

シルクプロテイン-ポリフェノールコンジュゲートの合成と機能評価

大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻

宇山 浩

The biological and pharmacological effects of polyphenols have been demonstrated in numerous human, animal and in vitro studies. The present report describes synthesis and bio-related properties of polyphenol conjugates on poly(amino acid)s such as silk protein and poly(ϵ -lysine). In this study, chlorogenic acid, caffeic acid, and green tea catechin were used as polyphenol for the conjugation. At first, silk protein was chemically modified with the polyphenols by using dehydrating coupling agent, but the introduced ratio of the polyphenols was very low. Next, an enzymatic conjugation of the polyphenols on poly(ϵ -lysine) has been examined. The conjugates were successfully synthesized by the oxidation of the polyphenols using *Myceliophthora* laccase as catalyst in the presence of poly(ϵ -lysine). The antioxidant activity of the resulting conjugates was evaluated in terms of superoxide anion scavenging activity. The conjugates greatly scavenged superoxide anions in a concentration dependent manner on the polyphenol unit level, compared to the monomeric polyphenol. These data imply that the enzymatic conjugation enormously improved the antioxidant property of the polyphenols. Additionally, the conjugates showed good inhibitory effects toward disease-related enzymes, xanthine oxidase, collagenase, and hyaluronidase.

1. 緒言

緑茶をはじめとする食品に含まれるポリフェノール類は、優れた抗酸化性、抗ガン活性、抗菌性、抗炎症性、抗ウィルス性などの種々の生理活性を有することが知られており、動脈硬化などの成人病やガン発生を予防する機能性食品基材として注目されている。一方、天然にはプロアントシアニジンに代表されるポリフェノールオリゴマーが知られており、低分子ポリフェノール類とは異なる特異的な生理活性を示す。動脈硬化抑制作用、胃潰瘍抑制作用、大腸ガン抑制作用、糖尿病合併症抑制作用などが見出されている。

一方、我々は低分子量ポリフェノール類を人工的に高分子量化することで、ポリフェノールの機能向上・新機能発現を検討してきた¹⁻⁸⁾。本研究ではシルクプロテインを始めとするタンパク質(ポリアミノ酸)へポリフェノールを導入し、その機能の増幅を調べた。

2. 実験

ポリフェノール類としてはクロロゲン酸(ChA)、カフェ酸(CA)といったカルボン酸含有のポリフェノールと緑茶抽出カテキン(GTC)を用いた。幹ポリマーへのコンジュゲート化は幹ポリマー側鎖のアミノ基を利用し、①ポリフェノールのカルボン酸間の脱水縮合、②ポリフェノール類の酵素的酸化を伴うカップリング、の二種類の方法を検討した。



Synthesis of Silk Protein-Polyphenol Conjugates and Evaluation of Their Properties

Hiroshi Uyama

Department of Applied Chemistry,
Graduate School of Engineering, Osaka
University

②に関し、ポリ(ϵ -リジン)-クロロゲン酸コンジュゲートの合成を詳しく述べる。大気中、ポリ(ϵ -リジン)(0.64 g, 5 mmol monomer unit)を蒸留水 20 mlに溶解させ、pHを7に調整した。ここに2 mlのメタノールに溶解させたクロロゲン酸(0.089g, 0.25mmol)を混合した。ラッカーゼ溶液(5 μ l, 5units)を添加することで反応を開始し、24時間後、6 N HCl数滴を加え、10%メタノールを含む蒸留水中で透析することにより精製した(cut-off MW=500)。得られた溶液を凍結乾燥し、0.38gのコンジュゲートを得た。¹H-NMR(DMSO-d₆): δ /ppm = 1.0-2.0 (br. CH₂CH₂CH₂ of PL), 2.4-2.9 (CH₂), 3.0-3.2 (br ϵ -CH₂), 3.2-3.6 (br. CHOH), 3.6-3.9 (α -CH₂), 7.5-8.6 (br. CH=CH, Ar-H), 8.7-9.1 (br. Ar-OH)。ポリ(ϵ -リジン)-カフェ酸コンジュゲート、ポリ(ϵ -リジン)-緑茶カテキンコンジュゲートは同様に合成した。

