

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580156

研究課題名(和文) 食用植物からのアミロイド凝集阻害物質の探索と作用機序の解明

研究課題名(英文) Search for Inhibitors of Amyloid beta Aggregation from Edible Plants and Their Mechanism

研究代表者

繁森 英幸 (SHIGEMORI, Hideyuki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70202108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：サツマイモ、コーヒー等に含まれるカフェオイルキナ酸(CQA)に、アルツハイマー型認知症の毒素であるアミロイド(A β)凝集阻害活性があることを見出し、活性発現にはカテコール構造が重要であることを明らかにするとともに、その作用機構の解明を行った。また、A β 凝集阻害活性試験を指標にして、活性物質としてオリーブ等に含まれるフェニルエタノイド配糖体を見出した。さらに、得られたA β 凝集阻害活性物質には顕著な肝細胞増殖因子(HGF)促進活性を示すことを見出した。以上より、これらの化合物はA β 凝集阻害活性、抗酸化活性ならびにHGF産生促進活性をもつことで神経細胞保護作用を示すことを見出した。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is one of the most common forms of dementia. Amyloid β -proteins (A β) are considered to play an important role in the pathogenesis of AD. Caffeoylquinic acids (CQA) contained in the sweet potato and coffee, etc. exhibited potent inhibitory activity of the aggregation of A β . The catechol moiety in CQAs was indicated important role for the activity by structure-activity relationship of CQAs and related compounds. On the other hand, phenylethanoid glycosides included in the olive etc. were isolated as the active compounds using the A β aggregation inhibition test such as Thioflavin-T method. In addition, these A β aggregation inhibitors showed potent promotion activity of hepatocyte growth factor (HGF). Therefore, these bioactive compounds exhibit potent neuroprotective effect by their A β aggregation inhibitory activity, antioxidant activity, and HGF promotion activity.

研究分野：天然物化学

キーワード：アミロイド凝集阻害活性 アルツハイマー病 Th-T カフェ酸誘導体 HGF産生促進活性 サツマイモ
コーヒー 神経細胞保護作用

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、これまでにサツマイモ、プロポリス、コーヒー等に含まれるカフェオイルキナ酸(CQA)が、アルツハイマー型認知症(AD)の毒素であるアミロイド(A β)による神経細胞死を保護する作用のあること、また記憶障害モデルマウスを用いた経口投与実験で顕著な記憶障害改善作用のあることを見出した。さらに最近、CQA類にA β 凝集阻害活性があることを見出した。

2. 研究の目的

そこで本研究ではA β 凝集阻害活性におけるCQA類の構造活性相関を調べて活性発現に重要な部位を見出すことを目的とした。また、植物から新たなA β 凝集阻害物質を探索するとともに生物有機化学的手法を用いてCQA類や新たに見出したA β 凝集阻害物質の作用機序を解明することで、アルツハイマー型認知症に対する予防や治療薬開発の基礎研究に貢献することを目的とする。一方で、肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor; HGF)は、肝細胞などの様々な細胞の増殖を促進するのみならず、血管新生促進、抗アポトーシス作用などの多様な作用も知られている。したがって、HGFは肝硬変以外にも神経変性疾患など、様々な疾患の治療への応用が考えられており、とくに最近では、ADの治療への応用にも期待されている。そこで、A β 凝集阻害活性物質によるHGF産生促進活性を評価することも目的とした。

3. 研究の方法

(1)CQA類によるA β 凝集阻害活性および構造活性相関

サツマイモ茎葉やプロポリスから種々のCQA類を単離するとともに有機合成により、種々の類縁化合物を合成した。これらの化合物を用いてチオフラビン-T(Th-T)法を用いたA β 凝集阻害活性試験を行い、構造活性相関を調べた。また、顕著な活性が認められたCQA類について透過型電子顕微鏡(TEM)や円二色性(CD)スペクトル法を用いてA β 凝集阻害活性の評価を行った。

(2)CQA類によるA β 42オリゴマー形成への影響

近年、A β 42の凝集中間体であるオリゴマーが神経細胞毒性を示すことからA β 42オリゴマーがADの毒性本体と考えられている。そこでCQA処理によるA β 42のオリゴマー形成への影響を調べるためにウェスタンブロットングを行った。

