

O-アシルイソペプチドの特性を利用した
疎水性ペプチドの合成法開発とその応用

2014 年

川島 浩之

論文目録

本論文は次の報文を基礎とするものである。

1. 学位論文の基礎となる報文の著者名, 題目, 印刷・公表の方法, その時期および該当する章・節

1. Hiroyuki Kawashima, Tomomi Kuruma, Masayuki Yamashita, Youhei Sohma, and Kenichi Akaji: Synthesis of an *O*-acyl isopeptide by using native chemical ligation in an aqueous solvent system. *J. Pept. Sci.* in press. [第二章・第一節・第二項]
2. Hiroyuki Kawashima, Youhei Sohma, Tomoya Nakanishi, Hitomi Kitamura, Hidehito Mukai, Masayuki Yamashita, Kenichi Akaji, and Yoshiaki Kiso: A new class of aggregation inhibitor of amyloid- β peptide based on an *O*-acyl isopeptide. *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 6323–6327 (2013). [第三章]
3. Youhei Sohma, Moe Yamasaki, Hiroyuki Kawashima, Atsuhiko Taniguchi, Masayuki Yamashita, Kenichi Akaji, Hidehito Mukai, and 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). [第二章・第二節]
4. Youhei Sohma, Hitomi Kitamura, Hiroyuki Kawashima, Hironobu Hojo, Masayuki Yamashita, Kenichi Akaji, and 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). [第二章・第一節・第一項]
5. Taku Yoshiya*, Hiroyuki Kawashima*, Yuka Hasegawa, Kazuhiro Okamoto, Tooru Kimura, Youhei Sohma, and Yoshiaki Kiso: Epimerization-free synthesis of cyclic peptide by use of the *O*-acyl isopeptide method. *J. Pept. Sci.*, **16**, 437–442 (2010). *equal contribution. [第一章]

2. 参考論文の著者名, 題目, 印刷・公表の方法およびその時期

1. Emi Adachi, Hiroyuki Nakajima, Chiharu Mizuguchi, Padmaja Dhanasekaran, Hiroyuki Kawashima, Kohjiro Nagao, Kenichi Akaji, Sissel Lund-Katz, Michael C. Phillips, and Hiroyuki Saito: Dual role of an N-terminal amyloidogenic mutation in apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.*, **288**, 2848–2856 (2013).
2. Taku Yoshiya, Yuka Hasegawa, Wakana Kawamura, Hiroyuki Kawashima, Youhei Sohma, Tooru Kimura, and 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 (Pept. Sci.)*, **96**, 228–239 (2011).
3. Taku Yoshiya, Hiroyuki Kawashima, Youhei Sohma, Tooru Kimura, and Yoshiaki Kiso: *O*-Acyl isopeptide method: efficient synthesis of isopeptide segment and application to racemization-free segment condensation. *Org. Biomol. Chem.*, **7**, 2894–2904 (2009).

論文要旨

氏名 (英字名) : 川島浩之 (Hiroyuki Kawashima)

学位論文題目 : *O*-アシルイソペプチドの特性を利用した疎水性ペプチドの合成法開発とその応用

O-アシルイソペプチドは、ペプチド鎖中の Ser または Thr の側鎖水酸基において、ネイティブのアミド結合 (*N*-アシル型) をエステル結合 (*O*-アシル型) へと異性化させたものである。*O*-アシルイソペプチドは、本エステル部分において主鎖 N-H に起因する水素結合供与能をもたず、分子全体の二次構造に影響を与える。また、*O*-アシルイソペプチドは、対応する親ペプチドと比較して、イオン化し得るアミノ基を 1 つ多くもつため一般的に水溶性が向上する。一方、中性条件下においては *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応を経て、親ペプチドへと迅速かつ定量的に変換される。本研究では、*O*-アシルイソペプチドのもつこれらの特性を利用して、新規ペプチド合成法及びアミロイド β (A β) 凝集阻害剤の開発研究を行った。

1. エピメリ化を伴わない環状ペプチド合成への応用

環状ペプチドは創薬シードとして重要であるが、鎖状ペプチドを環化反応に供した際、ペプチド C 末端の活性化で生じるオキサゾロン環に由来するエピメリ化が問題となる (図 1A)。著者は、鎖状保護ペプチドの C 末端を *O*-アシルイソペプチドとし、C 末端アミノ酸残基の α -アミノ基にウレタン型保護基を導入する事により、エピメリ化を起こす事なく環化反応を達成できるのではと考えた (図 1B)。6 残基からなる環状ペプチド cyclo(Arg-Ala-Gly-Asn-Ala-Ser) の合成において、従来の手法を用いた場合は 39% のエピメリ化が確認されたが、*O*-アシルイソペプチド法を使用した場合はエピメリ化に由来する副生成物は検出されなかった。得られた環状 *O*-アシルイソペプチドは、中性のリン酸緩衝液中において、*O*-to-*N* 分子内アシル転位反応を経て、1 分以内に目的の環状ペプチドへと定量的に変換された。

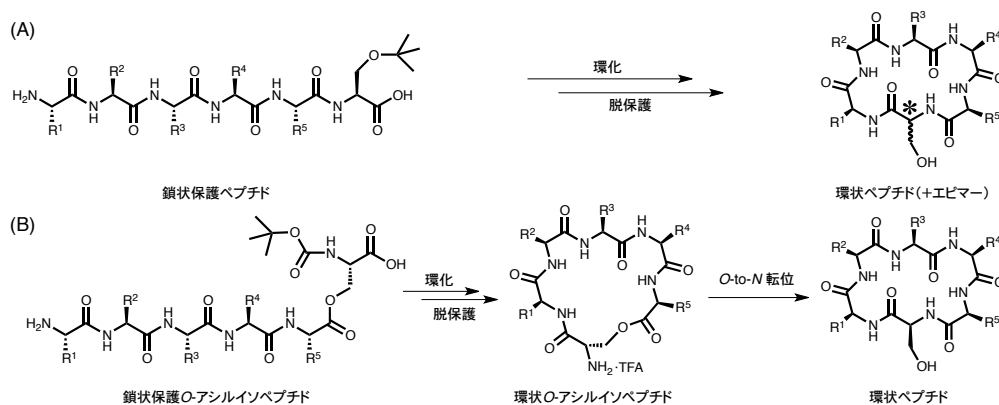


図 1. 環状ペプチドの合成.(A) 通常的手法.(B) *O*-アシルイソペプチド法.

2. *O*-アシルイソペプチドを利用した疎水性ペプチドの効率的合成

Native Chemical Ligation (NCL) は C 末端にチオエステルを有するペプチドと N 末端に Cys を有するペプチドとを側鎖無保護で縮合させる収斂的合成手法の一つとして広く利用されている。しかし、疎水性の高い膜タンパク質やアミロイドタンパク質の合成では、NCL 後の HPLC 精製時において、目的ペプチドの低い溶解性や逆相カラム固定相との強い疎水性相互作用のため、目的物を高い収率で得る事が困難である。そこで、これらの難点の解決を目指し、*NpHtrII* (古細菌 *Natronomonas pharaonis* 関

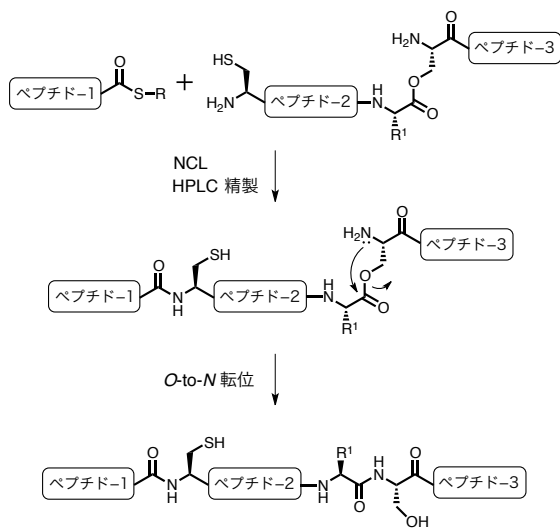


図 2. NCL による *O*-アシルイソペプチドの合成を鍵とする疎水性ポリペプチドの効率的合成法.

3. アミロイド β 凝集阻害剤開発への応用

単量体 $A\beta$ がオリゴマーを経て不溶性のアミロイド繊維へと凝集する過程がアルツハイマー病の発症に重要な役割を果たしていると考えられているため、 $A\beta$ の凝集阻害剤は本疾患の治療薬となる可能性がある。今回著者は、*O*-アシルイソペプチドがネイティブ $A\beta$ 1-42 の凝集に対して阻害活性を有することを見出した (図 3A 左)。しかしながら、*O*-アシルイソペプチドは中性条件下にてネイティブ $A\beta$ へと変換される。そこで、Ser²⁶ を *N*-Me- β -Ala に代替した安定誘導体 **1** について検討を行った (図 3A 右)。蛍光アニソトロピーを用いた評価より、**1** が $A\beta$ の凝集を濃度依存的に阻害することが示唆された。また、ウエスタンブロット及び原子間力顕微鏡による評価の結果、**1** は $A\beta$ のオリゴマー形成を遅延させ、繊維形成を阻害する事が示唆された (図 3B)。これまでに報告されているペプチド性の $A\beta$ 凝集阻害剤は、 $A\beta$ の β -ストランド形成領域に着目した設計がなされている。一方、**1** は β -シート形成に直接関与しない位置 (Gly²⁵-Ser²⁶) に修飾部位を持つため、既存の凝集阻害剤とは異なる機構で作用している可能性が考えられる。

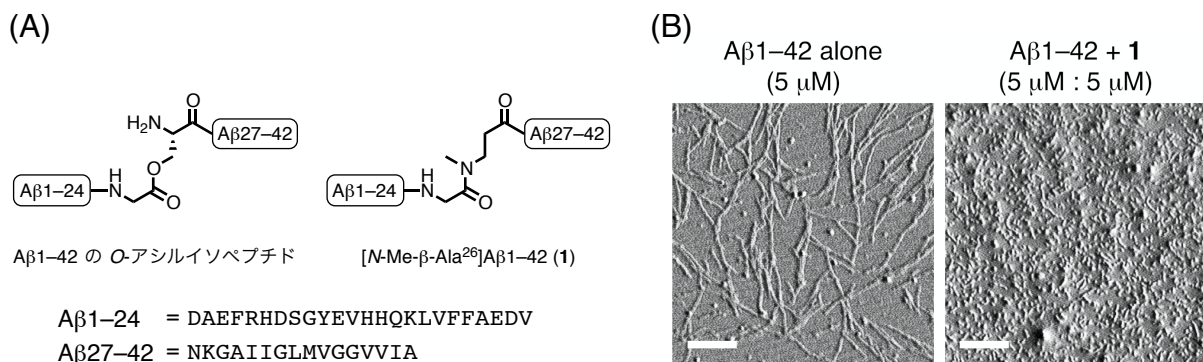


図 3. (A) $A\beta$ 1-42 の *O*-アシルイソペプチドと安定誘導体 **1** の構造. (B) 原子間力顕微鏡による **1** の $A\beta$ 繊維形成阻害作用の評価 (bar = 0.4 μ m).

連膜タンパク質) の膜貫通領域及び pGlu-ADan (家族性デンマーク型認知症関連アミロイドペプチド) をモデル基質として、*O*-アシルイソペプチド法の応用を検討した (図 2). その結果、反応溶媒として DMF を使用する、あるいは *O*-アシルイソペプチド部分のアミノ基を orthogonal な Aloc 基で保護することにより、*O*-アシルイソペプチド構造を保持したまま NCL を行うことに成功した。このため、*O*-アシルイソペプチドとして効率良く HPLC 精製を行うことができ、精製後、*O*-to-*N* 転位反応により目的のポリペプチドを高収率で得ることができた。

また、[Pyr¹¹] $A\beta$ 11-42 (アルツハイマー病関連低溶解性アミロイドペプチド) の *O*-アシルイソペプチドでは、親ペプチドと比べ水溶性及び凝集性が顕著に改善され、水系溶媒中での生物学的評価を実施する事ができた。

目次

理論の部

	頁
緒言	1
第一章 エピメリ化を伴わない環状ペプチド合成への応用	4
第一節 モデルペプチドの環化反応時における従来の手法と <i>O</i> -アシルイソペプチド法での エピメリ化を生ずる程度の比較.....	5
第二節 環状 <i>O</i> -アシルイソペプチドについて	9
第二章 <i>O</i> -アシルイソペプチドを利用した疎水性ペプチドの効率的合成.....	11
第一節 Native Chemical Ligation (NCL) による <i>O</i> -アシルイソペプチドの合成.....	11
第一項 有機溶媒中 NCL による膜タンパク質モデルの合成.....	12
第二項 水溶液中 NCL によるアミロイドペプチドの合成.....	16
第二節 アルツハイマー病関連低溶解性アミロイドの <i>O</i> -アシルイソペプチドにおける 生物学的評価	20
第三章 アミロイド β 凝集阻害剤開発への応用.....	26
第一節 <i>O</i> -アシルイソペプチドのネイティブ A β 1-42 に対する凝集阻害作用の評価.....	27
第二節 <i>O</i> -アシルイソペプチドの安定誘導体の分子設計と合成.....	28
第三節 安定誘導体のネイティブ A β 1-42 に対する凝集阻害作用の評価	29
結語	33
謝辞	34

実験の部

	項
使用機器について	35
合成実験	36
評価実験	43
引用文献	48

理論の部

緒言

O-アシルイソペプチドは、ペプチド鎖中の Ser または Thr の側鎖水酸基において、ネイティブのアミド結合 (*N*-アシル型) をエステル結合 (*O*-アシル型) へと異性化させたものである。*O*-アシルイソペプチドは、本エステル部分において主鎖 N-H に起因する水素結合供与能をもたず、分子全体の二次構造に影響を与える。また、*O*-アシルイソペプチドは、対応する親ペプチドと比較して、イオン化し得るアミノ基を 1 つ多くもつため一般的に水溶性が向上する。一方、中性条件下においては *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応を経て、親ペプチドへと迅速かつ定量的に変換される (図 1)。¹⁻²⁰⁾

著者は、*O*-アシルイソペプチドのこれらの特性を利用すれば、低溶解性あるいは凝集性のためこれまで合成困難とされてきたペプチドやタンパク質を効率的に合成できるのではと考えた。本研究では、*O*-アシルイソペプチドの特性を利用する事で、エピメリ化を伴わない環状ペプチド合成法の開発や、疎水性の高い膜タンパク質やアミロイドペプチドの効率的な合成法開発研究を行った。本手法により、創薬シードとして重要な環状ペプチドや、種々の病態に関連する低溶解性・凝集性ペプチドなどを効率的に合成する事は、医薬品開発研究に貢献すると考えられる。

さらに、*O*-アシルイソペプチドの応用研究として、アミロイド β ($A\beta$) 凝集阻害剤の開発研究を行った。 $A\beta$ はアルツハイマー病に関連するペプチドであるが、近年、当研究室では $A\beta$ 1-42 の *O*-アシルイソペプチドを合成する事に成功している。²⁻⁵⁾ $A\beta$ 1-42 の *O*-アシルイソペプチドは非凝集性かつ高水溶性であるため、実験操作時の取扱いを容易にし、再現性の良い実験系を提供する有用なツールとしてこれまで認識されてきた。著者は、 $A\beta$ 1-42 の *O*-アシルイソペプチドが非凝集性かつネイティブ $A\beta$ 1-42 とエステル部分以外は同じアミノ酸配列を有する点に着目し、この *O*-アシルイソペプチドがネイティブ $A\beta$ 1-42 と相互作用し、 $A\beta$ 1-42 の凝集を阻害できるのではないかと考えた。その結果、*O*-アシルイソペプチドは $A\beta$ 1-42 の繊維形成を抑制し、*O*-アシルイソペプチドの安定誘導体においても阻害活性が維持される事が明らかとなった。本研究は、他のアミロイドペプチドにも応用できる可能性があり、それらが関与する病態の発症機構の解明や治療薬開発に新たな知見を与えるものとして期待される。

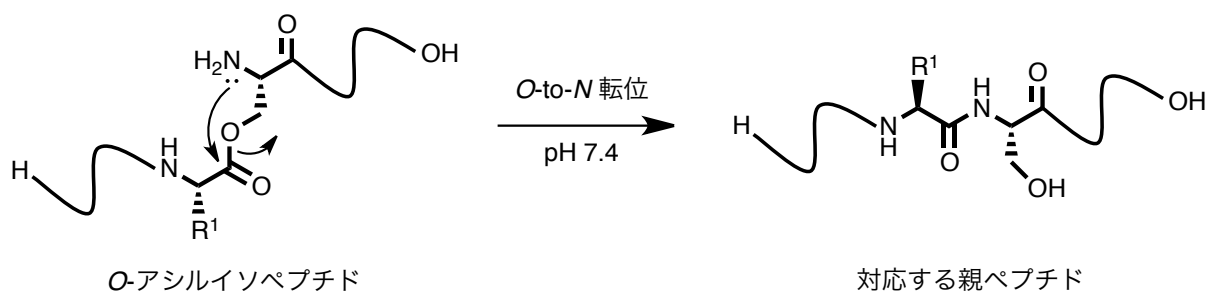


図 1 *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応を経由した *O*-アシルイソペプチドから親ペプチドへの変換。

(注) 本論文で使用した略号を下に記す.

1. アミノ酸の略号

Ala (A): alanine	Arg (R): arginine	Asn (N): asparagine	Asp (D): aspartic acid
Cys (C): cysteine	Glu (E): glutamic acid	Gln (Q): glutamine	Gly (G): glycine
His (H): histidine	Ile (I): isoleucine	Leu (L): leucine	Lys (K): lysine
Met (M): methionine	Phe (F): phenylalanine	Pro (P): proline	Ser (S): serine
Thr (T): threonine	Trp (W): tryptophan	Tyr (Y): tyrosine	Val (V): valine

Pyr: pyroglutamic acid
Xaa: any amino acid

2. 構造に関する略号

Aloc: allyloxycarbonyl
Boc: *tert*-butyloxycarbonyl
Bzl: benzyl
FAM: 5-carboxy fluorescein
Fmoc: 9-fluorenylmethyloxycarbonyl
ODS: octadecylsilyl
PMC: 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl
Me: methyl
*t*Bu: *tert*-butyl
Trt: trityl

3. 試薬に関する略号

CHCA: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
DCM: dichloromethane
DIC: 1,3-diisopropylcarbodiimide
DIEA: *N,N*-diisopropylethylamine
DMAP: 4-dimethylaminopyridine
DMEM: Dullbecco's modified Eagle medium
DMF: *N,N*-dimethylformamide
DMS: dimethyl sulfide
DMSO: dimethyl sulfoxide
DPPA: diphenylphosphoryl azide
EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDT: 1,2-ethanedithiol
FBS: fetal bovine serum
Gn·HCl: guanidine hydrochloride

HATU: *N*-[(dimethylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]pyridin-1-ylmethylene]-*N*-methylmethanaminium hexafluorophosphate *N*-oxide
HBTU: 1-[*bis*(dimethylamino)methyliumyl]-1*H*-benzotriazole-3-oxide hexafluorophosphate
HCTU: 5-chloro-1-[*bis*(dimethylamino)methyliumyl]-1*H*-benzotriazole-3-oxide hexafluorophosphate
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol
HOBt: 1-hydroxybenzotriazole
HRP: horse radish peroxidase
HS: horse serum
LDS: lithium dodecyl sulfate
MESNa: sodium 2-mercaptoethanesulfonate
MPAA: 4-mercaptophenylacetic acid
TCEP·HCl: *tris*(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
NDGA: nordihydroguaiaretic acid
NMP: *N*-methylpyrrolidone
PB: phosphate buffer
TBS-T: *tris*(hydroxymethyl)aminomethane-buffered saline with 0.1% Tween[®] 20
TEA: triethylamine
TFA: trifluoroacetic acid
Th-T: thioflavin-T
TIS: triisopropylsilane
SDS: sodium dodecyl sulfate
WST-8: 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2*H*-tetrazolium

4. その他の略号

A β : amyloid β peptide
AFM: atomic force microscopy
CD: circular dichroism
ECL: enhanced chemiluminescence
HPLC: high-performance liquid chromatography
MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization
MS: mass spectrometry
PAGE: poly-acrylamide gel electrophoresis
PVDF: polyvinylidene difluoride
TOF: time-of-flight

第一章

エピメリ化を伴わない環状ペプチド合成への応用

環状ペプチドは創薬シードとして重要²¹⁻²⁵⁾であるが、鎖状ペプチドを環化反応に供した際、ペプチド C 末端の活性化で生じるオキサゾロン環に由来するエピメリ化が問題となる (図 1.1A).^{26,27)} 著者は、鎖状保護ペプチドの C 末端を *O*-アシルイソペプチドとし、C 末端アミノ酸残基の α -アミノ基にウレタン型保護基を導入する事により、エピメリ化を起こす事なく環化反応を達成できるのではと考えた (図 1.1B).²⁸⁻³⁰⁾

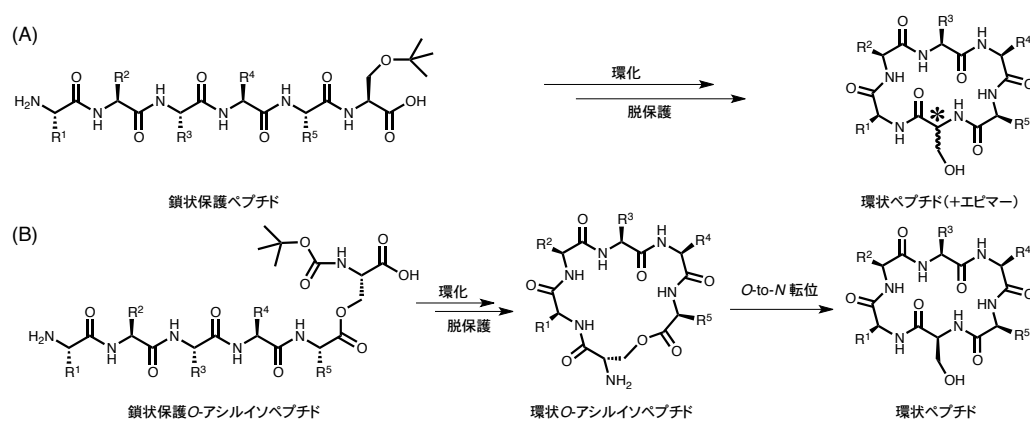


図 1.1 環状ペプチドの合成. (A) 通常的手法. (B) *O*-アシルイソペプチド法.

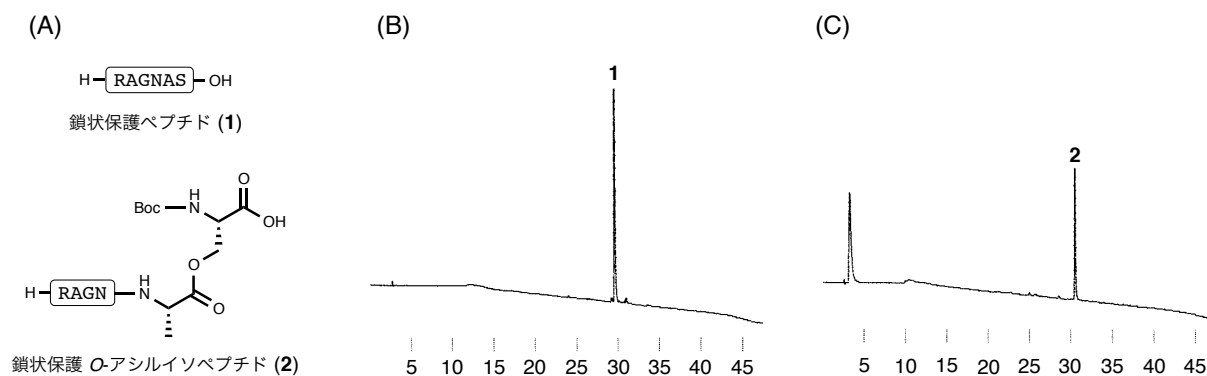


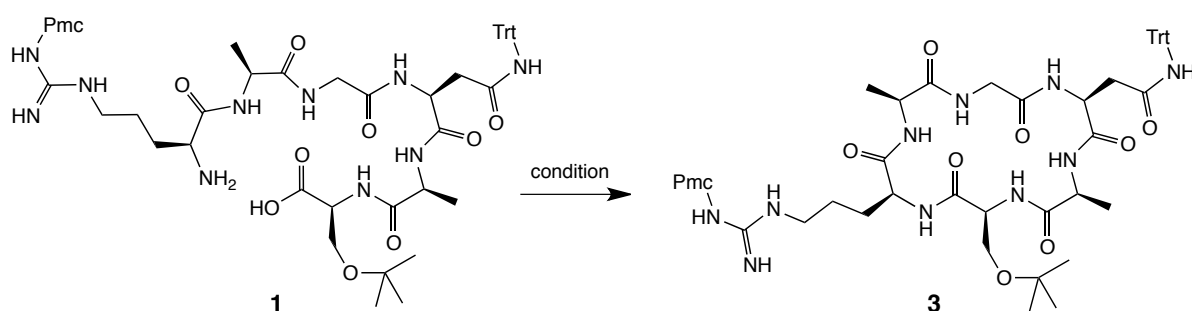
図 1.2 (A) 環化反応の原料化合物 1 及び *O*-アシルイソペプチド 2 の構造. (B) pure 1 及び (C) pure 2 の分析 HPLC チャート; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μ m, 12 nm.), 0–100% MeCN, 40 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 °C).

