

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850080

研究課題名(和文) 伝統生薬チョウトウコウに含まれるアミロイド オリゴマー化抑制物質の同定と作用機構

研究課題名(英文) Identification of amyloid beta aggregation inhibitors in a traditional herbal medicine Uncaria rhynchophylla and their inhibitory mechanism

研究代表者

村上 一馬 (Murakami, Kazuma)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80571281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の原因物質であるアミロイド (A<sub>42</sub>)のオリゴマー化(凝集)を阻害する薬剤は、AD治療・予防薬として有望である。このことから、天然物や機能性食品成分を中心にA<sub>42</sub>の凝集阻害剤の探索研究が世界中で行われている。本研究では、伝統生薬チョウトウコウのアセトン抽出物の凝集抑制能に着目し、カフェ酸トリテルペノイドエステルであるウンカリン酸A-Dを活性物質の一部として同定した。これらの化合物は、A<sub>42</sub>凝集抑制物質としては新しい骨格をもつ。またオリゴマー形成に不可欠な核形成過程を選択的に抑制することから、線維伸長過程を抑える従来の凝集阻害剤とは異なる性質をもつことが判明した。

研究成果の概要(英文)：The 42-mer amyloid  $\beta$ -protein (A<sub>42</sub>), a causative agent of Alzheimer's disease (AD), oligomerizes (aggregates) to show neurotoxicity. Therefore, inhibitors of A<sub>42</sub> aggregation including natural products and functional food ingredients are promising agents for the therapeutics of AD. We identified uncarinic acids A ~ D from Uncaria rhynchophylla, a Chinese medicinal herb, as active components for the inhibition of A<sub>42</sub> aggregation. Uncarinic acid A ~ D are triterpenoid caffeate ester, which are novel type of aggregation inhibitors. In the aggregation process of A<sub>42</sub>, they inhibited the nucleation phase required for A<sub>42</sub> oligomerization, rather than the extension phase for its fibril elongation, which is a target of typical aggregation inhibitors like catechol-type flavonoids.

研究分野：生物有機化学

 キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 凝集 漢方生薬 単離構造決定 チョウトウコウ トリテルペン N  
MR

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は、代表的な神経変性疾患であり、最も早期に現れる病理学的特徴として老人斑が知られている。本疾患の発症には、老人斑の構成成分であるアミロイド  $\beta$  ペプチド ( $A\beta$ ) が関与するとする「アミロイド仮説」が広く受けられている。 $A\beta$  には主に 40、42 残基からなる  $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$  が存在し、 $A\beta_{42}$  が高い凝集能及び神経細胞毒性を示すことより、AD 発症に重要な役割を果たしている。近年、準安定な凝集中間体であるオリゴマー (2 あるいは 3 量体を基本単位とした 2 ~ 24 量体) が毒性本体と指摘されていることから、 $A\beta_{42}$  オリゴマーを標的とした薬剤の開発競争が世界中で行われている。近年、本仮説に基づいて中期~末期の AD 患者を対象とした臨床試験 (ワクチン免疫療法等) が行われているが、いずれも病状の進行を遅らせることはできず、あまり良い結果は得られていない (Mullard, A. *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 657)。しかしながら、本結果は「アミロイド仮説」を否定するものではなく、 $A\beta_{42}$  オリゴマーの蓄積が始まるとされる 40 代頃からの予防の必要性を強く示唆している。

AD は生活習慣病の一つと考えられていることから、食品やサプリメント等による AD 予防に対する国民の関心は高い。本研究代表者らはこれまで、マリアアザミ種子のメタノール抽出物であるシリマリニンに顕著な抗 AD 活性があることを動物実験で報告した (Murata, N. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 2299)。また、活性本体の一つとしてカテコール系フラボノイドであるタキシフォリン (図 1) を同定するとともに、タキシフォリンは、溶存酸素により酸化された *o*-キノンが  $A\beta_{42}$  の 16 番目あるいは 28 番目のリシン残基 (Lys16, 28) と直接共有結合 (マイケル付加) することにより凝集を抑制していることを初めて明らかにした (図 1: Sato, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 23212)。一方、非カテコール系のクルクミン (図 1) は、 $A\beta_{42}$  の Phe19, 20 を介した芳香環どうしの  $\pi/\pi$  スタッキング等によって、凝集を阻害することが判明している (Masuda, Y. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5967)。これらの結果より、 $A\beta_{42}$  の凝集抑制には、「カテコール構造」と「平面性」という 2 つの構造因子が少なくとも必要である可能性が示唆された。そこで本