(3)A β 凝集阻害活性試験を用いた種々の植物からの活性物質の探索

Th-T法を用いて食用植物や薬用植物から活性物質の単離構造決定を行った。この際上記の結果からカテコール構造を複数有する化合物に活性が認められたことからこのような構造を持つ化合物が含まれる植物材料を選別した。上記の活性試験によって選別さ

れた植物材料を水および有機溶媒で抽出分配し、活性画分を見出した。得られた活性画分を順相および逆相のカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過ならびにHPLC等を用いて分離・精製し、活性物質の単離を行った。得られた活性物質について、NMR、MS等の機器分析ならびに化学誘導反応等によりそれらの化学構造を明らかにした。

(4)ポリフェノール化合物のHGF産生促進活性の評価

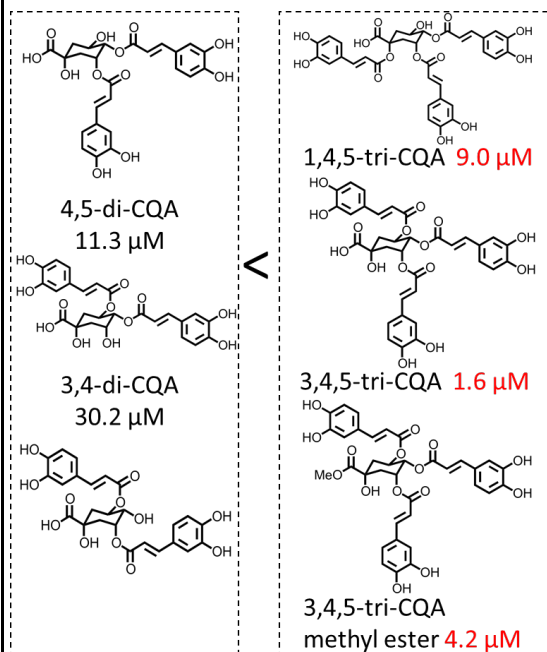
CQA類ならびにacteoside等のフェニルエタノイド配糖体を正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)に処理して、ELISA用プレートに抗HGF抗体を接着させプロッキングさせたものに添加した。これにビオチン化抗体ならびにストレプトアビジン標識HRPを添加し、酵素基質ABTSを添加することにより、HGF産生量を測定した。

4. 研究成果

(1)CQA類によるA β 凝集阻害活性および構造活性相関

CQA類によるA β 凝集阻害活性を評価するため、CQA類縁化合物および誘導体を用いてTh-Tアッセイを行った。その結果、quinic acid、cinnamic acidおよびdimethyl chlorogenic acidでは活性を示さなかった一方で、caffeic acidおよびchlorogenic acidではそれらより強い活性を示したことから、カフェオイル基およびフェノール性水酸基の存在が重要であることが明らかになった(図1)。

また、chlorogenic acid < 3,4-di-O-caffeoylquinic acid (3,4-di-CQA), 4,5-di-O-caffeoylquinic acid (4,5-di-CQA) <



