

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790118

研究課題名（和文） アミロイドβペプチドの病態機構解明と凝集阻害剤の創製

研究課題名（英文） Research on pathological mechanism of amyloid beta peptide and application to the aggregation inhibitor

研究代表者 相馬 洋平 (Youhei Sohma)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任研究員

研究者番号：10565518

研究成果の概要（和文）：E22Δ型Aβやピログルタミン酸含有Aβ11-42における*O*-アシルイソペプチドを合成することにより、水溶性を顕著に改善し、凝集や毒性に関わる種々の性質について明らかにすることができた。また、*O*-アシルイソペプチドおよびGly²⁵-Ser²⁶配列を修飾したいくつかのペプチド誘導体が、Aβの凝集に対する阻害活性を有することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Studies with the *O*-acyl isopeptides of Aβ mutants and pyroGlu-Aβ enabled us to identify new functions of amyloid beta peptides. In addition, the *O*-acyl isopeptide of Aβ1-42 with an ester bond at the Gly²⁵-Ser²⁶ moiety had a capability of inhibiting fibril formation of Aβ1-42 at equimolar ratio.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：アミロイド、アルツハイマー病、イソペプチド、ペプチド、凝集、阻害剤

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は、我が国における認知症の半数以上を占める難治性疾患であり、その発症にはアミロイドβペプチド（Aβ）が深く関わっていると推察されているものの、治療薬開発に繋がる病態機構の解明は暗中模索状態で、病状の進行を止める治療薬は存在しないのが現状である。Aβは水溶性が極端に低くしかも高頻度に自己会合・凝集化するために研究上取り扱いが大変難しく、そのためAβの分子形態と毒性との関連を解析し病因を特定することが困難である。

2. 研究の目的

アルツハイマー病原因ペプチドであるアミロイドβペプチド（Aβ）は水溶性が低く凝集性が高いため研究上取り扱いが難しい。本研究ではAβの会合化・凝集化過程をランダム構造の単量体状態から再現できる化学基盤ツールを利用してアルツハイマー病発症の分子機構解明に貢献する。さらに、病原性Aβ分子種の形成を阻害するペプチド性化合物をデザイン・合成・活性評価することにより、アルツハイマー病治療薬としての候補化合物探索を行う。

3. 研究の方法

本研究では「クリックペプチド」という化学基盤ツールを利用することで、A β の凝集機構に新規な知見を提供するとともに、A β の凝集発現を抑えることのできる新規化合物を創製する。クリックペプチドとは、A β のO-アシルイソペプチド（25位グリシンが26位セリン側鎖の β -ヒドロキシル基にアシル化された構造）を合成し、これをpH変換などにより *in situ* でA β へと変換（クリック）する手法である。本A β クリックペプチドは、水溶性・非凝集性のプレカーサー分子であり望むタイミングで単量体のA β を産生可能であるため、A β の病的な凝集過程を、自然界と同様に単量体状態から再現できる可能性がある。

本研究においては、①A β クリックペプチドを利用し、A β の病的な凝集過程を再現した実験システムを確立し、毒性発現機構解明に貢献する。蛍光ラベル標識化した誘導体を作成し細胞実験に供することで、A β の局在についても調べる。これらを総合してA β の細胞毒性機構を精査する。②毒性型A β の形成に対して阻害活性を有するペプチド性化合物を獲得する。分子レベルでの作用機序解明・構造-活性相関などを進め、高活性阻害剤の創出を目指した。

4. 研究成果

(1) 今回、A β 1-40(E22 Δ)およびA β 1-42(E22 Δ)におけるO-アシルイソペプチドをFmoc型ペプチド固相合成法により合成した。得られたO-アシルイソペプチドはネイティブのA β 1-40(E22 Δ)、A β 1-42(E22 Δ)と比べそれぞれ高い水溶性を示した。また、円二色性スペクトル(CD)による二次構造評価より、O-アシルイソペプチドは酸性溶液中、ランダムコイル構造を維持することが示唆された。これは、イソペプチド部分での主鎖N-Hに起因する水素結合が存在せず、その結果、凝集の元凶なる β -シート形成が抑制されたためと考えられる。一方、O-アシルイソペプチドは生理的pH条件下、O-to-N分子内アシル転位を経て、半減期約10秒でA β 1-40(E22 Δ)およびA β 1-42(E22 Δ)へそれぞれ変換された。

