

博士論文

アミロイド β オリゴマーの安定化を指向したアミロイド β 1-42誘導体のデザインと合成

山本 将史

博士論文

アミロイド β オリゴマーの安定化を指向したアミロイド β 1-42 誘導体のデザインと合成

山本 将史

目次		
略語表		4
序論		6
本論		
第1章	オキシムリンカーを有する A β 42 誘導体の設計・合成・性質評価	15
	1-1 オキシムリンカーを有する A β 42 誘導体の化合物設計	
	1-2 オキシムリンカーを有する A β 42 誘導体の合成	
	1-3 コントロールペプチドの合成	
	1-4 オキシムオリゴマーの形態解析	
	1-5 SDS-PAGE による解析	
	1-6 CD スペクトルによる解析	
	1-7 チオフラビン T アッセイ	
	1-8 細胞毒性評価	
	1-9 オキシム交換反応によるオキシムリンカーの切断	
	1-10 小括	
第2章	ラクタムリンカーを有する A β 42 誘導体の設計・合成・性質評価	49
	2-1 ラクタムリンカーを有する A β 42 誘導体の化合物設計	
	2-2 ラクタムリンカーを有する A β 42 誘導体の合成	
	2-3 ラクタムオリゴマーの形態解析	
	2-4 SDS-PAGE による解析	
	2-5 CD スペクトルによる解析	
	2-6 チオフラビン T アッセイ	
	2-7 サイズ排除クロマトグラフィーによる解析	
	2-8 細胞毒性評価	
	2-9 塩橋構造の違い	
	2-10 先行研究との違いに関する考察 (検討データを含む)	
	2-11 オキシムリンカーを有する誘導体 2 との違いに関する考察	
	2-12 小括	
Experimental sections		69
References		77

総括	80
謝辞	81

略語表

A β	amyloid- β peptide
AD	Alzheimer disease
AFM	atomic force microscopy
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
DAP	2,6-diaminopimeric acid
DIC	diisopropyl carbodiimide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
ESI	electrospray ionization
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
h	hour
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Hexafluorophosphate
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
Me	methyl
min	minute
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
ppm	parts per million
QOL	quality of life
rt	room temperature
SD	standard deviation
SEC	size-exclusion chromatography
SEM	standard error of the mean
SPPS	solid-phase peptide synthesis
TEM	Transmission electron microscopy
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
ThT	thioflavin T
TIS	triisopropylsilane
TOF	time-of-flight or turnover frequency

UV ultraviolet
WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-
2H-tetrazolium

序論

アルツハイマー病 (AD) は、認知機能の低下を主症状とする神経変性疾患の一つである^[1]。AD の患者数は全世界で現在約 3000 万人と推定されており、認知症患者の半数以上を占める。さらに、2050 年には患者数が 1 億人にも上ると予想されている^[2]。1906 年に Alois Alzheimer が AD 患者の剖検例を報告してから 100 年余りが経ち、AD の病態解明は進んだとされている。しかしながら、未だ明らかになっていない部分が多く残されていることから、仮説に基づいた予防・治療法の開発が行われているのが現状である。このような背景から、現在のところ根本的な予防・治療法はなく、対症療法に留まっている。

AD の発症機構として「アミロイドカスケード仮説」が提唱されている (Figure 1)^[3]。AD の病理の三大特徴として、老人斑、神経原線維変性、神経細胞死が挙げられる。この中で、老人斑は疾患発症前から患者脳内に沈着が見られることから注目されるようになった^[3]。この老人斑は、アミロイド β ペプチド ($A\beta$) が異常に凝集し、その凝集体が蓄積したものであることが分かってきている^[3]。 $A\beta$ は、アミロイド前駆体タンパク (amyloid precursor protein) から N 末端側を β -secretase に、C 末端側を γ -secretase に順に切断されることにより産生される。ここで、 γ -secretase の切断部位が 40 番目や 42 番目など複数にわたることから、 $A\beta$ には $A\beta_{1-40}$ や $A\beta_{1-42}$ などいくつかのアイソフォームが存在する。産生した $A\beta$ モノマーは凝集性が高く、オリゴマーを経由し、クロス β -シート構造を有するアミロイド線維を形成する^[4]。そして、 $A\beta$ の凝集体であるオリゴマー、線維が神経毒性を示すことから^[5,6]、 $A\beta$ の凝集が AD の発症に深く関わっているとされている。特に、 $A\beta_{1-42}$ は $A\beta_{1-40}$ など他の $A\beta$ に比べ、凝集性が高く、毒性も強いことが分かってきている^[7]。

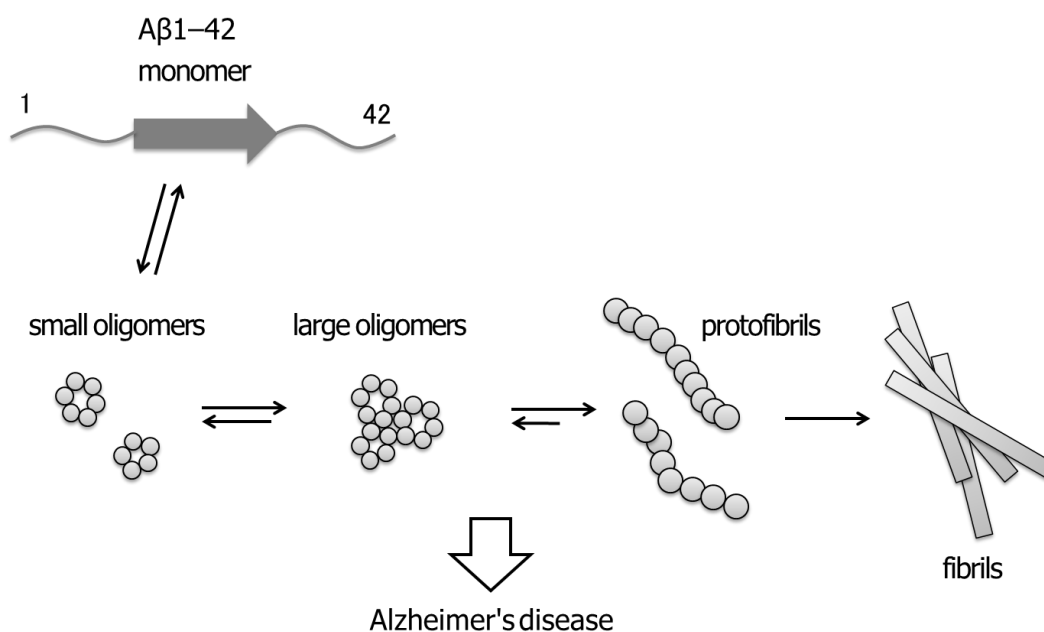


Figure 1. Amyloid cascade hypothesis

様々な凝集体の中で、アミロイド線維よりオリゴマーの方が神経毒性は強いと考えられている^[9]ことから、毒性本体である A β オリゴマーの性質を解析することはアルツハイマー病の原因を解明するために非常に重要である。しかし、A β の凝集混合物の中から毒性本体のオリゴマーを単離しその性質解析することは、オリゴマーが動的に構造変化を起こし、かつ不安定であるため、極めて困難である。そこで、何らかの手法により A β オリゴマーを安定化することができれば、A β オリゴマーの性質を解析することができると考えられる。

A β オリゴマーを安定化する手法として、これまでに報告されている研究例を以下に挙げる。Balducci らは、4 °C にてインキュベーションしたサンプルを用いて均一な A β オリゴマーを調製し、それを AFM 解析および SEC (size-exclusion chromatography) にて分析している^[9]。4 °C にて調製した A β サンプルでは線維は観察されず、オリゴマーを支持する化学種が AFM にて観察されている (Figure 2a) ^[9]。また、SEC では initial state と同じ溶出時間に単一のピークを検出している (Figure 2b) ^[9]ことから、4 °C にて調製した A β サンプルは少なくとも SEC で溶出される、均一な化学種を形成していることが分かる。

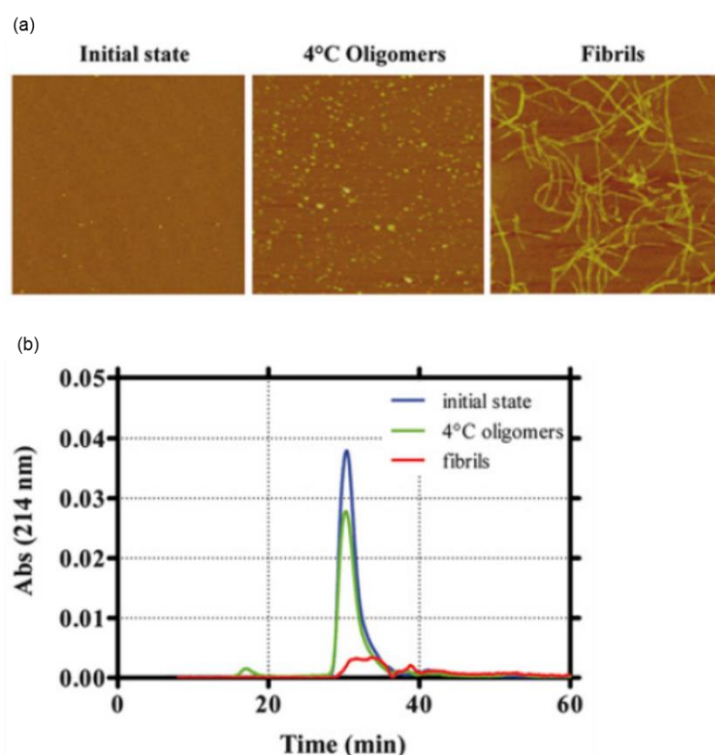


Figure 2. The pictures of (a), (b) are cited from ref. 9. Atomic force microscopy (AFM) and size exclusion chromatography (SEC) of different A β 1–42 preparations. (a) AFM characterization of the A β 1–42 the “initial state” corresponds to the freshly dissolved peptide kept at 4 °C; the oligomers were formed after 24 h incubation at 4 °C, pH 7.4, and the fibrils after 24 h of incubation at 37 °C, pH 2 (scan size 2 μ m \times 2 μ m). (b) Initial state (blue), 4 °C A β 1–42 oligomers (green), and fibrils (red) analyzed by SEC, monitoring absorbance at 214 nm.

しかしながら、Balducci らが報告している 4 °C で調製した A β オリゴマーは、SEC で単一のピークを与えていることから、ある程度均一な A β サンプルであると考えられるものの、オリゴマー自身の安定性評価には至っていない。また、当然、当該オリゴマーは生理的溫度 (37 °C) では均一性を喪失すると考えられる。

したがって、A β オリゴマーを安定化するためには、生化学的な手法のみでは困難であることが想定される。一方で、A β オリゴマーを安定化する手法として検討されている別の手法として、A β の構造をもとに直接化学修飾する手法が挙げられる。これまでに報告されている化学修飾 A β オリゴマーとして、以下の研究報告がある。

・ Härd らの研究

Härd らは、A β 42 および A β 40 の Ala²¹ および Ala³⁰ を Cys に置換し、側鎖のそれぞれのチオール基をジスルフィド結合で架橋したペプチド (A β 42CC および A β 40CC) を化学合成し (Figure 3a) [10c]、それらが形成するオリゴマーの二次構造 (Figure 3c) [10c] や形態学的解析 (Figure 3d) [10c]、および毒性評価を行っている [10a, c, d] (Figure 5, ①)。A β 42CC の β -sheet oligomers は SDS-PAGE にてダイマーやトリマーに相当する分子量のバンドを与え (Figure 3e) [10c]、TEM (Transmission electron microscopy) にてプロトフィブリル状のものが確認されている (Figure 3d) [10c]。また、SH-SY5Y human neuroblastoma cells を用いて、それぞれのオリゴマー、プロトフィブリルの神経毒性を評価し、 β -シート構造を有するオリゴマーが最も神経毒性が強いこと (Figure 3f) [10c] を報告している。これらの結果は、A β 42 の Ala²¹ と Ala³⁰ を Cys へ置換し、それぞれの側鎖をジスルフィド結合で架橋したことによるオリゴマーの安定化効果と考えることができる。しかし、最も神経毒性が高い化学種と同定された β -sheet oligomer の安定性に関しては評価されていない。

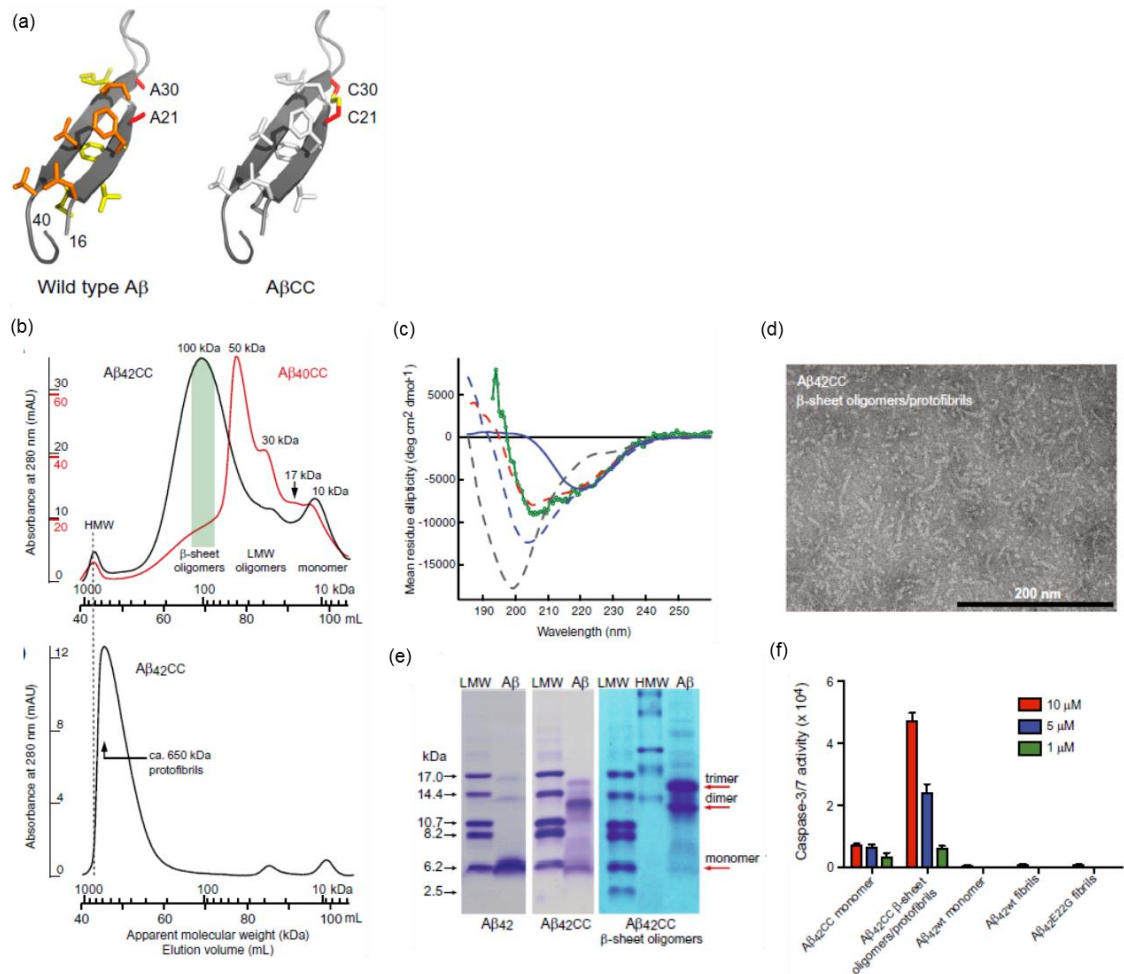


Figure 3. The pictures of (a), (b), (c), (d), (e), (f) are cited from ref. 10c. (a) (Left) The β -hairpin conformation of A β 40 observed in complex with an Affibody binding protein. Nonpolar side chains at the two hydrophobic faces are shown as sticks and colored yellow and orange, respectively. The Ala²¹ and Ala³⁰ methyls are located in close proximity on opposite β -strands. (Right) Model of the A β A21C/A30C double mutant.

(b) (upper) Formation and separation of A β 42CC (black) and A β 40CC (red) oligomers during SEC on a Superdex 200 PG 16/600 column. Monomer peptide samples were loaded in denaturing buffer and eluted with native phosphate buffer at pH 7.2. Apparent molecular weights and classification of eluted oligomers have been indicated. HMW aggregates elute with the void volume. Sample amounts: 2.7 mg A β 40CC and 1.7 mg A β 42CC; (down) SEC of concentrated A β 42CC β -sheet oligomers (1 mL, 145 μ M), which form protofibrils with an average apparent molecular weight of \sim 650 kDa. The dotted line shows that these are smaller than HMW aggregates in (b).

(c) CD (mean residue ellipticity) of SEC fractions pooled as indicated by shaded areas in (b). Dashed lines: 8-kDa monomer (gray, 12 μ M), 30-kDa LMW oligomers (blue, 16 μ M), and 96-kDa β -sheet oligomers (red, 8 μ M) of A β 40CC. Green: \sim 100-kDa β -sheet oligomers of A β 42CC (13 μ M). Solid

blue line: the 30-kDa LMW oligomer fraction of A β 40CC after concentration and heat treatment showing formation of β -sheet oligomers.

(d) TEM micrograph of a concentrated sample of A β 42CC β -sheet oligomers (190- μ M monomer concentration) showing assembly of β -sheet oligomers into protofibrils.

(e) SDS/PAGE of wild-type A β 42 (Left), purified but unfractionated A β 42CC (Center), and A β 42CC β -sheet oligomers formed during SEC as in (b) (Right). The right lanes in all panels contain A β samples, and other lanes contain high and low molecular weight standards (HMW and LMW). Weights corresponding to monomer and SDS-resistant dimers and trimers have been indicated. The loading buffer contained 2.5 mM TCEP (heat-stable reducing agent) to completely break all disulfide bonds.

(f) Neurotoxicity of A β CC to SH-SY5Y human neuroblastoma cells. A β CC samples, except β -sheet oligomers/protofibrils, were prepared and isolated by SEC, as in (b), concentrated to ~75 to 250 μ M in phosphate buffer at pH 7.2, and added to cell cultures at 1-, 5-, or 10- μ M concentrations. Caspase-3/7 activity reporting on apoptosis was measured after 24 h of treatment. Dose-dependence of apoptosis induced by A β 42CC species compared with that of wild-type A β 42 monomer and fibrils and A β 42E22G.

・ Teplow らの研究

Teplow らは PICUP という手法を用いて、SDS-PAGE で A β 40 のオリゴマーを分離し、それらの性質解析を行っている (Figure 4a, lane 1, Figure 5, ②) [10b]。まず、SDS-PAGE を行い、ゲルの切り出し・抽出を経て様々な会合度のオリゴマーの単離を行った (lane 2-6)。レーン 2 は単離後のオリゴマー群を再度混合して SDS-PAGE 解析したものであり、レーン 3, 4, 5, 6 は、単離されたモノマー、ダイマー、トリマー、テトラマーをそれぞれ SDS-PAGE 解析したものである。なお、レーン 7 はコントロールであり、オリゴマーを含まないゲルに対し同様の操作を行い、バンドが観測されないことを確認したものである。

次に、彼らは単離されたモノマーからテトラマーの性質を比較している。その結果、会合度が大きいオリゴマーほど、 β -シート構造を形成しやすく (Figure 4b) [10b]、対応する単量体 (PICUP 処理なし; UnXL) の凝集を促進しやすく (シード活性が高い) (Figure 4c) [10b]、かつ、神経様細胞 PC12 に対し強い細胞毒性を示すことが明らかにしている (Figure 4d) [10b]。しかし、彼らの報告においてもオリゴマーそのものの安定性評価は検討されていない。

近年、彼らは上記研究を A β 42 へ展開し、A β 42 の Tyr¹⁰ を Phe¹⁰ へと置換するとともに、Asp¹、Phe²⁰、Ala³⁰、Ala⁴² をそれぞれ Tyr へと置換した変異体を 4 種類それぞれ化学合成し、それらに対し PICUP 処理を行っている [10d]。その結果、Ala⁴² を Tyr へと置換した変異体において、最大で 9 量体までをゲル中のバンドとして検出することに成功しているものの、これらのオリゴマーについて単離は行っていないということを報告している。

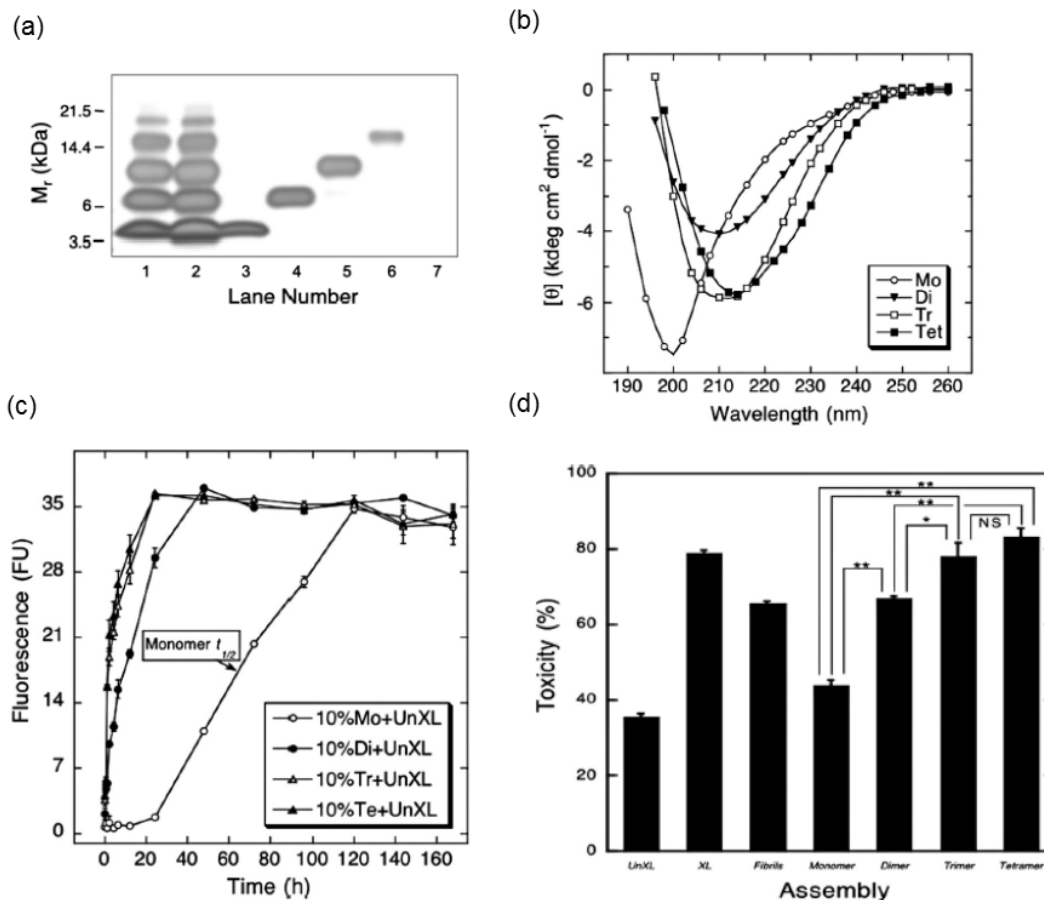


Figure 4. The pictures of (a), (b), (c), (d) are cited from ref. 10b. (a) Stability of purified oligomers. Aβ samples were subjected to PICUP and SDS-PAGE. Individual gel bands were stained with Coomassie blue, excised, and then extracted under alkaline conditions. The extracts then were reconstituted in F12K medium and analyzed by SDS-PAGE and silver staining. Lane 1, cross-linked Aβ immediately after PICUP (cross-linking control). Lane 2, cross-linked Aβ subjected to the entire protocol, but with all bands pooled together (control for unfractionated Aβ subjected to alkaline extraction). Lane 3, monomer band. Lane 4, dimer band. Lane 5, trimer band. Lane 6, tetramer band. Lane 7, a "band-equivalent"-sized piece of gel ("no protein" control). The data are representative of results from each of three independent experiments.