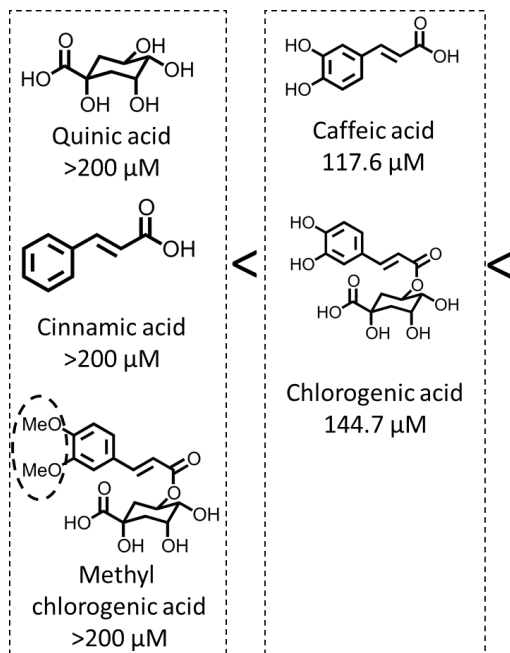


図 1. CQA 類の A₄₂ 凝集阻害活性

1,4,5-tri-*O*-caffeoylquinic acid (1,4,5-tri-CQA), 3,4,5-tri-*O*-caffeoylquinic acid (3,4,5-tri-CQA), 3,4,5-tri-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (3,4,5-tri-CQA methyl ester) の順に活性が強くなることから、カフェオイル基の結合数が増えるほど活性が強くなると考えられる。これら類縁化合物の中でも顕著な活性を示した 4,5-di-CQA および 3,4,5-tri-CQA に着目し、以降の実験を行った。

4,5-di-CQA および 3,4,5-tri-CQA を用いて条件を詳細に設定し A₄₂ 凝集体への影響を経時的に調べた。A₄₂ のみでは時間経過とともに蛍光値が増加した一方で、4,5-di-CQA および 3,4,5-tri-CQA を処理した際には濃度依存的な蛍光量の減少が認められた (図 2A)。

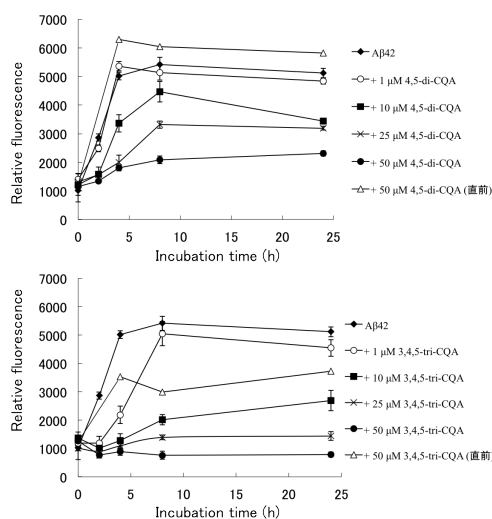


図 2. 4,5-di-CQA (上図) および 3,4,5-tri-CQA (下図) の A₄₂ 凝集阻害活性 (Th-T 法)

しかし Th-T 測定の前直前に 3,4,5-tri-CQA を処理した結果、同様に蛍光値の低下が見られたため、化合物が Th-T の蛍光自体を阻害している可能性が考えられた。そこで CQA が A₄₂ の凝集を直接阻害しているかを検証するため、TEM を用いて A₄₂ の凝集形態の変化を観察した。A₄₂ のみでは多数のフィブリルの形成が認められた一方で、4,5-di-CQA および 3,4,5-tri-CQA を処理することでフィブリルの形成がほとんど観察されなかったことから、CQA は直接的に A₄₂ の凝集を阻害していることが明らかになった (図 3)。

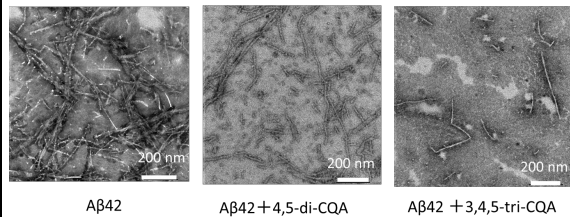


図 3. 4,5-di-CQA および 3,4,5-tri-CQA による A₄₂ 凝集形態変化の観察 (TEM)

(2) CQA 類による A₄₂ オリゴマー形成への影響

A₄₂ を 2 時間インキュベーションして遠心した上清を分析したところ、三量体の形成が認められた。一方 3,4,5-tri-CQA を処理したところ三量体の形成量に変化は見られなかった (図 4)。一方、A₄₂ による神経細胞毒性に与える影響を評価するため、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用いて MTT アッセイを行った。その結果、A₄₂ 単独処理では細胞生存率が減少したのに対し、CQA を共処理することで濃度依存的に細胞生存率が回復することがわかった。

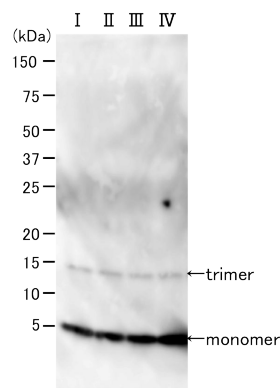


図 4. 3,4,5-tri-CQA による A₄₂ オリゴマー形成の影響 (ウェスタンブロッティング法)