3. 結果

本研究の前半ではポリフェノールとしてクロロゲン酸とカフェ酸を用いた。これらはコーヒーの独特の褐色、香り、味のもとになるものであり、抗酸化性、抗炎症性、抗アレルギー性などの様々な生理活性が知られている。コーヒーは13世紀半ば頃からアラビアを中心とするイスラム教の国々で愛飲され薬としても用いられたと言われており、後に欧州に伝わり現在では緑茶と並び世界中で広く飲用されている。近年ではコーヒーに肝臓がん予防効果があることなども報告されている。

最初にモデル反応として、合成ポリアミンの一種である分岐状ポリエチレンイミン(分子量2万)とカフェ酸の反

応を検討した。水中でのペプチド結合形成に一般的に用いられる縮合剤 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩と縮合助剤 N-ヒドロキシスクシンイミドを用いることで、カフェ酸が効率的に導入された(ポリエチレンイミンのアミノ基当たり数%の導入)。

スーパーオキシドアニオンは通常の好気性代謝などによって、生体内で常に生成している。そのひとつにキサンチンがキサンチンオキシダーゼによって尿酸に変わる反応がある。この過程で酸素が電子受容体として働くことで同時にスーパーオキシドアニオン (SOD) が発生する。そこで、このキサンチン/キサンチンオキシダーゼ系を用いてスーパーオキシドアニオンを発生させ、化学発光法で検出することにより生成物のスーパーオキシドアニオン消去能、すなわち SOD 様活性を調べた。その結果、カフェ酸に比較してコンジュゲート化による機能の向上が見られなかった。次にシルクプロテインを用いて同様の反応を行ったが、カフェ酸の導入率が1%以下であったため、酵素法によるポリフェノール類のコンジュゲート化に切り替えて、狙いとするコンジュゲートの合成を試みた。

クロロゲン酸とカフェ酸といったカルボン酸基含有ポリフェノールを用いる酵素的コンジュゲート化を検討した。幹ポリマーとしては、抗菌・静菌作用を有する食品基材であるポリ(εリジン)を用いた。*Myceliophthora* 由来のラッカーゼを触媒に用い、ポリフェノールをポリ(εリジン) (PL) にコンジュゲートさせた。ポリ(εリジン) -

クロロゲン酸コンジュゲート (PL-ChA) の UV-vis スペクトルを測定したところ、250 ~ 450nm にポリリジンがほとんど吸収を示さないのに対し、コンジュゲート化によりクロロゲン酸に由来する吸収が見られた。カフェ酸においても同様の結果が得られた。ポリ(εリジン)へのクロロゲン酸とカフェ酸の導入率を元素分析により求めたところ、7.4% (PL-ChA) と 8.1% (ポリ(εリジン)-カフェ酸コンジュゲート (PL-CA)) であった。

得られたコンジュゲートの SOD 様活性を調べた (Fig. 1)。クロロゲン酸、カフェ酸のいずれにおいてもポリペプチドへのコンジュゲート化により SOD 様活性が大きく向上した。また、コンジュゲート化ポリフェノールの DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) ラジカルに対する消去能を測定した。DPPH は天然には存在しないが、比較的安定なラジカルであり評価が簡便なことから、抗酸化性の指標としてよく用いられる。Table 1 に IC₅₀ 値として抗酸化性機能を示す。これより、DPPH 消去能がコンジュゲート化により低下することが明らかとなった。

キサンチンオキシダーゼによりキサンチンから尿酸が生じる反応は、プリン体と呼ばれる共通構造を持つ物質が分解される最後の過程である。プリン体は体内の代謝によって生成したり、またビールや動物性食品に含まれることでも知られており、最終産物である尿酸が関節に蓄積することにより痛風などの症状を引き起こす。よってキサンチンオキシダーゼの阻害物質はスーパーオキシドアニオンの生

