

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 27 日現在

機関番号：23401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14723

研究課題名(和文) 蛋白質安定化による疾患予防を目指した、低プロオキシダント性抗酸化物質の探索

研究課題名(英文) Investigation on antioxidants with low pro-oxidant activity to stabilize proteins responsible for neurodegenerative disease.

研究代表者

黒川 洋一 (KUROKAWA, Yoichi)

福井県立大学・生物資源学部・講師

研究者番号：40326088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経疾患の原因蛋白質の酸化を抑制する候補化合物の探索を行った。抗酸化能を持つ既知化合物約400種類より、反応性の高い活性酸素種であるヒドロキシルラジカル発生能が低く、ルミノール化学発光あるいはG6PDH酸化的失活性を指標とした抗酸化能に優れた物を選抜した。これらの多くはフラボノイド類であり、特にメチル化フラボンに効果が認められた。fALS SOD1変異体発現マウス神経芽腫由来細胞 Neuro 2aにおける毒性緩和効果を評価したところ、セスキテルペン的一种に効果が認められたほか、ポリメチル化フラボノイドにはSOD1に対する酸化的変性を部分的に抑制する効果が確認された。

研究成果の概要(英文)：We aimed in this research to explore antioxidants such prevent oxidative denaturation of proteins which are causative of certain neurodegenerative disease, such as familial amyotrophic lateral sclerosis (fALS). For this purpose, we first chose antioxidants that have low pro-oxidant activity, an ability to generate hydroxyl radical via copper-induced oxidation. We then investigated anti-oxidant activity of compounds with low pro-oxidant activity by measuring their ability to inhibit chemical luminescence of luminol or to protect inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase under an oxidative condition such generates hydroxyl radical, finding that several flavonoids including methylated flavones have such ability. When we examined the alleviation effects of compounds on toxicity in Neuro 2a cells expressing fALS SOD1 mutant, some sesquiterpene was found as effective one. Finally, polymethoxyflavonoids were found to have partially prevent the oxidative denaturation of SOD1 protein.

研究分野：生化学

キーワード：抗酸化能 ターゼ 1 プロオキシダント能 銅イオン還元能 ヒドロキシルラジカル スーパーオキシドディスム 蛋白質変性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 蛋白質の酸化は、細胞レベルの障害やヒトの健康上大きな問題である神経疾患を引き起こすとされており、「蛋白質の酸化」を抑制する抗酸化物質を簡便に予測する方法が求められていた。*in vivo*での効能評価が困難とされる DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 法や ORAC (活性酸素吸収能力値) 法などの既存の抗酸化評価法とは基盤を異にする評価法が必要と考えられた。また、銅イオン還元能を指標とする総抗酸化能の妥当性の吟味にも関心が持たれた。

(2) 活性酸素種のうち最も反応性が高いとされるヒドロキシルラジカルが発生する条件下での、卵白由来蛋白質オボアルブミンの酸化的分解を抑制する化合物が報告されていた。アスタキサンチンやフェルラ酸などの抗酸化物質は分解抑制能を持つと報告されていたが、そのような効能を持つフラボノイドは報告されていなかった (Yanai N *et al. Biosci Biotechnol Biochem.* (2008))。ヒドロキシルラジカルを消去する、あるいはその発生を抑制する能力を持ち、ヒドロキシルラジカル発生条件下での蛋白質分解を抑制できるような化合物の探索に関心が持たれた。

(3) アスコルビン酸、ケルセチンなどの既知の抗酸化物質は、使用条件によってはラジカルの発生を伴う毒性を持つことが知られており (Kondakçi E *et al. Talanta.* (2013), Zheng LF *et al. Food Chem. Toxicol.* (2008))、その一因は銅イオン還元能に依存する「プロオキシダント能」、特にヒドロキシルラジカル発生能のためと考えられた。プロオキシダント能が低い化合物例としてフェニルプロパノイド等が報告されていた (Ito M *et al. Food Chem. Toxicol.* (2005))。また、プロオキシダント能が低い一連の化合物を予備的に見出していたので、低プロオキシダント性化合物を網羅的に探索し、評価することに関心が持たれた。

