

公益社団法人 日本農芸化学会 創立 90 周年
・日本農芸化学会中部支部 創立 60 周年記念



日本農芸化学会中部支部
第172回例会(若手シンポジウム)

講演要旨集

『化学の視点から拓く天然物・生命科学研究』

日時:平成 26 年 11 月 22 日(土) 13:15~

場所:信州大学農学部 30 番講義室

(〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村 8304)

主催:公益社団法人 日本農芸化学会中部支部

共催:信州大学農学部

公益社団法人 日本農芸化学会創立 90 周年・同中部支部創立 60 周年記念

日本農芸化学会中部支部 第 172 回例会(若手シンポジウム)

『化学の視点から拓く天然物・生命科学研究』

日時:平成 26 年 11 月 22 日(土) 13 時 15 分より

会場:信州大学農学部(南箕輪キャンパス)

30 番講義室(総合実験実習棟2階)

参加費:無料

プログラム

13:15 開会の挨拶

13:20 「香気寄与成分同定の戦略と方法 ―ユズとコーヒーの香りを中心に―」

宮里博成(長岡香料株式会社)

13:55 「青枯病菌の病原力と二次代謝を制御するクオラムセンシングシグナル分子」

甲斐建次(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

14:30～ 休憩

14:50 「異常アミノ酸含有環状ペプチド誘導体の合成と構造活性相関」

今野博行(山形大学大学院理工学研究科)

15:25 「アミロイド β を標的としたアルツハイマー病の新しい治療戦略」

村上一馬(京都大学大学院農学研究科)

16:00 閉会の辞

16:20～18:00 懇親会(農学部生協食堂)

香気寄与成分同定の戦略と方法 — ユズとコーヒーの香りを中心に —

宮里 博成 (長岡香料株式会社)

1. はじめに

私たちの身の周りには多種多彩な香りが存在する。例えば、食事時の料理から醸し出される香り、入浴時の石鹸やシャンプーの香り、公園の草木や花壇に色鮮やかに咲いた花の香りのように、香りは私たちを取り囲み、暮らしを心豊かなものにしてくれる存在である。香りは数多くの揮発性有機化合物で構成されるが、全体の香りに真に貢献する香気寄与成分は、そのうちのわずかでしかない¹⁾。その中には、香りの閾値が低いことによって全体の香りに貢献する微量成分がある。このような微量香気寄与成分の同定は、一般的なガスクロマトグラフィー (GC) による検出が困難であるので極めて難しく、現在でもその多くが未知のままである。未知の微量香気寄与成分は、現行のフレーバー (食品香料) をより本物感のあるものへと改善し、人々の嗜好を満足させることのできるフレーバーを創製するための重要なパーツとして期待できるので、産業的にも重要である。筆者らは、ユズや焙煎コーヒーの未知の微量香気寄与成分を同定するために、有効な戦略を立て、有力な方法を用いた。その結果、ユズや焙煎コーヒーから新規の微量香気寄与成分を見出すことができた。

2. 未知の微量香気寄与成分同定のための戦略と方法

まず、未知の微量香気寄与成分をスクリーニングするために、におい嗅ぎガスクロマトグラフィー (GC-O) および AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) 法²⁾を行った。次に、微量香気寄与成分を濃縮するために、酸塩基処理・シリカゲルカラムクロマトグラフィー・イオン交換クロマトグラフィー (IEC)・分取高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などの複数の分離分画法を行った。つづいて、同定に必要な質量スペクトルを取得するために、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) または多次元ガスクロマトグラフィー質量分析法 (MDGC-MS) を行い、得られた質量スペクトルから化学構造を推定した。その構造を確認するために、立体選択的またはエナンチオ選択的な合成法によって推定した化合物を化学合成し、得られた化合物の質量スペクトルと保持指標 (RI) と香調の三点を照合し、全てが一致することを確認することによって、未知成分の化学構造を決定した。最後に、同定した化合物の添加効果を分析した。

3. ユズ

徳島県産ユズの果皮ヘキサン抽出物から、AEDA法によって、アルベド様香気 (albedo-like) をもつ未知の微量香気寄与成分 **1** (FDファクター128) および汗臭 (sweaty) をもつ未知の微量香気寄与成分 **2** (FDファクター128) を検出した。

微量香気寄与成分**1**を同定するために、まず抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで炭化水素部 (ヘキサン画分) と含酸素部 (エーテル画分) に分画した後、含酸素部を逆相分取HPLC (移動相: エタノール-水) に供して24画分に分画することで、**1**を高い濃度で含む画分を得た。これをGC-MSに供し、**1**の質量スペクトルを取得した。質量スペクトルから**1**の化学構造を*trans*-4,5-epoxy-(*E,Z*)-2,7-decadienalと推定した。クロスカップリング反応, LAH還元, Prilezhaev エポキシ化反応, Lindlar 還元, Dess-Martin酸化, Wittig 反応の6段階の反応を用いて、本化合物を全収率9.4%で立体選択的に化学合成した。照合の結果、**1**が*trans*-4,5-epoxy-(*E,Z*)-2,7-decadienalであることを確認した³⁾。次に、Katsuki-Sharpless 不斉エポキシ化反応を鍵として、**1**の光学異性体4*S*,5*S*体と4*R*,5*R*体を鏡像体過剰率96% eeでエナンチオ選択的に化学合成した。つづいて、 γ -シクロデキストリン結合型カラム (gamma-DEX 225) で**1**の光学異性体比を測定した結果、**1**は4*S*,5*S*体 (>99% ee) であることを明らかにした。したがって、**1**を(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E,Z*)-2,7-decadienalと同定した⁴⁾。

