

# モデル脊椎動物であるゼブラフィッシュを用いた安全なメラニン産生抑制活性物質の創薬研究

広島大学大学院医系科学研究科薬学分野

山野 喜

In Europe, animal testing on cosmetics has been banned without exception since 2013, and globally, animal testing tends to be avoided. The international trend of conducting animal experiments based on the concept of the 3Rs (Reduction, Replacement, Refinement) is becoming more and more established, and when conducting animal experiments, it is required to use animal species with as little or no sensation as possible. Meanwhile, in the process of searching for new cosmetic raw material candidates, it is desirable to discover more effective and safer ones at an early stage.

In this study, we used zebrafish, a well-known vertebrate model organism, to search for new cosmetic materials from natural resources and to verify the usefulness of zebrafish as a method for evaluating new cosmetic material candidates. Zebrafish from the embryonic stage to just after hatching were used to screen for natural resource samples that inhibit melanin pigment production in zebrafish, and a total of five compounds were isolated from two microbial culture extracts. Of these, compounds S2 and F1 effectively inhibited melanin pigment production in zebrafish without any obvious toxicity. For the purpose of comparison, a search study was performed from plant extracts that show tyrosinase inhibitory activity *in vitro* but not melanin pigment inhibitory activity in zebrafish. As a result, 20 compounds were isolated, three of which were new compounds. None of the obtained compounds showed melanin pigment inhibitory activity in zebrafish, and some of them showed hatching inhibitory activity. These results suggest that the search for melanin production inhibitors using zebrafish is a useful approach for early evaluation of the efficacy and potential toxicity of candidate materials for cosmetics to the living body.

## 1. 緒言

EUでは2013年から化粧品開発における動物実験が全面禁止となり、世界的にも同様に動物実験は忌避されるようになってきている。毒性試験や研究開発において必要な動物実験に関しても“動物実験の3R (Reduction (削減)、Replacement (置き換え)、Refinement (苦痛の軽減))”の考えに則って行うという国際的な流れがあり、できる限り合理的かつ生体に対する苦痛の少ない実験手法を選択し、可能な限り意識や感覚の少ない低位の動物種を使用することが求められている。そのため、ヒトに近い動物であるからというだけの理由で安易にラット等を用いて毒性や効能の評価を行うことは避けるべき状況となっている。

しかし、化粧品や医薬品の開発過程において、製品に用いる可能性のある化合物がもつ生体への潜在的な毒性や効能をできる限り早い段階で評価することは、安全で高品質な化粧品や医薬品を作り出す上で重要であり、何かしらの方法でそれらを行う必要がある。

そこで本研究では、脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュを用い、天然資源由来のメラニン色素産生抑制物質の探索を行うことを通して哺乳類を用いた動物実験の代替法

としてのゼブラフィッシュを用いた研究開発手法の有用性の検証を行った。

ゼブラフィッシュは体長4~5cm程度のインド原産の小型熱帯魚で、コイ科コイ目に属し、金魚やコイに近い種である (Fig. 1)。丈夫で飼育、繁殖が容易であり、一つの水槽で多数飼育ができ、多産で、卵が透明であることからその発生過程を顕微鏡で観察できるなどといった、実験動物として用いる上で重要な多くの利点を有しており、脊椎動物のモデル生物として長く用いられてきた歴史がある。当初は発生生物学と分子遺伝学の分野において用いられていたが<sup>1,2)</sup>、その後哺乳類との生理学的類似性の高さが確認され<sup>3,4)</sup>、その利便性が認められたことで様々な分野で用いられるようになり、現在では創薬や毒性研究にも利用されている<sup>5,6)</sup>。

メラニン色素産生抑制活性の評価のためのモデル生物として、ゼブラフィッシュは多くの利点を有している。まず、ゼブラフィッシュを用いた実験は、メラニン合成に関わる酵素の阻害活性試験や細胞培養などの*in vitro*系とは異なり、生体全体を用いた*in vivo*評価系であることから、複雑な生体内環境においても被験物質が実際に期待した効果



Drug discovery research for a safe melanin production inhibitor using zebrafish as a vertebrate model

Yoshi Yamano

Department of Pharmacognosy, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University



Fig. 1 ゼブラフィッシュ

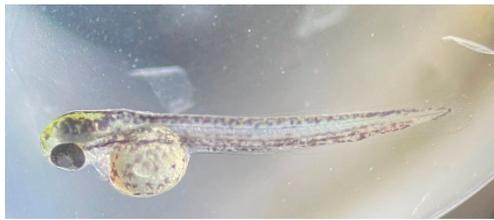


Fig. 2 受精後72時間におけるゼブラフィッシュのメラニン産生

を示すかどうかという本質に関わる点を評価することができる。ゼブラフィッシュの卵は受精後24時間で器官形成が見られ、48時間で尾部におけるメラニン産生(黒い斑点の形成)が見られるようになる(Fig. 2)。卵は96wellプレートの各wellにピペットで複数個ずつ入れることができ、その飼育水に被験物質を添加しておくだけで、比較的短い時間(2~3日)でメラニン産生抑制活性を顕微鏡で確認することができる。また、ゼブラフィッシュは卵から発生初期を通して7日間までは、飼育水に含まれる物質を主に皮膚から吸収するため、その吸収様式がヒトの皮膚吸収のモデルに近いといわれている<sup>7,8)</sup>。

