

博士學位論文

グリセリルアスコルビン酸誘導体の
メラニン産生抑制作用に関する研究

平 徳久

博士學位論文

グリセリルアスコルビン酸誘導体の
メラニン産生抑制に関する研究

平成 30 年 11 月 16 日

平 徳久

目次

序論	1
本論	6
第一章 アルキルグリセリルアスコルビン酸 (AGA) の合成および評価	6
第一節 グリセリルアスコルビン酸の合成	6
第二節 AGA の合成	7
第三節 AGA のメラニン産生抑制作用	10
第四節 グリセリル-ヘキシルアスコルビン酸の安定性	15
第二章 AGA のメラニン産生抑制作用機序	16
第一節 チロシナーゼ活性阻害抑制作用	16
第二節 チロシナーゼおよびチロシナーゼ関連遺伝子への影響	19
第三節 2-O-hexyl-3-O-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (VC-HG)のメラノソーム輸送阻害作用	22
第三章 VC-HG のオートファジー活性化作用	24
第一節 メラノソーム輸送阻害によるオートファジー活性化	24
第二節 VC-HG によるオートファジー活性化作用	28
結論	32
実験の部	34
参考文献	59
謝辞	

序 論

L-アスコルビン酸

L-ascorbic acid (以下, AsA と省略する) の歴史は古く, 1928 年に Szent-Györgyi らにより, ウシの副腎やオレンジ等から分離され, 1933 年に Haworth と Karrer らにより, 化学構造が決定され, 壊血病(scurvy)に対して抗壊血病作用 (anti-scorbutic) を示す物質であることから, ascorbic acid と命名された. 1937 年に, Szent-Györgyi はノーベル生理医学賞, Haworth と Karrer はノーベル化学賞を受賞している. このアスコルビン酸には立体構造が異なる, L-体と D-体が存在しており, ビタミン C 作用を示すのは L-体となっている. AsA は哺乳類では肝臓で合成されている物質であるが, ヒトなどの霊長類は, AsA の合成に必要な L-グルノラクトンオキシダーゼを持っていないため, 体内では合成できない. そのため, ヒトは食物から AsA を摂取する必要がある. また, AsA は, 抗酸化作用, メラニン産生抑制作用, コラーゲン産生促進作用, 異物代謝作用, 鉄イオンの吸収および発癌物質であるニトロソアミンの生成抑制など様々な作用が知られており¹⁾, 医薬, 食品, 飼料および化粧品など様々な分野で利用されている. 我々はこれまでに AsA の抗酸化作用に着目し, 高い抗酸化作用を有する AsA 誘導体 3-O-laurylglyceryl-AsA を開発している^{2,3)} (Figure 1). また, 化粧品分野においては AsA の作用の中でも, 美白作用を求めて使用されることが多く, メラニン産生抑制作用に着目して AsA 誘導体が現在までに合成されており, 2-O- α -D-glucopyranosyl-AsA, magnesium L-ascorbyl-2-phosphate, 3-O-ethyl-AsA などの誘導体 (Figure 1) が開発され, 医薬部外品の主剤としても認可されており, 様々な医薬部外品に利用されている. AsA やその誘導体は, チロシナーゼ活性阻害作用を有することで, メラニン産生を抑制しており, AsA は *o*-quinone 類を *o*-diphenol 類に還元する作用をもつので, L-DOPAquinone を L-DOPA に還元することで, メラニン産生を抑制している^{4,7)}. このチロシナーゼは銅を含有する酵素であり, 皮膚や毛髪の色を決定するメラニンの産生に重要な役割を果たしている⁴⁾.

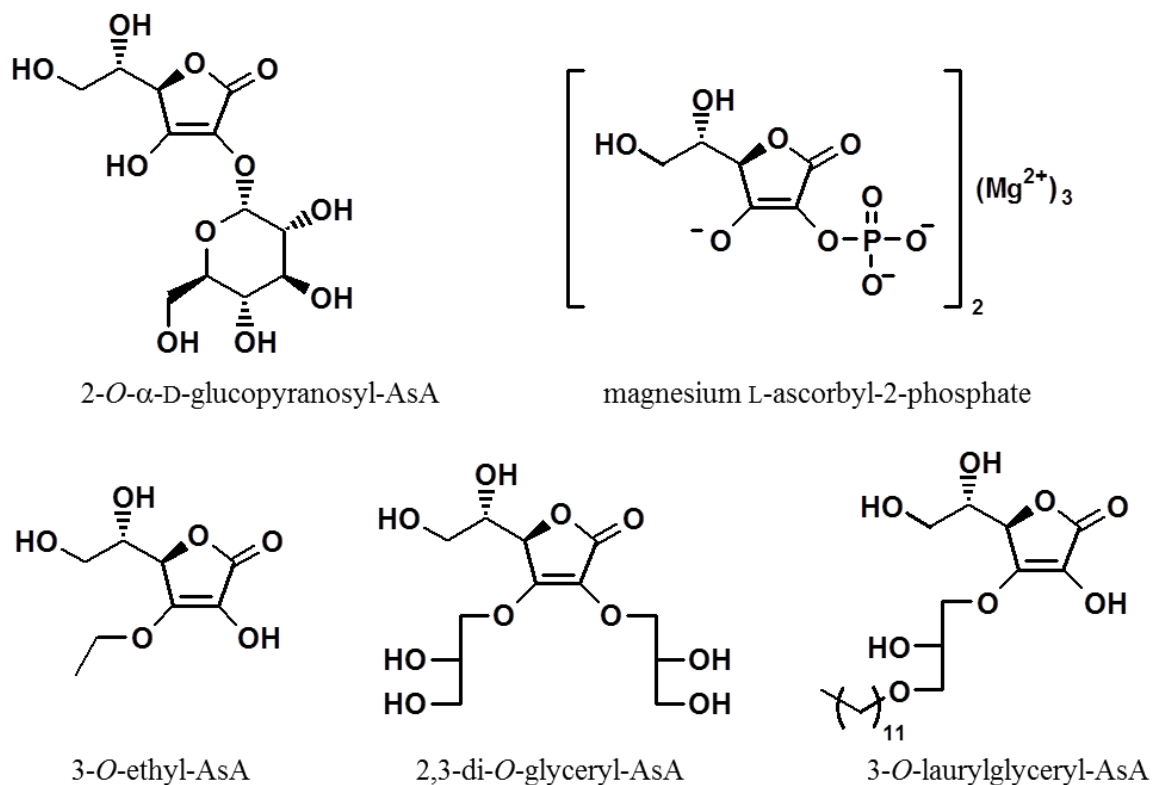


Figure 1. Structure of L-ascorbic acid derivatives.

しかし, AsA はその分子構造のため, 化粧品製剤中では不安定であり, 経時的な残存率の低下や製剤の褐変, 乳化物の分離や粘性製剤の粘度低下を引き起こし, 化粧品においては非常に使用し難いものであった. それらを解決するために, 我々は AsA のエンジオール基の 2 つの水酸基にグリセリル基を置換した, AsA 誘導体 2,3-di-glyceryl-AsA (Figure 1) を開発している⁸⁾. このアスコルビン酸誘導体は, 2 位および 3 位の水酸基が置換されることで経時的な安定性が向上し, ノニオン性化合物であるため乳化物においても分離を引き起こすことがなく安定に配合することが可能である. しかしながら, これら AsA 誘導体や AsA においては, 親水性物質であるため, 浸透性が低く実際にメラニン産生抑制作用を発揮するには, 高い濃度での適用が必要である. また, その浸透性の低さのため, 十分なメラニン産生抑制作用は得られていなかった.

メラニン

シミやそばかすは、女性にとって肌悩みの一つであり、その悩みを解決すべく様々な美白化粧品が開発されている。その美白化粧品の日本国内での市場規模は近年約 2,000 億円を越える値で推移しており、そこからその需要の高さが伺える。そのシミやそばかすの産生にはメラニンが深く関係している。

メラニンは、動物、植物、細菌および真菌などに見られる天然の色素であり、不均一なポリフェノール様の複雑な構造の生体高分子である。そのメラニンは、黄色から黒色まで様々な色を呈する物質であり⁹⁻¹³⁾、メラニンの色素沈着の程度や分布など様々な要因により¹¹⁻¹⁴⁾、ヒトなど哺乳類の皮膚および毛髪の色を決定している。このメラニンは皮膚や毛髪で産生されており¹⁵⁻¹⁶⁾、UV などの吸収や活性酸素種消去を行うことにより、肌や毛髪をそれら刺激から守っている。しかし、UV へ長時間暴露されることなどによるメラニンの過剰産生は、肝斑、そばかす、黒皮症のような皮膚障害を引き起こす原因ともなっている¹⁷⁻²⁰⁾。メラニンは、表皮の基底層に分布しているメラノサイトから分泌されており、メラノサイトは UV²¹⁾、Pro-opiomelanocortin (POMC)由来の α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) および他の神経ペプチド^{15, 22-24)}ならびに theophylline などのホスホジエステラーゼ阻害剤を含む様々な因子によって刺激されることが知られている。これら刺激により、様々な機序を介してメラノソームにおいてメラニンが産生される。このメラニンは、L-tyrosine, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) を基質とし、チロシナーゼ, tyrosinase-related protein-1, 2 (TRP-1, TRP-2)^{25, 26)}により触媒され産生される²⁷⁾ (Figure 2)。また、この L-DOPA は DOPAchrome 生成時に DOPAquinone から生成することも確認されている²⁸⁾。

産生されたメラニンを含む成熟メラノソームは、モータータンパク質である Kinesin により微小管に沿って細胞辺縁部へと輸送される^{29, 30)}。続いて、メラノソームは細胞辺縁部に張り巡らされたアクチン繊維に受け渡され、Rab27a と MyosinVa を含む複合体により、アクチン繊維に沿ってメラノサイト樹状突起先端部へと輸送される^{29, 31)}。その後、細胞外へ

放出されたメラノソームは、ファゴサイトーシスによりケラチノサイトに取り込まれ、皮膚全体へと分布されることになる³²⁾。

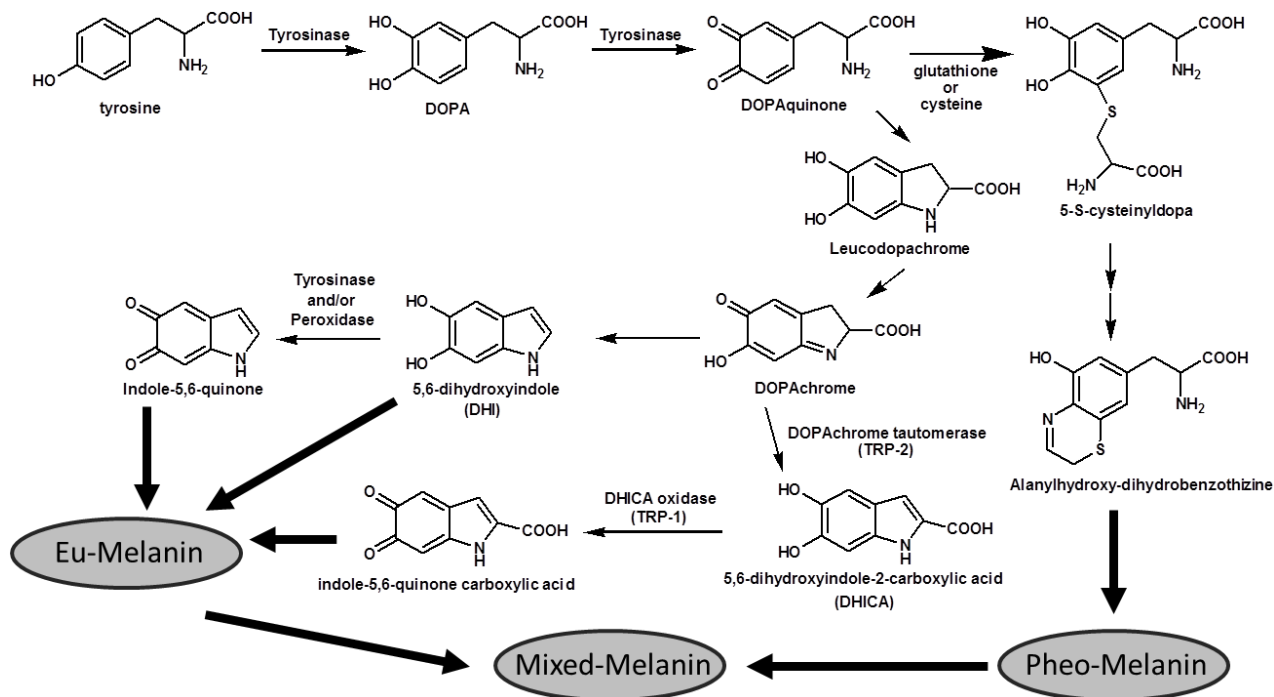


Figure 2. The melanogenic pathway.

そこで、本研究では、エンジオール部の酸素原子上にグリセリル基および様々な炭素鎖長を有するアルキルグリセリル AsA の合成を行い、そのメラニン産制抑制作用について検証を行い、メラニン産生抑制活性の IC_{50} 値とアルキル鎖長において正の相関を有することが確認され、2-O-hexyl-3-O-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (VC-HG) が化粧品素材として有用であることを見出した³³⁾。(第1章)

第1章で合成した化合物のメラニン産生抑制作用のメカニズムを解明するため、チロシナーゼ活性阻害作用に関して検証を行い、合成したいずれの誘導体においてもチロシナーゼ活性阻害作用を示さないことを確認した。また、合成品の中で、特に高いメラニン産制抑制活性を示したアルキルグリセリル AsA について、tyrosinase, TRP-1, TRP-2 の遺伝子発現抑制作用について検証を行ったところ、それら遺伝子発現に影響を及ぼしていることが

認められた³³⁾. さらに, 細胞毒性が低く高いメラニン産生抑制作用を示した VC-HG について, 更なる阻害メカニズムを解明すべく, メラノソーム輸送阻害作用に関しても検証を行い, メラノソーム輸送因子についても mRNA 発現を抑制していることを明らかとした³⁴⁾. (第2章)

メラノサイトにおいてメラノソーム輸送阻害が起こり, メラノサイト内に蓄積されたメラノソームがどのような挙動を示すかについてはこれまで解明されていなかった. そこで, メラノソーム輸送に関わる因子である Myosin Va をノックダウンした B16 melanoma 4A5 細胞を用いて検証を行った結果, theophylline 誘発によるメラニン産生条件下において, メラニン量が有意に減少することが確認された. また, 生体内の分解システムであるオートファジーに着目して検証を行ったところ, メラノソーム輸送阻害により, オートファジーが活性化されることが示唆された³⁵⁾. さらに, 第2章においてメラノソーム輸送阻害が確認された VC-HG において, オートファジー活性化作用を検証したところ, VC-HG にその効果が確認された³⁶⁾. (第3章)

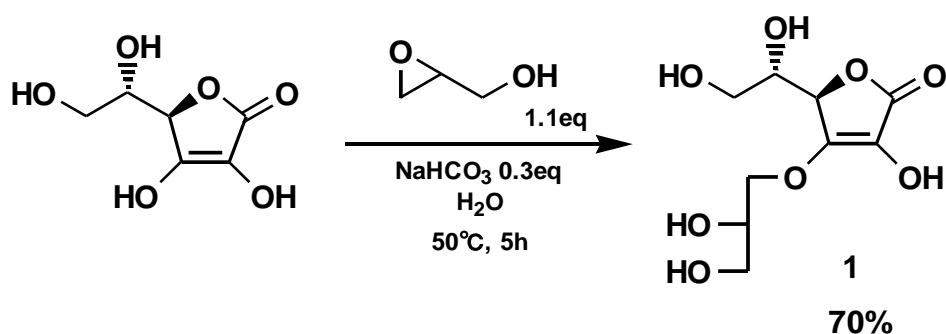
本 論

第一章 アルキルグリセリルアスコルビン酸 (AGA) の合成および評価

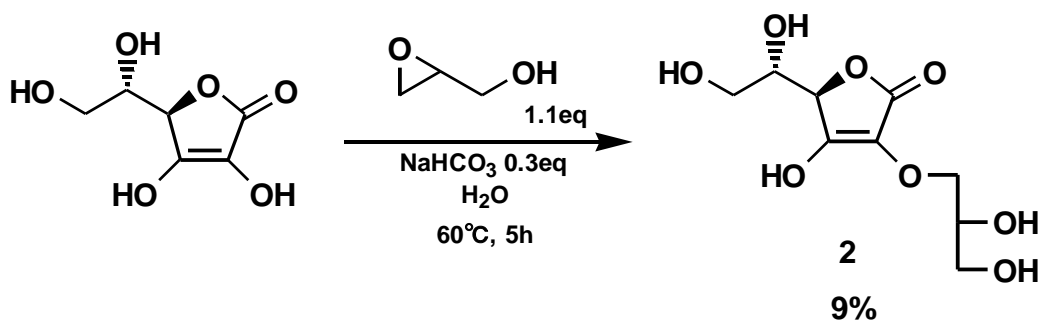
第一節 グリセリルアスコルビン酸の合成

AsA と 2,3-epoxy-1-propanol とを反応させることにより, グリセリルアスコルビン酸 ; 3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**1**) (Scheme 1) および 2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**2**) (Scheme 2) の合成を行った³⁶⁾. 反応条件として, NaHCO₃ を 0.3eq 添加して反応を行うことにより, AsA の 3 位水酸基への反応が進行し, NaHCO₃ を 2.0eq 添加して反応を行うことにより, AsA の 2 位水酸基選択的にアルキル化反応が進行し, 目的化合物を 70% の収率で得た. 各種 NMR スペクトルにより構造を確認した (Figure 3).

上記反応は, 酸性条件下では, 3 位水酸基の解離に伴い AsA 自身の酸が触媒となり反応が進行し, 塩基性条件下では 2 位水酸基に反応が進行したと示唆される. また, この反応は, 溶媒として水を使用しており, 且つ保護や脱保護を伴わない反応工程であるため, 工業的生産を行う際に有利な反応であると考えられる.



Scheme 1. Synthesis of 3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**1**).



Scheme 2. Synthesis of 2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**2**).

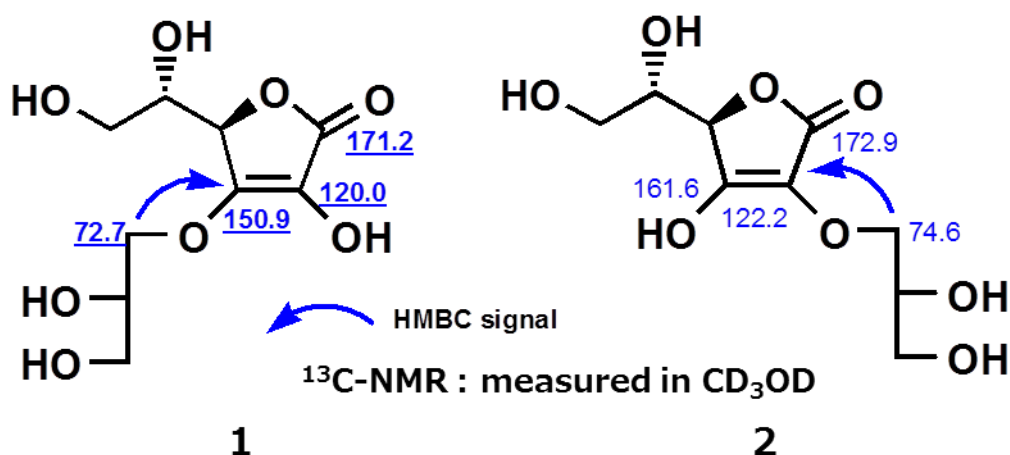
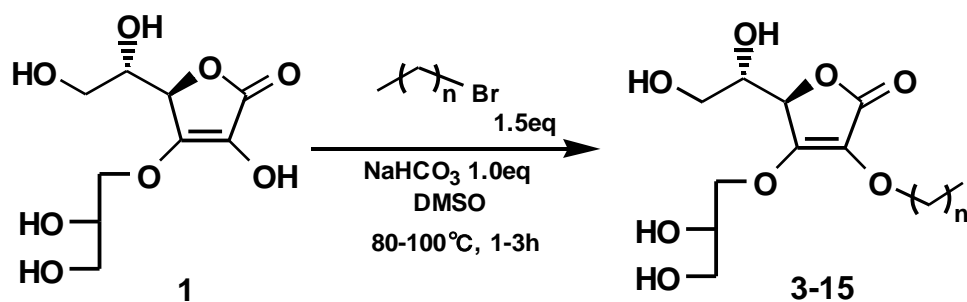


Figure 3. HMBC signal of 3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**1**) and 2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**2**).

第二節 AGA の合成

第一節において得られた **1** を原料として、種々の炭素鎖長の alkyl bromide を使用し反応を行うことで、13 種の 2-*O*-alkyl-3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**3–15**) の合成を行った³⁶⁾ (Scheme 3). 得られた AGA 誘導体の収率を、Table 1 に示す. また、**2** を原料として、同様に alkyl bromide と反応を行い、13 種の 3-*O*-alkyl-2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**16–28**) の合成を行った (Scheme 4). 得られた AGA 誘導体の収率を、Table 2 に示す.

