

新規な化粧品素材としてのコウジ酸、 β -ツージャプリシン、*p*-アミノ安息香酸、及び、アルブチンのさらなる高機能化を目的とした酵素的分子設計

岡山県立大学 保健福祉学部栄養学科

中 島 伸 佳

Kojic acid, β -thujaplicin, and *p*-aminobenzoic acid were glucosylated to their monoglucosides by UDP-glucosyltransferase reaction. Arbutin and polyphenol glucosides (naturally occurring plant pigments) were acylated with aromatic acids to their acylated forms by lipase or acyltransferase reactions. As the results, further stabilization and functionalization of the natural-bioactive compounds as the cosmetic materials has been achieved by the enzymatic-modification method.

1. 緒 言

近年、自然環境の破壊や環境汚染、生活習慣の変化や食生活の多様化により、「人類を取り巻く地球環境に関わる諸問題」が注視されるに至っている。このような状況下において、天然資源の大量消費による有用な植物資源の枯渇にも伴い、天然由来の生薬成分や生理機能性物質の価値が見直されてきた。

これらの機能性物質の中で、広義の植物性（ポリ）フェノール関連化合物は、抗菌作用、抗酸化作用やラジカル消去能などを有し、さらには免疫力の向上効果、抗ウイルス作用や制癌作用などの様々な有用生理機能を示すことから、最近では、化粧品、食品添加物、医薬品などとしても注目されている。

本研究では、植物色素類を始めとした天然由来の（ポリ）フェノール化合物の、「化粧品素材」としての使用上の安全性と有効性を拡大させること、すなわち、安定化と高機能化を通して、これらの機能性物質の薬理・生理活性を向上させ、有効に活用できる新機能性成分へと「分子設計」を行うことを主目的に、「グルコシル化とアシル化を介した酵素的機能改変」の方法を開発した。

2. 実 験

2. 1 化粧品素材としての（ポリ）フェノールグルコシド類の酵素的アシル化

リパーゼ（主に、Chirazyme L-2、10mg）のエステル交換反応を利用して、ポリフェノールグルコシド 10mg、及び、芳香族酸ビニル 100mg を、アセトン 10ml 中で、数日間、37℃で攪拌しながら反応させ、フラボノイド（ポリフェノール）グルコシドの芳香族酸エステル化を行なった。

また、アシル CoA 合成酵素とフラボノイド：アシル転移酵素を含むムラサキイモ培養細胞由来の無細胞抽出液（粗酵素液）を生体触媒として、ATP と Coenzyme A の存在下、フラボノイドグルコシドの糖部分への遊離の芳香族酸によるアシル（エステル）化について検討した。

2. 2 化粧品素材としての（ポリ）フェノール性化合物の酵素的グルコシル化

（ポリ）フェノール類 10 μ mol、UDP glucose 70 μ mol、及び、100 μ mol Tris-HCl buffer (pH 7.8) を含む 1 ml の反応液中に、ユーカリ培養細胞由来の UDP-グルコシルトランスフェラーゼ含有膜画分 0.1g（湿潤状態、培養細胞 0.5g に相当）を加え、30℃で緩やかに攪拌しながら、一昼夜グルコシル化反応を行なった。

さらに、ユーカリ膜画分を用いて連続的にグルコシル化反応を行う「膜型バイオリクターシステム」の開発や、パン酵母による UDP-グルコース発酵を同時進行させた UDP-グルコシルトランスフェラーゼ共役反応系による効果的なグルコシル化について検討した。

3. 結果と考察

3. 1 化粧品素材としての（ポリ）フェノールグルコシド類の酵素的アシル化による機能改変

3. 1. 1 アルブチンの芳香族酸エルテル化

天然植物色素（ポリフェノールグルコシド類）は、ある種の植物細胞中において、そのグルコシド糖の一部が様々な芳香族酸によりエステル化された「アシル化植物色素」として、光や熱に対して安定に存在し、抗酸化性を始めとした有用な生理機能を発揮していると考えられている。そこで、本研究においては、リパーゼのエステル交換反応を応用して、（ポリ）フェノールグルコシド類の安定化と高機能化（機能改変）を主目的に、アルブチンや天然植物色素類（フラボノイド系、並びに、アントシアン系植物色素）の、芳香族酸（桂皮酸や*p*-クマール酸）ビニルによる酵素的エステル（アシル）化を可能にした。



