

【研究報告】

アミロイドβタンパク修飾による細胞死抑制
—コマツナ種子由来成分からのアプローチ—

岡田 瑞恵¹⁾ 岡田 悦政²⁾

¹⁾ Nutrition section, Ageing and Nutrition Research, Yms Laboratory,

²⁾ 愛知県立大学大学院 看護学研究科 健康管理・基礎老化研究室

要約

我々は、種子抽出物のスクリーニングによって、Aβ誘導の神経細胞死を抑制する効果が得られた乾燥コマツナ種子水溶性抽出物 (KSE) のAβへの修飾の有無を、Congo red (CR) による吸収スペクトル及び分子量から検討した。さらにAβはグルコーストランスポーターを障害することが報告されているため、グルコースの取り込み自体に影響を与えることを推定し、グルコースの取り込みに対するAβの影響及びKSEがどの程度緩和出来るかを検討した。吸収スペクトルのピークは、Aβ+CRよりもKSE+Aβ+CRによって長波長側に移動した。電気泳動によるKSE+AβのバンドはAβ単独のバンド位置にはAβを識別できなかった。また、Aβはグルコースの細胞への取り込みを阻害したが、KSEによって改善された。KSEはAβを修飾することで、グルコースの取り込みを改善させ、細胞死抑制に貢献したものと考えられた。

キーワード：Amyloid-β、Komatsuna seed、Congo red、Modification、Glucose-uptake

1. はじめに

アミロイドβタンパク (Aβ) は、難可溶性のβシート構造を持つタンパク質であり、老化などによってAβの分解酵素の分泌低下のため蓄積され、結果として神経細胞死を招くことでアルツハイマー症 (AD) が進行すると考えられている。Kuhlaらは、Aβの生成が促進されると一連のカスケード反応の進行とともに常に、炎症反応が繰り返されることを報告している [1]。これらの反応による活性酸素種 (ROS) の発生が推測され、細胞死の引き金になることが考えられる。しかしながら、細胞死の段階の機構は未だ推論の域を出ない。一方、我々は、長年、食用植物成分の抗酸化活性、抗糖化性に関する研究を通し、疾病予防を目的として、種実、乾燥種子、スプラウト、果皮の抽出成分に関する研究を進めている。これらの研究の一部として実施したアルツハイマー症抑制をテーマとした研究において、Aβによる細胞死を抑

制するため、食用植物由来種子成分のパイロット的スクリーニングを行い、コマツナ種子抽出水溶性成分 (KSE) による細胞死抑制効果を見出した [2,3]。このKSEの細胞死抑制機構を考えるにあたって、Aβから生成されるROSに対するスカベンジャーとしてのKSEの間接的な役割ばかりでなく、他の可能性としてAβに対する修飾を考えた。近年、Aβにphytochemicalなどの食用植物由来成分が修飾することでAβの構造を変え、その結果Aβの毒性を回避することが幾つか報告されている。例えば、クルクミン [4]、レスベラトロール [5]、スルフォラファン [6]、テアフラビン [7] などがある。これらのように、AβにKSEが修飾する可能性を探ることを目的としながら、以下のことを検証した。Aβは、インスリンと共通のペプチド配列を持ち、さらにAβとインスリンはインスリンレセプター (IR) に対し競合し [8]、また、Aβはインスリン分解酵素によって分解される [9]。ここで、このXieらによる「AβとインスリンはIRに対し競合する」という報告から推論するならば、インスリンを介して糖の取り込みが行われる場合、Aβが誘導する細胞死の機構にはAβによる糖の取り込み阻害が関係している可能性がある。KSEがAβを修飾することが可能ならば、Aβの構造を変えることでIRへの結合を抑制でき、インスリンの働きを阻害しないであろうと考えた。

連絡先：岡田悦政 〒463-8502
愛知県名古屋市守山区上志段味東谷
TEL：052-736-1401
FAX：052-736-1415
E-mail：yolage@nrs.aichi-pu.ac.jp

なお、脳におけるグルコースの取り込みは、グルコーストランスポーター（GLUT1,3はほとんど全ての脳の領域に、GLUT4は小脳のみ存在 [10]）を介した経路で行われている。脳内インスリンは、グルコーストランスポーターのトランスポレーションの促進などを介し、グルコースの取り込みを調節しており [11]、また、軸索の再生 [12,13] などにも関与している。一方、 $A\beta$ はグルコーストランスポーターを障害することも明らかになっている [14]。そこで $A\beta$ がインスリンを介したグルコーストランスポーターの働きを阻害するならば、グルコースの取り込み自体においても影響を与え、それが細胞死を招く引き金となり、また連鎖的に細胞死が進むことは否めない。もし、KSEが $A\beta$ を修飾するならば、 $A\beta$ によるグルコースの取り込み阻害を改善することが推察される。