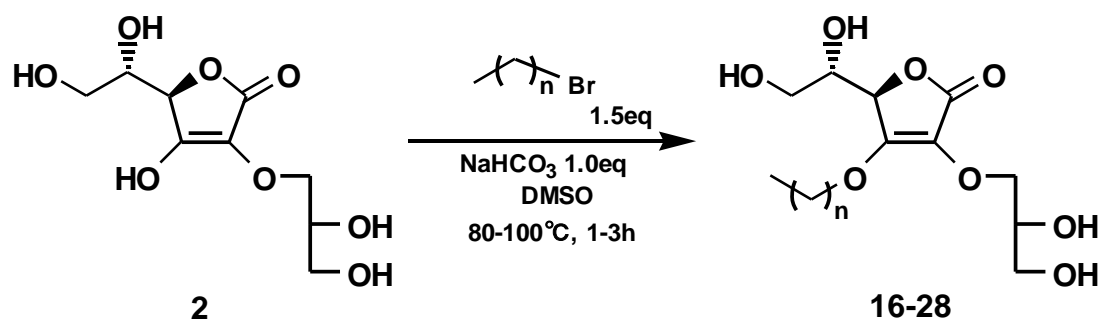


Scheme 3. Synthesis of 2-*O*-alkyl-3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**3-15**).

Table 1. Yield of 2-*O*-alkyl-3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**3-15**).

n	Compound	yield (%) ※
1	3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -ethyl-AsA (3)	28
2	3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -propyl-AsA (4)	43
3	2- <i>O</i> -butyl-3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (5)	33
4	3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -pentyl-AsA (6)	45
5	3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -hexyl-AsA (7)	37
6	3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -heptyl-AsA (8)	41
7	3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -octyl-AsA (9)	51
8	3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -nonyl-AsA (10)	42
9	2- <i>O</i> -decyl-3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (11)	39
10	3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -undecyl-AsA (12)	40
11	3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -dodecyl-AsA (13)	55
12	3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -tridecyl-AsA (14)	35
13	3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -tetradecyl-AsA (15)	45

※ : Yield is not optimized.



Scheme 4. Synthesis of 3-*O*-alkyl-2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**16-28**).

Table 2. Yield of 3-*O*-alkyl-2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**16-28**).

n	Compound	yield (%)
1	2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -ethyl-AsA (16)	31
2	2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -propyl-AsA (17)	50
3	3- <i>O</i> -butyl-2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (18)	53
4	2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -pentyl-AsA (19)	50
5	2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -hexyl-AsA (20)	38
6	2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -heptyl-AsA (21)	58
7	2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -octyl-AsA (22)	70
8	2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -nonyl-AsA (23)	79
9	3- <i>O</i> -decyl-2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (24)	48
10	2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -undecyl-AsA (25)	6
11	2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -dodecyl-AsA (26)	43
12	2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -tridecyl-AsA (27)	13
13	3- <i>O</i> -tetradecyl-2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (28)	47

※ : Yield is not optimized.

第三節 AGA のメラニン産生抑制作用

前述のように, AsA や AsA 誘導体は美白効果を求めて化粧品に配合されており, 今回合成した AGA 誘導体は, アルキル鎖が結合することで疎水性が高くなっており, メラニン産生抑制作用の増強が期待された. そこで, B16 melanoma 4A5 細胞を用いて, theophylline 誘発におけるメラニン産生抑制作用に関して検証を行った. その結果を Table 3 に示す.

Table 3. Inhibitory effects of alkylglyceryl AsA (**1-28**) and commercially available AsA derivatives on theophylline-stimulated melanogenesis and viability of B16 melanoma 4A5 cells.

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	100 μ M	300 μ M	1000 μ M	3000 μ M	
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (1)	0.0 \pm 4.1 (100.0 \pm 6.4)	-11.8 \pm 1.9 (100.0 \pm 1.0)	-10.7 \pm 1.1 (96.8 \pm 2.3)	-5.0 \pm 2.9 (100.4 \pm 0.4)	0.5 \pm 2.5 (107.9 \pm 1.0)	>3000
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (2)	0.0 \pm 4.4 (100.0 \pm 8.5)	-9.7 \pm 1.2 (101.2 \pm 2.2)	-4.8 \pm 1.0 (102.0 \pm 3.6)	-2.3 \pm 1.7 (101.6 \pm 3.2)	-6.1 \pm 2.7 (106.7 \pm 1.8)	>3000
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -ethyl-AsA (3)	0.0 \pm 5.9 (100.0 \pm 3.3)	-28.1 \pm 3.2 (101.3 \pm 3.3)	-2.8 \pm 3.6 (99.7 \pm 1.8)	-8.9 \pm 2.0 (101.3 \pm 1.5)	40.4 \pm 8.6** (103.8 \pm 4.1)	>3000
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -propyl-AsA (4)	0.0 \pm 9.2 (100.0 \pm 1.3)	-2.1 \pm 5.3 (101.6 \pm 1.9)	8.2 \pm 3.2 (98.2 \pm 1.7)	2.5 \pm 7.9 (94.5 \pm 2.0)	35.9 \pm 3.4 * (95.0 \pm 1.5)	>3000
2- <i>O</i> -butyl-3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (5)	0.0 \pm 6.0 (100.0 \pm 2.1)	-1.2 \pm 0.8 (94.5 \pm 2.3)	20.8 \pm 10.6 (97.4 \pm 0.8)	30.2 \pm 5.1 ** (93.9 \pm 0.8)	58.9 \pm 2.7 ** (88.7 \pm 1.1)	2220
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -pentyl-AsA (6)	0.0 \pm 11.4 (100.0 \pm 2.1)	-14.0 \pm 9.7 (118.1 \pm 2.9)	29.8 \pm 8.1 (107.3 \pm 2.3)	45.9 \pm 1.2 ** (105.1 \pm 1.2)	81.9 \pm 3.3 ** (78.7 \pm 1.1 #)	931
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -ethyl-AsA (16)	0.0 \pm 3.0 (100.0 \pm 6.2)	-4.2 \pm 2.3 (104.9 \pm 1.4)	-5.4 \pm 1.5 (95.9 \pm 1.2)	12.1 \pm 2.2 ** (95.9 \pm 3.1)	42.0 \pm 1.4 ** (84.0 \pm 1.1)	>3000
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -propyl-AsA (17)	0.0 \pm 7.4 (100.0 \pm 4.3)	-5.9 \pm 3.3 (98.4 \pm 4.7)	-3.9 \pm 4.1 (95.6 \pm 3.5)	1.3 \pm 4.2 (92.0 \pm 2.3)	23.2 \pm 5.6 ** (82.9 \pm 2.3)	>3000
3- <i>O</i> -butyl-2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (18)	0.0 \pm 2.7 (100.0 \pm 1.0)	0.2 \pm 4.4 (99.8 \pm 1.1)	36.3 \pm 2.8 ** (89.1 \pm 1.6)	68.0 \pm 2.1 ** (78.1 \pm 0.5 #)	84.1 \pm 1.4 ** (70.6 \pm 1.0 #)	473
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -pentyl-AsA (19)	0.0 \pm 5.2 (100.0 \pm 0.4)	14.0 \pm 4.4 * (86.7 \pm 1.5)	53.0 \pm 1.1 ** (73.4 \pm 0.7 #)	83.1 \pm 1.4 ** (54.7 \pm 0.8 #)	97.1 \pm 0.9 ** (22.5 \pm 0.5 #)	283
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -hexyl-AsA (20)	0.0 \pm 2.9 (100.0 \pm 1.0)	43.5 \pm 2.6 ** (95.3 \pm 0.6)	77.0 \pm 2.1 ** (83.9 \pm 0.4)	94.9 \pm 1.5 ** (60.8 \pm 0.6 #)	80.9 \pm 4.1 ** (44.7 \pm 1.9 #)	117
AsA	0.0 \pm 1.7 (100.0 \pm 2.2)	—	—	-17.4 \pm 4.0 (103.8 \pm 0.8)	3.8 \pm 4.7 (89.2 \pm 0.8)	>3000
magnesium L-ascorbyl-2-phosphate	0.0 \pm 5.5 (100.0 \pm 0.5)	—	—	2.1 \pm 4.1 (125.6 \pm 3.6)	14.5 \pm 1.3 * (92.8 \pm 3.0)	>3000
2- <i>O</i> - α -D-glucopyranosyl-AsA	0.0 \pm 3.0 (100.0 \pm 4.3)	—	—	-8.9 \pm 2.7 (106.8 \pm 2.2)	15.0 \pm 3.5 * (108.4 \pm 5.4)	>3000
erythrobinic acid	0.0 \pm 6.7 (100.0 \pm 5.7)	-22.9 \pm 6.5 (98.7 \pm 4.3)	-10.6 \pm 4.8 (94.8 \pm 3.6)	75.8 \pm 4.2 ** (44.5 \pm 2.0 #)	92.6 \pm 15.3 ** (29.8 \pm 2.2 #)	—
arbutin	0.0 \pm 10.0 (100.0 \pm 3.7)	32.2 \pm 3.4 ** (92.2 \pm 0.6)	22.3 \pm 4.3 ** (96.0 \pm 2.0)	63.0 \pm 2.3 ** (96.2 \pm 2.7)	94.0 \pm 2.8 ** (105.8 \pm 2.9)	830

Table 3. Cont.

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 2- <i>O</i> -hexyl-AsA (7)	0.0 \pm 5.7 (100.0 \pm 6.0)	-1.8 \pm 4.9 (102.1 \pm 4.9 [#])	5.6 \pm 2.0 (96.1 \pm 4.9)	26.2 \pm 6.0 ** (88.4 \pm 6.6)	53.1 \pm 3.1 ** (77.1 \pm 5.8 [#])	81.4
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 2- <i>O</i> -heptyl-AsA (8)	0.0 \pm 9.5 (100.0 \pm 0.7)	-4.2 \pm 6.3 (100.6 \pm 3.0)	3.4 \pm 5.2 (95.4 \pm 3.6)	20.0 \pm 6.4 * (91.9 \pm 4.7)	52.2 \pm 5.0 ** (79.7 \pm 2.9 [#])	89.1
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 2- <i>O</i> -octyl-AsA (9)	0.0 \pm 8.3 (100.0 \pm 5.1)	5.7 \pm 6.9 (108.4 \pm 6.2)	10.6 \pm 4.6 * (102.8 \pm 4.8)	22.4 \pm 4.4 ** (92.5 \pm 4.6)	64.1 \pm 8.2 ** (80.0 \pm 4.4)	68.8
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 2- <i>O</i> -nonyl-AsA (10)	0.0 \pm 5.9 (100.0 \pm 2.3)	0.2 \pm 4.4 (99.2 \pm 0.5)	19.1 \pm 1.3 ** (88.9 \pm 4.2)	51.9 \pm 4.6 ** (77.6 \pm 3.6 [#])	91.6 \pm 1.2 ** (58.4 \pm 2.3 [#])	28.8
2- <i>O</i> -decyl-3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxy- propyl)-AsA (11)	0.0 \pm 6.7 (100.0 \pm 4.3)	3.7 \pm 7.8 (98.6 \pm 4.3)	39.2 \pm 4.1 ** (85.9 \pm 2.3)	78.1 \pm 4.8 ** (73.5 \pm 5.8 [#])	98.0 \pm 3.7 ** (27.9 \pm 2.8 [#])	13.0
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 2- <i>O</i> -undecyl-AsA (12)	0.0 \pm 2.9 (100.0 \pm 4.8)	12.4 \pm 3.0 ** (106.2 \pm 2.5)	35.4 \pm 2.8 ** (90.8 \pm 7.1)	89.3 \pm 1.5 ** (69.0 \pm 1.9 [#])	100.3 \pm 4.7 ** (25.8 \pm 1.9 [#])	15.1
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 2- <i>O</i> -dodecyl-AsA (13)	0.0 \pm 5.3 (100.0 \pm 7.3)	20.4 \pm 10.2 * (112.1 \pm 5.8)	50.0 \pm 5.7 ** (103.8 \pm 1.2)	96.0 \pm 2.9 ** (73.3 \pm 2.1 [#])	97.9 \pm 4.2 ** (24.6 \pm 3.4 [#])	10.6
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 2- <i>O</i> -tridecyl-AsA (14)	0.0 \pm 5.2 (100.0 \pm 2.7)	0.1 \pm 8.6 (96.3 \pm 3.5)	46.0 \pm 7.9 ** (87.2 \pm 1.8)	97.1 \pm 2.3 ** (63.7 \pm 1.1 [#])	107.8 \pm 9.1 ** (23.5 \pm 2.1 [#])	11.3
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 2- <i>O</i> -tetradecyl-AsA (15)	0.0 \pm 7.1 (100.0 \pm 2.3)	6.3 \pm 2.6 (101.2 \pm 1.8)	48.4 \pm 2.2 ** (89.1 \pm 4.5)	97.6 \pm 1.8 ** (56.3 \pm 3.2 [#])	100.0 \pm 18.2 ** (21.0 \pm 2.4 [#])	11.1
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 3- <i>O</i> -heptyl-AsA (21)	0.0 \pm 2.8 (100.0 \pm 7.1)	-6.3 \pm 2.7 * (97.9 \pm 0.9)	0.9 \pm 8.2 (92.7 \pm 3.7)	21.0 \pm 5.0 ** (92.7 \pm 4.2)	44.6 \pm 6.2 ** (86.3 \pm 2.7)	>100
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 3- <i>O</i> -octyl-AsA (22)	0.0 \pm 8.8 (100.0 \pm 2.0)	-10.4 \pm 6.0 (98.8 \pm 3.4)	1.0 \pm 7.0 (99.3 \pm 5.2)	2.3 \pm 5.9 (91.6 \pm 4.0)	34.8 \pm 8.2 ** (83.0 \pm 4.9)	>100
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 3- <i>O</i> -nonyl-AsA (23)	0.0 \pm 14.8 (100.0 \pm 2.4)	-1.3 \pm 9.4 (96.6 \pm 5.5)	-2.6 \pm 8.0 (90.6 \pm 2.2)	14.9 \pm 5.6 (81.2 \pm 4.7)	77.1 \pm 2.4 ** (60.7 \pm 3.2 [#])	72.9
3- <i>O</i> -decyl-2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxy- propyl)-AsA (24)	0.0 \pm 5.0 (100.0 \pm 3.2)	-5.8 \pm 6.0 (92.5 \pm 5.7)	20.9 \pm 5.4 ** (87.1 \pm 1.6)	64.3 \pm 3.8 ** (68.5 \pm 2.6 [#])	102.7 \pm 2.4 ** (34.3 \pm 1.5 [#])	23.5
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 3- <i>O</i> -undecyl-AsA (25)	0.0 \pm 2.0 (100.0 \pm 4.8)	-5.1 \pm 2.3 * (101.0 \pm 2.9)	26.6 \pm 3.0 ** (85.8 \pm 3.5)	85.0 \pm 3.8 ** (53.6 \pm 2.7 [#])	100.8 \pm 10.1 ** (24.0 \pm 0.5 [#])	18.1
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 3- <i>O</i> -dodecyl-AsA (26)	0.0 \pm 7.9 (100.0 \pm 7.2)	14.1 \pm 8.5 * (99.8 \pm 4.2)	46.0 \pm 3.0 ** (87.3 \pm 2.8)	96.2 \pm 2.8 ** (45.5 \pm 1.1 [#])	89.6 \pm 24.4 ** (24.3 \pm 12.7 [#])	12.1
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 3- <i>O</i> -tridecyl-AsA (27)	0.0 \pm 8.4 (100.0 \pm 5.5)	20.1 \pm 5.7 ** (104.9 \pm 4.1)	44.2 \pm 3.9 ** (84.3 \pm 2.8)	96.6 \pm 3.0 ** (40.2 \pm 2.5 [#])	112.9 \pm 10.1 ** (21.0 \pm 1.5 [#])	11.7
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)- 3- <i>O</i> -tetradecyl-AsA (28)	0.0 \pm 7.6 (100.0 \pm 1.3)	32.8 \pm 7.2 ** (85.1 \pm 4.6)	75.7 \pm 3.9 ** (62.6 \pm 1.6 [#])	95.9 \pm 8.4 ** (23.0 \pm 2.1 [#])	95.2 \pm 20.7 ** (18.1 \pm 1.9 [#])	5.0
hydroquinone	0.0 \pm 4.4 (100.0 \pm 1.6)	37.4 \pm 3.7 ** (94.1 \pm 1.7)	59.5 \pm 3.7 ** (85.2 \pm 1.4)	76.3 \pm 2.1 ** (64.3 \pm 0.8 [#])	—	8.7

Each value represents the mean \pm S.D. (n = 4); asterisks denote significant differences from the control group, * p < 0.05, ** p < 0.01; # cytotoxic effects were observed, and values in parentheses indicate cell viability (%). —: not measured.

Table 3 に示すように、医薬部外品の有効成分として認可され、既に市場で使用されている magnesium L-ascorbyl-2-phosphate や 2-*O*- α -D-glucopyranosyl-AsA において³⁷⁾、3000 μ M の濃度で優位にメラニン産生を抑制することが確認された。しかし、それら AsA 誘導体は高

いメラニン産生抑制作用を有する *arbutin* よりも低い活性($IC_{50} = 830 \mu M$)^{37, 38)}であった。AsA の 2 位水酸基にアルキル鎖が結合した、一連の 2-*O*-alkyl-3-*O*-glyceryl-AsA 誘導体 (3-15) において、炭素数 6-14 のアルキル鎖長を有する誘導体 (7-13) で、高いメラニン産生抑制活性を示した ($IC_{50} = 11.1-89.1 \mu M$)。また、AsA の 3 位水酸基にアルキル鎖が結合した、3-*O*-alkyl-2-*O*-glyceryl-AsA 誘導体 (16-28) において、炭素数 4-14 のアルキル鎖長を有する誘導体 18-28 で、高いメラニン産生抑制活性を示した ($IC_{50} = 5.0-473 \mu M$)。これらメラニン産生抑制活性の IC_{50} 値とアルキル鎖長についてプロットすると、アルキル鎖長と $1/IC_{50}$ において正の相関を示すことが確認され、つまりは、アルキル鎖長の増加とともにメラニン産生抑制活性が増加することが確認された (Figure 4)。一方で、アルキル鎖長の増加に伴い、細胞毒性が増加していることも確認された。これら誘導体の中でも、2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-tetradecyl-AsA (28, $IC_{50} = 5.0 \mu M$) は、有効濃度領域において、顕著な細胞毒性を伴わずに、最も高いメラニン産生抑制活性を示した。この活性は、非常に高いメラニン産生抑制活性を示す *hydroquinone* ($IC_{50} = 8.7 \mu M$) と同程度の活性であり、*arbutin* ($IC_{50} = 830 \mu M$) の約 170 倍の活性を示した。一方で、化粧品に使用することを考慮すると、活性のみならず高い安全性を有していることが重要であり、3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-hexyl-AsA (7, $IC_{50} = 81.4 \mu M$) や 2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-hexyl-AsA (20, $IC_{50} = 117 \mu M$) のヘキシル基を有する誘導体は、細胞毒性が低く適度な活性を有することから、化粧品原料素材として優れるものであると示唆された。Figure 5 に、それら誘導体のメラニン産生の様相について示す。また、化粧品原料素材として優れることが示唆された 7 に関して、正常メラノサイトにおいても、メラニン産生抑制活性を検証したところ、コントロールと比較して、有意にメラニン産生を抑制していることが確認された (Figure 6)。

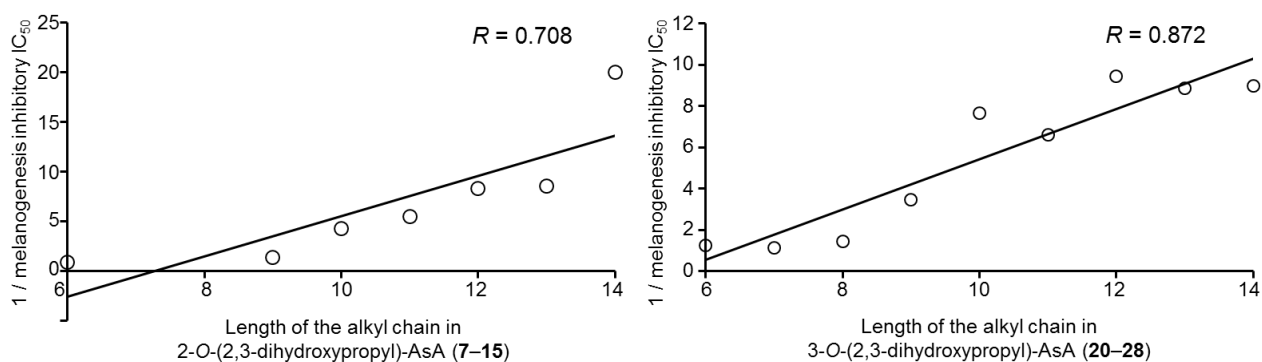


Figure 4. Correlation between melanogenesis inhibitory activity [$1/IC_{50}$ values (μM)] and length of the alkyl chain in 2-O-alkyl-3-O-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA compounds (**7–15**) and 3-O-alkyl-2-O-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA compounds (**20–28**).

