

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860093

研究課題名(和文) 基質配列に基づく構造活性相関研究を通じた新規BACE1阻害剤の開発

研究課題名(英文) Development of novel BACE1 inhibitors: Structure activity relationship study based on the substrate sequence

研究代表者

小林 数也 (Kobayashi, Kazuya)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80647868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、アルツハイマー病根本治療薬の開発を最終目標として、新規 セクレターゼ(BACE1)阻害剤の開発に取り組んだ。BACE1基質ペプチドの配列をベースに遷移状態アナログとしてヒドロキシエチルアミン(HEA)を用いた阻害剤のP1'部位の構造活性相関研究では、HEAモチーフの最適構造を同定することに成功した。また、架橋構造導入による構造の固定化研究では、質量分析において目的とする環状BACE1阻害剤の生成を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：I have investigated to develop novel γ -secretase (BACE1) inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. Our structure-activity relationship study for P1' site of hydroxyethylamine (HEA)-type BACE1 inhibitors, which were designed based on the substrate sequence, identified an optimum structure of HEA unit. Furthermore, in our study for improvement of their activity and bioavailability using bridged structure, a bridged BACE1 inhibitor was identified by MS spectrometer.

研究分野：メディシナルケミストリー

キーワード：アルツハイマー病 BACE1 ヒドロキシエチルアミン 遷移状態アナログ

1. 研究開始当初の背景

アミロイドβペプチド(Aβ)の産生に關与するβ-セクレターゼ(BACE1)は、アルツハイマー病治療薬開発における重要な創薬標的の一つであり、これまでに多くのBACE1阻害剤が報告されているが、他の酵素に対する選択性や血液脳関門の透過性など多くの課題を残しており、より有用な阻害剤の開発が求められている。

アスパラギン酸プロテアーゼであるBACE1の阻害剤設計では、その基質切断部位に遷移状態を模倣したイソスターを導入する手法が多く用いられている。所属研究室では、遷移状態アナログとしてヒドロキシエチルアミン(HEA)に着目し、研究開始時までに合成したいくつかのHEA型BACE1阻害剤において中程度の活性を確認しており、HEAの遷移状態アナログとしての有効性を明らかにしていた(図1)。

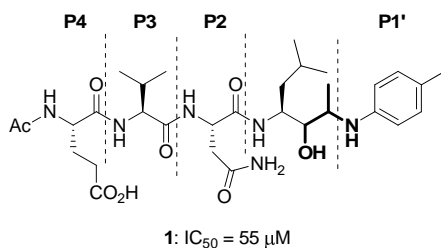


図1. HEA型BACE1阻害剤1

また所属研究室では、基質切断部位周辺の配列(P4~P1')を非天然アミノ酸に置換したドデカペプチドが、天然型や変異型のAPP配列を持つペプチドよりもBACE1による認識・切断を受けやすくなることを報告していた(図2)。

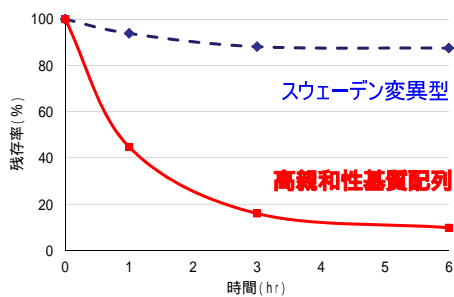


図2. BACE1高親和性基質配列

一方、合成したHEA型BACE1阻害剤1に関して、BACE1との共結晶のX線構造解析を行ったところ、P1部位とP3部位の側鎖間に大きな疎水性ポケットが存在することを明らかにしていた(図3)。P1-P3間への架

橋構造の導入は、いくつかのグループにより検討がなされていたが、それらの報告では環サイズ及び架橋構造に関する詳細な検討はなされておらず、十分な構造最適化が行われていなかった。

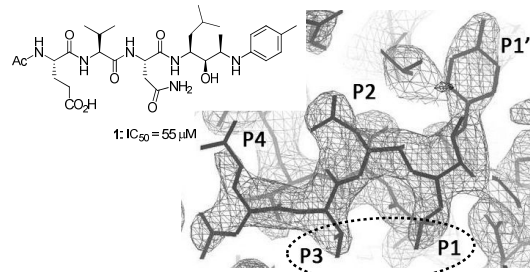


図3. 阻害剤1のX線結晶構造解析

2. 研究の目的

本研究では、上述した背景を考慮し、アルツハイマー病根本治療薬の開発を最終目標として、以下の3つの手順から新規セクレターゼ(BACE1)阻害剤の開発を行うこととした。

(1) BACE1の高親和性基質配列をベースに、遷移状態アナログとしてヒドロキシエチルアミン(HEA)を用いたP1'部位の最適化を行う。

(2) P1-P3間への架橋構造の導入による構造の固定化を試み、(1)の結果と組み合わせることで新規ペプチド性BACE1阻害剤を開発する。

(3) (1)、(2)のアプローチから得られた構造情報に基づいて、BACE1阻害剤の低分子化を行い、他酵素に対する選択性や血液脳関門透過性などの既存の阻害剤における問題点の克服を図る。

