

平成30年6月22日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07426

研究課題名(和文) 神経変性保護作用を有するフェノール類配糖体の創製

研究課題名(英文) Enzymatic synthesis of novel rutinoid and its neuroprotective properties

研究代表者

片山 茂 (Katayama, Shigeru)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：30443922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経変性疾患予防剤の開発を目的として「生体吸収性に優れたフェノール類配糖体」を酵素合成法により創製し、神経栄養因子産生促進作用について検討した。ルチナーゼの逆反応を利用してルチンのルチノースをフェルラ酸に転移させることでフェルラ酸ルチノシド(FAR)を合成した。初代培養アストロサイトにFARを添加したところ、BDNF発現量は遺伝子・タンパク質ともに増加した。BDNFは神経細胞の生存・成長促進に寄与することから、FARは神経保護作用を有することが示唆された。一方、小腸上皮モデルCaco-2単層膜を用いた透過性試験により、FARはフェルラ酸よりも細胞膜透過性が向上することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Phenolic compounds are known to be efficient antioxidants; however, their use is often limited by their weak solubility either in hydrophilic or hydrophobic formulations. Thus, glycosylation of hydrophilic compound can be a potent strategy to alter their solubility. In the present study, we synthesized new phenol compounds using rutinase as transglycosidative enzyme and investigated its neuroprotective properties. Rutinoids were prepared using the reverse reaction of hydrolysis by rutinase. More than 10 kinds of phenolic compounds were successfully glycosylated by the reverse reaction of rutinase. The solubility and Caco-2 permeability of ferulic acid rutinoid (FAR) significantly improved by glycosylation with rutinose. FAR induced the upregulation of neuroprotection-related genes such as BDNF and NGF in mouse primary astrocytes. These results suggest that transglycosylation using rutinose is an effective method for preparing novel neuroprotective phenolic compounds.

研究分野：食品科学

キーワード：配糖体 神経変性疾患 神経栄養因子 BDNF 神経新生 フェルラ酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢化社会が進む中で、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の患者数は増大している。神経変性疾患とは、ある特定の神経細胞群が原因不明の障害を受けて脱落していく病気の総称であり、共通の病態として異常な構造を持つタンパク質凝集体が神経細胞に蓄積することが知られている。健常者は「分子シャペロン」や神経の免疫細胞である「ミクログリア」がアミロイドβ (Aβ) 等の異常タンパク質を速やかに除去するが、これらの作用は高齢化とともに低下し、神経変性が引き起こされる。この十数年の医学の進歩によって神経変性疾患に関する研究は著しい進展が見られたが、いまだ病態の十分な解明には至っておらず、根本的治療法は存在していないのが現状である。

(2) これまで、多くのフェノール性化合物に異常タンパク質の凝集阻害効果が示されてきたが、最近研究代表者は、神経細胞を用いた *in vitro* 試験により、ケール由来ポリフェノール (C₁₆H₂₈O₅ 及び C₁₈H₃₂O₆) やブチルカフェ酸 (C₁₃H₁₇O₆) が「分子シャペロン」Hsp70 の発現を増強させることを見出した。腸上皮モデル細胞 Caco-2 を用いた細胞膜透過性試験により、これらの化合物の生体吸収性を検討したところ、膜透過性は著しく低いことが判明した。神経変性疾患予防剤の開発には、候補化合物であるフェノール性化合物の生体吸収性を高める必要性が示唆された。研究代表者はこれまでに、酵素反応を用いた安全な方法で糖鎖や脂肪鎖を付加して、フェノール性化合物の親水性・疎水性を改変する手法を確立している。本手法は化合物のさらなる高機能化が可能となっており、糖鎖はキャリアとしての効果が見込まれることから、候補となるフェノール性化合物の生体吸収性の改変効果が期待できる。