I : A₄₂, II : A₄₂+quinic acid, III : A₄₂+3,4,5-tri-CQA, IV : A₄₂+3,4,5-tri-CQA

(3) A₄₂ 凝集阻害活性試験を用いた種々の植物からの活性物質の探索

Th-T法を用いて種々の植物からA凝集阻害活性物質の探索を行った結果、オリーブ等に含まれるフェニルエタノイド配糖体であるacteosideやoraposideに顕著な活性が認められた。そこで、部分構造であるcaffeic acidならびにhydroxytyrosolについて活性を調べたところ活性値は10分の1程度まで減ずることがわかった。さらにフェノール性水酸基をメチル化した化合物では全く活性が見られなかった。以上のことから複数のカテコール構造が活性発現には重要であることが明らかとなった(図5)。

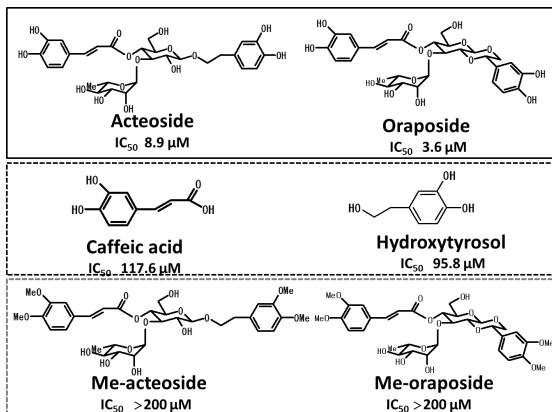


図5. フェニルエタノイド化合物のA凝集阻害活

(4)ポリフェノール化合物のHGF産生促進活性の評価

CQA類ならびにフェニルエタノイド配糖体を用いてHGF産生量を測定した結果、4,5-di-CQA、acteosideおよびcaffeic acidに有意なHGF産生量の増加が確認されたが、部分構造であるhydroxytyrosolやquinic acidには活性が認められなかった(図6)。以上のことから、カフェオイル基が活性発現には重要であることが示唆された。