本稿では、KSEの $A\beta$ に対する修飾の可能性、 $A\beta$ 存在下における糖の取り込みへの影響及び、その $A\beta$ の影響がKSE存在下ではどのように変化するかを報告する。

2. KSEによる $A\beta$ 誘導細胞死の抑制

KSEは、コマツナ乾燥種子より熱水抽出により得られた水溶性成分（複合物）である。抽出方法は乾燥種

子を粉碎し、重量に対し10倍量の水を加え10分間95-100℃で加温し、その後60分間攪拌し浸出させ、氷冷後、ろ過して得られたものをKSEとした[2]。KSEは、総フェノール量0.98 $\mu\text{g}/4 \mu\text{L}$ （クロロゲン酸当量）を含有し、ラジカルスカベンジャーである [15]。マウス海馬神経細胞（DS Pharma Biomedical Co, Ltd.）において、 $A\beta$ (25-35) 24 h 暴露の場合（図1-1）、 $A\beta$ 単独投与において、コントロールに対し20%生細胞数を低下させたが、KSEはコントロールレベルに戻した[3]。また、 $A\beta$ (1-42) 48 h 暴露の場合（図1-2）は、 $A\beta$ 単独において生細胞数は81.3%に減少したが、KSEは103%とコントロールレベルに戻した[2]。これらの機構を推察するにあたって、 $A\beta$ から生成されるROS消去によるダイレクトな細胞の保護が可能であったものと当初考えたが、しかし、Yaoらの報告のように、2つの抗酸化物質GinkgolidesやビタミンEは $A\beta$ 派生のフリーラジカル消去は高いものの、一方において、抗酸化物質による細胞の処理は、 $A\beta$ 誘導の細胞死から救えなかったとしている [16]。これは、細胞死抑制が必ずしもラジカルスカベンジャーとしての働きだけとは限らないことを意味している。また、先に述べたように、クルクミン、レスベラトロールなどの報告例から、KSEの $A\beta$ への修飾により、細胞死抑制に繋がった可能性がある。また、低濃度（4 μL , 7.5 μL ）

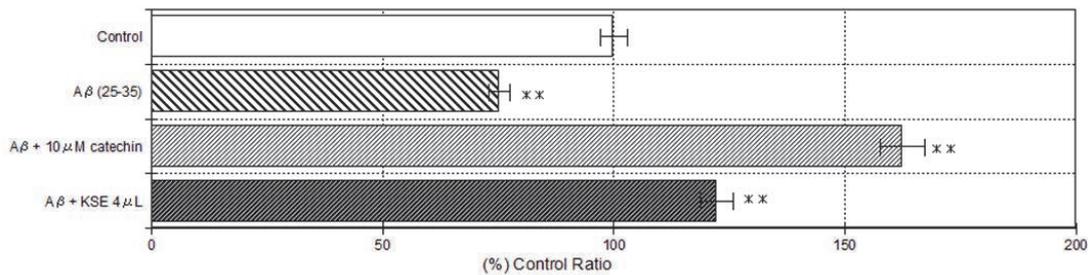


図1-1. KSEの投与による $A\beta$ (25-35) 暴露後の細胞数

マウス神経細胞（ 2.66×10^3 cells/well）をKSE（4 μL ）で24 h 処理し、その後10 μM $A\beta$ (25-35) を加えて37℃で24 h incubateした。トータル培養時間48 h 暴露後の細胞数を示した（文献3より改変）。細胞生存数は、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc.) を使用して測定した。コントロールを100%とした結果を表し、有意差は、** $P < 0.01$ を示した。

