

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580161

研究課題名(和文) アミロイド性蛋白質を用いた抗アミロイドーシス性カテコール誘導体の分子モデリング

研究課題名(英文) Molecular modeling of anti-amyloidogenic catechol derivatives using amyloidogenic proteins

研究代表者

中村 宗一郎 (NAKAMURA, Soichiro)

信州大学・農学部・教授

研究者番号：00105305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：A β 、ApoAII、ヒト型シスタチン及びステフィンを標的アミロイドとして、天然中に存在する種々のカテコール基を有するフェノール化合物の抗アミロイド効果を広く調べるとともに、酵素を利用して長さや性質の異なる脂肪アルコール鎖や糖鎖を付加し、それらの修飾が抗アミロイド効果に及ぼす影響を調べた。また、セサミンのカテコール誘導体も実験に用いた。その結果、標的アミロイドに共通して、カテコール基が有効であること、フェノール化合物への糖鎖導入効果はないが、脂肪アルコール鎖については導入効果があり、その鎖長が重要であることが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：Molecular modeling of anti-amyloidogenic catechol derivatives was performed using Amyloid-beta, ApoA-II, human cystatin C and stefin B as model proteins. We prepared enzymatic lipophilized/glycosylated phenolic compounds in addition to mono- and di-catecholates of sesamin, and used for anti-amyloidogenic experiments. As the result, we found that there was a strong relationship between amphiphilicity and anti-amyloidogenic activity of tested phenolic compounds. We also found that lipophilic chain length introduced was an important factor in the anti-amyloidogenic activity of novel catechol derivatives.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：アミロイド性蛋白質 抗アミロイド効果 カテコール誘導体 分子モデリング 抗アミロイドーシス
食品素材

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会からの要請

超高齢化社会の到来により、アルツハイマー病に代表されるアミロイドーシス患者数は増加の一途をたどり、その数は日本国内でも~数万人に上ると推定されている。アミロイドーシスとは、本来正常に機能する蛋白質やペプチドの高次構造に何らかの異常が生じ、それが凝集し合うことでアミロイド線維状の蛋白質を形成し、それらが体内組織や細胞内に沈着し、機能不全やアポトーシスを起こす疾患のことを示している。アミロイドーシスには、アルツハイマー病の他、クロイツフェルト・ヤコブ病、プリオン病、透析アミロイドーシス、遺伝性アミロイド性脳出血、家族性アミロイドーシスなどが含まれている。これまでに種々のアミロイドーシス治療剤の創製が試みられてきたが、未だに効果的な治療薬の開発に至っていないのが現状である。こうして、本研究では、薬食同源という考え方に基づき、“食べて予防し、食して治す”という考え方に基づき、食品成分を起点にした安全な抗アミロイド剤の創製に資するための基礎的研究を行うことにした。

(2) 研究開始に至る経緯

これまでの研究で、多くのフェノール化合物には蛋白質のアミロイド線維化阻害効果があり(*Chem. Biol. Drug Des.*, 67, 27-37, 2006)、中でも、その抗アミロイドーシス効果にはカテコール構造が有効である(*J. Biol. Chem.*, 285, 149-14954, 2010)ことが明らかにされてきた。一方、著者らも当時、アミロイド性脳出血症の原因蛋白質であるヒト型シスタチンを用いて、朝鮮人参ジンセノサイド及び大豆イソフラボンの効果を調べ、 $A\beta$ やヒト型シスタチンのようなアミロイド性(アミロイド線維形成性)の蛋白質の線維状化を抑制するためには付加している糖の鎖長が重要な因子であることを見出していた。このような状況の中で、本研究では、酵素を用いた安全な方法で脂肪アルコール鎖や糖鎖が付加したカテコール誘導体を調製し、種々の標的アミロイドを用いてその効果を評価する研究に着手することにした。

2. 研究の目的

これまでの研究で、種々のフェノール化合物にはアミロイド線維の形成と沈着を阻害・抑制する効果があることが示されているが、未だに構造生化学的には不明な部分が多く残されているのが現状である。そこで本研究では、カテコール基を有するフェノール化合物を骨格に、長さや性質の異なる脂肪アルコール鎖や糖鎖を付加し、アミロイド性蛋白質である $A\beta$ 、ApoAII、シスタチン等の線維状化抑制効果を調べ、ヒトに安全な抗アミロイドーシス食品素材の創製へと繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 供試標的アミロイド