Enzymatic Stabilization and Functionalization of Natural-Bioactive Compounds as the Cosmetic Materials

Nobuyoshi Nakajima

Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural University

まず、美白作用を有することが報告されているヒドロキノン β -D-グルコシドであるアルブチンをアシル基受容体に、桂皮酸ビニルをアシル基供与体として、リパーゼのエルテル交換反応を利用することによりアルブチンシンナメートを合成した。本エステル化反応は、アルブチンのグルコシド糖であるグルコースのC6位の一級OH基に位置特異的であった(図1)¹⁾。

3. 1. 2 イソクエルシトリン (フラボノイド系植物色素) の芳香族酸エルテル化

リパーゼのエルテル交換反応を利用して、フラボノイド系植物色素のひとつであるイソクエルシトリン(クエルセチン-3-O- β -D-グルコピラノシド)と各種の芳香族酸ビニル(桂皮酸ビニルや

-クマール酸ビニル等)⁶⁾を原料に、そのグルコシド糖への芳香族酸エステル化を行った(図2)。

各種のアシル化イソクエルシトリンの収量は、30~60%であった。単離精製した芳香族酸エステル誘導体について、¹³C-NMR測定を行い、糖の一級アルコール(C6)部位由来のシグナルにおいて高磁場側へのシフトが認められた。また、芳香族酸の酸部分のカルボニル炭素由来のピークの低磁場側へのシフトも観測された。しかし、ポリフェノール骨格のフェノール性水酸基やグルコシド糖の二級水酸基の炭素については、ピークのシフトは全く確認されなかった。以上の結果から、イソクエルシトリンの糖部分の一級水酸基に芳香族酸が位置特異的にエステル化されて

おり、他の水酸基はエステル化されていないことが確認された^{4,15)}。

また、そのアグリコンであるクエルセチンやグルコシドであるイソクエルシトリンと比較して、イソクエルシトリン

-クマレートやイソクエルシトリンシンナメートが、熱や光に対して最も安定であることが確認された(図3)。しかも、ラジカル消去能も保持していた(表1)^{13,15)}。

3. 1. 3 クリサンテミン (アントシアニン系植物色素) の芳香族酸エステル化

リパーゼのエルテル交換反応を利用して、アントシアニン系植物色素のひとつであるクリサンテミン(シアニジン-3-O- β -D-グルコピラノシド)と各種の芳香族酸ビニル⁶⁾を原料に、そのグルコシド糖への位置特異的な芳香族酸エステル化を行った^{4,13)}。

これらの酵素的に合成したアシル化クリサンテミン類の中で、クリサンテミン

-クマレートやシンナメートが、熱や光に対して最も安定であることが確認され(図3)、ラジカル消去能も保持していた(表1)^{13,15)}。

3. 1. 4 植物培養細胞由来の酵素反応系を用いたフラボノイド系植物色素のアシル化

ムラサキイモ細胞由来の酵素反応系を用いて、遊離の芳香族酸を原料としたフラボノイド系植物色素のアシル化法を開発した。

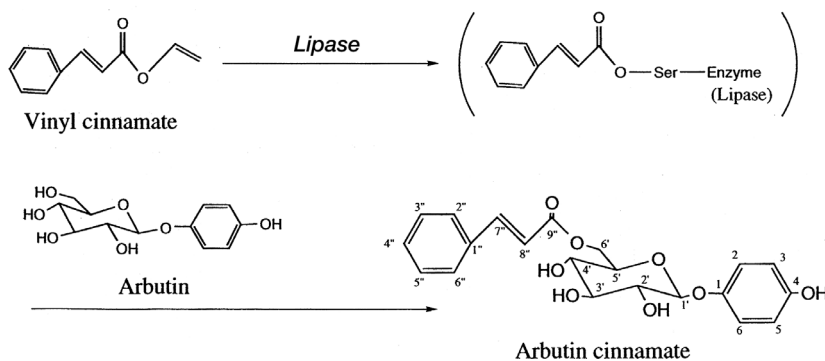


図1 Reaction scheme for lipase-catalyzed regioselective transesterification to synthesize arbutin cinnamate.

