

学位申請論文

チロシナーゼ活性制御化合物の
構造的特性と制御機構の解明

平成30年3月

ヒノキ新薬グループ
株式会社 肌粧品科学開放研究所
生化学室(在東京理科大学 薬学部 田沼研究室)

大山 貴央

目次

目次.....	0
略語表.....	4
第1章 序論.....	5
1.1. 皮膚の色調と美容	5
1.2. 皮膚の色調を決定する要因.....	7
1.3. チロシナーゼ.....	11
1.4. チロシナーゼの立体構造	17
1.5. チロシナーゼ活性を調節する薬剤.....	19
1.5.1. チロシナーゼ阻害剤の応用範囲.....	19
1.5.2. チロシナーゼ活性化剤	21
1.5.3. チロシナーゼ活性制御の課題点.....	23
1.6. 本研究の概観.....	25
第2章 フェニル安息香酸誘導体のチロシナーゼ阻害作用.....	26
2.1 背景	26
2.2. 実験材料・試薬・方法	27
2.2.1. 材料.....	27
2.2.2. チロシナーゼ活性の測定.....	27
2.2.3. コンピュータを用いた阻害様式の予測.....	27
2.3. 実験結果.....	28
2.3.1. PBA 異性体のマッシュルームチロシナーゼに対する阻害活性.....	28
2.3.2. <i>in silico</i> ドッキングシミュレーションによる PBA 異性体とマッシュルームチロシナーゼとの結合モデルの作成及び結合様式の評価.....	31
2.3.3. 3-PBA エチルエステルのマッシュルームチロシナーゼ阻害作用.....	34
2.3.4. PBA 異性体の 4'-位の水酸基修飾型誘導体のマッシュルームチロシナーゼ阻害活性.....	35
2.3.5. <i>in silico</i> ドッキングシミュレーションによる 4-PBA 誘導体(化合物 6、9)のマッシュルームチロシナーゼとの結合モデル及び結合様式と阻害能の評価	37
2.4. 考察	39
第3章 チロシナーゼ阻害剤の作用メカニズムに関する理論的考察	42
3.1 背景	42
3.2. 実験・及び調査の理論的背景	43
3.2.1. コウジ酸の IC ₅₀ の横断的調査及び阻害能の比較のための指標の確立	43

3.2.2.	チロシナーゼに対する阻害様式の決定	44
3.3.	実験材料・試薬・方法	46
3.3.1.	材料.....	46
3.3.2.	チロシナーゼ阻害活性の測定及び阻害様式の決定.....	46
3.3.3.	<i>in silico</i> ドッキングスタディ	46
3.4.	実験結果及び考察	47
3.4.1.	コウジ酸のチロシナーゼ阻害活性評価.....	47
3.4.2.	その他の阻害剤の阻害活性評価に対する応用	52
3.4.3.	各阻害剤のモノフェノラーゼ及びジフェノラーゼ活性に対する阻害能の強さ の比較	56
3.4.4.	Index と見かけの阻害様式の関係.....	57
3.4.5.	代表的な阻害剤の <i>in silico</i> ドッキングシミュレーションによる各フォームへの 結合時の自由エネルギー評価.....	63
3.5.	本節の結論	65
第 4 章	チロシナーゼ活性化作用物質の骨格研究.....	66
4.1	背景・目的	66
4.2.	実験材料・試薬・方法	66
4.2.1.	材料.....	66
4.2.2.	チロシナーゼ活性の測定.....	66
4.2.3.	コンピュータを用いた阻害様式の予測.....	66
4.3.	実験結果	67
4.3.1.	活性化剤候補化合物の選定	67
4.3.2.	化合物 5 誘導体のチロシナーゼ阻害及び活性化作用.....	67
4.3.3.	<i>in silico</i> ドッキングシミュレーションによる活性化モデルの構築.....	72
4.3.4.	化合物 5-2 のマッシュルームチロシナーゼによる代謝反応	75
4.4.	考察	79
第 5 章	ヒトチロシナーゼ活性の阻害に重要な活性中心の構造に関する研究.....	85
5.1.	背景	85
5.2.	実験材料・試薬・方法	89
5.2.1.	材料.....	89
5.2.2.	<i>in vitro</i> ヒトリコンビナントチロシナーゼアッセイ	89
5.2.3.	メラノソーム抽出及び <i>in vitro</i> (melanosome 系)チロシナーゼアッセイ	89
5.2.4.	ヒトチロシナーゼのホモロジーモデリング	90
5.2.5.	ヒトチロシナーゼに対する各阻害剤の結合モード予測	90
5.2.6.	化合物の ClogP 計算	91
5.3.	実験結果	92

5.3.1. 市販のリコンビナントヒトチロシナーゼによる各種阻害候補化合物の評価...	92
5.3.2. ヒトメラノーマ細胞由来メラノソーム抽出系を用いた PBA 異性体のチロシナーゼ阻害活性評価	94
5.3.3. ヒトチロシナーゼのホモロジーモデリング	97
5.3.4. 安息香酸誘導体及びツヤプリシン類とヒトチロシナーゼとのドッキングフォーム.....	99
5.4. 考察	102
第 6 章 総括	106
付録.....	109
A1 美白剤としてのチロシナーゼ阻害剤の例	109
A2 酵素反応速度論	113
A2.1. 酵素反応速度論の基礎.....	113
A2.2. 阻害剤の反応機構解析.....	114
A2.3. チロシナーゼの酵素反応速度論	116
A3 メラノソームが存在することの確認.....	117
謝辞.....	119
参考文献	120

略語表

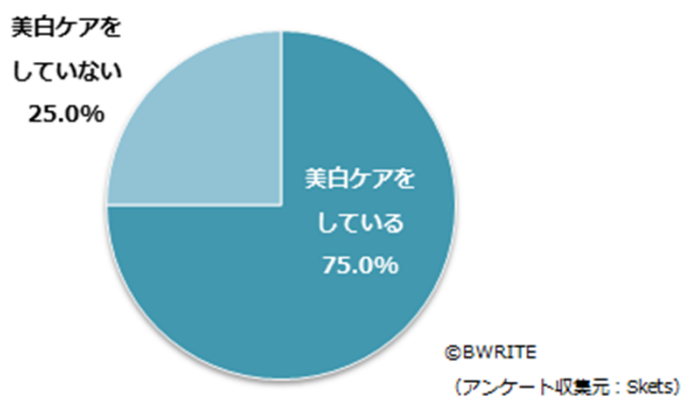
aBCA	alpha-Bromocinnamaldehyde	KA	Kojic acid
AbTYR	<i>Agaricus bisporus</i> tyrosinase	Km	Michaelis constant
aCCA	alpha-Chlorocinnamaldehyde	MBTH	3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone
AM1	Austin model 1	Me	Methyl
aMCA	alpha-Methylcinnamaldehyde	MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
BA	Benzoic acid	MOPAC	Molecular Orbital PACkage
D	L-DOPA (L-3,4- dihydroxyphenylalanine)	NBUVB	Narrow-band ultraviolet B
DC	Dopachrome	PBA	Phenybenzoic acid
DMSO	Dimethylsulfoxide	PDB	Protein data bank
DOPA	3,4-dihydroxyphenylalanine	PKC	Protein kinase C
DQ	L-Dopaquinone	S	Substrate
E	Enzyme	ScTYR	<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i> tyrosinase
EE	Ethyl ester	T	L-Tyrosine
ES	Enzyme-substrate complex	THI	Tyrosine hydroxylase isoform I
ESI	Enzyme-substrate-inhibitor complex	THSG	Tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D- glucoside
ESR	Electron spin resonance	Tyr	Tyrosinase
EU	Enzyme unit	Tyrp	Tyrosinase related protein
HQ	Hydroquinone	Vmax	Maximum velocity
hTYR	Human tyrosinase		
I	Inhibitor		

第1章 序論

1.1. 皮膚の色調と美容

「色の白いは七難隠す」という日本のことわざにもあるとおり、美白は古来より尊いものとして定義されてきた。「美白」という言葉が人口に膾炙したのは、1990年代後半だとされているが、正確な出自を記した文献はない。しかし、美白という行為そのものは、洋の東西を問わず古くから行われてきた。白い肌が美しいという記述は、日本においては「日本書紀」にまでさかのぼることができる。平安時代の「枕草子」でも白粉がとれて舎人の黒い地肌が露出することは、見苦しいと記述されている[1]。西洋においても、4大文明の興ったころから、美白が高貴の象徴として捉えられていた[1,2]。翻って、現代の日本においても、美白は人々の、とりわけ女性たちの関心の対象である。女性向け情報サイト BWRITE (<http://bwrite.biz/archives/8351> 2016年11月8日閲覧)では、20代以上の女性200人に美容に関するアンケートを実施したところ、75%の女性が美白ケアをしていると回答した。しかも、そのうち半数以上が年間を通して美白ケアを行っているという(Figure 1.1.1.)。このように美白は、現代の女性にとって必須のアイテムであり、美容上大きな関心事であるといえる。これまでに数多くの美白剤が探索されてきた。中には分子メカニズムが不明なまま利用されるものもある。特にターゲットとなるチロシナーゼと美白剤の相互作用についての理解は進んでいない。本研究では美白剤の阻害メカニズムのうち、未だ理解の十分でない部分を示し、種々のフェニル安息香酸誘導体を用いてそれについて考察し、明らかにしていくことを目的とした。

A Q3-1:あなたは、「美白ケア（美白・ホワイトニング効果のあるスキンケアの使用）」をしていますか。 (n=200 単一回答)



B Q3-2 最初に、「美白ケア（美白・ホワイトニング効果のあるスキンケアの使用）」をはじめる時期は何月頃ですか？ (n=200 単一回答)

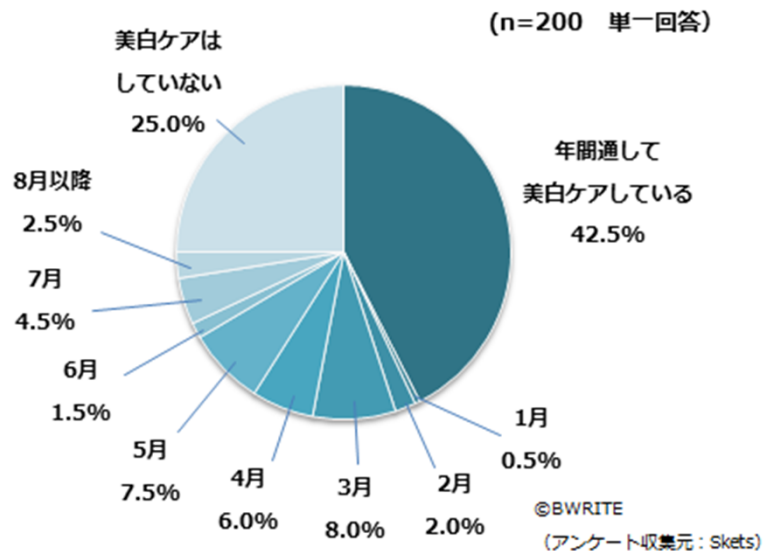


Figure 1.1.1. 20代以上の女性に対する美白に関するアンケート 女性向け情報サイト BWRITE (<http://bwrite.biz/archives/8351> 2016年11月8日閲覧)のまとめた美白に対する意識調査。A 美白ケアを行っているか B 美白ケアを始める時期 に関してそれぞれ20代以上の女性200人に対し調査した結果を円グラフにて示す。

1.2. 皮膚の色調を決定する要因

皮膚のしみやそばかす等、色素の過剰な生成によって引き起こされる症候は、美容的観点から避けては通れない課題であり、多くの化粧品、医薬部外品、医薬品の開発において広く研究されている。その色調の元となっているのがメラニンである。メラニン分子は巨大なバイオポリマーであり、原料はアミノ酸の1種のチロシンである。メラニン生成酵素群の中で着目されているのがチロシナーゼ(EC 1.14.18.1)であり、チロシンがメラニンとなるまでのステップの中で律速となる部分を担っている。チロシナーゼは、近年、化粧品、医薬のみならず、農業、材料科学など様々な分野で注目されているタンパク質である。チロシナーゼは、主に2つの反応を触媒する。1つはL-DOPAのようなオルト(*o*-)ジフェノールを*o*-キノンへと酸化する反応(ジフェノラーゼ活性)であり、もう1つはL-チロシンのようなモノフェノールを*o*-キノンへと酸化する反応(モノフェノラーゼ活性)である(Figure 1.2.1.) [3, 4]。従来、モノフェノールは、一度*o*-ジフェノールに酸化されてから*o*-キノンへと酸化されると考えられていたが、最近の研究では直接*o*-キノンが生成され、後に述べる反応によって*o*-キノンが還元されて溶液中に*o*-ジフェノールが生じているとされている。*o*-キノンは、後に詳しく述べるが、酸化され、重合して巨大なバイオポリマーであるメラニン分子となる。

メラニン分子は、哺乳動物の細胞においてはメラニン産生細胞(メラノサイト)によって合成される。メラノサイトにはメラノソームという特徴的な細胞小器官があり、メラノサイト内で成熟したメラノソームが隣接するケラチノサイトに受け渡され、ケラチノサイト内に蓄積することで皮膚の色調が黒色を呈する。メラノサイトは、発生時に神経堤より分化した細胞であるといわれており、主に表皮や毛包へ分布するが、真皮、心臓、内耳器官への分布も報告されている。しかしながら、表皮以外に分布したメラノサイトの機能や役割についてはほとんど解明されていない[5]。

皮膚は、Figure 1.2.2.A に示すように層状の構造を形成しており、表皮と真皮は基底膜によって隔てられている。表皮は基底膜に接する基底層の細胞が分裂し、分化することで

形成される。その分化の過程で有棘細胞、顆粒細胞となり最終的には脱核してケラチン線維に富む扁平な死細胞となり、約 28 日のサイクルで表面から脱落する(ターンオーバー) [6]。メラノサイトは基底層にあり、基底層のケラチノサイト 30 個に対してメラノサイト 1 個の割合で存在している[5]。メラノサイトで作られたメラニン、メラノソームという特殊な構造体に封入され、周囲の細胞へ受け渡され、表皮のターンオーバーとともに排出される[7]。したがって、ターンオーバーのサイクルが乱れると、メラニンは表皮に蓄積し、皮膚は黒色を呈する。

人種間でのメラノサイトの数は同じであり、皮膚の色の違いはチロシナーゼの活性によるとされている。Fitzpatrick は、1972 年から 1975 年にかけて屋外での太陽光に対するオーストラリア人の肌色の変化や皮膚反応などを調べ、Skin Phototype I ～Ⅲの分類を行った。現在ではそれに加えて、Ⅳ～Ⅵが付されている。肌色が白に近いタイプがⅠであり、黒くなるに従って数字が大きくなる (Table 1.2.1.)[8]。

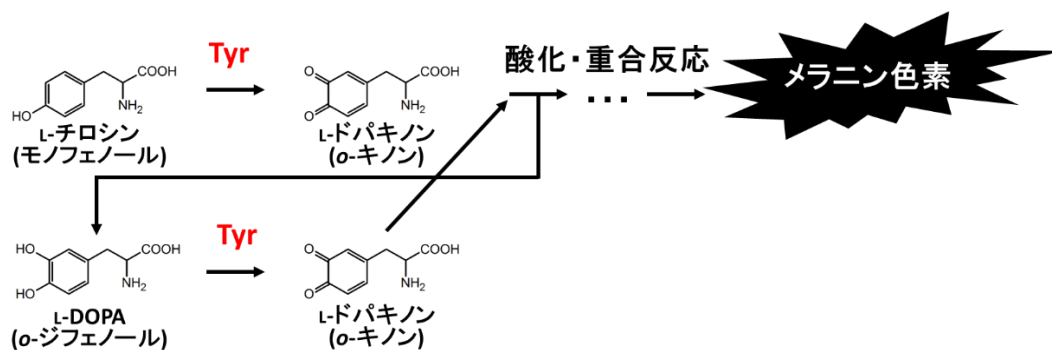


Figure 1.2.1. チロシナーゼの酵素反応の概要 チロシナーゼ(**Tyr**)は L-チロシンなどのモノフェノールを *o*-キノンへと酸化する(モノフェノラーゼ活性)。*o*-キノンは複数の酸化過程及び重合反応を経て、メラニンとなる。また、その過程で L-DOPA などの *o*-ジフェノールが生じるが、*o*-ジフェノールもチロシナーゼによって酸化されて *o*-キノンとなる(ジフェノラーゼ活性)。

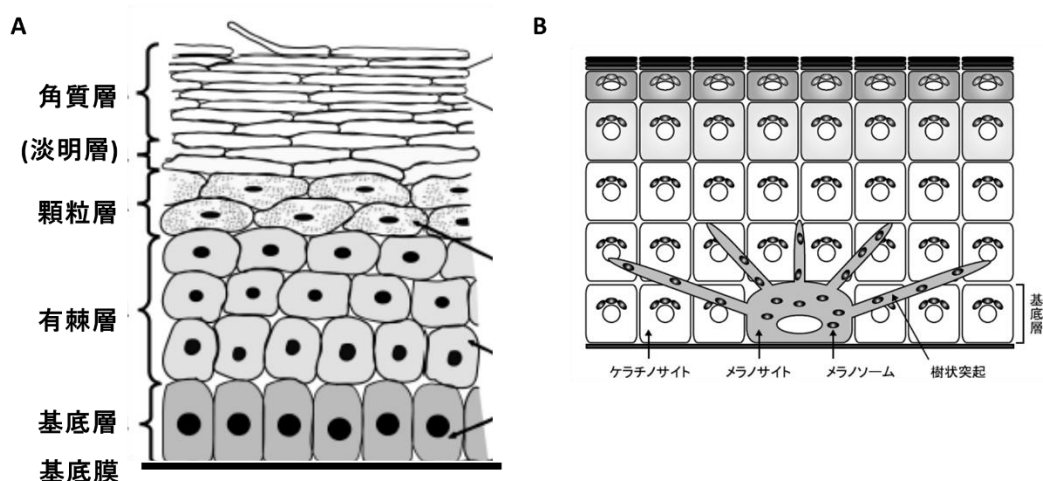


Figure 1.2.2. 表皮の構造 Śniegórska らの図(Postepy Biochem. 2016;62(1):36-45, Ryc. 1) [6]を一部改変。基底層の細胞は分化するに従って、有棘層、顆粒層となりながら、皮膚の外側へおしやられ、やがて脱核して角質層となり剥がれ落ちる。B 石田らの図(顕微鏡 Vol.48 (1) 2013, 図 1) [7]を引用。メラノサイト内で作られたメラノソームは周囲の細胞へメラノソームを輸送する。

Table 1.2.1. Fitzpatrick により分類された Skin Phototypes

Phototype	Sunburn and tanning history	Skin color
I	Burns easily Never tans	Ivory white
II	Burns easily Tans minimally with difficulty	White
III	Burns moderately Tans moderately and uniformly	White
IV	Burns minimally Tans moderately and easily	Beige-olive, lightly tanned
V	Rarely burns Tans profusely	Moderate Brown or tanned
VI	Never burns Tans profusely	Dark brown or black

1.3. チロシナーゼ

チロシナーゼは、自然界に広く存在するタンパク質の1つである。特に、放線菌(*Streptomyces castaneoglobisporus*)、マッシュルーム(*Agaricus bisporus*)のものがよく研究されており、それぞれ結晶構造も報告されている(第1章 1.5.節も参照) [9-11]。化粧品・医療の分野では、ヒト(*Homo sapiens*)のチロシナーゼも研究対象にはなっているが、下等生物のチロシナーゼは溶液中に拡散しているタンパク質であるのに対し、ヒトを含む哺乳動物のチロシナーゼは膜結合型タンパク質である。このことが障害となり、酵素学的な性状解析はほとんどなく、結晶構造も報告されていない。また、食品科学の分野では、リンゴやジャガイモなどのチロシナーゼが研究対象となっている。植物は、メラニン分子を虫害などからの生体防御に使用しているため、果物の収穫後などに傷つくと、褐変がおこる。したがって、この分野では、食品の色を美しく保ったり、品質を高く保ったりすることを主な課題としたチロシナーゼの研究が行われている[12]。

チロシナーゼはヘモシアニン、カテコールオキシダーゼと相同性が高く、これらはいずれも活性中心に銅及び酸素を含んでいる。ヘモシアニンは軟体動物などにおいて血液中にあり、酸素を運搬する。カテコールオキシダーゼは、ジフェノラーゼ活性は持つが、モノフェノラーゼ活性は持たない酸化酵素である。これら3者はその機能ゆえにヘモシアニン、カテコールオキシダーゼ、チロシナーゼの順に進化したとされていたが、近年の進化学的研究では共通の遺伝子を基にするものの、それぞれ独立に進化してきた酵素であると示されている[13]。これら3種の酵素はいずれも活性中心に2つの銅原子を含み、銅タンパク質に位置づけられる。銅タンパク質は、配位している銅イオンの吸収スペクトルやESR(Electron Spin Resonance)スペクトルの違いによって、3つのタイプに分類される。

タイプI銅は、配位しているシステインのSから Cu^{2+} への電荷移動遷移による強い吸収が600 nm付近に見られ、濃い青色を呈する。このことからタイプI銅を含むタンパク質は、ブルー銅タンパク質と呼ばれる。一方で、タイプII銅は、そのような電荷移動吸収帯を

持たず、呈色も弱い。タイプⅠ銅やタイプⅡ銅は常磁性であるが、それとは異なり、3核、すなわち3つの銅イオンを活性中心に持つ酵素において、そのうちの2つは反強磁性的相互作用により ESR 不活性となっている。これらの銅イオンは、タイプⅢ銅と呼ばれる。チロシナーゼ、カテコールオキシダーゼ、ヘモシアニンも2核の銅タンパク質であるが、これらの銅イオンもタイプⅢ銅である[14-16]。

したがって、チロシナーゼを含む3種の銅タンパク質は、タイプⅢ銅タンパク質に分類され、銅を活性中心に保持するための進化的に保存された配列を共通に持つ。この配列はヒスチジンに富み、Figure 1.3.1. A に示すように6つのヒスチジンが2つの銅イオンを保持するために役立っている。タイプⅢ銅イオンの間に保持される酸素は、原理上 side-on 型と end-on 型を形成することが可能である(Figure 1.3.1. B)が、チロシナーゼの場合は side-on 型であることが示されている。この酸素種は、基質であるチロシンのフェノール基の *o*-位を求電子的に攻撃する[14]。

チロシナーゼの活性中心はさらに、酸素の保持の仕方によって3つの状態を取ると考えられている。まずは、酸素を全く保持していない *deoxy* 型酵素、次に、酸素分子を1つ保持している *oxy* 型酵素、そして、水酸化物イオンを1つ保持している *met* 型酵素である(Figure 1.3.2. A)。チロシナーゼの反応サイクルは、これらの3つの状態を行き来する大変複雑なものである[17]。ここでは、*deoxy* 型酵素を出発点として説明する。まず、*deoxy* 型酵素は水溶液中の溶存酸素分子を捕捉して *oxy* 型酵素となる。*oxy* 型酵素は、モノフェノールと反応すると *deoxy* 型酵素を再生し、対応する *o*-キノンを生成する。一方で、*oxy* 型酵素が *o*-ジフェノールと反応すると、*o*-キノンの生成とともに自身は *met* 型酵素となる。この *met* 型酵素は、*oxy* 型酵素よりも *o*-ジフェノールに対する親和性が高いとされており、*o*-ジフェノールと反応して *o*-キノンの生成とともに *deoxy* 型酵素へと戻る。すなわち、モノフェノラーゼ活性(サイクル)では、1サイクルにつき1分子の *o*-キノンを、ジフェノラーゼ活性(サイクル)では、1サイクルにつき2分子の *o*-キノンを生成する (Figure 1.3.2. B) [18-21]。

o-キノンからメラニンのポリマライズにいたるまでは生理的な条件下では自然に進行する。ここでは、L-チロシンを出発物質とした系について説明する。まず、前述のように L-チロシンは、L-ドパキノンとなる。次に、L-ドパキノンは、環を巻いてロイコドパクロムとなる。続いてロイコドパクロムと L-ドパキノンが反応して、ロイコドパクロムはドパクロムに、L-ドパキノンは L-DOPA となる。L-チロシンのみを出発物質とした場合、溶液中の L-DOPA はここで生じる。ドパクロムは複数の過程を経て酸化され、5, 6-ジヒドロキシインドール、インドール-5, 6-キノン、5, 6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸、インドール-2-カルボン酸-5, 6-キノンを生じる(Figure 1.3.3.a)。哺乳類にはチロシナーゼ関連タンパク質 (Tyrosinase related protein 1; Tyrp1, Tyrosinase related protein 2; Tyrp2) などがあり、反応を補助している。これらの生成物が複雑にポリマライズして巨大なバイオポリマー、すなわち、メラニン分子となる。これは黒色をしており、ユーメラニンと呼ばれる。

一方で、反応系にシステインやグルタチオンなどの SH 基を持つ還元性の分子が存在すると、Figure 1.3.3.の b のほうへ反応が進み、最終的に重合したバイオポリマーはフェオメラニンと呼ばれる。フェオメラニンはユーメラニンとは異なり、黄赤色を呈する。

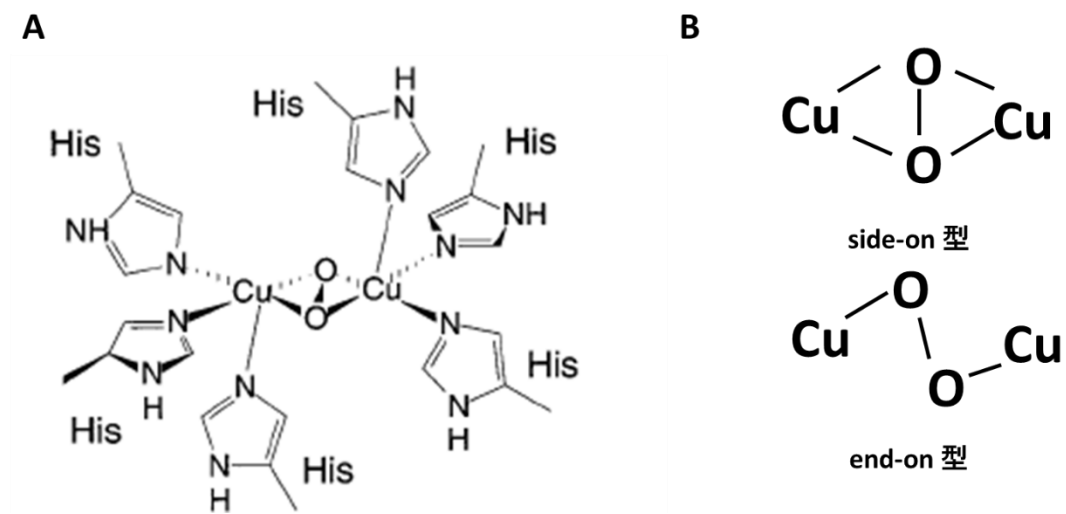
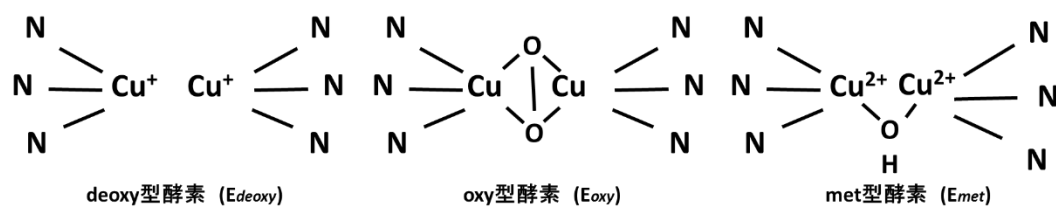


Figure 1.3.1. チロシナーゼの活性中心における酸素の状態 A. Gerdemann ら (Acc. Chem. Res. 2002, 35, 183–191) Figure 3B より抜粋 B タイプⅢ銅酸化酵素の酸素原子がとりうる錯体の様態。

A



B

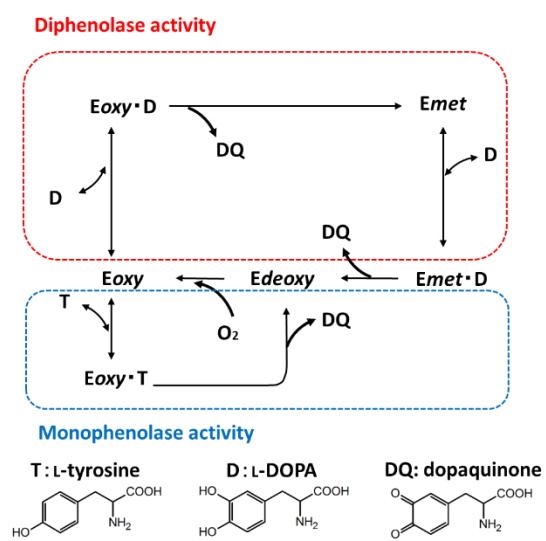


Figure 1.3.2. チロシナーゼの 2 つの活性サイクル A. チロシナーゼの活性中心のとりうる 3 つの状態
N: ヒスチジン残基の N 原子 B. チロシナーゼの 2 つの活性サイクル。T: L-チロシン、D: L-DOPA、DQ: L-
ドパキノン

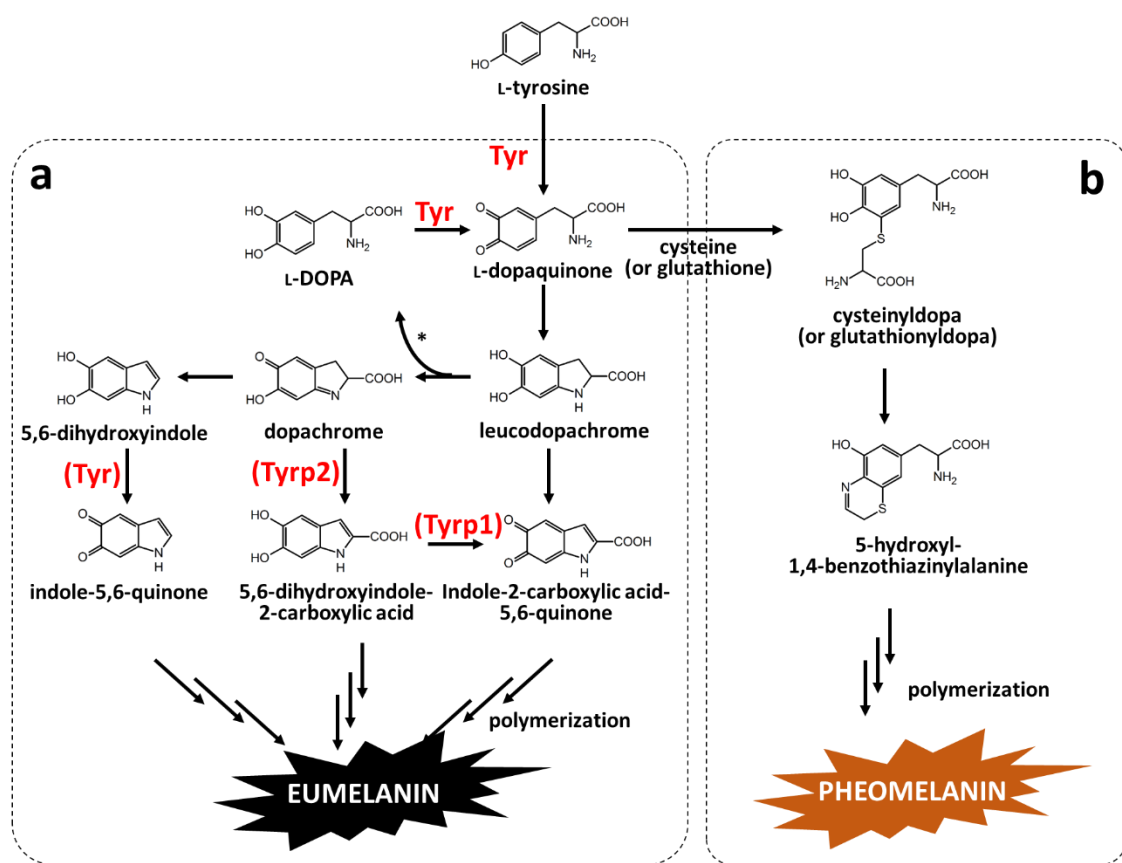


Figure 1.3.3. メラニンの生合成経路 a. ユーメラニン(eumelanin)の生合成経路 b. フェオメラニン(pheomelanin)の生合成経路 **Tyr**: チロシナーゼ、**Tyrp1**: チロシナーゼ関連タンパク質 1、**Tyrp2**: チロシナーゼ関連タンパク質 2 *2 分子の leucodopachrome から dopachrome 及び L-DOPA が生じる

