

イリエ カズヒロ  
入江 一浩

共同研究者

竹腰清乃理

(京都大学大学院理学研究科・教授)

村上一馬

(京都大学大学院農学研究科・助教)

清水孝彦

(千葉大学大学院医学研究院・客員准教授)

略歴

1982年 京都大学農学部食品工学科卒業

1984年 同大学大学院農学研究科修士課程修了、同年  
京都大学農学部助手

1988年 農学博士

1999年 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻  
助教授

2007年 同大学院同研究科食品生物科学専攻教授、現  
在に至る。

この間1992年4月から1年間、米国スタンフォード大学化  
学科客員研究員 (Paul A. Wender教授)

食品中のポリフェノール類によるアミロイド $\beta$ の毒性緩和機構

The mechanism of suppression of amyloid  $\beta$ -induced neurotoxicity  
by polyphenols in food

The 42-residue amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$  42) is a promising target in the therapeutics of Alzheimer's disease (AD). The neurotoxicity is induced by the aggregation of A $\beta$  42. Although there are numerous papers on polyphenols and flavonoids to prevent the aggregation and neurotoxicity of A $\beta$  42, the inhibitory mechanism remains fully unanswered. Here we found that taxifolin from silymarin, a catechol-type flavonoid, suppressed the aggregation and neurotoxicity of A $\beta$  42. Sodium periodate as an oxidant accelerated the prevention of A $\beta$  42 aggregation, whereas no inhibition was observed under the anaerobic condition. These inhibitory effects were associated with the formation of *o*-quinone moiety in taxifolin in the presence of oxygen. Since the presence of A $\beta$  42-taxifolin adduct was detected by LC-MS, A $\beta$  42 mutants substituted at the basic amino acid residues (Arg5, Lys16, Lys28) with *n*-leucine were prepared to identify the reaction site. Taxifolin did not prevent the aggregation of K16nL-A $\beta$  42, but substantially inhibited that of R5nL-A $\beta$  42 and slightly inhibited that of K28nL-A $\beta$  42. Further studies on various flavonoids including myricetin and quercetin, which were previously reported to have anti-aggregative ability, indicated *o*-dihydroxyl groups on the B-ring to be essential for the inhibitory activity of these flavonoids. These findings suggest the specific inhibitory mechanism of A $\beta$  42 aggregation by catechol-type flavonoids, in which the formation of *o*-quinone structure could be involved in the prevention of A $\beta$  42 aggregation by targeting Lys16.

Interestingly, morin, kaempferol, and datiscetin without a catechol moiety moderately suppressed the aggregation of A $\beta$  42 mutants as well as wild-type A $\beta$  42 even in the absence of oxygen. The results imply the existence of another inhibitory mechanism for A $\beta$  42 aggregation by non-catechol flavonoids other than auto-oxidation followed by the Michael addition of Lys residues, as observed for the catechol-type flavonoids.

# 1. はじめに

アルツハイマー病(AD)の原因物質と考えられている42残基のアミロイドβタンパク(Aβ42:図1)は、凝集することによって神経細胞毒性を示すことから、Aβ42の凝集を抑制する化合物の開発競争が世界中で行われている<sup>1)</sup>。ADは生活習慣病の一つと考えられており、食品あるいは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。これまで、カレー色素の一つであるクルクミン等のポリフェノール類を中心としたAβ42の凝集抑制剤が数多く報告されているが<sup>2)</sup>、凝集の抑制に必要な構造因子ならびにそれらのAβ42に対する相互作用部位の同定などのメカニズム解析はあまり行われていない。最近、我々の研究グループは、サプリメントとして知られているマリアアザミ種子の抽出物・シリマリニンが、*in vitro*と*in vivo*においてAD病態を緩和することを見いだした<sup>3)</sup>。本稿では、シリマリニンによるこれらの抗AD活性、ならびにシリマリニンに含まれる活性本体の同定とその凝集抑制機構に関する研究結果を報告する。