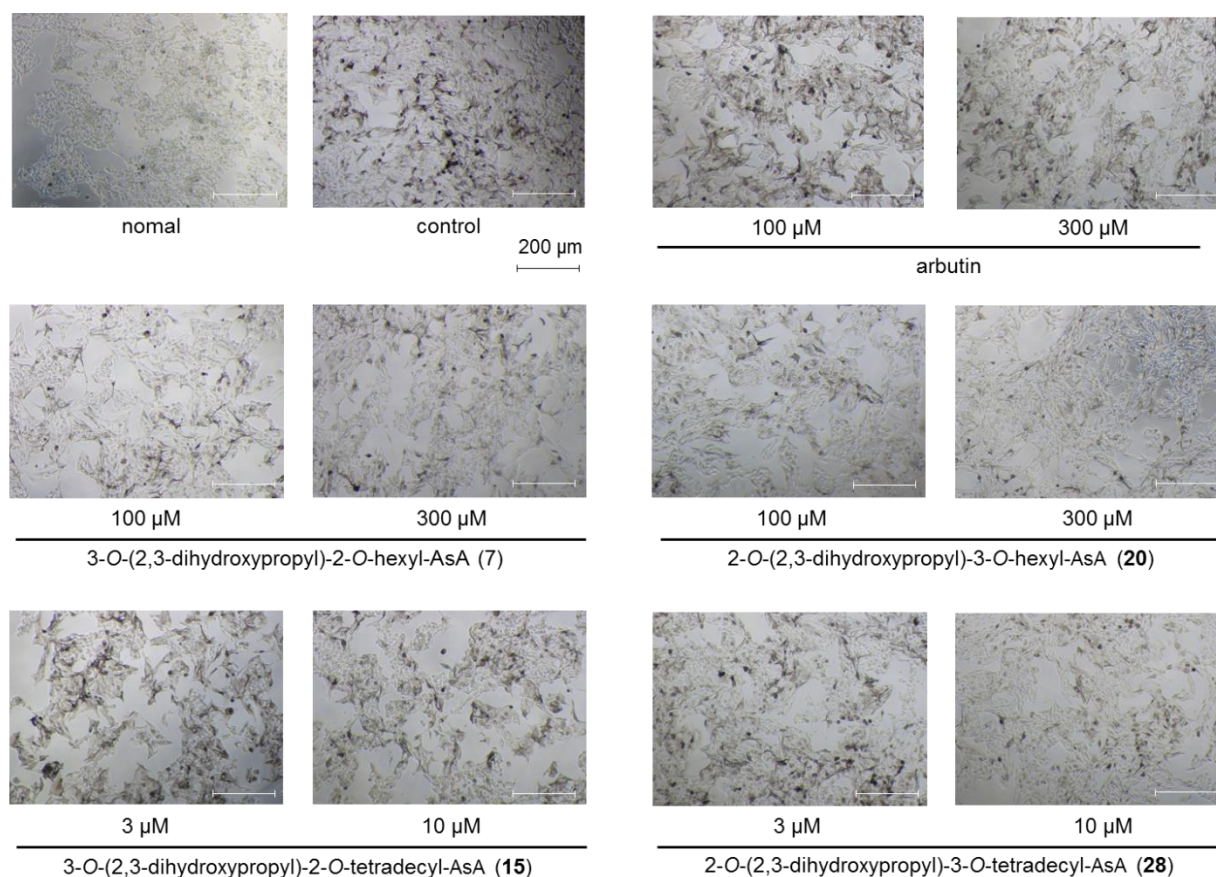


Figure 5. Theophylline-stimulated B16 melanoma 4A5 cells. 72 h after treatment with **7** (100 μM , 300 μM), **20** (100 μM , 300 μM), **15** (3 μM , 10 μM), or **28** (3 μM , 10 μM). The images are representative of several experiments. normal: theophylline(-), control: theophylline(+)

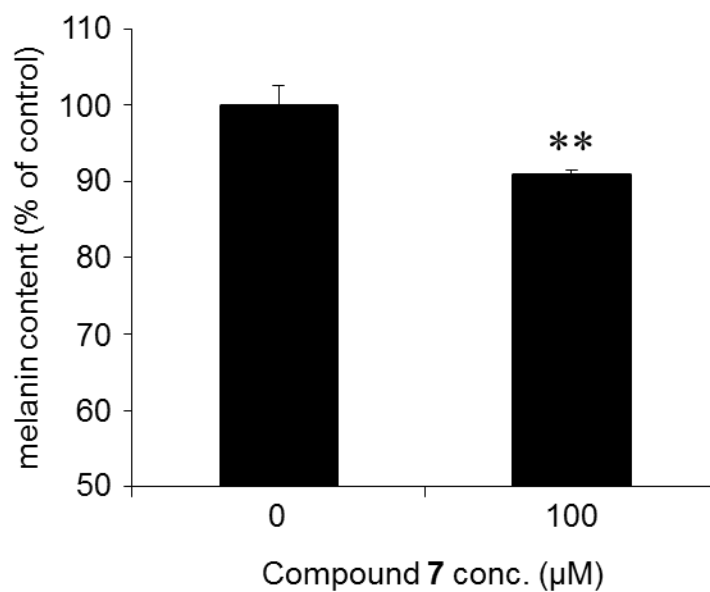


Figure 6. Inhibitory effect of 3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-hexyl-AsA (**7**) on melanogenesis by normal melanocytes.

Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 3$); asterisks denote significant differences from the control group, ** $p < 0.01$.

第四節 グリセリル-ヘキシル-AsA の安定性

アスコルビン酸は水溶液中では不安定な化合物であり、様々な化粧品に配合することは困難であった。そこで、上述のメラニン産生抑制活性において、化粧品原料素材として優れることが示唆された化合物 **7** および **20** の安定性について検証を行った。それぞれの化合物 20 mg/mL 水溶液を調製し、125 °C 下にて保管し有効成分量について、HPLC にて測定を行った。その結果、アスコルビン酸は経時的に残存率が低下することが確認され、3 時間後には 9 % の残存率となったが、**7** および **20** においては残存率が共に 80 % 以上 (**7**; 85 %, **20**; 82 %) と高い残存率を示し、安定性に優れていることが示唆された (Figure 7)。

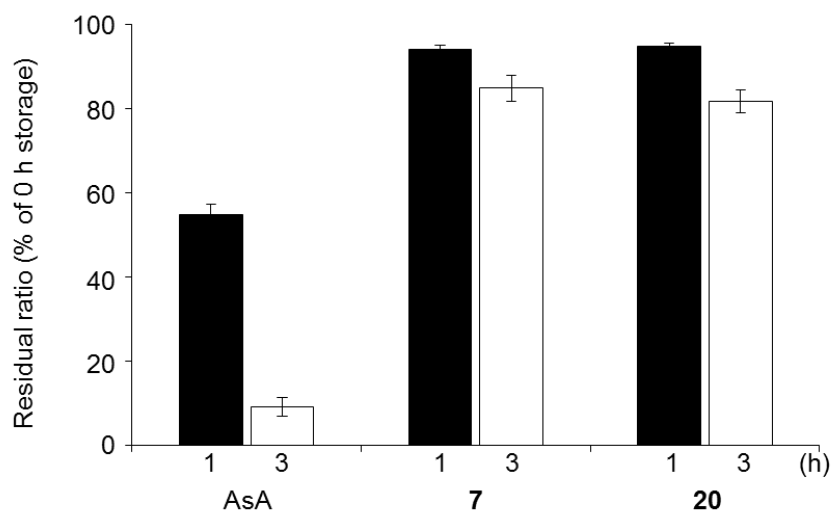


Figure 7. Residual ratio of **7**, **20**, and AsA in aqueous solution (20 mg/mL at 125°C in the dark) after 1 h (black bars) and 3 h (white bars).

Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 3$)

第二章 AGA のメラニン産生抑制作用機序

第一節 チロシナーゼ活性阻害抑制作用

前述の通り、AsA や AsA 誘導体の多くはチロシナーゼ活性阻害作用を機序として、メラニン産生を抑制している。そこで、第一章で合成しメラニン産生抑制作用が確認された AGA 誘導体 (7-15, 20-28) に関して、マッシュルームチロシナーゼを用いたチロシナーゼ活性阻害試験を行った、その結果を Table 4 に示す。また、化粧品原料素材として優れると示唆された化合物 3-O-(2,3-dihydroxypropyl)-2-O-hexyl-AsA (7) について、B16 melanoma 4A5 細胞より粗酵素として抽出したチロシナーゼを用いて、チロシナーゼ活性阻害試験を行った (Figure 8)。

美白を目的として化粧品にも使用されているコウジ酸^{39, 40)}において、L-Tyrosine および L-DOPA いずれを基質として用いた場合においても、有意にチロシナーゼ活性を阻害することが確認された (L-Tyrosine; $IC_{50} = 43.6 \mu M$, L-DOPA; $IC_{50} = 89.1 \mu M$)。一方、AGA 誘導体は、L-Tyrosine および L-DOPA いずれを基質に用いた場合においても、チロシナーゼ活性阻害は認められなかった。また、B16 melanoma 4A5 細胞より抽出した粗酵素を用いた酵素阻害試験においても活性を示さなかった。これらのことから、AGA 誘導体は AsA や既存の AsA 誘導体の作用機序であるチロシナーゼ活性阻害とは異なる作用機序により、メラニン産生を抑制していることが示唆された。

Table 4. Effects on activity of tyrosinase from mushroom.

Treatment	Inhibition (%)					
	Substrate: L-Tyrosine			Substrate: L-DOPA		
	0 μ M	30 μ M	100 μ M	0 μ M	30 μ M	100 μ M
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -hexyl-AsA (7)	0.0 \pm 0.4	-1.5 \pm 6.7	0.9 \pm 1.4	0.0 \pm 6.3	-1.5 \pm 1.5	-1.0 \pm 0.7
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -heptyl-AsA (8)	0.0 \pm 0.4	-1.7 \pm 4.0	1.0 \pm 2.4	0.0 \pm 6.3	-0.7 \pm 3.1	1.1 \pm 4.8
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -octyl-AsA (9)	0.0 \pm 0.4	-0.3 \pm 2.3	-0.6 \pm 4.3	0.0 \pm 2.4	2.4 \pm 1.1	2.3 \pm 2.7
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -nonyl-AsA (10)	0.0 \pm 0.4	4.0 \pm 6.1	-1.2 \pm 4.5	0.0 \pm 2.4	4.8 \pm 6.6	0.9 \pm 6.0
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -hexyl-AsA (20)	0.0 \pm 10.7	1.4 \pm 4.7	-6.1 \pm 0.6	0.0 \pm 8.7	-5.7 \pm 5.1	-2.4 \pm 4.2
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -heptyl-AsA (21)	0.0 \pm 10.7	-9.2 \pm 2.1	-9.8 \pm 3.9	0.0 \pm 8.7	-10.0 \pm 1.7	-11.3 \pm 2.4
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -octyl-AsA (22)	0.0 \pm 10.7	-11.5 \pm 1.6	-14.4 \pm 1.8	0.0 \pm 11.2	-13.1 \pm 3.3	-4.5 \pm 2.0
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -nonyl-AsA (23)	0.0 \pm 7.0	-5.0 \pm 3.1	-2.6 \pm 2.4	0.0 \pm 2.2	-4.1 \pm 2.2	-1.5 \pm 2.2
	0 μ M	10 μ M	30 μ M	0 μ M	10 μ M	30 μ M
2- <i>O</i> -decyl-3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (11)	0.0 \pm 0.4	1.3 \pm 3.1	0.4 \pm 1.7	0.0 \pm 2.4	0.4 \pm 1.1	2.4 \pm 2.9
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -undecyl-AsA (12)	0.0 \pm 0.4	2.9 \pm 3.9	1.0 \pm 2.5	0.0 \pm 3.2	-4.6 \pm 1.4	-5.1 \pm 2.2
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -dodecyl-AsA (13)	0.0 \pm 6.7	-0.7 \pm 4.5	-7.1 \pm 1.4	0.0 \pm 3.2	-3.1 \pm 3.3	-4.6 \pm 2.2
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -tridecyl-AsA (14)	0.0 \pm 6.7	-4.7 \pm 2.9	-7.1 \pm 1.7	0.0 \pm 3.2	-4.7 \pm 5.0	-4.4 \pm 1.8
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -tetradecyl-AsA (15)	0.0 \pm 6.7	-7.0 \pm 6.7	-9.7 \pm 2.7	0.0 \pm 13.8	-8.9 \pm 3.5	-8.2 \pm 4.3
3- <i>O</i> -decyl-2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (24)	0.0 \pm 7.0	-4.1 \pm 5.3	-3.1 \pm 4.1	0.0 \pm 4.2	0.7 \pm 3.8	-5.3 \pm 4.2
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -undecyl-AsA (25)	0.0 \pm 7.0	-8.0 \pm 0.6	-8.7 \pm 1.5	0.0 \pm 4.2	-10.2 \pm 2.3	-10.7 \pm 3.8
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -dodecyl-AsA (26)	0.0 \pm 7.0	-2.2 \pm 6.4	-0.5 \pm 4.3	0.0 \pm 3.0	-6.4 \pm 3.1	-6.6 \pm 8.7
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -tridecyl-AsA (27)	0.0 \pm 7.0	-3.3 \pm 8.1	-5.4 \pm 1.9	0.0 \pm 3.0	-2.0 \pm 3.3	-3.2 \pm 2.7
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -tetradecyl-AsA (28)	0.0 \pm 7.0	-4.4 \pm 4.6	-8.4 \pm 1.0	0.0 \pm 3.0	-5.7 \pm 9.5	-8.1 \pm 5.2
Substrate: L-Tyrosine	Inhibition (%)					
Treatment	0 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M	IC ₅₀ (μ M)
kojic acid ⁴¹⁻⁴⁷⁾	0.0 \pm 2.4	12.2 \pm 3.3	46.4 \pm 2.6 **	66.5 \pm 2.1 **	96.8 \pm 0.9 **	43.6
Substrate: L-DOPA	Inhibition (%)					
Treatment	0 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M	IC ₅₀ (μ M)
kojic acid ⁴¹⁻⁴⁷⁾	0.0 \pm 0.9	22.3 \pm 2.1**	50.6 \pm 0.6 **	78.2 \pm 0.7 **	89.3 \pm 0.3 **	29.6

Each value represents the mean \pm S.D. (n = 4); asterisks denote significant differences from the control group, ** p < 0.01. AsA: L-ascorbic acid.

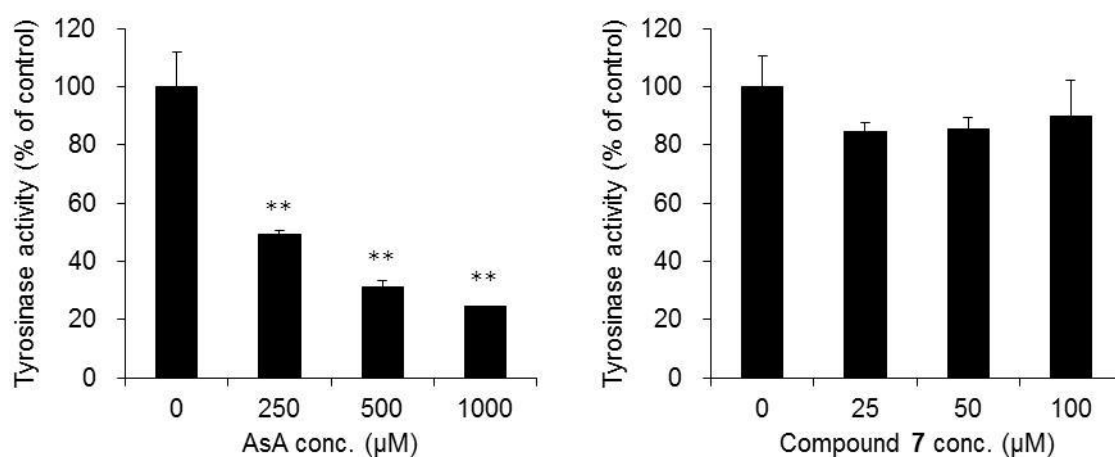


Figure 8. Effects of 3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-hexyl-AsA (**7**) on the activity of mammalian tyrosinase. Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 3$); asterisks denote significant differences from the control group, ** $p < 0.01$.

第二節 チロシナーゼおよびチロシナーゼ関連遺伝子への影響

チロシナーゼおよび tyrosinase related protein-1,2 (TRP-1, TRP-2) はメラニンの生合成において、主要な段階を触媒している³⁴⁾。AGA 誘導体のメラニン産生抑制の作用機序解明のため、B16 melanoma 4A5 細胞におけるこれら酵素の mRNA 発現に対する、**7**, **15**, **20** および **28** の影響について検証を行った (Table 5)。

Table 5. Effects of **7**, **15**, **20**, and **28** on expression of tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 mRNA in B16 melanoma 4A5 cells.

Treatment	Tyrosinase mRNA/ β -actin mRNA		
	0 μ M	30 μ M	100 μ M
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -hexyl-AsA (7)	1.00 \pm 0.05	0.60 \pm 0.07 **	0.42 \pm 0.03 **
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -hexyl-AsA (20)	1.00 \pm 0.22	0.72 \pm 0.10	0.59 \pm 0.07 *
Treatment	TRP-1 mRNA/ β -actin mRNA		
	0 μ M	30 μ M	100 μ M
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -hexyl-AsA (7)	1.00 \pm 0.21	0.48 \pm 0.15 *	0.37 \pm 0.05 **
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -hexyl-AsA (20)	1.00 \pm 0.21	0.67 \pm 0.12	0.50 \pm 0.15 *
Treatment	TRP-2 mRNA/ β -actin mRNA		
	0 μ M	30 μ M	100 μ M
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -hexyl-AsA (7)	1.00 \pm 0.32	0.53 \pm 0.18	0.70 \pm 0.06
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -hexyl-AsA (20)	1.00 \pm 0.10	1.07 \pm 0.30	0.88 \pm 0.25
Treatment	Tyrosinase mRNA/ β -actin mRNA		
	0 μ M	3 μ M	10 μ M
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -tetradecyl-L-ascorbic acid (15)	1.00 \pm 0.12	0.78 \pm 0.10	0.58 \pm 0.09 **
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -tetradecyl-L-ascorbic acid (28)	1.00 \pm 0.12	0.54 \pm 0.03 **	0.29 \pm 0.08 **
Treatment	TRP-1 mRNA/ β -actin mRNA		
	0 μ M	3 μ M	10 μ M
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -tetradecyl-L-ascorbic acid (15)	1.00 \pm 0.24	1.02 \pm 0.27	0.92 \pm 0.22
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -tetradecyl-L-ascorbic acid (28)	1.00 \pm 0.24	0.88 \pm 0.20	0.83 \pm 0.27
Treatment	TRP-2 mRNA/ β -actin mRNA		
	0 μ M	3 μ M	10 μ M
3- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-2- <i>O</i> -tetradecyl-L-ascorbic acid (15)	1.00 \pm 0.11	0.58 \pm 0.06 **	0.50 \pm 0.08 **
2- <i>O</i> -(2,3-dihydroxypropyl)-3- <i>O</i> -tetradecyl-L-ascorbic acid (28)	1.00 \pm 0.11	0.43 \pm 0.11 **	0.35 \pm 0.05 **

Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 3$); asterisks denote significant differences from the control group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. AsA: L-ascorbic acid.

また、これら化合物に関して、チロシナーゼタンパク質の発現に対する影響について検証を行った⁴⁸⁾ (Figure 9). さらに、培養細胞中におけるチロシナーゼ活性についても検証を行った (Figure 10).

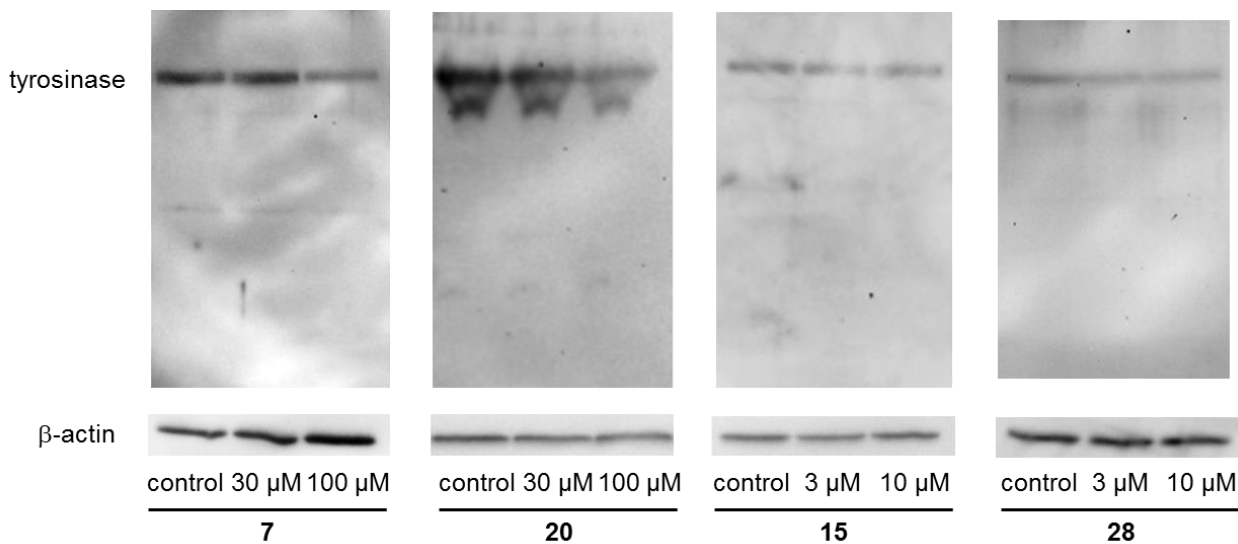


Figure 9. Effects of **7**, **15**, **20** and **28** on the expression of tyrosinase protein in B16 melanoma 4A5 cells.

