

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 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32613

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790119

研究課題名（和文） 新規 BACE1 阻害剤の開発：低分子量化へのアプローチ

研究課題名（英文） Development of new BACE1 inhibitors: an approach for downsizing molecules

研究代表者

柿澤 多恵子 (KAKIZAWA TAEKO)

工学院大学・工学部・講師

研究者番号：60445963

研究成果の概要（和文）：アミロイβ ペプチドの産生に關与する酵素である BACE1 は、アルツハイマー病の治療のための薬剤開発のターゲットとなっている。本研究では、低分子量の BACE1 阻害剤の設計・合成を行い、比較的高活性な KMI-927 などの種々のテトラペプチド型の BACE1 型阻害剤を報告した。

研究成果の概要（英文）：The enzyme BACE1 is a major target for developing drugs for the treatment of Alzheimer's disease, because it catalyzes the production of amyloid β peptide. We designed and synthesized several low-molecular-weight tetrapeptidic BACE1 inhibitors with high potency from KMI-927.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病患者の脳では、アミロイド β ペプチド (Aβ) などから構成されるアミロイドプラークの沈着が認められており、アルツハイマー病発症の基盤と考えられている。従って、アルツハイマー病の予防・治療に向け、Aβ の産生に關与する酵素である BACE1 を阻害する薬剤を開発することは、大変重要であると考えられている。

研究費申請当時、研究代表者が所属した研究グループでは、アルツハイマー病の治療・

予防を目的とした BACE1 阻害剤の合成研究が盛んに行われていた。中でも、BACE1 の基質配列を基にデザインしたペプチド型阻害剤を数多く合成し、報告していた。構造活性相関の過程において、高活性化化合物も多数報告されていたが、そのほとんどのものは分子量が比較的大きく、薬剤としての実用化に向けた更なる分子サイズの低下が課題として挙げられていた。そこで本研究では、薬剤の低分子量化に着目し、実験を行った。

2. 研究の目的

本研究は、低分子量の BACE1 阻害剤の合成を目的としている。BACE1 は、A β の産生に関与する酵素であるため、BACE1 阻害剤を開発することは、アルツハイマー病治療に向けた重要な課題であると考えられる。申請当時、研究代表者の所属したグループでは、数々の BACE1 阻害剤を合成し、報告していた。これらはリコンビナント BACE1 に対して高い阻害活性を示すものの、分子サイズが大きいため、実用化に向けた更なる低分子量化が望まれていた。本研究では、こうした研究背景を考慮し、高活性で低分子量の BACE1 阻害剤の開発を目指し、薬剤合成を行った。

3. 研究の方法

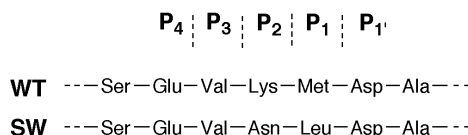
種々の BACE1 阻害剤を化学合成し、活性を評価した。化学合成に用いた試薬類、および活性評価に使用したリコンビナント BACE1 は、市販されているものをそのまま使用した。阻害剤のデザインは、研究代表者が所属した研究グループによって見出された構造活性相関研究、および申請者が新たに行ったスクリーニングのデータを参照した。阻害剤合成は、一般的な固相および液相によるペプチド合成法に基づいて行った。合成した阻害剤は、HPLC を用いて精製し、MS などを用いてキャラクタリゼーションを行った。合成した阻害剤は、リコンビナント BACE1 と合成基質を用いた競合アッセイを行い、活性を評価した。

4. 研究成果

アルツハイマー病の治療薬開発を目的とし、低分子量の BACE1 阻害剤の合成を行った。BACE1 は、A β の産生に関与する酵素であるため、BACE1 を阻害する薬剤を開発することは、重要であると考えられている。

研究費申請当時、研究代表者の所属したグループでは、スウェーデン型 (SW) の BACE1 の基質配列を基にデザインしたペプチド型 BACE1 阻害剤を数多く合成し、発表していた。BACE1 による切断部位近傍の基質の配列、およびこれまでに報告されていた阻害剤のうち、代表的な化合物である KMI-429 の構造を図 1 に示す。構造活性相関研究の結果、高活性な阻害剤も多く報告されていたものの、これらのペプチド型阻害剤は、主にアミノ酸 5~8 残基から構成されており、薬剤としては更なる低分子量化が課題であると言えた。