## 2. マリアアザミ種子に含まれるシリマリニンの抗AD活性

まず、研究室に保管されている各種天然物に対して、Aβ42の凝集抑制試験を行なった。その結果、シリマリニンが、神経細胞分化のモデル細胞であるPC12細胞に対して顕著な抗Aβ42毒性効果を示した。シリマリニンは既に肝臓薬として欧米で普及しており、<sup>4)</sup>複数のフラボノイドからなることが知られている。<sup>5)</sup>Aβ42の凝集能に対する効果を、チオフラビンT蛍光法を用いて調べたところ、シリマリニンは濃度依存的にAβ42の凝集活性を抑制し、100μM添加時にはAβ42の凝集線維がまったく形成されないことを電子顕微鏡で確認した(図2A、C)。また、シリマリニンは、PC12細胞に対するAβ42の毒性も濃度依存的に抑制し、神経細胞の保護効果も一部認められた(図2B)。

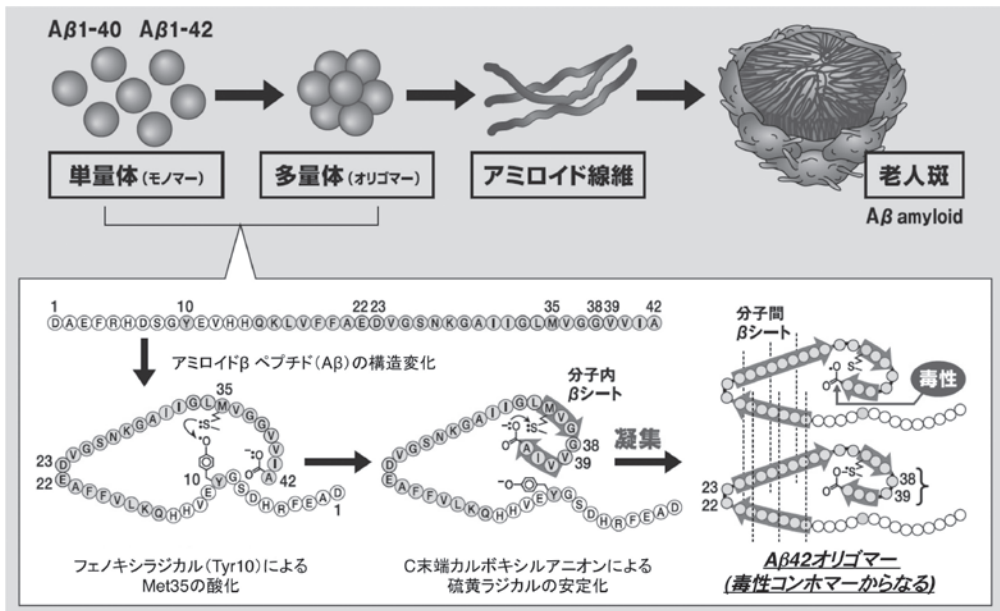


図1 Aβ42の神経細胞毒性発現機構ならびにオリゴマーの推定構造

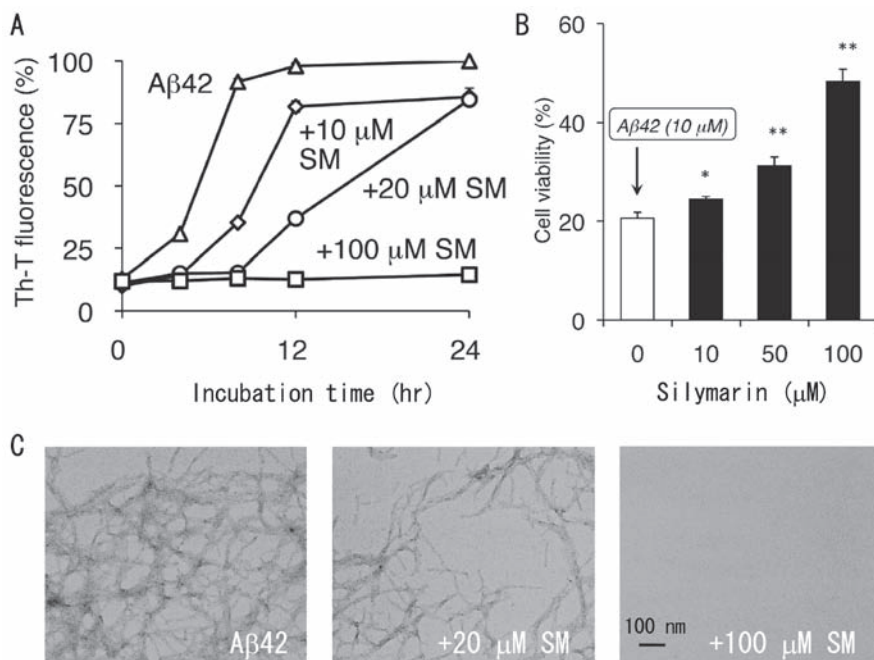


図2 *In vitro*でのシリマリンのAβ42の凝集抑制(A, C)ならびに神経細胞毒性の緩和(B)。SM: シリマリン。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  versus Aβ42(シリマリン非存在下)。

