

氏名	ぱりんだ けんかん <b>PARINDA KHAENGKHAN</b>
学位(専攻分野)	博 士 ( 学術 )
学位記番号	博甲第 539 号
学位授与の日付	平成 21 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	<b>Studies on anti-amyloidogenic substances in mulberry leaf</b> (桑葉に含まれる抗アミロイド物質に関する研究)
審査委員	(主査)教授 原田繁春 教授 中島敏博 教授 巽 二郎 准教授 亀井加恵子

### 論文内容の要旨

アルツハイマー病は加齢に伴って起こる神経変性疾患である。世界で 1500 万人にのぼる患者がいると推定されており、高齢化社会にあって深刻な問題となっている。アルツハイマー病脳で顕著に観察される病理的特徴として、過剰にリン酸化されたタウタンパク質の細胞内凝集（神経原線維変化）と  $\beta$  アミロイドペプチド (A $\beta$ ) の細胞外蓄積（アミロイドplaques、老人斑）がある。A $\beta$ は 40 あるいは 42 残基からなる線維状ペプチド (A $\beta$ 40 あるいは A $\beta$ 42) であり、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) が  $\beta$ -セクレターゼと  $\gamma$ -セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによって切断されて生成する。A $\beta$ は凝集して線維を形成し、さらに沈着してアミロイドplaquesを形成する。凝集 A $\beta$ は神経細胞死をもたらすことが明らかにされている。また、A $\beta$ の濃度と凝集レベルは神経変性過程に関連していることが指摘されており、A $\beta$ がアルツハイマー病の発症過程において重要な役割を果たしていると考えられている。

桑葉はカイコの餌として古来より利用されている。桑葉にはルチン、ケルセチン、イソケルセチン、アストラガリンなど多くのポリフェノール類が含まれており、強い抗酸化力を示す。また、これまでに桑葉の抽出液が A $\beta$ の凝集を抑制するとともに、A $\beta$ による神経細胞死を阻害することが明らかにされている。

本論文は、桑葉に含まれている A $\beta$ 凝集阻害活性および A $\beta$ 線維分解活性に関する研究をまとめたものであり、4 章から構成されている。第 1 章は序論であり、アルツハイマー病の進展における A $\beta$ の役割について説明し、さらに桑葉の生理機能、桑葉成分であるフラボノイドやポルフィリンなどについて解説するとともに、本研究の目的と意義を述べている。

第 2 章では、桑葉抽出液に A $\beta$ 線維分解活性が含まれることを新たに明らかにし、桑品種間における A $\beta$ 纖維分解活性を比較した。実験には、京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センターで栽培されている桑木 258 品種 282 本を用いている。内訳は、*Morus bombycina* Koidz. に属する 119 品種 132 本、*M. alba* L. の 46 品種 53 本、*M. Latifolia* Poir. の 89 品種 93 本、*M. kagayamae* Koidz. の 2 品種 2 本、*M. nigra* L. の 1 品種 1 本である。いずれも枝の上部から 5 枚の葉を採取し、メタノールで抽出した。事前に凝集させた A $\beta$ 42 に桑葉抽出液を添加してインキュベート後、チオフラビン T を添加した。チオフラビン T は凝集した  $\beta$  アミロイドペプチドに結

合して蛍光を発することが知られており、蛍光強度を測定することによって凝集 A<sub>β</sub>42 を定量した。その結果、18 品種の桑葉抽出液添加したものはコントロールの 70%以下の蛍光強度を示し、A<sub>β</sub>42 線維が分解されたことが明らかとなった。しかし、46 品種の桑葉は A<sub>β</sub>42 線維を分解しなかった。さらに、A<sub>β</sub>42 線維分解活性が強かった 22 品種の桑葉を選択し、A<sub>β</sub>42 線維分解活性の強い桑品種のスクリーニングを行った結果、白早生が最も強い活性を示した。これらの結果は、桑品種によって大きく A<sub>β</sub>42 線維分解活性が異なることを示しており、桑葉の機能利用のために活性の強い品種をスクリーニングする必要があることを明らかにした。

第 3 章では、桑葉のメタノール抽出物より A<sub>β</sub>42 凝集抑制活性および A<sub>β</sub>42 線維分解活性を持つ化合物を精製し、同定した。桑品種には *M. Alba* L.に属するミナミサカリを用い、180°C、7 秒間の熱風処理によって乾燥した葉を用いた。葉をメタノールで抽出し、逆相クロマトグラフィーを繰り返すことによって分画した結果、強い A<sub>β</sub>42 凝集抑制活性および A<sub>β</sub>42 線維分解活性を示す 3 種類の成分を精製した。質量分析および NMR スペクトルによる解析の結果、ケンフェロール-3-O-グルコシド、ケンフェロール-3-O-(6-マロニル)グルコシドおよびフェオホルビド a であると同定した。ケンフェロールの配糖体に関しては他のグループによって A<sub>β</sub>42 凝集抑制活性および A<sub>β</sub>42 線維分解活性が報告されていたが、フェオホルビド a に関しては新たな知見である。