第一節 モデルペプチドの環化反応時における従来の手法と *O*-アシルイソペプチド法でのエピメリ化を生ずる程度の比較

そこで本研究では、6 残基環状ペプチド cyclo(Arg-Ala-Gly-Asn-Ala-Ser) をモデルとして、鎖状保護ペプチド H-Arg(Pmc)-Ala-Gly-Asn(Trt)-Ala-Ser(tBu)-OH (**1**) 及び鎖状保護 *O*-アシルイソペプチド Boc-Ser(H-Arg(Pmc)-Ala-Gly-Asn(Trt)-Ala)-OH (**2**) を環化反応に供し、エピメリ化を生ずる程度について比較検討を行う事とした (図 1.2).

鎖状保護ヘキサペプチド **1** は、DMF 中 HATU-collidine 法 (条件 1),³¹⁻³³⁾ CH₂Cl₂ 中 HATU-collidine 法 (1% DMF 含有, 条件 2), 及び DMF 中 DPPA (diphenylphosphoryl azide)-NaHCO₃ 法 (条件 3)^{34,35)} による環化反応の条件検討を行った (表 1.1, 図 1.3). 条件 1 では、反応開始 12 時間後において、目的環状保護ペプチド **3** が 60% 得られ、副生成物 (エピマー) である [D-Ser]-**3** は 39% 確認された (図 1.3A). 一方、環化反応に用いる溶媒を CH₂Cl₂ に変更した条件 2 の場合では、[D-Ser]-**3** は 2% にとどまった (図 1.3B). また、条件 3 においては、反応開始 5 日の時点で、出発物質が 21% も残り、15% の [D-Ser]-**3** がみられた (図 1.3C). 全ての条件においてこれらのエピマーが確認された要因としては、環化反応時、C 末端カルボキシ基を活性化した際に生じるオキサゾロン環の形成が考えられる。また、各々の条件において、分子間反応による二量体副生成物の形成は ESI-MS を用いた質量分析では確認されなかった。

表 1.1 鎖状保護ペプチド **1** の環化反応.^[a]



条件	試薬	溶媒	反応時間	ピーク面積比 ^[b] (%)		
				1	3	[D-Ser]- 3 ^[c]
1	HATU (2 eq)-collidine (4 eq)	DMF	12 h	1	60	39
2	HATU (2 eq)-collidine (4 eq)	CH ₂ Cl ₂ ^[d]	1 h	3	95	2
3	DPPA (3 eq)-NaHCO ₃ (3 eq)	DMF	5 d	21	64	15

[a] ペプチド濃度; 1 mM, rt. [b] 分析用 HPLC のピークエリアより評価した. [c] [D-Ser]-**3** の基準試料を別途合成し, HPLC を用いてエピメリ化発生割合の評価に用いた. [d] 1% DMF 含有.

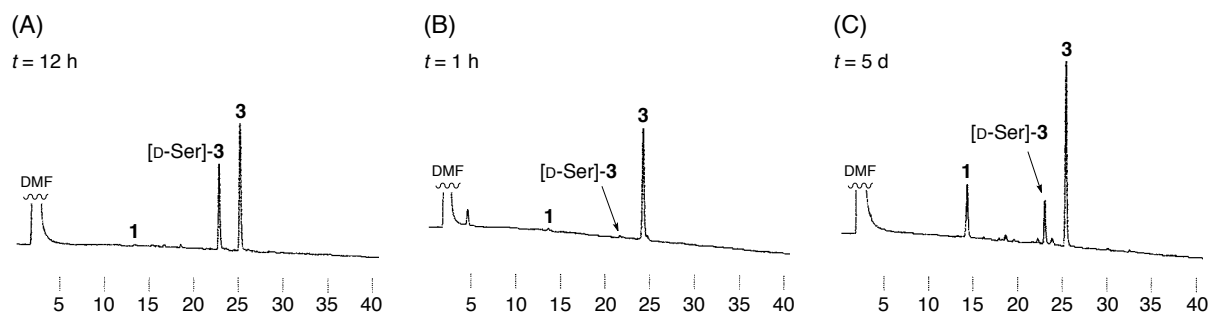
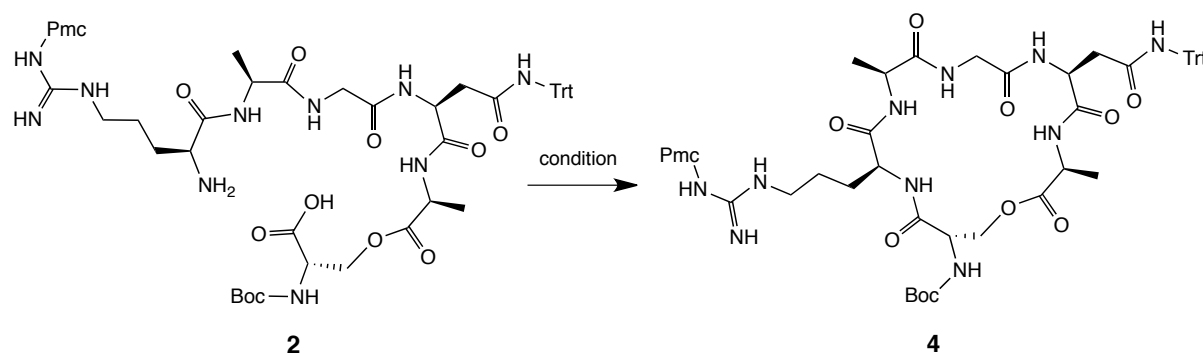


図 1.3 環状保護ペプチド **3** の合成. (A) 条件 1 (B) 条件 2 (C) 条件 3 それぞれにおける環化反応後の分析 HPLC チャート; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μ m, 12 nm.), 45–100% MeCN, 55 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 $^{\circ}$ C).

鎖状保護 *O*-アシルイソペプチド **2** についても先ほどと同様の 3 条件で環化反応を行った (表 1.2). DMF 中 HATU–collidine を用いた条件 1 では, 反応開始 12 時間後において, 94% の目的環状保護 *O*-アシルイソペプチド **4** を得る事ができ, エピメリ化由来の副生成物である [D-Ser]-**4** は検出されなかった (図 1.4A). このような結果が得られたのは, 鎖状保護 *O*-アシルイソペプチドの C 末端アミノ酸残基の α -アミノ基にウレタン型保護基である Boc が導入され, オキサゾロン環形成を防ぐ事でエピメリ化を抑制したためであると考えられる. また, CH_2Cl_2 (1% DMF 含有) を使用した場合には (条件 2), 環化反応開始からわずか 1 時間で, エピメリ化を招く事なく 94% の **4** を得る事ができた (図 1.4B). しかしながら, DPPA– NaHCO_3 を用いた条件 3 では, 目的環状ペプチド **4** の他に, Ser 欠損体である des-Ser-**4** が 36% と高い割合で検出され, さらに 2% の [D-Ser]-**4** と思われるピークが確認された (図 1.4C). des-Ser-**4** が検出された理由としては, 条件 3 では反応に要する時間が 5 日間と比較的長く, それに伴い *O*-アシルイソペプチドの C 末端の活性化が長く続いたため, 酸無水物の形成を経て, Boc- Δ Ala-OH が脱離する事で生じたと考えられる (図 1.5).³⁶⁾ また, 各々の条件において, 分子間反応による二量体副生成物の形成は ESI-MS を用いた質量分析では確認されなかった.

表 1.2 鎖状保護 *O*-アシルイソペプチド **2** の環化反応.^[a]



条件	試薬	溶媒	反応時間	ピーク面積比 ^[b] (%)			
				2	4	[D-Ser]- 4 ^[c]	des-Ser- 4 ^[d]
1	HATU (2 eq)-collidine (4 eq)	DMF	12 h	6	94	N.D. ^[e]	N.D.
2	HATU (2 eq)-collidine (4 eq)	CH ₂ Cl ₂ ^[f]	1 h	6	94	N.D.	N.D.
3	DPPA (3 eq)-NaHCO ₃ (3 eq)	DMF	5 d	1	61	2	36

[a] ペプチド濃度; 1 mM, rt. [b] 分析用 HPLC のピークエリアより評価した. [c] [D-Ser]-**4** の基準試料を別途合成し, HPLC を用いてエピメリ化発生割合の評価に用いた. [d] cyclo(RAGNA) + [D-Ala] 誘導体. [e] N.D. = not detected. [f] 1% DMF 含有.

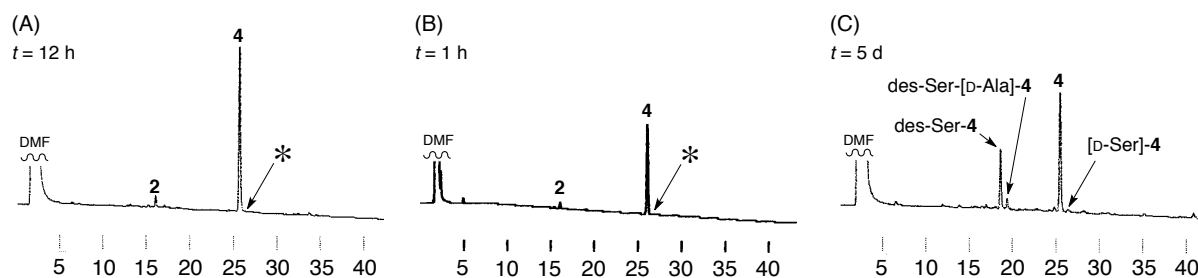


図 1.4 環状保護 *O*-アシルイソペプチド **4** の合成. (A) 条件 1, (B) 条件 2, (C) 条件 3 それぞれにおける環化反応後の分析 HPLC チャート; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μ m, 12 nm.), 45–100% MeCN, 55 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 °C). * [D-Ser]-**4** の保持時間にピークはみられなかった.

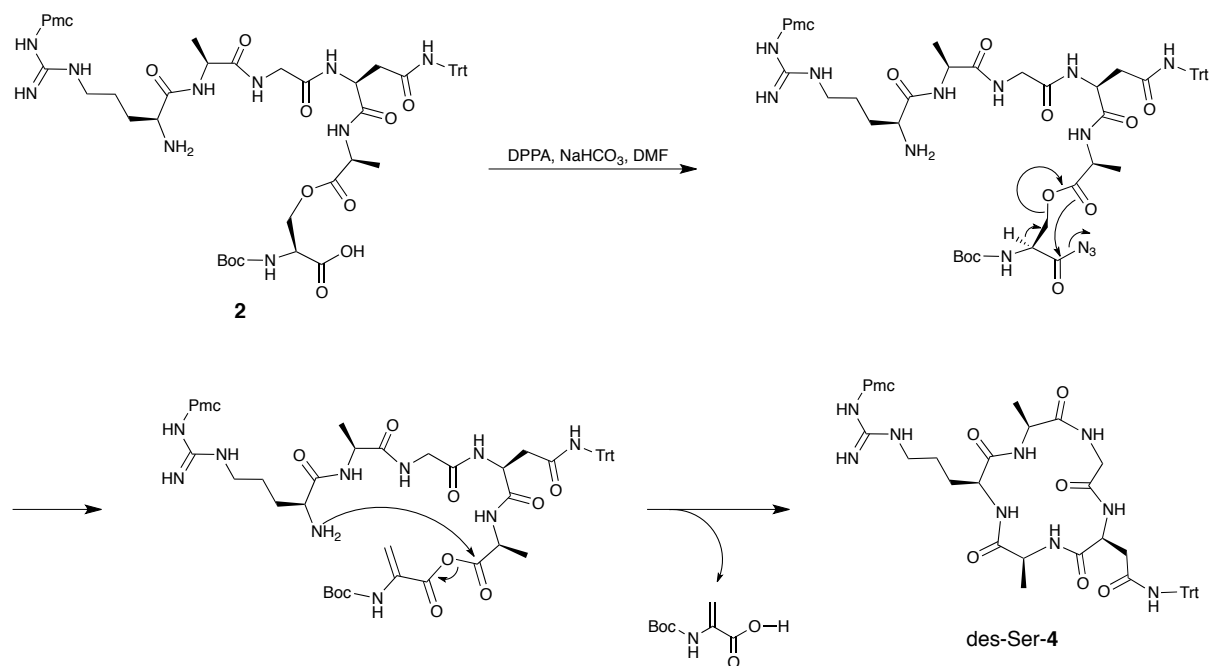


図 1.5 鎖状 *O*-アシルイソペプチド **2** から **des-Ser-4** を生成する推定機構.

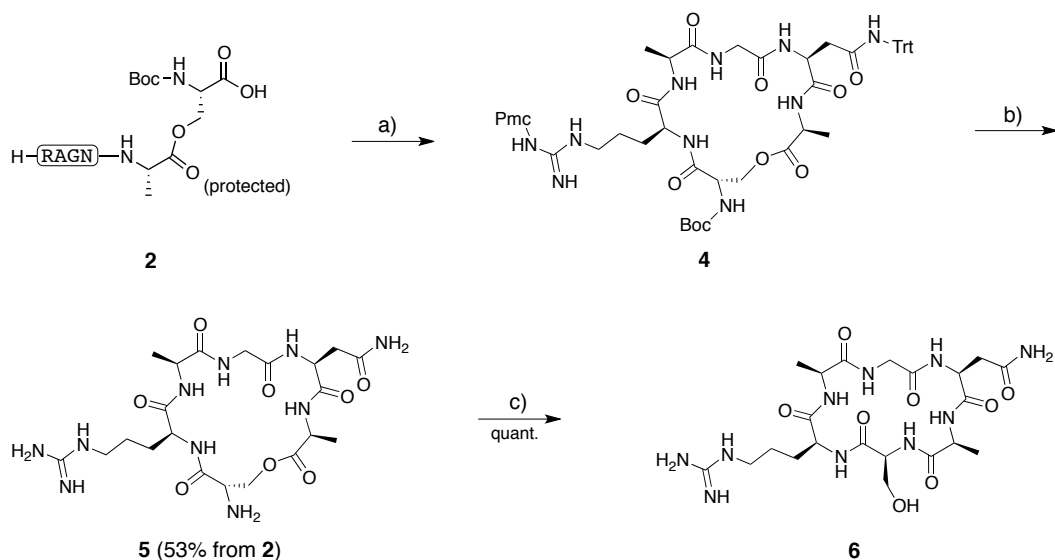


図 1.6 環状ペプチド **6** の合成: a) HATU (2 eq), 2,4,6-collidine (4 eq), CH₂Cl₂ (6% DMF 含有), ペプチド濃度: 1 mM, 3 h, rt.; b) TFA (92.5%)-*m*-cresol (2.5%)-thioanisole (2.5%)-H₂O (2.5%), 60 min, rt.; c) 3-(trimethylammonium)propyl-functionalized silica gel carbonate (2 eq), H₂O/CH₃CN (1:1), 3 h, rt, 濾過後に 0.1% TFA aq を添加.

第二節 環状 *O*-アシルイソペプチドについて

最終的に、環化速度と副反応の両面において優れている条件 2 を用いて環化を行い、TFA による脱保護の後、環状 *O*-アシルイソペプチド **5** (53%) を得た (図 1.6, 1.7A). **5** は 10 mM リン酸緩衝液中 (pH 7.6) で容易に *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応を起こし、対応する環状親ペプチド **6** へと変換された (図 1.7B). すなわち、立体構造が制限された環状ペプチドにおいても、鎖状ペプチドの場合と同様に *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応が定量的に進行するという事が示唆された. また、本結果は、J. Martinez, M. Amblard らの研究結果³⁷⁾ を支持するものであり、環状デブシペプチド合成における副反応としての *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応の起こりやすさを裏付けるものである.³⁸⁾

続いて、シリカゲル担持塩基 [3-(trimethylammonium)propyl-functionalized silica gel carbonate] を用いた転位実験を行った. シリカゲル担持塩基 (2 eq) 存在下、環状 *O*-アシルイソペプチド **5** を H₂O/CH₃CN (1:1) の溶液に溶解させると、振盪後 1 分の時点で約 25% が **6** へと変換された (図 1.7C). その後、さらに続けて 1 時間振盪したとき、定量的に *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応が進む事が確認され、他に目立った副反応も検出されなかった. シリカゲル担持塩基は容易にフィルターで除去され、得られた濾液を凍結乾燥する事により、目的環状ペプチド **6** (pure) を得た (図 1.8A). また、同様の反応を水中で行った場合 (CH₃CN を含まない)、転位反応はおよそ 1 時間で完了したが、環状 *O*-アシルイソペプチド **5** の Ala-Ser 間のエステル部分における加水分解体が 2% 程度検出された. なお、ここで得られた **6** は、別途合成した基準試料と比較し、分析 HPLC の保持時間が同等である事を確認した.

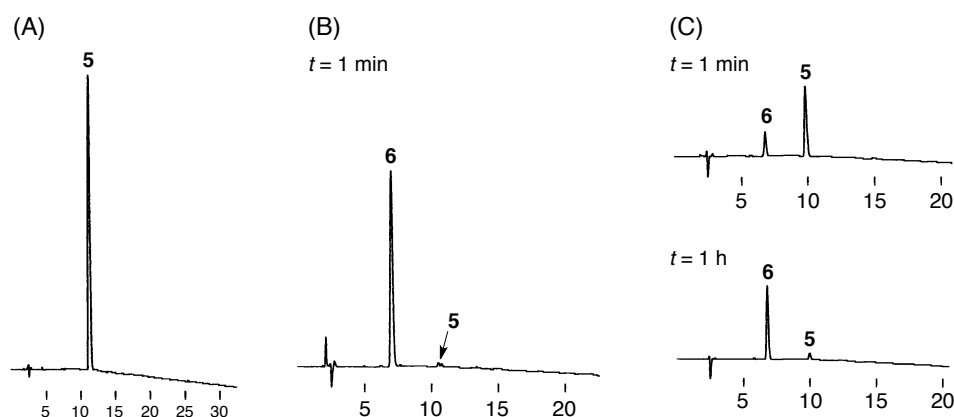


図 1.7 (A) 環状脱保護 *O*-アシルイソペプチド **5** (pure) の分析 HPLC チャート. (B) リン酸緩衝液 (pH 7.6) 中及び (C) 固相担持塩基 (2 eq) 存在下、H₂O : MeCN (1 : 1) の混合溶媒中での *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応. 分析 HPLC 条件; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μ m, 12 nm.), 2–22% MeCN, 40 min, λ 220 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 °C).

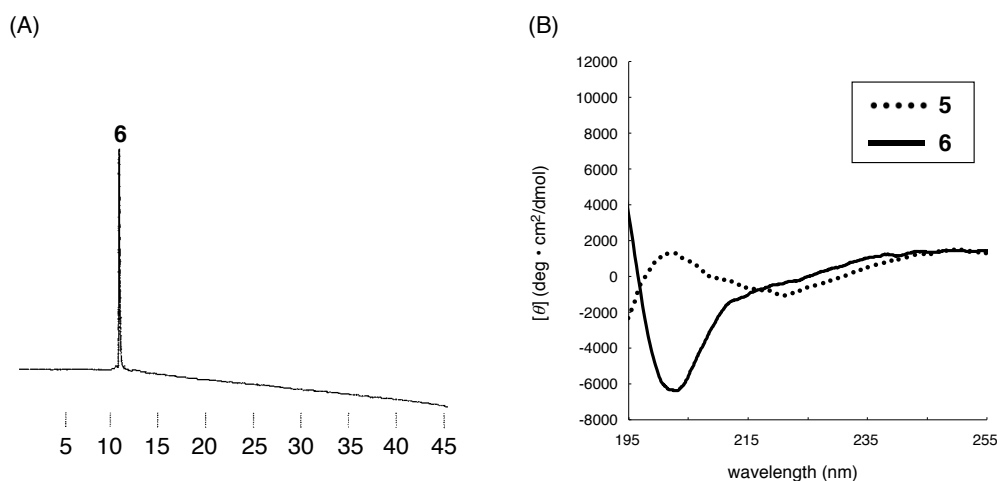


図 1.8 (A) pure **6** の分析 HPLC チャート; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μ m, 12 nm.), 0–100% MeCN, 40 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 °C). (B) リン酸緩衝液 (pH 2.6, rt) 中における環状 *O*-アシルイソペプチド **5** 及び対応する環状親ペプチド **6** の CD スペクトル (区間 20 プロットの移動平均線).

