

ビタミンEの高機能化とさらなる有効利用を目的とした 新規化粧品素材の酵素・化学複合的分子創製

大分大学医学部化学講座

下 田 恵

Vitamin E functions as a chain-breaking antioxidant that prevents the propagation of free radical reactions. Recently, vitamin E has attracted much attention clinically because of its potential to be a very useful drug, and has been widely studied for its anticancer, anti-atherosclerosis, and anticarcinogenesis effects. On the other hand, vitamin E is unstable against light and heat. Chemical modifications such as esterification of unstable organic compounds are characteristic reactions, which improve their stability, bioavailability, and pharmacological properties, e.g., the esters of aromatic compounds have been used in folk medicines. To overcome the shortcomings of vitamin E, several efforts have been made to synthesize vitamin E derivatives by chemical methods. However, little attention has been paid to the biocatalytic modification of vitamin E by cultured plant cells. We attempted the functionalization of vitamin E by its modification through both biocatalytic and chemical procedures.

1. 緒 言

近年、資源の大量消費による有用機能性物質の枯渇に伴い、天然由来の生薬化合物や生理活性化合物の価値が見直されてきた。これらの機能性化合物の中で、ビタミン関連化合物は、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、化粧品および医薬品などとしても注目されている。ビタミン関連化合物でも特に、ビタミンEは、血管系疾患の予防効果、制癌効果、血行促進作用などの生理機能を示し、医薬品はもとより、化粧品として利用されている¹⁻³⁾。

一方、天然植物生薬成分は、ある種の植物細胞中において、その構造の一部が様々なアルキルもしくは脂肪酸によりエステル化された「アシル化合物」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^{4,5)}。

また近年、生体触媒が行う反応を合成プロセスの一過程に組み込んだ有用物質生産の試みが盛んに行われ、その成果は医薬品や香料、嗜好品、などのファインケミカルズの生産へ利用されるに及んでいる⁶⁾。有機合成に生体触媒を利用するメリットのひとつとして、その選択性の高さがあげられる。生体触媒による反応では、必要とする位置に必要な立体を持ち、化学的に合成した場合には煩雑な行程を要する化合物についても、一段階の酵素的反応で得られる。このことから、生体触媒の有機合成化学への利用に期

待がかけられている。今日までに利用された主な生体触媒は、微生物、菌体、酵母、動物細胞、植物細胞、およびそれらの酵素系である。

本研究では、ビタミンEの化粧品としてのさらなる有効活用を目的として、リパーゼおよび植物培養細胞を生体触媒とする酵素的合成法と化学的合成法を活用した、ビタミンEの「アシル化」を中心とした化学修飾を行った。即ち、本研究において、ビタミンEを高機能化するため、酵素的合成法と化学的合成法を利用し、新規かつ安定な化粧品素材の複合的分子創製法を開発した。

2. 実 験

2.1. 酵素的手法によるビタミンEのプロピオニル化

リパーゼは本来エステル加水分解反応を触媒する酵素であるが、有機溶媒中で反応させると、逆加水分解反応すなわちエステル化を触媒する。このことを利用して、有機溶媒中におけるビタミンEの酵素触媒を活用した化学修飾を目的として、リパーゼによるエステル化を行った。酵素反応には、有機溶媒として1,2-ジクロロプロパンとヘキサンとの混合溶液を使用した。基質ビタミンEを50mlの有機溶媒が入った酵素反応用フラスコへ入れ、全体が均一の溶液となるまで加温した。溶液を室温まで冷却後、プロピオン酸とリパーゼをフラスコへ加え、40℃、120回転/分の条件で振盪インキュベーションを行った。

24時間反応させた後、有機溶媒を減圧下において留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行い、反応生成物を得た。

2.2. 酵素的手法によるビタミンEのゲンチオビオシル化、ルチノシル化

タバコおよびユーカリ植物培養細胞を用いる酵素的手法により、ビタミンEのゲンチオビオシル化、ルチノシル化を行った。植物培養細胞は主に筆者らの研究室において誘



Functionalization of vitamin E to generate new cosmetics by biocatalytic and chemical methodology

