

クリックペプチドの開発：アルツハイマー病関連アミロイド β ペプチドを 産生する刺激応答性プレカーサー

谷口 敦彦

Development of Click Peptide: Stimuli-responsive Precursor Producing Alzheimer's Disease-related Amyloid β Peptide

Atsuhiko TANIGUCHI

Department of Medicinal Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, 1 Shichono-cho,
Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8412, Japan

(Received May 30, 2009)

In a pathological mechanism of Alzheimer's disease (AD), amyloid β peptide ($A\beta$) 1-42 plays a crucial role. However, the detailed pathological mechanism remains unclear. This elucidation is hampered by handling difficulties of $A\beta$ 1-42 due to its poor water-solubility and uncontrollable aggregation. These properties prevent reproducing neurotoxicity-related assembly events of $A\beta$ 1-42 in the experiments, leading to discrepant study outcomes. Namely, such properties of $A\beta$ 1-42 are serious obstacles to establish an experiment system that clarifies the pathological mechanism of $A\beta$ 1-42 in AD. To solve these problems, we developed "click peptide" of $A\beta$ 1-42 based on the "O-acyl isopeptide method". The click peptide, which contains an O-acyl instead of N-acyl residue at Gly²⁵-Ser²⁶ of $A\beta$ 1-42, is converted to $A\beta$ 1-42 via an O-to-N intramolecular acyl migration upon being triggered by pH-change (pH-click) or photo-irradiation (photo-click). The click peptide was 100-fold more water-soluble than $A\beta$ 1-42 and clearly adopted a monomeric random coil structure due to the O-acyl moiety in the peptide backbone. The click peptide was quickly converted to monomer $A\beta$ 1-42 with a random coil structure under physiological conditions upon an action (click). The obtained $A\beta$ 1-42 underwent both self-assembly and conformational changes with time. Because the *in situ* production of intact $A\beta$ 1-42 from the water-soluble and non-aggregative precursor could overcome the handling problems of $A\beta$ 1-42, this click peptide strategy would provide a reliable experiment system to investigate the pathological functions of $A\beta$ 1-42 in AD.

Key words—amyloid β ; Alzheimer's disease; assembly; water-solubility; click peptide; isopeptide

1. はじめに

高齢化が急速に進む現在、認知症の克服は急務である。認知症の中でもアルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD)¹⁾は大きな注目を集めている。ADでは、特徴的な病理学的所見として患者脳内に老人斑 (アミロイド斑) がみられる。これを構成する主要成分は、アミロイド β ペプチド (amyloid β peptide: $A\beta$) である (Fig. 1)^{2,3)} $A\beta$ は神経毒性を示し、⁴⁾ AD 発病因子であると考えられている (アミロイド仮説)^{5,6)} $A\beta$ は、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid β precursor protein: APP) が β -セ

クレターゼ及び γ -セクレターゼによって順次切断されることで産生される (Fig. 1)。 γ -セクレターゼの切断部位によって、40 残基からなる $A\beta$ 1-40 と 42 残基からなる $A\beta$ 1-42 が主要分子種として産生される。 $A\beta$ 1-42 は $A\beta$ 1-40 より高い凝集性及び神経毒性を示すため、AD の発病機構において重要な役割を果たしていると考えられている。^{7,8)} しかし、その詳細な神経毒性メカニズムはいまだ不明である。この解明の障害となっているものは、 $A\beta$ 1-42 の低水溶性及び高凝集性に起因するハンドリングの困難さである。^{9,10)} このために、 $A\beta$ 1-42 の神経毒性に深い関連を持つとされる $A\beta$ の会合過程を、毒性実験で再現することが難しく、結果的に研究室間及び実験間でデータのばらつきや矛盾が生じる。¹¹⁻¹⁴⁾ これは AD 研究において大きな問題となっている。

この問題を克服するため、木曾らの研究グループ

京都薬科大学薬品化学分野 (〒607-8412 京都市山科区御陵四丁野町 1)

e-mail: ky01220@poppy.kyoto-phu.ac.jp

本総説は、平成 20 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (化学系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

