

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18490

研究課題名(和文) アミロイド線維形成阻害に有用な海藻由来新規化合物の探索と機能評価

研究課題名(英文) Screening and characterization of chemical compound derived from marine algae: Prevention of amyloid fibril formation

研究代表者

八木 寿梓 (Yagi, Hisashi)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10432494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の異常凝集(アミロイド線維)はさまざまな疾患の発症原因と考えられている。特にアミロイドーシスの原因産物であるアミロイド線維を阻害することは、疾患の発症予防や医薬品・機能性食品の開発に貢献する。本研究はアミロイド線維の形成を阻害することを目的として、海藻が有する化合物等がアミロイド線維形成に及ぼす影響を調べた。海藻には緑藻・紅藻・褐藻が存在するが、その中で褐藻由来の多糖および水溶性の海藻抽出液がインシュリンのアミロイド線維形成を阻害することがわかった。特に褐藻由来の多糖は将来的な医薬品・機能性食品等に関与において非常に有用である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is thought that the abnormal protein aggregation (amyloid fibrils) causes various folding diseases. Especially, the prevention of amyloid fibril formation, which is one of causative products of amyloidoses, by natural organic compounds contribute to developing the pharmaceutical products and functional foods. In this study, to inhibit the amyloid fibrillation, we investigated the effects of the compounds of marine algae on amyloid fibrillation. Marine algae are classified green, red, and brown algae. Our results showed that one of polysaccharides and water-soluble seaweed extracts which derived from brown algae prevented the amyloid fibrillation, suggested that one of polysaccharides of brown algae can be useful for development of the pharmaceutical compounds and functional foods.

研究分野：生物学

キーワード：アミロイド線維 海藻 多糖 蛋白質異常凝集検出装置

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質異常凝集研究の重要性

本来、タンパク質は生理的な機能を有し、細胞の機能維持に重要な役割を担っている。しかしながら、様々なストレスや環境因子によって、タンパク質は変性、修飾あるいは不必要な分解を受ける。それらのタンパク質の一部は性質が変化し、結果として細胞内外に凝集して蓄積する。その凝集過程が多くの重篤な疾患の発症原因になることが明らかになった。特に、アルツハイマー病や白内障などの高齢に伴い発症する疾患群は、タンパク質の異常凝集が引き金となっている。最近では生活習慣病の一つである II 型糖尿病もタンパク質の異常凝集が原因の一つとして考えられている。特に、線維状の凝集体 (アミロイド線維) が蓄積する疾患を総称してアミロイドーシスと呼ぶ。アミロイドーシスは年々疾患の種類が増加し、現在においては約 30 種類報告されており、そのほとんどが難治性疾患である。遺伝性の疾患もあるが、多くは孤発性である。今まで原因不明だった疾患が「アミロイド沈着」あるいは「異常凝集」で説明ができるようになったが、疾患の予防や治療に関してはまだ研究段階である。理由として、基礎研究でのタンパク質異常凝集研究の難しさが、線維形成の詳細な分子機構が解明されていないためである。この分野は世界中で競争が高く、高齢化社会を迎えた日本においてもこの領域研究の発展は重要で社会的な意義を持つ。

(2) 本申請課題の日本及び外国での現状

アミロイド研究の最重要課題は、アミロイド線維の形成をいかに抑制するかである。そのために線維形成の分子機構に関する詳細な知見を得る事が必須であり、様々な手法を駆使して研究が行われている。ポリフェノールが抑制化合物として知られており、ポリフェノールの一種のフラボノイド系であるアントシアニンは、ブルーベリー等の赤紫色をした植物体に多く含まれている色素成分で、線維形成の抑制に有用であることがわかった (Iwasa et al. *Biochemistry* (2013))。また、全世界を地域別に比較すると、地中海沿岸地域で生活する人々のアルツハイマー病発症率が、他の地域よりも 40%低い統計データがある。その地域の食習慣としてオリーブ油を多量に摂取する傾向がある (Abuznait et al. *Chem. Neurosci.* (2013))。オリーブ油のフェノール成分であるオレオカンタルがアルツハイマー病原因ペプチドの分解酵素の活性を高めることで疾患の発症を抑えているとも考えられ、摂取したオレオカンタルが直接原因ペプチドに作用するわけではなく、間接的に機能している可能性もある。将来的な機能性食品や医薬品の開発等の応用研究を考えると、疾患発症原因タンパク質等に対して化合物等が直接相互作用して機能することが望ましい。