A β 1-40(E22 Δ)およびA β 1-42(E22 Δ)のO-アシルイソペプチド(0.1%TFA水溶液)をpH7.4のリン酸緩衝液で希釈し、得られた中性溶液を37°Cでインキュベート後、経時的に各種測定に供した。A β 1-40(E22 Δ)はインキュベート数分後(O-to-N転位直後)のCDスペクトル解析において β -シート構造がpredominantに観察された。Western blotの結果と照らし合わせ、A β 1-40(E22 Δ)はモノマーあるいは低分子量オリゴマー状態において素早くランダムコイルから β -シート構造へ

と変換し、その後徐々にオリゴマー化することが示唆された。同様の実験から、野生型A β 1-40の場合はランダムコイル状態を維持しながらオリゴマー化することが示され、両者の会合中の二次構造変換には顕著な差が観察された。一方、チオフラビンT蛍光アッセイによる評価では、蛍光強度(アミロイド線維量に相関)に差は見られなかった。また、神経成長因子(NGF)により分化したPC12細胞に対する毒性の評価では、両者ともに有意な細胞毒性は認められなかった。

A β 1-42(E22 Δ)においても野生型A β 1-42と比べ、インキュベート後のすみやかな β -シート形成が観察された。さらに、Western blot解析においてもA β 1-42(E22 Δ)と野生型A β 1-42の間に顕著な違いが観察された。野生型A β 1-42の場合は経時的にオリゴマー由来のバンドが増加したのに対し、A β 1-42(E22 Δ)においてはインキュベート直後からオリゴマーのバンドが観察された。また本バンドのサイズ(kDa)にも差が見られた。チオフラビンT蛍光アッセイにおいてはA β 1-42(E22 Δ)は野生型A β 1-42と同程度または若干低い蛍光強度を示した。また、A β 1-42(E22 Δ)は野生型A β 1-42と比べNGF-PC12細胞に対して顕著に低い細胞毒性を示した。これはA β 1-42(E22 Δ)が野生型とは異なる機構でシナプス毒性を発現している可能性を支持している。

(2) Islet amyloid polypeptide (IAPP、別名アミリン)は、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞からインスリンと共に放出される37残基のペプチドホルモンである。IAPPは高い凝集性を持ち、II型糖尿病患者などの膵島においてアミロイド沈着を形成する。その凝集過程で形成されるオリゴマーやアミロイド線維は β 細胞に対して毒性を持ち、II型糖尿病の進行段階における β 細胞の機能不全や壊死に関与すると考えられている。またIAPPを用いた生物学的・物理化学的実験においては、その高い自己会合性のためにペプチドの保存中・操作中にさえも凝集が起り実験に悪影響を及ぼすため、均一なモノマー状態のIAPPを調製することは難しいと考えられる。そこで、クリックペプチド戦略をIAPPに対して応用した。すなわち、IAPPの8位アラニン-9位スレオニンおよび19位セリン-20位セリンにおいてエステル構造を導入したO-アシルイソペプチドを、2段階のセグメント縮合法により合成した。まずSer¹⁹-Ser²⁰間にイソペプチド構造を有する[Gln¹⁰-Ser²⁰]を、塩基存在下、ウロニウム型縮合剤であるHATUにより[Asn²¹-Tyr³⁷]-樹脂と反応させた。さらにAla⁸-Thr⁹にイソペプチド構造、Cys²-Cys⁷にジスルフィド結合を有する[Lys¹-Thr⁹]を反応させた後、TFAによる脱樹脂・脱保護を経てIAPPのO-アシルイソペプチドを得た。