Kei Shimoda

Department of Chemistry, Faculty of Medicine, Oita University

導し、継代培養したものを変換実験に用いた。植物培養細胞は培養用フラスコ内の新鮮な寒天培地に植え継いで、3週間ごとに継代培養を行った。変換実験に用いるため、培養細胞の一部を、寒天を含まない液体培地に移植し、振盪培養器内において25℃、120回転/分の条件で培養すると、2週間ほどで均一なサスペンション状態の培養細胞が得られた。この培養細胞（約50グラム）を新鮮な液体培地（100ml）に移植して、同じ培養条件で1週間前培養を行った。培養細胞への基質の投与はクリーンベンチ内において無菌状態でを行った。基質を前培養した細胞に投与し、一定期間、同じ振盪条件で反応を行った。細胞部分はメタノール浸漬し、メタノール抽出物を有機溶媒と水で分配し、培地部分は有機溶媒で抽出した。変換生成物をシリカゲルカラム、イオン交換カラム、TLC、HPLCを用いる各種クロマトグラフィーにより単離・精製した後に、スペクトル測定により構造解析を行った。変換反応の経時的追跡は、上記と同様にインキュベートさせた複数のフラスコについて、一定時間ごとにフラスコ一本から反応物を抽出することにより行った。生成物の相対量は、抽出物の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析により求めた。

2. 3. 化学的手法によるビタミンEのステアリン化

ビタミンEのエステル化による高機能化を目的として、揮発性の機能性成分を創製するため、ビタミンEのステアリン化を行った。ビタミンEをピリジンに溶解した後、70℃に加熱した。これに、ピリジンに溶解したステアリン無水物を加え、3時間加熱した。さらに、3時間の還流を行った。TLCによるチェック後、蒸留水による希釈を行った。30分の静置の後、ヘキサン抽出を行った。ヘキサン抽出物を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、反応生成物を得た。

2. 4. 化学的手法によるビタミンEのメリビオシル化

ビタミンEのメリビオシル化による、ビタミンEの化学修飾を行った。ビタミンEをアセトニトリルに溶解した後、2, 2', 3, 3', 4, 4', 6-ヘプタアセチルアルファメリビオシルフルオライド、1, 1, 3, 3-テトラメチルゲアニジン、および3フツ化ホウ素ジエチルエーテル錯体の混合物へ加えた。2時間、室温において攪拌後、有機物を酢酸エチルにより抽出を行った。シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製後、ビタミンE 2, 2', 3, 3', 4, 4', 6-ヘプタアセチルメリビオシドを得た。これらを加水分解することにより、ビタミンEメリビオシドを反応生成物として得た。

3. 結 果

3. 1. 酵素的手法によるビタミンEのプロピオニル化

プロピオン酸を有機酸として用いたりパーゼによるエス

テル交換反応について、有機溶媒として1, 2-ジクロロプロパンとヘキサンを使用して、ビタミンE（図1、化合物1）とプロピオン酸、リパーゼを振盪インキュベーションすることにより、ビタミンEのプロピオニルエステル体（図1、化合物2）を得た。

以上、「化粧品素材」としてのビタミンEの安定化と高機能化を目的に、リパーゼのエステル交換反応を応用して、ビタミンEの有機アルキル酸による酵素的エステル（アシル）化を可能にした。

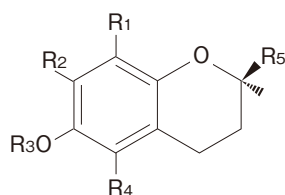
3. 2. 酵素的手法によるビタミンEのゲンチオビオシル化、ルチノシル化

生体触媒としてタバコ植物培養細胞を使用して、ビタミンEと振盪インキュベーションすることにより、ビタミンEの変換生成物を得た。HPLC分析の結果、変換生成物は、細胞部分のメタノール浸漬画分に含まれることが明らかとなった。メタノール抽出物をシリカゲルカラム、イオン交換カラム、TLC、HPLCを用いる各種クロマトグラフィーによる精製を行った。反応生成物を単離し、スペクトル測定により構造解析を行ったところ、ビタミンEのゲンチオビオシド体（図1、化合物3）が得られた。

