

学 位 論 文 題 名

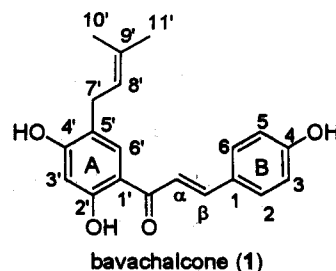
ヒドロキシカルコン類の抗酸化活性に関する研究

学位論文内容の要旨

本研究はより効果の高い天然由来抗酸化活性物質の探索および応用研究を目指したものであり、内容は大きく三部からなる。まず第一に、新しいリード化合物となりうる活性物質を見出す目的で、酸化ストレス条件化で生育している海浜植物に着目し、ハマハタザオ根から DPPH ラジカル消去活性物質を探索し、bavachalcone (1) を単離、同定した。

第二に、ヒドロキシカルコン (1) がラジカル消去活性物質として単離されたことから、6 種のヒドロキシおよびメトキシカルコン (2-7) を合成し、アセトンおよびメタノール中における DPPH ラジカル消去活性の構造活性相関および反応機構の解明を行った。

第三に、ヒドロキシカルコン類はチロシナーゼ阻害活性を有することがすでに知られていることから、2-7 に加えて新たに 9 種のヒドロキシカルコン (8-16) を合成し、ヒドロキシカルコン類の構造とチロシナーゼ阻害活性の関係について検討を加えた。以下にその結果を要約する。



(1) ヒドロキシカルコン類のラジカル消去反応

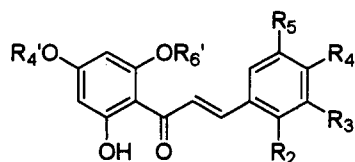
6 種のヒドロキシカルコン (2-7) を対応するアセトフェノンとベンズアルデヒドをアルカリ条件化で縮合させることによって合成し、アセトンおよびメタノール中における DPPH ラジカル消去反応機構の解明を行った。化合物 2 は 2'-ヒドロキシ-4',6'-ジメトキシ化された A 環と 3,4-ジヒドロキシ化された B 環からなり、3 は 2 の 2',4',6'-トリヒドロキシ体、4, 5 はそれぞれ 2, 3 に対応する 2,3-ジヒドロキシ体、6, 7 はそれぞれ 3,4,5-トリヒドロキシ体に相当する。DPPH ラジカル消去当量 (アセトン中、メタノール中) は、2 (2.1、5.8)、3 (3.8、4.0)、4 (1.8、4.8)、5 (3.0、3.9)、6 (4.4、5.6)、7 (4.6、5.1) であった。興味深いことに、4',6'-ジメトキシ体 2, 4 はそれぞれ対応するヒドロキシ体である 3, 5 と比較してアセトン中での活性は低かったが、メタノール中では逆に高くなるという逆転現象が起こった。一方で、B 環にピロガロール型構造を持った 6, 7 の活性の差は小さく、両溶媒とも同程度の活性を示した。DPPH ラジカルとの反応を経時的に ^1H NMR を用いて分析した結果、アセトン中では 2 はキノン体を生成し、徐々に分子内閉環によってオーロンへと変化するのに対し、3 はキノン体から急速に閉環してオーロンおよびフラバノンを生成することがわかった。この

反応性の差は2では分子内水素結合の切断によるコンホメーションの変化が閉環反応には必要であるためと示唆された。メタノール中では2, 3ともに多数の解析不能なシグナルパターンとなり、複雑な反応が進行していることが示唆された。このことより、2のメタノール中のラジカル消去当量が飛躍的に増大するのは溶媒和によって分子内水素結合が弱まっているためと説明できた。化合物4, 5の活性が対応する2, 3よりも低いのはキノンへの酸化速度が遅いためであること、6, 7は没食子酸など他のピロガロール類と同様複雑な酸化物へ変化していることも明らかとなった。