一方、ゼブラフィッシュの発生過程において、被験物質が正常な器官形成プロセスを阻害するような作用を有していると、孵化阻害や生育遅延、奇形の発生などを誘発することから、ゼブラフィッシュは被験物質の有害性を確認する手段としても用いられている。そのため、ゼブラフィッシュを用いてメラニン色素の産生抑制活性を評価することで、同時に被験物質の潜在的な毒性も評価することが可能であり、被験物質の生体への効能と安全性を一度に評価できる優れた手法であると考えられる。

本研究では、微生物や植物などの天然資源からメラニン色素合成阻害活性をもつ化合物を探索することで、ゼブラフィッシュを評価系に用いた探索手段の有用性の検証を行った。研究手順としては、まず当研究室が保有する植物・微生物培養抽出物ライブラリーを用いて、メラニン色素合成を担う酵素であるチロシナーゼの阻害活性を*in vitro*において評価し、続いてその阻害活性を示したサンプルからゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性を示すサンプルを選別し(微生物BLS-1-3-3, BLS-1-4-4)、その活性を指標に化合物を探索した。また、対照実験として、チロシナーゼ阻害活性は見られたがゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性は見られなかったハウチワノキ材部から、そのチロシナーゼ阻害活性を指標に化合物を探索し、それぞれの天然資源から得られる化合物の構造と活性の関係を比較した。

## 2. 方法

### 2.1. 植物および微生物の活性評価用抽出物の調整

植物は主に沖縄県で採集したものをを用い、methanolを

用いて室温抽出し活性評価用の抽出物を得た。微生物は液体培地(Seed broth)で2週間静置培養後、ポテト培地に移しさらに2週間静置培養したものを、acetoneにて抽出し、得られた粗抽出物をさらに水と2-butanoneを用いて分配し、2-butanone層を活性評価用抽出物とした。すべての抽出物はDMSOによって濃度調整しスクリーニングに用いた。

### 2.2. チロシナーゼ阻害活性試験法

酵素は Mushroom tyrosinase (Sigma)を用いた。96 wellプレートの各wellに、濃度調整した被験サンプル溶液10 $\mu$ Lと0.25mg/mLに調整したL-tyrosine入りK-phosphate buffer (0.05M, pH6.8)を40 $\mu$ Lずつ加え、475nmにおけるbackgroundの吸光度を測定した。続いて100units/mLに調製した mushroom tyrosinase 溶液 (K-phosphate buffer)を50 $\mu$ Lずつ加えて、25 $^{\circ}$ Cで10分間反応させたのち、475nmにおける吸光度を測定し、この値からbackgroundの吸光度を引いた値を基に、酵素反応阻害率を算出した。各サンプルの試験は少なくとも3回行い、その平均値と標準偏差値を示した。half maximal inhibitory concentration value (IC<sub>50</sub> 値)は阻害率50%を跨ぐ2点のサンプル濃度と阻害率の値から2点直線法を用いて算出した。

### 2.3. ゼブラフィッシュメラニン産生抑制活性試験法

ゼブラフィッシュは14hours/10hoursの明暗サイクル下、水温26 $^{\circ}$ Cで飼育した。採卵日の前日に雄と雌を同じ水槽に置いておき、次の日に水槽の底から受精卵を採取した。滅菌蒸留水で受精卵をよく洗浄したのちEmbryo medium中に分散させた。続いて96wellプレートの各ウェルに被験サンプル溶液を1 $\mu$ L添加しておき、そこに受精卵3個と99 $\mu$ LのEmbryo mediumを分注した。72hour後に顕微鏡観察およびメラニン色素の吸光度測定によりメラニン産生抑制活性を評価した。メラニン色素の定量には被験サンプルに晒したゼブラフィッシュを10匹用い、PBSで洗浄後、1% Triton X-100を含むPBS中でホモジナイズした。遠心分離により上清を取り除いたのち、100 $\mu$ Lの1N NaOH/10% DMSOを加え、よく攪拌後、80 $^{\circ}$ Cで2hourおくことでメラニンを溶解させた。続いて遠心分離後上清をとり、405nmの吸光度を測定しControlの吸光度の値との比較からメラニン色素産生抑制活性を算出した。各化合物の試験は少なくとも3回行い、その平均値と標準偏差値を示した。IC<sub>50</sub>値は阻害率50%を跨ぐ2点のサンプル濃度と阻害率の値から2点直線法を用いて算出した。

### 2.4. 微生物の簡易同定

スクリーニングの結果メラニン産生抑制活性を示した微生物を、16S rRNA 配列をもとに簡易同定した。まず各微

生物株をMH broth中で増殖させたのち、CTAB法を用いてgenome DNAを単離した。続いてそのgenome DNAをテンプレートに27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) および1492R (GGYTACCTTGTACGACTT) プライマーを用いて16S rRNA領域をPCRで増幅し、精製後、サンガー法により塩基配列を解析した。得られた塩基配列をGenBankのデータベースでBlast検索することにより、微生物を同定した。

## 2. 5. 抽出物からの化合物の精製・構造解析

ゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性もしくはチロシナーゼ阻害活性が確認された抽出物をヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、水の各種溶媒を用いて分配した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODSカラムクロマトグラフィー、HPLCを用いて順次精製を行った。単離した化合物の構造は、MS、NMR、IRなどの各種物理化学データを解析することにより決定した。

