

アキノノゲシ (*Lactuca indica*)由来メラニン合成促進物質

畠恵司^a, 堀一之^{a,*}, 向山俊之^b, 坂本賢二^b, 高橋砂織^a

^a秋田県総合食品研究所, ^b榎坂本バイオ

Activators of Melanin Biosynthesis from *Lactuca Indica*

Keishi Hata^a, Kazuyuki Hori^{a,*}, Toshiyuki Mukaiyama^b,

Kenji Sakamoto^b and Saori Takahashi^a

^aAkita Research Institute of Food & Brewing (ARIF), 4-26 Sanuki, Araya-machi, Akita 010-1623, Japan,

^bSakamoto-Bio, 25 Kourokuzawa, Memeki, Yuwa-machi, Kawabe-gun, Akita 010-1233, Japan

(Received June 24, 2003)

The extracts from *Lactuca indica* showed a marked stimulative effect on differentiation of the mouse melanoma cell line, B16 2F2. We isolated lupeol (1), lupenyl acetate (2) and lupenyl palmitate (3) as differentiation-inducing compounds of B16 2F2 cells from the extracts.

Key Words: *Lactuca indica*, B16 2F2, Differentiation, Lupenyl Palmitate, Melanin

マウスメラノーマ細胞株 B16 はメラニン生産株として知られており、この細胞株を使用して、種々の美白物質の探索研究がなされている¹⁻³⁾。また、B16細胞のメラニン産生誘導や細胞の分化機構についても活発に研究されており、それに伴い、分化誘導因子が幾つか報告されている。これら研究において最も広く用いられているのが α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)である。 α -MSHは細胞膜上に存在する受容体 (α -melanocortin receptor 1)に結合し、この受容体と複合体形成をしているアデニルシクラーゼを活性化することにより細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、下流の情報伝達系にシグナル伝達すると考えられている⁴⁾。そのために他の cAMP 上昇試薬やアナログである forskolin や dibutyryl cAMP 処理により B16細胞分化の指標であるメラニン産生促進が観察される⁵⁾。下流の情報伝達系に関しても特異的な阻害剤を使用した実験において、徐々に全容が解明されつつある^{6,7)}。更に、B16細胞分化誘導

物質は同細胞のメラニン生産能の促進物質であるため、抗白髪物質や日焼け促進剤 (tanning 剤)として応用面でも期待されている。しかしながら、B16細胞分化誘導物質の探索研究は、白血病細胞分化誘導因子の探索^{8,9)}などに比べて報告例は少ない。我々はこれまで、B16由来の高分化誘導能を有する細胞株、B16 2F2を選抜し、タンポポ根生薬 (蒲公英根)より、同細胞分化誘導物質として lupeol (1)を単離した¹⁰⁾。また、同物質の構造活性相関の研究より、B16 2F2細胞分化誘導活性は lupane 骨格を有するトリテルペンに特異的であり、C-3位の酸化によって生じるケトン体は、メラニン合成誘導に対する ED₅₀値を著しく減少させるという知見を得ている¹¹⁾。

本研究においては、先に B16 2F2分化誘導活性を認めた蒲公英根抽出物より、更に強い活性を示したアキノノゲシ (*Lactuca indica*)メタノール抽出物より、活性物質を単離した。構造解析の結果、活性物質は 1, lupenyl

acetate (**2**)及び lupenyl palmitate (**3**)であった。

材料及び方法

1. 材料

アキノノゲシは2001年10月秋田市に自生する全草を採取し洗浄後、凍結乾燥し -20°C で保存した。蒲公英根はウチダ和漢薬株式会社から購入した。植物抽出物の調製は以下の通り行った。植物試料(10 g)を100 mlの蒸留水、熱蒸留水、MeOH、EtOAc中で破碎する。4 $^{\circ}\text{C}$ 8,000 x g, 30分間遠心分離を行い、上清を回収した。上清は更にNo5ろ紙でろ過し、抽出液を得た。抽出液を減圧乾固させ、それぞれの抽出物とした。

2. 細胞

マウスメラノーマ細胞株 B16 2F2 は 10 % fetal bovine serum, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン及び 100 U/ml ペニシリンを含む Dulbecco's modified Eagle medium で培養した。B16 2F2 細胞の分化の指標であるメラニン合成促進は細胞内メラニン含量を定量することで評価した¹⁰⁾。