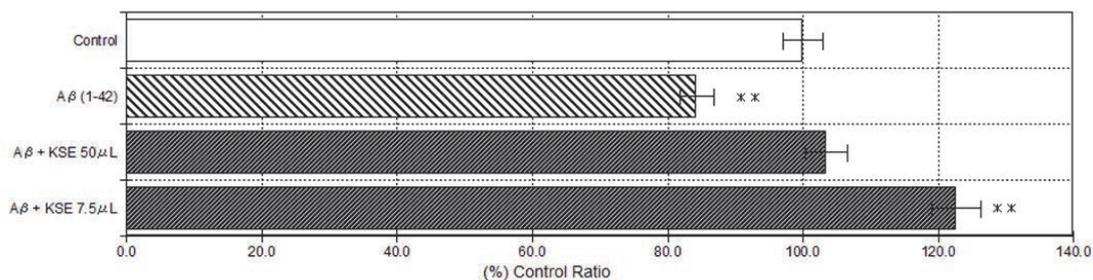


図1-2. KSEの投与による $A\beta$ (1-42) 暴露後の細胞数

マウス神経細胞（ 2.6×10^4 cells/well）をKSE（7.5 μL , 50 μL ）で1 h 処理し、その後10 μM $A\beta$ (1-42) を加えて37℃で48 h incubateした。 $A\beta$ 48h 暴露後の細胞数を示した（文献2より改変）。細胞生存数は、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc.) を使用して測定した。コントロールを100%とした結果を表し、有意差は、** $P < 0.01$ を示した。

の KSE (図 1 - 1, 図 1 - 2) には、僅かな細胞増殖促進傾向が見られるが、考えられる一つの理由は、我々の preliminary な研究結果から KSE が持つ細胞増殖促進効果や、apoptosis 抑制効果によるものかも知れない。

3. KSE の A β への修飾

1) 吸収スペクトルからの検討

KSE の細胞死抑制機構として、A β に KSE が修飾し構造的変化を起こした結果であることが推察されたため、試験管内において A β に親和性を持つアゾ色素である Congo red (CR) を用い、300-700 nm にてその吸収スペクトルを測定した (図 2)。CR は、500 nm 付近に吸収ピークを持ち、A β と結合すると長波長側にシフトする特徴が知られている。図 2-a に示すように、1h 後の A β + CR の混合物は、486 nm と CR 単独 (482 nm) より 4 nm 長波長シフトした。48h 後、CR 単独ピークは変化せず、A β + CR ピークはさらに 2 nm 長波長シフトし、488 nm となり、CR 単独より 6 nm 長波長側にピークが変化した。これが、KSE 存在下ではどうか。混合して 1h 後、7.5 μ L KSE + A β + CR は 492 nm であり、A β + CR より 6 nm 長波長側にピークが移動した。50 μ L KSE + A β + CR は、A β + CR より 2 nm 長波長にピークが移動した。さらに、図 2-b のように、48 h 後は、7.5 μ L KSE + A β + CR は、498 nm と 1h 後の同一混合物よりも 6 nm 長波長側に、50 μ L KSE + A β + CR は、498 nm と 10 nm 長波長側にそれぞれピークが移動し、48 h 後には KSE の濃度による差が認められなくなった。以上の結果は、KSE による A β 凝集促進効果でないことを、凝集確認試験であるチオフラビン T を用いた実験において確認している。KSE + A β に CR が加えられることで、先に KSE が A β を修飾したところに CR がバインドすることが推察されるため、A β + CR のピークよりも KSE + A β + CR はさらに長波長側にピークが存在する結果を示したと考えられる。このことは、アミロイドと CR は水素結合し易い特性を持ち、

また、前述したように KSE はラジカルスカベンジャーであるため [15]、KSE による水素供与あるいは引き抜きといった機構が反映されたものと推察される。

2) SDS-PAGE による分子量からの検討

次に、分子量からその確認を行うために、A β + KSE 混合物を 37 $^{\circ}$ C、20 h インキュベーション後 SDS-PAGE による電気泳動を行った。結果を図 3 に示した。Lane.2 の A β の 4514 Da のバンドと比較して Lane.1 の KSE + A β は、明らかに A β のバンドがうすく、同様なバンドは確認されなかった。また、Lane.2 に見られる A β の 15 kDa 以上の 2 つのバンドも同様な傾向であった。これは、KSE が A β を修飾したか、あるいは A β を KSE が分解したか、いずれかが推察されるが、KSE は、熱水抽出されていること及び 1) の吸収スペクトルの結果から考え合わせると、KSE が A β を修飾した可能性が高い。なお、KSE による A β への影響は、KSE と A β を先に混合した場合、A β の検出を低下させることを A β ELSA kit において確認していることから、KSE が A β を修飾した可能性が高いと考えている。