(b) Secondary structure dynamics of Aβ assemblies. Isolated oligomers [monomer (Mo), dimer (Di), trimer (Tr), and tetramer (Te)] were prepared in 10 mM PBS, pH 7.4, and then monitored immediately by CD. Data are representative of three independent experiments.

(c) Nucleation of Aβ assembly. The nucleation activity of different Aβ preparations was assessed by addition of each preparation to uncross-linked Aβ, which then was incubated for 7 d at 37 °C in 10 mM PBS, pH 7.4. Aliquots were assayed periodically by using ThT. The preparations were 10% (vol/vol) Aβ monomer (Mo), dimer (Di), trimer (Tr), or tetramer (Te). Binding is expressed as mean fluorescence [in arbitrary fluorescence units (FU)] ± SE. Data were obtained in three independent

experiments. Arrows indicate times at which half maximal ThT binding was observed.

(d) LDH activity. Uncross-linked (UnXL), cross-linked (XL), fibrillar, monomeric, and purified oligomeric (dimers, trimers, tetramers) A β samples were added at final nominal concentrations of 25 μ M to differentiated PC12 cells. LDH activity in the supernatant fluid then was measured after 48 h. Data are representative of that obtained in three independent experiments. Each column represents means \pm SE. The statistical significance of the toxicity differences among samples was determined by one-way fractional ANOVA and multiple comparison tests. *, P < 0.01; **, P < 0.001. NS, not significant.

・その他の研究

入江らは、A β 40 の Glu²² をプロリンに置換し、Ala³⁰ において L,L-DAP で結合させた A β 40 ダイマーを化学合成し、その凝集性や形態学的解析、および細胞毒性などの性質解析をしている^[10e]。(Figure 5, ③)

Nowick らは、ペプチドの主鎖に N-メチル化したアミノ酸を導入し、A β の 17 番目から 36 番目に相当する部分配列を用いてトリマーを合成し、その X 線結晶構造解析、毒性評価、二次構造解析などを行っている^[10f]。(Figure 5, ④)

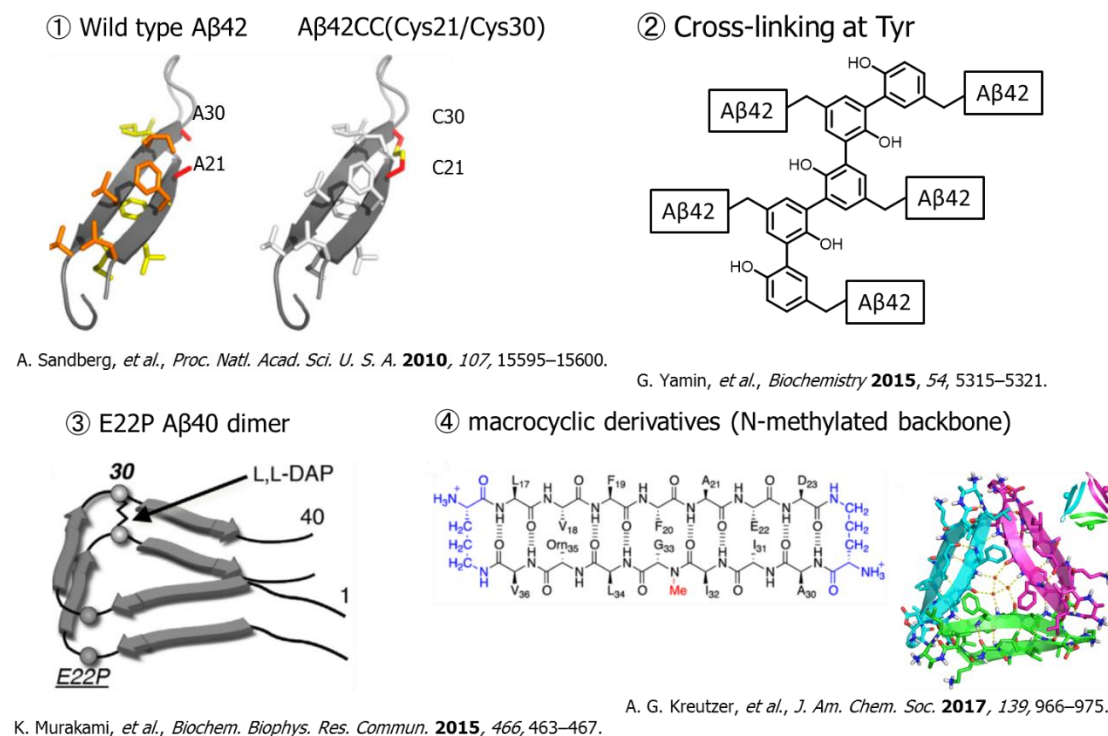


Figure 5. Previously reported A β oligomers.

しかし、これらの論文で報告されている A β オリゴマーは、A β 42 が有するアミノ酸配列に変異（ネイティブとは異なるアミノ酸に置換）を入れている、もしくは、A β 42 の部分配列のみを用いているため、それらの構造変換の影響を受けていることから結果生じるオリゴマーである可能性を含んでいる。また、報告されているオリゴマーはいずれも、オリゴマーから線維へ凝集状態の変化を起こすことができないものである。したがって、ネイティブ A β が形成するオリゴマーの性質を反映できていない可能性がある。

以上のような背景から、本研究では、A β オリゴマーの安定化を試みるにあたり、A β の構造をもとに直接化学修飾する手法を選択した。この手法によりネイティブ A β の凝集混合物の中から単離することなく、均一性の高い状態の A β オリゴマーが得られると考えたからである。また、化学修飾によるオリゴマーミミックの安定化は、動的に構造変化を起こすオリゴマーの性質解析に対して有用なアプローチであると考えられる。

さらに、ネイティブ A β 42 から生成されるオリゴマーを反映すべく、本論文では、ネイティブ A β 42 が有するアミノ酸配列を 100%維持した形で安定オリゴマーの形成を目的とした。すなわち、A β 42 が有するアミノ酸残基を全て有し、微小な構造変換のみによりオリゴマーを安定化するという戦略を立てた。そして、得られた A β 42 誘導体のオリゴマーの凝集性、二次構造、毒性などの性質解析を行った。

A β の化学修飾の構造変換の設計方針として、A β の構造安定化に寄与していると考えられている A β ペプチドの側鎖同士の相互作用を利用した、A β ペプチド側鎖の環化に着目した。ペプチド側鎖の環化により、コンフォメーション固定化による会合状態の安定性向上が期待できると考えたためである。検討の結果、A β 42 の 23 番目のアスパラギン酸 (Asp²³) と 28 番目のリジン (Lys²⁸) の側鎖間の塩橋を共有結合で代替することによって、安定オリゴマーが形成することを見出した。さらに、化学的な刺激によって、可逆的な共有結合を切断することにより安定オリゴマーから線維への変換が可能であることを見出した。化学的な刺激によってオリゴマーから線維へ変換可能な安定 A β オリゴマーミミックである点が、本研究におけるオリゴマーミミックの特徴および新規性である。本論文では、上記 A β 42 環化誘導体の安定オリゴマーの性質解析研究について述べる。

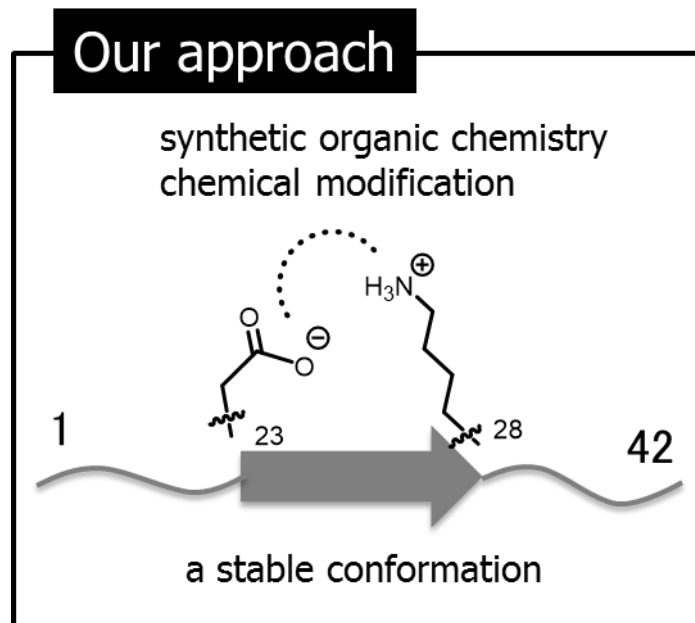


Figure 6. Chemical modification of A β 42.

第1章では、A β 42の Asp²³と Lys²⁸の側鎖を可逆的な共有結合であるオキシムリンカーで環化させた誘導体の設計、合成、および性質評価について述べる。また、オキシムリンカーの結合・切断によるオリゴマーから線維への変換について述べる。

第2章では、A β 42の Asp²³と Lys²⁸の側鎖を不可逆的な共有結合であるラクタム結合で環化させた誘導体の設計、合成、および性質評価について述べる。

本研究により得られた知見がネイティブ A β オリゴマーの性質解析につながり、A β さらにはアミロイドが関与する病態の発症機構の解明や AD 治療薬の開発に貢献できれば幸いである。

第1章 オキシムリンカーを有する A β 42 誘導体の設計・合成・性質評価

1-1 オキシムリンカーを有する A β 42 誘導体の化合物設計

A β 42 に対して有機合成化学的に化学修飾を施すにあたり、A β 42 の凝集性をコントロールすることが必要であると考えた。すなわち、メチオニンを有するネイティブ構造の A β 42 誘導体は A β 42 由来の低溶解性および高い凝集性が予想され、それらの単離および性質解析が困難であることが想定された。そこで、A β 42 の Met³⁵ が酸化された A β 42 メチオニンスルホキシド体に着目した。A β メチオニンスルホキシド体は A β の凝集性を特徴づける β -シート構造を形成する配列中に付加されたスルホキシドに起因し、A β ペプチドの疎水性が軽減されていることから、ネイティブ A β 42 と比較して、その凝集速度が軽減されている。また、A β 42 メチオニンスルホキシド体はアルツハイマー病患者の脳内にも存在するアイソフォームであることが知られている^[11]。したがって、A β 42 メチオニンスルホキシド体に対して化学修飾を施した誘導体の性質解析をすることにより、本研究の目的は達成できると考えた。

A β 42 を化学修飾し、その安定オリゴマーミミックを取得するにあたり、A β ペプチドのコンフォメーションを固定化する戦略を立てた。A β はその凝集の過程においてペプチド鎖同士の分子間相互作用、特に疎水性相互作用により β -シート構造を形成し、凝集が進行すると推定されている。この時、A β ペプチドが様々なコンフォメーションを形成することにより、二量体、三量体、四量体などの比較的小さな会合体が生成する。しかし、それら小さな会合体は不安定であるために、小さな会合体の分子種がさらに会合し、より大きな会合体に変化していく。すなわち、A β が様々な凝集混合物を与える原因の一つとして、凝集の進行過程におけるペプチド鎖のコンフォメーションの多様性があると考えた。

そこで、A β ペプチド鎖を有機合成化学的に化学修飾し、そのコンフォメーションをある程度固定化することができれば、凝集混合物に至る様々な分子間相互作用を軽減でき、一定のコンフォメーションを有する均一性の高い A β サンプルを取得できるのではないかとこの仮説を立てた。

コンフォメーションを固定化する戦略として、A β ペプチドの側鎖の官能基を利用し、共有結合で環化させることを計画した。環化戦略として、A β の構造安定化に寄与していると考えられている Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖の塩橋構造（イオンの相互作用、Figure 1-1）^[12,13a,b]を利用することを考えた。

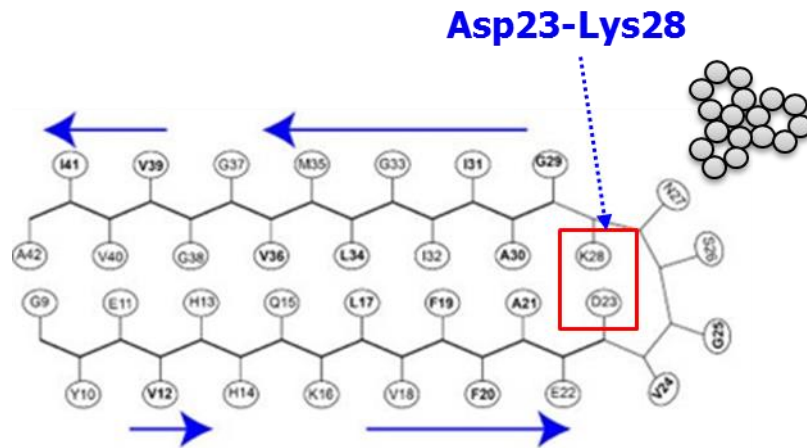


Figure 1-1. The salt-bridge of A β 42 oligomer.

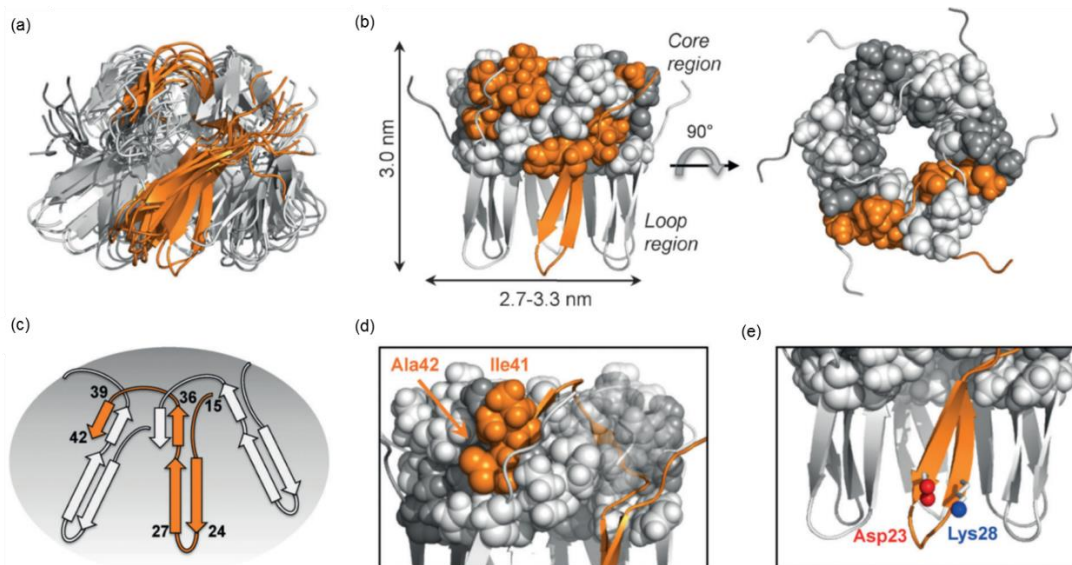


Figure 1-2. The pictures of (a), (b), (c), (d), (e) are cited from ref. 13b. Models of hexameric A β 42cc building blocks of protofibrils. (a) Superposition of the ten models with the lowest Rosetta scores (residues 1–14 were not included in the modeling; all-atom r.m.s. deviation=1.31 Å). (b) Dimensions of the hexamer barrel with the loop and core regions indicated. Side chains of the hydrophobic core (those with the largest change in accessible surface area upon hexamer formation) are shown as spheres. The image to the right is rotated by 90° relative to the left image. (c) Simplified representation of the hexamer topology. The numbers refer to the residue positions in the orange protomer. (d) The backbone and side chains of the C-terminal residues Ile⁴¹ and Ala⁴² (orange spheres) are packed into the hydrophobic core of the hexamer. (e) Asp²³-Lys²⁸ salt bridge.

Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖の塩橋構造は、A β 42 オリゴマーに観察されている (Figure 1-1, 1-2) [13a,b]—一方、A β 42 線維には観察されず、別のアミノ酸残基 (Asp¹ の側鎖 (Figure 1-3)

[14]、または Ala⁴² の C 末端 (Figure 1-4) [15]) と Lys²⁸ で塩橋構造が観察されていることが知られている。すなわち、Aβ₄₂ における Asp²³ と Lys²⁸ の塩橋構造は、Aβ₄₂ オリゴマーに特有の相互作用であることが推定できる。そこで、Aβ₄₂ の Asp²³ の側鎖のカルボキシル基と Lys²⁸ の側鎖のアミノ基を共有結合で連結することにより、安定な Aβ オリゴマーが取得することができるのではないかと考えた。

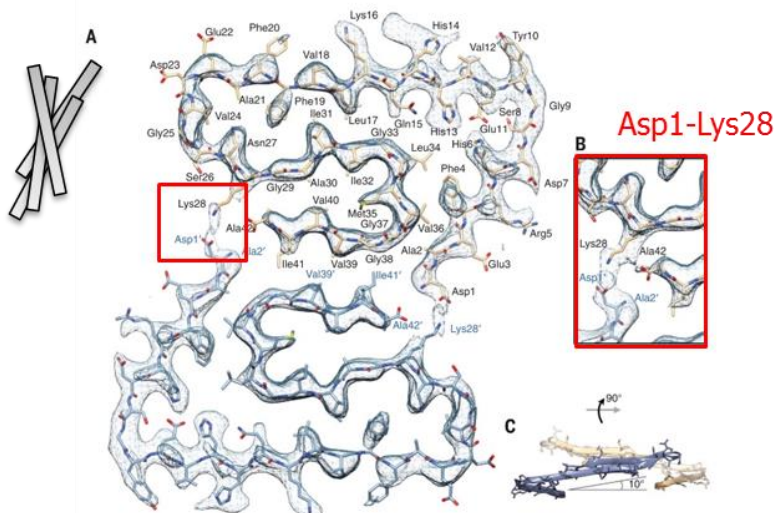


Figure 1-3. The salt-bridge (Asp¹-Lys²⁸) of Aβ₄₂ fibril. The pictures is cited from ref. 14.

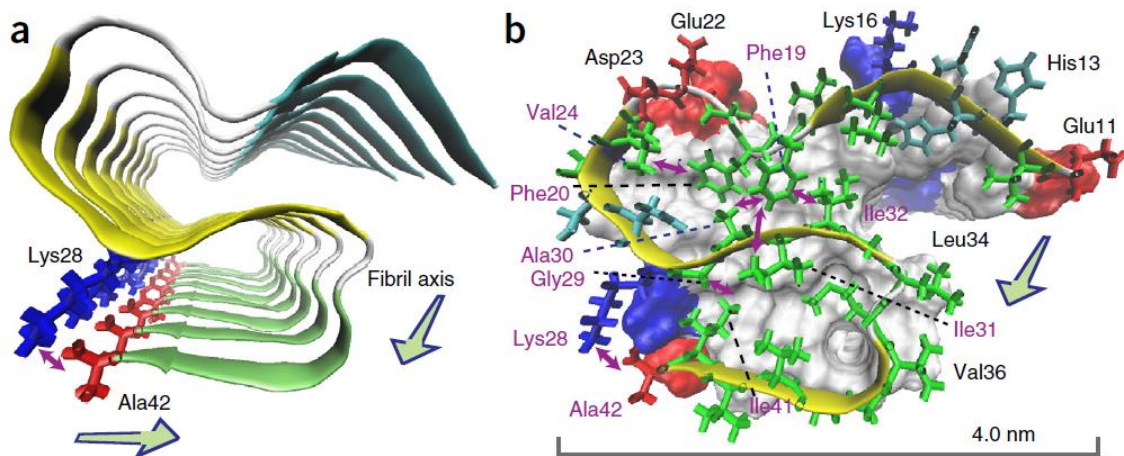


Figure 1-4. The salt-bridge (Lys²⁸-Ala⁴²) of Aβ₄₂ fibril. The pictures is cited from ref. 15.