3. アキノノゲシ由来 B16 2F2 細胞分化誘導物質の単離

アキノノゲシ全草凍結乾燥物(200 g)を5 LのMeOH中で破碎し、濾過後抽出液を得た(この操作を5回行った)。抽出液は減圧乾固させ(33.7 g), CHCl_3 -MeOH- H_2O (4:4:3)の組成で分液操作を行った。上層(H_2O 層)並びに下層(CHCl_3 層)の両方についてB16 2F2細胞メラニン合成促進能を調べた結果、活性は CHCl_3 層に検出された。そこで活性画分を減圧乾固し(13.6 g), シリカゲルクロマトグラフィーで分離を行い, *n*-hexane-EtOAc (5:1)で溶出し, Fractions I~VIIを得た。活性が検出されたFr. I (1.63 g), II (1.85 g), IV (1.61 g)を各々シリカゲルクロマトグラフィーで更に精製し, Fr. IVからは*n*-hexane-EtOAc (5:1)で溶出することにより**1** (=lupeol, 532.4 mg)が, Fr. IIは*n*-hexane- CHCl_3 (2:1)で溶出することにより**2** (=lupenyl acetate, 633.4 mg)が単離された。またFr. Iからは*n*-hexane- CHCl_3 (10:1)で溶出される化合物**3** (384.2 mg)が活性物質として単離されたので、以下構造解析を行った。

4. 化合物**3**の化学構造

化合物**3**は, mp 94-96 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +52.7^{\circ}$ (c 0.3, CHCl_3)を示す無色柱状結晶物質である。IR (KBr) スペクトルでは水酸基由来吸収が存在せず 1728 cm^{-1} に大きいエステルカルボニル由来の吸収が認められ, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) では δ 4.90 (1H, dd, $J=10.8, 5.6$ Hz)に化合物**1**の3 β 水酸基がアシル化されたと推測される特徴的な3 α 位プロトンのシグナルおよび δ 1.25付近に脂肪酸長鎖アルキル由来の大きなシグナルが認められた。さらに $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)において, δ_{C} 179.57にアシルカルボニル由来の炭素シグナル, δ_{C} 80.60に化合物**1** (δ_{C} 79.05)に比べ1.55アシレーションシフトした3位炭素シグナルおよび δ_{C} 27.95~29.6に長鎖脂肪酸由来(**1**のメチレンシグナル群と重なる)のメチレン炭素シグナル群および δ_{C} 15.99に脂肪鎖末端メチル由来のシグナルが現れた。そこで, **3**のEI-MSを測定したところ, m/z 664 (nominal, HR-EI-MS 664.6125, Calcd. for $\text{C}_{46}\text{H}_{80}\text{O}_2$ 664.6158)に分子イオンピークが, またその脱メチルイオンピーク m/z 649 および 14 ずつ順次切断されたイオン群が認められたものの, それ以外の不飽和由来の2あるいは4少ないシグナルは全く観測されず, その脂肪酸は飽和のみでC-16のバルミチン酸を最長とすることが推測された。以上から最終的に脱エステル化により**3**の化学構造を確認することとした。すなわち, **3** (10 mg)をMeOH (2 ml)に溶解し, 氷冷中で攪拌しながらNaOMe-MeOH溶液 (28%) 0.2 mlを加えた。その後, 反応液を攪拌しながら室温から徐々に加熱し最終的には60 $^{\circ}\text{C}$ で2時間反応させた。反応液はそのうち1.5 mlを飽和食塩水-水中に注ぎ, EtOAcで抽出操作を行い, EtOAc層を飽和食塩水で洗浄後, 硫酸マグネシウムで乾燥, 減圧乾固し粗生成物を得た。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し (移動層 *n*-hexane-EtOAc 5:1)その主化合物を単離した。得られた化合物は, 各種スペクトルの解析によりlupeol (化合物**1**)であると決定した。また, 残りの反応液 (0.5 ml)はMeOHで希釈後, 炭酸銀を用いて中和し, 乾燥窒素でMeOHを蒸発させ, その残さを CHCl_3 (0.5 ml)で溶解後10%トリメチルシリルジアゾメタン-ヘキサン溶液 (ジーエルサイエンス)を窒素の泡