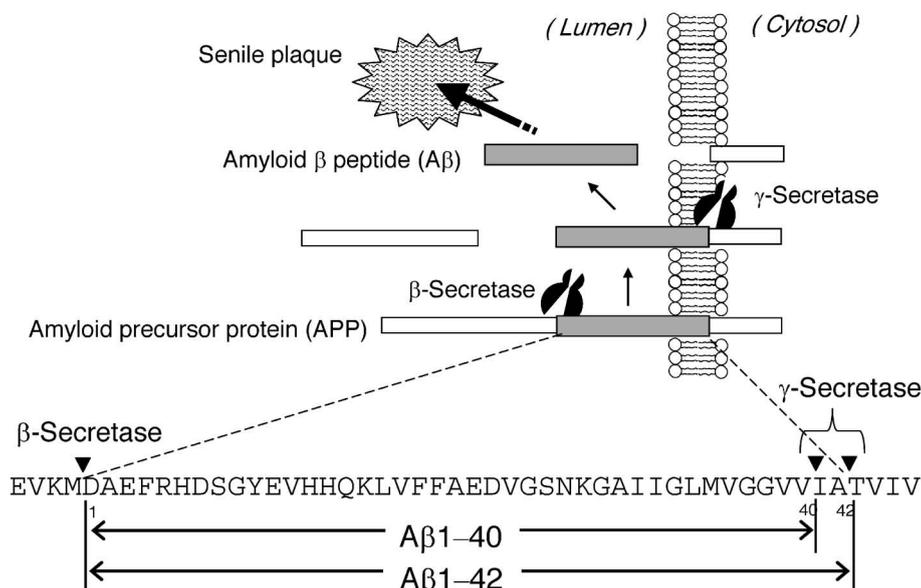


Fig. 1. Amyloid β Peptides ($A\beta$ s) in Alzheimer's Disease (AD)

$A\beta$ s, which form senile plaques, are produced from amyloid precursor proteins (APPs) after cleavages by β - and γ -secretases. The predominant forms of $A\beta$ s mainly consist of 40- and 42-residue peptides, designated $A\beta$ 1-40 and $A\beta$ 1-42, respectively.

は独自の効率的ペプチド合成法“*O*-アシルイソペプチド法”¹⁵⁻¹⁸⁾を基盤とした“クリックペプチド”¹⁹⁻²³⁾を開発している。本クリックペプチドはそれ自身、 $A\beta$ 1-42より高い水溶性を示すとともに凝集を起こさない。一方、まるで「コンピュータのマウスをクリックすると画面が切り替わる」ように、本クリックペプチドはpH変化又は光照射の刺激(“クリック”)に反応して速やかに $A\beta$ 1-42に変換される。これを $A\beta$ の水溶性・非凝集性プレカーサーとして使用することで、 $A\beta$ 1-42のハンドリング問題を克服することができると考えられる。本総説では、筆者らが取り組んだクリックペプチドの開発研究について紹介する。

2. *O*-アシルイソペプチド法¹⁵⁻¹⁸⁾

固相ペプチド合成 (solid-phase peptide synthesis: SPPS)²⁴⁾において、アミノ酸配列によっては、難溶解性及び凝集性のために合成困難なペプチド (difficult sequence 含有ペプチド)^{25,26)}が知られている。このようなペプチドの効率的合成法として、木曾らの研究グループは“*O*-アシルイソペプチド法”を報告した (Fig. 2).¹⁵⁾ 本手法ではまず、ヒドロキシ基含有アミノ酸残基 (セリン, スレオニン) において、本来の α -アミノ基のアシル化 (ペプチド結合) の代わりに側鎖 β -ヒドロキシ基をアシル化 (エステル結合) した*O*-アシルイソペプチドを合成