(a)



(b)

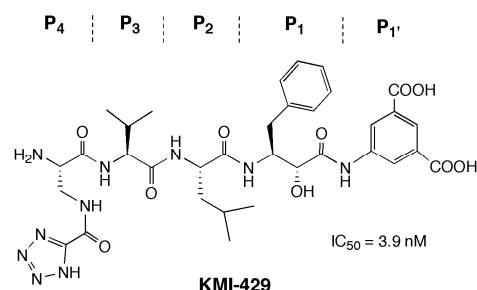


図 1. (a) BACE1 の基質配列 (wild-type (WT) とスウェーデン型 (SW)) および、(b) これまでに報告されていた代表的な BACE1 阻害剤である KMI-429 の構造。

本研究では、薬剤の実用化に向けた低分子量化に焦点を当て、研究を行った。その結果、P₄ から P₁ までのアミノ酸 4 残基から構成される様々なテトラペプチド型の BACE1 型阻害剤をデザインし、合成した。得られた化合物は、合成基質とリコンビナント BACE1 を用いた酵素アッセイにより活性を評価した。合成した阻害剤はリコンビナント BACE1 に対し、比較的高い阻害活性を見せた。また、阻害剤の P₄、P₂ および P₁ 部位の構造活性相関を行い、それぞれ活性を評価した。合成した一連の化合物のうち、KMI-927 (図 2) は、BACE1 に対して比較的高活性を示した。

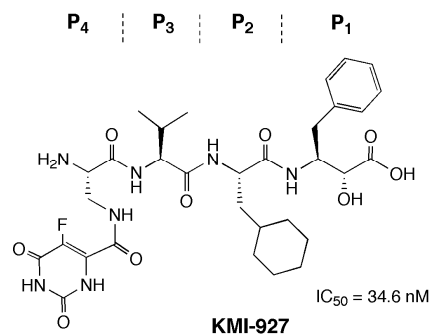


図 2. KMI-927 の構造。

また申請期間中に、BACE1 の基質配列を基にしたペプチドライブラリーを合成し、スクリーニングを行った。P₄ から P₁ までの各部位をそれぞれライブラリー化させ、BACE1 とのアッセイを行い、切断された基質の断片を LC-MS を用いて解析した。その結果、薬剤設計の際に参照することができそうなアミノ酸を数種類特定したため、今後の更なる創薬研究に役立つ予定である。

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 5 件)

① H-O. Kumada, J-T. Nguyen, K. T. Kakizawa, K. Hidaka, T. Kimura, Y. Hayashi, and Y. Kiso, 「Development of [Ile⁴⁰] HTLV-I protease inhibition assay using novel fluorogenic and chromogenic substrate」 *Journal of Peptide Science*, **17**, pp.569-575 (2011). 査読有り。

DOI: 10.1002/psc.1375

② Y. Sohma, H. Wang, A. Taniguchi, Y. Hirayama, T. Kakizawa, M. Yamasaki, H. Mukai, and Y. Kiso, 「Self-assembly pathways of E22Δ-type amyloid β peptide mutants generated from non-aggregative O-acyl isopeptide precursors」 *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **19**, pp.3787-3792 (2011). 査読有り。doi:10.1016/j.bmc.2011.04.056

③ T. Kakizawa, A. Sanjoh, A. Kobayashi, Y. Hattori, K. Teruya, and K. Akaji, 「Evaluation of superior BACE1 cleavage sequences containing unnatural amino acids」 *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **19**, pp.2785-2789 (2011). 査読有り。

doi:10.1016/j.bmc.2011.03.056

④ T. Kakizawa, Y. Kawano, K. Naganeyama, and M. Shimoi, 「Dehydrocoupling reactions of secondary and primary amine-borane adducts catalyzed by half-sandwich carbonyl complexes, [CpMn(CO)₃], [(η⁶-C₆H₆)Cr(CO)₃], and [CpV(CO)₄]」 *Chemistry Letters*, **40**, pp.171-173 (2011). 査読有り。

doi:10.1246/cl.2011.171

⑤ T. Kakizawa, K. Hidaka, D. Hamada, R. Yamaguchi, T. Uemura, H. Kitamura, H. D. Tagad, T. Hamada, Z. Ziora, Y. Hamada, T. Kimura, and Y. Kiso, 「Tetrapeptides, as small-sized peptidic inhibitors; synthesis and their inhibitory activity against BACE1」 *Journal of Peptide Science*, **16**, pp.257-262 (2010). 査読

