒することがわかった。

S. mutans 由来 sucrose phosphorylase による安息香酸配糖化反応を詳細に調べるために、反応液から経時的にサンプリングを行い、生成物の HPLC 分析を行った。反応液からは配糖体と思われる 3 種類の生成物が確認され、反応開始 48 時間後には安息香酸からの変換率は約 70% に達した。反応生成物及びアセチル化物の各種スペクトル解析から、3 種類の生成物の構造を 1-*O*-benzoyl α -D-glucopyranoside、2-*O*-benzoyl α -D-glucopyranose、2-*O*-benzoyl β -D-glucopyranose であると決定した。精製した 1-*O*-benzoyl α -D-glucopyranoside は水溶液中で非酵素的に 2-*O*-benzoyl α -D-glucopyranose、2-*O*-benzoyl β -D-glucopyranose に変化することがわかった。上記の結果より、sucrose phosphorylase の配糖化反応による生成物として、1-*O*-benzoyl α -D-glucopyranoside が生成した後、分子内アシル基転位により 2-*O*-benzoyl α -D-glucopyranose、2-*O*-benzoyl β -D-glucopyranose が生成するものと考えられる。

本酵素は安息香酸だけでなく酢酸をはじめとする短鎖脂肪酸、ヒドロキシ酸、ジカルボン酸といった種々のカルボキシル化合物を配糖化することができ、幅広い受容体特異性を有していることが明らかとなった。

総括

本研究では α -アルブチンが各種ハイドロキノン配糖体のなかで最も強力なヒトチロシナーゼに対する阻害効果を有していること、また、細胞の生育に影響を与えない濃度でヒトメラノーマ細胞やヒト皮膚 3 次元モデルでのメラニン生成を抑制することを明らかにした。さらに本研究では配糖化により分子内の静電的な環境を変化させ、生理活性物質の活性を変えることができる可能性を見出した。

また、本研究では **sucrose phosphorylase** がカルボキシル化合物へのグルコース転移反応を触媒することを明らかにするとともに、酵素反応生成物の分子内アシル基転位により 2 次生成物が生じることを明らかにした。特に *S. mutans* 由来 **sucrose phosphorylase** は酸性領域での反応性により本酵素反応に適しているとともに幅広い受容体特異性を有していることから、産業的な応用を考えるうえで有用性の高い酵素であることが示唆された。

審査結果の要旨

天然の生理活性物質の中には強いにおいや刺激を持つものや、水溶性や安定性に乏しいものが多く存在し、食品や化粧品に利用するときそのような性質を改良することが非常に重要である。水酸基を有する化合物では、配糖化はそのための有力な方法の一つであり、化合物の溶解性、安定性、吸収性および味質などが改善されることが知られている。本研究では、ヒドロキノンにグルコースが α -結合した配糖体、**4-hydroxyphenyl α -D-glucopyranoside** (α -アルブチン) の美白素材としての応用開発研究を目的に行われたものであり、さらに、カルボキシル基を有する化合物への糖質関連酵素による糖転移反応による新たな性質改良法についても検討された。

α -アルブチンおよび **4-hydroxyphenyl β -D-glucopyranoside** (アルブチン) のヒトチロシナーゼに対する阻害効果: ヒト由来のチロシナーゼに対する α -アルブチンとアルブチンの阻害作用を比較した結果、 α -アルブチンの IC_{50} 値は **2 mM** であったがアルブチンは **30 mM** 以上であった。これは、 α -アルブチンのマッシュルームチロシナーゼに対する阻害作用はアルブチンと同等かあるいはそれ以下であるという報告と大きく異なるものであった。このことから、美白成分のスクリーニングにはヒトチロシナーゼを用いることが非常に重要であることが示唆された。

アルブチンおよび α -アルブチン配糖体の酵素合成およびヒトチロシナーゼに対する阻害効果: アルブチンおよび α -アルブチンを受容体分子、可溶性デンプンを糖供与体とし、サイクロデキストリン合成酵素の糖転移反応による配糖体の酵素合成を試みたところ、両者とも反応に供したアルブチンの約 **70%** あるいはそれ以上が配糖化された。反応液からそれぞれ、アルブチン- α -グルコシドとアルブチン- α -マルトシド、 α -アルブチン- α -グルコシドと α -アルブチン- α -マルトシドを単離した。2 種のアルブチン配糖体はアルブチンよりヒトチロシナーゼを強力に阻害した。一方、2 種の α -アルブチン配糖体の阻害効果はともに α -アルブチンよりも弱く、アルブチンよりも強力であった。ヒドロキノン配糖体の構造と阻害作用の関連性を推測するため、密度汎関数法 (DFT) によるエネルギー計算により、それぞれの化合物の最適化構造および静電ポテンシャルを求めた。その結果、ヒドロキノン配糖体のヒトチロシナーゼに対する阻害効果には分子サイズおよび糖鎖部分の結合のしかたに影響されるベンゼン環周辺の静電環境が強く影響している可能性が示唆さ

れた。

α -アルブチンのヒトメラノーマ細胞および正常ヒト皮膚三次元モデルにおけるメラニン生成抑制効果： α -アルブチンの美白効果について検討するため、HMV-II 培養ヒトメラノーマ細胞のメラニン生成に対する α -アルブチンの効果について調べた結果、 α -アルブチンは細胞増殖に影響を与えない濃度で、HMV-II 細胞のメラニン生成を抑制した。より皮膚に近い状態で α -アルブチンの効果を確認するために、表皮を再現した培養ヒト皮膚三次元モデルに対する α -アルブチンの作用について調べた。 α -アルブチンは細胞の生育には影響を与えない濃度で、皮膚モデルのメラニン生成を濃度依存的に抑制した。このメラニン生成抑制効果は α -アルブチンの分解により遊離したヒドロキノンによるものではなく α -アルブチン自身によるものであり、以上の結果から α -アルブチンは安全かつ有効な美白素材となりうることを示唆された。

スクロースホスホリラーゼによるカルボキシル化合物への新規糖転移反応：カルボキシル基に糖転移を行う酵素の開発を目的にスクリーニングを行った結果、*Streptococcus mutans* のスクロースホスホリラーゼがスクロースを糖供与体として安息香酸へ糖転移することを見いだした。反応液からは配糖体と思われる3種類の生成物が確認され、それらの構造を 1-*O*-benzoyl α -D-glucopyranoside, 2-*O*-benzoyl α -D-glucopyranose, 2-*O*-benzoyl β -D-glucopyranose であると決定した。その後の解析により、まず 1-*O*-benzoyl α -D-glucopyranoside が酵素的に合成された後、分子内アシル基転位反応により 2-*O*-benzoyl α -D-glucopyranose, 2-*O*-benzoyl β -D-glucopyranose が生成するものと考えられた。本酵素は安息香酸だけでなく酢酸をはじめとする短鎖脂肪酸、ヒドロキシ酸、ジカルボン酸といった種々のカルボキシル化合物を配糖化することができ、幅広い受容体特異性を有していることが明らかとなった。

以上のように、 α -アルブチンおよびアルブチンの配糖体はより有効な美白素材となる可能性が示され、かつ美白効果をもつ化合物をスクリーニングする際にはヒトチロシナーゼに対する阻害効果を指標とすることが重要であることが示唆された。また、カルボキシル基へのグルコース転移を行う酵素を初めて見いだした。

以上の成果は、応用微生物学、天然物化学、酵素化学の分野だけでなく、生理活性物質の新たな改良法の可能性といった応用分野に大きく貢献するものであり、本論文の審査ならびに学力確認の結果とあわせて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。