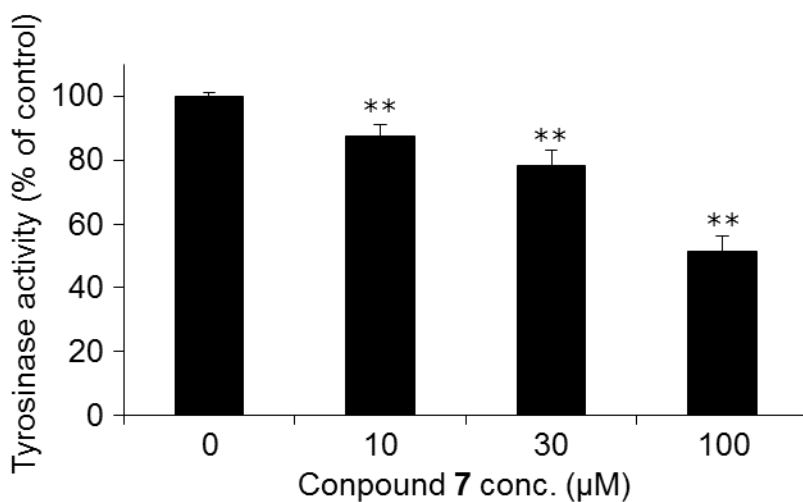


Figure 10. Effects of 3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-hexyl-AsA (**7**) on tyrosinase activity in cultured cells.

Each value represents the mean \pm S.D ($n = 3$); asterisks denote significant differences from the control group, ** $p < 0.01$.

Table 5 に示すように、試験を行ったいずれの AGA 誘導体においてもチロシナーゼ mRNA 発現を抑制することが確認され、Figure 9 に示すように、チロシナーゼタンパク質の発現を抑制していることが確認された。また、7 および 20 については 100 μ M の濃度で TRP-1 の発現を有意に抑制し、14 および 28 については TRP-2 の発現を有意に抑制することが確認された。さらに、化合物 7 は、基質として L-DOPA を使用した際に、培養細胞におけるチロシナーゼ活性を低下させた。これは、培養細胞におけるチロシナーゼ活性が、チロシナーゼの発現の抑制によって低下していることを示唆している。

以上の結果より、これら AGA 誘導体のメラニン産生抑制作用は、AsA や既存の AsA 誘導体のようなチロシナーゼ活性阻害によるものではなく、酵素の発現を抑制することにより、メラニンの産生が抑制されていることが示唆された。

第三節 VC-HG によるメラノソーム輸送阻害

第二節にて、3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-hexyl-AsA (7) (以下、VC-HG と省略) において、チロシナーゼや TRP に関与することでメラニン産生を抑制していることが確認され、化粧品原料として優れることが示唆された。しかしながら、メラニン産生を完全には抑制していないものと考えられる。そこで、メラニンが産生された後の挙動についても検討を行った。メラノソーム輸送因子である、MyosinVa, Rab27a, Kinesin の mRNA 発現に関して検証を行った (Figure 11)。

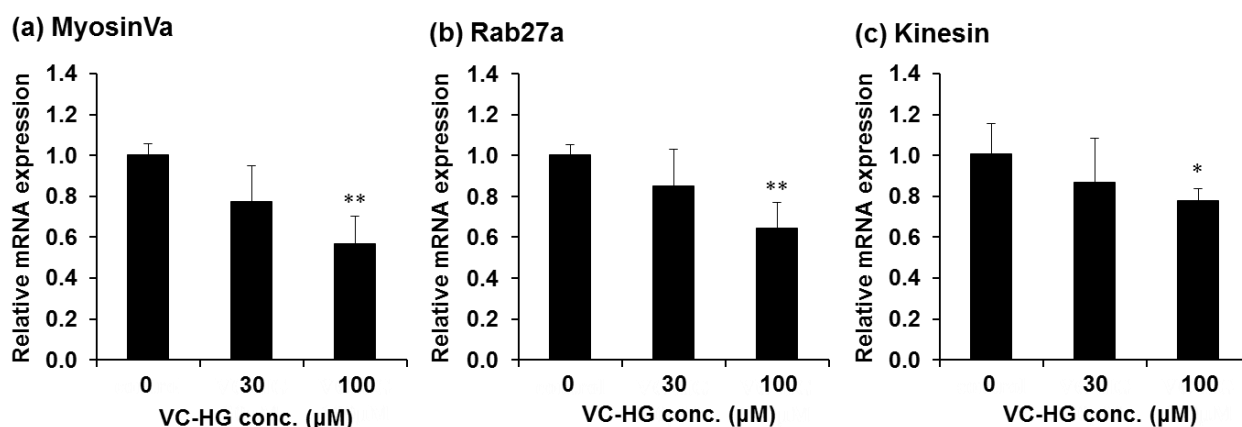


Figure 11. mRNA expression levels of melanogenesis-related genes following treatment with or without VC-HG.

Bars indicate means \pm SD (n = 4). *P < 0.05, **P < 0.01 indicates a significant difference against 0 μ mol/L VC-HG

上記 Figure 11 に示したように、VC-HG を添加することで、メラノソーム輸送に関連する mRNA 発現が抑制されていることが確認された。このことから、VC-HG はメラノソーム内で産生されたメラニンをメラノサイトの樹状突起に輸送することを阻害していることが示唆された。

そこで、上記に関して、B16 melanoma 4A5 細胞を用いて、VC-HG 添加時におけるメラニン産生抑制作用の様相についてタイムラプス顕微鏡下での観察を行い、メラノソームの挙動について観察を行った (Figure 12).

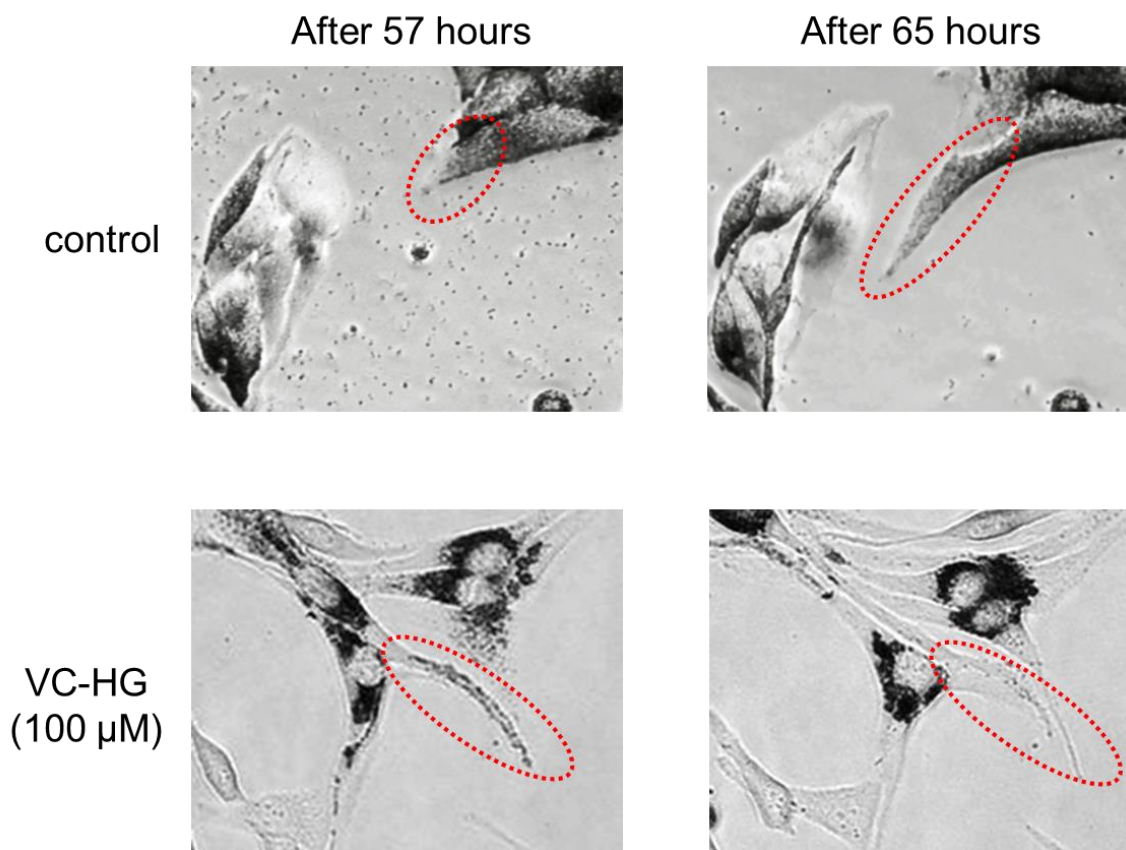


Figure 12. Melanosome transport inhibition by VC-HG treatment.

Figure 12 で示したように、メラノソームの輸送が阻害されていることが確認され、一部樹状突起先端に移ったメラノソームについても、逆行輸送によりメラノサイト核周辺に集まることが確認された。

第三章 VC-HG のオートファジー活性化作用

第一節 メラノソーム輸送阻害によるオートファジー活性化

前章で述べたように、VC-HG がメラノソーム輸送阻害作用を有していることが確認された。しかしながら、メラノソーム輸送阻害によりメラノサイト内に蓄積されたメラノソームがどのような挙動を示すかについては、これまで明らかにされていなかった。そこで、まず初めに、MyosinVa のノックダウンが細胞にどのような影響を及ぼすかを調べるために、MyosinVa をノックダウンした B16 melanoma 4A5 細胞 (M-KD cells) にて、theophylline 誘発におけるメラニン含量の測定を行った。メラノソームの輸送を阻害することで、細胞内でメラノソームの蓄積が起こり、細胞内メラニン含量の増加が起きることが予想されたが、cAMP シグナル伝達を介したメラニンの活性化因子である theophylline 誘発における試験において、M-KD cells では、細胞内のメラニン量が有意に減少することが確認された (Figure 13).

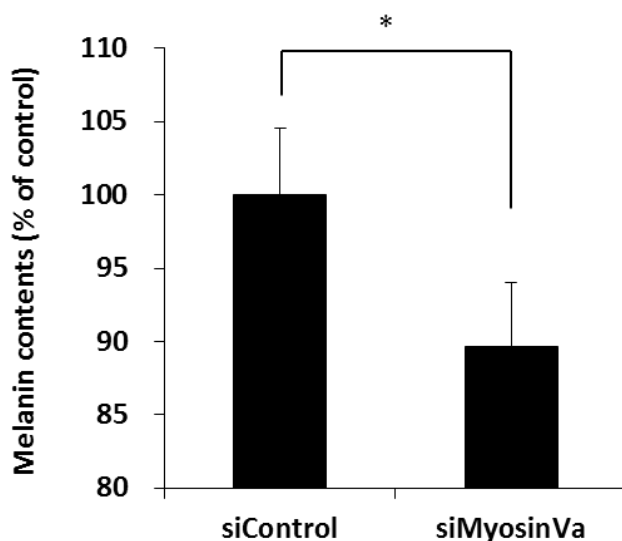


Figure 13. Influence of MyosinVa knockdown on intracellular melanin content.

また、細胞内メラノソーム輸送阻害が生じた際のチロシナーゼに対する影響を確認するため、M-KD cellsにおけるチロシナーゼタンパク質の発現に関して検証を行った。その結果、MyosinVaをノックダウンしたM-KD cellsでは、チロシナーゼタンパク質の発現の低下が確認された (Figure 14)。これはtheophylline存在下でのチロシナーゼmRNA発現の抑制の結果と一致するものであった (Figure 15, a)。一方、theophylline非存在下で培養したM-KD cellsでは、チロシナーゼmRNAの発現レベルに変化を示さなかった (Figure 15, b)。

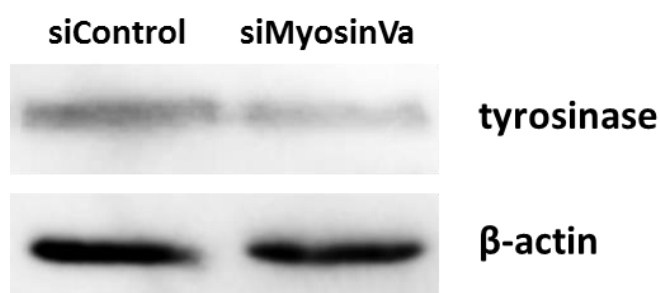
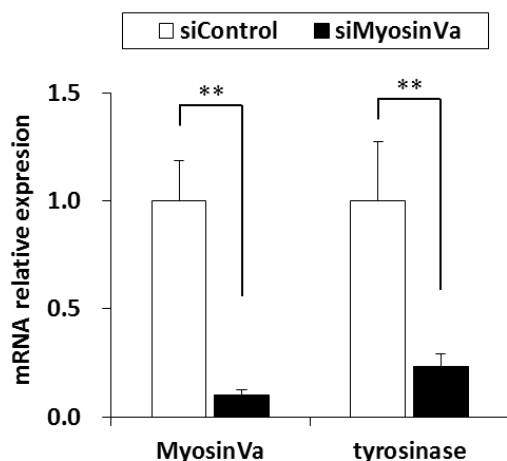


Figure 14. Tyrosinase protein expression following knockdown of MyosinVa.

(a) Theophylline-stimulated condition



(b) Non-stimulated condition (steady state)

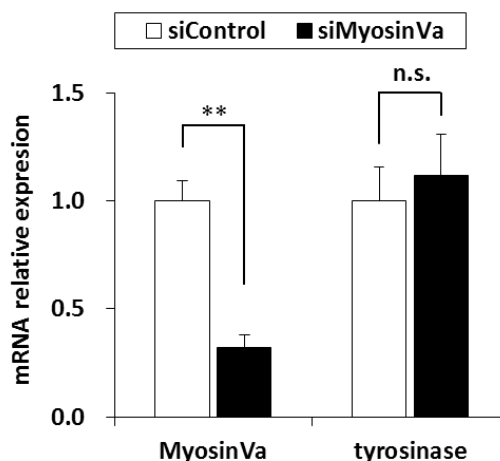


Figure 15. Influence of MyosinVa knockdown on mRNA expression level of tyrosinase. Bars indicate means \pm S.D. (n = 3). **p < 0.01 indicate a significant difference between groups. n. s. indicates not significant.

上記得られた結果より、細胞内メラノソーム輸送阻害によって、メラニンが蓄積されたメラノソームの分解が誘導されている可能性が示唆された。また、オートファジーシステムにより、機能していないオルガネラが分解されることが報告されている^{49, 50)}。これらのことから、theophylline で処理した M-KD cells においてメラニン含量が減少する機序解明のため、オートファジー関連因子に対する MyosinVa ノックダウンの影響を調べた。オートファゴゾームの構成要素である Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) -II⁵¹⁾について検証を行ったところ、M-KD cells において発現の上昇が確認され、オートファジーの選択的基質である p62⁵¹⁾については発現が低下していることが確認された (Figure 16)。また、免疫染色においても、コントロールと比較して M-KD cells の方が、より強い LC3 発現レベルを示した。さらに、その細胞内局在がメラノソーム構造タンパクである Pmel17 と共局在していることが確認された (Figure 17)。これらの結果から、MyosinVa ノックダウンにより、細胞内の核周辺領域に蓄積するメラノソームは、オートファジーによって分解されることが示唆された。

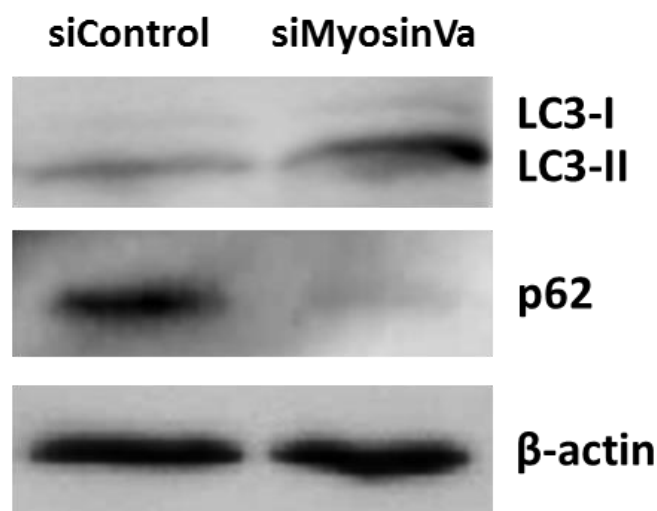


Figure 16. Influence on the expression of autophagy-related proteins in M-KD cells.

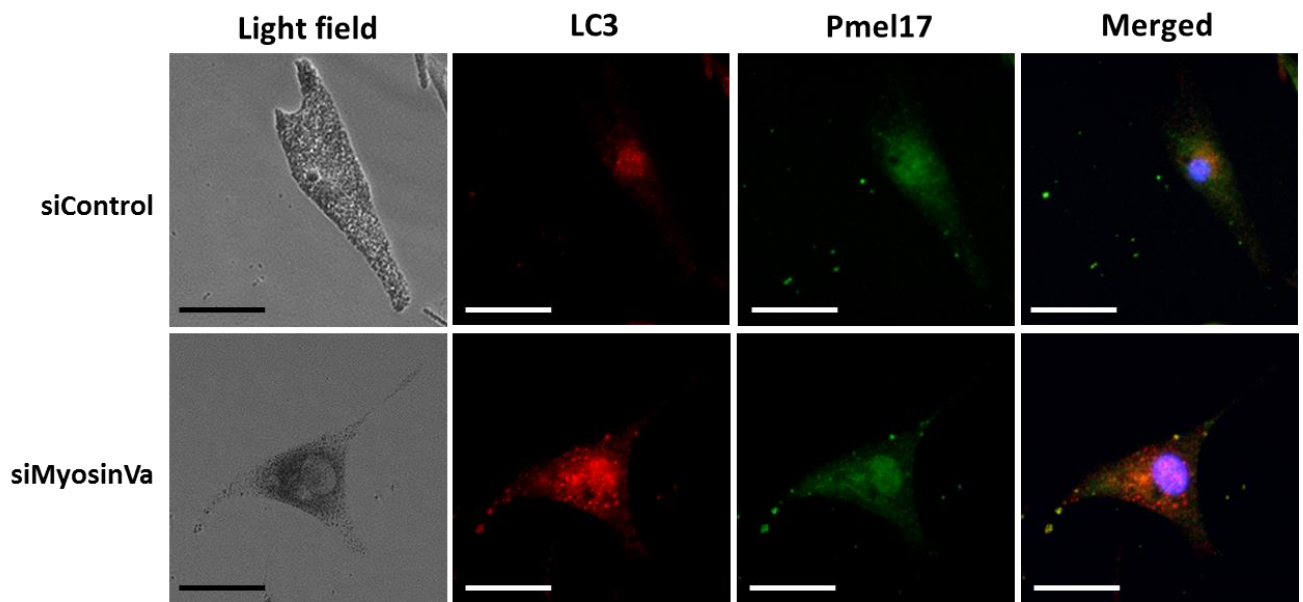


Figure 17. Localization of LC3 and Pmel17 proteins in M-KD cells using immunofluorescence analysis. Bar scales: 25 μ m.

第二節 VC-HG によるオートファジー活性化作用

前節で述べたように、メラニンの輸送を阻害することで、オートファジーの活性化が起きていることが確認された。そこで、メラニンの輸送阻害が確認されたVC-HGについて、オートファジー活性化に対する有効性に関して検証を行った。theophylline存在下にて、VC-HGを処理したB16 melanoma 4A5細胞では、濃度依存的なLC3-IIの増加およびp62の減少を示した (Figure 18)。また、免疫染色においてVC-HGを処理した細胞は、コントロールと比べ高いLC3発現レベルを示し (Figure 19), その細胞内局在がPmel17と共局在していることが確認された。

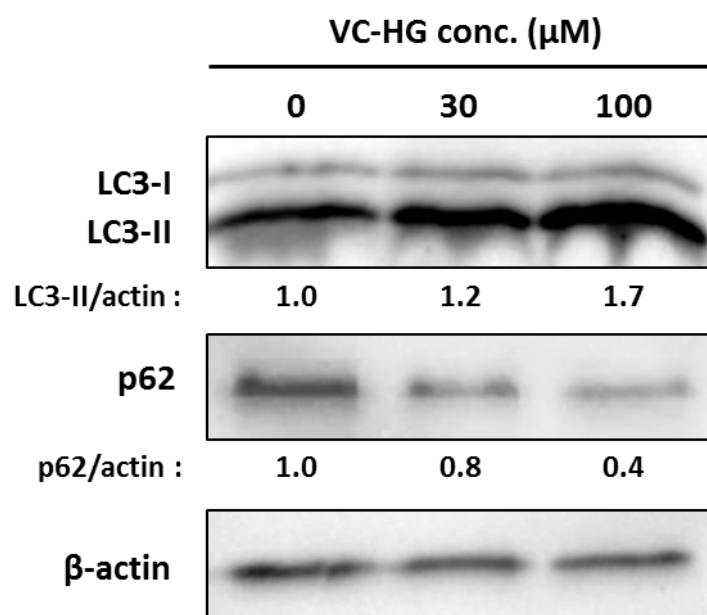


Figure 18. Effect of autophagy activation by VC-HG in B16 melanoma 4A5 cells.