申請者は、線維形成の分子機構の解明に重点を置き、生物物理学的手法、生化学的手法を用いて研究を展開してきた。顕微鏡を用いた線維形成反応の可視化や、線維形成を促進する化学的な因子 (界面活性剤、アルコール) と物理的な因子 (攪拌、超音波) が線維形成に及ぼす影響と、その分子機構に関する詳細な知見を得てきた。本研究はこれまで培ってきた知識を用いて、天然有機化合物を用いたアミロイド線維形成の阻害に関する研究を展開する。

2. 研究の目的

難治性疾患であるアミロイドーシスは、生体機能を有するタンパク質やペプチドが何らかの原因によって構造異常を起こし、その結果として線維状の凝集体を形成して体内の多くの組織に沈着する疾患である。国民病の一つであるアルツハイマー病や生活習慣病の一つである II 型糖尿病等の疾患が含まれている。これらの疾患には根本的な治療方法は開発されておらず、いかにしてこのような凝集形成を阻害・抑制するかが重要な課題となっている。しかしながら、いつ発症するかわからない疾患を投薬等で予防することは現実的ではない。本研究は、「医食同源」をもとに、海藻等から生産される様々な化合物が、アミロイドーシス発症原因タンパク質・ペプチドの凝集形成抑制に効果を持つと考え、新規化合物の探索、線維形成に及ぼす分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究の当初は、(1) 蛋白質異常凝集検出装置 (HANABI) による新規有用化合物のスクリーニング、(2) アミロイド線維形成タンパク質と新規有用化合物の分子機構の解明、の二つに重点をおいた。しかしながら、オリゴ糖調製に必要な糖分解酵素が必要となり、その酵素を有する海洋性細菌の単離、目的酵素のクローニング等も(3)の項目として追加した。

具体的に(1)においては、超音波発生装置とマイクロプレートリーダーを組み合わせた新規に開発した装置 HANABI を用いて、海藻が有する成分や、鳥取県に生育している海藻を採取し調製した水溶性抽出液等をモデルタンパク質であるインシュリンの反応溶液に添加して効果の有無を選別する。本研究では、海藻が有する成分として海藻特有の多糖を用い、水溶性の抽出液においては、鳥取県から採取した緑藻、紅藻、褐藻それぞれから調製したものをを用いた。HANABI によるスクリーニングを行なったあと、溶液に対する超音波照射という高ストレスの物理刺激から、中程度の物理的ストレスである溶液の震盪に変更し、添加する多糖の濃度依存性や分子量依存性等を調べた。アミロイド線維の検出にはアミロイド線維特異性蛍光色素であるチオフラビン T を用いて、経時的に蛍光

測定を行なった。

(2)においては、(1)で得られた成果をもとに、添加物がインシュリンの構造や、反応中に形成する凝集物について、円二色性分光法で二次構造の変化を、透過型電子顕微鏡を用いて、形態観察を行なった。

派生的に生じた(3)においては、目的酵素を有する海洋性細菌の単離を行い、そのあと酵素活性が高い菌を選択し、次世代シーケンサーによるドラフトゲノム解析で遺伝子を同定後、大腸菌の系を用いてクローニング・精製を行い、その特性評価を行なった。

4. 研究成果

(1) 蛋白質異常凝集検出装置 (HANABI) による新規有用化合物のスクリーニング

HANABI は超音波照射という強力な物理的刺激により短時間かつ多検体の試料をスクリーニングすることが可能である。このHANABIを用いて、インシュリンのアミロイド線維形成に対する海藻多糖と、鳥取県の高松から採取した海藻(緑藻、紅藻、褐藻)の水溶性抽出液 11 種についてその効果を検証した。

海藻多糖の影響については HANABI で褐藻由来の多糖がインシュリンの線維形成を阻害する効果が示唆されたので、中程度の物理的刺激である震盪反応に変更し、比較対象として他の海藻由来の多糖も用いてより詳細に調べた。その結果、紅藻や一部の褐藻由来の多糖にはインシュリンの線維形成を阻害する効果はなかった。従って、同じ多糖でも褐藻由来の 2 種の多糖が阻害効果を示し、特にそのうちの一つの多糖が強い効果を有したため、まずはこの多糖に焦点を当てさらなる検証を行なった。

多糖は数十万に及び高分子である。発症予防等を考慮した場合、この状態では体内で吸収されるかはわからない。従って、多糖を低分子化させる必要があり、本実験では加水分解による低分子化を行い、分子量依存的な線維形成阻害効果を調べた。その結果、低分子化させすぎると、線維形成阻害効果が無くなり逆に線維形成を促進させる傾向が見られた。また、様々な平均分子量で阻害効果を調べると最適な分子量の存在が明らかになり、今後の応用研究に期待できる成果となった。分子量の最適化を行い、その条件において添加する多糖の濃度依存性を検証した。その結果、実験開始当初に用いていた濃度よりも 4 分の 1 から 8 分の 1 程度まで濃度を下げても十分な阻害効果を示すこともわかった。この多糖に関しては 2016 年度に特許申請も行なった。