次に微量香気寄与成分**2**を同定するために、まず果皮ヘキサン抽出物を酸塩基処理し、酸性画分と中性塩基性画分を得た。酸性画分をGC-Oに供した結果、**2**を検出したので、揮発性の脂肪酸と推測した。この画分をさらにIECで精製した。得られた画分をMDGC-MS (1D: TC-WAX; 2D: InertCap 1) に供し、**2**の質量スペクトルを取得した。質量スペクトルから**2**の化学構造を4-methyl-3-hexenoic acidと推定した。確認のために、ホモプロパルギルアルコールの位置選択的アルキル化反応とJones 酸化の2段階の反応を用いて、候補化合物の両幾何異性体を収率5% (*E*体) と8% (*Z*体) で立体選択的に化学合成した。照合の結果、**2**を(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acidと同定した⁵⁾。

最後に、新規成分**1**と**2**のユズ飲料に対する添加効果を分析した結果、双方とも良好な効果をもつことを確認した。

4. 焙煎コーヒー

焙煎コーヒー豆 (ブラジル産アラビカ種) の抽出液を固相抽出法に供し、香気成分を含む固相抽出物を得た。AEDA法によって刺激的な香気 (pungent) をもつ未知の微量香気寄与成分**3** (FDファクター243) を検出した。**3**を同定するために、焙煎コーヒー豆の連続蒸留抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、**3**を濃縮した。**3**を含む

画分をMDGC-MS (1D: TC-WAX; 2D: BETA DEX 225) に供し、**3**の質量スペクトルを取得した。シミュリティ検索の結果、**3**の化学構造を2,3-または2,5-または2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedioneと推定した。確認のためにそれぞれの候補化合物を化学合成した。2,6-ジメチル体は、2,6-dimethylhydroquinoneの*O*-メチル化、Benkeser還元、酸加水分解の3段階の反応を経て全収率12%で化学合成した。照合の結果、**3**は2,6-ジメチル体であることが判明した。さらに、キラルカラムによる光学分割から、**3**はメソ体つまり*cis*体であることが判明した。したがって、**3**を*cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedioneと同定した⁶⁾。最後に、新規成分**3**のコーヒー飲料に対する良好な添加効果を確認した。

5. おわりに

筆者らは複数の分析技術と合成技術を組み合わせた戦略と方法を用いることによって、ユズや焙煎コーヒーの新規の微量香気寄与成分を明らかにした。本アプローチはあらゆる食材の未知の微量香気寄与成分の解明に応用できると期待される。

参考文献

1) McGorin RJ (2012) in: Marsili R (ed) Flavor, Fragrance, and Odor Analysis 2nd edn. CRC Press, Boca Raton. 2) Grosch W (1993) Trend Food Sci Tech 4:68–73. 3) Miyazato H, Hashimoto S, Hayashi S (2012) Eur Food Res Technol 235:881–891. 4) Miyazato H, Hashimoto S, Hayashi S (2013) Eur Food Res Technol 237:933–942. 5) Miyazato H, Hashimoto S, Hayashi S (2013) Flavour Frag J 28:62–69. 6) Miyazato H, Nakamura M, Hashimoto S, Hayashi S (2013) Food Chem 138:2346–2355.

演者略歴

氏名 宮里 博成 (みやざと ひろなり)

