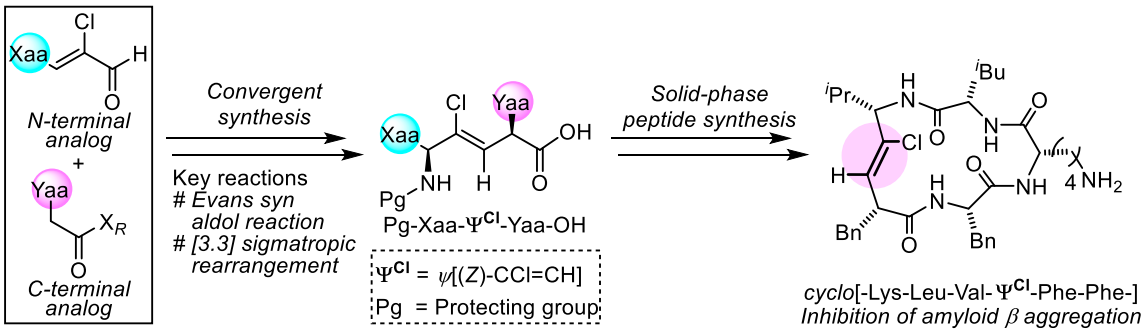
115　Aβ凝集阻害を指向したペプチドミメティックの開発	小早川　拓也

【目的】記憶や思考能力障害の症状を引き起こすアルツハイマー病（AD）は日常生活の単純な作業能力を損失する可能性のある疾患であり、治療薬の創出は急務である。アルツハイマー病の発症はアミロイドβペプチド（Aβ）の凝集に伴う神経毒性によるものが有力視されており、凝集阻害可能なペプチド性リード化合物も報告されている。しかし、現在までにペプチドを起源とした機能性分子の創製には至っていない。本研究ではペプチドの構造解析、機能維持および向上を指向したペプチドミメティック（クロロアルケン型ジペプチドイソスター：CADI）をケミカルツールとするための CADI の新規合成戦略の開発および、新規のペプチドミメティックを基盤とした Aβの凝集阻害の向上を目指した。

【方法】ペプチドミメティック、特に CADI を“収束的”に合成戦略を立案した。すなわち、N 末端と C 末端アミノ酸に相当するアナログを別々に調製し、コンジュゲートさせる方法である。具体的には Evans *syn* aldol 反応で N 末端と C 末端アミノ酸に相当するアナログをコンジュゲートさせた後に、[3.3]-シグマトロピー転位（市川アリルシアナート転位）を経ることで、目的とする CADI が合成できるものとした。また、本戦略で得られたペプチドミメティックをペプチド固相合成と組み合わせることで、阻害能が期待される環状ペプチドミメティックの合成を行った。

【結果】Evans *syn* aldol 反応と市川アリルシアナート転位を鍵反応とすることで、目的とする CADI を短工程にて合成することに成功した。また、本合成戦略を活用して、環状ペプチドミメティック（*cyclo*[-Lys-Leu-Val-ϕ[(*Z*)-CCl=CH]-Phe-Phe-]）の合成を達成した。得られた本環状ペプチドミメティックは Aβ凝集阻害活性が大幅に向上することが確認された。

CADI の収束的合成と Aβ凝集阻害剤への応用



115. Aβ凝集阻害を指向したペプチドミメティックの開発

小早川　拓也

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 生体機能分子研究部門 メディシナルケミストリー分野

Key words：クロロアルケン型ジペプチドイソスター，ペプチドミメティック，アミロイドβペプチド

緒　言

記憶や思考能力の障害の症状を示す認知症は世界規模で進み、現在では新薬の開発が強く求められている。認知症の種類の中でもアルツハイマー病（Alzheimer’s disease：AD）は患者数の過半数を占める疾患である。脳内で産生される 40〜42 残基のアミロイドβペプチド（Aβ）は自己組織化に伴う繊維状集合体（アミロイド繊維）を形成して、神経毒性を示す。そのため、AD の発病因子として最も有力視されている［1］。しかし、凝集や毒性の発現機構において、未解明の領域が多く占めていることから、創薬展開を行うのが困難な状況にある。特に Aβ16〜20 付近が疎水性相互作用することで、凝集することも報告されている［2］。そのため、本部位を標的としたペプチド創薬が可能となれば、優れた凝集阻害剤の創製が期待される。

しかし、ペプチドを基盤とした Aβペプチドの凝集阻害を目指した創薬展開の成功例は世界的に俯瞰しても皆無であるのが現状である。その理由として、ペプチドは“ペプチド主鎖骨格の加水分解酵素による切断”や“ペプチド分子の細胞膜透過能が低い”などが原因で、ペプチドの潜在的な薬理活性を活かしきれていないことが考えられる。