化学的な刺激によって可逆的な共有結合を切断することにより、安定オリゴマーから線維への変換を可能にすべく、共有結合の平衡系を利用することを考えた。

共有結合でありながら可逆的な結合・解離が容易に実現できる系、すなわち共有結合の平衡系を活用する化学として「動的共有結合化学 (dynamic covalent chemistry)」という概念が、Lehn らによって提唱されている^[16]。動的共有結合化学に基づいて形成される分子は、熱力学的に安定な構造をもつ一方で、温度、光、圧力、触媒や鋳型の有無など、特定の外部刺激によりその構造を変化させることができる。

この考え方は、架橋分子のリサイクルの架橋形式に適応することができる。すなわち、架橋分子の構成単位が刺激に応じて可逆的に開裂する動的共有結合を有しているため、適当な刺激（熱、光、触媒など）により架橋・解離を行き来することができる。このような系では可逆の開裂を化学反応とするため、架橋構造以外の構成単位は刺激による化学反応に一切関与しない構造となっているため、非常にリサイクルに適した系と言える。

例えば、アミンやアミノオキシ基を有する化合物と、アルデヒドやケトンなどのカルボニル化合物との反応で生成するイミンやオキシムでは、水の付加・脱離を伴うイミン結合やオキシム結合の形成・開裂平衡の他、別のアミンやイミンとの反応による交換平衡反応が成立する（Figure 1-5）。この系は動的共有結合のインターロック分子構築で最もよく検討されてきた交換平衡反応系であるとされている^[17]。

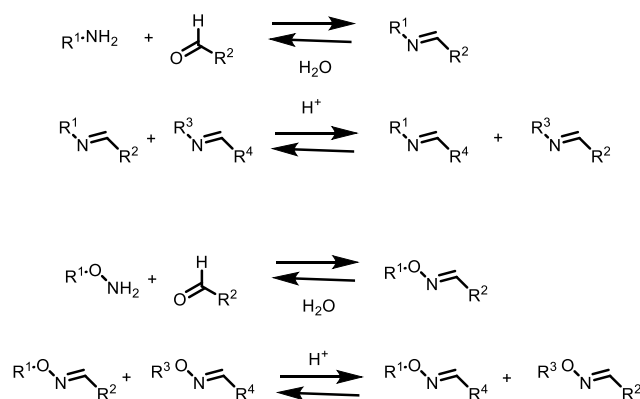


Figure 1-5. Reversible imine and oxime bond cleavage.

また、Lehn らは動的共有結合の平衡系を、新たなホスト・ゲスト相互作用の探索手法として、分子認識・超分子化学の考え方に基づいた、動的コンビナトリアル化学（Dynamic Combinatorial Chemistry: DCC）を提唱している^[16]。この考え方は、安定に単離された分子を構成要素とする従来のコンビナトリアル・ライブラリーとは異なり、分子集合体の平衡混合物をそのまま構成要素とするという点に特徴がある（動的コンビナトリアル・ライブラリー（Dynamic Combinatorial Library: DCL））。

Stoddart らによれば、ライブラリー混合物にホストとなる鋳型（Template）を加えれば、そのホストと最も強力に結合しうる特定の分子集合体が熱力学的平衡を経て増幅されてくる（Figure 1-6）^[17]。つまり、構成要素の混合物自体が最も相性の良い組み合わせを自動的に見つけ出してくることが可能となる。各要素の増幅度を分析すれば、新しい分子相互作用の組み合わせを少ない試行回数で見いだすことができる。

原理的には様々な応用が可能と考えられ、ホストをタンパク質、ゲストを有機小分子集合体にできれば、タンパク質に強固に結合できる分子が探索可能である。この手法は医薬品リードの探索そのものといえる。例えば、小分子の構成要素として、アルデヒドとアミンを有

する分子を組み合わせることにより、生成するイミンを還元し、新しいアミン分子を得ることができる (Figure 1-7) [18]。また、小分子の構成要素をアミンに替えてアミノオキシ基を有する分子へ変換することにより、オキシムを得ることができる (Figure1-8) [18]。

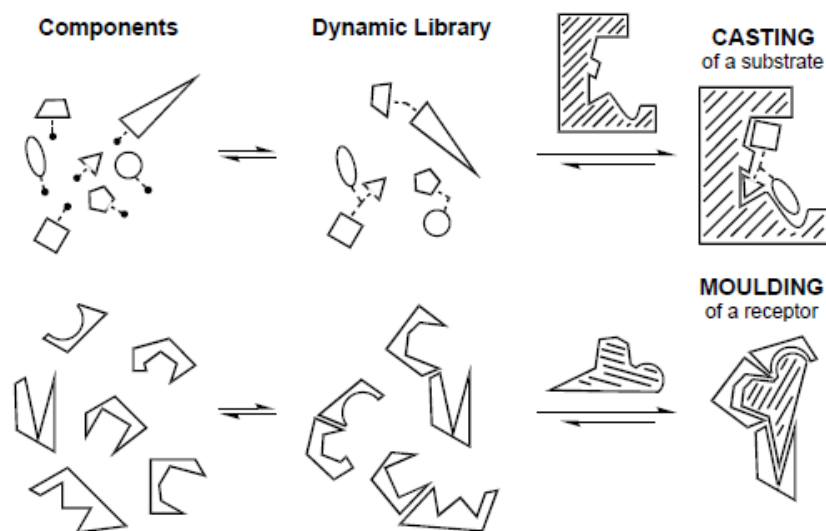


Figure 1-6. Diagrammatic representation of casting and moulding in DCLs. In casting, a macromolecule provides a cavity within which the optimum ligand may be trapped, whereas, in moulding, the ligand collects the optimum receptor around itself.

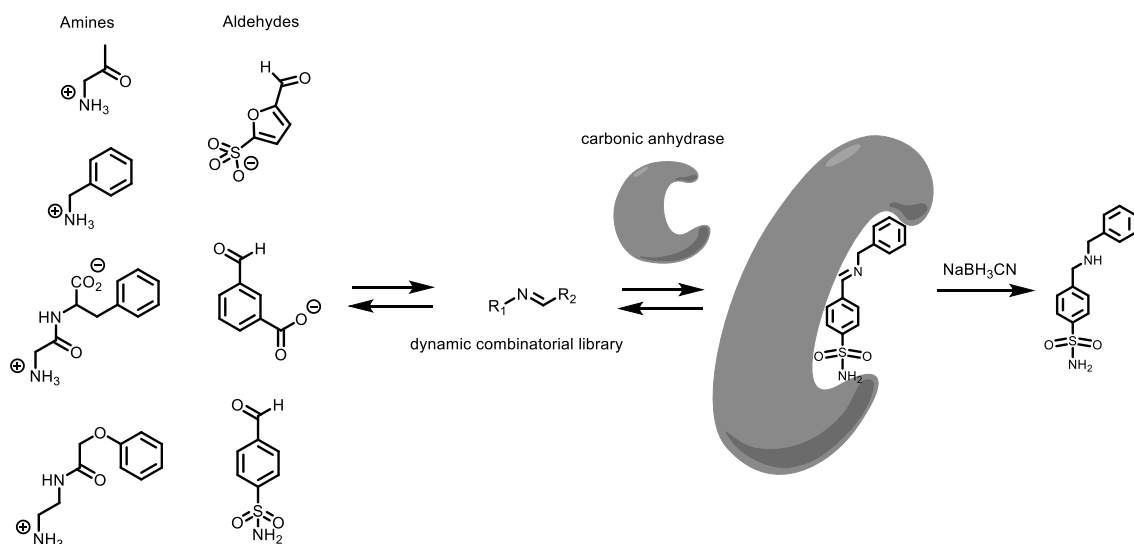


Figure 1-7. Formation of a DCL of imine from four amines and three aldehydes.

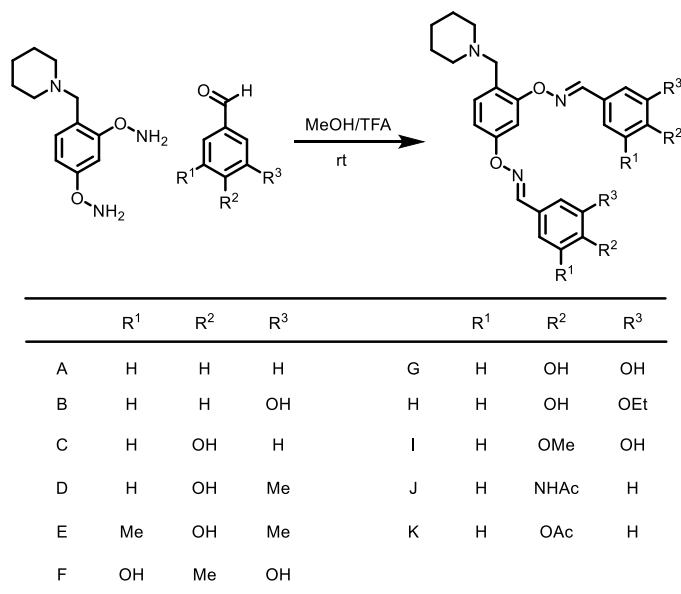


Figure 1-8. Formation of an oxime-based DCL.

また、Figure 1-5 で示したイミン交換反応は、フォールディングによって駆動される、らせんオリゴマー形成でもイミン結合の動的な性質が有効に活用されている。Moore らは、末端に異なるイミン構造を持つ 2 種類のオリゴアセチレンを用いて、酸触媒のイミン交換平衡によりランダムコイル状の生成物のフォールディングにより、らせん分子状の生成物の構築に成功している (Figure 1-9) [19a,b]。すなわち、イミン交換することにより、分子の三次元構造が変化することを意味している。Figure 1-9 ではイミン交換反応を例に挙げているが、基質をオキシムに替えても同様なオキシム交換反応が成立すると考えられる。

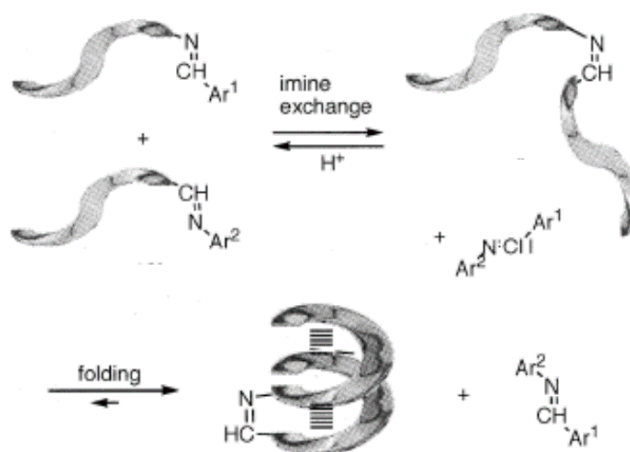


Figure 1-9. Helix formation by molecular folding via reversible imine bond cleavage.

オキシム交換反応によりオキシムリンカーの結合・切断を活用した、ペプチドの三次元構造の変化をとらえた研究例として、Haney らの研究が報告されている [20a,b]。

Haney らは、ペプチドの側鎖をオキシム結合でクロスリンクさせ、 α -ヘリックスのコンフォメーションの変化をとらえている。彼らの研究によると、オキシムリンカーで結合していないペプチド **12**~**15** (Figure 1-10a) [20b]は α -ヘリックス構造に変化がないものの、それぞれのペプチドに対してオキシムリンカーで結合させたペプチド (Figure 1-10b) [20b]は、リンカーの長さおよびリンカーを導入する位置に応じて、それぞれのペプチドが形成する α -ヘリックス構造が異なることを示している (Figure 1-10c) [20b]。このことは、オキシムリンカーを有するペプチドでは、対応するオキシムリンカーを有さない (切断された) ペプチドと比較し、それらの二次構造が変化することを示唆している。

A β の凝集過程においては A β ペプチドの二次構造が影響を与えていることから、ペプチドの二次構造の変化は A β ペプチドの会合・凝集に変化を及ぼす可能性があると考えられる。すなわち、A β 42 ペプチドの側鎖にオキシム構造を導入することにより、オキシムリンカーが結合している時と切断された時において、その二次構造が変化し、A β の会合・凝集が変化すると期待できる。

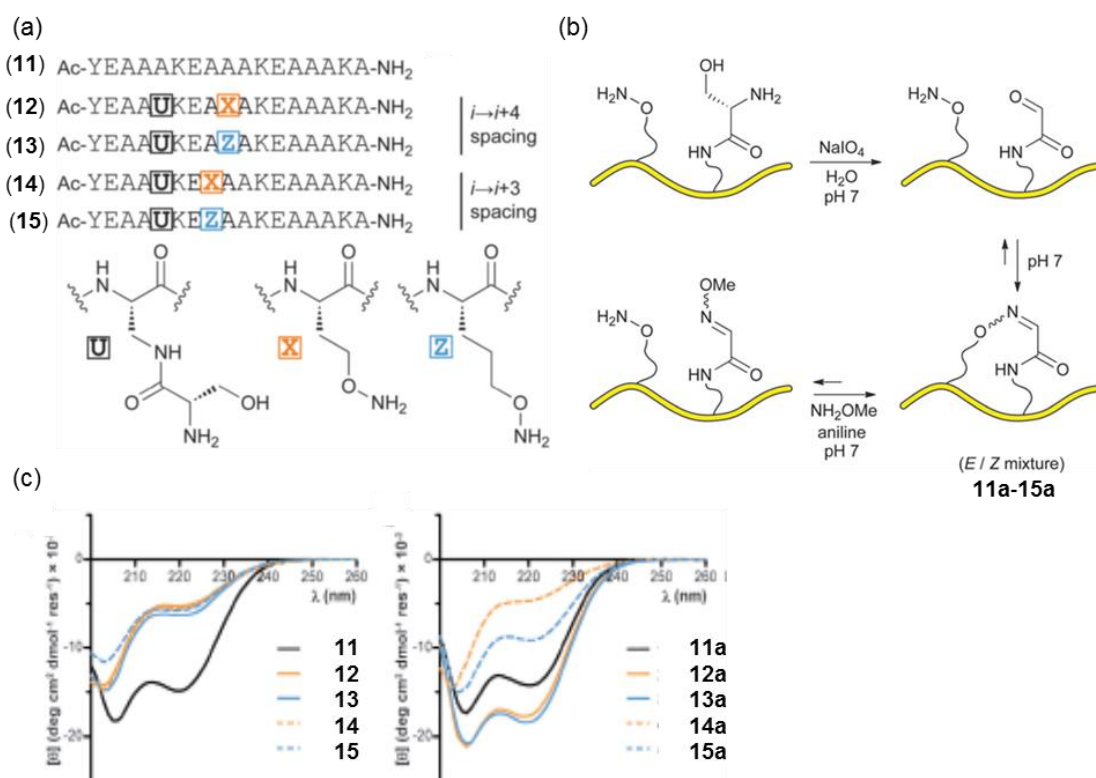


Figure 1-10. The pictures of (a), (b), (c) are cited from ref. 20b. (a) Structures of peptides **11**–**15** and residues U, X and Z. (b) Conversion of peptides **12**–**15** to cyclic oximes **12a**–**15a**, and exchange of **12a** to linear oxime. (c) Circular dichroism scans at 20 °C (a,b) for peptides **11**–**15** and oxime-bridged cyclic peptides **12a**–**15a**. Measurements were carried out on 100 mM concentration peptide solutions in 100 mM phosphate pH 7 in absence (left) or presence (right) of 200 mM sodium periodate. Measurements of **12a**–**15a** were carried out on unseparated E/Z oxime mixtures.

以上のことから、A β 42 の側鎖に導入する共有結合としてオキシムリンカーを採用することにした。オキシムリンカーは加水分解による結合・切断により、オリゴマーから線維への変換が可能になると考えたからである。そこで、本研究では、メチオニンスルホキシドを有する A β 42 に対して、Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖の塩橋構造をオキシムリンカーに代替した化合物 **2** (以下、**2** と記載) を設計・合成し、その性質を評価することとした (Figure 1-11)。

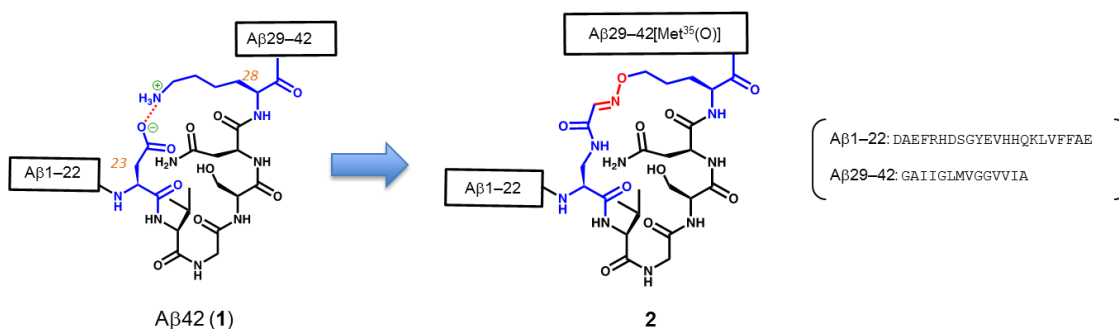


Figure 1-11. Simplified chemical structures of A β 42 and its mimic.

しかしながら、ネイティブ構造の A β 42 誘導体は水への溶解性が低く、高い凝集性を有することから、合成および性質評価において取り扱いが困難であることが想定された。そこで、相馬・木曾らによって確立された、A β 42 での凝集性低減・水溶性向上に実績のある *O*-アシルイソペプチド法^[21]を適用することを計画した (Figure 1-12)。*O*-アシルイソペプチドは主鎖アミド結合を Ser または Thr の側鎖ヒドロキシル基を用いたエステル結合へと異性化したペプチドである。A β 42 では、Gly²⁵-Ser²⁶ 間のアミド結合をエステル結合へと変換したものがこれに相当する (*O*-acyl A β 42)。この構造変換により、主鎖アミド結合の N-H が本来有している水素結合供与能が失われるため、凝集に至る二次構造変化が抑制され、凝集性が低減されると報告されている^[21]。同時に、酸性条件下ではプロトン化されたアミノ基の存在により水溶性が向上する。さらに、*O*-アシル A β 42 は、中性条件下 *O*-to-*N* アシル基転位反応を経て速やかにネイティブの A β 42 へと変換されることから (半減期 $t_{1/2} = 10$ sec)、高水溶性・非凝集性の前駆体として機能することができる。

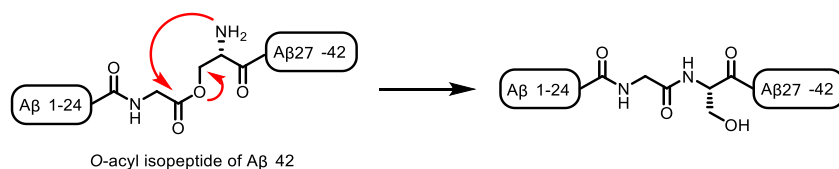


Figure 1-12. *O*-to-*N* acyl rearrangement of *O*-acyl isopeptide of A β 42.

この A β 1-42 における知見を活用し、本研究における合成ターゲットとしては *O*-アシルイソペプチド構造を有するオキシム誘導体 **3** とした (Figure 1-13)。

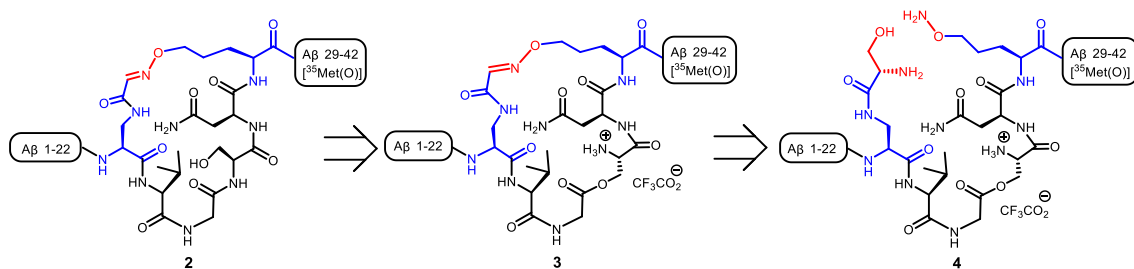


Figure 1-13. Design and retrosynthesis of **2**.

オキシムリンカーで環化させた A β 42 誘導体の設計にあたり、オキシムライゲーション法を活用することを考えた。オキシムライゲーション法では N 末端にセリンを有するペプチドに対して、過ヨウ素酸ナトリウムを作用させ温和な条件にてアルデヒドへと変換し、続くアミノオキシ基との反応により、オキシムを形成させている^[22]。そこで、アミノ酸残基の側鎖にセリンを導入することにより、側鎖にアルデヒドを生成させることが可能となると考えた。すなわち、図に示すアミノ酸残基を A β ペプチドに導入し、過ヨウ素酸ナトリウムで酸化させることにより、分子内オキシム形成を計画した (Figure 1-14)。本法を用いることで A β ペプチドを損傷させずに、温和な条件にてオキシム形成ができると考えた^[23]。そこで、A β 42 の Asp²³ と Lys²⁸ に相当するアミノ酸残基に、側鎖末端にセリンを有するアミノ酸とアミノオキシ基を有するアミノ酸で代替することにした。

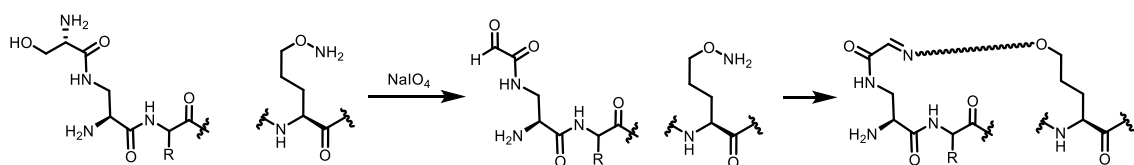


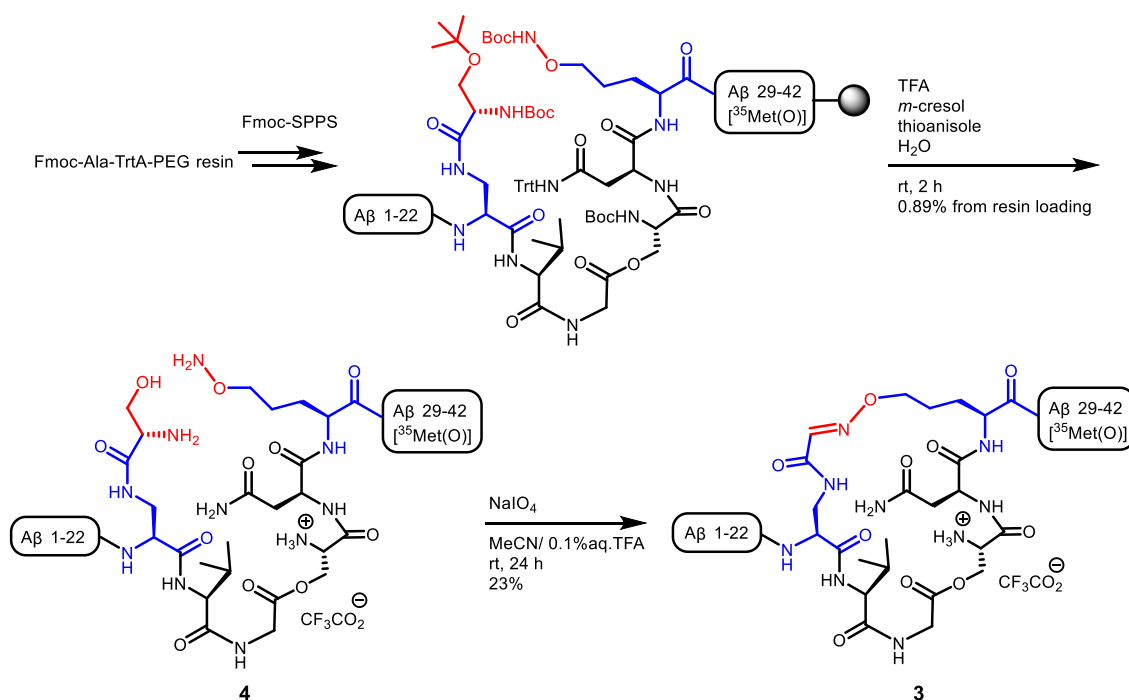
Figure 1-14. NaIO₄ oxidation reaction.

