

平成 23 年 5 月 1 日現在

機関番号：13601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580124
 研究課題名（和文） アミロイド型蛋白質を用いた抗コンフォメーション病食品素材の分子モデリング
 研究課題名（英文） Molecular modeling of food-grade compounds with anti-conformational disease effects by using amyloidogenic proteins

研究代表者
 中村 宗一郎（NAKAMURA SOICHIRO）
 信州大学・農学部・教授
 研究者番号：00105305

研究成果の概要（和文）：全身性アミロイドーシスや認知症を引き起こすとされている L68Q ヒト型シスタチンやアミロイド 蛋白質を用いて、種々の天然フェノール化合物及びそれらのリポフィル化あるいはグリコシル化誘導体のアミロイド線維形成抑制能を調べた。その結果、グリコシル化に比べリポフィル化の方がより効果的であることが明らかにされた。本研究で示された構造と機能に関する成果は、今後の抗コンフォメーション病食品素材の分子設計に活用されるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Anti-conformational disease effects of naturally-occurring phenolic compounds and their glycosyl and lipophilic derivatives were investigated by using amyloidogenic proteins containing cystatin C L68Q variant and A which are responsible for hereditary cystatin C amyloid angiopathy and Alzheimer's disease, respectively. As the result, it was revealed that lyophilization was more effective than glycosylation for improving anti-amyloidogenicity of the tested phenolic compounds. These observations regarding conformation-functional relationship can be useful for novel inhibitors design as therapeutic agents for amyloid-associated diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学，食品科学，食品生化学

キーワード：アミロイド線維形成，天然フェノール化合物，フェノール化合物誘導体，分子モデリング，リポフィル化，グリコシル化，アミロイド型蛋白質，抗アミロイド効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会的背景

超高齢社会が進む中で、アルツハイマー病や透析アミロイドーシスなどアミロイド

線維の沈着によって引き起こされる疾病が社会問題化している。アミロイド線維は、変性した蛋白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ことが明らかにされつつある。アミロイド線維を主とする物質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、総称してアミロイドーシスあるいはコンフォメーション病とよばれ、現在までにアルツハイマー病（アミロイド）、クロイツフェルト・ヤコブ病やBSEなどのプリオン病（プリオン蛋白質）、透析アミロイドーシス（ β 2ミクログロブリン）、遺伝性アミロイド性脳出血（シスタチン）、家族性アミロイドーシス（リゾチーム）など20種類以上の疾病が報告されている。

（2）研究計画に至るまでの背景

この10年間で医学と蛋白質化学との融合によりアミロイド物質の生化学的研究は著しく進歩したが、その生成機序については未だ不明の要素が多い。一方、これまでの研究で、多くのフェノール化合物に蛋白質のアミロイド線維化阻害効果があることが明らかにされているが、それらの効果の強弱と構造との関係についても未だ不明の部分が多く残されている。申請者らはこれまでに、アミロイド性脳出血症の原因蛋白質であるヒト型シスタチンを用いて、大豆イソフラボン等の効果を調べ、シスタチンのようなアミロイド線維形成型蛋白質（以下、アミロイド型蛋白質と略す。）の線維状化を抑制するためには付加する糖鎖長が重要な因子であることを明らかにした。そこで本研究では、酵素を用いた安全な方法で脂肪アルコール鎖や糖鎖が付加したフェノール化合物を調製し、アミロイド型蛋白質を用いてその効果を評価することとした。

2. 研究の目的

本研究では、コンフォメーション病の原因となるアミロイド線維の伝播を予防し、アミロイドーシス発症抑制に資するために、アミロイド線維形成誘発性シスタチン、ステフィン、アミロイド等を用いて、これらの蛋白質がアミロイド型へと転換することを阻害あるいは抑制することのできる新規機能性フェノール化合物の創製を試みることを目的とした。すなわち本研究では、まず、リパーゼ及びグルコシダーゼを用いて、フェルラ酸やクロロゲン酸などのフェノール化合物に長さの異なる糖鎖や脂肪鎖を付加して様々なタイプの新生フェノール誘導体を調製し、次にアミロイド型蛋白質を用いてそれらの線維状化抑制効果を測定した。得られた結果は、データマイニングプログラムによって解析し、より効果的にアミロイド型蛋白質の線維状化を抑制することのできるフェノール化合物の分子設計を試みた。また、

