

令和元年6月20日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01909

研究課題名(和文) シソ科植物の成分に基づく新規アミロイド凝集阻害物質の開発とその分子機構

研究課題名(英文) Development of novel amyloid-beta aggregation inhibitors based on the constituents of *Perilla frutescens* var. *crispa*, and their mechanism of action

研究代表者

上井 幸司 (UWAI, KOJI)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80347905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：化学合成したロスマリン酸誘導体のアミロイド(A β)凝集阻害活性を微量ハイスループットスクリーニング(MSHTS)法およびThT法による評価と、A β と誘導体間のドッキングシミュレーションを行なった。その結果、高活性化合物の構造的特徴は、疎水性基とフェノール性水酸基を併せ持ち、一般的な中枢神経系に作用する薬物と近い疎水性を示した。また、2つの評価法から得られた結果の違いから、構造により活性発現機構が異なることが示唆されたため、生化学および分光学的手法により詳細な機能解析を行い、A β 凝集段階の初期を抑制する化合物群と中程度の大きさの凝集対向士の凝集を抑制する化合物群に分類することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病(AD)の原因の一つである患者の脳内でのアミロイド(A β)タンパクの凝集・蓄積を強く阻害するアオジソの、主要な活性成分の一つであるロスマリン酸をもとにした様々な誘導体を合成し、その凝集阻害機構を検討した。その結果、ロスマリン酸誘導体の構造の違いにより、凝集体の中でも脳の神経細胞に対して強い毒性を示す可溶性オリゴマーの形成に影響することが明らかになった。ADの患者数は世界的に増加し続け、その克服が喫緊の課題となっているが、現状では対症療法しかなく、根本的な治療法が求められている。本研究で得られた新しい物質はADの予防や治療、またAD発症の原因研究に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, amyloid-beta aggregation inhibitory activities of synthesized rosmarinic acid derivatives were evaluated by micro-litter high-through put screening system (MSHTS) and ThT method, and docking simulation between A β and the derivatives were also studied. Results suggested that the compounds showed higher activity owned both lipophilic moiety and phenolic hydroxyls and their CLogP values were nearly equal to values of general drugs acted to central nervous system. Considering the difference of the activities obtained by two different methods (MSHTS and ThT), the derivatives showed the activity by two different mechanisms based on their chemical structure. The additional detailed biochemical and spectroscopic studies, the derivatives were divided to two groups: one was the compounds that inhibited the initial stage of the aggregation and another was the compounds that inhibited the aggregation between middle size aggregates.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド ロスマリン酸 凝集阻害 シソ 構造活性相関

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に入り、2030年代には65歳以上の人口が我が国の総人口の1/3を占めるようになると言われている。それに伴い認知症患者の数も増加し、2030年には約350万人に達するとみられている。なかでも1990年以降、アルツハイマー病(AD)の増加が顕著である。ADは、現在認知症患者の5~7割を占めており、AD患者の増加は医療費や介護費などの社会保障費の増大につながるため、その進行予防を実現する治療法の開発は喫緊の課題である。厚生労働省でも2015年に、認知症施策推進総合戦略(新オレンジプラン)を策定し、認知症対策が行われてきている。ADは認知障害、人格の変化を伴い、最終的には意思疎通も困難になる疾患である。現在、我が国で用いられているADの薬物治療には、コリンエステラーゼ阻害薬およびN-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬があるが、患者の心的・行動的症状を緩和させ病状の進行を遅らせることを目的として投与されており、根本的治療法の確立が急務となっている。

AD患者の脳内では、アミロイドβ(Aβ)タンパクが凝集し、老人斑が形成されるが、このAβ凝集体が神経細胞やシナプスの脱落などの神経毒性を示し、ADの病因とも言われている(アミロイドカスケード仮説、(Hardy & Higgins, 1992))。従って、Aβ凝集阻害物質がADの予防・治療に繋がることが期待されている。Aβは、38~43個のアミノ酸からなる約4kDaのペプチドであり、凝集により疎水性のβシート構造をとる。このAβが分解除去を受けずに脳内に蓄積することで凝集沈着し老人斑を形成する。AβはC末端側の位置により複数のアイソフォームが存在するが、主な成分としてはアミノ酸数が40のAβ40と42のAβ42が挙げられる。Aβ42がより凝集・不溶化しやすく、実際の老人斑においてもAβが先行して蓄積することから、Aβがより強い毒性を持つものと考えられている(Iwatsuboら、1994)。ところが、Aβ凝集の詳細な凝集機構は未だに明らかになっていない。

