

<平成 20 年度助成>

カボチャでアルツハイマー病改善 — ニコチアナミンによる記憶改善とその作用解明 —

高 田 晃

(弘前大学農学生命科学部)

1. はじめに

高齢化が進行するわが国において高齢者医療費の3割強を占める高血圧症の克服は大きな研究課題である。また、高齢化に伴い顕在化した認知症、特にアルツハイマー型認知症の予防や治療への注目も増している。最近、脳関門透過型アンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害剤がアルツハイマー型認知症の発症を有意に低下させる¹⁾との報告がなされた。これを裏付けるように、ACE阻害剤によるラットやマウスの記憶保持増強効果^{2,3)}や高血圧症患者でのノンコンプライアンス(薬の飲み忘れ)の改善⁴⁾に関する報告もある。よって、脳関門透過型ACE阻害物質あるいはそれを多く含む食材には高血圧症とアルツハイマー型認知症を同時に改善させる可能性が期待される。

ACEはアンジオテンシンIから強力な血圧上昇作用を有するアンジオテンシンIIへの変換を促進する酵素であり、血圧調節機構における重要性とともに、その作用機構もよく調べられている。一方、記憶保持との関わりについては、1)脳関門透過型ACE阻害剤のみが記憶改善効果を示すこと、2)脳内ACEが記憶保持に関わる脳内ペプチド、LVV-ヘモルフィン-7の分解を触媒する⁵⁾ことから、脳内ACEの阻害が記憶保持増強に関係していると考えられている。最近、早狩らはカボチャ抽出物から得られたACE阻害活性画分の血圧降下作用と記憶保持増強効果を見出しており、それには脳関門透過型ACE阻害物質が含まれていることが示唆された。以上のような背景から、

本研究ではカボチャに含まれるACE阻害物質を特定するとともに、その記憶改善効果を調べた。また構造活性相関研究により、天然物より高活性なACE阻害剤を見出すことができたので報告したい。

2. カボチャに含まれるACE阻害物質の同定

カボチャ(2.0 kgFW、FW:生重)を粉碎後、遠心分離し、得られた上清画分を陰イオン交換クロマトグラフィーにて分離した。0.3 M HCl_{aq}で溶出された画分を陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにて順次分離すると、ACE阻害活性画分0.20 gを得ることができた。最後に本活性画分32 mg(カボチャ0.30 kgFW相当)を、TSK-SAXカラムを用いたHPLCにて精製すると、ACE阻害物質4.5 mgを単離することができた(Table 1)。得られたACE阻害活性物質は各種NMRスペクトル、MSスペクトルの解析によりニコチアナミンであることが

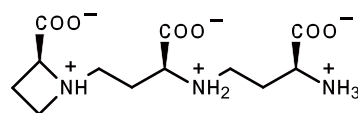


Figure 1 ニコチアナミンの構造

Table 1 ニコチアナミンの精製

separation	weight/g	IC ₅₀ (μg/mL)	recovery (%)
	180	310	100
AG 1-X8	2.0	3.5	98
Dowex 50W-X4	0.95	1.7	96
Sephadex G-25	0.20	1.0	34
TSK-SAX	0.0045	0.15	17

判明した。なお、分離の指標とした ACE 阻害活性試験は早狩らの方法⁶⁾に従い、ACE はラット脳より調製したものをを用いた。

ニコチアナミン⁷⁻¹⁰⁾はその代謝産物であるムギネ酸¹¹⁻¹³⁾とともに植物体内における金属イオン輸送に関わる物質であるが、ACE 阻害活性も報告されている¹⁴⁾。また、ニコチアナミンは腸から吸収された後、血圧降下作用を示すことが高血圧症モデルラットやマウス¹⁵⁾を用いた実験から明らかになっている。本物質が早狩らが明らかにしたカボチャエキスの作用の活性本体であることが考えられる。しかし、精製後のニコチアナミンの回収率は 17%と低く、結論付けるためにはカボチャ粗抽出液にその活性を説明するに足る量のニコチアナミンが含まれているのか定量しなければならない。また、ニコチアナミンが記憶改善に関与するのかどうかについても不明である。そこで、以下の節ではニコチアナミンの定量とその記憶改善効果について検討した。