する。本イソペプチドはペプチド主鎖に*O*-アシル構造を有することで、本来のペプチドの難溶解性や凝集性を払拭し、比較的高収率・高純度で得られる。続いて、得られたイソペプチドから*O*-to-*N*分子内アシル転位を経て、目的ペプチドを効率的に得ることができる (Fig. 2)。

本手法は、difficult sequence 含有ペプチドに分類される $A\beta$ 1-42²⁷⁾の効率的合成において有効性を示した。^{16,17)} この研究の中で、 $A\beta$ 1-42の*O*-アシルイソペプチドである26-*O*-アシルイソ $A\beta$ 1-42 (26-*O*-acyl iso $A\beta$ 1-42: 26-AIA β 42, **1**)は、25位グリシン-26位セリン間に*O*-アシル構造を持つため、 $A\beta$ 1-42より100倍高い水溶性を示すと同時に、マイルドなpH 7.4において副反応なく $A\beta$ 1-42に変換された (Fig. 3)。そこで筆者らは、このような**1**の特性が、 $A\beta$ 1-42の合成上の問題のみならず、物理化学的・生物学的実験における問題をも解決し得ると考えた。すなわち、 $A\beta$ 1-42の低水溶性・高凝集性はハンドリングの難しさを招き、 $A\beta$ の毒性メカニズム解明を妨げているので、この克服に*O*-アシルイソペプチド法を利用することができると考えた。本着想は、刺激(クリック)に反応して実験系内で $A\beta$ 1-42を素早く産生する“クリックペプチド”の開発につながった。

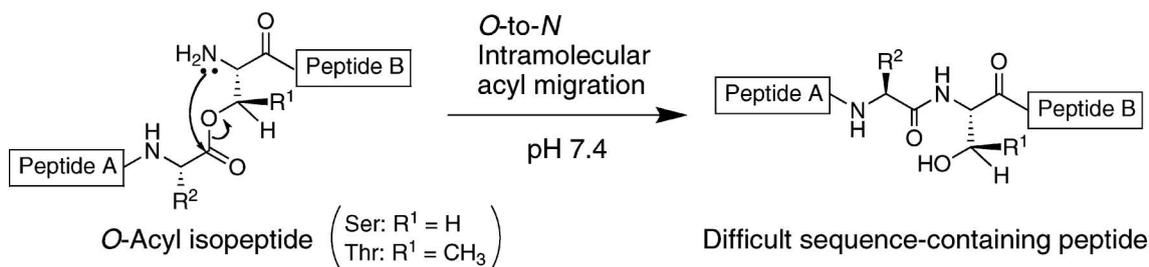


Fig. 2. O-Acyl Isopeptide Method

A difficult sequence-containing peptide was efficiently synthesized from O-acyl isopeptide via an O-to-N intramolecular acyl migration.