(3) 上記の研究背景を踏まえて、これまでに得た候補化合物にキャリア分子となる糖鎖を付加することで、生体吸収性を高めたフェノール類配糖体を作製し、「神経細胞保護作用を有するハイブリッド型の神経変性疾患予防剤」の開発に取り組む。スクリーニング試験を通じて機能活性相関データを蓄積していくことで、構造最適化を図る。活性の高い構造を模範として天然素材から類似構造を探することも可能であり、本研究で得られる成果は機能性食品を超えて医薬品の開発に応用できる可能性を有している。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、神経変性疾患予防剤の開発を目的として、「生体吸収性に優れたフェノール類配糖体」を酵素合成法により創製し、初代神経細胞を用いたスクリーニング試験での構造活性相関データをもとに、リモデル

ングを繰り返し、構造最適化を図る。さらに動物実験により、*in vivo* での効果を検証し、その作用機序の解明を試みる。

(2) フェノール化合物の配糖体化では水への溶解性が改善することから、細胞透過性の向上も期待される。そこで本研究では、新たな機能性としてフェルラ酸ルチノシドの神経栄養因子産生促進作用について検討すると共に、フェルラ酸ルチノシドの細胞透過性を評価することを目的とした。フェルラ酸は抗酸化能や免疫調節作用など数多くの機能性が報告されており、ルチノシド化による細胞透過性の向上は機能性素材としての高度利用が可能となる。

3. 研究の方法

(1) フェルラ酸のルチノシル化は、ダットンソパ由来ルチナーゼの逆反応を利用してルチンのルチノースをフェルラ酸に転移させることで行った。ルチナーゼ、フェルラ酸およびルチンを 20 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) に懸濁し、40 °C で 24 時間振とう下でインキュベーションすることによりフェルラ酸ルチノシドを合成した(図1)。その後 Inertsil NH2 カラムを用いた HPLC により合成物を分離精製した。

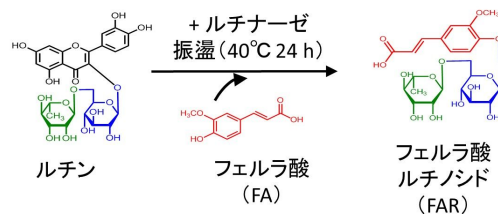


図1 フェルラ酸ルチノシド合成の概要

(2) BDNF 産生促進作用はマウス初代培養アストロサイトを用いた *in vitro* 試験により検討した。フェルラ酸ルチノシド (終濃度 50 μM) をマウス初代培養アストロサイトに添加 6 時間後、リアルタイム PCR 法により BDNF、NT-3 及び NGF の遺伝子発現量を測定した。タンパク質の発現解析は試料添加 48 時間後のセルライゼートを用いてウエスタンブロット法で行った。Caco-2 単層膜を用いた透過性試験では、Caco-2 細胞をトランスウェルに播種し、21 日間培養により得た単層膜を使用した。Caco-2 単層膜にフェルラ酸またはフェルラ酸ルチノシド (終濃度 50 μM) を添加し、37 °C で 3 時間インキュベーションした。下層の培地を回収後、凍結乾燥により濃縮後、HPLC により定量分析を行った。

(3) C57BL/6J マウスを用いて、腹腔内投与試験を行った。投与試験では、6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスをコントロール群 (PBS 投与)、フェルラ酸投与群 (50 mg/kg/day) 及びフェルラ酸ルチノシド投与群 (50 mg/kg/day) の合計 3 群に群分けした。腹腔内投与を 5 日間

連続で行った後、解剖を行った。脳海馬及び大脳皮質における神経栄養因子の発現量をウェスタンブロッティング法により解析した。さらにパラフィン包埋切片を作製し、組織蛍光免疫染色法により脳内における神経栄養因子及び神経細胞の局在を解析した。

4. 研究成果

(1) マウス初代培養アストロサイトにフェルラ酸ルチノシドを添加したところ、BDNF 発現量は遺伝子・タンパク質ともに増加することが示された。NGF においても発現は増加する傾向が認められたが、NT-3 では顕著な変化は認められなかった。神経栄養因子であるBDNF は神経細胞の生存および成長促進効果を有することから、フェルラ酸ルチノシドによる BDNF 産生促進は神経細胞保護に寄与することが期待される。