続いて、環状 *O*-アシルイソペプチド **5** とその親である環状ペプチド **6** について、10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.6, 38 mM NaCl 含有) 中における CD スペクトルの測定を行った (図 1.8B). 環状 *O*-アシルイソペプチド **5** のスペクトルにおいては、195 nm 付近に極小値及び、200 nm 付近に極大値がみられた。一方、環状親ペプチド **6** の場合は、190 nm 付近において極大値を示し、203 nm 付近では極小値が確認された。これより、環状 *O*-アシルイソペプチド **5** は環状親ペプチド **6** とは異なる二次構造を有していると考えられる。本結果は、鎖状 *O*-アシルペプチドの場合で知られる二次構造の変化が環状ペプチドにおいても同様に生じているという事を示唆するものである。¹⁻²⁰⁾

今回の実験では、*O*-アシルイソペプチド法を応用し、エピマーを生じる事無く環状ヘキサペプチドを合成する事に成功した。環化反応に用いる条件としては、 CH_2Cl_2 中 HATU-collidine 法 (1% DMF 含有) が副反応抑制及び反応速度の両面から優れている事が分かった。また、CD スペクトルの結果より、合成された環状 *O*-アシルイソペプチドは、対応する環状親ペプチドとは異なる二次構造を有している事が考えられる。環状 *O*-アシルイソペプチドは *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応を経て、定量的かつ速やかに目的環状ペプチドへと変換された。本結果より、エピメリ化を起こさないアミノ酸残基として以前から使用されている Gly, Pro に加え、新たに Ser, Thr も縮合点として選択できると考えられるため、本手法は環状ペプチドの効率的な合成手法として期待される。

第二章

O-アシルイソペプチドを利用した疎水性ペプチドの効率的合成

O-アシルイソペプチドとする事で、水溶性の改善や二次構造の変化が見込まれるため、このような *O*-アシルイソペプチドの特性を利用すれば、低溶解性あるいは凝集性によりこれまで合成困難とされてきたペプチドやタンパク質を効率的に合成できるのではと考えた。本研究では、収斂的ペプチド合成法として広く用いられている Native Chemical Ligation における低溶解性ペプチド合成の収率改善を目的として、膜タンパク質モデル及びアミロイドペプチドの合成を行う事とした。さらに、極端に低い水溶性をもつアルツハイマー病関連アミロイドペプチド [Pyr¹¹]Aβ₁₁₋₄₂ については、*O*-アシルイソペプチドとする事で水溶性を改善し、これまで困難であった生物学的な評価実験を行う事とした。

第一節 Native Chemical Ligation (NCL) による *O*-アシルイソペプチドの合成

Native Chemical Ligation (NCL) は C 末端にチオエステルを有するペプチドと N 末端に Cys を有するペプチドとを側鎖無保護で縮合させる収斂的合成手法の一つとして広く利用されている。³⁹⁻⁴⁰⁾ しかし、疎水性の高い膜タンパク質やアミロイドタンパク質の合成では、それらのもつ低い溶解性や逆相カラム固定相との強い疎水的相互作用のため、目的化合物を高い収率で得る事が困難である。⁴¹⁻⁴⁶⁾ このような背景から、疎水性ポリペプチドの溶解性を改善し NCL を効率的に行う事を目的として、peptide- α -チオエステル-(Arg)n を利用する手法^{44,45)} や反応溶媒に DMF を利用する手法⁴⁶⁾ などが報告されている。しかし、これらの溶解性を改善する試みは NCL 反応時においてのみ有効であり、精製時における低溶解性の問題は依然として残されたままである。そこで、これらの難点の解決を目指し、NpHtrII⁴⁶⁾ (古細菌 *Natronomonas pharaonis* 関連膜タンパク質) の膜貫通領域及び pGlu-ADan⁴⁸⁾ (家族性デンマーク型認知症関連アミロイドペプチド) をモデル基質として、*O*-アシルイソペプチド法の応用を検討した (図 2.1)。

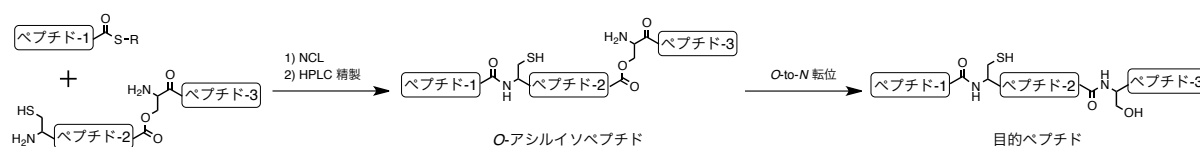


図 2.1 NCL による *O*-アシルイソペプチドの合成を鍵とする疎水性ペプチドの効率的合成法。

第一項 有機溶媒中 NCL による膜タンパク質モデルの合成

塩基の存在下, DMF 中にて膜タンパク質のモデルペプチドを NCL により合成したという Dittmann らの報告⁴⁶⁾に着想を受け, 本研究では, *NpHtrII* 膜貫通領域の *O*-アシルイソペプチド H-Ser(Ala-Val-Gln-Glu-Ala-Cys-Ala-Val)-Ala-Ile-Leu-OH (**9**) の合成を DMF 中で行う事とした. これは, 過去の *O*-アシルイソペプチドを扱った実験において,¹⁻⁷⁾ *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応が, 水溶液中と比較して, 有機溶媒中では進行しにくいという知見に基づくものであり, DMF を反応溶媒として用いる事で, *O*-アシルイソペプチド構造を維持したまま NCL を達成できると考えたためである.

化合物 **9** を NCL により DMF 中で合成するにあたり, N 末端側 α -アリールチオエステルセグメント H-Ala-Val-Gln-Glu-Ala-S-C₆H₄-CH₂-COOH (**7**, 3.0 mg) 及び C 末端側 *O*-アシルイソペプチドセグメント H-Ser(Cys-Ala-Val)-Ala-Ile-Leu-OH (**8**, 3.0 mg) を 20 mM 4-mercaptophenylacetic acid (MPAA),⁴⁷⁾ 40 mM triethylamine (TEA) 及び 20 mM *tris*(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP-HCl) を含有する DMF 中に溶解し (ペプチド濃度: 3.5 mM), 37 °C にてインキュベートした. 分析 HPLC により反応を観測すると, 開始 1 時間で NCL は 70% 程度進行した (図 2.2A). なお, この時点において, 極少量しか対応する親ペプチド (= *N*-アシル体 **10**) が検出されなかったのは特筆すべき点である. す

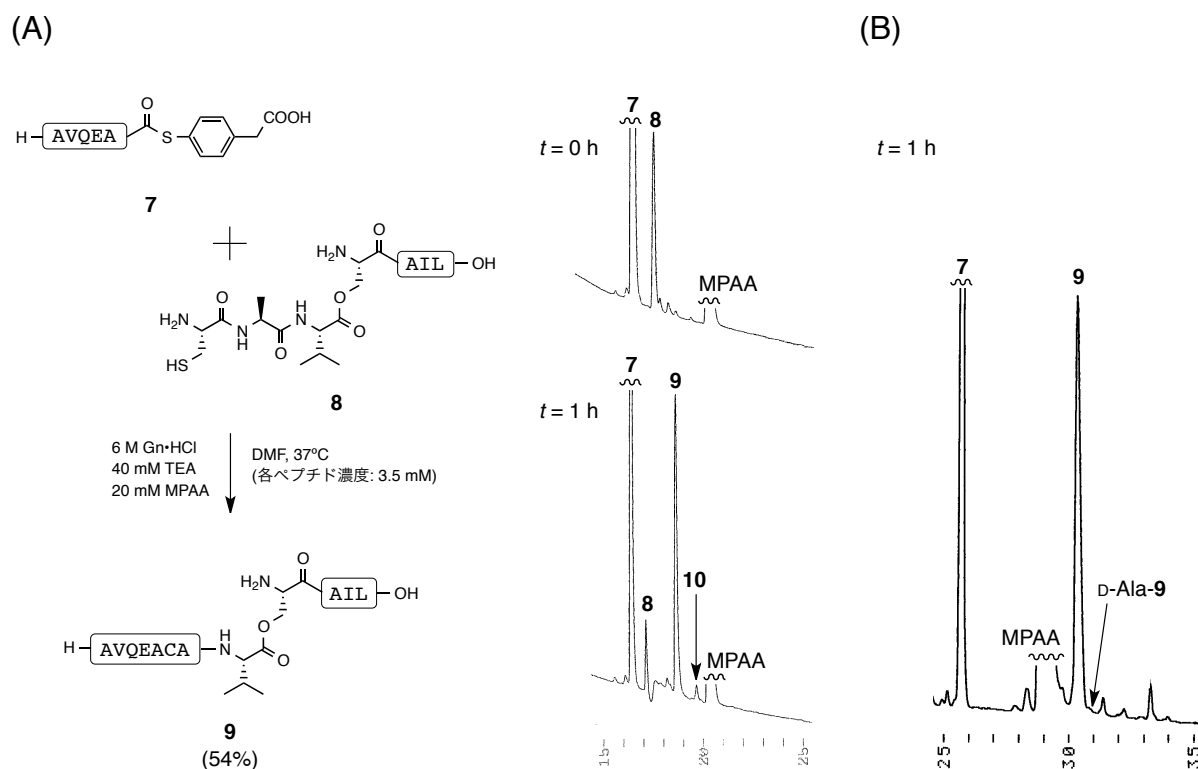


図 2.2 NCL による *O*-アシルイソペプチド **9** の合成. 分析 HPLC 条件; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μ m, 12 nm.), 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 °C), (A) 0–100% MeCN, 40 min, λ 230 nm, (B) 0–60% MeCN, 60 min, λ 230 nm. peak rejection: 10000.

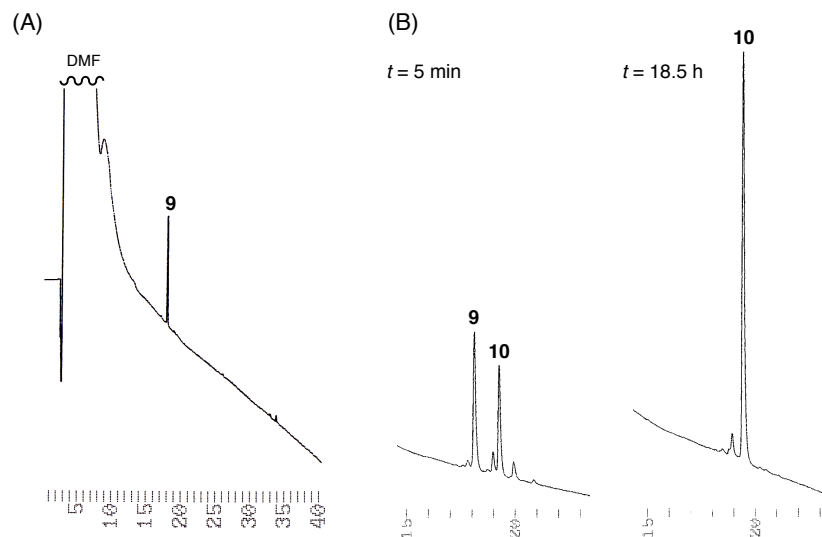


図 2.3 (A) pure **9** の分析 HPLC チャート. (B) *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応を経由した *O*-アシルイソペプチド **9** から対応する親ペプチド **10** への変換. 分析 HPLC 条件; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μ m, 12 nm.), 0–100% MeCN, 40 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 °C).

なわち, DMF 中でライゲーションを行う事で, *O*-アシルイソペプチド **9** の *O*-to-*N* 転位反応は, 大部分において抑制された事が明らかとなった. さらに, **7** の C 末端アミノ酸残基である Ala のエピメリ化は検出限界以下である事も確認された (図 2.2B). ライゲーションにより得られた **9** は反応中も DMF に可溶であり, 一切の沈殿はみられなかった.

1 時間後の反応溶液は逆相 HPLC カラムを用いて一度に分取し, 0.1% TFA aq 及び CH₃CN の濃度勾配による溶出を行うことで, 目的の *O*-アシルイソペプチド **9** を 54% の収率で得た (図 2.3A). なお, 精製後の **9** は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5, 10% DMF 含有) 中 37°C にて *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応に供し, 18.5 時間でほぼ定量的に対応する親ペプチド **10** へと変換された (図 2.3B). 転位により得られた親ペプチド **10** は, 別途合成した基準試料と比較して, HPLC 保持時間及び MALDI-MS (TOF) により得られた分子量がそれぞれ同一である事を確認した.

対照実験として, N 末端側 α -アリールチオエステルセグメント (**7**, 3.0 mg) と C 末端側セグメント H-Cys-Ala-Val-Ser-Ala-Ile-Leu-OH (**11**, 3.0 mg) とを 20 mM MPAA, 40 mM TEA 及び 20 mM TCEP-HCl を含有する DMF 中にて NCL 反応に供したところ (図 2.4A, ペプチド濃度: 3.5 mM), 反応開始 1 時間でゲル状の沈殿を生じた. この沈殿を HFIP に溶解させ HPLC により分析すると, 目的ペプチド **10** が主として検出された (図 2.4B). 一方, 反応溶液の上清には **10** はほとんど検出されなかった (図 2.4A). すなわち, **7** と **11** との NCL は定量的に進行しているが, これにより得られた目的ペプチド **10** は DMF に対する溶解性の低さから沈殿を生じたと考えられる. 得られた沈殿は

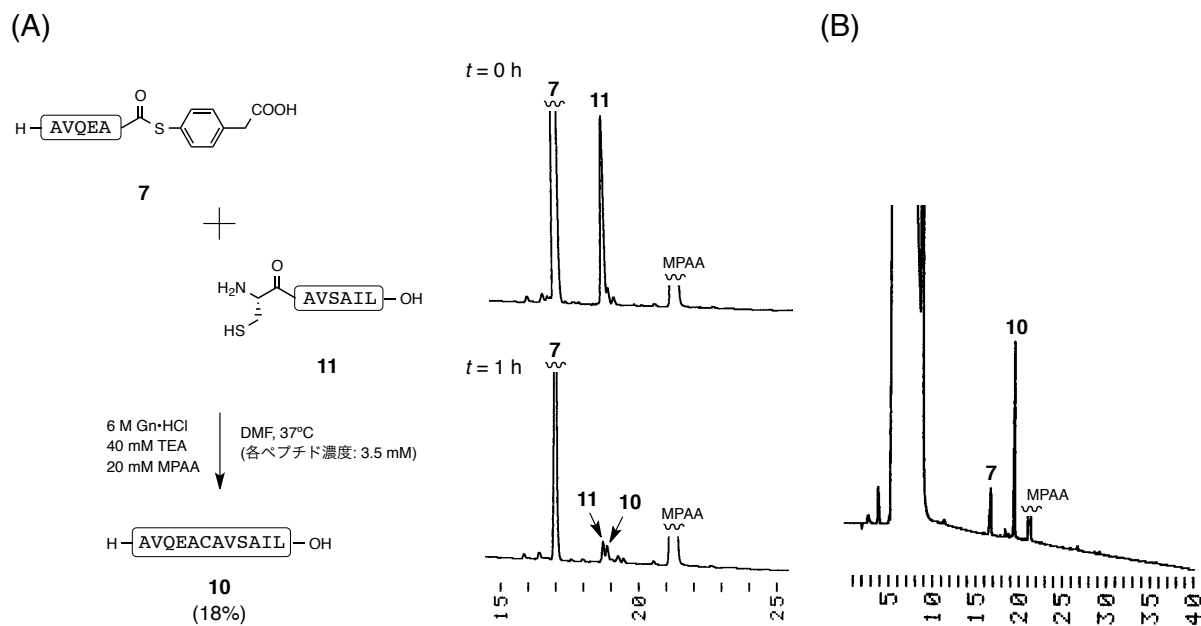


図 2.4 通常の手法による NCL を用いた **10** の合成. (A) 反応溶液の分析 HPLC チャート. (B) 沈殿を HFIP に溶解し, HPLC 分析を行った. 分析 HPLC 条件; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μ m, 12 nm.), 0–100% MeCN, 40 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 $^{\circ}$ C).

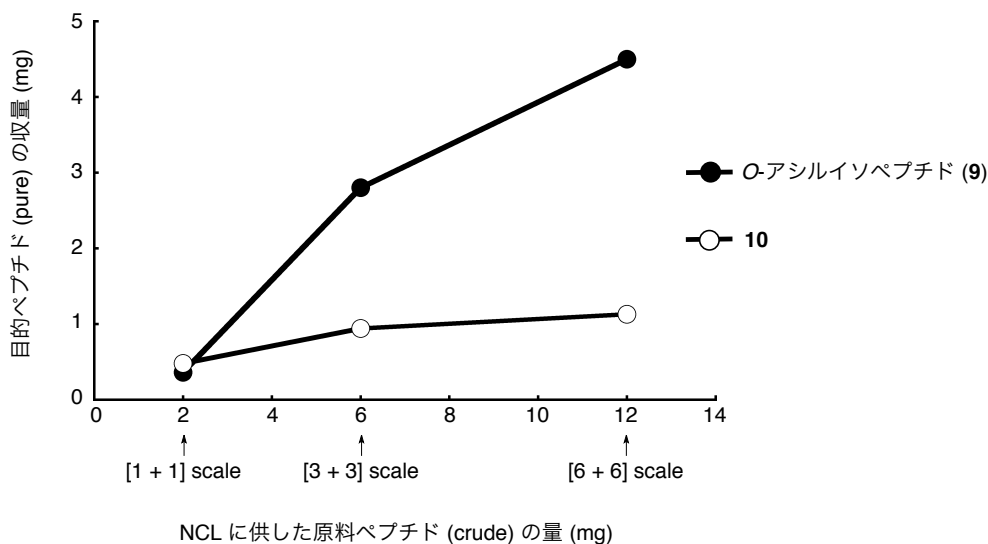


図 2.5 NCL の反応スケールと目的化合物 (pure) の収量との関係. O-アシルイソペプチドを利用した場合 (●): 0.36 mg ([1+1] scale), 2.8 mg ([3+3] scale), 4.5 mg ([6+6] scale); 通常の手法の場合 (○): 0.47 mg ([1+1] scale), 0.94 mg ([3+3] scale), 1.1 mg ([6+6] scale). 分取 HPLC 条件; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 20 x 250 mmI.D. S-5 μ m, 12 nm.), 流速 0.5 mL/min (カラム温度: 40 $^{\circ}$ C).

HFIP に溶解し、逆相 HPLC カラムを用いて一度に分取し精製を行ったが、目的ペプチド **10** の収率は 18% に留まった ([3+3] scale, 図 2.5). これは、*O*-アシルイソペプチドを用いた場合の 1/3 程度でしかない. 精製段階において、*O*-アシルイソペプチド **9** と比べ **10** の収率がこのように低下した要因としては、より疎水性の高い **10** の方が逆相カラム固定相の ODS と強く相互作用し、より溶出されにくいためであると考えられる.

さらに、N 末端側セグメント 6 mg と C 末端側セグメント 6 mg とのライゲーシオン ([6+6] scale) より得られた目的ペプチドを、逆相 HPLC を用いて精製した際には、通常的手法を用いた場合に比べ、*O*-アシルイソペプチドを用いた場合では 4 倍以上の収率改善が見られた (**9** の収率: 4.5 mg, **10** の収率: 1.1 mg, 図 2.5). 一方、[1+1] scale の場合では、収率に大きな違いは見られなかった. 本結果より、通常のライゲーシオンにより得られた **10** の HPLC による精製時においては、[3+3] 及び [6+6] scale の場合ではカラム固定相との疎水的相互作用により満足のいく収率が得られないが、*O*-アシルイソペプチドを用いた場合では、その疎水性が弱められるため、[3+3] 及び [6+6] scale においても良好な収率で精製できる事が明らかとなった.

第二項 水溶液中 NCL によるアミロイドペプチドの合成

次に、水溶液中でも同様に本手法の応用が可能であるかどうかを検討するため、家族性デンマーク型認知症に関連するアミロイドペプチドである pyroGlu¹-ADan⁴⁸ の合成を行った (図 2.6). *O*-アシルイソペプチド **12** の還元体である **16** の合成は, pyroGlu¹-ADan1-21-SCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺ [Ile21Ala] (**14**) と Aloc-Ser²⁹(ADan22-28)-Gln-Glu-Lys-His-Tyr³⁴ (**15**) との NCL により行う事とした (図 2.7). その際,

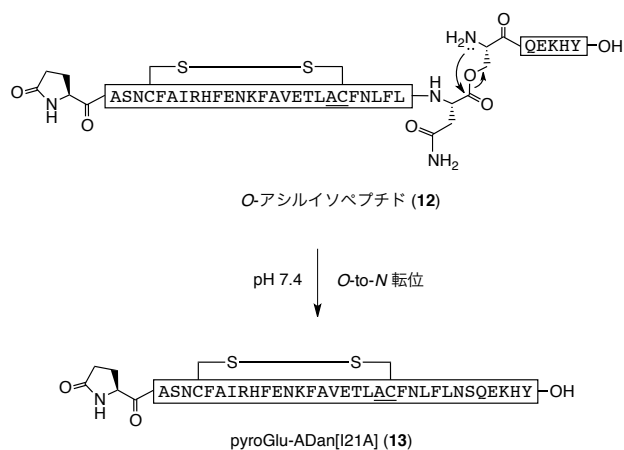


図 2.6 *O*-アシルイソペプチド (**12**) の *O*-to-*N* 転位を経由した親ペプチド (**13**) への変換. 下線部は NCL における縮合点を示す.

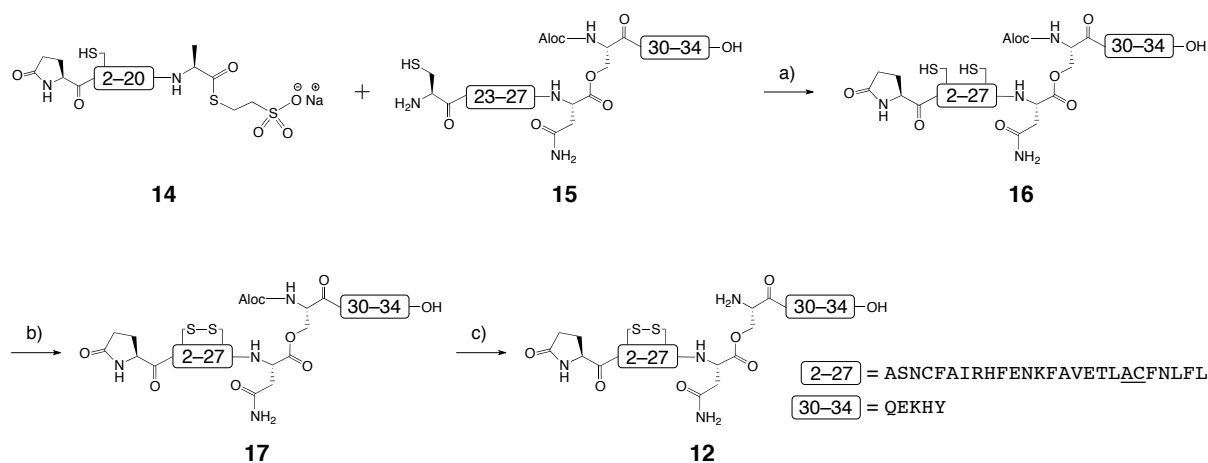


図 2.7 pyroGlu¹-ADan [Ile21Ala] の *O*-アシルイソペプチド (**12**) の合成: a) MPAA (20 eq), TCEP·HCl (20 eq), 6 M GnHCl/0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5), 22 h, rt, 25%; b) 1 M HCl aq : DMSO (1:99), 24 h, rt, 74%; c) Pd(PPh₃)₄ (1 eq), PhSiH₃ (100 eq), DCM : DMF (1:1, including 0.1% TFA), 1 h, rt, 84%. 下線部は NCL における縮合点を示す.

Ile²¹ の側鎖 β-メチルの嵩高さから NCL が進行しにくい事が危惧されたため、本研究では Ile²¹ を Ala²¹ へと置換した。また、pyroGlu¹-ADan の C 末端側領域はアミロイド性に寄与していると考えられているため、⁴⁸⁾ Ser²⁹ に *O*-アシルイソペプチド構造を組み入れる事で pyroGlu¹-ADan のアミロイド性が低下する事を期待した。これは、アミロイドペプチドに *O*-アシルイソペプチド構造を持たせる事で、ペプチド本来の二次構造に変化を与え、凝集性を低減させる事に成功したという過去の報告に基づくものである。²⁻⁵⁾ なお、中性付近の pH 条件下、水溶液中にて NCL を行うにあたり、*O*-アシルイソペプチドの *O*-to-*N* 転位反応を避けるため、Ser²⁹ の α-アミノ基は orthogonal な保護基である allyloxycarbonyl (Aloc) により保護する事とした。

pyroGlu¹-ADan1-21-Nbz (*N*-acyl-benzimidazolinone)⁴⁹⁾ を 6 M Gn·HCl/0.1 M リン酸緩衝液中 TCEP-HCl (15 eq) と sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MESNa, 25 eq) を加え、pH 6.5 に調節した後、室温で 1.5 時間反応し、逆相 HPLC で精製する事で C 末端側 α-チオエステルセグメント pyroGlu¹-ADan1-21-S-CH₂-CH₂-SO₃⁻Na⁺ (**14**, 図 2.8A) を得た。得られた **14** と通常の Fmoc 型固相合成法により得た *O*-アシルイソペプチドセグメント Aloc-Ser²⁹(ADan22-28)-Gln-Glu-Lys-His-Tyr³⁴ (**15**, 図 2.8B) とを TCEP-HCl (20 eq), MPAA (20 eq) 存在下、6 M Gn·HCl/0.1 M リン酸緩衝液中で pH 6.5 に調節した後、室温で NCL に供し (各ペプチド濃度: 1 mM), 反応の進行を HPLC により観察した (図 2.8C). 開始 5 分の時点で、既に目的化合物 **16** のピークがみられ、その後 22 時間まで NCL が進行した。22 時間後の反応溶液を逆相 HPLC により精製し、**16** を 25% の収率で得た (図 2.8D).