フェオホルビド a はクロロフィル a の分解産物でありポルフィリン骨格を持つ。同様にポルフィリン骨格を持つヘミンおよびヘマチンの A<sub>β</sub>42 凝集抑制活性が報告されていたことから、市販の各種ポルフィリン化合物の活性を検討した。その結果、クロロフィル、ナトリウム銅クロロフィリン、プロトポルフィリン、亜鉛プロトポルフィリン IX、ヘミン、ヘマチンが強い活性を示したのに対し、フェオホルビド a メチルエステル、フェオフィチン a、クロロフィル a およびクロロフィル b の活性は弱く、フェオホルビド a の活性は中程度であった。これらの結果は、ポルフィリン化合物の A<sub>β</sub>42 凝集抑制活性および A<sub>β</sub>42 線維分解活性はポルフィリン環に結合しているカルボキシル基の数に相関しており、環に配位している金属は関係しないことを示している。A<sub>β</sub> に含まれる 5 残基からなる疎水領域が A<sub>β</sub> の自己凝集に関与しており、その領域に相当するペプチドが疎水結合を介して A<sub>β</sub> と結合し、A<sub>β</sub> の線維化を阻害することが報告されている。これらのことより、疎水性のポルフィリン環と A<sub>β</sub> の疎水領域との疎水的相互作用を介して、ポルフィリン化合物と A<sub>β</sub> が結合すると考えられる。ポルフィリン環に結合しているカルボキシル基は、A<sub>β</sub>42-ポルフィリン化合物複合体の溶解度を増加させることによって、A<sub>β</sub>42 線維と可溶性 A<sub>β</sub>42 の平衡を可溶性 A<sub>β</sub>42 側に移動させると考えられる。このことが、ポルフィリン化合物の A<sub>β</sub>42 凝集抑制活性および A<sub>β</sub>42 線維分解活性のメカニズムであると結論付けている。

A<sub>β</sub> は細胞毒性をもち、細胞を死滅させることが知られている。そこで、海馬ニューロンに桑葉抽出液およびフェオホルビド a を投与し、A<sub>β</sub> の細胞毒性に対する神経細胞保護作用について検討した。その結果、桑葉抽出液は神経保護作用を示したのに対し、フェオホルビド a は神経保護作用を示さなかった。一方、ケンフェロールの配糖体は神経保護作用を有することが報告されている。フェオホルビド a はかさ高く、疎水性であるポルフィリン環のために、細胞膜に容易に結合することが考えられる。これは、A<sub>β</sub> を標的とした薬剤の設計において、細胞に投与した際の局在性を考慮する必要があることを示している。以上の結果より、A<sub>β</sub> を標的とした薬剤の論理設計について、A<sub>β</sub> と結合するための疎水性領域と A<sub>β</sub> 線維を解離させるための親水性領域に加え、細胞に投与した際に正しく局在させるために疎水性領域と親水性領域のバランス、分子の大きさや形

を考慮することが必要であることを提唱した。

第4章は結論であり、本研究成果を総括している。

## 論文審査の結果の要旨

本学位論文は、アルツハイマー病の進展に関与するアミロイド $\beta$ ペプチドの凝集を桑葉成分が抑制することに着目して研究を行ったものである。アルツハイマー病脳で顕著に観察される病理的特徴の一つとして、 $\beta$ アミロイドペプチド( $A\beta$ )の細胞外蓄積が知られている。 $A\beta$ は40あるいは42残基からなる線維状ペプチド( $A\beta40$ あるいは $A\beta42$ )であり、凝集して線維を形成し、アミロイドplaquesを形成する。凝集 $A\beta$ は神経細胞死をもたらすことが明らかにされている。また、 $A\beta$ の濃度と凝集レベルは神経変性過程に関連していることが指摘されており、 $A\beta$ がアルツハイマー病の発症過程において重要な役割を果たしていると考えられている。