3. 質量分析を利用したニコチアナミンの定量

ニコチアナミンの定量法に関して HPLC・ESIMS を利用した方法が複数報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾が、いずれも Dansyl 化や Fmoc 化といった誘導化を必要としている。本研究では誘導化をすることなく定量する方法を検討した。

ニコチアナミンは両性イオン性であるため、ESIMS による検出感度が高いことが予測できた。そこで、ニコチアナミンの質量分析を行い、分子イオンピーク [m/z 304.15 (M+H)⁺] のイオンピーク面積とニコチアナミン量に一次相関があることを確認した (Figure 2)。その検出限界は 2 ng、定量限界は 6 ng であった。しかし、ニコチアナミンは極性が高く、汎用担体である ODS では保持ができないため、夾雑物が多い粗精製エキスでそのまま定量実験をすると、定量精度が下がってしまう。そこで、種々の分離条件を検討した結果、

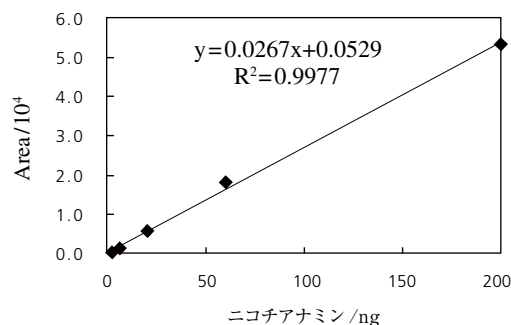


Figure 2 Calibration curve of nicotianamine

親水性カラム Cosmosil[®]-Hilic をプレカラムとして利用すると、効果的に夾雑物を分離でき、定量が可能であることが判明した。

定量実験には陽イオン交換クロマトグラフィー後の ACE 阻害活性画分を用いた。溶媒はアセトニトリル - 水 - ギ酸 (60:40:0.1) を使用した。その結果、カボチャエキスのニコチアナミン定量値は 104 mg/kgFW であった。これはカボチャエキスの ACE 阻害活性がニコチアナミンに起因すると仮定したときのニコチアナミン量 (128 mg/kgFW、ニコチアナミンの IC₅₀=1.7 μM) と良い一致を示した (Table 3)。以上の結果、ニコチアナミンがカボチャの ACE 阻害活性本体であると結論付けることができた。ニコチアナミンは多くの植物に存在することが知られている^{8,9)}。そこで、約 30 種の食材の ACE 阻害活性を調べたところ、カボチャ以外にダイズ、ナス、トマトのエキスを ACE 阻害活性を見出した (Table 2)。さらに、上述の方法でニコチアナミン量を定量したところ、いずれも活性から予測される値と良い一致を示した。このように今回の研究で調べた限りにおいては、ACE 阻害活性を示す食材の活性本体はすべてニコチアナミンであることが分かった。ニコチアナミンは食経験豊富な食材にすでに含まれていることから、その安全性は高いと考えられた。

4. ニコチアナミンの長期記憶改善効果

前述のように、早狩らはモーリス水迷路法によりカボチャの ACE 阻害活性画分の長期記憶保持

Table 2 各種食材エキス (0.02gFW/mL) の ACE 阻害活性

阻害活性 (%)		阻害活性 (%)		阻害活性 (%)	
カボチャ	82	オクラ	2	サツマイモ	6
ナス	86	ゴーヤ	1	シイタケ	2
トマト	83	ニンジン	1	マイタケ	1
ダイズ	90	ダイコン	9	ブナシメジ	8
タマネギ	26	葉ダイコン	3	ナメコ	1
リョクトウ	9	ナガイモ	13	エノキ	20
ツルムラサキ	3	バレイショ	13	リンゴ	8
ピーマン	2	キャベツ	3	ナシ	8
ブロッコリー	10	ミズナ	3	ブドウ	14
アスパラガス	4	コマツナ	10	プルーン	3
モロヘイヤ	1				

