

イソプレン側鎖を有する植物成分の *ex vivo* 有機合成とその生理活性の評価

宇都義浩^{1*}, 小山大輔², 大友直紀², 安部千秋², 白井 齊², 中田栄司¹, 堀 均¹

Design, *ex vivo* Synthesis, and Biological Activities of Plant Constituents

Containing an Isoprene Side-chain Based on Isoprenomics

by

Yoshihiro UTO, Daisuke KOYAMA, Naoki OTOMO, Chiaki ABE, Tadashi SHIRAI,
Eiji NAKATA, Hitoshi HORI

Phytyl quinols, namely acyclic tocopherols, are key intermediates of tocopherol biosynthesis, but their biological activities remain unclear. We therefore investigated the structure-activity relationship of phytyl quinols to apply a chemical biosynthesis design for an antiatherosclerosis drug based on isoprenomics. We have achieved the biosynthesis-oriented synthesis of α - and β -phytyl quinol as an unnatural intermediate, other γ - and δ -phytyl quinol as a natural one. All four phytyl quinols showed almost the same moderate inhibitory activity against low-density lipoprotein oxidation instead of their different degree of C-methylation with character different from tocopherols. *In vivo* toxicities of phytyl quinols against chick embryo chorioallantoic membrane vasculature were hardly observed. We proposed phytyl quinols were possible antioxidants in plants and animals, like vitamin E.

Key words: Antioxidant, Acyclic tocopherol, Antiatherosclerosis drug, phytyl quinol,
Chick embryo chorioallantoic membrane, Isoprenomics

1 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部
Division of Bioinformatics Engineering,
Department of Life System,
Institute of Technology and Science,
Graduate School of The University of Tokushima
2 徳島大学大学院先端技術科学教育部
Graduate School of Advanced Technology and Science,
The University of Tokushima
*連絡先: 〒770-8506 徳島市南常三島町 2-1
徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

1. まえがき

イソプレン側鎖を有する植物成分は、テルペノイド、フェニルプロパノイド、キノン類、ピロン類、フラボノイドやその他多くの芳香族化合物において数多く単離・同定されているが、イソプレン側鎖と生理活性の関係についてはほとんど未知である。そこで我々は、“イソプレノミクス”(植物及び動物で生合成されるプレニル芳香族化合物を探索して生物活性を調べ、合成に関わる

DNA やタンパクを同定して chemotype を明らかにし、それによって得られた知見を医薬品開発に応用する研究)を提唱し⁽¹⁾⁻⁽²⁾, イソプレノミクスを基盤としてイソプレノ側鎖を有する植物成分及びその誘導体の分子設計・合成と生物活性について詳細な解析を行っている。本プロジェクト研究の目的は、植物及びそれらを原料とする健康食品からイソプレノ側鎖を有する新規分子を探索し、それらの *ex vivo* 有機合成を行い、その生物活性を調べて構造活性相関 (SAR) を明らかにすることである。本研究目的達成のために、今回、ビタミン E を構成する主成分の一つであるトコフェロールに着目した。トコフェロールの生合成経路を Fig. 1 に示す。ホモゲンチジン酸がフィチル化を受けて鍵前駆体 2-メチル-6-フィチルヒドロキノン(フィ

チル化キノール)が生成し、これがトコフェロール環化酵素により環化し、トコフェロールが、次いで S-アデノシルメチオニン (SAM) によりモノメチル化され、トコフェロールが合成される。また、2-メチル-6-フィチルヒドロキノンは SAM によるモノメチル化後、環化することでトコフェロールが、次いで SAM によりモノメチル化され、トコフェロールが合成される⁽³⁾。しかしながら、環化する前に高度のメチル化を受けたフィチル化キノール類は植物中に存在するのか、また、それらの分子はどのような生物活性を示すのかについては全く不明であり大変興味深い。そこで我々は、メチル化数の異なるフィチル化キノールの *ex vivo* 有機合成を行い、低比重リポタンパク質 (LDL) に対する抗酸化活性との相関について調べた。

