

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790117

研究課題名(和文)非天然アミノ酸を組み込んだ持続性BACE1阻害剤の設計と合成

研究課題名(英文)Design and synthesis of long-acting BACE1 inhibitors incorporating unnatural amino acids

研究代表者

柿澤 多恵子(KAKIZAWA, Taeko)

早稲田大学・理工学術院・講師

研究者番号：60445963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：BACE1は、アルツハイマー病の治療や予防を目的とした創薬研究のターゲットとなっている酵素である。研究代表者は過去の研究で、BACE1の基質配列に基づいたペプチドライブラリのスクリーニングを行い、BACE1阻害剤設計に有効と思われる非天然のアミノ酸情報を得ている。本研究では、これらのアミノ酸情報を基に阻害剤合成を行い、酵素レベルでの活性評価を行った。また、新たに非天然アミノ酸を数種類選定し、基質配列のP4からP1'に相当する部分に対してスクリーニングを行い、今後の創薬研究に有用と思われるアミノ酸を特定した。

研究成果の概要(英文)：The aspartic protease beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) has been studied for its role in Alzheimer's disease (AD), and is known to be responsible for generating amyloid peptides (A β). As insoluble A β plaques are considered to be critical for the onset of AD, BACE1 has been an important target for the development of therapeutic agents against AD. In a previous study, the author performed a peptide library screen and identified several unnatural amino acids that enable superior substrate cleavage by BACE1. In this study, the author has synthesized several substrate-based BACE1 inhibitors comprising unnatural amino acids that were identified in the previous screen. The enzymatic assay proved that the inhibitors displayed moderate inhibitory activity against recombinant BACE1. In addition, a further peptide library screen was carried out in positions P4-P1' of the substrate and several unnatural amino acids were newly identified for future drug design.

研究分野：創薬科学分野

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)と言われる凝集性の高いペプチドなどが繊維状に固着したアミロイドプラークが見られ、これがアルツハイマー病発症の原因の一つであると考えられている。BACE1は、Aβの産生に關与する酵素であり、アルツハイマー病の治療や予防を目的とした創薬研究のターゲットとなっている。

研究代表者は、ペプチド合成に基づいた創薬研究を行ってきた。特に、これまでの研究で、BACE1の基質に相当するAβの部分配列を含んだペプチドライブラリの合成とスクリーニングを行い、BACE1阻害剤設計に有効と思われる非天然のアミノ酸情報を得ている(引用文献)。この研究では、体内に存在するプロテアーゼ等の様々な酵素類への耐性などを将来的に考慮する目的で、ライブラリ調整に非天然のアミノ酸を採用するなどの工夫を行っている。スクリーニングは、基質配列のP₄からP₁'に相当する部分に対して行っており、これらの実験結果は今後の創薬研究に有用な情報であると思われる。

2. 研究の目的

(1) アミノ酸スクリーニングの結果を利用した薬剤の合成

本研究では、これまでのスクリーニングで得られたアミノ酸の情報(引用文献)を基にBACE1阻害剤を合成し、阻害活性の評価を行う。

(2) BACE1アッセイ系の調整と薬剤設計の

為のスクリーニング: 引用文献で特定した基質配列を基に、更なるスクリーニングを行ってBACE1阻害剤設計に有効と思われるアミノ酸情報を得る。スクリーニングを行うため、基質となるライブラリペプチドの合成および、リコンビナントBACE1によるスクリーニングのためのアッセイ系の調整を行い、これらを利用して実験を行う。得られた情報は、将来の薬剤設計に役立てる。

3. 研究の方法

(1) アミノ酸スクリーニングの結果を利用した薬剤の合成

研究代表者は、引用文献のアミノ酸情報を基に、BACE1阻害剤を数種類合成した。合成は一般的なペプチドの固相合成法によって行い、合成した薬剤はHPLCによって精製した。生成物のキャラクタリゼーションはESI-MSによって行った。合成した化合物の活性評価は、リコンビナントBACE1に対し引用文献と同様の評価系により行った。

(2) BACE1アッセイ系の調整と薬剤設計の

為のスクリーニング: 阻害剤設計に有用なアミノ酸を更に選定するため、研究代表者はBACE1アッセイ系の調整およびペプチドラ

イブラリを用いたスクリーニングを行った。まず、参考文献で得られた配列を基にしたアミノ酸10残基で構成されるペプチドSer-Glu-Ile-Thi-Thi Nle-Ala-Glu-Phe-Argを基本シーケンスとし、非天然アミノ酸を今回新たに数種類選定してP₄からP₁'に相当する部位をそれぞれライブラリ化させた。すなわち、P₄ライブラリの場合、配列はSer-Xaa-Ile-Thi-Thi Nle-Ala-Glu-Phe-Arg(Xaaは今回選定した非天然アミノ酸)のように設定した。ライブラリの合成は、一般的な固相合成法で行った。ライブラリの酵素アッセイは、引用文献およびのアッセイ系を基本とし、使用するライブラリごとにリコンビナントBACE1の濃度を調整するなどの改良を加えて行った。すなわち、ペプチドライブラリとBACE1をMESバッファー(pH 5.0)中、37℃でインキュベートし、HPLCの測定とMALDI-TOF-MSによって切断されたペプチドを同定した。