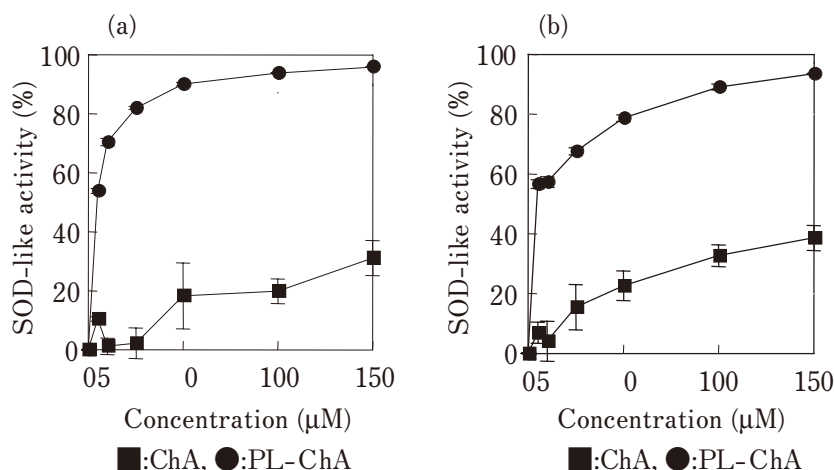


Fig.1 SOD-like activity of PL-polyphenol conjugates: (a) chlorogenic acid; (b) caffeic acid.

Table 1 Antioxidant property and enzyme inhibition activity of PL-polyphenol conjugates

Product	IC ₅₀ (μM)		
	DPPH scavenging	Collagenase inhibition	Hyaluronidase inhibition
Chlorogenic acid	18.4	145	145
PL-ChA	>30	>150	157
Caffeic acid	17.3	145	145
PL-CA	>30	150	230

成を抑制するとともに、尿酸の生成を阻害することによる痛風治療薬としても有用であると考えられる。Fig. 2に本コンジュゲートのキサンチンオキシダーゼ阻害能を示した。クロロゲン酸、カフェ酸のコンジュゲートは濃度に応じたキサンチンオキシダーゼ阻害を示し、モノマーと同程度であるの阻害活性を示した。

マトリックスメタロプロテイナーゼはZnを活性中心に持つ酵素群であり、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメリシンなどからなる。これらは細胞外マトリックスのタンパク質を分解、再構築する酵素で、その恒常性を保つのに重要な役割を果たしているが、その発現や活性のバランスが崩れると様々な病態が発症する。そのため近年、がんや炎症、関節炎などに対し、マトリックスメタロプロテイナーゼをターゲットとした薬剤の開発に注目が集まっている。同様に、微生物 (*Clostridium histolyticum*) 由来のコラゲナーゼについても多くの研究が行われている。この微生物コラゲナーゼは基底膜の主成分であるIV型コラーゲンを分解する酵素である。コラーゲンは骨、軟骨、皮膚、血管などに多く含まれ、体内の全タンパク質の30%を占める。コラーゲンの衰えにより動脈硬化、関節痛、肌あれ、シミ・しわなどの症状が現れる。よって、これらの症状を予防するためのコラゲナーゼ阻害剤の研究が盛んに行われており、ポリフェノール類もそのひとつである。そこで本研究で得られたコンジュゲートのコラゲナーゼ阻害能について評価を行った (Table 1)。その結果、コンジュゲート

に阻害活性が見られたが、その活性はモノマーと同程度あるいはそれ以下に留まった。

ヒアルロニダーゼは人間の肌や眼球、鶏のとさかに含まれる保湿成分であるヒアルロン酸を分解する酵素である。真皮中に存在する酵素ヒアルロニダーゼは活性化して、かゆみ・ひりつき・毛細血管の拡張による赤み、むくみなどの炎症を引き起こす。またヒアルロニダーゼは炎症時の血管透過性を増加させることにより、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎やじんましんなどのI型アレルギー症状にも深く関わっており、抗炎症剤、抗アレルギー剤としてヒアルロニダーゼ阻害剤の開発が求められている。本研究で得られたコンジュゲートのヒアルロニダーゼ阻害能について評価を行った (Table 1)。その結果、コラゲナーゼ阻害と同様に顕著な活性の増幅は見出されなかった。

次に緑茶抽出ポリフェノール (緑茶カテキン) のポリ (ε-リジン) へのコンジュゲートを試みた。緑茶に含まれるカテキン類は最も豊富に存在しよく研究されている植物ポリフェノールの1つである。茶の木は *Camellia sinensis* というツバキ科に属する植物で、その乾燥葉重量中に10~15%のカテキン類が含まれる。中国や日本では古くから健康によいとされ、嗜好品としてだけでなく様々な疾患に対する民間療法として緑茶が飲用されてきたが、その薬効の多くがこのカテキン類によるものであると考えられる。緑茶カテキンの主成分の構造を Fig. 3 に示す。本研究では緑茶カテキンとして三井農林製ポリフェノン70Sを用いた。