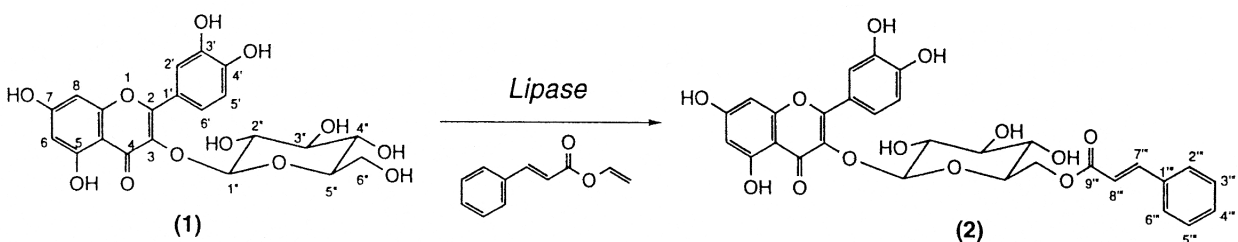


図2 Reaction scheme for lipase-catalyzed regioselective transesterification to synthesize isoquercitrin cinnamate.

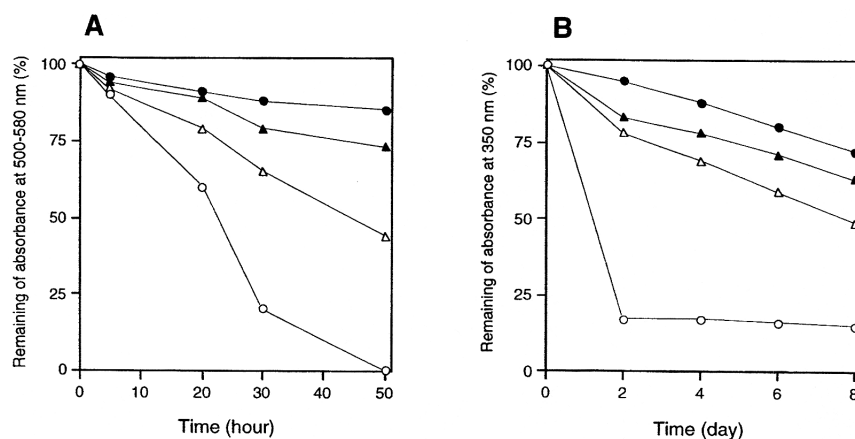
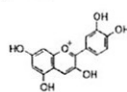
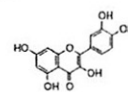
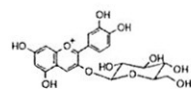
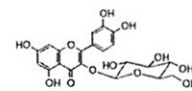
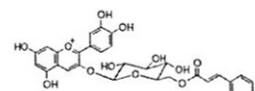
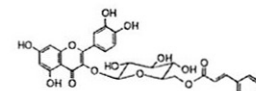
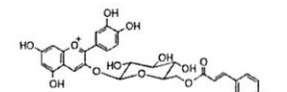
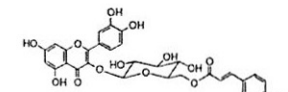


図3 Comparison of the Light-resistance of the Flavonoid Compounds.