では、A β への修飾部位には特徴があるのだろうか？ 幾つかの報告例を示すと、Grelle らは、テアフラビン (TF3)、そしてアミロイド形成のインヒビターとして証明されている epigallocatechin gallate (EGCG) と CR の 3 つを比較している。TF3、EGCG そして CR それぞれの特異性はあるものの、A β の 2 領域 12-23、24-36 番目のアミノ酸に全てバインドしており [7]、また、Nagaveni らは、スルフォラファンは A β の N 末端のアスパラギン酸の遊離 NH₂ 基と、16 位と 28 位のリジンの ϵ -アミノ基に共有結合していることを報告している [6]。ポリフェノールであり、水素を供与しやすい EGCG と同様、KSE の総フェノール量及びラジカル消去能から鑑みて、A β を修飾していることが推察された。

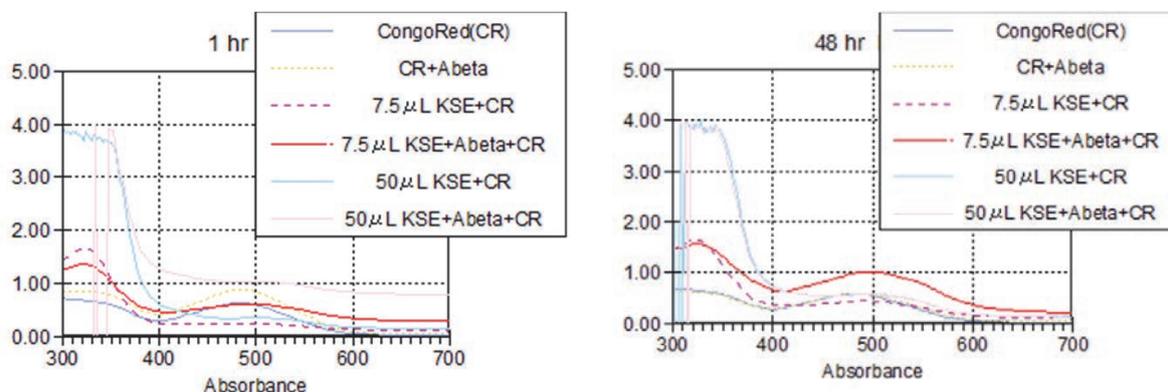


図 2. CR による A β の吸収スペクトル

KSE 50 μ L に、50 μ L A β (25-35) (31.765 μ g/mL) を加え、30 min 室温にて振盪しながら incubate した。その後、50 μ L CR (Congo red) 200 μ M を加え、15 分室温にて振盪しながら incubate し、300-700 nm の吸収スペクトルを測定した。これを 0 時間とし、その後、以下の時間で測定を行った。

- 1 時間後、300-700 nm にてスキャンした。
- 48 時間後、300-700 nm にてスキャンした。

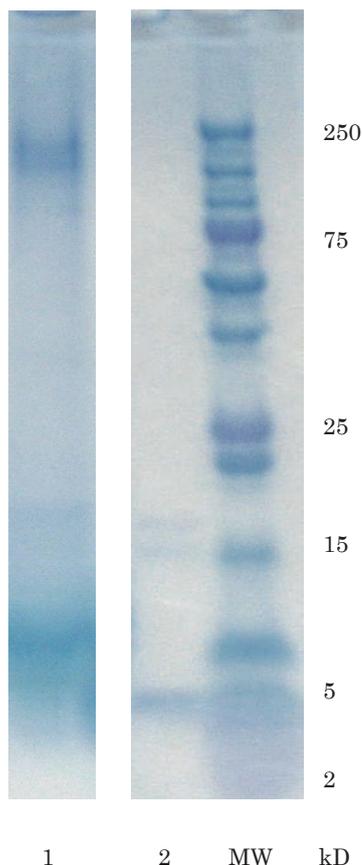


図3. SDS-PAGEによる泳動パターン

75 μ L KSE に、75 μ L A β (1-42) (10 μ M ; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を加え、37°C で 20h incubate した。それからこの混合物 10 μ L を 15 % SDS ポリアクリルアミドゲルに載せ、40A で 1.5 h 泳動した。ゲルは、Quick CBB PLUS (Wako co. Ltd) で染色した。分子量マーカーは、standard molecular weight markers (Precision Plus Protein™ Prestained Standards; Bio-Rad Laboratories) を使用した。

MW : 分子量マーカー

1 : KSE + A β (1-42)

2 : A β (1-42)