研究代表者らは、より高い活性をもつ抑制物質を広く天然物に求めることで本知見を検証し、より優れた  $A\beta_{42}$  凝集抑制物質を同定しようという着想に至った。

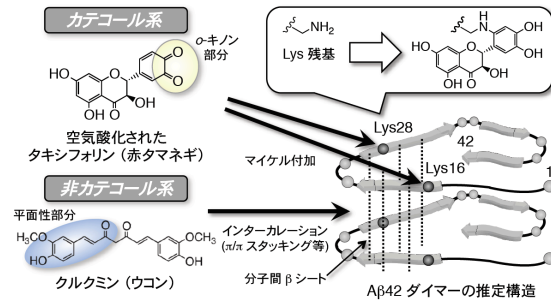


図 1 カテコール系ならびに非カテコール系フラボノイドによる  $A\beta_{42}$  の凝集阻害機構。  $A\beta_{42}$  の凝集体において、Gln15~Ala21 及び Val24~Ile32 領域が分子間  $\beta$  シート構造の形成に参与している (Murakami, K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15168)。

## 2. 研究の目的

近年、本研究代表者らは、伝統的な生薬であるチョウトウコウ (図 2: アカネ科カギカズラ *Uncaria rhynchophylla* におけるかぎ状の茎刺部) のアセトン抽出物が、 $A\beta_{42}$  の凝集能を顕著に抑制することを見いだした。しかしながら、チョウトウコウの主成分であるインドールアルカロイド類はいずれも不活性であった。本研究は、チョウトウコウに含まれる  $A\beta_{42}$  凝集抑制活性をもつ成分を単離・構造決定し、その作用機構を分子レベルで解明することを目的としている。さらに、カテコール構造を機軸とした凝集阻害剤を設計・合成し、凝集抑制活性を調べた。



図 2 チョウトウコウ (釣藤鉤: アカネ科カギカズラ *Uncaria rhynchophylla* におけるかぎ状の茎刺部)

### 3. 研究の方法

#### (1) チョウトウコウに含まれる A $\beta$ 42 凝集抑制活性成分の同定

チョウトウコウのアセトン抽出物を酢酸エチルと水に分配し、シリカゲルクロマトグラフィーを用いて、トルエン、酢酸エチル/トルエン (1:1)、酢酸エチル、クロロホルム/メタノール (1:1) 溶出物にそれぞれ分画し、スクリーニングに供した。凝集抑制能は、チオフラビン T 蛍光法によって評価した。活性を示した画分は、各種 ODS カラムによってさらに精製した。A $\beta$ 42 凝集抑制能を示した物質について、NMR, MS 等による各種機器分析を行い、構造決定した。

#### (2) チョウトウコウの活性成分による A $\beta$ 42 凝集抑制機構の NMR による解析

標識 A $\beta$ 42 (25  $\mu$ M) を用いて、活性化化合物存在下 (500  $\mu$ M) あるいは非存在下での 2次元  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST-HSQC スペクトルを比較した。化学シフトの変化から活性化化合物と A $\beta$ 42 における相互作用部位を推定できる。本測定は、医薬基盤研究所 (大阪府茨木市) の共通機器である 800 MHz の NMR 装置 (Bruker 社製, クライオプローブ装置 AVANCE II) を外部利用した。

#### (3) カテコール構造を機軸とした新しい A $\beta$ 42 凝集阻害剤の合成と活性評価

A $\beta$ 42 への親和性が高い化合物として、高い自己認識能を有することが知られている A $\beta$ 16-20 (KLVFF; Watanabe, K. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 290, 121) に着目し、カテコール構造を含む 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) で Lys16 を置換した A $\beta$ 16-20 誘導体を合成した。続いて、凝集抑制能を項目(1)と同様に、チオフラビン T 蛍光法で評価した (A $\beta$ 42 : 25  $\mu$ M, 誘導体 : 50  $\mu$ M)。

