

新たな生理機能を付加させることを目的とした 新規化粧品素材の酵素的分子創製

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

石原 浩二

Arbutin was acylated with aromatic acids and related compounds to the corresponding acylated forms by a lipase-catalyzed transesterification. As the results, further stabilization and functionalization of natural bioactive compounds as cosmetic materials have been achieved by the enzymatic-modification method.

1. 緒言

近年、生活習慣の変化や食生活の多様化により、我々人類を取り巻く環境に関わる問題がクローズアップされている。このような状況の中、天然資源の大量消費による有用な植物資源の枯渇に伴い、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るようになってきた。これら機能性化合物の中で、特に、植物色素の生理機能に大きな注目が集まっている。

花の色の多彩さ、美しさを担う天然の植物色素は、フェノール性のフラボノイドを基本骨格とした配糖体（グルコシド）構造を有している。さらに植物色素は糖の特定の水酸基が *p*-クマール酸やカフェー酸、フェルラ酸などの各種芳香族酸によるエステル化を受けており、この化学的な修飾が植物色素の安定化や生理作用に深く関与していると考えられている。天然の植物色素は、健康食品としても注目される一方、美白効果作用を有する化合物も存在しており、化粧品素材としての利用や研究も盛んに行われている。

そこで本研究は、天然植物色素への効率的かつ実用的な芳香族酸エステル化を方法確立し、応用することで、植物色素の光や熱に対する安定性を高め、また、抗酸化能やラジカルスカベンジング能および紫外線遮蔽効果（紫外線からの遺伝子の保護作用）などの生理機能を付加させることで、新規化粧品素材開発を念頭においた植物色素の機能性向上を主目的とする。対象とする化合物は美白効果があるとされているアルブチンとし、申請者が既に確立している方法を応用することで、アルブチンに桂皮酸、*p*-クマール酸、フェルラ酸などの各種芳香族酸エステル基を導入したアシル化アルブチンを酵素的に合成し、美白効果だけでなく、ラジカルスカベンジング能、抗酸化作用、紫外線遮

蔽効果などの第三次機能を付加させた、高機能性新規化粧品素材の開発を検討することにした。

2. 実験

2.1 化粧品素材としてのアルブチンの酵素的アシル化

我々がこれまでに開発した合成方法は、芳香族酸を化学合成によりビニルエステルへと変換し、この芳香族酸ビニルエステルをアシルドナーとした、リパーゼによるエステル交換反応を利用したポリフェノールグルコシドのアシル化法であった¹⁻⁵⁾。しかし、この方法では、アシルドナーとしてビニルエステルが必要であり、アシルドナーをいかにして準備するかがキーステップとなっていた²⁾。そこで、本実験では、アシルドナーを経由しない、酸成分とアルコール成分を直接エステル化するダイレクトな合成ルートについて検討を行うことにした。

リパーゼ (Chirazyme L-2) 50 mg、アルブチン (基質) 10 mg、芳香族酸として *p*-クマール酸 50 mg、溶媒 (アセトン、アセトニトリル、アルコール系溶媒など) 3 ml、モレキュラーシーブス 100 mg を 37℃ ~ 65℃ で攪拌し、最適な反応温度、攪拌方法、芳香族酸の種類について調査した。生成物は TLC 分析 (展開溶媒、クロロホルム:メタノール = 5:1) し、UV 及びヨウ素発色により確認し、¹H-、¹³C-NMR、FAB-MS 分析により同定した。

3. 結果と考察

3.1 溶媒の影響

リパーゼを用いたトランスエステル化で汎用される溶媒として、アセトニトリル、アセトン、イソプロピルエーテル、そしてアルコール系溶媒としてメタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、*tert*-ブタノールを使用し、変換率を比較したところ、*tert*-ブタノールを用いた時が最も高い変換率を示した。

また、あらかじめモレキュラーシーブスで脱水した溶媒を用いた方がより高い変換率を示すことがわかり、さらに、



Enzymatic Stabilization and Functionalization of Natural Plant Pigment as Cosmetic Materials

Kohji Ishihara

Department of Life Science, Okayama University of Science

脱水溶媒の中でも *t*-ブタノールを用いた時が最もよい変換率を示した。しかしながら、脱水操作をより厳密に行い、無水系で有機合成を行うレベルにまで溶媒を脱水してしまうと、アシル化反応はほとんど進行しなくなった。これは、リパーゼ反応が微水系で進行することを示唆しているものと考えられる。

3.2 反応温度

3.1で最も高い変換率を示した脱水 *t*-ブタノールを溶媒として用い、酵素反応で最もよく用いられる反応温度である 37℃ 及び 45℃ で反応を行った。しかし、いずれにおいても変換率は低いものであった。そこで、さらに反応温度を上げ、55℃ もしくは 65℃ で反応を行った結果、反応温度 55℃ が最も高い変換率を示し、65℃ ではほとんど反応が進行しないことがわかった。これは、65℃ という高温では、酵素であるリパーゼが失活するためであると考えられる。

3.3 攪拌方法

攪拌方法として、上下転倒型、攪拌子による回転型、ボルテックスミキサーによるバイブレーション型と3種類の攪拌方法を試した。その結果、バイブレーション型攪拌が最も変換率が高く、また再現性もあった。これは、攪拌方法としてかなり激しい条件が必要であることを示唆していると考えられる。