本論文は、桑葉に含まれている $A\beta$ 凝集阻害活性および $A\beta$ 線維分解活性に関する研究をまとめたものである。論文の前半部において、桑葉抽出液に $A\beta$ 線維分解活性が含まれることを新たに明らかにした。さらに、桑木258品種282本について $A\beta$ 纖維分解活性を測定した結果、18品種の桑葉は $A\beta42$ 線維を強く分解したが、46品種の桑葉は $A\beta42$ 線維を分解しなかった。これらは、桑品種によって大きく $A\beta42$ 線維分解活性が異なることを示しており、桑葉の機能利用のためには活性の強い品種をスクリーニングする必要があることを明らかにした。

論文の後半部において、桑葉のメタノール抽出物より $A\beta42$ 凝集抑制活性および $A\beta42$ 線維分解活性を持つ化合物を精製し、3種類の活性物質を得た。NMRおよび質量分析によって、それらをケンフェロール-3-O-グルコシド、ケンフェロール-3-O-(6-マロニル)グルコシドおよびフェオホルビドaであると同定した。ケンフェロールの配糖体に関しては、他のグループによってすでに $A\beta42$ 凝集抑制活性および $A\beta42$ 線維分解活性が報告されていたが、フェオホルビドaに関しては新たな知見である。

フェオホルビドaはクロロフィルaの分解産物でありポルフィリン骨格を持つことから、各種ポルフィリン化合物の活性を検討した。その結果、クロロフィル、ナトリウム銅クロロフィリン、プロトポルフィリン、亜鉛プロトポルフィリンIX、ヘミン、ヘマチンが強い活性を示したのに対し、フェオホルビドaメチルエステル、フェオフィチンa、クロロフィルaおよびクロロフィルbの活性は弱く、フェオホルビドaの活性は中程度であった。これらの結果は、ポルフィリン化合物の $A\beta42$ 凝集抑制活性および $A\beta42$ 線維分解活性はポルフィリン環に結合しているカルボキシル基の数に相関しており、環に配位している金属は関係しないことを示している。 $A\beta$ に含まれる5残基からなる疎水領域が $A\beta$ の自己凝集に関与していることが報告されている。このことより、疎水性のポルフィリン環と $A\beta$ の疎水領域間の疎水的相互作用を介して、ポルフィリン化合物と $A\beta$ が結合すると考えられる。ポルフィリン環に結合しているカルボキシル基は、 $A\beta42$ -ポルフィリン化合物複合体の溶解度を増加させることによって、 $A\beta42$ 線維と可溶性 $A\beta42$ の平衡を可溶性 $A\beta42$ 側に移動させると考えられる。このことが、ポルフィリン化合物の $A\beta42$ 凝集抑制活性および $A\beta42$ 線維分解活性のメカニズムであると結論付けている。

$A\beta$ は細胞毒性をもち、細胞を死滅させることが知られている。そこで、海馬ニューロンに桑葉抽出液およびフェオホルビドaを投与し、 $A\beta$ の細胞毒性に対する神経細胞保護作用について検討した。その結果、桑葉抽出液は神経保護作用を示したのに対し、フェオホルビドaは神経保護作

用を示さなかった。一方、ケンフェロールの配糖体は神経保護作用を有することが報告されている。フェオホルビド a はかさ高く、疎水性であるポルフィリン環のために、細胞膜に容易に結合することが考えられる。これは、A $\beta$ を標的とした薬剤の設計において、細胞に投与した際の局在性を考慮する必要があることを示している。以上の結果より、A $\beta$ を標的とした薬剤の論理設計について、A $\beta$ と結合するための疎水性領域と A $\beta$ 線維を解離させるための親水性領域に加え、細胞に投与した際に正しく局在させるために疎水性領域と親水性領域のバランス、分子の大きさや形を考慮することが必要であることを提唱した。

以上、本学位論文は桑葉に含まれる A $\beta$ 凝集抑制活性物質に関する貴重な研究成果をまとめたものである。新規な知見を含んでおり、A $\beta$ を標的とした薬剤の論理設計をする上で重要な意義を持つ論文である。なお、本論文は、査読付の論文誌に採録が受理された以下の学術論文をもとにしている。

1. Parinda Khaengkhan, Keita Takahashi, Tetsuhiro Niidome, Masatoshi Ichida, Hachiro Sugimoto, Shigeharu Harada, and Kaeko Kamei. A comparison of the amyloid  $\beta$  fibril-destabilizing activities of leaves among varieties of the mulberry. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* に掲載予定
2. Parinda Khaengkhan, Yuki Nishikaze, Tetsuhiro Niidome, Kenji Kanaori, Kunihiko Tajima, Masatoshi Ichida, Shigeharu Harada, Hachiro Sugimoto, and Kaeko Kamei. Identification of an anti-amyloidogenic substance from mulberry leaves. *NeuroReport*, 2009 Jul 16. [Epub ahead of print]