これに対して、本研究ではペプチドリード創薬において、ペプチド結合の基底状態の模倣体“クロロアルケン型ジペプチドイソスター（CADI）：図 1”に着目し、分子設計を行った［3］。van der Waals 半径や電気陰性度の観点から本 CADI はペプチド結合の化学的等価体として機能を発揮するだけでなく、ペプチド分子内の構造が固定化されることも期待される。そのため、CADI はペプチドミメティックとして、標的タンパク質への親和性の向上が期待される。また、分光学的構造解析では困難な生理活性ペプチドの機能部位の詳細な解析ツールとしても期待される。

本研究において“1. 多様な CADI の合成を可能とする方法論の開発”と、その応用として“2. Aβ16〜20（疎水性相互作用領域）への CADI の導入”を行い、新規ペプチドミメティックの創製を目指した。

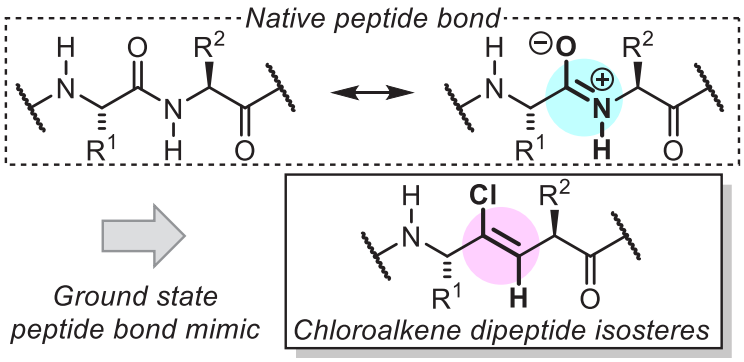


図 1. クロロアルケン型ジペプチドイソスター（CADI）の分子設計

方　法

1. 多様な CADI の合成を可能とする方法論の開発：CADI の収束的合成法の開発

これまでの基底状態を模倣したペプチドミメティックは、N 末端側鎖から増炭反応を行い、ジアステレオ選択的にアミノ酸側鎖に相当するアルキル基を導入する方法論がほとんどであった。すなわち、直線的に合成し、目的とするペプチドミメティックを得ていたため、合成法としての効率性や、迅速的にペプチドミメティックのライブラリーを構築するのは困難であった。

この状況下、ペプチドミメティック、特に CADI ついて“収束的”に合成することを主眼として、合成戦略を立案した（図 2）。すなわち、N 末端と C 末端アミノ酸に相当するアナログを別々に調製し、コンジュゲートさせる方法である。具体的には Evans *syn* aldol 反応で N 末端と C 末端アミノ酸アミノ酸に相当するアナログをコンジュゲートさせた後に、[3.3]-シグマトロピー転位（市川アリルシアナート転位）を経ることで、目的とする CADI が合成できるものとした。

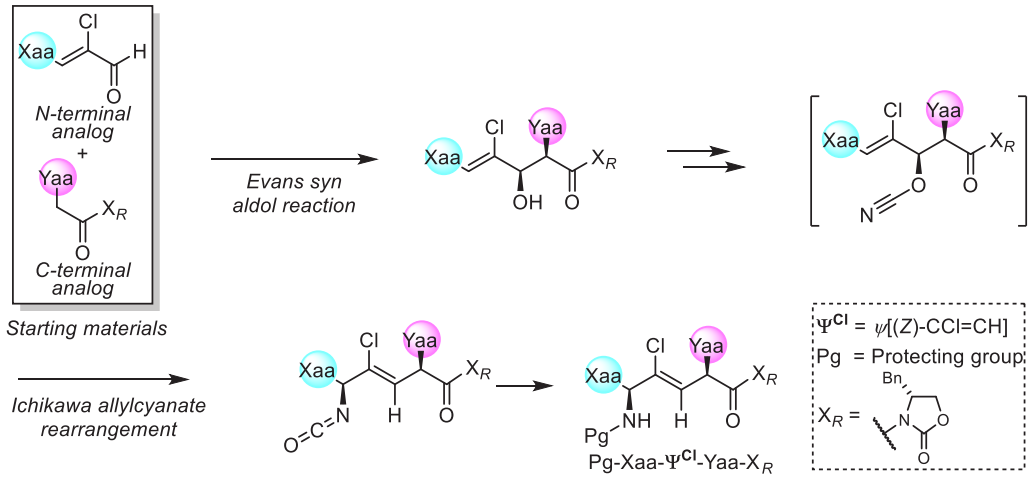


図 2.　CADI の収束的合成法の概要

2. Aβ16～20（疎水性相互作用領域）への CADI の導入

“1. 多様な CADI の合成を可能とする方法論の開発：CADI の収束的合成法の開発”にて得られた CADI を Aβ16～20（疎水性相互作用領域）である Lye-Leu-Val-Phe-Phe 配列に導入し、凝集阻害の向上を試みた。特に、報告例のある *cyclo*[Lys-Leu-Val-Phe-Phe]［4］に CADI の導入（図 3）を行い、阻害能の検証を行った。