1-2 オキシムリンカーを有する A β 42 誘導体の合成

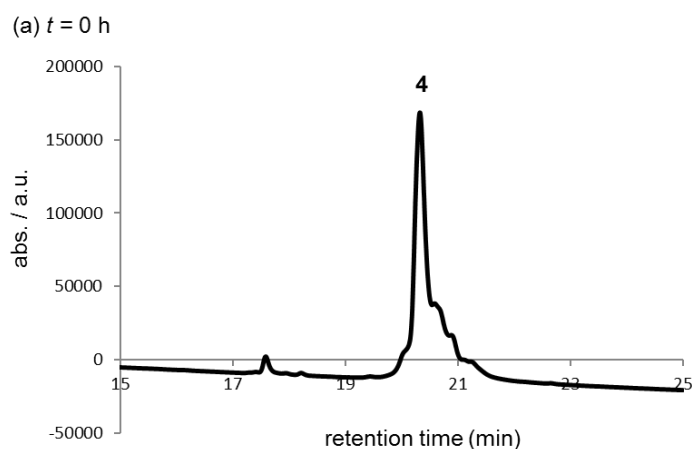
O-アシルイソペプチド構造を有するオキシム誘導体**3**は、Scheme 1-1に示すごとく合成した。Asp²³とLys²⁸に相当するアミノ酸残基をそれぞれ、側鎖末端にセリンを有するアミノ酸 Fmoc-Dap{(t-Bu)Ser-Boc}-OH (Dap; 2,3-diaminopropionic acid)、およびアミノオキシ基を有するアミノ酸 Fmoc-Gly(CH₂CH₂CH₂ONHBoc)-OH^[33]に代替し、Fmoc-Ala-TrtA-PEG resinを用いて、Fmocペプチド固相合成法により Asp¹までペプチド鎖を構築した。その後、TFAカクテル (TFA/*m*-cresol/thioanisole/H₂O=92.5/2.5/2.5/2.5) にて樹脂からの切り出しと保護基の除去を行った。得られた粗物質のペプチドを逆相HPLCにて、オキシム前駆体であるアミノアルコール体**4**を含むフラクションを回収した。ここで、**4**を逆相HPLCにて精製しているのは、精製しない粗物質の**4**を用いて過ヨウ素酸ナトリウムを用いたオキシム化反応を行うと、**4**を得る過程で含まれている副生成物の影響で、**3**の単離・精製が困難であったか

らである。

得られた**4**に対して、高希釈条件下（基質濃度0.1 mM）、過ヨウ素酸ナトリウムを作用させ、アミノアルコール部位をアルデヒドへ酸化し、続く分子内オキシム化反応を行った。反応の様子をHPLCにて分析したところ、原料である**4**の消失に伴い、オキシム体**3**の生成を確認した（Figure 1-15）。反応終了後、溶媒を凍結乾燥によって留去し、残渣を逆相HPLCにて精製することにより、目的物である**3**を合成した（収率23%, Scheme 1-1, Figure 1-15, 1-16）。



Scheme 1-1. Synthesis of **3**.



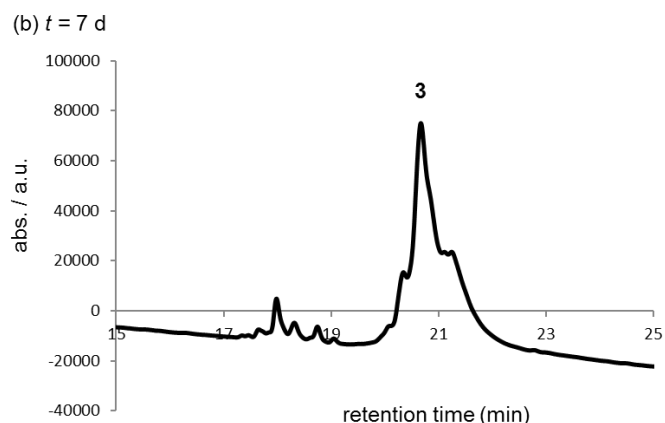


Figure 1-15. HPLC charts of the NaIO_4 oxidation **4** to give **3**. HPLC analysis was performed with a linear gradient of 0–100% MeCN in 0.1% aqueous TFA over 40 min at a 40 °C at a flow rate of 1 mL/min, detected at 230 nm.

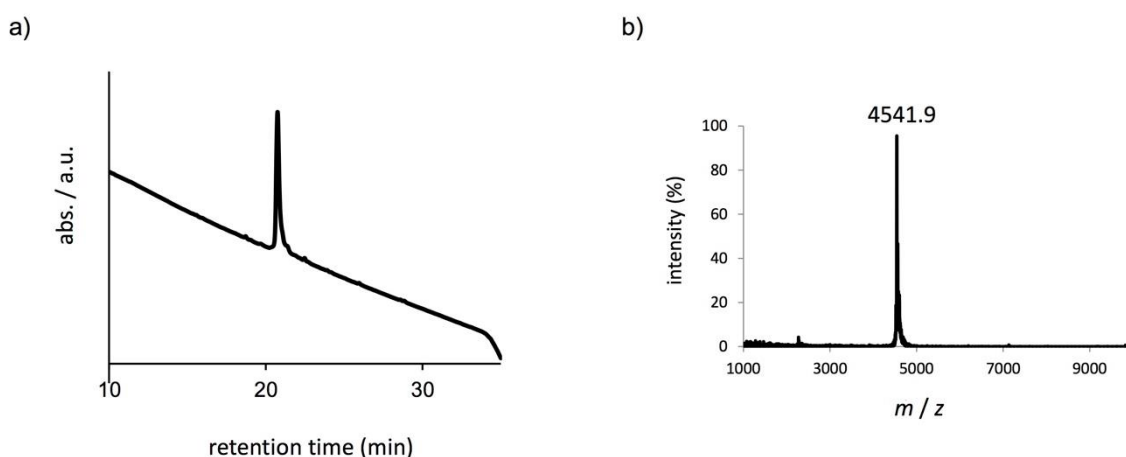


Figure 1-16. (a) The HPLC chart of purified **3**. HPLC analysis was performed with a linear gradient of 0–100% MeCN in 0.1% aqueous TFA over 40 min at a 40 °C at a flow rate of 1 mL/min, detected at 230 nm; (b) MALDI-TOF MS spectrum of purified **3**.

2 の *O*-アシル体である **3** は期待通り高水溶性を示し、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid; TFA) 水溶液を溶媒として用いて、200 μM 高濃度のストック溶液も調製可能であった。続いて、以後の生化学的評価、生物物理学的評価のため、**3** のストック溶液内に存在する全ての凝集体を除く目的で超遠心を行い (4 °C, 100,000 rpm, 3 h)、上清 3/4 を回収した。その後、超遠心後の上清 3/4 の濃度を測定し、**3** のストック溶液の濃度とした。**3** の超遠心後の上清の濃度が 200 μM を維持していたことから、**3** のストック溶液の調製の際には、凝集体がほとんど生成していないことが考えられる。

さらに、**3** が **2** へと変換されるか否かを分析 HPLC によって検証した (Figure 1-17)。その結果、アッセイで用いる 0.1 M, pH 7.4 のリン酸緩衝液 (phosphate buffer; PB) にて **3** のスト

ック溶液を希釈すると、**3**のピークは消失し新たなピークへと定量的に変換されたことが確認された (Figure 1-18)。したがって、*O*-アシルイソペプチド構造が分子内オキシムリンカーを有する環状構造においても、*O*-to-*N*分子内アシル基転位反応が進行することが示された。以上の結果から、Aβ42と同様に、**3**は**2**の高水溶性・非凝集性の前駆体として機能すると考えることができる。

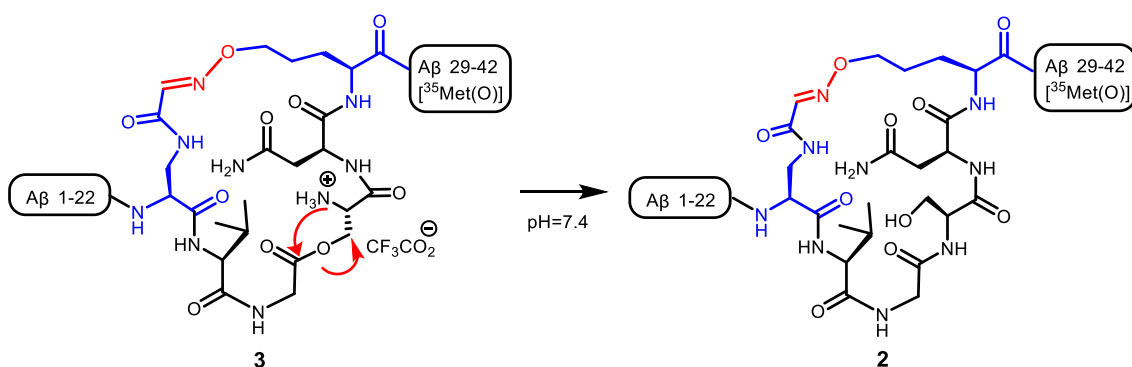


Figure 1-17. Intramolecular *O*-to-*N* acyl rearrangement of **3**.

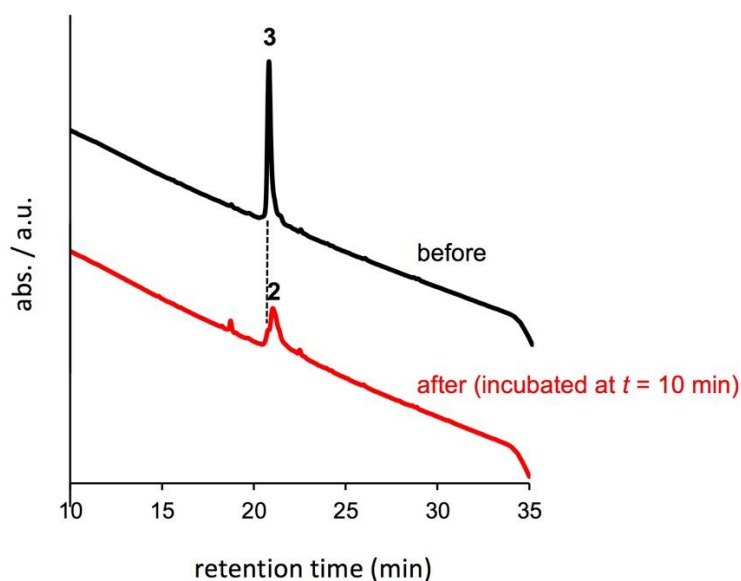


Figure 1-18. HPLC charts of the conversion from **3** to **2**. The HPLC analysis was performed using a C18 reverse phase column (4.6×150 mm; YMC-Triart C18 column) with a linear gradient of MeCN (0–100% over 40 min) in 0.1% aqueous TFA at a flow rate of 1.0 mL/min at 40 °C, and peaks were detected at 230 nm. Stock solution of **3** was diluted with 0.1% aqueous TFA and 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) (final concentration: 10 μM), and the solutions were immediately subjected to analytical HPLC to obtain the charts designated as before; black and after; red, respectively. The retention time of in situ generated **2** was identical to that of the authentic sample.

1-3 コントロールペプチドの合成

アルツハイマー病患者の脳から採取された A β サンプルにおいて、37 番目のグリシン (Gly³⁷) に屈曲構造が観察された^[12]。屈曲構造とは、Gly³⁷ 付近で折れ曲がり構造を有し、A β ペプチド鎖の N 末端領域 (A β 1-20) に接近しているという構造である (Figure 1-19 c,d)^[24]。そして、屈曲している Gly³⁷ に最も近い位置に配置しているアミノ酸残基として 15 番目のグルタミン (Gln¹⁵) が観察されている (Figure 1-19 a,b)^[24]。今回、アルツハイマー病患者の脳から採取された A β サンプルの中で、Gly³⁷ で屈曲構造が観察されたことから、生体内に存在する A β においては Gly³⁷ と Gln¹⁵ が近接した構造が A β ペプチドの一つの安定構造であることが考えられた。そこで、Gly³⁷ と Gln¹⁵ の側鎖を架橋させることにより、A β ペプチドのコンフォメーションを固定化できるのではないかと考えた。したがって、図に示すオキシム誘導体 **5** を設計、合成、評価した (Figure 1-20)。そして、オキシムリンカーで架橋する位置の違いから **5** の凝集性および神経毒性などの性質の違いを考察することにした。

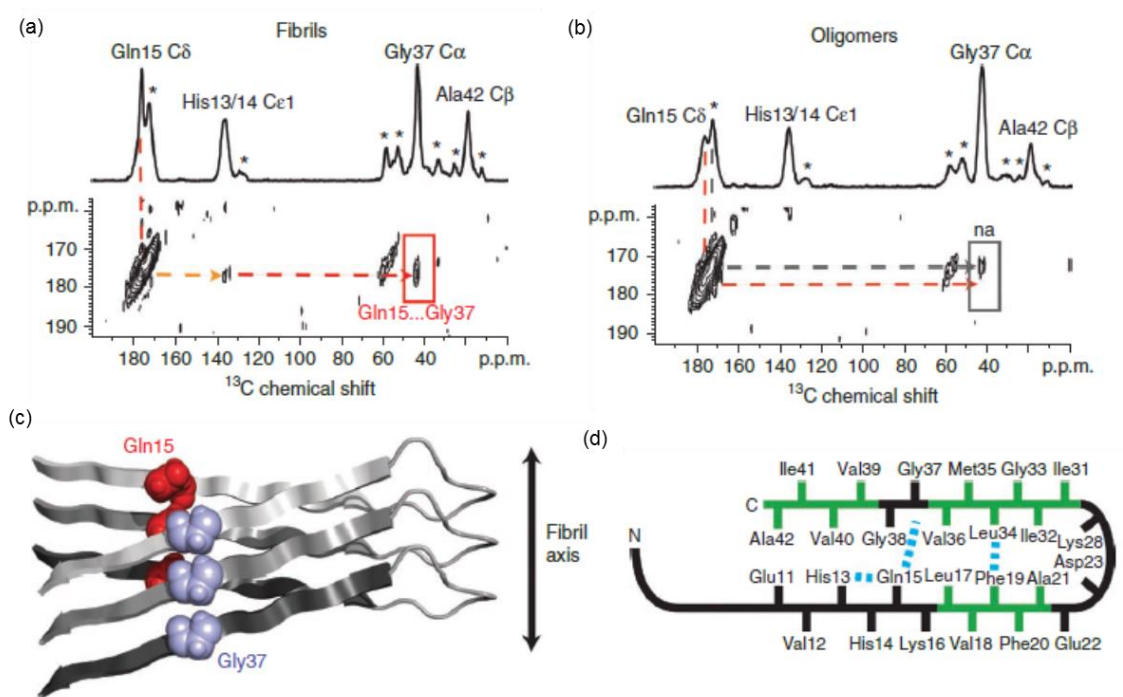


Figure 1-19. Gln¹⁵ and Gly³⁷ in A β 42. The pictures of (a), (b), (c), (d) are cited from ref. 24. (a) Above, one-dimensional ¹³C spectrum showing chemical-shift assignments for His^{13/14}, Gln¹⁵, Gly³⁷ and Ala⁴² in A β 42 fibrils formed from an equimolar mixture of A β 42–His-Gln-Ala:A β 42–Gly³⁷ peptides. Natural abundance ¹³C assignments are marked with an asterisk. Below, region of the two-dimensional DARR NMR spectrum showing specific ¹³C...¹³C intermolecular contacts between Gln¹⁵ and Gly³⁷ (red arrow), intramolecular contacts between Gln¹⁵ and His^{13/14} (orange arrow) and no contact between Gln¹⁵ and Ala⁴², indicating a staggered, domain-swapped architecture. (b) Above, one-dimensional ¹³C-spectrum showing chemical-shift assignments for His^{13/14}, Gln¹⁵, Gly³⁷ and Ala⁴² in A β 42

oligomers formed from an equimolar mixture of A β 42–His–Gln–Ala:A β 42–Gly³⁷ peptides. Below, two-dimensional DARR NMR spectrum showing no molecular contacts between Gln¹⁵ and His^{13/14}, Gly³⁷, or Ala42 (red arrow), indicating the absence of a staggered, domain-swapped architecture in A β 42 oligomers. Only a small natural abundance (na) cross-peak is observed (gray arrow). (c) Model of staggering between the N- and C-terminal β -strands at the Gln¹⁵–Gly³⁷ contact in A β 42 fibrils. (d) Schematic of the monomer within A β 42 fibrils.

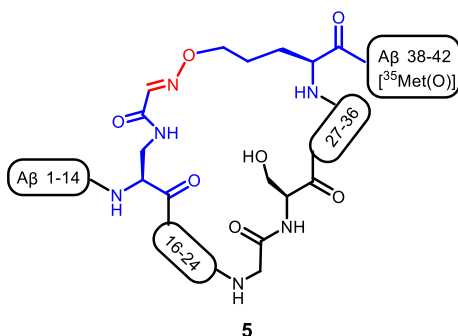
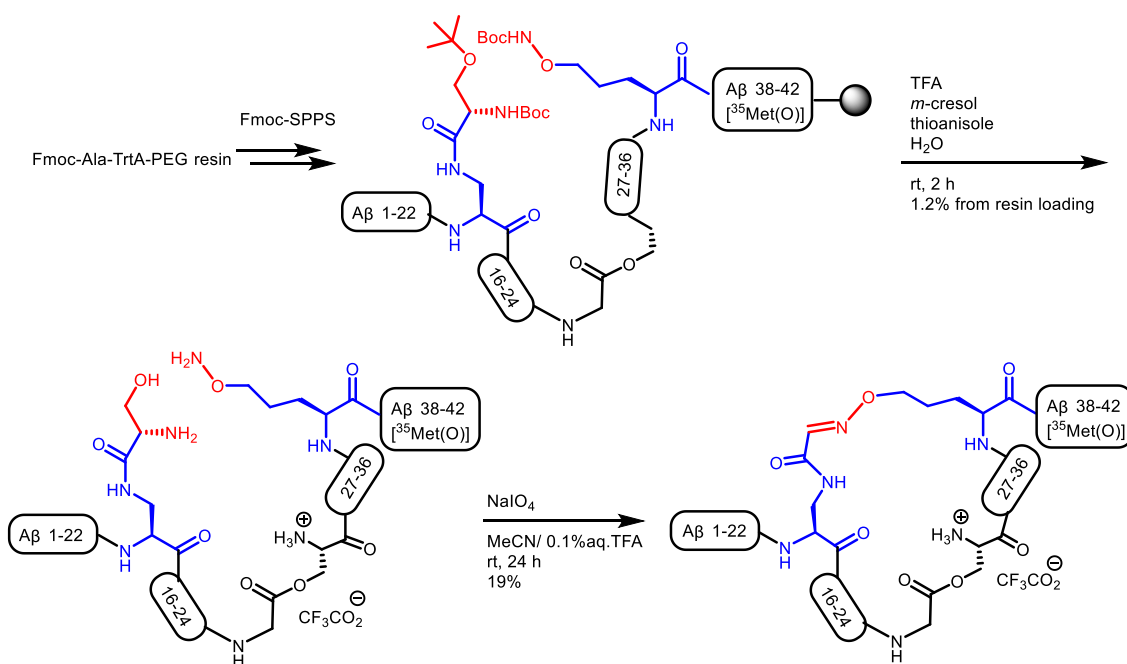


Figure 1-20. Structure of **5**.

オキシム誘導体**5**も**2**と同様に*O*-アシルイソペプチド体としてScheme 1-2に示すごとく合成した。Gln¹⁵に相当するアミノ酸残基としてFmoc-Dap{(*t*-Bu)Ser-Boc}-OHを、Gly³⁷に相当するアミノ酸残基としてFmoc-Gly(CH₂CH₂CH₂ONHBoc)-OHを用いた。そして、前述の**3**と同様のスキームにて合成した (Scheme 1-2, Figure 1-21, 1-22)。



Scheme 1-2. Synthesis of *O*-acyl isopeptide of **5**.

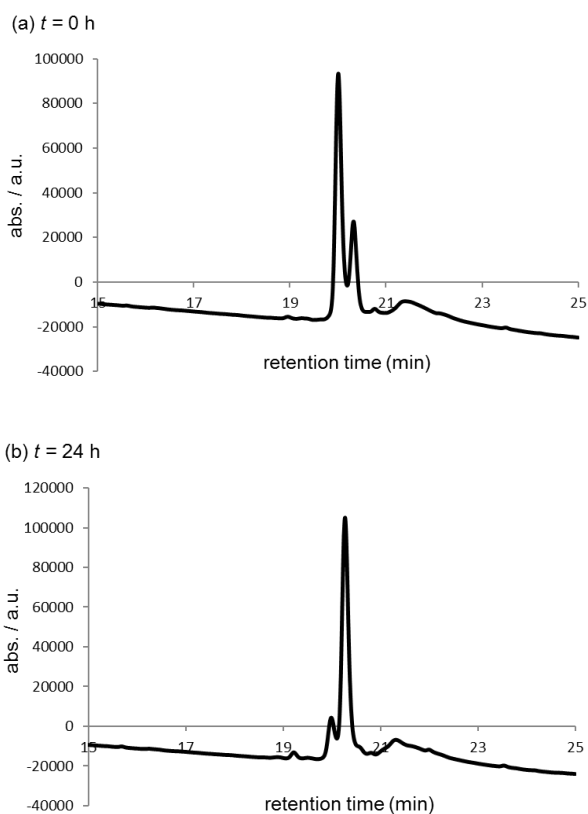


Figure 1-21. HPLC charts of the NaIO_4 oxidation to give *O*-acyl isopeptide of **5**. HPLC analysis was performed with a linear gradient of 0–100% MeCN in 0.1% aqueous TFA over 40 min at a 40 °C at a flow rate of 1 mL/min, detected at 230 nm.