1.4. チロシナーゼの立体構造

今までに報告されているチロシナーゼの X 線結晶回折構造は、以下のものがある。

- (i) *Streptomyces castaneoglobisorus* チロシナーゼ[11]
- (ii) *Bacillus megaterium* チロシナーゼ[22]
- (iii) *Citrobacter freundii* チロシナーゼ[23]
- (iv) *Agaricus bisporus* チロシナーゼ[9, 10]

特に、マッシュルーム(*A. bisporus*; iv)チロシナーゼは広く使われているにも関わらず、X 線結晶構造は 2011 年になるまで報告されなかった。それ以前は、放線菌(*S. castaneoglobisorus*; i)チロシナーゼの構造を基にコンピュータ上でホモロジーモデリングの手法を用いてタンパク質構造を構築するより他はなかった[24]。ヒトチロシナーゼを含む哺乳類のチロシナーゼの結晶構造は、まだ報告されていない。

2011 年に報告されたマッシュルームチロシナーゼの構造は、2Y9W(ネイティブ型)及び 2Y9X(トロポロンとの共結晶)である。これによれば、マッシュルームチロシナーゼは、H サブユニットと L サブユニットが 2 つずつ集まった 4 量体である。銅を含む活性中心は、H サブユニットにある[9]。活性に重要であると考えられるアミノ酸は、①銅を保持するためのアミノ酸 ②基質や阻害剤と相互作用すると考えられるアミノ酸である。①のアミノ酸は 6 つのヒスチジン残基であり、His61、His85、His94 及び His 259、His263、His296 である。そのうち、His85、His259、His263 がポケットの入り口に近い。その他には、His244、Glu256、Phe90、Phe264、Val283、Asn260 が基質を活性中心に呼び込むのに重要であると考えられている。基質以外にも阻害剤との重要なアクセスポイントとして、Arg286、Ser282、Pro284、Val247、Val248 などが考えられているが、いずれもどのような相互作用を行うかということとはほとんど考察されていない(Figure 1.4.1.)[4]。

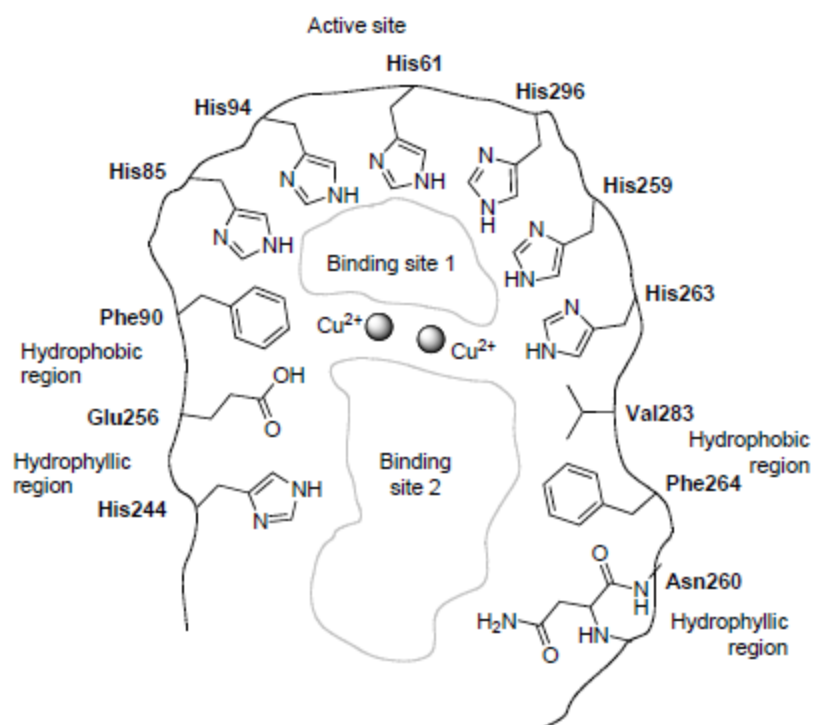


Figure 1.4.1. チロシナーゼの活性中心において重要なアミノ酸 Gunia-Krzyżak らの図(Curr Med Chem. 2016;23(31):3548-3574, Fig. (4)) [4]を引用。

1.5. チロシナーゼ活性を調節する薬剤

1.5.1. チロシナーゼ阻害剤の応用範囲

ヒトのチロシナーゼ活性を制御する目的として、最も重要なのが、化粧品分野における応用である。チロシナーゼを阻害することによって、皮膚の色素沈着を低減することができ、この場合、より安全で強い阻害能を持つ化合物が求められる。他に、チロシナーゼが原因で起こる疾病の治療にも応用可能である。肝斑(melasma)は、比較的頻度の高い色素沈着症状であり、発症頻度は地域や人種にもよるが、9-40%である[25]。治療にはチロシナーゼ阻害剤であるハイドロキノン(付録 A1(a))が用いられる。

農業化学や食品化学の分野では、褐変制御が問題となる。リンゴやマッシュルームでは、その組織が傷つくという刺激によってチロシナーゼ活性が顕在化しメラニンを生成した結果、褐色になる。これは各々の生物の防御機構であると考えられるが、食品製造及び流通業者にとってはこの着色は防止すべきものであり、褐変制御法のひとつとしてチロシナーゼの阻害剤が応用可能である[12]。

チロシナーゼの制御を治療ターゲットとすることに関して論争が続いているものとして、メラノーマ(melanoma)やパーキンソン病(Parkinson's disease)との関係がある。メラノーマは、メラノサイトが異常な増殖性を持つようになった癌であり、最も悪性度の高い癌のうちの1つである。メラノーマは、悪性黒色腫と呼ばれるように黒色を呈するのが特徴であり、メラニン色素の蓄積を伴うのが普通である。しかし、近年、黒色を呈さないメラノーマ(amelanotic melanoma)が報告され、メラニン色素とメラノーマとの因果関係に関して疑問もある。メラノーマとチロシナーゼの関係性に関しては、糖鎖修飾の阻害剤によるメラノーマ細胞の増殖抑制とメラニン量の低下[26, 27]、チロシナーゼ阻害作用を持つフラボノイドによるメラノーマ細胞の増殖抑制[28]などの報告があるが、これらは別のターゲットの抑制による増殖抑制と、メラニン生合成経路の抑制が独立事象であるという可能性を残して、直接的な証拠とはなっていない。近年の統

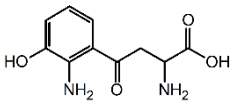
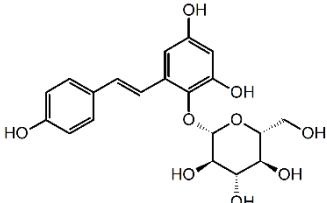
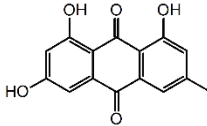
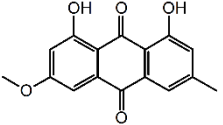
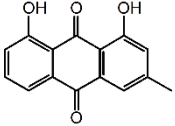
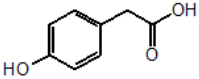
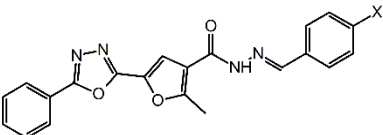
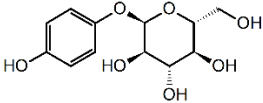
合的なゲノム解析で、チロシナーゼ関連タンパク質のマスターレギュレータである転写因子 **MITF** が、悪性のメラノーマで増加していることが報告された[29]。また、*MITF* のノックダウンにより変動する **miRNA** で、チロシナーゼ関連タンパク質の発現を制御するものが発見された[30]。これらは、チロシナーゼの発現及びメラノーマの黒化が単にメラノサイトが増殖することの結果であることを思わせる。2015 年には、**Sekine** らのグループがチロシナーゼをノックダウンしたマウスメラノーマ細胞を **C57BL/6** マウスに尾静脈注射して生存率を確認しているが、コントロール群と比べ生存率に差は見られなかった[31]。しかしながら、この実験ではチロシナーゼのノックダウンにより転移する臓器の部位が変化しており、チロシナーゼとメラノーマの悪性度についての議論の決着はまだついていない。

1.5.2. チロシナーゼ活性化剤

低分子化合物によるチロシナーゼの活性化がいくらか報告されているが、チロシナーゼ阻害剤とは異なり、活性化剤はあまり着目されていない。通常、反応の活性化メカニズムは、①酵素のリン酸化、切断、などの構造変化 ②アロステリック調節 が考えられるが、現在報告されているチロシナーゼ活性化剤は、総じて基質類似の構造を持っている。Table 1.5.2.に、現在までに報告されている活性化剤をまとめた。ほとんどの活性化作用は、マッシュルームチロシナーゼのジフェノラーゼ活性に対して報告されている。 α -アルブチンや 4-ヒドロキシフェニル酢酸はモノフェノラーゼ活性に対しては阻害効果を示す[32, 33]。3-ヒドロキシキヌレニンはチロシナーゼの基質となるような *o*-アミノフェノールの誘導体の研究から生まれた活性化剤であり、Xie らはそれを Substrate/Activator と呼んでいる[34]。

チロシナーゼ阻害剤が *in silico* 解析などの手法によって、マッシュルームチロシナーゼを阻害するのに重要なアミノ酸に関する知見が提唱されているのに対し(1.4.節も参照)、チロシナーゼ活性化剤にはそのような構造学的な知見はない。また、チロシナーゼ活性化剤は、実験室レベルでは確認されているが、これまでに使用実績はない。

Table 1.4.2. チロシナーゼ活性化剤

Compound		Activation (conc.)	Substrate	Year	Ref.
Structure	Name				
	3-Hydroxy kynurenine	650% (240 μ M)	0.3 mM L-Tyrosine	2003	[34]
	2,3,5,4'- Tetrahydroxysti lbene-2-O- β -D- glucoside (THSG)	126% (70 mg/mL)	0.27 mM L-DOPA	2008	[35]
	Emodin	31% (15 mg/mL)	0.27 mM L-DOPA	2008	[35]
	Physcion	15% (15 mg/mL)	0.27 mM L-DOPA	2008	[35]
	Chrysophanol	10% (15 mg/mL)	0.27 mM L-DOPA	2008	[35]
	4-Hydroxy phenylacetic acid	108% (0.8 mM)	1.0 mM L-DOPA	2009	[33]
	6a (X = H) 6b (X = Cl) 6d (X = NO ₂)	6a: 840 % 6b: 72% 6d: 23.6%	3.90 mM L-DOPA	2013	[36]
	α -Arbutin	65% 2.5 mM	0.5 mM L-DOPA	2014	[32]

1.5.3. チロシナーゼ活性制御の課題点

チロシナーゼ制御性化合物、特にこれまで多く報告されてきた阻害剤について、体系的にまとめることは難しい。なぜなら、チロシナーゼ阻害剤の探索の報告には2つの潮流があるからである。1つは化粧品的なアプローチである。化粧品においては「天然物神話」ともいうべき「合成でない、天然の化合物こそが安全である」という消費者意識があり、美白化粧品に配合するチロシナーゼ阻害剤も天然物のなかから多く探索がなされてきた。これらは、天然物の骨格・構造の範囲では異性体等を評価しているものの、類縁骨格については天然でない場合には評価の対象とならないため、重要な構造をはっきりさせられない側面もある。このことから、本論文で解決したい1つ目の問題は、チロシナーゼの阻害剤として重要な構造はいかなるものであるのか、という問いである。また、活性化作用を持つ化合物に関して、その構造がいかなるものであるのかということは阻害剤以上に判明しておらず、共に解決したい課題である。

2つ目の潮流は有機合成化学の報告論文において、生体分子に対する阻害効果の1つとしてチロシナーゼが選択されることが多いという点である。これらの阻害剤は基本骨格もばらばらで統一的な取り扱いが難しい。本論文で取り組む2つ目の問題は、これらを作用メカニズムという観点から、統一できないかという問いである。例えば、これまでこれらのチロシナーゼ阻害剤は酵素学的な解析として、ラインウェーバー・バークプロットを用いて競合・非競合阻害などの様式が決定されている。そのうちほとんどが非競合阻害様式であるにもかかわらず、酵素のアクティブポケットとの相互作用について述べられているものもあり、分子メカニズムに関して定説がない。

阻害剤評価の際、マッシュルームチロシナーゼは商業的に安価で利用可能であり、評価法としてよく用いられる。しかし、マッシュルームのチロシナーゼとヒトのチロシナーゼの配列相同性は23%程度であり、マッシュルームチロシナーゼで阻害活性を示した化合物が、ヒトでは著効しないという報告もある。これらのことから、ヒトチロシ

ナーゼで活性を示す化合物を探索しなければならないが、1.3.節でも記したように、ヒトチロシナーゼの *in vitro* 活性を測定する系の開発は進んでいない。最近、直接ヒト皮膚3次元モデルやヒト検体での *in vivo* で評価する方法が用いられてきている。しかし、ヒトチロシナーゼの活性中心の構造や酵素反応のメカニズムなどの酵素学的な研究はほとんど行われておらず、未解決のまま残されている。そこで、3つ目の問題点として、ヒトチロシナーゼの活性中心とマッシュルームチロシナーゼの活性中心の構造はどのように異なり、同じ部分は何なのかという点の解明が必要であると考えられる。

1.6. 本研究の概観

1.5節でチロシナーゼ活性を調節する薬剤の適用範囲について紹介した。そして、これまでの研究で残されている問題点を指摘した。阻害剤の構造及びヒトチロシナーゼの活性中心に関する構造的な知見を包括的に理解しなければならない一方で、マッシュルームチロシナーゼの活性中心の構造についてもまだまだ理解が進んでいないことも事実である。本研究ではまず、マッシュルームチロシナーゼの構造について整理する必要があると考えた。

第2章で明らかにするのは、フェニル安息香酸誘導体の *in vitro* マッシュルームチロシナーゼ阻害作用、及びその阻害剤の酵素との相互作用に重要だと考えられるアミノ酸残基である。その相互作用の仕方について、今までに得られている知見と併せて考察をする。

次に、第3章では、これらの阻害剤の2種類の基質に対する効果の差に着目し、今まで考察されてこなかったチロシナーゼの活性中心の3つの状態とチロシナーゼ阻害剤との関わりについて解析する。

第4章では、マッシュルームチロシナーゼの活性を増大させる化合物に関しての考察を、第2章、第3章の考察に基づいてさらに深める。

第5章では、フェニル安息香酸誘導体、及びツヤプリシン類がヒトチロシナーゼに及ぼす効果について検証し、ヒトチロシナーゼとマッシュルームチロシナーゼの違いについてより詳細に検討する。

第6章では、これまでの議論を総括し、チロシナーゼ阻害剤のこれからについて展望する。

第2章 フェニル安息香酸誘導体のチロシナーゼ阻害作用

2.1 背景

チロシナーゼ阻害剤として多くの化合物が報告されているが、その多くは複雑な構造を持つ化合物であり、阻害活性に寄与する構造を同定するのが困難である。特に、チロシナーゼの活性中心に配位する銅イオンのキレート作用を持つ化合物が重要であると考えられるが、明確にそれを示すものは少ない。また、チロシナーゼの活性中心についても重要なアミノ酸の予測は行われているが、その作用メカニズムまで言及している研究は少なく、その詳細は、不明のままである。そこで本研究では、フェニル安息香酸(Phenylbenzoic acid: PBA)異性体を用いて、チロシナーゼ阻害作用物質の探索及び阻害作用を担う重要な構造の解明を目的とした。本研究ではまず、フェニル安息香酸の異性体(Table 2.3.1.)についてチロシナーゼ阻害活性を測定し、マッシュルームチロシナーゼの結晶構造との *in silico* ドッキングスタディを行い、阻害剤の構造及び酵素の阻害反応において重要なアミノ酸の同定を行った。その後、種類の誘導体(Table 2.3.2.)についても同様に検討し、より詳細に構造学的な知見を得た。

2.2. 実験材料・試薬・方法

2.2.1. 材料

マッシュルームチロシナーゼは、Sigma 社より購入した。2500U/mL となるように 50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH = 6.5)で溶解し、試験開始直前まで -80℃ の冷凍庫にて保管した。安息香酸は、和光純薬工業株式会社より購入した。2-PBA (2-phenylbenzoic acid) 及び 4-PBA (4-phenylbenzoic acid) は東京化成工業株式会社より購入した。3-PBA (3-phenylbenzoic acid) 及び 3-PBA-EE (3-phenylbenzoic acid ethyl ester) は、Combi-Blocks 社より購入した。それぞれジメチルスルホキシド(DMSO)に 100 mM で溶解し、適宜希釈して試験に供した。

2.2.2. チロシナーゼ活性の測定

チロシナーゼ活性測定系は、96 穴マイクロタイタープレート上に構築した。各種阻害剤を 2 μ L 各ウェルにアプライし、400 U/mL のマッシュルームチロシナーゼ溶液を 10 μ L、リン酸カリウム緩衝液(pH = 6.5)を 38 μ L 加えた。すぐに 0.1 mM の L-チロシンまたは 0.5 mM の L-DOPA を加え、30℃ でそれぞれ 60 秒ごとまたは 30 秒ごとに 475 nm の吸光度を測定した。

チロシナーゼ活性は、化合物を加えた場合の傾きを A、コントロールウェル(2% DMSO)の傾きを B としたとき比活性(%) = $(A/B) \times 100$ または阻害率(%) = $100 - \text{比活性}(\%)$ として示した。IC₅₀ は、50% 阻害率を示す濃度をグラフから求めた。

2.2.3. コンピュータを用いた阻害様式の予測

PBA 異性体を ChemDraw® Ultra と Chem3D® Ultra で描画し、MOPAC 及び AM1 半経験的ハミルトニアンで最適化した。マッシュルームチロシナーゼの *deoxy* 体の結晶構造を、タンパク質データバンク(PDB)よりダウンロードした(PDB ID: 2Y9X) [37]。2 つの銅イオンの座標は、6 つのヒスチジン残基に対し、放線菌(*Streptomyces*

castaneoglobisporus)チロシナーゼ(PDB ID: 1wx2)を重ね合わせることで得た。*Emet* モデルを得るために、パーオキシドイオンも同様に酸素分子を重ね合わせて一方の酸素原子を取り除いた。ドッキングに使用する *Emet* モデルは、非極性水素原子及び *Gastiger* 原子電荷を付与した。溶媒パラメータは、*Addsol* プログラムを用いて作成した。活性部位のグリッドポイントは、*AutoGrid* を用いて一辺が 40 単位の立方体とした(1 単位=0.375 Å)。*AutoGrid* の中心は、(x, y, z) = (-14.245, -16.367, 21.615)であった。リガンドドッキングは、*AutoDock4.2* の Lamarckian Genetic Algorithm を用いた。おおまかな結合自由エネルギーを empirical 関数に基づいて計算し、既知のタンパク質-リガンド複合体から線形予測を行って決定した。この関数は、ファンデルワールス結合、水素結合、静電引力、リガンドのねじれ、脱溶媒和を含む。ドッキングで表されたエネルギーは、リガンドの持つエネルギー及びリガンドの分子内相互作用によるエネルギーも含む。ドッキングのパラメータは、全てデフォルトのものを使用した。リガンドの回転角は、*AutoTors* プログラムを用いて付与した。シミュレーションは、20 回行った。エネルギーが最小となる結合モードは、*Amber9* を用いて得た。銅イオンのファンデルワールスパラメータは、 $R=1.27 \text{ \AA}$ 、 $E=0.06 \text{ kcal/mol}$ に設定した[38]。1000 ステップの真空の最急降下法を行って、結合モードのエネルギーを最小化した。Harmonic restraint with force constant は、 $100 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$ として銅イオン、パーオキシドイオン、6 つのヒスチジン残基に適用した。

2.3. 実験結果

2.3.1. PBA 異性体のマッシュルームチロシナーゼに対する阻害活性

まず、チロシン水酸化反応に対する PBA 異性体(化合物 1-3)の阻害能について評価した。コントロールとして安息香酸を用いた。その結果、3-PBA(化合物 2)と 4-PBA(化合物 3)が濃度依存的な阻害作用を示し、それぞれ IC_{50} は 6.97、63.24 μM であった。一

方で 2-PBA(化合物 1)は、ほとんど阻害活性を持たなかった(Figure 2.3.1.A)。次に、L-DOPA 酸化活性について評価した。L-DOPA 酸化活性においても、3 つの異性体と安息香酸のうち 3-PBA が最も高い阻害能を示した($IC_{50}=36.32\ \mu M$; Figure 2.3.1.B)。これらの IC_{50} 値については Table 2.3.1.にまとめた。このことから、PBA 異性体に関して、3-PBA が最も強いチロシナーゼ阻害剤であることが判明した。

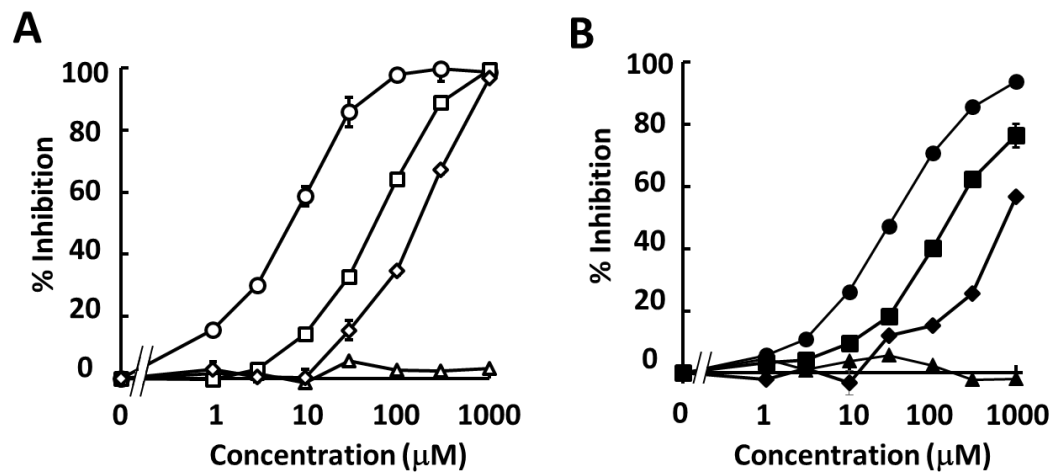


Figure 2.3.1 3種のPBA異性体のマッシュルームチロシナーゼに対する阻害作用 L-チロシンを基質とした場合(A: オープンシンボル)及びL-DOPAを基質とした場合(B: クローズドシンボル)のチロシナーゼ阻害活性について示している。データは阻害率として表記し、各シンボルは、2-PBA(△)、3-PBA(○)、4-PBA(□)及び安息香酸(◇)である。データは3回の独立に行った実験の平均値±SEで表示した。

2.3.2. *in silico* ドッキングシミュレーションによる PBA 異性体とマッシュルームチロシナーゼとの結合モデルの作成及び結合様式の評価

2-PBA、3-PBA、4-PBA (化合物 1-3)のマッシュルームチロシナーゼ阻害能の差について明らかにするために、コンピュータシミュレーションによるドッキングスタディを行った。その結果、Figure 2.3.2.A に示すように、活性の低かった 2-PBA は、カルボキシ基が銅イオンの方を向かなかった。3-PBA、4-PBA 及び安息香酸はカルボキシ基が銅イオンの方へ配向した。特に、3-PBA は安息香酸の配向パターンと一致した。また、3-PBA と 4-PBA を拡大して比べてみたところ(Figure 2.3.2.B)、3-PBA は、マッシュルームチロシナーゼの活性中心に含まれる Asn260 残基のカルボニル部分と π - π 相互作用をしているものと見られたが、4-PBA の 4 位のフェニル基は、3-PBA のそれに比べて少し遠ざかっていた。これらのデータから、3-PBA の強い阻害作用について、カルボン酸部分のキレート作用及び 3 位のフェニル基の Asn260 残基に対する π - π 相互作用が寄与していると考えられた。また、これらのドッキングポーズの持つ結合自由エネルギーについて計算したところ、Table 2.3.1.のような結果が得られ、*in vitro* で得られた阻害活性の序列、2-PBA<<安息香酸<4-PBA<3-PBA と一致した。これらのことから、PBA 異性体のうち、3-PBA とマッシュルームチロシナーゼとの相互作用がエネルギー的に最も安定しており、Asn260 との相互作用がその安定化に寄与していることが示唆された。

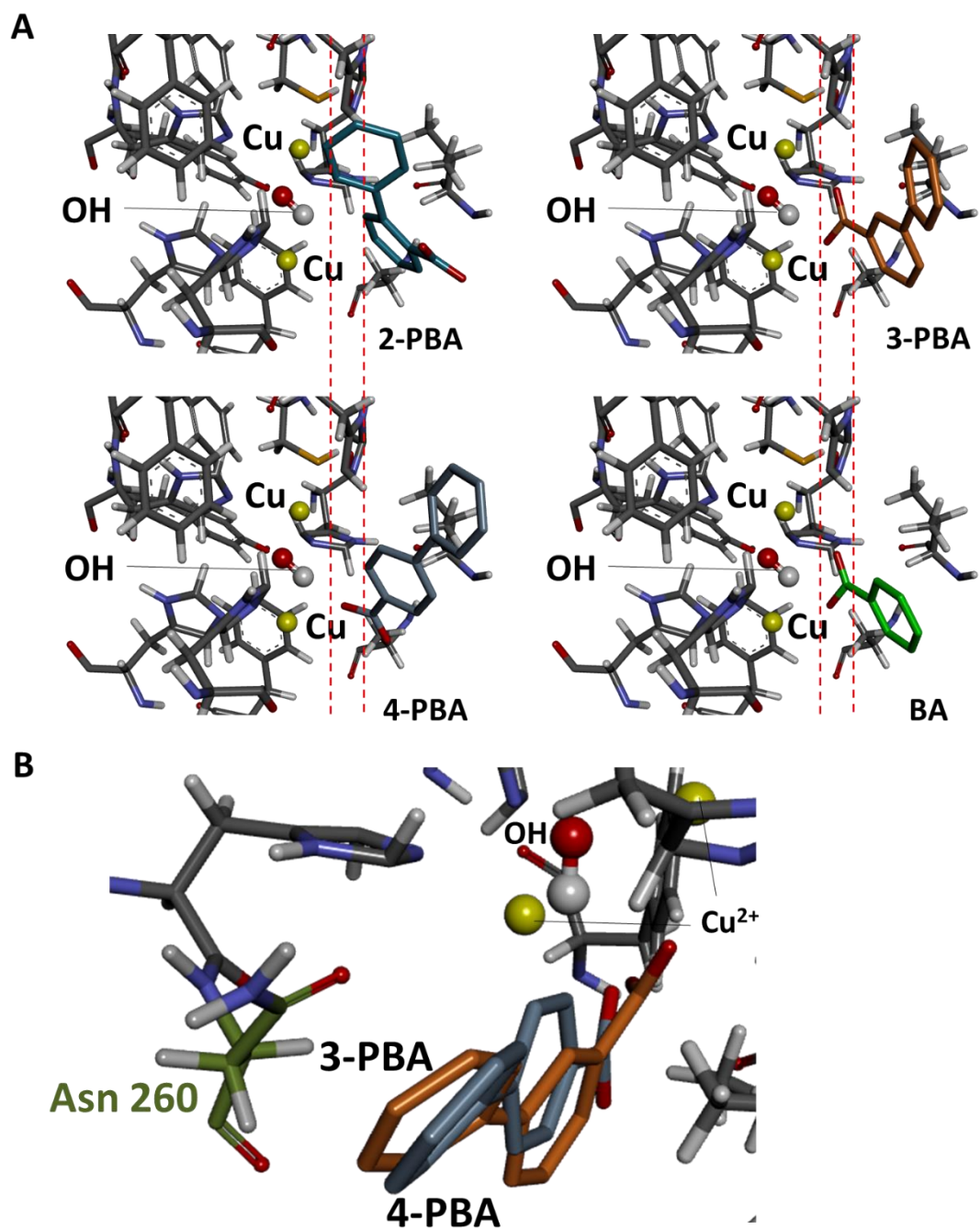
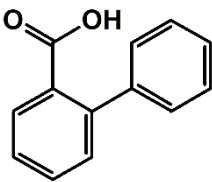
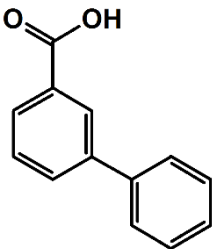
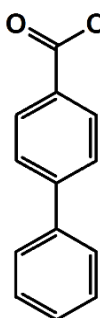
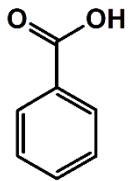


Figure 2.3.2 PBA 異性体のマッシュルームチロシナーゼの活性中心に対する結合様式 A PBA 異性体の結合様式 2-, 3-, 4-PBA と安息香酸の炭素原子は、それぞれマリン、オレンジ、ブルー、グリーンのスティック表示をしてある。アミノ酸残基の炭素鎖、酸素原子、銅イオンは、それぞれグレー、レッド、イエローで表示してある。赤色の垂直な点線は、リガンドの位置の比較を補助するために表示してある。 B Asn260 と 3-, 4-PBA のフェニル基との相互作用を示す拡大図 (A)で描かれた 3-, 4-PBA の図をオーバーラップした。カラーリングは、(A)と同様の表現を行っている。PBA：フェニル安息香酸 BA:安息香酸

Table 2.3.1. PBA 異性体のマッシュルームチロシナーゼに対する基質ごと(L-チロシン及びL-DOPA)の IC₅₀ とコンピュータによって予測された結合自由エネルギー(ΔG (kcal/mol))

Structures	Compounds	IC ₅₀ (μM)		ΔG (kcal/mol)
		Substrate		
		L-Tyr	L-DOPA	
	2-Phenylbenzoic acid (2-PBA: 化合物 1)	>1000	>1000	3.10
	3-Phenylbenzoic acid (3-PBA: 化合物 2)	6.97	36.32	-8.97
	4-Phenylbenzoic acid (4-PBA: 化合物 3)	63.24	216.05	-3.31
	Benzoic acid	224.5	822.11	-2.07

PBA: Phenylbenzoic acid

2.3.3. 3-PBA エチルエステルのマッシュルームチロシナーゼ阻害作用

次に、3-PBA のカルボン酸をエチルエステル化した化合物(Figure2.3.4.A)を用いて、チロシナーゼ阻害能を評価したところ、モノフェノラーゼ活性及びジフェノラーゼ活性がほぼ消失した(Figure2.3.3.B)。このことから、3-PBA のマッシュルームチロシナーゼ阻害作用において、カルボン酸が重要な役割を果たすことが示唆された。

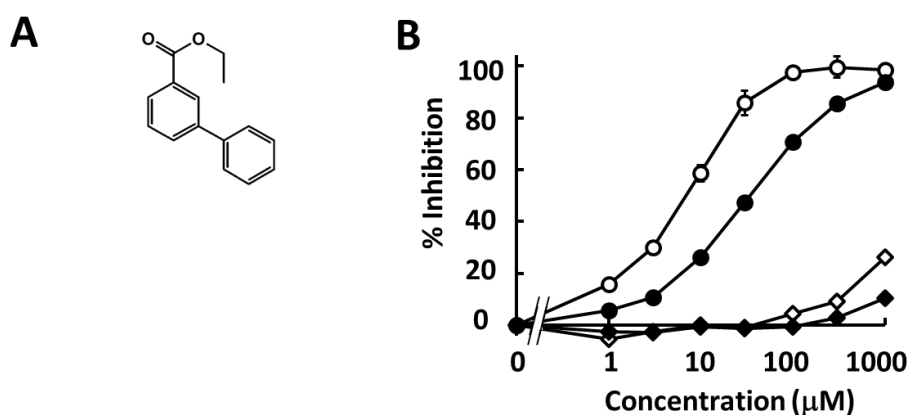
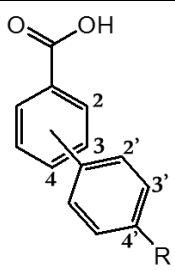


Figure.2.3.3 3-PBA エチルエステルのチロシナーゼ阻害作用 A 3-PBA エチルエステルの構造式 B 3-PBA エチルエステルのチロシナーゼ阻害作用 3-PBA のモノフェノラーゼ阻害活性(○)、ジフェノラーゼ阻害活性(●)、及び 3-PBA エチルエステルのモノフェノラーゼ阻害活性(◇)、ジフェノラーゼ阻害活性(◆)。データは 3 回の独立な実験の平均値±SE で表示した。