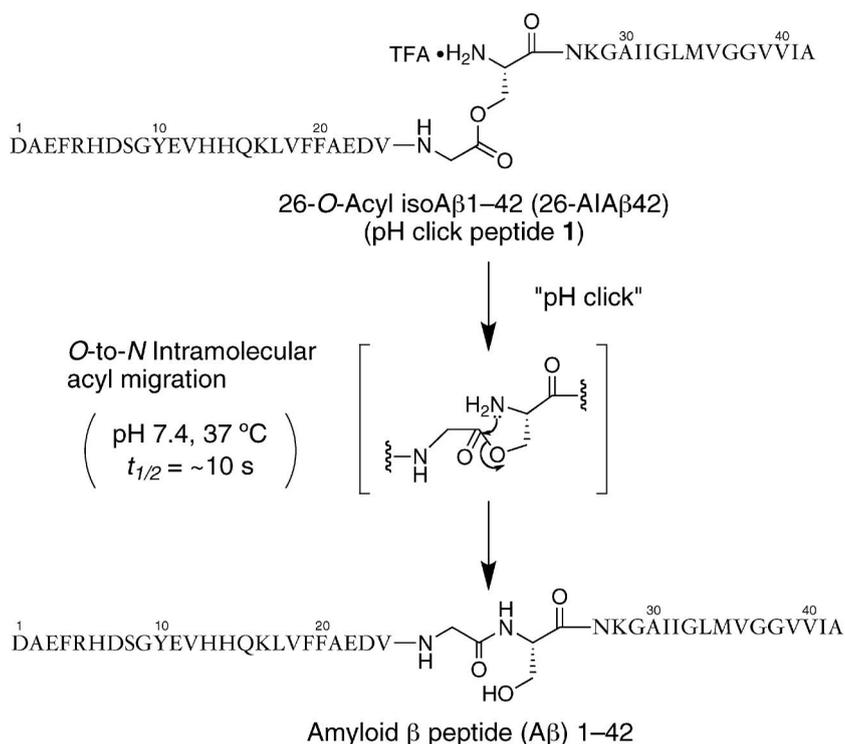


Fig. 3. pH Click Peptide

26-AIAβ42 (pH click peptide 1) was quickly and quantitatively converted to Aβ1-42 via a pH-dependent O-to-N intramolecular acyl migration under physiological conditions (pH 7.4, 37°C).

3. pH クリックペプチド^{20,22)}

26-AIAβ42 (**1**) は、0.1%トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid: TFA) 水溶液中、37°Cの酸性条件下で24時間以上安定であった。また、同水溶液中、室温で6日間以上、さらに−80°Cで1ヵ月間以上安定に保存することができた。一方、**1**の0.1% TFA水溶液をpH7.4リン酸緩衝液で希釈してpHを7.4に調整したところ、pH依存的なO-to-N分子内アシル転位を起こし、速やか($t_{1/2} = \sim 10$ s)かつ定量的にAβ1-42へ変換された (Fig. 3)。すなわち、**1**はpH変化 (“pHクリック”) に応答してAβ1-42を産生するので、筆者らはこれを “pHク

リックペプチド” と命名した。

pHクリックペプチド**1**は0.1%TFA水溶液中、37°Cにおいて、オリゴマー及びアミロイド線維を形成しないと同時に、その二次構造はランダムコイル構造を維持した。一方、前述のように酸性条件下から中性条件下 (pH7.4) に変化させたところ、**1**はランダムコイル構造を持つモノマーAβ1-42を産生した。さらに引き続き生理的条件下 (pH7.4, 37°C) でインキュベートすると、その産生されたAβ1-42はモノマーをスタートとしてオリゴマー及びアミロイド線維を形成した。また、そのAβ1-42においてランダムコイル構造からβシート構造に

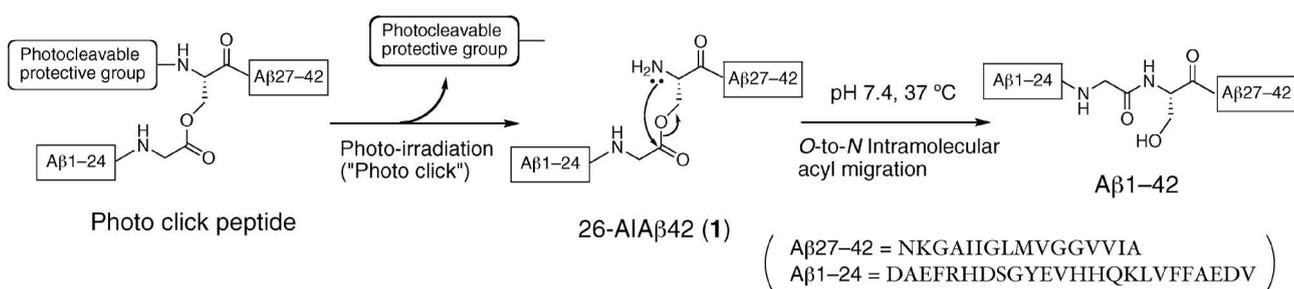
至る二次構造変化も観察された。一般的に、A β 1-42はその低水溶性・高凝集性ゆえ、モノマーのみを得ることが難しいが、クリックペプチドから系内で素早くA β 1-42を産生させることで、容易にランダムコイル構造のモノマーを得ることができた。さらに、その状態をスタートに揃えたA β 1-42の会合過程を再現することができた。