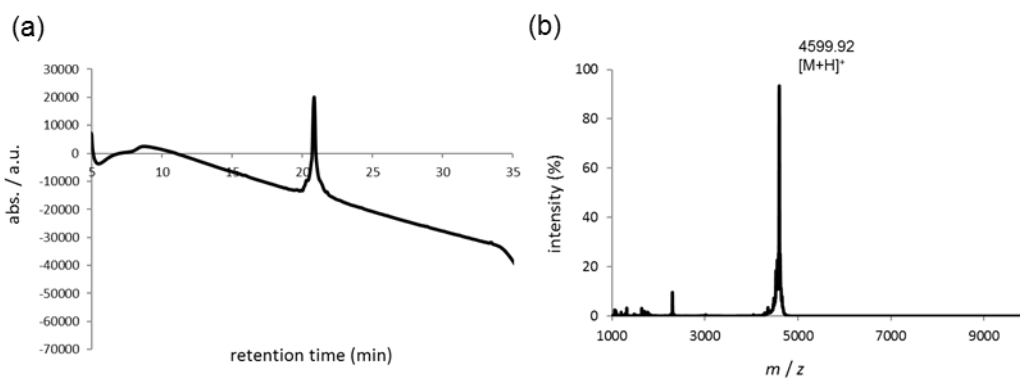


Figure 1-22. (a) HPLC chart of purified *O*-acyl isopeptide of **5**. HPLC analysis was performed with a linear gradient of 0–100% MeCN in 0.1% aqueous TFA over 25 min at a 40 °C at a flow rate of 1 mL/min, detected at 230 nm. (b) MALDI-TOF-MS chart of purified *O*-acyl isopeptide of **5**.

1-4 オキシムオリゴマーの形態解析

次に、**2** で生成するオリゴマー化学種の形態学的な知見を得るため、AFM を用いて解析を行った。なお、本論文における実験においては、*O*-アシルイソペプチドのストックソリューションをそれぞれの緩衝溶液 (pH 7.4) に混合させ、実験系内で *O*-to-*N* アシル基転位反応をさせることにより、種々の評価を行った。

まず、**2** (10 μ M) の 0.1 M HEPES バッファー溶液 (pH 7.4, 0.1 M NaCl 含有) を 37 °C で所定の時間 (インキュベート直後、3 時間、24 時間) インキュベートした後、AFM にて生成物の形態を観察した。その結果、インキュベート直後の時点で、*z*-height が 2~4 nm の小さな粒上のオリゴマー化学種が観察された^[25]。インキュベート 3 時間後および 24 時間後も同様なサイズのオリゴマー化学種が観察された。しかしながら、アミロイド特有の線維は全く観察されなかった (Figure 1-24a, Figure 1-25)。

比較対照として、同じく対応する *O*-アシルイソペプチドから得られた、23 番目と 28 番目にアスパラギン酸及びリシンをそれぞれ持つ **6** (Figure 1-23) では、インキュベート直後及び 3 時間後では、**2** で観察されたようなオリゴマー化学種は観察されず、24 時間後にアミロイド線維が観察された (Figure 1-24b)。この結果より、**6** は 3 時間後までは AFM で見える大きさ以下のオリゴマーを形成し、それを核として急速に線維へと成長したものと考えられる。一方で、**2** は少なくとも 24 時間後までは安定なオリゴマーを与えることが分かった。

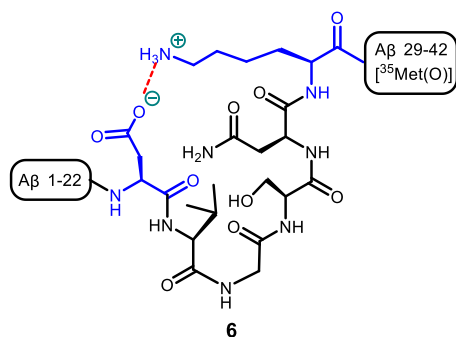


Figure1-23. Structure of **6**.

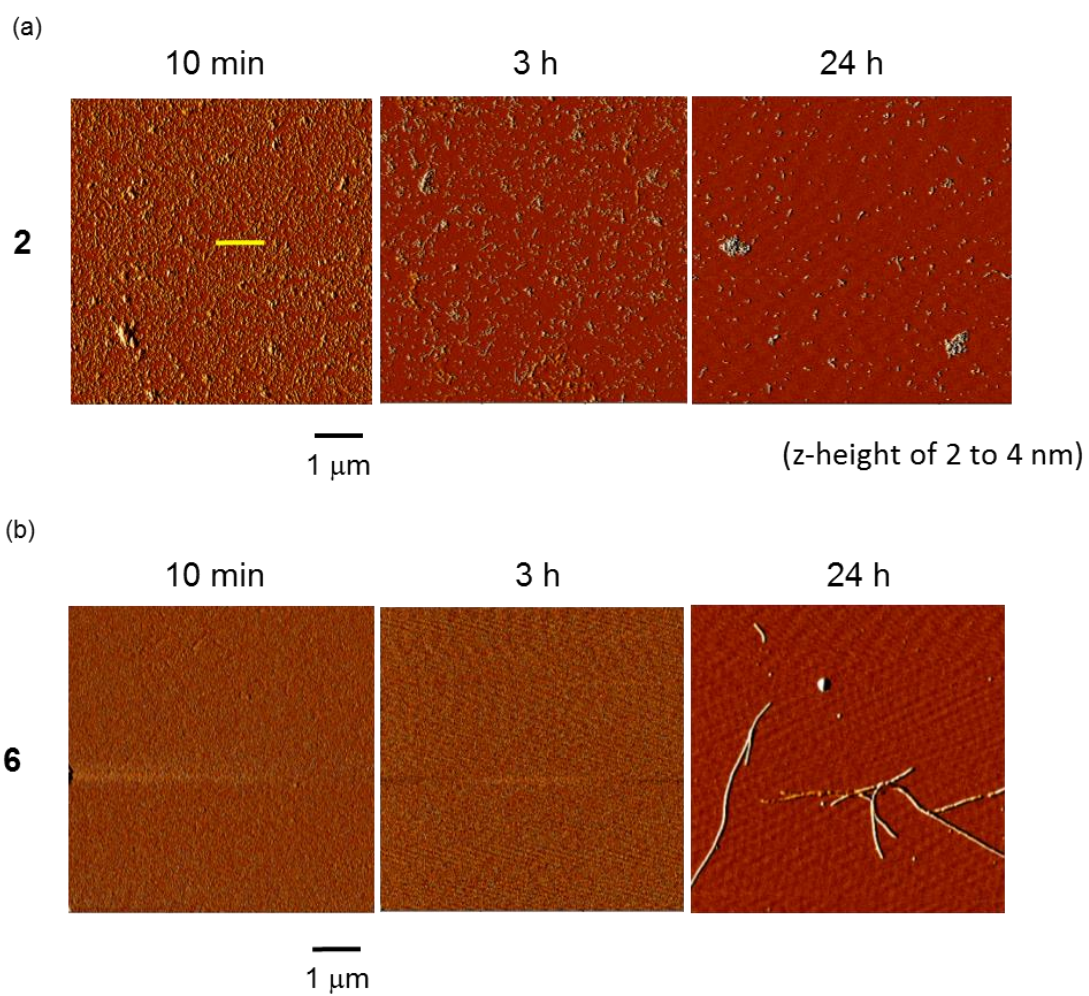


Figure 1-24. AFM images of (a) **2** (10 μ M) and (b) **6** (10 μ M). All samples were incubated in 0.1 M HEPES buffer containing 0.1 M NaCl (pH 7.4) at 37 $^{\circ}$ C for the indicated time periods and then analyzed. Scale bars measure 1 μ m. The images are shown in amplitude mode.

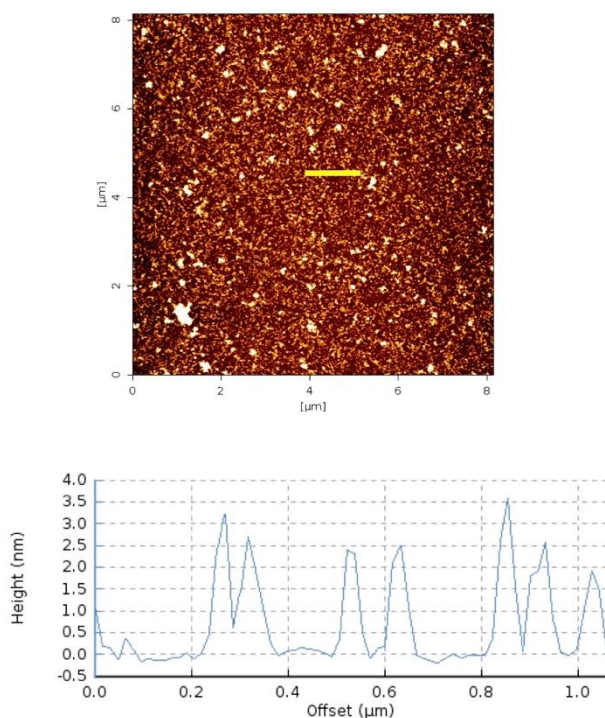


Figure 1-25. AFM image of **2** (10 μM). The sample was incubated in 0.1 M HEPES buffer containing 0.1 M NaCl (pH 7.4) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The image is shown in height mode. Lower graph indicates z-heights obtained at the yellow bar of upper image.

なお、*O*-アシルイソペプチド構造を有するオキシム誘導体 **3** の 0.1%TFA 溶液を直接 AFM にて解析したところ、z-height が 1 nm 未満であり、オリゴマーが観察されなかった (Figure 1-26)。ネイティブ A β 42 の *O*-アシルイソペプチドが非凝集性を有していることから考えられるように、環状構造を有するオキシム誘導体 **3** においても *O*-アシルイソペプチドの特長である非凝集性が維持されていると言える。したがって、上述で観察されたオリゴマーは分子内 *O*-to-*N* アシル基転位後の **2** に由来したものであり、転位後の **2** は速やかにオリゴマーを形成していることが確認された。

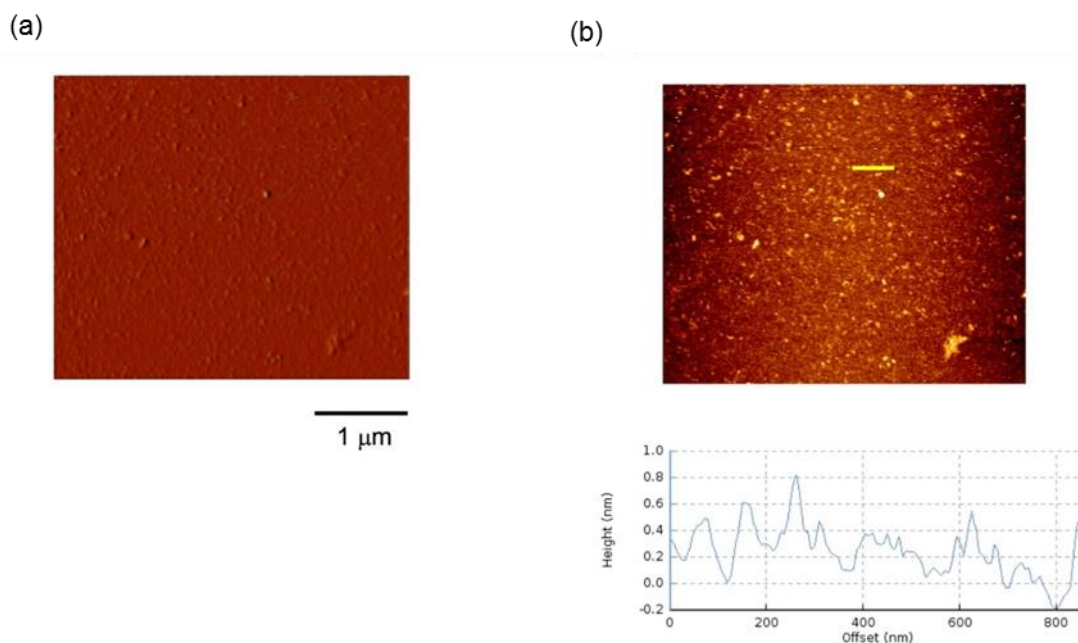


Figure 1-26. AFM images of **3** (10 μM) as a 0.1% aqueous TFA. (a) The image is shown in amplitude mode. Scale bar measures 1 μm ; (b) The image is shown in height mode. Lower graph indicates z-heights obtained at the yellow bar of upper image.

さらに、比較対照として 23 番目、28 番目に替えて 15 番目、37 番目のアミノ酸残基側鎖にオキシムリンカーを導入した $\text{A}\beta_{42}$ 誘導体 **5** を用いて AFM 解析を行った。その結果、**5** で観察されたオリゴマーは **2** と比べ顕著に少なかった (Figure 1-27a)。しかし、攪拌によるアジテーションを行った **5** の AFM 解析では、3 時間後、24 時間後ともにオリゴマーが多く観察された (Figure 1-27b)。このことから、オリゴマー形成が抑制された **5** においても、外部から刺激を与えるとオリゴマー形成が促進されることが示唆された。

以上のことから、 $\text{A}\beta_{42}$ での安定オリゴマー形成には、23 番目と 28 番目のアミノ酸側鎖でのオキシム結合が重要であることが分かった。

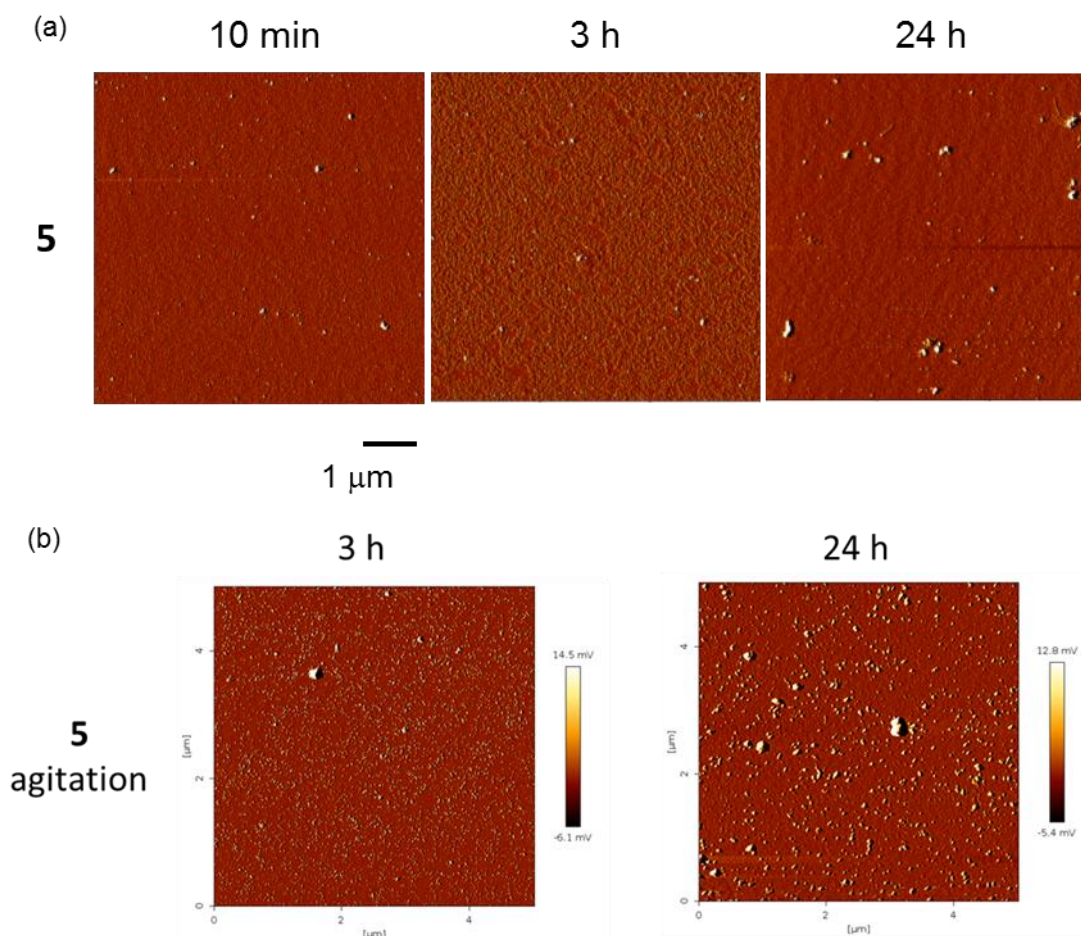


Figure 1-27. AFM images (amplitude mode). **5** (10 μM) was incubated (a) without agitation or (b) with agitation in 0.1 M HEPES-NaCl buffer (pH 7.4) at 37 °C for indicated time.

1-5 SDS-PAGE による解析

次に、**2** の会合状態の変化を SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) により解析した (Figure 1-29)。**2** (20 μM)、Aβ42 (**1**) (20 μM)、**6** (20 μM) の 10 mM リン酸緩衝溶液 (pH=7.4) を 37 °C で各測定時間 (インキュベート直後、3、24、72 時間) インキュベートした。それぞれのサンプルを Tris (2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) と過硫酸アンモニウムを添加し、可視光を照射して PICUP 処理^[26]を行った。その後、それぞれのサンプルを Novex® 15% Tris-glycine gel を用いて電気泳動を行い、銀染色によりオリゴマー分布を検出した。

PICUP (Photo-induced cross-linking of unmodified protein) のメカニズムを Figure 1-28 に示す。 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ は、酸化剤である過硫酸アンモニウムの存在下にて光照射されると、一電子酸化を受けて $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ へと変換される。当該錯体の酸化活性により、チロシン残基が一電子酸化を受けてチロシルラジカルが生じる。これにより錯体は一電子還元されてもとの $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ へと戻り、触媒サイクルが完結する。一方で、生じたチロシルラジカ

ルは、近傍に存在するチロシン残基とラジカルカップリングを起こす (Figure 1-28) [27]。この反応が分子間で起こることにより、系中で生じていた Aβ オリゴマー種が安定化される。なお、本反応はオリゴマーなど弱い分子間相互作用が存在する分子同士でラジカルカップリングが起こるとされている。

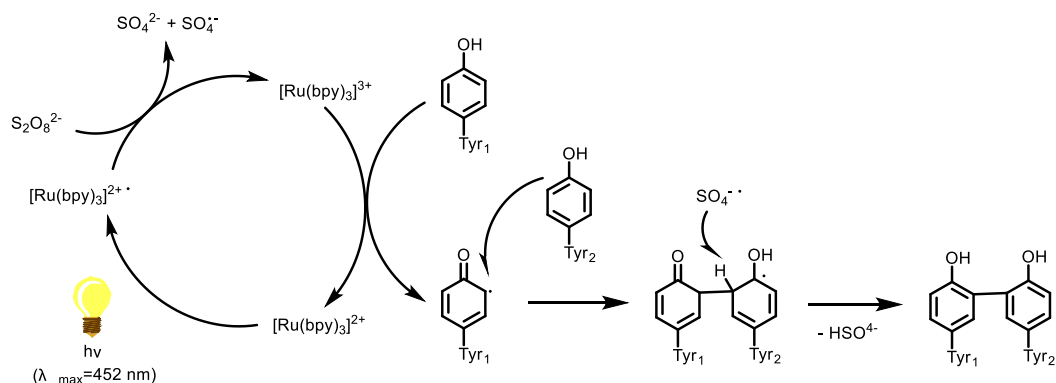


Figure 1-28. Mechanism of PICUP.

2 はインキュベート直後においてモノマー以外にダイマー、トリマー、テトラマー（低分子量オリゴマー）に相当するバンドに加えて、250 kDa 付近に高分子量オリゴマーのスメアなバンドが観察された。この 250 kDa オリゴマーは、毒性の高い **1** でも形成されていた ($t = 3$ h)。**2** では、3 時間後には低分子量オリゴマーのバンド強度が減弱し、高分子量オリゴマーのバンド強度が強くなった。また、24 時間では低分子量オリゴマーのバンドはほとんど観察されず、高分子量オリゴマーのバンドのみ観察され、そのバンド強度は 72 時間後でも維持されていることが示唆された (Figure 1-29)。

一方、オキシムリンカーを持たない **6** では、インキュベート直後に低分子量オリゴマーのみ観察されたが、**2** や **1** で観察された 250 kDa 付近の高分子量オリゴマーは観察されなかった。さらに、72 時間後では低分子量オリゴマーも観察されず、バンドが全て消失した (Figure 1-29)。これは、72 時間後では **6** がゲルに入っていない大きな会合体に凝集したことを示唆していると考えられる。

1 で観察される、250 kDa 付近の高分子量オリゴマーは 3 時間後に観察されるものの、24 時間後および 72 時間後には減弱または消失していることから、**1** が形成する高分子量オリゴマーは安定ではないことが考えられる。一方で、**2** で観察された高分子量オリゴマーは 24 時間後、72 時間後においても安定であることが考えられる。本結果は、AFM での解析結果と一致しており、オキシムリンカーで架橋した **2** では安定なオリゴマーが速やかに形成され、オキシムリンカーを持たない **6** では低分子量オリゴマーを形成し、それをきっかけに急速に大きな凝集体へと成長したことが示唆された。

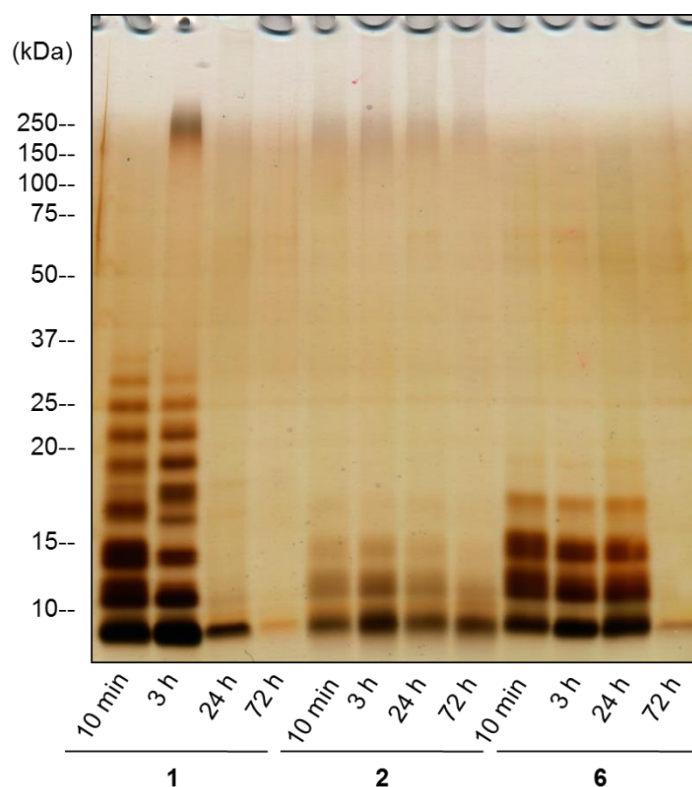


Figure 1-29. SDS-PAGE analysis of **1** (20 μ M), **2** (20 μ M), and **6** (20 μ M) after PICUP. Samples were incubated in phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) at 37 °C for the indicated time-periods and then analyzed. The aggregates were separated using a 15% Tris-glycine gel and detected with silver staining.

