

# 論文内容要旨 (和文)

2021 年度入学 大学院博士後期課程

バイオ工学専攻 バイオ化学分野

氏 名 XU FUSHENG



論文題目 Synthesis and evaluation of catecholamine derivatives as amyloid-beta aggregation inhibitors

(アミロイドβ凝集阻害剤としてのカテコールアミン誘導体の合成と評価)

## [緒言]

アルツハイマー病は、認知機能の低下という人間の健康に大きな課題を提起する慢性の神経障害である。広範な研究が行われているが、まだ正確な病態メカニズムは解明されていない。アルツハイマー病患者の特徴として、アミロイドベータと呼ばれるペプチドの高度凝集体が脳神経細胞へ蓄積することがあげられる。アミロイドベータは36-43個のアミノ酸残基から構成される凝集性ペプチドで、アミロイドベータ前駆体タンパク質から生成することが知られている。また、アミロイドベータの凝集は、アルツハイマー病の臨床的および病理学的症状に影響を与えると報告されている。したがって、アミロイドベータの凝集を阻害することは、アルツハイマー病の治療および予防のための重要な戦略となる。以前からアミロイドベータ凝集阻害剤の探索研究が活発に行われており、その中でもウコンに含まれるクルクミンが、顕著なアミロイドベータ凝集阻害効果を示している。しかしながら、分子の不安定さと難水溶性に課題があった。

最近の研究でレッドクローバー (*Trifolium pratense*) から単離されたカテコール誘導体クロバミドがアミロイドベータの凝集抑制効果を持つことが報告された [1-2]。クロバミドはカテコールとアミド構造を有する化合物であり、過去に報告された構造と異なる構造的特徴を有している。そこで筆者は、クロバミドの構造的特性を考慮した様々なクロバミド誘導体ならびにカテコールアミン誘導体を設計、合成し、それらのアミロイドベータ凝集阻害能について調査した。さらに、水溶性や細胞毒性などの評価もあわせて実施した。

## [実験方法ならびに結果と考察]

筆者はまずクロバミドの合成を行った。合成したクロバミドは後に示す評価において、顕著な活性を示したが安定性を欠くことがわかった。分子内に存在するカルボン酸がその原因であると推測し、メチルエステル誘導体に導いたところ、活性を維持した状態で安定性が向上することがわかった。そこで評価するクロバミド誘導体はメチルエステル体として調製した。また、芳香環上のフェノール性水酸基の数や位置について構造活性相関研究を実施するため、様々なクロバミド誘導体を合成した。さらに、メチルエステル部分をヒドロキシメチル基、あるいは水素に置き換えたカテコールアミン誘導体を多数合成した。

次に、Thioflavin T 法を用いてクロバミド誘導体ならびにカテコールアミン誘導体がアミロイドベータに与える凝集阻害効果について評価した。実験の結果、カテコールアミン構造を持つ化合物がアミロイドベータの凝集に顕著な阻害効果を示すことを見出した。一方で、カテコール構造を欠損させた誘導体は、ほとんどまたは全く阻害効果を示さなかった。合成したこれらの誘導体の凝集阻害率を測定した後、シェイクフラスク法で、それらの水溶性を評価した。その結果、優れた水溶性を示すカテコールアミン誘導体が多数見られた。また細胞毒性についてWST-8法で評価したところ、ほとんどのカテコールアミン誘導体で大きな毒性は示さなかった。

これらの結果を総合的に評価し、高い凝集阻害率、優れた水溶性、最小限の細胞毒性を示す阻害剤を特定することに成功した。特定したカテコールアミン誘導体とアミロイドベータの状態を調べるために、透過型電子顕微鏡による観察を行った。カテコールアミン誘導体とアミロイドベータを20時間培養したものを観察したところ、カテコールアミン誘導体を加えないアミロイドベータの複雑な相互結合構造と比較して、アミロイドベータの凝集サイズが著しく減少することが観察された。動的光散乱法より、この粒子半径を 112 nm と決定した。アミロイドベータのみの場合この粒子半径は 4127 nmであることから、凝集体の成長が抑制されていると結論付けた。