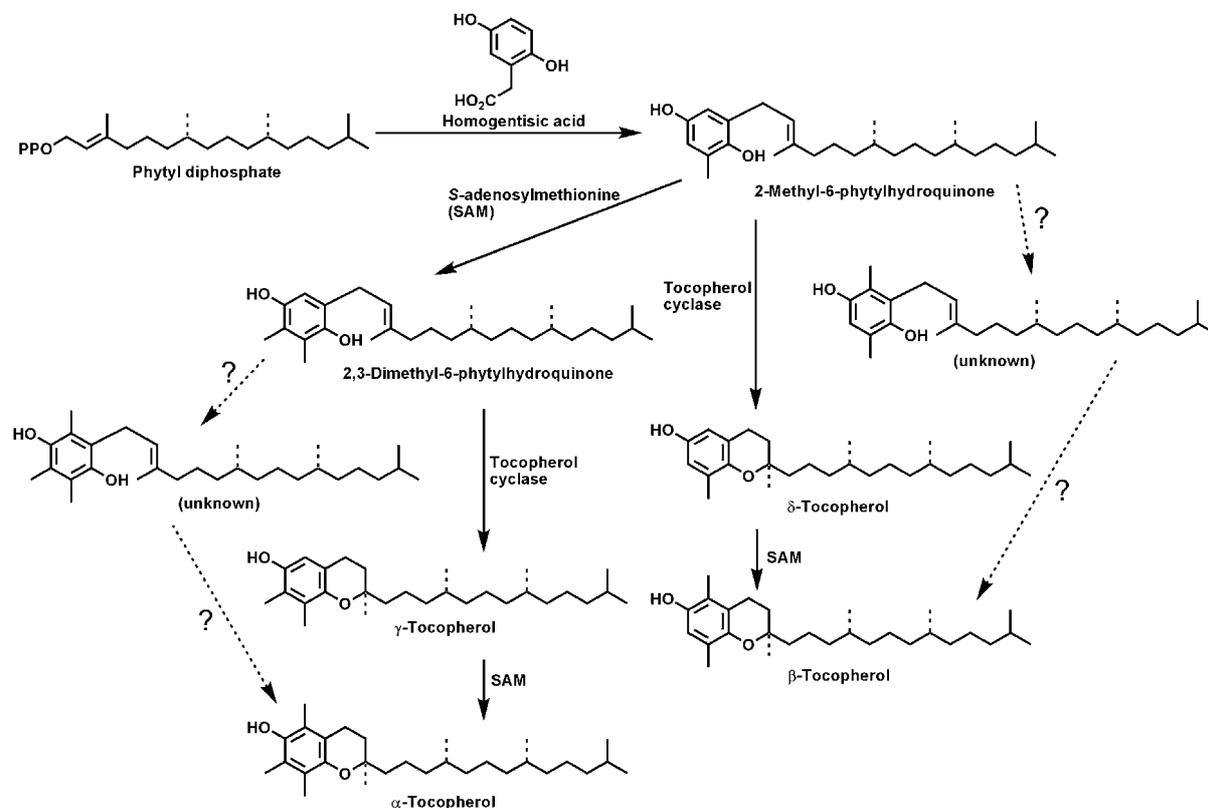


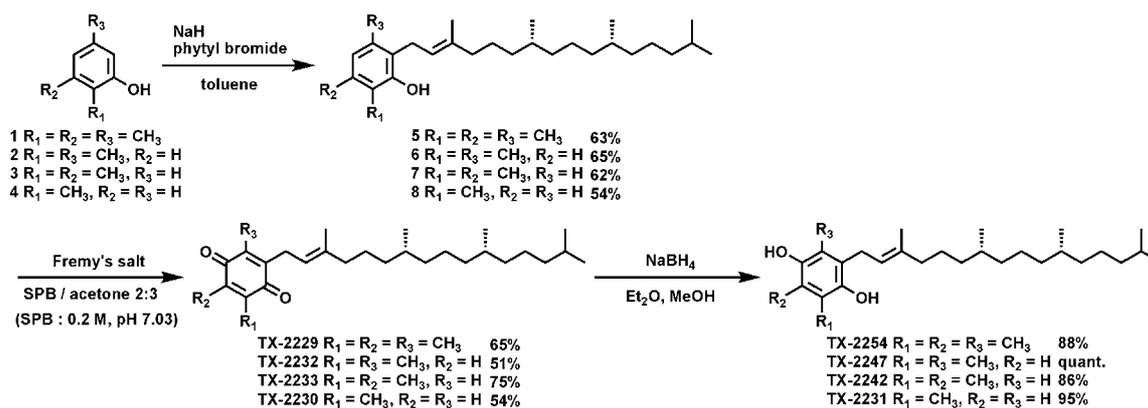
Fig. 1. Biosynthesis of tocopherols.