(4) 芳香族アミノ酸であるトリプトファン代謝産物において、キヌレン酸やキサンツレニック酸には銅イオン還元能はあるが、過酸化水素などの活性酸素種の発生能は低いことが報告されていた (Goldstein LE *et al. Biochemistry* (2000)) が、報告がほとんどなかったニコチン酸やピコリン酸などの抗酸化能およびプロオキシダント能の解析に関心が持たれた。

(5) 家族性筋萎縮性側索硬化症 (fALS) の原因物質の一つとされるスーパーオキシドディスムターゼ SOD1 変異体蛋白質は、His 残基の酸化的修飾を伴って凝集することが知られている。この過程の後期には芳香族アミノ酸の酸化が起こることが知られていた (Zhang H, *et al J Biol. Chem* (2003), Taylor DM *et al. J Biol Chem.* (2007), Coelho FR *et al. J Biol Chem.* (2014)) が、本蛋白質の凝集の初期となる酸化反応については不明な点が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

(1) 抗酸化物質を、その銅イオン還元能、およびプロオキシダント能に応じて分類し、低プロオキシダント性抗酸化物質の構造および性質を明らかとすること。

(2) 対象とする抗酸化物質の抗酸化能を、ルミノール等の低分子、蛋白質などの高分子を標的として解析し、その効能の相関を解明すること。

(3) 神経疾患である家族性筋萎縮性側索硬化症 (fALS) の原因物質である SOD1 変異体蛋白質等に対する安定化効果の高い化合物の簡便な探索方法を確立すること。

## 3. 研究の方法

(1) アミノ酸関連化合物、フェニルプロパノイド、スチルベノイド、フラボノイドなどを含む既存の化合物約 200 種類を対象として、「プロオキシダント能」および「抗酸化能」を解析した。

(2) 「プロオキシダント能」は、「一価の銅イオン特異的な指示薬 Bathocuproine disulfonic acid (BCS) を用いた銅イオン還元能」(菊池ら、分析化学 (1990))、「プラスミド DNA のニック化あるいは直線化能」(Aruma OI, *Biochem.J.* (2001)) をヒドロキシルラジカル発生 の指標として評価した。

(3) 「抗酸化能」は、「ペントースリン酸経路に関与し、細胞内の還元物質ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) の維持に重要であるグルコース 6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) の酸化的失活を抑制する能力」、「ヒドロキシルラジカル発生条件下でのプラスミド DNA の酸化的分解 Aruma OI, *Biochem.J.* (2001)) を抑制する能力、または「ヒドロキシルラジカル発生に伴うルミノール発光」(Parejo I, *Pharmacol. Toxicol Methods.* (2000)) を抑制する能力を指標として評価した。

(4) スーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) を酸化剤存在下でインキュベートした際の凝集あるいは分解を抑制する効果をイムノプロット等で評価したほか、fALS SOD1 変異体を発現するマウス神経芽腫由来細胞 Neuro 2a における毒性緩和効果を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 抗酸化物質は、「銅イオン還元能およびプロオキシダント能の両方とも高い」、あるいは「銅イオン還元能、およびプロオキシダント能の両方とも低い」、「銅イオン還元能を持つがプロオキシダント能は低い」の少なくとも 3 つのグループに分類できることが分かった。低プロオキシダント性が報告されたオイゲノール以外にも、同様の性質を持つフラボノイドが存在することが分かった。また、銅イオン還元能が検出されない抗酸化物質も存在し、本指標は、抗酸化能の評価には不適切な場合もあると考えられた。