1999年3月 信州大学工学部物質工学科卒業

2001年3月 大阪大学大学院工学研究科物質化学専攻修了

2001年4月 長岡香料株式会社技術開発研究所分析研究室配属

2014年3月 信州大学大学院総合工学系研究科博士(農学)学位取得

現在に至る

主な研究テーマ：香料科学

今後の展望：生活を豊かなものにするフレーバーを創製することを目標にして未知の微量香気寄与成分の解明を今後も行っていく。

青枯病菌の病原性と二次代謝を制御するクオラムセンシングシグナル分子

甲斐 建次（大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科）

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は 200 種以上の植物種に感染し、萎凋・枯死を引き起こす病害細菌である。トマト、タバコ、ジャガイモ、ピーナッツ、バナナなどの経済的に重要な農作物も宿主とするため、本菌の病原性発現機構の解明と、その知見に基づいた有効な防除法の開発が切望されている。*R. solanacearum* の主たる病原力因子は維管束内で大量に産生される細胞外多糖 (EPS) であり、それが維管束の通水を阻害するため植物は萎凋する。植物細胞壁分解酵素なども重要な病原力因子であることが知られている。これら病原力因子の産生はグローバルビルレンスレギュレーター PhcA によって制御されている。したがって、*phcA* 遺伝子欠損株は宿主植物に対する病原性を完全に失う。PhcA の活性は PhcB によって合成されるクオラムセンシング (QS) シグナル分子、3-hydroxypalmitic acid methyl ester (3-OH PAME) を受容する二成分情報伝達系 PhcS/PhcR によって菌密度依存的に調節されていることが示唆されている (図 1)。この *phc* QS 系が本菌のいくつかの二次代謝経路を制御することが報告されているが、他にどのような二次代謝産物が産生制御されているのか、それらが本菌の病原力に寄与するかどうかについては不明であった。また、3-OH PAME の同定から 20 年近く経っているにも関わらず、同定を達成したグループ以外から、本シグナル分子を *R. solanacearum* 培養液中に検出したという報告はない。つまり、図 1 のようなモデルが *phc* QS 機構の本当の姿かどうか疑問がある。本講演では、*phc* QS 系で制御される二次代謝と、それを活性化する QS シグナル分子に関する我々の研究を紹介したい。

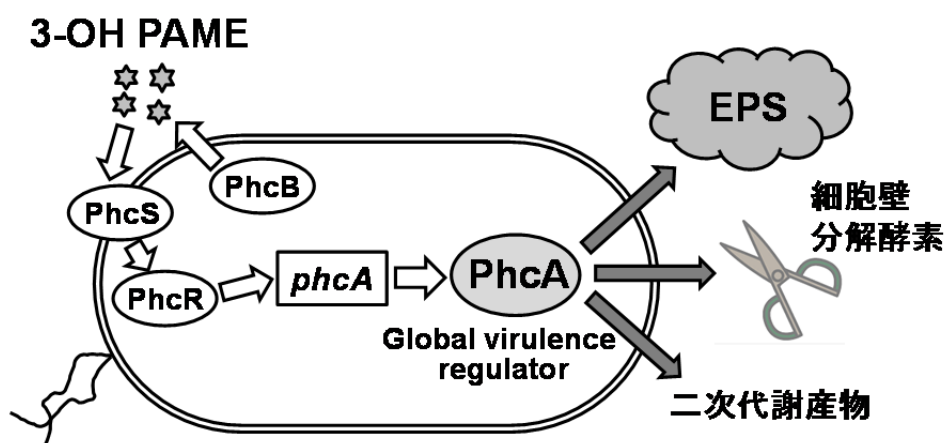


図1. クオラムセンシングによる青枯病菌の病原力制御機構

1. *phc* QS 系によって制御される二次代謝

phc QS 系で制御される二次代謝産物を明らかにするため、*phcA* 欠損株 ($\Delta phcA$) を作製し、野生株 (OE1-1) との二次代謝プロファイルの比較を行った。その結果、 $\Delta phcA$ において消失する 5 種の主要なピークを OE1-1 から見出した。それらを単離・構造決定し、既知の ralfuranone A と B に加え、新規類縁体である ralfuranone J-L を同定した (図 2)。なお、ralfuranone 類の全合成を達成し、天然物と合成品のスペクトルデータが一致することを確認している。

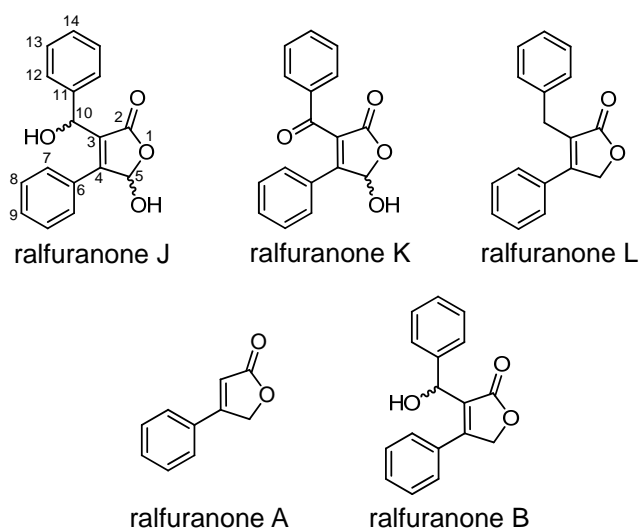


図2. Ralfuranone 類の構造

罹病した植物の維管束内から回収した菌泥中に ralfuranone 類が検出され、実際に *R. solanacearum* の病徴が引き起こされる過程で、これらの化合物が機能していることが示唆された。そこで、ralfuranone 類の合成酵素である RalA を欠損させた $\Delta ralA$ を作製し、OE1-1 と病原力の比較を行った。その結果、 $\Delta ralA$ においてトマトとタバコに対する病原力が大きく低下した。当然のことながら、 $\Delta ralA$ は ralfuranone 類を産生しない。また、ralfuranone 類には植物毒素としての活性はないようであった。したがって、ralfuranone 類は植物に作用しているというより、むしろ *R. solanacearum* に対して何らかの活性を持つことが予想された。