本研究では $A\beta$ (42aa)、ApoAII (79aa)、ヒト型シスタチン(120aa)及びヒト型ステフィン(98aa)を用いた。また、ApoAII については ApoAII 由来 N-末端側ペプチド(DMQLSFTQYFQ)及び C-末端側ペプチド(QLTPLVRSAGTSLVNFFS)も実験に用いた。 $A\beta$ 及び ApoAII 由来ペプチドはペプチド合成によって調製されたものを用いた。ApoAII は無細胞系発現系によって、ヒト型シスタチン及びステフインはピキア酵母発現系によってそれぞれ調製した。

(2) 供試カテコール及び誘導体の調製

アシル化及びグリコシル化
ジヒドロキシ安息香酸、カフェ酸及びケルセチンのように分子の一部にカテコール基を持つフェノール化合物をベースにリゾプス属カビ由来のリパーゼあるいは韃靼ソバ由来ルチナーゼやピフィズ菌由来 β グリコシダーゼによって長さや種類の異なる脂肪アルコール鎖あるいは糖鎖を付加したカテコール誘導体を作成した。酵素合成したフェノール化合物は、Inertsil ODS-3 カラムを用いた HPLC で分離精製を行い、 1H & ^{13}C -NMR スペクトル解析によって構造決定した。

亜臨界処理によるカテコール化

本研究では、亜臨界状態の水に着目し、セサミンの亜臨界水処理によるカテコール化を試みた。すなわち 50 mg の供試セサミンを 4.2 mL 容ステンレス製耐熱容器に入れ、脱気した超純水を 1.6 g 加えて密封後、亜臨界状態(200~300 °C)で所定の時間加熱処理した。カテコール化セサミンは HPLC で精製後、NMR で構造確認を行った。

(3) 抗アミロイド試験法

In vitro 系による抗アミロイド試験は、チオフラビン T (ThT) との反応性に加えて、Western-blotting 法を活用して標的アミロイドの変性度合を追跡した。すなわち、 $A\beta$ についてはサーマルサイクラーを用いて 37 °C で 24 時間インキュベーションし、その後、ThT を 5 μ M (終濃度) 加えてアミロイド線維形成量の測定を行った。また、透過型電子顕微鏡(TEM)観察及び抗 $A\beta$ 抗体を用いたドットプロット解析による検証も行った。さらに、新規に創製された抗アミロイド性カテコール誘導体については、老化促進マウス(SAMP8)を用いた検討も行った。

(4) 食品衛生学的試験法

今回の研究で有効性が確認されたカテコール誘導体については、サルモネラ菌を用いたエイムズテスト(Ames test)及び枯草菌を用いたレックアッセイ(Rec-assay)を用いて変異原性を調べ、さらに、マウスを用いた急性毒性についても調べた。

4. 研究成果

(1) 本研究での主要な研究成果

シスタチン及びステフィンの調製

著者らはこれまでの研究で人工的にヒト型シスタチンを調製することに成功している (*Bioconj. Chem.*, 15, 1289-1296, 2004)。本研究でもピキア言語を用いてヒト型ステフィンの cDNA を合成し、それをピキア酵母発現ベクター pPCIZα に導入し、そのベクターで *Pichia pastoris* を形質転換することによってヒト型ステフィンを調製した (*Biotech. Appl. Biochem.*, 60, 283-288, 2013)。

ApoAII の調製

本研究では完全長の ApoAII の発現に成功した。すなわち、マウスからクローニングした ApoA-II の cDNA を無細胞発現用ベクター pEU3b-MH17-1GST に挿入し、無細胞蛋白質合成系によって GST 融合 ApoA-II として発現させた。C¹⁴-Lue を標識としたオートラジオグラフィによって GST 融合 ApoA-II (34.7 kDa) の発現が確認されたので、Glutathione Sepharose 4B 担体と GST 融合蛋白質切断用プロテアーゼである PreScission protease (GE ヘルスケア) を用いたアフィニティー精製を行った。その結果、完全長の ApoA-II を切り出すことに成功した。完全長であることは N 末端のアミノ酸配列によって確認した。

カテコール化セサミンの抗アミロイド性

亜臨界水処理によって、モノカテコール体及びジカテコール体セサミンを効率良く生成できることが明らかにされた。収率は最大でそれぞれ 26.3% (300 °C, 250 sec) 及び 11.1% (300 °C, 270 sec) であった。カテコール化によってセサミンの抗アミロイド効果は著しく上昇し、図 1 に示すように、Aβ₁₋₄₂ に対する天然型セサミンのアミロイド線維形成抑制効果は 5.2% であったのに対してモノカテコール体及びジカテコール体の抑制効果は、それぞれ 34.8% 及び 60.3% であった。このような効果は、TEM 観察及び抗 Aβ 抗体を用いた実験によっても確認された。