次に、ADモデルマウスを用いてシリマリンの*in vivo*における抗AD活性を調べた。ADマウスには、世界中で普及しているJ20系統<sup>6)</sup>を用いた。本マウスは6ヶ月齢頃から、Aβ凝集物が蓄積し始め、12ヶ月齢頃には海馬付近に老人斑が認められる。このことから、6ヶ月齢のADマウスに対して、シリマリンを半年間予防的に摂餌投与した(0.2 g/kg/day)。抗Aβ抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、シリマリン摂取群において脳内の老人斑の面積は減少していた(図3A)。本結果を検証するため、トリス緩衝液不溶画分に含まれるAβ量をELISA試験で測定したところ、シリマリンによって有意に低下していた。さらに、老人斑の蓄積と高い関連を示す脳内炎症を免疫組織染色法で調べた結果、ミクログリアの過剰炎症がシリマリンによって緩和されることを確認した。

一方、解剖直前に、ADマウスに特徴的な各種異常行動への影響を検討した。Y迷路テストにより多動行動を、高架式十字迷路テストにより不安行動をそれぞれ調べたところ、これらの異常行動はいずれもシリマリン摂取群において改善されることが判明した(図3C)。そこで、AD特有の異常行動と関連が深いAβオリゴマー量を評価した。評価方法は、AβのN末端抗体(82E1)<sup>7)</sup>をプレート上に固定し、さらに同一抗体で検出するサンドイッチELISA法を用いた。その結果、トリス緩衝液可溶画分に含まれるAβオリゴマー量は約30%減少した(図3B)。一方、Aβ産生に関わる加水分解酵素(BACE1)の活性は、シリマリン摂取によってほとんど変化しなかった。以上の結果より、シリマリンはAβの凝集あるいはオリゴマー形成を直接抑制することによって、種々のAD症状を緩和していることが示唆された。<sup>3)</sup>