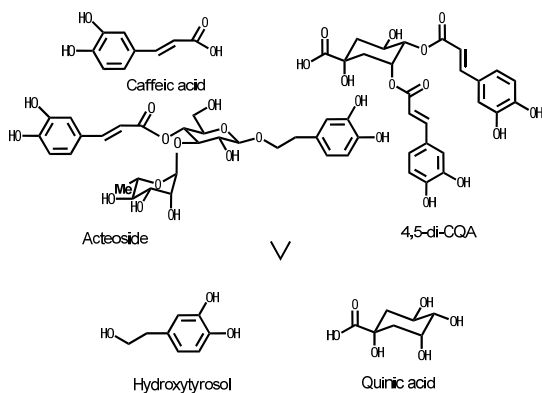


図6. ポリフェノール化合物のHGF産生促進活性

まとめ

本研究によりCQA類に顕著なA凝集阻害活性を有することを見出した。また構造活性相関からカフェオイル基を持たないキナ酸やカテコール構造部分のフェノール性水酸基を修飾した化合物では全く活性が認められない一方で、カフェオイル基を複数有するdi-CQAおよびtri-CQAでは強い活性を示したことからカテコール構造が活性発現には重要であることが示唆された。CQAを処理することにより、シート形成による毒性発現ではなく、非毒性コンホマーへと導かれる可能性が示唆された。Aの凝集機構として19番目、20番目のPhe残基におけるベンゼン環の電子平面が相互作用する π - π スタッキング効果がシート形成の駆動力となっていると考えられている。ポリフェノールの芳香環はAのPhe側鎖と π -スタッキングを形成することによりA同士の間をスタッキングを阻害すると推定されており、CQAによる阻害機構にも関与していると考えられる。また、オリーブ等に含まれるフェニルエタノイド配糖体に顕著なA凝集阻害活性が認められた。構造活性相関により、CQA類と同様にカテコール構造のフェノール性水酸基が活性発現に重要であることを見出した。一方で、CQA類やフェニルエタノイド配糖体に顕著なHGF産生促進活性を見出した。構造活性相関により、この活性発現にもカテコール構造のフェノール性水酸基が重要であることを見出した。以上の結果から、これまでの研究と併せて考察すると、CQA類やacteoside類のような桂皮酸誘導体は、A凝集阻害活性により、毒性オリゴマーの形成を抑制し、それらの抗酸化活性により、酸化ストレスを抑制し、さらにはHGF産生促進活性を持つことで抗アポトーシスを誘導して神経細胞保護作用を示すことが示唆された(図7)。CQA類は動物実験においても顕著な学習記憶障害改善効果を有することを見出している。また、CQA類やフェニルエタノイド配糖体はプロポリス、コーヒー、サツマイモ、オリーブ等の食品中に広く含まれることから、AD予防を目的とした機能性食品開発への応用が期待される。

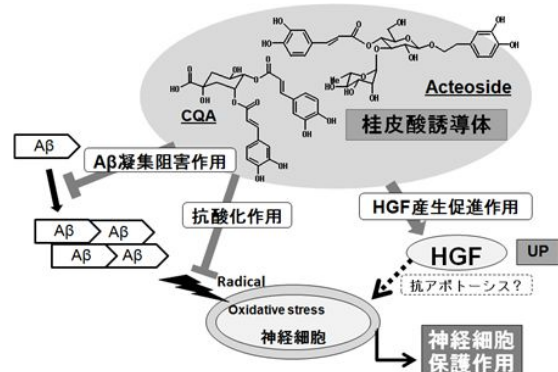


図7. 桂皮酸誘導体の神経細胞保護作用機構

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)

M. Kurisu, R. Nakasone, Y. Miyamae, D. Matsuura, H. Kanatani, S. Yano, and H. Shigemori, "Induction of hepatocyte growth factor production in human dermal fibroblasts by caffeic acid derivatives", *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有、**36**, 2018-2021 (2013). DOI:10.1248/bpb.b13-00596

R. Nakasone, M. Kurisu, M. Onodera, Y. Miyamae, D. Matsuura, H. Kanatani, S. Yano, and H. Shigemori, "Promoting effects on hepatocyte growth factor production of daphnane diterpenoids from *Daphne odora*", *Heterocycles*, 査読有、**87**, 1087-1092 (2013). DOI:10.3987/COM-13-12687

③M. Kurisu, Y. Miyamae, K. Murakami, J. Han, H. Isoda, K. Irie, and H. Shigemori, "Inhibition of amyloid β aggregation by acteoside, a phenylethanoid glycoside", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有、**77**, 1329-1332 (2013). DOI: 10.1271/bbb.130101

K. Sasaki, J. Han, H. Shigemori, and H. Isoda, "Caffeoylquinic acid induces ATP production and energy metabolism in human neurotypic SH-SY5Y cells", *Nutrition and Aging*, 査読有、**1**, 141-150 (2012). DOI: 10.3233/NUA-2012-0012

Y. Miyamae, M. Kurisu, K. Murakami, J. Han, H. Isoda, K. Irie, and H. Shigemori, "Protective effects of caffeoylquinic acids on the aggregation and neurotoxicity of the 42-residue amyloid β -protein", *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、**20**, 5844-5849 (2012). DOI:10.1016/j.bmc.2012.08.001

[学会発表](計15件)

Yukine Aihara and Hideyuki Shigemori, Search for Amyloid β Aggregation Inhibitors from *Inonotus obliquus*, Graduate Conference on Agricultural Biotechnology 2015, March 5-8, 2015, Central Luzon State University, Philippine

繁森英幸、栗栖真奈美、中曽根理絵、小野寺愛実、宮前友策、松浦大輔、金谷裕敏、谷野伸吾、植物由来化合物のHGF産生促進作用、第12回日本機能性食品医学学会総会、2014年12月14日、京都国際会館、京都