2. 結果と考察

2.1 フィチル化キノールの *ex vivo* 有機合成

4つのフィチル化キノール及びフィチル化キノンの合成スキームを Scheme 1 に示す。対応するメチル置換フェノール (1-4) を出発原料としてトルエン中で水素化ナトリウムを用いてフィチル化 (5-8) し、次いでフレーミー塩を用いてキノン体 (型: TX-2229, 型: TX-2232,

型: TX-2233, 型: TX-2230) へと酸化した後、水素化ホウ素ナトリウムを用いてヒドロキノン体 (型: TX-2254, 型: TX-2247, 型: TX-2242, 型: TX-2231) へと還元した。目的物であるフィチル化キノール(ヒドロキノン体)の総収率は 28-40%であった。また、ヒドロキノン体は酸化に弱く、酸素存在下では比較的速やかにキノン体へと変換されることが観察された。



Scheme 1. Synthesis of phytyl quinols and phytyl quinones.

2.2 フィチル化キノールの構造最適化と分子軌道

分子設計・合成した α -型フィチル化キノール(TX-2254)及び本生成経路における最終産物である d - α -トコフェロールの構造最適化と分子軌道エネルギーについて非経験的分子軌道計算(GAUSSIAN 03, 6-31G, RHF)を行った。その結果を Fig. 2 に示す。TX-2254 の安定構造は、ベンジル位の水素とベンゼン環水素との立体障害によりヒ

ドロキノン環とフィチル基が直交した構造をとることが示され、 d - α -トコフェロールのようなほぼ直線構造とは異なることが示唆された。しかしながら、両分子の最高被占軌道(HOMO)及び最低空軌道(LUMO)のエネルギー値に差は見られなかった。以上の結果から、両分子の生体膜に対する親和性が異なることが予想される。

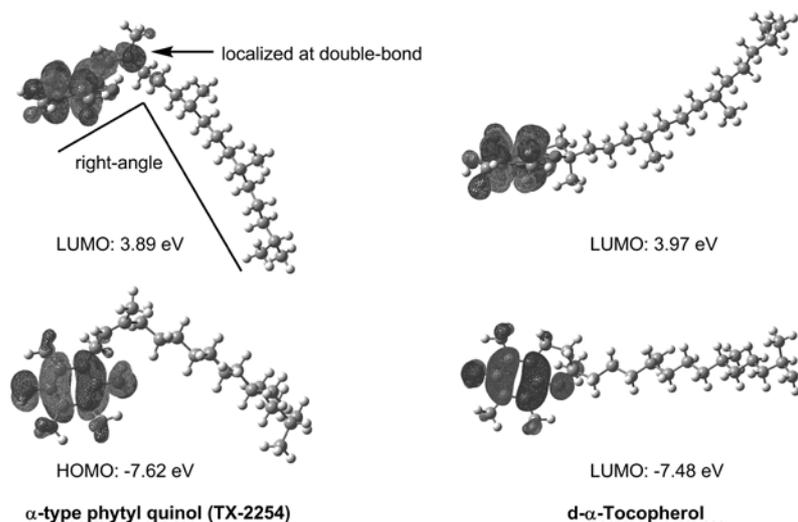


Fig. 2. Optimized geometry and HOMO and LUMO energies of TX-2254 (left) and d - α -tocopherol (right).

2.3 フィチル化キノールのラジカル反応性

合成したフィチル化キノールの抗酸化活性を評価するために、人工ラジカルであるジフェニルピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカルに対する反応性を検討した⁽⁴⁾。50%のDPPHラジカルと反応してラジカルを消去する化合物濃度である EC_{50} 値を Table 1 に示す。ビタミン E の中で最も抗酸化活性の強い成分の一つである d - α -トコフェロールの EC_{50} 値 ($21.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$) と比較すると、 α -型の TX-2231 のみ同程度のラジカル反応性 ($20.9 \pm 3.1 \mu\text{M}$) を示し、メ

チル置換数の増加に伴いラジカル反応性が減少する傾向を示した(TX-2242: $24.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$ > TX-2247: $26.5 \pm 3.4 \mu\text{M}$ > TX-2254: $27.9 \pm 0.9 \mu\text{M}$)。一方、フィチル化キノン体はほとんどラジカル反応性を示さなかった ($EC_{50} > 200 \mu\text{M}$)。これは、ラジカル反応に必要な引き抜かれやすい水素が存在しないためである。以上の結果より、天然型だけでなく非天然型のフィチル化キノールもトコフェロール類と同程度のラジカル反応性を示し、その度合いはヒドロキノン骨格のメチル基の置換数と反比例することが示唆された。