有り。

DOI 10.1002/psc.1238

[学会発表] (計 5 件)

① Taeko Kakizawa・Koushi Hidaka・Daisuke Hamada・Ryoji Yamaguchi・Tsuayoshi Uemura・Hitomi Kitamura・Harichandra D. Tagad・Takeshi Hamada・Zyta Ziora・Yoshio Hamada・Tooru Kimura・Yoshiaki Kiso

「Design and Preparation of the Tetrapeptides as Low Molecular Sized BACE1 Inhibitors」

5th International Peptide Symposium (Kyoto, Japan) 2010 年 12 月 4 日~9 日

② Hui Wang・Youhei Sohma・Atsuhiko Taniguchi・Yuta Hirayama・Taeko Kakizawa・Hidehito Mukai・Yoshiaki Kiso

「Click Peptide: Application to E22 Δ -type Mutant of Amyloid β Peptide」

5th International Peptide Symposium (Kyoto, Japan) 2010 年 12 月 4 日~9 日

③ Taeko Kakizawa・Yasunao Hattori・Kenta Teruya・Akira Sanjoh・Kenichi Akaji

「Evaluation of substrate specificities for BACE1 using synthetic peptide libraries」

5th International Peptide Symposium (Kyoto, Japan) 2010 年 12 月 4 日~9 日

④ 柿澤 多恵子・服部 恭尚・照屋 健太・三城 明・赤路 健一

「LC-MS を用いたペプチドライブラリーからの BACE 1 基質特異性のスクリーニング」第 6 回 3 大学連携研究フォーラム (京都府立大学) 2010 年 12 月 7 日

⑤ 柿澤 多恵子・服部 恭尚・照屋 健太・三城 明・赤路 健一

「ペプチドライブラリーを用いた BACE 1 基質特異性の検討」

第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム (京都テルサ) 2010 年 11 月 17 日~19 日

[その他]

国際会議のプロシーディング等

① T. Kakizawa, K. Hidaka, D. Hamada, R. Yamaguchi, T. Uemura, H. Kitamura, H. D. Tagad, T. Hamada, Z. Ziora, Y. Hamada, T. Kimura, and Y. Kiso, Japanese Peptide Society,

「Design and Preparation of the Tetrapeptides as Low Molecular Sized BACE1 Inhibitors」 *Peptide Science 2010*, ed. N. Fujii and Y. Kiso, p. 252 (2011).

② H. Wang, Y. Sohma, A. Taniguchi, Y. Hirayama, T. Kakizawa, H. Mukai, and Y. Kiso, Japanese Peptide Society, 「Click Peptide: Application to E22 Δ -type Mutant of Amyloid β Peptide」 *Peptide Science 2010*, ed. N. Fujii and Y. Kiso, p.221 (2011).

③ T. Kakizawa, Y. Hattori, K. Teruya, A. Sanjoh, and K. Akaji, Japanese Peptide Society, 「Evaluation of substrate specificities for BACE1 using synthetic peptide libraries」 *Peptide Science* **2010**, ed. N. Fijii and Y. Kiso, p.121 (2011).

④ H. Wang, T. Kakizawa, A. Taniguchi, T. Mizuguchi, Y. Sohma, H. Mukai, T. Kimura, and Y. Kiso, Japanese Peptide Society, 「Investigation of A β 1-42 Mutants Based on *O*-Acyl Isopeptide Method; Synthesis of *O*-Acyl Isopeptides and *in Situ* Production of their Native Forms」 *Peptide Science* **2009**, ed. K. Okamoto, p.367-368 (2010).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿澤 多恵子 (KAKIZAWA TAEKO)

工学院大学・工学部・講師

研究者番号：60445963