次にカテコールアミン誘導体とアミロイドベータの相互作用部位を予測する目的でドッキングシミュレーションを実施した。シミュレーションでは、アミロイドベータの凝集核部分と考えられているKLVEFアミノ酸配列部分を中心にクロバミド誘導体の相互作用を解析した。その結果、カテコールアミン誘導体のカテコール構造がアミロイドベータのリシンと相互作用し、水素結合を形成していることが示された。カテコールアミン誘導体のカテコール構造が酸化されカテコールキノンが形成され、リシンの側鎖アミノ基と相互作用するためではないかと予測した。それを裏付けるように、安定なキノン構造を形成すると思われるカテコールアミン誘導体が特に顕著な凝集阻害活性を示す結果となっている。

#### [結論]

筆者は様々なカテコール構造を有するクロバミド誘導体ならびにカテコールアミン誘導体を設計、合成した。そして、カテコール構造を含む化合物がアミロイドベータの凝集を効果的に阻害できることを示すことができた。筆者が見出したカテコールアミン誘導体は優れた水溶性を持ち、細胞毒性をほとんど示さない。また、透過型電子顕微鏡や動的光散乱法による観察により、カテコールアミン誘導体の存在下、アミロイドベータの凝集が抑制されていることを確認することができた。最後に、カテコールアミン誘導体の作用メカニズムを予測するためにドッキングシミュレーションを活用した。カテコールアミン誘導体による阻害はアミロイドベータのリシン残基との相互作用によるものと推測した。

# 論文内容要旨 (英文)

2021 年度入学 大学院博士後期課程

バイオ工学専攻 バイオ化学分野

氏 名 \_\_\_\_\_ XU FUSHENG



論 文 題 目 Synthesis and evaluation of catecholamine derivatives as amyloid-beta aggregation inhibitors

Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disorder, impairs cognitive function, yet its underlying mechanism remains unclear. A key hallmark of AD is the accumulation of amyloid-beta peptides ( $A\beta$ ) in brain neurons.  $A\beta$ , a peptide composed of 36-43 amino acid residues, has a propensity to aggregate, contributing to the pathogenesis of AD symptoms. Inhibition of  $A\beta$  aggregation is considered a crucial therapeutic strategy for treating AD. Although curcumin in turmeric has shown potential as an  $A\beta$  aggregation inhibitor, it suffers from limitations in stability and water solubility. Recent studies have revealed that clovamide, a catechol derivative from red clover, exhibits inhibitory activity against  $A\beta$  aggregation. In this thesis, the author reports the synthesis of various clovamide and catecholamine derivatives and evaluates their ability to inhibit  $A\beta$  aggregation, along with their water solubility and cytotoxicity profiles.

Since the synthesized clovamide was unstable under assay conditions, the author improved its stability by converting the carboxylic acid to a methyl ester. A series of clovamide and catecholamine derivatives were synthesized to investigate the effects of phenolic hydroxyl groups on the structure-activity relationship. Using the Thioflavin T assay, it was found that clovamide and catecholamine derivatives possessing a catechol structure significantly inhibited  $A\beta$  aggregation. Additionally, clovamide and catecholamine derivatives exhibited excellent water solubility and low cytotoxicity. The author selected reasonable candidates through screening. Transmission electron microscopy analysis revealed that the selected catecholamine derivatives reduced the size of  $A\beta$  aggregates after co-incubation for 20 hours. Dynamic light scattering measurements showed that the particle radius of  $A\beta$  aggregates in the presence of catecholamine derivatives was 112 nm, compared to 4127 nm for  $A\beta$  alone. These results suggest that catecholamine derivatives inhibit  $A\beta$  aggregation. Finally, the author performed molecular docking simulations between catecholamine derivatives and  $A\beta$  aggregates. These results predicted that the hydroxy groups of 1,2- and 1,4-catechol structures in catecholamine derivatives interacted with lysine residues on the aggregated core region of  $A\beta$  through the formation of hydrogen bonds. This interaction, arising from the oxidation of catechol to form quinone structures, suggests that stable quinone structures exhibit significant inhibition of  $A\beta$  aggregation.