$\Delta ralA$ を詳しく調べてみると、OE1-1 に比べてバイオフィーム形成 (BF) 能が有意に低下することが分かった。また、 $\Delta ralA$ に *ralA* 遺伝子を相補したところ BF 能が回復することが確認された。したがって、ralfuranone 類は *R. solanacearum* の内生の BF レギュレーター分子として機能して、病原力の制御に関わる可能性が示唆された。

2. *phc* QS 系を制御するシグナル分子

phc QS 系を制御するシグナル分子は、*S*-アデノシルメチオニン依存のメチルトランスフェラーゼと予想される PhcB によって生合成される。その遺伝子を欠損させた $\Delta phcB$ では EPS が産生されなくなるため、コロニーは流動性を失いソリッドなものになる。 $\Delta phcB$ と OE1-1 を対峙して培養すると、OE1-1 が合成・分泌するシグナル分子によって $\Delta phcB$ の QS 系が活性化され EPS 産生が誘導された。中央にプラスチックの仕切りがあるシャーレ中で $\Delta phcB$ と OE1-1 を対峙培養しても、 $\Delta phcB$ の EPS 産生が誘導されたことから、OE1-1 が合成するシグ

ナル分子は揮発性を有していることが確認された。OE1-1 培養物の酢酸エチル抽出物に強い活性が認められたことから、シグナル分子は脂溶性物質で間違いない。しかし、その酢酸エチル抽出物を GC-MS や LC-MS で分析してみても、3-OH PAME は検出されなかった。Δ*phcB* では *ralfuranone* 類の産生も認められなくなる。この場合も、OE1-1 との対峙や OE1-1 抽出物処理により Δ*phcB* における *ralfuranone* 類の産生が回復する。よって、シグナル分子は *R. solanacearum* の二次代謝も制御することが確認された。

PhcB の機能から推測すると、OE1-1 が作るシグナル分子はメチルエステル構造を持つ分子であることが予想される。OE1-1 培養液から得られた化合物が真の QS シグナル分子であるのかどうかの検討を進めている。なお、QS シグナル分子の研究は論文未発表の内容を多く含むため、詳細は講演で紹介する予定である。

演者略歴

氏名 甲斐 建次 (かい けんじ)

2002 年 3 月 大阪府立大学農学部応用生物化学科卒業

2007 年 5 月 京都大学大学院農学研究科博士後期課程修了

2007 年 6 月 静岡大学農学部産学官連携研究員

2008 年 1 月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科助教

現在に至る

主な研究テーマ：植物病原細菌と菌類内生細菌のクオラムセンシング、クオラムセンシング制御物質の開発。

今後の展望：細菌どうしの化学会話（ケミカルコミュニケーション）で使われる言語（シグナル分子）を理解（構造解明）する研究を進め、細菌たちにこちら側から指示（アゴニスト・アンタゴニスト）を送り、彼らの行動を制御できるようになりたい。

異常アミノ酸含有環状ペプチド誘導体の合成と構造活性相関

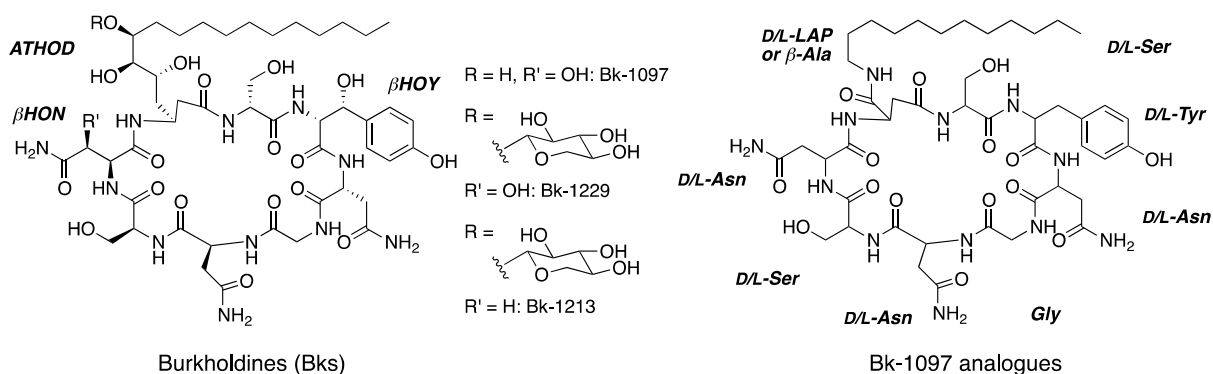
今野博行（山形大学大学院理工学研究科）

【はじめに】

一般的な蛋白性アミノ酸から構成されるペプチド類は天然に広く存在し様々な生物活性を有するが、生体内で消化されやすいため医薬品等には利用されにくい。一方で、非リボソーム系異常アミノ酸含有ペプチドは主に海洋性天然物として海綿や微生物から続々と単離、構造決定され、新奇な構造と生物活性を有するものが多い。特に異常アミノ酸含有環状ペプチドはコンフォメーションの制限もあり、抗がん、抗ウイルス作用などが報告されている。私たちは環状（デブシ）ペプチド類の化学合成を基盤に抗真菌活性、細胞毒性に関する構造活性相関研究を展開してきた。その成果について紹介したい。