2.4 フィチル化キノールの LDL 抗酸化活性

低比重リポタンパク質 (LDL) は血液中の主要なコレステロール輸送タンパク質であり, LDL の酸化修飾はアテローム性動脈硬化症の要因の一つとして提唱されている⁽⁵⁾⁻⁽⁶⁾. よって, LDL の酸化を防御する抗酸化物質は有望な抗動脈硬化剤となる可能性を有する. そこで, ヒト血清から単離した LDL に対するフィチル化キノールの抗酸化活性を評価した. 評価方法は LDL の初期酸化によって生じる共役ジエン生成阻害活性 (Lag time)⁽⁷⁾と, LDL 脂質の過酸化に伴って生成するチオバルピツール酸反応物 (TBARS) 法⁽⁸⁾により行った. その結果を Table 1 に示す. 共役ジエン生成阻害活性 (Lag time) は, 値 (min) が大きいほど強い抗酸化活性を有することを表しており, α -トコフェロールが最も強い LDL 抗酸化活性を有することが示された (Lag time = 100.8 min; TBARS IC₅₀ = 66.5 ± 13.1

μM). フィチル化キノール類を比較すると, 型の TX-2254 が最も強い阻害活性 (84.4 min) を示し, メチル置換数の減少に伴い阻害活性が減少する傾向を示した (TX-2247: 82.6 min > TX-2242: 81.5 min > TX-2231: 77.2 min). この傾向は DPPH ラジカルに対する反応性とは全く逆であり大変興味深い理由が不明である. 一つの可能性として, メチル置換数の増加による分子の脂溶性の増加, すなわち LDL 脂質との親和性の向上によるものが考えられる. また, TBARS 法においては, 型の TX-2231 が最も高い活性であり, DPPH ラジカル反応性と一致した結果を示したが, メチル置換数との相関はなく 型の TX-2242 のみ低い活性を示した (TX-2254: 115.8 ± 5.8 μM = TX-2247: 111.9 ± 2.3 μM > TX-2242: 148.0 ± 10.1 μM). 一方, フィチル化キノール体は DPPH ラジカル反応性の結果と同じ理由により両評価法において全く活性を示さなかった.

Table 1. Antioxidative property of phytyl quinols and phytyl quinones.

Antioxidant	DPPH EC ₅₀ (μM)	LDL lag time (min)	LDL TBARS IC ₅₀ (μM)
TX-2254	27.9 ± 0.9	84.4	115.8 ± 5.8
TX-2247	26.5 ± 3.4	82.6	111.9 ± 2.3
TX-2242	24.3 ± 0.4	81.5	148.0 ± 10.1
TX-2231	20.9 ± 3.1	77.2	97.0 ± 3.4
TX-2229	> 200	58.2	> 1000
TX-2232	> 200	59.8	> 1000
TX-2233	> 200	50.2	> 1000
TX-2230	> 200	44.8	> 1000
dl- α -tocopherol	21.4 ± 0.9	100.8	66.5 ± 13.1

2.5 フィチル化キノールの *in vivo* 毒性

一般的に, 抗酸化剤, 特に天然抗酸化剤は全く無毒であると盲目的に信じられているが, これは非常に危険な考えである. しかしながら, 多くの抗酸化剤研究において *in vivo* 毒性の評価はほとんど行われていない. その理由として, 現在最も広く用いられている実験動物であるラットやマウスは高価であり, 実験手法が煩雑なため高度な技術を要し, また特別な実験施設を必要とするために限られた研究グループだけが利用するためであると考えられる. それに対し, 我々は, 発育鶏卵を用いた次世代 *in vivo* 実験モデルの構築を試みている. 発育鶏卵とは, 孵卵状態の受精鶏卵であり, 温度と湿度のみのコントロールだけで餌や排泄物等の世話が不要であり, 閉鎖系かつジェネティック制御下で成長するため個体差が小さく, 逃亡や暴れる危険性が皆無いため特別な動物実験施設が不要であり, ラット・

マウスに比べて 10 分の 1 以下と非常に安価である, という多くの利点を有している. よって, 多くの候補薬剤をスクリーニングするのに最適な *in vivo* 実験モデルとなる可能性を秘めている. そこで, 今回, フィチル化キノールの *in vivo* 毒性を評価する目的で, 発育鶏卵の血管に対する障害性を調べた. その結果を Fig. 3 に示す. 図中の写真は, 10 μg の TX-2247 を鶏卵漿尿膜の血管に投与した際, 血管障害性が見られなかった場合 (A) と見られた場合 (B) を示している. 1 化合物に対し 10 個の鶏卵を用いて血管障害性を測定し数値化した結果を棒グラフで示しており, 0.1 ~ 10 μg の範囲において α -トコフェロールとすべてのフィチル化キノールにおいて血管障害性はほとんど観察されなかった. また, 実験に用いた鶏卵はすべて生存していた. この結果から, フィチル化キノールの発育鶏卵に対する毒性はほとんどないことが示された.