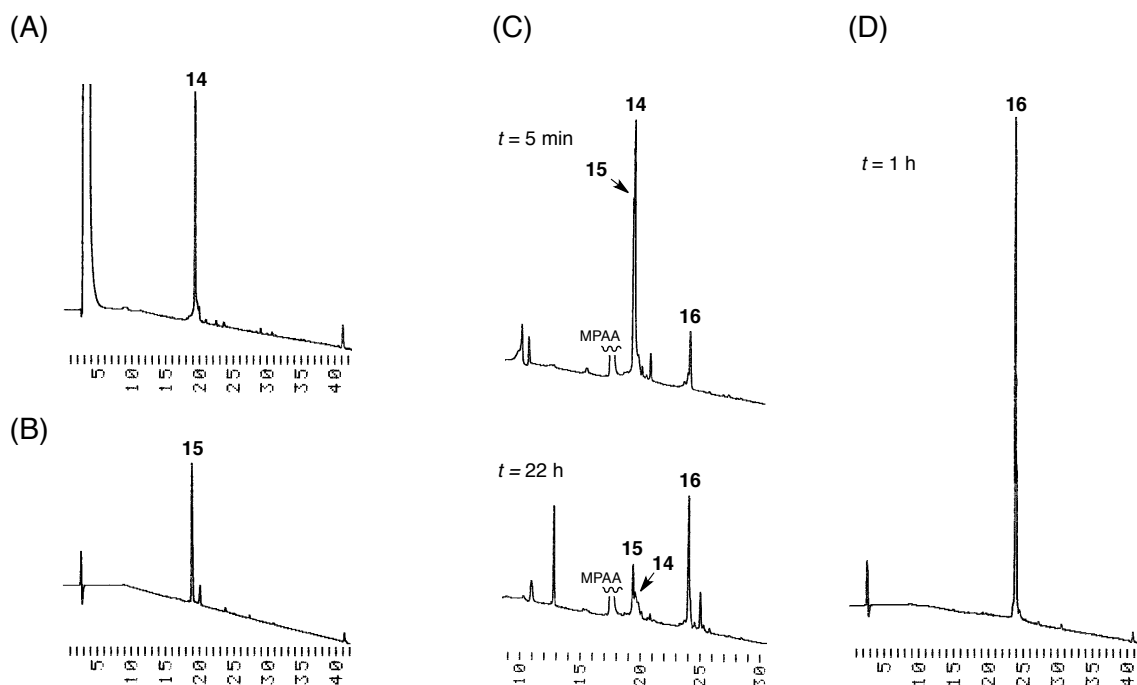


図 2.8 NCL による **16** の合成. (A) pure **14**, (B) pure **15**, (C) NCL 反応溶液, 及び (D) pure **16** の分析 HPLC チャート. 分析 HPLC 条件; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μm, 12 nm.), 0-100% MeCN, 40 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 °C).

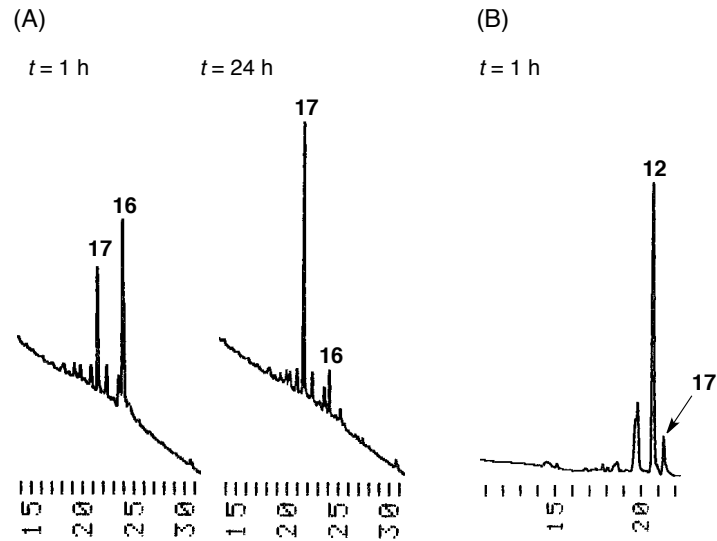


図 2.9 (A) DMSO 酸化による **17** の合成. (B) 脱 Aloc 反応による *O*-アシルイソペプチド **12** の合成. 分析 HPLC 条件; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μm , 12 nm.), 0–100% MeCN, 40 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$).

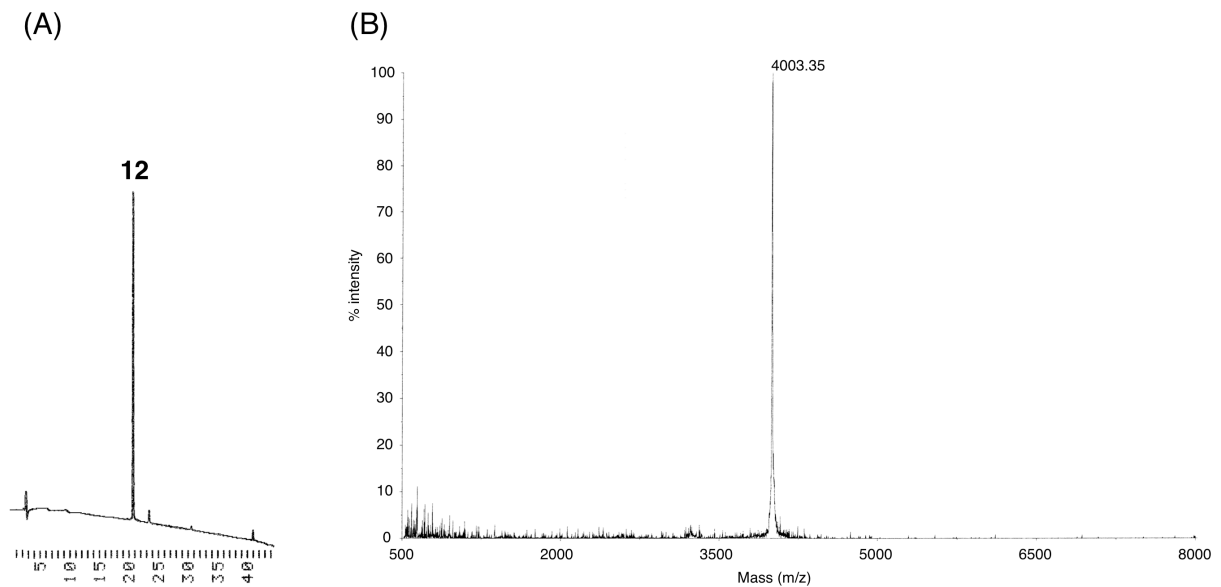


図 2.10 (A) pure **12** の分析 HPLC チャート; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μm , 12 nm.), 0–100% MeCN, 40 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$). (B) pure **12** の MALDI-MS (TOF) によるマスペクトル.

得られた **16** を 1 M HCl aq : DMSO (1:99 v/v) に溶解し (ペプチド濃度 : 90 μ M), 分子内ジスルフィド結合を形成させた (図 2.9A). 酸化反応は定量的に進行し, 24 時間後の反応溶液を逆相 HPLC により精製し, 目的化合物 **17** を得た (74%). 得られた **17** は Ar 雰囲気中 Pd(PPh₃)₄ (1 eq) と PhSiH₃ (100 eq) 共存下, 50% DCM/DMF を溶媒として用い, 脱 Aloc 反応に供した (図 2.9B).⁵⁰ 開始 1 時間で反応はほぼ進行し, 反応溶液を逆相 HPLC により精製する事で, pGlu¹-ADan[Ile21Ala] の *O*-アシルイソペプチド (**12**) を得た (84%, 図 2.10A).

精製した **12** は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) 中へ溶解し, 37°C で *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応を行い, HPLC を用いて反応の経過を観察した (図 2.11). 開始 1 分の時点で, 既に一部の **12** から親化合物である **13** への転位が認められ, 3 分のインキュベートで **12** の約半量が転位し, 30 分でほぼ定量的に転位反応が進行した. なお, ここで得られた **13** は, 別途合成した基準試料と比較して, 分析 HPLC の保持時間が同等である事を確認した.

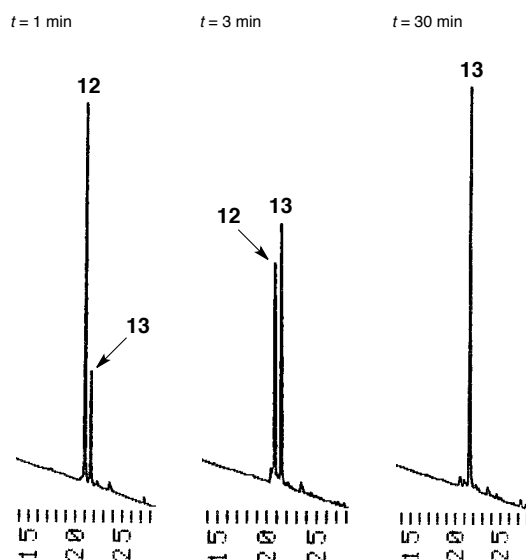


図 2.11 *O*-to-*N* 転位反応を経由した *O*-アシルイソペプチド **12** から親ペプチド pyroGlu¹-ADan [Ile21Ala] (**13**) への変換. 分析 HPLC 条件; C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μ m, 12 nm.), 0–100% MeCN, 40 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 °C).

第二節 アルツハイマー病関連低溶解性アミロイドの *O*-アシルイソペプチドにおける生物学的評価

アルツハイマー病患者脳内において特徴的な病理学的所見の一つに「老人斑」の形成がみられるが、これを構成する主要成分はアミロイド- β (A β) とよばれるペプチドである。⁵¹⁾ A β の分子種で主要なものには 40 残基及び 42 残基のアミノ酸からなる A β 1-40 と A β 1-42 があるが、A β 1-42 の方が凝集し易く、神経細胞毒性も高い事が知られている。⁵²⁻⁵⁴⁾ 近年、 β -セクレターゼなどのアミノペプチダーゼにより A β 1-40(42) の N 末端側のアミノ酸残基が欠損した A β 3-40(42) 及び A β 11-40(42) が老人斑中に多く存在する事が報告されている。⁵⁵⁾ 特に、それらの N 末端に位置する Glu が生体内のグルタミンシクラーゼ (QC)⁵⁶⁾ により環化し、ピログルタミン酸 (Pyr) となった [Pyr³]A β 3-40(42) 及び [Pyr¹¹]A β 11-40(42) は酵素分解に対して安定であり、本疾患に重要な役割を果たすものとして注目されている。⁵⁷⁻⁶²⁾

表 2.1 に示す様に、A β 1-42 (**19**), A β 11-42 (**21**), [Pyr¹¹]A β 11-42 (**23**) の水溶性はそれぞれ 0.14 mg/mL, 0.09 mg/mL, <0.01 mg/mL である。[Pyr¹¹]A β 11-42 (**23**) の水溶性が特に低い理由としては、N 末端側の親水性領域が欠損しており、かつ N 末端のイオン化し得るアミノ基が環構造をとる事で保護されるためであると考えられる。これら A β 分子種のもつ極端に低い水溶性や凝集性は実験中の取り扱いを著しく困難にしており、研究室間及び実験間でデータのばらつきや矛盾を生んでいる。^{62,63)} 特に、これまでに知られている A β 分子種と比較して、[Pyr¹¹]A β 11-42 (**23**) の凝集性や細胞毒性について論じた報告は多くない。^{64,65)}

当研究室では、Gly²⁵-Ser²⁶ の間でエステル結合をもつ A β 1-42 の *O*-アシルイソペプチド (**18**) を過去に合成し、²⁻⁵⁾ A β 1-42 の水溶性を 100 倍以上改善する事に成功している (表 2.1)。 **18** は酸性 pH 条件下において非凝集性である一方、中性 pH 条件下では *O*-to-*N* アシル転位反応を経て容易に A β 1-42 へと変換される。得られた A β 1-42 はモノマーを起点として直ちに凝集するため、**18** は再現性の良い実験系を提供する有用なツールである。⁶⁶⁻⁷⁰⁾ 本研究では、[Pyr¹¹]A β 11-42 (**23**) の低水溶性を改善する事を目的として **23** の *O*-アシルイソペプチド (**22**) を合成し (図 2.12), 生物学的評価実験を行った。

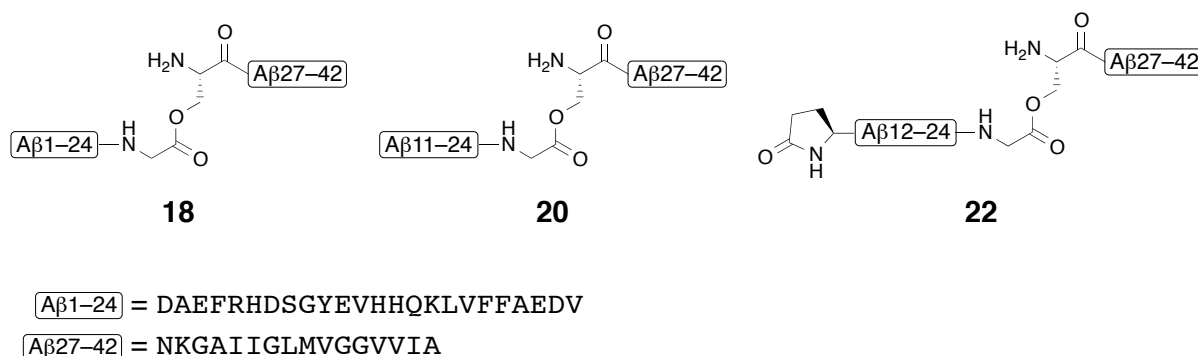


図 2.12 A β 1-42, A β 11-42 及び [Pyr¹¹]A β 11-42 の *O*-アシルイソペプチド **18**, **20** 及び **22** の構造。

表 2.1 各 A β 分子種の水溶性と保持時間.

A β 分子種	エントリー		水溶性 (mg/mL)			保持時間 (分) ^[c]	
	イソペプチド体	ネイティブ体	イソペプチド体	ネイティブ体	改善比 ^[a]	イソペプチド体	ネイティブ体
A β 1-42	18	19	15.0 ^[b]	0.14 ^[b]	107	20.4	20.8
A β 11-42	20	21	1.6	0.09	17	21.5	22.0
[Pyr ¹¹]A β 11-42	22	23	1.4	<0.01	140	21.9	22.6

[a]イソペプチド体/ネイティブ体. [b] 参考文献 2 参照. [c] 分析 HPLC 測定条件: C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μ m, 12 nm.), 0-100% MeCN 40 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 °C).

O-アシルイソペプチド **22** の水溶性は 1.4 mg/mL であり, 親である **23** の 140 倍以上の水溶性の改善が認められた (表 2.1). また, **22** の分析 HPLC の保持時間 ($t_R = 21.9$ 分) は **23** ($t_R = 22.6$ 分) よりも短くなっているが, これは *O*-アシルイソペプチドとする事で水溶性が向上したためであると考えられる. *O*-アシルイソペプチド **20** 及び **22** は十分な水溶性をもつため, 0.1% TFA aq に溶解させた後, 超遠心処理する事で 700 μ M, 500 μ M のストックソリューションをそれぞれ調製する事ができた.

得られた *O*-アシルイソペプチド **20** 及び **22** のストックソリューションは, 0.1% TFA aq (pH 2) で希釈し (ペプチド濃度: 10 μ M, 37 °C), 酸性条件下における二次構造を CD により評価した (図 2.13). *O*-アシルイソペプチド **20** 及び **22** は, 波長 198 nm 付近に極小値をもつランダムコイル構造をとり, 少なくとも 24 時間はランダムコイル構造を維持する事が確認できたが (図 2.13 B, C), これは過去に報告した **18** で見られた CD スペクトルの結果とよく一致する (図 2.13 A).⁵⁾ A β は凝集する際, 一般に β -シート構造をとる事が知られるため, **20** 及び **22** は酸性条件下においては非凝集性である事が示唆された.

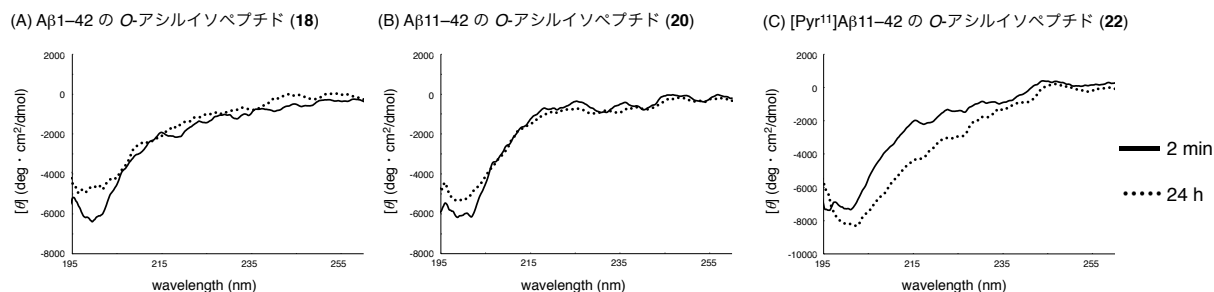


図 2.13 0.1% TFA aq (pH 2) 中における *O*-アシルイソペプチド **18**, **20** 及び **22** の CD スペクトル (区間 20 プロットの移動平均線).

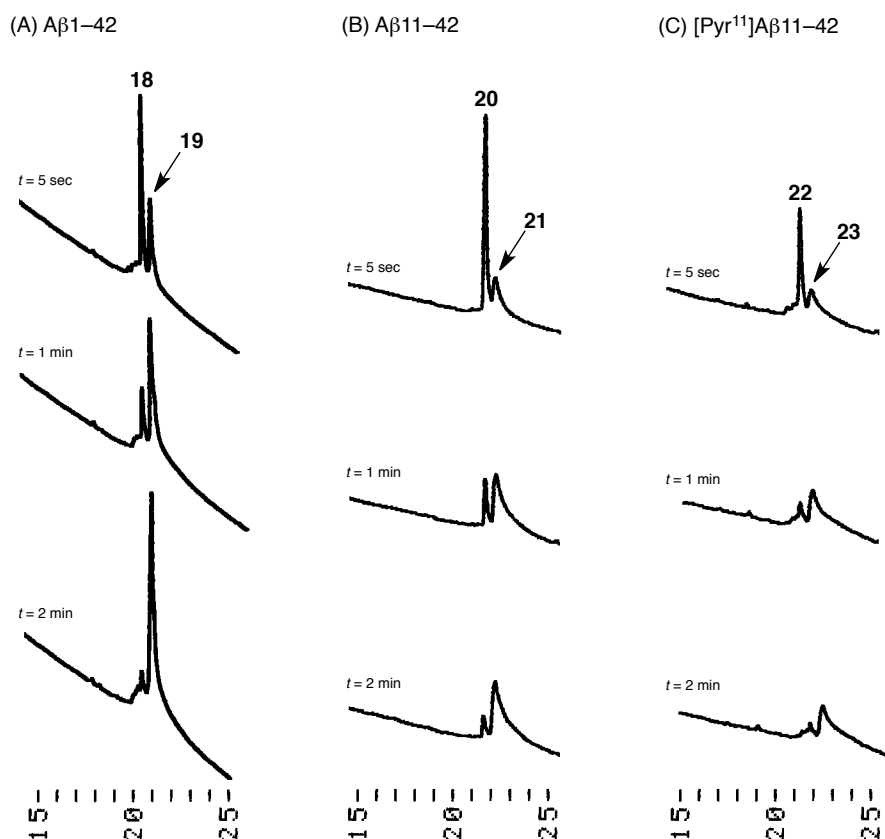


図 2.14 分析 HPLC による *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応の評価. 0.1 M リン酸緩衝液中で各 *O*-アシルイソペプチド Aβ1-42 (18), Aβ11-42 (20) 及び [Pyr¹¹]Aβ11-42 (22) をインキュベートし (pH 7.4, 37 °C), 5 秒後, 1 分後, 2 分後の転位反応の進行を分析 HPLC により評価した. 分析 HPLC 条件: C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μm, 12 nm.), 0-100% MeCN, 40 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 °C).

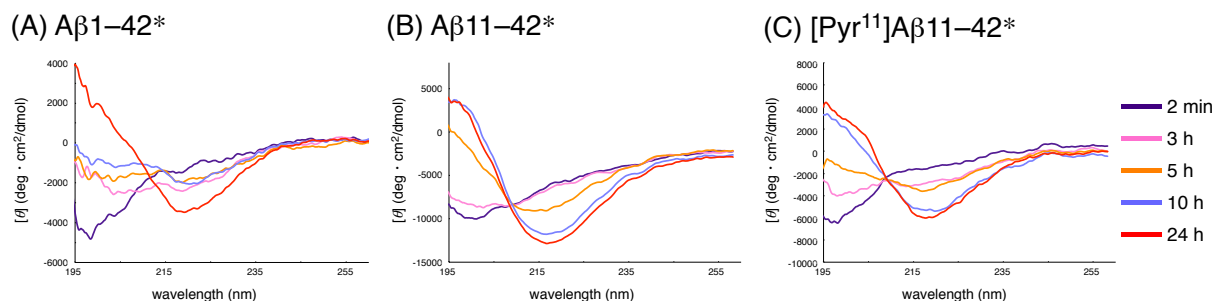


図 2.15 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 37 °C) 中における Aβ1-42, Aβ11-42 及び [Pyr¹¹]Aβ11-42 の経時的な CD スペクトルの変化 (区間 20 プロットの移動平均線). * *O*-アシルイソペプチド由来.

O-アシルイソペプチド **20** 及び **22** は 0.1 M のリン酸緩衝液中でインキュベートすると (pH 7.4, 37 °C), およそ 2 分に対応する親ペプチド **21** 及び **23** へと定量的に変換された (図 2.14 B, C). すなわち, これらの *O*-アシルイソペプチドは生体内 pH 条件下 (pH 7.4) において, 速やかに対応する親ペプチドへと変換されるため, 親ペプチドである A β 11-42 及び [Pyr¹¹]A β 11-42 の病的な凝集過程を実験的に再現する事ができると考えられた.

そこで, *O*-アシルイソペプチド **20** 及び **22** のストックソリューションを pH 7.4 のリン酸緩衝液に混合し, 実験系内で *O*-to-*N* 転位させる事で, A β 11-42 及び [Pyr¹¹]A β 11-42 の二次構造がどのように変化するかを CD により評価した (図 2.15). 2 分経過後に測定した CD スペクトルでは, いずれの場合においてもランダムコイル構造を示したが (図 2.15 B, C), これらのサンプルをさらにインキュベートし, 3, 5, 10 及び 24 時間の時点での二次構造を評価すると, β -シート構造に特徴的な 198 nm 付近の極大値と 218 nm 付近にみられる極小値が経時的に増大していき, 10 時間インキュベートした段階で CD の値は安定した. 本結果より, **20** 及び **22** が親ペプチドへと転位し, ランダムコイル構造から β -シート構造へと二次構造を変化させる速度は, 過去に報告した *O*-アシルイソペプチド **18** の場合とあまり差はみられず,⁹⁾ A β の N 末端側 10 残基及び Glu¹¹ のピログルタミン酸化の有無は A β の β -シート形成速度について与える影響は少ないと推察された.