4. 研究成果

(1) アミノ酸スクリーニングの結果を利用した薬剤の合成

: 今回合成した薬剤の合成の一例を図1に示す。阻害剤に使用したアミノ酸情報は引用文献に従い、阻害剤のP₁部位にはFmoc-(3S, 4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid(Fmoc-Sta-OH)などの、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤合成全般に広く用いられている一般的なアミノ酸の複数種類を選定し、合成に用いた。

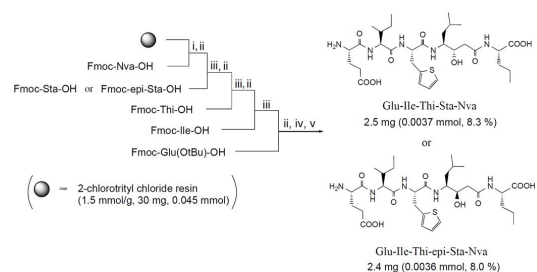


図1. 固相合成法によるBACE1阻害剤の合成 (Reagents / conditions; i, DIPEA in DMF, 3 h; ii, 20% piperidine / DMF, 20 min; iii, DPCDI, HOBt, DIPEA in DMF, 2 h; iv, TFA, thioanisole, *m*-cresol, H₂O (92.5, 2.5, 2.5, 2.5), 2 h; v, preparative HPLC)。

合成した阻害剤をリコンビナントBACE1によるアッセイ系(引用文献)で評価したところ、今回合成した阻害剤のIC₅₀はおおよそ数μM~数百μMの範囲にあり、中程度の活性を示すことが分かった。

(2) BACE1アッセイ系の調整と薬剤設計の

為のスクリーニング: 薬剤の設計に有用なアミノ酸情報を得るため、研究代表者は

BACE1 アッセイ系の調整およびライブラリ化させた合成ペプチドを用いたスクリーニングを行った。BACE1 とペプチドライブラリをインキュベートし、HPLC と マススペクトルによって切断されたペプチドの同定を行った。切断されたペプチドの N 末端側のフラグメントを同定することにより、BACE1 の活性部位に、より適合しやすいシーケンスを特定することができる。例として図 2 に P₂ ライブラリを用いた際の、インキュベーション 0 時間および 1 時間後の HPLC の結果を示す。1 時間後の測定では、BACE1 により切断されて生じたライブラリペプチドの N 末端側のフラグメント Ser-Glu-Ile-Xaa-Thi が数種類観測され、これらを同定した。

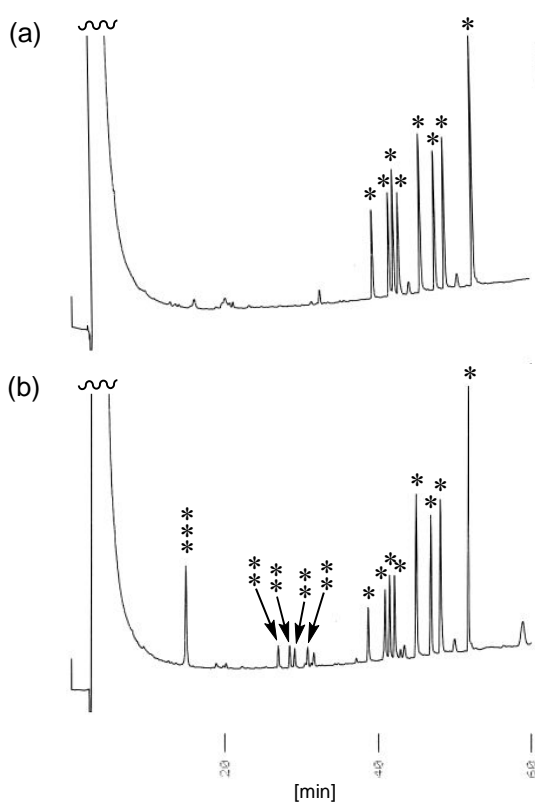


図 2 .P₂ ライブラリを用いたスクリーニング。インキュベート (a) 0 時間、および (b) 1 時間後の HPLC による測定結果 (図の * は P₂ のライブラリペプチド Ser-Glu-Ile-Xaa-Thi, Nle-Ala-Glu-Phe-Arg, ** は切断された N 末端のフラグメント Ser-Glu-Ile-Xaa-Thi, *** は C 末端側のフラグメント Nle-Ala-Glu-Phe-Arg)。

このようなアッセイを P₄ から P₁ まで行い、それぞれの部位でのアミノ酸情報を得ることができた。得られた情報を将来の阻害剤の合成に役立てる予定である。

また今後の課題として、今回合成した阻害剤の生体内等での実用性の評価、および今回

新たに特定したアミノ酸を用いた阻害剤の合成と評価などが挙げられる。

<引用文献>

T. Kakizawa, A. Sanjoh, A. Kobayashi, Y. Hattori, K. Teruya, and K. Akaji, Evaluation of superior BACE1 cleavage sequences containing unnatural amino acids, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, pp.2785-2789 (2011).