【Burkholdine 系環状オクタリポペプチドの合成と抗真菌活性】

Burkholdines (Bks) は Schmidt らによって *Burkholderia ambifaria* 2.2N から単離、構造決定された異常アミノ酸含有環状オクタリポペプチド類である。¹ Xylocandin 類, occidiofungin 類と類似性があり、 β -1,3-グルカンシンターゼを強力に阻害すると考えられているが、その詳細は未だ明らかにされていない。そのため真菌特異的な薬剤、分子プローブの開発に期待が寄せられている。我々は入手容易な D/L-アミノ酸の組み合わせを用いることで抗真菌活性を有する化合物の発見を目指し、抗真菌剤のリード化合物の足がかりを探索した。

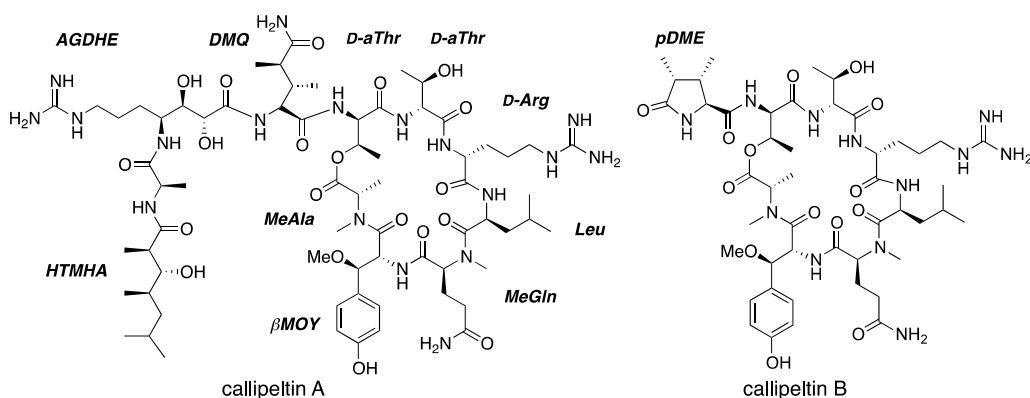


化学合成は直鎖ペプチドの調製を Fmoc-固相合成法で行い、樹脂からの切り出し後、溶液中で環化ならびに脱保護を行った。得られた環状ペプチドライブラリーに対していくつかの抗真菌活性、細胞毒性試験などを行った。その結果、天然物に最も近い化合物に高い阻害活性が見られた。² 次にダウンサイジングによる活性発現モチーフ等について調査した所、抗真

菌活性は全く見られなくなった。この結果は天然物がかなり厳密に標的酵素を認識していることを示している。

【Callipeltin 系環状デプシペプチドの合成と細胞毒性】

私たちはケモカインレセプター CCR5 阻害剤創製に向けた取り組みの中で、callipeltin 類に偶然にも出会った。Callipeltin A³ ならびに B⁴ は1996年、海綿 *Callipelta* sp. から単離、構造決定された環状デプシペプチドであるが、その不安定さから立体化学が不明なアミノ酸も存在していた。そこでまずアナログ体の入手にも柔軟に対応できる合成法の開発を行うこととし、立体化学の決定と細胞毒性に関する構造活性相関研究を行った。



はじめに入手が困難な異常アミノ酸類を合成した。β-Methoxytyrosine (βMOY)⁵ ならびに pyroglutamic acid (pDME)^{6,7} は可能性のある4つの異性体を合成し、それぞれについて立体化学の確認を行った。また *N*-Me アミノ酸、D-allothreonine (D-aThr)⁸ の調製も合わせて行った。これらを用いて Fmoc-固相合成法により様々な直鎖ペプチドを得、環化を検討した。異常アミノ酸を有するペプチド合成法は通常のペプチド合成では対応が難しいことを痛感した。詳細な条件検討の結果、デプシ部位での環化のみが callipeltin B へと導いてくれた。⁹ 一方でアナログ体の合成には別ルートが必要であった。このようにして得た callipeltin アナログについて *Hela* 細胞を用いて構造活性相関を行い、細胞毒性発現部位の抽出を行ったところ、環状構造、pDME などが必須であることがわかった。

【おわりに】

本研究は天然物合成とアッセイというクラシカルな農芸化学的研究かと思う。しかしながら強力な生物活性を持つ天然物は魅力的で、未だ人知を越えた存在であることは明らかであ

る。教えて欲しいことがまだたくさんある。

参考文献

1. Tawfik, K.; Schmidt, E. W.; *et al.* *Org. Lett.* **2010**, *12*, 664-666.
2. Konno, H.; Otsuki, Y.; Matsuzaki, K.; Nosaka, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4244-4247.
3. Zampella, A.; D'Auria, M. V.; *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6202-6209.
4. D'Auria, M. V.; Zampella, A.; Paloma, L. G.; Minale, L. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 9589-9596.
5. Konno, H.; Aoyama, S.; Nosaka, K.; Akaji, K. *Synthesis* **2007**, 3666-3672.
6. Konno, H.; Takebayashi, Y.; Nosaka, K.; Akaji, K. *Heterocycles* **2010**, *81*, 79-89.
7. Kikuchi, M.; Konno, H. *Heterocycles* **2014**, *89*, 1620-1631.
8. Kikuchi, M.; Konno, H. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 7098-7101.
9. Kikuchi, M.; Konno, H. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4324-4327.