これまでに、クルクミンやカテキン、ミリセチンなど天然由来の比較的小分子のポリフェノールがAβ凝集阻害物質として報告されてきた(例えば、Masudaら、2006)のに対し、これまでに我々はこの微量ハイスループットスクリーニング(MSHTS)法により52種類の香辛料抽出物に対してAβ凝集阻害活性を評価した結果、特にシソ科ハーブ系の香辛料が高い凝集阻害活性を示し、そのうちより活性の高かったサマーサボリーの成分探索を行ったところ、主活性成分はロスマリン酸であることを明らかにした(Ishigakiら、2013)。ロスマリン酸には残念ながら既にAβ凝集阻害活性が報告されていたが、その詳細な阻害機構の報告はない。また、同じシソ科のアオジソは、これまで最も活性の高かったスペアミントの約40倍もの活性を示し、ロスマリン酸量では説明できないほど高いAβ凝集阻害活性を示した。さらに、北海道産の海藻類についてもスクリーニングし、海藻の多糖類がAβ凝集阻害活性を示すことが示唆された(Ogaraら、2015)

2. 研究の目的

我々のこれまでのスクリーニングにより高いAβ凝集阻害活性を示したシソ科植物に含まれるロスマリン酸の誘導体を合成し、凝集阻害活性を評価、ドッキングシミュレーションと生化学および分光的手法によりそれらのAβ凝集阻害機構を解明する。この知見をもとにより強力なAβ凝集阻害物質を創生する。これによりこれまでその詳細が明らかにならなかったAβ凝集阻害機構の解明とそれに基づくAβ凝集阻害物質の創製、活性評価によりAD予防・治療薬の開発へと繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ロスマリン酸誘導体の合成

27種のロスマリン酸誘導体を、ケイ皮酸誘導体を起点に化学合成した。

(2) ロスマリン酸誘導体のAβ凝集阻害活性

ロスマリン酸誘導体のAβ凝集阻害活性をMSHTS法およびチオフラビンT(ThT)蛍光法により評価した。

(3) ロスマリン酸誘導体とAβ(1-42)モノマーのドッキングシミュレーション

CSB PDBより取得したAβ(1-42)のモノマー構造データ1Z0Qおよび27種類のロスマリン酸誘導体の結合を、AutoDock 4.2によりドッキングシミュレーションした。

(4) ロスマリン酸誘導体存在下でのAβ凝集体二次構造のCDスペクトルによる経時的観察

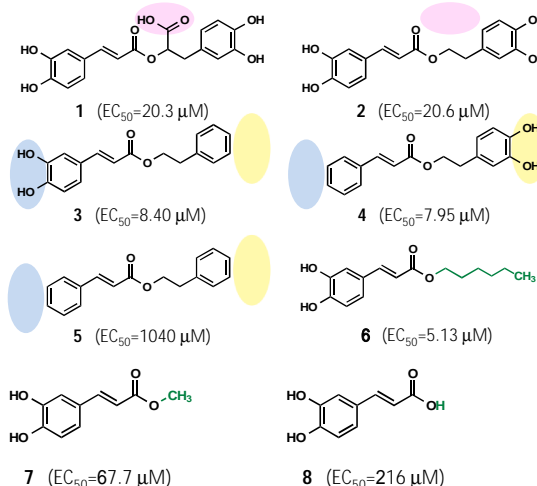
ロスマリン酸誘導体とAβの混合溶液(30 μM Aβ, 1xPBS)を、37℃で加温し、経時的に円二色性分光計(J-725, JASCO)によりCDスペクトル測定を行った(25℃)。測定条件は、以下の通り。感度: Standard (100 nm deg), 開始波長: 260 nm, 終了波長: 185 nm, データ取込間隔: 0.2 nm, 走査モード: Continuous, 走査速度: 100 nm/min, レスポンス: 0.5 sec, バンド幅: 1.0 nm, 積算回数: 10。スムージング条件には、Binomialを使用し、コンボリューション幅を99とした。測定値[θ]_{obs}は、平均残基モル橢円率[θ]に変換し、GraphPad prism6(Graphpad software, San Diego, CA)に測定波長260-185 nmと各波長での平均残基モル橢円率[θ]を入力し、connecting line/curveすることでグラフを作成した。

