

|         |   |       |
|---------|---|-------|
| 称号及び氏名  | 博士（応用生命科学）  | 菊川 昌希 |
| 学位授与の日付 | 平成29年9月25日  |       |
| 論文名     | Enzymatic synthesis of water-soluble ferulic acid derivatives and their improving effects for Alzheimer's disease.<br>(水溶性フェルラ酸誘導体の酵素合成およびアルツハイマー病改善効果に関する研究) |       |
| 論文審査委員  | 主査  | 阪本 龍司 |
|         | 副査  | 乾 隆   |
|         | 副査  | 山地 亮一 |

## 論文要旨

### 序論

フェルラ酸 (FA) は、植物細胞壁中に広く偏在しているポリフェノールであり、小麦などの単子葉植物ではアラビノキシランに、甜菜などの双子葉植物ではペクチンに結合していることが多い。アラビノキシランでは  $\alpha$ -L-アラビノフラノース側鎖の 5 位の水酸基に、ペクチン中ではアラビナン領域の  $\alpha$ -L-アラビノフラノースの 2 位の水酸基、あるいはガラクトタン領域の  $\beta$ -D-ガラクトピラノースの 6 位の水酸基にエステル結合している。局在と組成は植物によって異なり、同一植物においても器官が異なれば、比率も異なってくることがわかっている。

FA は抗酸化・抗炎症・紫外線吸収作用などを有する機能性物質であり、食品、化粧品、医療産業での利用が期待されている。また、近年ではアルツハイマー病 (AD) などの脳疾患の予防効果が注目されている。しかし、FA は水溶性および脂溶性が低いために、食品や化粧品分野での利用は制限され、サプリメントとしては嚥下能力が低下した高齢患者の服用に問題を抱えている。

溶解性を向上させる手段として、FA のアシル基に糖やアルキルを導入させる方法がある。FA の脂溶性向上を目的とした酵素合成の研究はリパーゼやフェルラ酸エステラーゼ (FAE) などで行われており、報告例も比較的多い。一方で、水溶性向上を目的とした報告例は数例しかない。水溶性誘導体の場合、グリセロールや糖をエステル化させることで水溶性向上が期待できる。当研究グループでは、*Aspergillus niger* 由来 FAE のエステル縮合能を利用したフェルラ酸グリセロールエステル (FA-G1) の合成に成功している。しかし水

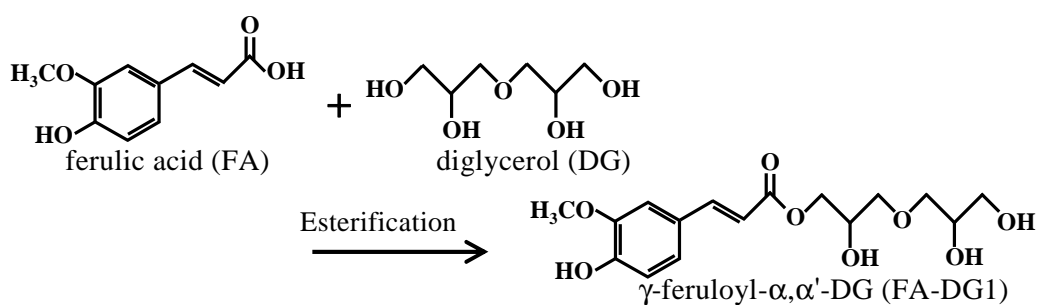
溶性は 1.20 mg/ml と元の FA の水溶性 (0.69 mg/ml) と比べて格段に増加する結果とはならなかった。

AD は認知症の一つであり、日本の超高齢社会における問題の一つである。病理学的には脳の萎縮、 $\beta$ -アミロイド ( $A\beta$ ) 凝集による老人斑形成、神経原線維変化の多発などの特徴を持つ神経変性疾患である。 $A\beta$  は 40~42 個のアミノ酸から為るペプチドで、正常脳では適切な排出が行われるが、加齢などの影響で産生と排出のバランスが崩れると脳内濃度が高まり、凝集し脳内に蓄積してしまう。凝集  $A\beta$  は、アストロサイトやマイクログリアを活性化し、一酸化窒素 (NO)、活性酸素種や炎症性サイトカインの産生を促進し、神経炎症を誘導する。従って  $A\beta$  凝集による慢性的な神経炎症は AD の発病、進行に関与していると考えられている。