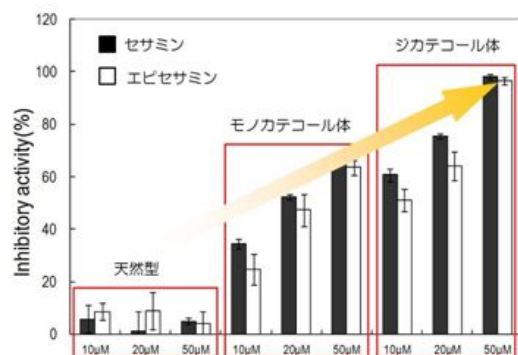


図1 カテコール化セサミンの抗アミロイド性

脂肪酸鎖導入効果, 糖鎖導入効果及びセサミンのカテコール化効果

標的アミロイド別にカテコール基を有するフェノール化合物の脂肪酸鎖導入(アシル化)や糖鎖導入(グリコシル化)による効果あるいはセサミンをカテコール化することの効果について調べた。ApoAII については、まず ApoAII 由来 N-末端側ペプチド(11aa)及び C-末端側ペプチド(18aa)を用いてアミロイド形成性についての実験を行った。その結果、ApoAII のアミロイド形成には C-末端側ペプチドが必須であることが明らかにされ、このペプチドで形成されたアミロイド線維フィブリル(シード)を完全長の ApoAII に加えると再現性の高いアミロイド形成が起こることも示された。こうして、以降の ApoAII に対する抗アミロイド試験には C-末端側ペプチドシードを用いることにした。

Aβ (42aa), ApoAII (79aa), ヒト型シスタチン(120aa)及びヒト型ステフィン(98aa)に対するカテコール基を有するフェノール化合物の脂肪酸鎖導入効果あるいは糖鎖導入効果及びセサミンのカテコール化効果について調べた結果をまとめて図 2 に示した。図示したように、どの標的アミロイドに対してもアシル化(Lipophilization)及びカテコール基の導入(Hydrolyzation)は効果的であるが、グリコシル化(Glycosylation)は抗アミロイド性を改善する効果に繋がらないことが示された。このことについては桂酸酸類へのアシル化及びグリコシル化を例にして詳細に検討した。その結果、標的アミロイドに共通して、糖鎖導入効果は見いだされなかったが、脂肪アルコール鎖については、一定の傾向が見られることが明らかにされた。すなわち、Aβ に対しては鎖長が長ければ長いほどより強い抗アミロイド効果がある(C4 < C8 < C16)が、ヒト型ステフィンに対しては至適鎖長がある(C4 < C8 < C16)ことが明らかにされた。以上のような効果は、培養細胞を用いたバイオアッセイ及び老化促進マウス SAM を用いた動物実験においても追認された。

Protein/peptide	Structural model	Effectiveness of modification		
		Lipophilization ^a	Glycosylation ^b	Hydrolyzation ^c
Aβ		↑	→	↑
Apo AII		↑	→	↑
Cystatin L68Q		↑	→	↑
Stefin B		↑	→	↑

^alipophilization with short chain; ^bGlycosylation with rutinose; ^cSub-critical water treatment

図2 カテコール基を有するフェノール化合物の抗アミロイド性及び各種修飾効果

(2) 食品衛生学的安全性及び今後の展望

平成 25 年度には抗アミロイド効果を示したフェノール化合物の食品衛生学的な安全

性についても検討した。その結果、エイムズテスト及びレックアッセイにおいて、脂肪アルコール鎖や糖鎖導入は供試菌株に対して殺菌及び静菌効果の増強を齎すが、新たな変異原性を引き起こすことはないということが確認された。また、マウスを用いた毒性試験では脂肪アルコール鎖は供試フェノール化合物のLD50を低くし、糖鎖導入はLD50を上昇させることも明らかにされた。本研究の過程では、ゴマリグナン的一种であるセサミノールには強い抗アミロイド性があることが明らかにされた(片山他:アミロイド形成阻害剤及びアミロイド形成阻害方法,特願2013-006296)。また、セサミノールを亜臨界水で処理すると、セサミンの場合と同様にカテコール化が起こり(中村他:セサミン分解物の製造方法及びアミロイド形成阻害剤,特願2010-250407),その抗アミロイド性は著しく上昇することも明らかにされた。

今後引き続き、今回の研究で得られた知見をもとに、カテコール基を有するフェノール化合物に着目した研究を継続して実施する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

Hazuki Kondo, Haruka Sugiyama, Shigeru Katayama, Soichiro Nakamura: Enhanced anti-amyloid activity of hydroxy cinnamic acids by enzymatic esterification with alkyl alcohols, *Biotech. Appl. Biochem.*(査読有), 印刷中 DOI: 10.1002/bab.1182