## 3. 結果

### 3. 1. 探索サンプル決定のためのスクリーニング

当研究室が保有する微生物および植物の抽出物ライブラリーを用いて、一次スクリーニングとしてチロシナーゼ阻

害活性試験を行った。研究室に保有するおよそ1000サンプルをスクリーニングし、そのうち23サンプルが100 $\mu$ g/mLの濃度で50%以上のチロシナーゼ阻害活性を示した (Fig. 3)。

続いてこの23サンプルを用いて、ゼブラフィッシュに対するメラニン産生抑制活性試験を行った結果、8サンプルが100 $\mu$ g/mLの濃度で明確な抑制活性を示し、そのうち特に再現性に優れていた2サンプル (BSL1-3-2, 1-4-4 株) を本研究の探索源に決定した (Fig. 4b, c)。また、対照実験として、ゼブラフィッシュに対するメラニン産生抑制活性は見られなかったが (Fig. 4d) チロシナーゼ阻害活性を示したサンプルである沖縄産植物ハウチワノキ材部から、チロシナーゼ阻害活性化合物を探索し、ゼブラフィッシュメラニン産生抑制活性をもつ抽出物から単離される化合物との機能と構造の比較を行った。

### 3. 2. BSL1-3-2株の同定と単離した化合物

同定: BSL1-3-2株は広島県広島市の宇品海岸で採取した海水から分離培養した細菌である。微生物種の同定のために本細菌の16S rRNA領域の塩基配列を解析し、GenBankに登録されている微生物16S rRNAからBlast検索を行ったところ、*Staphylococcus* sp. strain H62の16S rRNAと100%

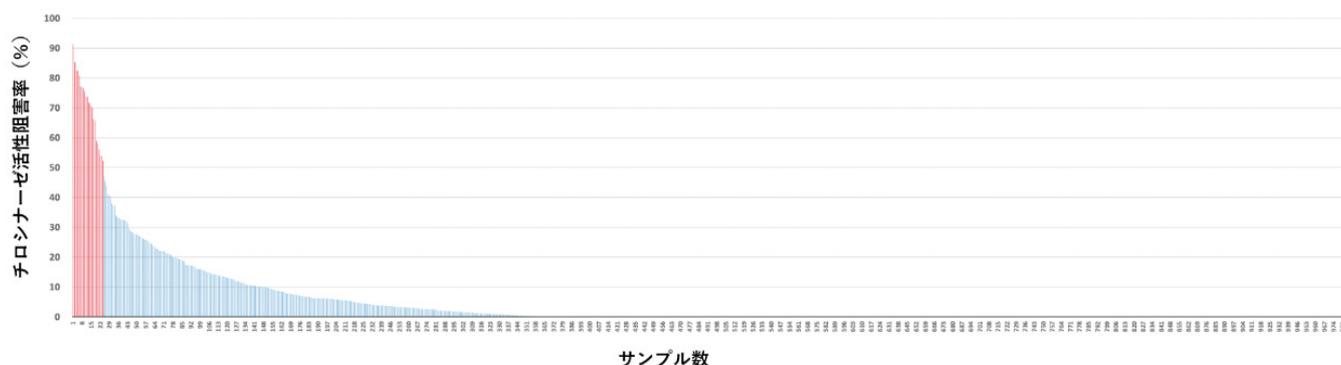


Fig. 3 チロシナーゼ阻害活性スクリーニングの結果 (100 $\mu$ g/mL, 赤線: 50%以上の阻害活性を示したサンプル)

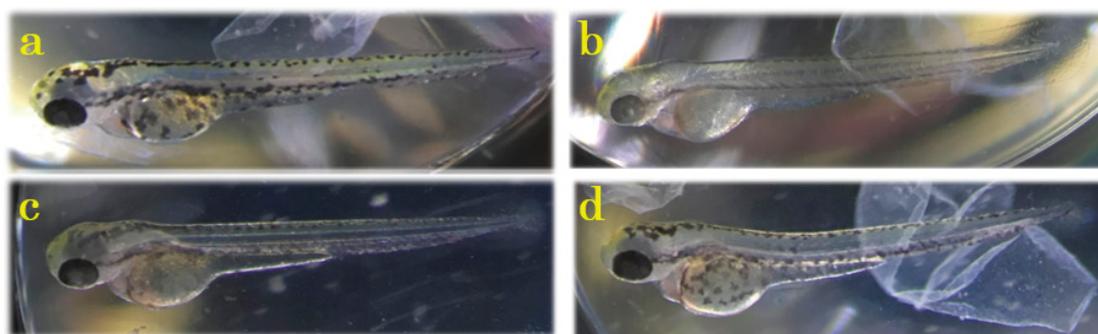


Fig. 4 メラニン産生抑制活性スクリーニングの結果 (100 $\mu$ g/mL) a: Control, b: BSL1-3-2, c: BSL1-4-4, d: ハウチワノキ材部

の相同率を示したことから、本菌種を *Staphylococcus* sp. であると推定した。

培養：本株を SMS 寒天培地上で培養し得られたコロニーを液体培地 Seed broth 500mL に植菌し 2 週間培養後、固体培地であるポテト培地 5kg に移し 2 週間培養した。

化合物の精製：菌体抽出物を分配し、各画分のうちゼブラフィッシュのメラニン色素産生抑制活性が最も強かった酢酸エチル層 5.7g から化合物の精製を行った。その結果、3 つの化合物 maltol (S1. 7.0mg)、5-hydroxymaltol (S2. 21.3mg)、monomethyl succinate (S3. 14.5mg) を単離同定した (Fig. 5)。