Table 3 各種食材のニコチアナミン定量結果

食材	定量値 ^a (mg/kgFW)	予測値 ^b (mg/kgFW)
カボチャ	104	128
ダイズ	65	69
ナス	25	22
トマト	31	35

^a ESIMS から算出したニコチアナミン量^b ACE 阻害活性から算出したニコチアナミン量

増強効果を明らかにしている。そこで、カボチャより精製したニコチアナミンをマウス (SD, 10 週齢、雄、各試験区 3 匹) に自由摂食させ、長期記憶改善効果を 4 日間測定した。なお、記憶保持の解析はモーリス水迷路法にて行い、標的へ到達時間で評価した。飼料の調製は粉餌 125 g にニコチアナミン 1 mg または 5 mg を含むように蒸留水とともに混合し、適当な大きさに裁断したものを乾燥させてから用いた。

その結果、試験開始 2 日目以降、ニコチアナミン投与区では非投与区に比べ、濃度依存的に長期記憶保持の増強効果が認められた (Table 4)。よって、カボチャエキスの長期記憶保持増強効果はニコチアナミンによる作用であることが明らかとなった。脳関門透過型 ACE 阻害剤のみがアルツハイマー病発症を抑制するとの報告¹⁾を考慮すると、ニコチアナミンは脳関門透過型 ACE 阻害物質として機能している可能性が示唆された。一

Table 4 ニコチアナミンによる長期記憶保持増強効果

	Days			
	1	2	3	4
非投与区	48 ± 15.1	44 ± 12.2	26.3 ± 10.8	18.5 ± 11.7
1 mg 投与区	51 ± 11.6	19 ± 13.3	12.3 ± 4.0	10.7 ± 10.8
5 mg 投与区	45 ± 9.2	7.5 ± 4.1	10 ± 4.4	9.5 ± 7.6

* ゴールまでの時間 / sec

般に脂溶性が高いほうが脳関門を通過しやすいと考えられているため、カルボキシル基やアミノ基といった極性官能基を複数具えているニコチアナミンが本当に脳関門を通過しているのか興味を持たれる。今後、放射ラベル化ニコチアナミンを利用した透過性実験を行う必要がある。