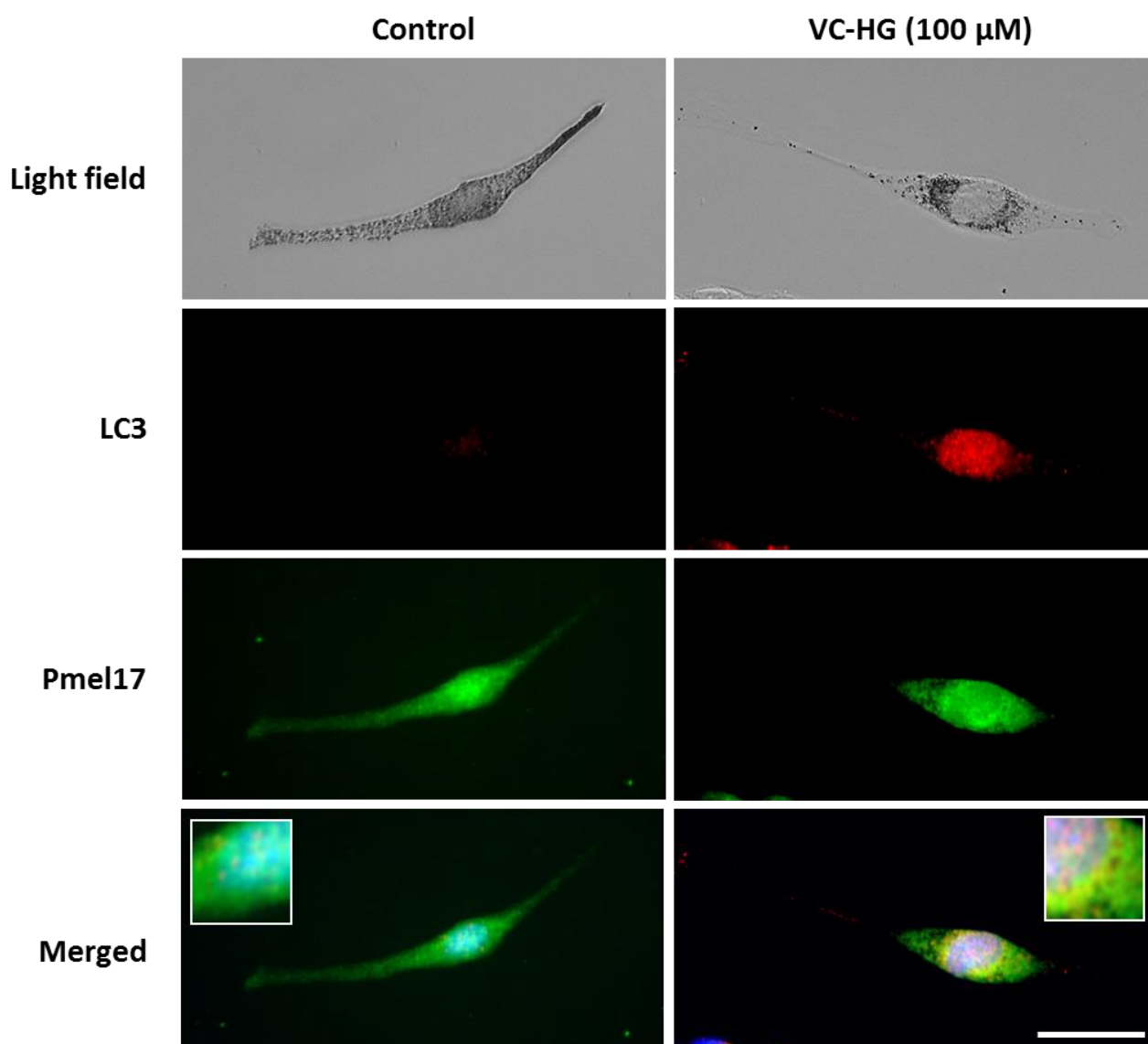


Figure 19. Localization of LC3 and Pmel17 proteins in B16 melanoma 4A5 cells treated with VC-HG using immunofluorescence analysis. Bar scales: 50 μ m.

オートファジーを活性化することによりメラニン量の減少が起こるか否かを検証するため、オートファジーを活性化するrapamycinをB16 melanoma 4A5細胞に処理することで検証を行った^{53, 54}。rapamycinで細胞を処理することで、濃度依存的にメラニン量が優位に減少することが確認された (Figure 20, a)。

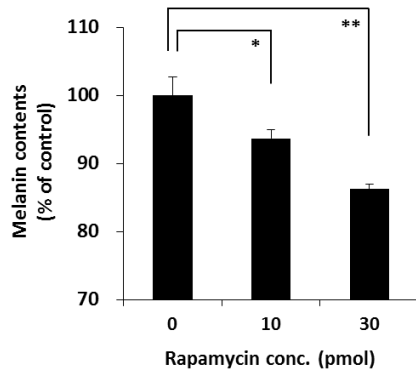
VC-HGによるメラニン含量の減少とオートファジー活性化との関連を評価するため、オートファジー阻害剤であるHydroxychloroquine Sulfate (HCQ) またはpepstain AをVC-HG添

加時に同時に添加し、メラニン産生量を測定した。VC-HGのみを添加した場合、メラニン産生量の有意な減少が確認された。一方で、VC-HGとHCQ またはpepstain Aを同時に添加したB16 melanoma 4A5細胞においては、VC-HGによるメラニン産生量の低下が抑制された。これらの結果より、VC-HGはオートファジーを活性化することで、B16 melanoma 4A5細胞におけるメラニン産生を抑制している可能性が示唆された (Figure 20, b, c)。

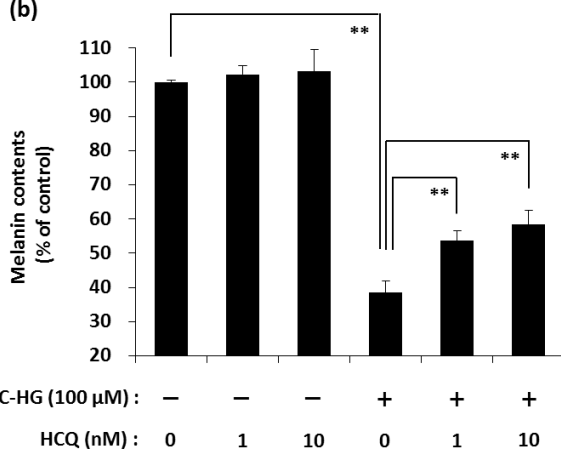
これら結果において、VC-HGのメラニン量低下とrapamycinによるメラニン量低下を比較すると、rapamycinによるメラニン量の有意な低下は起こるものの、その作用はVC-HGよりも低いことから、オートファジーのみが細胞内メラニン含量の調節に関与しているわけではないことが示唆される。これらの現象は、VC-HGのメラニン産生抑制機序が、チロシナーゼやTRP-1の発現低下、メラノソームの輸送阻害であることとも合致すると考えられる。

以上のことより、VC-HG は、オートファジーを活性化しメラニン産生を抑制することにより、皮膚の色素沈着を抑制する有効なアプローチであると結論する。

(a)



(b)



(c)

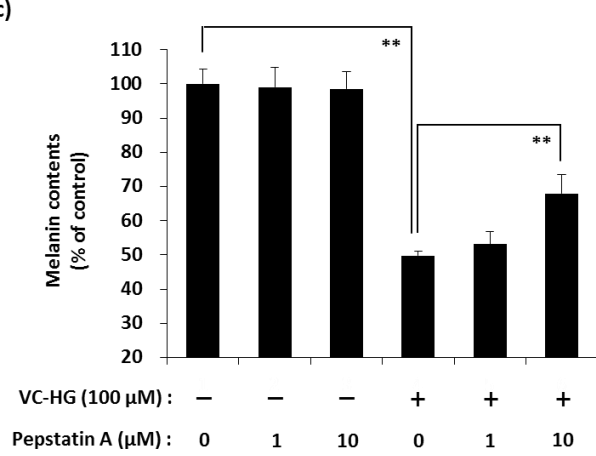


Figure 20. Influence of autophagy activation by VC-HG on melanogenesis. Bars indicate means±S.D. (n = 3). * p<0.05, ** p<0.01 indicate a significant difference between groups.

結 論

アスコルビン酸 (AsA) の新規誘導体であるアルキルグリセリルアスコルビン酸 (AGA) 誘導体の合成および生理活性評価を行い、以下の知見を得た。

- 1) AsA と 2,3-epoxy-1-propanol を用いて、酸性条件下または塩基性条件下にて反応を行うことにより、3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**1**) および 2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**2**) を得た。
- 2) 3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**1**) または 2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**2**) を原料とし、各種 alkylbromide と反応させることで、13 種の 2-*O*-alkyl-3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**3**–**15**) および 13 種の 3-*O*-alkyl-2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**16**–**28**) を得た。
- 3) AGA 誘導体について、メラニン産生抑制活性を評価し、アルキル鎖長の増加とともにメラニン産生抑制活性が増加することを確認し、3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-tetradecyl-AsA (**15**) および 2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-tetradecyl-AsA (**28**) が高いメラニン産生抑制活性を有すること、3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-hexyl-AsA (**7**; VC-HG) が化粧品原料素材として有用な化合物であることを見出した。
- 4) AGA 誘導体について、AsA のメラニン産生抑制の作用機序であるチロシナーゼ活性評価を行い、いずれの AGA 誘導体においてもチロシナーゼ活性阻害作用は認められず、通常の AsA やその誘導体とは異なる作用機序でメラニン産生を抑制していることを確認した。
- 5) **14**, **20**, **28** および VC-HG について、メラニン産生抑制作用機序について検証を行い、4 種の AGA 誘導体についてチロシナーゼの発現を抑制することでメラニン産生を抑制してい

ることが確認された。さらに、**20** および **VC-HG** について、**TRP-1** の発現阻害、**14, 28** については **TRP-2** の発現を阻害することでメラニン産生抑制効果を示すことが確認された。

6) **VC-HG** について、**MyosinVa, Rab27a** および **Kinesin** の mRNA 発現を抑制することにより、メラノソーム内で産生されたメラニンのメラノサイト樹状突起への輸送を阻害していることを確認した。

7) メラニンの輸送阻害とオートファジーの関係について検証を行い、**MyosinVa** をノックダウンした **B16 melanoma 4A5** 細胞にて、**LC3-II** の発現が上昇し、**p62** の発現が低下していることを確認した。

8) **VC-HG** について、オートファジー活性化作用に関して検証を行ったところ、**VC-HG** を処理した **B16 melanoma 4A5** 細胞において、**LC3-II** の発現上昇および **p62** の発現低下が起きていることが確認され、**VC-HG** がメラノサイトにおいてオートファジーを活性化していることを確認した。

実験の部

第一章の実験

融点は, Yanaco New Science Inc の Yanagimoto micromelting point apparatus を用いて測定した。

旋光度は, JASCO Corporation の specific rotations, JASCO P-2200 digital polarimeter を用いて測定した。

紫外吸収スペクトル (UV)は, Shimadzu の UV-1600 spectrometer を用いて測定した。

水素および炭素核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$) スペクトルは, JEOL の JNM-ECA600 (600 MHz), JNM-ECA500 (500 MHz), および JNM-ECS400 (400 MHz) を用いて測定した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は, Shimadzu Prominence を, ポンプは Shimadzu の LC-20AD を, 脱気ユニット (デガッサ) は Shimadzu の DGU-20A₃ を, オートサンプラーは Shimadzu の SIL-20AC を, カラムオーブン は Shimadzu の CTO-20A を, 検出器は Shimadzu の SPD-M20A を, カラムは Imtakt の Cadenza CD-C18 (2.0×15cm, 3 μm) を用いた。

カラムクロマトグラフィーの吸着材は, 関東化学のシリカゲル 60N (球状, 中性, 順相) を用い, 薄層クロマトグラフィー (TLC) には, Merck の silica gel 60F₂₅₄ を使用し, スポットの検出には UV (254nm) および 2% $\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ –5% H_2SO_4 水溶液を噴霧し, 加熱時の呈色により行った。

試薬および試液については, 富士フィルム和光純薬株式会社, 東京化成工業, ナカライテスク株式会社製を使用した。

第一節の実験

グリセリルアスコルビン酸の合成

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**1**)の合成 :

L-ascorbic acid (30.0 g, 0.17 mol)の水溶液に, sodium hydrogen carbonate (4.29 g, 51.1 mmol) を添加攪拌後, 2,3-epoxy-1-propanol (12.6 g, 0.17 mol) を滴下することで加え, 50°Cで5時間攪拌を行った. その後, methanol を加え濾過し, 濾液を減圧下溶媒留去し, 粗生成物 45.7g を得た. 得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [1371g, CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35: 5, v/v)] で分離精製し, 3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**1**, 29.6g, 0.12 mol, 70.6 %) を得た.

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**2**)の合成 :

L-ascorbic acid (10.0 g, 56.8 mmol) の水溶液に, sodium hydrogen carbonate (9.54 g, 114 mmol)を添加攪拌後, 2,3-epoxy-1-propanol (8.41 g, 114 mmol) を滴下することで加え, 60°Cで5時間攪拌を行った. その後, methanol を加え濾過し, 濾液を減圧下溶媒留去し, 粗生成物 19.0g を得た. 得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [570g, CHCl₃-MeOH-H₂O (6: 4: 1, v/v)] で分離精製し, 2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**2**, 1.21g, 4.84 mmol, 8.5 %) を得た.

以下に, 3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**1**)および 2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**2**)の物性データを示す.

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**1**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 15.4$. (*c* 3.70, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 244 (3.32)]; IR (TlBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3275, 1759, 1693, 1335, 1045; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 3.59 (2H, m, H₂-3'), 3.66 (2H, m, H₂-6), 3.89 (1H, m, H-5), 3.92 (1H, m, H-2'), [4.45 (dd, *J* = 6.5, 11.0 Hz)/4.49 (dd, *J* = 6.5, 11.0 Hz), 4.59 (dd, *J* = 3.8, 11.0 Hz)/4.62 (dd, *J* = 3.8,

11.0 Hz), H₂-1'], 4.82 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-4); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD): δ_C 63.4 (t, C-6), 63.7 (t, C-3'), 70.56/70.61 (d, C-5), 71.79/71.89 (d, C-2'), 73.4/73.6 (t, C-1'), 76.9 (d, C-4), 121.17/121.24 (s, C-2), 151.84/151.88 (s, C-3), 173.04/173.07 (s, C-1); HRESIMS m/z : 273.0577 [M + Na]⁺ (calcd for C₉H₁₄O₈Na, 273.0581).

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**2**): Colorless needles, mp.153.0-153.2; [α]_D²⁶ + 55.7 (c 0.31, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 238 (3.89); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹:3326, 2920, 2849, 1759, 1680, 1466, 1329, 1165, 1115, 1034; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 3.61 (2H, m, H₂-3'), 3.67 (2H, m) (2H, m, H₂-6), 3.90 (1H, m, H-2'), 3.92 (1H, dt-like, $J = 1.8, 6.4$ Hz, H₃-5), [4.07 (1H, dd, $J = 4.1, 10.4$ Hz)/4.09 (1H, d, $J = 3.6, 10.4$ Hz), H-1'], 4.86 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-4); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) ; δ_C 63.3 (t, C-6), 63.7 (t, C-3'), 70.4 (d, C-5), 72.0 (d, C-2'), 74.6 (t, C-1'), 76.8 (t, C-4'), 122.2 (s, C-2), 161.6 (s, C-3), 172.9 (s, C-1); HRESIMS m/z : 273.0576 [M + Na]⁺ (calcd for C₉H₁₄O₈Na, 273.0581).

第二節の実験

アルキルグリセリルアスコルビン酸の合成

2-*O*-alkyl-3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**3-15**) の合成 :

2-*O*-alkyl-3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**3-15**) は以下の一般化した方法に従って各種合成を行った ; 3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**1**) の DMSO 溶液に, 各種 alkyl bromide を添加し 100°C で 3 時間攪拌を行った. 反応液を水にあけ EtOAc にて抽出を行った. その後, EtOAc を Brine にて洗浄を行い, MgSO₄ にて乾燥させ減圧下溶媒留去し, 粗生成物を得た. 得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [CHCl₃-MeOH-H₂O (30: 3: 0.3, v/v → 20: 3: 0.3, v/v)] で分離精製し, 2-*O*-alkyl-3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**3-15**) を得た.

3-*O*-alkyl-2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**16-28**) の合成 :

3-*O*-alkyl-2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**16-28**) は以下の一般化した方法に従って各種合成を行った ; 2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**2**) の DMSO 溶液に, 各種 alkyl bromide を添加し 100°C で 3 時間攪拌を行った. 反応液を水にあけ EtOAc にて抽出を行った. その後, EtOAc を Brine にて洗浄を行い, MgSO₄ にて乾燥させ減圧下溶媒留去し, 粗生成物を得た. 得られた粗生成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [CHCl₃-MeOH-H₂O (30: 3: 0.3, v/v → 20: 3: 0.3, v/v)] で分離精製し, 2-*O*-alkyl-3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**16-28**) を得た.

以下に, 上記方法にて合成した各種 AGA 誘導体の物性データを示す.

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-ethyl-AsA (**3**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 37.0$ (*c* 0.32, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 236 (3.91)]; IR (ATR) ν_{\max} cm⁻¹: 3316, 2934, 2889, 1748, 1667, 1321, 1169, 1111, 1026; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 1.31 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, H₃-2''), 3.60 (2H, brd, *J* = 5.5 Hz, H₂-3'), 3.65 (2H, dd-like, *J* = 1.8, 5.5 Hz, H₂-6), 3.90 (2H, m, H-5, 2'), 4.09 (2H, m,

H₂-1''), [4.47/4.48 (1H, dd, $J = 6.4, 10.5$ Hz), 4.59/4.60 (1H, dd, $J = 3.6, 10.5$ Hz), H₂-1'], 4.88 (1H, brs, H-4); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 15.5 (q, C-2''), 63.2 (t, C-6), 63.5 (t, C-3'), 69.1 (t, C-1''), 70.46/70.50 (d, C-5), 71.49/71.55 (d, C-2'), 73.97/74.05 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 123.87/123.91 (s, C-2), 159.53/159.58 (s, C-3), 172.3 (s, C-1); HRESIMS m/z : 301.0883 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₁H₁₈O₈Na, 301.0894).

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-propyl-AsA (**4**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 41.7$ (c 0.33, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 235 (3.94); IR (ATR) ν_{\max} cm⁻¹: 3325, 2940, 2880, 1748, 1669, 1323, 1165, 1113, 1040; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.99 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H₃-3''), 1.72 (2H, m, H₂-2''), 3.60 (2H, brd, $J = 6.0$ Hz, H₂-3'), 3.65 (2H, dd-like, $J = 1.4, 6.4$ Hz, H₂-6), 3.91 (2H, m, H-5, 2'), 3.99 (2H, m, H-1''), [4.47/4.48 (1H, dd, $J = 6.4, 10.5$ Hz), 4.58/4.59 (1H, dd, $J = 4.1, 11.0$ Hz), H₂-1'], 4.87 (1H, brs, H-4); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 10.7 (q, C-3''), 24.0 (t, C-2''), 63.2 (t, C-6), 63.5 (t, C-3'), 69.1 (t, C-1''), 70.49/70.53 (d, C-5), 71.5/71.6 (d, C-2'), 74.0/74.1 (t, C-1'), 75.55/75.58 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 123.24/123.26 (s, C-2), 159.27/159.30 (s, C-3), 172.3 (s, C-1); HRESIMS m/z : 315.1046 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₂H₂₀O₈Na, 315.1050).

2-*O*-butyl-3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**5**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 47.4$ (c 0.34, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 236 (3.93); IR (TlBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3393, 1749, 1674, 1331, 1167, 1117, 1049; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 0.96 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H₃-4''), 1.45 (2H, m, H₂-3''), 1.68 (2H, m, H₂-2''), 3.60 (2H, brd, $J = 5.8$ Hz, H₂-3'), 3.65 (2H, m, H₂-6), 3.90 (1H, m, H-5), 3.91 (1H, m, H-8), 4.03 (1H, m, H-1''), [4.47 (dd, $J = 6.0, 10.6$ Hz)/4.48 (dd, $J = 6.3, 10.7$ Hz), 4.57 (dd, $J = 3.8, 10.7$ Hz)/4.59 (dd, $J = 4.0, 10.6$ Hz), H₂-1'], [4.858 (d, $J = 1.5$ Hz)/4.859 (d, $J = 1.5$ Hz), H-4]; ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ_C 14.1 (q, C-4''), 20.1 (t, C-3''), 32.9 (t, C-2''), 63.2 (t, C-6), 63.56/63.59 (t, C-3'), 70.5/70.6 (d, C-5), 71.5/71.6 (d, C-2'), 73.69/73.72 (d, C-1'), 74.0/74.1 (t, C-1''), 76.7 (d, C-4), 123.28/123.30 (s, C-2), 159.23/159.25 (s, C-3), 172.2 (s, C-1); HRESIMS m/z : 329.1203 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₃H₂₂O₈Na, 329.1207).