老化促進モデルマウス（SAM）を用いた実験によってもその効果を調べた。こうして、本研究では将来的に「食べて予防する」ことができる抗コンフォメーション病食品素材の開発に資することを目的とした。

3. 研究の方法

（1）天然フェノール化合物

抗アミロイド効果を持つことが予測される天然フェノール化合物として、図1に示すようにフェノールカルボン酸類（フェルラ酸、クロロゲン酸、カフェ酸）、フェノールアミン類（ドーパミン、チラミン、シネフリン）、フラボノイド類（ゲニスチン、ナリゲニン、ケルセチン）、リグナン類（ノルジヒドログアヤレト酸、クルクミン、セサミノール）、カテキン類等を供試サンプルとした。加えて、天然のフェノール化合物である朝鮮ニンジン由来のジンセノサイド及びその派生物ならびにアンズ由来のカロテノイド及びその派生物も供試サンプルとした。

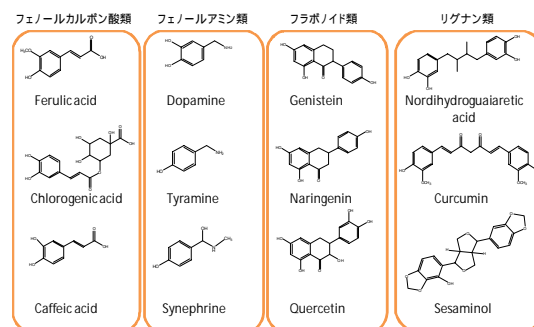


図1. 供試天然フェノール化合物の分類

（2）新規酵素合成フェノール化合物の調製

天然フェノール化合物に加えて、フェルラ酸、カフェ酸、桂皮酸、カテキン等のフェノール化合物をグルコシダーゼ及びリパーゼによって長さや種類の異なる糖鎖あるいは脂肪アルコール鎖を付加した新規フェノール化合物を作成した。付加する糖鎖にはグルコース、マンノース及びルチノースを、脂肪アルコール鎖にはブタノール、オクタノール、ヘキサデカノールをそれぞれ用いた。酵素合成された新規フェノール化合物は、フラッシュカラムクロマトグラフィーで分画し、最終的には分取 HPLC で単独成分にまで精製し、供試サンプルとした。

（3）アミロイド形成型ペプチド

抗アミロイド効果の標的ペプチドとして、アルツハイマー型認知症の原因物質であるアミロイドペプチド（A β 1-42）及び全身性アミロイドーシスの原因物質であるアポリポ蛋白質 A-（ApoA-）を標的とし、天然フェノール化合物及び新規酵素合成フェノ

ール化合物誘導体のアミロイド線維形成抑制能を調べた。

(4) 遺伝子組換え技術によるアミロイド型蛋白質の調製

ピキア言語を用いて、アミロイド型蛋白質であるヒト型シスタチン C、ヒト型ステフィン A 及びヒト型ステフィン B の cDNA を調製し、ピキア発現ベクターの AOX プロモーターあるいは GAP プロモーター下流に挿入し、それらを用いて *Pichia pastoris* を形質転換した。組換え蛋白質は疎水性カラム及びサイズ排除カラムクロマトグラフィーによって分離精製した。ヒト型シスタチン C については、部位指定変異の手法を用いて、代表的なアミロイド形成型蛋白質である遺伝性アミロイドーシス型シスタチン, L68Q を調製し、実験に用いた。

(5) イン・ピトロ系におけるアミロイド線維形成抑制能の測定

アミロイド線維化抑制効果については、まずはチオフラビン T との反応性を調べ、次に Western-blotting 法を用いて供試蛋白質の線維化度を追跡し、同時に電子顕微鏡を用いた構造生化学的な観察も行った。

(6) 動物実験

イン・ピボ系における効果を確認するため、本研究では、老化促進モデルマウス SAM (Senescence Accelerated Mouse) を用いた動物実験も行った。0.1% の最終濃度で3ヶ月間混餌投与を行い、披検動物の運動性能及び学習記憶能の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 本研究での主要な成果