4. 光クリックペプチド^{19,21)}

pHクリックペプチド**1**はクリックの際に中性緩衝液で希釈する操作が必要である。また、pHクリックではpH7.4の生理的条件下でクリックの制御を行うことができない。そこで、筆者らは光をトリ

ガーとしたクリックペプチドの創製を目指した。一般的に光トリガーシステムは、実験系内への試薬添加やpH調整を要することなく系外からの光照射により速やかに活性化することができる、また光照射のタイミングと位置を任意に調節することで活性化のタイミングと位置を限定することができるという利点を持っている。²⁸⁾

そこで筆者らは、光照射（“光クリック”）に応答する“光クリックペプチド”を開発するため、**1**の26位セリンアミノ基に最も汎用されている光解離性保護基6-nitroveratryloxycarbonyl (Nvoc) 基²⁹⁾を導入した**2**を合成した(Fig. 4).¹⁹⁾ pH7.4緩衝液中、



Peptide	Photocleavable protective group Structure	Name	Water-solubility (μM)
A β 1-42	—	—	6.6
26-Nvoc-AIA β 42 (Photo click peptide 2)		6-Nitroveratryloxycarbonyl Nvoc ²⁹⁾	0.69
26-Mapoc-AIA β 42 (Photo click peptide 3)		4-Dimethylaminophenacyloxy-carbonyl Mapoc ³⁰⁾	4.0
26-DEACMoc-AIA β 42 (Photo click peptide 4)		(7-Diethylaminocoumarin-4-yl)-methyl-oxycarbonyl DEACMoc ³¹⁾	Not determined
26-ACMoc-AIA β 42 (Photo click peptide 5)		(7-Aminocoumarin-4-yl)methyl-oxycarbonyl ACMoc ³²⁾	3.5
26-BCMACMoc-AIA β 42 (Photo click peptide 6)		{7-[Bis(carboxymethyl)amino]-coumarin-4-yl}methyl-oxycarbonyl BCMACMoc ³³⁾	640

Fig. 4. Photo Click Peptides and Their Water-solubilities

A β 1-42 was produced from photo click peptide via an O-to-N intramolecular acyl migration upon being triggered by photo-irradiation. 26-BCMACMoc-AIA β 42 (photo click peptide **6**) has higher water-solubility than A β 1-42.

2 は非 UV 照射下において安定であった一方、UV 照射（波長：355 nm）によって光反応及びそれに続く自発的な *O*-to-*N* 分子内アシル転位を起こして A β 1-42 に変換された (Fig. 4).

しかしながら、2 は Nvoc 基の疎水性のために A β 1-42 より低い水溶性を示した。この性質は光クリックペプチドを A β 実験ツールとして使用する際、深刻な制約をもたらす。そこで、より実践的に有用な水溶性光クリックペプチドを開発するために、Nvoc 基の代わりに Fig. 4 に示すような様々な光解離性保護基を導入した。²¹⁾ これらを導入した光クリックペプチド 3-6 の中で、{7-[bis(carboxymethyl)amino]coumarin-4-yl} methyloxycarbonyl (BCMAC-Moc) 基³³⁾を導入した 6 は、その光解離性保護基に pH7.4 でイオン化しやすいカルボキシ基を有するため、A β 1-42 より 100 倍近く高い水溶性を示した (Fig. 4).