(2) 高いキレート能を持つ8-キノリノールは 100  $\mu\text{M}$  の低濃度でプラスミド DNA の酸化分解をほぼ 100%抑制し、キレート剤 EDTA よりも数倍高い効果を示した。また、8-キノリノールは、100  $\mu\text{M}$  でルミノールの化学発光をほぼ 100%抑制した。プラスミド DNA の酸化分解の抑制、ルミノールの化学発光抑制を指標としたいずれの系でも、本化合物が同程度の抑制効果を示したことから、抗酸化能評価は妥当であると考えられた。

また、8-キノリノール同様にキノリン構造を持つ銅イオンキレート剤を評価したところ、5-Chloro-8-quinolinol や 5,7-Dichloro-8-quinolinol でも 100  $\mu\text{M}$  でルミノールの化学発光をほぼ 100%抑制したほか、高いニック化抑制効果を示した。一方、Clioquinol では 100  $\mu\text{M}$  でルミノールの化学発光抑制効果は 50%程度であり、プラスミド DNA のニック化は抑制せず、直線化を抑制する効果を示した。これらの違いは、後者ではヒドロキシルラジカル発生抑制能が低いためと考えられた。

(3) トリプトファンの代謝経路に生じるジカルボキシル化合物キノリン酸(QA)、およびその代謝物であるニコチン酸(NCA)、ピコリン酸(PCA)の抗酸化能を比較したところ、QA および PCA にはプラスミド DNA の酸化分解を顕著に抑制する効果、すなわちニック化を抑制する効果が見られたのに対して、NCA には直線化を抑制する効果しか見られなかった。この違いは、前者が持つピリジン環および、その2位のカルボキシル基を有する部分構造により、金属イオンキレート能を持つが、後者では該当する構造が存在しないためと推定された。

アミノ酸代謝産物のキヌレン酸(KA)やキサントニク酸(XA)では、共にプラスミド DNA の酸化分解に対して直線化を抑制する効果が見られたが、ルミノール発光抑制能は KA では高々10%程度で、XA では約 90%であった。この違いの差は金属イオンキレート能にあると考えられた。

今後、プラスミド DNA、ルミノール評価系では pH の違い(ルミノールでは pH9.0、その他の系では pH7.4)を念頭において、抗酸化物質の金属イオン、特に銅イオンに対するキレート能を評価する必要があると考えられる。

(4) 「銅イオン還元能およびプロオキシダント能の両方とも高い」化合物の例であるタキシフォリンは、プラスミド DNA の酸化分解を抑制する効果よりも促進する効果の方が顕著であったほか、ルミノールの化学発光を 100  $\mu\text{M}$  の高濃度においても全く抑制しなかった。同じグループに属するケルセチンは、化学発光は約 80%以上阻害した(10  $\mu\text{M}$ )が、プラスミド DNA の酸化分解抑制効果は同様に認められなかった。その他の化合物についても、顕著なルミノール化学発光抑制能を示したが、プラスミド DNA の酸化分解抑制効

果を示さなかった。このグループの化合物は、抗酸化能、およびプロオキシダント能の双方を有する物が多いためと推測された。

(5) 「銅イオン還元能、プロオキシダント能ともに低い」抗酸化物質の例であるアナカルジン酸は、ALS 患者由来 iPS 細胞を用いた評価系で、特定の蛋白質の変性や神経突起の異常を抑制する (*Science Translational Medicine* (2012))と判明している。本化合物は、プラスミド DNA の酸化分解に対して直線化を抑制し、ルミノール化学発光を約 90%以上、顕著に抑制する効果を示した(100  $\mu\text{M}$ )。その他、タイ産ショウガ由来化合物 1'-acetoxychavicol acetate にも同様の効果が認められた。

(6) 銅イオン還元能の有無に関わらず、金属イオン存在下でのヒドロキシルラジカル発生能が低い「低プロオキシダント性化合物」は、オイゲノールやアスタキサンチン以外には、-リポ酸、ナリンゲニンやヘスペレチンなどのフラバノン、クリソスレイオールなどのフラボン、ゲニステインなどのイソフラボンに存在した。これらのほとんどはルミノール化学発光抑制能も示したことから、「低プロオキシダント性抗酸化物質」であると考えられた。