### 3. 3. BSL1-4-4株の同定と単離した化合物

同定：BSL1-4-4株は B1-3-2株と同様に広島県広島市の宇品海岸で採取した海水から分離培養した細菌である。同様に 16S rRNA 領域の塩基配列を解析し、GenBank において blast 検索したところ、*Francisella uliginis* strain TX07-7310 の 16S rRNA と 99% の相同率を示したことから、本種を *Francisella uliginis* もしくはその近縁種であると推定した。培養・精製方法も BSL-1-3-2 と同様の手順で行い、ゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性の最も強かった酢酸エチル層 4.8g から、4 つの化合物 5-hydroxymaltol (F1. 25.6 mg)、4-[formyl-5-(methoxymethyl)-1H-pyrrol-1-yl] butanoic acid (F2. 0.7 mg)<sup>9)</sup>、succinic

acid (F3. 3.0mg)、monomethyl succinate (F4. 9.0mg) を単離同定した (Fig. 6)。

### 3. 4. 沖縄産植物ハウチワノキから単離した化合物

2004 年に沖縄県中頭郡にて採取した植物ハウチワノキ (学名 *Dodonaea viscosa*) の材部 900g の抽出物 58.9g から化合物の探索を行った。その結果、3 個の新規ジテルペン化合物 (D1. 4.4mg, D2. 138mg, D3. 7.5mg) (Fig. 7) と、17 個の既知化合物として 4 つのジテルペン labd-13 (E)-en-8, 15-diol (D4. 12.3mg)<sup>10,11)</sup>、ent-15, 16-epoxy-9 $\alpha$ H-labd-13 (D16. 27.5mg)、14-diene-3 $\alpha$ , 8 $\beta$ -diol (D5. 970 mg)<sup>12)</sup>、hutriwaic acid (D6. 26.9mg)<sup>13,14)</sup>、6-hydroxyhardwickjic acid (D7. 4.1mg)<sup>15)</sup>、4 つのフラボノイド viscosine (D8. 53.3mg)<sup>16)</sup>、7, 4'-trihydroxy-3'-(4-hydroxy-3-methylbutyl-5'-(trimethylbut-2-enyl)-3,6-dimethoxyflavone (D9. 48.4mg)<sup>10,17)</sup>、alizarin (D10. 31.8mg)<sup>17,18)</sup>、dodovisone C (D11. 6.0mg)<sup>19)</sup>、3 つのクマリン scopoletin (D12. 25.0mg)<sup>20)</sup>、isofraxidin (D13. 4.3mg)<sup>21,22)</sup>、fraxetin (D14. 15.6mg)<sup>23)</sup>、1 つのリグナン (+)-pinoresinol (D15. 8.0mg)<sup>24)</sup>、そして他の 5 つの化合物 protocatechuic acid (D16. 27.5mg)<sup>25)</sup>、(E)-cinnamic acid (D17. 19.6mg (D18 と の mixture)<sup>26)</sup>、methyl hydrogen azelate (D18. 19.6mg (D17 と の mixture)<sup>27)</sup>、 $\beta$ -hydroxypropiovanillone (D19. 11.1mg)<sup>28)</sup>、4-hydroxyacetophenone (D20. 2.7mg)<sup>29)</sup> であった (Fig. 8)。

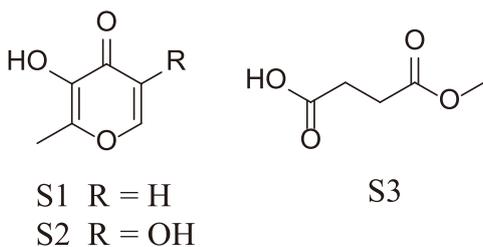


Fig. 5 BSL1-3-2株から単離された化合物

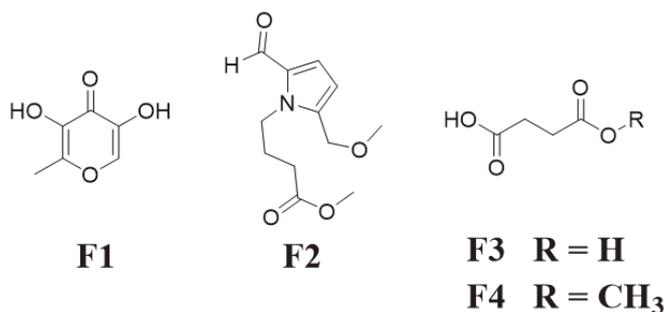


Fig. 6 BSL1-4-4株から単離された化合物

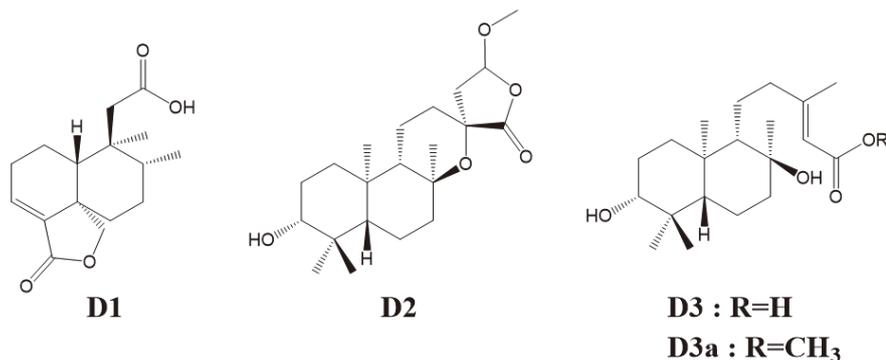


Fig. 7 ハウチワノキ材部から単離された新規化合物

なお、D17とD18はmixtureの状態を得られたため、活性試験の対象からは外した。

### 3. 5. 単離化合物のチロシナーゼ阻害活性

BSL1-3-2株、BSL1-4-4株およびハウチワノキ材部

より得られた計25種の化合物に対してチロシナーゼの阻害活性を評価した (Fig. 9)。ポジティブコントロールにはArbutinを用いた。それぞれ1 mg/mLおよび100 μg/mLの化合物濃度でのチロシナーゼ阻害活性を評価した結果、S2およびF1が最も強い活性を示した。S2およびF1の