2.3.4. PBA 異性体の 4'-位の水酸基修飾型誘導体のマッシュルームチロシナーゼ阻害活性

基質である L-チロシンは、ベンゼン環の 4 位にフェノール性水酸基を持つアミノ酸であるといえる。そこで、次に 4'-位の水酸基及びメトキシ基が PBA 異性体のマッシュルームチロシナーゼ阻害活性に与える影響について検討した。2-PBA(化合物 1)、3-PBA(化合物 2)、4-PBA(化合物 3)の 4'-位に水酸基を付加した化合物をそれぞれ化合物 4、5、6 とし、メトキシ基を付加した化合物を化合物 7、8、9 とした。2.3.1.と同様の方法で L-チロシン及び L-DOPA を基質とした場合のチロシナーゼ阻害活性を測定し、 IC_{50} を求めたところ、表 2.3.3.のような結果が得られた。活性のほとんどなかった 2-PBA は、4'-位の水酸化によって若干阻害能を獲得したが、メトキシ化によって阻害活性は再度消失した。このことから、4'-位の水酸基がチロシナーゼの活性中心の銅イオンにキレートすることが示唆された。また、3-PBA は PBA 異性体の中では最も強い阻害能を持っていたが、4'-位の水酸基及びメトキシ基の導入によって阻害能が徐々に減弱した。4-PBA では、4'-位の水酸基及びメトキシ基の導入によって阻害能が同程度に増大した。この理由について明らかにするために、化合物 6 及び 9 について、マッシュルームチロシナーゼの結晶構造とのドッキングスタディを行った。

Table 2.3.2. フェニル安息香酸誘導体のチロシナーゼ阻害活性 (μM)

		4'-position (R)		
		H	OH	OCH ₃
2-PBA derivatives	No.	1	4	7
	IC ₅₀ (monophenolase)	> 1000	100.18	> 1000
	IC ₅₀ (diphenolase)	> 1000	>1000	>1000
3-PBA derivatives	No.	2	5	8
	IC ₅₀ (monophenolase)	6.97	10.59	15.30
	IC ₅₀ (diphenolase)	36.32	57.20	54.18
4-PBA derivatives	No.	3	6	9
	IC ₅₀ (monophenolase)	63.24	14.70	15.30
	IC ₅₀ (diphenolase)	216.05	104.17	67.50

PBA: Phenylbenzoic acid

2.3.5. *in silico* ドッキングシミュレーションによる 4-PBA 誘導体(化合物 6、9)のマッシュルूमチロシナーゼとの結合モデル及び結合様式と阻害能の評価

化合物 6 は 4'-位の水酸基の付加により、阻害活性が大幅に向上した。これは 2-PBA の 4'-位の水酸化及びメトキシ化の実験から考えれば、水酸基が銅イオンへキレートしたためと考えられる。しかし、4'-位にメトキシ基を導入してもその活性はほとんど変化しなかった。そこで、水酸基とカルボキシ基のキレートに対する寄与について論じるために、化合物 6 と化合物 9 のマッシュルूमチロシナーゼに対するドッキングスタディを行った。その結果、Figure 2.3.4.A に示すように、化合物 6 は水酸基が銅イオンへと配向し、一方で、化合物 9 はカルボキシ基が銅イオンへ配向した。化合物 9 では、メトキシ基が Val248 に近づいていて相互作用する可能性が示唆された。それに対して、化合物 6 ではそのような目立った相互作用は見られなかった。2つの化合物ともに、銅イオンから遠い方のフェニル基が活性中心の Phe264 に対し、垂直に位置していた。これは、CH- π 相互作用の一種である T 型 π 相互作用を形成していると考えられる。また、化合物 6 と 9 を重ね合わせると、6の方がより活性中心の奥まで入り込んでいた(Figure 2.3.4.B)。これらの結果から、水酸基とカルボキシ基の両方に銅イオンに対するキレート作用の可能性があり、その向きは化合物の側鎖によっても左右されることが示唆された。また、それらの側鎖との相互作用を決定するマッシュルूमチロシナーゼの重要なアミノ酸について、Val248 との相互作用、Phe264 の T 型 π 相互作用とそれを補助する平行に位置した Arg268 が重要であることが明らかとなった。

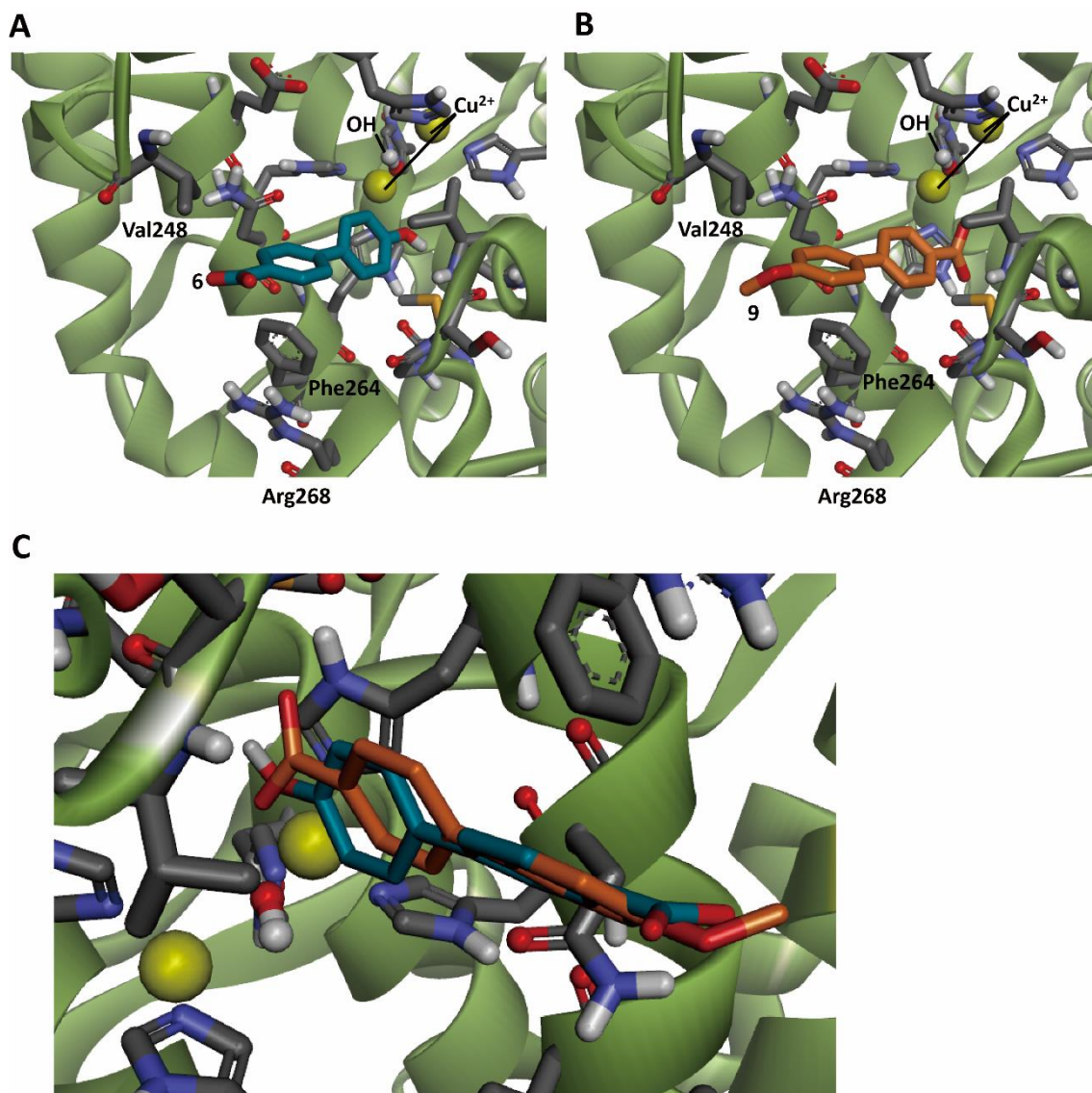


Figure 2.3.4 化合物 6 及び 9 のマッシュルームチロシナーゼの活性中心に対する結合様式 A 化合物 6、B 化合物 9 の結合様式 化合物 6 及び 9 の炭素原子はそれぞれマリンとオレンジのスティック表示をしてある。アミノ酸残基の炭素鎖、酸素原子、銅イオンは、それぞれグレー、レッド、イエローで表示してある。活性中心から遠いアミノ酸は、バックボーンとして、薄いグリーンのリボン表示を行った。 C 化合物 6 及び 9 のオーバーラップ図 A、B で描かれた 3、4-PBA の図をオーバーラップした。カラーリングは A、B と同様の表現を行っている。

2.4. 考察

皮膚の色素沈着抑制の観点から、現在までに多くのチロシナーゼ阻害剤の創製研究がなされてきた。しかしながら、チロシナーゼの阻害に関して重要な活性中心の構造的な知見は少ない。本研究は、チロシナーゼ阻害剤の作用時に重要なアミノ酸を同定することを目的とした。

まず、フェニル安息香酸(PBA)の異性体に着目し、そのチロシナーゼ阻害活性を測定したところ、3-PBA(Compound 2)が最も強い阻害活性を持った($IC_{50}=6.97$ 、及び $36.32\ \mu M$ (それぞれモノフェノラーゼ活性、ジフェノラーゼ活性))。このとき安息香酸は、 $IC_{50}=224.5$ 、及び $822.11\ \mu M$ (それぞれモノフェノラーゼ活性、ジフェノラーゼ活性)であり、報告されているジフェノラーゼ阻害活性($710\ \mu M$)と概ね一致した[39]。 *in silico* ドッキングスタディでは、2位のフェニル基を持つ2-PBA(化合物1)は立体反発が生じ、カルボキシ基が活性中心の銅イオンへ配向できないことが予測された(Figure.2.3.3.)。これは、*in vitro* での実験結果と一致している。また、 IC_{50} と結合自由エネルギーが関連したこと(Table 2.3.1.)からも、この *in silico* モデルが妥当であることが示された。また、このモデルにおいて、カルボキシ基が銅イオンに配向可能な化合物であると評価された3-PBA(化合物2)について考えると、カルボキシ基をエチルエステル化することによって活性が消失したことから、3-PBAのカルボキシ基には銅イオンに対するキレート作用があり、その作用が強力な阻害能を発揮するために重要であるといえる。3-PBA(化合物2)と4-PBA(化合物3)の比較では、カルボキシ基の配向が若干異なっていたことに加え、Asn260との π - π 相互作用の有無もその活性の差に寄与していることが示唆された。実験2.3.4.から、3-PBA(化合物2)の4'-位のヒドロキシル化及びメトキシ化によって阻害能が少しずつ低下したことから、このAsn260との相互作用は、これらの基の付加によって減弱していると考えられる。OH基やOMe基は電子供与性の基であり[40]、ベンゼン環の π 電子系に影響を与えると考えられ、そのことがAsn260との π - π 相互作用を減弱したものと考えられる。また、化合物6と9のドッキングフォームから、

Phe264 残基と阻害化合物との T 型 π 相互作用が阻害剤と酵素との相互作用に関して重要であることが示唆された。T 型 π 相互作用は生体物質においても、分子内及び分子間でよく見られる π - π 相互作用である[41,42]。Wang らの研究では、2-(4-fluorophenyl)-quinazolin-4(3H)-one とマッシュルームチロシナーゼとのドッキングシミュレーションにより見出された、化合物と酵素との相互作用に重要であると考えられるアミノ酸残基の中に Asn260 と Phe264 が指摘されており、今回の結果は、この指摘をアミノ酸残基の機能的側面について拡張するものである[43]。さらに、今回の実験で、新たに Val248 と Arg268 の重要な役割について明らかとなった。Val248 は、疎水性相互作用によって阻害剤の結合に関与すると考えられた。また、Arg268 は、Phe264 に対して平行に位置することで、Phe264 の T 型 π 相互作用を補助していると考えられた(Figure 2.3.5.)。以上の結果及び考察から、チロシナーゼ阻害剤とマッシュルームチロシナーゼの相互作用部位に関する知見を深めることができた。

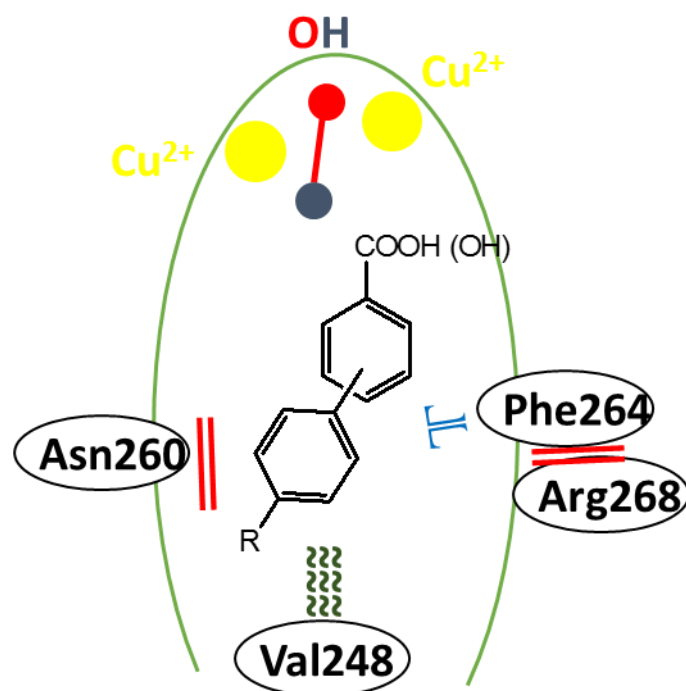


Figure 2.3.5 マッシュルームチロシナーゼの活性中心と PBA 誘導体との相互作用に重要なアミノ酸及び相互作用様式の提案 チロシナーゼのアクティブポケットは、グリーンの線で表示した。2つの銅イオン、酸素原子、水素原子は、それぞれイエロー、レッド、ブルーの丸で示した。疎水性相互作用、平行 π - π 相互作用、T型 π 相互作用は、それぞれモスグリーンのウェーブ、レッドの二重線、ブルーの **T** 字で示した。

第3章 チロシナーゼ阻害剤の作用メカニズムに関する理論的考察

3.1 背景

これまでに多くのチロシナーゼ阻害剤が報告されており、体系的にまとめあげるのは困難なほどである。Chen は、2009 年にチロシナーゼ阻害剤を(a) Polyphenol (b) Benzaldehyde and Benzoate derivatives (c) Long-chain Lipids and Steroids (d) Other natural and Synthetic Inhibitors (e) Irreversible inactivators の 5 つのグループにまとめた。この分類では、(d) Other natural and Synthetic Inhibitors にその他全ての阻害剤が分類されている[44]。また、Lee らは 2016 年の総説で flavonoids, hydroquinone, chalcone, stilbene, kojic acid derivative, natural from various sources, synthetic に分類した[45]。この分類では、Chen の(a) Polyphenol と(d) Other natural and Synthetic Inhibitors の一部が統合され、細分化されている。Loizzo らは、2012 年に天然化合物だけでなく、植物抽出エキス成分についても阻害作用の知られているものの基原植物、部位、抽出溶媒、 IC_{50} を一覧表にまとめた[46]。これら阻害剤についてまとめる際に気をつけなければならないことは、これら化合物やエキス成分を評価する際のアッセイ条件が異なることである。基質、反応時間、酵素ユニットなどが異なれば、 IC_{50} を単純に比較することは難しい。Gunia-Krzyzak らは、それらの反応条件に加えて、阻害様式について統合的にまとめたが、各研究者の反応条件があまりにも違いすぎるため、 IC_{50} を直接的に比較すべきではないと述べている[47]。酵素学的な研究の成果により、チロシナーゼ阻害剤は競合、非競合、不競合、混合の 4 種からなる典型的な阻害様式へあてはめられているが、その阻害様式の決定がどのような意味を持つのかについてのより踏み込んだ議論は行われてこなかった。通例、非競合や不競合阻害剤を考える場合、酵素基質結合部位以外のアロステリック部位を想定する。しかし、チロシナーゼではそのような部位は報告されていない。当該化合物が非競合阻害様式であるのに、詳細なディスカッション無しにコンピュータによる阻害剤と基質結合部位のドッキングを行っている文献もある。なぜなら、1.3.節で論じたようなチロシ

ナーゼの活性サイクルに登場する 3 つのフォーム(*oxy*-, *deoxy*-, *met*-チロシナーゼ)に対して、どの阻害剤がどのフォームをターゲットとするのかという議論がなされていないためである。すなわち、阻害剤の作用メカニズムの推定において、この 3 つのフォームの存在が無視されているのである。見かけの阻害様式(競合、非競合、不競合、混合など)がなぜ現れてくるのか。この疑問は *oxy*-, *deoxy*-, *met*-チロシナーゼの各フォームを峻別することによってこそ、推定が可能なのではないかと考えた。そこで本章では、基質類似の阻害剤としてコウジ酸、安息香酸、ヒノキチオール及び安息香酸誘導体(化合物 2、3、5、6、8、9)を用いて、ターゲットフォームは何かという観点から、見かけの阻害様式を解析することによって、より合理的な阻害メカニズムを推定することを目指した。

3.2. 実験・及び調査の理論的背景

3.2.1. コウジ酸の IC_{50} の横断的調査及び阻害能の比較のための指標の確立

チロシナーゼの酵素反応における基質濃度 $[S]$ 、50%阻害濃度 IC_{50} 及び酵素ユニット EU の関係を明らかにするために、多数の文献値を Pubmed 及び Google Scholar から調査した。変数 X を $[S]$ と IC_{50} で構成し、EU と X が線形関係をもつか否かを検討する。すなわち、

$$X = f([S], IC_{50}) \quad (4-1)$$

のとき、

$$EU = pX + q \quad (4-2)$$

となるような f の決定をめざす。ここで、 p 、 q は実数である。

モノフェノラーゼ、及びジフェノラーゼにおけるそれぞれの変数に対しては上付きの添え字でそれぞれ L-チロシンの T と L-DOPA の D を用いることにすれば、モノ

フェノラーゼの場合、基質濃度は[L-Tyrosine]、 IC_{50} は IC_{50}^T 、 X は X^T 、EU 及び現れる定数 p 、 q は EU^T 、 p^T 、 q^T である。また、ジフェノラーゼの場合も同様に、基質濃度は[L-DOPA]、 IC_{50} は IC_{50}^D 、 X は X^D 、EU 及び現れる定数 p 、 q は EU^D 、 p^D 、 q^D である。

3.2.2. チロシナーゼに対する阻害様式の決定

チロシナーゼの反応メカニズムは、第 1 章 1.3.節に示したとおり極めて複雑である。ここで、モノフェノラーゼサイクルに対して、以下の仮定をおいて、反応機構を推測してみたい。

仮定 1. $[T] \gg [D]$ とする。反応サイクル中ドパキノンがドパクロムになる過程で、L-DOPA が生成する。この濃度はチロシンの濃度に比べて無視できるほど小さい。従って、ジフェノラーゼサイクルによって生じるドパキノンは、L-DOPA として再生されるのみであり、ドパクロムの生成速度としてはカウントされない。

仮定 2. 一連のジフェノラーゼサイクル中の酵素量の和を形式的に E_{met}' とおく。すなわち、

$$E_{met}' = E_{oxy} + E_{oxy} \cdot D + E_{met} + E_{met} \cdot D$$

すると、チロシナーゼのモノフェノラーゼサイクルは、Figure 3.2.1.のように簡略化できる。

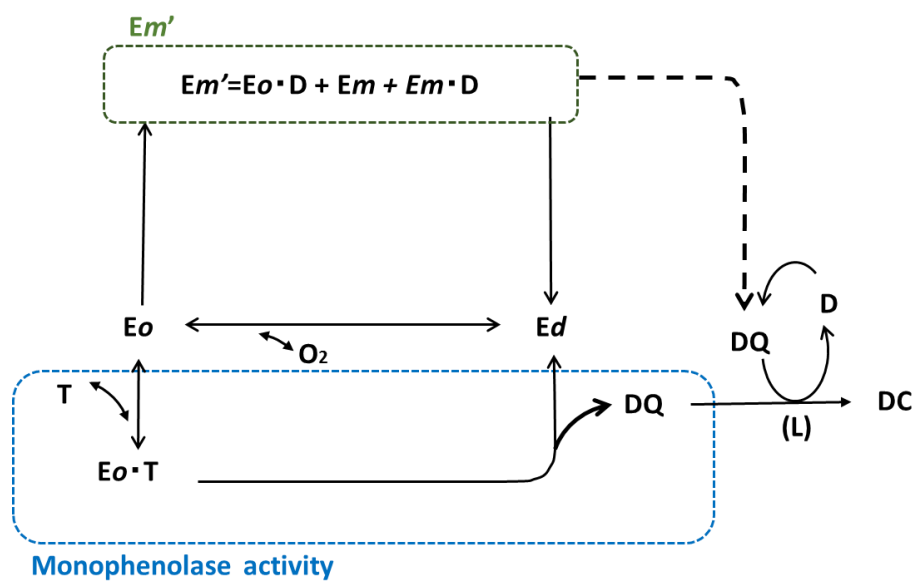


Figure 3.2.1. モノフェノラーゼ活性の単純化モデル 単純化したモノフェノラーゼ活性のモデル。Eo·D、Em、Em·D をまとめて、ひとつの形式的な酵素 Em' と考える。ジフェノラーゼ活性から生じる DQ は無視できる。なぜなら、L-DOPA へリサイクルされるからである。Eo; Eoxy、Em; Emet、Ed; Edeoxy、T; L-Tyrosine、D; L-DOPA、DQ; dopaquinone、L; leucodopachrome、DC ; dopachrome

3.3. 実験材料・試薬・方法

3.3.1. 材料

コウジ酸は、和光純薬工業株式会社(大阪)にて購入し、ジメチルスルホキシド(DMSO)に 100 mM で溶解し、適宜希釈して試験に供した。

3.3.2. チロシナーゼ阻害活性の測定及び阻害様式の決定

チロシナーゼ活性の測定は、第 2 章 2.2.2.節で述べた方法を取った。阻害様式の決定においては、L-チロシンは 0.0625–0.5 mM、L-DOPA は 0.125–1.0 mM の間で変化させて系に加えた。各種定数の決定は、ラインウェーバー・バークプロットを用いて決定した。

3.3.3. *in silico* ドッキングスタディ

deoxy-フォームのマッシュルームチロシナーゼの結晶構造(2Y9X)と *oxy*-フォームの *S. castaneoglobisporus* チロシナーゼの結晶構造をプロテインデータバンク(PDB [37])よりダウンロードし、それらを TM-align [48]で重ね合わせ、*oxy*-フォームのマッシュルームチロシナーゼを得た。そこから、酸素原子を 1 つ抜き去り、*met* フォームのモデルとした。ヒノキチオール、コウジ酸、安息香酸の結合モードは、Autodock Vina をドッキングソフトウェアとして用いた[49]。化合物の構造は、Chem BioDraw® Ultra を用いて描画し、OpenBabel を用いて、3D 構造へ変換した[50]。AutoDock Vina ではグリッドサイズを(x, y, z) = (20, 20, 20)とし、グリッドの中心を(x, y, z) = (-11.917, -26.694, -42.417)とした。その他のパラメータはデフォルト値を用いた。

3.4. 実験結果及び考察

3.4.1. コウジ酸のチロシナーゼ阻害活性評価

チロシナーゼ阻害剤のうち、多くの場合コウジ酸が陽性対象として用いられている[51]。そこで、コウジ酸の IC_{50} を比較することで阻害能を統合的に論じることができるようになると考えられる。2.2.節のアッセイ系と他研究室でのアッセイ結果の比較のため、コウジ酸の阻害能評価を本アッセイ系でも行った。その結果、Figure 3.4.1.に示すように、コウジ酸は本アッセイ系においても濃度依存的に阻害能を示した。 IC_{50} は、モノフェノラーゼ、ジフェノラーゼ活性に対し、それぞれ 6.95 及び 15.8 μM であった (Table 3.4.1., 3.4.2.). 次に、報告されている文献の IC_{50} の横断的な比較を行った。この比較解析においては IC_{50} だけではなく、酵素ユニット、基質の濃度が併記され、再現可能であることが必須である。多数の文献の中から、それが可能な文献を選出し、モノフェノラーゼ活性、ジフェノラーゼ活性のそれぞれについてまとめた。 IC_{50} と $[Substrate]$ を反映させるのに最も簡単なのは、比の値をとることである。単純な比 $\frac{IC_{50}}{[Substrate]}$ 及び対数の比 $\frac{\log IC_{50}}{\log [Substrate]} = \log_{[Substrate]} IC_{50}$ について、それらを説明変数とし、EU を従属変数として線形近似し、どの説明変数が妥当であるかを R^2 値によって判断した。その結果、モノフェノラーゼ及びジフェノラーゼの両者において、 $\log_{[Substrate]} IC_{50}$ の値を採用した場合、最も当てはまりがよいことが判明した (Figure 3.4.2.; A, D)。このことから、この値を $R = \log_{[Substrate]} IC_{50}$ と定義した。一方で、 IC_{50} のみ、または $\frac{IC_{50}}{[Substrate]}$ では線形関係は認められなかった (Figure 3.4.2.; B, C, E, F)。よって、チロシナーゼ阻害活性について、 $\log_{[S]} IC_{50}$ の値が有用であると考えられる。

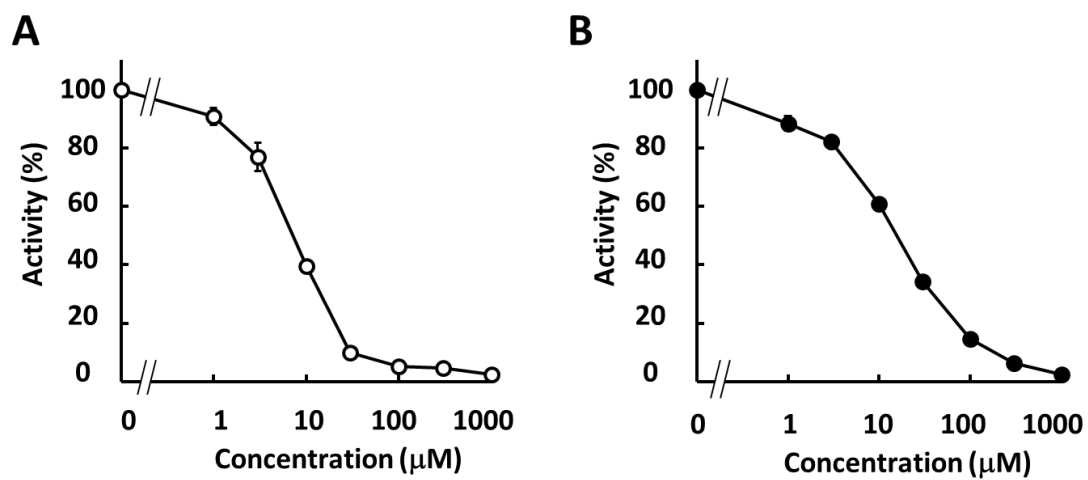


Figure 3.4.1. コウジ酸のマッシュルームチロシナーゼ阻害活性 L-チロシンを基質とした場合 (A : ○)及び L-DOPA を基質とした場合(B : ●)のチロシナーゼ阻害活性について示している。データは比活性(%)として表記した。データは3回の独立な実験の平均値±SE で表示した。

Table 3.4.1. コウジ酸のモノフェノラーゼ阻害活性の文献値及び各説明変数

IC_{50} (μ M)	Unit/mL	[L-Tyrosine] (μ M)	$\frac{IC_{50}}{[L - Tyrosine]}$	$\log_{[L-Tyrosine]}IC_{50}$	Ref
6.95	40	100	0.0695	0.4209	This manuscript
13.2	13	180	0.0733	0.4968	[52]
15.09	47.57	1047.61	0.0144	0.3903	[53]
15.5	45.58	833.33	0.0186	0.4075	[54]

Table 3.4.2. コウジ酸のジフェノラーゼ阻害活性の文献値及び各説明変数

IC_{50} (μ M)	Unit/mL	[L-DOPA] (μ M)	$\frac{IC_{50}}{[L - DOPA]}$	$\log_{[L-DOPA]}IC_{50}$	Ref
15.8	40	500	0.0316	0.4441	This manuscript
16.6	3	85	0.1952	0.6323	[55]
16.67	30	500	0.0333	0.4527	[56]
17.9	50	2500	0.0071	0.3687	[57]
18.57	25	500	0.0371	0.4701	[58]
19	30	500	0.0380	0.4737	[59]
26.5	13	360	0.0736	0.5567	[52]

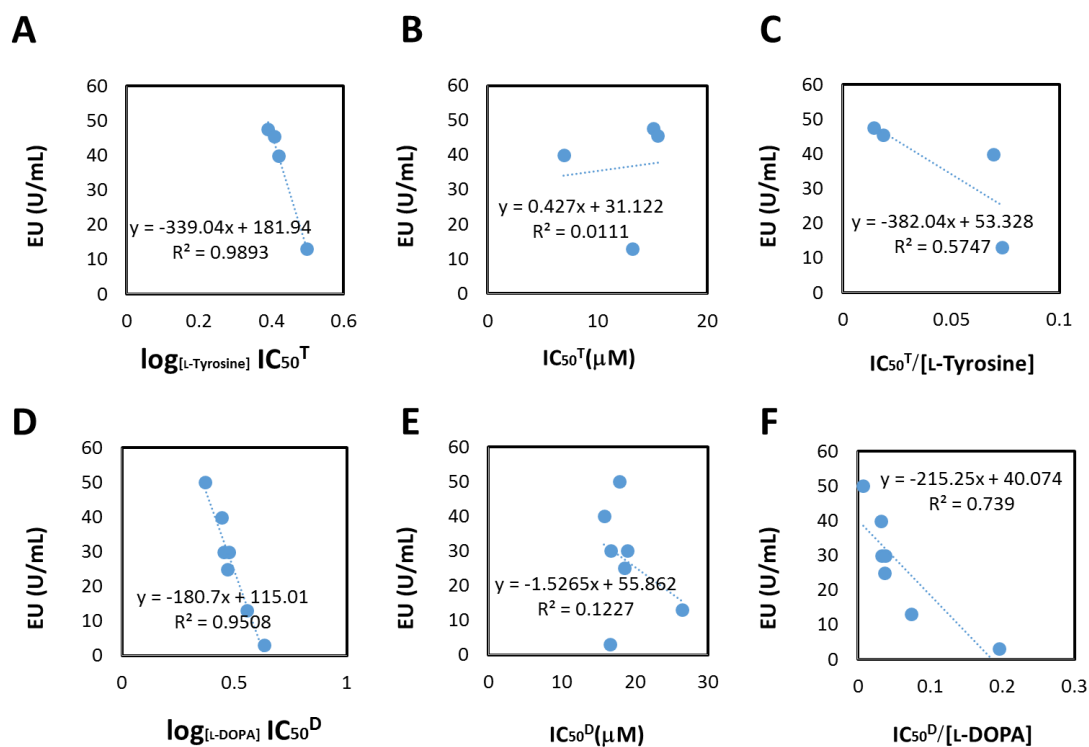


Figure 3.4.2. IC_{50} に関連する比の値と酵素ユニットの相関

コウジ酸のマッシュルームチロシナーゼに対する阻害活性情報の文献値(Table 3.4.1.及び 3.4.2.)を集計した。酵素ユニットと $\log_{[Substrate]}IC_{50}$ (A; モノフェノラーゼ活性、D; ジフェノラーゼ活性)、 IC_{50} (B; モノフェノラーゼ活性、E; ジフェノラーゼ活性)、 $\frac{IC_{50}}{[Substrate]}$ (C; モノフェノラーゼ活性、F; ジフェノラーゼ活性)間の相関解析。

Table 3.4.3. 回帰によって得られたパラメータ

Explanatory variable	Activities	Figures	p	q	r ²
$\log_{[\text{Substrate}]}IC_{50}$	Monophenolase	1A	-339.04 (U)	181.94 (U)	0.9893
	Diphenolase	1D	-180.70 (U)	115.01 (U)	0.9508
IC_{50}	Monophenolase	1B	0.4270 (U/nmol)	31.122 (U)	0.0111
	Diphenolase	1E	-1.5265 (U/nmol)	55.862 (U)	0.1227
$IC_{50}/[\text{Substrate}]$	Monophenolase	1C	-382.04 (U)	53.328 (U)	0.5747
	Diphenolase	1F	-215.25 (U)	40.074 (U)	0.7390

