

氏 名 (本国籍)	山内 恒生 (岐阜県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 6 4 1 号
学位授与年月日	平成 2 7 年 3 月 1 3 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Mechanism of Controlling Melanin Biosynthesis by the Constituents of Tropical Medicinal Plants (熱帯産薬用植物成分のメラニン生合成制御機構に関する研究)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 鈴木 徹 副査 岐阜大学 教授 光 永 徹 副査 静岡大学 教授 河 合 真 吾

論 文 の 内 容 の 要 旨

メラニンとは毛髪や皮膚などに存在する色素であり、紫外線によるダメージから皮膚などを守るはたらきがある。しかしメラニン生合成が老化やストレスなどにより過剰になることによりしみやそばかすの原因となり、逆にメラニンが欠乏することで白髪や色素欠乏症といった美容や健康上のトラブルとなる。このため体内におけるメラニン量を適切に保つことが美容や健康を保つ上で強く望まれている。そこで本研究はメラニン生成を制御する化合物を熱帯産植物から探索し、活性成分の構造解析とメラニン生合成の制御機構の解明を目的とした。

用いた薬用植物は、スクリーニングにより顕著な細胞内メラニン生成促進活性を示した *Helminthostachys zeylanica* である。この植物の根の 50%エタノール水抽出物を一連のカラムクロマトグラフィーにより分画し、4'-O-β-D-glucopyranosyl-quercetin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside (1) と 4'-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl-quercetin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside (2) を単離した。B16 メラノーマ細胞を用いた細胞試験の結果、化合物 1 は細胞内メラニン生成促進活性を示したが、化合物 2 は構造が類似しているにもかかわらず活性を示さなかった。この結果から quercetin に結合する置換基が quercetin 誘導体のメラニン生成促進活性に関与していると考え、様々な quercetin 誘導体の合成を行い、構造活性相関の調査を行った。Rutin を出発物質として合成した 19 種の quercetin 誘導体のうち化合物 1 や quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (3), quercetin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside (4) に細胞内メラニン生成

促進活性が認められた。しかしこれらの合成物は細胞外メラニンの増加には関与しなかった。一方 3-O-methylquercetin (12) や 3, 4', 7-O-trimethylquercetin (15) は低細胞毒性で細胞内外共にメラニン生成を促進した。

次に化合物 12 と 15 の作用機序を解明するためにメラニン合成の律速反応を触媒する tyrosinase の活性や発現に与える影響を調査した。その結果化合物 12 と 15 は tyrosinase 活性を促進しなかったが細胞内の tyrosinase 発現量を濃度依存的に増加した。さらに化合物 15 は p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) のリン酸化と tyrosinase の転写因子である microphthalmia-associated transcription factor (MITF) の発現を促進することで tyrosinase の発現を促進することが明らかとなった。一方化合物 12 は MITF や p-p38MAPK を増加せずにメラニン合成酵素の発現を促進した。このため化合物 12 は未知の転写因子を介して、あるいはメラニン合成酵素の分解に関与することでメラニン合成酵素量を増加したと考察した。

メラニンはメラノソーム内で合成され、その後微小管輸送とアクチン輸送を経て細胞膜方向に特異的に輸送される。メラノサイトは樹状突起を伸長しメラノソームをケラチノサイトや毛母細胞に輸送することで、皮膚や毛髪の色素沈着が生じる。メラノソームのアクチン輸送では、メラノソーム表面に存在する Rab27A を介してモータータンパク質であるミオシン Va と結合し輸送複合体を形成する。EPI64 は Rab27A を不活性化してメラノソーム表面から排除し、メラノソームの輸送を制御している。化合物 12 と 15 が細胞外のメラニン量を増加したことから、メラノソーム輸送に影響していると考え、本化合物で処理した B16 メラノーマ細胞内の EPI64 の発現量をウェスタンブロット法で測定した。その結果、化合物 12 と 15 は EPI64 の発現を濃度依存的に阻害した。さらに化合物 12 や 15 で処理した細胞は Rab27A とメラノソームの共局在が免疫蛍光染色顕微鏡検査により確認された。このためメラノソーム上に存在し活性化した Rab27A が、本化合物で処理することで細胞中に多く存在することが示された。以上の結果から化合物 12 や 15 がメラニン合成酵素量を増加し、さらには EPI64 の発現を阻害することでメラノソームのアクチン輸送を促進し細胞外メラニン量が増加したと結論付けた。