5. ニコチアナミンの構造活性相関研究

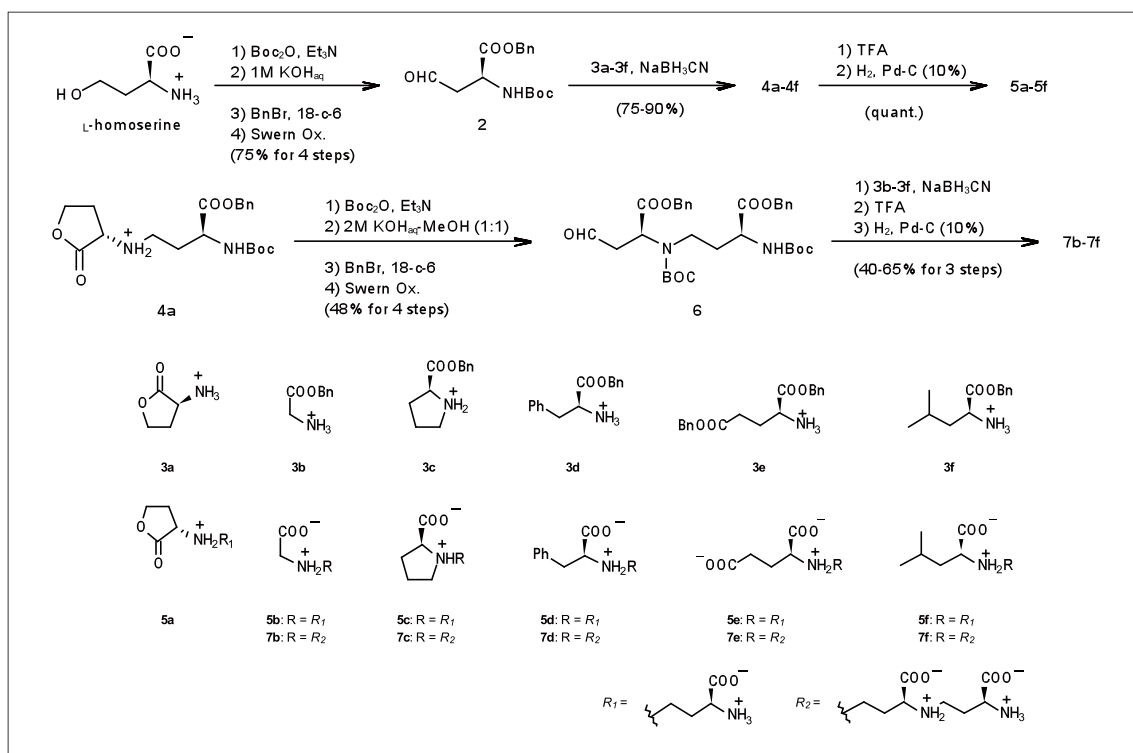
カプトプリルなど ACE の基質結合部位へ結合する阻害剤の作用機構については X 線解析などによりすでに詳しく調べられているが、ニコチアナミンによる阻害機構についてはよく分かっていない。ニコチアナミンは植物体内においてキレートとして働き、金属イオンの輸送に重要な役割を担っていることが知られている^{10, 19)}。このため、代表的なキレートである EDTA と同様に、ニコチアナミンの亜鉛イオン (ACE の中心金属原子) への配位が阻害メカニズムの本質であると考えら

れていた。しかし、ニコチアナミンによる ACE 阻害活性は高濃度金属イオン存在下においても抑制されず、ニコチアナミンは同じく亜鉛イオンを活性中心部位に有する leucine aminopeptidase や alkaline phosphatase の阻害を全くしないことなどから、上述の機構は疑わしい。また、速度論実験でもニコチアナミンによる ACE 阻害形式は従来の阻害物質のような競合阻害ではなく混合阻害であることも指摘されている²⁰⁾。これらのことはニコチアナミンが ACE と基質結合部位とは異なる部位に結合してその酵素活性を阻害するアロステリック阻害剤であることを示唆しているが、結合部位や結合によりどのような構造変化が起きているかなど、その詳細は不明である。

著者はニコチアナミンの作用機構を調べることが、従来の ACE 阻害剤とは異なるタイプの阻害剤開発につながると考え、構造活性相関研究を行った。ニコチアナミンは非ペプチド性のアミノ酸 3 量体であるが、極性官能基である α -アミノ酸部位は ACE との水素結合による相互作用に重要であろうと予想した。一方、2-カルボキシアゼチジン部のカルボン酸部の相互作用の必要性は

予測できるものの、環状構造の必要性については疑問であった。また、2-カルボキシアゼチジンが高価であることも、その誘導体調製や今後の研究展開の障害になると考えられたので、本研究ではアゼチジン環部位に的を絞った構造活性相関を調べることとした。具体的には、2-カルボキシアゼチジンを最も単純なアミノ酸であるグリシンに変換した 7b、ニコチアナミン結合部位の周辺環境に関する知見を得るために異なる化学的性質の側鎖を有するアミノ酸(プロリン、フェニルアラニン、グルタミン酸、ロイシン)に変換した各種類縁体 7c-7f を合成した (Scheme 1)。また、阻害活性発現に 3 量体構造が必須であるかを調べるために、ホモセリン部位を一つ減らした 2 量体類縁体 5a-5f も合成した。なお、ニコチアナミンあるいは類縁化合物であるムギネ酸の合成研究はすでに複数例知られている²²⁻²⁴⁾が、今回の実験では大船らの合成方法²¹⁾を参考にした。