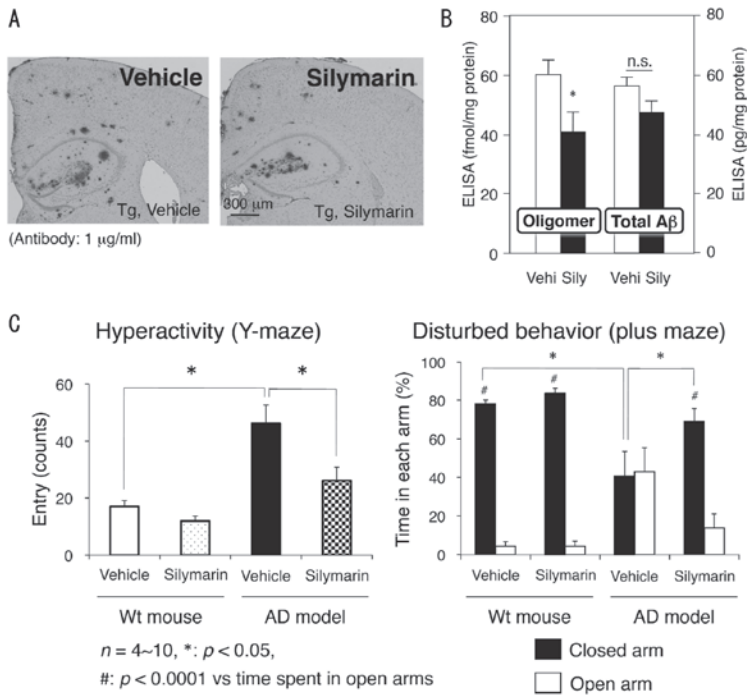


図3 シリマリンによるADマウスの病態に対する予防効果。(A) 免疫組織染色による老人斑評価、(B) 可溶画分中のオリゴマーと全Aβ量のELISA、(C) Y迷路試験と高架式十字迷路テスト。

### 3. タキシフォリンの同定と構造活性相関

フラボノイド類の混合物であるシリマリンの活性成分の単離を目的として、シリマリンをシリカゲルクロマトグラフィーならびに逆相系HPLCを用いて分画した。NMR及びMS等の各種機器分析の結果、taxifolin(タキシフォリン)、silibinin A、silibinin B、silychristin、isosilychristin、silydianinの6種の既知フラボノイドを同定した(図4)。これらのAβ42の凝集に対する影響を調べたところ、カテコール構造をもつタキシフォリンのみが強い凝集抑制活性を示すことが判明した。またタキシフォリンの各種水酸基の役割を調べる目的で、3'、4'、7位メトキシ体4種を合成し、凝集抑制試験を行った。その結果、B環の3'位と4'位両方の水酸基は抑制活性に必須であるが、A環の7位水酸基はほとんど関与していないことが示唆された(図4)。



図4 シリマリンに含まれる各種フラボノイド類の構造式と凝集抑制に必要な構造因子

#### 4. タキシフォリンの空気酸化によるAβ42の凝集抑制活性への影響

これまでに報告されたAβ42の凝集抑制物質の多くはカテコール構造をもっており、空気酸化による酸化体(o-キノン体)の形成が重要視されている<sup>8)</sup>。そこで、タキシフォリンに酸化剤である過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO<sub>4</sub>)を加えたところ、タキシフォリンのみの場合に比べてAβ42の凝集能は大きく低下した(図5A)。一方、減圧下(約8mmHg)でタキシフォリンを添加してもAβ42の凝集は阻害されなかった(図5B)。またUV測定より、これらの凝集抑制能の変化は、酸化型タキシフォリンの生成とよく相関していた(図5C)。化学的に不安定な酸化型タキシフォリンの存在を直接<sup>1</sup>H NMRで検出できなかったが、1,2-phenylenediamineを添加することでphenazineへの誘導が<sup>1</sup>H NMRで確認された(図5D)。以上の結果より、タキシフォリンの酸化によるo-キノン体の形成がAβ42の凝集抑制に必須であることが明らかになった。