本研究では、まず初めに FAE による水溶性 FA 誘導体の酵素合成を行い、FA の水溶性向上を試みた。さらにその AD 改善効果を細胞試験および AD モデルマウスで検証し、有効性メカニズムの解析を行った。

## 1 章 FAE を用いた水溶性 FA 誘導体の合成

ペクチナーゼ製剤 (ペクチナーゼ PL "アマノ"; 天野エンザイム社) より精製した FAE を用いて、グリセロールの 2 量体のジグリセロール (DG) をアシル基受容体にエステル縮合反応を行った。主生成物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより精製し、黄色シラップ状のジグリセロールエステル (FA-DG) を単離した。3 種類の異性体が確認されたので、NMR による構造解析を行ったところ、それらは FA のエステル置換位の違い、もしくは DG のエーテル結合位の違いによるものであった。主生成物である FA-DG1 ( $\gamma$ -feruloyl- $\alpha,\alpha'$ -DG : 下図) の水溶性は、元の FA と比べて 1,000 倍以上 (> 980 mg/ml) に増加した。一方、FA のもつ紫外線吸収特性や抗酸化能については、エステル化することによっても、それらの機能は保持されていた。



次に、合成反応の最適化を行った。4 つのパラメータ (FA 濃度、pH、温度、水分含有率) について検討した結果、最適条件下において対 FA 収率 95% と極めて効率的にエステル体を合成することに成功した。特に効果的であったのは反応系内の水分含有率であり、エバポレーターで水分を蒸発させながら反応させることで、大幅な収率向上がみられた。さらに、反応途中の溶液に FA を数回に分けて添加する Fed-Batch 法を採用することにより、高収率に加え、高収量での FA-DG 合成系を実現させた。

Fed-Batch 法では FA-DG だけでなく、1 分子の DG に 2 分子の FA がエステル結合したジフェルロイルジグリセロール (diFA-DG) も合成された。これは反応液中で大量に合成された FA-DG が、DG と同様に FA のアクセプターとして認識されるためだと考えられ

た。確認された 5 種の HPLC のピークのうち 3 種類に関しては NMR によって分子構造を決定した。diFA-DG の水溶性は、FA の 1/4 程度に減少した。またトリグリセリドにも難溶解性で、低級アルコール (メタノール、エタノール) には可溶性であった。一方で抗酸化能は FA の 2 倍の値を示した。

## 2 章 アストロサイトの NO 産生および iNOS 産生抑制効果の検証

獲得した水溶性 FA 誘導体 (FA-DG1) および先に獲得した FA-G1 のアストロサイト異常活性化に対する抑制効果について検証した。異常活性化による過剰な NO および誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) の産生は AD の要因の一つと考えられている。

ラット胎仔より大脳皮質アストロサイトを調製し、96 ウェルプレートに播種した。播種したアストロサイトに対し FA および誘導体を添加後、リポ多糖 (LPS) による刺激を行った。24 時間後にグリース法により上清中の NO 産生量を測定し、ウエスタンブロッティング法により iNOS およびシグナル伝達物質のタンパク量を測定した。LPS 刺激により、NO が過剰産生されるが、FA および誘導体処理によりそれらが濃度依存的に抑制されることを確認した。FA 以外に他の桂皮酸類 (シナピン酸、*p*-クマリン酸、コーヒー酸、3,4-ジメトキシ桂皮酸) に対して、同様の試験を行ったところ、シナピン酸も NO 産生を抑制することが明らかとなった。

FA および誘導体に関しては、iNOS 発現に関与する NF- $\kappa$ B 経路への影響を検証した。NF- $\kappa$ B は細胞質内で I $\kappa$ B- $\alpha$  と複合体を形成している。LPS 刺激によるシグナル伝達により I $\kappa$ B- $\alpha$  が分解されると、NF- $\kappa$ B が核内移行し、核内で iNOS 産生を誘導する。そこで、FA および誘導体処理による iNOS 産生量、NF- $\kappa$ B 核内移行量、I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解量を測定した。その結果、いずれの量も減少していることが確認された。従って、FA および誘導体の NO 産生抑制効果は NF- $\kappa$ B 経路のシグナル伝達抑制によるものであることが明らかとなった。