合成した各種類縁体の ACE 阻害活性試験の結果を Table 5 にまとめた。6 種類の 2 量体類縁体 5a-5f はいずれも阻害活性を全く示さず ($IC_{50} > 50$ mg/L)、阻害活性発現にはアミノ酸ユニットが



Scheme 1 ニコチアナミン類縁化合物の合成

3つ以上必要であることが示された。グリシン類縁体 7b とプロリン類縁体 7c の阻害活性 ($IC_{50} = 0.15 \text{ mg/L}$) は意外なことに、天然物であるニコチアナミンの活性 ($IC_{50} = 0.50 \text{ mg/L}$) より約 3 倍強いことが示された。ニコチアナミンのアゼチジン環は歪みの大きな 4 員環構造であるため、7b-c のような鎖状構造や 5 員環構造に比べ、 $O=C-C-N$ の角度が約 5° 大きい (Figure 3)。これがカルボキシル基と ACE 側鎖との水素結合相互作用にわずかなミスマッチを生じさせたのかもしれない。フェニルアラニン類縁体 7d の ACE 阻害活性 ($IC_{50} = 0.05 \text{ mg/L}$) はニコチアナミンの活性より 10 倍強く、カプトプリルに匹敵するほどであった。7d のベンゼン環がニコチアナミンの結合部位付近に存在する芳香族性残基と付加的な相互作用が生じたためと考えられた。一方、グルタミン酸類縁体 7e、ロイシン類縁体 7f はいずれもニコチアナミンより約 4 倍、グリシン類縁体と比較すると約 10 倍活性が低下していた。アニオン性側鎖や脂肪族性側鎖の存在が ACE との相互作用を低下させたためであろう。このように、各種類縁体の ACE 阻害活性を調べることで、未知のニコチアナミン結合部位の化学的環境に関する情報を得ることができた。今後、これらの知見をもとにニコチアナミン結合部位の特定を目指したい。

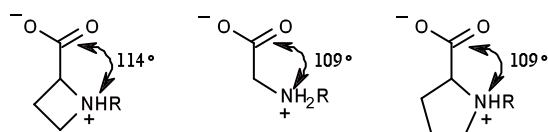


Figure 3

Table 5 ニコチアナミン誘導体の ACE 阻害活性

	IC_{50} (mg/L)			IC_{50} (mg/L)	
ニコチアナミン	0.50	カプトプリル		0.035	
5a	>50				
5b	>50	7b		0.15	
5c	>50	7c		0.15	
5d	>50	7d		0.050	
5e	>50	7e		2.0	
5f	>50	7f		2.0	

6. まとめ

本研究では、LC-ESIMS を利用した定量によりカボチャに含まれる ACE 阻害活性本体がニコチアナミンであることを示した。また、モーリス水迷路法によりニコチアナミンの長期記憶改善効果についても明らかにした。ニコチアナミンはカボチャ、ダイズなど食経験豊富な食材に多く含まれるため、安全性が高いことが予想される。また、熱安定性が高いため、加熱調理による分解もない。高齢化社会の進行に伴って高血圧症あるいは認知症患者が増加傾向にあることを考慮すると、ニコチアナミンあるいはそれを多く含んだ食品素材のニーズは今後益々高まると期待される。

ニコチアナミンの作用機構は従来の ACE 阻害剤とは異なることが指摘されている。そこで各種類縁体を化学合成し、構造活性相関研究を行った。その結果、2-カルボキシアゼチジン環部分をフェニルアラニンに変換することで、活性が約 10 倍上昇することを見出した。これにより各種アルツハイマー病モデルマウスへのニコチアナミン投与を通じて長期記憶改善効果の科学的根拠を知るための量的供給が容易になった。今後、ラベル化ニコチアナミンを供給し、結合部位特定や脳関門透過性を調べていきたいと考えている。

謝辞

本研究に対し多大なご助成を賜りました浦上食品・食文化振興財団に心から感謝いたしますとともに、貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり ACE をご供与いただきました弘前大学医学部の早狩誠教授に深く感謝いたします。

文献

- 1) Ohrui, T.; Tomita, N.; Seto-Nakagawa, T.; Matsui, T.; Maruyama, M.; Niwa, K.; Arai, H. Sasaki, H. Effects of brain-penetrating ACE inhibitors on Alzheimer disease progression, *Neurology* 2004, 63, 1324-1325.