この水溶性光クリックペプチド 6 と A β 1-42 をそれぞれ、生理的条件下 (pH7.4, 37°C) でインキュベートし、凝集性を比較した。A β 1-42 はインキュベート時間とともにオリゴマーやアミロイド線維を形成するのに対して、6 はモノマー状態を保ち、アミロイド線維形成を起こさなかった。また、同様にインキュベートを行い、それぞれの二次構造を検討したところ、A β 1-42 はランダムコイル構造から β シート構造を形成したのに対し、6 はランダムコイル構造を維持した。このように、光クリックペプチドにおいて、42 残基の A β 1-42 ペプチド鎖中わずか 1 ヶ所に *O*-アシル構造を導入することで、A β 1-42 の強力な凝集性を払拭することができた。これは、エステル結合とペプチド結合の水素結合様式が異なることから、³⁴⁾ クリックペプチドの主鎖におけるエステル結合 (*O*-アシル構造) が本来のペプチド鎖間水素結合を乱し、凝集の元凶となる高次構造を不安定化させたためと考えられる。

最後に、光クリックペプチド 6 に pH7.4 緩衝液中、UV 照射（波長：355 nm）を行ったところ、BCMACMoc 基は速やかに (2 min) 解離した。さらに引き続き、37°C で 30 分間インキュベートすることによって *O*-to-*N* 分子内アシル転位を起こし、A β 1-42 に変換された。これは、光クリックペプチドを A β 実験に用いることで、光照射 (光クリック) による高い時間・空間制御をもって A β 1-42 を産生

することができる可能性を示唆する。

5. おわりに

A β 1-42 を用いた実験で大きな障害となっているハンドリングの難しさは、A β 1-42 の低水溶性・高凝集性に起因する。そこで、このような A β 1-42 の望まれない性質を払拭したクリックペプチドを操作及び保存中で扱い、実験系内でクリックペプチドからインタクトな A β 1-42 を速やかに産生することで、A β 1-42 のハンドリング問題を克服することができる。このクリックペプチドの使用は AD の発病メカニズム解明、ひいては新規創薬ターゲットの発見につながると期待している。

謝辞 本研究において終始ご指導頂いた京都薬科大学薬品化学分野・木曾良明教授に深く感謝致します。本研究の一部にご協力頂きました京都大学・松崎勝巳教授並びに奈良先端科学技術大学院大学・廣田 俊教授に厚く感謝致します。本研究の遂行に際して有益なご助言を頂きました元京都薬科大学薬品化学分野・林 良雄助教授 (現東京薬科大学教授)、Dr. M. Skwarczynski (現クイーズランド大学 博士研究員)、並びに相馬洋平博士 (現シカゴ大学博士研究員) に深く感謝致します。そして、本研究を進めるに当たり、ご支援頂きました諸氏に心から感謝致します。また、筆者は本研究の一部を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。

REFERENCES

- 1) Alzheimer A., Stelzmann R. A., Schnitzlein H. N., Murtagh F. R., *Clin. Anat.*, **8**, 429-431 (1995).
- 2) Glenner G. G., Wong C. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 885-890 (1984).
- 3) Masters C. L., Simms G., Weinman N. A., Multhaup G., McDonald B. L., Beyreuther K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4245-4249 (1985).
- 4) Yankner B. A., Duffy L. K., Kirschner D. A., *Science*, **250**, 279-282 (1990).
- 5) Hardy J. A., Higgins G. A., *Science*, **256**, 184-185 (1992).
- 6) Hardy J., Selkoe D. J., *Science*, **297**, 353-356 (2002).
- 7) Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa

- H., Nukina N., Ihara Y., *Neuron*, **13**, 45–53 (1994).
- 8) Younkin S. G., *Ann. Neurol.*, **37**, 287–288 (1995).
- 9) Zagorski M. G., Yang J., Shao H., Ma K., Zeng H., Hong A., *Methods Enzymol.*, **309**, 189–204 (1999).
- 10) Teplow D. B., *Methods Enzymol.*, **413**, 20–33 (2006).
- 11) Busciglio J., Lorenzo A., Yankner B. A., *Neurobiol. Aging*, **13**, 609–612 (1992).
- 12) Simmons J. K., May P. C., Tomaselli K. J., Rydel R. E., Fuson K. S., Brigham E. F., Wright S., Lieberburg I., Becker G. W., Brems D. N., Li W. Y., *Mol. Pharmacol.*, **45**, 373–379 (1994).
- 13) Howlett D. R., Jennings K. H., Lee D. C., Clark M. S., Brown F., Wetzel R., Wood S. J., Camilleri P., Roberts G. W., *Neurodegeneration*, **4**, 23–32 (1995).
- 14) Soto C., Castano E. M., Kumar R. A., Beavis R. C., Frangione B., *Neurosci. Lett.*, **200**, 105–108 (1995).
- 15) Sohma Y., Sasaki M., Hayashi Y., Kimura T., Kiso Y., *Chem. Commun.*, 124–125 (2004).
- 16) Sohma Y., Sasaki M., Hayashi Y., Kimura T., Kiso Y., *Tetrahedron Lett.*, **45**, 5965–5968 (2004).
- 17) Sohma Y., Hayashi Y., Kimura M., Chiyo-mori Y., Taniguchi A., Sasaki M., Kimura T., Kiso Y., *J. Pept. Sci.*, **11**, 441–451 (2005).
- 18) Sohma Y., Yoshiya T., Taniguchi A., Kimura T., Hayashi Y., Kiso Y., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **88**, 253–262 (2007).
- 19) Taniguchi A., Sohma Y., Kimura M., Okada T., Ikeda K., Hayashi Y., Kimura T., Hirota S., Matsuzaki K., Kiso Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 696–697 (2006).
- 20) Sohma Y., Kiso Y., *ChemBioChem*, **7**, 1549–1557 (2006).
- 21) Taniguchi A., Skwarczynski M., Sohma Y., Okada T., Ikeda K., Prakash H., Mukai H., Hayashi Y., Kimura T., Hirota S., Matsuzaki K., Kiso Y., *ChemBioChem*, **9**, 3055–3065 (2008).
- 22) Taniguchi A., Sohma Y., Hirayama Y., Mukai H., Kimura T., Hayashi Y., Matsuzaki K., Kiso Y., *ChemBioChem*, **10**, 710–715 (2009).
- 23) Kiso Y., Taniguchi A., Sohma Y., “Wiley Encyclopedia of Chemical Biology,” Vol. 1, Wiley & Sons Inc., Hoboken, 2009, pp. 379–383.
- 24) Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149–2154 (1963).
- 25) Kent S. B. H., “Peptides, Structure and Function; Proceedings of the 9th American Peptide Symposium,” eds. by Deber C. M., Hruby V. J., Kopple K. D., Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1985, pp. 407–414.
- 26) Atherton E., Sheppard R. C., “Peptides, Structure and Function; Proceedings of the 9th American Peptide Symposium,” eds. by Deber C. M., Hruby V. J., Kopple K. D., Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1985, pp. 415–418.
- 27) Tickler A. K., Clippingdale A. B., Wade J. D., *Protein Pept. Lett.*, **11**, 377–384 (2004).
- 28) Mayer G., Heckel A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 4900–4921 (2006).
- 29) Patchornik A., Amit B., Woodward R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6333–6335 (1970).
- 30) Ueda S., Fujita M., Tamamura H., Fujii N., Otaka A., *ChemBioChem*, **6**, 1983–1986 (2005).
- 31) Hagen V., Bendig J., Frings S., Eckardt T., Helm S., Reuter D., Kaupp U. B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 1046–1048 (2001).
- 32) Cuerten B., Kullmann P. H. M., Bier M. E., Kandler K., Schmidt B. F., *Photochem. Photobiol.*, **81**, 641–648 (2005).
- 33) Hagen V., Dekowski B., Nache V., Schmidt R., Geissler D., Lorenz D., Eichhorst J., Keller S., Kaneko H., Benndorf K., Wiesner B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 7887–7891 (2005).
- 34) Arnett E. M., Mitchell E. J., Murty T. S. S. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 3875–3879 (1974).