3.4.2. その他の阻害剤の阻害活性評価に対する応用

SIGMA 社のデータシートによれば、酵素ユニットは「pH6.5、25°C/L-Tyrosine を含む 3 mL の溶液中で A280 を 0.001/min で生じせしめる量」と記載されている。よって、ジフェノラーゼ活性における酵素ユニットは、モノフェノラーゼ活性における酵素ユニットの概念と異なると考えられる。しかしながら、モノフェノラーゼとジフェノラーゼは活性中心を共有するので、 EU^T と EU^D は線形関係にあると仮定する。これを書き下すと、

$$EU^T = K_1 EU^D + K_2 \quad (4-3)$$

ここで、 K_1 、 K_2 は実験により定められる定数である。

3.4.1. 節の結果から、

$$EU^T = p^T \log_{[L-Tyrosine]} IC_{50}^T + q^T \quad (4-4)$$

$$EU^D = p^D \log_{[L-DOPA]} IC_{50}^D + q^D \quad (4-5)$$

であり、(4-3)式より

$$p^T \log_{[L-Tyrosine]} IC_{50}^T + q^T = K_1 (p^D \log_{[L-DOPA]} IC_{50}^D + q^D) + K_2 \quad (4-6)$$

であって、これを整理すると

$$\log_{[L-Tyrosine]} IC_{50}^T = \frac{K_1 p^D}{p^T} \log_{[L-DOPA]} IC_{50}^D + \frac{K_1 q^D + K_2 - q^T}{p^T} \quad (4-7)$$

の形となる。つまり、 R^T と R^D は線形である。本研究では、次にこれが成り立つか調べる。まず、第2章2.3節のデータ(化合物2、3、5、6、8、9)及びヒノキチオール(モノフェノラーゼに対する $IC_{50}=0.0581 \mu M$ 、ジフェノラーゼに対する $IC_{50}=0.0234 \mu M$)、本節におけるコウジ酸のデータ(Table 3.4.1.)の9データセットを用いて、 $R^D - R^T$ グラフを作成した

(Figure 3.4.3.●)。その結果、 R^T と R^D は線形回帰に対して当てはまりがよいことが判明した ($R^2 = 0.9946$)。次に、文献値でモノフェノラーゼ活性阻害作用とジフェノラーゼ活性阻害作用の両方を測定している論文を Pubmed 及び Google Scholar を用いて検索したところ、Table 3.4.5.に示すデータセットが得られた。これを Figure 3.4.3.上にプロットすると(●)、ほぼ同じ直線状に分布したが、ばらつきは大きくなった。これらの文献から集めたデータセットは、特に反応条件を統制していないため、ばらつきが大きくなったと考えられる。

以上の結果から、実数の定数 a, b を用いて

$$R^T = aR^D + b$$

$$\text{ただし、} a = \frac{K_1 p^D}{p^T}, b = \frac{K_1 q^D + K_2 - q^T}{p^T}$$

(4-8)

Table 3.4.4. モノフェノラーゼ活性、ジフェノラーゼ活性に対する IC₅₀ が同じ論文で評価されている化合物

Compounds	IC ₅₀ ^D (μM)	[L-DOPA] (μM)	IC ₅₀ ^T (μM)	[L-Tyrosine] (μM)	Ref.
aBCA	49	500	75	1000	[60]
aCCA	110	500	140	1000	[60]
aMCA	450	500	440	1000	[60]
Kinobeaon A	27	1000	22	1000	[61]
Compound1	19.5	360	1.01	180	[62]
Compound2	32.6	360	18.4	180	[62]
Compound3	5.22	360	1.28	180	[62]
Compound4	7.48	360	1.79	180	[62]
Compound5	84.1	360	11.2	180	[62]
Compound6	20.4	360	4.96	180	[62]
Kojic acid	37.3	360	12.3	180	[62]
Compound1	128.2	360	2.9	180	[52]
Compound3	0.5	360	0.03	180	[52]
Compound4	144	360	18.4	180	[52]
Kojic acid	26.5	360	13.2	180	[52]

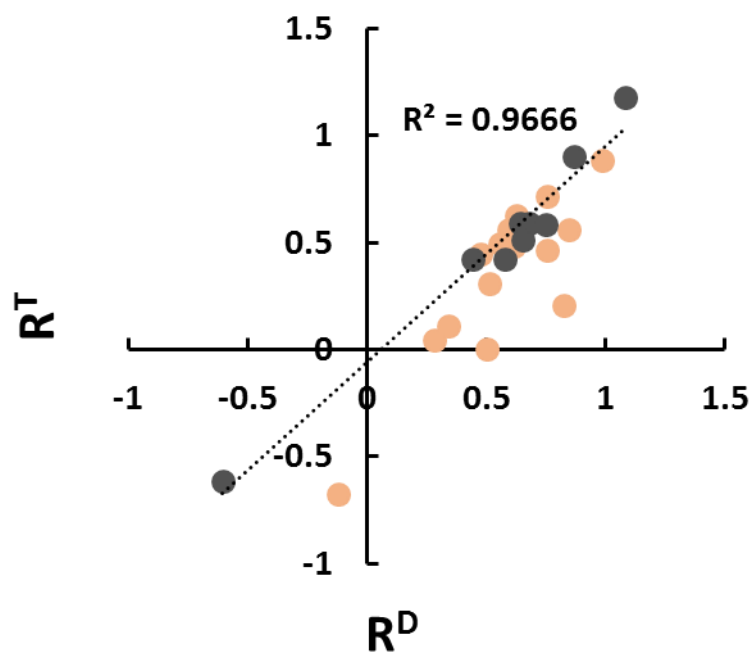


Figure 3.4.3. モノフェノラーゼ阻害活性とジフェノラーゼ阻害活性の相関

モノフェノラーゼ阻害活性の R 値とジフェノラーゼ阻害活性の R 値の間の相関を調べた。横軸と縦軸は、それぞれジフェノラーゼ阻害活性に対する R 値(R^D)、モノフェノラーゼ阻害活性に対する R 値(R^T)である。Table 3.4.4.の結果を用いた場合のプロット(●)に対し、最小二乗法で近似直線を引くと、 $R^2=0.9660$ であった。モノフェノラーゼとジフェノラーゼ阻害活性を同時に評価している文献の IC_{50} の値(Table 3.4.5.)から算出した R 値を用いて同様にプロットしたのが橙色のマーカである(●)。

3.4.3. 各阻害剤のモノフェノラーゼ及びジフェノラーゼ活性に対する阻害能の強さの比較

次に、チロシナーゼ阻害剤がモノフェノラーゼ及びジフェノラーゼの両方に平等に作用するか否かを検討する。3.4.2節、4-8 式に

$$R^T = \log_{[L-Tyrosine]}(IC_{50}^T) \quad (4-9)$$

$$R^D = \log_{[L-DOPA]}(IC_{50}^D) \quad (4-10)$$

を戻せば、

$$\log_{[L-Tyrosine]}(IC_{50}^T) = a \log_{[L-DOPA]}(IC_{50}^D) + b \quad (4-11)$$

ここで、底の変換公式を用いれば、

$$\begin{aligned} \log_{[L-Tyrosine]}(IC_{50}^T) &= \frac{a \log_{[L-Tyrosine]}(IC_{50}^D)}{\log_{[L-Tyrosine]}[L-DOPA]} + \log_{[L-Tyrosine]}[L-Tyrosine]^b \\ &= \log_{[L-Tyrosine]}(IC_{50}^D)^{\frac{a}{\log_{[L-Tyrosine]}[L-DOPA]}} \\ &\quad + \log_{[L-Tyrosine]}[L-Tyrosine]^b \end{aligned} \quad (4-12)$$

両辺対数をはずして、

$$IC_{50}^T = [L-Tyrosine]^b (IC_{50}^D)^{\frac{a}{\log_{[L-Tyrosine]}[L-DOPA]}} \quad (4-13)$$

この式の右辺はジフェノラーゼ活性阻害作用の強さを、モノフェノラーゼ活性阻害作用のスケールで表した値を意味している。フェニル安息香酸類縁体、ヒノキチオール、コウジ酸、安息香酸のデータを代入すれば、

$$IC_{50}^T = 0.75(IC_{50}^D)^{0.75} \quad (4-14)$$

そこで、あるチロシナーゼ阻害剤が、モノフェノラーゼ及びジフェノラーゼのどちらに対して強く阻害するかを示す **Index** として、本研究においては

$$Index = IC_{50}^T - 0.75(IC_{50}^D)^{0.75} \quad (4-15)$$

あるいは、一般化して、

$$Index = IC_{50}^T - [L - Tyrosine]^b (IC_{50}^D)^{\frac{a}{\log[L-Tyrosine][L-DOPA]}} \quad (4-16)$$

の大小でチロシナーゼ阻害剤を分類する。この **Index** が小であれば(IC_{50}^T が小さい)、その化合物はモノフェノラーゼ活性に対する阻害能が大きいとみなせ、逆に大であれば(IC_{50}^D が小さい)、その化合物はジフェノラーゼ活性に対する阻害能が大きいとみなせる。各化合物について、このインデックスを計算したものが、Table3.4.6.である。

3.4.4. **Index** と見かけの阻害様式の関係

多くのチロシナーゼ阻害作用をもつ化合物に関する報告で、その阻害様式に関する実験を行っているが、それらの阻害剤が *oxy*-, *deoxy*-, *met*-の3つのフォームのどのフォームをターゲットにしているかの考察はほとんどなされていない。前節で、モノフェノラーゼ阻害活性とジフェノラーゼ阻害活性の強さのバランスを記述する **Index** を提案した。そこで、見かけの阻害様式と **Index** の関係について次に考察する。まず、各化合物の見かけの阻害様式をラインウェーバー・バークプロットを用いて決定した (Figure 3.4.4.)。コウジ酸、安息香酸、化合物 2、3、8、9 は、非競合阻害様式、ヒノキチオールは以前報告されているように競合阻害様式を示した[24]。インデックスの値と、見かけの阻害様式を Table 3.4.6.にまとめた。一般に、非競合阻害様式はアロステリック部位に対して化合物が結合することによって酵素のコンホメーションが変化し、酵素と基質が反応しにくくなる場合に起こる(付 A2)。しかし、私が所属するグループでチ

ロシナーゼの表面をコンピュータシミュレーションで網羅的に探索したところ、3つの空隙が発見されたが、大きさから考えて低分子化合物の結合しうるものは1つのみであった。コウジ酸やフェニル安息香酸をその空隙にドッキングシミュレーションを行っても、基質結合部位にドッキングした場合より高い親和性は得られなかった。逆に様々な *in silico* スクリーニング化合物を新規空隙にドッキングしてスクリーニングしたところ、相互作用しうると判定されたものは構造的に **PBA** などのこれまでのチロシナーゼ阻害物質とは異なる構造であった。もちろん、これは直ちにアロステリック阻害の可能性を排斥するものではないが、**PBA** などの基質類似化合物がチロシナーゼの活性中心以外の部位に結合する可能性は極めて低いと考えている。そこで、本研究においては、以下、基質類似の化合物では活性中心に競合的に結合し、阻害するという前提に立つことにする。さらに、**3-PBA** の様に銅原子と作用するカルボキシ基にエトキシ基を導入するだけで全く阻害作用を示さなくなってしまうことなどの事実がもこれに根拠を与える(第2章 2.3.3.節)。3.2.2.節で論じたように、モノフェノラーゼ活性を単純化してジフェノラーゼサイクルからのドパクロムの生成をゼロとみなすと、モノフェノラーゼサイクルにおけるジフェノラーゼ活性の効果は無視できる(Figure 3.2.1.)。このモデルでは、*Emet* 及び *Edeoxy* に対する競合的な阻害がモノフェノラーゼ活性を発揮できる *Eoxy* のトータル量を減少させると見做すことができる。最大反応速度 V_{max} は、 $V_{max} = k_p[E]_T$ と定義されるので(付録 A2)、酵素のトータル量が減少すれば V_{max} が減少することがわかる。 K_m が変化せず V_{max} が減少すれば見かけ上ラインウェーバー・バークプロットは非競合阻害モデルと同じになってしまう。逆に言えば、ある化合物がマッシュルームチロシナーゼのモノフェノラーゼ活性に対し、非競合阻害様式でありかつ、活性ポケットへ可逆的に結合するとき、*Emet* または *Edeoxy* を阻害していると考えるのが適当であると考えられる。そこで、この考えからチロシナーゼ阻害剤の新しい分類方法を提案する。それは *Eoxy*、*Edeoxy*、*Emet* のどのフォームに対する阻害剤であるかによって、

Type O、Type D、Type M 阻害剤と分類するという方法である(Figure 3.4.5.)。

Type O 阻害剤は、見かけ上モノフェノラーゼ活性に対し、競合的である。Type M と Type D 阻害剤は、モノフェノラーゼ活性に対して非競合的である。Emet は、主にジフェノラーゼ活性で使われているので、Type M 阻害剤の Index は大きくなるはずである。これに対して、Edeoxy はジフェノラーゼ活性には大きく関与しないので、Type D 阻害剤の Index は小さくなるはずである。これらのことより、競合阻害であったヒノキチオール、化合物 5、6 は、Type O 阻害剤、非競合阻害であってかつ大きな Index を持った安息香酸及び化合物 3 を Type M 阻害剤、小さな Index を持ったコウジ酸、化合物 2、8、9 を Type D 阻害剤に分類した。Type O 阻害剤のうち、化合物 5、6 は、チロシンと同じフェノール部分を有する。よって、このタイプはチロシンと同じ要領で OH 基を活性中心のほうへ向けて相互作用すると考えられる。ヒノキチオールはトロポロン骨格をもち、そのうち、活性中心へ相互作用する官能基として共役 α -ヒドロキシカルボニル基をもつ。マッシュルームチロシナーゼとトロポロンの共結晶は、*deoxy*-体であった[9]。このことから、トロポロン骨格を持つ化合物は、*oxy*-チロシナーゼに結合すると同時に、配位している酸素を追い出している可能性を示唆する。化合物 5、6 のモノフェノラーゼ阻害作用の IC_{50} はそれぞれ 10.5 μ M、14.7 μ M であった。一方で、ヒノキチオールの IC_{50} は 0.0581 μ M であった。この 3 オーダーの差を考えると、化合物 5、6 は *oxy*-チロシナーゼに対して結合するだけで、酸素を追い出さないなので、強さを発揮できないのではないかと考えられる。

コウジ酸は、ヒノキチオールと同じ α -ヒドロキシカルボニル基を持つが、ヒノキチオールとは異なり、非共役型である。この性質の違いによって、Type D 阻害剤の特徴を持ったと考えられる。

安息香酸は Type M であったが、側鎖の出方によってその誘導体は Type M となったり(化合物 3)Type D となったりした(化合物 2、8、9)。このことは、Type M 阻害剤と

Type D 阻害剤では化合物の活性中心に対するアクセスにはそれほど影響がなく、むしろ、ポケットを構成するアミノ酸残基との相互作用の方が強く影響されていると考えられる。

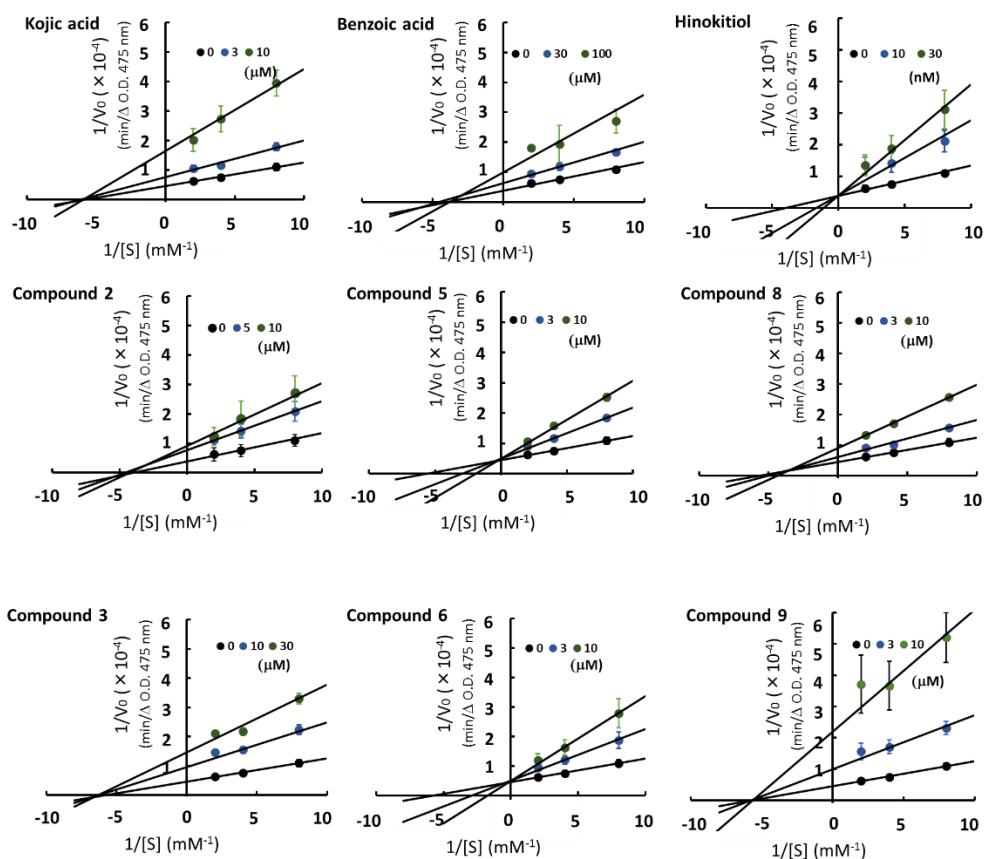


Figure 3.4.4. 低分子基質類似チロシナーゼ阻害剤のマッシュルームチロシナーゼに対するラインウェーバー・バークプロット マッシュルームチロシナーゼ活性は、3.3.節に示した方法で測定した。横軸に $1/[S]$ mM^{-1} 、縦軸に $1/V_0 \text{ min}/\Delta \text{O.D. 475 nm}$ をとった両逆数プロットである。 V_0 は、酵素反応の初速度、 $[S]$ は基質濃度である。化合物の名前と濃度は、それぞれ各グラフの左上と右上に示した。少なくとも 3 回の実験のデータは平均値を示し、エラーバーは SE を示す。

Table 3.4.6. フェニル安息香酸誘導体及びコントロール阻害剤の Index 値と見かけの阻害様式

Index	Compounds	Apparent Types	Types
109.35	Benzoic acid	Non-competitive	Type M
20.97	Compound 3	Non-competitive	Type M
1.00	Kojic acid	Non-competitive	Type D
0.34	Compound 8	Non-competitive	Type D
0.013	Hinokitiol	Competitive	Type O
-2.55	Compound 9	Non-competitive	Type D
-4.12	Compound 2	Non-competitive	Type D
-5.00	Compound 5	Competitive	Type O
-9.75	Compound 6	Competitive	Type O

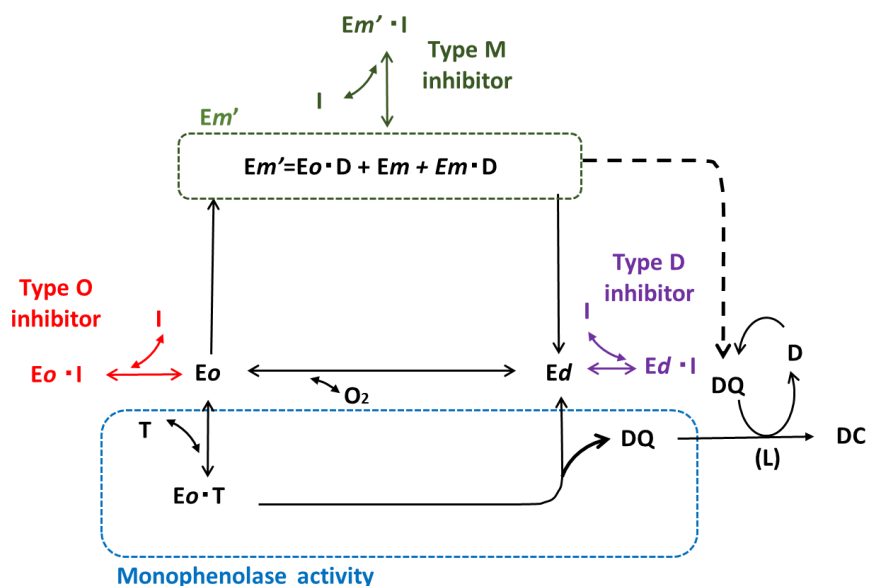


Figure 3.4.5. モノフェノラーゼ活性の単純化モデルと 3 種の阻害剤 Type O inhibitor (赤)、Type M inhibitor (緑)、Type D inhibitor (紫) はそれぞれ、 E_o 、 E_m' 、 E_d へ可逆的に結合するとする。 E_o ; Eoxy、 E_m ; Emet、 E_d ; Edeoxy、 T ; L-Tyrosine、 D ; L-DOPA、 DQ ; dopaquinone、 L ; leucodopachrome、 DC ; dopachrome

3.4.5. 代表的な阻害剤の *in silico* ドッキングシミュレーションによる各フォームへの結合時の自由エネルギー評価

Type O、Type D、Type M 阻害剤の典型的な例、ヒノキチオール、コウジ酸、安息香酸について、*oxy*-、*deoxy*-、*met*-チロシナーゼとのドッキングスタディを行った。その結果、ヒノキチオール、コウジ酸、安息香酸はそれぞれ、*oxy*-、*deoxy*-、*met*-チロシナーゼのモデルに対して、最も低い結合自由エネルギーを示した(Figure 3.4.5.)。このことはヒノキチオールを Type O、コウジ酸を Type D、安息香酸を Type M と分類することの妥当性を支持するものである。

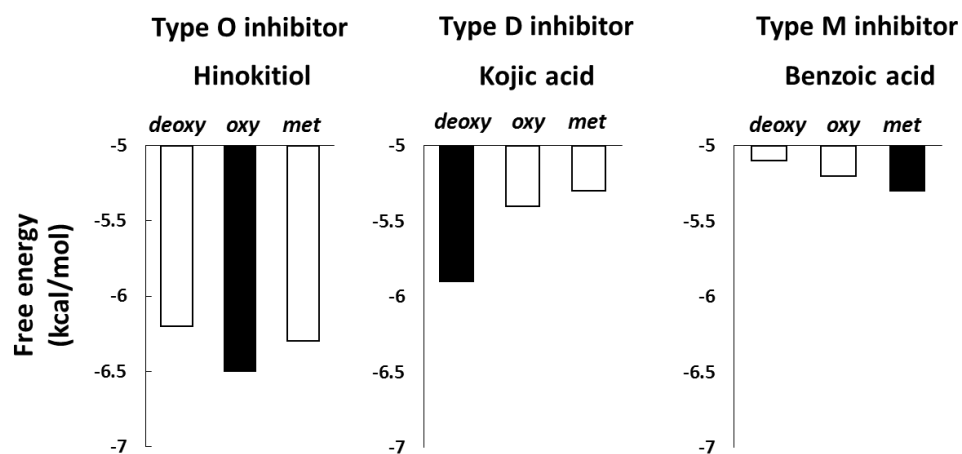


Figure 3.4.6. 代表的な Type O、Type D、Type M 阻害剤の *deoxy*-、*oxy*-、*met*-チロシナーゼのコンピュータモデルに対する *in silico* ドッキング解析 代表的な Type O 阻害剤(ヒノキチオール)、Type D 阻害剤(コウジ酸)、Type M 阻害剤(安息香酸)の *deoxy*-、*oxy*-、*met*-チロシナーゼに対して *in silico* ドッキング解析を行った。黒いバーは各グラフで最もエネルギーの低い値である。

3.5. 本節の結論

多くのチロシナーゼ阻害剤が報告されてきたが、チロシナーゼの3つのフォーム(*oxy*-, *deoxy*-, *met*-チロシナーゼ)のどれに作用しているかについての議論はこれまでにほとんどなされなかった。本節ではこの問題を解決するために、まず、モノフェノラーゼ活性とジフェノラーゼ活性のどちらを優先的に阻害するかを示す **Index** を立式した。この **Index** を計算し、見かけの阻害様式を測定すれば、その組み合わせで各々の阻害剤がターゲットとしているフォームがわかる。もし、阻害剤が *oxy*-チロシナーゼに対して結合するならば、阻害様式は競合阻害になるはずである(**Type O** 阻害剤)。一方で、*deoxy*-チロシナーゼか *met*-チロシナーゼに対して競合的に阻害すれば、みかけの阻害様式は非競合阻害になるだろう(**Type D**、**Type M** 阻害剤)。**Type D** 阻害剤は **Index** の値が小さく、**Type M** 阻害剤は **Index** の値が大きい。この境界はまだはっきりしないが、おそらくコウジ酸(**Type D** 阻害剤)が1つの基準になると考えられる。以上をまとめると、本節で考えたチロシナーゼ阻害剤の **Index** は、阻害剤の作用メカニズムを考える上でこれまでにない重要な情報になりうると結論される。

第4章 チロシナーゼ活性化作用物質の骨格研究

4.1 背景・目的

第1章1節でも述べたように、人々の美白への関心は高く、チロシナーゼに対する阻害剤が多数検討されてきた。一方で、白色人種の文化において、肌の色を小麦色に焼くことが経済的なステータスとなる場合があるという[63, 64]。よって、皮膚の色調を理想的な小麦色に呈色させるような素材、及びそれを含む化粧料の開発に対する潜在的な要望がある。しかしながら、活性化剤の報告は阻害剤のそれに比べるとほとんどない。第2章では、フェニル安息香酸(PBA)誘導体のチロシナーゼ阻害能について調べ、その阻害活性に重要であると考えられるチロシナーゼの活性中心の構造的な特徴について考察した。そこで本章ではそれとは逆に、PBA 誘導体の中からチロシナーゼ活性化作用を持つ物質を見出すことを目的とした。さらに、活性化作用を発揮するのに重要なマッシュルームチロシナーゼのアクティブポケットの構造について、*in silico* 手法を用いてより詳細に解析する。

4.2. 実験材料・試薬・方法

4.2.1. 材料

化合物 5-1、5-2、5-3、5-4、5-5 は、それぞれ Combi-Blocks 社より購入した。コントロール化合物である 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene 2-O-beta-D-glucoside (THSG)、 α -Arbutin は、それぞれ SIGMA、和光純薬工業株式会社にて購入した。いずれも、ジメチルスルホキシド(DMSO)に 100 mM で溶解し、適宜希釈して試験に供した。

4.2.2. チロシナーゼ活性の測定

チロシナーゼ活性の測定は、第2章2.2.2.節に示した方法を用いて行った。

4.2.3. コンピュータを用いた阻害様式の予測

ドッキングスタディは、第3章 3.3.3.節に示した方法を用いて行った。

4.3. 実験結果

4.3.1. 活性化剤候補化合物の選定

チロシナーゼ活性化剤として報告されている数種の化合物(1.節も参照)を比較すると、フェノール性水酸基を持つものが多いことが見て取れる。そこで、フェニル安息香酸誘導体のうち、4'-水酸化 3-PBA(化合物 5: Table 2.3.2.)の誘導体 (化合物 5-1、5-2、5-3、5-4)についてチロシナーゼ活性化作用を調べることにした(Figure 4.3.1.)。

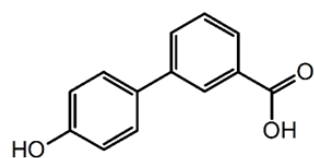
4.3.2. 化合物 5 誘導体のチロシナーゼ阻害及び活性化作用

2.3.1.節と同様の方法で、化合物 5 誘導体のモノフェノラーゼ活性及びジフェノラーゼ活性について調べたところ、Figure 4.3.2.の結果を得た。驚くべきことに、全ての化合物 5 誘導体は、濃度を高くするとモノフェノラーゼ活性を阻害したが、化合物 5-2、5-3、5-4、5-5 は、低濃度ではむしろ、ある特定の濃度域で、2.8~72.8%の活性化作用を示した(これを、セミアクチベーション(Semi-Activation)と呼ぶことにする)。また、ジフェノラーゼ活性の評価では、化合物 5-1、5-2、5-3、5-4 は濃度依存的にシグモイドカーブを描き、活性化作用が認められた。一方で、化合物 5-5 はジフェノラーゼ活性に対しては阻害作用を示した。コントロールとして、THSG 及び α -アルブチンに対しても同様の実験を行ったところ、THSG ではモノフェノラーゼ活性に対しては 200%以上の非常に強い活性化作用を示したが、ジフェノラーゼ活性に対しては弱い活性化作用であった。また、 α -アルブチンはモノフェノラーゼ活性に対しては活性化作用を示さなかったが、ジフェノラーゼ活性に対しては弱い活性化作用を示した。これらのことから、化合物 5 の誘導体のうち、化合物 5-2、5-3、5-4、5-5 は、活性化メカニズムがこれまでの報告されている活性化剤とは異なる新しいタイプの活性化剤である可能性が示唆された。また、化合物 5-1 は α -アルブチンと同様のタイプの活性化剤である可能性が示唆

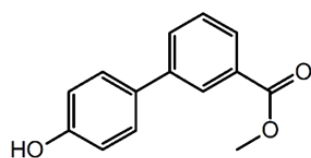
された。

阻害作用／活性化作用の定量化には、次の指標を用いた。モノフェノラーゼの阻害作用は、薬剤未処理の活性を 100 とした場合、活性が 50%となる点を見かけの 50%阻害能度(IC_{50}^{app})としてグラフから読み取り、評価した。モノフェノラーゼの活性化作用は、最も比活性が高いところの活性を最大活性化力(A_{max}^T)と定義し、比較した。ジフェノラーゼ活性の活性化作用も同様に最大活性化力(A_{max}^D)と定義し、比較した。そして、50%活性化された活性化剤濃度(AC_{50})をグラフから求め、比較した(Table 4.3.1.)。

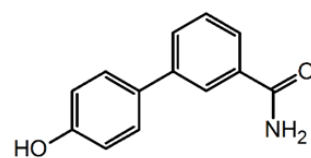
その結果、モノフェノラーゼ活性に対しては、化合物 5-3($A_{max}^T = 172.8\%$)、ジフェノラーゼに対しては、化合物 5-2($A_{max}^D = 144\%$)が最も高いチロシナーゼ活性化作用を示すことが判明した。



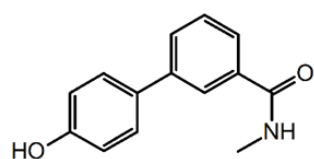
Compound 5



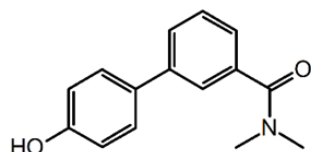
Compound 5-1



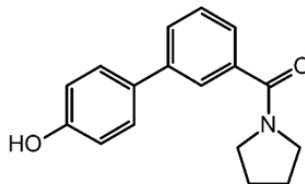
Compound 5-2



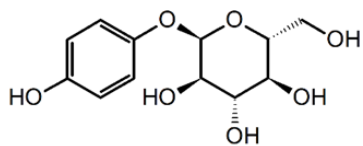
Compound 5-3



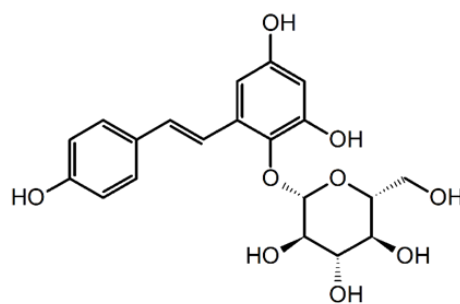
Compound 5-4



Compound 5-5



α -Arbutin



THSG

Figure 4.3.1. 化合物 5 (4'-hydroxy-3-phenylbenzoicacid) 誘導体及び既知のチロシナーゼ活性化剤(α -アルブチン、THSG)の化学構造式