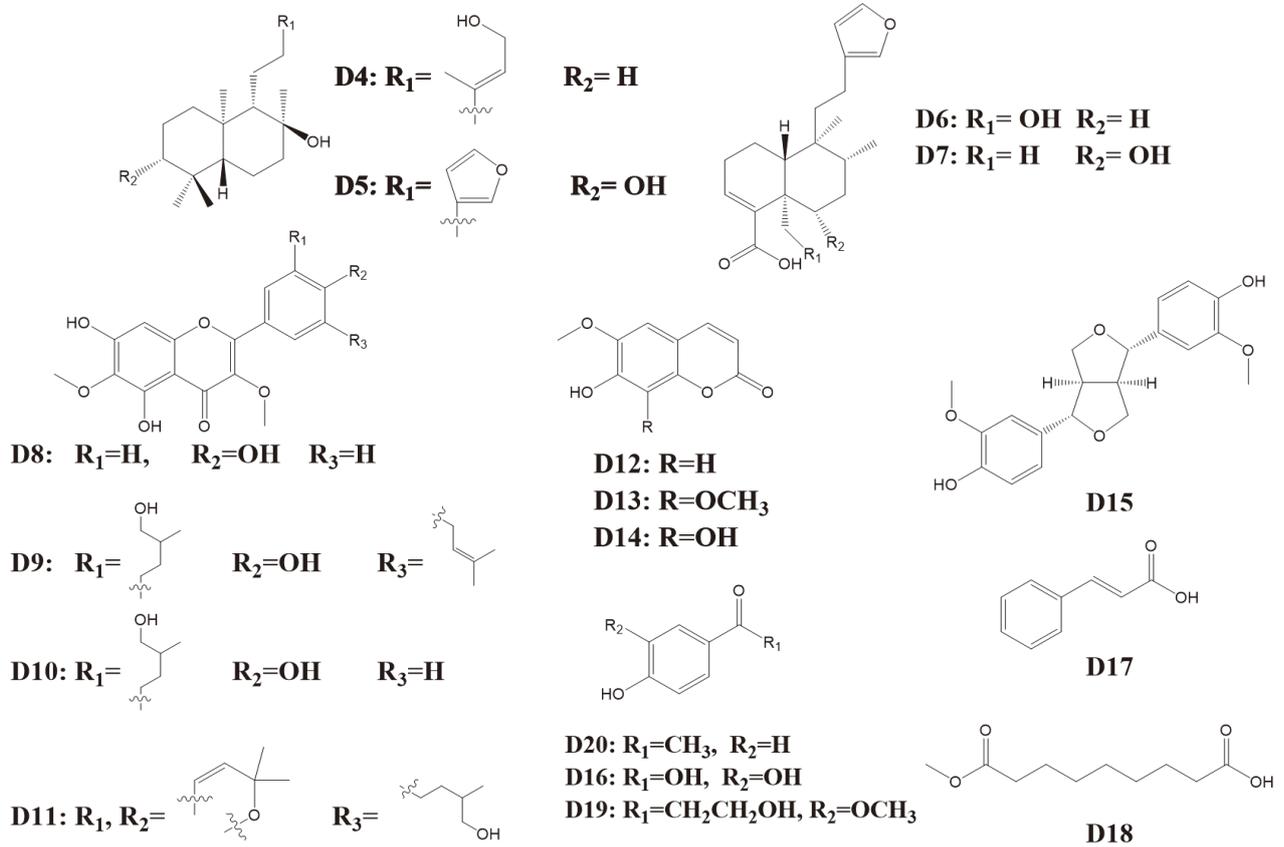


Fig. 8 ハウチワノキ材部から単離された化合物

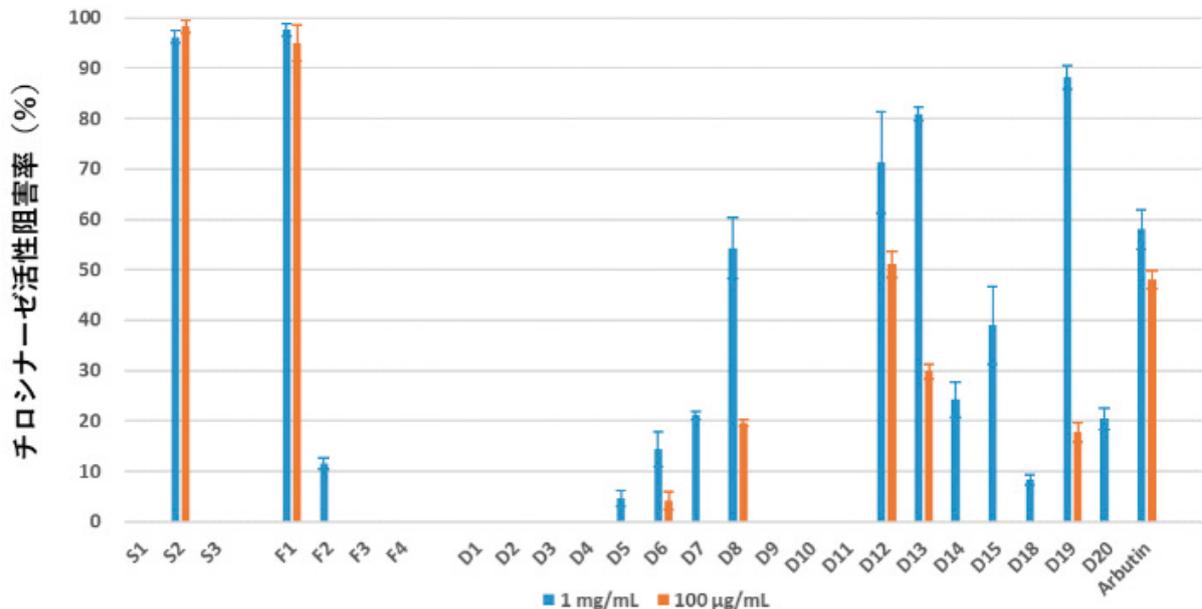


Fig. 8 ハウチワノキ材部から単離された化合物



Fig. 10 メラニン色素産生抑制活性試験の結果 a: Control, b: S2 (100µg/mL), c: Kojic acid (2mg/mL)

IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 2.76±0.32, 3.24±0.22µg/mLであった。またハウチワノキ由来の化合物としてはD12, D13, D19が比較的強い活性を示した。

### 3. 6. 単離化合物のゼブラフィッシュメラニン産生抑制活性

チロシナーゼ阻害活性と同様に本研究で得られた計25種の化合物を用いてゼブラフィッシュメラニン産生抑制活性を評価した。化合物濃度は100µg/mLとし、十分な孵化率(80%以上)を示し明確なメラニン産生抑制活性が見られた化合物に関しては、ホモジネートの吸光度からその阻害率も算出した。

活性試験の結果、5-hydroxymaltol (S2 および F1) がゼブラフィッシュに対し毒性を示さず、メラニン産生抑制活性を示し、溶媒のみを添加したゼブラフィッシュに比べそれぞれ 46.8±10.2%と 38.2±8.4%メラニン色素の産生を抑制した (Fig. 10)。ポジティブコントロールとして用いた Kojic acid は 2mg/mL の濃度で 66.2±5.5% の産生抑制活性を示した。

その他の結果としては、S1 が阻害率 12.0% と弱い活性を示し、S1, S2, F1 以外の化合物では明確なメラニン産生抑制活性が見られなかった。一方、F2, D2, D4, D5, D8~D13, D19 はゼブラフィッシュに対して 100µg/mL の濃度で強いふ化阻害活性を示し、全てゼブラフィッシュの孵化を 90% 以上阻害した。また F2 を添加したゼブラフィッシュの中で、孵化に成功した個体には、奇形が見られた (Fig. 11)。

## 4. 考 察

本研究ではゼブラフィッシュをメラニン産生抑制活性の機能評価系として用いることで、サンプルの安全性と有効性を正確かつ迅速に評価することができるかどうかを検証した。具体的には *in vitro* でメラニン合成酵素の阻害活性を示すサンプルをスクリーニングし、そこからさらに *in vivo* でゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性を示すものをスクリーニングし、両方の試験において活性を示したサンプルからその活性化化合物の探索を行った。また比較のために *in vivo* でメラニン産生抑制活性は見られなかったが、*in vitro* では活性を示したサンプルからもその活性化化合物の探索を行った。その結果、微生物株 BSL1-3-2 と



