

アスタキサンチンの誘導体化による機能性改善と代謝特性に関する研究

薬科学専攻 高橋 滉平

第1章 モクズガニ *Eriocheir japonica* におけるアスタキサンチンエステルの加水分解に関する研究

【背景・目的】モクズガニ *Eriocheir japonica* は日本全国の河川に分布するモクズガニ科モクズガニ属に分類される甲殻類の一種である¹。モクズガニは捕食の過程でアスタキサンチン(ASTX) (1)とよばれる赤色色素を体内に取り込み、遊離型とタンパク質に結合したエステル型として保有している。ASTX類は抗酸化作用を有し、モクズガニにとって必要な栄養素であるが、モクズガニ体内のASTX分布について解析されたことはない。また、過剰に蓄積されたASTXエステルは、加水分解酵素により代謝を受けると考えられるが、その代謝過程についても明らかになっていない。エステルを加水分解する代表的な酵素として、哺乳類のみならず魚類や昆虫類を含む多くの生物に存在が確認されているカルボキシルエステラーゼ(CES, EC3.1.1.1)が知られている²。しかし、モクズガニの代謝機能についてはほとんど明らかになっておらず、CESを始めとした加水分解酵素の存在は報告されていない。そこで本研究では、モクズガニにおけるASTXの役割を調査し、モクズガニの加水分解代謝を担う酵素について解明を試みた。

【方法】モクズガニは、石狩川産の天然個体及びAstx供給個体を使用した。ASTX類の体内分布については、モクズガニを各部位ごとに分けた後、それぞれエタノールで抽出したAstx類をHPLCにより定量した。次に、モクズガニ中腸線より得られたS9画分に対し、CESの標準的な基質である4-ニトロフェニルアセテート(PNPA)を用いた加水分解活性の測定を行った。また、抗hCES1抗体を用いたWestern Blot法によるタンパク質の定性解析を行った。さらに、当研究室で既に合成された**1b**、**2**、**3**、及び**4**を各種酵素液と反応させ、代謝生成物をHPLCにより定量した(図1)。本研究で用いた酵素液は、モクズガニ中腸腺S9、ヒト肝臓S9、ヒト肝臓ミクロソーム(HLM)、ヒト小腸ミクロソーム(HIM)及びヒトの肝臓に主に発現するエステラーゼであるヒトCES1(hCES1)、ヒトCES2(hCES2)及びアリールアセトアミドデアセチラーゼ(AADAC)である。

【結果・考察】ASTX体内分布について調べた結果、天然群とASTX供給個体群のいずれにおいても、甲羅における含有量が最も高かった。ASTX供給個体群は、天然個体群に比べて殻胸部部は減少し、筋肉部は大きく増加した。今回使用したモクズガニは飼育施設内で飼育されており、紫外線による酸化ストレスが低い状態であった。そのため、活動するために必要な本体筋肉に優先的に蓄積されたのだと考えられる。これより、ASTXの分布部分で外部からの保護的役割を果たしている可能性が示唆された。次にPNPAを基質に用いて加水分解代謝を調べた結果、モクズガニ中腸腺のS9画分に認められた加水分解活性がミクロソーム画分では確認されず、サイトゾル画分で確認されたことから、サイトゾル画分に局在していることが示唆された。また、S9画分について、抗ヒトhCES1抗体によるWestern Blotを行ったところ、分子量が61,000のhCES1に近い位置に免疫交叉性を示すタンパク質が検出された。したがって、モクズガニ中腸腺にはCESに類似した加水分解酵素が存在することが確認された。基質特異性については、hCES2基質である**2**及び**3**の加水分解速度は高かったが、hCES1A1基質である**4**の加水分解速度は**2**及び**3**より著しく低かった(図1)。免疫組織化学的染色によってhCES1A1に類似したエステラーゼが検出されたがhCES2基質の加水分解速度は高かった。このためモクズガニのエステラーゼはhCES1よりもhCES2に近い基質特異性を持つと考えられる。また、**1b**の加水分解において、モクズガニ中腸腺S9画分において代謝物であるASTXの生成が確認された。このことから、モクズガニはASTXエステルを加水分解し、遊離型ASTXを供給する代謝経路を持つ可能性が示唆された。また、