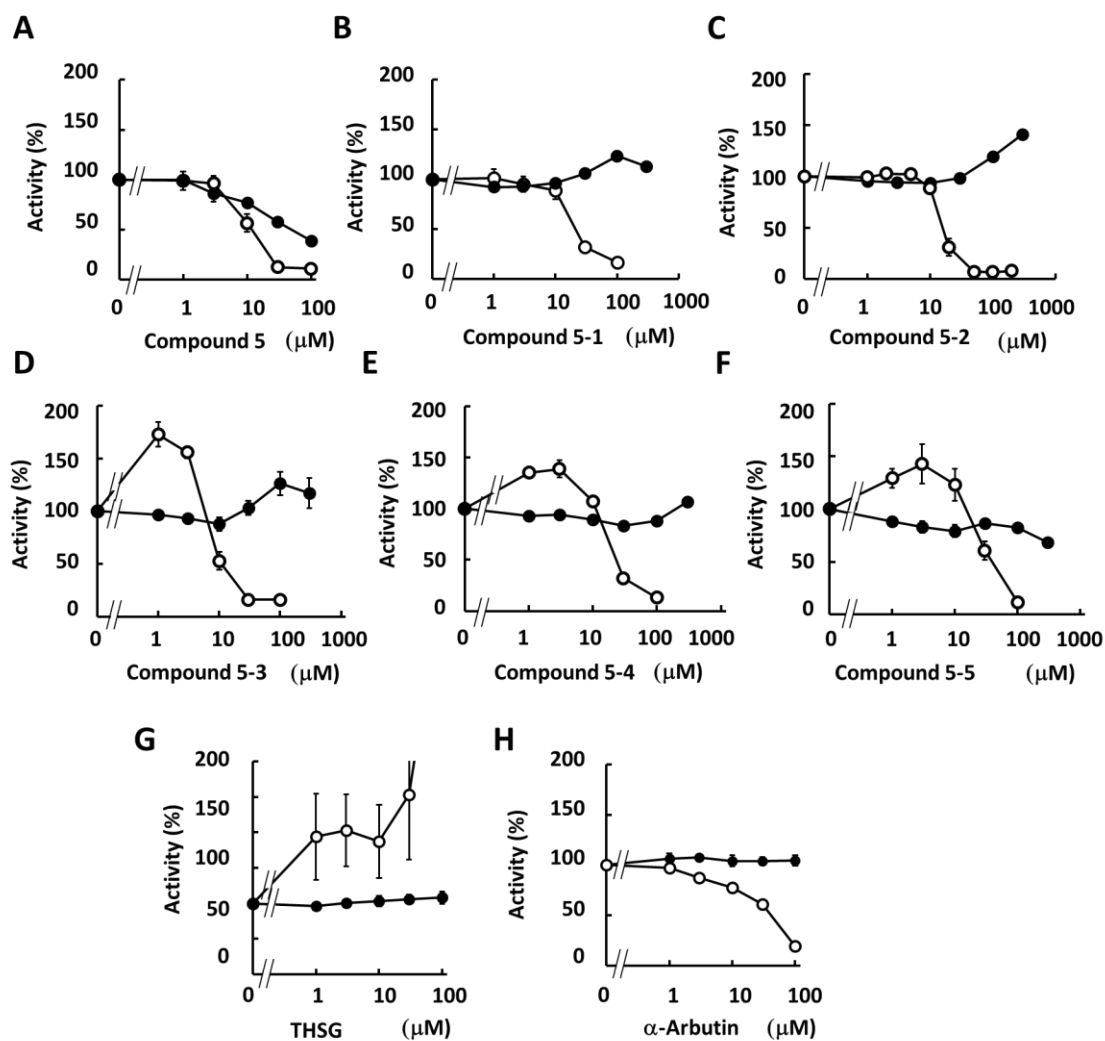


Figure 4.3.2. 化合物 5 (4'-hydroxy-3-phenylbenzoicacid) 誘導体及び既知のチロシナーゼ活性化剤(α -アルブチン、THSG)のチロシナーゼ阻害作用 L-チロシンを基質とした場合(A : ○)及び L-DOPA を基質とした場合(B : ●)のチロシナーゼ阻害活性について示している。データは比活性(%)として表記した。データは 3 回の独立な実験の平均値 \pm SE で表示した。

Table 4.3.1. チロシナーゼに対する化合物 5 類縁体及びコントロール化合物の阻害／活性化作用と Index 値

Compounds	Monophenolase		Diphenolase		
	A_{\max}^T (%)	IC_{50} (μ M)	A_{\max}^D (%)	AC_{50} (μ M)	Index
Compound 5	Inhibition	10.59	Inhibition	$IC_{50} = 57.2$	-5.00
Compound 5-1	Inhibition	21.15	118.0	30.32	11.4
Compound 5-2	102.8	18.11	144.1	> 101.5	< -5.87
Compound 5-3	172.8	10.93 ^a	121.7	31.28	1.02
Compound 5-4	138.7	23.21 ^a	106.7	190.6	-15.2
Compound 5-5	142.7	38.89 ^a	Inhibition	$IC_{50} > 500$	< -40.4
α -Arbutin	Inhibition	41.64	106.0	< 1	> 40.8
THSG	> 551.8	$AC_{50} > 50$	108.2	> 10	—

A_{\max}^T : モノフェノラーゼ活性に対する最大活性化力 IC_{50}^{app} , T : モノフェノラーゼ活性に対する見かけの IC_{50} 、 A_{\max}^D : ジフェノラーゼ活性に対する最大活性化力)、 AC_{50} : A_{\max}^D の 50% を活性化する濃度、 a : みかけの IC_{50} 値

4.3.3. *in silico* ドッキングシミュレーションによる活性化モデルの構築

第3章でモノフェノラーゼ活性の IC_{50} とジフェノラーゼ活性の IC_{50} を比較する値として

$$IC_{50}^T = 0.75(IC_{50}^D)^{0.75} \quad (4-14)$$

を示した。この計算法を拡張して、 IC_{50}^D の代わりに AC_{50}^D も用いて計算すると、Table 4.3.1.に示す値となる。化合物 5-1 及び α -アルブチンの Index と比較して、5-2、5-3、5-4、5-5 の Index は小さいか、負の値を示す。すなわち、化合物 5-2、5-3、5-4、5-5 は、*oxy*-チロシナーゼに優先的に結合している可能性が高い。一方で、化合物 5-1 及び α -アルブチンは、*met*-チロシナーゼと結合している可能性が高い。THSG は Index を評価できなかったが、モノフェノラーゼに対する作用が非常に強く、低濃度でも活性化作用を示すので、*oxy*-チロシナーゼに対するドッキングシミュレーションを行った。そこで、化合物 5、5-1、5-2、5-3、5-4、5-5、THSG を *oxy*-チロシナーゼに対して、化合物 5-1、 α -アルブチン、THSG を *met*-チロシナーゼに対して *in silico* ドッキング解析を行った (Figure 4.3.3.). そして、このモデルにおいて各化合物とマッシュルームチロシナーゼとの相互作用に重要なアミノ酸との結合様式の予測を行った。

化合物 5 は、モノフェノラーゼ活性に対してもジフェノラーゼ活性に対しても阻害剤として振る舞い、フェニル基と Asn260 との並行 π - π 相互作用が予測された (Figure 4.3.3. A)。化合物 5-1 と α -アルブチンは、モノフェノラーゼ活性に対しては阻害作用を示し、ジフェノラーゼ活性に対しては活性化作用を示した。このうち、化合物 5-1 及び α -アルブチンでは、His244 との相互作用が予測された (Figure 4.3.3. B)。化合物 5-2、5-3、5-4 はモノフェノラーゼ活性をセミアクチベーションし、ジフェノラーゼ活性を活性化した。これらの化合物では Arg268 との水素結合が予測された (Figure 4.3.3. C)。化合物 5-5 は、モノフェノラーゼ活性に対してセミアクチベーションであり、ジフェノ

ラーゼ活性に対しては阻害作用を示した。ドッキングシミュレーションの結果、*oxy*-チロシナーゼとの間には目立った相互作用が見られなかった(Figure 4.3.3. E)。モノフェノラーゼ活性、ジフェノラーゼ活性双方を活性化した THSG は、His244 及び His85 と水素結合している可能性が高いと考えられる。

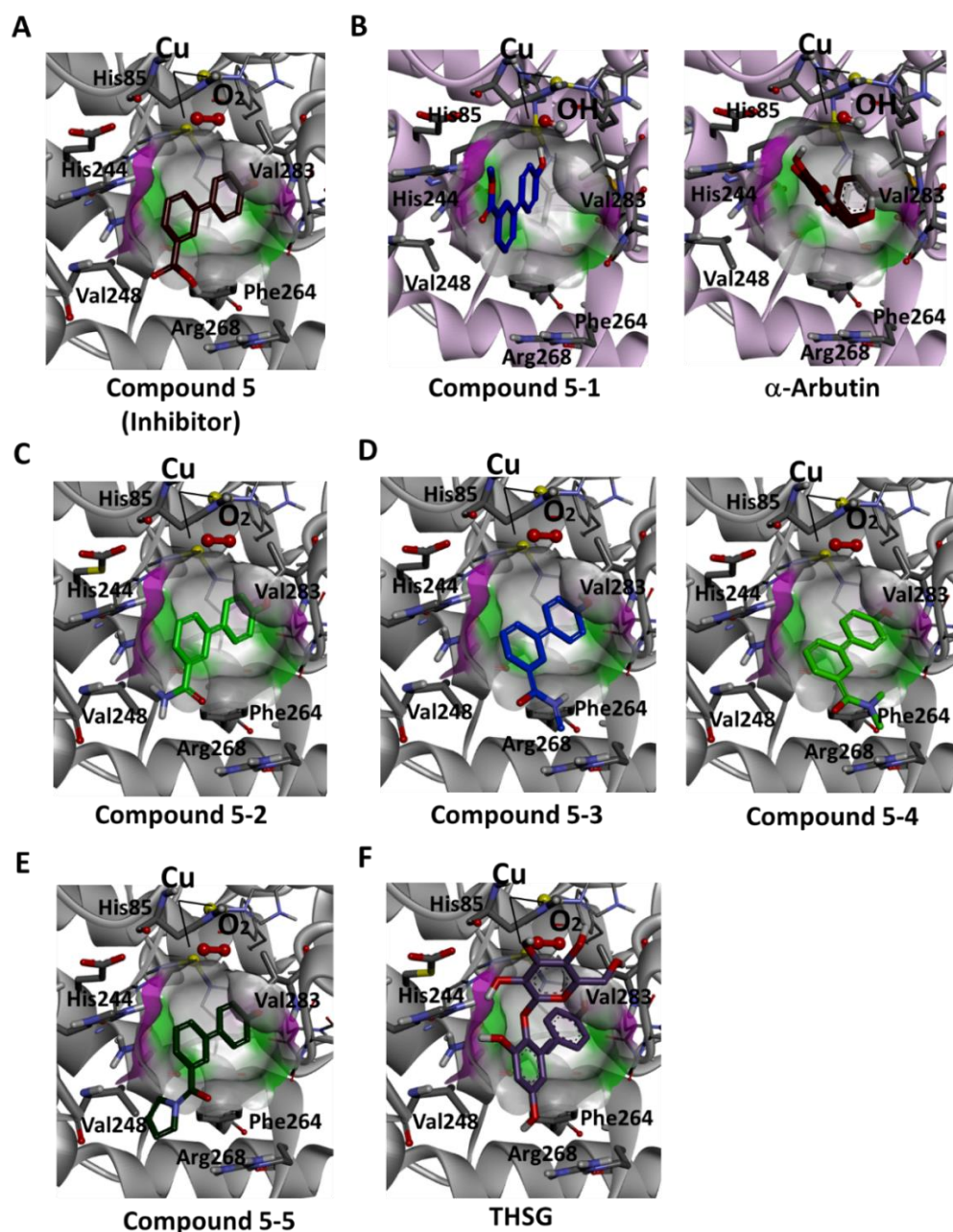


Figure 4.3.3. 化合物 5 類縁体及び α -アルブチン、THSG のマッシュルームチロシナーゼの活性中心に対する結合様式 A 化合物 5(茶)の *oxy*-チロシナーゼに対する結合様式 B 化合物 5-1(青：左)及び α -アルブチン(赤茶：右)の *met*-チロシナーゼに対する結合様式 C 化合物 5-2(オレンジ)、5-3(マリン)、5-4(グリーン)の *oxy*-チロシナーゼに対する結合様式 D 化合物 5-5(モスグリーン)の *oxy*-チロシナーゼに対する結合様式。 A-D アミノ酸残基の炭素鎖、酸素原子、窒素原子、銅イオンは、それぞれグレー、レッド、薄青、イエローで表示してある。活性中心から遠いアミノ酸はバックボーンとして、薄い灰色(*oxy*-チロシナーゼ：A、C、D、E(左))及び薄いピンク(*met*-チロシナーゼ：B、E(右))のリボン表示である。

4.3.4. 化合物 5-2 のマッシュルームチロシナーゼによる代謝反応

活性化剤の活性化メカニズムについてより詳細に解析するために、化合物 5 類縁体の中で最もジフェノラーゼ活性の活性化作用が大きかった化合物 5-2 を選択し、モノフェノラーゼ活性に対してラインウェーバー・バークプロットを作成した。モノフェノラーゼ活性に対して解析を行ったのは、 $[T] \gg [D]$ の条件が満たされることで系を単純化できるからである(第 3 章 3.2.節参照)。Figure 4.3.4.A に示すように、グラフは 1 点に収束しなかった。化合物 5-2 の濃度が $5 \mu\text{M}$ の場合、 K_m と V_{max} は増大した。この意味するところは、L-チロシンに対するみかけの親和性は低下したが、反応物の生成速度は上昇したことを意味する。しかし、 $10 \mu\text{M}$ の処理によって反応速度自体は大きくならなかったが、 K_m が小さくなり、 $0 \mu\text{M}$ の K_m と同等になった。そこで、この結果は、酵素の状態が変化していることによって引き起こされた結果であると考えた。このとき、Figure 4.3.4. B に示すように化合物 5-2 自身も代謝されているはずである。チロシナーゼによって代謝される化合物としてカテキン類、3-ヒドロキシキヌレニンなどが報告されており、いずれもフェノール構造を持つ化合物である[34, 65]。特に、3-ヒドロキシキヌレニンは、マッシュルームチロシナーゼ活性化作用を示す物質としても報告されている[34]。化合物 5-2 もフェノール構造を持ち、チロシナーゼ活性化作用を持つので、チロシナーゼによって代謝される可能性は十分に考えられる。そこでまず、化合物 5-2 の紫外可視吸光スペクトルを測定したところ、 270 nm の吸収極大波長を持ち、その吸光度は濃度に比例した($R^2 = 0.9942$)(Figure 4.3.4. C)。そこで、反応バッファー中にチロシナーゼのみ(E)または化合物 5-2 のみ(C)あるいはその両方を加えて、 270 nm の吸光度を経時的に測定したところ、両方を加えた場合のみその吸光度は時間依存的に減少した(Figure 4.3.4. D)。仮に化合物 5-2 が代謝を受けているとすれば、*o*-キノン体が生成されるはずである。そこで、*o*-キノン体と特異的に反応して安定な誘導体を形成する化合物である 3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazone Hydrochloride (MBTH)を反応溶液中に

加え、紫外可視吸光スペクトルの変化を観測したところ、330 nm 付近に特異的な変化が観察された(Figure 4.3.4. F)。そこで、チロシナーゼ(E)、化合物 5-2(C)及び MBTH(M)を混合し、330 nm の吸光度の変化を経時的に測定したところ、時間依存的にシグモイド曲線を描き、吸光度の値が増加した(Figure 4.3.4. G)。E、C、M のいずれかひとつを除くと、この吸光度の値の増加は見られなかった。上記の結果から、化合物 5-2 はチロシナーゼによって代謝されている可能性が示唆された。

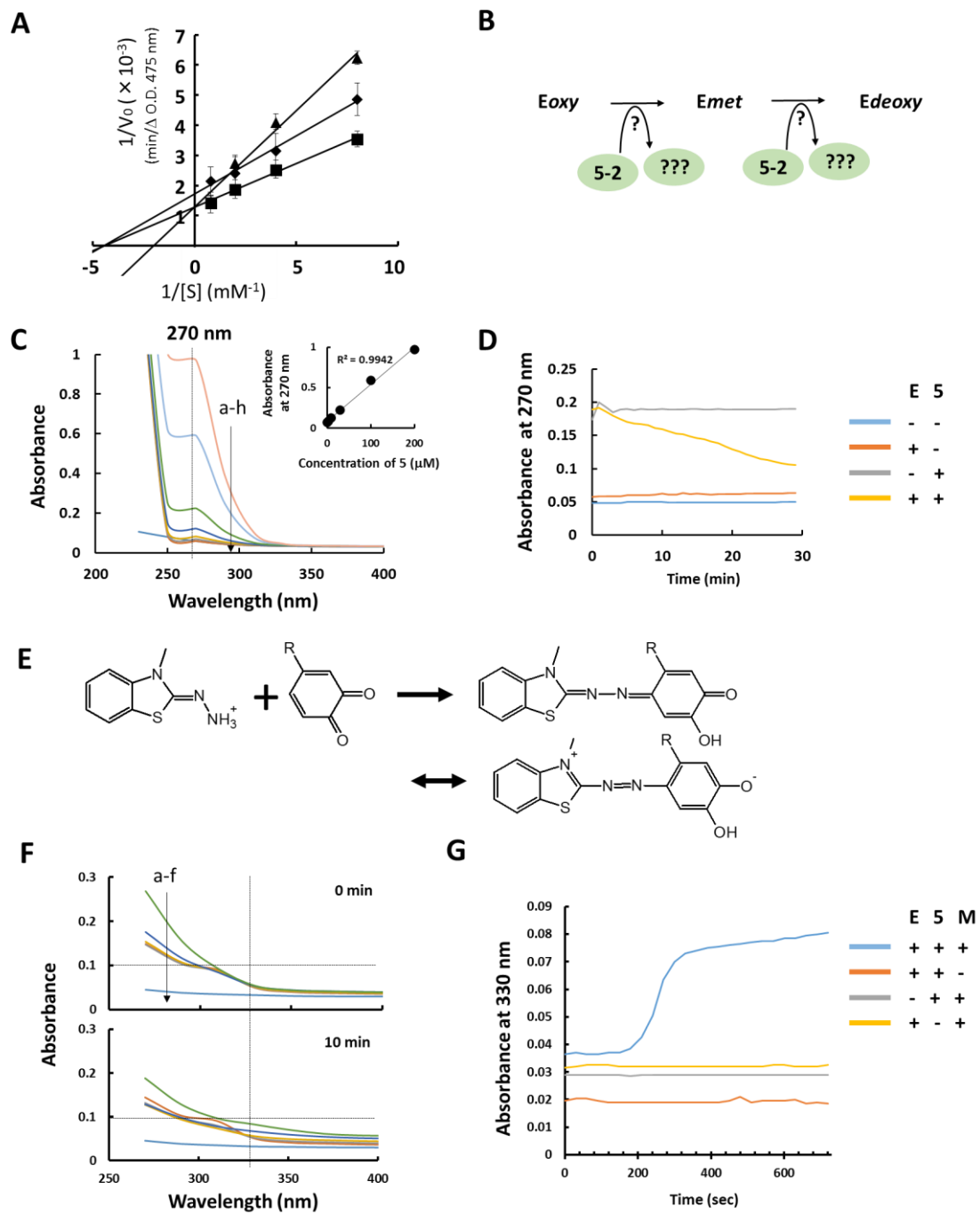


Figure 4.3.4. (前頁)化合物 5-2 のマッシュルームチロシナーゼによる代謝反応 A 化合物 5-2 のモノフェノラーゼ活性に対するラインウェーバー・バークプロット。化合物 5-2 はそれぞれ 0 μM (◆)、5 μM (▲)、10 μM (■)である。B 化合物 5-2 の代謝とチロシナーゼのフォームの変化のモデル図 Eoxy : oxy-チロシナーゼ、Emet : met-チロシナーゼ、Edeoxy : deoxy-チロシナーゼ。C 様々な濃度における化合物 5-2 の吸光度。a-f ; 化合物 5-2 を 50 mM リン酸カリウム緩衝液に溶解したもの。濃度はそれぞれ a : 200、b : 100、c : 30、d : 10、e : 3、f : 1、g-h ; コントロール g : DMSO、h : バッファーD 化合物 5-2 の特異的吸光度(270 nm)のマッシュルームチロシナーゼによる変化。E : Enzyme(4 U マッシュルームチロシナーゼ)、C : 30 μM 化合物 5-2 E 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone hydrochloride (MBTH)と *o*-キノンの反応。Winder らの論文(Eur J Biochem, 1991, Fig. 1)を参考に作成した[66]。(F) 化合物 5-2-チロシナーゼの反応系における MBTH の効果 MBTH と *o*-キノンの adduct による 330 nm の吸光度(タテの点線を補助線としている)変化。混合後 0 min (上のパネル)、及び混合後 10 min (下のパネル)の様子。化合物 5-2 の濃度はそれぞれ a : 30、b : 10、c : 3、d : 1、e-f ; コントロール、e : DMSO、f : バッファー (F) マッシュルームチロシナーゼ(E)、30 μM 化合物 5-2(C)及び MBTH(M)を組み合わせる混合した際の吸光度の経時的変化。+ : 系に加えたことを示す、- : バッファーのみ

4.4. 考察

Fitzpatrick はオーストラリア人の肌色の研究から、ヒトの肌の色を 3 タイプに分類した (Skin Phototype)。その後、この概念は拡張され、現在 6 タイプに分類されている(第 1 章 1.2. 節参照)。スキنفォトタイプ I ~ III の人種では、肌が日光にさらされてもメラニン産生力が弱いため黒くならず、従って紫外線による DNA ダメージに対してより脆弱であるといえる。美容的・社会的観点からも白人文化においては小麦色に焼けた肌は憧れの対象であり、肌を黒くすることの需要については 4.1. 節に述べた通りである。ヒトのメラノサイトの数は、人種間では差がないといわれており、その差はチロシナーゼの活性であるとされている。つまり、肌色の調節を行うためのアプローチとして、チロシナーゼの活性中心の構造について理解しておくことの重要性はきわめて大きい。マッシュルームとヒトチロシナーゼの配列相同性は、わずか 23% 程度であるが、活性中心では空間的配置も含めると類似している部分もある(第 5 章にて詳細を論じる)。現在マッシュルームチロシナーゼでは Table 1.4.2.(第 1 章 1.5.2. 節)に示したような活性化剤が報告されているが、その活性化メカニズムについてはほとんど解析されていない。しかし、マッシュルームチロシナーゼとヒトチロシナーゼの構造を対比させることでこれらの化合物のヒトチロシナーゼへの応用、あるいはその後の構造最適化が可能になると考えられる。そこで本章ではマッシュルームチロシナーゼ活性化剤として 3-フェニル安息香酸誘導体の化合物 5 を、既報の α -アルブチンと THSG と比較しながらその特性を検討し、*in silico* ドッキングシミュレーションの手法を用いて活性化メカニズムについて構造学的な考察を行った。

化合物 5 の誘導体のうち、THSG と同様の作用を示すもの、すなわち、モノフェノラーゼとジフェノラーゼの両方の活性を濃度依存的に促進するものはなかった。一方で、 α -アルブチンのようにモノフェノラーゼ活性を阻害するがジフェノラーゼ活性は活性化する化合物として化合物 5-1 及び 5-2 が見出された。モノフェノラーゼに対し、部分的な活性化(セミアクチベーション)を示した化合物は 3 つ(化合物 5-3、5-4、5-5)であり、そのうち、ジフェ

ノラーゼ活性に対する活性化作用を発揮したのは化合物 5-3 及び 5-4 であり、化合物 5-5 は逆に阻害作用を示した。化合物 5 誘導体のうちで最も活性化作用を示した化合物 5-2 についての詳細な解析から少なくとも化合物 5-2 のジフェノラーゼ活性化作用については化合物自身が基質となって代謝され、変化を受けている可能性がある。3-ヒドロキシキヌレニンは基質であり、活性化剤でもあるので Sanjust らは Substrate/Activator と呼んだ[34]。化合物 5 誘導体は、同じ類の作用を示している可能性もある。

前章では、次のような問題提起を行った。チロシナーゼには *oxy*-, *deoxy*-, *met*-チロシナーゼの 3 種類のフォームが知られているのに、なぜ阻害剤のメカニズム推定ではそのことに触れないのであろうか、という疑題である。そこで、その解答の 1 つとして化合物のモノフェノラーゼに対する作用とジフェノラーゼに対する作用の差を Index という数値を指標として表し、見かけの阻害様式より真の阻害メカニズムを推定する方法について論じた。酵素の活性化は、アロステリック部位を介した酵素のコンホメーション変化を介するという報告は多い。しかし、第 3 章 3.4.4 節で論じたように、基質類似構造である PBA 類似体が別の部位に結合するとは考えにくい。その上で、基質結合部位を化合物が共有することで活性化作用が引き起こされることは、どのように理解すればよいだろうか。私は、このモデルとして、阻害剤の場合と同様にして、チロシナーゼの 3 つのフォームを区別すれば説明が可能であるのではないかと考えた。これまでに、Xie らが 4-ヒドロキシフェニル酢酸について、モノフェノラーゼ活性は阻害するが、ジフェノラーゼ活性は活性化することを報告している。その理由について、*oxy*-フォームを阻害するが *met*-フォームを活性化することが原因なのではないかと考察している[33]。一方、Qin らは、 α -アルブチンが同様の作用を持つことについて α -アルブチンが *oxy*-フォームに対して自殺基質となる一方で、活性化作用に関してはアロステリック作用のような機構でチロシナーゼのコンホメーション変化を引き起こすためではないかと論じている[32]。これらの考えに対して、私の見解は異なるものである。それは、化合物 5-2 が代謝されていたことから、活性化剤は自身が代謝を受けて活性化作用

を示す可能性を考えていることである。もしそうであるならば、チロシナーゼのフォームも変化する可能性もある。この立場に立ったモデルを Figure 4.3.5.に示した。これについて以下に説明する。

化合物が *oxy*-チロシナーゼに結合する場合、化合物自身は代謝され、*oxy*-チロシナーゼを *met*-チロシナーゼへと変化させる(タイプ I 活性化剤 : A_I)。 *met*-チロシナーゼに結合する場合、*met*-チロシナーゼを *deoxy*-チロシナーゼへと変化させる(タイプ II 活性化剤 : A_{II})。酸素が溶液中に飽和していれば、これはすぐに *oxy*-チロシナーゼとなるので、この時点では、間接的に *oxy*-チロシナーゼは増加するが、*met*-チロシナーゼの量が足りなければモノフェノラーゼ活性は減弱すると考えられる。また、 A_I と A_{II} の両方の作用を持つ化合物も想定する。さらに、その結合比率や親和性のバランスでモノフェノラーゼ活性の濃度依存的な活性化作用を持たせることもできると考えられる(例 : THSG)。しかし、今回の化合物 5 誘導体の中には、そのような性質を持つ化合物は見出せなかった。

本研究では、はじめて THSG とマッシュルूमチロシナーゼの結合モードを *in silico* で予測した(Figure 4.3.4. F)。これにより、THSG は His85 残基との相互作用が予測された。His85 は、マッシュルूमチロシナーゼの活性中心に銅原子をキレートしているヒスチジン残基の 1 つであり、反応に関わる酵素の部分構造そのものを直接的に変化させている可能性がある。

これまでチロシナーゼ活性化剤の研究、探索は行われてこなかった。本研究において、活性化作用に重要であると考えられるアミノ酸残基についてはじめて言及した。タイプ I 活性化に重要なアミノ酸残基との相互作用は Asn260、Arg268 との水素結合が考えられ、タイプ II 活性化に重要なものは His244 との水素結合と考えられた。また、そのほかに、His85 との水素結合が、THSG のように強力な活性化作用を示す可能性も示唆された。また、本章で見出された化合物の骨格は、構造最適化によってチロシナーゼ活性を高めるための薬剤として、白斑やパーキンソン病などの治療への応用が可能であると期待される。以上のことか

ら、チロシナーゼ活性化剤をヒト疾患に応用することは非常に興味深いものであるが、2つの障壁がある。1つは活性化に重要なアミノ酸がヒトでも保存されているかどうか、もう1つはチロシナーゼの活性化を引き起こせたとして、その考え自体が妥当かどうかということである。

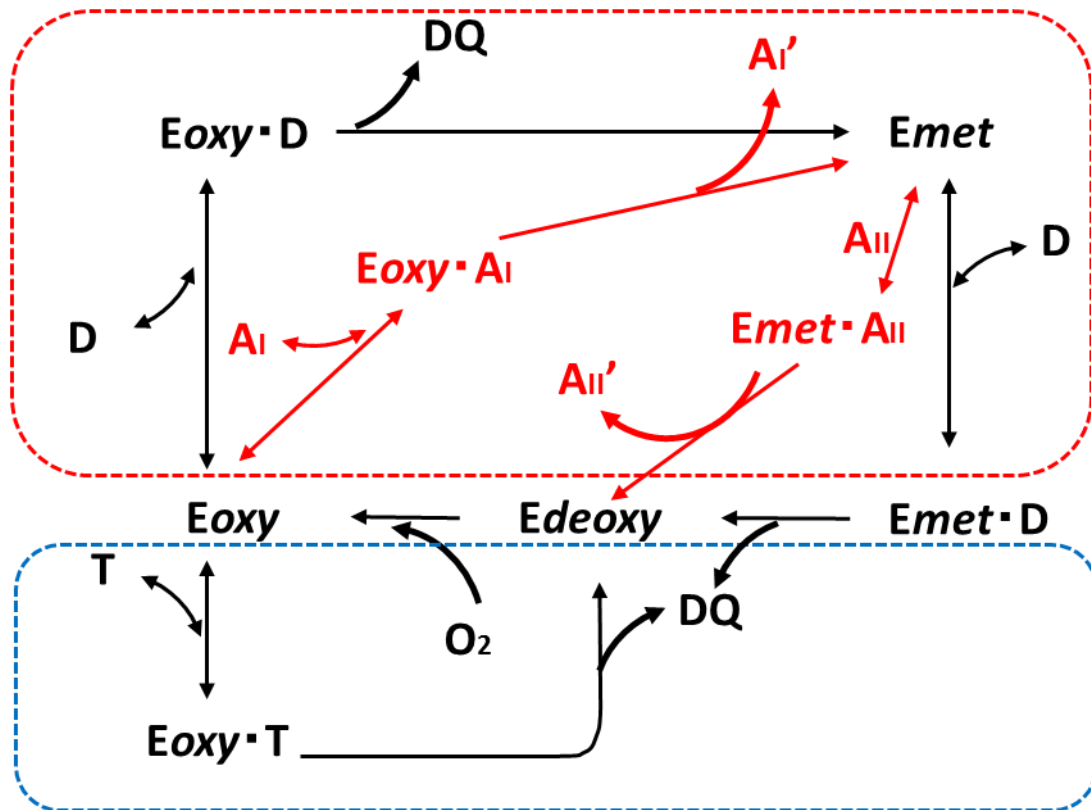
尋常性白斑(白斑症、白癜; vitiligo)は、皮膚に不規則な色素欠失症状を呈する疾患であり、発症頻度は0.5-2%である。原因は、メラノサイトに対する自己免疫反応と、活性酸素の発生も一要因と考えられている。メラノサイトが脱落しておれば、チロシナーゼはそこに存在していないのではないかという指摘もなされる。しかし、近年メラノサイトを復活させる方法として、Narrow-Band UVB (NBUVB)照射療法が行われている。NBUVBは、 311 ± 2 nm というごく狭い領域の波長の紫外線及びそれを用いた光線療法の名称であり、乾癬やアトピー性皮膚炎にも用いられる。この光線は、皮膚に対する紫外線の影響を抑えつつ、T細胞にアポトーシスを引き起こし過剰な炎症を抑制することによって治療効果を出すことができるとされているが、白斑症においては、近年の研究で、NBUVBの照射によって毛包のバルジからメラノサイトのステムセルが遊走することを促し、表皮におけるメラノサイトの再分布が引き起こされることが示されている[67]。この併用薬としてチロシナーゼ活性化剤は有効であると考えられるが、これまでに応用例は見られない。

パーキンソン病は、錐体外路症状を示す進行性の神経変性疾患であり、中脳の黒質にあるドパミン神経の消失が原因の1つであるとされる。従って、病変部は、黒質の脱色を伴う[68]。この黒質の色はメラニンであり、ニューロメラニンと呼ばれる。ニューロメラニンの生成に対するチロシナーゼの寄与については、議論が分かれている。黒質ニューロンでは、チロシナーゼの mRNA の発現が確認されているが、チロシナーゼタンパク質はみることができない[69]。また、チロシナーゼ欠損の個体であるアルビノ個体の黒質は黒く、メラニンを含むという報告がある[70]。これらの報告では、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)がメラニン合成を担っているとされている。一方で、TH が null のマウスでチロシナーゼによる