次に、合成したイソペプチドについて、CD スペクトル測定による二次構造評価およびチオフラビン T アッセイによるアミロイド線維形成能評価を行った。イソペプチドは、酸性条件下において特定の二次構造を示さず、チオフラビン T の蛍光強度は上昇しなかった。一方 IAPP においては、同条件下、二次構造形成およびチオフラビン T 蛍光強度の上昇が観察された。このことから、本イソペプチドはネイティブの IAPP と比べてアミロイド線維形成能や二次構造形成能が低いことが示された。さらに、中性条件下、本イソペプチドは *O*-to-*N* 分子内アシル基転位反応によりほぼ定量的に IAPP に変換された。*In Situ*にて産生した IAPP は、ランダムコイル構造から α -ヘリックス/ β -シートへと経時的に変化し、アミロイド線維量の増加が観察された。

(3) 蛋白質合成化学においては、ケミカルライゲーション法(化学選択的な反応により無保護のペプチド鎖同士を縮合する方法)によりポリペプチド鎖を構築する手法が頻繁に用いられるが、膜蛋白質など、極端に疎水性の高い蛋白質由来のポリペプチドにおいてはライゲーション後の HPLC 精製が極めて厄介である。すなわち、この手のポリペプチドは極性溶媒に対する溶解性が極端に低く、また逆相カラム固定相との相互作用が過剰に強固なため、HPLC 精製によって純度の高いポリペプチドを得ることが極めて困難となる。

膜貫通領域ペプチドをモデル配列として、DMF 中、塩基存在下、ペプチドチオエステルと Cys-ペプチドとの間でネイティブケミカルライゲーションを行った。結果、*O*-to-*N*アシル基転位反応を伴うことなく *O*-アシルイソペプチド構造を維持したまま、効率良くペプチド鎖同士を縮合することが可能であった。逆相 HPLC による精製について検討したところ、ライゲーション後の *O*-アシルイソペプチドは、ODS (octadecylsilyl) カラムからの回収率が顕著に優れていた。*O*-アシルイソペプチドを利用した本合成戦略はアミロイド蛋白質などの疎水性蛋白質における効率的合成に貢献するものと期待される。

(4) *O*-アシルイソペプチド法を基盤とし、*N* 末端に 蛍光基である FAM および Biotin-linker を結合した $A\beta$ イソペプチドを合成した。FAM- $A\beta$ および Biotin- $A\beta$ は、wt- $A\beta$ と同程度の細胞毒性を示した。また、FAM- $A\beta$ が細胞に局在する様子を観察した。一方、Biotin- $A\beta$ が、 $A\beta$ と相互作用するタンパク質を同定するにあたり有用なツールとなりうる事が示唆された。

(5) 極端に水溶性の低いピログルタミン酸含有 $A\beta_{11-42}$ において、*O*-アシルイソペプチドを利用することにより、水溶性を実験可能な水準にまで押し上げることで、種々の

生化学的実験を行うことができた。例えば、チオフラビン T 蛍光アッセイによるアミロイド線維量評価では、pyroGlu- $A\beta_{11-42}$ の蛍光強度は $A\beta_{1-42}$ より低く、pyroGlu- $A\beta_{11-42}$ が形成する繊維は $A\beta_{1-42}$ よりも微細であることが示唆された。原子間力顕微鏡の結果からも同様の結論が支持された。また、pyroGlu- $A\beta_{11-42}$ の毒性は $A\beta_{1-42}$ と比べやや低い傾向であった。尚、 $A\beta_{11-42}$ との比較から、*N* 末端のピログルタミン酸は毒性の発現に必須ではないことが明らかとなった。これら一連の結果は、 $A\beta$ の凝集機構解明に有用な知見を与えるものと期待される。

