

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450153

研究課題名(和文)量子ドットプローブを用いたフェニルプロパノイド系抗アミロイド性新素材の分子設計

研究課題名(英文)Molecular design of novel phenylpropanoid-derived anti-amyloid compounds using quantum-dot probes

研究代表者

中村 宗一郎 (NAKAMURA, Soichiro)

信州大学・役員等・理事

研究者番号：00105305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢社会が進む中で、アミロイド線維の沈着によって引き起こされる疾病が大きな社会問題となりつつある。本研究では、自然界に普通に分布しているフェニルプロパノイド化合物に着目し、それらに、長さや性質の異なる糖鎖や脂肪酸鎖を付加した複合体ライブラリーを作成し、どのようにすれば抗アミロイド活性を高めることができるかについて検討した。抗アミロイド活性の測定には量子ドットで標識したアミロイド性ペプチドをプローブに用い、さらにハエと線虫を用いた実験も実施した。その結果、リパーゼによってエステル化したフェルラ酸とカフェ酸を新規抗アミロイド性化合物として提案することができた。

研究成果の概要(英文)：With the progress of super aging society, diseases caused by deposition of amyloid fibrils are becoming a social problem. In this study, I focused on phenylpropanoids that are widely distributed in nature, and tried to create novel active compounds linked with sugar chains or fatty acid chains of different chain length and hydrophobicity. And then, structure-function relationship was investigated to enhance their anti-amyloid activities. For measurement of anti-amyloid activity, amyloidogenic peptide-linked quantum dots was used as a probe. In addition, experiments using drosophila and nematode were also conducted. As a result, ferulic acid ester and caffeic acid ester synthesized by lipase were proposed as a novel anti-amyloid compound.

研究分野：食品化学

キーワード：量子ドットプローブ フェニルプロパノイド 脂肪酸エステル 抗アミロイド性新素材 生体系における効果

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会が進む中で、アミロイド線維の沈着によって引き起こされる疾病が大きな社会問題となっている。アミロイド線維は、変性したタンパク質分子が規則的に会合することによって形成される超分子複合体であり、様々な疾患の発症に深く関わっている。アミロイド線維が全身諸臓器の細胞内外に沈着することによって機能障害を引き起こす一連の疾患は、アミロイドーシスとよばれ、現在までにアルツハイマー病、透析アミロイドーシス、遺伝性アミロイド性脳出血症など多くの疾病が報告されている。この十数年間の生命科学分野の研究の進展によってアミロイドーシスに関する研究には著しい進展が見られた。しかしながら、アミロイド線維の生成機序、毒性及びその制御については多くの謎が残されたままであった。これまで、多くのフェノール化合物にアミロイド線維化を阻害する効果があることが示されてきたが、それらの効果は標的タンパク質によって大きく異なることも指摘されてきた。この研究領域では、構造活性相関や生体系での効果等、解明しなければならない課題が多く残されている状態であった。

## 2. 研究の目的

天然芳香族化合物にはアミロイド、インスリン、シスタチン、あるいはリゾチームといったアミロイド性ペプチドやタンパク質に対してそれらの線維化を防ぐ効果(抗アミロイド性)を示すものがあることが知られている。そこで本研究では、フェニルアラニンやチロシンを起源とし、天然中に豊富に分布している C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> 構造を基本骨格とするフェニルプロパノイド化合物に着目し、それらに、長さや性質の異なる糖鎖や脂肪酸鎖を付加した複合体ライブラリーを作成し、量子ドットで標識したアミロイド性ペプチドを用いて、新しいタイプの抗アミロイド性新素材の

分子設計を行うこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) フェニルプロパノイド複合体の調製

供試フェニルプロパノイドは桂皮酸及びその誘導体とし、複合体形成には我々が開発した酵素合成法(Katayama et al., J. Agric. Food Chem., 61, 9617, 2013; Kondo et al., Biotech. Appl. Biochem., 61, 401, 2014)を用いた。

### (2) 抗アミロイド性の測定

#### チオフラビン T (ThT) 法

供試物質と標的アミロイド性物質とを所定の温度でインキュベーションし、経時的に反応液 8 µL を取り出し、100 µM ThT 溶液 1.6 mL と混合後、励起波長 446 nm、蛍光波長 490 nm で測定した。こうして得られたデータから IC<sub>50</sub> 値を算出した。

#### 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察法

供試液 5 µL を 400 メッシュコロジオン膜にスポットし、1% PTA 溶液で染色した後、TEM (JEM-1400, JEOL, Japan) を用いて線維形成の状態を観察した。