審査結果の要旨

メラニンは毛髪や皮膚などに存在する色素であり、紫外線によるダメージから皮膚などを守るはたらきがある。しかしメラニン生合成が老化やストレスなどにより過剰になることによりしみやそばかすの原因となり、逆にメラニンが欠乏することで白髪や色素欠乏症といった美容や健康上のトラブルとなる。このため体内におけるメラニン量を適切に保つことが美容や健康を保つ上で強く望まれている。そこで本学位論文申請者の山内恒生氏は、メラニン生成を制御する化合物を熱帯産植物から探索し、活性成分の構造解析とメラニン生合成の制御機構の解明を目的として学位論文研究を実施した。

山内恒生氏は、スクリーニング試験により顕著な細胞内メラニン生成促進活性を示した *Helminthostachys zeylanica* の根抽出物に着目した。50%エタノール水抽出物を一連のカラムクロマトグラフィーにより分画し、4'-O-β-D-glucopyranosyl-quercetin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside (1) と 4'-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-

glucopyranosyl-quercetin-3-O-β-D- glucopyranosyl-(1→4)-β-D- glucopyranoside (2)を単離した。それらの B16 メラノーマ細胞を用いた細胞試験の結果、化合物 1 は細胞内メラニン生成促進活性を示したが、化合物 2 は構造が類似しているにもかかわらず活性を示さなかった。この結果から quercetin に結合する置換基が quercetin 誘導体のメラニン生成促進活性に関与していると考え、様々な quercetin 誘導体の合成を行い、構造活性相関の調査に至った。19 種の quercetin 誘導体のうち化合物 1 や quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (3), quercetin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside (4)に細胞内メラニン生成促進活性を認めた。一方 3-O-methylquercetin (12) や 3, 4', 7-O-trimethylquercetin (15)は低細胞毒性で細胞内外共にメラニン生成を促進した。

次に化合物 12 と 15 の作用機序を解明する事を目的とし、tyrosinase の活性や発現に与える影響を調査した。その結果両化合物は tyrosinase 活性を示さず、細胞内の tyrosinase 発現量を濃度依存的に増加した。さらに化合物 15 は p38 のリン酸化と tyrosinase の転写因子である MITF の発現を促進することで tyrosinase の発現を促進することを明らかにした。一方化合物 12 は MITF や p-p38MAPK を増加せずにメラニン合成酵素の発現を促進したことから、化合物 12 はメラニン合成酵素の分解に関与すると考察した。

メラニンはメラノソーム内で合成され、その後微小管輸送とアクチン輸送を経て細胞膜方向に特異的に輸送される。メラノサイトは樹状突起を伸長しメラノソームをケラチノサイトや毛母細胞に輸送することで、皮膚や毛髪の色素沈着が生じる。メラノソームのアクチン輸送では、メラノソーム表面に存在する Rab27A を介してモータータンパク質であるミオシン Va と結合し輸送複合体を形成する。EPI64 は Rab27A を不活性化してメラノソーム表面から排除し、メラノソームの輸送を制御している。化合物 12 と 15 が細胞外のメラニン量を増加したことから、メラノソーム輸送に影響していると考え、本化合物で処理した B16 メラノーマ細胞内の EPI64 の発現量をウェスタンブロット法で測定した。その結果、化合物 12 と 15 は EPI64 の発現を濃度依存的に阻害した。さらに化合物 12 や 15 で処理した細胞は Rab27A とメラノソームの共局在が免疫蛍光染色顕微鏡検査により確認された。このためメラノソーム上に存在し活性化した Rab27A が、本化合物で処理することで細胞中に多く存在することが示された。以上の結果から化合物 12 や 15 がメラニン合成酵素量を増加し、さらには EPI64 の発現を阻害することでメラノソームのアクチン輸送を促進し細胞外メラニン量が増加したと結論付けた。

以上述べた山内恒生氏の学位論文発表内容および審査会での質疑応答への対応などを審議した結果、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. K. Yamauchi, T. Mitsunaga, I. Batubara "Novel quercetin glucosides from *Helminthostachys zeylanica* root and acceleratory activity of melanin biosynthesis "journal of natural medicines, 67,369-374, 2013.
2. K. Yamauchi, T. Mitsunaga, I. Batubara "Synthesis of quercetin glycosides and their melanogenesis stimulatory activity in B16 melanoma cells" Bioorganic & Medicinal Chemistry, 22, 937-944, 2014,

3. K. Yamauchi, T. Mitsunaga, M. Inagaki, T. Suzuki "Synthesized quercetin derivatives stimulate melanogenesis in B16 melanoma cells by influencing the expression of melanin biosynthesis proteins MITF and p38 MAPK" *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22, 3331-3340, 2014.
4. K. Yamauchi, T. Mitsunaga, M. Inagaki, T. Suzuki "Quercetin derivatives regulate melanosome transportation *via* EPI64 inhibition and elongate the cell shape of B16 melanoma cells" *Biomedicine & Pharmacotherapy*, in press