Fig. 11 化合物F2添加により発生した奇形

1-4-4 から計 7 個の化合物を単離し、そのうち S2, F1 が強いゼブラフィッシュメラニン産生抑制活性を示した。一方、比較のために探索を行った植物ハウチワノキ材部から 20 個の化合物を同定したが、いずれの化合物もゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性を示さなかった。さらに F2, D2, D4, D5, D8~D13, D19 はゼブラフィッシュのふ化阻害や奇形発生といった毒性を示した。

スクリーニングの段階でゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性を示したサンプル (微生物株 BSL1-3-2, 1-4-4) からは期待通り *in vivo* でもメラニン産生抑制活性を示す S2, F1 が得られた。このことから、本活性試験法は混合物および単一化合物のいずれの状態においても *in vivo* で作用するサンプルを評価できることが示された。活性化化合物である S2 および F1 はいずれも 5-hydroxymaltol であり、本化合物はチロシナーゼ阻害剤としてすでに化粧品に用いられているコウジ酸と同じ分子量であり、分子サイズや官能基の位置も似ていることから、類似した細胞内浸透性とチロシナーゼ阻害機構を有すると推定される。ゼブラフィッシュを評価系に用いた探索の結果、実際に市販品に用いられている化合物と似た化合物が得られたことも、本評価系が有効性の高いサンプルを選別するのに適していることを示唆している。5-hydroxymaltol は TA100 に対する変異原性を示すことが報告されているという懸念事項があるが<sup>30)</sup>、この変異原性は同論文中でコーヒー、紅茶、アルコール飲料や現在医薬部外品の美白剤として承認されているコウジ酸も同様に示すことが記されていることから、特別な注意を要するものではないと推定される。5-hydroxymaltol はその構造からだけでも、コウジ酸と同様にチロシナーゼ阻害活性をもつことが容易に推定されるが、意外なことに筆者が調べた範囲ではそのチロシナーゼ阻害活性に言及した文献が見当たらないことから、本研究で初めてそのメラニン産生抑制効果が示された可能性がある。