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-pentyl-AsA (**6**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 40.9$ (*c* 0.32, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 235 (3.98); IR (ATR) ν_{\max} cm⁻¹: 3304, 2934, 2874, 1750, 1670, 1321, 1165, 1115, 1032; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.93 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H₃-5''), 1.39 (4H, m, H₂-3'', 4''), 1.70 (2H, m, H₂-2''), 3.60 (2H, brd, *J* = 5.5 Hz, H₂-3'), 3.65 (2H, dd-like, *J* = 1.4, 6.4 Hz, H₂-6), 3.91 (2H, m, H-5, 2'), 4.02 (1H, m, H-1''), [4.47/4.48 (1H, dd, *J* = 6.4, 10.6 Hz, *J* = 6.0, 10.6 Hz), 4.58/4.59 (1H, dd, *J* = 4.1, 10.6 Hz, H₂-1'), 4.86 (1H, brs, H-4); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 14.4 (q, C-5''), 23.5 (t, C-4''), 29.1 (t, C-3''), 30.5 (t, C-2''), 63.2 (t, C-6), 63.5/63.6 (t, C-3'), 70.48/70.52 (d, C-5), 71.5/71.6 (d, C-2'), 74.0/74.1 (t, C-1', 1''), 76.7 (d, C-4), 123.2/123.3 (s, C-2), 159.2/159.3 (s, C-3), 172.3 (s, C-1); HRESIMS *m/z*: 343.1357 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₄H₂₄O₈Na, 343.1363).

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-hexyl-AsA (**7**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 42.2$ (*c* 0.32, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 236 (3.90); IR (TlBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3379, 2934, 1751, 1674, 1330, 1167, 1117, 1051; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.91 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, H₃-6''), 1.33 (4H, m, H₂-4'', 5''), 1.41 (2H, m, H₂-3''), 1.70 (2H, m, H₂-2''), 3.60 (2H, brd, *J* = 5.5 Hz, H₂-3'), 3.65 (2H, dd-like, H₂-6), 3.90 (2H, m, H-5, 2'), 4.03 (2H, m, H-1''), [4.47/4.48 (1H, dd, *J* = 6.4, 10.6 Hz/ *J* = 6.0, 10.6 Hz), 4.57/4.59 (1H, dd, *J* = 4.1, 10.7 Hz, H₂-1'), 4.86 (1H, brs, H-4); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 14.4 (q, C-6''), 23.7 (t, C-5''), 26.6 (t, C-3''), 30.7 (t, C-2''), 32.7 (t, C-4''), 63.2 (t, C-6), 63.6 (t, C-3'), 70.5 (d, C-5), 71.5/71.6 (d, C-2'), 74.01/ 74.04/74.09 (t, C-1', 1''), 76.7 (d, C-4), 123.2/123.3 (s, C-2), 159.2/159.3 (s, C-3), 172.3 (s, C-1); HRESIMS *m/z*: 357.1519 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₅H₂₆O₈Na, 357.1520).

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-heptyl-AsA (**8**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 29.8$ (*c* 0.35, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 236 (3.87); IR (TlBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3389, 2932, 2507, 1751, 1674, 1331, 1169, 1119, 1051; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.90 (3H, t, *J* = 6.4 Hz, H₃-7''), 1.34 (6H, m, H₂-4'', 5'', 6''), 1.42 (2H, m, H₂-3''), 1.70 (2H, m, H₂-2''), 3.60 (2H, brd, *J* = 5.5 Hz, H₂-3'), 3.65 (2H,

dd-like, $J = 1.8, 6.4$ Hz, H₂-6), 3.90 (1H, m, H-5, 2'), 4.04 (1H, m, H₂-1''), [4.47 (1H, dd, $J = 6.4, 10.6$ Hz), 4.57/4.59 (dd, $J = 4.1, 10.6$ Hz), H₂-1'], 4.86 (1H, brd, $J = 2.3$ Hz), H-4]; ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 14.4 (q, C-7'), 23.7 (t, C-6'), 26.9/ 30.2/ 30.8/33.0 (t, C-2', 3', 4', 5'), 63.2 (t, C-6), 63.5/63.6 (t, C-3'), 70.49/70.52 (d, C-5), 71.52/71.59 (d, C-2'), 74.0/74.1 (t, C-1', 1''), 76.7 (d, C-4), 123.2/123.3 (s, C-2), 159.2/159.3 (s, C-3), 172.3 (s, C-1); HRESIMS m/z : 371.1673 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₆H₂₈O₈Na, 371.1676).

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-octyl-AsA (**9**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 32.6$ (c 0.32, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 236 (3.91); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹:3368, 2855, 1751, 1676, 1339, 1169, 1115, 1071; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.90 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, H₃-8''), 1.31 (10H, m, H₂-4'', 5'', 6'', 7''), 1.42 (2H, m, H₂-3''), 1.70 (2H, m, H₂-2''), 3.59 (2H, brd, $J = 6.0$ Hz, H₂-3'), 3.65 (2H, dd-like, $J = 1.8, 6.4$ Hz, H₂-6), 3.90 (2H, m, H-5, 2'), 4.03 (1H, m, H₂-1''), [4.47/4.48 (1H, dd, $J = 6.4, 10.6$ Hz), 4.58/4.59 (1H, dd, $J = 4.6, 10.6$ Hz/ $J = 4.1, 10.6$ Hz), H₂-1'], 4.86 (d, $J = 1.8$ Hz, H-4) ; ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 14.5 (q, C-8''), 23.7 (t, C-7''), 27.0/30.4/30.5/30.8/33.0 (t, C-2', 3', 4', 5', 6'), 63.2 (t, C-6), 63.51/63.55 (t, C-3'), 70.49/70.52 (d, C-5), 71.52/71.59 (d, C-2'), 74.02/74.09 (t, C-1', 1''), 76.7 (d, C-4), 123.2/123.3 (s, C-2), 159.26/159.29 (s, C-3), 172.3 (s, C-1); HRESIMS m/z : 385.1829 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₇H₃₀O₈Na, 385.1833).

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-nonyl-AsA (**10**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 33.3$ (c 0.31, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 236 (3.93); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹:3327, 2924, 2853, 1761, 1684, 1333, 1169, 1117, 1046; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.89 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-9''), 1.30 (10H, m, H₂-4'', 5'', 6'', 7'', 8''), 1.42 (2H, m, H₂-3''), 1.70 (2H, m, H₂-2''), 3.60 (2H, brd, $J = 5.5$ Hz, H₂-3'), 3.65 (2H, dd-like, $J = 1.4, 6.4$ Hz, H₂-6), 3.91 (2H, m, H-5, 2'), 4.03 (1H, m, H₂-1'), [4.47/4.48 (1H, dd, $J = 6.4, 10.6$ Hz), 4.58/4.59 (1H, dd, $J = 4.6, 10.6$ Hz, $J = 4.1, 10.6$ Hz), H₂-1'], 4.86 (d, $J = 0.9$ Hz, H-4) ; ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) ; δ_C 14.5 (q, C-9''), 23.7 (t, C-8''), 27.0/30.4/30.5/ 30.7/30.8/33.1 (t, C-2'', 3'', 4'', 5'', 6'', 7''), 63.2 (t, C-6), 63.5/63.6 (t, C-3'), 70.48/70.52 (d, C-5),

71.5/71.6 (d, C-2'), 74.01/74.05/74.09 (t, C-1', 1''), 76.7 (d, C-4), 123.2/123.3 (s, C-2), 159.2/159.3 (s, C-3), 172.3 (s, C-1); HRESIMS m/z : 399.1988 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₈H₃₂O₈Na, 399.1989).

2-*O*-decyl-3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**11**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 31.4$ (*c* 0.30, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 236 (3.88); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3317, 2959, 2922, 2924, 2849, 1759, 1682, 1331, 1165, 1113, 1043; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 0.89 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H₃-10''), 1.30 (12H, brs, H₂-4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9''), 1.41 (2H, m, H₂-3''), 1.69 (2H, m, H₂-2''), 3.60 (2H, brd, $J = 5.6$ Hz, H₂-3'), 3.65 (2H, m, H₂-6), 3.90 (1H, m, H-5), 3.91 (1H, m, H-2'), 4.02 (1H, m, H₂-1''), [4.47 (dd, $J = 6.1, 10.7$ Hz)/4.48 (dd, $J = 6.2, 10.7$ Hz), 4.57 (dd, $J = 3.8, 10.7$ Hz)/4.59 (dd, $J = 3.9, 10.7$ Hz), H₂-1'], [4.860 (d, $J = 1.1$ Hz)/4.862 (d, $J = 1.5$ Hz), H-4]; ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) ; δ_C 14.4 (q, C-10''), 23.7 (t, C-9''), 26.9 (t, C-3''), 30.48 (t, C-2''), 30.44/30.48/30.7/30.8 (t, C-4'', 5'', 6'', 7''), 33.1 (t, C-8''), 63.2 (t, C-6), 63.5/63.6 (t, C-3'), 70.5/70.6 (d, C-5), 71.5/71.6 (d, C-2'), 74.02/74.05 (t, C-1'), 74.11 (t, C-1''), 76.7 (d, C-4), 123.26/123.29 (s, C-2), 159.24/159.27 (s, C-3), 172.2 (s, C-1); HRESIMS m/z : 413.2145 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₉H₃₄O₈Na, 413.2146).

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-undecyl-AsA (**12**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 34.7$ (*c* 0.34, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 236 (3.88); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3300, 2916, 2851, 1761, 1684, 1329, 1171, 1119, 1063, 1030; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 0.89 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, H₃-11''), 1.29 (14H, brs, H₂-4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10''), 1.41 (2H, m, H₂-3''), 1.70 (2H, m, H₂-2''), 3.60 (2H, brd, $J = 5.8$ Hz, H₂-3''), 3.65 (2H, m, H₂-6), 3.90 (1H, m, H-5), 3.91 (1H, m, H-2'), 4.02 (1H, m, H₂-1''), [4.47 (dd, $J = 6.3, 10.6$ Hz)/4.48 (dd, $J = 6.3, 10.6$ Hz), 4.57 (dd, $J = 4.0, 10.6$ Hz)/4.59 (dd, $J = 4.0, 10.6$ Hz), H₂-1'], [4.860 (d, $J = 1.8$ Hz)/4.861 (d, $J = 1.8$ Hz), H-4]; ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) ; δ_C 14.4 (q, C-11''), 23.7 (t, C-10''), 26.9 (t, C-3''), 30.70 (t, C-2''), 30.47/30.49/30.70/30.74/30.8 (t, C-4'', 5'', 6'', 7'', 8''), 33.1 (t, C-9''), 63.2 (t, C-6), 63.5/63.6 (t, C-3'), 70.5/70.6 (d, C-5), 71.5/71.6 (d, C-2'), 74.02/74.05 (t, C-1'), 74.11 (t, C-1''), 76.7 (d, C-4), 123.27/123.29 (s, C-2), 159.2/159.3 (s, C-3), 172.4 (s, C-1); HRESIMS m/z : 427.2299 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₀H₃₆O₈Na, 427.2302).

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-dodecyl-AsA (**13**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 38.4$ (*c* 0.31, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 236 (3.86)]; IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3422, 2918, 2851, 1749, 1676, 1319, 1115, 1070; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 0.89 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, $\text{H}_3\text{-12''}$), 1.29 (16H, brs, $\text{H}_2\text{-4''}$, 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10'', 11''), 1.41 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3''}$), 1.70 (2H, m, $\text{H}_2\text{-2''}$), 3.60 (2H, brd, $J = 5.7$ Hz, $\text{H}_2\text{-3'}$), 3.65 (2H, m, $\text{H}_2\text{-6}$), 3.90 (1H, m, H-5), 3.91 (1H, m, H-2'), 4.02 (1H, m, $\text{H}_2\text{-1''}$), [4.47 (dd, $J = 6.4, 10.7$ Hz)/4.48 (dd, $J = 6.4, 10.7$ Hz), 4.57 (dd, $J = 4.0, 10.7$ Hz)/4.59 (dd, $J = 4.0, 10.7$ Hz), $\text{H}_2\text{-7}$], 4.86 (1H, m, $J = 6.6$ Hz, H-2'): $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) ; δ_{C} 14.4 (q, C-12''), 23.7 (t, C-11''), 27.0 (t, C-3''), 30.5 (t, C-4''), 30.76 (t, C-2''), 30.72/30.76/30.79/30.81 (t, C-5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10''), 33.1 (t, C-10''), 63.2 (t, C-6), 63.56/63.58 (t, C-3'), 70.5/70.6 (d, C-5), 71.5/71.6 (d, C-2'), 74.0 (t, C-7), 74.1 (t, C-1''), 76.7 (d, C-4), 123.27/123.29 (s, C-2), 159.2/159.3 (s, C-3), 172.2 (s, C-1); HRESIMS m/z : 441.2457 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_8\text{Na}$, 441.2459).

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-tridecyl-AsA (**14**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 35.8$ (*c* 0.30, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 231 (4.02)]; IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3289, 2916, 2849, 1761, 1684, 1329, 1119, 1171, 1119, 1063, 1030; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 0.89 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, $\text{H}_3\text{-13''}$), 1.28 (18H, brs, $\text{H}_2\text{-4''}$, 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10'' 11'', 12''), 1.41 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3''}$), 1.70 (2H, m, $\text{H}_2\text{-2''}$), 3.60 (2H, brd, $J = 5.8$ Hz, $\text{H}_2\text{-3'}$), 3.65 (2H, m, $\text{H}_2\text{-6}$), 3.90 (1H, m, H-5), 3.91 (1H, m, H-2'), 4.02 (1H, m, $\text{H}_2\text{-1''}$), [4.47 (dd, $J = 6.3, 10.7$ Hz)/4.48 (dd, $J = 6.3, 10.7$ Hz), 4.57 (dd, $J = 4.0, 10.7$ Hz)/4.59 (dd, $J = 4.0, 10.7$ Hz), $\text{H}_2\text{-1'}$], [4.859 (d, $J = 1.8$ Hz)/4.861 (d, $J = 1.8$ Hz), H-4]: $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) ; δ_{C} 14.4 (q, C-13''), 23.7 (t, C-12''), 27.0 (t, C-3''), 30.81 (t, C-2''), 30.48/30.50/30.71/30.78/30.81 (t, C-4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10'', 11''), 33.1 (t, C-12''), 63.2 (t, C-6), 63.56/63.58 (t, C-3'), 70.5/70.6 (d, C-5), 71.5/71.6 (d, C-2'), 74.0 (t, C-1'), 74.1 (t, C-1''), 76.7 (d, C-4), 123.27/123.29 (s, C-2), 159.2/159.3 (s, C-3), 172.2 (s, C-1); HRESIMS m/z : 455.2612 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{Na}$, 455.2615).

3-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-2-*O*-tetradecyl-AsA (**15**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 24.4$ (*c* 0.31, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 230 (3.99)]; IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3326, 2920, 2849, 1759, 1680, 1466, 1329, 1165, 1115, 1034; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 0.89 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, $\text{H}_3\text{-14''}$), 1.28 (20H, brs, $\text{H}_2\text{-4''}$, 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10'' 11'', 12'', 13''), 1.41 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3''}$), 1.70 (2H, m, $\text{H}_2\text{-2''}$), 3.60 (2H, brd, $J = 5.8$ Hz, $\text{H}_2\text{-3'}$), 3.65 (2H, m, $\text{H}_2\text{-6}$), 3.90 (1H, m, H-5), 3.91 (1H, m, H-2'), 4.02 (1H, m, $\text{H}_2\text{-1''}$), [4.47 (dd, $J = 6.4, 10.7$ Hz)/4.48 (dd, $J = 6.4, 10.7$ Hz), 4.57 (dd, $J = 3.8, 10.7$ Hz)/4.59 (dd, $J = 3.8, 10.7$ Hz), $\text{H}_2\text{-1'}$], [4.858 (d, $J = 1.5$ Hz)/4.860 (d, $J = 1.5$ Hz), H-4]: $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) ; δ_{C} 14.4 (q, C-14''), 23.7 (t, C-13''), 27.0 (t, C-3''), 30.80 (t, C-2''), 30.48/30.51/30.72/30.76/30.80 (t, C-4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10'', 11''), 33.1 (t, C-12''), 63.2 (t, C-6), 63.56/63.59 (t, C-3'), 70.5/70.6 (d, C-5), 71.5/71.6 (d, C-2'), 74.0 (t, C-1'), 74.1 (t, C-1''), 76.7 (d, C-4), 123.27/123.30 (s, C-2), 159.23/159.25 (s, C-3), 172.2 (s, C-1); HRESIMS m/z : 469.2769 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{O}_8\text{Na}$, 469.2772).

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-ethyl-AsA (**16**): Pale yellow oil; $[\alpha]_D^{26} + 34.3$ (*c* 0.33, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 236 (3.86)]; IR (ATR) ν_{\max} cm^{-1} : 3337, 2938, 2881, 1744, 1665, 1325, 1173, 1109, 1038; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 1.38 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, $\text{H}_3\text{-2''}$), 3.58 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3'}$) 3.64 (2H, dd-like, $J = 1.4, 6.4$ Hz, $\text{H}_2\text{-6}$), 3.87 (2H, m, H-5, 2'), [3.97 (1H, m), 4.13 (1H, m), 4.68 (2H, m, $\text{H}_2\text{-1''}$), 4.83 (d, $J = 0.9$ Hz, H-4): $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) ; δ_{C} 15.5 (q, C-2''), 63.3 (t, C-6), 63.98/63.48 (t, C-3'), 69.6 (t, C-1''), 70.6 (d, C-5), 72.0 (d, C-2'), 75.19/75.23 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 122.60/122.62 (s, C-2), 159.7 (s, C-3), 175.6 (s, C-1); HRESIMS m/z : 301.0887 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$, 301.0894).

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-propyl-AsA (**17**): Pale yellow oil; $[\alpha]_D^{26} + 49.8$ (*c* 0.31, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 237 (3.94)]; IR (ATR) ν_{\max} cm^{-1} : 3339, 2938, 2882, 1744, 1665, 1327, 1173, 1040; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 1.01 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, $\text{H}_3\text{-3''}$), 1.78 (2H, m, $\text{H}_2\text{-2''}$), 3.58 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3'}$), 3.64 (2H, dd-like, $J = 0.9, 6.4$ Hz, $\text{H}_2\text{-6}$), 3.87 (2H, m, H-5, 2'), [3.96/3.97 (1H, dd, $J = 6.4,$

10.1 Hz), 4.11/4.13 (1H, dd, $J = 4.1, 10.1$ Hz), H₂-1'], 4.50 (2H, m, H₂-1''), 4.83(1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-4): ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) ; δ_C 10.3 (q, C-3''), 23.9 (t, C-2''), 63.3 (t, C-6), 64.0 (t, C-3'), 70.6 (d, C-5), 72.0 (d, C-2'), 75.1 (t, C-1''), 75.19/75.23 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 122.4 (s, C-2), 159.9 (s, C-3), 172.6 (s, C-1); HRESIMS m/z : 315.1042 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₂H₂₀O₈Na, 315.1050).

3-*O*-butyl-2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**18**): Pale yellow oil; [α]_D²⁶ + 46.6 (*c* 0.31, MeOH); UV [MeOH, nm (log ε)]: 237 (3.89); IR (ATR) ν_{max} cm⁻¹: 3341, 2936, 2876, 1746, 1665, 1329, 1171, 1115, 1036; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.97 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H₃-4''), 1.47 (2H, m, H₂-3''), 1.74 (2H, m, H₂-2''), 3.58 (2H, m, H₂-3'), 3.64 (2H, dd-like, $J = 0.8, 6.4$ Hz, H₂-6), 3.86 (2H, m, H-5, 2'), [3.96/3.97 (1H, dd, $J = 6.4, 10.1$ Hz), 4.11/4.13 (1H, dd, $J = 4.1, 10.1$ Hz), H₂-1'], 4.55 (2H, m, H₂-1''), 4.83(1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-4): ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) ; δ_C 14.1 (q, C-4''), 19.9 (t, C-3''), 32.7 (t, C-2''), 63.3 (t, C-6), 63.28/64.01 (t, C-3'), 70.6 (d, C-5), 71.9 (d, C-2'), 73.4 (t, C-1''), 75.2/75.3 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 122.60/122.62 (s, C-2), 159.9 (s, C-3), 172.62/172.63 (s, C-1); HRESIMS m/z : 329.1200 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₃H₂₂O₈Na, 329.1207).

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-pentyl-AsA (**19**): Pale yellow oil; [α]_D²⁶ + 44.4 (*c* 0.30, MeOH); UV [MeOH, nm (log ε)]: 236 (3.93); IR (ATR) ν_{max} cm⁻¹: 3358, 2934, 2872, 1748, 1665, 1331, 1169, 1115, 1040; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.94 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, H₃-5''), 1.40 (4H, m, H₂-3, 4''), 1.76 (2H, m, H₂-2''), 3.58 (2H, m, H₂-3'), 3.64 (2H, dd-like, $J = 1.4, 6.4$ Hz, H₂-6), 3.86 (2H, m, H-5, 2'), [3.96/3.98 (1H, dd, $J = 6.4, 10.1$ Hz), 4.11/4.13 (1H, dd, $J = 4.1, 10.1$ Hz), H₂-1'], 4.54 (2H, m, H₂-1''), 4.84(1H, brs, H-4): ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) ; δ_C 14.3 (q, C-5''), 23.4 (t, C-4''), 28.9 (t, C-3''), 30.3 (t, C-2''), 63.3 (t, C-6), 63.97/64.00 (t, C-3'), 70.6 (d, C-5), 72.0 (d, C-2'), 73.7 (t, C-1''), 75.21/75.25 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 122.57/122.60 (s, C-2), 159.9 (s, C-3), 172.6 (s, C-1); HRESIMS m/z : 343.1357 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₄H₂₄O₈Na, 343.1363).