The acylated flavonoid glucosides were synthesized from their non-acylated forms with vinyl cinnamate or vinyl p-coumarate in dry acetone by Chirazyme L-2, and their structures were elucidated by NMR(¹H-and¹³C-) and MS analyses as described previously. The residual amounts of the plant pigments without incubation are expressed as 100%. **A:** anthocyanins(450mM) were incubated at room temperature in 1 ml of a 100mM Mcl \varnothing vain buffer (pH6.0) under illumination by white fluorescent light (one side, 5,000 lx) for various times; chrysanthem p-coumarate (500nm, ●), chrysanthem cinnamate (500nm, ▲); chrysanthem (530nm, △), cyanidin (580nm, ○). **B:** flavonols (40mM) were incubated under illumination by light (one side, 20,000lx) in 1 ml of the buffer (pH7.0); isoquercitrin p-coumarate (350nm, ●); isoquercitrin cinnamate (350nm, ▲); isoquercitrin (350nm, △); quercetin (350nm, ○).

表1 Radical-scavenging abilities of plant pigments and their derivatives

Antioxidative substrate (30 nmol)	TAS ¹⁾ (mmol/l)	Antioxidative substrate (30 nmol)	TAS ¹⁾ (mmol/l)
Anthocyanins		Flavonols	
	7.16		3.57
	3.72		3.44
	2.48		3.42
	3.49		2.47

¹⁾ TAS = Total antioxidant status.

本反応に用いたムラサキイモ培養細胞由来の無細胞抽出液中には、芳香族酸からアシル-Coenzyme Aを合成する酵素（アシル-CoAリガーゼ）と、アシル-CoAをアシル基供与体として、ポリフェノールグルコシド類の糖の一級OH基に対してアシル基転移反応を触媒するトランスフェラーゼが存在すると考えられ、イソケルシトリンの、特にカフェー酸、及び、p-クマール酸によるそれぞれのアシル化が可能となった。本アシル化反応においても、ポリフェノールグルコシド糖の一級OH基に対して位置特異的であることが確認された（図4）⁷⁾。

3. 1. 5 ポリフェノールジグルコシドの芳香族酸エステル化

リパーゼのエステル交換反応を利用して、植物性ポリフェノールジグルコシドのひとつであるルチン、及び、ナリンギンへの芳香族酸エステル化を行った。

その結果、ナリンギン（図5）の場合は、ジグルコシド構造のグルコースのC6位の一級OH基がアシル化されたが、グルコシド糖に一級OH基が存在しないルチン（クエ

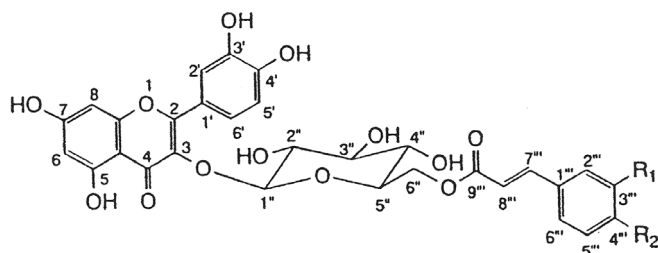


図4 Structure of acylated flavonoid glucosides (isoquercitrin aromatic acid esters).
 R1=R2=OH: isoquercitrin caffeate; R1=H, R2=OH: isoquercitrin p-coumarate;
 R1=OMe, R2=OH; isoquercitrin ferulate; R1=R2=H; isoquercitrin cinnamate.

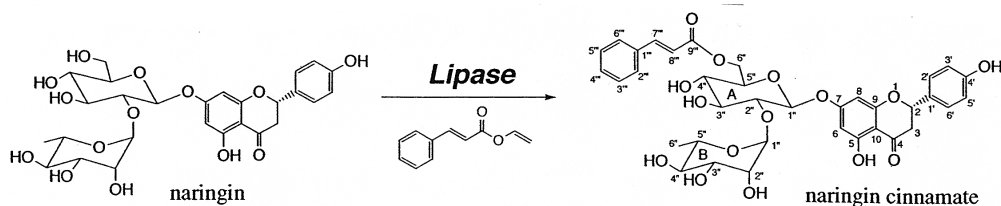


図5 Reaction scheme for lipase-catalyzed regioselective acylation for synthesis of naringin cinnamate.