BSL1-4-4から単離されたF2はゼブラフィッシュに対するふ化阻害および奇形の発生を引き起こすという結果が示された。このような毒性はエキスの段階では見られなかったが、F2の単離量は0.7mgと活性化化合物である5-hydroxymaltolの25.6mgと比べ微量にしか含まれていなかったことから、エキスの段階ではその毒性はマスクされていたと考えられる。このことからゼブラフィッシュを用いた評価系は、混合物としてのサンプルの有効性を総合的に評価できる一方で、各構成化合物の潜在的危険性の評価にも用いることができることが示唆された。これまでに報告されているF2に関する論文<sup>9,31,32)</sup>からは、F2はいくつかの細胞に対する影響が見られているが強い細胞毒性を示すという表記は見当たらないことから、*in vitro*での細胞毒性では評価できなかったF2の生体に対する毒性をゼブラフィッシュを用いることで初めて確認できた可能性がある。

対照実験として行った、チロシナーゼ阻害活性を示し、ゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性を示さなかったハウチワノキ材部抽出エキスから得られた化合物は、単離後もゼブラフィッシュメラニン抑制活性を示さなかった。一方、D12, D13, D19は*in vitro*においてチロシナーゼ阻害活性を示したが、*in vivo*においては卵のふ化阻害を引き起こした。

*in vitro*における酵素阻害活性試験は迅速に結果が得られる優れた試験法であるが、細胞内浸透性が低い化合物や生体への毒性が強い化合物、非特異的に多くの酵素を阻害する化合物など実用上問題がある化合物を判別することができないというデメリットもあり、今回得られた化合物ではそれらの判別されなかった特徴が毒性という形で現れた可能性がある。

本研究結果から、ゼブラフィッシュを用いるメラニン色素産生抑制活性試験法は、生体に対して毒性が低くかつ生体内でメラニン産生抑制活性を示す原料を開発の初期段階から効果的に選別できる可能性が示された。

## 5. 総括

ゼブラフィッシュのタンパク質は、ヒトのオルソログとの同一性は70%以下であるが、基質結合領域(多くの場合、薬物結合標的)などの機能ドメインでの保存性はかなり高く、100%の類似性に近づいており、これが多くの薬剤がゼブラフィッシュとヒトで同等の効果を示すというこれまで報告されてきた実験結果の科学的根拠となっている<sup>7)</sup>。ゼブラフィッシュを用いた評価系では、本研究でも示されたように、その成分の有効性だけでなく、短期・長期毒性に関しても同時に評価できるという利点があり、胚発生、メラニン色素産生、稚魚の生死、血流、内臓機能、行動量など、化合物が生体に与える影響を包括的に評価すること

ができる。化粧品はその効力の強さと同時に高い安全性が求められるものであることから、ゼブラフィッシュを用いた新規素材開発や毒性評価はそれらの目的に沿ったモデルになるのではないかと期待している。

## (引用文献)

- 1) Driever, W.; Solnica-Krezel, L.; Schier, A. F.; Neuhauß, S. C. F.; Malicki, J.; Stemple, D. L.; Stainier, D. Y. R.; Zwartkruis, F.; Abdelilah, S.; Rangini, Z.; Belak, J.; Boggs, C. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 123, 37-46 (1996)
- 2) Eisen, J. S. Zebrafish make a big splash. *Cell*, 87, 969-977 (1996)
- 3) Kimmel, C. B. Genetics and early development of zebrafish. *Trends. Genet.*, 5, 283-288 (1989)
- 4) Fishman, M. C. Zebrafish genetics : the enigma of arrival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 10554-10556 (1999)
- 5) den Hertog, J. Chemical genetics : drug screens in zebrafish. *Biosci. Rep.*, 25, 289-297 (2005)
- 6) Pichler, F. B.; Laurenson, S.; Williams, L. C.; Dodd, A.; Copp, B. R.; Love, D. R. Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. *Nat. Biotechnol.*, 21, 879-883 (2003)
- 7) Langheinrich, U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays*, 25, 904-912 (2003)
- 8) Cha, S.-H.; Ko, S. -C.; Kim, D.; Jeon, Y. -J. Screening of marine algae for potential tyrosinase inhibitor : Those inhibitors reduced tyrosinase activity and melanin synthesis in zebrafish. *The Journal of dermatology*, 38, 354-363 (2011)
- 9) Chin, Y. -W.; Lim, S. W.; Kim, S.-H.; Shin, D. -Y.; Suh, Y. -G.; Kim, Y. -B.; Kim, Y. C.; Kim, J. Hepatoprotective pyrrole derivatives of *Lycium chinense* fruits. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 79-81 (2003)
- 10) Feliciano, A. S.; Medarde, M.; Lopez, J. L.; Miguel del Corral, J. M.; Puebla, P.; Barrero, A. F. Terpenoids from leaves of *Juniperus thurifera*. *Phytochemistry*, 27, 2241-2248 (1988)
- 11) Zdero, C.; Bohlmann, F.; Niemeyer H.M. *Seco-Labdanes and other constituents from Ophryosporus floribundus*. *Phytochemistry*, 29, 3247-3253 (1990)
- 12) Mata, R.; Contreras, J. L.; Crisanto, D.; Pereda-Miranda, R.; Castañeda, P.; Del Rio, F. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, XVIII. New secondary metabolites from *Dodonaea viscosa* J.