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-hexyl-AsA (**20**): Pale yellow oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} + 42.5$ (*c* 0.35, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 237 (3.96); IR (ATR) ν_{max} cm^{-1} : 3367, 2930, 2859, 1748, 1667, 1331, 1167, 1117, 1041; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 0.92 (3H, t-like, $J = 6.9$ Hz, $\text{H}_3\text{-6''}$), 1.34 (4H, m, $\text{H}_2\text{-4''}$, $5''$), 1.44 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3''}$), 1.75 (2H, m, $\text{H}_2\text{-2''}$), 3.57 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3'}$) 3.63 (2H, dd-like, $J = 1.4, 6.4$ Hz, $\text{H}_2\text{-6}$), 3.86 (2H, m, H-5, 2'), [3.95/3.97 (1H, dd, $J = 6.4, 10.1$ Hz), 4.10/4.12 (1H, dd, $J = 4.1, 10.1$ Hz), $\text{H}_2\text{-1'}$], 4.53 (2H, m, $\text{H}_2\text{-1''}$), 4.84 (1H, brs, H-4): $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) ; δ_{C} 14.3 (q, C-6''), 23.6 (t, C-5''), 26.3 (t, C-4''), 30.6 (t, C-3''), 32.6 (t, C-2'') 63.3 (t, C-6), 64.00/64.03 (t, C-3'), 70.6 (d, C-5), 72.0 (d, C-2'), 73.7 (t, C-1''), 75.2/75.3 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 122.60/122.63 (s, C-2), 159.9 (s, C-3), 172.6 (s, C-1); HRESIMS m/z : 357.1515 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{Na}$, 357.1520).

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-heptyl-AsA (**21**): Pale yellow oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} + 40.4$ (*c* 0.34, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 235 (3.91); IR (ATR) ν_{max} cm^{-1} : 3341, 2926, 2857, 1748, 1669, 1331, 1167, 1115, 1040; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 0.90 (3H, t-like, $J = 6.9$ Hz, $\text{H}_3\text{-7''}$), 1.36 (6H, m, $\text{H}_2\text{-4''}$, $5''$, $6''$), 1.44 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3''}$), 1.75 (2H, m, $\text{H}_2\text{-2''}$), 3.57 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3'}$) 3.64 (2H, dd-like, $J = 1.8, 6.0$ Hz, $\text{H}_2\text{-6}$), 3.86 (2H, m, H-5, 2'), [3.94/3.97 (1H, dd, $J = 6.4, 10.1$ Hz), 4.11/4.13 (1H, dd, $J = 4.1, 10.1$ Hz), $\text{H}_2\text{-1'}$], 4.54 (2H, m, $\text{H}_2\text{-1''}$), 4.83 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-4): $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) ; δ_{C} 14.4 (q, C-7''), 23.7 (t, C-6''), 26.7 (t, C-5''), 30.1/ 30.7 (t, C-3'' , $4''$), 32.9 (t, C-2''), 63.3 (t, C-6), 63.97/64.01 (t, C-3'), 70.6 (d, C-5), 71.9 (d, C-2'), 73.7 (t, C-1''), 75.21/75.25 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 122.58/122.60 (s, C-2), 159.9 (s, C-3), 172.6 (s, C-1); HRESIMS m/z : 371.1674 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_8\text{Na}$, 371.1676).

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-octyl-AsA (**22**): Pale yellow oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} + 42.3$ (*c* 0.34, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 236 (3.92); IR (ATR) ν_{max} cm^{-1} : 3364, 2924, 2857, 1748, 1667, 1331, 1165, 1115, 1036; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 0.90 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, $\text{H}_3\text{-8''}$), 1.32 (8H, m, $\text{H}_2\text{-4''}$, $5''$, $6''$, $7''$), 1.42 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3''}$), 1.75 (2H, m, $\text{H}_2\text{-2''}$), 3.58 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3'}$) 3.63 (2H, dd-like, $J = 1.4, 6.4$

Hz, H₂-6), 3.87 (2H, m, H-5, 2'), [3.96/3.97 (1H, dd, *J* = 6.4, 10.1 Hz), 4.11/4.12 (1H, dd, *J* = 3.9, 10.1 Hz), H₂-1'], 4.53 (2H, m, H₂-1''), 4.83 (1H, d, *J* = 1.4, H-4): ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) ; δ_C 14.4 (q, C-8''), 23.7 (t, C-7''), 26.7 (t, C-6''), 30.33/30.39 (t, C-4'', 5''), 30.6 (t, C-3''), 32.9 (t, C-2''), 63.3 (t, C-6), 63.99/64.02 (t, C-3'), 70.6 (d, C-5), 72.0 (d, C-2'), 73.7 (t, C-1''), 75.2/75.3 (t, C-1'), 76.68/76.70 (d, C-4), 122.60/122.64 (s, C-2), 159.9 (s, C-3), 172.63/172.64 (s, C-1); HRESIMS *m/z*: 385.1827 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₇H₃₀O₈Na, 385.1833).

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-nonyl-AsA (**23**): Pale yellow oil; [α]_D²⁶ + 39.1 (*c* 0.30, MeOH); UV [MeOH, nm (log ε)]: 237 (3.92); IR (ATR) ν_{max} cm⁻¹: 3358, 2924, 2855, 1750, 1669, 1333, 1163, 1115, 1040; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.90 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, H₃-9''), 1.30 (10H, brs, H₂-4'', 5'', 6'', 7'', 8''), 1.42 (2H, m, H₂-3''), 1.75 (2H, m, H₂-2''), 3.58 (2H, m, H₂-3') 3.64 (2H, dd-like, *J* = 1.4, 6.4 Hz, H₂-6), 3.86 (2H, m, H-5, 2'), [3.96/3.97 (1H, dd, *J* = 6.4, 10.1 Hz), 4.11/4.13 (1H, dd, *J* = 4.1, 10.1 Hz), H₂-1'], 4.53 (2H, m, H₂-1''), 4.83 (1H, d, *J* = 1.4, H-4): ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) ; δ_C 14.5 (q, C-9''), 23.7 (t, C-8''), 26.7 (t, C-7''), 30.4/ 30.5/ 30.6 (t, C-3'', 4'', 5'', 6''), 30.6 (t, C-3''), 33.1 (t, C-2''), 63.2 (t, C-6), 63.97/64.00 (t, C-3'), 70.6 (d, C-5), 71.9 (d, C-2'), 73.7 (t, C-1''), 75.2/75.3 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 122.57/122.60 (s, C-2), 159.9 (s, C-3), 172.6 (s, C-1); HRESIMS *m/z*: 399.1984 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₈H₃₂O₈Na, 399.1989).

3-*O*-decyl-2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-AsA (**24**): Pale yellow oil; [α]_D²⁶ + 36.7 (*c* 0.33, MeOH); UV [MeOH, nm (log ε)]: 237 (4.02); IR (ATR) ν_{max} cm⁻¹: 3364, 2924, 2855, 1749, 1666, 1333, 1165, 1119, 1030; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.89 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, H₃-10''), 1.30 (12H, brs, H₂-4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9''), 1.43 (2H, m, H₂-3''), 1.75 (2H, m, H₂-2''), 3.59 (2H, m, H₂-3') 3.66 (2H, dd-like, *J* = 1.4, 6.4 Hz, H₂-6), 3.86 (2H, m, H-5, 2'), [3.96/3.97 (1H, dd, *J* = 6.4, 10.1 Hz), 4.10/4.12 (1H, dd, *J* = 4.1, 10.1 Hz), H₂-1'], 4.53 (2H, m, H₂-1''), 4.83 (1H, brs, H-4): ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) ; δ_C 14.4 (q, C-10''), 23.7 (t, C-9''), 26.7 (t, C-8''), 30.4/30.7 (t, C-3'', 4'', 5'', 6'', 7''), 33.0 (t, C-2''), 63.3 (t, C-6), 64.0 (t, C-3'), 70.6 (d, C-5), 72.0 (d, C-2'), 73.7 (t, C-1''), 75.2/75.3 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4),

122.61/122.64 (s, C-2), 159.9 (s, C-3), 172.6 (s, C-1); HRESIMS m/z : 413.2146 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{19}H_{34}O_8Na$, 413.2146).

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-undecyl-AsA (**25**): Pale yellow oil; $[\alpha]_D^{26} + 35.9$ (c 0.31, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 237 (3.95); IR (ATR) ν_{max} cm^{-1} : 3358, 2922, 2853, 1750, 1669, 1333, 1163, 1115, 1040; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.89 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, H_3-11''), 1.29 (14H, brs, H_2-4'' , $5''$, $6''$, $7''$, $8''$, $9''$, $10''$), 1.44 (2H, m, H_2-3''), 1.75 (2H, m, H_2-2''), 3.58 (2H, m, H_2-3') 3.64 (2H, dd-like, $J = 1.4, 6.4$ Hz, H_2-6), 3.86 (2H, m, $H-5, 2'$), [3.96/3.97 (1H, dd, $J = 6.4, 10.1$ Hz), 4.10/4.13 (1H, dd, $J = 4.1, 10.1$ Hz), H_2-1'], 4.53 (2H, m, H_2-1''), 4.83 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, $H-4$): ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) ; δ_C 14.4 (q, C-11''), 23.8 (t, C-10''), 26.7 (t, C-9''), 30.46/30.48/30.69/30.73/30.77 (t, C-3'', 4'', 5'', 6'', 7'', 8''), 33.1 (t, C-2''), 63.2 (t, C-6), 64.0 (t, C-3'), 70.6 (d, C-5), 71.9 (d, C-2'), 73.7 (t, C-1''), 75.2/75.3 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 122.58/122.60 (s, C-2), 159.9 (s, C-3), 172.6 (s, C-1); HRESIMS m/z : 427.2301 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{20}H_{36}O_8Na$, 427.2302).

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-dodecyl-AsA (**26**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 41.7$ (c 0.33, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 237 (3.96); IR (ATR) ν_{max} cm^{-1} : 3341, 2922, 2853, 1748, 1668, 1335, 1165, 1115, 1028; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.89 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H_3-12''), 1.29 (16H, brs, H_2-4'' , $5''$, $6''$, $7''$, $8''$, $9''$, $10''$, $11''$), 1.44 (2H, m, H_2-3''), 1.75 (2H, m, H_2-2''), 3.57 (2H, m, H_2-3') 3.64 (2H, dd-like, $J = 1.8, 6.4$ Hz, H_2-6), 3.86 (2H, m, $H-5, 2'$), [3.96/ 3.97 (1H, dd, $J = 6.4, 10.1$ Hz), 4.11/4.13 (1H, dd, $J = 4.1, 10.1$ Hz), H_2-1'], 4.53 (2H, m, H_2-1''), 4.83 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, $H-4$): ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) ; δ_C 14.4 (q, C-12''), 23.7 (t, C-11''), 26.7 (t, C-10''), 30.47/30.67/30.70/30.74/30.78 (t, C-3'', 4'', 5'', 6'', 7'', 8'',9''), 33.1 (t, C-2''), 63.3 (t, C-6), 64.00/64.03 (t, C-3'), 70.6 (d, C-5), 71.9 (d, C-2'), 73.7 (t, C-1''), 75.22/ 75.27 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 122.61/122.64 (s, C-2), 159.9 (s, C-3), 172.6 (s, C-1); HRESIMS m/z : 441.2458 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{21}H_{38}O_8Na$, 441.2459).

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-tridecyl-AsA (**27**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 37.8$ (*c* 0.30, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 233 (4.02)]; IR (ATR) ν_{\max} cm^{-1} : 3358, 2922, 2853, 1750, 1670, 1333, 1167, 1115, 1042; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 0.89 (3H, t, $J = 6.4$ Hz, $\text{H}_3\text{-13''}$), 1.29 (18H, brs, $\text{H}_2\text{-4''}$, $5''$, $6''$, $7''$, $8''$, $9''$, $10''$, $11''$, $12''$), 1.44 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3''}$), 1.75 (2H, m, $\text{H}_2\text{-2''}$), 3.58 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3'}$) 3.64 (2H, dd-like, $J = 1.8, 6.0$ Hz, $\text{H}_2\text{-6}$), 3.86 (2H, m, H-5 , $2'$), [3.96/3.97 (1H, dd, $J = 6.9, 10.1$ Hz/ 6.4, 10.1Hz), 4.11/4.13 (1H, dd, $J = 3.7, 10.1$ Hz), $\text{H}_2\text{-1'}$], 4.54 (2H, m, $\text{H}_2\text{-1''}$), 4.83 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-4): $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) ; δ_{C} 14.5 (q, C-13''), 23.7 (t, C-12''), 26.7 (t, C-11''), 30.48/30.69/30.73/30.78/30.81 (t, C-3'', 4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10''), 33.1 (t, C-2''), 63.2 (t, C-6), 63.96/63.99 (t, C-3'), 70.6 (d, C-5), 71.9 (d, C-2'), 73.7 (t, C-1''), 75.19/75.25 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 122.6 (s, C-2), 159.9 (s, C-3), 172.6 (s, C-1); HRESIMS m/z : 455.2616 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{Na}$, 455.2615).

2-*O*-(2,3-dihydroxypropyl)-3-*O*-tetradecyl-AsA (**28**): An amorphous powder; $[\alpha]_D^{26} + 31.1$ (*c* 0.30, MeOH); UV [MeOH, nm (log ϵ): 237 (3.93)]; IR (ATR) ν_{\max} cm^{-1} : 3379, 2922, 2853, 1750, 1669, 1333, 1167, 1117, 1040; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 0.89 (3H, t, $J = 6.4$ Hz, $\text{H}_3\text{-14''}$), 1.28 (20H, brs, $\text{H}_2\text{-4''}$, $5''$, $6''$, $7''$, $8''$, $9''$, $10''$, $11''$, $12''$, $13''$), 1.44 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3''}$), 1.75 (2H, m, $\text{H}_2\text{-2''}$), 3.58 (2H, m, $\text{H}_2\text{-3'}$) 3.64 (2H, dd-like, $J = 1.4, 6.4$ Hz, $\text{H}_2\text{-6}$), 3.86 (2H, m, H-5 , $2'$), [3.96/3.97 (1H, dd, $J = 6.9, 10.1$ Hz/ 6.4, 10.1Hz), 4.11/4.13 (1H, dd, $J = 4.1, 10.1$ Hz), $\text{H}_2\text{-1'}$], 4.54 (2H, m, $\text{H}_2\text{-1''}$), 4.83 (1H, d, $J = 0.9$ Hz, H-4): $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) ; δ_{C} 14.5 (q, C-14''), 23.7 (t, C-13''), 26.7 (t, C-12''), 30.48/30.69/30.73/30.78/30.81 (t, C-3'', 4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10'', 11''), 33.1 (t, C-2''), 63.2 (t, C-6), 63.97/64.00 (t, C-3'), 70.6 (d, C-5), 71.9 (d, C-2'), 73.7 (t, C-1''), 75.20/75.25 (t, C-1'), 76.7 (d, C-4), 122.6 (s, C-2), 159.9 (s, C-3), 172.6 (s, C-1); HRESIMS m/z : 469.2773 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{O}_8\text{Na}$, 469.2772).

第三節の実験

細胞培養

B16 melanoma 4A5 細胞 (RCB0557, 理化学研究所) を, 10% ウシ胎児血清 (FBS), penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 µg/mL) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (glucose 4500 mg/mL) 培地 (DMEM, Sigma Aldrich) で培養 (5% CO₂, 37°C) した.

正常ヒト表皮メラノサイト (Black donor, クラボウ) を, DermaLife M LifeFactors 含有 DermaLife Basal Medium 培地 (クラボウ) で培養 (5% CO₂, 37°C) した.

B16 melanoma 4A5 細胞における theophylline 誘発メラニン産生抑制活性

48 well マイクロプレートに B16 melanoma 4A5 細胞を, 10%FBS 含有 DMEM (sigma-Aldrich) を用いて播種し (8.0×10³ cells/well, 200 µL/well), 24 時間培養した. 培養後, 6 mM theophylline 含有培地 (50 µL/well, 終濃度 1 mM) および被験サンプル含有培地 (50 µL/well) を添加した. 72 時間培養後, アスピレーターで培地を除去し, 蒸留水 105 µL を添加し, 超音波破碎機により細胞を破碎した. 破碎後, 5 µL/well ずつ 96 well マイクロプレートに移し, BCA protein Assay Kit (Thermo) を用いて (95 µL/well 添加) タンパク質量を定量し, 細胞生存率とした. 残りの細胞破碎液に 6 M NaOHaq.にて溶解 (20 µL/well, 60 °C, 30 min) した. 室温まで冷却した後, 96 well マイクロプレートに細胞溶解液を分取 (100 µL/well) し, 生成したメラニンの吸光度をマイクロプレートリーダー (EnSpire™ 2300 Multilabel Reader, Perkin Elmer 製)にて測定した (測定波長: 405 nm, 参照波長: 655 nm). なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地へ添加した(DMSO 終濃度 0.1%).

$$\text{Inhibition(\%)} = [(A-B)/A]/(C/100) \times 100$$

[A : 被験サンプル未添加 (コントロール) の吸光度, B : 被験サンプル添加の吸光度, C : 細胞生存率]

正常ヒト表皮メラノサイトにおけるメラニン産生抑制活性

6 well マイクロプレートに正常ヒト表皮メラノサイトを播種し (3.0×10^5 cells/well, 2 mL/well), 24 時間培養した. 培養後, 被験サンプル含有培地 (50 μ L/well) を添加した. 6 日間培養後, アスピレーターで培地を除去し, 蒸留水 105 μ L を添加し, 超音波破碎機により細胞を破碎した. 破碎後, 5 μ L/well ずつ 96 well マイクロプレートに移し, BCA protein Assay Kit (Thermo) を用いて (95 μ L/well 添加) タンパク質量を定量し, 細胞生存率とした. 残りの細胞破碎液に 6 M NaOHaq.にて溶解 (50 μ L/well, 80 $^{\circ}$ C, 30 min) した. 室温まで冷却した後, 96 well マイクロプレートに細胞溶解液を分取 (100 μ L/well) し, 生成したメラニンの吸光度をマイクロプレートリーダー (EnSpireTM 2300 Multilabel Reader, Perkin Elmer 製) にて測定した (測定波長: 405 nm, 参照波長: 655 nm). なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地へ添加した (DMSO 終濃度 0.1%).

第四節の実験

分析条件

以下の分析条件にて，分析を行った．装置：Shimadzu Prominence, カラム：Cadenza CD-C18 (2.0 mmI.D.×150 mm, 3 μ m), 検出器：UV (240 nm), 移動相：[AsA ; 0.1% aqueous formic acid, **7** and **20** ; MeOH/ 0.1% aqueous formic acid, 40/60, v/v] , 流速：0.2 mL/min, カラム温度：40°C, 注入量：0.1 μ L.

安定性評価

AsA, **7**, および **20** について，それぞれ精密に秤量し，超純水にて 20 mg/mL の濃度に調製した溶液を，オートクレーブ (ADVANTEC) で加圧下 125°Cにて 1 時間または 3 時間加熱を行った．加熱後水が蒸発し質量が減少したものについては，超純水を添加し質量調整を行った．得られた試料溶液をメンブレンフィルター (0.45 μ m) でろ過し，HPLC 測定を行った．

第二章の実験

細胞培養

B16 melanoma 4A5 は第 1 章に記載の方法に準じて培養を行った。

第一節の実験

マッシュルーム由来チロシナーゼ活性阻害

96 well マイクロプレート (住友ベークライト製) に, 試料溶液 (DMSO 溶液) 5 μ L, 100 mM Na, K - リン酸緩衝液 (pH 6.5) 90 μ L, および基質 (L-tyrosine 2.5 mM または 3.0 mM L-DOPA) を 50 μ L 添加し, マッシュルーム由来チロシナーゼ (1380 units/ mL) 5 μ L を加え, 酵素反応させ (L-tyrosine : 25 $^{\circ}$ C, 30 min, L-DOPA : 25 $^{\circ}$ C, 5min), マイクロプレートリーダー (EnSpireTM 2300 Multilabel Reader, Perkin Elmer 製) を用いて測定した (測定波長 : 492 nm).

B16 melanoma 4A5 細胞由来チロシナーゼ活性阻害

6 well マイクロプレート (住友ベークライト製) に B16 melanoma 4A5 細胞を播種し (1.0 $\times 10^5$ cells/well, 2000 μ L/well), 24 時間培養した. 培養後, 6 mM theophylline 含有培地 (500 μ L/well) を添加し 72 時間培養した. 0.1% Triton X-100 を用いて粗酵素を抽出し, BCA protein Assay Kit を用いてタンパク質濃度を測定した. その後, 粗酵素を 500 μ g/mL に調整した. 各溶解物および試料 50 μ L を 2 mM の L-DOPA と混合した. その後, 37 $^{\circ}$ C で 30 分酵素反応させ, マイクロプレートリーダーを用いて吸光度測定した (測定波長 450 nm).