ルセチンチノシド) (図6) においては、主としてグルコースのC3位の二級OH基へのアシル化が生じていることが確認された¹¹⁾。

3. 2 化粧品素材としての(ポリ)フェノール化合物の酵素的グルコシル化による機能改変

3. 2. 1 グルコシルトランスフェラーゼによるβ-thujaplicinのグルコシル化

グルコシル化は、様々な外来物質の効果的な構造改変法の一つであり、不安定で疎水性の高い、すなわち水への溶解度が低い化合物を、より安定で、かつ親水性の高い化合物に変換することができる。

本研究においては、有用な生理機能を持つ様々な難溶性フェノール化合物のβ-グルコシル化を可能にした。その具体例として、ユーカリ培養細胞由来の膜結合型UDP-グルコーストランスフェラーゼを用いた、β-thujaplicin (ヒノキチオール)、*p*-アミノ安息香酸、サリチルアルコール、コウジ酸、ダイゼイン、及び、フラボノイド化合物等の酵素的グルコシル化による機能改変を行った。

まず、天然の抗菌成分であるヒノキチオールの酵素的モノグルコシル化を可能にした。ヒノキチオールモノグルコシドへの変換率は約45%であった。本反応系では、ユーカリ培養細胞由来の膜結合型UDP-グルコシルトランスフェラーゼが、糖供与体であるUDPglucoseの存在下、(ポリ)フェノール類の「フェノール性OH基」へのグルコシル化を位置特異的に触媒していると考えられる。また、糖供与体はCDPglucoseを用いても同様に進行した。

さらに、ユーカリ膜画分を用いて連続的にグルコシル化反応を行う「膜型バイオリアクターシステム」を開発した(図7)²⁾。

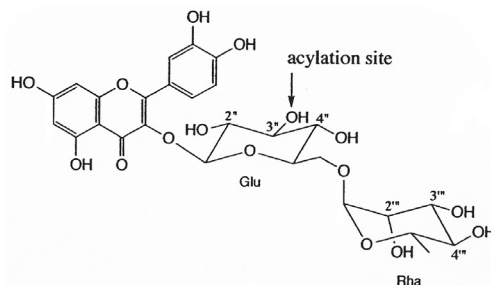


図6 Regioselectivity of the enzymatic acylation to rutin.

3. 2. 2 グルコシルトランスフェラーゼによる*p*-アミノ安息香酸のグルコシル化

次に、ユーカリ培養細胞由来のUDP-グルコシルトランスフェラーゼ反応系を用いて、「UVプロテクター」として用いられている*p*-アミノ安息香酸のモノグルコシル化を可能にした。

本法により可能となったグルコシル化は、*p*-アミノ安息香酸のCOOH基への位置特異的なモノグルコシド化であった。変換率は上記のヒノキチオールの場合とほぼ同様であった^{2, 5)}。

3. 2. 3 グルコシルトランスフェラーゼによるサリチルアルコールのグルコシル化

さらに、サリチルアルコールのサリシンへのグルコシル化も可能であった²⁾。

3. 2. 4 グルコシルトランスフェラーゼによるコウジ酸のグルコシル化

メラニン沈着を防ぐ働きを保持し美白作用を示すと考えられているコウジ酸の酵素的グルコシル化を可能にした

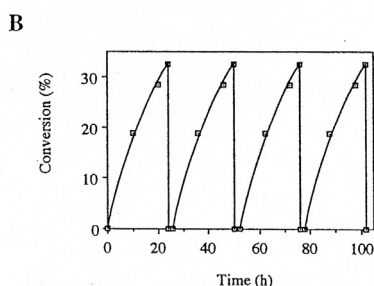
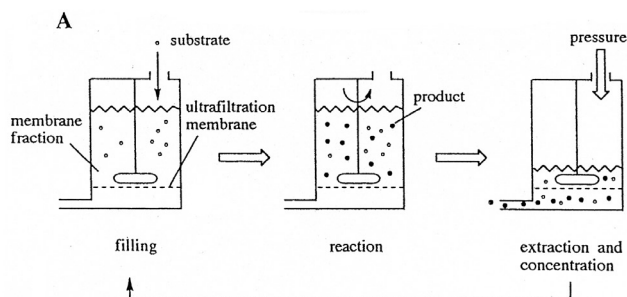