ヒト酵素の比較においては、AADAC では ASTX の生成が確認されず、hCES1 及び hCES2 においては ASTX の生成が確認された。以上より、モクズガニの体内における ASTX の役割、及び中腸線においてサイトゾル画分に加水分解酵素の存在を明らかにした。免疫学的解析では hCES1 に類似したタンパク質が検出されたが、その基質特異性はヒトと異なる可能性が示唆された³。

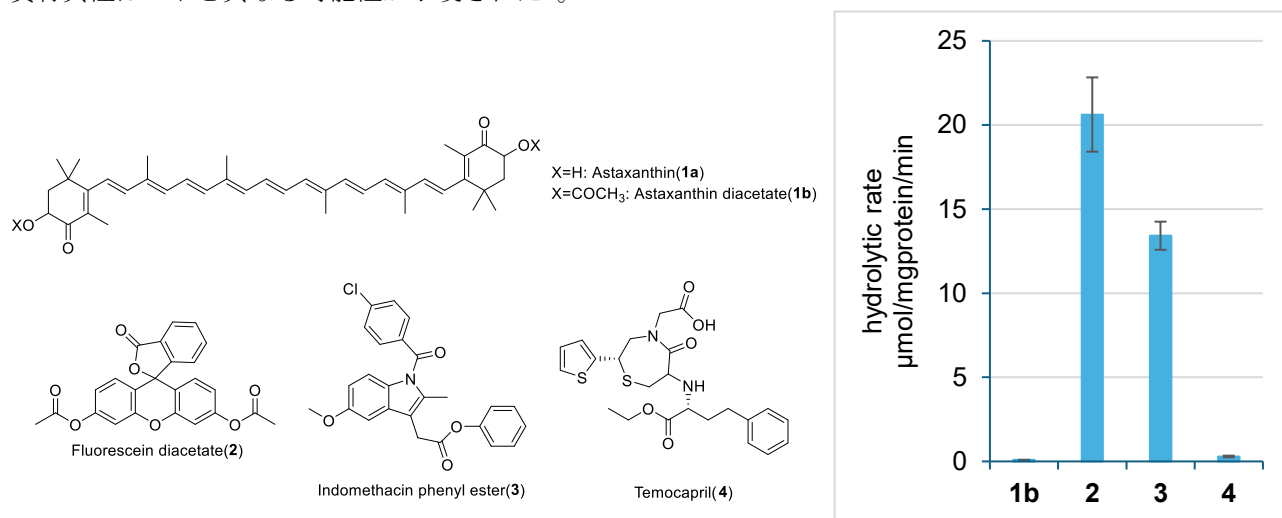


図 1. モクズガニ中腸腺 S9 画分における **1b-4** の加水分解活性. 値は平均値±標準偏差 (n = 3).

第2章 水溶性及び安定性向上を目的としたアスタキサンチン誘導体の合成と評価

【背景・目的】ASTX は強力な抗酸化作用を持つ一方、化学的安定性が低く、水溶性も著しく低いため、経口投与時の吸収性が低いという課題がある⁴。これを改善するため、リポソームや脂質ナノ粒子などによるカプセル化が進められており、表面修飾による安定化や抗酸化能向上も報告されている⁵。しかし、粒径や封入率のばらつき、薬物漏出、長期安定性、品質管理の複雑さなど、製造面・臨床面の課題は依然として大きい。また、エステル型 ASTX 誘導体の抗酸化能に関する研究も十分ではない。そこで本研究では、水溶性修飾基を導入した ASTX 誘導体を合成し、溶解性、代謝活性化速度、抗酸化試験法の一種である DPPH(di (phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium)法によりラジカル消去能を評価し、その有用性を検討した。