#### 量子ドットプローブ法

図 1 に示すように、sulfo-EMCS をリンカーに用いて、量子ドット QD-PEG-NH<sub>2</sub> と N 末側にシステイン残基を付加した標的アミロイド性ペプチドあるいはタンパク質とを共有結合させた。これを量子ドットプローブとしてアミロイド線維の形成を励起波長 280 nm、蛍光波長 350 nm で追跡した。

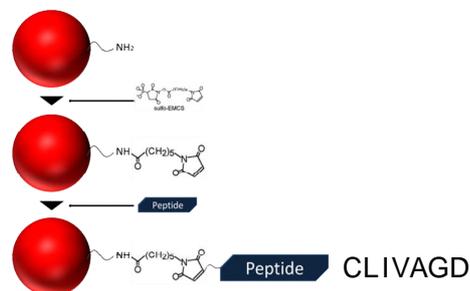


図1 ユニバーサルプローブの模式図

(3) 細胞及び動物を用いた実験

培養細胞及びニューロンを用いた実験

ヒト神経細胞腫由来 SK-N-SH 細胞及びマウス胎児の脳細胞から分離した初代培養細胞ニューロンを用いて、A オリゴマーが発する毒性に対する保護効果を調べた。

ハエ及び線虫を用いた実験

ハエの実験では、A 過剰発現ショウジョウバエ (GAL4-elav/+ & UAS-A 42/+) を用い、混餌投与が運動機能 (クライミング活性) に及ぼす効果を調べた。一方、線虫の実験では、*Caenorhabditis elegans* [fer-15(b26)II & fem-1(hc17)IV] を用い、混餌投与が寿命延長に及ぼす効果を調べた。

4. 研究成果

(1) 抗アミロイド性の改善効果

フェニルプロパノイド化合物に長さや性質の異なる糖鎖及び脂肪酸鎖を付加したものを供試物質として、それらの抗アミロイド性を ThT 法及び TEM 法によって調べた。標的アミロイド性物質には、アミロイド (A)、アポリポプロテイン II (ApoA-II)、ヒト型シスタチン L68Q (Cystatin L68Q) 及びヒト型ステフィン B (Stefin B) を用いた。その結果、表 1 に示すように、リポフィル化の有効性を確認することができた。

表 1 修飾法と抗アミロイド性改善効果との関係

標的	構造モデル	修飾法		
		リポフィル化	グリコシル化	カテコール化
A		↑	→	↑
Apo AII		↑	→	↑
Cystatin L68Q		↑	→	↑
Stefin B		↑	→	↑

(2) ユニバーサルプローブの創製

多様なアミロイド性ペプチド及びタンパク質に対して、アミロイド形成状態を高感度かつ定量的に測定することが可能な「ユニバ

ーサル量子ドットプローブ」の開発を試みた。

標的には A、Apo AII、Cystatin L68Q、Stefin B、インスリン及びリゾチームの 6 種類を用いた。文献情報をもとに種々のプローブを作成し、その効果を調べた。その結果、量子ドットに CLIVAGD から成るペプチドを付加したもの (図 1) をユニバーサルプローブとして提案することができた (特願 2015-126857)。

(3) 新規化合物の細胞に対する効果

次に、生体系での効果を調べた。その結果、フェルラ酸及びカフェ酸のエステル化による神経細胞保護作用の有意な改善効果が観察された。そこで、マウス初代培養ニューロンを用いて、遺伝子発現の状態を調べたところ、図 2 に示すように、分子シャペロン HSP70 の発現を誘導していることが認められた。

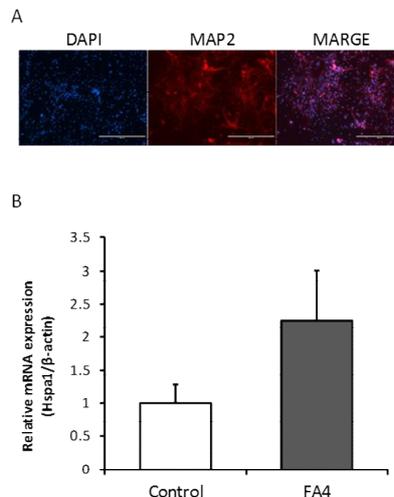


図 2 エステル化の HSP70 発現誘導効果に及ぼす効果

(4) 新規化合物の動物に対する効果

続いて、A 過剰発現ショウジョウバエの運動機能に及ぼす影響と線虫の寿命延伸に及ぼす効果を調べた。その結果、ハエの実験において、未修飾のフェルラ酸及びカフェ酸に比べエステル化すると供試ハエの運動機能の低下を有意に抑制できる (28.6% 40.0%) ことが明らかにされた。線虫の実験においても同様な効果が見られ、図 3 に示すように、特にフェルラ酸ブチルエステル