演者略歴

氏名 今野 博行 (こんの ひろゆき)

1994年3月 東北大学農学部農芸化学科卒業

1996年3月 東北大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士前期課程修了・修士(農学)

1999年3月 東北大学大学院薬学研究科製薬化学専攻博士後期課程修了・博士(薬学)

1999年4月 ペンシルベニア大学化学科博士研究員

2000年9月 徳島大学工学部生物工学科助手

2004年1月 京都大学大学院薬学研究科助手

2004年10月 京都府立医科大学大学院医学研究科助手/助教

2009年4月 山形大学大学院理工学研究科准教授

現在に至る

その間 1998年-2000年 日本学術振興会特別研究員, 2008年 有機合成化学協会研究企画賞,
2009年 日本ペプチド学会奨励賞, 2011年 日本農芸化学会奨励賞

主な研究テーマ: 天然物を範とした疾患関連蛋白質阻害剤の創製研究

今後の展望: 天然物を基盤にした阻害剤を作り, それを応用した研究へと展開していきたい

アミロイド β を標的としたアルツハイマー病の新しい治療戦略

京都大学大学院農学研究科 村上 一馬

はじめに

アルツハイマー病 (AD) の主な病理学的特徴として、神経細胞外に蓄積する老人斑 (無症状の初期段階から蓄積) ならびに神経細胞内に見られる神経原線維変化 (老人斑蓄積から約 10 年後に形成) が知られている。老人斑の構成成分である 42 残基のアミロイド β タンパク質 (A β 42) は、2 あるいは 3 量体を基本単位として凝集 (オリゴマー化: 2~24 量体, 2 x *n*-mer or 3 x *n*-mer) することによって神経細胞毒性 (シナプス毒性) を示す (オリゴマー仮説)。A β 42 の神経細胞毒性は、酸化ストレスと密接に関係していることが知られている。これまで A β 42 あるいはその凝集体を標的とした治療が世界中で精力的に進められて来たが、未だに根本的な治療法は確立されていない。本演者らは、A β 42 の毒性発現に必要な構造情報をあまり考慮しない治療戦略をとっていることがその理由の一つと考え、A β 42 の毒性立体構造を明らかにするとともに、その構造特異的な抗体を開発した。本講演では、これらの研究成果について最新の知見も交えながら紹介する。

1. A β 42 の毒性コンホマーを特徴とした神経細胞毒性発現機構

まず、A β 42 凝集体の 2 次構造を明らかにする目的で、 β シート構造を取りにくくターン構造を形成しやすいプロリン残基を用いて A β 42 の系統的置換を行ったところ、Glu22 と Asp23 残基付近での「毒性ターン」構造を特徴とする毒性コンホマー (配座異性体) を明らかにした。^{1,2)} 本知見は、遺伝性 AD の変異の多くが Glu22 と Asp23 残基に集中していることをよく説明できる。³⁾ 続いて、種々の A β 42 変異体のラジカル産生能と立体構造との関係を電子スピン共鳴 (ESR) 法で調べた結果、「毒性ターン」の形成によって、A β 42 のラジカル化において重要な Tyr10 と Met35 残基が 15 Å 以内に近接し、両残基間の距離は活性の低い A β 40 に比べて 15~20 Å 小さいことがわかった。⁴⁾ さらに、A β 42 は C 末端領域で逆平行 β シート構造を形成しやすいことより、生成した Met ラジカルは C 末端カルボキシルアニオンによって安定化されることが示唆された。以上の結果より、平衡反応で一部開裂した C 末端のカルボキシルラジカルが毒性を示すという、A β 42 独自の神経細胞毒性発現機構を提唱した (図 1)。⁵⁾ 本機構は、A β 42 と A β 40 との間で著しく異なる凝集能及び神経細胞毒性の差を分子レベルで初めて明快に説明するものであると同時に、未解明の A β 42 のオリゴマー構造ならびにその基本単位構造 (2, 3 量体) の推定に示唆を与えるものである。⁶⁾