緑藻・紅藻・褐藻を含む 11 種の水溶性海藻抽出液においても、HANABI を用いて阻害効果の有無をスクリーニングした。これらの海藻抽出液は糖を含め多くの化合物を含んでいる。紅藻からの抽出液は線維形成に対する阻害効果が見られなかったが、緑藻の抽出液は少しの阻害効果を示した。HANABI の高スト

レス条件下で線維形成時間の差が見られたことは有意な差だと考えられた。海藻抽出液の実験においても褐藻の 2 種が明らかな線維形成阻害効果を示した。この褐藻 2 種は食用ではなく、廃棄対象でもある雑海藻に分類される海藻である。つまり、この褐藻 2 種の有用性が明らかになれば、食料問題と競合せず、新たな医薬品・機能性食品開発に展開できると期待される。実際に阻害効果が見られた褐藻 2 種についても線維形成条件を震盪反応に変更し、有意な差が生じるかを検討した。それぞれの海藻抽出液をインシュリンの反応溶液に濃度依存的に添加すると、一つの褐藻抽出液は実験開始時に使用した濃度の 10 分の 1 程度でも阻害効果を示した。他方、もう一つの候補の褐藻は同じ濃度でも同程度の阻害効果を示さなかった。同じ褐藻でも種によってその成分が異なることが原因だと考えられた。この抽出液にはこれまでに阻害効果を明らかにしている褐藻特有の多糖も含まれているが、多糖単独で使用した濃度よりも抽出液の中に含まれている多糖の濃度は低いと考えられるため、本実験で得られた成果は、多糖と抽出液に含まれる他の化合物との相乗的な作用により阻害効果を示したと考えられた。

(2) アミロイド線維形成タンパク質と新規有用化合物の分子機構の解明

(1)ではアミロイド線維の形成の有無を経時的に調べることができるチオフラビン T を用いた蛍光測定で判断している。アミロイド線維が形成される時にはタンパク質の二次構造が大きく変化する。実際に、褐藻由来の多糖をインシュリンの反応溶液に添加し、二次構造の変化を追跡した。本実験で用いている反応条件ではインシュリンは部分的な α ヘリックス構造を形成しており、アミロイド線維を形成すると β シート構造に変化する。反応開始時と反応終了後のサンプルを、二次構造を調べることができる CD 測定を行うと、何も添加していないサンプルや低濃度の多糖を添加したサンプルにおいては、 β シート構造に変化していることがわかった。他方、チオフラビン T の蛍光強度の増加が認められなかったサンプルにおいて同様の測定を行うと、反応開始時の α ヘリックス構造を示すスペクトルと全く同じスペクトルを反応終了後も示したことから、添加した多糖はインシュリンの構造変化を抑制していることがわかった。海藻抽出液には多くの化合物が含まれているために光の吸収が大きく測定することができなかったが、チオフラビン T 蛍光測定が似た結果を示したことから同様の現象が起きていると推察した。

アミロイド線維は、部分的に変性したタンパク質同士の会合反応による核形成(核形成反応)が生じ、その後核が鋳型となり変性タンパク質が次々と結合し線維状の凝集体を形成する伸長反応の二段階反応からなる。多

糖がどの反応段階で阻害効果を示すかを調べるために、反応中の多糖添加開始時間を変えて実験を行なった。その結果、多糖の阻害効果は、核形成反応で作用し、伸長反応では効果がほとんどない事がわかった。このことは、多糖はインシュリンの二次構造変化を抑えつつ、アミロイド線維形成に伴う分子間の会合反応も抑制している事が示唆された。

多糖や海藻抽出液を添加した際に生じる反応溶液内の変化を直接的に明らかにする事は重要である。それぞれを添加した反応溶液の反応終了後の状態を透過型電子顕微鏡に供し、形態について観察した。多糖や海藻抽出液を添加していないインシュリンの反応溶液は容易にアミロイド線維を形成するため、電子顕微鏡観察結果においても線維状の典型的なアミロイド線維が観察された。他方、数百時間反応させてもチオフラビンTの蛍光強度の増加が認められなかったサンプルにおいては、多糖・海藻抽出液の両方もアミロイド線維は観察されず、不定形な凝集体を一部形成している事がわかった。このことは、アミロイド線維形成経路に沿って形成される会合体とは関係のない凝集体を形成させることより線維形成経路を遮断していると考えられた。