本研究では、まず、安全でより効果的な抗コンフォメーション病食品素材の開発に資するため、代表的なアミロイド形成型蛋白質である遺伝性アミロイドーシス型シスタチン, L68Q を用いて、ポリフェノールの抗アミロイド効果を調べ、構造との関係について考察した。ポリフェノールをフェノールカルボン酸類、フェノールアミン類、フラボノイド類、リグナン類、カテキン類等に分類し、L68Q 型シスタチン C のアミロイド形成に及ぼす影響を調べた。その結果、図 2 に代表例を示すように、種類によって阻害作用点に特長があることが明らかになった。また、アミロイド形成過程には、アミロイドシード形成とアミロイド線維の伸長の2つの段階があると推定された。ではフェノールカルボン酸類とフェノールアミン類が、ではフラボノイド類、カテキン類、及びリグナン類のポリフェノールが有効であることが示された。

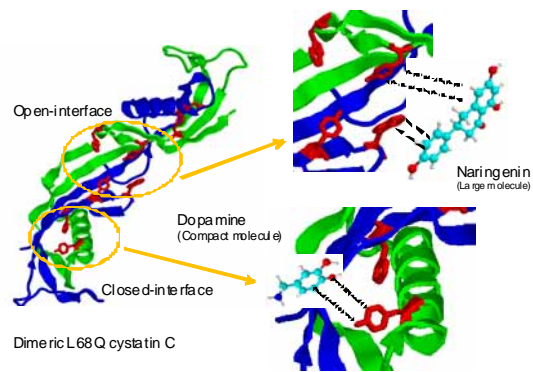


図 2 .L68Q シスタチンに対するポリフェノール類の抗アミロイド効果の模式図

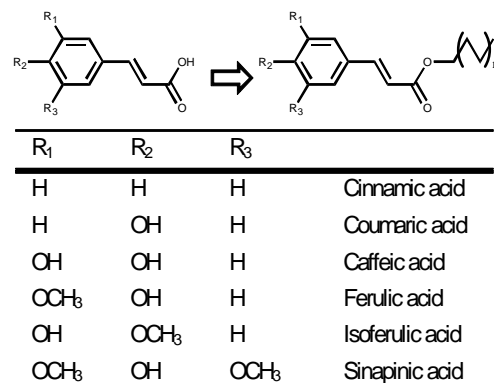


図 3 . 桂皮酸及びその誘導体のアシル化の模式図

次に、フェノール化合物の分子サイズや疎水性度が抗アミロイド効果に及ぼす影響を調べるために、フェノール化合物の酵素的リポフィル化及びグリコシル化を行った。その結果、フェルラ酸、カフェ酸及び桂皮酸(図 3)については、1.7%~10.3%の収率で、ブタノール、オクタノール及びヘキサデカノール修飾できることが明らかにされた。一方、ルチナーゼを用いて種々のフェノール化合物にルチノースを付加することにも成功した。これらの新規酵素合成フェノール化合物は、いずれも未修飾のものより強い抗アミロイド効果を示した。また、グリコシル化に比べリポフィル化の方がより効果的であることが明らかにされた。リポフィル化の鎖長としては、一般的に鎖長の長い方がより効果的であったが、シナピン酸に関しては最適疎水性の存在が示唆された。アルツハイマー型認知症の原因蛋白質であるアミロイド蛋白質(A 1-42)、ヒト型ステフィン A、ヒト型ステフィン B 及びアポリポ蛋白質 A- (ApoA-) に対しても同様の実験を行った結果、同じような傾向が確認された。また、天然のポリフェノール化合物である朝鮮ニンジン由来のジンセノサイド、杏由来のカロテノイド及びゴマ由来のセサミンの抗アミロイド効果についても調べ、構造・機能相関に

関する研究を行った。その結果、杏抽出物を用いた実験から、抗アミロイド効果はルテイン> カロテン> クリプトキサンチンの順であること、ゴマ抽出物を用いた実験から、セサミンを亜臨界処理してモノ及びジカテコール体に変化させると、その抗アミロイド効果が著しく上昇することが明らかにされた。また、老化促進モデルマウス(Senescence Accelerated Mouse, SAM)を用いた研究によって、杏抽出物にSAMの学習能低下を予防する効果があることが示された。