ドパミンの合成を示した報告もある[71]。また、アポモルフィンにより誘発したパーキンソンモデルマウスにおいて、自身のメラノサイトを黒質に移植することでパーキンソン病モデルマウスの代表的な行動である回転行動が抑制されたという報告もある[72]。しかし、この実験では、アルビノのメラノサイトを移植しても回転行動の改善が見られており、いまだチロシナーゼの黒質における役割には疑問が残っている。チロシナーゼの活性化が戦略として適切であるか否かはこれからの研究を待たなければならない。

本研究ではマッシュルームチロシナーゼ活性化作用物質の基本骨格及びそれと相互作用しうるマッシュルームチロシナーゼの活性中心の構造について明らかにした。これらの知見はチロシナーゼ活性化剤の応用研究の第一歩であると考えている。

Diphenolase activity



Monophenolase activity

Figure 4.3.5. チロシナーゼの2つの活性サイクルにおける活性化剤の作用機序モデル タイプ I 活性化剤 (A_{I})は *oxy*-チロシナーゼ(Eoxy)に結合し代謝され、 A_{I}' となる一方で、*oxy*-チロシナーゼを *met*-チロシナーゼ (Emet)に変換する。タイプ II 活性化剤(A_{II})は *met*-チロシナーゼ(Emet)に結合し代謝され、 A_{II}' となる一方で、*met*-チロシナーゼを *deoxy*-チロシナーゼ(Edeoxy)に変換する T: L-チロシン、D: L-DOPA、DQ: L-ドパキノン、 A_{I} , A_{II} :活性化剤

第5章 ヒトチロシナーゼ活性の阻害に重要な活性中心の構造に関する研究

5.1. 背景

美白化粧品または色素異常疾患治療薬としてチロシナーゼ阻害剤を考える場合、ヒトチロシナーゼでの評価が必要であるが、多くの場合マッシュルームチロシナーゼで代用されている。しかし、マッシュルームチロシナーゼとヒトチロシナーゼの配列相同性は 23% と低い(Figure 5.1.1.)。また、マッシュルームチロシナーゼが遊離の酵素であるのに対し、ヒトチロシナーゼは膜結合型の酵素であるという違いもある。ヒトチロシナーゼは、メラノサイト中のメラノソームという特殊な構造体の中に存在する。チロシナーゼはゴルジ体で糖鎖修飾を受けた後、メラノソーム内に輸送される。メラノソームは、リソソーム由来のオルガネラであり、膜状のプロトンポンプによって内部は細胞質内に比べると酸性である。メラノソームは成熟の段階によって I~IV 期に分類される。初期メラノソームでは pH = 5.0 であり、最終的に 6.8 となるといわれている。チロシナーゼの C 末端は細胞質側であり、N 末端はメラノソーム内に位置する。C 末端には 2 つのリン酸化部位があり、PKC β によってリン酸化されることで活性が約 2.5 倍上昇するといわれている。メラノソーム内には膜上にチロシンヒドロキシラーゼアイソフォーム I(THI)があり、L-チロシンを L-DOPA に変換している。イムノゴールド電子顕微鏡観察の手法によって、THI とチロシナーゼはメラノソーム膜状で隣り合わせになっていることが報告された。また、THI の至適基質濃度が μM オーダーであるのに対し、チロシナーゼのモノフェノラーゼ活性の至適基質濃度は mM オーダーである。メラノソームへの L-チロシンの供給は受動拡散によるとされており、実際にはモノフェノラーゼ活性は機能していないという可能性も報告されている。したがって、ヒトではモノフェノラーゼ活性を THI へ分担している可能性も指摘されている。[73]。

よって、大腸菌で発現させたチロシナーゼは前述のような修飾を受けない上に、膜結合状態でもないため、活性は修飾を受けたものに比して小さいと考えられるが、ヒトチロシ

ナーゼを大腸菌で発現させ、その活性を測定する研究は試みられている。Chen らは、大腸菌で発現させたヒトリコンビナントチロシナーゼを精製し、酵素学的な性質を調べている。この酵素は N 末端側 168-531 アミノ酸部分のみであり、分子量 57.0 kDa のタンパク質であるが、活性は保持している。ジフェノラーゼ活性の至適温度は 70℃で至適 pH は 8.5 であった[74]。Jeon らは同様に、大腸菌の過剰発現系によって作成した全長(66 kDa)のヒトリコンビナントチロシナーゼを用いて活性測定系を作成しており、ジフェノラーゼ活性の至適温度は 50℃、至適 pH は 7.5 であった[75]。

そこからさらに一步進んだ方策としては、ヒト培養細胞を用いるものがある。Boo らのグループは、ヒトチロシナーゼを HEK293T 細胞に発現させ、その cell-free extract を使ってヒトチロシナーゼ阻害剤及び阻害作用を持つ植物抽出液の探索を行っている[76, 77]。この方法のメリットはチロシナーゼを過剰に発現させられること、及びヒト細胞による修飾が受けられるというものであるが、メラノソームという構造体がないことが課題となる。そこで、メラノーマ細胞からのチロシナーゼあるいはメラノソームの cell-free extract を用いる方法も取られている。江崎グリコの Sugimoto らは、HMV-II 細胞の細胞破碎液の上清を用いて、ジフェノラーゼ活性を測定した[78]。それらの研究によれば、ヒトチロシナーゼの活性は他の生物種(特にマッシュルーム)に比べ、著しく小さい。Winder らは 1991 年に、3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazine Hydrochloride (MBTH ; 第 4 章 Figure 4.3.4.E も参照)を用いて、生成した L-DOPA を捕捉し、測定できることを報告した。この方法はしばしば上記のリコンビナント系／過剰発現系／メラノーマ細胞抽出系などの方法と組み合わせて用いられる[66]。

商業ベースでは、Enzo Life Sciences 社より活性の確認されたヒトリコンビナントチロシナーゼが販売されている。製品のデータシートから、このリコンビナントは Chen らの方法に準じていると考えられる。本章では、このヒトリコンビナントチロシナーゼを用いてフェニル安息香酸異性体(PBAs)や既存のチロシナーゼ阻害剤(ヒノキチオール、コウジ酸)の

ヒトチロシナーゼ活性調節作用について確認することを目的とした。また、その中で特に調節効果の高いものについて、より細胞内の状態に近いチロシナーゼを含むメラノソーム系を用いて阻害作用を検討し、考察する。

A

```
>AAB60319.1 tyrosinase [Homo sapiens]
MLLAVLYCLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECCPPWSGDRSPCGQLSGRGSCQNILLSNAPLGPQFP
FTGVDDRESWPSVFYNRCTQCSCGNFMGFNCGNCKFGFWGPNCTERRLLVRRNIFDLSAPEKDKFFAYLTL
AKHTISSDYVIPIGTYGQMKNGSTPMFNDINIYDLFVWMHYVVSMDALLGGSEIWRDIDFAHEAPAFLPW
HRLFLLRWEQEIQKLTGDENFTIPYWDWRDAEKCDICTDEYMGQHPNPNLLSPASFFSSWQIVCSRLE
EYNHQSLCNGTPEGPLRRNPGNHDKSRTPLRPSSADVEFCLSLTQYESGSMKAANFSFRNTLEGFASP
LTGIADASQSSMHNALHIYMGNTMSQVQGSANDPIFLLHHAFVDSIFEQWLQRHRPLQEVYPEANAPIGH
NRESYMPVFIPLYRNGDFFISSKDLGYDYSYLQSDPDSPQDYIKSYLEQASRIWSWLLGAAMVGAULTA
LLAGLVSLLCRHKRKLPEEKQPLLMEKEDYHSLYQSHL
```

```
>CAA11562.1 tyrosinase [Agaricus bisporus]
MSLIATVGPTGGVKNRLNIVDFVKNKFFTLVRSLELLQAKEQHDYSSFFQLAGIHGLPFTWAKERPS
MNLYKAGYCTHGQVLFPTWHRTYLSVLEQLQGAAIEVAKKFTSNQTDWVQAAQDLRQPYWDWGFELMPP
DEVIKNEEVNITNYDGKKISVKNPILRYHFHPIDPSFKPYGDFATWRTTVRNPDRNRREDIPGLIKKMRLE
EGQIREKTYNMLKFNDWERFSNHGISDDQHANSLESVHDDIHVMVGYGKIEGHMDHPFFAAFDPIFWL
HHTNVDRLLSLWKAINPDVWVTSGRNRDGTMGIAAPNAQINSETPLEPFYQSGDKVWTSASLADTARLGYS
YPDFDKLVGGTKELIRDAIDDLIDERYGSKPSSGARNTAFDLLADFKGITKEHKEDLKMWDWIHVAFFKK
FELKESFSLLFYASDGGDYDQENCFVGSINAFRGTAPETCANCQDNENLIQEGFIHLNHYLARDLESFE
PQDVHKFLKEKGLSYKLYSRGDKPLTSLSVKIEGRPLHLPPGEHRPKYDHTQARVVFDVAVHVIN
```

B

Download Graphics

CAA11562.1 tyrosinase [Agaricus bisporus]
Sequence ID: Query_235887 Length: 556 Number of Matches: 1

Range 1: 80 to 353 Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
48.5 bits(114)	3e-10	Compositional matrix adjust.	74/316(23%)	112/316(35%)	100/316(31%)
Query 201	AHEAPAFLPWHRLFLLRWEQEIQ-----KLTGDE-----NFTIPYWDW-----				238
	H F WHR +L EQ +Q K T ++ + PYWDW				
Sbjct 80	THGQVLFPTWHRTYLSVLEQLQGAAIEVAKKFTSNQTDWVQAAQDLRQPYWDWGFELMPP				139
Query 239	-----RDAEKCDICTDEYMGQHPNPNLLSPASFFSSWQIVCSRLEEYNS				284
	D +K + HP +P+ P F++W+				
Sbjct 140	PDEVIKNEEVNITNYDGKKISVKNPILRYHFHPIDPS-FKPYGDFATWRTTV-----				190
Query 285	HQSLCNGTPEGPLRRNPGNHDKSRTPLRPSSADVEFCLSLTQYESGSM-DKAAN-FSFRN				342
	RNP D++R +P + + E G + +K N F +				
Sbjct 191	-----RNP---DRNRREDIPG-----LIKMRLEEGQIREKTYNMLKFND				227
Query 343	TLEGFASPLTGIAD----ASQSSMHNALHIY----MNGTMSQVQGSANDPIFLHHAFV				393
	E F++ GI+D S S+H+ +H+ + G M +A DPIF LHH V				
Sbjct 228	AWERFSN--HGISDDQHANSLESVHDDIHVMVGYGKIEGHMDHPFFAAFDPIFWLHHTNV				285
Query 394	DSIFEQWLQRHRPLQEVYPEANAPIGHNRRESYM-----VFPFIPLYRNGDFFISS				442
	D + W + + P+ G NR+ M P P Y++GD +S				
Sbjct 286	DRLLSLW-----KAINPDVWVTSGRNRDGTMGIAAPNAQINSETPLEPFYQSGDKVWTS				338
Query 443	KDLGYDYSYLQSDPD 458				
	L D + L S PD				
Sbjct 339	ASLA-DTARLGYSYPD 353				

Figure 5.1.1. ヒトチロシナーゼとマッシュルームチロシナーゼの配列及び相同性 A ヒト [*Homo sapiens*]及びマッシュルーム [*Agaricus bisporus*]のアミノ酸一次配列 (FASTA 配列)。赤字はホモロジーモデリングに使用した部分 (Figure 5.3.3. 参照) B ヒトチロシナーゼ一次配列を Query、マッシュルームチロシナーゼを Subject として、BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) を用いた配列相同性の比較図

5.2. 実験材料・試薬・方法

5.2.1. 材料

G-361 ヒトメラノーマ細胞株は、理研バイオリソースセンター(Tsukuba, Japan)より購入した。G-361 は McCoy's 5A 培地(GE)に、10%FBS 及び 100 U/mL ペニシリン/ストレプトマイシン(和光純薬工業)を加えて 37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。 α -Thujaplicin、 β -Thujaplicin、 γ -Thujaplicin は和光純薬工業より購入した。

5.2.2. *in vitro* ヒトリコンビナントチロシナーゼアッセイ

ヒトリコンビナントチロシナーゼは、Enzo Life Sciences 社から購入した。反応は 96-well マイクロタイタープレート上で行い、反応条件はデータシートに従った。50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH=7.3)、0.5 mM L-DOPA、2% N,N'-dimethylformamide、5 mM 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH)を含む。阻害剤は DMSO に溶解しており、DMSO の終濃度が 2%となるように系に加えた。ヒトチロシナーゼは、1 well あたり 5 μ L ずつ加えた(1.15 μ g protein)。30°Cで 10 分ごとに最大 60 分まで 505 nm の吸光度を測定し、吸光度変化の傾きを求め、反応速度とし、阻害率を求めた。

5.2.3. メラノソーム抽出及び *in vitro* (melanosome 系)チロシナーゼアッセイ

75 cm² 細胞培養用フラスコ(AGC TECHNO GLASS CO.,LTD.(Iwaki))に 80%コンフルエントの細胞を用意し、培地を吸引後、500 μ L の 0.05%トリプシン/EDTA 溶液で 37°C、2 分間処理した後、10 mL の新たな培地で懸濁し、 1×10^7 細胞ごとに 20 mM のリン酸ナトリウム緩衝液で洗浄し、再び遠心操作の後、上清を除去して-80°Cで 24 時間以上保存した。MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone)チロシナーゼアッセイは、Wnder らの方法を改変して行った。-80°Cで凍結していた細胞に 0.1%NP-40 を含む 20 mM リン酸緩衝液(pH = 6.8)を 1 mL 加えて 10 分間インキュベートし、Potter-

Elvehjem 型ホモジェナイザーを用いて氷冷水中でホモジェナイズし 800×g で 10 分間遠心し、上清を得た(メラノソームを含む)。これを Ando らの方法を参考にし、アミコンウルトラ-0.5 mL 遠心式フィルター 10K デバイス(メルクミリポア社)を用いて、100 mM のリン酸ナトリウム緩衝液への置換、濃縮を行った。96-well マイクロタイタープレート上に 50 µL の MBTH-基質溶液(5 mM L-DOPA、5 mM MBTH、4.0% N,N'-dimethylformamide)と 48 µL のメラノソーム粗酵素液、2 µL の化合物を加えて 37°C で 10 分間インキュベートしたのち、505 nm の吸光度を測定し、0 点とした。さらに 37°C で 2 時間インキュベートし、505 nm の吸光度を測定した。それらの吸光度変化の傾きを反応速度とし、阻害率を求めた。最終画分にメラノソームが存在することはイムノブロット法を用いて示した (付録 A3)。

5.2.4. ヒトチロシナーゼのホモロジーモデリング

放線菌(*Streptomyces castaneoglobisporus*)チロシナーゼ(PDB ID: 1wx2)をプロテインデータバンク(PDB)からダウンロードしてテンプレートとした。ヒトチロシナーゼとチロシナーゼの配列アライメントデータは Sendovski らの文献[22]を参考にし、MODELLER9v3 を用いてモデリングした[79]。10 個のモデルを automodel class モードで生成し、RAMPAGE で評価した[80]。2 つの銅イオンとパーオキシドイオン、L-チロシン、6 つのヒスチジン残基(His180、His202、His211、His363、His367、His380)はテンプレートコンホメーションに固定して、*S. castaneoglobisporus* チロシナーゼの Tyr98 に重ね合わせるような形で、L-チロシンが配置するように位置を決定した。最も適切なモデルとして、Ramachandran plot で最も outlier 領域のスコアの低いモデルを選択した。

5.2.5. ヒトチロシナーゼに対する各阻害剤の結合モード予測

使用した化合物の構造は、ChemDraw® Ultra 及び Chem3D® Ultra で描画し、MOPAC

プログラムで最適化した。結合モードは、AutoDock Vina を用いてシミュレーションした[49]。非極性水素原子及び Gastiger 原子電荷を付与した。溶媒パラメータは、Addsol プログラムを用いて作成した。基質のチロシンから 7 Å 以内の残基で、Gly379 とヒスチジン残基を除くもの(Asn364、Ala365、Ile368、Met374、Ser375、Glu376、Val377、Glu378、Ser380)を可変領域として設定した。活性部位のグリッドポイントは、AutoGrid を用いて一辺が 40 単位の立方体とした(1 単位=0.375 Å)。AutoGrid の中心は、(x, y, z) = (-14.802, -17.878, 21.251)であった。リガンドドッキングは、AutoDock4.2 の Lamarckian Genetic Algorithm を用いた。おおまかな結合自由エネルギーを empirical 関数に基づいて計算し、既知のタンパク質-リガンド複合体から線形予測を行って決定した。この関数はファンデルワールス結合、水素結合、静電引力、リガンドのねじれ、脱溶媒和を含む。ドッキングで表されたエネルギーはリガンドの持つエネルギー及びリガンドの分子内相互作用によるエネルギーも含む。ドッキングのパラメータは全てデフォルトのものを使用した。リガンドの回転角は AutoTors プログラムを用いて付与した。シミュレーションは 10 回行った。エネルギーが最小となる結合モードは Amber9 を用いて得た。銅イオンのファンデルワールスパラメータは $R=1.27 \text{ \AA}$ 、 $E=0.06 \text{ kcal/mol}$ に設定した[38]。200 ステップの真空の最急降下法を行って、結合モードのエネルギーを最小化した。Harmonic restraint with force constant は $100 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$ として銅イオン、パーオキシドイオン、6 つのヒスチジン残基に適用した。

5.2.6. 化合物の ClogP 計算

構造式描画ソフト ChemSketch を用いて構造式を描画し、ソフトに付与されている機能を用いて logP を予測し、ClogP 値とした。

5.3. 実験結果

5.3.1. 市販のリコンビナントヒトチロシナーゼによる各種阻害候補化合物の評価

マッシュルームチロシナーゼで効果を示した化合物がヒトチロシナーゼにも効果を示すかを検討するために、市販のヒトリコンビナントチロシナーゼを用いてジフェノラーゼ活性を測定した。フェニル安息香酸誘導体(PBAs)の阻害活性について検証したところ、3-PBA が最も強い阻害活性を示し、 $IC_{50} = 15 \mu M$ であった(Figure 5.3.1.A)。2-PBA は、マッシュルームチロシナーゼに対しては阻害活性をほとんど示さなかったのに対し(第 2 章 2.3.1.節参照)、ヒトリコンビナントチロシナーゼに対しては阻害活性を示した($IC_{50} = 60 \mu M$: Figure 5.3.1. A)。阻害剤コントロール化合物としてヒノキチオール、コウジ酸の IC_{50} を求めると、それぞれ $6 \mu M$ 、 $200 \mu M$ であった(Figure 5.3.1.B)。これらを表にまとめたものが Table 5.3.1.である。

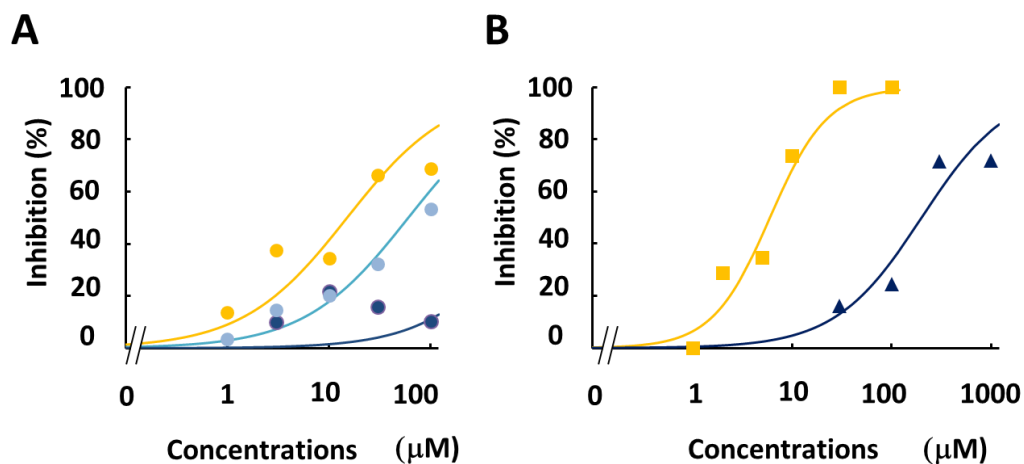


Figure 5.3.1. 3種のPBA異性体のヒトリコンビナントチロシナーゼに対する阻害作用 A PBA異性体のヒトリコンビナントチロシナーゼ阻害作用 データは阻害率として表記し、各シンボルは2-PBA(●)、3-PBA(●)、4-PBA(●)である。 B コウジ酸(▲)及びヒノキチオール(■)のヒトリコンビナントチロシナーゼに対する阻害作用。データは3回の独立に行った実験の平均値で表示した。曲線は、4-パラメータシグモイド曲線 $y = d + \frac{d-a}{1+(\frac{x}{c})^b}$ に $a=0$ 、 $d=100$ 、 $b=1$ を代入した $y = 100 + \frac{100}{1+(\frac{x}{c})}$ を重ねて c 値を IC_{50} とした。

5.3.2. ヒトメラノーマ細胞由来メラノソーム抽出系を用いた PBA 異性体のチロシナーゼ阻害活性評価

ヒトチロシナーゼがメラノソームの膜上で機能するのに対し、市販のヒトリコンビナントチロシナーゼは遊離状態である。よって、ヒトリコンビナントチロシナーゼで得られた結果の正当性を複数の視点から検証する必要がある。そこで、メラノソーム抽出系を用いてそれを評価した。その結果、3-PBA はリコンビナントチロシナーゼの $IC_{50}(15\ \mu M)$ より弱いながらも、阻害作用を示した($IC_{50}=732\ \mu M$)。一方で 2-PBA 及び 4-PBA はほとんど阻害作用を示さなかった(Figure 5.3.2.A)。

先行研究において、ツヤプリシン類(α -ツヤプリシン、 β -ツヤプリシン、 γ -ツヤプリシン; 付録 A1 も参照)がマッシュルームチロシナーゼに対して強力な阻害作用を発揮し、その阻害作用の序列は、 γ -ツヤプリシン $>$ β -ツヤプリシン $>$ α -ツヤプリシン $>$ コウジ酸であった[24]。そこで、本研究ではさらにツヤプリシン類及び対照化合物であるコウジ酸のチロシナーゼ阻害能を検討した。その結果、Figure 5.3.2.B に示すように、 γ -ツヤプリシンが最も高い阻害活性を示した。阻害作用の序列は、 γ -ツヤプリシン $>$ β -ツヤプリシン $>$ コウジ酸 $>$ α -ツヤプリシン ≈ 0 であった。 IC_{50} 値は Table 5.3.1. にまとめた。

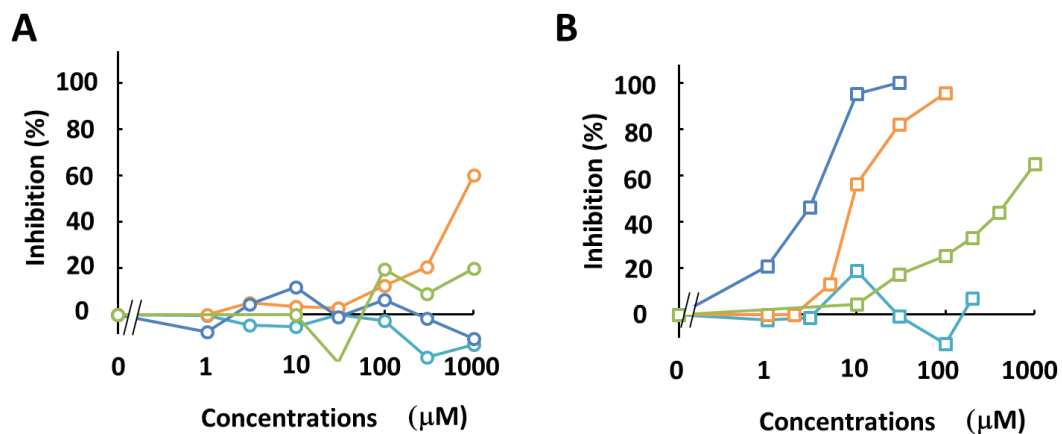


Figure 5.3.2. 3 種の PBA 異性体及びツヤプリシン異性体のヒトメラノソーム系に対する阻害作用 A PBA 異性体のヒトメラノソーム系ジフェノラーゼ活性阻害作用。データは阻害率として表記し、各シンボルは 2-PBA(○)、3-PBA(●)、4-PBA(○)及び安息香酸(○)である。 B ツヤプリシン異性体のヒトメラノソーム系ジフェノラーゼ活性阻害作用。データは阻害率として表記し、各シンボルは α -ツヤプリシン(□)、 β -ツヤプリシン(□)、 γ -ツヤプリシン(□)及びコウジ酸(□)である。データは 3 回の独立に行った実験の平均値で表示した。

Table 5.3.1. フェニル安息香酸異性体、コウジ酸、ヒノキチオール、安息香酸のジフェノラーゼ活性に対する IC₅₀ 値

	IC ₅₀ (μM) for mushroom tyrosinase	IC ₅₀ (μM) for human recombinant tyrosinase	IC ₅₀ (μM) for human melanosomal tyrosinase	ClogP
2-Phenylbenzoic acid (2-PBA: 化合物 1)	>1000	60	>1000	3.00 ± 0.29
3-Phenylbenzoic acid (3-PBA: 化合物 2)	36.3	15	732	3.84 ± 0.54
4-Phenylbenzoic acid (4-PBA: 化合物 3)	216	>1000	>1000	3.75 ± 0.48
Kojic acid	15.8	200	571	-0.64 ± 0.54
Hinokitiol	0.0234	6	8.98	1.89 ± 0.35
Benzoic acid	822	>1000	>1000	1.89 ± 0.21

5.3.3. ヒトチロシナーゼのホモロジーモデリング

次に、ヒトチロシナーゼの活性中心の構造をマッシュルームチロシナーゼのそれと比較するために、コンピュータシミュレーションで三次元構造の比較を行うことにした。しかし、ヒトチロシナーゼの X 線結晶回折構造は明らかにされていない。そこで、ヒトチロシナーゼの配列情報からホモロジーモデリングの手法を用いて、ヒトチロシナーゼの立体構造をコンピュータ上で構築した(Figure 5.3.3.A、B)。このモデルの妥当性を検証するために、ラマチャンドランプロットを作成したところ、Favored 領域が 85.2%、Allowed 領域が 9.7%、Outlier 領域が 5.2% となり、このモデルはタンパク質構造として十分に正当性を持つことが判明した(Figure 5.3.3.C)。また、マッシュルームチロシナーゼで L-チロシンのフェニル基と相互作用していると考えられる、Val283 に相当する残基があるかを調べると、同様の位置に Val377 が配置されていることが分かった(Figure 5.3.3.D)。

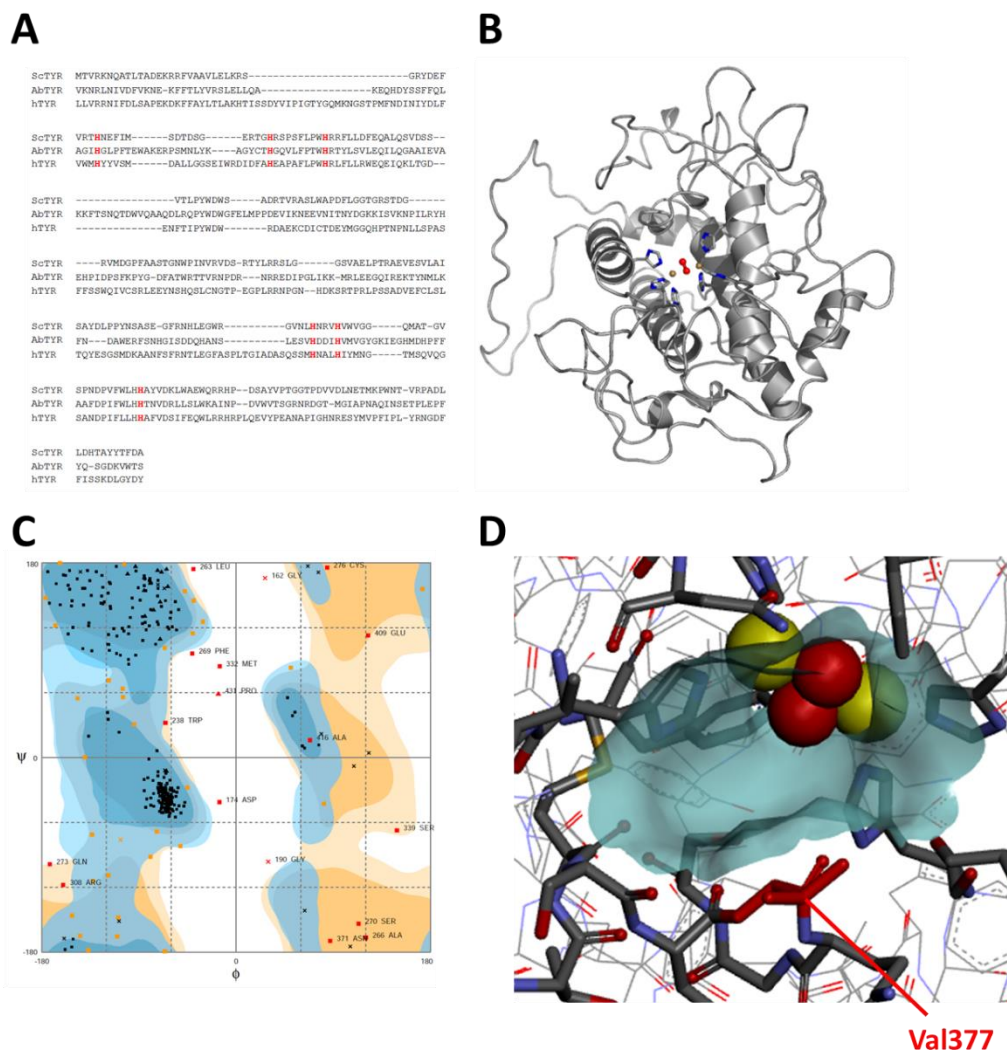


Figure 5.3.3. ヒトチロシナーゼのホモロジーモデル A 放線菌チロシナーゼ(ScTYR)、マッシュルームチロシナーゼ(AbTYR)、及びヒトチロシナーゼ(hTYR)の配列の比較 B ヒトチロシナーゼの放線菌チロシナーゼに対するホモロジーモデル 銅原子は黄色、酸素原子は赤の球で示した。 C 出来上がったモデルのラマチャンドランプロット。横軸φは1つ前の主鎖炭素との結合角、縦軸ψは1つ後の主鎖炭素との結合角である。ブルーの領域はプロリンの結合角について、黄色の領域はグリシンの結合角についてそれぞれ好ましいとされる角度の組み合わせを示し、各点は作成したホモロジーモデルの具体的な値を重ねてプロット(プロリン：■及び▲、グリシン：×)したものを示す。好ましい(favoured)とされる領域には 281 残基(85.2%)、許容されうる(allowed)領域には 32 残基(9.7%)、外れ値(outlier)の領域には 17 残基(5.2%)の残基が分布した。 D 作成したモデルの活性中心の拡大図。各アミノ酸は線表示し、特に活性中心を構成するアミノ酸は太いラインで表示している。特に Val377 を赤く示した。ブルーの曲面はそれらのなす表面を示す。銅原子は黄色、酸素原子は赤の球で示した。

5.3.4. 安息香酸誘導体及びツヤプリシン類とヒトチロシナーゼとのドッキングフォーム

ヒトチロシナーゼとマッシュルームチロシナーゼの活性中心の構造の共通部分及び異なる部分を明らかにし、ヒトチロシナーゼに対して有効な阻害剤の構造特性について検討するために、これまで本研究においてマッシュルームチロシナーゼで評価してきた PBA 異性体及びツヤプリシン類についてヒトチロシナーゼとのドッキングフォームを作成した。Figure 5.3.4.に示すように、安息香酸はベンゼン環部分が Val377 と相互作用していると考えられる。2-PBA はマッシュルームチロシナーゼに対するドッキングフォームとは異なり、アクティブポケットにその全体が収まりつつ、カルボキシ基の銅への配向が可能となっている。また、安息香酸ユニットのベンゼン環部分が Val377 との相互作用が予測される位置にある。さらに、2 つ目のベンゼン環が Asn364 の π 電子系と近く、かつ平行となっていることから、平行 π - π 相互作用が期待できる。しかしながら、安息香酸部分のベンゼン環はアクティブポケットの空間に対し、すき間なく入り込んでいる(赤い矢印)。3-及び 4-PBA においても同様にベンゼン環が Val377 との相互作用が予測される位置にあるが、4-PBA はカルボン酸の位置が銅原子からは遠く離れている。銅原子と安息香酸部分とを結んで延長した先には、Ser375 や Phe347 などがあり、4-PBA のカルボキシ基の位置を合わせると、逆にフェニル基の空間的な収まりが悪いことも推察された。