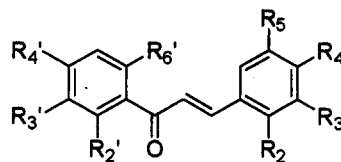
(2) ヒドロキシカルコン類のチロシナーゼ阻害活性

ヒドロキシカルコンの構造とチロシナーゼ阻害活性についてはすでにいくつかの報告があり、B環ヒドロキシ基の置換位置の重要性が示されている。本研究ではA環について着目し、2-7に加えて各種ヒドロキシあるいはメトキシ体(8-16)を調製して活性を比較した結果、8 ($IC_{50} = 120 \mu M$)が活性を示したのに対し9および10が活性を示さなかったことから阻害活性には2',4',6'-トリヒドロキシ構造が重要であることがわかった。化合物3は2',4',6'-トリヒドロキシ構造をもちながら阻害活性を示さなかったが、これは3がB環に3,4-ジヒドロキシ構造をもち、基質類似構造をとっているため、チロシナーゼの基質として機能したためと考えられた。化合物15 ($IC_{50} = 5 \mu M$)はこれまでに報告されているカルコン類の中で最も活性の高いものであるが、15にさらに2',4',6'-トリヒドロキシA環構造をあわせもたせた14 (2,2',4,4',6'-pentahydroxychalcone, $IC_{50} = 1 \mu M$)は15よりもさらに5倍活性が上昇した。また、14の6'位をメトキシに変換した16 ($IC_{50} = 3.1 \mu M$)も14よりはやや低いものの15よりも高い活性を示した。

供試ヒドロキシカルコンの中で最も強い阻害活性を示した14についてL-チロシンを基質としたチロシナーゼ阻害活性の阻害様式を求めた。Lineweaver-Burkプロットより、14の阻害様式は拮抗阻害、阻害定数 (K_i)は $3.1 \mu M$ であった。



- 2: $R_2, R_5 = H, R_3, R_4 = OH, R_4', R_6' = Me$
 3: $R_2, R_4', R_5, R_6' = H, R_3, R_4 = OH$
 4: $R_4, R_5 = H, R_2, R_3 = OH, R_4', R_6' = Me$
 5: $R_4, R_4', R_5, R_6' = H, R_2, R_3 = OH$
 6: $R_2 = H, R_3, R_4, R_5 = OH, R_4', R_6' = Me$
 7: $R_2, R_4', R_6' = H, R_3, R_4, R_5 = OH$



- 8: $R_2, R_3, R_3', R_4, R_5 = H, R_2', R_4', R_6' = OH$
 9: $R_2, R_3, R_3', R_4, R_5, R_6' = H, R_2', R_4' = OH$
 10: $R_2, R_3, R_3', R_4, R_4', R_5 = H, R_2', R_6' = OH$
 11: $R_2, R_2', R_5, R_6' = H, R_3, R_3', R_4, R_4' = OH$
 12: $R_2, R_3', R_4', R_5, R_6' = H, R_2', R_3, R_4 = OH$
 13: $R_2, R_3', R_5 = H, R_2', R_4', R_6' = OH, R_3, R_4 = OMe$
 14: $R_3, R_3', R_5 = H, R_2, R_2', R_4, R_4', R_6' = OH$
 15: $R_3, R_3', R_5, R_6' = H, R_2, R_2', R_4, R_4' = OH$
 16: $R_3, R_3', R_5 = H, R_2, R_2', R_4, R_4' = OH, R_6' = OMe$

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 端 潤
副 査 教 授 鍋 田 憲 助
副 査 教 授 原 博
副 査 助 教 授 橋 床 泰 之