(2) 次に小腸上皮モデルとして Caco-2 単層膜を用いて透過性試験を行った。その結果、フェルラ酸およびフェルラ酸ルチノシドは経時的に下層側に透過することが示された。両者を比較すると、フェルラ酸ルチノシドの方がフェルラ酸よりも顕著に高い透過率を示した。フェルラ酸ルチノシドにおいては少量ではあるが、アグリコンであるフェルラ酸が下層に検出された。以上の結果より、フェルラ酸はルチノシル化により上皮細胞透過性が増加することが示唆された。

(3) フェルラ酸及びフェルラ酸ルチノシドを用いてマウスへの投与試験を行った。フェルラ酸の腹腔内投与(50 mg/kg/day)により、海馬での BDNF 遺伝子発現量はコントロール群と比較して1.3倍増加したが、統計学上の有意差は得られなかった。タンパク質レベルでの発現に関しても、増加は1.2倍程度に留まり、顕著な変化は認められなかった。一方、大脳皮質においては、コントロール群との変化は認められなかった。本研究の結果では、フェルラ酸ルチノシドの in vivo での BDNF 産生促進作用は認められなかったことから、今後は投与量及び投与期間の見直しにより、再度検討を行う予定である。

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3件)

Kushimoto Shoko, Uchibori Yuki, Yanai Shuichi, Makabe Hidefumi, Nakamura Soichiro, Katayama Shigeru. Kale supplementation up-regulates HSP70 and suppresses cognitive decline in a mouse model of accelerated senescence, *Journal of Functional Foods*, 44, 292-298, 2018,

査読有

DOI:10.1016/j.jff.2018.03.011

Katayama Shigeru, Ohno Fumiaki, Mitani Takakazu, Akiyama Hiroshi, Nakamura Soichiro. Rutinosylated Ferulic Acid Attenuates Food Allergic Response and Colitis by Upregulating Regulatory T Cells in Mouse Models, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 10730-10737, 2017, 査読有

DOI:10.1021/acs.jafc.7b03933

Katayama Shigeru, Sugiyama Haruka, Kushimoto Shoko, Yusuke Uchiyama, Masato Hirano, Nakamura Soichiro, Effects of Sesaminol Feeding on Brain A Accumulation in a Senescence-Accelerated Mouse-Prone 8, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 4908-4913, 2016, 査読有

DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01237

[学会発表](計6件)

松本果楠子, 三谷壘一, 中村宗一郎, 片山茂, フェルラ酸ルチノシドの BDNF 産生促進作用と Caco-2 細胞透過性(若手優秀発表賞ポスター発表部門), 日本食品化学学会第24回総会・学術大会, 2018.5.18, 東京

Kanako Matsumoto, Shigeru Katayama, Fumiaki Ohno, Takakazu Mitani, Soichiro Nakamura, Enzymatic synthesis of novel rutinoid using rutinase and its functional properties, III International Conference on Food Chemistry & Technology (国際学会), 2017.11.3, 米国
Shoko Kushimoto, Shigeru Katayama, Takakazu Mitani, Tomohiro Ohno, Soichiro Nakamura, Long-term dietary intake of kale extract attenuates cognitive impairment in senescence-accelerated mouse prone 8, III International Conference on Food Chemistry & Technology (招待講演)(国際学会), 2017.11.3, 米国

清水綾乃, 有村美紗, 前淵元宏, 三谷壘一, 片山茂, 中村宗一郎, 日本食品化学学会 第22回総会・学術大会, 2016.6.3, 高知

Shigeru Katayama, Brain Health Benefits by Natural Dietary Bioactive Compounds: A Mechanistic Exploration, 2016 International Symposium and Annual Meeting of The KSABC (招待講演)(国際学会), 2016.6.16, 韓国

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70回日本栄養・食糧学会大会, 2016.5.14, 兵庫

6 . 研究組織

(1)研究代表者

片山 茂 (KATAYAMA, Shigeru)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号 : 30443922

(3)連携研究者

真壁 秀文 (MAKABE, Hidefumi)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号 : 90313840

古屋 茂樹 (Furuya Shigeki)

九州大学 (連合) 農学研究科 (研究院) 教授

授

研究者番号 : 00222274