次に, *O*-アシルイソペプチド **20** 及び **22** を用いて A β 11-42 と [Pyr¹¹]A β 11-42 の凝集性をチオフラビン-T (Th-T) 蛍光アッセイにより評価した (図 2.16). 本アッセイは, チオフラビン分子 (ex. 350 nm, em. 438 nm) が β -シート構造に富むアミロイド繊維と結合する事で, 励起波長及び蛍光波長が深色移動し (ex. 450 nm, em. 482 nm), より強い蛍光を発する事を利用したアミロイド繊維の定量法として一般的に用いられている手法である.⁷¹⁾ *O*-アシルイソペプチド **18**, **20**, **22** のストックソリューションは 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈後 (ペプチド濃度 10 μ M), 37 °C でインキュベートし, 0, 1, 3, 5, 10 及び 24 時間後における Th-T の蛍光強度を測定した. [Pyr¹¹]A β 11-42 の蛍光強度は, インキ

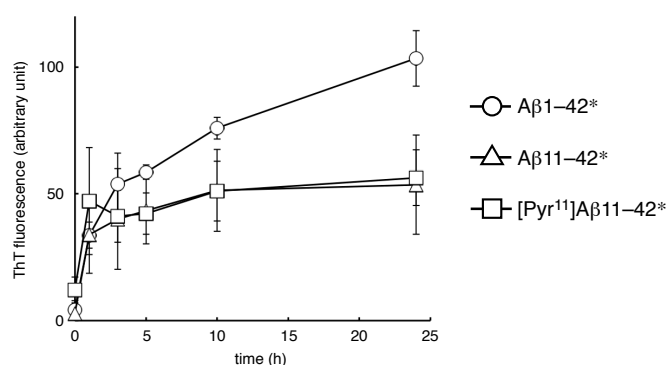


図 2.16 Th-T アッセイによる A β 11-42 及び [Pyr¹¹]A β 11-42 の凝集性の評価. 0.1 Mリン酸緩衝液中で各*O*-アシルイソペプチド A β 1-42 (**18**), A β 11-42 (**20**) 及び [Pyr¹¹]A β 11-42 (**22**) をインキュベートし (pH 7.4, 37 °C), 0, 1, 3, 5, 10, 24 時間における Th-T 蛍光強度を測定した (平均値 \pm 標準誤差). * *O*-アシルイソペプチド由来.

インキュベーション開始から 3 時間後においては、A β 1-42 と比較すると低い値を示し、24 時間後では A β 1-42 の半分程度であった。これより、[Pyr¹¹]A β 11-42 は A β 1-42 と比較して β -シート構造に富む繊維をあまり形成していない事が示唆された。この傾向は、A β 11-42 についても同様にみられ、従って A β 11-42 と [Pyr¹¹]A β 11-42 の凝集の程度は同程度であると考えられる。

A β 1-42, A β 11-42 及び [Pyr¹¹]A β 11-42 が形成する繊維の形態は、原子間力顕微鏡 (AFM) により観察する事で評価した (図 2.17)。O-アシルイソペプチド **18**, **20** 及び **22** のストックソリューションを 25 mM HEPES (pH 7.4, 100 mM NaCl 含有) 中に混合し、37 °C でインキュベーションを開始した直後 (0.5 h) では、いずれの A β 分子種においても繊維はみられなかった。A β 1-42 を 24 時間インキュベーションした後では、繊維高 3-5 nm 程度の太くしっかりとした繊維が観察された (図 2.17 A)。一方、A β 11-42 及び [Pyr¹¹]A β 11-42 を 24 時間インキュベーションした場合、A β 1-42 の時にみられたような太い繊維は観察されず、繊維高 <0.8 nm 程度の比較的細い繊維が優占的にみられた (図 2.17 B, C)。なお、本アッセイでは、A β 11-42 及び [Pyr¹¹]A β 11-42 における繊維形成速度及び繊維形態についての明確な違いは認められなかった。Th-T アッセイと AFM の結果より、A β の N 末端側 10 残基 (A β 1-10) の欠損は、形成される繊維の質を低下させるが、Glu¹¹ のピログルタミル化は繊維原性については影響を与えない事が示唆された。

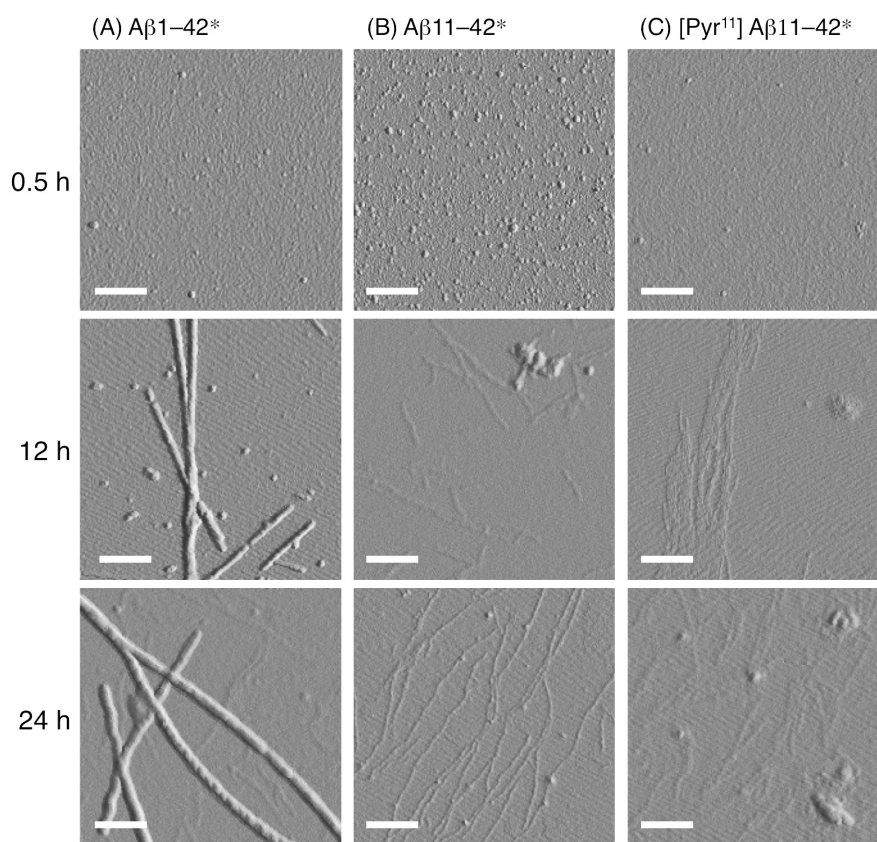


図 2.17 AFM による A β 1-42, A β 11-42 及び [Pyr¹¹]A β 11-42 の繊維形態の評価 (bar: 0.4 μ m). * O-アシルイソペプチド由来。

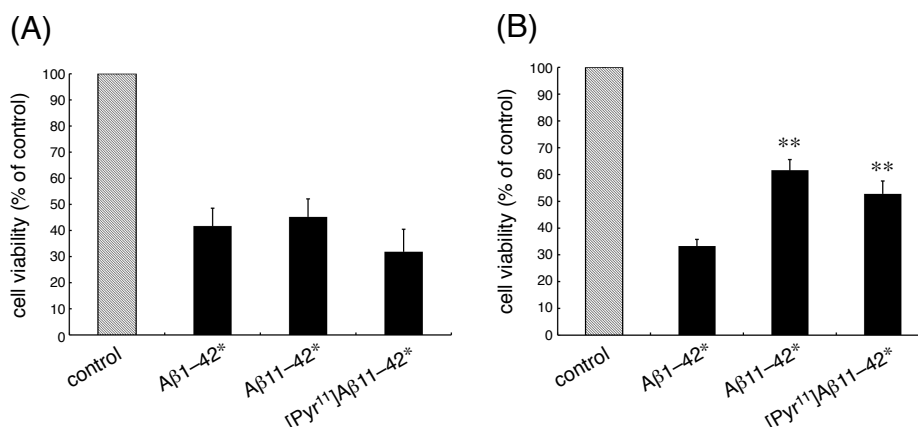


図 2.18 PC12 細胞を用いた Aβ1-42, Aβ11-42 及び [Pyr¹¹]Aβ11-42 の細胞毒性評価 (n = 3 又は 6, 平均値 ± 標準誤差). (A) 未分化型 PC12 細胞及び (B) 分化型 PC12 を用いた毒性評価 (各 Aβ 分子種の終濃度 = 10 μM). PC12 細胞の生存率は WST-8 を用いて評価した. ** $p < 0.01$ vs Aβ1-42* (one-way analysis of variance followed by dunnett's test). * O-アシルイソペプチド由来.

続いて、Aβ1-42, Aβ11-42 及び [Pyr¹¹]Aβ11-42 の細胞毒性を、ラット副腎髄質褐色細胞腫 (PC12) 細胞を用いて評価した (図 2.18). O-アシルイソペプチド **18**, **20** 及び **22** のストックソリューションは、25 mM HEPES-DMEM (pH 7.4, HS 1% 含有) 中にて、ペプチド濃度が 10 μM となるよう希釈後、48 時間インキュベートし (37 °C), PC12 細胞生存率を WST-8 を用いて決定した. 未分化型 PC12 細胞を用いた場合、Aβ11-42 及び [Pyr¹¹]Aβ11-42 を添加した際の細胞生存率は Aβ1-42 に匹敵した (図 2.18A). 一方、神経成長因子 (NGF) により交感神経節ニューロン様に分化させた PC12 細胞の場合では、Aβ11-42 及び [Pyr¹¹]Aβ11-42 の細胞生存率は Aβ1-42 と比較すると増大した (図 2.18B). これらの結果から、Aβ11-42 及び [Pyr¹¹]Aβ11-42 の神経細胞に対する毒性は、Aβ1-42 よりも低い事が示唆された.

本研究では、Aβ11-42 及び [Pyr¹¹]Aβ11-42 の低水溶性 Aβ 分子種について、超遠心処理後に得た高濃度かつ高水溶性 O-アシルイソペプチドのストックソリューションを利用し、生物学的評価試験を実施した. Aβ11-42 及び [Pyr¹¹]Aβ11-42 は NGF により分化させた PC12 細胞に対し、Aβ1-42 よりもやや低い毒性を示したが、ある程度の凝集性や細胞毒性を有している事が明らかとなった. Aβ11-42 及び [Pyr¹¹]Aβ11-42 より得られた結果を比較すると、Glu¹¹ におけるピログルタミル化が Aβ11-42 の凝集性及び細胞毒性に与える影響は少ないと考えられる. 本研究で得られた結果は、低水溶性ピログルタミン酸含有 Aβ 分子種の凝集メカニズムやアルツハイマー病発症との関わりを明らかにするために有用な知見を与えると期待される.

第三章

アミロイド β 凝集阻害剤開発への応用

アミロイド β ペプチド ($A\beta$) はアルツハイマー病患者脳内で特徴的にみられる「老人斑」の主要構成成分の一つである。 $A\beta$ はランダムコイル構造を有するモノマーから β -シート構造を形成し、オリゴマーを経てアミロイド繊維へと凝集する事が知られており、近年、この $A\beta$ の凝集過程は本疾患の発症と深く関係している事が示唆されている。⁵¹⁾

このような背景から、 $A\beta$ のアミノ酸配列に基づいた $A\beta$ 凝集阻害剤が研究されている。これらの阻害剤分子は $A\beta$ の中央 ($A\beta$ 12–24) 及び C 末端側 ($A\beta$ 30–40) に位置する β -シート形成領域^{72–74)} を模倣しており、多くの場合 *N*-メチル化やプロリン置換などの修飾が施されている。例えば、 $A\beta$ の自己認識部位として知られる KLVFF ($A\beta$ 16–20)^{75–83)} やその自己凝集性を改善した LPFFD ($A\beta$ 17–21(Val18Pro)),^{84–86)} 或いは $A\beta$ 25–35⁸⁷⁾ や C-terminal fragment (CTF)^{88,89)} などがこれまでに報告されている。 β -シート形成領域は $A\beta$ が凝集する際の自己認識部位として重要であるが、^{72–74)} これらのペプチド性阻害剤は $A\beta$ 分子と β -シート形成領域で疎水的相互作用や水素結合する事で $A\beta$ の凝集を競合的に阻害すると考えられている。 $A\beta$ の凝集機構が未だ不明であるため、このような凝集阻害剤は $A\beta$ の凝集機構やその阻害作用を明らかにする上で有用である。

一方、当研究室では $A\beta$ 1–42 のペプチド鎖中 Gly²⁵-Ser²⁶ 間でエステル結合を持たせた非凝集性・高水溶性の $A\beta$ 1–42 前駆体である *O*-アシルイソペプチド (**18**, 図 3.1) を過去に報告している。^{2–5)} **18** は酸性 pH 条件下で安定であり、生理的条件下 (pH 7.4) においては *O*-to-*N* 分子内アシル基転位反応により、迅速かつ定量的にネイティブ $A\beta$ 1–42 へと変換される。これは、**18** のもつ *O*-アシルイソペプチドの部分、すなわち Gly²⁵-Ser²⁶ のエステル部分が $A\beta$ 分子の凝集に重要な役割を果たしている事を示唆している。本研究では **18** を $A\beta$ 凝集阻害剤として応用する事を検討した。さらに、**18** は生理的条件下では *O*-to-*N* 転位により評価する事ができないため、中性で安定な誘導体 **24** を合成し、その凝集阻害活性の評価も行った。

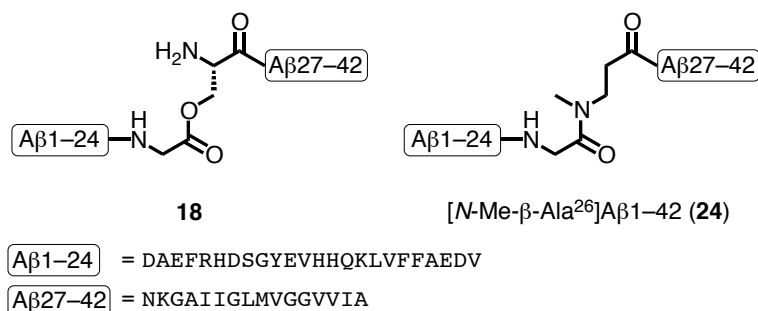


図 3.1 $A\beta$ 1–42 の *O*-アシルイソペプチド (**18**) と安定誘導体 (**24**) の構造。

第一節 O-アシルイソペプチドのネイティブ A β 1-42 に対する凝集阻害作用の評価

著者は、酸性中で非凝集性の **18** が Gly²⁵-Ser²⁶ の部分以外は A β 1-42 のアミノ酸配列を保存しているため、ネイティブ A β 1-42 と相互作用でき、凝集を阻害できるのではないかと考えた。そこで、本研究ではネイティブ A β 1-42 の凝集に与える **18** の影響を AFM により評価した (図 3.2)。A β 1-42 (10 μ M) と **18** (10 μ M 又は 30 μ M) を混合したサンプルを 0.1% TFA aq (pH 2, 37°C) 中でインキュベートし、0.5, 7 及び 11 時間後におけるサンプルを AFM により観察した。対照実験としてネイティブ A β 1-42 単独及び **18** 単独の観察も行った。A β 1-42 単独の場合では、0.5 時間ではオリゴマー由来の粒状の物体が観察され、7-11 時間では経時的に繊維量が増大した。一方、**18** 単独では、粒状の物体は観察されたものの、繊維は観察されなかった。この結果は、過去の研究より示された **18** が非凝集性であるという結果と一致するものである。²⁻⁵⁾ A β 1-42 と **18** を 1 : 1 の割合で混合した場合、A β 単独と比較して繊維の量は減少し、1 : 3 の割合で混合した場合には、繊維の量はさらに減少した。この結果より、**18** は A β 1-42 の繊維形成を濃度依存的に抑制する事が示唆された。

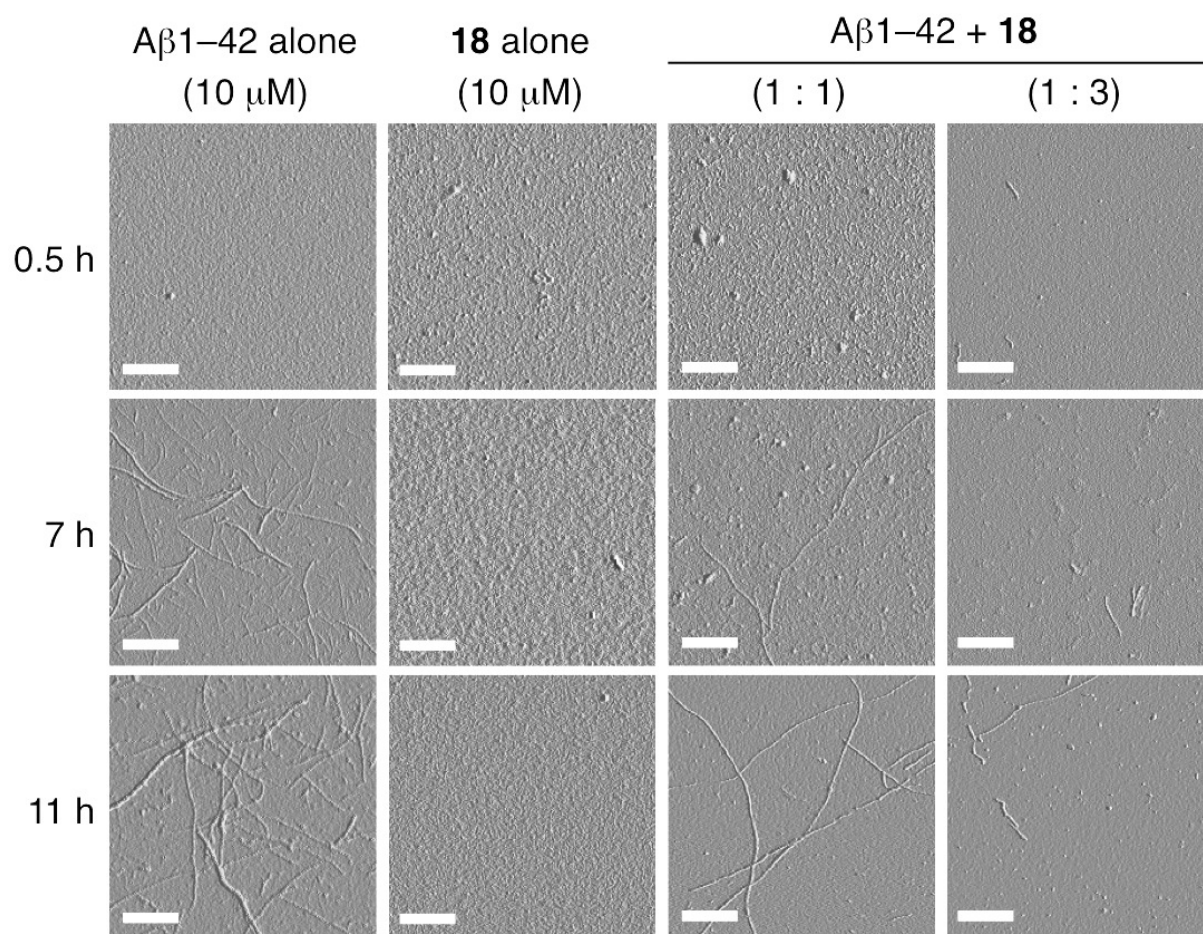


図 3.2 0.1% TFA aq (pH 2) 中インキュベート条件における AFM による **18** の繊維形成阻害活性の評価 (bar: 0.4 μ m).

第二節 O-アシルイソペプチドの安定誘導体の分子設計と合成

しかしながら、O-アシルイソペプチド **18** は中性では O-to-N 分子内アシル転位反応を経て直ちにネイティブ Aβ1-42 へと転位してしまうため、中性においても安定な O-アシルイソペプチド誘導体 **24** を設計した (図 3.3). 誘導体 **24** の設計にあたり、O-アシルイソペプチドのもつ β-エステル結合から β-アミド結合にすることで加水分解に対してより安定とし、O-アシルイソペプチドがエステル部分で水素結合供与能を持たないという特徴を模倣するために、アミド窒素をメチル化する事とした.^{90,91)} 誘導体 **24** は通常の Fmoc 型固相合成法によりペプチド鎖を構築し、TFA で脱樹脂した後、得られた粗ペプチド **27** の Met(O)³⁵ を DMS (40 eq), NH₄I (40 eq) により還元し、逆相 HPLC にて精製を行うことで合成した (図 3.3, 収率 4.6%).

合成した誘導体 **24** が O-アシルイソペプチド **18** の特徴を中性条件下でも模倣できているかどうかを確かめるため、**24** を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2, 37 °C) 中に溶解し、CD スペクトルの測定を行った (図 3.4A). 誘導体 **24** は、ランダムコイル構造に特徴的にみられる 200 nm 付近の極小値をもち、少なくとも 24 時間のインキュベートでは O-アシルイソペプチド **18** と同様にランダムコイル構造を維持する事が示唆された (図 2.13A vs 図 3.4A). また、誘導体 **24** を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2, 37 °C) 中でインキュベートし、HPLC 分析を行った結果、誘導体 **24** のピーク面積が 0 時間と 24 時間インキュベートでほとんど変化しない事から、少なくとも 24 時間は安定であると考えられた (図 3.4B).

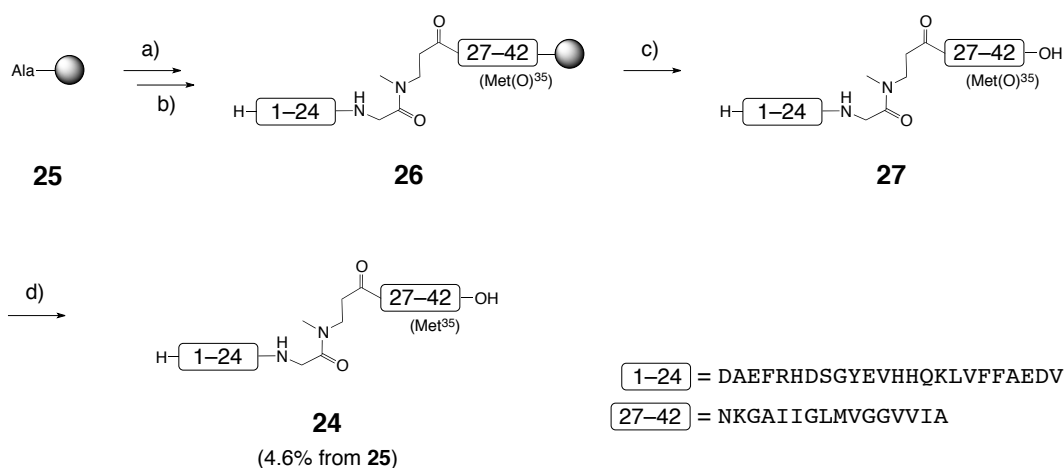


図 3.3 安定誘導体 **24** の合成.: a) Fmoc-AA-OH (5 eq), DIC (5 eq), HOBt (5 eq), DMF (3 mL), 1h, rt.; b) 20% piperidine/DMF, 10 min, rt.; c) H₂O : TIS : TFA (2.5 : 2.5 : 95), 90 min, 0 °C → rt.; d) DMS (40 eq), NH₄I (40 eq), TFA, 60 min, 0 °C.

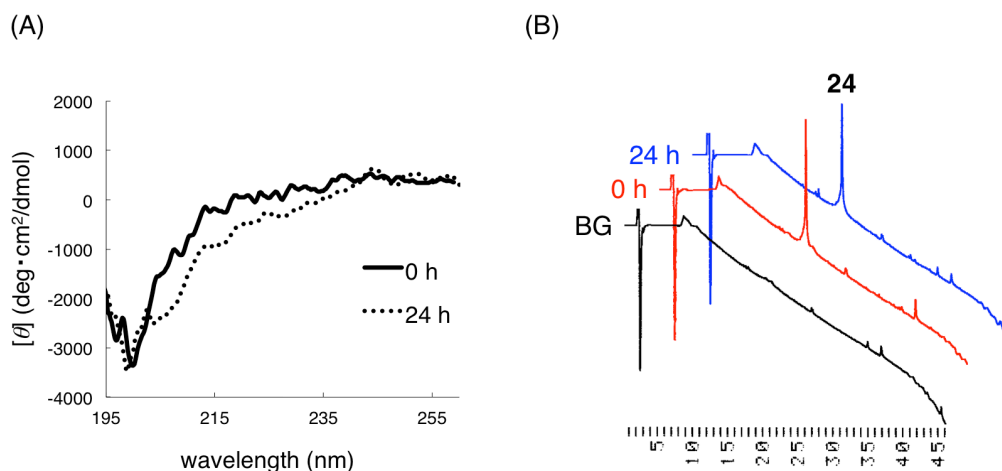


図 3.4 0.1M リン酸緩衝液中でインキュベート (pH 7.2, 37 °C) した際に誘導体 **24** の安定性確認実験. (A) CD スペクトル測定によるランダムコイル構造維持の確認 (区間 20 プロットの移動平均線). (B) 分析 HPLC による安定性確認. BG = back ground. 分析 HPLC 条件: C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μ m, 12 nm.), 0–100% MeCN, 40 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 °C).

