

氏名 (生年月日)

かわしま ひろ ゆき  
川島 浩之 (1985年7月4日)

学位の種類

博士 (薬学)

学位記番号

博 第149号

学位授与の日付

2014年3月15日

学位授与の要件

学位規則第4条第1項該当

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

論文審査委員

(主査) 教授 赤路 健一

(副査) 教授 山下 正行

(副査) 教授 安井 裕之

## 論文内容の要旨

*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  $\beta$  (A $\beta$ ) 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  $\alpha$ -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。

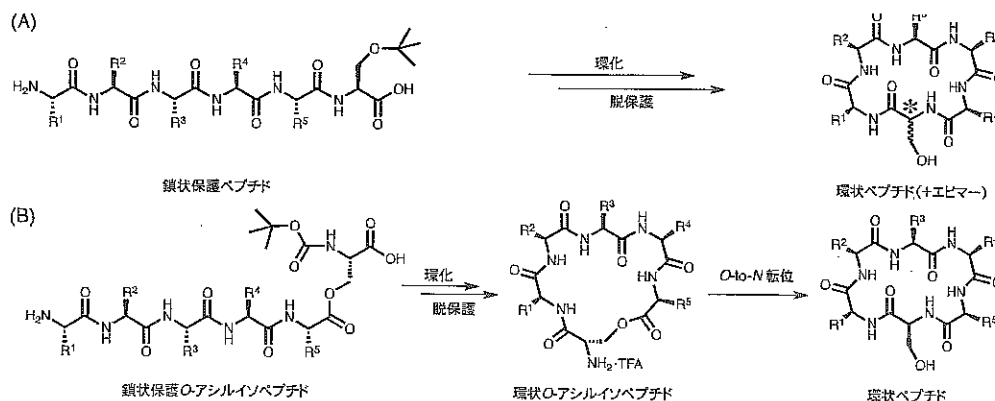


図 1. 環状ペプチドの合成。(A) 通常的手法。(B) *O*-アシルイソペプチド法。

### 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、*Np*HtrII (古細菌 *Natronomonas pharaonis* 関

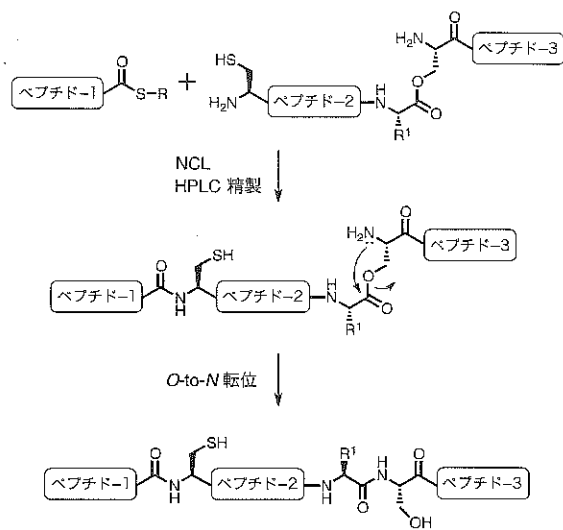


図 2. NCL による *O*-アシルイソペプチドの合成を鍵とする疎水性ポリペプチドの効率的合成法。

### 3. アミロイド $\beta$ 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、Ser<sup>26</sup> を *N*-Me- $\beta$ -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)。蛍光アノ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  $\beta$ -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  $\beta$ -シート形成に直接関与しない位置 (Gly<sup>25</sup>-Ser<sup>26</sup>) 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。

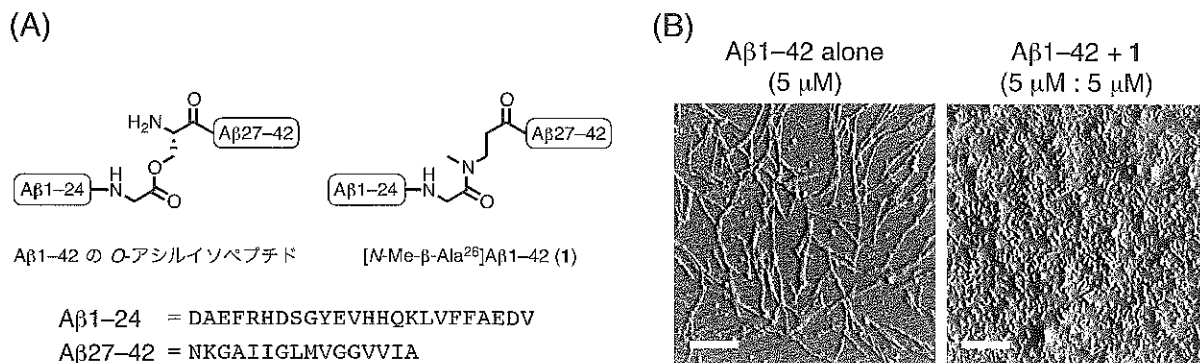


図 3. (A)  $A\beta$ 1-42 の *O*-アシルイソペプチドと安定誘導体 **1** の構造. (B) 原子間力顕微鏡による **1** の  $A\beta$  繊維形成阻害作用の評価 (bar = 0.4  $\mu$ m).