(5) TEM によるロスマリン酸誘導体存在下での A 凝集体の観察

ロスマリン酸誘導体と A の混合溶液 (30 μM A, 1xPBS) を, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 24 h 加温し, 支持膜付グリッド (エラストックカーボン ELS-C10 STEM Cu100P グリッド仕様) 上で 2 % タングステン酸 3 μL で処理し, TEM (H-7650, Hitachi) により測定を行った。

4. 研究成果

はじめに MSHTS 法によるロスマリン酸誘導体の A 凝集阻害活性を検討した。ロスマリン酸 (1) と、そのカルボキシ基 (桃色) を除去した化合物 2 の活性は同程度であったことから, カルボキシ基は活性発現には影響しないことが示唆された。さらに, 両端に存在するフェノール性水酸基 (黄色および青色) のいずれか一方を除去した化合物 3 および 4 の活性は有意に上昇した。ところが, 両端のフェノール性水酸基を除去した化合物 5 は活性をほとんど示さなかった。従って, いずれか一端でのフェノール性水酸基の存在, あるいは, 同一分子中での疎水性基と親水性基の共存が, A 凝集阻害活性発現に重要であることが示唆された。また, アルコキシ基 (緑色) の芳香環部をアルキル基に置換した化合物 6 は, 化合物 3 と同等の阻害活性を示した。この結果も疎水性基が活性に寄与することを支持する。続いて, アルキル基の鎖長と活性の関係を検討した。鎖長 C6 の化合物 6 は C1 の化合物 7 と比べ, 活性は有意に上昇し, 約 10 倍となった。また, エステル結合をもたない (アルコキシ基と縮合していない) カフェイン酸 (8) はほとんど活性を示さなかった。このことから, A 凝集阻害活性発現には, アルキル基の鎖長が関与することが示唆された。



MSHTS 法と ThT 法で得られるロスマリン酸誘導体の EC_{50} 値を比較すると, MSHTS 法から ThT 法で活性が「上昇 (橙色)」, 「低下 (青色)」, 「差なし (白色)」の 3 群に分類され, 化合物の疎水性と対応した (Figure 1). そこで, ロスマリン酸とカフェイン酸 C6 エステルを用いて, 化学構造による A 凝集阻害機構の違いを解析した。

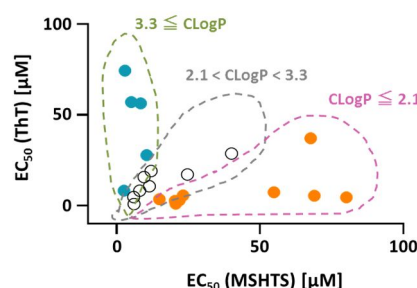


Figure 1 Relationships between EC_{50} and CLogP of RA derivatives.

ロスマリン酸または C6 エステルと A との結合を, AutoDock を用いてドッキング計算をしたところ (Figure 2), ロスマリン酸は同一ペプチド中の 23 番目のアスパラギン酸から 32 番目のイソロイシンに結合するクラスターが得られた。一方 C6 エステルは, A 凝集体のシートにまたがって結合した。A 凝集には 25 から 35 番目のアミノ酸配列が重要であると言われていることから, ロスマリン酸は A ペプチド同士の凝集を阻害するのに対して, C6 エステルはシートに結合し, 凝集体同士の結合を阻害することが示唆された。このことから, 阻害剤の脂溶性によって, A 上での結合位置が異なることが示唆された。

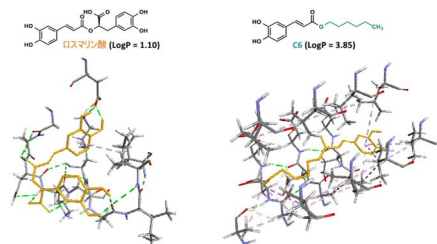


Figure 2 AutoDock によるドッキング計算

ThT 法による A 凝集阻害の経時的観察では, いずれの化合物も β -シート形成を阻害した。このとき, ThT の A 線維への結合相は, C6 エステル添加では 3 相のうち 1 相が消失した (Figure 3)。また, CD スペクトルによる A のコンホメーションの経時的観察では, β -シート形成速度や含有率に変化が観察された (Figure 4)。さらに, TEM 画像による A 凝集