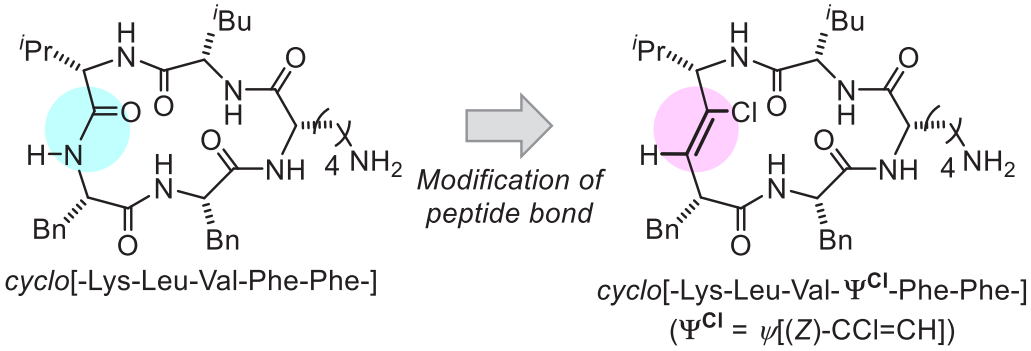


図 3.　Aβ凝集阻害ペプチドへの CADI の導入

結　果

1. 多様な CADI の合成を可能とする方法論の開発：CADI の収束的合成法の開発

“2. Aβ16～20（疎水性相互作用領域）への CADI の導入”も考慮して、モデルとするペプチドミメティックとして Val-Phe 型（Fmoc-Val-ψ[(*Z*)-CCl=CH]-Phe-OH **1**）を選択した（図 4）。まず、N 末端アミノ酸アナログに相当するアルデヒド **2** および C 末端アミノ酸に相当するオキサゾリジノン環 **3** を対して、Evans *syn* aldol 反応を行った。得られたアルコール **4** をカルバメート体 **5** へ変換した後、市川アリルシアナート転位反応、続く Fmoc 化反応を行うことで、短工程かつ高収率で CADI 骨格の構築に成功した。さらに、ペプチド固相合成法に適用可能とするため、成績体 **8** をカルボン酸体 **1** へ変換可能であることも明らかとした。

上記のような収束的にペプチドミメティックの合成が可能となったので、今後、種々のアミノ酸側鎖に対応する分子群を創製することに貢献するものと期待される。

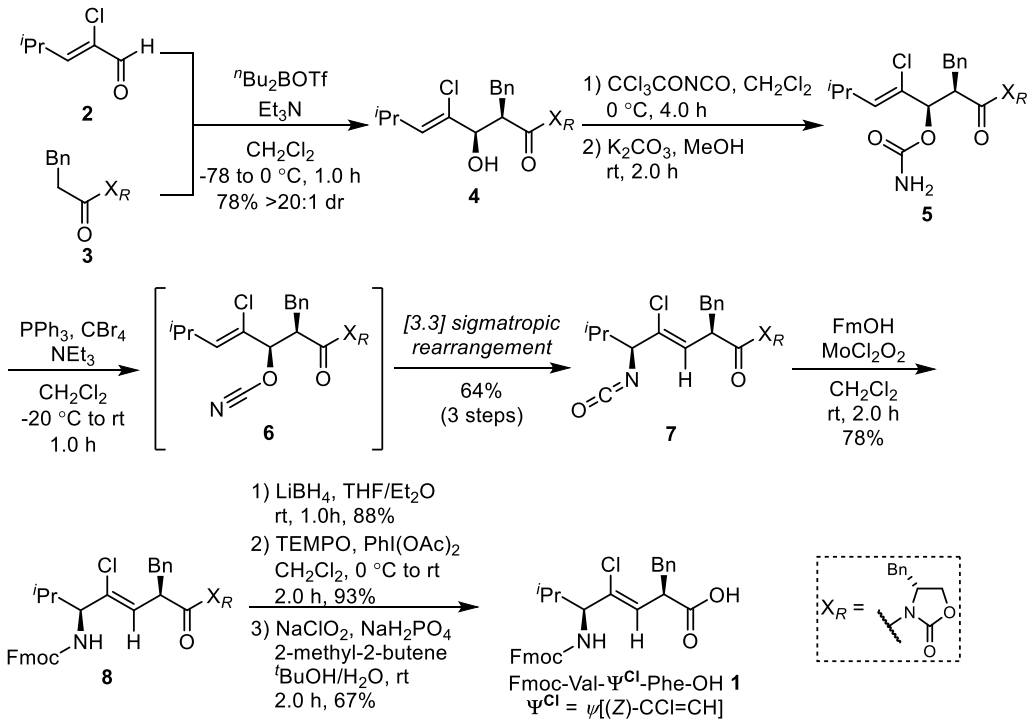
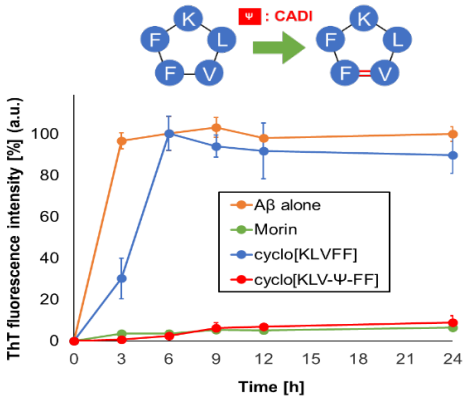