第三節 安定誘導体のネイティブ A β 1–42 に対する凝集阻害作用の評価

まず、酸性条件下で *O*-アシルイソペプチド **18** が A β 1–42 の凝集を抑制した時と同様に (図 3.2), 誘導体 **24** が中性条件下において A β 1–42 の凝集を抑制するかどうかを調べるため、蛍光アノトロピーアッセイを行った (図 3.5). 本アッセイは蛍光基の回転運動の程度を測定する手法であり、近年、A β の凝集を評価する目的で蛍光アノトロピーアッセイを用いた報告がされている.^{92–94)} 本実験では A β 1–42 の N 末端側を 5-carboxyfluorescein (FAM) で標識した 5-FAM-A β 1–42 を 5% 含む A β 1–42 を用い、A β 1–42 単独 (5 μ M), A β 1–42 (5 μ M) + betulinic acid⁹²⁾ (5 μ M), A β 1–42 (5 μ M) + nordihydroguaiaretic acid⁹⁵⁾ (NDGA; 5 μ M), A β 1–42 (5 μ M) + **24** (5 μ M) をそれぞれ 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中 37 °C でインキュベートし、0, 5 及び 10 時間後の蛍光アノトロピーを測定した (図 3.5A). A β 1–42 単独 (5 μ M) では、0 時間における蛍光アノトロピーの値は 0.07 であり、そこから 5 時間で最大値 0.18 をとり、10 時間後においてもその値は維持された. 蛍光アノトロピーが増大した事は、A β 1–42 が凝集した事により、A β 1–42 を標識している FAM 基の周辺が混み合うため、FAM 基の回転運動が抑制された事を示唆している. A β 1–42 の凝集を促進する事が報告されている betulinic acid を添加した場合には、A β 1–42 単独時にみられた場合と同様、経時的な蛍光アノトロピー値の増大が観察された. 一方、A β 1–42 の凝集阻害剤として知られる NDGA を加えた場合では、蛍光アノトロピー値は低く抑えられた. 本結果より、A β 1–42 の蛍光アノトロピー値は A β 1–42 の凝集状態をよく反映していると考えられる. ここに、誘導体 **24** (5 μ M) を添加した場合には、0 時間にお

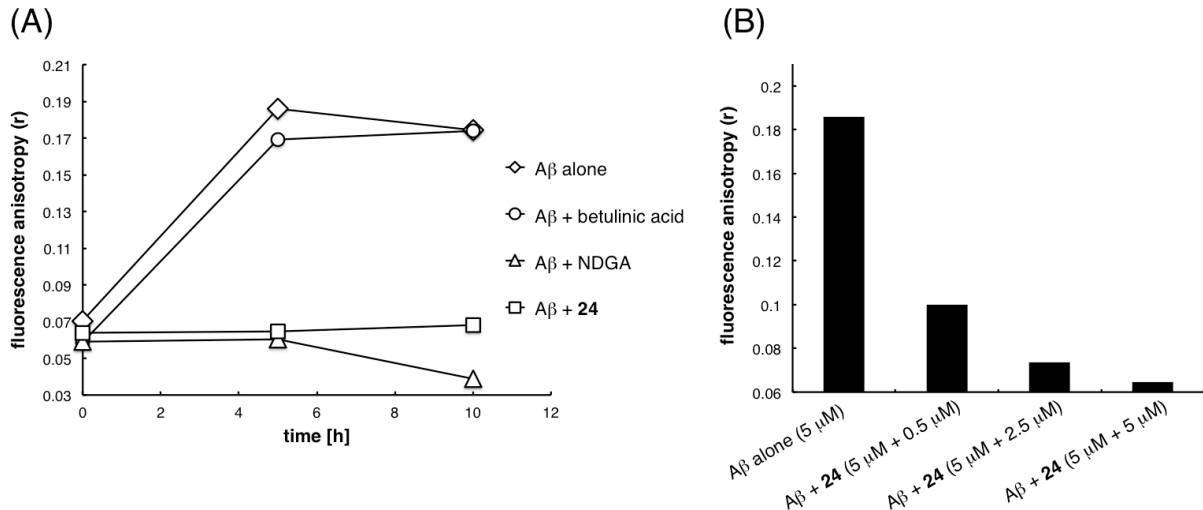


図 3.5 蛍光アニソトロピーアッセイによる **24** の Aβ1-42 凝集阻害活性の評価. (A) Aβ1-42 単独 (5 μM), Aβ1-42 (5 μM) + betulinic acid (5 μM), Aβ1-42 (5 μM) + NDGA (5 μM), Aβ1-42 (5 μM) + **24** (5 μM) をリン酸緩衝液中でインキュベートし (pH 7.4, 37 °C), 0, 5, 10 時間後の蛍光アニソトロピーを測定した. (B) Aβ1-42 (5 μM) + **24** (0.5 μM, 2.5 μM, 5 μM) をリン酸緩衝液中でインキュベートし (pH 7.4, 37 °C), 5 時間後における蛍光アニソトロピーを測定した.

けるアニソトロピーの値は 0.06 を示し, その値は 5-10 時間に渡って低く維持された. さらに, Aβ1-42 (5 μM) に対して **24** をそれぞれ 0.5, 2.5, 5 μM 共存させ 5 時間インキュベートしたところ, Aβ1-42 の蛍光アニソトロピーの値はそれぞれ 0.10, 0.07, 0.06 を示し, 誘導体 **24** の濃度比率が増大するに従って, 蛍光アニソトロピーの値は抑制された. すなわち, 誘導体 **24** は Aβ1-42 の凝集を濃度依存的に抑制する事が示唆された (図 3.5B).

次に, 誘導体 **24** が Aβ1-42 のオリゴマー形成を阻害するかどうかを調べるため, ウェスタンブロット法による評価を行った (図 3.6).⁹⁶⁾ Aβ1-42 (10 μM), Aβ1-42 + **24** (10 μM + 10 μM, 30 μM) のリン酸緩衝液溶液 (pH 7.4) を 37 °C でインキュベートした後, 各測定時間 (0, 3, 6, 12, 24 時間) におけるそれぞれのサンプルの一部を Nu-PAGE® Bis-Tris 4-12% gel を用いて電気泳動に供し, PVDF 膜への転写後, 抗 β-Amyloid (1-16) モノクローナル抗体 (6E10) を一次抗体に用い検出を行った. サンプル調製直後の全てのサンプル (0 時間) で, 4 kDa 周辺に Aβ1-42 モノマーに相当するバンドが主として確認された. Aβ1-42 単独のサンプルでは, 3 時間後に Aβ1-42 オリゴマーに由来するバンドが 50 ~ 80 kDa 付近に現れ, その後オリゴマーのバンド強度はインキュベート時間の経過に伴い減弱した. これは, インキュベート時間が増大するに従い, Aβ1-42 オリゴマーから繊維への凝集が進行し, 繊維形成のために必要なオリゴマー種が消費されたためであると考えられる. Aβ1-42 と **24** とを 1:1 で共存させた条件では, Aβ1-42 単独時と比較して, オリゴマーバンドが減弱していく速度に遅延がみられた. さらに, Aβ1-42 と **24** とを 1:3 で共存させた場合では, Aβ1-42 のオリゴマーバンドの強度はイン

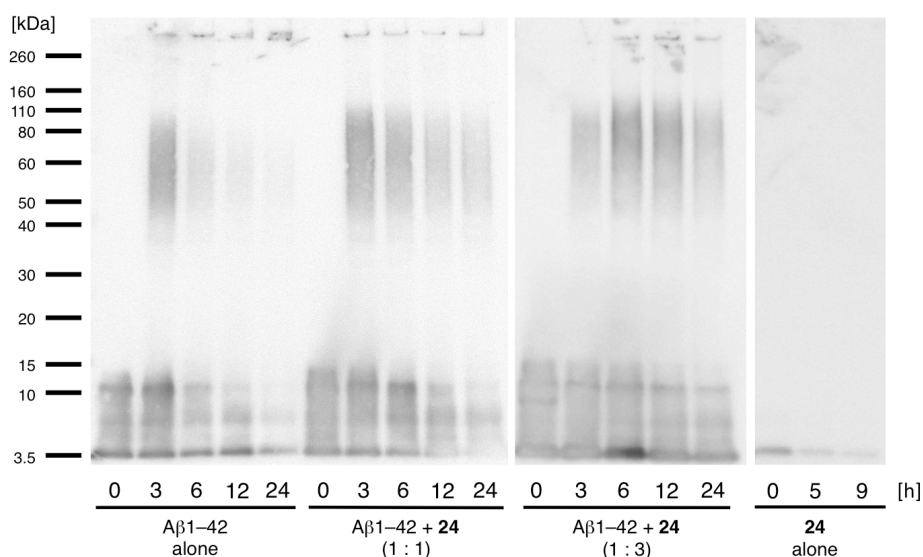


図 3.6 ウェスタンブロット法による誘導体 **24** の A β 1-42 オリゴマー形成阻害活性の評価. A β 1-42 単独 (10 μ M), A β 1-42 + **24** (10 μ M + 10 μ M, 30 μ M), **24** 単独 (10 μ M) をリン酸緩衝液中でインキュベートし (pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C), 各測定時間 (3, 6, 12, 24 時間) におけるそれぞれのサンプルの一部を Nu-PAGE[®] Bis-Tris 4-12% gel を用いて電気泳動に供した. PVDF 膜へ転写後, 抗 β -Amyloid(1-16) モノクローナル抗体 (6E10) を一次抗体に用い検出を行った. 11 kDa 周辺にみられたバンドは SDS 由来のアーティファクトである可能性がある.⁹⁷⁾

キュベート開始 6 時間後で最大となり, その後インキュベート時間が増大するに従い減弱していった. すなわち, オリゴマーバンドのピーク強度が現れる時間が, 3 時間後から 6 時間後へとシフトする事が確認された. これらの結果より, **24** は A β 1-42 のオリゴマー形成を濃度依存的に遅らせ, さらに大きな会合体への進行を遅延させると考えられる.

続いて **24** の A β 1-42 の繊維形成に対する影響を調べるため, A β 1-42 単独 (5 μ M), **24** 単独 (5 μ M) 及び A β 1-42 (5 μ M) + **24** (5 μ M) それぞれのサンプルを 0.1 M HEPES 緩衝液 (pH 7.4; 100 mM NaCl 含有) 中へ混合し, 調製直後 (0.5 時間) 及び 6 時間インキュベート (37 $^{\circ}$ C) 後のサンプルを AFM を用いて観察した (図 3.7). A β 1-42 単独の場合, 0.5 時間では A β オリゴマー由来と考えられる粒状の物体がみられ (図 3.7, 左上),^{54,96)} 6 h 経過時点ではフィブリルが主として観察された (図 3.7, 左下). 一方, **24** 単独では, 6 時間後においても繊維の形成はみられなかった (図 3.7, 中央下). A β 1-42 に **24** を共存させた場合では, 0.5 時間で粒状の物体が観察され (図 3.7, 右上), 6 時間経過時点においてもその状態を維持し, 繊維の形成は確認されなかった (図 3.7, 右下). 本結果より, **24** は A β 1-42 の繊維形成を阻害する事が示唆された.

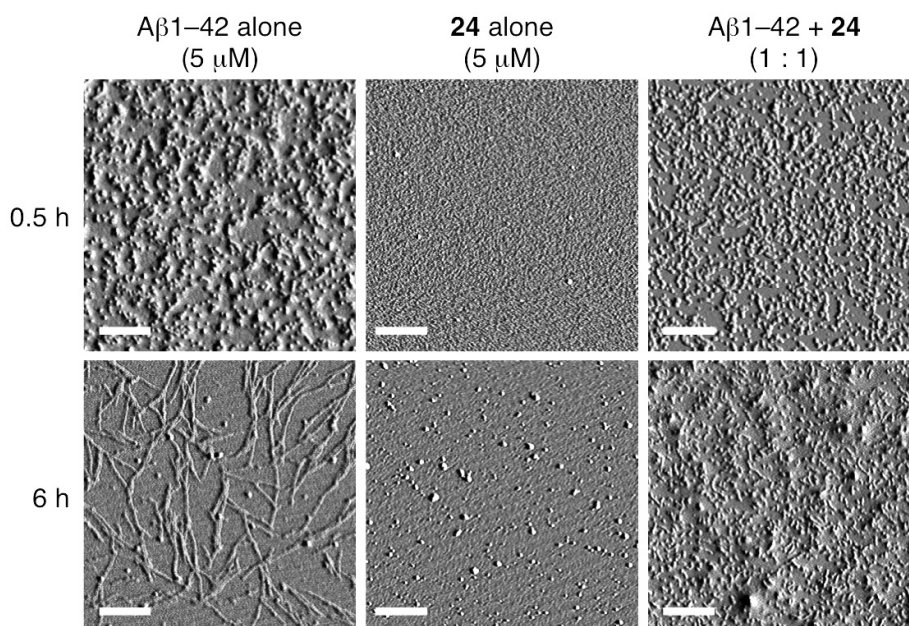


図 3.7 0.1 M HEPES 緩衝液 (pH 7.4; 100 mM NaCl 含有) 中インキュベート条件における AFM による **24** の A β 1-42 繊維形成阻害作用の評価 (bar = 0.4 μ m).

O-アシルイソペプチド (**18**) 及び中性条件下での加水分解に対する安定性を高めた [N-Me- β -Ala²⁶]-A β 1-42 (**24**) は酸性条件下及び中性条件下でそれぞれ A β 1-42 の凝集を抑制した。これらの化合物は Gly²⁵-Ser²⁶ の修飾部分を除けば A β 1-42 と同じ構造を有する。この修飾部位は、A β 1-42 が繊維を形成する際、Asp²³ と Lys²⁸ の塩橋により形成されるターン領域に位置している。⁷²⁻⁷⁴ KLVFF⁸⁴⁻⁸⁶ や CTF^{88,89} など、これまでに β -シート領域にフォーカスしたペプチド性阻害剤の報告はされてきたが、**18** 及び **24** のように A β のターン領域だけを修飾し、A β の凝集を阻害するものはこれまでに報告されていない。今後は構造活性相関を通じた小分子化、阻害メカニズムの詳細な検討が望まれるが、これらの化合物は従来とは異なる新しいメカニズムをもった A β 1-42 凝集阻害分子の開発につながる可能性があると期待される。

結語

本研究では、当研究室で開発の続いている *O*-アシルイソペプチドの特性を利用し、エピメリ化を伴わない環状ペプチド合成法の開発及び疎水性ペプチドの効率的合成法の開発を行った。さらに、これらの応用として、アルツハイマー病に関連するアミロイド β ペプチド ($A\beta$) 凝集阻害剤開発研究も行った。今回得られた結果より、*O*-アシルイソペプチドを利用すれば、創薬シードとして重要な環状ペプチドや、生体内で重要な役割を果たすと考えられているアミロイドペプチドなどを効率的に合成する事ができ、凝集性や溶解性を改善できる利点を活かして生物学的アッセイの実施が可能になると考えられる。また、各種アッセイを容易に行う目的で合成された $A\beta_{1-42}$ の *O*-アシルイソペプチドは、酸性条件下において、ネイティブ $A\beta_{1-42}$ の繊維形成を阻害し、その阻害活性は中性条件下で安定な誘導体 [*N*-Me- β -Ala²⁶] $A\beta_{1-42}$ (**24**) においても維持される事が明らかとなった。

近年、アルツハイマー病における $A\beta$ や II 型糖尿病におけるアミリン、パーキンソン病における α -シヌクレインなどの低溶解性・凝集性ペプチドが、それらの病態に重要な役割を果たしていると考えられているが、本研究がそのような疾患の病態解明や治療薬開発に少しでも貢献する事を期待する。

謝辞

終わりに臨み、本研究及び本論文の作成に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学 薬品化学分野 赤路健一 教授に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたって、全般にわたり御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学 薬品製造学分野 山下正行 教授に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたって、多大な御指導と御助言を賜りました京都薬科大学 木曾良明 教授 (現長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部 客員教授) に謹んで感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたって、全般にわたり直接の御指導を賜りました京都薬科大学 相馬洋平 助教 (現 東京大学大学院 薬学研究科 ERATO 金井触媒分子生命プロジェクト 医薬機能グループリーダー) に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたって、格別の御便宜を図って頂きました京都薬科大学 薬品化学分野 木村徹准教授 (現 京都薬科大学 学生実習支援センター 准教授), 服部恭尚 助教, 小林数也 助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたって、有益な御助言を賜りました京都薬科大学 21 世紀 COE プログラム 向井秀仁 COE 特任講師 (現 長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部 准教授) に深く感謝致します。

原子間力顕微鏡の測定にあたり、多大な御指導と御助言を賜りました大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質構造形成研究室 後藤祐児 教授, 八木寿梓 助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたって、御助言を賜りました東海大学 北條裕信 教授に厚く御礼申し上げます。

蛍光アニソトロピーアッセイを行うにあたり、多大な御指導と御助言を賜りました東京大学 有機合成化学教室 金井求 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の実験を行うにあたって、多大なご協力を頂きました京都薬科大学 薬品化学分野 谷口敦彦 博士, 吉矢拓 博士, 水口貴章 博士, 長谷川由佳 修士, 中西智哉 修士, 平山雄太 修士, 山崎萌 修士, 岡本一洸 学士, 北村仁美 学士, 來間有美 学士, 小林一矢 学士, 高木和歌子 学士, 辻本佳亮 学士, 古谷未希 学士, 山梨航 学士, 大野詩歩 氏, 高橋昌宏 氏, 安藤尚意 氏, 前田育子 氏, ならびに京都薬科大学 薬品化学分野に在籍しておりました諸氏に感謝致します。

本研究の一部は、日本学術振興会特別研究員制度の助成の下に行いました。

また、本論文の作成にあたり、御助言を賜りました京都薬科大学 代謝分析学分野 安井裕之 教授に深く感謝致します。

最後に、常に私を支えて下さった 父 川島成三郎, 母 川島美智代 に心より深く感謝致します。

実験の部

使用機器について

分析用 HPLC (ポンプ: L-2130 (日立製作所), 紫外可視吸光検出器: L-2420 (日立製作所), カラムオーブン: L-2300 (日立製作所), クロマトデータ処理装置: D-2500 (日立製作所)) には C18 逆相カラム (4.6 × 150 mm; YMC Pack ODS AM302) を用い, 検出波長 220 nm 或いは 230 nm において, 0.1% TFA 水溶液及び CH₃CN の濃度勾配による溶出を行った (流速: 0.9 mL min⁻¹, カラム温度: 40°C). 分取用 HPLC (ポンプ: 600 Controller (Waters), 紫外可視吸光検出器: 486 Tunable Absorbance Detector (Waters), クロマトデータ処理装置: D-2500 (日立製作所)) には C18 逆相カラム (20 × 250 mm; YMC Pack ODS SH343-5) を用い, 検出波長 230 nm において, 0.1% TFA 水溶液及び CH₃CN の濃度勾配による溶出を行った (流速: 5.0 mL min⁻¹, カラム温度: 室温). なお, 分析用及び分取用 HPLC の溶離液には全て高速液体クロマトグラフ用のものを使用した. MALDI-TOF-MS スペクトルの測定には飛行時間型質量分析計 Voyager DE-STR (Applied Biosystem) を使用し, α-CHCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) をマトリックスとして用いた. 固相合成時, 縮合反応などで樹脂を攪拌させる際には高速振盪機 (CM-1000, EYELA) を用いた. 凍結乾燥機には FreeZone Plus 2.5 Liter Cascade Benchtop Freeze Dry System (LABCONCO) を使用した. CD スペクトルの測定には円偏光二色性分光光度計 (Jasco J-720WI spectropolarimeter, 日本分光) を使用した. 蛍光アノトロピーの測定には分光蛍光光度計 (RF-5300PC, 島津製作所) を使用した. 超遠心分離機には Beckman TL-100 を使用し, ローターには TL-100.1 を使用した (435,000g, 4 °C, 3 時間).

原子間力顕微鏡 (AFM) には Nanoscope IIIa (ブルカー・エイエックスエス) または Nano Wizard II (JPK instrument) を使用した. なお, 前者の AFM を使用する場合は, ヘッドに MultiMode head を, スキャナーに E-シリーズピエゾセラミックスキャナー 6056E を使用した. カンチレバーには OMCL-AC160TS-R3 (共鳴周波数; 300 kHz, バネ定数; 26 N/m, Olympus) を使用した.

Nu-PAGE® を行うにあたり, 日本エイドー社の泳動槽を用い, PowerPac™ basic (Bio-Rad) を電源装置として使用した. 転写槽は TE22 Mini Tank Transfer Unit (GE healthcare) を使用した. バンドの検出にはルミノイメージアナライザー LAS-4000UVmini (富士フィルム) を使用した.

細胞実験を行うにあたり, CO₂ インキュベーターには HERAcell 150 (Thermo Electron) を使用し, 細胞の観察には倒立型光学顕微鏡 Eclipse TE300 Microscope (Nikon) を使用した. 細胞継代時に用いる遠心分離機には himac CF16RX (日立製作所) を使用し, ローターにはスウィングローター T5SS31 を使用した (120g, 室温, 5 分). 生細胞測定のマイクロプレートリーダーには SH-1000 (日立製作所) を用いた.

合成実験

一般操作

試薬について

Fmoc 保護アミノ酸及び樹脂は全てメルク株式会社, 渡辺化学工業株式会社より購入した. その他の試薬類は, 和光純薬工業株式会社, ナカライテスク株式会社, シグマアルドリッチジャパン株式会社及びペプチド研究所株式会社より購入し, これ以上の精製は行わずに実験に使用した.

Fmoc 型固相合成法によるペプチド鎖の構築

各反応の前にペプチド樹脂を DMF 中で振盪させることで, 十分に膨潤させた. Fmoc 基の除去では, 反応容器中のペプチド樹脂に 20% piperidine/DMF (1.5–2.5 mL) を加えて 1 分間振盪した後, 反応溶液を濾過し, 新たに 20% piperidine/DMF (1.5–2.5 mL) を加えて室温で 20 分振盪した. 反応後, 濾液が中性になるまで, DMF (1.5–2 mL x 10), CHCl₃ (1.5–2 mL x 5) を用いて十分に洗浄し, Kaiser 試験⁹⁸⁾ のためにペプチド樹脂の一部を取り置いた. Fmoc アミノ酸の縮合では, 反応容器中のペプチド樹脂に Fmoc アミノ酸 (2.5 eq), HOBt (2.5 eq), DMF (2 mL) を加え, 最後に DIC (2.5 eq) を添加してから室温で 2 時間振盪した. なお, Fmoc アミノ酸の側鎖保護基にはそれぞれ以下のものを採用した: Boc (Lys), *t*Bu (Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr), Pmc (Arg), Trt (Asn, Cys, Gln, His). 縮合反応後のペプチド樹脂を DMF (1.5–2.5 mL x 5) で十分に洗浄し, ペプチド樹脂の一部を取り, Kaiser 試験を行い縮合反応の進行を確認した. 各反応が完了していないと判断した場合は, 必要に応じて Fmoc 基の除去又は Fmoc アミノ酸の縮合を行った. 上記の操作を繰り返し行い, 目的のペプチド鎖を構築した.

固相合成における脱保護・脱樹脂

ペプチド鎖の構築を終えた樹脂を MeOH (1.5–2 mL x 5) で洗浄し, 真空ポンプで乾燥させたものに, TFA カクテル [*m*-cresol : thioanisole : H₂O : TFA (2.5 : 2.5 : 2.5 : 92.5) 又は H₂O : triisopropylsilane : TFA (2.5 : 2.5 : 95)] を 0 °C 下で加え (~20 mL/g (ペプチド樹脂)), その後室温で 90 分間攪拌した. 反応液から樹脂をガラスフィルターで濾去し, 濾液は減圧下濃縮を行った. 得られた濃縮液に 0 °C 下で Et₂O を加え粗ペプチドを沈殿させ, 遠心分離 (120 g, 5 min, rt) した後, 上清を取り除いた. 得られた粗ペプチドは H₂O : MeCN (1 : 1, 0.1% TFA aq 含有) に懸濁し, 凍結乾燥する事で, 無晶形粉末とした.