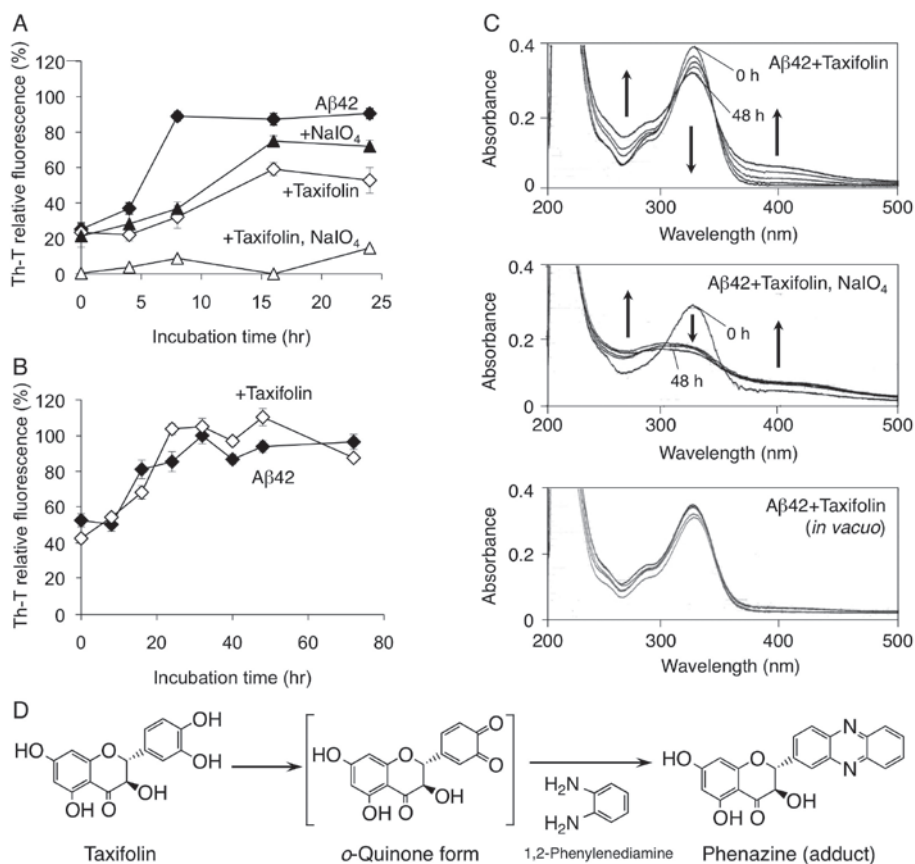


図5 タキシフォリンの自動酸化のAβ42凝集抑制能への影響(Aβ42 : taxifolin : NaIO<sub>4</sub> = 1:2:4)  
 (A) NaIO<sub>4</sub>存在下あるいは(B) 減圧条件下でのタキシフォリンのAβ42凝集抑制能  
 (C) 上記のAβ42凝集抑制試験におけるタキシフォリンのUVスペクトル  
 (D) 1,2-Phenylenediamineの添加による酸化型タキシフォリンの捕捉



## 5. A $\beta$ 42と酸化型タキシフォリンとの付加体のLC-MS解析

一般に $o$ -キノン構造を有する化合物は、求核性アミノ酸残基と共有結合を形成することによって、タンパク質の機能に影響を与えることが報告されている<sup>9)</sup>。このことから、 $o$ -キノン構造を持つ酸化型タキシフォリンがA $\beta$ 42の塩基性アミノ酸残基(Arg5、Lys16、Lys28：図1)とマイケル付加体あるいはシッフ塩基を形成することで凝集を抑制する可能性が予想された(図6)。そこで、A $\beta$ 42にタキシフォリン及びNaIO<sub>4</sub>を添加し(A $\beta$ 42 : taxifolin : NaIO<sub>4</sub> = 1 : 2 : 4)、リン酸緩衝液中、37°Cで4時間反応させた溶液を、LC-MS(ESI)で分析したところ、A $\beta$ 42の塩基性アミノ酸残基と酸化型タキシフォリンとのマイケル付加体と考えられるピーク(deconvoluted mass 4817.12)が検出された。