【方法】ASTX を基質として化学修飾を行い、エステル誘導体(**1c-11**)を合成した(図2)。合成した誘導体を水に懸濁させ、回収した上清を飽和水溶液とし、HPLCにより定量した。プロドラッグとしての可能性を評価するため、各種酵素溶液を用いて加水分解を行い、生成した代謝物を HPLC により定量した。また、誘導体自体の抗酸化能を評価するため、ラジカル消去率を DPPH Antioxidant Assay Kit (DOJINDO) 用いてラジカル消去率を測定した。本研究で用いた酵素溶液は HLM 及び HIM である。

【結果・考察】溶解度において、ASTX は極めて低い溶解度を示した(図2)。また、今回測定した ASTX 誘導体はいずれも ASTX よりも高い溶解度を示した。最も溶解度が低かった誘導体は **1h** であり、これは末端に環状構造を持つため疎水性が上がり、他のアミノ酸型エステルよりも水溶性が下がったためと考えられる。一方、最も高い溶解度を示したのは **1j** であり、類似の構造を持つ **1e** に対して 1.49 倍高い値を示した。これより、直鎖アミノ酸型エステル誘導体の N 末端にメチル基を導入することで溶解度が上がることが示唆された。代謝活性化の検討においては、**1b** では代謝物(ASTX)が確認されたが、**1c-1g** は検出限界以下となり、代謝物の検出は不可能であった。これはアシル基とアルコキシ基がともにかさ高く、代謝活性化酵素が基質に接近しにくいためであると考えられる。このため、プロドラッグとしての可能性は低いと示唆された。1.0 μM におけるラジカル消去率においては、今回合成した ASTX 誘導体は、ASTX より高いラジカル消去率を示した(図3)。最も高いラジカル消去率を示したのは、**1h** であり、類似の環状構造を持つ **1k** も高いラジカル消去率を示し

た。一方、**1h**と類似の構造を持つ**1l**は、**1h**より低いラジカル消去率を示した。また、最も高い溶解度を示した**1j**は、類似の構造を持つ**1e**より低いラジカル消去率を示した。これらの結果より、直鎖アミノ酸エステルのN末端にメチル基を導入した場合、溶解度を向上させるが、ラジカル消去能を低下させることが明らかとなった。環状構造を導入した場合、溶解度を低下させるが、ラジカル消去率を向上させることが明らかとなった。よって、ASTXを誘導体化する場合、導入する官能基の構造に留意する必要がある。