図7 Continuous enzymatic glucosylation of β-thujaplicin to the monoglucoside in a membrane reactor system. (A) Schematic diagram of repetitive batch system; (B) Continuous conversion of β-thujaplicin to the monoglucoside. The glucosylation reaction was performed at 30°C with gentle stirring in a stirred cell (10ml, Filtron Co., USA) equipped with an ultrafiltration membrane (M.W. 100,000 cut).

(図8)。コウジ酸の約40%がモノグルコシドへと変換された。また、5-O-β-D-グルコピラノシドが、7-O-β-D-グルコピラノシドよりも圧倒的に優位に生産された⁹⁾。

3. 2. 5 グルコシルトランスフェラーゼによるダイゼインのグルコシル化

同様の方法により、植物エストロゲン、イソフラボンのひとつであるダイゼインも本酵素反応を用いて、約20%の変換率でダイジン(ダイゼイン7-O-β-D-グルコピラノシド)に変換することが可能であった(図9)⁹⁾。

3. 2. 6 グルコシルトランスフェラーゼによる各種のフラボノイド化合物のグルコシル化

フラボン類、フラボノール類、イソフラボン類、並びに、カルコン類等の植物性ポリフェノール類を基質として、ユーカリ培養細胞由来のUDP-グルコシルトランスフェラーゼによるグルコシル化を検討した。

その結果、本酵素反応によるグルコシル化は、アピゲニンやルテオリン(フラボン類)のモノグルコシド化、ケンフェロール(フラボノール類)のアストラガリンへのモノグルコシル化、ケルセチン(フラボノール類)のモノグルコシドであるイソケルシトリン(ケルセチン-3-O-β-D-グルコピラノシド)やケルシメリトリン(ケルセチン-7-O-β-D-グルコピラノシド)へのグルコシル化、

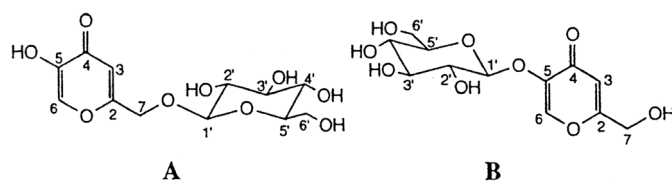


図8 Structures of kojic acid glucosides. (A) Kojic acid 7-O-β-D-glucopyranoside; (B) kojic acid 5-O-β-D-glucopyranoside.

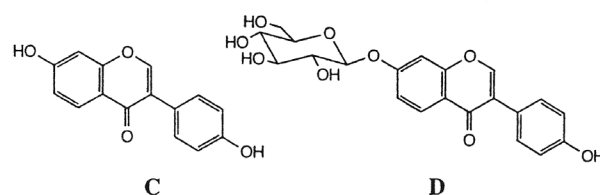


図9 Structures of daidzein glucosides. (C) Daidzein; (D) daidzin(daidzein 7-O-β-D-glucopyranoside).

並びに、エキナチン(カルコン)や上述したダイゼイン(イソフラボン)の位置選択的なモノグルコシル化が確認された²⁾。

3. 2. 7 パン酵母によるUDP-グルコース発酵を共役させUDP-グルコシルトランスフェラーゼ反応系によるグルコシル化

マグネシウムイオンとリン酸イオンの存在下、AMPとグルコースを原料に、「パン酵母」によるUDPglucose発酵により生産させたUDPglucoseを糖供与体として、ユーカリ培養細胞由来のUDP-グルコシルトランスフェラーゼによるモノグルコシル化を行う「共役反応系」を構築した(図10)⁵⁾。