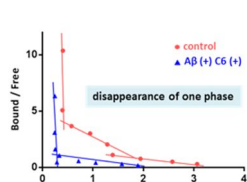


Figure 3 Scatchard plots

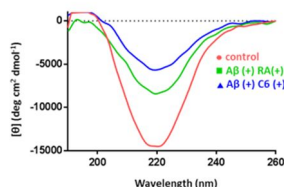


Figure 4 CD spectra

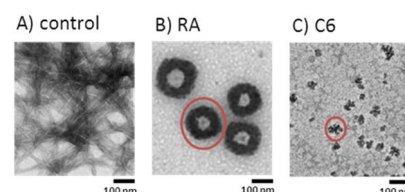


Figure 5 TEM images of A fibrils.

体の形状には顕著な違いが観察され、ロスマリン酸添加では小さな線維の集合である核が、C6エステル添加では小さな線維が観察されたが (Figure 5), 添加濃度によっても形状は異なった。以上の結果を詳細に解析したところ、ロスマリン酸は凝集の初期段階で ThT が結合できない形状に変化させる、もしくは β -シート同士の結合を阻害する可能性が示唆され、C6エステルは凝集初期の β -ヘリックスを安定化し凝集を阻害する、または小さな凝集体同士の結合を阻害している可能性が示唆された (Figure 6)。

この凝集阻害機構が異なると考えられる 2 つの化合物群のより詳細な凝集機構を明らかにする目的で、A モノマーとロスマリン酸誘導体との結合を STD-および SOFAST-HMQC NMR 法により検討した。その結果、いずれのタイプの誘導体も A と結合することが示唆されたが、モノマーとの結合を観測することができなかった。そこで、これらの誘導体がどのくらいの大きさの A 凝集体に結合・凝集阻害をしているのかを A と誘導体が含まれる溶液を PICUP 法処理後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて観察した。その結果、水溶性の高い誘導体は、非存在下と比べて 4 量体まで A オリゴマーの凝集を阻害剤促進し、その後を阻害することが示唆された。また、脂溶性の高い誘導体群は、阻害剤非存在下や水溶性誘導体と比較してモノマーのバンドが濃かったことから、A モノマーと結合して凝集を阻害する可能性が示唆された。

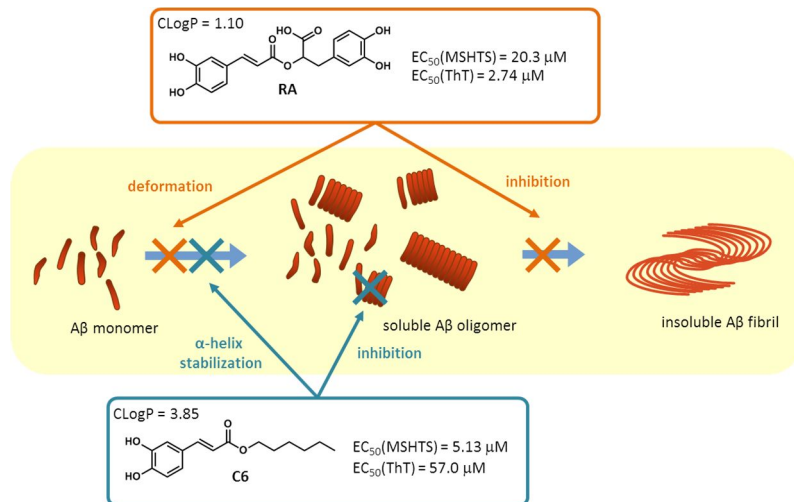


Figure 6 Proposed inhibition stage of RA and C6

これらの結果は阻害剤の構造により A 凝集の阻害段階や、生成する凝集体が異なることを示唆しており、今後 A 凝集阻害機構の解明と有効なアルツハイマー病治療薬の開発へと繋がることが期待される。これらのことから、本研究課題において十分な成果が得られたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) R. Sasaki, R. Tainaka, Y. Ando, Y. Hashi, D. H. Virupaksha, Y. Suga, Y. Murai, M. Anetai, K. Monde, K. Ota, I. Ito, H. Kikuchi, Y. Oshima, Y. Endo, H. Nakao, M. Sakono, K. Uwai, K. Tokuraku, An automated microliter-scale high-throughput screening system (MSHTS) for real-time monitoring of protein aggregation using quantum-dot nanoprobe, *Scientific Reports*, 査読あり, **9**, Article number 2587 (2019).