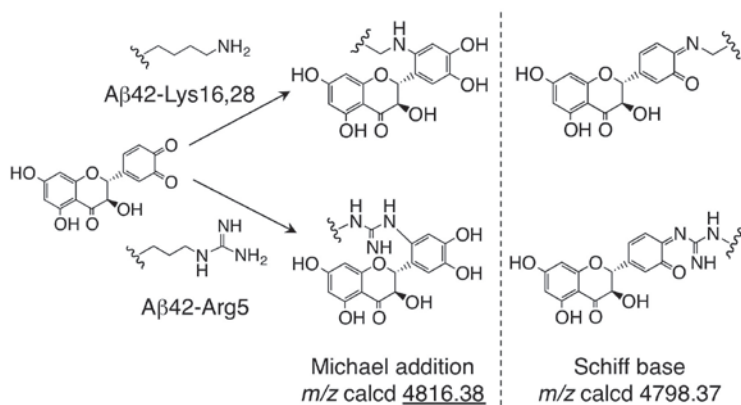


図6 A $\beta$ 42と酸化型タキシフォリンとの付加体形成メカニズム

## 6. タキシフォリンによるA $\beta$ 42変異体の凝集抑制能

A $\beta$ 42における酸化型タキシフォリンの結合部位を明らかにする目的でMS/MS解析を試みたが、付加体が微量かつ不安定であったため、さらなる解析は困難であった。そこで、酸化型タキシフォリンによるA $\beta$ 42の凝集抑制における塩基性アミノ酸残基の関与を調べるため、Arg5、Lys16、Lys28を $n$ -leucine( $n$ L)にそれぞれ置換したA $\beta$ 42変異体3種(R5nL-、K16nL-、K28nL-A $\beta$ 42)を合成し、タキシフォリン存在下での凝集能をそれぞれ調べた。その結果、タキシフォリンはK16nL-A $\beta$ 42の凝集能をほとんど抑制しなかったのに対して、K28nL-A $\beta$ 42の凝集能はやや低下し、R5nL-A $\beta$ 42の凝集能は野生型A $\beta$ 42と同程度に阻害された。なお、 $n$ L置換によるA $\beta$ 42変異の2次構造変化をCDスペクトルにより確認したところ、構造変化はほとんど認められなかった。以上の結果より、カテコール型フラボノイド類によるA $\beta$ 42の凝集抑制において、Lys16が主要な標的的部位であることが強く示唆された。

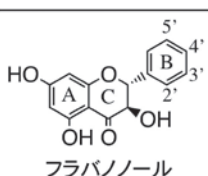
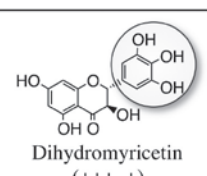
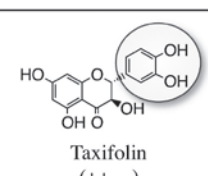
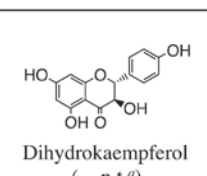
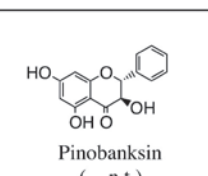
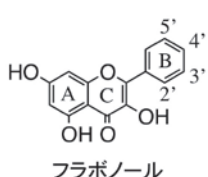
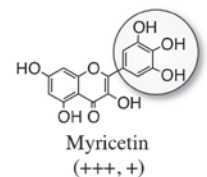
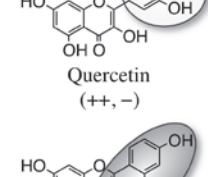
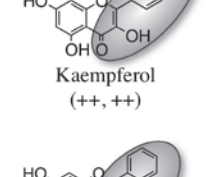
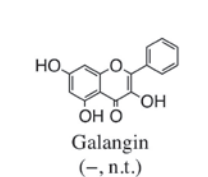
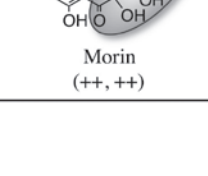
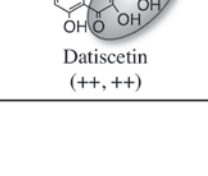
## 7. 各種フラボノイド類によるAβ42変異体の凝集抑制能

これまでAβ42の凝集抑制剤として報告されているフラボノイド類の多くは、myricetin、quercetin、morin、kaempferol(表1)のようなC環にα,β-不飽和カルボニル構造を有するフラボノールである<sup>2)</sup>。一方、C環にα,β-不飽和カルボニル構造をもたないものはフラバノールとして知られている。そこで、B環にカテコールをもつmyricetinとquercetin(フラボノール)、dihydromyricetin(フラバノール)について、K16nL-Aβ42の凝集能への影響を調べた。その結果、いずれも野生型Aβ42の凝集を抑制したが、K16nL-Aβ42の凝集能にはあまり影響を与えなかった。これらの効果は、K16,28nL-Aβ42を用いた場合、より顕著であった。さらに、B環に水酸基をもたないpinobanksin(フラバノール)ならびにgalangin(フラボノール)はAβ42の凝集をまったく抑制しなかった。