学 位 論 文 題 名

ヒドロキシカルコン類の抗酸化活性に関する研究

本研究はより効果の高い天然由来抗酸化活性物質の探索および応用研究を目指しヒドロキシカルコン類の抗酸化活性について検討を加えたものである。

酸化ストレス条件化で生育している海浜植物ハマハタザオ根から DPPH ラジカル消去活性物質として、bavachalcone (1)を単離、同定した。ヒドロキシカルコン (1)がラジカル消去活性物質として単離されたことから、6種のヒドロキシカルコン (2-7)を対応するアセトフェノンとベンズアルデヒドをアルカリ条件化で縮合させることによって合成し、アセトンおよびメタノール中における DPPH ラジカル消去反応機構の解明を行った。化合物 2 は 2'-ヒドロキシ-4',6'-ジメトキシ化された A 環と 3,4-ジヒドロキシ化された B 環からなり、3 は 2 の 2',4',6'-トリヒドロキシ体、4, 5 はそれぞれ 2, 3 に対応する 2,3-ジヒドロキシ体、6, 7 はそれぞれ 3,4,5-トリヒドロキシ体に相当する。DPPH ラジカル消去当量 (アセトン中、メタノール中)は、2 (2.1、5.8)、3 (3.8、4.0)、4 (1.8、4.8)、5 (3.0、3.9)、6 (4.4、5.6)、7 (4.6、5.1)であった。興味深いことに、4',6'-ジメトキシ体 2, 4 はそれぞれ対応するヒドロキシ体である 3, 5 と比較してアセトン中での活性は低かったが、メタノール中では逆に高くなるという逆転現象が起こった。一方で、B 環にピロガロール型構造を持った 6, 7 の活性の差は小さく、両溶媒とも同程度の活性を示した。DPPH ラジカルとの反応を経時的に $^1\text{H NMR}$ を用いて分析した結果、アセトン中では 2 はキノン体を生成し、徐々に分子内閉環によってオーロンへと変化するのに対し、3 はキノン体から急速に閉環してオーロンおよびフラバノンを生成することがわかった。この反応性の差は 2 では分子内水素結合の切断によるコンホメーションの変化が閉環反応には必要であるためと示唆された。メタノール中では 2, 3 とともに多数の解析不能なシグナルパターンとなり、複雑な反応が進行していることが示唆された。このことより、2 のメタノール中のラジカル消去当量が飛躍的に増大するのは溶媒和によって分子内水素結合が弱まっているためと説明できた。化合物 4, 5 の活性が対応する 2, 3 よりも低いのはキノンへの酸化速度が遅いためであること、6, 7 は没食子酸など他のピロガロール類と同様複雑な酸化物へ変化していることも明らかとなった。

次に、ヒドロキシカルコン類がチロシナーゼ阻害活性を有することがすでに知られていることから、2-7に加えて新たに9種のヒドロキシカルコン (8-16)を合成し、ヒドロキシカルコン類の構造とチロシナーゼ阻害活性の関係について検討を加えた。その結果、2',4',6'-トリヒドロキシ体 8 ($IC_{50} = 120 \mu M$)が活性を示したのに対しジヒドロキシ体 9 および 10 が活性を示さなかったことから阻害活性には2',4',6'-トリヒドロキシ構造が重要であることがわかった。化合物 3 は2',4',6'-トリヒドロキシ構造をもちながら阻害活性を示さなかったが、これは3がB環に3,4-ジヒドロキシ構造をもち、基質類似構造をとっているため、チロシナーゼの基質として機能したためと考えられた。化合物 15 (2,2',4,4'-tetrahydroxychalcone, $IC_{50} = 5 \mu M$)はこれまでに報告されているカルコン類の中で最も活性の高いものであるが、15にさらに2',4',6'-トリヒドロキシA環構造をあわせてもたせた 14 (2,2',4,4',6'-pentahydroxychalcone, $IC_{50} = 1 \mu M$)は15よりもさらに5倍活性が上昇した。また、14の6'位をメトキシに変換した 16 ($IC_{50} = 3.1 \mu M$)も14よりはやや低いものの15よりも高い活性を示した。供試ヒドロキシカルコンの中で最も強い阻害活性を示した 14 についてL-チロシンを基質としたチロシナーゼ阻害活性の阻害様式を求めた。Lineweaver-Burk プロットより、14の阻害様式は拮抗阻害、阻害定数 (K_i)は $3.1 \mu M$ であった。

以上のように、本研究はヒドロキシカルコン類縁体のラジカル消去反応機構解明とチロシナーゼ阻害反応の構造活性相関研究によって、植物フラボノイド類の中では研究の進んでいない天然カルコンの抗酸化反応メカニズムに新たな光をあてるものであり、今後の機能性食品、美白化粧品デザインの科学的根拠をなす重要なものであると認められた。

よって審査員一同は、西田 純が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。