一方、15番目と37番目にオキシムリンカーを導入した**5**では、いずれの時間帯においても、モノマー以外にダイマー、トリマーなどの低分子量のオリゴマーが少量観察されるのみであり、**1**や**2**で観察された250 kDa付近の高分子オリゴマー、および**1**や**6**で観察された線維は観察されなかった (Figure 1-30) [28]。AFMの結果と合わせて考えると、A β 42のGln¹⁵とGly³⁷を共有結合で連結すると、オリゴマーおよび線維形成が抑制されることが示唆された。Gly³⁷はA β 42の凝集過程で形成されるクロス β -シート構造における疎水性相互作用に重要なアミノ酸残基であると考えられている。したがって、Gly³⁷に変異を入れたA β 42誘導体である**5**ではA β ペプチドの会合および凝集に必要な疎水性相互作用が著しく減弱されたためと推定された。

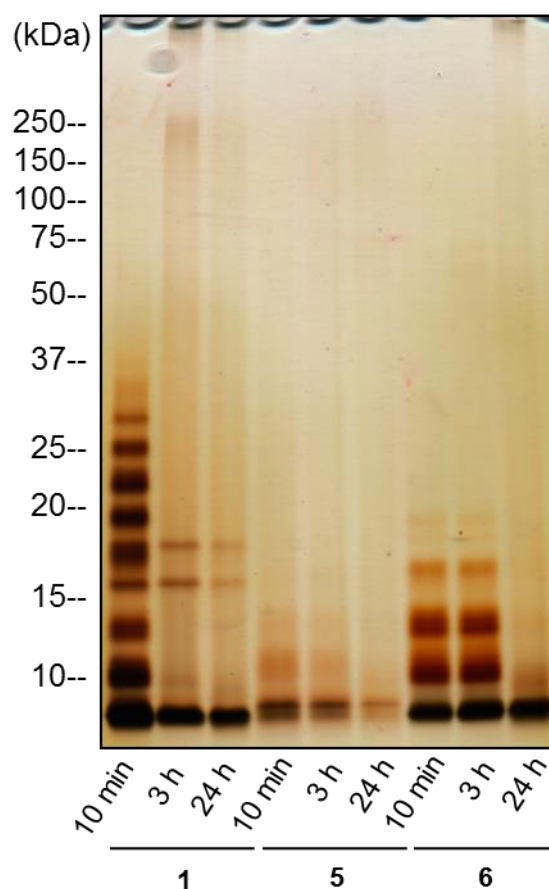


Figure 1-30. SDS-PAGE analysis of **1** (20 μ M), **5** (20 μ M), and **6** (20 μ M) after PICUP. Samples were incubated in phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) at 37 °C for the indicated time periods and then analyzed. The aggregates were separated using a 15% Tris-glycine gel and detected with silver staining.

1-7 CD スペクトルによる解析

2 の二次構造を確認するため、CD スペクトルの測定を行った (Figure 1-31)。 **2** (10 μ M) のリン酸緩衝溶液 (pH 7.4) を 37 °C で所定の時間 (インキュベート直後、3 時間、6 時間、24 時間) インキュベートした後、CD スペクトルを測定した。 **2** はインキュベート直後では β -シート構造の存在を示唆する CD スペクトルを与え、インキュベート 24 時間後には 218 nm 付近に極小値をとる典型的な β -シート構造由来のスペクトルを与えた (Figure 1-31a)。一方、 **6** では、インキュベート 6 時間まで、主にランダムコイルが存在していることを示すスペクトルを維持し、24 時間後に β -シート構造へと変化した (Figure 1-31b)。これらの結果より、Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖を可逆的な共有結合であるオキシム構造で架橋することにより、一定の二次構造である β -シート構造を与えることが分かった。

一方で、 **5** の生理的条件下での二次構造の変化を同様にして測定した。 **5** (10 μ M) のリン酸緩衝溶液 (pH 7.4) を 37 °C で所定の時間 (インキュベート直後、3 時間、6 時間、24 時間) インキュベートし、CD スペクトルを測定したところ、全ての時間においてランダムコ

イルが存在するスペクトルを維持した (Figure 1-31c)。したがって、A β 42 の Gln¹⁵ と Gly³⁷ を架橋することにより、ネイティブ A β 42 に特徴的な β -シート構造を形成できないことが示唆された。AFM および SDS-PAGE の結果と合わせて考えると、生成するオリゴマーの量が著しく少なく、その結果ペプチドの二次構造としてアミロイドに特徴的な β -シート構造を有する化学種が生成できていないことが示唆された。

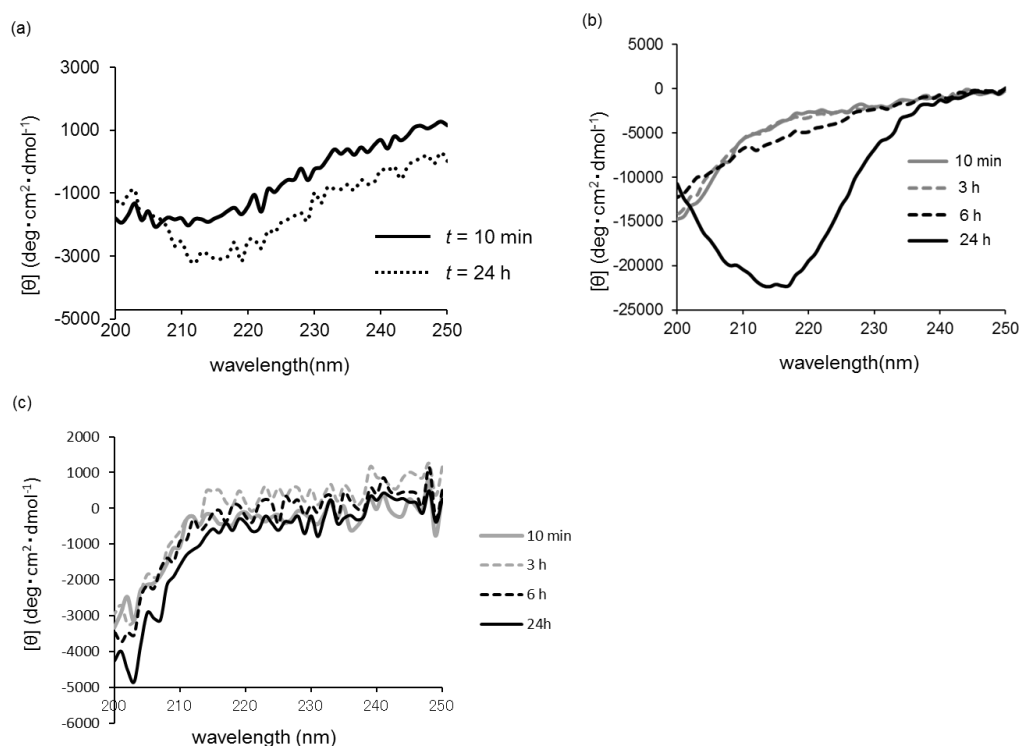


Figure 1-31. CD spectra of (a) **2** (10 μ M), (b) **6** (10 μ M), or (c) **5** (10 μ M) was incubated at 37 $^{\circ}$ C for indicated hours.

1-6 チオフラビン T アッセイ

チオフラビン T (ThT) 色素を用いた蛍光強度アッセイにより **2** および **6** の凝集体のクロス β -シート量を評価した。ThT は、A β の凝集 (主に、高分子量オリゴマーから線維) に特徴的なクロス β -シート構造を認識し結合する。そして結合時に 440 nm 付近の光で励起されると、480 nm 付近の蛍光を発することによりその蛍光強度が上昇することが知られている。そのため、ThT の蛍光強度変化は、A β の凝集の程度と相関することから、アミロイド線維の定量法として一般的に用いられている手法である (Figure 1-32a) [29]。

2 (10 μ M) の 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) を 37 $^{\circ}$ C でインキュベートし、インキュベート直後および 1、3、6、24 時間後に ThT 蛍光強度を測定した。その結果、**2** は比較的小さな蛍光強度 4 a.u.を示し、全インキュベート時間において、その蛍光値が維持された。一方、**6** はインキュベート 1 時間程度までは全く蛍光を示さず、3 時間後に 3 a.u.、6 時間後に

24 a.u.、24 時間後に 62 a.u.と蛍光値の上昇が確認された (Figure 1-32b)。すなわち、**6** の蛍光強度変化は、ラグフェーズの後、小さなオリゴマーの形成をきっかけにアミロイド線維を形成するという AFM、SDS-PAGE そして CD の結果と一致している。アミロイドオリゴマーの ThT 蛍光値は線維と比べ顕著に小さい値をとることが報告されている^[26]ことから、**2** はアミロイドに特徴的なクロスβ-シート構造を保持している安定オリゴマーと考えられる。

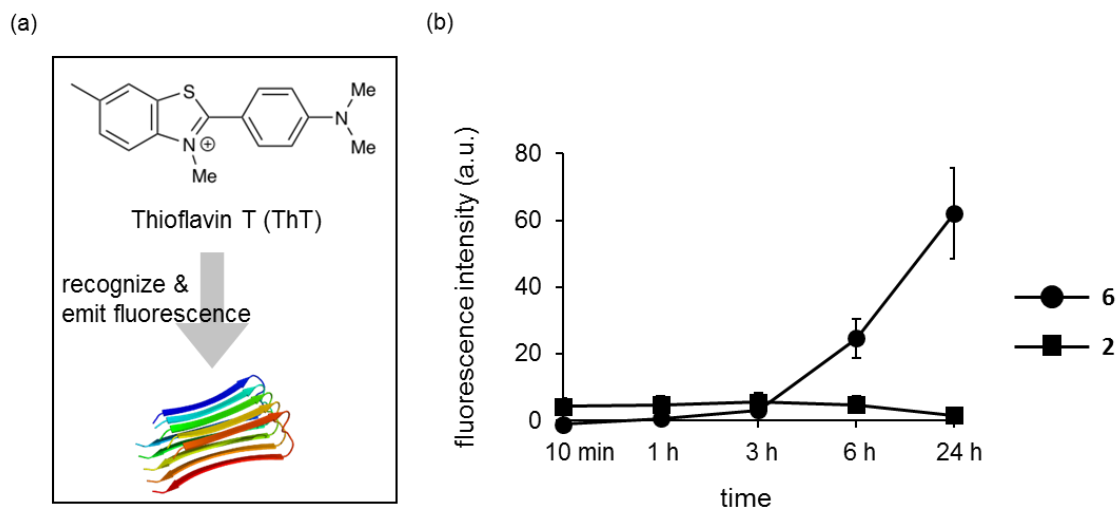


Figure 1-32. (a) Structure of Thioflavin T. (b) ThT assay ($\lambda_{ex} = 440 \pm 5$ nm, $\lambda_{em} = 480 \pm 10$ nm). **2** (10 μ M) or **6** (10 μ M) was incubated at 37 °C in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for the indicated times. Mean \pm s.d., $n = 3$.

1-8 細胞毒性評価

次に、**2** の神経毒性に与える影響について、ラット副腎褐色細胞腫である PC12 細胞を用いて検証した (Figure 1-33)。ウマ血清を 1%含む HEPES-DMEM 培地中の細胞に対し、**2** (3, 10 μ M)、**6** (5, 10 μ M) をそれぞれ、37 °C で 72 時間インキュベートした後、WST-8 試薬により生細胞数を定量した。

溶媒処置群の細胞生存率を 100%としたとき、**2** は濃度依存的に細胞生存率の低下が見られ、濃度 3 μ M では約 80%、濃度 10 μ M では約 60%程度まで細胞生存率が減少し、**2** の神経毒性はオキシムリンカーを有さない **6** とほぼ同程度であった。また、顕微鏡での観察により、**2** を添加した細胞では **6** を添加した細胞群と同様の形態変化が観察された (Figure 1-34)。

したがって、**2** により形成される化学種のオリゴマーは、**6** が有する細胞毒性をミミクしているものと考えられる。

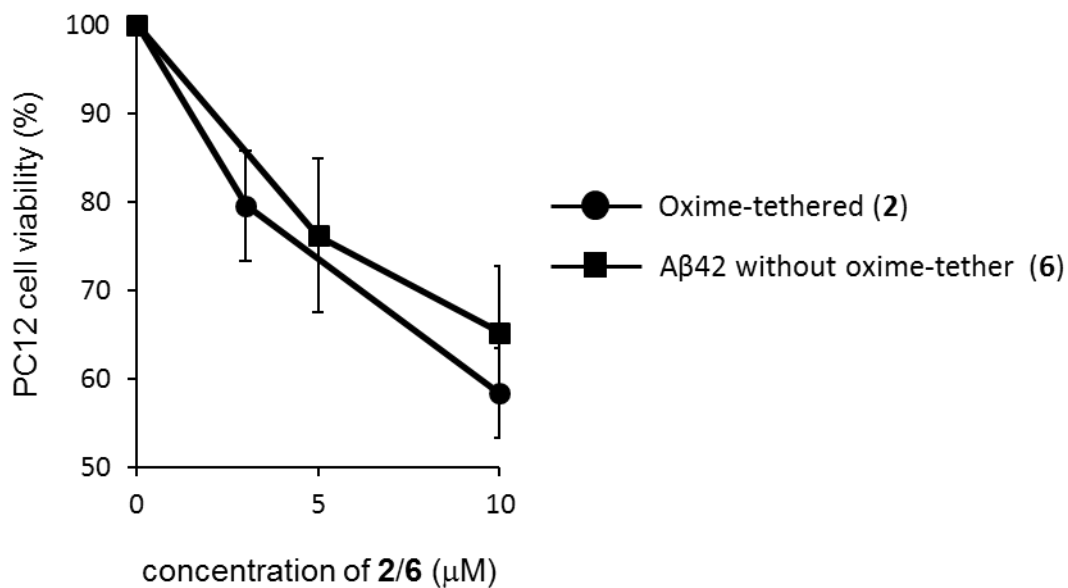


Figure 1-33. Cell viability assay. Well-seeded PC12 cells were treated with **2** or **6** at 37 °C under 5% CO₂ for 3 d. Mean ± SEM, *n* = 3.

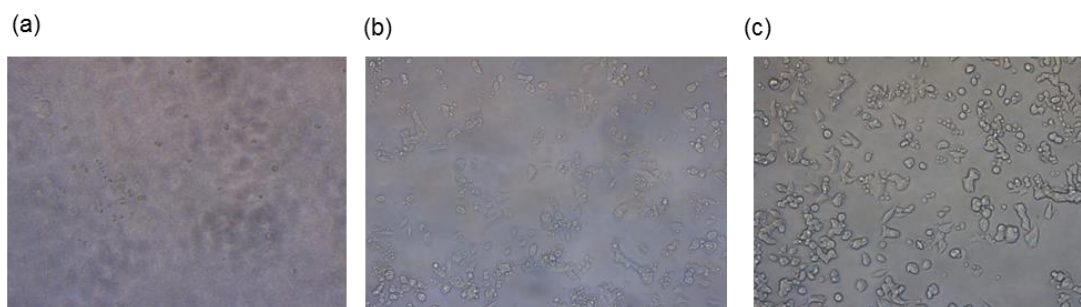


Figure 1-34. Photographs of PC12 cells. (a) **2** (10 μM), (b) **6** (10 μM), (c) only solvent (0.1% aqueous TFA).

1-9 オキシム交換反応によるオキシムリンカーの切断

2 の 23 番目と 28 番目の側鎖を架橋しているオキシムリンカーを、可逆的なオキシム交換反応によって切断することにより、オリゴマーと線維の変換が可能かについて検討を行った (Figure 1-35)。すなわち、**2** のオキシムリンカーのみを温和な反応条件を用いることによって選択的に切断し、**2** および開環体 **7** の生成状態を検出し、それぞれの性質の違いを評価することにした。

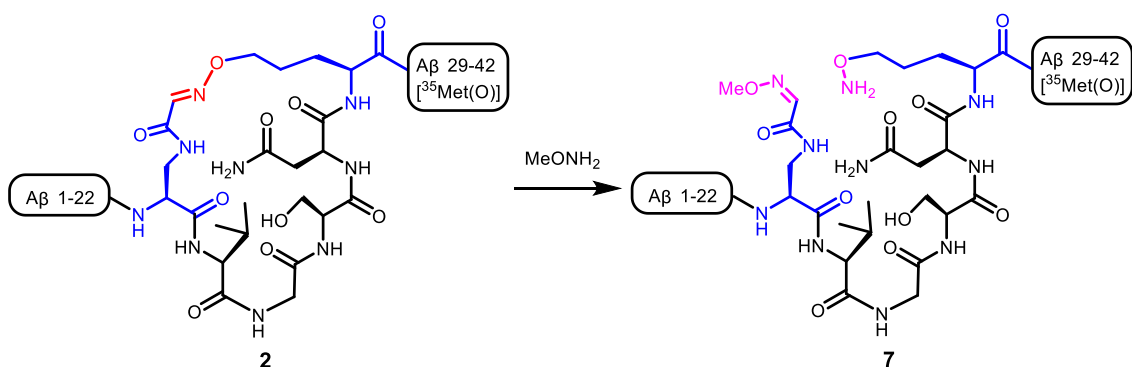


Figure 1-35. Oxime cleavage reaction.

2 のリン酸緩衝溶液 (pH 7.4, ペプチド濃度 0.1 mM) を室温で 1~2 時間インキュベートし、**2** の高分子量オリゴマーを形成させた後に、NH₂OMe 塩酸塩をそれぞれ 0.3、1、10 mM の濃度で加え、室温にて 24 時間インキュベートした。反応後の溶液を MALDI-TOF-MS にて解析し、分子内オキシムリンカーを有する **2** とオキシム交換反応により分子内リンカーが開環した **7** の分子量のピーク強度の比をグラフにした。オキシム体と開環体の生成比は以下の式に従い算出した。

$$\text{conversion(\%)} = \frac{\text{7 のピーク高さ}}{\text{7 のピーク高さ} + \text{2 のピーク高さ}} \times 100$$

その結果、**2** から **7** への変換率は NH₂OMe が 0.3 mM の時は 28%、1 mM の時は 58%、10 mM の時は 100%を示した。すなわち、**2** から **7** への変換率は NH₂OMe の濃度が大きくなるに伴い上昇し、NH₂OMe を 10 mM の濃度で添加した時にはほぼ定量的に **7** へ変換した。したがって、一定時間の間にオキシム体 **2** と開環体 **7** が平衡状態に達し、それぞれの生成比は反応系中に存在する NH₂OMe の濃度に依存することが示された (Figure 1-36, 1-37, 1-38)。

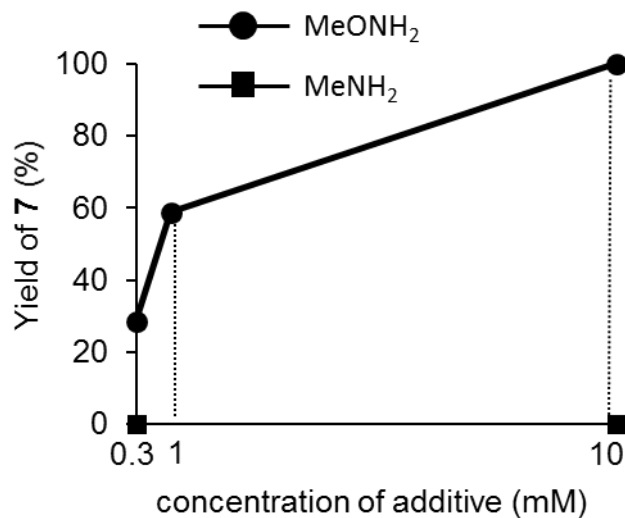


Figure 1-36. Yield of 7 from 2 (0.1 mM) in the presence of MeONH₂ (0.3, 1.0, and 10 mM) or MeNH₂ (0.3 and 10 mM).

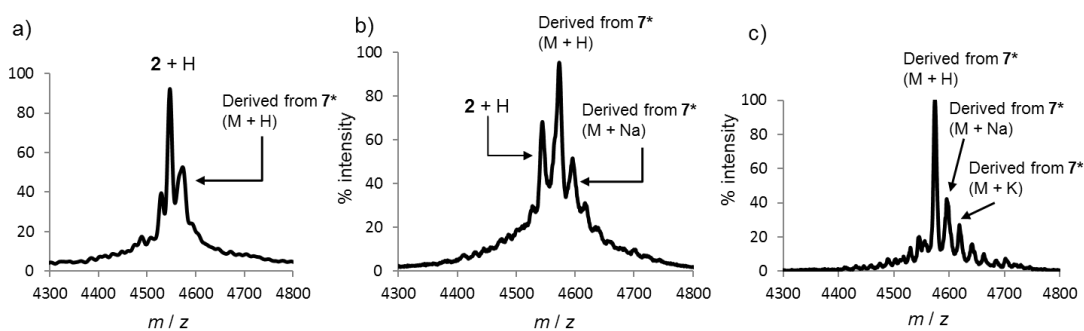


Figure 1-37. MALDI-TOF MS spectra of the reaction mixture between 2 (0.1 mM) and varied concentrations of methoxyamine·HCl (a: 0.3 mM; b: 1 mM; c: 10 mM) in phosphate buffer at pH 4. derived from 7*: found M = 4571 (detected as dehydrated form of 7).