(2) Y. Tsukamoto, S. Ikeda, K. Uwai, R. Taguchi, K. Chayama, T. Sakaguchi, R. Narita, W.-L. Yao, F. Takeuchi, Y. Otakaki, K. Watashi, T. Wakita, H. Kato, T. Fujita, Rosmarinic acid is a novel inhibitor for Hepatitis B virus replication targeting viral epsilon RNA-polymerase interaction, *PLOS ONE*, 査読あり, **13** (5), e0197664 (2018).

(3) R. Taguchi, K. Hatayama, T. Takahashi, T. Hayashi, Y. Sato, D. Sato, K. Ohta, H. Nakano, C. Seki, Y. Endo, K. Tokuraku, K. Uwai, Structure-activity relations of rosmarinic acid derivatives for the amyloid aggregation inhibition and antioxidant properties, *Eur. J. Med. Chem.*, 査読あり, **138**, 1066-1075 (2017).

〔学会発表〕(計 21 件)

(1) 佐々木里奈, 田井中玲奈, 安藤雄一, 太田公規, 門出健次, 上井幸司, 徳樂清孝, アミロイド凝集阻害物質の自動スクリーニングシステムの開発と天然物および化合物ライブラリーの

評価, 2018 年度日本生物物理学会北海道支部会 (札幌) 2019

(2) R. Sasaki, K. Monde, K. Uwai, K. Tokuraku, Development of an automated microliter-scale highthroughput screening system with quantum-dot nanoprobe for amyloid aggregation inhibitors, Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research 2019 (Muroran), 2019.

(3) 上井幸司, 久米田博之, 坂本和, 関千草, 中野博人, 馬渡康輝, 徳樂清孝
カフェ酸誘導体によるアミロイド 可溶性オリゴマー形成阻害の分光学的解析
化学系学協会北海道支部 2019 年冬季研究発表会 (札幌) 2019

(4) 上井幸司, 久米田博之, 坂本和, 杉浦亜美, 関千草, 中野博人, 徳樂清孝, 馬渡康輝, アミロイド 凝集阻害機構のカフェ酸誘導体をツールとした分光学的解析, 第 37 回日本認知症学会学術集会 (札幌) 2018

(5) 佐々木里奈, 安藤雄一, 上井幸司, 徳樂清孝, 量子ドットナノプローブを用いたアミロイド凝集阻害物質の自動化スクリーニングシステムの開発, 第 91 回日本生化学会大会(京都)2018

(6) 坂本和, 久米田博之, 杉浦亜美, 馬渡康輝, 田口莉帆, 関千草, 中野博人, 徳樂清孝, 上井幸司, アミロイド カフェ酸誘導体複合体の分光学的解析, 日本化学会北海道支部 2018 年夏季研究発表会 (北見) 2018

(7) 杉浦 亜美, 馬渡 康輝, 田口 莉帆, 関 千草, 中野 博人, 徳樂 清孝, 上井 幸司, アミロイド とカフェ酸エステル誘導体型凝集阻害剤の核磁気共鳴法による相互作用解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 名古屋, 2018

(8) 杉浦亜美, 馬渡康輝, 田口莉帆, 関千草, 中野博人, 徳樂清孝, 上井幸司, ロスマリン酸誘導体によるアミロイド 凝集阻害機構解明のための NMR 解析, 化学系学協会北海道支部 2018 年冬季研究会, 札幌, 2018

(9) Y. Ando, K. Ota, I. Ito, H. Kikuchi, Y. Oshima, Y. Endo, K. Uwai, K. Tokuraku, Screening of amyloid- aggregation inhibitors from aromatic low molecular compounds by a microliter-scale high-throughput screening system with quantum-dot nanoprobe, Neuroscience 2017 (Washington DC), 2017.