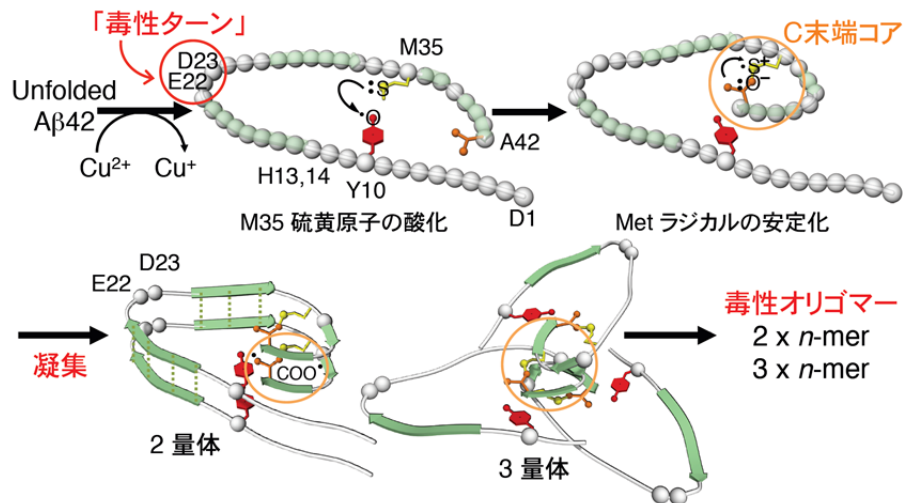


図1 Aβ42の神経細胞毒性発現機構と毒性オリゴマーの推定構造⁶⁾

2. 毒性コンホマーを標的とした立体構造特異抗体の開発と応用

ADの治療戦略において、Aβ42のワクチン療法や抗体投与による受動免疫療法が有望視されているが、重篤な副作用を示すことがあり、臨床試験は慎重に進められている。そこで副作用の少ない薬剤開発を目指して、Aβ42の毒性コンホマーのみを標的とした立体構造特異抗体の作製を試みた。毒性ターン構造を模倣した配座固定ペプチド(図2: 毒性配座理論)をハプテンとして得られた抗体を、各種Aβ42変異ペプチドでスクリーニングした結果、22番目付近でターン構造を取りやすいE22P-Aβ42に対して強く反応し、ターンを取りにくいE22V-Aβ42にはほとんど反応しないモノクローン(11A1と命名)の取得に成功した。⁷⁾ 一方、22番目付近のアミノ酸配列をエピトープとした従来の市販抗体(4G8)は、E22P-Aβ42にはほとんど反応せず、E22V-Aβ42に対して強く結合した。

次に、AD患者の剖検脳(海馬ならびに前頭葉領域)を用いて、11A1抗体の免疫組織染色実験を行ったところ、従来の市販抗体では染色されない細胞内Aβに対して11A1は反応した。また、11A1はAD患者脳の抽出物中のAβオリゴマー(特に3量体)に対して強く反応した。⁷⁾ 近年、AD発症前に現れるAβオリゴマーは細胞内に多く存在する臨床データが報告されていること、毒性コンホマー形成に不可欠なラジカル産生の亢進によってオリゴマー形成能が増大することが動物実験において明らかになったことから、⁸⁾ 11A1はAD発症の前段階を捉えている可能性がある。さらに、国内外の研究グループとの共同研究によって、11A1による細胞内Aβの染色像がAD患者のiPS由来神経細胞、⁹⁾ AD患者脳、¹⁰⁾ ならびにADモデルマウス脳¹¹⁾においても確認され、関連分野の研究者の関心を集めている。以上の結果より、11A1は有望なAD治療薬ならびに診断薬になる可能性が高い。なお、ヒト剖検脳は東京都健康長寿医療センター・高齢者ブレインバンクの村山繁雄博士より御供与いただいた。

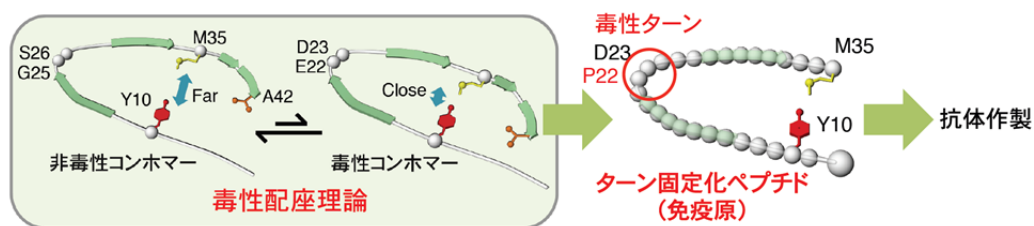


図2 毒性配座理論に基づいた抗「毒性コンホマー」抗体の作製概略

おわりに

現在、AD 治療に向けて抗体を含む多くの薬剤による臨床試験が行われているが、そのほとんどが AD 患者を対象とした第 3 相試験以降ではあまり良好な結果は得られていない。このような状況下、毒性立体構造という独自の視点から開発した抗 A β 「毒性コンホマー」抗体 (11A1) は、停滞している治療薬開発においてブレークスルーを与える可能性がある。本抗体は、2012 年 3 月に免疫生物研究所から販売開始され、2014 年 4 月に国際特許を取得した (US 8710193 B2)。今後、抗 A β 「毒性コンホマー」抗体を機軸とした更なる展開が期待される。

参考文献

- [1] Morimoto, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 52781-52788.
- [2] Irie, K. *et al.*, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, 7, 1001-1008.
- [3] Murakami, K. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 46179-46187.
- [4] Murakami, K. *et al.*, *ChemBioChem* **2007**, 8, 2308-2314.
- [5] Murakami, K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15168-15174.
- [6] Murakami, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, 78, 1293-1305.
- [7] Murakami, K. *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, 1, 747-756.
- [8] Murakami, K. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 44557-44568.
- [9] Kondo, T. *et al.*, *Cell Stem Cell* **2013**, 12, 487-496.
- [10] Soejima, N. *et al.*, *Curr. Alzheimer Res.* **2013**, 10, 11-20.
- [11] Kulic, L. *et al.*, *Transl. Psychiatry* **2012**, 2, e183.