4. 細胞内グルコース取り込みに対する A β の影響と KSE の抑制

脳内において、A β の存在がグルコーストランスポーターに対して障害を与える [14] ならば、グルコースの取り込み量においても影響を与えると考えた。そこで、A β の存在下において、グルコースの取り込み量に影響を与えるのか否か、また、A β と KSE 共存下において、A β の影響をどの程度回避できうるのか、マウス海馬神経細胞を用い、Glucose-free 培地における非放射性 2-deoxyglucose の細胞内取り込みを検討した。図 4 に示したように、10 μ M A β 単独はコントロールの 21.9% となり、かなり低下した。A β はグルコースの取り込み量に影響を及ぼしたことが示された。KSE の存在下ではどうか。7.5 μ L KSE + 10 μ M A β の場合 26.6%、また、50 μ L KSE + 10 μ M A β は 45.5% となった。A β 単独投与と比較して KSE + A β は細胞内取り込み量が高い結果となり、KSE は濃度依存的に高い傾向が見られた。KSE の存在によってグルコースの取り込みが改善され、A β のグルコーストランスポーターに対する影響を抑制していることが考えられた。以上のことから、A β は、グルコースの取り込み量に影響を与え、KSE は A β によって低下したグルコースの取り込みを濃度依存的に回復させることが示唆され、これによる細胞死抑制の可能性も推察された。

5. おわりに

この報告は、KSE の機能の一つである A β 誘導細胞死の抑制機構を探るための試みである。吸収スペクトル及び電気泳動像から A β への KSE の修飾による構造変化がうかがわれた。すなわち、KSE は A β を毒性の低い凝集体 (あるいは高分子量体) へと誘導することで神経毒性を抑制している可能性がある。また、A β とインスリンは一部共通のペプチド配列を持つことから、インスリンの働きに対し A β が擬似的な働きをし、脳内のインスリンの行うべき働きを阻害するのではないかという観点から、A β 単独と A β と KSE の共存下を比較し、A β がグルコースの取り込みの抑制をすること、KSE が

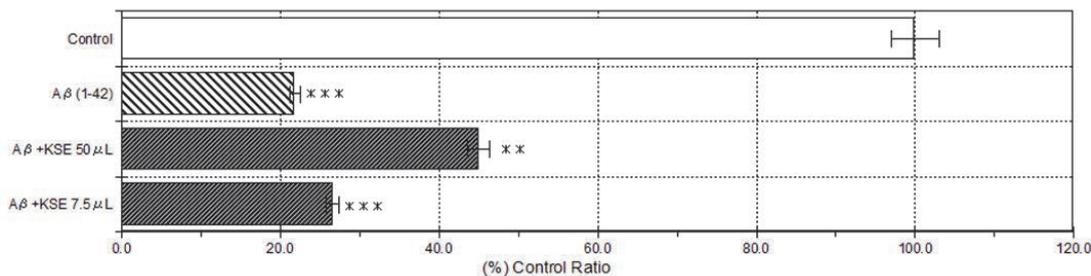


図4. グルコースの取り込みへの影響

グルコースの取り込みは、Glucose Uptake Cell-based Assay Kit (Cayman Chemical) を使用して測定した。マウス神経細胞 (2.6 x 10⁴ cells/well) を KSE (7.5 μ L, 50 μ L) で 1 h 処理し、その後 10 μ M A β (1-42) を加えて 37°C で 48h incubate した。その後、グルコースフリー培地で 1 h incubate 後、非放射性 2-deoxyglucose で、1 h incubate した。10 μ M A β 暴露後による 2-deoxyglucose の細胞内取り込みを測定した。コントロールを 100% とした結果を表し、有意差は、**P < 0.01, ***P < 0.001 を示した。

それを緩和することを報告した。なお、ここに紹介したコマツナは種子以外の、通常食用としている可食部の抽出成分においても、総フェノール量 1.45mM であり、peroxynitrite に対する消去効果はコントロールに対して半減させた。これらの結果から、コマツナ可食部においてもその可能性は否定できない。また、KSE の有効成分の検討は現在研究中であるが、一般に種子抽出物に含まれるポリフェノール成分は、gallic acid, protocatechuic acid, protocatechualdehyde, chlorogenic acid, p-coumaric acid, ferulic acid 等多種のフェノール性成分が確認されている。しかしながら、単離すると、種々の効果が低下することも我々は、過去の研究において度々経験している。それ故、今後の検討課題である。一方、KSE のような機能性成分の働きが明らかになるにつれ、食事から摂取して機能性成分が脳に到達できるのか、つまり、Blood-brain barrier (BBB) 通過が可能であるか否かがしばしば論点となる。この点の一例として、2005 年の Yang らの報告によると、クルクミンの BBB 通過が確認されている [3]。彼らは、Tg2576 マウスに 500 ppm のクルクミンを 5 ヶ月間与えた後、脳内の A β のプラークにクルクミンが結合していることを観察している。つまり、食餌由来によるクルクミンが BBB を通過することを証明した。今回ここに示した KSE、スルフォラファン [6] テアフラビン、EGCG [7] など一部の phytochemical は、A β を修飾することによって細胞死抑制に貢献する可能性がうかがえた。