### 4. 研究成果

#### (1) チョウトウコウに含まれる A $\beta$ 42 凝集抑制活性成分の同定

中国湖南省で採集されたチョウトウコウ (かぎ状の乾燥茎刺部, 乾燥重量 500 g) のアセトン抽出物を濃縮し、酢酸エチルと水で分配した。得られた酢酸エチル可溶区 (5.7 g) について、A $\beta$ 42 の凝集能に対する抑制

活性を指標にして、各種クロマトグラフィーにより分画した。その結果、各種機器分析 (NMR, MS, IR, 旋光度) より、トリテルペノイドエステルであるウンカリン酸 A (0.8 mg), B (1.1 mg), C (2.0 mg), D (2.4 mg) の 4 種類を単離・同定した (図 3)。これらはいずれも既知化合物であった (Lee, J. S., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1429-1432; Lee, J. S., *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 753-756)。一方、チョウトウコウの主成分であるイソリンコフィリンには凝集抑制能はなく、本研究によってチョウトウコウに含まれる凝集抑制物質の一部が初めて明らかになった。ウンカリン酸 A~D のようなトリテルペノイドとフェルラ酸構造からなる化合物は、新しいタイプの A $\beta$ 42 凝集抑制物質である。

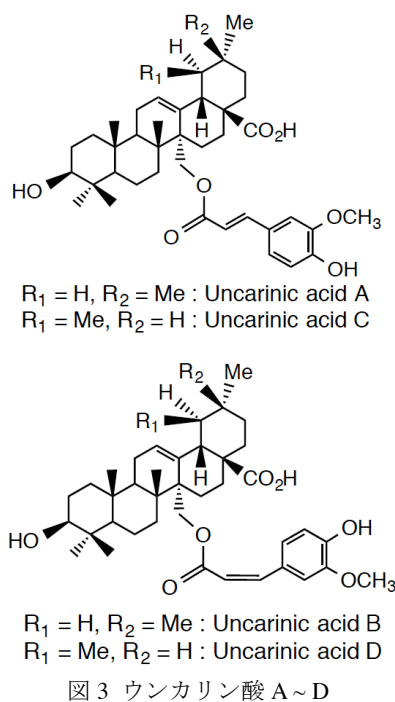


図 3 ウンカリン酸 A~D

ところで、A $\beta$ 42 の凝集過程は、通常、反応がゆっくりと進行する「核形成過程」と形成された線維が連鎖的に伸長する「アミロイド線維伸長過程」からなると考えられている (図 4)。そこで、ウンカリン酸類がいずれの過程に作用しているか明らかにする目的で、凝集核存在下 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で凝集抑制試験を行った。その結果、ウンカリン酸類は凝集の初期段階である核形成過程を選択的に抑えることから、線維伸長過程を抑制する従来の凝集阻害剤とは異なる作用機構をもつことが明らかになった。

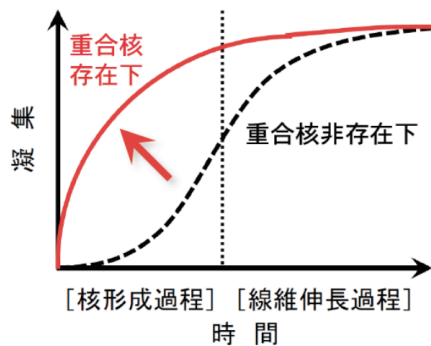


図4 Aβ42凝集の重合核依存モデル (内木ら, 薬学雑誌, 2010, 130, 503). 凝集核が存在する条件下では, Aβ42は核形成過程を経ることなく, 直接線維伸長過程に進む(実線). すなわち, 予め調製した凝集核を添加することによって, 線維伸長過程のみを観察できる.