HPLC 精製

粗ペプチドを DMSO に溶解し, 0.46 µm 径のフィルターで濾過後, 0.1% TFA aq-MeCN のグラジエント系を用いた分取用逆相 HPLC (流速 : 5 mL/min, カラム温度 : 40 °C, λ : 230 nm) に供し, 目的ペ

チドを含む溶出分画を集めて凍結乾燥し、無晶形粉末として得た。精製後のペプチドは $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 又は $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ の暗所に保存した。

2-chlorotriylchloride resin へのアミノ酸の導入

Ar 雰囲気下、反応容器に 2-chlorotriylchloride resin (200 mg, 1.3 mmol/g, 0.26 mmol), Fmoc-Xaa-OH (0.065 mmol), 1,2-dichloroethane (1.5 mL), 及び DIEA (0.13 mmol) を順次加え、室温で 2.5 時間振盪した。反応後の Fmoc アミノ酸樹脂を DMF (1.5–2.5 mL x 5) で洗浄し、DMF (1.5 mL–2.5 mL), MeOH (200 μL) 及び DIEA (0.26 mmol) を加えて室温で 20 分間振盪した (x 2)。その後、Fmoc アミノ酸樹脂を DMF (1.5–2.5 mL x 5), DMF : H₂O (1 : 1, 1.5–2.5 mL x 5), CHCl₃ (1.5–2.5 mL x 2), MeOH (1.5–2.5 mL x 2) で十分に洗浄し、真空ポンプを用いて乾燥させた。

次に、その Fmoc アミノ酸の導入率を測定する為に、10 mL メスフラスコに乾燥した Fmoc アミノ酸樹脂の一部 ($W = 2.00\text{--}4.00\text{ mg}$) を精密に量り取り、50% piperidine/DMF (0.8 mL) を加えて $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートした。その後、MeOH (1.6 mL) を加え、DMF で標線まで希釈した (最終全量 10 mL)。綿栓濾過で樹脂を除去した後、得られた濾液をサンプルとして、光路長 1 cm の石英セルを用いて 301 nm における吸光度 (A_{obs}) を測定した。なお、空試験用のサンプルとしては、10 mL のメスフラスコに 50% piperidine/DMF (0.8 mL) 及び MeOH (1.6 mL) を加え、DMF で標線まで希釈したもの (最終全量 10 mL) を使用し、同様に吸光度 (A_{blank}) を測定した。この一連の操作を、各 Fmoc アミノ酸樹脂について少なくとも 2 回行い、その平均値を用いて、Fmoc アミノ酸の導入率を下記の式より導いた (式 1)。

$$\text{Fmoc アミノ酸の導入率 [mmol/g]} = (A_{\text{obs}} - A_{\text{blank}})/(0.78W) \quad (\text{式 1})$$

A_{obs} : サンプルの吸光度, A_{blank} : 空試験により測定された吸光度, W : Fmoc アミノ酸樹脂量 (mg)

第一章に関する合成実験

H-Arg(Pmc)-Ala-Gly-Asn(Trt)-Ala-Ser(*t*Bu)-OH (1).

鎖状保護ペプチド **1** は通常の Fmoc 型固相合成法により合成した (0.088 mmol scale). 収量: 42.3 mg (0.034 mmol), 収率: 38% (Fmoc-Ser-resin に基づく); MALDI-TOF MS: found m/z 1162.3, calcd. 1162.4 (M+Na)⁺ (average). 分析用 HPLC (測定波長: 230 nm) による純度: 93%.

Boc-Ser(H-Arg(Pmc)-Ala-Gly-Asn(Trt)-Ala)-OH (2).

鎖状保護 *O*-アシルイソペプチド **2** は, 2-chlorotriptyl chloride resin に Boc-Ser(Fmoc-Ala)-OH²⁹⁾ を導入したものに, 通常の Fmoc 型固相合成法を用いて **1** と同様に合成した (0.046 mmol scale). なお, 脱 Fmoc の際には 20% piperidine/DMF の代わりに Reagent A⁹⁹⁾ (1-methylpyrrolidine (25 v/v%)-hexamethyleneimine (2 v/v%)-HOBt (3 w/v%)/NMP-DMSO (1 : 1)) を使用した. 収量: 27.2 mg (0.021 mmol), 収率: 46% (Boc-Ser(Fmoc-Ala)-resin に基づく); MALDI-TOF MS: found m/z 1206.0, calcd. 1206.4 (M+Na)⁺ (average). 分析用 HPLC (測定波長: 230 nm) による純度: 97%.

***O*-acyl isopeptide of cyclo(Arg-Ala-Gly-Asn-Ala-Ser) (5).**

DCM (36 mL, 6% DMF 含有) 中にて **2** (46.7 mg, 0.036 mmol) を攪拌し, そこに HATU (27.4 mg, 0.072 mmol) 及び 2,4,6-collidine (19.1 μ L, 0.14 mmol) を加え, 室温で 3 時間反応させた. 反応溶液を減圧濃縮し環状保護 *O*-アシルイソペプチド **4** を得た; MALDI-TOF MS: found m/z 1188.0, calcd. 1188.4 (M+Na)⁺ (average). 続いて, crude **4** を TFA : *m*-cresol : thioanisole : H₂O (92.5:2.5:2.5:2.5, 3 mL) の溶液に溶かし 45 分間室温の条件にて脱樹脂を行った. その後, 反応溶液を減圧濃縮し, Et₂O を用いてペプチドの白色沈殿を得た. この沈殿物を水 (1.5 mL) に溶解し, 直ちに分取用逆相 HPLC により精製した. 目的化合物を含む区画を集め, 直ちに凍結乾燥し環状 *O*-アシルイソペプチド **5** の白色無晶形粉末を得た; 収量: 15.1 mg (0.019 mmol), 収率: 53%, MALDI-TOF MS: found m/z 557.6, calcd. 557.6 (M+H)⁺ (average). 分析用 HPLC (測定波長: 230 nm) による純度: 95%.

***O*-Acyl isopeptide of cyclo(Arg(Pmc)-Ala-Gly-Asn(Trt)-Ala-D-Ser) ([D-Ser]-4).**

[D-Ser]-**4** は環状保護 *O*-アシルイソペプチド **4** と同様に合成し, crude として実験に用いた; MALDI-TOF MS: found m/z 1188.7, calcd. 1188.4 (M+Na)⁺ (average).

cyclo(Arg-Ala-Gly-Asn-Ala-Ser) (6).

5 (6.1 mg, 7.8 μ mol) を 水/CH₃CN (1:1, 0.2 mL) に溶解させ, その溶液中にシリカゲル担持塩基 [3-(trimethylammonium)propyl-functionalized silica gel carbonate] (21.7 mg, 15.6 μ mol) を加え (pH 7) 室温にて 3 時間振盪した. その後, フィルター濾過により反応溶液中からシリカゲル担持塩基を濾去し,

濾液に 0.1% TFAaq を 4.8 mL 加えた。この溶液を直ちに凍結乾燥させ、環状ネイティブペプチド **6** の白色無晶形粉末を得た；収量: 5.2 mg (7.8 μ mol, >99%), MALDI-TOF MS: found m/z 557.6, calcd. 557.6 (M+H)⁺ (average). 分析用 HPLC (測定波長: 230 nm) による純度: 96%.

第二章に関する合成実験

[Ala-Val-Gln-Glu-Ala]- α -thio(4-carboxymethyl)phenyl ester (**7**).

[Ala-Val-Gln-Glu-Ala]-Nbz (N-acyl-benzimidazolinone) は過去に報告⁴⁹⁾に基づき合成した。まず, Rink amide AM resin (270 mg, 0.20 mmol) に, HBTU (4 eq), HOBT (4 eq) 及び DIEA (6 eq) を用いて di-Fmoc-3,4-diaminobenzoic acid (4 eq, ナカライテスク株式会社) を導入し, 以降は通常の Fmoc 型固相合成法にてペプチド鎖を構築した。得られたペプチド樹脂は CH_2Cl_2 (2 mL) 中にて 4-nitrophenyl chloroformate (5 eq) と 1 時間室温で反応させた後, DMF で洗浄した (2–3 mL x 5)。その後, ペプチド樹脂は 0.5 M DIEA/DMF 中で 15 分間室温にて振盪し, DMF で洗浄 (2–3 mL x 2) 後, 真空ポンプにて乾燥させた (ペプチド樹脂 358.2 mg)。乾燥させたペプチド樹脂は H_2O : triisopropylsilane : TFA (2.5 : 2.5 : 95, 7.1 mL) により脱樹脂し, 減圧下で濃縮後, Et_2O により沈殿させたものを H_2O : MeCN (1 : 1, 0.1% TFA aq 含有) に溶解し, 凍結乾燥する事で, 粗ペプチド [Ala-Val-Gln-Glu-Ala]-Nbz (118.0 mg) を得た。

この粗ペプチド (50 mg) は 6 M Gn-HCl/0.1 M リン酸緩衝液中に溶解させ (ペプチド濃度 (理論値): 10 mM), 50 mM MPAA, 30 mM TCEP-HCl を添加し, 反応溶液の pH を 6.5 に調整し, 室温にてチオエステル化反応に供した。開始 1 時間後の反応溶液は分取用逆相 HPLC により精製し, 目的化合物を含む区画を集め, 直ちに凍結乾燥し **7** の無晶形粉末を得た；収量: 17.8 mg (0.026 mmol), 収率: 28%, MALDI-TOF MS: found m/z 689.7, calcd. 689.7 (M+Na)⁺ (average). 分析用 HPLC (測定波長: 230 nm) による純度: >95%.

H-Ser(Cys-Ala-Val)-Ala-Ile-Leu (**8**).

Fmoc-Leu-chlorotrityl resin (426 mg, 0.2 mmol) を出発物質として, 通常の Fmoc 型固相合成によりペプチド鎖を構築した (ペプチド樹脂: 542.8 mg)。なお, *O*-アシルイソペプチド部分は, Boc-Ser-OH (2.5 eq) を樹脂に導入した後, Fmoc-Val-OH (10 eq) を DMAP (0.1 eq), DIC (10 eq) 存在下 CH_2Cl_2 中室温にて固相上でエステル化する事で合成した (4 時間 x 2)。得られたペプチド樹脂の約半量 (271 mg) を H_2O : EDT : TIS : TFA (2.5 : 2.5 : 1 : 94.5, 5.4 mL) により脱樹脂し, 減圧下で濃縮後, Et_2O により沈殿させたものを H_2O : MeCN (1 : 1, 0.1% TFA aq 含有) に溶解し, 凍結乾燥する事で, 粗ペプチド **8** を得た (59.5 mg)。このうちの 26.7 mg を分取用逆相 HPLC により精製し, 目的化合物を含む区画を集め,

直ちに凍結乾燥し **8** の無晶形粉末を得た; 収量: 14.1 mg (0.02 mmol), 収率: 46%, MALDI-TOF MS: found m/z 698.4, calcd. 698.8 (M+Na)⁺ (average). 分析用 HPLC (測定波長: 230 nm) による純度: >95%.

Cys-Ala-Val-Ser-Ala-Ile-Leu (11).

化合物 **11** は上述の通常の Fmoc 型固相合成法により合成した (0.019 mmol scale). 収量: 5.1 mg (0.0075 mmol), 収率: 38%, ESI-MS: found m/z 698.4, calcd. 698.3 (M+Na)⁺ (exact). 分析用 HPLC (測定波長: 230 nm) による純度: >95%.

H-Ser(Ala-Val-Gln-Glu-Ala-Cys-Ala-Val)-Ala-Ile-Leu (9, NCL による合成).

DMF 中 20 mM MPAA, 40 mM TEA, 20 mM TCEP·HCl 存在下, 化合物 **7** (3.0 mg, 4.4 μmol) 及び **8** (3.0 mg, 4.4 μmol) を NCL に供した (ペプチド濃度: 3.5 mM). 開始 1 時間後の反応溶液を分取用逆相 HPLC により精製し, 目的化合物を含む区画を集め, 直ちに凍結乾燥し **9** の無晶形粉末を得た; 収量: 2.8 mg (2.4 μmol), 収率: 54%, HRMS (FAB): found m/z 1174.6135, calcd. 1174.6142 C₅₀H₈₈N₁₃O₁₇S (M+H)⁺ (exact). 分析用 HPLC (測定波長: 230 nm) による純度: >95%.

Ala-Val-Gln-Glu-Ala-Cys-Ala-Val-Ser-Ala-Ile-Leu (10, NCL による合成).

DMF 中 20 mM MPAA, 40 mM TEA, 20 mM TCEP·HCl 存在下, 化合物 **7** (3.0 mg, 4.4 μmol) 及び **11** (3.0 mg, 4.4 μmol) を NCL に供した (ペプチド濃度: 3.5 mM). 反応開始 1 時間でゲル状の沈殿が観察された. この沈殿を HFIP に溶解させ, その溶液を分取用逆相 HPLC により精製し, 目的化合物を含む区画を集め, 直ちに凍結乾燥し **10** の無晶形粉末を得た; 収量: 0.94 mg (0.80 μmol), 収率: 18%, HRMS (FAB): found m/z 1196.5974, calcd. 1196.5961 C₅₀H₈₇N₁₃O₁₇SNa (M+Na)⁺ (exact).

H-Ser(Ala-Val-Gln-Glu-Ala-Cys-Ala-Val)-Ala-Ile-Leu (authentic sample of 9, 固相合成).

化合物 **8** と同様の手法により合成した (5.6 μmol scale). 収量: 0.65 mg (0.56 μmol), 収率: 10%, MALDI-TOF MS: found m/z 1174.7, calcd. 1175.4 (M+H)⁺ (average).

H-Ser(Ala-Val-Gln-Glu-D-Ala-Cys-Ala-Val)-Ala-Ile-Leu (Ala⁵ のエピメリ化評価用).

化合物 **8** と同様の手法により合成した (4.5 μmol scale). 収量: 0.8 mg (0.68 μmol), 収率: 15%, MALDI-TOF MS: found m/z 1175.4, calcd. 1175.4 (M+H)⁺ (average).

Ala-Val-Gln-Glu-Ala-Cys-Ala-Val-Ser-Ala-Ile-Leu (authentic sample of 10, 固相合成).

化合物 **10** は上述の通常の Fmoc 型固相合成法により合成した. MALDI-TOF MS: found m/z 1196.9, calcd. 1197.4 (M+Na)⁺ (average).

pyroGlu¹-ADan1-21-SCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺ [Ile21Ala] (14).

化合物 **7** と同様の手法により合成した (0.02 mmol scale). 収量: 2.2 mg (0.80 μmol), 収率: 3%, MALDI-TOF MS: found m/z 2504.1, calcd. 2503.8 (M+H)⁺ (average). HPLC: 図 2.8A 参照.

Aloc-Ser²⁹(ADan22–28)-Gln-Glu-Lys-His-Tyr³⁴ (15).

化合物 **8** と同様の手法により合成した (0.06 mmol scale). なお, *O*-アシルイソペプチド部分は, Aloc-Ser-OH (5.0 eq) を樹脂に導入した後, Fmoc-Asn(Trt)-OH (10 eq) を固相上でエステル化する事で構築した (4 時間 x 2). 収量: 8.7 mg (4.4 μmol), 収率: 7%, MALDI-TOF MS: found m/z 1727.9, calcd. 1727.9 (M+H)⁺ (average). HPLC: 図 2.8B 参照.

Aloc-Ser²⁹(pyroGlu¹-ADan1–28)-Gln-Glu-Lys-His-Tyr³⁴ (16).

6 M Gn·HCl, 20 mM MPAA 及び 20 mM TCEP·HCl を含有する 0.1 M リン酸緩衝液を用いて, **14** (2.2 mg, 0.76 μmol) と **15** (1.5 mg, 0.72 μmol) をそれぞれ 1 mM となるように希釈し, 反応溶液の pH を 6.5 に調整し, 室温にて 22 時間反応させる事で **16** を合成した. 収量: 0.8 mg (0.18 μmol), 収率: 25%, MALDI-TOF MS: found m/z 4089.9, calcd. 4089.5 (M+H)⁺ (average). HPLC: 図 2.8D 参照.

DMSO 酸化反応による 17 の合成.

16 (0.4 mg, 0.090 μmol) を 1 mL の 1 M HCl aq : DMSO (1 : 99 v/v) 中へ溶解し, 室温にて 24 時間反応させた. 反応溶液は逆相 HPLC により精製し, 目的化合物を含む区画を集め, 直ちに凍結乾燥し **17** の無晶形粉末を得た; 収量: 0.3 mg (0.067 μmol), 収率: 74%, MALDI-TOF MS: found m/z 4087.7, calcd. 4087.5 (M+H)⁺ (average). HPLC: 図 2.9A 参照.

脱 Aloc による 12 の合成.

得られた **17** (0.18 mg, 0.040 μmol) は 50% DCM/DMF (0.1% TFA 含有) 中へ溶解し, Pd(Ph₃)₄ (45.2 μg , 0.04 μmol) 及び PhSiH₃ (0.48 μL , 4 μmol) を添加し, Ar 雰囲気下において脱 Aloc 反応に供した.⁵⁰ 開始 1 時間後の反応溶液は逆相 HPLC により精製し, 目的化合物を含む区画を集め, 直ちに凍結乾燥し **12** の無晶形粉末を得た; 収量: 0.15 mg (0.033 μmol), 収率: 84%, MALDI-TOF MS: found m/z 4003.3, calcd. 4003.5 (M+H)⁺ (average). HPLC: 図 2.9B, 2.10A 参照.

固相合成法による 13 の合成.

化合物 **13** は上述の通常の Fmoc 型固相合成法により合成した (0.18 mmol scale). なお, S-S 架橋反応については **17** と同様の手法により行った. 収量: 0.72 mg (0.16 μmol), 収率: 0.09%, MALDI-TOF MS: found m/z 4003.6, calcd. 4003.5 (M+H)⁺ (average). 分析用 HPLC (測定波長: 230 nm) による純度: >95%.

***O*-acylisopeptide of A β 1–42 (18).**

詳細は参考文献 3 を参照の事.

***O*-acylisopeptide of A β 11–42 (20).**

化合物 **18** と同様の手法により合成した. 収率: 17.6%, MALDI-TOF MS: found m/z 3336.8, calcd. 3336.9 (M+H)⁺ (average). 分析用 HPLC (測定波長: 230 nm) による純度: >95%.

***O*-acylisopeptide of [Pyr¹¹]A β 11–42 (22).**

化合物 **18** と同様の手法により合成した. なお, Pyr¹¹ 部分は pyroglutamic acid (2.5 eq) を縮合させる事で構築した. 収率: 16.2%, MALDI-TOF MS: found m/z 3318.8, calcd. 3318.9 (M+H)⁺ (average). 分析用 HPLC (測定波長: 230 nm) による純度: >95%.

第三章に関する合成実験

[*N*-Me- β -Ala²⁶]A β 1–42 (24).

化合物 **24** は上述の通常の Fmoc 型固相合成法により合成した (7.5 μ mol scale). なお, *N*-Me- β -Ala²⁶ 部分は Fmoc-*N*-Me- β -Ala-OH (2.5 eq, 渡辺化学工業株式会社) を縮合させる事で構築した. また, TFA 中 (0 °C), DMS (40 eq), NH₄I (40 eq) 存在下, 1 時間静置する事で Met(O)³⁵ の還元を行った. 収量: 1.9 mg (0.34 μ mol), 収率: 4.6%, MALDI-TOF MS: found m/z 4513.1, calcd. 4513.1 (M+H)⁺ (average). 分析用 HPLC (測定波長: 230 nm) による純度: >95%.

評価実験

第一章に関する評価実験

円偏光二色性 (CD) 分析による二次構造評価

環状ペプチド **5** 及び **6** を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.6, 38 mM NaCl 含有) 中に溶解し, 円偏光二色性分光光度計 (Jasco J-720WI spectropolarimeter, 日本分光) を用いて, それぞれの CD スペクトルを測定した. CD 測定条件: λ : 260 nm-190 nm, データ間隔: 0.1 nm, バンド幅: 1.0 nm, 積算回数: 8 回, 光路長: 0.1 cm, 測定温度: 室温. ただし, 平均残基モル楕円率 $[\theta]$ はサンプル中のアミド結合の数により補正した. 任意の波長 λ_i における $[\theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$) は以下の式より算出した (式 2). なお, CD スペクトルは移動平均法を用いて平滑化した (区間 20 プロット).

$$[\theta] = (\theta_{\text{obs}} - \theta_{\text{blank}}) / (10 \cdot l \cdot c \cdot A) \quad (\text{式 2})$$

θ_{obs} : 測定された楕円率 (mdeg), θ_{blank} : 空試験により測定された楕円率 (mdeg), l : 光路長 (cm),
 c : サンプルのモル濃度 (mol/L), A : 測定したサンプルの分子中に含むアミド結合の数.

第二章に関する評価実験

水溶性の評価

各ペプチドを水中に飽和させ, 室温で 10 分間振盪し, 孔径 0.46 μm のフィルター (Milipore, Bedford, MA, USA) で濾過した後, HPLC 分析を行い, 得られたピーク面積より飽和濃度を算出した. 濃度計算にあたり, 各ペプチドの濃度既知の標準 DMSO 溶液を別途調製し, HPLC 分析を行い, 得られたピーク面積から検量線を作成した. 分析 HPLC の条件: C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS AM, 4.6 x 150 mmI.D. S-5 μm , 12 nm.), 0-100% MeCN, 40 min, λ 230 nm, 流速 0.9 mL/min (カラム温度: 40 °C).

サンプルストックソリューションの調製

各 *O*-アシルイソペプチド **18**, **20**, **22** を 0.1%TFA aq に溶解し (>0.8 mg/mL), 卓上超音波洗浄機 (3510J-MT, ヤマト科学) を用いて超音波処理 (42 kHz, 1 時間) した後, 超遠心処理を行った (435,000g, 4 °C, 3 時間). 液面から 3/4 容積分の上清をとり, 測定波長 280 nm における上清の吸光度

を紫外可視分光光度計 (BioSpec-1600, 島津製作所) により測定し, チロシンのモル吸光係数 ($1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) から, Lambert-Beer の式を用いて濃度を決定した ($> 200 \mu\text{M}$, 式 3).

$$c = (A_{\text{obs}} - A_{\text{blank}}) / \epsilon \quad (\text{式 3})$$

c : サンプル濃度 (mol/L), A_{obs} : 測定された吸光度, A_{blank} : 空試験により測定された吸光度,
 ϵ : チロシンのモル吸光係数 ($= 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

濃度決定した上清はストックソリューションとして分注し $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ の暗所で冷凍保存した. これらのストックソリューションを用いて以降の評価実験を行う際は, その実験を開始する直前にストックソリューションを解凍し, 適当な緩衝液を用いて必要な終濃度まで希釈して使用した.

CD 分析による二次構造評価

O-アシルイソペプチド **18, 20, 22** を 0.1% TFA aq (pH 2) 又は 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でインキュベートし ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), 円偏光二色性分光光度計 (Jasco J-720WI spectropolarimeter, 日本分光) を用いて, 任意の時点におけるそれぞれの CD スペクトルを測定した. CD 測定条件: λ : 260 nm-190 nm, データ間隔: 0.1 nm, バンド幅: 1.0 nm, 積算回数: 4 回, 光路長: 0.1 cm, 測定温度: 室温. ただし, 平均残基モル楕円率 $[\theta]$ はサンプル中のアミド結合の数により補正した. 任意の波長 λ_i における $[\theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$) は式 2 より算出した. なお, CD スペクトルは移動平均法を用いて平滑化した (区間 20 プロット).