Gandan Jiang, Mei Lin Zhang, Mio Takase, Hideyuki Shigemori, Study on Inhibitory Activity

of Amyloid β Aggregation by Kukoamines, Ag-ESD Symposium 2014, November 13, 2014, University of Tsukuba, Tsukuba

繁森英幸、中曽根理絵、栗栖真奈美、小野寺愛実、宮前友策、松浦大輔、金谷裕敏、谷野伸吾、ジンチョウゲ由来 Daphnane 型ジテルペンの肝細胞増殖因子産生促進作用、第58回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、2014年9月20日、和歌山大学、和歌山

高瀬 澗、木立恵利、栗栖真奈美、竹田亜矢、中曽根理絵、宮前友策、村上一馬、入江一浩、繁森英幸、植物由来ポリフェノールのアミロイド凝集阻害活性、新規素材探索研究会第13回セミナー、2014年6月6日、新横浜フジビューホテル、横浜

繁森英幸、栗栖真奈美、中曽根理絵、宮前友策、松浦大輔、金谷裕敏、谷野伸吾、植物由来カフェ酸誘導体の肝細胞増殖因子産生促進活性、日本農芸化学2014年度大会、2014年3月29日、明治大学生田キャンパス、神奈川

川口あゆみ、繁森英幸、担子菌類からの機能性成分の探索、第24回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会、2013年11月15日、日立シビックセンター、茨城

繁森英幸、宮前友策、栗栖真奈美、村上一馬、入江一浩、韓 峻奎、磯田博子、食品由来カフェオイルキナ酸の神経細胞保護効果、第11回日本機能性食品医学学会総会、2013年12月8日、東京海洋大学、東京

木立恵利、栗栖真奈美、宮前友策、村上一馬、入江一浩、繁森英幸、植物由来カフェ酸誘導体のアミロイド凝集阻害活性に関する研究、第3回植物生理科学研究会、2013年7月13日、神戸天然物化学株式会社バイオリサーチセンター、神戸

木立恵利、栗栖真奈美、宮前友策、村上一馬、入江一浩、繁森英幸、植物由来カフェ酸誘導体のアミロイド凝集阻害活性に関する研究、新規素材探索研究会第12回セミナー、2013年6月7日、新横浜フジビューホテル、横浜

Eri Kidachi, Manami Kuisu, Yusaku Miyamae, Kazuma Muakami, Kazuhiro Irie, and Hideyuki Shigemori, Research the inhibitory activity on amyloid- β aggregation of pheolic compounds, 5th AG-BIO/PERDO Graduate Conference on Agricultural Biotechnology and KU-UT Joint Seminar II, December 9-12, 2012, Kasetsart University, Thailand

中曽根理絵、栗栖真奈美、小野寺愛実、宮前友策、松浦大輔、金谷裕敏、谷野伸吾、繁森英幸、ジンチョウゲ科植物から単離した Daphnane 型ジテルペンの HGF 産生促進活性、第 23 回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会、2012 年 11 月 30 日、日立シビックセンター、茨城

繁森英幸、宮前友策、栗栖真奈美、猪川 喬、村上一馬、入江一浩、韓 峻奎、磯田博子、干しいもに含まれるカフェオイルキナ酸のアルツハイマー症予防効果、第 23 回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会、2012 年 11 月 30 日、日立シビックセンター、茨城

栗栖真奈美、宮前友策、木立恵利、村上一馬、Han Junkyu、磯田博子、入江一浩、繁森英幸、植物由来桂皮酸誘導体のアミロイド凝集阻害活性に関する研究、第 2 回植物生理科学シンポジウム、2012 年 7 月 14 日、北海道大学、札幌

栗栖真奈美、宮前友策、木立恵利、村上一馬、Han Junkyu、磯田博子、入江一浩、繁森英幸、寄生植物由来化合物のアミロイド凝集阻害活性に関する研究、新規素材探索研究会第 11 回セミナー、2012 年 6 月 8 日、新横浜フジビューホテル、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

繁森 英幸 (SHIGEMORI, Hideyuki)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：7 0 2 0 2 1 0 8

(3) 連携研究者

入江 一浩 (IRIE, Kazuhiro)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：0 0 1 6 8 5 3 5