

氏名(本籍)	みやまへゆうさく 宮前友策(三重県)			
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博甲第5756号			
学位授与年月日	平成23年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	カフェオイルキナ酸の神経細胞保護作用に関する生物有機化学的研究			
主査	筑波大学教授	理学博士	繁森英幸	
副査	筑波大学教授	農学博士	杉浦則夫	
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	内海真生	
副査	筑波大学教授	博士(農学)	磯田博子	

### 論文の内容の要旨

高齢化社会を迎えアルツハイマー型認知症(AD)の患者数は増加の一途を辿っているが、有効な治療法は見出されていない。最近、3,5-di-O-カフェオイルキナ酸(3,5-di-CQA)に、アルツハイマー症に関与するとされているアミロイドβタンパク質(Aβ)による神経細胞死を抑制する効果のあることが見いだされた。しかしながら、活性に重要な部分構造やCQAの作用について明らかにされていない。そこで本研究では、COAを用いて神経細胞保護作用のメカニズムを生物有機化学的に明らかにすることを目的とした。

まず、プロボリスから単離した3,4,5-tri-O-カフェオイルキナ酸(3,4,5-tri-CQA)に着目し、Aβによる神経細胞死に対する保護作用を検討した結果、濃度依存的に細胞生存率の回復が見られた。プロテオミクスによりタンパク質の発現変化を網羅的に調べた結果、解糖系酵素であるglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)及びphosphoglycerate mutase 1(PGAM1)の発現増加が認められた。発現が増加した解糖系酵素のmRNA発現をリアルタイムPCRにより測定した結果、いずれの解糖系酵素もmRNA発現の増加が見られた。さらに細胞のエネルギー単位であるATPの産生量を測定した結果、ATP産生量の増加が見られた。

次に、詳細な構造活性相関を明らかにするため、多種類のCQA類縁体及び誘導体を合成し、合成した化合物及び天然由来の化合物をそれぞれ処理したSH-SY5Y細胞におけるATP産生量を測定した。その結果、i) ATP産生促進活性にはカフェオイル基の存在が重要であること、ii) カフェオイル基の結合数が増加するほど高い活性を示すこと、iii) 1位にカフェオイル基が結合した化合物より3位、4位または5位に結合したもののほうが高い活性を示すこと、iv) 1位のカルボキシル基が活性に重要であることを明らかにした。

さらに、CQAのAβ凝集阻害活性について検討する目的でTh-T試験を行った結果、Aβのみと比べ、濃度依存的に顕著な蛍光量の減少が認められた。また、透過型電子顕微鏡(TEM)によりAβ凝集形態の直接観察を行った結果、3,4,5-tri-CQA及び4,5-di-CQAを加えた溶液においてフィブリルと見られるAβ凝集体の減少及び消失が認められた。さらにAβのβシート構造の消失を検出するためCDスペクトル測定を行った。その結果、両化合物を処理することで、Aβ凝集体のβシート構造に特徴的な220 nmにおける負の吸収の顕著な減少が認められた。SH-SY5Yにおける神経細胞保護活性をMTTアッセイにより評価した結果、3,4,5-tri-CQA及び4,5-di-CQAのいずれも細胞生存率の回復が見られた。さらにウェスタンブロットティングに

より凝集状態の変化を調べた結果、3,4,5-tri-CQA を処理することにより分子量 100-200 KDa の巨大なオリゴマーが形成されることが明らかとなった。CQA 処理により神経細胞保護作用を示すことから形成された凝集体は非毒性オリゴマーであることが推測される。Th-T 試験により A $\beta$  凝集阻害活性における構造活性相関を検討した結果、カフェ酸の存在及びカフェ酸のフェノール性水酸基が活性に重要であること、カフェオイル基の結合数が増加するほど活性が強くなることが明らかにした。

以上の研究により、CQA による神経細胞保護作用のメカニズムを以下のように推定した。まず、CQA は A $\beta$  に直接作用し  $\beta$  シート構造の形成を阻害して、非毒性オリゴマー形成を誘導する。一方、細胞内に取り込まれた CQA は、解糖系酵素の発現増加を促す。それに伴い、細胞内の ATP 産生量が上昇し、細胞内の代謝レベルが回復する。これらの要因が単一ではなく、複合的に作用して神経細胞保護効果を示しているものと考えられる。

### 審査の結果の要旨

本研究は、プロポリスから単離した 3,4,5-tri-O- カフェオイルキナ酸 (3,4,5-tri-CQA) 等の CQA のアミロイド  $\beta$  タンパク質 (A $\beta$ ) による神経細胞死に対する神経細胞保護作用のメカニズムを生物有機化学的に調べた報告である。

まず、3,4,5-tri-CQA が ATP 産生量を増加させることから、プロテオミクスを用いて解糖系酵素である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 及び phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1) が関与していることを見出した。この ATP 産生に関わる CQA の構造活性相関を調べた結果、カフェオイル基の結合数やカルボキシル基の存在が活性に重要であることを明らかにした。さらに、Th-T 試験、透過型電子顕微鏡 (TEM)、CD スペクトル法およびウェスタンブロッティング法を駆使して、CQA の A $\beta$  凝集阻害によるメカニズムの解明を行った。すなわち、CQA は A $\beta$  に直接作用し  $\beta$  シート構造の形成を阻害して、非毒性オリゴマー形成を誘導する一方で細胞内に取り込まれた CQA は、解糖系酵素の発現増加を促し、それに伴い、細胞内の ATP 産生量が上昇し、細胞内の代謝レベルが回復する。以上のように、CQA のような天然物質による神経細胞保護作用のメカニズム解明研究はほとんど行われておらず、本研究はこの分野における重要な知見を示唆したものであり評価に値する。

CQA はコーヒー豆やプロポリス、サツマイモ、ムラサキイモなど食品中に広く含有される成分であることから、様々な食素材を利用することが可能であり、本研究の成果は認知症や老化の予防を目的とした機能性食品開発への応用に貢献できるものと考えられる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。