次に、ツヤプリシン類のドッキングも同様に行い、その構造的な側面を評価した。全てのツヤプリシン類では、トロポロン部分が Val377 と相互作用する位置にあった。そのとき、 α -ツヤプリシンは、 α -ヒドロキシカルボニル基が銅イオンの方向へ配向しなかった。 β -ツヤプリシン及び γ -ツヤプリシンは α -ヒドロキシカルボニル基が銅イオンの方向へ配向していたが、 β -ツヤプリシンは若干、空間的な余裕を欠いていた(Figure 5.3.5.)。これらのことから、PBA 異性体では 3-PBA が、ツヤプリシン類では γ -ツヤプリシンが最も反発の少ないドッキングポーズを取る可能性が高いと結論付けられる。

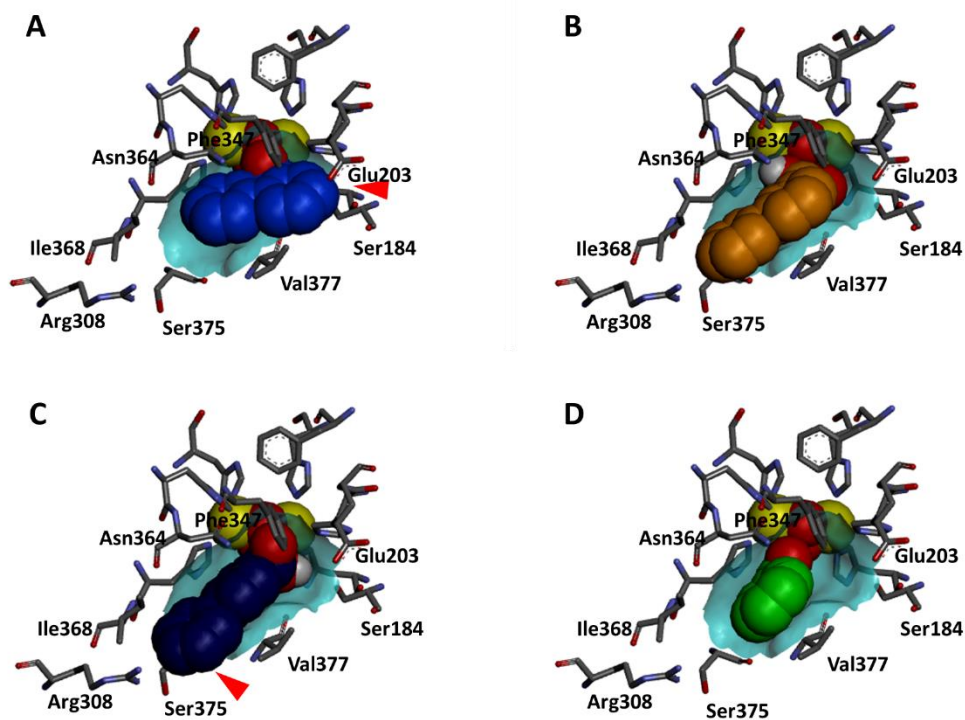


Figure 5.3.4. PBA 異性体のヒトチロシナーゼモデルの活性中心に対する結合様式 2-, 3-, 4-PBA と安息香酸の炭素原子は、それぞれマリン(A)、オレンジ(B)、ブルー(C)、グリーン(D)の CPK 表示をしてある。赤い矢印は空間的に反発の可能性がある部位を示す。アミノ酸残基の炭素鎖、酸素原子、銅イオン、酸素分子は、それぞれグレー、レッド、イエローで表示してある。酸素分子及び銅原子も CPK 表示している。PBA: フェニル安息香酸 BA:安息香酸

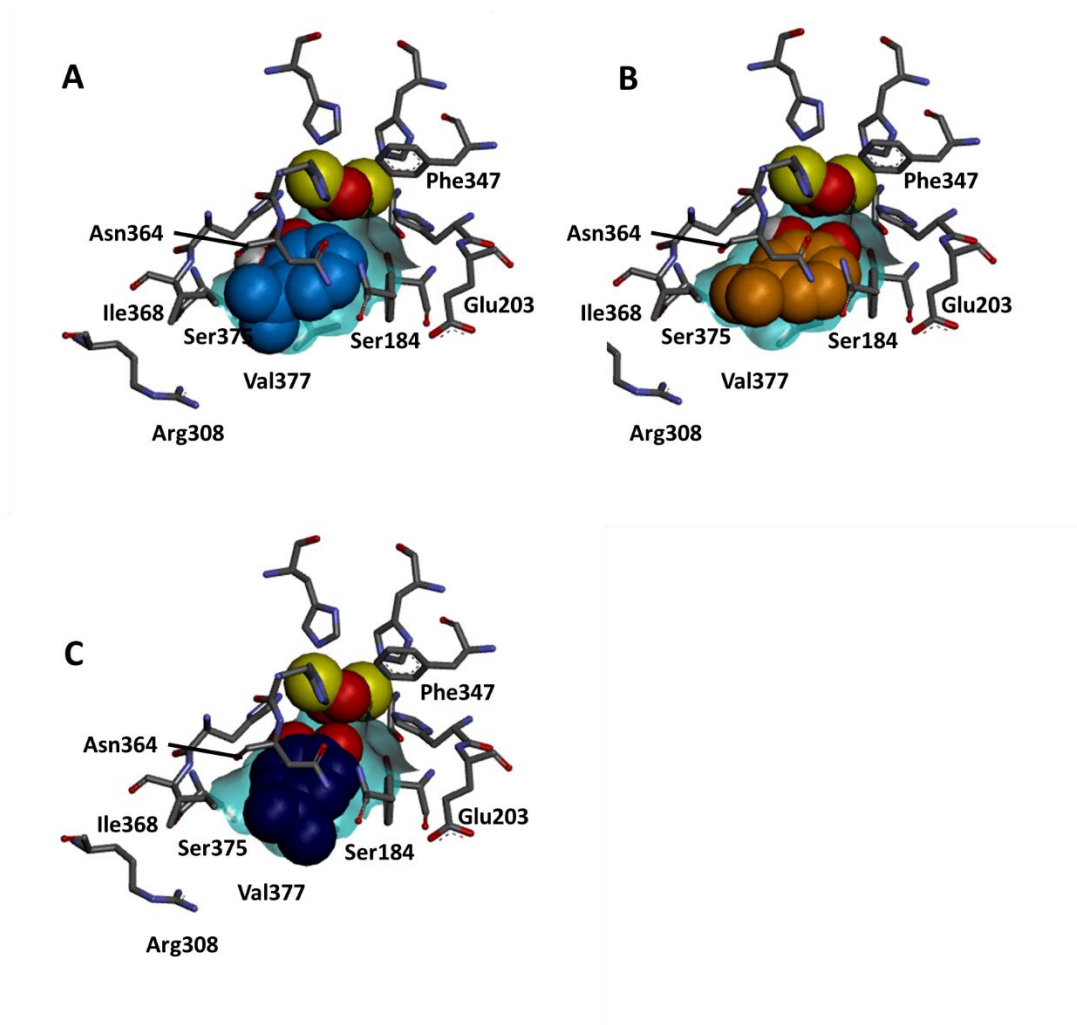


Figure 5.3.5. ツヤプリシン異性体のヒトチロシナーゼモデルの活性中心に対する結合様式 α -、 β -、 γ -ツヤプリシンの炭素原子は、それぞれマリン(A)、オレンジ(B)、ブルー(C)の CPK 表示をしてある。アミノ酸残基の炭素鎖、酸素原子、銅イオン、酸素分子は、それぞれグレー、レッド、イエローで表示してある。酸素分子及び銅原子も CPK 表示している。PBA：フェニル安息香酸 BA:安息香酸

5.4. 考察

これまでにチロシナーゼ阻害剤の研究では、主に簡便性とコストの面からマッシュルームチロシナーゼを用いた阻害剤評価が行われてきた。しかし、ヒトチロシナーゼは膜結合型タンパク質であり、しかも特殊なメラノソームという構造に埋め込まれている。本研究では、ヒトリコンビナントチロシナーゼ及びメラノソーム抽出系 *in vitro* アッセイを用いて、マッシュルームチロシナーゼで阻害作用を示した **PBA** 異性体及びツヤプリシン異性体について評価した。その結果、マッシュルームチロシナーゼとヒトチロシナーゼとでは阻害活性を示す構造が全く異なることが明らかとなった。さらに、ヒトリコンビナントチロシナーゼとメラノソーム系でも阻害活性に差が見られた。

2-PBA は、マッシュルームチロシナーゼではほとんど阻害活性を示さなかったが、ヒトリコンビナントチロシナーゼでは阻害活性を示した。これは、活性中心の空間の広さや形が異なるためであると考えられる。また、**Val377** に加え、**Asn364** との平行 π - π 相互作用をいう位置に 2 つ目のフェニル基が位置していたことも、**3-PBA** と同等な阻害活性を示した一因であると考えられる。一方で、メラノソーム系では阻害作用を示さなかった。この理由として、2 つの可能性が考えられる。1 つは、**PBA** 類の膜透過性の差によってメラノソーム系では作用を示さなかった可能性だ。しかし、Table 5.3.1.に示した理論的な $\log P$ 値(ClogP)は **PBA** 異性体による差は少ない。**3-PBA** はリコンビナントチロシナーゼでもメラノソーム評価系でも阻害作用を示した。このことから、膜透過性による説明は妥当性を欠くと考えている。もう 1 つは、ヒトリコンビナントチロシナーゼの高次構造による説明である。**Enzo Life Science** 社のヒトリコンビナントチロシナーゼは N 末端 168-531 のみであり、このことが、チロシナーゼの高次構造を変化させ、活性中心を開いた状態にして、化合物がアクセスしやすい状態になっているためではないかと推察される。この考えが正しいとすれば、少なくとも市販のリコンビナントチロシナーゼは、膜状に配列しているときの構造を反映しておらず、スクリーニングには適さないと考えられる。**3-PBA** は、マッシュルームチロシナーゼに

対する作用よりは弱いものの、リコンビナント系においてもメラノソーム系においても阻害作用を示した。ドッキングスタディの結果から、Val377 との相互作用、銅イオン方向へのカルボキシ基の配向、そして空間的な反発のないことなどがヒトチロシナーゼを阻害した要因であると考えられる。ただし、マッシュルूमチロシナーゼで 3-PBA と平行 π - π 相互作用が予測されていた Asn260 残基に相当する Asn364 は、3-PBA とは位置が平行ではなく離れていた。このことで、3-PBA は、マッシュルूमチロシナーゼに対する効果よりも弱い作用を示したのではないかと考えられる。4-PBA はマッシュルूमチロシナーゼでは阻害作用を持ったが、ヒトチロシナーゼでは全く作用を持たなかった。ドッキングスタディの結果から、空間的に上手く活性中心に嵌ることができなかったためであると考えられる。

α -ツヤプリシンは、 α -ヒドロキシカルボニル基の位置が銅方向へ配向していない。一方で、 β -ツヤプリシンは銅イオンへの配向は見られるが、側鎖のイソプロピル基が窮屈であった。 γ -ツヤプリシンは、銅イオンへの配向及び側鎖への立体的障壁もなくすんなり嵌っている。フェニル安息香酸異性体とツヤプリシン異性体の結果を比較すると、ヘッド構造としてはツヤプリシンの骨格(トロポロン骨格)のほうがより適当であると考えられる。

これまでに、マッシュルूमチロシナーゼの活性中心に重要な構造について詳細に解析してきた。本研究において、ホモロジーモデルを用いて、はじめてマッシュルूमチロシナーゼとヒトチロシナーゼの活性中心の構造を三次元的に詳細に比較した。酸素分子を含む二核銅中心に対して、カルボン酸、 α -ヒドロキシカルボニルなどのヘッド構造がヒトチロシナーゼに対しても有効に相互作用しうることが示唆された。また、ヘッド構造に続いて、 π 電子系の相互作用する空間があり、Val377 がその保持に重要であることが示唆された。これはマッシュルूमチロシナーゼにおいて Val283 に対応している。また、マッシュルूमチロシナーゼではその先の空間的な広がり狭く Val248 が占めていたが、ヒトモデルではその部分は空間的に広がっており、Arg308 が少し離れた位置に存在した。このことから、ヒトチロシナーゼに対しては、3-PBA や γ -ツヤプリシンの側鎖を変化させ、Arg308 と相互

作用できるようにすることによって、より特異的な構造最適化を行うことのできる可能性が示唆される。マッシュルームチロシナーゼで重要であった **Phe264** は、ヒトでは **Ile368** に置き換わっており、**Phe264** との相互作用に関する知見はヒトでは見直さなければならないことを示している。マッシュルームチロシナーゼにおいて平行 π - π 相互作用によって **3-PBA** などと相互作用することが予測されていた **Asn260** は、ヒトでは空間的に同じ位置に **Asn364** があり、進化的に保存されている残基であると考えられた。しかし、この角度が異なっているために、マッシュルームチロシナーゼで見られたような **3-PBA** との相互作用は欠落してしまったと考えられ、このことが **3-PBA** がヒトチロシナーゼに対して効果を減弱させたことの要因の1つであると考えられる。ヒトリコンビナントチロシナーゼを用いた実験では、マッシュルームチロシナーゼにおいて阻害作用を示した **4-PBA** やコウジ酸の阻害活性が著しく減弱した。この結果は、**Figure 5.4.1.**で考察したような構造の違いを反映していると考えられ、ヒトチロシナーゼでのアッセイの重要性について支持するものである。しかしながら、メラノソーム系の結果との比較では、リコンビナント系で阻害活性を持った **2-PBA** が阻害活性を持たなくなったことや、**3-PBA** の阻害活性が著しく減弱したことなどから、メラノソームに固定化されているチロシナーゼのタンパク質高次構造も阻害剤の設計に重要であり、メラノソーム上にあるほうが遊離のリコンビナント酵素よりも活性中心の空間的な広がり小さいことが示唆される。

以上のことから、美白化粧料の開発を目的として *in vitro* チロシナーゼアッセイを行う場合は、少なくともヒトメラノソーム系を用いて評価を行う必要があると考えられる。また、共同研究者の(株)理論創薬研究所 吉森篤史博士と共同で作成したヒトチロシナーゼのホモロジーモデルは、ヒトチロシナーゼ阻害剤のバーチャルスクリーニングに極めて有効であることが強く示唆される。

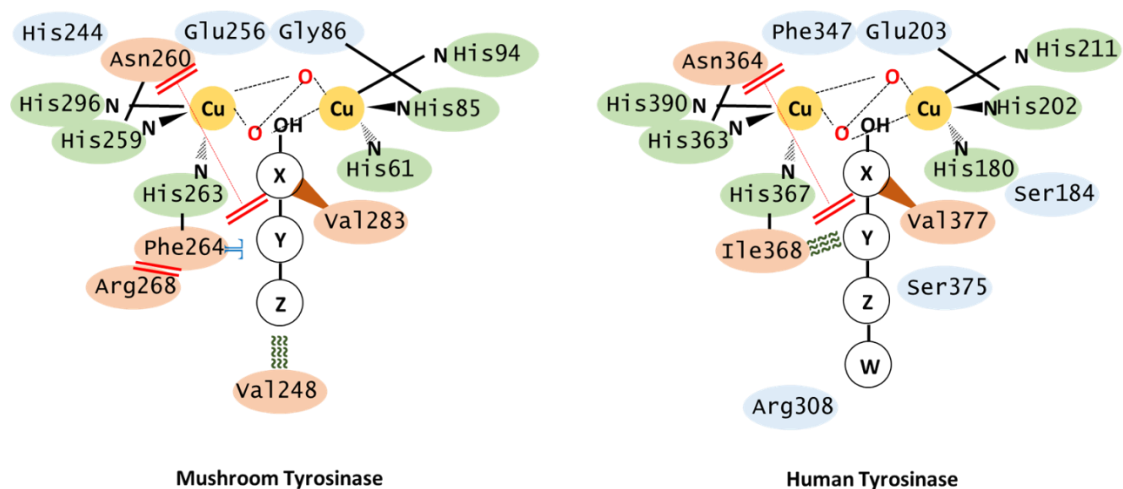


Figure 5.4.1. マッシュルームチロシナーゼとヒトチロシナーゼの活性中心における相互作用に重要なアミノ酸の比較 左にマッシュルームチロシナーゼ、右にヒトチロシナーゼの活性中心のアミノ酸について示した。中心付近に位置する各アミノ酸は楕円上にアミノ酸番号を表記して示した。銅イオンを活性中心に保持するためのヒスチジン残基はグリーンで示し、窒素原子を意味する N を表示した。本研究で阻害作用の発揮に重要であると示されたアミノ酸は赤で示した。活性中心付近にあるが、今回の研究では役割が明らかにならなかった残基は青で示した。疎水性相互作用、平行 π - π 相互作用、T 型 π 相互作用、CH- π 相互作用はそれぞれモスグリーンのウェーブ、レッドの二重線、ブルーの T 字、茶色の三角形で示した。X : π 電子系であることが必要である。代表例としてフェノール基の場合について示している。Y、Z、W : フェニル基またはアルキル基

第6章 総括

美白は、日本に古来よりある考え方であり、現代においてもその考えは脈々と日本人、特に女性の間で受け継がれている。その反応の中核を担うのがチロシナーゼであり、その阻害剤がこれまでに多く研究、探索されてきた。しかし、長い歴史ゆえに、酵素の構造学的な見方は実務面に比べて遅れている。

さらに、注意しておかなければならないことは、「ただ合成されただけのチロシナーゼ阻害剤」の氾濫である。しかも、チロシナーゼ活性の測定はこれまでマッシュルームチロシナーゼを用いて多く評価されてきた。その理由は「安価で簡便だから」である。しかし、ただ無目的に合成した化合物を「有用であるように見せるために」その題材としてチロシナーゼを選ぶのはナンセンスだ。本研究では帰納的ではなく演繹的なアプローチでチロシナーゼ阻害剤の構造学的な側面の探求を心がけた。

第1章では、本研究を理解するための導入として、チロシナーゼの構造・機能・応用範囲などの基礎情報について概説した。

第2章では、チロシナーゼ阻害剤としてフェニル安息香酸誘導体(PBAs)のチロシナーゼ阻害活性についてモノフェノラーゼ及びジフェノラーゼ活性を比較しながら、3-PBAがこの類縁体の中では最も強い阻害作用を持つことを見出した。3-PBAの誘導体を用いた解析においても、3-PBAが最も強い阻害作用を持った。4'-水酸化-4-PBAと4'-メトキシ化-4-PBAのドッキングシミュレーションによる構造学的な考察から、Asn260との平行 π - π 相互作用、Phe264とのT型 π 相互作用が重要であると予測された。さらに、チロシナーゼの構造学的特徴として、Phe264の角度をArg268が平行 π - π 相互作用によって支持していることも示唆された。

第3章では、ある阻害剤がモノフェノラーゼ活性とジフェノラーゼ活性に対して阻害能の大きさに差はあるかという疑問を出発点とした。まず、コウジ酸の IC_{50} として報告されている値を調べ、実験条件を統一するため、酵素ユニットと基質濃度、 IC_{50} の三者を結び

つける式を作成した。それを用いて、モノフェノラーゼ阻害活性とジフェノラーゼ阻害活性の間に

$$IC_{50}^T = [L - Tyrosine]^b (IC_{50}^D)^{\frac{a}{\log_{[L-Tyrosine]}[L-DOPA]}} \quad (4-13)$$

なる関係を見出した。この関係は、文献調査によって得られた値を用いてもよく成立した。そこで、この式にフェニル安息香酸の実験で得られた値を代入し、差の形に変形することで、Index 値を

$$Index = IC_{50}^T - 0.75(IC_{50}^D)^{0.75} \quad (4-15)$$

と定義した。この Index 値と見かけの阻害様式を比較することで、チロシナーゼ阻害剤を 3 つのタイプに分類することができた。Type O は *oxy*-チロシナーゼに、Type D は *deoxy*-チロシナーゼに、Type M は *met*-チロシナーゼにそれぞれ作用すると考えられる。

第 4 章では、4'-ヒドロキシ-3-PBA(化合物 5)のカルボキシ基をエステル化した化合物にチロシナーゼ活性化作用を見出した。ある種の活性化剤では、それ自体が代謝されることが活性化作用を示すのに重要であると考えられる。第 3 章で見出した Index を活性化剤に適用することにより、化合物 5 誘導体は A_I と A_{II} の 2 つのグループに分類できた。*in silico* 解析により、A_I は Asn260、Arg268、A_{II} は His244 との相互作用を想定した。

第 5 章では、これまでに検討した化合物のヒトチロシナーゼに対する作用の検討を行った。マッシュルームとヒトのチロシナーゼの阻害作用の強弱は必ずしも一致しないことが判明し、それぞれの阻害活性に寄与する活性中心のアミノ酸も明らかにした。ヒトチロシナーゼの活性中心に対しては適する形を有していながらもメラノソーム上のチロシナーゼに対しては空間的に活性中心に入りづらい構造をしている化合物も存在し、ヒトリコンビンナントチロシナーゼを用いた *in vitro* アッセイ系の限界についても示した。今までのところ、本研究において試した化合物の中では、ヒトチロシナーゼで最も阻害作用の強い化合物はγ-

ツヤプリシンであり、空間的な考察から γ -ツヤプリシンの誘導体はより強力なヒトチロシナーゼ阻害剤として応用展開が期待できる。

以上のように、本研究で究明したチロシナーゼの阻害剤に関する考察は、マッシュルーム及びヒトチロシナーゼの活性制御に対して新たな構造学的な知見を与えた。特に、マッシュルームチロシナーゼでは、基質結合部位への結合による活性化作用についての新たなモデルを提唱した。このことは、美白研究や皮膚の褐色化などの皮膚の色調改善を目的とした化粧品研究のみならず、チロシナーゼの不具合が原因で起こる疾病に対する治療法の新たな開発に大きく寄与するものと考えられる。

付録

本文の理解の助けとなる事項について説明を付す。

A1 美白剤としてのチロシナーゼ阻害剤の例

「美白化粧品」という言葉があるが、薬事法上は「美白」は効果・効能であるので、このような効果・効能を謳うためには当該商品が「医薬部外品」である必要がある。「医薬部外品」は、ポジティブリスト方式が用いられており、厚生労働省が定めた特定の成分しか用いることはできない。医薬部外品原料規格 2006(外原規 2006)の別表、医薬部外品添加物リストにその全てが公開されている。この規定は、医薬部外品として前例(使用実績)のある化合物とその濃度について示している。また、それに加えて、各社が独自に開発した原料・材料を申請する場合、安全性、安定性に関する試験、物質に関する情報の結果を提出すれば認可される場合があり、これらは「別紙規格」によって認められる。この成分の規格の詳細などに関しては公開されないため、基本的には他社が使うことはできない。さらに、有効成分については有効性を示すデータも必要である。このような経緯があり、「美白」を目的にして配合される化粧品成分は限定されており、その中でも「チロシナーゼ阻害作用」を謳った成分は、非承認成分としてハイドロキノン、承認成分としてはアルブチン、ルシノール、コウジ酸、エラグ酸の4種類のみである。また、かつて承認されていたが、健康被害の発生により使用が規制されたロドデンドロール(ロドデノール)についても述べる。さらに、チロシナーゼ阻害剤として重要な化合物にトロポロン及びヒノキチオールがある。以下に各論を述べる(Figure A1)。

(a) ハイドロキノン(Hydroquinone; HQ)

医薬品として用いられているチロシナーゼ阻害剤としてハイドロキノン(HQ)があり、肝斑(1.5.1.節)の治療に用いられている。4%HQを含むクリーム塗布により、統計的に有意

な改善が見られると報告されている。しかし、個人差により皮膚刺激を生じる場合や、長期間の使用でオクロノーシス(ochronosis; 組織褐変症)を引き起こす事例も報告されている[81-84]。ロート製薬からは、ハイドロキノンと安定配合した美容液(化粧品)が発売されている。

(b) アルブチン(Arbutin)

単にアルブチンといった場合には、 β -アルブチンのことを指す。 β -アルブチンはコケモモ、梨、ウワウルシなどに含まれている。このアルブチンは1990年に資生堂より申請され、承認を受けた[85]。その後、江崎グリコの西村らによってハイドロキノンの水酸基をグリコシド化する枯草菌(*Bacillus subtilis*)の菌株の単離が行われた。この菌株は α 型の合成を立体選択的に行うことができる。江崎グリコの研究では、 α -アルブチンはマッシュルームチロシナーゼをほとんど阻害しないが、ヒトチロシナーゼを強く阻害する($IC_{50} = 2.1 \text{ mM}$)とされており、ヒトに対する特異性を売りにした販売戦略を展開している[85, 86]。その後、別のグループが α -アルブチンにはマッシュルームチロシナーゼに対する活性化作用があることを報告した(1.4.3.節も参照) [32]。

(c) ルシノール(4-*n*-Butylresorcinol)

フェノールがかつて石炭酸と称して殺菌、消毒に用いられていたことは有名である。同様に強い殺菌作用を持つ物質としてレゾルシン(1,3-ジヒドロキシベンゼン)がある。レゾルシンにはチロシナーゼ阻害作用が知られていたが、皮膚刺激性が強いため深い研究はなされなかったが、ポーラ化成工業の片桐らによって4位に種々のアルキル基を導入した誘導体が開発され、4-*n*-ブチルレゾルシノール、通称ルシノールとして1998年に認可された[87]。

(d) コウジ酸(Kojic acid)

日本の農芸化学の大家である薮田貞次郎は、大学院在学中の1912年に麹菌の代謝産物

としてコウジ酸を発見した[88]。その後、1975年に山省製薬がコウジ酸にチロシナーゼ阻害作用を見出し、1988年に認可を受けた[89]。学術的な世界では、*in vitro* の評価系のスタンダードとして用いられている[51]。従来は、チロシナーゼ中の銅イオンをキレートすることで阻害作用を発揮すると考えられていたが、最近ではそれを疑問視する報告もある[90]。

(e) エラグ酸(Ellagic acid)

エラグ酸はイチゴ、ゲンノショウコ等に含まれるポリフェノールの一種であり、1997年にライオンにより申請され、承認された[85, 91]。

(f) ロドデンドロール(Rododendrol)

ラズベリーに含まれる芳香族化合物、ラズベリーケトンにはチロシナーゼ阻害作用を持つ。その類縁体としてカネボウが2008年に申請し、承認にいたった化合物がロドデンドロール(通称ロドデノール)であり、2%配合製品が6年間販売された。この薬用化粧品の使用者の皮膚適用部位に「白斑」が多発することが判明し、2013年7月より製品の自主回収が行われた。この機序は、チロシナーゼによって代謝されたロドデノールが *o*-キノン体となり、タンパク質に付加したり過剰な酸化ストレスを誘導したりしてメラノサイトを傷害することだといわれている。さらに、そのような代謝活性物質がハプテンとなり、メラノサイトを特異的に攻撃する細胞傷害性 T 細胞の活性化によるメラノサイトの死滅も示唆されている[92]。

(g) ヒノキチオール(Hinokitiol)

美白有効成分として有名ではないものの、強いチロシナーゼ活性阻害効果を持つ化合物にヒノキチオールがある。ヒノキチオールはタイワンヒノキ(*Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*)の樹皮より1936年に野副鐵男博士によって単離された。同時期に Erdtman と

Gripenberg がベイスギ(*Thuja plicata* Don.種)より同じ化合物を単離しており、その類縁体は Thujaplicin 類とも呼ばれる[93]。側鎖の位置により、 α -, β -, γ -Thujaplicin がある。この基本骨格はトロポロンと呼ばれる 7 員環非ベンゼン系芳香族化合物であり、強いキレート作用を持つ。トロポロンは、マッシュルームチロシナーゼとの結晶構造がとられている唯一の低分子化合物である[9]。

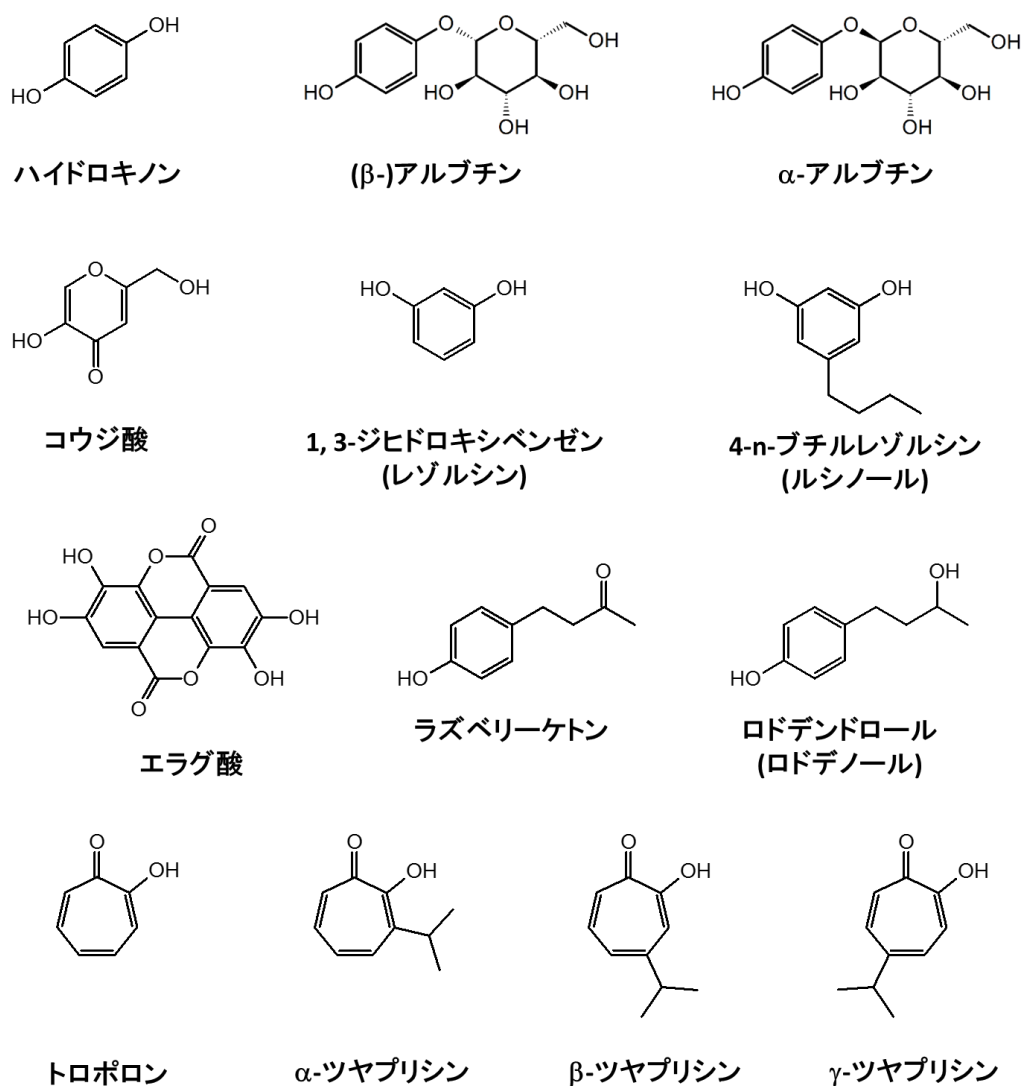


Figure A1 チロシナーゼ阻害剤の例

A2 酵素反応速度論

A2.1. 酵素反応速度論の基礎

生体反応における触媒の多くは酵素によるものである。酵素を利用したり酵素の阻害剤を創出したりするためには、酵素の特性をよく知る必要がある。しかしながら、酵素は複雑な分子機械であり、酵素がどのように反応を行っているのか、我々は眼で見て判別することはできない。そこで酵素反応速度論は、最も有力な方法の一つとなる。

ここでは、酵素を E、基質を S、生成物を P とおいて、酵素反応の途中に ES(酵素基質複合体)という中間体の存在を仮定する。そして、以下のように簡略化して表現する。