3. 研究の方法

(1) HEA型ペプチド性BACE1阻害剤の開発

HEA型ペプチド性BACE1阻害剤の開発を目標に、HEAモチーフ及びP1'部分に関する構造活性相関研究を行った。HEAモチーフに関しては、ヒドロキシ基及びそのβ位置置換基の立体化学が周辺構造や活性に大きな影響を及ぼすことが示唆されていたため、まずβ位にメチル基を有するものと有しないものについて、それぞれの立体異性体を選択的に合成し、それらの活性評価を行うことで、最適構造の同定を行った。

続いて、最適化したHEAモチーフをベースにP1'位への様々な置換基の導入を検討し、P1'位の構造最適化に着手した。

(2) 環状BACE1阻害剤の開発

(1)で得られたHEA型BACE1阻害剤をベースにP1側鎖とP3側鎖を架橋した環状BACE1阻害剤の開発を行った。バリン側鎖とロイシン側鎖をその構造を維持したまま架橋した場合、新たに2つの不斉点が形成されることになるが、まずは環の大きさと架橋部分の構造に関する情報を集めるために、分

枝のない単純化した構造について検討を行うこととした。環サイズに関しては、アルケン架橋型ペプチドを用いて検討することとし、合成に必要な非天然アミノ酸ユニットの合成と架橋型 BACE1 阻害剤の合成を行った。

4. 研究成果

(1) HEA 型ペプチド性 BACE1 阻害剤の開発

HEA ユニットに関する各ジアステレオマーの立体選択的な合成法を確立した。本合成法に従い、8 位にメチル基を有する HEA 型 BACE1 阻害剤の 4 つのジアステレオマーと 8 位に置換基の無い HEA 型 BACE1 阻害剤の 2 つのジアステレオマーを合成し、BACE1 阻害活性を評価したところ、ヒドロキシ基の立体化学は (*R*)-体が (*S*)-体よりも 20 倍以上の高活性を示すこと、メチル基の立体化学に関しては (*R*)-体が (*S*)-体よりも高活性であるものの、メチル基がない方がより高い活性を示すことが明らかとなった (図 4)。

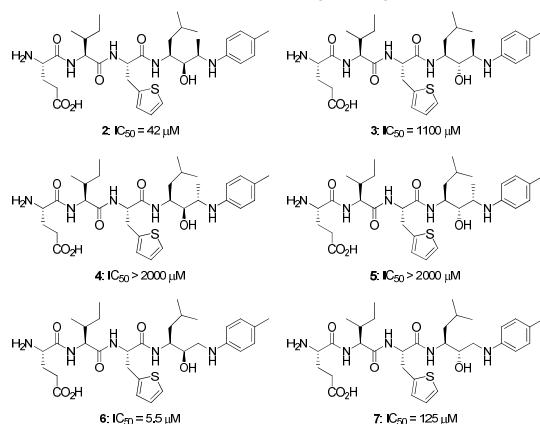
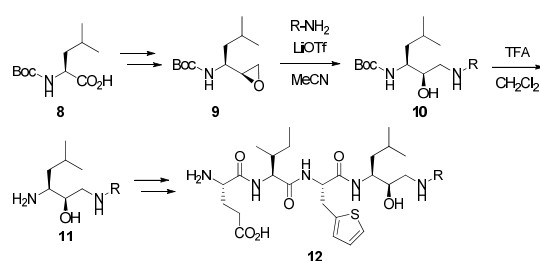


図 4. HEA 型 BACE1 阻害剤の阻害活性値

以上の検討の結果、HEA ユニットは無置換 (*R*)-体が最適構造であることが示されたため、本構造をベースに P1' 位への置換基の導入を試みたが、先の合成法ではトルイジン以外の置換基の導入が困難であった。そこで、より汎用性の高い新たな合成ルートを確認した (Scheme 1)。現在、本合成法による P1' 位への様々な置換基の導入を検討中であり、今後この研究を継続し、成果を論文としてまとめる予定である。

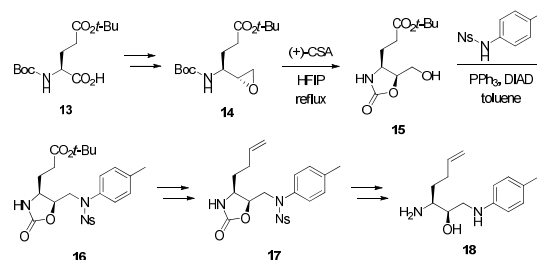


Scheme 1. 新規合成ルート

(2) 環状 BACE1 阻害剤の開発

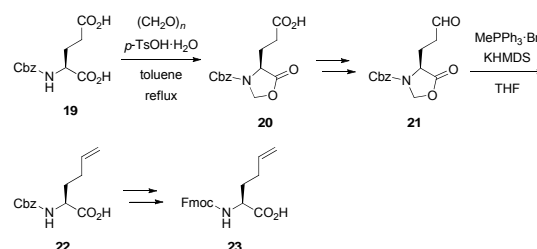
(1) で見出した無置換 (*R*)-HEA 構造をベー

スに、P1 側鎖と P3 側鎖を架橋した環状 BACE1 阻害剤のための非天然アミノ酸ユニットの合成を行った。側鎖アルケンと HEA 構造を有する P1 位アミノ酸ユニットは、Scheme 2 に示す手法により合成した。