## 3 章 A $\beta$ 側脳室注入マウスの記憶障害および A $\beta$ 凝集抑制効果の検証

AD 改善効果を AD モデルマウスを用いて評価した。FA および誘導体を 6 週間事前投与したマウスに AD の原因因子である A $\beta$  (25-35) を側脳室内に注入した。1 週間後に、恐怖付け試験および海馬脳神経細胞の観察を実施した。水のみを飲ませたコントロール群では記憶障害が生じ、恐怖付け試験においては健常マウスでは観察されるすくみ行動 (Freezing) が減少した。一方、FA および誘導体の投与群では、マウスのすくみ行動の減少が軽減された。また、海馬神経細胞の脱落も軽減された。従って、水溶性 FA 誘導体にも AD 改善効果を有していることが証明された。

次に FA および誘導体の神経細胞への影響を細胞試験で評価した。ラット胎仔より神経細胞を調製し、96 ウェルプレートに播種した。播種した神経細胞に対し、FA および誘導体と A $\beta$  を混合したものを添加し、24 時間後に MTT 法で細胞生存率を測定した。A $\beta$  のみを添加した場合には神経細胞死が誘導されたが、FA および誘導体を混合することで神経細胞死が抑制された。

さらに FA および誘導体の A $\beta$  に対する影響を検討した。A $\beta$  に FA および誘導体を混合し、3 日間インキュベートした。3 日後、凝集 A $\beta$  に特異的結合を示すチオフラビ

ン T 蛍光試薬により、凝集強度を測定した。A $\beta$  は経時的に凝集強度が上昇していくが、FA および誘導体により凝集が抑制された。また凝集した A $\beta$  に対しても蛍光強度の低下がみられたことより、凝集 A $\beta$  の乖離作用も有することが明らかとなった。従って、FA および誘導体は A $\beta$  凝集を抑制することで AD 改善効果を有していることが明らかとなった。

## 総括

本研究では FAE を用いて、高収率・高収量で水溶性 FA 誘導体を合成することに成功した。水溶性が 1,000 倍以上増加した FA 誘導体の報告例は我々の知る限りない。これにより、FA の様々な産業への応用が大いに期待できる。また FA 誘導体には FA とほぼ同様の AD 予防効果が認められ、そのメカニズムは A $\beta$  凝集抑制だけでなく、アストロサイトの異常活性化を抑制することで間接的に神経細胞死を抑制するものであることも新たに確認された。これらの結果により、嚥下能力の低下した高齢患者でも容易に FA を服用することが可能となった。今後は本研究を参考に、さらに作用機序、体内動態、安全性などが解明され、FA-DG が広く産業利用されることを期待する。

## 審査結果の要旨

フェルラ酸 (FA) は、植物細胞壁中に広く偏在しているポリフェノールであり、小麦などの単子葉植物ではヘミセルロースに、甜菜などの双子葉植物ではペクチンに結合していることが多い。また抗酸化・抗炎症・紫外線吸収作用などを有する機能性物質であり、食品、化粧品、医療産業での利用の可能性が示唆されている。近年ではアルツハイマー病 (AD) などの脳疾患の予防効果が注目されている。しかし、FA は水溶性および脂溶性が低いために、食品や化粧品分野での利用は制限され、サプリメントとしては嚥下能力が低下した高齢患者の服用に問題を抱えている。溶解性を向上させる手段として、FA のアシル基に糖やアルキルを導入させる方法がある。アルキルを導入し脂溶性を高める酵素合成は比較的行われているが、水溶性誘導体の酵素合成例は数例しかない。

一方で AD は認知症の一つであり、日本の超高齢社会における対策すべき課題の一つである。病理学的には脳の萎縮、 $\beta$ -アミロイド (A $\beta$ ) 凝集による老人斑形成、神経原線維変化の多発などの特徴を持つ神経変性疾患である。A $\beta$  凝集による慢性的な神経炎症は AD の発病、進行に関与していると考えられている。