ここで、 k_1, k_{-1}, k_p は反応速度である。

このとき、中間体 ES の濃度 $[ES]$ について、 $[]$ を各物質の濃度の表現として採用すれば、

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_p[ES] \quad (A2)$$

ここで、酵素反応において、反応のごく初期のミリ秒時間以内を除くと、基質がなくなるまでは $[ES]$ が一定であるという定常状態近似を行えば、

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (A3)$$

全ての酵素濃度 $[E]_T$ とすれば、

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (A4)$$

であることより、 $[E]$ を消去して $[ES]$ でまとめると、

$$[ES] = \frac{k_1[E]_T[S]}{k_{-1} + k_p + k_1[S]} \quad (A5)$$

反応速度 v は、

$$v = k_p[ES] = \frac{k_p k_1[E]_T[S]}{k_{-1} + k_p + k_1[S]} \quad (A6)$$

ここで、最大反応速度 $V_{\max} = k_p[E]_T$ であり、 $K_m = (k_{-1} + k_p)/k_1$ という値(ミカエリス定数)を導入すると、

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (A7)$$

となる。これが(Henri-)Michaelis-Menten 式である[94]。

A2.2. 阻害剤の反応機構解析

(7)式から v と $[S]$ の関係を示すグラフは双曲線であることがわかる。実験的に V_{\max} や K_m を求めるために Lineweaver と Burk はこの式の両逆数をとって、

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (A8)$$

とした。x 軸に $1/[S]$ 、y 軸に v をプロットすれば、直線となるので、x 切片と y 切片から K_m と V_{\max} が求められる。これを Lineweaver-Burk(ラインウェーバー・バーク)プロットという。阻害剤の阻害様式を判定する場合に、この解析が多く用いられている。

「競合阻害(competitive inhibition)」モデルでは、基質結合部位に基質と阻害剤が競合する。これをモデル化するために、①酵素 E にのみ阻害剤が結合する ②阻害剤と結合した E は、酵素反応を行うことができない。 という仮定(Figure A2 A)のもと導き出された式

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m(1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]} \quad (A9)$$

から、ラインウェーバー・バークプロットは、Figure A2 C となる。この図では、[I]の増加によって傾きが増すが、y 軸との交点は変化しない。これは、(9)式で[S]→∞とした場合に $v \rightarrow V_{max}$ となることに対応している。

「非競合阻害(noncompetitive inhibition)」モデルでは、酵素に基質結合部位とは異なる結合サイト(アロステリックサイト)があり、阻害剤や活性化剤がそこに結合することで反応速度を調節するというモデルである(Figure A2 B, D)。このモデルの条件は、①S と I が E に対し独立に結合する。 ②P は ES のみから生成するというモデルであり、式は

$$v = \frac{V_{max}[S]}{\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (A10)$$

となる。ここで、 K_i は酵素に阻害剤が結合するときの EI の解離定数である[94]。

これらのグラフ上の変化は、反応機構モデル成立の必要条件であって十分条件ではないが、おおむね必要十分条件として信じられている。特に、アロステリック阻害は、非競合阻害様式であると思われる。例えば、仮にアロステリック阻害であったとしても、阻害剤が結合することで基質が全く結合できなくなる場合を想定すれば、競合阻害様式を取ることは容易に想像できる。このような制約はあるが、Henri-Michaelis-Menten 型速度論は、現在でも最も簡便な試験法として色あせていない。また、ラインウェーバー・バークプロットには視覚的な説得力があり、実用的な側面である。実際の酵素反応は、それぞれ個別の反応機構を有しており複雑であり、酵素それぞれに対してモデルを構築するのが理想であるが、数学モデルを扱える生化学者は少なく、その試み

はあまり活発に行われてはいない。

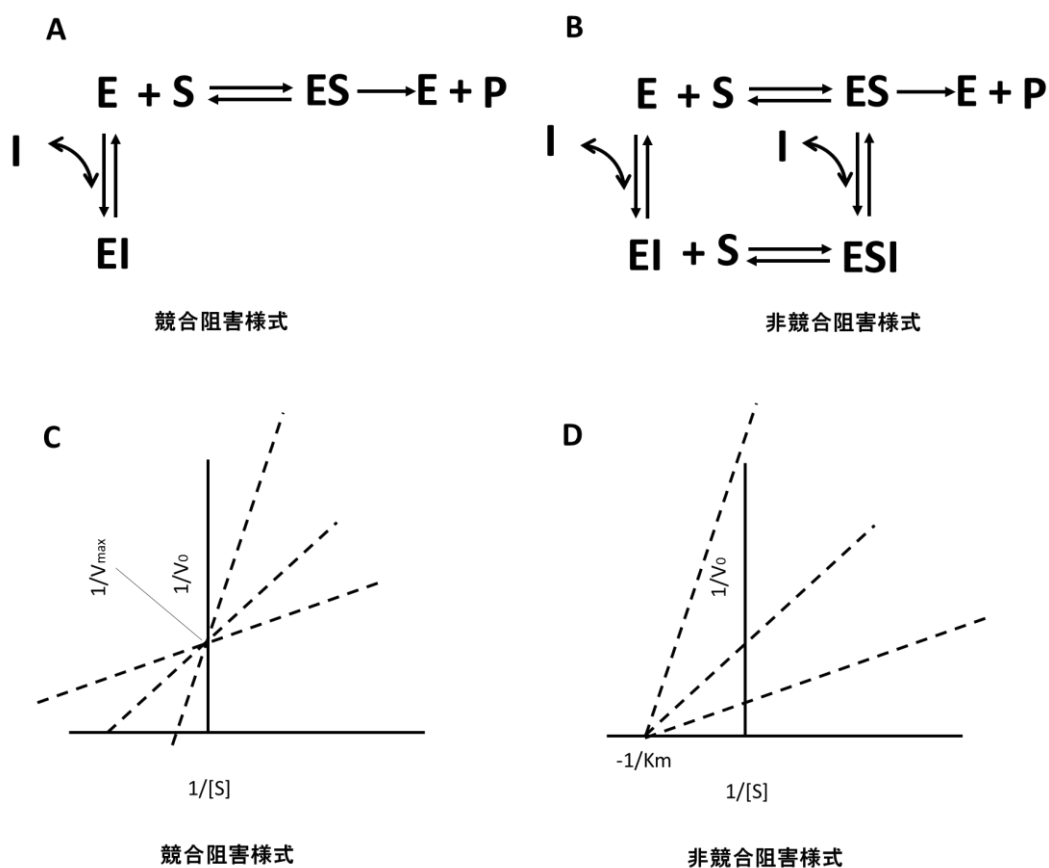


Figure A2.1. 酵素反応のモデルとラインウェーバー・バークプロット

A2.3. チロシナーゼの酵素反応速度論

チロシナーゼは前述の通り、複雑な反応であるため、Henri-Michaelis-Menten 式に従わないように思える。しかしながら、見かけ上の反応は Henri-Michaelis-Menten 式に従い、多くの論文でその形式に基づいた議論がなされている。これに関して、Ros らは基質が L-チロシンである場合と、L-DOPA である場合の両方において、見かけ上(7)式に帰着できることを示した[95]。すなわち、チロシンからドパクロムが生成する濃度 v_{DC}^T 及び DOPA からドパクロムが生成する濃度 v_{DC}^D はそれぞれ、見かけの最大反応速度 (V_{max}^T 、 V_{max}^D)、見かけの K_m (K_m^T 、 K_m^D) を用いて

$$v_{DC}^T = \frac{V_{max}^T[S]}{K_m^T + [S]} \quad (A11)$$

$$v_{DC}^D = \frac{V_{max}^D[S]}{K_m^D + [S]} \quad (A12)$$

である。ただし、この見かけ上の各パラメータは大変複雑ないくつもの定数から成り立っており、阻害剤などを系に別の要因として加えた場合は、その都度考慮していかなければならないことを意味する。よって、阻害剤を加えた場合に得られたパラメータから阻害機構を明らかにする方法については、ほとんど進展は見られない。

A3 メラノソームが存在することの確認

メラノソームのマーカーとして知られる Rab27A タンパク質を指標に最終画分にメラノソームが存在することを確認した。1×10⁵細胞に相当する細胞、沈殿画分または上清画分(melanosome を含む画分)をとり、SDS バッファー(トリスヒドロキシアミノメタン 98.3 mM, SDS 3.119%, グリセロール 10%, ブロモフェノールブルー 25 mg/mL:終濃度)を加え、15% Extra PAGE One (nakalai tesque)を用いて 20 mA 定電流で 80 分泳動した(トリスヒドロキシアミノメタン 25 mM, グリシン 191 mM, SDS 0.1%)。その後、メタノールで親水化した PVDF 膜(GE Healthcare)に 50 V 定電圧で 120 分転写を行い(トリスヒドロキシアミノメタン 25 mM, グリシン 191 mM)、Blocking One (nakalai tesque)で室温で 30 分ブロッキングを行った。1 次抗体反応は Can Get Signal A 液(TOYOBO)に 1/1000 に希釈した抗体液をビニール製のパックに封入し、4℃で 16 時間回転盤上でインキュベートした。抗チロシナーゼ抗体、抗 Rab27A 抗体はともに Santa Cruz 社から購入した。TBS-T(nakalai tesque)で 30 分計三回(1 分、1 分、28 分)洗浄後、2 次抗体反応に供した。2 次抗体は抗マウス IgG(GE Healthcare)を Can Get Signal B 液(TOYOBO)に 1/10000 に希釈して用いた。化学発光検出試薬として Luminata™

Crescedo Western HRP Substrate (メルクミリポア社)を用い、ChemiDoc MP(Biorad)で10～20秒露光した。使用した画分 c には Rab27A およびチロシナーゼが存在していることが示された(Figure A3)。

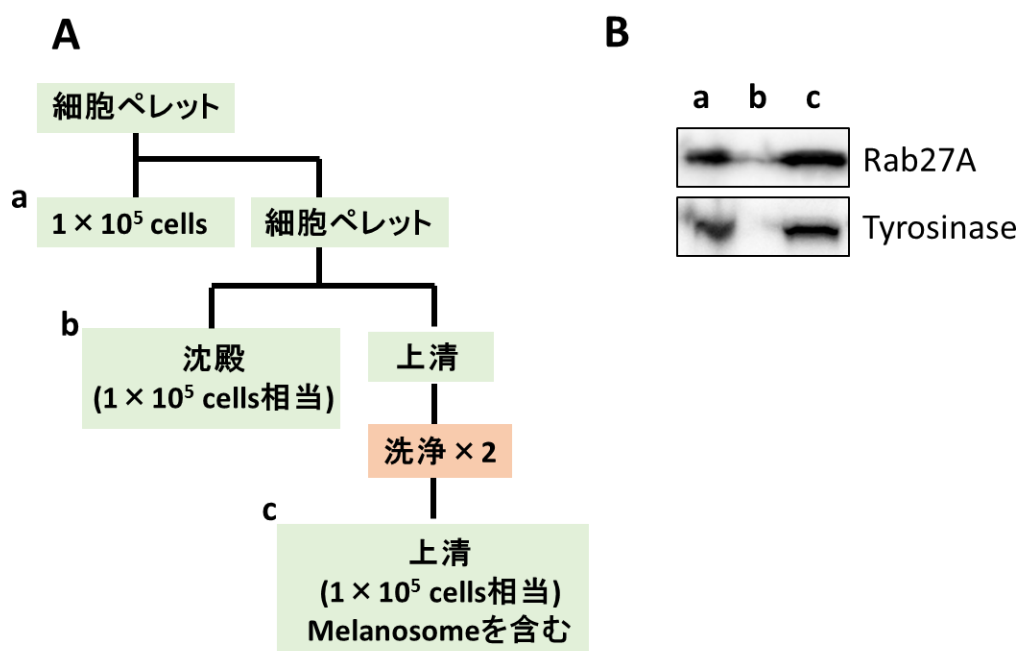


Figure A3. メラノソームが存在することの確認 A 5.2.3節で述べた方法の簡単なスキーム B メラノソームのマーカーである Rab27A およびチロシナーゼのイムノプロット図 a~c は A の各画分 a~c に相当する。

謝辞

本研究は、私がヒノキ新薬株式会社へ入社し、初めて取り組んだテーマであり、チロシンナーゼの分子メカニズムに関して考察を重ねた成果をまとめた課題です。

本研究を遂行するに当たり終始一貫してご指導を賜りました、東京理科大学 薬学部 田沼 靖一 教授に謹んで感謝申し上げます。田沼先生には、研究の進め方、論文の書き方はもとより、研究とは何かという哲学を丁寧にご指導賜りました。心から感謝申し上げます。

また、本研究の大きな部分を占める *in silico* 解析の部分では株式会社 理論創薬研究所 吉森 篤史 博士、高橋 哲 氏、山本 哲也 氏にご協力頂いたうえ、かかる手法のご教授をいただき、深く感謝申し上げます。

さらに、ヒノキ新薬株式会社 代表取締役社長 阿部 武彦 氏をはじめ、ヒノキ新薬グループ 株式会社肌粧品科学開放研究所 神谷 貴紀 所長、同研究所 生化学室室長 阿部 英明 博士、同 グループ社員の皆様には多大なるご支援、ご尽力を賜りましたこと、深く感謝申し上げます。特に阿部 英明 博士には本稿を全編通して文章校正をして頂き、心から感謝申し上げます。

また、東京理科大学 薬学部 修士課程時代にご指導賜り、引き続き暖かく研究活動を見守り、廊下ですれ違うたびに声をかけ、気にかけていただいた内海 文彰 教授に深く感謝申し上げます。

本研究のかかる論文作成時に、初歩的な有機化学の質問にも丁寧にお答え頂いた、東京理科大学 薬学部 内呂 拓実 教授に深く感謝申し上げます。

研究を進めるにあたり、実験器具などの研究室備品を共有させて頂きました、出向先の東京理科大学田沼研究室の学生の皆さんに感謝いたします。

最後に、私の研究生活を心身ともに支えてくださった大山家、今野家の家族の皆様、そして、最愛の妻、翠に感謝いたします。

参考文献

- [1] 石田かおり. 「美白」 意識の解釈学的現象学. 駒沢女子大学研究紀要 2013; 20: 1-12.
- [2] 高井奈緒. フロベールの小説における女性の肌の色に関する考察:『ボヴァリー夫人』,『感情教育』,『サランボー』 の場合. 言語・地域文化研究 (Language, area and culture studies) 2009; 1-23.
- [3] VJ Hearing. Determination of melanin synthetic pathways. Journal of Investigative Dermatology 2011; 131: E8-E11.
- [4] A Gunia-Krzyżak, J Popiol, H Marona. Melanogenesis Inhibitors: Strategies for Searching for and Evaluation of Active Compounds. Current Medicinal Chemistry 2016; 23: 3548-3574.
- [5] S Colombo, I Berlin, V Delmas, L Larue. Classical and nonclassical melanocytes in vertebrates. Melanins and melanosomes. Biosynthesis, biogenesis, physiological and pathological functions, Wiley-Blackwell, iWeinheim 2011.
- [6] D Sniegorska, C Kowalewski, K Wertheim-Tysarowska. [Epidermal barrier - molecular structure and disorders in selected ichthyoses]. Postepy Biochem 2016; 62: 36-45.
- [7] 石田森衛, 大林典彦, 谷津彩香, 福田光則. メラノソームの形成・成熟・輸送の仕組み. 顕微鏡= Microscopy 2013; 48: 26-32.
- [8] S Sachdeva. Fitzpatrick skin typing: applications in dermatology. Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology 2009; 75: 93.
- [9] WT Ismaya, HJ Rozeboom, A Weijn, JJ Mes, F Fusetti, HJ Wichers, BW Dijkstra. Crystal structure of Agaricus bisporus mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. Biochemistry 2011; 50: 5477-5486.
- [10] SG Mauracher, C Molitor, R Al-Oweini, U Kortz, A Rompel. Latent and active abPPO4 mushroom tyrosinase cocrystallized with hexatungstotellurate(VI) in a single crystal. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2014; 70: 2301-2315.
- [11] Y Matoba, T Kumagai, A Yamamoto, H Yoshitsu, M Sugiyama. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. J. Biol. Chem. 2006; 281: 8981-8990.
- [12] 村田容常, 本間清一. ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御. 日本食品科学工学会誌 1998; 45: 177-185.
- [13] F Aguilera, C McDougall, BM Degnan. Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. BMC Evol Biol 2013; 13: 96.
- [14] C Gerdemann, C Eicken, B Krebs. The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. Accounts of chemical research 2002; 35: 183-

191.

- [15] I MacPherson, ME Murphy. Type-2 copper-containing enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007; 64: 2887-2899.
- [16] 伊藤忍, 青野重利, 林貴史. フロンティア 生物無機化学. 三共出版株式会社 2016.
- [17] C Olivares, JC Garcia-Borron, F Solano. Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in Mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* 2002; 41: 679-686.
- [18] H Decker, F Tuczek. Tyrosinase catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends in biochemical sciences* 2000; 25: 392-397.
- [19] H Decker, R Dillinger, F Tuczek. How Does Tyrosinase Work? Recent Insights from Model Chemistry and Structural Biology This work was supported by the Medicine and Science Center of the University of Mainz (H.D.) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (F.T., R.D.). The authors thank M.Moller for help with the graphical artwork. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2000; 39: 1591-1595.
- [20] H Decker, T Schweikardt, F Tuczek. The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2006; 45: 4546-4550.
- [21] EI Solomon, P Chen, M Metz, SK Lee, AE Palmer. Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2001; 40: 4570-4590.
- [22] M Sendovski, M Kanteev, VS Ben-Yosef, N Adir, A Fishman. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J Mol Biol* 2011; 405: 227-237.
- [23] D Milic, D Matkovic-Calogovic, TV Demidkina, VV Kulikova, NI Sinitzina, AA Antson. Structures of apo- and holo-tyrosine phenol-lyase reveal a catalytically critical closed conformation and suggest a mechanism for activation by K⁺ ions. *Biochemistry* 2006; 45: 7544-7552.
- [24] S Takahashi, T Kamiya, K Saeki, T Nezu, S Takeuchi, R Takasawa, S Sunaga, A Yoshimori, S Ebizuka, T Abe, S Tanuma. Structural insights into the hot spot amino acid residues of mushroom tyrosinase for the bindings of thujaplicins. *Bioorg. Med. Chem.* 2010; 18: 8112-8118.
- [25] M Rodrigues, AG Pandya. Melasma: clinical diagnosis and management options. *Australas J Dermatol* 2015; 56: 151-163.
- [26] G Imokawa, Y Mishima. Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res* 1982; 42: 1994-2002.
- [27] H Takahashi, PG Parsons. Rapid and reversible inhibition of tyrosinase activity by glucosidase inhibitors in human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 1992; 98: 481-487.
- [28] F Liu-Smith, FL Meyskens. Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis

- and the potential for the prevention and treatment of melanoma. *Mol Nutr Food Res* 2016; 60: 1264-1274.
- [29] LA Garraway, HR Widlund, MA Rubin, G Getz, AJ Berger, S Ramaswamy, R Beroukhi, DA Milner, SR Granter, J Du, C Lee, SN Wagner, C Li, TR Golub, DL Rimm, ML Meyerson, DE Fisher, WR Sellers. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005; 436: 117-122.
- [30] P Wang, Y Li, W Hong, J Zhen, J Ren, Z Li, A Xu. The changes of microRNA expression profiles and tyrosinase related proteins in MITF knocked down melanocytes. *Mol Biosyst* 2012; 8: 2924-2931.
- [31] Y Sekine, S Togi, R Muromoto, S Kon, Y Kitai, A Yoshimura, K Oritani, T Matsuda. STAP-2 Protein Expression in B16F10 Melanoma Cells Positively Regulates Protein Levels of Tyrosinase, Which Determines Organs to Infiltrate in the Body. *J. Biol. Chem.* 2015; 290: 17462-17473.
- [32] L Qin, Y Wu, Y Liu, Y Chen, P Zhang. Dual effects of alpha-arbutin on monophenolase and diphenolase activities of mushroom tyrosinase. *PLoS One* 2014; 9: e109398.
- [33] J-G Xie, S-B Li, Y Xue, H-T Zhang, J Quan, H-L Nie, L-M Zhu, C Branford-White. 4-Hydroxyphenylacetic acid as a monophenolase inhibitor and a diphenolase activator on mushroom Tyrosinase. *Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2009. ICBBE 2009. 3rd International Conference on, IEEE 2009: 1-3.*
- [34] E Sanjust, G Cecchini, F Sollai, N Curreli, A Rescigno. 3-hydroxykynurenine as a substrate/activator for mushroom tyrosinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; 412: 272-278.
- [35] S Guan, W Su, N Wang, P Li, Y Wang. A potent tyrosinase activator from *Radix Polygoni multiflori* and its melanogenesis stimulatory effect in B16 melanoma cells. *Phytother. Res.* 2008; 22: 660-663.
- [36] MM El Sadek, SY Hassan, HE Abdelwahab, GA Yacout. Synthesis and bioassay of a new class of furanyl-1,3,4-oxadiazole derivatives. *Molecules* 2013; 18: 8550-8562.
- [37] HM Berman, J Westbrook, Z Feng, G Gilliland, TN Bhat, H Weissig, IN Shindyalov, PE Bourne. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 235-242.
- [38] RH Stote, M Karplus. Zinc binding in proteins and solution: a simple but accurate nonbonded representation. *Proteins* 1995; 23: 12-31.
- [39] HS Lee. Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 1400-1403.
- [40] G Clayden, W Warren. *Organic Chemistry*. sl: Oxford University Press, 2001. S.
- [41] S Tsuzuki, K Honda, T Uchimaru, M Mikami, K Tanabe. Origin of attraction and directionality of the π/π interaction: model chemistry calculations of benzene dimer interaction. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; 124: 104-112.

- [42] BK Mishra, N Sathyamurthy. Pi-pi interaction in pyridine. *J. Phys. Chem. A* 2005; 109: 6-8.
- [43] R Wang, WM Chai, Q Yang, MK Wei, Y Peng. 2-(4-Fluorophenyl)-quinazolin-4(3H)-one as a novel tyrosinase inhibitor: Synthesis, inhibitory activity, and mechanism. *Bioorg. Med. Chem.* 2016; 24: 4620-4625.
- [44] TS Chang. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10: 2440-2475.
- [45] SY Lee, N Baek, TG Nam. Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2016; 31: 1-13.
- [46] MR Loizzo, R Tundis, F Menichini. Natural and Synthetic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: An Update. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2012; 11: 378-398.
- [47] A Gunia-Krzyzak, J Popiol, H Marona. Melanogenesis Inhibitors: Strategies for Searching for and Evaluation of Active Compounds. *Curr. Med. Chem.* 2016; 23: 3548-3574.
- [48] Y Zhang, J Skolnick. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: 2302-2309.
- [49] O Trott, AJ Olson. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010; 31: 455-461.
- [50] NM O'Boyle, M Banck, CA James, C Morley, T Vandermeersch, GR Hutchison. Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminform.* 2011; 3: 33.
- [51] E Neeley, G Fritch, A Fuller, J Wolfe, J Wright, W Flurkey. Variations in IC(50) values with purity of mushroom tyrosinase. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10: 3811-3823.
- [52] X Tan, YH Song, C Park, KW Lee, JY Kim, DW Kim, KD Kim, KW Lee, MJ Curtis-Long, KH Park. Highly potent tyrosinase inhibitor, neorauflavane from *Campylotropis hirtella* and inhibitory mechanism with molecular docking. *Bioorg. Med. Chem.* 2016; 24: 153-159.
- [53] S Momtaz, N Lall, A Basson. Inhibitory activities of mushroom tyrosine and DOPA oxidation by plant extracts. *South African Journal of Botany* 2008; 74: 577-582.
- [54] ET Arung, K Shimizu, R Kondo. Inhibitory effect of artocarpanone from *Artocarpus heterophyllus* on melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29: 1966-1969.
- [55] M Rafiq, M Saleem, M Hanif, SK Kang, SY Seo, KH Lee. Synthesis, structural elucidation and bioevaluation of 4-amino-1,2,4-triazole-3-thione's Schiff base derivatives. *Arch. Pharm. Res.* 2016; 39: 161-171.
- [56] KM Khan, UR Mughal, MT Khan, U Zia, S Perveen, MI Choudhary. Oxazolones: new tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14: 6027-6033.

- [57] HC Kwong, CS Chidan Kumar, SH Mah, TS Chia, CK Quah, ZH Loh, S Chandraju, GK Lim. Novel biphenyl ester derivatives as tyrosinase inhibitors: Synthesis, crystallographic, spectral analysis and molecular docking studies. *PLoS One* 2017; 12: e0170117.
- [58] ME Chiari, DM Vera, SM Palacios, MC Carpinella. Tyrosinase inhibitory activity of a 6-isoprenoid-substituted flavanone isolated from *Dalea elegans*. *Bioorg. Med. Chem.* 2011; 19: 3474-3482.
- [59] W Xie, J Zhang, X Ma, W Yang, Y Zhou, X Tang, Y Zou, H Li, J He, S Xie, Y Zhao, F Liu. Synthesis and biological evaluation of kojic acid derivatives containing 1,2,4-triazole as potent tyrosinase inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* 2015; 86: 1087-1092.
- [60] Y Cui, G Liang, YH Hu, Y Shi, YX Cai, HJ Gao, QX Chen, Q Wang. Alpha-substituted derivatives of cinnamaldehyde as tyrosinase inhibitors: inhibitory mechanism and molecular analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63: 716-722.
- [61] T Kanehira, S Takekoshi, H Nagata, RY Osamura, T Homma. Kinobeaon A as a potent tyrosinase inhibitor from cell culture of safflower: in vitro comparisons of kinobeaon A with other putative inhibitors. *Planta Med.* 2003; 69: 457-459.
- [62] Y Wang, MJ Curtis-Long, BW Lee, HJ Yuk, DW Kim, XF Tan, KH Park. Inhibition of tyrosinase activity by polyphenol compounds from *Flemingia philippinensis* roots. *Bioorg. Med. Chem.* 2014; 22: 1115-1120.
- [63] 鈴木恒男. 好ましい肌色再現に関する人種間の比較: 白人の肌色に対する日本人と白人の好み. *日本色彩学会誌* 1991; 14: 153-161.
- [64] 西村栄美. 白人には美黒? *臨床皮膚科* 2005; 59: 32-32.
- [65] WJ van Rensburg, D Ferreira, E Malan, JA Steenkamp. Tyrosinase catalysed biphenyl construction from flavan-3-ol substrates. *Phytochemistry* 2000; 53: 285-292.
- [66] AJ Winder, H Harris. New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* 1991; 198: 317-326.
- [67] NB Goldstein, MI Koster, LG Hoaglin, NS Spoelstra, KJ Kechris, SE Robinson, WA Robinson, DR Roop, DA Norris, SA Birlea. Narrow Band Ultraviolet B Treatment for Human Vitiligo Is Associated with Proliferation, Migration, and Differentiation of Melanocyte Precursors. *J. Invest. Dermatol.* 2015; 135: 2068-2076.
- [68] KL Double, W Maruyama, M Naoi, M Gerlach, P Riederer. Biological role of neuromelanin in the human brain and its importance in Parkinson's disease. *Melanins and melanosomes: biosynthesis, biogenesis, physiological, and pathological functions* 2011; 225-246.
- [69] K Ikemoto, I Nagatsu, S Ito, RA King, A Nishimura, T Nagatsu. Does tyrosinase exist in neuromelanin-pigmented neurons in the human substantia nigra? *Neurosci Lett* 1998; 253: 198-200.

- [70] JM Foley, D Baxter. On the nature of pigment granules in the cells of the locus coeruleus and substantia nigra. *J Neuropathol Exp Neurol* 1958; 17: 586-598.
- [71] M Rios, B Habecker, T Sasaoka, G Eisenhofer, H Tian, S Landis, D Chikaraishi, S Roffler-Tarlov. Catecholamine synthesis is mediated by tyrosinase in the absence of tyrosine hydroxylase. *J Neurosci* 1999; 19: 3519-3526.
- [72] M Asanuma, I Miyazaki, FJ Diaz-Corrales, Y Higashi, M Namba, N Ogawa. Transplantation of melanocytes obtained from the skin ameliorates apomorphine-induced abnormal behavior in rodent hemi-parkinsonian models. *PLoS One* 2013; 8: e65983.
- [73] KU Schallreuter, S Kothari, B Chavan, JD Spencer. Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts. *Exp Dermatol* 2008; 17: 395-404.
- [74] GH Chen, WM Chen, YC Huang, ST Jiang. Expression of recombinant mature human tyrosinase from *Escherichia coli* and exhibition of its activity without phosphorylation or glycosylation. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60: 2838-2843.
- [75] S-H Jeon, K-H Kim, J-U Koh, K-H Kong. Inhibitory effects on L-dopa oxidation of tyrosinase by skin-whitening agents. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 2005; 26: 1135-1137.
- [76] J Park, YC Boo. Isolation of resveratrol from *vitis viniferae* caulis and its potent inhibition of human tyrosinase. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 645257.
- [77] M Kim, J Park, K Song, HG Kim, JS Koh, YC Boo. Screening of plant extracts for human tyrosinase inhibiting effects. *Int J Cosmet Sci* 2012; 34: 202-208.
- [78] K Sugimoto, T Nishimura, K Nomura, K Sugimoto, T Kuriki. Syntheses of arbutin- α -glycosides and a comparison of their inhibitory effects with those of α -arbutin and arbutin on human tyrosinase. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2003; 51: 798-801.
- [79] A Sali, TL Blundell. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993; 234: 779-815.
- [80] SC Lovell, IW Davis, WB Arendall, PI de Bakker, JM Word, MG Prisant, JS Richardson, DC Richardson. Structure validation by C α geometry: ϕ , ψ and C β deviation. *Proteins* 2003; 50: 437-450.
- [81] OA Ogbechie-Godec, N Elbuluk. Melasma: an Up-to-Date Comprehensive Review. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2017.
- [82] SN Mishra, RS Dhurat, DJ Deshpande, CS Nayak. Diagnostic utility of dermatoscopy in hydroquinone-induced exogenous ochronosis. *Int. J. Dermatol.* 2013; 52: 413-417.
- [83] K Shankar, K Godse, S Aurangabadkar, K Lahiri, V Mysore, A Ganjoo, M Vadamurty, M Kohli, J Sharad, G Kadhe, P Ahirrao, V Narayanan, SA Motlekar. Evidence-based treatment for melasma: expert opinion and a review. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2014; 4:

165-186.

- [84] RC Monteiro, BN Kishore, RM Bhat, D Sukumar, J Martis, HK Ganesh. A Comparative Study of the Efficacy of 4% Hydroquinone vs 0.75% Kojic Acid Cream in the Treatment of Facial Melasma. *Indian J Dermatol* 2013; 58: 157.
- [85] 長沼雅子. 香粧品の有効性の歴史的変遷. *日本香粧品学会誌* 2015; 39: 275-285.
- [86] K Sugimoto, T Nishimura, T Kuriki. Development of alpha-arbutin: Production at industrial scale and application for a skin-lightening cosmetic ingredient. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 2007; 19: 235.
- [87] 片桐崇行, 大久保禎, 及川みどり, 二木希世子, 釈政雄, 河合充夫, 竹ノ内正紀. 4 - n - ブチルレゾルシノール (ルシノール) のメラニン産生抑制作用とヒト色素沈着に対する有効性. *日本化粧品技術者会誌* 2001; 35: 42-49.
- [88] 鈴木昭憲. 天然物有機化学. *日本農芸化学会誌* 1987; 61: 79-83.
- [89] 三嶋豊, 芝田孝一, 瀬戸英伸, 大山康明, 波多江慎吉. コウジ酸のメラニン生成抑制作用と各種色素沈着症に対する治療効果. *皮膚* 1994; 36: 134-150.
- [90] B Deri, M Kanteev, M Goldfeder, D Lecina, V Guallar, N Adir, A Fishman. The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition. *Sci Rep* 2016; 6: 34993.
- [91] 横山美保子, 伊藤祐成. 色素沈着症に関するエラグ酸配合製剤の有用性評価. *皮膚* 2001; 43: 286-291.
- [92] 知 最上. Leukoderma caused by chemicals : mechanisms underlying 4-alkyl/aryl-substituted phenols- and rhododendrol-induced melanocyte loss. *国立医薬品食品衛生研究所報告* 2015; 13-20.
- [93] N Liu, W Song, CM Schienebeck, M Zhang, W Tang. Synthesis of Naturally Occurring Tropones and Tropolones. *Tetrahedron* 2014; 70: 9281-9305.
- [94] IH Segel, *Enzyme kinetics*, Wiley, New York(1975).
- [95] JR Ros, JN Rodriguez-Lopez, F Garcia-Canovas. Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1204: 33-42.