チオフラビン-T (Th-T) アッセイによる凝集性評価

O-アシルイソペプチド **18, 20, 22** を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でそれぞれインキュベートし ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), 任意の時間におけるサンプル水溶液の一部 ($15 \mu\text{L}$) を採取した. これに 0.5 mM Th-T aq ($1.5 \mu\text{L}$) 及び 50 mM Gly-NaOH 緩衝液 ($150 \mu\text{L}$, pH 8.5) を順次加え十分に混和した後, 速やかに Th-T の蛍光強度を測定した. 蛍光強度の測定に際し, 440 nm 及び 480 nm の波長をそれぞれ励起波長及び蛍光波長として用いた. なお, Th-T 蛍光強度の測定値は, 1 M Tris-HCl 緩衝液 ($164 \mu\text{L}$) 中における 1 mM calsein aq ($2.5 \mu\text{L}$) の蛍光強度を基準とし, その相対値を算出した. 本アッセイは各 *O*-アシルイソペプチドについて少なくとも 3 回測定し, その平均値を採用した.

原子間力顕微鏡法 (AFM) による繊維形態の評価

O-アシルイソペプチド **18, 20, 22** を 25 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4, 100 mM NaCl 含有) 中でそれぞれインキュベートし ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), 各測定時間におけるサンプル溶液の一部 ($10 \mu\text{L}$) を天然雲母板 (ニラコ) の^{へまかい}劈開面上にのせ, 3 分間室温で放置し, ペプチドを雲母板に吸着させた. 得られた雲母板の表面を超純水 ($20 \mu\text{L}$) で漱ぎ, サンプル溶液に由来する塩を洗浄し, 室温で十分に乾燥させた後 AFM に

よる観察を行った。測定は、カンチレバーの drive amplitude を自動で設定した後、大気中 tapping mode で行った (5 x 5 nm, 走査速度; 0.5 Hz, 走査線; 512 本)。本評価実験は 1 つのサンプルについて少なくとも 3 回に渡り同様の実験を繰り返し行った。また、サンプルが吸着した雲母板 1 枚につき 3 視野以上観察し、代表的な視野をデータとして採用した。

PC12 細胞を用いた細胞毒性評価

poly-D-Lys コーティングされた 96 穴マイクロプレート (Becton Dickson Labware, Bedford, MA) に 1 ウェル当たり 5.0×10^3 個の PC12 を播種し, 100 μL の 25 mM HEPES-DMEM (10 v/v% FBS, 5 v/v% HS, 1 mM ピルビン酸 Na 含有) 中にて 3 日間インキュベートした (37 °C, 10% CO₂)。マイクロプレートを 150 μL の 25 mM HEPES-DMEM (serum-free, 1 mM ピルビン酸 Na 含有) で洗浄した後, 100 μL の 25 mM HEPES-DMEM (1 v/v% HS, 1 mM ピルビン酸 Na 含有) 又は 25 mM HEPES-DMEM (50 ng/mL NGF, 1 mM ピルビン酸 Na 含有) へと培地を交換し, それぞれ 1 日又は 4 日間インキュベートした。次に, *O*-アシルイソペプチド **18**, **20**, **22** をそれぞれのウェルに添加し (終濃度: 12 μM), 2 日間インキュベートした後, 各ウェルに WST-8 (10 μL , ナカライテスク) を加え, 2 時間インキュベートした時の吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した (吸収波長: 450 nm, 参照波長: 655 nm)。測定値からブランク (viecle) の数値を減じた値から, 細胞の生存率を算出した。本アッセイは, 各 *O*-アシルイソペプチドについて少なくとも 3 回測定し, その平均値を採用した。

第三章に関する評価実験

サンプルストックソリューションの調製

ネイティブ A β 1-42 (ペプチド研究所) 及び **24** を 0.02% NH₃ aq に溶解し (~ 0.3 mg/mL), 卓上超音波洗浄機 (3510J-MT, ヤマト科学) を用いて超音波処理 (42 kHz, 1 時間) した後, 超遠心処理を行った (435,000g, 4 °C, 3 時間)。液面から 3/4 容積分の上清をとり, 測定波長 280 nm における上清の吸光度を紫外可視分光光度計 (BioSpec-1600, 島津製作所) により測定し, チロシンのモル吸光係数 (1490 M⁻¹cm⁻¹) から, Lambert-Beer の式を用いて濃度を決定した (~ 60 μM , 式 3)。濃度決定した上清はストックソリューションとして分注し - 80 °C の暗所で冷凍保存した。なお, *O*-アシルイソペプチド (**18**) 及び 5-FAM-A β 1-42 (AnaSpec Inc.) の場合は, 溶かす溶媒に 0.1% TFA aq を用い, 以降の操作は A β 1-42 の時と同様に行った。これらのストックソリューションを用いて以降の評価実験を行う際は, その実験を開始する直前にストックソリューションを解凍し, 適当な緩衝液を用いて必要な終濃度まで希釈して使用した。

CD 分析による二次構造評価

誘導体 **24** を 0.1% TFA aq (pH 2) 中でインキュベートし (37 °C), 円偏光二色性分光光度計 (Jasco J-720WI spectropolarimeter, 日本分光) を用いて, 任意の時点における CD スペクトルを測定した. CD 測定条件: λ : 260 nm-190 nm, データ間隔: 0.1 nm, バンド幅: 1.0 nm, 積算回数: 4 回, 光路長: 0.1 cm, 測定温度: 室温. ただし, 平均残基モル楕円率 $[\theta]$ はサンプル中のアミド結合の数により補正した. 任意の波長 λ_i における $[\theta]$ (deg·cm²/dmol) は式 2 より算出した. なお, CD スペクトルは移動平均法を用いて平滑化した (区間 20 プロット).

AFM による A β 1-42 繊維形成阻害活性評価

各測定時間におけるサンプル溶液の一部 (10 μ L) を天然雲母板 (ニラコ) の劈開面上^{へきかい}にのせ, 3 分間室温で放置し, ペプチドを雲母板に吸着させた. 得られた雲母板の表面を超純水 (20 μ L) で漱ぎ, サンプル溶液に由来する塩を洗浄し, 室温で十分に乾燥させた後 AFM による観察を行った. 測定は, カンチレバーの drive amplitude を自動で設定した後, 大気中 tapping mode で行った (5 x 5 nm, 走査速度: 0.5 Hz, 走査線: 512 本). 本評価実験は 1 つのサンプルについて少なくとも 3 回に渡り同様の実験を繰り返し行った. また, サンプルが吸着した雲母板 1 枚につき 3 視野以上観察し, 代表的な視野をデータとして採用した.

蛍光偏光解消法による A β 1-42 凝集阻害活性評価

蛍光偏光解消法を用いた蛍光異方性 (fluorescence anisotropy: r) の測定は過去に報告された方法に基づいて行った.^{92,94)} 本評価実験では, 5-FAM-A β 1-42 (AnaSpec Inc.) と A β 1-42 を 5 : 95 の割合で混合したものを A β 1-42 のサンプルとして使用した. A β 1-42 単独 (5 μ M), A β 1-42 + betulinic acid (5 μ M : 5 μ M), A β 1-42 + NDGA (5 μ M : 5 μ M) 及び A β 1-42 (5 μ M) + **24** (0.5, 2.5, 5 μ M) のサンプルは 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中 37 °C でインキュベートした. 各測定時間においてそれぞれのサンプルの一部を採取 (8 μ L) し, 0.1 M リン酸緩衝液により希釈 (8 μ L \rightarrow 400 μ L) 後, 直ちに分光蛍光光度計を用いて r 値を測定した. 蛍光強度の測定には光路長 3 mm の石英セルを使用した. なお, 測定に用いた励起波長 494 nm (バンド幅 15 nm) 及び蛍光波長 521 nm (バンド幅 15 nm) は蛍光プローブとして使用した 5-FAM-A β 1-42 に由来している. 観測された蛍光強度は 0.02 秒間隔で 60 秒間測定し, その平均値から以下の式より r 値を求めた (式 4).

$$r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH}) \quad (\text{式 4})$$

ただし, I_{vv} , I_{vh} , I_{hv} , I_{hh} は, 励起光側と蛍光側に設置された偏光子の方向の組み合わせにより観測されたそれぞれの蛍光強度を表す. 各添字については, v は垂直方向 (vertical, 90°), h は水平方向 (horizontal, 0°) の偏光子の方向を示し, 前に書かれたものが励起側の偏光子の方向を, 後に書かれたものが蛍光側の偏光子の方向を表す. G は装置固有の偏光の偏りを補正する値であり, 以下の式より求めた (式 5).

$$G = I_{HV} / I_{HH}$$

(式 5)

ウエスタンブロット法による A β 1-42 のオリゴマー形成阻害活性評価

A β 1-42 (10 μ M), A β 1-42 + **24** (10 μ M + 10 μ M 又は 30 μ M) のリン酸緩衝液溶液 (pH 7.4) を 37 °C でインキュベートした後、各々の測定時点においてサンプル溶液の一部 (9 μ L) をドデシル硫酸リチウム (LDS) 緩衝液 (5 μ L) 及び超純水 (6 μ L) と混合し、電気泳動にかけるまで - 80 °C にて冷凍保存した。解凍したサンプルは加熱処理し (70 °C, 10 分), MES-SDS (morpholinoethanesulfonic acid-sodium dodecylsulfate) 泳動緩衝液中、非還元的条件下において Nu-PAGE[®] Bis-Tris 4-12% gel (invitrogen) を用いて電気泳動を行った (35 min, 200V)。なお、分子量マーカーには Novex[®] sharp pre-stained protein standards (Life technology) を用いた。泳動後のゲルを polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) に転写し (2 時間, 250 mA), 得られた PVDF 膜は TBS-T により洗浄後, 5 w/v %-skim milk/TBS-T を用いてブロッキング反応に供した (2 時間)。続いて、その PVDF 膜を抗 β -Amyloid(1-16) モノクローナル抗体 (クローン: 6E10, Covance) により一次抗体処理し (1 : 10000, 4 °C, 18 h), TBS-T による洗浄後 (x 3), 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP; horseradish peroxidase) で標識した抗マウス IgG-HRP 抗体により二次抗体処理を行った (1 : 8000, rt, 1 h)。これらの処理を終えた PVDF 膜は、TBS-T による洗浄後 (x 3), ECL (enhanced chemiluminescence, GE healthcare) を検出試薬として、デンストメーター (LAS-4000mini, 富士フィルム) を用いて画像化した。本評価試験は 1 つのサンプルについて少なくとも 3 回実施し、代表的な画像をデータとして採用した。

引用文献

1. Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. *Chem. Commun.* **2004**, 124–125.
2. Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5965–5968.
3. Sohma, Y.; Hayashi, Y.; Kimura, M.; Chiyomori, Y.; Taniguchi, A.; Sasaki, M.; Kimura, T.; Kiso, Y. *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 441–451.
4. Sohma, Y.; Hirayama, Y.; Taniguchi, A.; Mukai, H.; Kiso, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1729–1733.
5. Taniguchi, A.; Sohma, Y.; Hirayama, Y.; Mukai, H.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Matsuzaki, K.; Kiso, Y. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 710–715.
6. Sohma, Y.; Yoshiya, T.; Taniguchi, A.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Kiso, Y. *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2007**, *88*, 253–262.
7. Sohma, Y.; Wang, H.; Taniguchi, A.; Hirayama, Y.; Kakizawa, T.; Yamasaki, M.; Mukai, H.; Kiso, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *19*, 3787–3792.
8. Kiso, Y.; Taniguchi, A.; Sohma, Y. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* Vol. 1. Wiley, Hoboken, 2009, pp. 379–383.
9. Sohma, Y.; Kiso, Y. *Chem. Rec.* **2013**, *13*, 218–223.
10. Mutter, M.; Chandravarkar, A.; Boyat, C.; Lopez, J.; DosSantos, S.; Mandal, B.; Mimna, R.; Murat, K.; Patiny, L.; Saucedo, L.; Tuchscherer, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4172–4178.
11. Carpino, L. A.; Krause, E.; Sferdean, C. D.; Schuemann, M.; Fabian, H.; Bienert, M.; Beyermann, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7519–7523.
12. Hentschel, J.; Krause, E.; Börner, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7722–7723.
13. Shigenaga, A.; Tsuji, D.; Nishioka, N.; Tsuda, S.; Itoh, K.; Otaka, A. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1929–1931.
14. Coin, I.; Beyermann, M.; Bienert, M. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 3247–3256.
15. Nepomniaschiy, N.; Grimminger, V.; Cohen, A.; DiGiovanni, S.; Lashuel, H. A.; Brik, A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5243–5246.
16. Vila-Perello, M.; Hori, Y.; Ribo, M.; Muir, T. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7764–7767.
17. Boussert, S.; Diez-Perez, I.; Kogan, M. J.; de Oliveira, E.; Giralt, E. *ACS Nano* **2009**, *3*, 3091–3097.
18. Bozso, Z.; Penke, B.; Simon, D.; Laczko, I.; Juhasz, G.; Szegedi, V.; Kasza, A.; Soos, K.; Hetenyi, A.; Weber, E.; Tohati, H.; Csete, M.; Zarandi, M.; Fulop, L. *Peptides* **2010**, *31*, 248–256.
19. Cao, P.; Raleigh, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4052–4053.
20. Hojo, H.; Katayama, H.; Tano, C.; Nakahara, Y.; Yoneshige, A.; Matsuda, J.; Sohma, Y.; Kiso, Y.; Nakahara, Y. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 635–639.

21. Veber, D. F.; Freidinger, R. M.; Perlow, D.S.; Paleveda Jr, W. J.; Holly, F. W.; Strachan, R. G.; Nutt, R. F.; Arison, B. H.; Homnick, C.; Randall, W. C.; Glitzer, M. S.; Saperstein, R.; Hirschmann, R. *Nature* **1981**, *292*, 55–58.
22. Grieco, P.; Cai, M.; Liu, L.; Mayorov, A.; Chandler, K.; Trivedi, D.; Lin, G.; Campiglia, P.; Novellino, E.; Hruby, V. J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2701–2707.
23. Mizuguchi, T.; Uchimura, H.; Kakizawa, T.; Kimura, T.; Yokoyama, S.; Kiso, Y.; Saito, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3279–3282.
24. Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512–523.
25. Veber, D. F.; Holly, F. W.; Nutt, R. F.; Bergstrand, S. J.; Brady, S. F.; Hirschmann, R.; Glitzer, M. S.; Saperstein, R. *Nature* **1979**, *280*, 512–514.
26. Davies, J. S. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 471–501.
27. Ehrlich, A.; Heyne, H-U.; Winter, R.; Beyermann, M.; Haber, H.; Carpino, L. A.; Bienert, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8831–8838.
28. Yoshiya, T.; Sohma, Y.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Kiso, Y. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7905–7909.
29. Yoshiya, T.; Kawashima, H.; Sohma, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2894–2904.
30. Coin, I.; Schmieder, P.; Bienert, M.; Beyermann, M. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 299–306.
31. Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397–4398.
32. Carpino, L. A.; El-Faham, A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*: 695–698.
33. Enholm, E.; Bharadwaj, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3470–3471.
34. Shioiri, T.; Ninomiya, K.; Yamada, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6203–6205.
35. Brady, S. F.; Freidinger, R. M.; Paleveda, W. J.; Colton, C. D.; Homnick, C. F.; Whitter, W. L.; Curley, P.; Nutt, R. F.; Veber, D. F. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 764–769.
36. Taniguchi, A.; Yoshiya, T.; Abe, N.; Fukao, F.; Sohma, Y.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Kiso, Y. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*: 868–874.
37. Lécaillon, J.; Gilles, P.; Subra, G.; Martinez, J.; Amblard, M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4674–4676.
38. Stawikowski, M.; Cudic, P. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8587–8590.
39. Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H. *Science* **1994**, *266*, 776–779.
40. Kent, S. B. H. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 338–351.
41. Johnson, E. C. B.; Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7140–7141.
42. Bollhagen, R.; Schmiedberger, M.; Grell, E. *J. Chromatogr. A* **1995**, *711*, 181–186.
43. Kassim, S. Y.; Restrepo, I. M.; Kalivretenos, A. G. *J. Chromatogr. A* **1998**, *816*, 11–20.
44. Sato, T.; Saito, Y.; Aimoto, S. *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 410–416.
45. Johnson, E. C. B.; Kent, S. B. H. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1795–1799.
46. Dittmann, M.; Sauermann, J.; Seidel, R.; Zimmermann, W.; Engelhard, M. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 558–562.

47. Johnson, E. C. B.; Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640–6646.
48. Vidal, R.; Révész, T.; Rostagno, A.; Kim, E.; Holton, J. L.; Bek, T.; Bojsen-Møller, M.; Braendgaard, H.; Plant, G.; Ghiso, J.; Frangione, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *25*, 4920–4925.
49. Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6851–6855.
50. Decostaire, I. P.; Lelièvre, D.; Aucagne, V.; Delmas, A. F. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6523–6526.
51. Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* **2002**, *297*, 353–356.
52. Younkin, S. G. *Ann. Neurol.* **1995**, *37*, 287–288.
53. Selkoe, D. J. *Nature* **1999**, *399*, A23–A31.
54. Dahlgren, K. N.; Manelli, A. M.; Stine, W. B.; Baker, L. K.; Krafft, G. A.; LaDu, M. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32046–32053.
55. Huse, J. T.; Liu, K.; Pijak, D. S.; Carlin, D.; Lee, V. M.; Doms, R. W. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 16278–16284.
56. Cynis, H.; Scheel, E.; Saido, T.; Schilling, S.; Demuth, H. U. *Biochemistry* **2008**, *47*, 7405–7413.
57. Jawhar, S.; Wirths, O.; Bayer, T. A. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 38825–38832.
58. He, W.; Barrow, C. J. *Biochemistry* **1999**, *38*, 10871–10877.
59. Tekirian, T. L.; Yang, A. Y.; Glabe, C.; Geddes, J. W. *J. Neurochem.* **1999**, *73*, 1584–1589.
60. Russo, C.; Violani, E.; Salis, S.; Venezia, V.; Dolcini, V.; Damonte, G.; Benatti, U.; D'Arrigo, C.; Patrone, E.; Carlo, P.; Schettini, G. *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 1480–1489.
61. Schilling, S.; Lauber, T.; Schaupp, M.; Manhart, S.; Scheel, E.; Böhm, G.; Demuth, H. U. *Biochemistry* **2006**, *45*, 12393–12399.
62. Schlenzig, D.; Manhart, S.; Cinar, Y.; Kleinschmidt, M.; Hause, G.; Willbold, D.; Funke, S. A.; Schilling, S.; Demuth, H. U. *Biochemistry* **2009**, *48*, 7072–7078.
63. Rahimi, F.; Shanmugam, A.; Bitan, G. *Curr. Alzheimer Res.* **2008**, *5*, 319–341.
64. Sanders, H. M.; Lust, R.; Teller, J. K. *Peptides* **2009**, *30*, 849–854.
65. D'Arrigo, C.; Tabaton, M.; Perico, A. *Biopolymers* **2009**, *91*, 861–873.
66. Balducci, C.; Beeg, M.; Stravalaci, M.; Bastone, A.; Sclip, A.; Biasini, E.; Tapella, L.; Colombo, L.; Manzoni, C.; Borsello, T.; Chiesa, R.; Gobbi, M.; Salmona, M.; Forloni, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 2295–2300.
67. Beeg, M.; Stravalaci, M.; Bastone, A.; Salmona, M.; Gobbi, M. *Anal. Biochem.* **2011**, *411*, 297–299.
68. Földi, I.; Datki, Z. L.; Szabó, Z.; Bozsó, Z.; Penke, B.; Janáky, T. *J. Neurochem.* **2011**, *117*, 691–702.
69. Martínez, J.; Lisa, S.; Sánchez, R.; Kowalczyk, W.; Zurita, E.; Teixidó, M.; Giralt, E.; Andreu, D.; Avila, J.; Gasset, M. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27999.
70. Stravalaci, M.; Bastone, A.; Beeg, M.; Cagnotto, A.; Colombo, L.; Di Fede, G.; Tagliavini, F.; Cantù, L.; Del Favero, E.; Mazzanti, M.; Chiesa, R.; Salmona, M.; Diomedede, L.; Gobbi, M. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27796–27805.

71. Naiki, H.; Higuchi, K.; Hosokawa, M.; Takeda, T. *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 244–249.
72. Petkova, A. T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 16742–16747.
73. Hou, L.; Shao, H.; Zhang, Y.; Li, H.; Menon, N. K.; Neuhaus, E. B.; Brewer, J. M.; Byeon, I.-J. L.; Ray, D. G.; Vitek, M. P.; Iwashita, T.; Makula, R. A.; Przybyla, A. B.; Zagorski, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1992–2005.
74. Williams, A. D.; Shivaprasad, S.; Wetzel, R. *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 1283–1294.
75. Tjernberg, L. O.; Näslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlström, A. R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8545–8548.
76. Ghanta, J.; Shen, C.-L.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29525–29528.
77. Tjernberg, L. O.; Lilliehöök, C.; Callaway, D. J. E.; Näslund, J.; Hahne, S.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12601–12605.
78. Gordon, D. J.; Sciarretta, K. L.; Meredith, S. C. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8237–8245.
79. Chalifour, R. J.; McLaughlin, R. W.; Lavoie, L.; Morissette, C.; Tremblay, N.; Boule, M.; Sarazin, P.; Stea, D.; Lacombe, D.; Tremblay, P.; Gervais, F. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34874–34881.
80. Gordon, D. J.; Meredith, S. C. *Biochemistry* **2003**, *42*, 475–485.
81. Cruz, M.; Tusell, J. M.; Grillo-Bosch, D.; Albericio, F.; Serratos, J.; Rabanal, F.; Giralt, E. *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 324–328.
82. Kokkoni, N.; Stott, K.; Amijee, H.; Mason, J. M.; Doig, A. J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 9906–9918.
83. Amijee, H.; Bate, C.; Williams, A.; Virdee, J.; Jeggo, R.; Spanswick, D.; Scopes, D. I. C.; Treherne, J. M.; Mazzitelli, S.; Chawner, R.; Evers, C. E.; Doig, A. J. *Biochemistry* **2012**, *51*, 8338–8352.
84. Soto, C.; Kindy, M. S.; Baumann, M.; Frangione, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *226*, 672–680.
85. Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Kumar, R. A.; Castaño, E. M.; Frangione, B. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 822–826.
86. Adessi, C.; Frossard, M. J.; Boissard, C.; Fraga, S.; Bieler, S.; Ruckle, T.; Vilbois, F.; Robinson, S. M.; Mutter, M.; Banks, W. A.; Soto, C. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13905–13911.
87. Hughes, E.; Burke, R. M.; Doig, A. J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25109–25115.
88. Bose, P. P.; Chatterjee, U.; Nerelius, C.; Govender, T.; Norström, T.; Gogoll, A.; Sandegren, A.; Göthelid, E.; Johansson, J.; Arvidsson, P. I. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 8002–8009.
89. Fradinger, E. A.; Monien, B. H.; Urbanc, B.; Lomakin, A.; Tan, M.; Li, H.; Spring, S. M.; Condrón, M. M.; Cruz, L.; Xie, C. W.; Benedek, G. B.; Bitan, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 14175–14180.
90. Sciarretta, K. L.; Boire, A.; Gordon, D. J.; Meredith, S. C. *Biochemistry* **2006**, *45*, 9485–9495.
91. Bieschke, J.; Siegel, S. J.; Fu, Y.; Kelly, J. W. *Biochemistry* **2008**, *47*, 50–59.
92. Planchard, M. S.; Samel, M. A.; Kumar, A.; Rangachari, V. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 900–908.

93. Poduslo, J. F.; Howell, K. G.; Olson, N. C.; Ramirez-Alvarado, M.; Kandimalla, K. K. *Biochemistry* **2012**, *51*, 3993–4003.
94. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer: Berlin, 2006. third ed., Chapter 10.
95. Naiki, H.; Hasegawa, K.; Yamaguchi, I.; Nakamura, H.; Gejyo, F.; Nakakuki, K. *Biochemistry* **1998**, *37*, 17882–17889.
96. Stine, W. B., Jr.; Dahlgren, K. N.; Krafft, G. A.; LaDu, M. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11612–11622.
97. Bitan, G.; Kirkitadze, M. D.; Lomakin, A.; Vollers, S. S.; Benedek, G. B.; Teplow, D. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 330–335.
98. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
99. Li, X.; Kawakami, T.; Aimoto, S. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8669–8672.