そこで、3.1～3.3で検討した条件検討の結果を用い、ベストな組み合わせ、すなわち、溶媒に *t*-ブタノール（事前にモレキュラーシーブスで脱水したもの）、反応温度 55℃、バイブレーション型攪拌という条件でアルブチンの *p*-クマレート化反応を行ったところ、65% にまで変換率を高めることに成功した。

3.4 生成物の確認

TLC 分析の結果、基質であるアルブチンが Rf 値 0.22、アシルドナーである *p*-クマール酸が Rf 値 0.56、生成物ら

しいスポットが Rf 値 0.39 に一つだけ確認できた。そこで、プレパラティブ TLC にて分離し、生成物と考えられるスポット部分を取り出し、クロロホルムで抽出、減圧下で溶媒を除去後、残った白色粉末について NMR 分析を行った。その結果、アルブチンに特有なピークと *p*-クマール酸に特有なピークの両方が観測された。また、*p*-クマール酸のカルボキシル基の炭素とアルブチンの糖の C6 位の炭素が高磁場側へシフトしていること、その他の炭素のシグナルについてはシフトがなかったことから考えて、アルブチンの糖の 1 級水酸基がある C6 位と *p*-クマール酸の酸部分が脱水縮合してエステル結合が生成していると判断した。また、FAB-MS 分析の結果からも、アルブチンと *p*-クマール酸がエステル結合していることを示唆するデータが得られ、以上の結果から、図 1 にあるように、アルブチンの *p*-クマレートの生成を確認した。

3.5 他のアシルドナーを用いたアルブチンのアシル化

アシルドナーとして、フェルラ酸、カフェー酸、*p*-アミノ安息香酸、 α -リボ酸、キナ酸を用い、同様の実験を行った。その結果、フェルラ酸（変換率 30%）、*p*-アミノ安息香酸（変換率 75%）、 α -リボ酸（変換率 >90%）をアシルドナーとした場合に、生成物のスポットが確認できた。アシル化の変換率については、アシルドナーとして α -リボ酸を用いた場合が最も高く、次いで *p*-アミノ安息香酸、そして *p*-クマール酸の順であった。この結果から、本研究で用いた酵素リパーゼは芳香族酸だけでなく、 α -リボ酸に対して高い特異性を有していると考えられる。アルブチンの α -リボ酸エステルと考えられる生成物に関しては、現在、化学構造と生理活性について調査中である。

4. 総括

以上、「化粧品素材」として有用なアルブチンの安定化と高機能化を目標に、微生物由来のリパーゼの優れた触媒作用を高度に利用した芳香族酸エステル化（アシル化）の

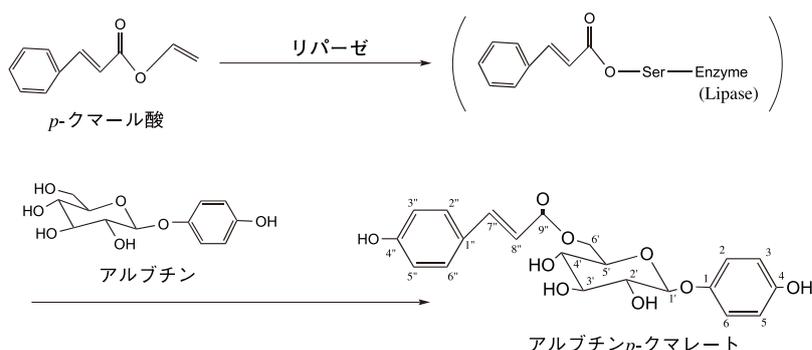


図 1 Reaction scheme for lipase-catalyzed transesterification to synthesize arbutin *p*-coumarate.

ための方法について検討を行った。その結果、酸成分（芳香族カルボン酸）をビニルエステルへと変換することなく、ダイレクトにアルブチンへと縮合させる方法を確立し、効率的なアシル化アルブチンの酵素的合成に成功した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を頂いた(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, H. Hamada et. al., Lipase-Catalyzed Direct and Regioselective Acylation of Flavonoid Glucoside for Mechanistic Investigation of Stable Plant Pigments, *J. Biosci. Bioeng.*, 87 (1), pp. 105-107 (1999).
- 2) K. Ishihara, N. Nakajima, H. Hamada, et. al., A

Chemoenzymatic Synthesis of Aromatic Carboxylic Acid Vinyl Esters, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 7, pp. 307-310 (1999).

- 3) N. Nakajima, K. Ishihara, H. Hamada, et al., Regioselective Acylation of Flavonoid Glucoside with Aromatic Acid by an Enzymatic Reaction System from Cultured Cells of *Ipomoea batatas*, *J. Biosci. Bioeng.*, 90(3), pp. 347-349 (2000).
- 4) K. Ishihara, Y. Nishimura, T. Kubo et. al., Enzyme-Catalyzed Acylation of Plant Polyphenols for Interpretation of Their Functions, *Plant Biotechnology*, 19(3), pp. 211-214 (2002).
- 5) K. Ishihara and N. Nakajima, Structural Aspects of Acylated Plant Pigments: Stabilization of Flavonoid Glucosides and Interpretation of Their Functions, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 23, pp. 411-417 (2003).