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、[Pyr<sup>11</sup>] $A\beta$ 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。

## 審査の結果の要旨

*O*-アシルイソペプチドは、ペプチド鎖中の Ser または Thr の側鎖水酸基を利用して主鎖アミド結合 (*N*-アシル型) を側鎖エステル結合 (*O*-アシル型) へと異性化させたペプチドである。*O*-アシルイソペプチドは、主鎖 N-H に起因する水素結合供与能をもたずイオン化し得るアミノ基を一つ多くもつため水溶性が向上する。さらに、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もとのアシル型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これらの特性を利用した疎水性ペプチドの新たな合成法を確立するとともに、アミロイドβペプチドの凝集阻害剤創製研究を行った。

### 1. エピメリ化を伴わない環状ペプチド合成への応用

申請者は、*O*-アシルイソペプチドが遊離のアミノ基を持つという構造上の特徴から、本イソペプチドをカルボキシル末端に置けば従来問題となっていたアシル基に由来するエピメリ化を抑制できると予想し、環状ペプチドの合成によってその効果を検討した。その結果、カルボキシル末端にウレタン型保護基を有する *O*-アシルイソアミノ酸残基を用いる合成経路で環状ペプチド cyclo(Arg-Ala-Gly-Asn-Ala-Ser) を合成すれば、従来法による合成で見られた 39% のエピメリ化を完全に抑制できることを確認した。

### 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

ついで、*O*-アシルイソペプチドが示す高い水溶性を利用した疎水性ペプチドの合成法の確立を行った。Native Chemical Ligation (NCL) 法は保護基を利用せずに縮合反応を行えることから疎水性ペプチド合成にも多用されるフラグメント縮合戦略であるが、縮合後の疎水性目的ペプチドの溶解性が従来法での精製法に十分適応できないという問題があった。申請者は、*O*-アシルイソペプチドを利用することによりこの問題点を解決できると予想し、12 残基からなる疎水性膜貫通モデルペプチドおよび 34 残基からなるアミロイド関連ペプチドの合成を行った。その結果、*O*-アシルイソペプチドを含むイソペプチドでは縮合後ペプチドの水溶性および凝集性が顕著に改善され、通常の HPLC 法で容易に精製が可能であること、pH 調節によりこのイソペプチドが容易に本来のペプチド体へと変換されること、を見出しその有用性を確認した。

### 3. アミロイドβ凝集阻害剤開発への応用

申請者は、前 2 章で確立した *O*-アシルイソペプチドを用いる疎水性ペプチド合成法をアミロイドβ凝集阻害剤開発へと展開させた。アミロイドβはアルツハイマー病発症に深くかわる凝集性ペプチドであるが、その *O*-アシルイソペプチド体は凝集性を持たない。申請者はこの非凝集性イソペプチドが凝集性ペプチドとエステル部分以外は全く同じアミノ酸配列を有する点に着目し、アミロイドβの *O*-アシルイソペプチドがアミロイドβと相互作用することが可能であり、その相互作用によってアミロイドβの凝集を阻害できるので

はないかと考えた。そこで実際にアミロイド $\beta$ のOアシルイソペプチド体を合成しそのアミロイド $\beta$ 凝集阻害能について、蛍光アニソトロピー、ウエスタンブロット、原子吸光顕微鏡測定、などを用いて検討した。その結果、アミロイド $\beta$ Oアシルイソペプチドは、アミロイド $\beta$ のオリゴマー形成を遅延させ、繊維形成を阻害できることを見出した。さらに、本Oアシルペプチドは $\beta$ シート形成に直接関与しない位置にエステル結合を持ち、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を示唆した。

以上申請者は本研究において、Oアシルイソペプチドを利用した新たな疎水性ペプチド合成法を確立するとともに、アルツハイマー病発症に深くかかわるアミロイド $\beta$ 凝集阻害ペプチドを見出すことに成功した。これらの結果は新規疎水性ペプチド合成法の確立とともに、新たな作用機序に基づくアルツハイマー病治療薬開発につながる貴重な成果である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値を有するものと判断する。