In conclusion, the author synthesized a series of new compounds based on clovamide and catecholamine derivatives and evaluated their inhibition of  $A\beta$  aggregation and related properties. Those possessing catechol structures effectively inhibited  $A\beta$  aggregation, and these candidate derivatives exhibited excellent water solubility and low cytotoxicity.



# 学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

令和6年 8月 1日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

主査 ..... 今野 博行 .....

副査 ..... 阿部 宏之 .....

副査 ..... 真壁 幸樹 .....

副査 ..... 鳴海 敦 .....

副査 .....



学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

論文申請者	バイオ工学専攻・バイオ化学分野 氏名 XU FUSHENG		
論文題目	Synthesis and evaluation of catecholamine derivatives as amyloid-beta aggregation inhibitors (アミロイドβ凝集阻害剤としてのカテコールアミン誘導体の合成と評価)		
学位論文審査結果	合格	論文審査年月日	令和6年 7月17日～ 令和6年 7月31日
論文公聴会	令和6年 7月31日	場 所	工学部3号館3-2307号室
最終試験結果	合格	最終試験年月日	令和6年 7月 31日

## 学位論文の審査結果の要旨 (1,000字程度)

近年、アルツハイマー病の根本治療としてアミロイドβ (Aβ) 凝集阻害が有望であると考えられており、それらに対応する抗体や低分子化合物の探索が活発に行われている。本論文ではその阻害剤候補としてカテコール系天然物に着目し、それら誘導体の化学合成と構造活性相関研究を主眼に置き研究を展開している。

第1章では研究の背景について詳細に述べられている。アルツハイマー病の現状からその原因と考えられているアミロイド仮説、さらにAβについて説明している。さらに、本論文の着想となったクルクミンに関する研究、今回焦点を当てたクロバミドについて述べている。

第2章ではカテコール系天然物クロバミドを用いた研究について、分子設計、化学合成、さらにそれらの評価結果を詳細に述べている。はじめにクロバミドの化学合成を行った所、物質の不安定性さに直面した。その原因としてカルボン酸が分子内環化を引き起こすことを突き止めた。そのため入手できるものの、その後はエステル化を施すことで構造維持を行っている。次に、ドーパ、チロシン、カテコールアミンなどを骨格とし、芳香環上にフェノール性水酸基を複数導入し、様々なクロバミド誘導体を合成している。その後、合成化合物について多角的に物質評価を行い、顕著な物性を示した誘導体を選抜している。評価結果から、強力なAβ凝集阻害活性を示すためにはスパーサーを介した2つのカテコール構造が必須であった。一方で、スパーサー部分の構造には柔軟性が見られ、アミド結合を含むものであればsp<sup>2</sup>炭素を持つ4あるいは6元素鎖の誘導体はAβ凝集阻害活性を維持できることを見出している。

第3章では総括を行なっている。得られた結果はスパーサー部分の剛直性や平面性に関する新しい知見を与えるものであり、今後の構造最適化に有用な情報となる。高い水溶性と物質安定性、低い細胞毒性、さらに合成が容易であることも利点であると結論付けている。

以上の結果は今後のAβ凝集阻害剤開発研究の大きな足掛かりとなり、その応用が期待できる。本研究の成果は学術論文2報に掲載され、当該専攻の審査基準を満たしている。以上より、博士(工学)の学位論文として価値と水準を十分に満たしており、合格と判断した。

本論文は、研究倫理又は利益相反等に係る学内規則に基づく手続きは必要ありません。

## 最終試験の結果の要旨

最終試験は、公聴会実施後に口頭で行った。その結果、学位論文の内容及び専門知識、関連知識の理解度は十分であり、博士の学位を授与するのに十分な知識と能力を有していると判断した。その結果、最終試験について合格と判定した。