(10) 上井幸司, 田口莉帆, 畑山晃輝, 高橋倫人, 太田公規, 橋友理香, 関千草, 中野博人, 遠藤泰之, 徳樂清孝, ロスマリン酸誘導体をツールとしたアミロイド 凝集阻害機構の解析, 第 36 回日本認知症学会学術集会, 金沢, 2017 年

(11) 畑山晃輝, 田口莉帆, 安藤雄一, 関千草, 中野博人, 徳樂清孝, 上井幸司, ジベンジリデンアセトン類のフェノール性水酸基が A 凝集阻害活性に及ぼす影響, 日本薬学会第 137 年会 (仙台), 仙台, 2017

(12) K. Hatayama, R. Taguchi, Y. Ando, C. Seki, H. Nakano, K. Tokuraku, and K. Uwai, Structure-activity Relationship of Amyloid Aggregation Inhibitors: Dibenzylideneacetone Derivatives, Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research 2017 (Muroran), 2017

(13) Y. Ando, K. Ota, I. Ito, H. Kikuchi, Y. Oshima, Y. Endo, K. Uwai, K. Tokuraku, Discovery of lead compounds targeting Amyloid- aggregation from aromatic low-molecular compounds, Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research 2017 (Muroran), 2017.

(14) 田口莉帆, 高橋倫人, 畑山晃輝, 太田公規, 橋友理香, 関千草, 中野博人, 遠藤泰之, 徳樂清孝, 上井幸司, メカニズムに着目したカフェイン誘導体のアミロイド 凝集阻害活性評価 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, つくば, 2016

(15) R. Taguchi, T. Takahashi, S. Kosaka, K. Tokuraku, K. Uwai, Presumption of amyloid-aggregation mechanism based on the structure-activity relationships for aggregation inhibition and docking studies, The 4th symposium on structure-activity relationship and the 32st assembly for pesticide design research, Kyoto, 2016

(16) K. Hatayama, R. Taguchi, T. Takahashi, C. Seki, H. Nakano, K. Tokuraku, and K. Uwai, Effect of the number and position of phenolic hydroxyl groups on the A aggregation inhibition of polyphenols, The 7th Forum on Studies of Environmental and Public Health Issues in the Asian mega-Cities (EPAM 2016) (Muroran), 2016

(17) R. Taguchi, T. Takahashi, K. Hatayama, Y. Hashi, C. Seki, H. Nakano, K. Tokuraku and K. Uwai, Inhibitory mode of rosmarinic acid derivatives against amyloid - beta aggregation: their ThT and MSHTS analyses, The 7th Forum on Studies of Environmental and Public Health Issues in the Asian mega-Cities (EPAM 2016) (Muroran), 2016

(18) 徳樂清孝, 上井幸司, 量子ドットナノプローブを用いたアミロイド凝集過程のリアルタイムイメージング技術とその活用, 第 54 回粉体に関する討論会, 登別, 2016

(19) 田口莉帆, 高橋倫人, 畑山晃輝, 橋友理香, 関千草, 中野博人, 徳樂清孝, 上井幸司, ロスマリン酸誘導体をツールとしたアミロイド 凝集阻害機構の解明, 日本化学会北海道支部 2016 年夏季研究発表会, 室蘭, 2016

(20) 畑山晃輝, 田口莉帆, 高橋倫人, 関千草, 中野博人, 徳樂清孝, 上井幸司, A 凝集阻害物質のフェノール性水酸基が活性発現へ及ぼす影響, 日本化学会北海道支部 2016 年夏季研究発表

表会，室蘭，2016

(21)田口莉帆，高橋倫人，畑山晃輝，橋 友理香，関 千草，中野博人，徳樂清孝，上井幸司，
アミロイド 凝集阻害機構の解明を指向したロスマリン酸誘導体の構造活性相関，日本薬学会
北海道支部第 143 回例会，札幌，2016

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：アミロイド形成を評価する方法、装置及びプログラム

発明者：徳樂清孝、上井幸司

権利者：国立大学法人室蘭工業大学

種類：公開特許

番号：特願 2018-242280

出願年：2018 年

国内外の別： 国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www3.muroran-it.ac.jp/biocat/Top.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：徳樂 清孝

ローマ字氏名：TOKURAKU, Kiyotaka

研究協力者氏名：林 貴史

ローマ字氏名：HAYASHI, Takafumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。