文献

1. Kuhla B, Loske C and Garcia De AS et al. Differential effects of "Advanced glycation endproducts" and beta-amyloid peptide on glucose utilization and ATP levels in the neuronal cell line SH-SY5Y. *J Neural Transm* 111 (3) :427-439, 2004.
2. Okada Y and Okada M. Komatsuna seed extracts protection against amyloid β (1-42) -induced neuronal cell death. *J Diabetes Metab* 5 (5) , 2014.
3. Okada Y and Okada M. Protective effects of plant seed extracts against amyloid β -induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *J Pharm Bioallied Sci* 5 (2) :141-147, 2013.
4. Yang F, Lim PG and Begum N. A et al. Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* 280 (7) :5892-5901, 2005
5. Ge JF, Qiao JP and Qi CC et al. The binding of resveratrol to monomer" and fibril amyloid-beta. *Neurochem Int.* 61 (7) :1192-1201, 2012.
6. Nagaveni V, Lakshmi VV and Prabhakar S. Sulforaphane interaction with amyloid beta 1-40 peptide studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 28 (20) :2171-2180, 2014.
7. Grelle G, Otto A and Lorenz M et al. Black tea theaflavins inhibit formation of toxic amyloid- β and α -synuclein fibrils. *Biochemistry* 50 (49) : 10624-10636, 2011.
8. Xie L, Helmerhorst E and Taddei K et al. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci* 22 (10) :RC221, 2002.
9. Kurochkin VI and Goto S. Alzheimer' β -amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS lett* 345 :33-37, 1994.
10. Rayner DV, Thomas ME and Trayhum P. Glucose transporters (GLUTs1-4) and their mRNA in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. *Can J Physiol Pharmacol* 72 (5) :476-479, 1994.
11. Uemura E and Greenlee HW. Insulin regulates glucose uptake by promoting translocation of glucose transporter GLUT3. *Exp Neurol* 198 (1) : 48-53, 2005.
12. Toth C, Brussee V and Martinez JA et al. Rescue and regeneration of injured peripheral nerve axons by intrathecal insulin. *Neuroscience* 139 (2) :429-449, 2006.
13. Xu QG, Li XQ and Kotecha SA et al. Insulin as an in vivo growth factor. *Exp Neurol* 188 (1) :43-51, 2004.
14. Mark JR, Pang Z and Geddes W. J et al. Amyloid β -peptide impairs glucose transporter in hippocampal and cortical neurons: Involvement of membrane lipid peroxidation. *J. Neurosci* 17 (3) : 1046-1054, 1997.
15. Okada Y, Okada M and Sagesaka Y. Screening of dried plant seed extracts for adiponectin production activity and tumor necrosis factor- α inhibitory activity on 3T3-L1 adipocytes. *Plant Foods Hum Nutr* 65 (3) :225-232, 2010.
16. Yao ZX, Drieu K and Szwedda LI et al. Free radicals and lipid peroxidation do not mediate beta-amyloid-induced neuronal cell death. *Brain Res* 847 (2) :203-210, 1999.

Inhibition of cell death by a modification of the amyloid β protein using komatsuna seed extracts.

Mizue Okada¹, Yoshinori Okada²

¹Nutrition section, Ageing and Nutrition research, Yms Laboratory, Japan

²Laboratory on Ageing & Health Management, Graduate School of Nursing & Health, Aichi Prefectural University, Japan

Summary

We recently conducted a large scale screening of 15 plant seeds' aqueous extracts for inhibitory activity on Amyloid β ($A\beta$)-induced neurotoxicity in vitro. The study showed that Komatsuna seed extracts (KSE) effectively decreased $A\beta$ -induced neurotoxicity. In this study, we investigated the effects of KSE on $A\beta$ structure modification using SDS gel electrophoresis and absorption spectrum. KSE reduces the toxicity of $A\beta$ by modifying $A\beta$. KSE improves the inhibition of $A\beta$ glucose uptake.