演者略歴

氏名 村上 一馬 (むらかみ かずま)
 2002 年 3 月 京都大学農学部生物機能科学科卒業
 2007 年 3 月 京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻博士後期課程修了, 博士 (農学)
 (この間, 2004 年 4 月~2007 年 3 月学振特別研究員 DC1)
 2007 年 4 月 東京都健康長寿医療センター研究所 学振特別研究員 SPD
 (この間, 2007 年 6 月~2008 年 3 月米国 UCLA, 2009 年 6 月~8 月豪州メルボルン大学客員研究員)
 2009 年 10 月 京都大学大学院農学研究科 助教
 2013 年 7 月 京都大学大学院農学研究科 准教授, 現在に至る

受賞歴: 天然有機化合物討論会奨励賞 (2005, 2010), ペプチド討論会国際会議若手奨励賞 (2006), IUPAC 天然物化学国際会議ポスター賞 (2006), 日本基礎老化学会奨励賞 (2008), 天然物化学談話会奨励賞 (2012), 日本農芸化学会英文誌論文賞 (2012), 日本農芸化学奨励賞 (2013)

主な研究テーマ: アミロイド β の機能解析と薬剤開発

今後の展望: 凝集性タンパク質に着目した脳・老年疾患の予防研究, 準安定タンパク質オリゴマーの構造解析, 核酸分子を用いた新しい認識薬の開発

日本農芸化学会中部支部 賛助企業（五十音順）

| | | |
|---|------------------------------|---|
|  | アサヒビール(株) 名古屋工場 | http://www.asahibeer.co.jp/ |
|  | 天野エンザイム(株) 岐阜研究所 | http://www.amano-enzyme.co.jp/jp/ |
|  | イチビキ(株) 研究開発部 | http://www.ichibiki.co.jp/ |
|  | (株)伊藤園 生産本部 | http://www.itoen.co.jp/ |
|  | 加藤化学(株) 技術部 | http://www.katokagaku.co.jp/ |
|  | (株)岐阜セラツク製造所 品質保証部 | http://www.gifushellac.co.jp/ |
|  | 金印(株) 研究開発部 | http://www.kinjirushi.co.jp/ |
|  | (株)三和化学研究所 三重研究所 | http://www.skk-net.com/ |
|  | 敷島製パン (株) 研究部 | http://www.pasconet.co.jp/ |
|  | (株)真誠 | http://www.shinsei-ip.ne.jp/ |
|  | 太陽化学(株) ニュートリション事業部 | http://www.taiyokagaku.com/ |
|  | 辻製油(株) | http://www.tsuji-seiyu.co.jp/ |
|  | 東海物産(株) 食品研究所 | http://www.tokaibsn.co.jp/ |
|  | 中日本冰糖(株) | http://www.nakahyo.co.jp/ |
|  | (株)ニッポンジーン | http://www.nippongene.com/ |
|  | 日本食品化工(株) 研究所 | http://www.nisshoku.co.jp/ |
|  | フジ日本精糖(株) 研究開発室 | http://www.fnsugar.co.jp/ |
|  | 物産フードサイエンス(株) 研究開発センター | http://www.bfsci.co.jp/ |
|  | ポッカサッポロフード&ビバレッジ(株) 中央研究所 | http://www.pokkasapporo-fb.jp/ |



(株)Mizkan-Holdings 中央研究所

<http://www.mizkan.co.jp/company/>



名糖産業(株) 食品開発部

<http://www5.mediagalaxy.co.jp/meito/>



ヤマモリ(株) 桑名工場

<http://www.yamamori.co.jp/>



養命酒製造(株) 中央研究所

<http://www.yomeishu.co.jp/>

協力企業（五十音順）

旭松食品(株) 食品研究所

サンエイ糖化(株) 素材開発部

東海漬物(株) 漬物機能研究所

アステラス製薬(株) CSR 部

サンジルス醸造(株) 生産本部

(株)東洋発酵

伊藤忠製糖(株) 品筆保証室

敷島スターチ(株) 技術開発室

東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所

伊那食品工業(株)

新日本化学工業(株) 研究部

名古屋製酪(株) 中央研究所

科研製薬(株) 生産技術研究所

大和製罐（株） 総合研究所

三井農林(株) 食品総合研究所

カネハツ食品(株) 技術部

竹本油脂（株） 情報調査室

盛田(株) 小鈴谷工場

キリンビール(株) 名古屋工場

デザイナーフーズ(株)