また、ユーカリ植物培養細胞を生体触媒として用いる酵素的手法により、ビタミンEの変換を行った。上記と同様に、タバコ植物培養細胞による変換の場合にも、細胞のメタノール浸漬画分に反応生成物が含まれることが明らかとなった。メタノール抽出物をシリカゲルカラム、イオン交換カラム、TLC、HPLCを用いる各種クロマトグラフィーを利用した精製を行い、反応生成物を単離し、スペクトル測定により構造解析を行ったところ、ビタミンEはユーカリ植物培養細胞により、ルチノシド体（図1、化合物4）に変換されることが明らかとなった。

次に、タバコ培養細胞およびユーカリ培養細胞の各種植物培養細胞のビタミンEに対する変換様式を調べるため、ビタミンE変換の経時変化を調べた。その結果、図2に示したように、タバコ植物培養細胞は、ビタミンEと振盪インキュベーションを開始した後、ビタミンEのゲンチオビオシド体に変換する能力があることが分かった。これに対して、ユーカリ植物培養細胞とビタミンEを振盪インキュベーションした場合には、図3に示したように、ビタミンEのゲンチオビオシド体に加えて、ビタミンEのルチノシド体に変換されることが分かった。

以上の結果から、タバコ培養細胞とユーカリ培養細胞は、外来基質として加えられたビタミンEを、それぞれ対応するゲンチオビオシド体、ルチノシド体に変換する能力があることが明らかとなった。また、ビタミンEをルチノシド体へ変換する機能は、ユーカリ培養細胞にみられる特徴的な変換であることが明らかとなった。



- 1: $R_1, R_2, R_4 = \text{CH}_3, R_3 = \text{H}, R_5 = [(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{CH}_3$
- 2: $R_1, R_2, R_4 = \text{CH}_3, R_3 = \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}, R_5 = [(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{CH}_3$
- 3: $R_1, R_2, R_4 = \text{CH}_3, R_3 = \beta\text{-Glc-(1-6)-}\beta\text{-Glc}, R_5 = [(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{CH}_3$
- 4: $R_1, R_2, R_4 = \text{CH}_3, R_3 = \alpha\text{-Rham-(1-6)-}\beta\text{-Glc}, R_5 = [(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{CH}_3$
- 5: $R_1, R_2, R_4 = \text{CH}_3, R_3 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}, R_5 = [(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{CH}_3$
- 6: $R_1, R_2, R_4 = \text{CH}_3, R_3 = \alpha\text{-Gal-(1-6)-}\beta\text{-Glc}, R_5 = [(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{CH}_3$