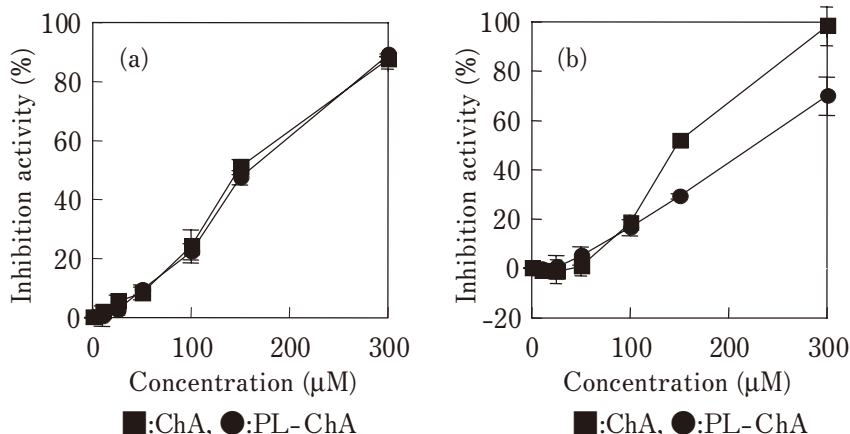


Fig. 2 XO inhibition activity of PL-polyphenol conjugates: (a) chlorogenic acid; (b) caffeic acid.

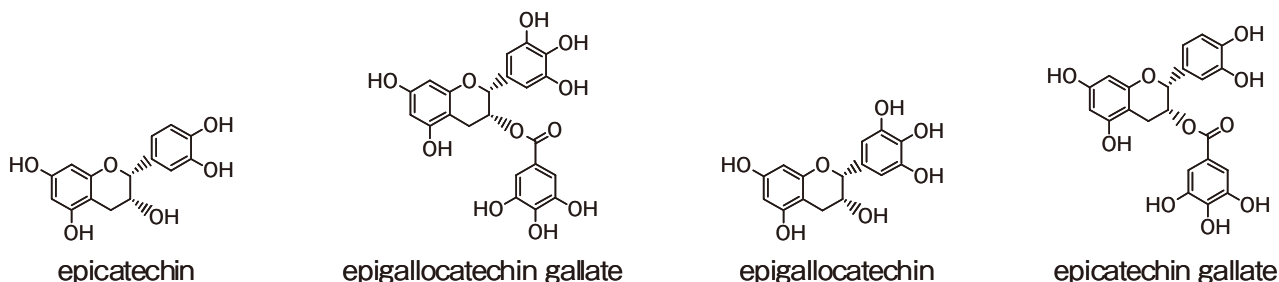


Fig. 3 Structure of typical catechin derivatives in green tea

コンジュゲートの合成はカフェ酸、クロロゲン酸の場合と同様にラッカーゼ触媒を用いて行った。得られたポリ(ϵ -リジン)-緑茶カテキンコンジュゲート (PL-GTC) における緑茶カテキンの導入率は 3.4mol% であった。

抗酸化性評価の尺度として、上述の DPPH 消去能と SOD 様活性以外に、安定カチオンラジカル (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS) に対する消去能を測定した。評価結果を Table2 に示す。比較として工業的に用いられている抗酸化剤である BHT や Trolox の抗酸化性を示した。DPPH ラジカル、ABTS ラジカル

については、緑茶カテキン、ポリ(ϵ -リジン)-緑茶カテキンコンジュゲートともに低濃度で効果的に消去された。DPPH についてはコンジュゲート化により緑茶カテキンより抗酸化性が低下したが、ABTS に対しては抗酸化性が向上した。SOD 様活性については、コンジュゲート化による著しい向上が見られた。

ポリ(ϵ -リジン)-緑茶カテキンコンジュゲートの酵素阻害活性について調べたところ、キサンチンオキシダーゼ、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼのいずれに対しても、コンジュゲート化により阻害活性が大幅に向上した (Fig.4)。