3. 2. 8 植物培養細胞変換法と酵素法によるカプサイシン関連化合物のグルコシル化

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるカプサイシン関連化合物のフェノール性OH基へのモノグルコシル化(図11)を経て、さらに、デンプンを糖供与体としたCGTaseによるカプサイシンオリゴサッカライド類の合成を可能にした^{10,12)}。

4. 総括

以上、「化粧品素材」として有用な天然植物色素を始め

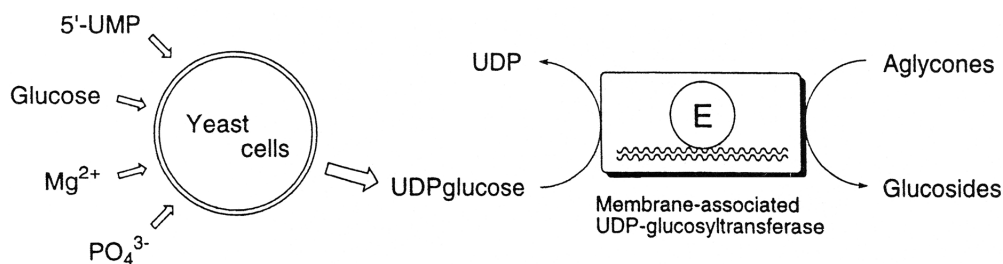


図 10 Reaction scheme for synthesis of β -D-glucosides by the coupled enzymatic reaction with UDP-glucosyltransferase and yeast cells.

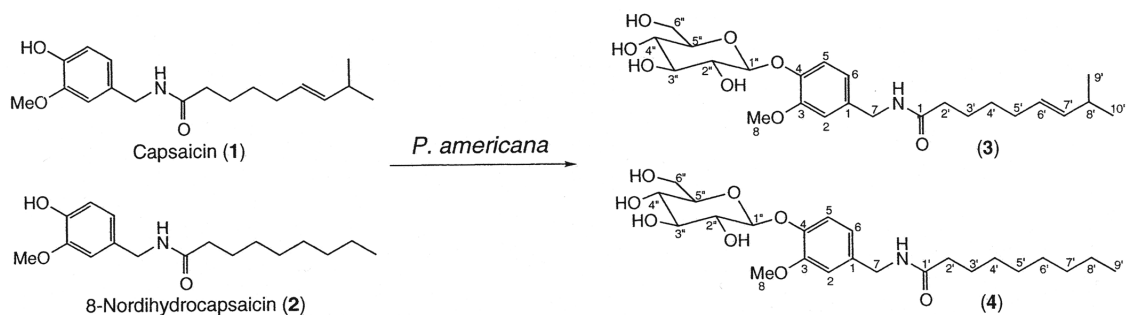


図 11 Synthesis of capsaicin β -D-glucopyranoside (3) and 8-nordihydrocapsaicin β -D-glucopyranoside (4) from 1 or 2 by the cultured cells of *P.americana*.

とした（ポリ）フェノールグルコシド類の安定化と生理機能の高機能化を目指して、微生物由来のリパーゼのエステル交換反応や植物細胞由来の酵素共役反応系を利用した、ポリフェノールグルコシド類の芳香族酸エステル化（アシル化）のための方法を開発した。

さらに、抗酸化性（ポリ）フェノール化合物等の機能改変と「化粧品素材」としての有効利用方法のさらなる拡大を主目的に、植物や微生物由来の酵素反応を利用した、各種のフェノール性化合物やフラボノイド類のグルコシル化による構造機能改変を可能にした。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援をいただきました（財）コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

(引用文献)

- 1) N. Nakajima, K. Ishihara, S. Matsumura, H. Hamada, K. Nakamura, and T. Furuya, Lipase-catalyzed Synthesis of Arbutin Cinnamate in Organic Solvent and Application of Transesterification to Stabilize Plant Pigments. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**(11), pp. 1926-1928, 1997.
- 2) N. Nakajima, T. Furuya, K. Ishihara, S. Matsumura,

S. Mizobata, and H. Hamada, Effective Production of β -Thujaplicin 2-*O*- β -D-glucoside by UDP-glucosyltransferase Fraction from Cultured Cells of *Eucalyptus perriniana* in a Membrane Reactor. *J. Ferment. Bioeng.*, **84**(5), pp. 455-460, 1997.