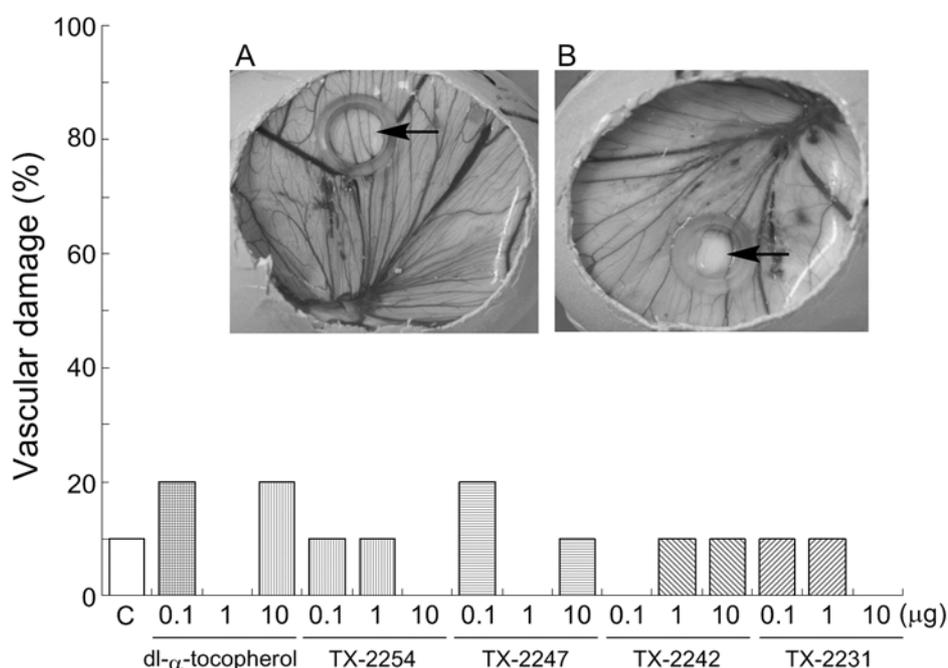


Fig. 3. In vivo toxicity of phytyl quinols and dl-α-tocopherol in the chick CAM vasculature. These photograph (A, B) shows CAM vasculature without damage (A) or with damage (B) when 10 μg of TX-2247 was treated.

本研究の成果をまとめると、天然型及び非天然型のフィチル化キノールがトコフェロール類(ビタミンE)と同様に植物や動物において低毒性かつ強い抗酸化剤として作用する可能性が示された。今後は、発育鶏卵を用いて抗動脈硬化症に対する *in vivo* 活性を評価する予定である。

3. おわりに

本研究は、平成18年度大学院ソシオテクノサイエンス研究部研究プロジェクトによる研究結果の一部をまとめたものです。研究助成を賜りました関係各位に深く感謝の意を表します。また、本研究の成果は、第18回ビタミンE研究会、International Society on Oxygen Transport to Tissue 2007 (ISOTT2007)、International Conference on Food Factors for Health Promotion 2007 (ICoFF2007)にて既に発表しており、特に ICoFF2007 における発表内容に対しては研究奨励賞を受賞致しました。本研究に御協力頂きました皆様の方々にこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Y. Uto, S. Ae, A. Hotta, J. Terao, H. Nagasawa, and H. Hori, *Adv. Exp. Med. Biol.* 578, 113 (2006).
- 2) Y. Uto, S. Ae, D. Koyama, M. Sakakibara, N. Otomo, M. Otsuki, H. Nagasawa, K. L. Kirk, and H. Hori, *Bioorg. Med. Chem.* 14, 5721 (2006).

- 3) A. Stocker, H. Fretz, H. Frick, A. Ruttimann, and W. D. Woggon, *Bioorg. Med. Chem.* 4, 1129 (1996).
- 4) M. S. Blois, *Nature* 181, 1199 (1958).
- 5) D. Steinberg, *Adv. Exp. Med. Biol.* 369, 39 (1995).
- 6) J. L. Witztum, and D. Steinberg, *J. Clin. Invest.* 88, 1785 (1991).
- 7) W. A. Pryor, and L. Castel, *Methods Enzymol.* 105, 293 (1984).
- 8) K. Yagi, *Methods Mol. Biol.* 108, 101 (1998).