(FA4)及びカフェ酸ヘキシルエステル(CA6)では、有意な寿命延伸効果が示された。これらはいずれも安全な方法で調製されており、食品への応用も可能と考えられる。

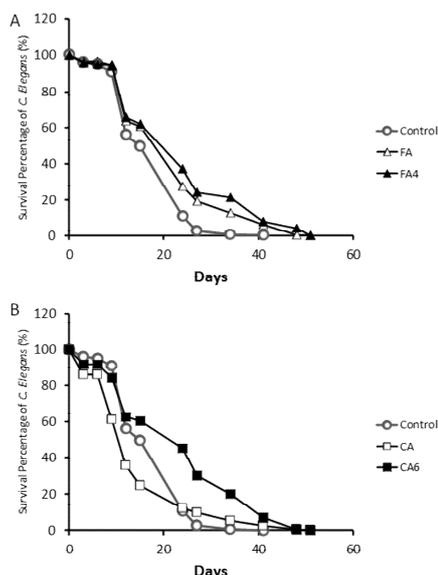


図3 エステル化の線虫の寿命延伸に及ぼす効果

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Lebetwa, N., Mitani, T., Nakamura, S., Katayama, S.: Role of phosphate groups on antiviral activity of casein phosphopeptide against feline calicivirus as a surrogate for norovirus, *J. Sci. Food Agric.*, 97 (6), 2017, 1939-1944

DOI: 10.1002/jsfa.7999 (査読有)

Heng, M.Y., Katayama, S., Mitani, T., Ong, E.S., Nakamura, S.: Solventless extraction methods for immature fruits: Evaluation of their antioxidant and cytoprotective activities, *Food Chem.*, 221, 2017, 1388-1393

DOI: 10.1016/j.foodchem. (査読有)

Katayama, S., Sugiyama, H., Kushimoto, S., Uchiyama, Y., Hirano, M., Nakamura, S.: Effects of sesaminol feeding on

brain A accumulation in a senescence-accelerated mouse-prone 8, *J. Agric. Food Chem.*, 64 (24), 2016, 4008-4013

DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01237(査読有)

Lee, K.O., Kim, E.H., Kim, G., Jung, J.Y., Katayama, S., Nakamura, S., Suh, J.Y.: Biophysical characterization of the domain association between cytosolic A and B domains of the mannitol transporter enzymes IIMT1 in the presence and absence of a connecting linker, *Protein Science*, 25 (10), 2016, 1803-1811

DOI: 10.1002/pro.2988 (査読有)

Katayama, S., Tazawa, S., Kassai, M., Mitani, T., Nakamura, S.: Intestinal immunomodulatory effects of a hypoallergenic buckwheat Fag e 1 prepared by Maillard-type glycation with a mannan type-polysaccharide, *Jpn J. Food Chem. Safety*, 23 (2), 2016, 72-79 (査読有)

Kondo, H., Sugiyama, H., Katayama, S., Nakamura, S.: Enhanced antiamyloid activity of hydroxy cinnamic acids by enzymatic esterification with alkyl alcohols. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61, 2014, 401-407

DOI: 10.1002/bab.1182 (査読有)

[学会発表](計20件)

Heng, M.Y., Katayama, S., Mitani, T., Ong, E.S., Nakamura, S.: Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of immature fruit extracts obtained by solvent-free extraction methods、日本農芸化学会2017年度大会、2017.03.18-20、京都

Bai, J., Ichikawa, N., Karasawa, K.,

Shirai, I., Sakai, T., Mitani, T., Katayama, S., Nakamura, S.: Agarar-oligosaccharide enhances tight junction of Caco-2 intestine epithelial cells、日本農芸化学会2017年度大会、2017.03.18-20、京都  
丹治典子、宮崎穂菜実、橋友理香、三谷壘一、米倉真一、片山茂、中村宗一郎：異なるモデル動物におけるエステル化フェルラ酸およびカフェ酸の抗老化作用、日本農芸化学会2017年度大会、2017.03.18-20、京都  
有村美紗、三谷壘一、片山茂、中村宗一郎：初代培養アストロサイトにおける味噌抽出物のBDNF産生促進効果、日本農芸化学会2017年度大会、2017.03.18-20、京都  
Katayama, S., Shimizu, A., Mitani, T., Maebuchi, M., Nakamura, S.: Effects of soy peptides on cognitive performance in senescence-accelerated mice and elderly people, ISNFF2016, 2016.10.9-12, Orlando, USA  
Shimizu, A., Mitani, T., Nakamura, S., Katayama, S.: Soybean-derived basic peptides enhance production of neurotrophic factor in primary cultured astrocytes, ISNFF2016, 2016.10.9-12, Orlando, USA  
Corpuz, H.M., Mitani, T., Katayama, S., Nakamura, S.: Amazake-derived peptides reduce H2O2-induced oxidative stress through the upregulation of the neuroprotective genes in SK-N-SH cells, ISNFF2016, 2016.10.9-12, Orlando, USA  
清水綾乃、有村美紗、前淵元宏、三谷壘一、片山茂、中村宗一郎：大豆由来塩基性ペプチドのBDNF産生促進効果、日本食品化学学会第22回総会・学術大会、2016.06.03、高知