Shigeru Katayama, Rie Imai, Haruka Sugiyama, Soichiro Nakamura: Oral administration of soy peptides suppresses cognitive decline by induction of neurotrophic factors in SAMP8 mice, *J. Agric. Food Chem.* (査読有) 62, 3563-3569, 2014. DOI: 10.1021/jf405416s

Shigeru Katayama, Fumiaki Ohno, Yuki Yamauchi, Miyuki Kato, Hideo Makabe, Soichiro Nakamura: Enzymatic synthesis of novel phenol acid rutosides using rutinase and their antiviral activity in vitro. *J. Agric. Food Chem.* (査読有) 61, 9617-9622, 2013. DOI: 10.1021/jf4021703

Kosuke Nakamura, Yuki Maeda, Kensuke Morimoto, Shigeru Katayama, Kazunari Kondo, Soichiro Nakamura: Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in *Pichia pastoris* using codon optimization, *Biotech. Appl. Biochem.*(査読有) 60, 283-288, 2013. DOI: 10.1002/bab.1079

Shigeru Katayama, Hirofumi Ogawa, Soichiro Nakamura: Apricot carotenoids possess potent anti-amyloidogenic activity in vitro, *J. Agric. Food Chem.* (査読有) 59, 12691-12696, 2011. DOI: 10.1021/jf203654c

〔学会発表〕(計10件)

福本高大, 片山茂, 中林昌基, 山内陸, 中村宗一郎: A β , ApoA 及び stefin B を標的としたクロロゲン酸及びその代謝産物の抗アミロイド効果, 2014年度日本農芸化学会, 2014.3.27-30, 東京

杉山遥, 片山茂, 中村宗一郎: ゴマ由来セサミノールは生体内において α -セクレターゼの発現を上昇させる, 日本農芸化学会中部支部第168回例会, 2013.10.12, 名古屋

Kensuke Morimoto, Shigeru Katayama, Takahiro Fukumoto, Kosuke Nakamura, Soichiro Nakamura: Amyloidogenicities of artificially synthesized human stefins A and B, ISNFF 2012, 2012.12.2-6, Hawaii, USA

Haruka Sugiyama, Shigeru Katayama, Hirofumi Ogawa, Soichiro Nakamura: Anti-amyloid activities of apricot-derived carotenoids, ISNFF 2012, 2012.12.2-6, Hawaii, USA

Soichiro Nakamura, Shigeru Katayama: Molecular design of anti-amyloid phenolic compounds using amyloidogenic proteins and peptides, ISNFF 2012 (招待講演), 2012.12.2-6, Hawaii, USA

Takahiro Fukumoto, Shigeru Katayama, Akira Nozawa, Yuzuru Tozawa, Soichiro Nakamura: Production of Amyloidogenic ApoA-II by cell-free protein synthesis and its possible application, Protein Island Matsuyama International Symposium, 2012.9.25, Matsuyama, Japan

Soichiro Nakamura, Shigeru Katayama: Screening of naturally-occurring food compounds expecting prevention effects against amyloidosis containing Alzheimer-type dementia and modification of their functionalities by lipophilization, glycosylation, and partial hydrolysis, The 6th symposium for comparative studies on food intake and nutrition between Korea and Japan (招待講演), 2012.8.2, Jinju, Korea

小川紘史, 片山茂, 中村宗一郎: セサミン, エピセサミン及びそれらのカテコール誘導体のA β アミロイド線維形成抑制

効果，2012 年度日本農芸化学会，
2012.3.23-25，京都

Yuki Yamauchi, Shigeru Katayama, Soichiro Nakamura: Anti-viral activity of Rhamnoglycosylated phenolic compounds, The 5th Rare Sugar Congress, 2011.11.9-12, Kagawa, Japan

杉山遥，小川紘史，片山茂，中村宗一郎：
カテコール体セサミンの抗アミロイド効果，第4回食品薬学シンポジウム，
2011.10.28，東京

〔産業財産権〕出願状況（計 1 件）

名称：アミロイド形成阻害剤及びアミロイド形成阻害方法

発明者：片山茂，中村宗一郎，内山裕介

権利者：信州大学

種類：特許

番号：特願 2013-006296

出願年月日：平成 25 年 1 月 17 日

国内外の別：国内

6．研究組織

（1）研究代表者

中村 宗一郎（NAKAMURA, Soichiro）

信州大学・農学部・教授

研究者番号：00105305

（2）研究分担者

藤井 博（FUJII, Hiroshi）

信州大学・農学部・教授

研究者番号：90165340

（3）連携研究者

樋口 京一（HIGUCHI, Keiichi）

信州大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20173156