- Nat. Prod.*, 54, 913-917 (1991)
- 13) Huang, Z.; Jiang, M. -Y.; Zhou, Z. -Y.; Xu, D. Two new clerodane diterpenes from *Dodonaea viscosa*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: A Journal of Chemical Sciences*, 65, 83-86 (2010)
- 14) Jefferies, P. R.; Payne T.G. Diterpenes of the cascarillin group from *Dodonaea species*. *Tetrahedron Lett.*, 48, 4777-4782 (1967)
- 15) Zdero, C.; Bohlmann F.; Mungai G.M. Clerodanes, seco-clerodanes, geranyl geraniol derivatives and unusual sesquiterpenes from *Conyza hypoleuca*. *Phytochemistry*, 30, 575-581 (1991)
- 16) van Heerden, F. R.; Viljoen, A. M.; van Wyk, B.-E. The major flavonoid of *Dodonaea angustifolia*. *Fitoterapia*, 71, 602-604 (2000)
- 17) Zhang, L. B.; Ji, J.; Lei, C.; Wang, H. Y.; Zhao, Q. S.; Hou, A. J. Isoprenylated Flavonoid and Adipogenesis-Promoting Constituents of *Dodonaea viscosa*. *J. Nat. Prod.*, 75, 699-706 (2012)
- 18) Muhammad, A.; Anis, I.; Khan, A.; Marasini, B. P.; Choudhary, M. I.; Shah, M. R. Biologically active C-alkylated flavonoids from *Dodonaea viscosa*. *Arch. Pharm. Res.*, 35, 431-436 (2012)
- 19) Gao, Y.; Fang, Y.-D.; Hai, P.; Wang, F.; Liu, J. K. Isoprenylated flavonoids and clerodane diterpenoids from *Dodonaea viscosa*. *Nat. Prod. Bioprospect.*, 3, 250-255 (2013)
- 20) Vasconcelos, J. M. J.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris subsp. maritima*. *Phytochemistry*, 49, 1421-1424 (1998)
- 21) Tsukamoto, H.; Hisada, S.; Nishibe, S. Coumarins from bark of *Fraxinus japonica* and *F. mandshurica var. japonica*. *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 4069-4073 (1985)
- 22) Hu, H. -B.; Zheng, X. -D.; Jian, Y. -F.; Liu, J. -X.; Zhu, J. -H. Constituents of the root of *Anemone tomentosa*. *Arch. Pharm. Res.*, 34, 1097-1105 (2011)
- 23) Yasuda, T.; Fukui, M.; Nakazawa, T.; Hoshikawa, A.; Ohsawa, K. Metabolic Fate of Fraxin Administered Orally to Rats. *J. Nat. Prod.*, 69, 755-757 (2006)
- 24) Moon, S. -S.; Rahman, A. A.; Kim, J. -Y.; Kee, S. -H. Hanultarin, a cytotoxic lignan as an inhibitor of actin cytoskeleton polymerization from the seeds of *Trichosanthes kirilowii*. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 7264-7269 (2008)
- 25) Zhang, H. L.; Nagatsu, A.; Okuyama, H.; Mizukami, H.; Sakakibara, J. Sesquiterpene glycosides from cotton oil cake. *Phytochemistry*, 48, 665-668 (1998)
- 26) Chaloner, P. A. Geminal and vicinal carbon-13-carbon-13 coupling constants in carboxylic acid derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1028-1032 (1980)
- 27) Khlebnikova, T. B.; Pai, Z. P.; Fedoseeva, L. A.; Mattsat, Y. V. Catalytic oxidation of fatty acids. II. Epoxidation and oxidative cleavage of unsaturated fatty acid esters containing additional functional groups. *React. Kinet. Catal. Lett.*, 98, 9-17 (2009)
- 28) Achenbach, H.; Stocker, M.; Constenla M. A. Constituents of tropical medicinal plants. Part 31. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry*, 27, 1835-1841 (1988)
- 29) Zander, W.; Mohr, K. I.; Gerth, K.; Jansen, R.; Muller, R. *p*-Hydroxyacetophenone amides from *Cystobacter ferrugineus*, strain Cb G35. *J. Nat. Prod.*, 74, 1358-1363 (2011)
- 30) Kosuge, T.; Tsuji, K.; Nukaya, H.; Terada, A.; Ochiai, M.; Wakabayashi, K.; Nagao, M.; Sugimura, T. Isolation and Identification of 5-Hydroxymaltol, a Mutagenic Substance in Glucose Pyrolysate. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 881-883 (1983)
- 31) Le, T. P. L.; Lee, J. W.; Kim, J. G.; Han, J. S.; Kwon, H.; Lee, D.; Lee, M. K.; Hwang, B. Y. Tetrahydroprotoberberine N-Oxides from *Chelidonium Majus* and Their Inhibitory Effects on NO Production in RAW 264.7 Cells. *Phytochemistry Letters*, 41, 38-42 (2021)
- 32) Xiong, J.; Huang, Y.; Wu, X. -Y.; Liu, X. -H.; Fan, H.; Wang, W.; Zhao, Y.; Yang, G. -X.; Zhang, H. -Y.; Hu, J. -F. Chemical Constituents from the Fermented Mycelia of the Medicinal Fungus *Xylaria Nigripes*. *Helv. Chim. Acta.*, 99, 83-89 (2016)