Heng, M.Y., Ong, E.S., Mitani, T., Katayama, S., Nakamura, S.: Chemical profiling of whole Huanglian extract prepared by green technology using pressurized hot-water extraction system、日本食品化学学会第22回総会・学術大会、2016.06.03、高知  
Corpuz, H.M., Mitani, T., Katayama, S., Nakamura, S.: Modulation of neuroprotective genes by Japanese Amasake-derived bioactive peptides、第76回日本栄養・食糧学会大会、2016.05.14、西宮  
片山茂、大野史晃、三谷壘一、中村宗一郎：食物アレルギーおよび大腸炎モデルマウスに対するフェルラ酸ルチノシドの免疫調節作用、第76回日本栄養・食糧学会大会、2016.05.14、西宮  
清水綾乃、片山茂、前淵元宏、三谷壘一、中村宗一郎：大豆ペプチドに含まれる神経保護効果を有する機能性ペプチドの同定、日本農芸化学会2016年度大会、2016.03.28、札幌  
丹治典子、片山茂、三谷壘一、真壁秀文、中村宗一郎：フェルラ酸エステルHsp70発現誘導を介する神経細胞保護効果、日本農芸化学会2016年度大会、2016.03.28、札幌  
Katayama, S., Nakamura, S.: Modulation of neuroprotective genes by natural dietary bioactive compounds in senescence-accelerated mice, PacifiChem, 2015.12.17, Hawaii, USA  
Heng, M.Y., Ong, E.S., Katayama, S., Nakamura, S.: Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations, PacifiChem, 2015.12.17, Hawaii, USA  
Tanji, N., Katayama, S., Kondo, H.,

Nakamura, S.: Esterification can lead to an improvement of anti-amyloid effects and neuroprotective effects of cinnamic acid derivatives, ICAAI2014, 2014.11.20-21, Cheng Rai, Thailand  
中村宗一郎、片山茂、福本高大、山内陸、中林昌基、徳楽清孝: 種々のアミロイドジェニックペプチド及びタンパク質を用いた抗アミロイド性フェノール化合物の分子デザイン、日本食品化学学会第20回総会・学術大会、2014.05.21-23、東京  
中林昌基、片山茂、福本高大、徳楽清孝、中村宗一郎: 無細胞タンパク質発現系によるAPO-IIの完全長合成と量子ドットナノプローブ法への応用に関する研究、日本食品化学学会第20回総会・学術大会、2014.05.21-23、東京  
丹治典子、片山茂、中村宗一郎: 脂肪鎖導入によるフェノール性化合物の高機能化に関する研究、日本食品化学学会第20回総会・学術大会、2014.05.21-23、東京  
Nakamura, S., Katayama, S.:  
Anti-amyloidogenicities of catechol lignans converted from sesamin and sesaminol under subcritical water condition, The 105th Annual Meeting & Expo, 2014.05.06, San Antonio, USA

#### 〔産業財産権〕

出願状況（計3件）

名称：腸管保護剤及び腸管保護方法、医薬品、飲食品並びにタイトジャンクション関連因子発現促進剤

発明者：唐澤幸司、白井郁也、酒井武彦、三谷壘一、片山茂、中村宗一郎

権利者：伊那食品工業株式会社、信州大学  
種類：特許

番号：特願 2017-044560

出願年月日：平成 29 年 3 月 9 日

国内外の別：国内

名称：神経栄養因子の脳内分泌促進するための食品添加用組成物

発明者：片山茂、三谷壘一、中村宗一郎、前淵元宏

権利者：不二製油株式会社、信州大学

種類：特許

番号：特願 2016-041191

出願年月日：平成 28 年 3 月 3 日

国内外の別：国内

名称：アミロイド凝集性評価用汎用量子ドットナノプローブ

発明者：中村宗一郎、片山茂

権利者：上野製薬株式会社、信州大学

種類：特許

番号：特願 2015-126857

出願年月日：平成 27 年 6 月 26 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・役員等・理事

研究者番号：00105305

##### (2) 連携研究者

徳楽 清孝 (TOKURAKU, Kiyotaka)

室蘭工業大学・工学系研究科・准教授

研究者番号：00332106

樋口 京一 (HIGUCHI Keiichi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20173156