(6) $A\beta$ の Gly²⁵-Ser²⁶ 配列をコアとした一連のペプチド誘導体を、ペプチド固相合成法により調製し、得られたペプチドを *O*-アシルイソペプチドを利用した原子間力顕微鏡に供した。*O*-アシルイソペプチド自身が凝集性を持たないことから、Gly²⁵-Ser²⁶ 間のアミド結合が $A\beta$ の凝集において重要な役割を果たしていると仮定し、Gly²⁵-Ser²⁶ 領域を修飾した $A\beta$ の新規凝集調整分子に焦点を当て構造-活性相関を行った。結果、長鎖ペプチド性分子ではあるものの、 $A\beta$ の繊維形成を有意に阻害することのできる分子を発見した。

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 11 件)

- ① Taku Yoshiya, Hiroyuki Kawashima, Yuka Hasegawa, Kazuhiro Okamoto, Tooru Kimura, Youhei Sohma, Yoshiaki Kiso: Epimerization-free synthesis of cyclic peptide by use of the *O*-acyl isopeptide method. *J. Peptide Sci.*, 16, 437-442 (2010). 査読あり DOI 10.1002/psc.1261
- ② Taku Yoshiya, Yuka Hasegawa, Wakana Kawamura, Hiroyuki Kawashima, Youhei Sohma, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso: *S*-Acyl isopeptide method: use of allyl-type protective group for improved preparation of thioester-containing *S*-acyl isopeptides by Fmoc-based SPPS. *Biopolymers*, 96, 228-239 (2011). 査読あり DOI 10.1002/bip.21410
- ③ Hironobu Hojo, Hidekazu Katayama, Chiharu Tano, Yuko Nakahara, Azusa Yoneshige, Junko Matsuda, Youhei Sohma, Yoshiaki Kiso, Yoshiaki Nakahara: Synthesis of the sphingolipid activator protein, saposin C, using an azido-protected *O*-acyl isopeptide as an aggregation-disrupting element.

- Tetrahedron Lett.* 52, 635-639 (2011)
査読あり
DOI:10.1016/j.tetlet.2010.11.154
- ④ Youhei Sohma, Yuta Hirayama, Atsuhiko Taniguchi, Hidehito Mukai, Yoshiaki Kiso: ‘Click peptide’ using production of monomer A β from the *O*-acyl isopeptide: Application to assay system of aggregation inhibitors and cellular cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 1729-1733 (2011). 査読あり
DOI:10.1016/j.bmc.2011.01.021
- ⑤ Taku Yoshiya, Ayano Higa, Naoko Abe, Fukue Fukao, Tomomi Kuruma, Yuki Toda, Youhei Sohma, Yoshiaki Kiso: “Click peptide” concept: *O*-acyl isopeptide of islet amyloid polypeptide as a non-aggregative precursor molecule, *ChemBioChem*, 12, 1216-1222 (2011). 査読あり
DOI: 10.1002/cbic.201100025
- ⑥ Youhei Sohma, Hui Wang, Atsuhiko Taniguchi, Yuta Hirayama, Taeko Kakizawa, Moe Yamasaki, Hidehito Mukai, Yoshiaki Kiso: Self-assembly pathways of E22delta-type amyloid β peptide mutants generated from non-aggregative *O*-acyl isopeptide precursors, *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 3787-3792 (2011). 査読あり
DOI: 10.1016/j.bmc.2011.04.056
- ⑦ Harichandra D. Tagad, Yoshio Hamada, Jeffrey-Tri Nguyen, Koushi Hidaka, Takashi Hamada, Youhei Sohma, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso: Structure-guided design and synthesis of P₁' position 1-phenylcycloalkylamine-derived pentapeptidic BACE1 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 5238-5246 (2011). 査読あり
DOI: 10.1016/j.bmc.2011.07.002
- ⑧ Youhei Sohma, Hitomi Kitamura, Hiroyuki Kawashima, Hironobu Hojo, Masayuki Yamashita, Kenichi Akaji, Yoshiaki Kiso: Synthesis of an *O*-acyl isopeptide by using native chemical ligation to efficiently construct a hydrophobic polypeptide, *Tetrahedron Lett.* 52, 7146-7148 (2011). 査読あり
DOI: 10.1016/j.tetlet.2011.10.116
- ⑨ Stephen Kent, Youhei Sohma, Suhuai Liu, Duhee Bang, Brad Pentelute and Kalyaneswar Mandal: Through the looking glass - a new world of proteins enabled by chemical synthesis, *J. Peptide Science*, 18, 428-436 (2012). 査読あり
DOI: 10.1002/psc.2421
- ⑩ Youhei Sohma, Moe Yamasaki, Hiroyuki Kawashima, Atsuhiko Taniguchi, Masayuki Yamashita, Kenichi Akaji, Hidehito Mukai, Yoshiaki Kiso: Comparative properties of A β 1-42, A β 11-42, and [Pyr¹¹]A β 11-42 generated from *O*-acyl isopeptides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 1326-1329 (2013). 査読あり
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.082>
- ⑪ Youhei Sohma, Yoshiaki Kiso: Synthesis of *O*-acyl isopeptides, *Chem. Rec.* 13, 218-223 (2013). 査読あり
DOI: 10.1002/tcr.201200023