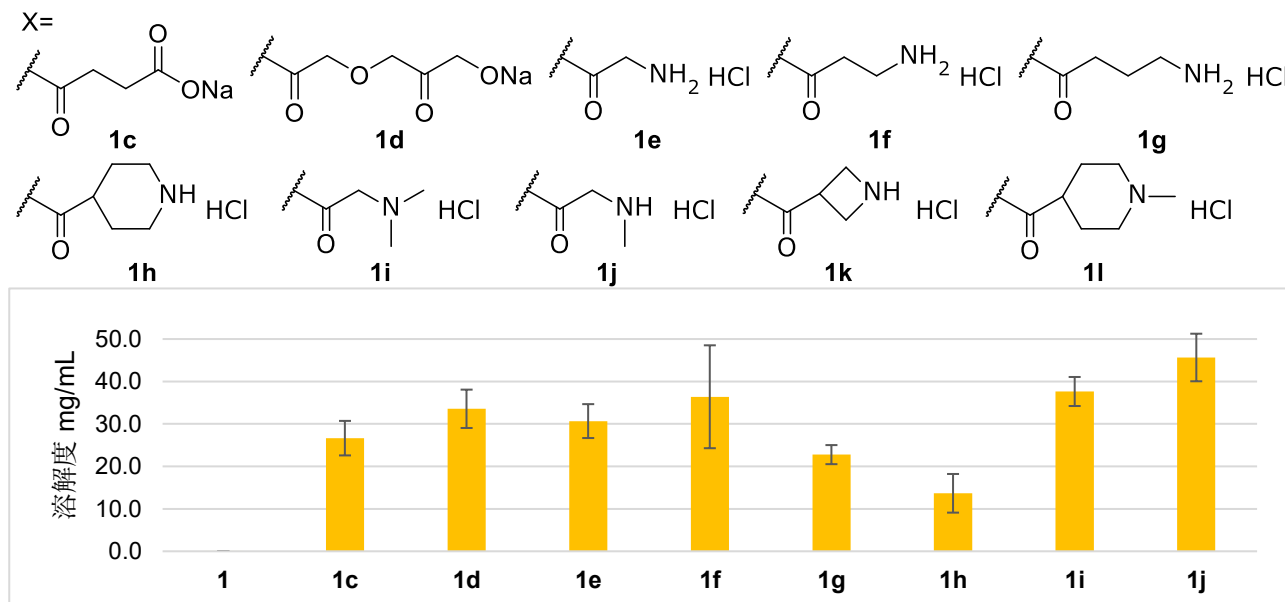


図 2. ASTX 誘導体官能基(1c-1l)及び1、1c-1jの溶解度。値は平均値±標準偏差 (n=3)。

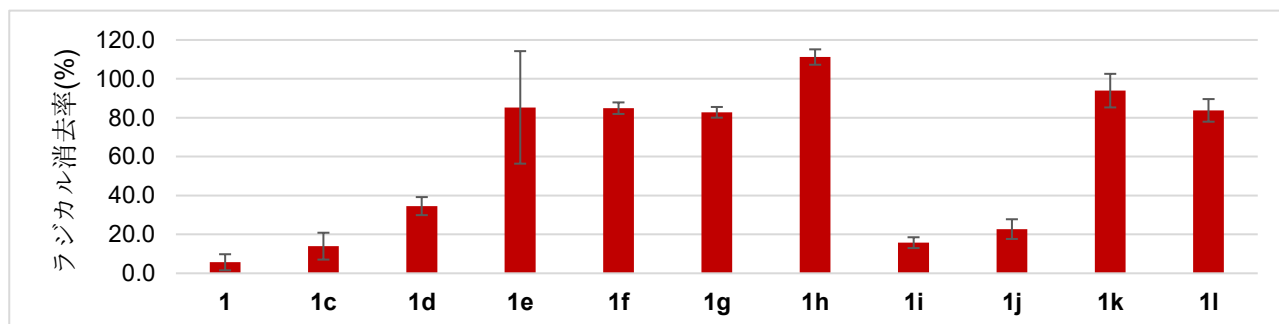


図 3. 1.0 μ MにおけるASTXと誘導体のラジカル消去率(%). 値は平均値±標準偏差 (n=3)。

第3章. アトルバスタチン誘導体の加水分解におけるカルボキシルエステラーゼの種差

【背景・目的】医薬品は、動物実験を対象とした前臨床試験で薬効や安全性が確認できた後に臨床試験を実施することが出来る。しかし、薬物動態においてヒトと実験動物の間での差異が認められるため、実験動物で得られたデータをヒトに外挿できない場合がある。この原因の一つとして、薬物代謝酵素の種差が挙げられ、その結果として薬物動態パラメータに大きな種差が生じることも報告されている⁶。一方、加水分解反応を触媒するCESは、プロドラッグを含む医薬品の代謝のみならず、エステルやアミド、チオエステル結合を持つ多くの食品成分、天然物、環境化学物質の代謝にも関与しており、これらの薬効や安全性において極めて重要な役割を果たしている²。そこで本研究では、肝臓の加水分解に大きく寄与するCES1に着目し、ヒト(hCES1)、マウス(mCES1)およびカンクイザル(mfCES1)における基質特異性の種差を解明することを目的として、構造および電子的特徴の異なるアトルバスタチンエステルを用いて加水分解能を比較検討した(図4)。

【方法】当研究室で合成したアトルバスタチンエステル誘導体(6b-6ae)を基質とし、CES存在下で加水分解反応を行い、代謝物をHPLCで定量した。hCES1については、Corning社より購入したものを、mCES1および

mfCES1 については、各々の肝臓より cDNA クローニングし、pTarget ベクターに組換えた cDNA を、Trans IT-293 試薬で HEK293 細胞に transfection し、72 時間後に細胞を採取したものを用いた。また、得られた酵素が CES1 と免疫学的に同一であるか確認するため、活性染色を行った。