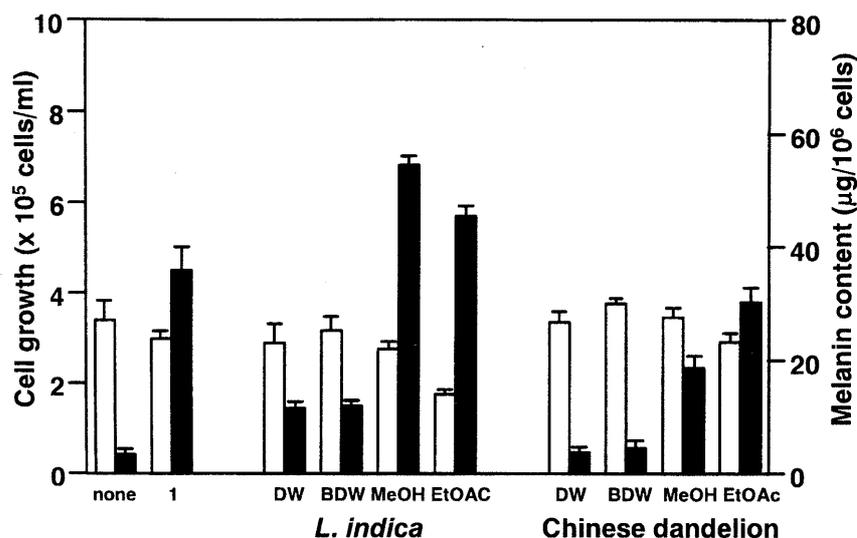


Fig. 1 Differentiation-Inducing Activities of Two Taraxacum Plant Extracts on B16 2F2 Cells.

B16 2F2 cells were incubated with 100 µg/ml each extracts for 72 h, and the cell growth (□) and melanin content (■) were measured. **1** (10 µM) was used as a positive control. The column and bars represent mean ± S.D. (n=4).

が出なくなるまで加え、その溶液を分離することなくガスクロマトグラフィーに付した(装置: HP 5890II, カラム: スペルコ Omega WAX 250 30m × 0.25 mm id, 0.25 µm, He 30 cm/秒, 120 → 220°C 4°C/分昇温, 比較用サンプルとしてスペルコ 37 種 FAME mix を使用). その結果は, t_R 6.01 分に methyl palmitate 由来のピークのみが観察され, 他の脂肪酸メチルエステル由来のシグナルは全く観察されなかった. 以上を総合し, 化合物 **3** の化学構造を lupenyl palmitate と決定した.

結果及び考察

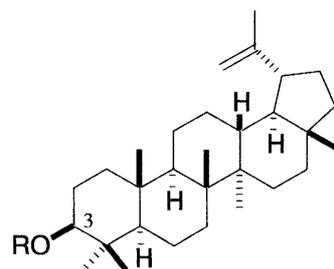
1. アキノノゲシ抽出物の B16 2F2 細胞分化誘導活性

Fig. 1 にアキノノゲシ H₂O (DW), 熱 H₂O (boiled DW: BDW), MeOH 及び EtOAc 抽出物の B16 2F2 細胞増殖及びメラニン生産能に対する影響を調べた結果を示した. 同時に 10 µM の **1** をメラニン合成促進活性の positive control として用いた. アキノノゲシ抽出物の B16 2F2 細胞増殖に対する影響は, EtOAc 抽出物で無添加の処理区に比べて約 52 % まで阻害した以外は, 顕著な影響は認められなかった. 一方, B16 2F2 細胞のメラニン合成に対する影響は顕著であり, 未処理の区と比較して, DW 抽出物が 2.1 倍, BDW 抽

出物が 2.5 倍, MeOH 抽出物が 12.3 倍, EtOAc 抽出物が 10.5 倍のメラニン合成を誘導した. 特に, MeOH 及び EtOAc 抽出物は positive control として用いた **1** (10 µM) 誘導能 (7.5 倍) より高値を示した. また, 以前に我々が報告したタンポポ根生薬 (蒲公英根) 由来の各抽出物よりも高い値であった. 以上のことから, アキノノゲシは抗白髪剤等の原料として有益なものと推察される.

2. アキノノゲシ由来 B16 2F2 細胞分化誘導物質

アキノノゲシ MeOH 抽出物より B16 2F2 細胞分化誘導活性を指標に 3 種の化合物 (Fig. 2) を単離した. 構造解析の結果, 何れの化合物も lupane 骨格を有するトリテルペン及びその誘導体であった (Fig. 2). **1** 及び



- 1: R = H (lupeol)
- 2: R = COCH₃ (lupenyl acetate)
- 3: R = COC₁₅H₃₁ (lupenyl palmitate)