[学会発表] (計 8 件)

- ① 相馬洋平, Stephen B. H. Kent, 木曾良明、エルテルまたはチオエステルを含むペプチド合成法開発とその生物研究への応用、第 8 回次世代を担う有機化学シンポジウム (東京) 2010.5.13
- ② アミロイド β ペプチドおよびインスリンの機能解明を目指したエステル含有ペプチドの利用、相馬洋平、谷口敦彦、向井秀仁、Stephen B. H. Kent、木曾良明、日本ケミカルバイオロジー学会第 5 回年会 (横浜) 2010.5.18
- ③ Youhei Sohma, Atsuhiko Taniguchi, Yuta Hirayama, Hui Wang, Moe Yamazaki, Hidehito Mukai, Yoshiaki Kiso, Use of *O*-acyl isopeptides to identify new functions of amyloid beta peptides, 31st European Peptides Symposium, Copenhagen, Denmark, 2010.9.5
- ④ Youhei Sohma, Atsuhiko Taniguchi, Yuta Hirayama, Hui Wang, Moe Yamazaki, Hidehito Mukai, Yoshiaki Kiso, Use of *O*-acyl isopeptides to identify new functions of amyloid beta peptides, 5th International Peptide Symposium, Kyoto, 2010.12.4
- ⑤ Youhei Sohma, Use of ester-containing peptides for identifying the functions of human insulin and amyloid peptide, 大阪大学蛋白質研究所セミナー New Trend of Peptide Science in Asia and Oceania (大阪) 2010.12.10
- ⑥ 相馬洋平, Hui Wang, 山崎 萌, 平山雄太, 谷口敦彦, 川島浩之, 比嘉彩乃, 吉矢 拓, 向井秀仁, 木曾良明、アミロイドベータペプチドおよびアミリンの凝集機構解明を目指した *O*-アシルイソペプチドの利用、第 9 回次世代を担う有機化学シンポジウム (東京) 2011.5.12.
- ⑦ 相馬洋平、エステル含有ペプチドを基盤とした生物有機化学研究、第 46 回天然物

化学談話会（熱川）2011. 7. 8.

- ⑧ 相馬洋平、北村仁美、川島浩之、北條裕信、赤路健一、木曾良明、ネイティブケミカルライゲーション法を利用したD-アシルイソペプチドの合成、第61回日本薬学会近畿支部総会・大会（神戸）、2011. 10. 22.

〔図書〕（計2件）

- ① 相馬洋平、最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用、遺伝子医学MOOK21号、メディカルドゥ、2011
② 相馬洋平、ペプチド医薬の最前線、シーエムシー出版、2012

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

（1）研究代表者

相馬 洋平（Youhei Sohma）

東京大学・大学院薬学系研究科・特任研究員
研究者番号：10565518