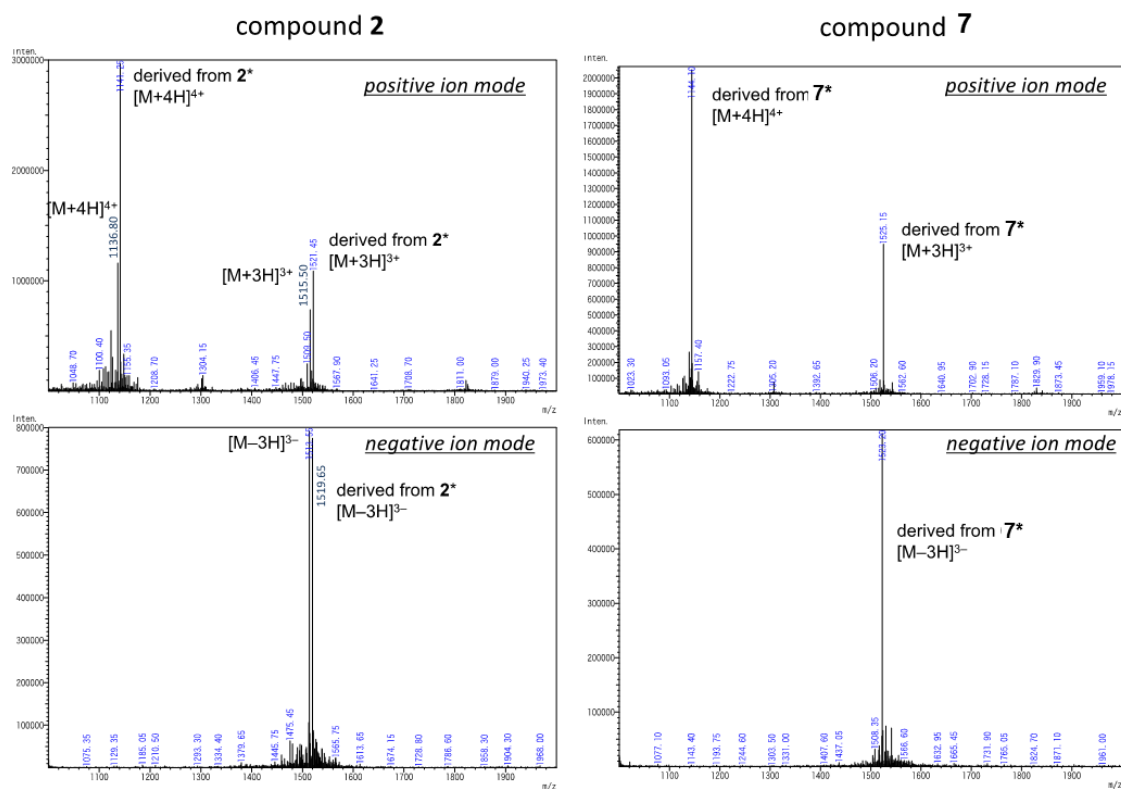


Figure 1-38. ESI-MS spectra of **2** and **7** (**2***: detected as hydrated form of **2**). Compound **2***: a sample before addition of methoxyamine•HCl was analyzed. “Compound **7***”: identical sample to c) in Figure 1-31 was analyzed.

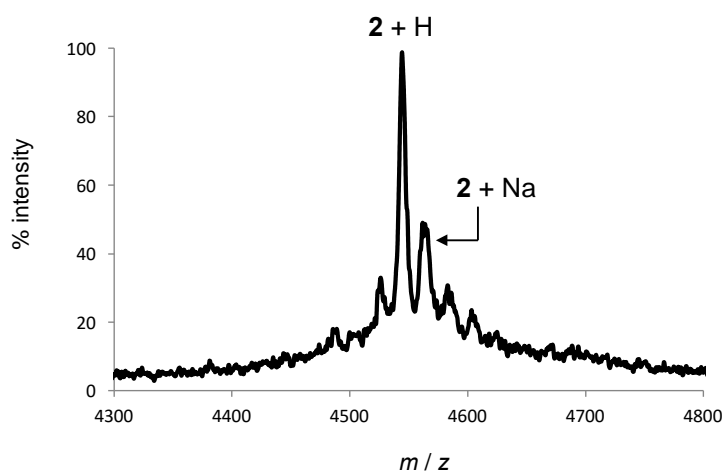


Figure 1-39. MALDI-TOF MS spectrum of the reaction mixture between **2** (0.1 mM) and methylamine•HCl (10 mM) in phosphate buffer at pH 4.

次に、**2** のオキシムリンカーが切断することによる形態学的変化を評価するため、**2** と NH_2OMe の反応液を AFM にて観察した。

2 の 0.1 M HEPES 緩衝溶液 (pH 7.4, 0.1 M NaCl 含有, ペプチド濃度 0.1 mM) を室温で 1 ~2 時間インキュベートし、高分子量オリゴマーを形成させた。その後、 NH_2OMe 塩酸塩の水溶液を 10 mM の濃度になるように加え、pH を 4 に調整した後に、室温にて 24 時間インキュベートした。AFM にて生成物の形態を観察したところ、オリゴマーは観察されず、ネイティブ A β 42 (**1**) やオキシムリンカーを持たない **6** に観察されるような線維が主に観察された (Figure 1-40b)。

本実験のコントロール実験として、 NH_2OMe 塩酸塩の代わりに MeNH_2 塩酸塩の水溶液を 10 mM の濃度になるように加え、室温にて 24 時間インキュベートした。その結果、**2** は **7** へ変換することなく、100%安定に **2** のまま存在し、AFM 解析からオリゴマー (z-high; 2-4 nm) が主に観察された (Figure 1-40a, Figure 1-41)。また、**2** は MeNH_2 塩酸塩と反応してないことをマス・スペクトルにて確認した。したがって、これらの解析より、**2** は 23 番目と 28 番目の側鎖間でオキシムリンカーを形成しているときはオリゴマー状態をとり、オキシムリンカーが切断されると線維へと変化することが示された。

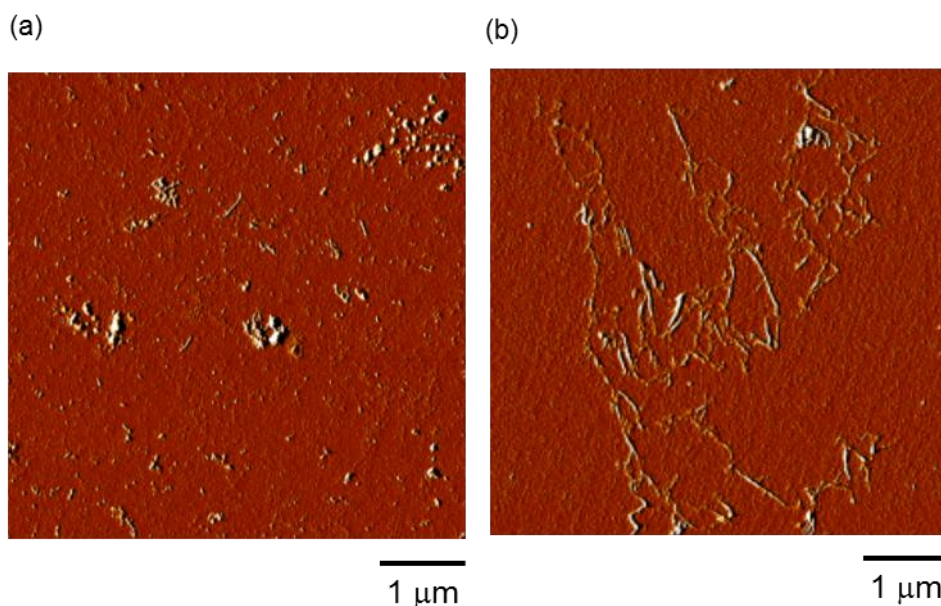


Figure 1-40. AFM images of **2** (0.1 mM) in the presence of 10 mM MeONH_2 where **7** is dominant (b) or MeNH_2 where **2** is dominant (a). The sample was incubated in 0.1 M HEPES buffer containing 0.1 M NaCl at 37 °C. Scale bars measure 1 μm . The images are shown in amplitude mode.

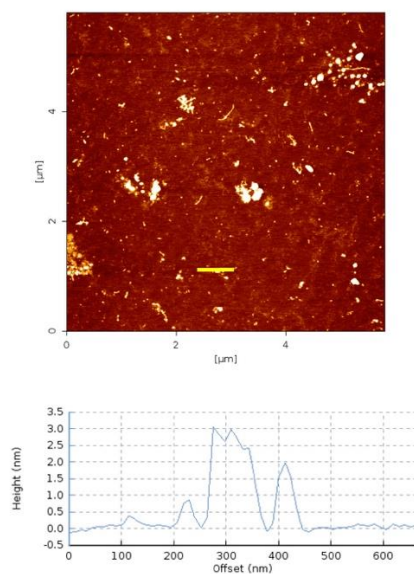


Figure 1-41. AFM image of **2** (0.1 mM) in the presence of 10 mM MeNH₂. The sample was incubated in 0.1 M HEPES buffer containing 0.1 M NaCl (pH 7.4) at 37 °C. The image is shown in height mode. Lower graph indicates z-heights obtained at the yellow bar of upper image.

次に、オキシムリンカーを有する A β 42 誘導体 **2** におけるオキシム結合の可逆性に関して検討した。**2** を 6 M GnHCl/0.1 M リン酸緩衝溶液に溶解させ、室温にて NH₂OMe 塩酸塩を添加し、オキシムリンカーを切断し **7** へと開環させた後に、限外ろ過にてバッファー交換を繰り返すことにより、系中の NH₂OMe を除去した。その後、TFA を加え pH を 1 とした後に、室温にて一晩インキュベートした。その溶液の分子量を MALDI-TOF-MS にて測定したところ、オキシム体 **2** がメインで観測された (Figure 1-42)。すなわち、系中に存在する NH₂OMe の量が減少したことにより、オキシム交換反応 (Figure 1-35) の平衡が原系側に移動し、**2** の生成量が増加したと考えられる。この結果から、**7** と **2** のオキシム結合は可逆性を有することが示された。

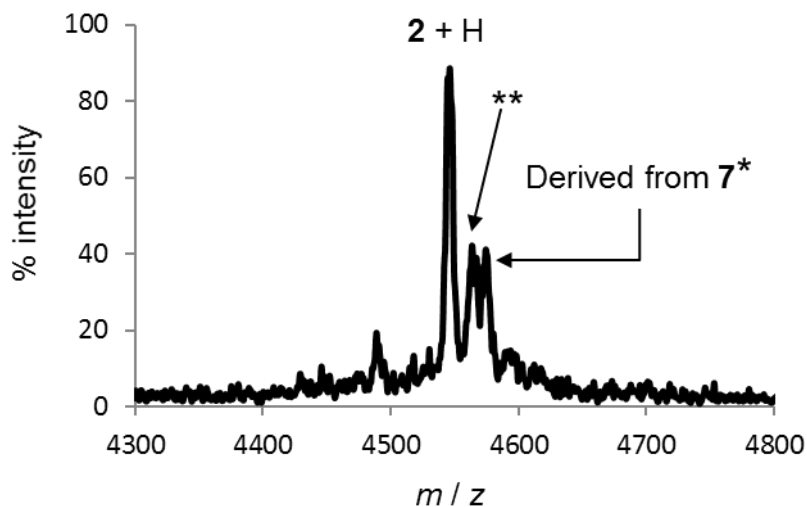


Figure 1-42. MALDI-TOF MS spectra after removal of methoxyamine. After predominant conversion of **2** to **7** was confirmed (phosphate buffer, pH 4, **2**: 0.1 mM, methoxyamine: 10 mM, guanidinium chloride: 6 M to suppress possible aggregation during the following ultrafiltration), methoxyamine was removed using ultrafiltration for 2 h. The resulting solution was acidified to pH 1, and the solution was incubated at room temperature for 16 h. The peak designated as “derived from **7***”: found $M = 4571$ (detected as dehydrated form of **7**). The peak designated as “**”: found $(M + H) = 4560$ (corresponding to a mass of hydrolyzed aldehyde product at the oxime bonds of **2** / **7**).

また、分析 HPLC にて分取した **7** に対して、1% TFA 水溶液に溶解させ 16 時間後に溶液の分子量を測定したところ、閉環体 **2** が 50% 程度観測された (Figure 1-43)。この結果から、開環体 **7** と閉環体 **2** のオキシム結合は可逆性を有することが示された。

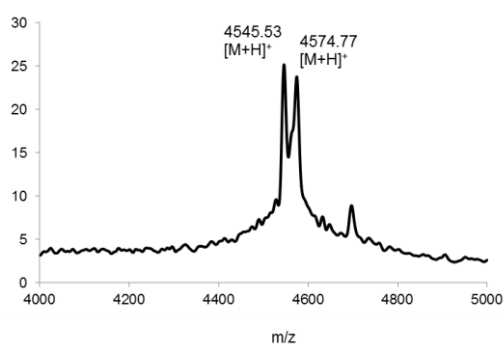


Figure 1-43. MALDI-TOF-MS of oxime closed reaction.

次に、オキシムリンカーを切断した **7** とオキシムリンカーを有する **2** の神経毒性に与える影響について、ラット副腎褐色細胞腫である PC12 細胞を用いて検証した (Figure 1-44)。ウマ血清を 1% 含む HEPES-DMEM 培地中の細胞に対し、**2** (40 μM) に対して、

MeONH₂ および MeNH₂ (2 mM) をそれぞれ添加し、37 °C で 24 時間インキュベートし、**7** または **2** を形成させた。これらに対して、PC12 細胞に添加し、37 °C で 72 時間インキュベートした後、WST-8 試薬により生細胞数を定量した。

溶媒処置群の細胞生存率を 100%としたとき、MeONH₂ および MeNH₂ を添加した群ではいずれも約 60%程度の細胞生存率を示した。MeONH₂ を添加した群ではオキシムリンカーが切断され **7** を生成しており、MeNH₂ を添加した群ではオキシムリンカーを維持した **2** の状態を維持していることを踏まえると、**7** と **2** が有する神経毒性は、ほぼ同程度であると考えられる。コントロール実験として、上記における条件下では MeONH₂ および MeNH₂ を添加したのみの細胞では、細胞生存率が低下しないことを確認している。

本実験の結果、オキシムリンカーが切断された **7** により形成される線維が有する神経毒性は、オキシムリンカーを維持している **2** が形成するオリゴマーの神経毒性とほぼ同程度であることを示唆している。このことは、Aβ オリゴマーが Aβ 線維よりも神経毒性が高い^[5,6]ということと矛盾する結果のように思える。しかし、**2** が形成するオリゴマーが AFM 解析で見えるレベルの大きなサイズであったため、毒性がそれほど強くなかったという可能性がある。すなわち、神経毒性が高いと考えられる化学種はトリマー、ヘキサマーなど、**2** が形成するオリゴマーより小さな化学種である可能性が高いことが考えられる。また、**2** に導入したオキシム構造自身が毒性に影響している可能性も考えられる。

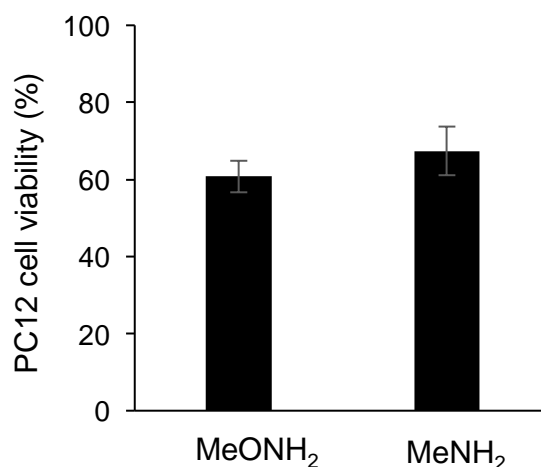


Figure 1-44. Comparative toxicity of the oligomer formed from compound **2** (x-axis: MeNH₂) and fibril formed from compound **7** (x-axis: MeONH₂), corresponding to closing and opening forms of the oxime linker, respectively. Compound **2** (in 0.1% TFA) was added to PBS containing MeONH₂ or MeNH₂ (**2**, 40 μM; MeONH₂/MeNH₂, 2 mM; pH 7.4; we confirmed that **7/2** was dominant in the condition with MeONH₂/MeNH₂, respectively), incubated at 37 °C for 1 d, and the solutions were added to PC12 cell plates (final **2**, 10 μM; MeONH₂/MeNH₂, 500 μM). Then, the cells were

incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 2 d. Mean ± SEM, *n* = 3. Cell toxicity was not observed in the presence of MeONH₂/MeNH₂ at the concentration of 500 μM. Cell viability in the presence of MeONH₂ or MeNH₂ only (500 μM) is designated as “100” at y-axis.

1-10 小括

本章では、Aβ₄₂ の Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖を可逆的な共有結合であるオキシムリンカーで連結したオキシム誘導体 **2** を設計・合成し、その性質を評価した。その結果、**2** は線維形成をしない安定オリゴマーを与え、一定の二次構造である β-シート構造を維持することが分かった。また、**2** が形成するオリゴマーはアミロイド特有のクロス β-シート構造を形成し、神経毒性を有することが分かった。比較対照として、Gln¹⁵、Gly³⁷ の側鎖をオキシム結合で連結させたオキシム誘導体 **5** では、オリゴマー形成が顕著に抑制されたことから、Aβ₄₂ オリゴマーの安定化には Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖間のリンカー構造が重要であることが示唆された。

さらに、23 番目と 28 番目の側鎖を架橋しているオキシムリンカーを、可逆的なオキシム交換反応によって選択的に切断することにより、オリゴマー／線維の変換が可能かについて検討を行った。その結果、分子内オキシムリンカーを有する **2** ではオリゴマー状態を維持し、オキシム結合が切断された **7** では線維へと凝集状態が変化することが判明した。また、**2** のオキシムリンカーが切断された **7** からオキシム交換反応の反応剤を反応系中から除去することにより、元の **2** に変化することを見出した。したがって、**2** のオキシムリンカーは可逆性を有することが示唆された。

第2章 ラクタムリンカーを有する A β 42 誘導体の設計・合成・性質評価

2-1 ラクタムリンカーを有する A β 42 誘導体の化合物設計

前章にて述べたように、A β 42 の 23 番目と 28 番目の側鎖の塩橋構造を可逆結合であるオキシム構造で代替し、オキシムリンカーの開閉によりオリゴマーから線維への変換が可能となる知見が得られた。**2** が安定なアミロイドオリゴマー状態を維持したことは、A β の 23 番目と 28 番目の側鎖間に存在する塩橋がオリゴマーの形成と安定化に重要な役割を果たしていることを示唆している。しかし、**2** はリンカー部分の開閉を実現するために、可逆的なオキシム構造を採用しており、A β の塩橋とは構造の相同性が必ずしも高くないと考えられる。そこで、塩橋構造により近い代替構造として、A β 40 の Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖間で脱水縮合したラクタム誘導体 **9** の報告 (Figure 2-2) [31] に着目した。

A β 40 ラクタム誘導体 **9** はネイティブ A β 40 と比較してチオフラビン T 蛍光強度の上昇が速く、凝集速度が速くなっていることが示唆されている (Figure 2-1a) [31]。また、**9** は凝集の結果、ネイティブ A β 40 と同様に線維を形成する性質を維持している (Figure 2-1b) [31]。これらのことから、A β 40 における Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖を不可逆的な共有結合であるラクタム結合で連結させると、凝集速度が変化し線維形成が促進すると言われている。また、インタクトな Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖においてラクタム結合した **8** は、塩橋により近い構造をとっていることが推定される。以上のことから、A β 42 においても Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖をラクタム結合で環化させた **8** は、A β 42 における塩橋構造を代替している誘導体であることが考えられる。そこで、**8** を合成し、その性質を評価し、ネイティブ構造の A β 42 および前章で合成したオキシム結合で環化させた **2** と比較することにした (Figure 2-3)。

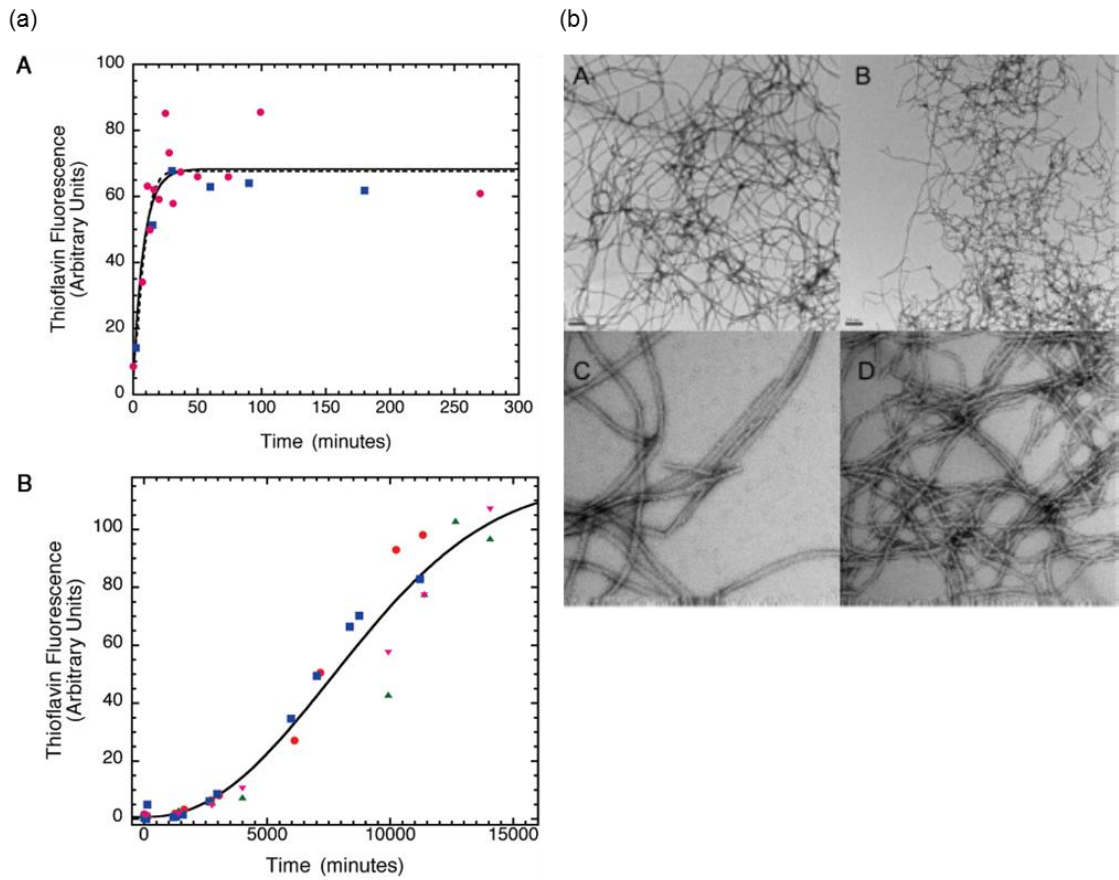


Figure 2-1. The pictures of (a), (b) are cited from ref. 31. (a) Fibril kinetic growth curves for Aβ40-lactam(D23/K28) (A) and Aβ40 (B) as a relative thioflavin T fluorescence.

