

## 158. アミロイドーシス発症予防に向けた有用海藻成分の探索

八木 寿梓

鳥取大学 工学部附属グリーン・サステイナブル・ケミストリー研究センター

Key words : アミロイドーシス, アミロイド線維, 海藻

### 緒言

超高齢化社会を迎える日本において、高齢に伴い発症する難治性疾患の発症予防は、若年層の負担軽減、高齢者の健康維持・自立において非常に重要である。特に、アルツハイマー病やパーキンソン病等を含む神経変性疾患、生活習慣病の一つである II 型糖尿病等の発症を予防することは今日の課題である。これらを含む疾患群は多因子性であり、生活習慣が影響すると考えられている。これまでの研究から、これら疾患の共通機構としてさまざまな組織にタンパク質が異常凝集して沈着していることがわかった。本来、生体内で機能し生命活動を担っているタンパク質が、さまざまなストレスや老化による細胞機能低下によって、タンパク質が変性して会合し、病原性の異常凝集体を形成する。このようなタンパク質の異常によって生じる疾患はフォールディング病とも呼ばれている<sup>1,2)</sup>。

タンパク質の異常凝集体の一つの形態として、線維状の凝集体であるアミロイド線維が知られている。疾患に依存してアミロイド線維を形成するタンパク質は異なるが、アミロイド線維は脳・眼を含む多くの組織に沈着する<sup>3)</sup>。このアミロイド線維が原因で発症する疾患を総称してアミロイドーシスと呼び、アルツハイマー病等もアミロイドーシスに含まれ、今日までに約 30 症例が報告されており、年々増加傾向にある。アミロイド線維が細胞内外に沈着し細胞を破壊するため組織の機能を失う。一度沈着したアミロイド線維の分解・除去が難しいことと、損傷した組織・細胞の再生が困難であることから、これらの疾患の根治的な治療方法は開発されておらず、アミロイド線維を形成させない予防が必須である。

アミロイド線維形成の阻害研究が展開されており、さまざまな視点からアプローチされている。アミロイド線維形成は大きく 3 つの過程にわけられ、原因タンパク質の変性過程、その後に変性分子同士の会合による核形成過程、その核が形成されると爆発的に線維が増殖する伸長過程である。この反応過程にもとづいた阻害研究として、タンパク質を変性させないようにタンパク質分子内を架橋するような化合物の合成、分子間相互作用を阻害して核を形成させない阻害剤の開発や毒性の高いアミロイド線維ではなく、毒性のない不定形な凝集体へ誘導させる誘導物質の探索などが挙げられる。最近では、ポリフェノール系の化合物が抑制化合物として知られ、注目されている。ポリフェノールは、フラボノイド系、フェノール酸やクルクミン等が代表的に挙げられる。アミロイド線維の形成抑制において効果的だと報告されているのはフラボノイド系アントシアニンやクルクミンである。アントシアニンはブルーベリー等の赤紫色をした植物体に多く含まれている色素成分で、肝機能の向上や疲れ目の解消などに効果と言われていたが、アミロイド線維の形成抑制にも有用であることがわかってきた<sup>4)</sup>。

また、アルツハイマー病の発症率を例にあげると全世界を地域別に比較した場合、地中海沿岸地域で生活する人々のアルツハイマー病発症率が他の地域と比較して 40 %低いという統計データがある。地中海沿岸地域の食習慣としてオリーブ油を多量に摂取する傾向がある<sup>5)</sup>。オリーブ油の成分分析からフェノール成分であるオレオカンタールが体内にあるアルツハイマー病原因ペプチドに対して間接的あるいは直接的に作用し疾病の発症を抑えているとも考えられている。これらのことから、日々の食習慣等が将来発症しうる重篤な疾患を予防できることが示唆されており「医食同源」がアミロイドーシス研究にとって意義があることを示している。

海藻は、健康増進の食材として日本人の食に多用されている。約 2,500 種類の海藻が日本に生育しているが、その中の約 100 種類が食用として使用されている。その他の海藻は雑海藻として扱われており、廃棄対象となっている。近年、これら未利用の海藻が有用な資源として捉えられ多くの分野で利活用されつつあり、注目されている。海藻は緑藻・紅藻・褐藻に分類されており、それら海藻が有する成分が期待されている。海藻由来のポリフェノールや多糖、低分

子化合物等がアミロイド線維形成阻害に有用であれば、機能的食品や医薬品の開発といった応用研究にも期待でき、未利用資源の有効活用にもつながる。

本研究では、アミロイドーシスの発症予防を目的として、鳥取県に生育する未利用の海藻や海藻成分に着目し、アミロイド線維形成におよぼす影響について調べた。

## 方 法

### 1. 海藻抽出液の調製

海藻成分を評価するために、鳥取県の酒ノ津漁港から緑藻 7 種、褐藻 11 種、紅藻 15 種の計 33 種類の海藻を採取した。採取した海藻はすみやかに水洗し凍結保存した。抽出液の調製には各海藻 5 g を乳鉢の中ですり潰し、全量が 50 mL となるように超純水を加えて 3 時間の熱水抽出を行った。この熱水抽出液に含まれる海藻を取り除くために濾過した後、さらに 12,000 rpm、30 min で遠心分離を行い、上清画分と沈殿画分に分離した。上清画分は 3 日間凍結乾燥を行い、粉末状にした。この上清画分を水溶性の抽出液とした。ろ紙に残った海藻および遠心分離後の沈殿画分は脂溶性の成分とした。本研究では採取した海藻の中から水溶性抽出液として得られたものを用いた。

### 2. 蛋白質異常凝集検出装置 (HANABI) を用いた海藻抽出液の評価

アミロイド線維形成反応の問題点として、アミロイド線維が形成されるまでに必要とする時間が挙げられる。反応溶液を静置した状態では、アミロイド線維はタンパク質や溶液条件に依存して一日から数日の時間を要して形成するため非効率である。このアミロイド線維形成反応を促進させるために反応溶液の攪拌や振盪等の方法が用いられている。また、一度に多検体の測定を行うためにはプレートリーダーが有効だが、常時攪拌や振盪することは難しい。これらの問題を解決するために HANABI を開発した<sup>6)</sup>。HANABI は、浴槽型の超音波発生装置とマイクロプレートリーダーを組み合わせた装置である。専用の 96 穴プレートに超音波を照射することにより、アミロイド線維形成反応を加速させる。HANABI は多検体での測定が可能で、アミロイド研究の効率性が大幅に上昇する。本研究では、この HANABI を用いて水溶性の海藻抽出液を評価した。評価対象としてインスリノーマ (アミロイドーシスに含まれる) 原因タンパク質と考えられているインシュリンのアミロイド線維形成に対する影響を調べた。インシュリンのアミロイド線維形成の検出には、アミロイド線維に特異的に結合して蛍光を発する蛍光色素 thioflavin T (ThT) を用い、ThT の蛍光強度の増加を経時変化で調べた<sup>7)</sup>。

## 結 果

### 1. 海藻抽出液がアミロイド線維形成に及ぼす効果

海藻抽出液添加によるインシュリンのアミロイド線維形成に及ぼす影響を調べるために 11 種類の水溶性海藻抽出液を調製した。調製した水溶性海藻抽出物 11 種類の内 9 種類においては、何も添加していないインシュリンのアミロイド線維形成反応と比較して、蛍光強度及びアミロイド線維形成開始時間に差異が見られず抑制・阻害効果を示さなかった。その中でも少し抑制効果が見られた緑藻 A の結果を図 1 に示した。

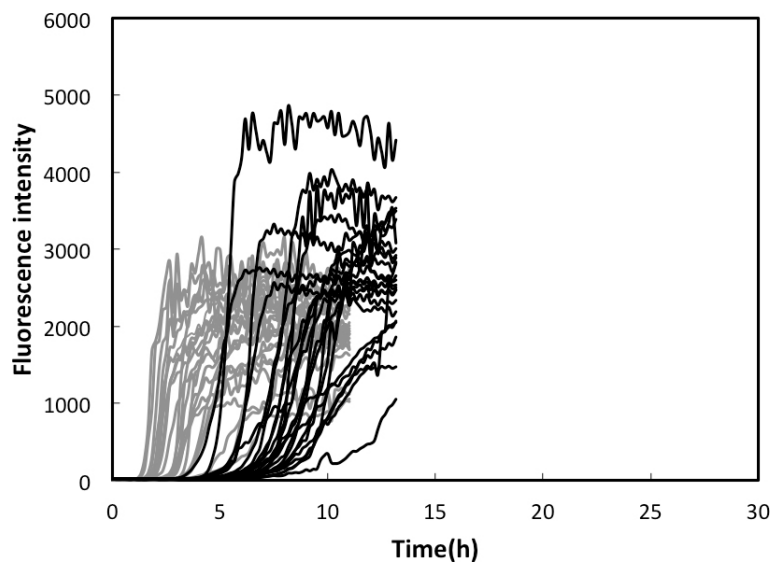


図1. 緑藻 A 抽出液添加によるインシュリンのアミロイド線維形成  
緑藻抽出液未添加（灰色）、添加（黒色）。

海藻抽出液無添加のインシュリンのコントロールは灰色に示した。コントロールは約 2.5 hr から ThT の蛍光強度の増加が見られ、アミロイド線維を形成していることがわかった。それに対して緑藻 A の海藻抽出液を添加した場合にはアミロイド線維形成が約 7.5 hr から始まり、約 5 hr の遅延効果が見られたが、蛍光強度はコントロールと比較して同等であった（黒色）。緑藻では効果的な抑制効果が見られなかったため、次に 2 種類の褐藻 A、B から得られた海藻抽出液の効果調べ、その結果をそれぞれ図 2、3 に示した。

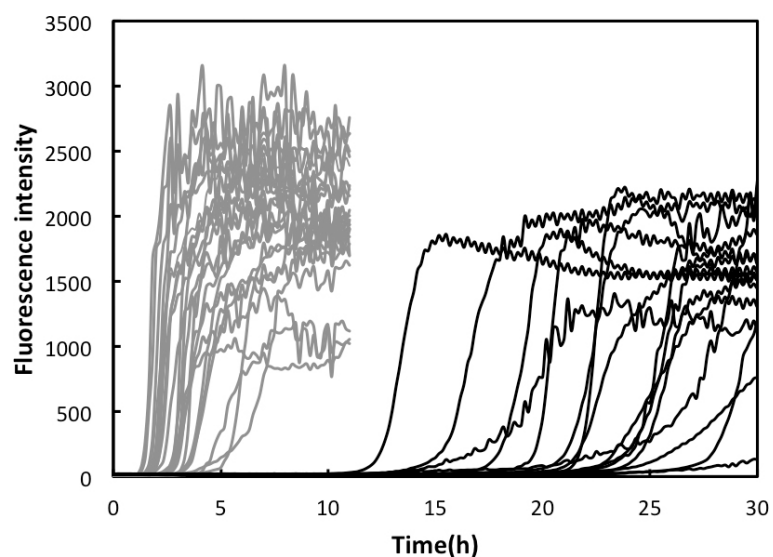


図2. 褐藻 A 抽出液添加によるインシュリンのアミロイド線維形成  
褐藻 A 抽出液未添加（灰色）、添加（黒色）。

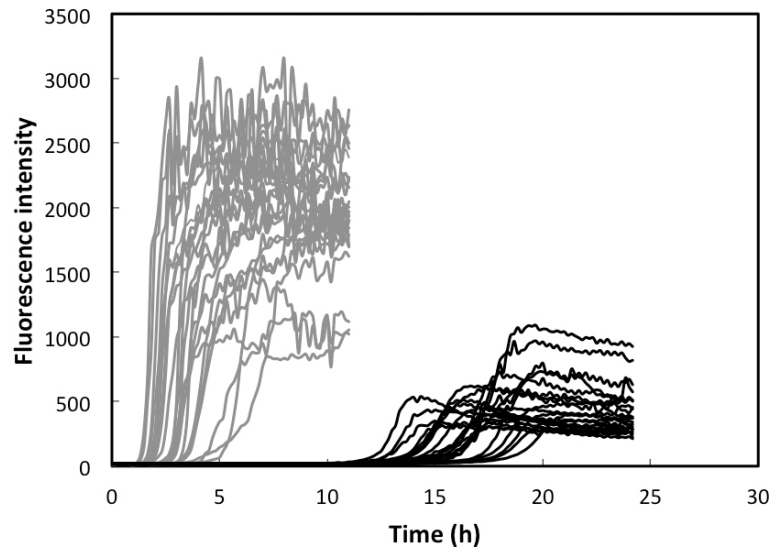


図3. 褐藻 B 抽出液添加によるインシュリンのアミロイド線維形成  
褐藻 B 抽出液未添加 (灰色)、添加 (黒色)。

褐藻 A の抽出液は緑藻 A の抽出液と比較して大きな抑制効果が見られた (図2、黒線)。コントロールと比較しても平均して約 10 hr の遅延効果が得られた。しかしながら、蛍光強度においてはコントロールと同等の値を示したことから、抑制効果は得られているが最終的にアミロイド線維を形成していると考えられた。それに対して、褐藻 B の抽出液添加の効果については興味深い結果が得られた (図3)。褐藻 A と同様に 10 hr 以上の遅延効果が得られ、さらに蛍光強度をコントロールと比較しても、大幅に蛍光強度の増加を抑えた (図3、黒色)。これらのことから褐藻 B の抽出液においては線維形成の抑制効果を示す成分を含んでいることが示唆され、雑海藻の中から有用な海藻を発見することに成功した。

## 考 察

本研究では、アミロイドーシス発症予防を目指し、有用な海藻成分の探索を行った。その結果、緑藻 A においては少しの抑制効果、褐藻 A と褐藻 B においては明らかな抑制効果が見られた。褐藻 A においては、蛍光強度の増加の傾きがコントロールとほぼ同様であったため、アミロイド線維形成反応の反応過程において伸長過程ではなく核形成過程に影響を及ぼしていると考えられた。つまり、分子間相互作用を妨げていることが示唆された。また、サンプル間で遅延時間に大きなばらつきがみられた。核形成はタンパク質モノマーの会合によって生じるが、この会合をどの程度阻害したかによって遅延時間が異なると考えられた。他方、褐藻 B においては、遅延効果とともに蛍光強度の減少が見られた。この原因として、アミロイド線維が形成する過程で一部のタンパク質が褐藻 B に含まれる成分によって異なる構造体形成 (不定形凝集) に誘導され、最終的に形成するアミロイド線維の比率が減少したためだと考えられた。毒性の高いアミロイド線維から毒性が低い不定形凝集に誘導することは非常に意味がある。さらに、本研究は超音波照射下で抑制効果の評価を行っており、超音波は周波数にも依存するが化合物等の分解にも用いられる。超音波という高ストレス下においてこのような抑制効果が得られたことから、抑制に関わっている成分の安定性の高さも評価でき、今後の医薬品開発に向けた応用研究に期待できる。

## 文 献

- 1) Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):884-90. PMID: 14685248.
- 2) Shastry BS. Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochem Int*. 2003 Jul;43(1):1-7. PMID: 12605877.
- 3) Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses (second of two parts). *N Engl J Med*. 1980 Jun 12;302(24):1333-43. PMID: 6990257. DOI: 10.1056/NEJM198006123022403.

- 4) Iwasa H, Kameda H, Fukui N, Yoshida S, Hongo K, Mizobata T, Kobayashi S, Kawata Y. Bilberry anthocyanins neutralize the cytotoxicity of co-chaperonin GroES fibrillation intermediates. *Biochemistry*. 2013 Dec 23;52(51):9202-11. doi: 10.1021/bi401135j. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24308332.
- 5) Abuznait AH, Qosa H, Busnena BA, El Sayed KA, Kaddoumi A. Olive-oil-derived oleocanthal enhances  $\beta$ -amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: in vitro and in vivo studies. 2013. *ACS Chem Neurosci*.; 4(6): 973-982. doi: 10.1021/cn400024q.
- 6) Umemoto A, Yagi H, So M, Goto Y. High-throughput analysis of ultrasonication-forced amyloid fibrillation reveals the mechanism underlying the large fluctuation in the lag time. 2014. *J Biol Chem*.; 289(39): 27290-27299. doi: 10.1074/jbc.M114.569814.
- 7) Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem*. 1989 Mar;177(2):244-9. PMID: 2729542.