(7) カテコール構造を持つフラボノイド類では、フラバノンであるエリオジクチオール、フラバノールであるエピカテキン、フラボノールであるケルセチンでは、高いプロオキシダント能が認められたが、フラボンであるルテオリンのプロオキシダント能が最も低いことが分かった。その 3' または 4' 位の水酸基が修飾された化合物であるクリソスレイオール、ディオスメチンでは、プロオキシダント能はほとんど検出されないことが分かった。

(8) 低プロオキシダント性かつ高抗酸化性化合物のうち、比較的簡単な構造を持つポリフェノール類であるフェルラ酸やシリンガ酸では、ルミノールの化学発光を 10  $\mu\text{M}$  で 70%以上阻害したが、G6PDH に対する保護効果は高々10%程度と低かった。一方、フラボノイド類では、例えばナリジン、ヘスペレチン、などに G6PDH の活性を 50%以上保護する物が認められた。

(9) 主に柑橘類等に存在するポリメトキシフラボノイド(PMF)では、ノビレチン等、低プロオキシダント性かつ中程度のルミノール発光抑制能を持つ物が多く見られた。これら PMF では、SOD1 に対する酸化変性を部分的に抑制する効果が認められたが、比較的単純な構造を持つフラボンではそのような効果は認められなかった。

(10) fALS SOD1 変異体発現マウス神経芽腫由来細胞 Neuro 2a における毒性緩和効果を評価したところ、セスキテルペンであるゼルンボンに緩和効果が認められた。本化合物は銅イオン還元能、プロオキシダント能とも低かったが、ルミノール化学発光抑制能は 100

μM で高々40%程度であった。

#### 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)

低プロオキシダント性抗酸化物質の分類、フラボノイド類における低プロオキシダント性および抗酸化性の系統的評価、グルコース-6-リン酸脱水素酵素の酸化的失活抑制を指標とした抗酸化能評価に関して報告予定

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

黒川洋一、眞柄佳奈、高見勇成、安藤賢司、伊佐純一「蛋白質の安定化能を持つ、低プロオキシダント性抗酸化物質の探索」  
2017年 日本農芸化学会大会 2017年3月18日(京都女子大学(京都府京都市))

黒川洋一、伊佐純一、眞柄佳奈、高見勇成、安藤賢司「ビタミンおよび食由来抗酸化物質のプロオキシダント能、抗酸化能の解析」  
ビタミン、バイオファクター、食と健康に関する研究会 2016年12月17日(名古屋大学(愛知県名古屋市))

黒川洋一、眞柄佳奈、高見勇成、安藤賢司、小林恭一、大東肇「低プロオキシダント性を示す食等由来エキスの探索」  
第8回 北陸合同バイオシンポジウム 2015年10月29日-30日(山中座、すずや今日楼(石川県加賀市))

黒川洋一、眞柄佳奈、高見勇成、安藤賢司「蛋白質安定化を目指した、低プロオキシダント性抗酸化物質の探索」  
2015年 酵素補酵素研究会 2015年7月10日(アオッサ、みらくる亭(福井県福井市))

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

黒川 洋一(KUROKAWA, Yoichi) 福井県立大学・生物資源学部・講師

研究者番号：40326088

##### (2)研究分担者

渡邊 征爾(WATANABE, Seiji) 名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：70633577

##### (3)連携研究者

大東 肇(OHIGASHI, Hajime) 福井県立大学・生物資源学部・名誉教授

研究者番号：80026583

加納 健司(KANO, Kenji) 京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：10152828

入江 一浩(IRIE, Kazuhiro) 京都大学・(連合)農学研究科・教授

研究者番号：00168535

山中 宏二(YAMANAKA, Koji) 名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：80446533