図 4. Val-Phe 型 CADI の収束的合成

2. Aβ16～20（疎水性相互作用領域）への CADI の導入

“1．多様な CADI の合成を可能とする方法論の開発：CADI の収束的合成法の開発”にて合成されたペプチドミメティック **1** をペプチド固相合成法と組み合わせることで、環状ペプチドミメティック（*cyclo*[-Lys-Leu-Val-ψ[(*Z*)-CCl=CH]-Phe-Phe-] **9**）の合成を達成した。

続いて、得られた環状ペプチドミメティックはAβの凝集を認識して蛍光を発する Thioflavin T (ThT)を用いて評価した（図 5）[5]。その結果、*cyclo*[Lys-Leu-Val-Phe-Phe]の場合、89.8%の蛍光強度だったことに対し、CADI を導入したペプチドミメティック **9** 存在下では 9.0%であった。すなわち CADI が導入されることによって、Aβ凝集阻害活性が大幅に向上することが確認された。



Concentrations
Aβ : 10 μM
Inhibitor : 20 μM

Conpound	ThT fluorescence Intenisity [%]*
Morin	6.4 ± 0.7
cyclo [KLVFF]	89.8 ± 8.8
cyclo [KLV-Ψ-FF]	**9.0 ± 3.2**

* Incubated at 37 ℃ for 24 h
Relative values with Aβ alone
Mean ± SD, n = 3

図 5. 環状ペプチドミメティックのＡβ凝集阻害活性試験

考　察

以上のように、N 末端と C 末端アミノ酸に相当するアナログから Evans syn aldol 反応と市川アリルシアナート転位を鍵反応とすることで、多様な CADI ライブラリー構築をするための合成戦略を開発することに成功した。また、本手法で合成したペプチドミメティックはペプチド固相合成法に適用可能であることも明らかとした。さらに、本 CADI を導入した環状ペプチドミメティック（*cyclo*[-Lys-Leu-Val-ψ[(Z)-CCl=CH]-Phe-Phe-]）は親ペプチド（*cyclo*[-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-]）と比較して、優れたＡβ凝集を阻害し、CADI を基盤としたペプチドミメティックの有用性を示すことができた。本阻害能の向上は、環全体の剛直性が強くなり、Ａβとの相互作用が強まったためと推測される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は東京医科歯科大学生体材料工学研究所の玉村啓和教授、東京薬科大学の野水基義教授、林良雄教授、谷口敦彦講師である。また、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に心から感謝申し上げます。

文　献

1) Minter M. R., Taylor J. M., Crack P. J. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. J Neurochem. 2016 Feb;136(3):457-74. Epub 2015 Nov 18. PMID: 26509334 DOI: 10.1111/jnc.13411

2) Nelson R, Sawaya M.R., Balbirnie M., Madsen A. Ø., Riekel C., Grothe R., Eisenberg D. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. Nature. 2005 Jun 9;435(7043):773-8. PMID: 15944695 DOI: 10.1038/nature03680

3) Kobayakawa T., Matsuzaki Y., Hozumi K., Nomura W., Nomizu M., Tamamura H. Synthesis of a Chloroalkene Dipeptide Isostere-Containing Peptidomimetic and Its Biological Application. ACS Med Chem Lett. 2017 Dec 27;9(1):6-10. PMID: 29348803 DOI: 10.1021/acsmedchemlett.7b00234.

4) Arai T., Araya T., Sasaki D., Taniguchi A., Sato T., Sohma Y., Kanai M. Rational design and identification of a non-peptidic aggregation inhibitor of amyloid-β based on a pharmacophore motif obtained from cyclo[-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-].Angew Chem Int Ed Engl. 2014 Jul 28;53(31):8236-9. Epub 2014 Jun 16. PMID: 24931598 DOI: 10.1002/anie.201405109

5) LeVine H III Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. Methods Enzymol. 1999;309:274-84. PMID: 10507030 DOI: 10.1016/s0076-6879(99)09020-5