### (2) チョウトウコウの活性成分による Aβ42 凝集抑制機構の NMR による解析

ウンカリン酸類はカテコール構造をもたないことから, 先行研究(項目1)のタキシフォリンのように Aβ42 のリシン残基に直接共有結合する可能性は低い. そこで, ウンカリン酸類が作用する Aβ42 の領域を調べることが目的として, 溶液 NMR を測定した. Aβ42 は凝集速度が速いことから, 低温条件下 (4 °C) で SOFAST 法を用いることよって, Aβ42 の 2 次元 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N SOFAST-HSQC スペクトルを短時間 (1 時間以内) で得ることができた. 予備的に, 過剰量 (20 倍量) のウンカリン酸 D を Aβ42 溶液に添加して測定したところ, Aβ42 モノマーの分子間 β シート形成に関わる領域を含んだ複数のアミノ酸残基 (Asp7, Lys16 等) と相互作用していることを示唆するデータを得た. ウンカリン酸類による, 核形成過程の特異的な凝集阻害機構を一部説明できる可能性がある. ただし, ウンカリン酸類の濃度を変えて詳細に検討する必要がある.

### (3) カテコール構造を機軸とした新しい Aβ42 凝集阻害剤の合成と活性評価

先行研究(項目1)から, 化合物の「カテコール構造」は Aβ42 のリシン残基へのマイケル付加反応において, 不可欠である. そこで, Aβ42 への親和性が高い化合物として, 高い自己認識能を有することが知られている Aβ16-20 (KLVFF: Watanabe, K. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 290,

121) の Lys16 残基を, カテコール構造を含む 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) で置換した Aβ16-20 誘導体(図5)を合成し, Aβ42 の凝集能への影響を調べた. その結果, 本誘導体は Aβ42 の凝集活性を強く抑制することがわかった. 以上の結果より, Aβ42 凝集阻害剤の設計における, 「カテコール構造」と「平面性」等の Aβ42 への親和性因子の重要性について, プルーフオブコンセプトの基盤が得られた.

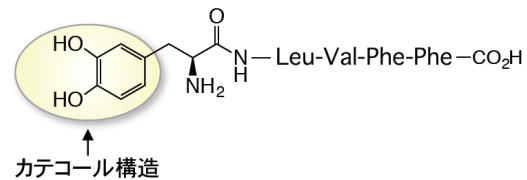


図5 L-DOPA で Lys16 を置換した Aβ16-20 誘導体

### 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 0 件)

なし

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 村上一馬: アミロイド β を標的としたアルツハイマー病の新しい治療戦略, 日本農芸化学会中部支部 第 172 回例会 若手シンポジウム 化学の視点から拓く天然物・生命科学研究, 「信州大学農学部 (長野県南箕輪村)」, 平成 26 年 11 月 22 日 【招待講演】.
- (2) Murakami, K., Ido, K., Sato, M., Yamaguchi, K., and Irie, K.: Inhibitors for Aβ42 aggregation in a traditional herbal medicine *Uncaria rhynchophylla*. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2014 in Copenhagen, Denmark, July 14, 2014.
- (3) 村上一馬, 井戸恭平, 佐藤瑞穂, 山口加乃子, 入江一浩: 伝統生薬チョウトウコウに含まれるアミロイド β の凝集抑制物質, 2014 年度日本農芸化学会大会, 「明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市)」, 平成 26 年 3 月 29 日.
- (4) 村上一馬, 佐藤瑞穂, 入江一浩: ポリフェノールによるアミロイド β42 の凝集抑

制機構，第6回タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会，「京都大学原子炉実験所（大阪府熊取町）」，平成25年11月14日【招待講演】。

- (5) 村上一馬，佐藤瑞穂，入江一浩：ポリフェノールによるアミロイドβの凝集阻害機構，第3回生理化学ユニットシンポジウム，「京都大学楽友会館（京都府京都市）」，平成25年7月2日【招待講演】。

〔図書〕（計0件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻  
生命有機化学分野ホームページ

<http://www.orgchem.kais.kyoto-u.ac.jp/>

京都大学教育研究活動データベース

<http://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/zP8kX>

アウトリーチ活動

入江一浩，村上一馬，久米利明：化学を武器にアルツハイマー病に挑む，京都大学アカデミックデイ2014，「京都大学百周年時計台記念館（京都府京都市）」，平成26年9月28日。

<http://research.kyoto-u.ac.jp/academic-day/2014/38/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 一馬 (MURAKAMI, Kazuma)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：80571281

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし