

アルツハイマー病の記憶障害を改善する海洋天然物の探索

申請代表者 酒井 隆一 北海道大学水産科学研究院海洋応用生命科学部門 教授
所内共同研究者 東田 千尋 病態制御部門神経機能学分野 准教授

【報告セミナー要旨】

【背景】 アルツハイマー病は治療薬の開発が困難な最大の神経疾患といわれる。アルツハイマー病の発症機構は十分に解明されているとはいえないものの、いくつかの重要な仮説が存在する。そのひとつにアミロイド仮説といわれるものがある。アミロイド β ($A\beta$) は神経の修復や伸長に欠かせないとされる膜タンパク質アミロイド β 前駆体蛋白質が酵素分解されて生じるペプチドで、オリゴマーを形成することで神経細胞に毒性を示す。この $A\beta$ 生成がアルツハイマー病の要因のひとつであると考えるのがアミロイド仮説である。そこで、 $A\beta$ の生成を防ぐ酵素阻害剤や、 $A\beta$ のオリゴマー形成阻害等の機序に着目した創薬が進められている。しかし、現在本疾病の治療薬として利用されている薬物は、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤4種とNMDA受容体アンタゴニスト1種で、その作用は発症後の症状改善に重点を置くものであり、疾病の根本治療につながるものではない。そこで、本研究では、 $A\beta$ の作用で損傷を受けた神経細胞の修復を促す評価系を用いることで、「疾病の治療につながる薬物の探索」をコンセプトに海洋生物の抽出物に含まれる活性物質を探索する研究を計画した。

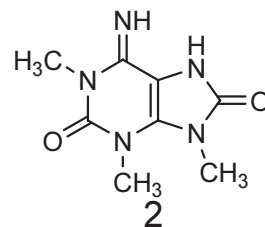
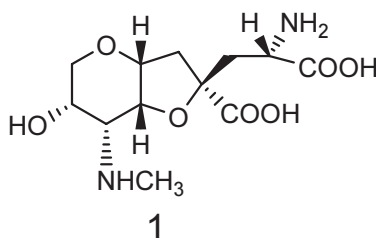
海洋生物からは陸上由来の生物にはないユニークな化学構造を持つ生理活性物質が数多く知られており、テトロドトキシンやカイニン酸、ポリエテル毒やコノトキシン等に代表される特異な作用点を持つ化合物の宝庫である。

我々の研究室ではこれまでにマウスや海馬ニューロンを用いた評価系で海綿から新規のグルタミン酸受容体のアゴニストであるダイシハーベイン (1) やGABA受容体のモジュレーター活性を持つ新規プリン (2) 等を見出してきた。今回は、これまでの研究で蓄積した抽出物を材料にスクリーニングを行った。

【結果】 パラオ共和国で採集した海綿を始めとする海洋生物129種の水抽出物について損傷した神経細胞の修復を軸策の伸長を指標に評価したところ、9種の抽出物に活性が確認された。活性を示した腔腸動物の一種であるヤギPal663と同種の試料と思われ、すでに分離が進んでいたPal459について検討した。抽出物は、透析により分画し、低分子画分とタンパク質画分に分離、低分子画分はさらにSephadexLH-20で分画、さらにそれぞれの画分をHPLCにより分画した。それぞれの画分について活性を評価した結果、HPLC精製画分であるCKX1-46-4に有意な活性が確認された。

【考察と展望】 海洋生物の抽出物は、非常に複雑な混合物であるにもかかわらず、今回の探索法で候補抽出物を絞り込むことができた。今後、得られた活性成分は極微量であったのでより多くの活性物

Neuroactive compounds from Sponges



質の単離を行う。またその構造を検討するとともに、他のサンプルについても分離・精製を行ってゆく予定である。

■背景・目的

海綿を始めとする海洋無脊椎動物に含まれる生理活性物質は、その新規性、多様性から創薬シーズとして注目されてきた。申請者はこれまでにマウスやゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 検定と培養神経細胞や発現受容体を用いた *in vitro* 検定を組み合わせたスクリーニングを用い、海洋生物から新規の興奮性アミノ酸ダイシハーベイン、GABA 受容体調節作用を持つプリン誘導体、新規神経毒ペプチドアーキュレイン等を見出し、その構造と生理活性を明らかにしてきた¹⁻³。これら化合物はいずれもこれまでに類を見ない構造と生理活性を持つもので、海洋天然物が神経科学の分野においても有望な活性物質探索源であることを立証したといえる。すなわち、もし生物検定を工夫することで海洋生物抽出物ライブラリーの潜在性をさらに引き出すことができれば、新規の医薬資源となる化合物の発見につながることを期待できる。これまでに海洋生物の抽出物は、細胞毒性や酵素阻害作用、抗菌・抗カビ作用等主に阻害剤の探索源として注目され20000種を超える化合物が報告されてきた。それらには申請者が過去に携わったエクテナシディンや最近上市されたハリコンドリンの誘導体エリプリンように抗がん剤として利用されているものもある。しかし、アルツハイマー病の治療を目指して探索研究が行われた例は少ない。そこで本研究では和漢医薬総合研究所の東田准教授が構築したアルツハイマー病などの難治性神経疾患モデルを用い、海洋生物由来成分の探索を行う。東田の検定法は、神経細胞やマウスを用いた神経損傷や認知障害を改善する効果を調べるもので、既存の関連酵素阻害作用を調べる検定法とは根本的に異なり、アルツハイマー病の中核症状である認知障害を改善する活性成分を見出そうとするものである。本研究では申請者の研究室で培ってきた海洋天然物の採集、分離精製、構造決定と東田の持つ神経科学の蓄積を融合し、アルツハイマー病の治療・診断薬の開発や発症機構の解明に資する化合物を海洋生物から見出すことを目的とする。

アッセイ結果：海洋生物水抽出物における 樹状突起および軸策の萎縮抑制

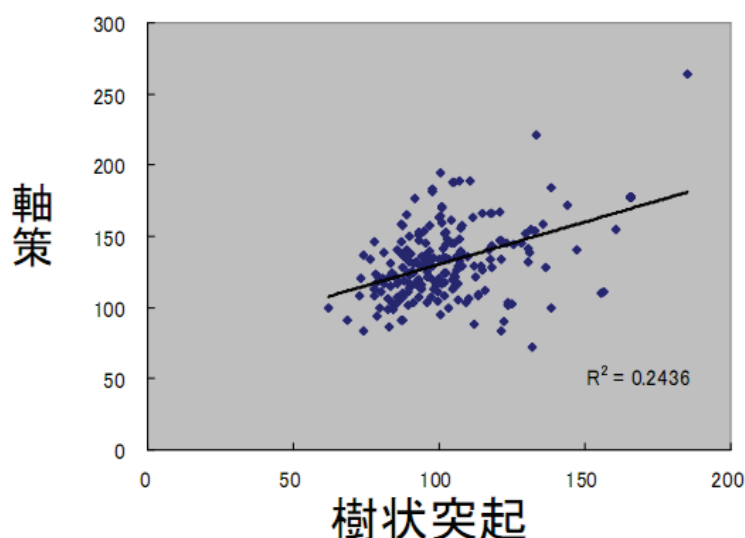


図1 スクリーニングにおける軸策伸長および樹状突起形成活性の比較

スクリーニングの結果(軸策伸長)

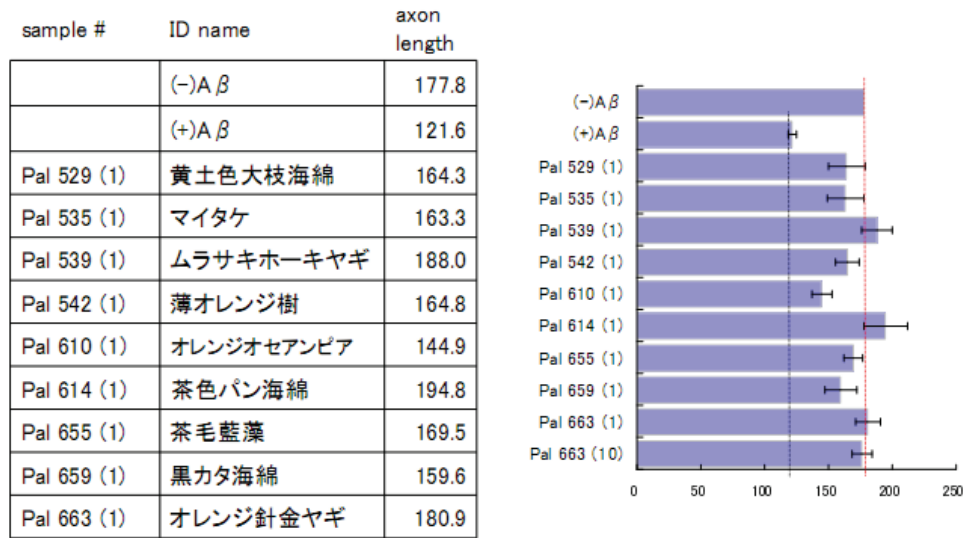


図2 スクリーニングで軸策伸長を示したサンプル (IDは試料のフィールド名)



図3 活性を示したサンプルの写真

■結果・考察

パオ産の海洋生物を中心に水抽出物を調製し、軸索の伸長(軸策伸長活性とする)および樹状突起の形成に対するアミロイドペプチドの毒性阻害を指標にスクリーニングを行った。試験を行った

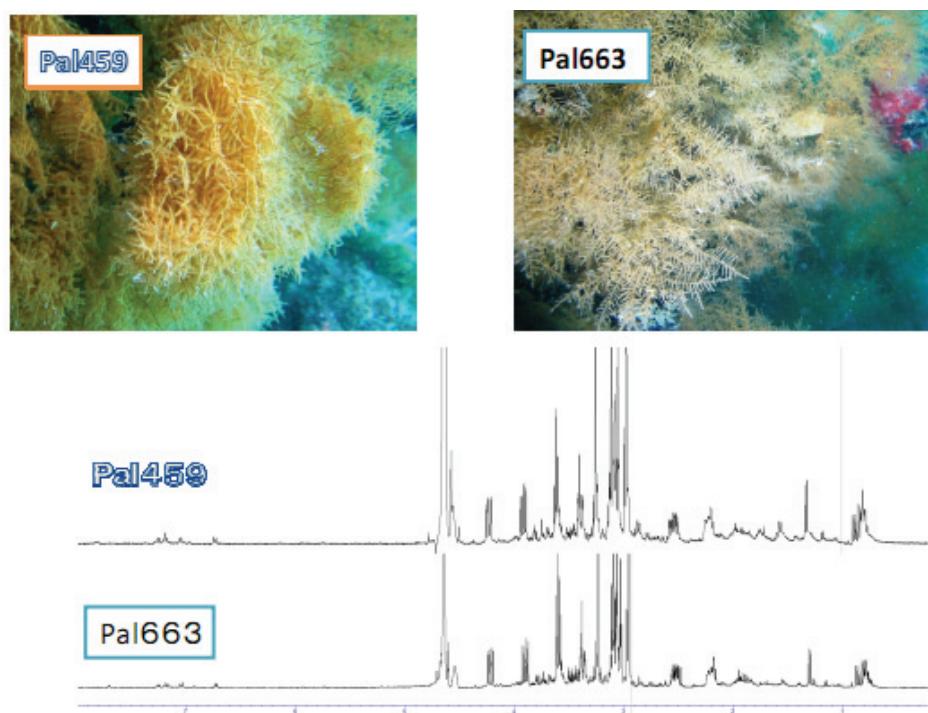


図4 Pal663と459の水中写真とNMRスペクトル

129サンプルの2つの活性についてその相関を調べたところ相関係数は0.24となり、それぞれ異なった試料が活性を示す傾向となっていた（図1）。アルツハイマー病の治療により重要な要素と考えられる軸索伸長活性に絞り込むと9サンプルに活性を示すものが見られた（図2）。このヒット率は約7%で、他の海洋天然物アルツハイマー治療薬スクリーニングの結果と比較しても遜色はなく（www.kagakucafe.org/yoshikuni120218.pdf）、この検定法が海洋生物の新しい活性物質の探索に有用であることが示唆された。得られた9サンプルの内訳は海綿6種、腔腸動物2種、そして藍藻1種であった。それらの写真を図3に示す。それぞれのNMRを測定し、そのプロファイル調べた。多くの試料は粗抽出物に共通の複雑な混合物を示唆するスペクトルパターンを示したが、形態から *Antipathes* sp. と考えられる腔腸動物やギPal663には粗抽出物にもかかわらず単一化合物由来と思われる興味深いスペクトルを与えた。そこでまずこの試料の分離を行うこととした。本試料と形状が類似していたPal459はすでに抽出・分離が進行中であったので、抽出物のNMRを比較したところ、Pal663と良く一致した（図4）。そこで、Pal459の分離をさらに進めることとした。まず、水抽出物を透析し低分子と高分子画分に分画した。低分子画分はさらにSephadexLH-20 カラムを用いて分離し、全6画分を得た。最も量が多かった画分3をさらに逆相HPLCを用いて分離し、ほぼ純粋な分画物3種を含め全10種の分画物を得た（図5）。得られた分画物の活性を調べた結果いくつかの分画物に軸索伸長活性が確認された（図5）。精製の進んだCHX1-48-3, CHX1-55-3, CHX1-46-4およびSephadex分画物のCHX1-9-7に活性傾向が見られた。この中で有意な活性を示したものはCHX1-46-4のみであった（図6）。この試料はHPLCによる精製後の化合物なので純度は高いと考えられる。HPLCのUVチャートから本化合物は260nm付近に吸収を持つ芳香族化合物である可能性が高い。しかし、0.2mg程度のサンプルを用いて¹HNMRの測定を行ったところシグナルは全く得られなかった（図7）。したがってこの化合物の構造決定にはさらに量を得る必要がある。また、UVデータから本化合物がプリン類

Pal459の分離

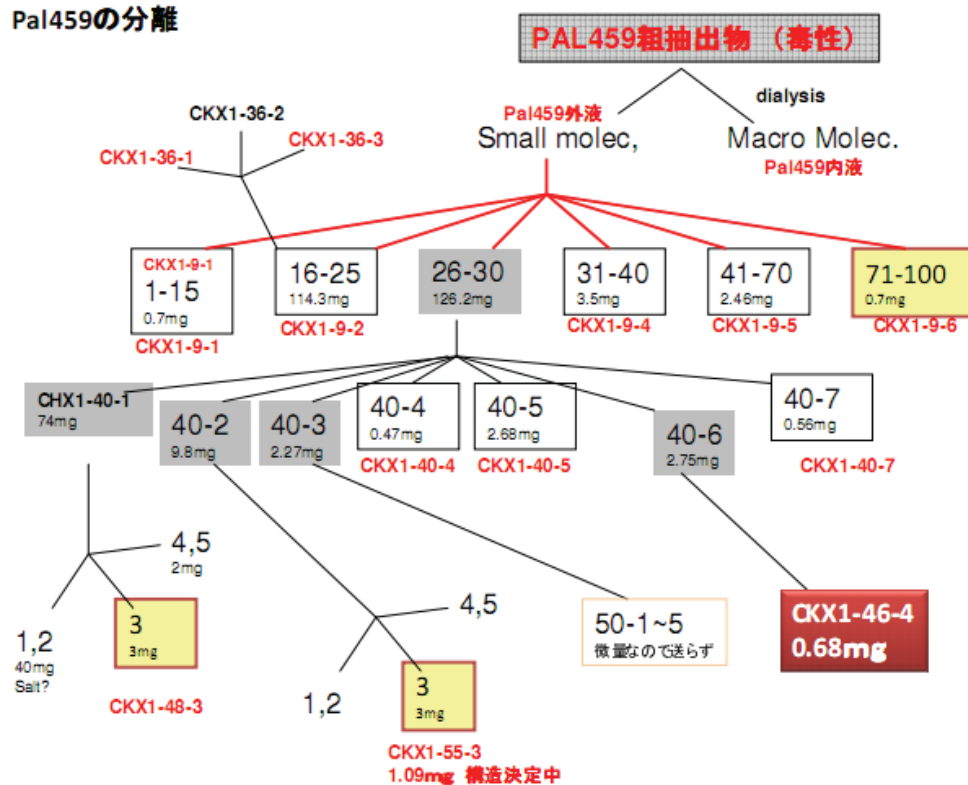


図5 Pal 459の分離 黄色囲み：活性傾向(有意差無し), 赤：有意差在

PAL459シリーズ 活性評価: A β (25-35)誘発軸索萎縮の改善

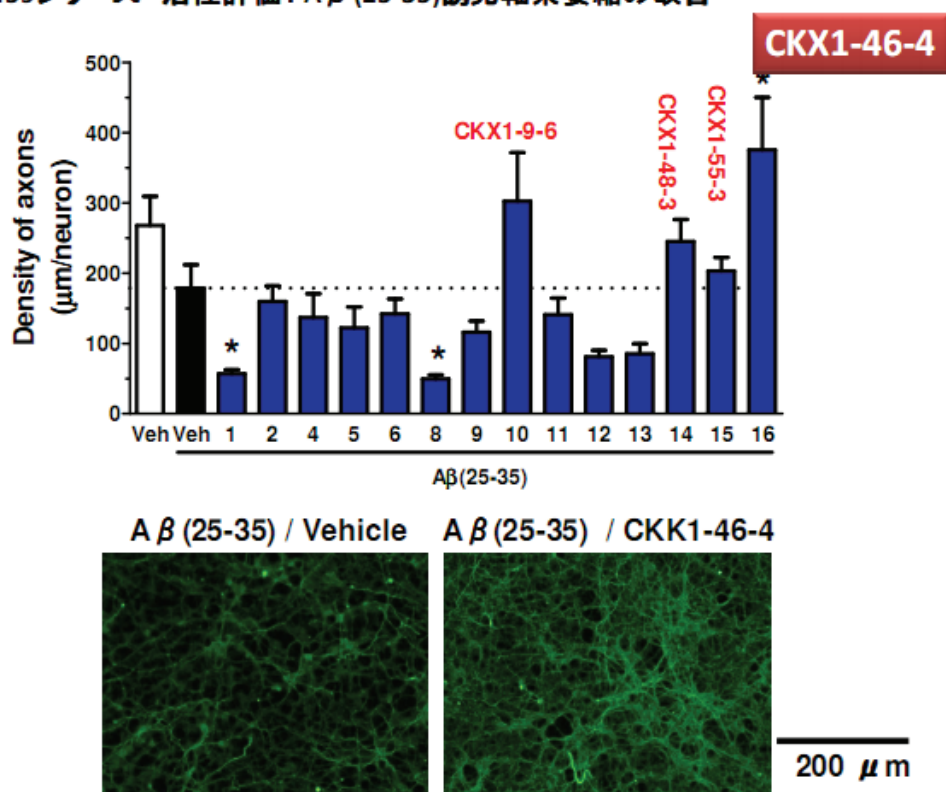


図6 分画物の活性データ(上グラフ)と活性画分CKX1-46-4による軸策伸長(下写真)

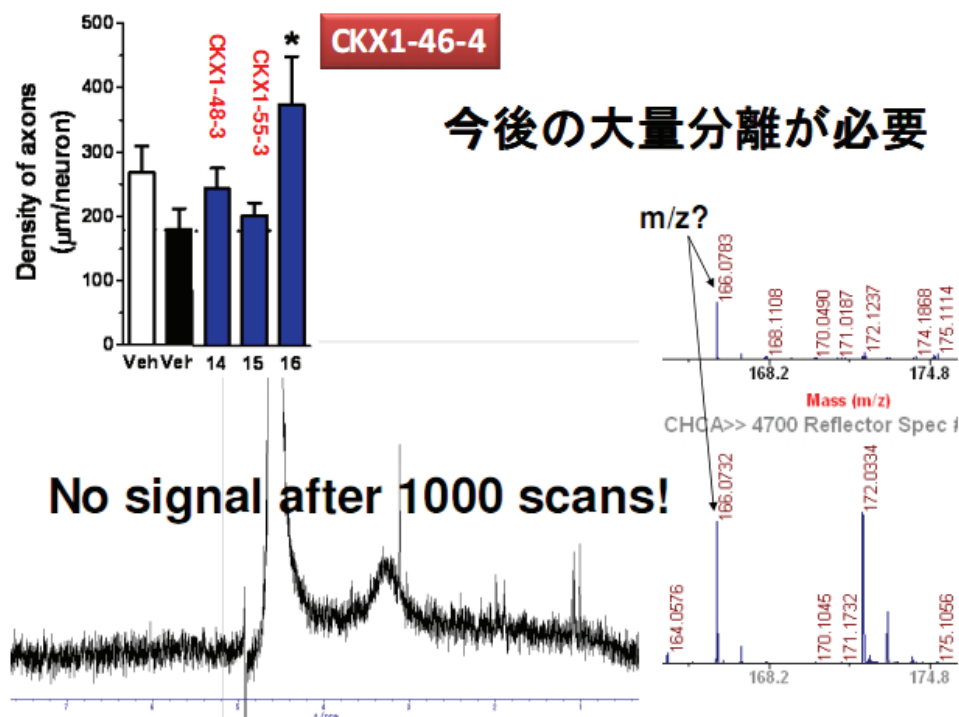


図7 CKX1-46-1のNMRと質量分析データ

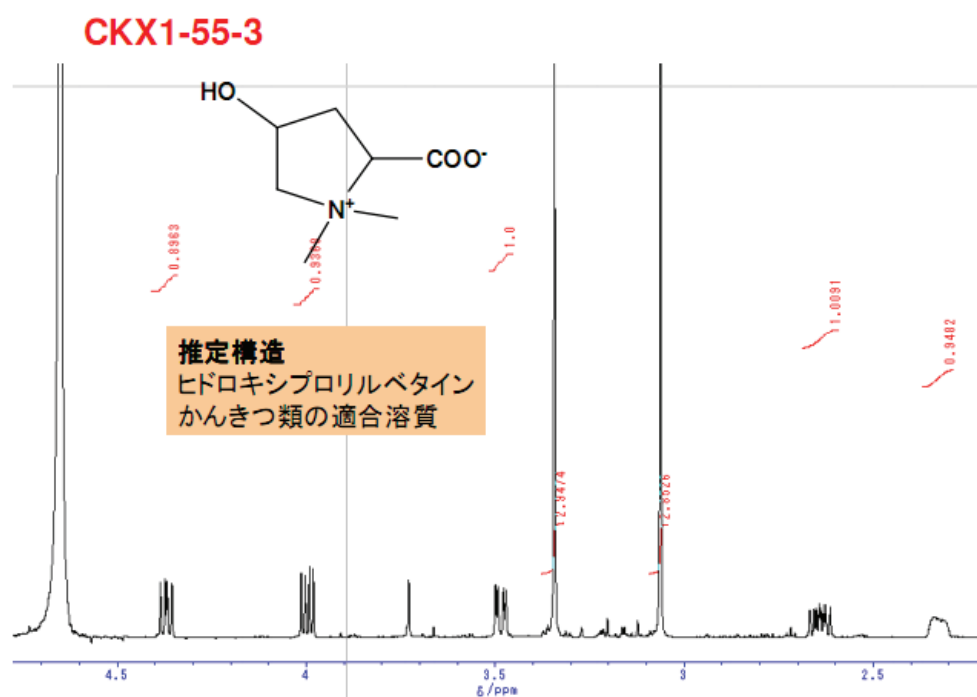


図8 CKX1-55-3のNMRと推定構造

である可能性も示唆されるが、その置換基によっては全くプロトンが観察されない可能性も考えられる。今後はこれらの点も留意し構造研究を行う予定である。弱いながらも活性傾向を示したCHX1-55-3 (1) は純度が高かったので(図8), その構造決定を行った。¹³CNMRにおいて1は1つのカルボニル基を含む7つの炭素原子が観測された。また、HSQCデータより2つのN-CH₃ (δ 54.1, 59.1), 2つのCH₂ (δ 79.6, 41.4), 2つのCHX (δ 81.3, 71.9) の存在が示された。高分解能質量分析の

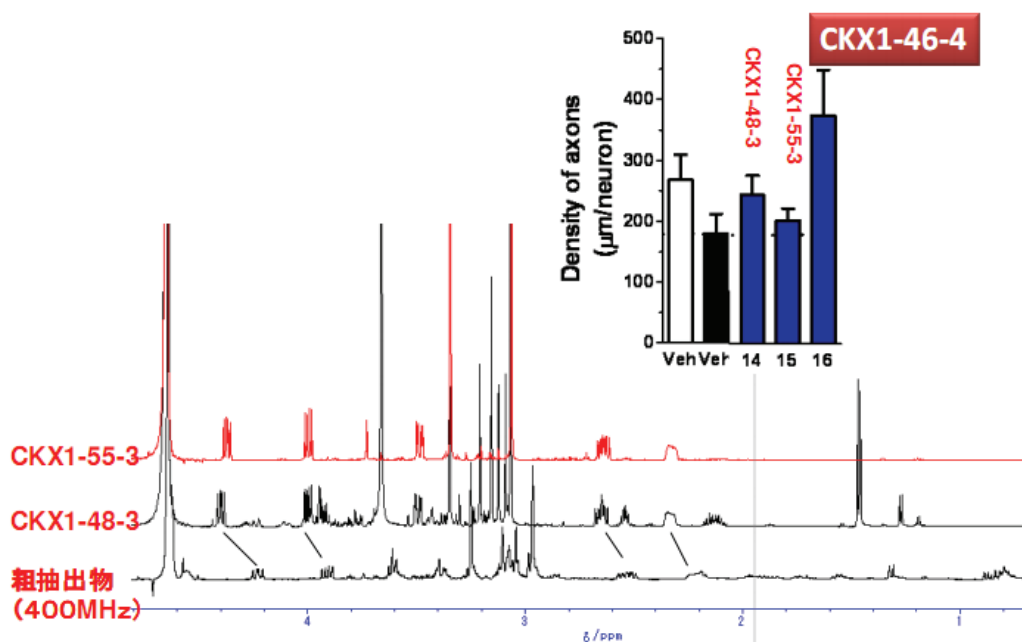


図9 活性傾向を示した成分のNMRデータの比較

結果からの分子式は $C_7H_{13}NO_3$ と推定された。さらに詳細な2次元NMRデータの解析の結果、本化合物はN,N-ジメチル-3-ヒドロキシピロリンであると推定された(図8)。CKX1-48-3にもそのNMRより主成分として1が含まれていることがわかった(図9)。本化合物は柑橘類等の適合溶質として知られており⁴、果実の凍結等から細胞を保護する作用があると考えられている。今回得られた結果は、本化合物の細胞保護作用によりアミロイドの毒性が軽減された可能性を示唆する。今後は合成化合物で構造と活性の確認を行う予定である。

■結論

今回、東田が開発したアミロイドにより阻害された軸索伸長の回復を図る検定系を用い初めて海洋生物の抽出物の評価を行った。海洋生物にはテトロドトキシンを始めとした強力かつ選択的な神経毒が多く知られている。また最近の研究ではテトロドトキシンが強力な鎮痛作用を示すことががん患者で立証されるなど、「毒から薬へ」と応用を図る研究も進んでいる。その例として、猛毒を持つイモガイの毒コノトキシンがある。コノトキシンはN-型カルシウムチャンネルの強力なブロッカーであるが、同時に強力な鎮痛作用を示すため米国などで承認され臨床応用されている。このような背景の中、決定的な治療薬がない最大の脅威アルツハイマー病の治療に資する化合物の探索にも海洋生物が脚光を浴びている。しかし、アミロイド仮説を始めとするいくつかの仮説に基づく研究が最近になって報告されてはいるが、有望な活性物質を見出した例はまだ少ない⁵⁻⁷。今回の結果は、海洋生物に含まれるペタインなどの低分子化合物にも何らかの作用が期待されること、また多岐にわたる活性化合物が含まれている可能性を示唆した。今回は活性を示した9種の試料のうち1種のもの分離を行うにとどまったが、今後これらの試料の分離精製をさらに進めることで、海洋天然物の特徴である意外性のある構造を持つ活性物質が見出されるものと期待している。

■文献

1. Matsunaga, S.; Jimbo, M.; Gill, M. B.; Wyhe, L. L.; Murata, M.; Nonomura, K.; Swanson, G. T.; Sakai, R., Isolation, amino acid sequence and biological activities of novel long-chain polyamine-associated peptide toxins from the sponge *Axinyssa aculeata*. *Chembiochem* **2011**, 12, (14), 2191-200.
2. Sakurada, T.; Gill, M. B.; Frausto, S.; Copits, B.; Noguchi, K.; Shimamoto, K.; Swanson, G. T.; Sakai, R., Novel N-methylated 8-oxoisoguanines from Pacific sponges with diverse neuroactivities. *J Med Chem* **2010**, 53, (16), 6089-99.
3. Sakai, R.; Swanson, G. T.; Shimamoto, K.; Green, T.; Contractor, A.; Ghetti, A.; Tamura-Horikawa, Y.; Oiwa, C.; Kamiya, H., Pharmacological properties of the potent epileptogenic amino acid dysiherbaine, a novel glutamate receptor agonist isolated from the marine sponge *Dysidea herbacea*. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, 296, (2), 650-8.
4. Nolte, K. D.; Hanson, A. D.; Gage, D. A., Proline accumulation and methylation to proline beta-ine in Citrus: Implications for genetic engineering of stress resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **1997**, 122, (1), 8-13.
5. Alonso, E.; Vale, C.; Vieytes, M. R.; Laferla, F. M.; Gimenez-Llort, L.; Botana, L. M., The cholinergic antagonist gymnodimine improves Abeta and tau neuropathology in an in vitro model of Alzheimer disease. *Cell Physiol Biochem* **2011**, 27, (6), 783-94.
6. Williams, P.; Sorribas, A.; Liang, Z., New methods to explore marine resources for Alzheimer's therapeutics. *Curr Alzheimer Res* **2010**, 7, (3), 210-3.
7. Alonso, E.; Fuwa, H.; Vale, C.; Suga, Y.; Goto, T.; Konno, Y.; Sasaki, M.; LaFerla, F. M.; Vieytes, M. R.; Gimenez-Llort, L.; Botana, L. M., Design and synthesis of skeletal analogues of gambierol: attenuation of amyloid-beta and tau pathology with voltage-gated potassium channel and N-methyl-D-aspartate receptor implications. *J Am Chem Soc* **2012**, 134, (17), 7467-79.