申請者は、フェルラ酸エステラーゼ (FAE) による水溶性 FA 誘導体の合成を行い、FA の水溶性向上を試みた。さらに得られた誘導体に対して AD 改善効果を含む機能性を評価した。

1 章では、ペクチナーゼ製剤より精製した FAE を用いてジグリセロール (DG) をアシル基受容体にエステル縮合反応を行った。主生成物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグ

ラフィーにより精製し、黄色シラップ状のジグリセロールエステル (FA-DG) を単離した。得られた FA-DG の水溶性は、元の FA と比べて 1,000 倍以上に増加した。一方、FA のもつ紫外線吸収特性や抗酸化能については、エステル化することによっても、それらの機能は保持されていた。

次に、合成反応の最適化を行った。4 つのパラメータ (FA 濃度、pH、温度、水分含有率) について検討した。最適条件で酵素合成を行うと、95% と極めて高い収率が得られた。さらに、反応途中の溶液に FA を数回に分けて添加する Fed-Batch 法を採用することにより、高収率に加え、高収量での FA-DG 合成系を実現させた。Fed-Batch 法では FA-DG だけでなく、1 分子の DG に 2 分子の FA がエステル結合したジフェルロイルジグリセロール (diFA-DG) も合成された。しかし diFA-DG の水溶性は、FA の 4 分の 1 程度と難水溶性であった。一方で、抗酸化能は FA の 2 倍の値を示した。

2 章では、AD の病因の一つと考えられているアストロサイト異常活性化の抑制効果について検証した。ラット大脳皮質由来アストロサイトに対してリポ多糖処理をしたところ、一酸化窒素 (NO) が過剰産生されるが、FA および誘導体処理によりそれらが抑制されることを確認した。さらに iNOS 発現に関与する NF- $\kappa$ B 経路への影響を検証した。ウェスタンブロット法により NF- $\kappa$ B 経路に関与するタンパク量を測定したところ、FA および誘導体処理によって、iNOS 産生量、NF- $\kappa$ B 核内移行量、I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解量がいずれも減少することが確認された。この結果より、FA および誘導体の NO 産生抑制効果は NF- $\kappa$ B 経路のシグナル伝達抑制によるものであることを明らかにした。

3 章では、AD 改善効果を AD モデルマウスを用いて評価した。AD の原因因子である A $\beta$  (25-35) を側脳室内に注入したコントロールマウスでは記憶障害が生じ、恐怖付け試験では健常マウスでは観察されるすくみ行動 (Freezing) が減少していた。一方、FA および誘導体を 6 週間事前投与することで、A $\beta$  注入マウスの記憶障害の症状が軽減された。また、同マウスでは海馬神経細胞の脱落も軽減されていた。次にラット神経細胞を用いて FA および誘導体を評価した。その結果、FA および誘導体は A $\beta$  誘導性の神経細胞死を抑制することが明らかとなった。さらに A $\beta$  凝集抑制効果を検討した。凝集 A $\beta$  に特異的なチオフラビン T 蛍光試薬を用いて、FA および誘導体を添加した場合の A $\beta$  の凝集強度を測定した。その結果、いずれの化合物も A $\beta$  凝集を抑制した。また凝集した A $\beta$  に対しても蛍光強度の低下がみられたことより、A $\beta$  乖離作用も有することが明らかとなった。従って、FA および誘導体は A $\beta$  凝集を抑制することで AD 改善効果を有していることが明らかとなった。

申請者は FAE を用いて、高収率・高収量で水溶性 FA 誘導体を合成することに成功した。水溶性が 1,000 倍以上増加した FA 誘導体の報告例は申請者の知る限りない。また FA 誘導体には FA とほぼ同様の AD 予防効果が認められ、そのメカニズムは A $\beta$  凝集抑制だけでなく、アストロサイトの異常活性化を抑制することで間接的に神経細胞死を抑制するものであることも新たに確認された。これにより、AD サプリメント用途としての可能性も広がった。これらの成果は、FA が広く産業利用できる可能性を広げるものである。また応用生命科学特に、応用酵素化学、細胞生物学の分野に大きく貢献するものであり、本論文の審査並びに、最終試験の結果と併せて、博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。