Fig. 2 Chemical Structures of 1-3

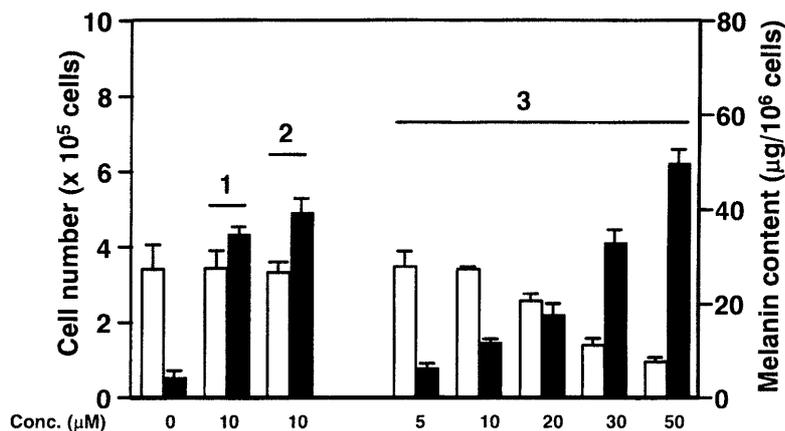


Fig. 3 Stimulating-Effects of 1-3 on the Melanogenesis of B16 2F2 Cells

B16 2F2 cells were incubated with 1-3 for 72 h, and the cell growth (□) and melanin content (■) were measured. The column and bars represent the mean ± S.D. (n=4).

2は我々の既報¹¹⁾で同細胞分化誘導活性を有することを報告しており、本研究で lupane 骨格 C-3 位が palmitic acid で置換された 3 を新たに単離したため、3 の B16 2F2 細胞増殖並びに分化の指標であるメラニン合成に対する影響を検討した (Fig. 3)。3 は 5-20 µM の濃度では B16 2F2 細胞の増殖抑制を示さなかったが、50 µM 添加時は未処理の区の 27.3% まで増殖を抑制した。しかしながら、同濃度の 3 を添加した B16 2F2 細胞の生存率、形態並びにシャーレに対する付着性は未処理の区と変わらず、3 は B16 2F2 細胞に対して細胞毒性というよりは、細胞増殖抑制作用を示すものと推定された。またメラニン合成は 10 µM 以上の濃度で促進した。しかしながら 1 や 2 と比較した場合、メラニン合成促進活性は弱く、10 µM の添加量で 1 は未処理の区の 9.2 倍、2 は 10.3 倍の促進活性を示したのに対して、同濃度の 3 は 3.1 倍の促進活性にとどまった。また、既報¹¹⁾で我々は lupane トリテルペンの C-3 位の構造が活性発現に重要な役割を担うことを報告したが、本研究において C-3 位に長鎖の脂肪酸が付加した 3 は 1 や 2 に比べ弱いメラニン合成促進能を示し、C-3 位の違いが活性の強弱に関係ある結果が得られた。これらの結果は既報の結果を支持するものである。

謝辞

本研究の一部は、(財)インテリジェンスコスモス学術振興財団「自然科学研究に対する

助成事業」ならびに、(財)あきた産業機構平成 14 年度「テクノ共同開発助成金」によるものです。

引用文献

1. Katagiri T., Yokoyama K., Koiso I., Matsukami I., Nakano H., *Jpn. J. Dermatol.* **104**, 1367-1372 (1994)
2. Hata K., Iwahori Y., Hori K., Okada Y., Okuyama T., *Natural Medicines*, **54**, 144-147 (2000)
3. Hata K., Hori K., Miura N., Sakamoto K., Takahashi S., *Natural Medicines*, **55**, 304-307 (2001)
4. Busca R., Abbe P., Mantoux F., Aberdam E., Peyssonnaud C., Eychene A., Ortonne J. P., Ballotti R., *EMBO J.*, **19**, 2900-2910, 2000
5. Engalo W., Rezzonico R., Durand-Clement M., Lallemand D., Ortonne J. P., Ballotti R., *J. Biol. Chem.*, **270**, 24315-24320 (1995)
6. Engalo W., Bertolotto C., Busca R., Pages G., Ortonne J. P., Ballotti R., *J. Biol. Chem.*, **273**, 9966-9970 (1998)
7. Smalley K., Eisen T., *FEBS Lett.*, **476**, 198-202 (2000)
8. Collins S. J., *Blood*, **70**, 1223-1228 (1987)
9. Honma Y., *Leukemia Lymphoma*, **43**, 1169-1178 (2002)
10. Hata K., Ishikawa K., Hori K., Konishi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 962-967 (2000)
11. Hata K., Hori K., Takahashi S., *J. Nat. Prod.*, **65**, 645-648 (2002)