Scheme 2. P1 位アミノ酸ユニットの合成

また、P3 位に相当するアミノ酸ユニットは、Scheme 3 の合成法により合成した。



Scheme 3. P3 位アミノ酸ユニットの合成

得られたアミノ酸ユニットを HEA 型 BACE1 阻害剤に導入し、環化前駆体に対して閉環メタセシス反応を行ったところ、目的の分子量を有する化合物の生成が確認できた。現在、本環化反応及び目的物の精製について検討を行っている。また、これと並行して、鎖長の異なるアミノ酸ユニットの合成法の検討も行っており、今後は様々な鎖長の架橋型 BACE1 阻害剤を合成し、架橋構造についての構造活性相関研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Kouji Ohnishi, Haruka Sakurai, Kazuya Kobayashi, Hidefumi Makabe, Kenta Teruya, Kenichi Akaji, Yasunao Hattori: Syntheses of a Pyrrolidine Analog of a Tetrahydrofuran Containing Acetogenin, *cis*-Solamin. *Heterocycles*, **2015**, *91*, 573-582, 査読有, DOI: 10.3987/COM-14-13163

Yasuhiro Shimamoto, Yasunao Hattori, Kazuya Kobayashi, Kenta Teruya, Akira Sanjoh, Atsushi Nakagawa, Eiki Yamashita, Kenichi Akaji: Fused-ring

Structure of Decahydroisoquinolin as a Novel Scaffold for SARS 3CL Protease Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 876-890, 査読有, DOI: 10.1016/j.bmc.2014.12.028

Yuki Toda, Kazuyuki Takata, Yuko Nakagawa, Hikaru Kawakami, Shusuke Fujioka, Kazuya Kobayashi, Yasunao Hattori, Yoshihisa Kitamura, Kenichi Akaji, Eishi Ashihara: Effective Internalization of U251-MG-secreted Exosomes into Cancer Cells and Characterization of Their Lipid Components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *456*, 768-773, 査読有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.12.015

Chiyuki Awahara, Tadashi Tatsumi, Saki Furuta, Gen Shinjoh, Hiroyuki Konno, Kazuto Nosaka, Kazuya Kobayashi, Yasunao Hattori, Kenichi Akaji: Effect of Prime-site Sequence of Retro-inverso-modified HTLV-1 Protease Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2482-2488, 査読有, DOI: 10.1016/j.bmc.2014.02.050

Maria Hayashi, Kazuya Kobayashi, Hiroyoshi Esaki, Hiroyuki Konno, Kenichi Akaji, Keiko Tazuya, Kazuko Yamada, Toshikatsu Nakabayashi, Kazuta Nosaka: Enzymatic and Structural Characterization of an Archaeal Thiamin Phosphate Synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1844*, 803-809, 査読有, DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.02.017

Hiroyuki Konno, Hitoshi Endo, Satomi Ise, Keiki Miyazaki, Hideo Aoki, Akira Sanjoh, Kazuya Kobayashi, Yasunao Hattori, Kenichi Akaji: Synthesis and Evaluation of Crucumin Derivatives toward an Inhibitor of Beta-site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 685-690, 査読有, DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.11.039

〔学会発表〕(計 3件)

井尻 咲、松原弘樹、川崎友紀、宮城崇滉、出口綾香、小林数也、服部恭尚、赤路健一: ヒドロキシエチルアミン型 BACE1 阻害剤の活性立体配置の同定とプライムサイト構造活性相関研究. 日本薬学会第 135 年会, 2015.3.28. 兵庫医療大学(神戸)

川崎友紀、松原弘樹、井尻 咲、宮城崇滉、出口綾香、小林数也、服部恭尚、赤路健一: ヒドロキシエチルアミン型 BACE1 阻害剤の立体選択的合成によるプライムサイト構造活

性相関研究. 日本薬学会第 134 年会, 2014.3.28. 熊本大学黒髪キャンパス(熊本)

松原弘樹、井尻 咲、川崎友紀、宮城崇滉、出口綾香、小林数也、服部恭尚、赤路健一: ヒドロキシエチルアミン型 BACE1 阻害剤の立体選択的合成と活性評価. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2013.10.12. 同志社女子大学 京田辺キャンパス(京都)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 数也 (KOBAYASHI, Kazuya)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 8 0 6 4 7 8 6 8

(2) 連携研究者

赤路 健一 (AKAJI, Kenichi)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 6 0 1 4 2 2 9 6

服部 恭尚 (HATTORI, Yasunao)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 2 0 5 6 7 0 2 8

(3) 研究協力者

出口 綾香 (DEGUCHI, Ayaka)
京都薬科大学・薬学部・研究生