図1 化学的および酵素的手法により合成されたビタミンE誘導体

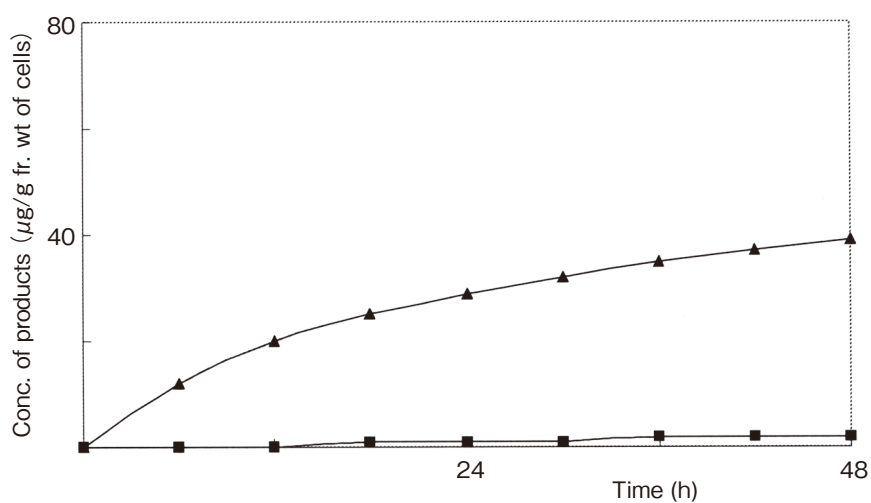


図2 タバコ植物培養細胞によるビタミンEゲンチオビオシドの合成
▲：ビタミンE グルコシド、■：ビタミンE ゲンチオビオシド

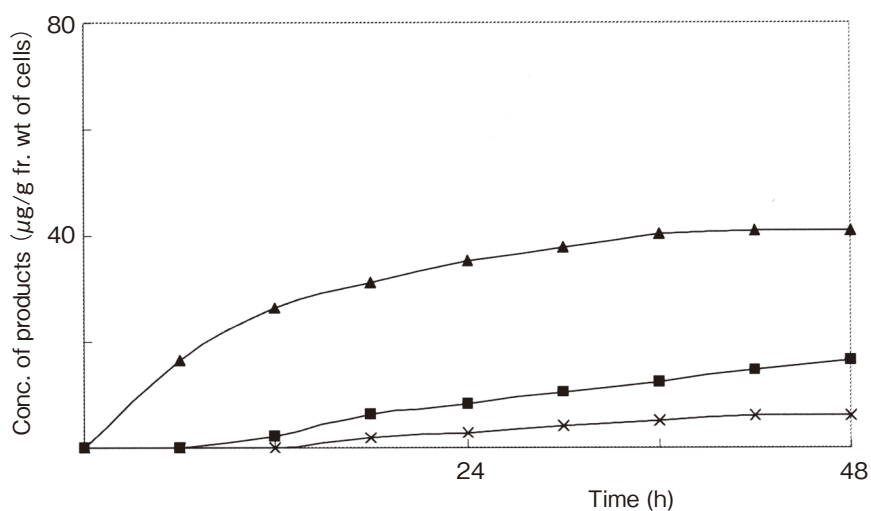


図3 ユーカリ植物培養細胞によるビタミンE ルチノシドの合成
▲：ビタミンE グルコシド、■：ビタミンE ゲンチオビオシド、X：ビタミンE ルチノシド

3.3. 化学的手法によるビタミンEのステアリン化

ビタミンEを、ステアリン無水物をエステルドナーとして使用してピリジン中で還流することにより、ビタミンEのステアリン化に成功し、ヘキサン抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、ステアシルビタミンE（図1、化合物5）を反応生成物として得た。

以上、ビタミンEのエステル化による高機能化を目的として、化学的合成手法により、ビタミンEのステアリン化を可能にした。

3.4. 化学的手法によるビタミンEのメリビオシル化

化学的合成手法により、1,1,3,3-テトラメチルグアニジン存在下、アセトニトリル中で、ビタミンEの2,2',3,3',4,4',6-ヘプタアセチルメリビオシル化することに成功した。ビタミンE 2,2',3,3',4,4',6-ヘプタアセチルメリビオシドの加水分解は定量的に進行し、対応するビタミンEメリビオシド（図1、化合物6）を得た。

以上、ビタミンEの化学的合成手法によるメリビオシル化を可能にした。

4. 考 察

ビタミンEを高機能化することを目的として、新規な化粧品素材としてビタミンE誘導体の合成を行った。各種の化学的修飾は、それぞれの反応に適した合成手法により行った。すなわち、リパーゼによる酵素的手法によるビタミンEのプロピオニルエステル化（アシル化）、植物培養細胞を生体触媒として用いる酵素的手法によるビタミンEのゲンチオビオシル化、ルチノシル化、化学的合成法を活用したビタミンEのステアリン化（アシル化）、およびメリビオシル化に成功した。

5. 総 括

以上、ビタミンEを高機能化するための植物培養細胞などの生体触媒を利用した合成法と化学的合成法による、ビタミンEの「アシル化」を中心とした化学修飾を行い、新規かつ安定な化粧品素材の複合的分子創製法を構築した。

謝 辞

本研究にご助成頂きました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Rimm ER, Stampfer MJ, Ascherio A, et al., :Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men, N. Engl. J. Med., 328, 1450-1456, 1993.
- 2) Stampfer M, Hennekens C, Manson J, et al., :Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women, N. Engl. J. Med., 328, 1444-1449, 1993.
- 3) Brigelius-Flohe R, Traber MG, :Vitamin E: function and metabolism, FASEB J., 13, 1145-1155, 1999.
- 4) Subbaiah PV, Horvath P, Achar SB, :Regulation of the activity and fatty acid specificity of lecithin-cholesterol acyltransferase by sphingomyelin and its metabolites, ceramide and ceramide phosphate, Biochemistry, 45, 5029-38, 2006.
- 5) Tosi MR, Tugnoli V, :Cholesteryl esters in malignancy, Clin. Chim. Acta, 359, 27-45, 2005.
- 6) Ishihara K, Hamada H, :Biotransformation using plant cultured cells, J. Mol. Catal. B: Enz., 23, 145-170, 2003.