第二節の実験

チロシナーゼおよびチロシナーゼ関連因子評価

96 wellマイクロプレート (住友ベークライト製) に, B16 melanoma 4A5細胞を 4×10^3 cells/wellを播種し, 24時間培養した後, 被験物質およびtheophylline (終濃度 1 mM) を添加した (被験物質未添加をコントロールとした). 72時間培養後, PBSで洗浄した後, Power SYBR Green Cells-to-CT kit (Thermo Fisher Scientific 製) を用いて, total RNAを細胞から抽出し, StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Life Technologies) を使用し, 逆転写反応 (37 °C, 60min → 95 °C, 5min) を行うことでcDNAを合成した. 参考遺伝子には, β -actinを用いた. キットおよび試薬の使用方法は添付のプロトコルに従った. 各種成分のmRNAは以下に示すprimerを用いて増幅させた後, $\Delta\Delta$ Ct法にて相対定量を行った.

gene	forward	reverse
tyrosinase	CCTCCTGGCAGATCATTTGT	GGTTTTGGCTTTGTCATGGT-
TRP-1	CTTTCTCCCTTCCTTACTGG	TGGCTTCATTCTTGGTGCTT
TRP-2	TGAGAAGAAACAAAGTAGGCAGAA	CAACCCCAAGAGCAAGACGAAAGC
β -actin	GGGAAATCGTGCGTGACAT	CAGGAGGAGCAATGATCTC

Western Blotting

6 wellマイクロプレート (住友ベークライト製) に B16 melanoma 4A5 細胞を播種し (1.0×10^5 cells/well, 2000 μ L/well), 24 時間培養した. 培養後, 6 mM theophylline 含有培地 (50 μ L/well) を添加し 72 時間培養した. その後, プロテアーゼ阻害剤を含む RIPA 緩衝液を用いて細胞内のタンパク質を抽出した. 10 %SDS-PAGE を用いてタンパク質を分離し, 次いでポリビニリデンジフルオライド膜に転写後, tyrosinase (1 : 1000) および β -actin (1 : 2000) に

特異的な一次抗体 (β -actin:Abcam 製, tyrosinase: Santa Cruz Biotechnology, Inc 製) とインキュベートした. WesternBreeze Chemiluminescent キット (Invitrogen,Carlsbad 製) を用いて膜上のタンパク質バンドを可視化し, ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad,Hercules 社 製) を用いて画像を得た.

第三節の実験

メラニン輸送関連因子評価

96 well マイクロプレート (住友ベークライト製) に, B16 melanoma 4A5 細胞を 4×10^3 cells/well を播種し, 24 時間培養した後, 被験物質および theophylline (終濃度 1 mM) を添加した (被験物質未添加をコントロールとした). 72 時間培養後, PBS で洗浄した後, Power SYBR Green Cells-to-CT kit (Thermo Fisher Scientific 製) を用いて, total RNA を細胞から抽出し, StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Life Technologies) を使用し, 逆転写反応 (37 °C, 60min → 95 °C, 5min) を行うことで cDNA を合成した. 参考遺伝子には, β -actin を用いた. キットおよび試薬の使用方法は添付のプロトコルに従った. 各種成分の mRNA は以下に示す primer を用いて増幅させた後, $\Delta\Delta$ Ct 法にて相対定量を行った.

gene	Forward	reverse
tyrosinase	CCTCCTGGCAGATCATTGT	GGTTTTGGCTTTGTCATGGT
MyosinVa	AGTGCAGCAGCTAAGAGCAT	ATTCTTGCACGTTTGCTTTC
Rab27b	ATGTCGGATGGAGATTACGA	CCATAACTGCAGGTGGATTC
Kinesin	CCGAGCACAAGAGAAAGTCC	TAGCTTTTCCTTTGCCTCCA
β -actin	GGGAAATCGTGCGTGACAT	CAGGAGGAGCAATGATCTC

タイムラプス観察

細胞培養については第二章第三節と同様に行い, タイムラプス観察については, タイムラプス顕微鏡 BZ-X700 (キーエンス) を用いて行った.

第三章の実験

細胞培養

B16 melanoma 4A5 細胞は第一章三節に記載の方法に準じて培養を行った。

メラニン定量

メラニンの定量は、第一章第三節記載の方法に準じて行った。

RNA 干渉

B16 melanoma 4A5 細胞を 96well プレートに播種し 24 時間培養後, Lipofectamine 2000 (Life Technologies) と 100 nM Myosin Va-small interfering RNA (siMyosin Va) もしくは non-targeting siRNA (siControl) との混合液を添加し, 37 °C、5 % CO₂ 条件下にて 24 時間処理をした。細胞を theophylline (終濃度 1 mM) の存在下または非存在下で 48 時間インキュベートした。得られた細胞を M-KDcells とした。

Western blotting

細胞を培養後, プロテアーゼ阻害剤を含む RIPA 緩衝液を用いて細胞タンパク質を抽出した後, タンパク質を 10 % または 15 % SDS-PAGE を用いて分離し, 次いでポリビニリデンジフルオライド膜に転写した。tyrosinase (1 : 1000), LC3 (1 : 1000), p62 (1 : 1000) および β -actin (1 : 2000) に特異的な一次抗体 (Cell Signaling Technology 製) とインキュベートした。WesternBreeze Chemiluminescent キット (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて膜上のタンパク質バンドを可視化し, ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて検出を行った。

免疫染色

細胞を 4 % ホルムアルデヒドで (PBS (-) に溶解) に 15 分間処理することで細胞を固定し,

0.2% Triton X-100 (PBS (-) に溶解) を10分間処理することで透過処理を行った。PBS (-) にて洗浄後, 1 % IgG-free BSA (PBS (-) に溶解) に浸漬させ, 室温で1時間ブロッキングを行った。次に, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rabbit anti-LC3 polyclonal抗体またはgoat anti-Pmel17 polyclonal (Cell Signaling Technology) の2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1 % BSA含有PBS (-) に溶解) を室温で1時間処理し, 1次抗体反応を行った。PBS (-) にて洗浄後, donkey anti-rabbitIgG H&L (Alexa Fluor 555) (Abcam) またはdonkey anti-goatIgG H&L (Alexa Fluor488) (Abcam) (1 % BSA含有PBS (-) に溶解) を室温で1時間処理し, 2次抗体反応を行った。PBS (-) にて洗浄後, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI (Dojindo Laboratories) (PBS (-) に溶解) を室温暗所で5分間処理し, 核染色を行った。共焦点画像は, BZ-X700蛍光顕微鏡 (キーエンス) を用いて得た。

第一節の実験

MyosinVa ノックダウンによるメラニン量の検証

48 well マイクロプレート (住友ベークライト製) に, 4×10^3 cells/well (200 $\mu\text{L}/\text{well}$) の細胞密度で播種した, M-KD cells を 24 時間培養した後, theophylline (終濃度 1 mM) を添加し, 48 時間培養した。その後メラニン量の定量を行った。

MyosinVa ノックダウンによる各 mRNA 発現量検証

48 well マイクロプレートに, 8×10^3 cells/well (200 $\mu\text{L}/\text{well}$) の細胞密度で播種したM-KD cellsを24時間培養した後, theophylline (終濃度 1 mM) を添加 (or 未添加) した。48時間培養後, PBSで洗浄した後, Power SYBR Green Cells-to-CT kit (Thermo Fisher Scientific 製) を用いて, total RNAを細胞から抽出し, StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Life Technologies) を使用し, 逆転写反応 (37 °C, 60min \rightarrow 95 °C, 5min) を行うことでcDNAを合成した。参考遺伝子には, β -actinを用いた。キットおよび試薬の使用方法は添付のプロトコルに従った。各種成分のmRNAは以下に示すprimerを用いて増幅させた後, $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法にて相対定量を行った。

gene	forward	reverse
tyrosinase	CCTCCTGGCAGATCATTGT	GGTTTTGGCTTTGTCATGGT-
MyosinVa	AGTGCAGCAGCTAAGAGCAT	ATTCTTGCACGTTTGCTTTC
β -actin	GGGAAATCGTGCGTGACAT	CAGGAGGAGCAATGATCTC

MyosinVa ノックダウンによるオートファジー活性化検証

6 well マイクロプレートに、 1×10^5 cells/well (2 mL/well) の細胞密度で播種した M-KD cells を 24 時間培養した後、theophylline (終濃度 1 mM) を添加し、48 時間培養した。その後 Western Blotting により、LC3 および p62 のタンパク質発現に関して、ChemiDoc Touch Imaging System にて検出を行った。

MyosinVa ノックダウンによる LC3 共局在検証

48 well マイクロプレートに、 4×10^3 cells/well (200 μ L/well) の細胞密度で播種した M-KD cells を 24 時間培養した後、theophylline (終濃度 1 mM) を添加し、48 時間培養した。その後、免疫染色により LC3 および Pmel17 を染色し、BZ-X700 蛍光顕微鏡により観察を行った。

VC-HG 処理によるオートファジー活性化および LC3 局在化検証

6 well マイクロプレートに、B16 melanoma 4A5 細胞を 1×10^5 cells/well の細胞密度で播種し、24 時間培養した後、各濃度の VC-HG (VC-HG 未添加を control とし) および theophylline (終濃度 1 mM) を添加し、72 時間培養した。その後、Western Blotting により LC3 および p62 のタンパク質発現に関して ChemiDoc Touch Imaging System にて検出した。また、免疫染色により LC3 および Pmel17 を染色し、BZ-X700 蛍光顕微鏡により観察を行った。

統計処理

測定値は平均値±標準偏差で表し, student の t 検定によって有意差検定を行った. p 値 0.05 未満を統計的に有意とした.

参考文献

- 1) Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *New Engl. J. Med.*, **314**, 892-902 (1986).
- 2) Katsuyama Y., Tsuboi T., Taira N., Yoshioka M., Masaki H. 3-*O*-Laurylglyceryl ascorbate activates the intracellular antioxidant system through the contribution of PPAR-g and Nrf2. *J. Dermatol. Sci.*, **82**, 143-216 (2016).
- 3) Katsuyama Y., Taira N., Tsuboi T., Yoshioka M., Masaki H., Muraoka O. 3-*O*-Laurylglyceryl ascorbate reinforces skin barrier function through not only the reduction of oxidative stress but also the activation of ceramide synthesis. *Int. Cosmet. Sci.*, **39**, 49-55 (2017).
- 4) Tai A., Goto S., Ishigura Y, Suzuki K., Nitoda T, Yamamoto I. Permeation and metabolism of a series of novel lipophilic ascorbic acid derivatives, 6-*O*-acyl-2-*O*- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acids with a branched-acyl chain, in a human living skin equivalent model. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 623–627(2004).
- 5) Parvez S., Kang M., Chung, H.S., Cho, C., Hong, M.-C., Shin, M.-K., Bae, H. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.*, **20**, 921–934 (2006).
- 6) Chang T.S., An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 2440–2475 (2009).
- 7) Isaacs N., Eldik R. A mechanistic study of the reduction of quinones by ascorbic acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 1465–1468 (1997).
- 8) 松岡桓準, 平徳久, 中村清香, 勝山雄志, 吉岡正人. 新規保湿型ビタミン C 誘導体グリセリル化アスコルビン酸の有用性. 日本化粧品技術者会誌., **48**, 200–207 (2014).
- 9) Land E.J., Ramsden C.A., Riley P.A. Tyrosinase autoactivation and the chemistry of *ortho*-quinone amines. *Acc. Chem. Res.*, **36**, 300–308 (2003).
- 10) d'Ischia M., Napolitano A., Pezzella A., Land E.j., Ramsden C.A., Riley P.A. 5,6-Dihydroxyindoles and indole-5,6-diones. *Adv. Heterocycl. Chem.*, **89**, 1–63 (2005).

- 11) d'Ischia M., Napolitano A., Pezzella A., Meredith P., Sarna T. Chemical and structural diversity in eumelanins: Unexplored bio-optoelectronic materials. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 3914–3921 (2009).
- 12) d'Ischia M., Napolitano A., Ball V., Chen C.T., Buehler M.J. Polydopamine and eumelanin: From structure-property relationships to a unified tailoring strategy. *Acc. Chem. Res.*, **47**, 3541–3550 (2014).
- 13) Micillo R., Panzella L., Koike K., Monfrecola G., Napolitano A., d'Ischia, M. “Fifty Shades” of black and red or how carboxyl groups fine tune eumelanin and pheomelanin properties. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 746 (2016).
- 14) D'Ischia M., Wakamatsu K., Napolitano A., Briganti S., Garcia-Borron J. C., Kovacs D., Meredith P., Pezzella A., Picardo M., Sarna T., et al. Melanins and melanogenesis: Methods, standards, protocols. *Pigm. Cell Res.*, **19**, 572-594 (2006).
- 15) Slominski A., Tobin D.J., Shibahara S., Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.*, **84**, 1155-1228 (2004).
- 16) Slominski A., Wortsman J., Plonka P.M., Schallreuter K.U., Paus R., Tobin D.J. Hair follicle pigmentation. *J. Investig. Dermatol.*, **124**, 13-21 (2005).
- 17) Prota G. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med. Res. Rev.*, **8**, 525-556 (1998).
- 18) Hearing V.J., Korner A.M., Pawelek J.M. New regulators of melanogenesis are associated with purified tyrosinase isozymes. *J. Investig. Dermatol.*, **79**, 16-18 (1982).
- 19) Hearing, V.J.; Jiménez, M. Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.*, **19**, 1141-1147 (1987).
- 20) Kuzumaki T., Matsuda A., Wakamatsu K., Ito S., Ishikawa K. Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinate expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes. *Exp. Cell Res.*, **207**, 33-40 (1993).

- 21) Friedmann P.S., Gilchrest B.A. Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. *J. Cell. Physiol.*, **133**, 88-94 (1987).
- 22) Slominski A., Wortsman J., Luger T., Paus R., Slomon S. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to Stress. *Physiol. Rev.*, **80**, 979-1020 (2000).
- 23) Slominski A., Zmijewski M.A., Zbytek B., Tobin D.J., Theoharides T.C., Rivier J. Key role CRF in the skin stress response system. *Endocr. Rev.*, **34**, 827-884 (2013).
- 24) Hunt G., Todd C., Cresswell J.E., Thody A.J. Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell Sci.*, **107**, 205-211 (1994).
- 25) Iozumi K, Hoganson GE, Pennella R, Everett M.A., Fuller B.B. Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol.*, **100**, 806-811 (1993).
- 26) del Marmol V, Beermann F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.*, **381**, 165-168 (1996).
- 27) Jiménez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Urabe K, Hearing V.J., Lozano J.A., García-Borrón J.C. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.*, **269**, 17993-18001 (1996).
- 28) Cooksey C.J., Garratt P.J., Land E.J., Pavel S, Ramsden C.A., Riley P.A., Smit N.P. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. Evidence of the Indirect Formation of the Catecholic Intermediate Substrate Responsible for the Autoactivation Kinetics of Tyrosinase. *Biochem Soc Trans.*, **39**, 1191-1196 (2011).
- 29) Hume AN, Seabra MC. Melanosomes on the move: a model to understand organelle dynamics. *J. Biol. Chem.*, **272**, 26226-26235 (1997).

- 30) Hara M, Yaar M, Byers HR, Goukassian D, Fine RE, Gonsalves J, Gilchrest BA. Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *J Invest Dermatol.*, **114**, 438-443 (2000).
- 31) Van Gele M, Geusens B, Schmitt AM, Aguilar L, Lambert J. Knockdown of myosin Va isoforms by RNAi as a tool to block melanosome transport in primary human melanocytes. *J Invest Dermatol.*, **128**, 2474-2484 (2008).
- 32) Ando H., Niki Y., Ito M., Akiyama K., Matsui M.S., Yarosh D.B., Ichihashi M. Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *J. Invest. Dermatol.*, **132**, 1222-1229 (2012).
- 33) Taira N., Katsuyama Y., Yoshioka M., Muraoka O., Morikawa T. Structural Requirements of Alkylglyceryl-L-Ascorbic Acid Derivatives for Melanogenesis Inhibitory Activity. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1144 (2018).
- 34) Taira N., Katsuyama Y., Yoshioka M., Okano Y., Masaki H. 3-O-Glyceryl-2-O-hexyl ascorbate suppresses melanogenesis by interfering with intracellular melanosome transport and suppressing tyrosinase protein synthesis. *J. Cosmet., Dermatol.*, (2017). doi: 10.1111/jocd.12451.[Epub ahead of print]
- 35) Katsuyama Y., Taira N., Yoshioka M., Okano Y., Masaki H. Disruption of melanosome transport in melanocytes treated with theophylline causes their degradation by autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **485**, 126-130 (2017).
- 36) Yoshioka M., Taira N., Kamiyama A., Uehara K., Hashimoto N. Ascorbic Acid Derivative or Salt Thereof, Production Method Thereof, and Cosmetic. U.S. Patent US 8163939B2, 24 April (2012).
- 37) Couteau C., Coiffard L. Overview of skin whitening agents: Drugs and cosmetic products. *Cosmetics*, **3**, 27 (2016).

- 38) Chiku K., Dohi H., Saito A., Ebise H., Kouzai Y., Shinoyama H., Nishida Y., Ando A. Enzymatic synthesis of 4-hydroxyphenyl β -D-oligoxylosides and their notable tyrosinase inhibitory activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1123-1128 (2009).
- 39) Kim Y.J., Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 1707-1723 (2005).
- 40) Parvez, S.; Kang, M.; Chung, H.-S.; Cho, C.; Hong, M.-C.; Shin, M.-K.; Bae, H. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.*, **20**, 921-934 (2006).
- 41) Morikawa, T.; Nakanishi, Y.; Ninomiya, K.; Matsuda, H.; Nakashima, S.; Miki, H.; Miyashita, Y.; Yoshikawa, M.; Hayakawa, T.; Muraoka, O. Dimeric pyrrolidinoindoline-type alkaloids with melanogenesis inhibitory activity in flower buds of *Chimonanthus praecox*. *J. Nat. Med.*, **68**, 539-549 (2014).
- 42) Morikawa T., Kitagawa N., Tanabe G., Ninomiya K., Okugawa S., Motai C., Yoshikawa M., Lee I.J., Muraoka O. Quantitative determination of alkaloids in lotus flower (flower buds of *Nelumbo nucifera*) and their melanogenesis inhibitory activity. *Molecules*, **21**, 930 (2016).
- 43) Morikawa T., Ninomiya K., Kuramoto H., Kamei I., Yoshikawa M., Muraoka O. Phenylethanoid and phenylpropanoid glycosides with melanogenesis inhibitory activity from the flowers of *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. *J. Nat. Med.*, **70**, 89-101 (2016).
- 44) Ninomiya K., Matsumoto T., Chaipech S., Miyake S., Katsuyama Y., Tsuboyama A., Pongpiriyadacha Y., Hayakawa T., Muraoka O., Morikawa T. Simultaneous quantitative analysis of 12 methoxyflavones with melanogenesis inhibitory activity from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *J. Nat. Med.*, **70**, 179-189 (2016).
- 45) Manse Y., Ninomiya K., Nishi R., Kamei I., Katsuyama Y., Imagawa T., Chaipech S., Muraoka O., Morikawa T. Melanogenesis inhibitory activity of a 7-O-9'-linked neolignan from *Alpinia galanga*. *Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 6215-6224 (2016).
- 46) Manse Y., Ninomiya K., Okazaki A., Okada-Nishida E., Imagawa T., Imamura-Mizushima M., Yamano Y., Kaname K., Nakamura S., Morikawa, T. Melanogenesis inhibitory activity of

- diterpenoid and triterpenoid constituents from the aerial part of *Isodon trichocarpus*. *Nat. Prod. Commun.*, **12**, 1185-1188 (2017).
- 47) Manse Y., Ninomiya K., Nishi R., Hashimoto Y., Chaipech S., Muraoka O., Morikawa, T. Labdane-type diterpenes, galangalditerpenes A-C, with melanogenesis inhibitory activity from the fruit of *Alpinia galanga*. *Molecules*, **22**, 2279 (2017).
- 48) Bertolotto C., Buscà R., Abbe P., Bille K., Aberdam E., Ortonne J. P., Ballotti R. Different *cis*-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: Pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 694-702 (1998).
- 49) Seglen P.O., Bohley P. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia*, **48**, 158-172 (1992).
- 50) Mizushima N. Autophagy: process and function, *Genes.*, **21**, 2861-2873 (2007).
- 51) Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO. J.*, **19**, 5720-5728 (2000).
- 52) Sahani M.H., Itakura E., Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy*, **10**, 431-441 (2014).
- 53) Wu L., Feng Z., Cui S., Hou K., Tang L., Zhou J., Cai G., Xie Y., Hong Q., Fu B., Chen X.. Rapamycin upregulates autophagy by inhibiting the mTOR-ULK1 pathway, resulting in reduced podocyte injury. *PLOS ONE*, **8**, e63799 (2013).
- 54) Cai Z., Yan L.J. Rapamycin, autophagy, and Alzheimer's disease. *J. Biochem. Pharmacol. Res.* , **1**, 84-90 (2013).

謝 辞

本研究に際し、御指導、御鞭撻を賜りました 森川 敏生 教授 に衷心より感謝いたします。

実験を進めるにあたり、御懇篤なるご指導を賜りました 近畿大学 薬学総合研究所 村岡 修 客員教授に深謝いたします。

また、本研究を進めるにあたり、多大なる御助言、御討論下さいました東京工科大学 応用生物学部 正木 仁 教授、株式会社 CIEL 岡野 由利 博士、近畿大学 薬学部 田邊 元三 教授、近畿大学 薬学総合研究所 二宮 清文 准教授に深謝致します。

そして、日々の研究室生活および実験でお世話になった食品薬学研究室および有機薬化学研究室内の諸氏に心より感謝の意を示しお礼申し上げます。

最後に、本研究の機会を与えて頂いた 吉岡 正人 代表取締役 をはじめ、株式会社成和化成 に深く感謝いたします。