- 2) Hirawa, N.; Uehara, Y.; Kawabata, Y.; Numabe, A.; Gomi, T.; Ikeda, T.; Suzuki, T.; Goto, A.; Toyo-oka, T.; Omata, M. Long-term inhibition of renin-angiotensin system sustains memory function in aged Dahl rats, *Hypertension* **1999**, *34*, 496-502.
- 3) Mondadori, C.; Hengerer, B.; Ducret, T.; Borkowski, J. Delayed emergence of effects of memory-enhancing drugs: Implications for the dynamics of long-term memory, *Proc. Natl. Acad. Soc. USA* **1994**, *91*, 2041-2045.
- 4) Yadfat, Y.; Bar-On, D.; Amir, M.; Cristal, N. Quality of life in normotensives compared to hypertensive men treated with isradipine or methyldopa as monotherapy or in combination with captopril: the LOMIR-MCT-IL study, *J. Hum. Hypertens.* **1996**, *10*, 117-122.
- 5) Hayakari, M.; Satoh, K.; Izumi, H.; Kudoh, T.; Asano, J.; Yamazaki T.; Tsuchida, S. Kinetic-controlled hydrolysis of Leu-Val-Val-hemorphin-7 catalyzed by angiotensin-converting enzyme from rat brain, *Peptides* **2003**, *24*, 1075-1082.
- 6) Hayakari, M.; Seito, R.; Furugori, A.; Hashimoto, Y.; Murakami, S. An improved colorimetric assay of angiotensin-converting enzyme in serum, *Clin. Chem. Acta* **1984**, *144*, 71-75.
- 7) Noma, M., Noguchi, M., Tamaki, E. A new amino acid, nicotianamine, from tobacco leaves, *Tetrahedron Lett.* **1971**, *12*, 2017-2020.
- 8) Noma, M., Noguchi, M. Occurrence of nicotianamine in higher plants, *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1701-1702.
- 9) Rudolph, A.; Bechker, R.; Schulz, G.; Prochazka, Z.; Toman, J.; Macek, T.; Herout, V. The occurrence of the amino acid nicotianamine in plants and microorganisms. A reinvestigation, *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **1985**, *180*, 557-563.
- 10) Takahashi, M.; Terada, Y.; Nakai, I.; Nakanishi, H.; Yoshimura, E.; Mori, S.; Nishizawa; N. K. Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development, *Plant Cell* **2003**, *15*, 1263-1280.
- 11) Takemoto, T.; Nomoto, K.; Fushiya, S.; Ouchi, R.; Kusano, G.; Hikino, H.; Takagi, S.; Matsuura, Y.; Kakudo, M. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **1978**, *54*, 469.
- 12) Nomoto, K.; Ohfuné, Y. Studies on structures, syntheses and metal complexes of mugineic acids, *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **1982**, *40*, 401-414.
- 13) Takagi, S. Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washings. I. Activity measurement and preliminary characterization. *Soil Sci. Plant Nutr.* **1976**, *22*, 423-433.
- 14) Kinoshita, E.; Yamakoshi, J.; Kikuchi, M. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 1107-1110.
- 15) Hayashi, A.; Nakayama, T.; Murakami, K.; Aoyagi, Y.; Kimoto, K. Effects of nicotianamine on blood pressure in Tsukuba hypertensive mice (THM). *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **2005**, *58*, 315-321.
- 16) Mori, S.; Nishizawa, S. Methionine as a dominant precursor of phytosiderophores in *Graminaceae* plants, *Plant Cell Physiol.* **1987**, *28*, 1081-1092.
- 17) Hayashi, A.; Nakayama, T.; Aoyagi, Y.; Kimoto, K. Purification of nicotianamine from hayatouri (*Sechium edule*) and estimation of quantitative determination method. 『日本食品科学工学会誌』, **2005**, *52*, 154-159.
- 18) Wada, Y.; Yamaguchi, I.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N. K. Highly sensitive quantitative analysis of nicotianamine using LC/ESI-TOF-MS with an internal standard, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 435-441.
- 19) Ripperger, H.; Schreiber, K. Nicotianamine and analogous amino acids, endogenous iron carriers in higher plants, *Heterocycles* **1982**, *17*, 447-461.
- 20) Hayashi, A.; Kimoto, K. Nicotianamine preferentially inhibits Angiotensin I-converting enzyme, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2007**, *53*, 331-336.
- 21) Ohfuné, Y.; Tomita, M.; Nomoto, K. Total synthesis of 2'-deoxymugineic acid, the metal chelator excreted from Wheat root, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2409-2410.
- 22) Matsuura, F.; Hamada, Y.; Shioiri, T. Efficient synthesis of mugineic acid, a typical phytosiderophore, utilizing the phenyl group as the carbonyl synthon, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *51*, 7917-7920.
- 23) Miyakoshi, K.; Oshita, J.; Kitahara, T. Expedient synthesis of nicotianamine and 2'-deoxymugineic acid, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3355-3360.
- 24) Bouzaoui, M.; Mari, S.; Czernic, P.; Curie, C.; Martinez, J.; Cavellier, F. Synthesis and biological activity of nicotianamine and analogues. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *611*, 555-557.