H. Konno, H. Endo, S. Ise, K. Miyazaki, H. Aoki, A. Sanjoh, K. Kobayashi, Y. Hattori, K. Akaji, Synthesis and evaluation of curcumin derivatives toward an inhibitor of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, pp.685-690 (2014).

T. Kakizawa, K. Hidaka, D. Hamada, R. Yamaguchi, T. Uemura, H. Kitamura, H. Tagar, T. Hamada, Z. Ziora, Y. Hamada, T. Kimura, and Y. Kiso, Tetrapeptides, as small-sized peptidic inhibitors; synthesis and their inhibitory activity against BACE1, *J. Pept. Sci.*, **16**, pp.257-262 (2010).

D. Shuto, S. Kasai, T. Kimura, P. Liu, K. Hidaka, T. Hamada, S. Shibakawa, Y. Hayashi, C. Hattori, B. Szabo, S. Ishiura, Y. Kiso, KMI-008, a novel β -secretase inhibitor containing a hydroxymethylcarbonyl isostere as a transition-state mimic: design and synthesis of substrate-based octapeptides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, pp.4273-4276 (2003).

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 3 件)

T. Kakizawa, H. Hashimoto, and H. Tobita, Linking of phosphinidene-capped triruthenium carbonyl clusters with diphosphine ligands, *Inorg. Chim. Acta*, **425**, pp.7-10 (2015). 査読有。
doi.org/10.1016/j.ica.2014.09.003

D. Ogasawara, Y. Itoh, H. Tsumoto, T. Kakizawa, K. Mino, K. Fukuhara, H. Nakagawa, M. Hasegawa, R. Sasaki, T. Mizukami, N. Miyata, and T. Suzuki, Lysine-specific demethylase 1-selective inactivators: protein-targeted drug delivery mechanism, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, pp.8620-8624 (2013). 査読有。
DOI: 10.1002/anie.201303999

T. Kakizawa, Octacarbonyldi- μ_2 -hydro [μ_3 -[(1,3,5-trimethylphenyl)phosphinidene]] (triphenylphosphane)-*triangulo*-triruthenium, *Acta Cryst.*, **E68**, m1293 (2012). 査読有。
doi:10.1107/S1600536812039499

〔学会発表〕(計 8 件)

柿澤 多恵子、太田 庸介、伊藤 幸裕、鈴木 孝禎、Structure-activity relationship studies of the peptidic inactivators of histone demethylase LSD1、第 51 回ペプチド討論会、2014 年 10 月 22 日-24 日(徳島)。

柿澤 多恵子、太田 庸介、伊藤 幸裕、鈴木 孝禎、Truncation studies of histone H3 peptide analogs as lysine-specific demethylase 1 inactivators、第 51 回ペプチド討論会、2014 年 10 月 22 日-24 日(徳島)。

荒井 卓也、大野 彰子、柿澤 多恵子、栗原 正明、宮田 直樹、中川 秀彦、福原 潔、 $A\beta_{1-42}$ および $A\beta_{1-43}$ の C 末端モチーフを有するアルツハイマー病治療薬の開発、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27 日-30 日(熊本)。

Taeko Kakizawa, Daisuke Ogasawara, Yukihiko Itoh, Hiroki Tsumoto, Koshiki Mino, Kiyoshi Fukuhara, Takaki Koide, Hidehiko Nakagawa, Makoto Hasegawa, Ryuzo Sasaki, Tamio Mizukami, Naoki Miyata, Takayoshi Suzuki, Peptidic Inactivator for Histone Demethylase LSD1, APIPS (4th Asia-Pacific International Peptide symposium, 50th Japanese Peptide Symposium), 2013 年 11 月 2 日-4 日(Osaka, Japan).

荒井 卓也、大野 彰子、柿澤 多恵子、小澤 俊彦、宮田 直樹、栗原 正明、中川 秀彦、福原 潔、抗酸化作用を有する新規アルツハイマー病治療薬の開発、第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会、2013 年 6 月 13 日-14 日(名古屋)。

荒井 卓也、大野 彰子、柿澤 多恵子、中川 秀彦、小津 俊彦、栗原 正明、福原 潔、宮田 直樹、AD 治療薬の開発を指向した $A\beta_{1-40}$ および $A\beta_{1-42}$ の C 末端モチーフを有するビタミン E 誘導体、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日-30 日(横浜)。

Taeko Kakizawa, Akane Kobayashi, Hiroyuki Konno, Akira Sanjoh, Kenichi Akaji, A specific substrate for BACE1 determined by peptide library screening, ISAT-Special (The 11th International Symposium on Advanced Technology), 2012 年 10 月 30 日(Tokyo, Japan).

Taeko Kakizawa, Hisako Hashimoto, Hiromi Tobita, Phosphinidene-capped ruthenium carbonyl clusters; syntheses, reactivities, and structure expansion reactions, ISAT-Special (The 11th International Symposium on Advanced Technology), 2012 年 10 月 30 日(Tokyo, Japan).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿澤 多恵子 (KAKIZAWA, Taeko)

早稲田大学・理工学術院・講師

研究者番号：60445963