Table 2 Antioxidant activity of PL-GTC conjugate

Product	Radical scavenging activity (IC_{50} (μ M))		
	DPPH	ABTS	Superoxide anion
Green tea catechin	7.2	5.2	55.8
PL-GTC conjugate	16.9	4.4	4.6
BHT	—	—	>>200
Trolox	24.8	—	155

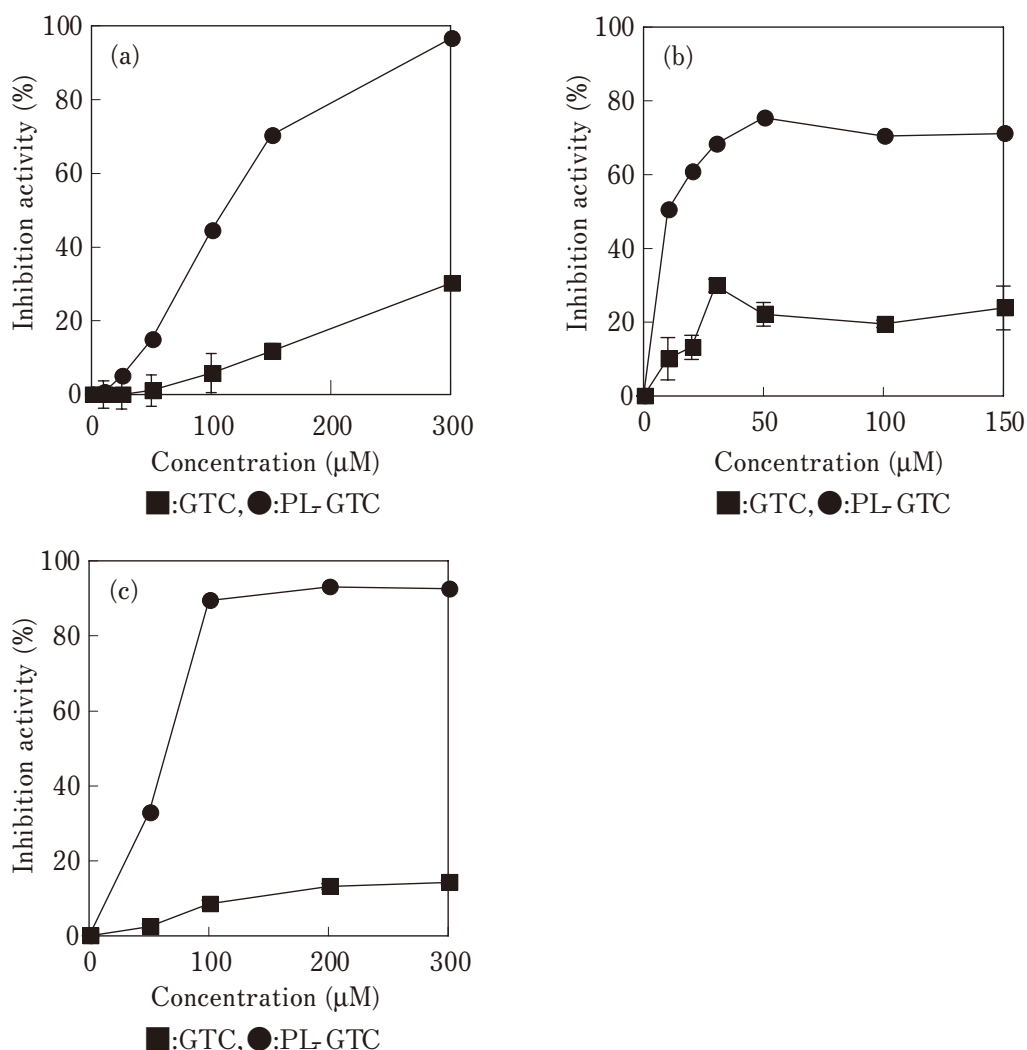


Fig. 4 Enzyme inhibition activity of GTC and PL-GTC conjugate for: (a) xanthine oxidase; (b) collagenase; and (c) hyaluronidase

これらの結果から、緑茶カテキンの機能向上にポリペプチドへのコンジュゲート化が有効であることがわかった。この結果はカフェ酸、クロロゲン酸のコンジュゲート化と異なり、緑茶カテキンに特有の現象である。