(2) 国内外での位置付けとインパクト

本研究は、アイスランド型遺伝性アミロイド性脳出血の原因であるヒト型シスタチンCのL68Q変異体、アルツハイマー型認知症の原因であるアミロイド蛋白質(A1-42)、ヒト型ステフィンA、ヒト型ステフィンB及びアポリポ蛋白質A- (ApoA-)を標的蛋白質として、種々の天然ポリフェノールに加え、酵素工学的に調製したリポフィル化及びグリコシル化フェノール化合物の抗アミロイド効果について調べ、より強い効果を持ったアミロイド線維形成抑制性フェノール化合物を分子デザインを試みたものである。本研究では、フェノール化合物の抗アミロイド線維形成効果には分子サイズが重要であること、アミロイド線維の伸長抑制にはグリコシドの糖鎖長の寄与率が高いこと、また、フェノール化合物の疎水性が重要であることを明らかにすることができた。これらの知見は、今後の抗アミロイドシスの予防薬の分子モデリングを進める上で重要なステップになるものと確信される。

(3) 今後の展望

本研究では、種々のアミロイド誘発性モデル蛋白質あるいはペプチドを用いて、種々の天然フェノール化合物及びそれらのリポフィル化及びグリコシル化誘導体のアミロイド線維形成抑制能を調べ、フェノール化合物の抗アミロイド効果の構造・機能相関について検討した。その結果、フェノール化合物の抗アミロイド効果には両親媒性が重要であるとの確証を得るに至った。また、セサミンの亜臨界処理実験からフェノール化合物としてはカテコール体の有望性が示唆された(中村他:セサミン分解物の製造方法及びアミロイド形成阻害剤,特願2010-250407)。今後も引き続き、このような視点での研究を続けて行くが、特にカテコール体フェノール化合物に着目した研究の展開が期待される。

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)

[学会発表](計19件)

小川紘史, 片山茂, 中村宗一郎: セサミンおよびセサミン誘導体のAアミロイド線維抑制効果, 日本農芸化学会2011年度大会, 2011.3.26-28, 京都

近藤葉月, 中村宗一郎(他3名, 5番目): リポフィル化桂皮酸誘導体のアミロイドジェニック蛋白質およびペプチドに対するアミロイド線維形成阻害作用, 日本農芸化学会2011年度大会, 2011.3.26-28, 京都

Soichiro Nakamura, Hazuki Kondo, and Shigeru Katayama: Anti-amyloid effects of novel amphiphilic phenolic compounds prepared by enzymatic lipophilization, PacifiChem 2010, 2010.12.15-21, Hawaii, USA

Shigeru Katayama, Hirofumi Ogawa, Hideaki Iwai, Soichiro Nakamura: Anti-amyloidogenic effects of apricots carotenoids on amyloid-protein, PacifiChem 2010, 2010.12.15-21, Hawaii, USA

Kensuke Morimoto, Yuki Maeda, Shigeru Katayama, Soichiro Nakamura: Evaluation of amyloidogenicities of human cystatins A, B and C using synthesized phenolic esters as probe, PacifiChem 2010, 2010.12.15-21, Hawaii, USA

森本賢右, 近藤葉月, 前田悠樹, 片山茂, 中村宗一郎: アミロイド誘発性変異シスタチンのアミロイド線維形成を阻害するフェノール酸エステルの分子モデリング, 日本農芸化学会中部支部第159回例会, 2010.10.30, 名古屋

近藤葉月, 小川紘史, 森本賢右, 片山茂, 中村宗一郎: , 日本農芸化学会中部支部第159回例会, 2010.10.30, 名古屋

森翔也, 中村宗一郎(他5名, 7番目): リポフィル化フェノール化合物のアポリポ蛋白質A-に対する抗アミロイド効果, 日本農芸化学会2010年度大会, 2010.3.28-30, 東京

小川紘史, 岩井秀明, 片山茂, 中村宗一郎: アンズ由来カロテノイドに期待されるアルツハイマー型認知症予防効果, 日本農芸化学会2010年度大会, 2010.3.28-30, 東京

近藤葉月, 片山茂, 中村宗一郎: 酵素的エステル化によるフェノール酸類の抗アミロイド機能改変, 日本農芸化学会2010年度大会, 2010.3.28-30, 東京