興味深いことに2'位、4'位に水酸基をもつフラボノールであるmorin、kaempferol、datisctin(表1)は野生型Aβ42だけでなく、K16nL-Aβ42の凝集能に対してもある程度の抑制効果を示した。さらに、これらの化合物は減圧下(約8 mmHg)でも野生型Aβ42の凝集を顕著に抑制した。

以上の結果より、C環のα,β-不飽和カルボニル構造は凝集抑制には必ずしも必須ではなく、B環のカテコール構造が重要であることが明確に示された。一方、B環にカテコール構造をもたず、C環にα,β-不飽和カルボニルを有する場合(morin、kaempferol、datisctin)、Aβ42のリシン残基との付加体を形成している可能性は低く、別のメカニズムの存在が考えられる(後述)。

表1 各種フラバノールならびにフラボノールの構造式及びAβ42凝集抑制能。  
括弧内の記号は、順に野生型Aβ42、K16nL-Aβ42に対する凝集抑制活性を示す。

B環の水酸基の数	(OH) <sub>3</sub>	(OH) <sub>2</sub>	OH	—
 <p>フラボノール</p>	 <p>Dihydromyricetin (+++、+)</p>	 <p>Taxifolin (++、-)</p>	 <p>Dihydrokaempferol (-, n.t.<sup>a)</sup>)</p>	 <p>Pinobanksin (-, n.t.)</p>
 <p>フラボノール</p>	 <p>Myricetin (+++、+)</p>	 <p>Quercetin (++、-)</p>	 <p>Kaempferol (++、++)</p>	 <p>Galangin (-, n.t.)</p>
		 <p>Morin (++、++)</p>	 <p>Datisctin (++、++)</p>	

<sup>a</sup>n.t.: not tested

## 8. 結 語

本研究では、シリマリンが*in vivo*において強い抗AD活性を示すことを明らかにし、A $\beta$ 42の凝集抑制活性を有する化合物の一つとしてタキシフォリンを同定した。本研究代表者らはこれまでに、A $\beta$ 42凝集体の構造解析<sup>10)</sup>から、Gln15 ~ Ala21ならびにVal24 ~ Ile32領域が分子間 $\beta$ シート構造の形成に関与していることを報告している(図1)。本研究結果より、カテコール型フラボノイドは空気酸化によって*o*-キノン体を形成し、A $\beta$ 42のリシン残基(主としてLys16)との共有結合を介して、分子間 $\beta$ シートを取りにくくすることによりA $\beta$ 42の凝集を抑制し、毒性を緩和するメカニズムが提唱された<sup>11)</sup>。

ごく最近、固体NMR実験から、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造をもつ非カテコール系のポリフェノールであるクルクミンは、A $\beta$ 42のPhe19、20との芳香環どうしの $\pi/\pi$ スタッキングによって凝集を阻害している可能性が示唆された<sup>12)</sup>。一方、タキシフォリンとA $\beta$ 42凝集体との固体NMR解析では、このような $\pi/\pi$ スタッキング相互作用はほとんど認められなかったことから<sup>11)</sup>、タキシフォリンによるA $\beta$ 42の凝集抑制機構は、クルクミンによるものとはまったく異なるものと考えられる。以上の研究成果は、食品中の機能成分によるA $\beta$ 42の新しい凝集抑制戦略をもたらすものである。

## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、公益財団法人アサヒグループ学術振興財団の助成を賜りましたことを深謝いたします。

## 参考文献

- 1) Haass, C. and Selkoe, D. J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 101-112.
- 2) Ono, K. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1762*, 575-586.
- 3) Murata, N. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 2299-2306.
- 4) Morazzoni, P. *et al.*, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1993**, *18*, 289-297.
- 5) Lee, J. I. *et al.*, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *845*, 95-103.
- 6) Mucke, L. *et al.*, *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 4050-4058.
- 7) Horikoshi, Y. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *319*, 733-737.
- 8) 増田裕一、入江一浩、*FFIジャーナル* **2010**, *215*, 53-58.
- 9) Zhu, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26846-26857.
- 10) Murakami, K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15168-15174.
- 11) 村上ら、第54回天然有機化合物討論会講演要旨集 **2012**, *54*, 97-102.
- 12) Masuda, Y. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5967-5974.