アミロイド線維形成の特徴の一つとして seeding 効果が挙げられる。これは、形成したアミロイド線維を未反応の溶液に添加すると添加した線維が鋳型となり、線維形成が加速される反応である。多糖添加によって得られた不定形凝集を未反応のインシュリン溶液に添加しても seeding 効果は見られなかった。このことから、形成した不定形な凝集体はアミロイド線維形成とは関係のない凝集体である事が示された。今後はこの不定形な凝集体が細胞に対して毒性を有しているかを検討する必要がある。

(3) オリゴ糖精製を目的とした海洋性細菌の単離・目的酵素のクローニング・特性評価

先に述べたが多糖は高分子であるために、体内での吸収等の問題が考えられる。体内に存在する多糖分解酵素の存在を期待するか、海藻の生育環境で海藻多糖を資化する微生物を利用してオリゴ糖を調製するかを選択がある。後者を選択する場合は、海水から有用な微生物を単離する必要があり、多糖資化性菌として数種の海洋微生物の単離に成功した。野生株からの多糖分解に関わる酵素を精製し、その特徴づけを行なった。その結果、これまでに報告されている類似の分解酵素にはない、新たな性質を有していることを発見した。

酵素の新規性を調べるとともに、オリゴ糖を調製するためには、大量の酵素が必要となる。次世代シーケンサーを用いて単離した菌のドラフトゲノム解析を行い、野生株から精製した酵素のN末端アミノ酸シーケンスのデータと合わせて、目的の酵素の遺伝子を

同定した。そして、その目的酵素を異種発現させるために、クローニングを行い、大腸菌を用いた異種発現系の構築に成功し、酵素の大量取得を可能とした。異種発現させた酵素を精製し、その諸性質を野生株から精製した酵素と比較すると活性の大きさ等も含めてほとんど差が見られなかった。加水分解によって得られたオリゴ糖と酵素分解によって得られるオリゴ糖に線維形成の阻害効果の違いが見られるかどうかを今後検討していく予定である。精製した一部の酵素についてはその新規性から論文として報告した。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Hisashi Yagi, Asako Fujise, Narumi Itabashi, Takashi Ohshiro.
Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium *Cobetia* sp. NAP1 isolated from brown algae.
Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 80: 2338-2346 (2016),
(査読有)
DOI: 10.1080/09168451.2016.1232154

[学会発表](計 6 件)

八木 寿梶, 木下 竣貴, 柏原 直樹, 川本 仁志, 三木 康成, 鈴木 宏和, 大城 隆.
海藻多糖によるアミロイド線維形成阻害. 日本農芸化学会 2017 年大会,
2017.3.18-20. 京都女子大学
(京都府、京都市)

八木 寿梶, 藤瀬 麻紗子, 板橋 成美, 鈴木 宏和, 大城 隆.
Polysaccharide lyase 7 に分類される新規アルギン酸リアーゼの特性評価
日本農芸化学会 2016 年大会,
2016.3.27-30. 札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)

八木 寿梶, 藤瀬 麻紗子, 板橋 成美, 鈴木 宏和, 大城 隆.
Polysaccharide lyase family 7 に分類される *Shewanella* sp. YH1 株由来アルギン酸リアーゼの特性評価
日本農芸化学会中四国支部大会,
2016.1.23. 岡山県立大学
(岡山県、総社市)

Hisashi Yagi. Understanding the molecular mechanisms of amyloid fibrillation by using biophysical methods. Seminar. (招待講演)
Academia Sinica, Taiwan, 2015.11.27

Hisashi Yagi. How should we understand the protein world. Thursday Noon Science Gathering. (招待講演) National Taiwan University, Taiwan, 2015.11.26

()

木下 竣貴、藤澤 史帆、藤瀬 麻紗子、鈴木 宏和、大城 隆、八木 寿梓、海藻成分を用いたアミロイド線維形成阻害. 日本農芸化学会中四国支部大会、2015.6.13.鳥取大学(鳥取県、鳥取市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：フコイダンを有効成分とした認知症予防飲食物及び予防剤

発明者：八木 寿梓、川本 仁志、三木 康成、大城 隆。

権利者：海産物のきむらや

種類：特許

番号：特願 2016-109105

出願年月日：2016年5月31日

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

八木 寿梓 (YAGI, Hisashi)

鳥取大学・工学研究科・助教

研究者番号：10432494

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者