- 3) H. Hamada, Y. Miyamoto, N. Nakajima, and T. Furuya, High Selective Transformation by Plant Catalysts. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **5**, pp. 187-189, 1998.
- 4) N. Nakajima, K. Ishihara, T. Itoh, T. Furuya, and H. Hamada, Lipase-catalyzed Regioselective and Direct Acylation of Flavonoid Glucoside for Mechanistic Investigation of Stable Plant-pigment. *J. Biosci. Bioeng.*, **87**(1), pp. 105-107, 1999.
- 5) N. Nakajima, K. Ishihara, H. Hamada, S. Yamane, K. Nakamura, and T. Furuya, Multi-enzymatic Glucosylation Using *Eucalyptus* UDP-glucosyltransferase Coupled UDPglucose-fermentation by Bakers' yeast. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**(5), pp. 934-936, 1999.
- 6) K. Ishihara, N. Nakajima, T. Itoh, H. Yamaguchi, T. Furuya, and H. Hamada, A Chemoenzymatic Synthesis of Aromatic Carboxylic Acid Vinyl Esters. *J. Mol.*

- Catal. B: Enzymatic, **7**, pp. 307-310, 1999.
- 7) N. Nakajima, K. Ishihara, H. Hamada, S. Kawabe, and T. Furuya, Regioselective Acylation of Flavonoid Glucoside with Aromatic Acid by an Enzymatic Reaction System from *Ipomoea batatas*. J. Biosci. Biotech., **90**(3), pp. 347-349, 2000.
- 8) K. Sanada, A. Kawaguchi, T. Furuya, K. Ishihara, N. Nakajima, and H. Hamada, High Production of β-Thujaplicin with *Thuja dolabrata* var. *hondai* cells in a Semi-continuous Culture System. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, **11**, pp. 59-61, 2000.
- 9) N. Nakajima, K. Ishihara, and H. Hamada, Functional Glucosylation of Kojic acid and Daidzein with the Eucalyptus Membrane-Associated UDP-Glucosyltransferase Reaction System. J. Biosci. Biotech., **92**(5), pp. 469-471, 2001.
- 10) H. Hamada, K. Nishida, T. Furuya, K. Ishihara, and N. Nakajima, Preparation of a New Papper: Chemoenzymatic Synthesis of Capsaicin oligosaccharide and 8-Nordihydrocapsaicin oligosaccharide. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, **16**, pp. 115-119, 2001.
- 11) K. Ishihara, Y. Nishimura, T. Kubo, C. Okada, H. Hamada, and N. Nakajima, Enzyme-Catalyzed Acylation of Plant Polyphenols for Interpretation of their Functions. Plant Biotechnol., **19**(3), pp. 211-214, 2002.
- 12) H. Hamada, S. Ohiwa, T. Nishida, H. Katsuragi, T. Takeda, H. Hamada, N. Nakajima, and K. Ishihara, One-step Glucosylation of Capsaicinoids by Cultured Cells of *Phytolacca americana*. Plant Biotechnol., **20**(3), pp. 252-255, 2003.
- 13) N. Nakajima, M. Sugimoto, H. Yokoi, H. Tsuji, and K. Ishihara, Comparison on Acylated Plant Pigments: Light-resistibility and Radical Scavenging Ability. Biosci. Biotech. Biochem., **67**(8), pp. 1823-1832, 2003.
- 14) K. Ishihara, H. Hamada, T. Hirata, and N. Nakajima, Biotransformation using Plant Cultured Cells. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, **23**, pp. 145-170, 2003.
- 15) K. Ishihara and N. Nakajima, Structural Aspects of Acylated Plant Pigments: Stabilization of Flavonoid Glucosides and Interpretation of their Functions. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, **23**, pp. 411-417, 2003.