Memory Improvement Effect of Nicotianamine and Its ACE Inhibitory Mechanism

Noboru Takada

Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University

Hypertension and Alzheimer's disease are the serious issues on our health. The angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors have been considered to be one of the most important hypertensive drugs, since ACE catalyzes the hydrolysis of angiotensin I to generate angiotensin II, a potent vasoconstrictor. Recently, it was reported that brain penetrating ACE inhibitors such as captopril can reduce the incidence of Alzheimer's disease in elderly hypertensive patients. These evidences indicate that brain penetrating ACE inhibitors can prevent both hypertension and Alzheimer's disease. In this report, we describe the identification of an ACE inhibitor (nicotianamine) from pumpkin which can improve hypertension and long-term-memory function.

Nicotianamine (4.5 mg) was isolated from 2.0 kgFW of pumpkin in the guidance of *in vitro* ACE inhibitory assay. We developed a quantification method employing LC-ESIMS system and Cosmosil® HILIC column and then identified that nicotianamine is the most available ACE inhibitor from vegetable sources such as pumpkin and soybean.

It was showed with Morris water maze test in mice that treatment of nicotianamine improved long-term-memory function in dose-dependent manner. Taking the memory improvement effect by brain penetrating ACE inhibitor into account, nicotianamine was suggested to have a potential to penetrate blood-brain-barrier.

Although it has been well-known the antihypertensive effect of nicotianamine, its detail ACE inhibitory mechanism has not been identified. Nicotianamine does not have enough potential to chelate zinc ion and cannot inhibit Zn containing enzymes, except for ACE. Furthermore, its inhibition pattern for ACE is that of mixed inhibition, different from other inhibitors which show competitive pattern. To examine its inhibitory mechanism more, we prepared 11 nicotianamine derivatives (**5a-5f**, **7b-7f**) and then carried out the structure-relationship study. As the results, it was found that azetidine ring moiety is not necessary for exhibiting the activity and that phenyl group in **7d** enhances the activity because of additional π - π interaction with ACE residue. These results gave an important clue for clarifying the inhibitory mechanism of nicotianamine for ACE.