【結果・考察】 hCES1 では、**6b** 及び **6e** においては高い活性が見られたが、炭素鎖が長くなるにつれて鎖長依存的に活性は低下した。一方、mCES1 では、炭素数による加水分解活性の変化はほぼ確認されず、hCES1 に比べ、分子サイズを認識しにくい可能性が示唆された。mfCES1 は **6b** において最も高い活性を示し、**6c** から **6e** にかけてはわずかに増加したが、その後は炭素鎖が長くなるにつれて活性は減少し、hCES1 とは異なる鎖長特異性を持つことが確認された。3 種の CES1 はいずれも **6b** に対して加水分解活性が最も高く、それ以外のエステルにおいては **6e** において比較的高い活性を持つことが示唆された。次に電子密度の影響について、**6n** と **6t** を比較したところ、**6t** の方が、hCES1 では 2.4 倍、mCES1 では 6.6 倍、mfCES1 では 4.5 倍ほど活性が高くなった。これより、フルオロ基による電子的効果は mCES1 および mfCES1 で大きく、hCES1 では比較的小さいことが明らかとなった。活性染色では、全サンプルにおいて hCES1 とほぼ同じ位置に 1 本の強いバンドが検出された。このバンドは、三量体としての分子量と pI 値の類似性から CES1 にゆらいずと考えられた。mfCES1 と mCES1 は同じタンパク質量で分析したが、mCES1 のバンドはより強かった。これは、基質特異性、触媒効率の違いによるものと推察された。なお、CES1 に対応するバンド以外には検出されなかったことから、他のエステラーゼの影響は最小限と考えられる。以上より、CES 存在下における加水分解速度は、hCES1 の方が、mCES1 や mfCES1 よりも活性が高いこと、また、加水分解速度は、基質の構造および電子密度に依存することが明らかになった⁷。

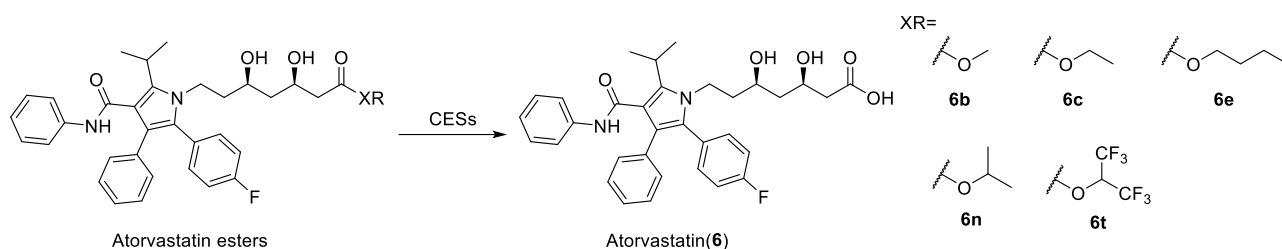


図 4. CES におけるアトルバスタチンエステルの加水分解反応

【参考文献】

- (1) Kobayashi, S. *Journal of Crustacean Biology* **2002**, 22 (3), 601-606.
- (2) Hosokawa, M. *Molecules* **2008**, 13 (2), 412-431.
- (3) Takahashi, M.; Takahashi, K.; Yamaguchi, T.; Kohama, T.; Hosokawa, M. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2024**, 270, 110932.
- (4) Faulks, R. M.; Southon, S. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2005**, 1740 (2), 95-100.
- (5) Cao, X.; Yu, C.; Cheng, S.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Huang, J. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2024**, acsami.4c01953.
- (6) Imai, T. *Drug Delivery System* **2007**, 22 (1), 48-53.
- (7) Takahashi, M.; Sakai, S.; Takahashi, K.; Hosokawa, M. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* **2025**, 46 (2), 49-57.