前田悠樹, 岩井秀明, 片山茂, 中村宗一郎, 遺伝子工学的手法で調製されたシスタチンA, B及びCのアミロイド形成能,

日本農芸化学会 2010 年度大会，
2010.3.28-30，東京

前田悠樹，近藤葉月，片山茂，中村宗一郎：遺伝性アミロイドーシス型シスタチンを用いた抗アミロイド作用を有するリポフィル化フェノール化合物の分子設計，日本農芸化学会中部支部第 156 例会，2009.10.3，名古屋

小川紘史，山内雄貴，片山茂，中村宗一郎：アルツハイマー型認知症予防が期待されるポリフェノールの酵素的グリコシル化，日本農芸化学会中部支部第 156 例会，2009.10.3，名古屋

Hirofumi Ogawa, Shigeru Katayama and Soichiro Nakamura: Ginsenosides show different behaviors in anti-amyloidogenicity between amyloid β -protein and human cystatin C, 5th Pacific Rim Food Protein Symposium, Vancouver, 2009.8.21-23, Vancouver, Canada

Hazuki Kondo, Shigeru Katayama and Soichiro Nakamura: Enzymatic synthesis of anti-amyloid phenolic compounds, 5th Pacific Rim Food Protein Symposium, Vancouver, 2009.8.21-23, Vancouver, Canada

前田悠樹，中村宗一郎(他 6 名，8 番目)：遺伝性アミロイドーシス誘発性 L68Q シスタチンが PC12 セルラインに及ぼす影響，日本農芸化学会 2011 年度大会，2009.3.27-29，福岡

大脇貴薫，中村宗一郎(他 6 名，8 番目)：L68Q シスタチンを標的としたフラボノイド類の抗アミロイド効果の評価，日本農芸化学会 2011 年度大会，2009.3.27-29，福岡

大脇貴薫，前田悠樹，近藤葉月，中村宗一郎：遺伝性アミロイドーシス型シスタチンを用いたポリフェノール類の抗アミロイドーシス性，日本農芸化学会中部支部第 153 例会，2008.11.1，名古屋

Yuki Maeda, Takanobu Owaki, and Soichiro Nakamura: Food-grade phenolic compounds can modulate the amyloidogenicity of human cystatin C, 14th IUFoST, 2008.10.19-23, Shanghai, China

〔図書〕(計 2 件)

Soichiro Nakamura, Takanobu Owaki, Yuki Maeda, Shigeru Katayama, Kosuke Nakamura: Amyloidogenic proteins and peptides, In: Mine, Y., Li-Chan, Y., Bo, J. (ed) Bioactive proteins and peptides as functional foods and

nutraceuticals, Blackwell Publishing Ltd, New York, 2010, pp87-99

Soichiro Nakamura, Junya Hata, Kosuke Nakamura, Hao Jing, David D. Kitts, Shuryo Nakai: Site-specific glycosylation using Pichia expression system improves structural stability and antimicrobial activity of human cystatin C. In: Berhardt, L.V. (ed) Advances in medicine and biology, Nova Science Publishers, New York, 2010, pp243-254

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：セサミン分解物の製造方法及びアミロイド形成阻害剤

発明者：中村宗一郎，片山茂，小川紘史，橋口武史

権利者：信州大学

種類：特許

番号：特願 2010-250407

出願年月日：平成 22 年 1 月 9 日

国内外の別：国内

〔その他〕(計 4 件)

報道関係：

信大生に奨励賞，農芸化学会支部で研究発表，ポリフェノールを検証，農学部 4 年小川さん，2009.10.6，信濃毎日新聞

信州大学大学院農学研究科の近藤さん，カナダのシンポ学生優秀賞に，蛋白質研究のポスター発表で「とてもうれしい」，2009.9.4，信濃毎日新聞

信州大学大学院の近藤さん，国際シンポで優秀発表賞，フェノール新たに合成，認知症の予防治療に効果も，2009.9.3，中日新聞

日本農芸化学会中部支部の奨励賞，信大院生 3 人受賞，農学研究科の探究心に刺激，それぞれの研究を振り返る大脇さん，鈴木さん，飯島さん，2008.11.15，信濃毎日新聞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 宗一郎 (NAKAMURA SOICHIRO)

信州大学・農学部・教授

研究者番号：00105305

(2)研究分担者

寺嶋 正治 (TERASHIMA SHOJI)
東海学園大学・人間健康学部・教授
研究者番号：40227517

藤井 博 (FUJII HIROSHI)
信州大学・農学部・教授
研究者番号：90165340

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし