

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	佐藤 瑞穂
論文題目	Inhibitory Mechanism for Amyloid β 42 Aggregation by Catechol-type Flavonoids (カテコール型フラボノイドによるアミロイド β 42 凝集抑制機構)		
(論文内容の要旨)			
<p>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 ($A\beta$42) は、凝集することにより神経細胞毒性を示す。近年、ケルセチン、EGCG などのフラボノイドが $A\beta$42 の凝集を阻害することが報告されているが、凝集抑制活性に必要な構造因子ならびに $A\beta$42 における相互作用部位については不明な点が多い。申請者の研究グループは近年、マリアアザミ種子のメタノール抽出物であるシリマリンが、AD モデルマウスにおいて AD 様症状を改善することを報告した。本論文は、シリマリンに含まれる活性本体を同定し、その凝集抑制機構を、有機化学的手法を用いて解析した結果をとりまとめたものである。その主な内容は以下の通りである。</p> <p>第 1 章では、$A\beta$42 の凝集と毒性発現メカニズム、ならびにこれまでに報告されている $A\beta$ 凝集抑制剤とその作用機構の概略を説明し、本研究の目的および意義について述べている。</p> <p>第 2 章では、シリマリンから主要なフラボノイド 6 種を単離・同定し、それらの $A\beta$42 凝集抑制活性をチオフラビン T 蛍光法によって調べた結果を示している。これらのうち、カテコール構造を有するタキシフォリンだけが $A\beta$42 の凝集を顕著に抑制した。さらに、複数のタキシフォリンのメトキシ誘導体の $A\beta$42 凝集抑制活性を調べたところ、A 環 7 位の水酸基は抑制活性にほとんど寄与せず、B 環 3', 4' 位の水酸基 (カテコール構造) が特に重要であることが判明した。</p> <p>第 3 章では、タキシフォリンによる $A\beta$42 凝集抑制作用におけるカテコール構造の役割について述べている。カテコール構造は、容易に空気酸化されて <i>o</i>-キノン体を形成することが知られている。酸化剤である過ヨウ素酸ナトリウムを添加することによって、タキシフォリンの凝集抑制能は著しく増大した。一方で、減圧条件下では、タキシフォリンの抑制能は消失した。また、これらの凝集抑制活性の変化は、酸化型タキシフォリン (<i>o</i>-キノン体) の生成と相関していることが、UV 測定より明らかになった。</p> <p>一般に、<i>o</i>-キノン体を有する化合物は、タンパク質中の塩基性アミノ酸残基と共有結合を形成することによって、その機能に影響を与えることが知られている。LC-MS (ESI) 分析および、5, 16, 28 番目の塩基性アミノ酸残基をそれぞれノルロイシンに置換した $A\beta$42 変異体に対するタキシフォリンの凝集抑制活性を評価することにより、16 番目のリシン残基が凝集抑制における主要な標的であることが示された。</p> <p>ところで、これまでに $A\beta$42 凝集抑制剤として報告されているフラボノイドの多</p>			

くは、C 環 2, 3 位に二重結合を有するフラボノールである。一方、タキシフォリン等の C 環に二重結合をもたないフラバノールの A β 42 の凝集能に与える影響はほとんど検討されていなかった。そこで、B 環水酸基の位置および数が異なるフラボノール 6 種ならびにフラバノール 4 種について、A β 42 凝集能への影響を評価した。その結果、タキシフォリンが含まれるフラバノールだけでなく、フラボノールにおいても、カテコール構造が抑制活性に重要であることがわかった。さらに、非カテコール型フラボノールの A β 42 凝集抑制活性は、酸素濃度とは無関係であった。以上の結果より、非カテコール型フラボノールにおける A β 42 凝集抑制には、空気酸化を介した付加体形成以外のメカニズムの存在が示唆された。

第 4 章では、タキシフォリンと A β 42 との相互作用について、固体 NMR 法を用いて検討した結果を述べている。共同研究者の増田らは、固体 NMR 法による解析から、非カテコール型ポリフェノールであるクルクミンが、A β 42 の Phe19 および Phe20 との π/π スタッキングなどを介して、分子間 β シート領域 (Gln15 ~ Ala21) と相互作用することによって凝集を抑制している可能性を報告している。そこで、B 環を ^{13}C で標識したタキシフォリンと、分子間 β シート領域を中心に $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ 標識した A β 42 を用いて 2 次元距離相関 NMR を測定した。その結果、クルクミンを用いた実験で観測された Phe19 および Phe20 とのクロスピークは検出されなかったことから、タキシフォリンによる凝集抑制機構は、クルクミンとは異なることが明らかになった。

以上より、カテコール型フラボノイドは空気酸化されて *o*-キノン体を形成し、主として A β 42 の 16 番目のリシン残基と共有結合し、分子間 β シートを取りにくくすることによって凝集を抑制するという新しいメカニズムが提唱された。一方、B 環にカテコール構造をもたず、C 環に二重結合をもつフラボノールの場合、クルクミンと同様に化合物の平面性が高いことから、A β 42 どちらの分子間 β シートへの挿入など、付加体形成以外のメカニズムの関与が示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 3 8 字 \times 3 6 行で作成し、合わせて、3, 0 0 0 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、4 0 0 ~ 1, 1 0 0 words で作成し
審査結果の要旨は日本語 5 0 0 ~ 2, 0 0 0 字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

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 ($A\beta_{42}$) は凝集することによって神経細胞毒性を示す。AD は生活習慣病の一つと考えられていることから、食品成分による AD 予防が期待されている。これまでに、種々のフラボノイドの *in vitro* における $A\beta_{42}$ 凝集抑制能が報告されているが、分子レベルでの作用機序に関する報告例は少ない。本論文では、マリアアザミ種子抽出物であるシリマリンに含まれるタキシフォリンが、 $A\beta_{42}$ の凝集を顕著に抑制することを見いだした。また、タキシフォリン等のカテコール型フラボノイドは、空気酸化されて *o*-キノン体を形成し、 $A\beta_{42}$ のリシン残基と共有結合を形成することにより凝集を抑制する新機構を提唱した。評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. これまでに報告されている $A\beta_{42}$ の凝集を抑制するフラボノイドの多くは、C 環に二重結合をもつフラボノールに分類される。本研究において、C 環に二重結合を持たないフラバノールとして、タキシフォリンおよびジヒドロミリセチンの $A\beta_{42}$ 凝集抑制能を初めて明らかにした。
2. LC-MS (ESI) 分析により、酸化型タキシフォリンが $A\beta_{42}$ の主として 16 番目のリシン残基とマイケル付加することを示した。カテコール型フラボノイドと $A\beta_{42}$ の付加体の存在を明確に示したのは、本論文が最初である。
3. 固体 NMR 法より、カテコール型フラボノイドであるタキシフォリンの $A\beta_{42}$ 凝集抑制機構は、平面性の高い非カテコール型ポリフェノールであるクルクミンとは明らかに異なることを示すデータを得た。

以上の研究成果は、これまで不明であったフラボノイド類の $A\beta_{42}$ 凝集抑制の作用機序の一端を明らかにしたのみならず、機能性食品因子による $A\beta_{42}$ の新しい凝集抑制戦略をもたらすものであり、天然物化学、生命有機化学、ならびに食品機能学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 26 年 2 月 7 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から 3 ヶ月以内)