4. 考 察

本研究ではカフェ酸、クロロゲン酸、緑茶カテキンといったポリフェノール類のタンパク質へのコンジュゲート化を試みた。ポリフェノールのカルボン酸基を利用したコンジュゲートではモデル系で反応の進行を確認できたが、アミノ基（リジン残基）の少ないシルクプロテインでは、十分な反応の進行を達成できなかった。また、シルクプロテインは可溶性サンプルの分子量が高くなく（数千程度）、そのことが収率と導入率の低下につながっていると思われる。

一方、酵素法については、モデルポリマーであるポリ(ε-リジン)に対するポリフェノールの導入法が確立できた。ラッカーゼの添加により空気酸素を用いた酸化が利用できるように、コンジュゲート体合成の操作は極めて簡便である。また、抗酸化性や酵素阻害活性が見出されたことから、実用的化粧品基材としての可能性が示された。

活性酸素やフリーラジカルによる酸化傷害は種々の疾病や発がん、老化と密接に関わっている。酸化ストレスは、細胞のDNA、細胞膜上のリン酸脂質、蛋白、糖質を傷害し、老化や血管傷害、脳障害、がんなどを進行させる。こうした酸化ストレスから体を防御して体を錆びつづのを防止するために、優れた抗酸化作用を有する食品や医薬品が必要とされる。現在、緑茶カテキンをはじめとするポリフェノール類は飲料やサプリメントなどの健康食品として用いられているが、さらに機能を高めることにより疾患を治療する製剤などへの積極的な利用が期待される。その観点から本研究で開発したポリ(ε-リジン)には機能性食品、予防薬への用途が想定される。

5. まとめ

本研究では、主に酵素を触媒に用いたクロロゲン酸、カフェ酸、緑茶カテキンのポリ(ε-リジン)へのコンジュゲート体の合成と機能評価を行った。コンジュゲート化によりスーパーオキシドアニオン除去能が著しく向上し、キサンチンオキシダーゼ、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼといった疾患関連酵素に対する阻害能が見出された。これらの結果から、我々が先に見出したポリフェノール類の高分子量化による生理活性の増幅という手法をクロロゲン酸、

カフェ酸、緑茶といったポリフェノール類に拡張できることが明らかとなり、得られたポリフェノール含有コンジュゲートには機能材料としての応用が期待される。

(参考文献)

- 1) M. Kurisawa, J. E. Chung, Y. J. Kim, H. Uyama, and S. Kobayashi, Amplification of Antioxidant Activity and Xanthine Oxidase Inhibition of Catechin by Enzymatic Polymerization, *Biomacromolecules*, **4**, 469-471 (2003).
- 2) M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, and S. Kobayashi, Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly(rutin), *Biomacromolecules*, **4**, 1394-1399 (2003).
- 3) M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, and S. Kobayashi, Oxidative Coupling of Epigallocatechin Gallate Amplifies Antioxidant Activity and Inhibits Xanthine Oxidase Activity, *Chem. Commun.*, 294-295 (2004).
- 4) Y. J. Kim, J. E. Chung, M. Kurisawa, H. Uyama, and S. Kobayashi, New Tyrosinase Inhibitors, (+)-Catechin-Aldehyde Polycondensates, *Biomacromolecules*, **5**, 474-479 (2004).
- 5) Y. J. Kim, J. E. Chung, M. Kurisawa, H. Uyama, and S. Kobayashi, Superoxide Anion Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibition of (+)-Catechin-Aldehyde Polycondensates. Amplification of Antioxidant Property of (+)-Catechin by Polycondensation with Aldehydes, *Biomacromolecules*, **5**, 547-552 (2004).
- 6) Y. J. Kim, H. Uyama, and S. Kobayashi, Inhibition Effects of (+)-Catechin-Aldehyde Polycondensates on Proteinases Causing Proteolytic Degradation of Extracellular Matrix, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 256-261 (2004).
- 7) N. Ihara, S. Schmitz, M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, and S. Kobayashi, Amplification of Inhibitory Activity of Catechin against Disease-Related Enzymes by Conjugation on Poly(ε-lysine), *Biomacromolecules*, **5**, 1633-1636 (2004).
- 8) N. Ihara, M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, and S. Kobayashi, Enzymatic Synthesis of a Catechin Conjugate of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane and Evaluation of Antioxidant Property, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 430-433 (2005).