(b) Electron micrographs of negatively stained fibrils formed by Aβ1-40 (A, C, at 15000× and 98000× magnification, respectively), and Aβ1-40-Lactam(D23/K28) (B, D, at 15000× and 98000× magnification, respectively). Fibrils were grown from ~115 μM peptide in 10 mM sodium phosphate, pH 7.40 from a peptide stock in DMSO (final DMSO concentration <2%). Aβ1-40 fibrils exhibit typical morphology of long, unbranched, twisting amyloid fibrils. Aβ1-40-lactam(D23/K28) are not as frequently twisted and are composed of single fibrils.

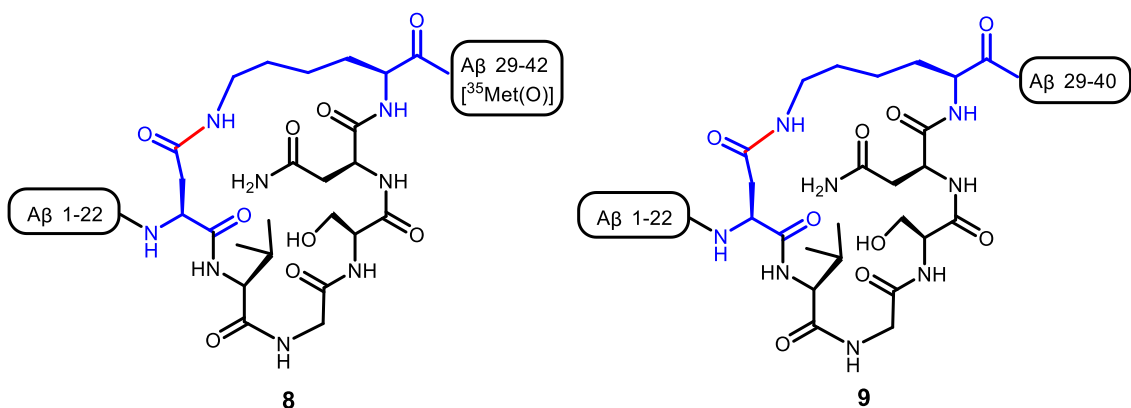


Figure 2-2. Simplified chemical structures of A β and the mimics.

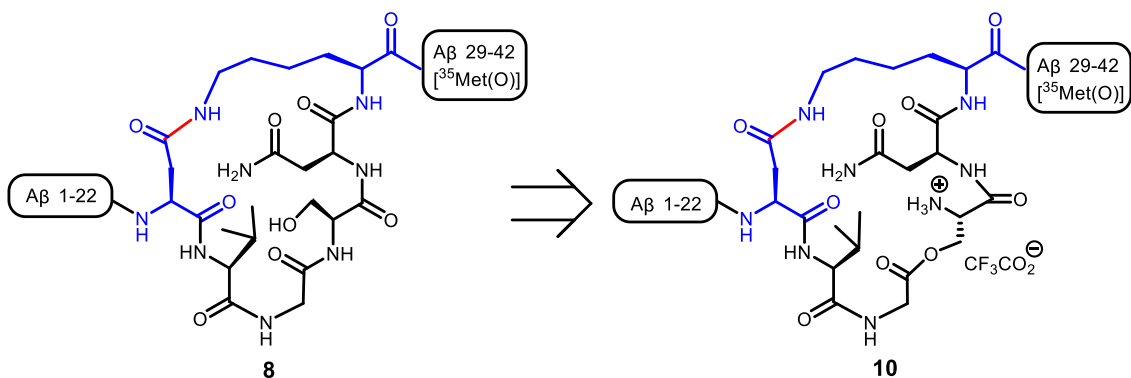
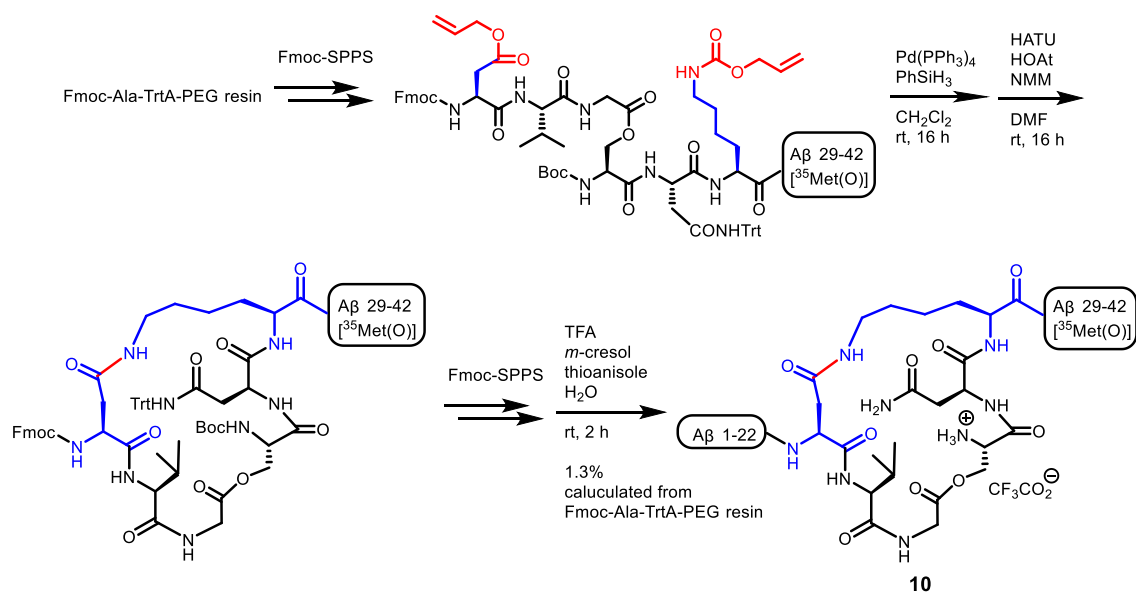


Figure 2-3. Synthetic target of **10**.

2-2 ラクタムリンカーを有する A β 42 誘導体の合成

8も、先と同様に合成が容易で水溶性に優れた*O*-アシルイソペプチド体**10**として合成した。Fmoc-Ala-TrtA-PEG resinを用いて、Fmocペプチド固相合成法により、Asp²³までペプチド鎖を構築した後に、アルゴン雰囲気下、Pd(PPh₃)₄とPhSiH₃を用いて、Asp²³側鎖のアリル基とLys²⁸側鎖のAlloc基を選択的に除去した。続いて、脱保護した側鎖間をHATUおよびHOAtを用いて分子内で環化させ、ラクタム環を構築した^[32]。その後、Fmocペプチド固相合成法によりAsp¹までペプチド鎖を構築した後に、TFAカクテル (TFA/*m*-cresol/thioanisole/H₂O=92.5/2.5/2.5/2.5) にて樹脂からの切り出しと保護基の除去を行い、得られた粗物質のペプチドを逆相HPLCにて精製することにより、目的物である**10**を得た (Scheme 2-1)。



Scheme 2-1. Synthesis of **10**.

10 は期待通り高水溶性を示し、0.1% (v/v) TFA 水溶液を溶媒として用いて、200 μ M 程度の高濃度のストック溶液も調製可能であった。続いて、以後の生化学的評価、生物物理学的评价のため、**10** のストック溶液内に存在する全ての凝集体を除く目的で超遠心を行い (4 $^{\circ}$ C, 100,000 rpm, 3 h), 上清 3/4 を回収した。その後、超遠心後の上清 3/4 の濃度を測定し、**10** のストック溶液の濃度とした。**10** の超遠心後の上清の濃度が 120~170 μ M であったことから、**10** のストック溶液には超遠心処理で除かれる程度の凝集体が含まれていたことが考えられる。

さらに、**10** が **8** へと変換されるか否かを分析 HPLC によって検証した (Figure 2-5)。その結果、アッセイで用いる 0.1 M, pH 7.4 のリン酸緩衝液 (phosphate buffer; PB) にて **10** のストック溶液を希釈すると、**10** のピークは消失し新たなピークへと定量的に変換されたことが確認された。したがって、*O*-アシルイソペプチド構造が分子内ラクタムリンカーを有する環状構造においても、*O*-to-*N* 分子内アシル基転位反応が進行することが示された。以上の結果から、A β 42 と同様に、ラクタム構造を有する **10** においても **8** の高水溶性・非凝集性の前駆体として機能すると考えることができる。

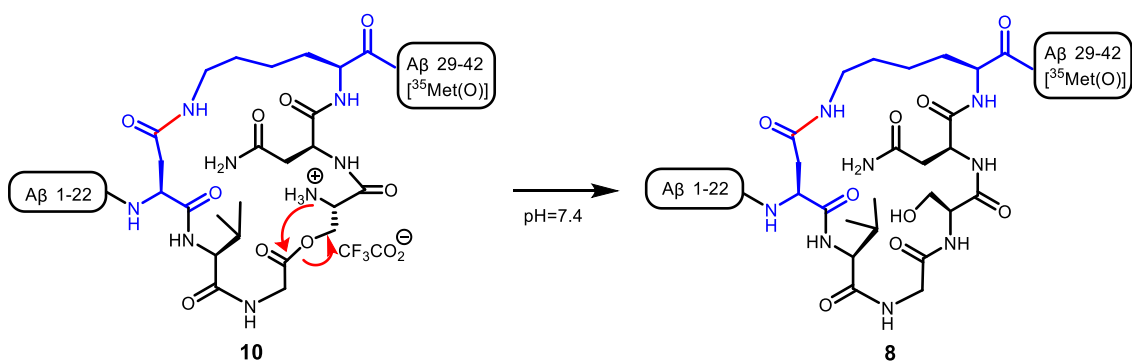


Figure 2-4. Intramolecular *O*-to-*N* acyl rearrangement of **10**.

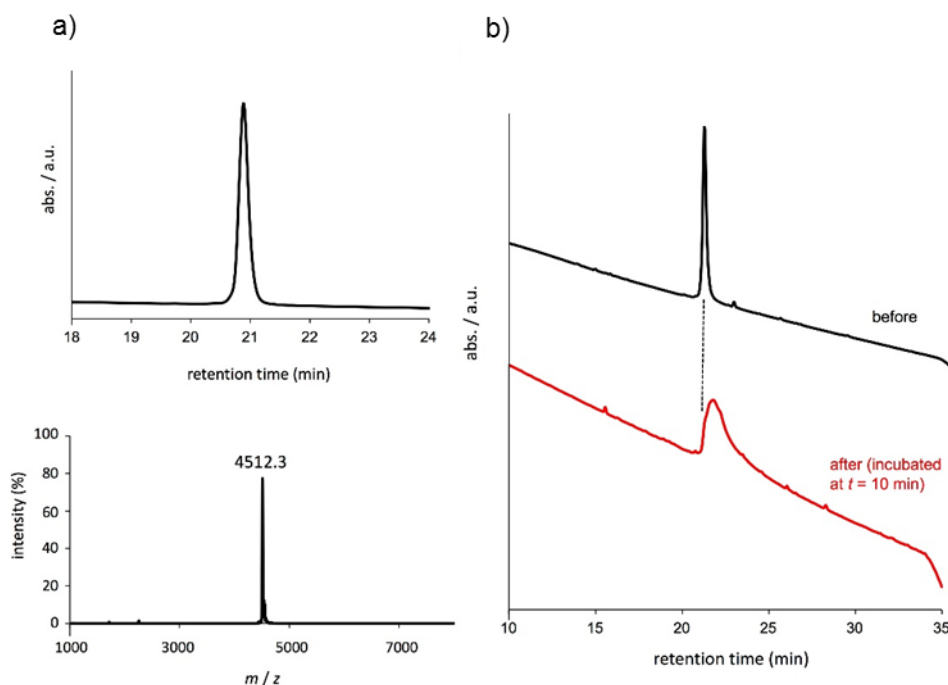


Figure 2-5. (a) Upper: HPLC chart of purified **10**. HPLC analysis was performed with a linear gradient of 0–100% MeCN in 0.1% aqueous TFA over 40 min at 40 °C at a flow rate of 1 mL/min, detected at 230 nm. Lower: MALDI-TOF-MS spectrum of purified **10**. (b) HPLC charts of the conversion from **10** to **8**. The HPLC analysis was performed using a C18 reverse phase column (4.6×150 mm; YMC-Triart C18 column) with a linear gradient of MeCN (0–100% over 40 min) in 0.1% aqueous TFA at a flow rate of 1.0 mL/min at 40 °C, and peaks were detected at 230 nm. Stock solution of **10** was diluted with 0.1% aqueous TFA and 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) (final concentration: 10 μ M), and the solutions were immediately subjected to analytical HPLC to obtain the charts designated as before rearrangement; black and after rearrangement; red, respectively.

2-3 ラクタムオリゴマーの形態解析

次に、**8** で生成するオリゴマー化学種の形態学的な知見を得るため、AFM を用いて解析を行った (Figure 2-6)。

まず、**8** (10 μ M) の 0.1 M HEPES 緩衝溶液 (pH 7.4, 0.1 M NaCl 含有) を 37 °C で所定の時間 (インキュベート直後、3 時間、24 時間) インキュベートした後、AFM にて生成物の形態を観察した。その結果、**8** ではインキュベート直後に高分子量オリゴマーあるいはプロトフィブリル状の化学種が観察され、3 時間後、24 時間後にも同様な化学種が観察された。しかし、アミロイド線維は観察されなかった。イソペプチドである **10** では **8** で観察されたような高分子量オリゴマーまたはプロトフィブリル状の化学種が観察されなかったことから、**10** が転位した **8** がオリゴマーを形成したと考えられる。一方、前章でも述べたように、ラクタムリンカーを持たない **6** ではラグフェーズの後にアミロイド線維が形成された。これらの結果より、**8** のラクタムリンカーが A β 42 のプロトフィブリルおよび高分子量オリゴマー形成を促進し、生成したオリゴマーが安定であることが示された。

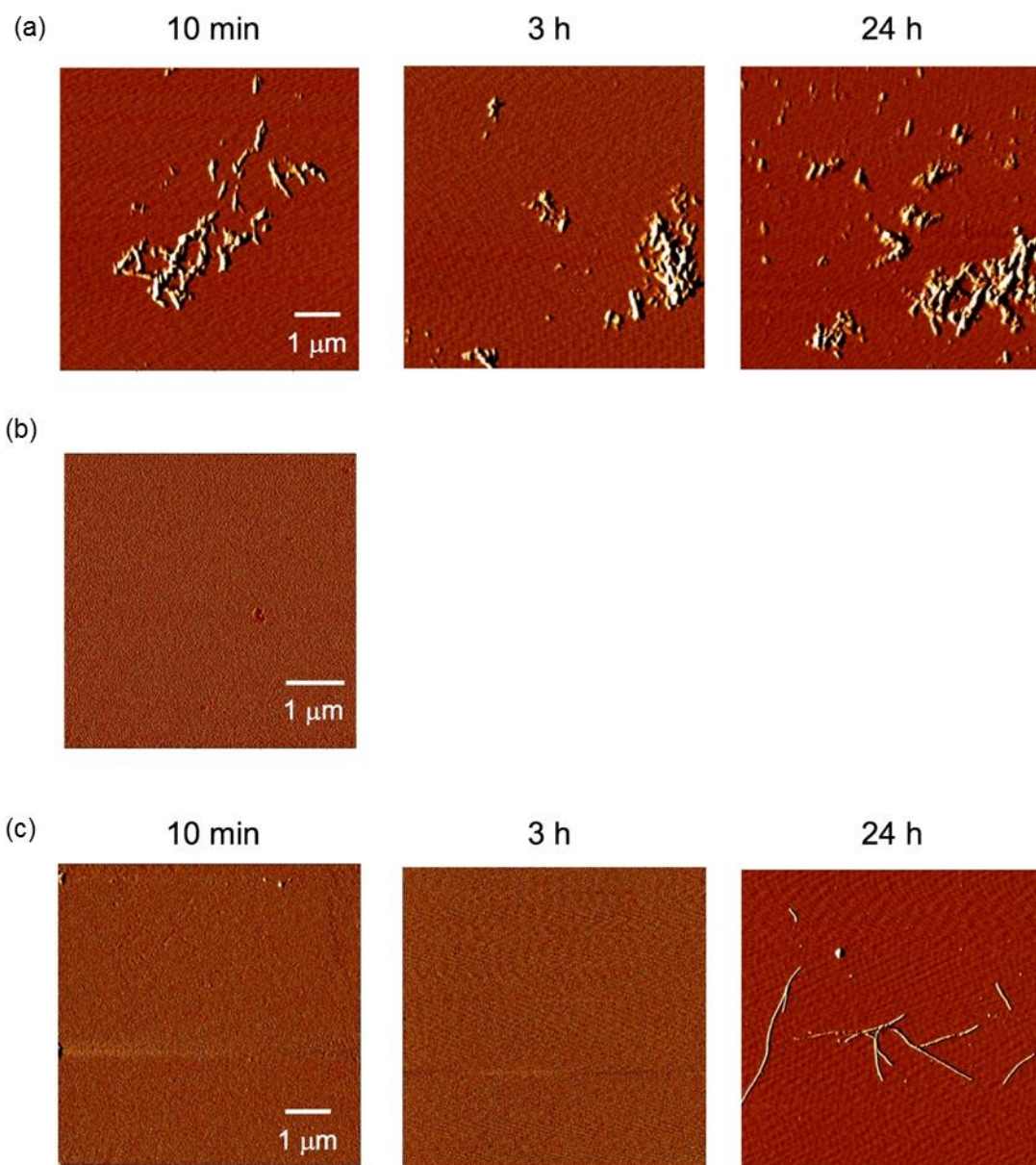


Figure 2-6. AFM images of (a) **8**, (b) **10**, and (c) **6**. Samples (10 μM) were incubated in 0.1 M HEPES buffer containing 0.1 M NaCl (pH 7.4) at 37 °C for the indicated time periods and then analysed in (a) and (c). In (b), instead, **10** was analyzed by AFM by incubation with 0.1% aqueous TFA (i.e., without *O*-to-*N* acyl rearrangement). The images are shown in amplitude mode.

2-4 SDS-PAGE による解析

次に、**8** の会合状態の変化を SDS-PAGE により解析した (Figure 2-7)。**8**、Aβ42 (**1**)、および **6** のリン酸緩衝溶液 (pH=7.4) を 37 °C でインキュベートした後に、各測定時間 (インキュベート直後、3、24、72 時間) で PICUP 処理^[13]を行い、Novex® 15% Tris-glycine gel を用いて電気泳動を行った。その後、ウエスタンブロット法により検出した。ウエスタン

ブロット法はPVDF膜へ転写後、抗アミロイドβモノクローナル抗体（6E10）を一次抗体に用いて検出を行った。

8はインキュベート直後においてモノマー以外にダイマー、トリマー、テトラマー（低分子量オリゴマー）に相当するバンドが主として観察され、250 kDa 付近に高分子量オリゴマーのバンドが観察された。この250 kDa 付近の高分子量オリゴマーは、**1**や前章で述べたオキシムリンカーを有するAβ42誘導体**2**と同様のものであった。

さらに、**8**では3時間後には、250 kDa 付近の高分子量オリゴマーのバンド強度がインキュベート直後と比較して強く観察された。また、24時間後および72時間後では低分子量オリゴマーのバンドは観察されず、250 kDa 付近の高分子量オリゴマーはバンド強度が3時間後と比較して減少するものの、高分子量オリゴマーの存在を維持した。

一方、前章で述べたように、ラクタムリンカーを持たない**6**ではラグフェーズの後にアミロイド線維が形成されるため、前章1-5で述べたSDS-PAGEの銀染色の結果と同様の結果が得られた。したがって、Asp²³とLys²⁸をラクタムリンカーで結合させることにより、低分子量オリゴマーから速やかに高分子量オリゴマーを形成することが促進された。さらに、**8**が形成する高分子量オリゴマーは24時間および72時間維持することが示唆された。

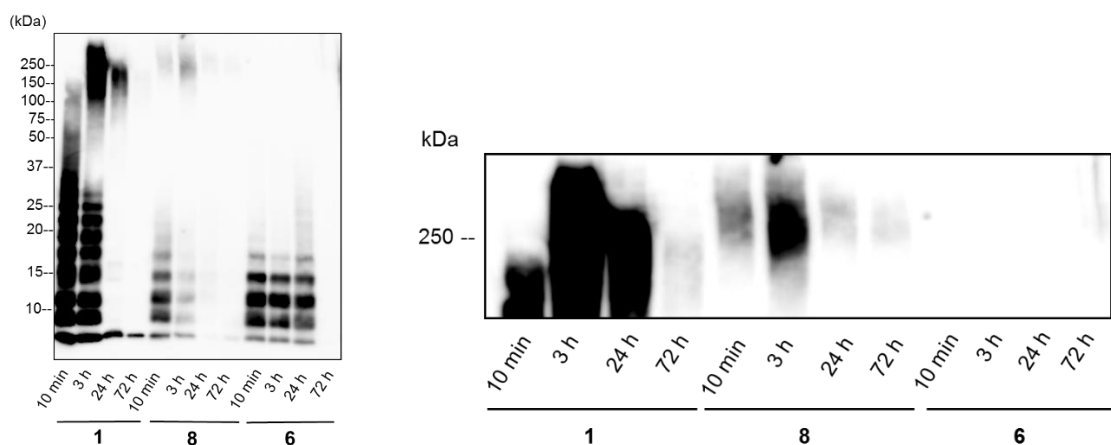


Figure 2-7. SDS-PAGE analysis of **1** (20 μM), **8** (20 μM) and **6** (20 μM). Aβ samples incubated at 37 °C in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) for the indicated times, and then samples were treated by photoinduced cross-linking. The resulting products were analyzed by SDS-PAGE on a 15% gel. Bands were detected by western blotting. The mobilities of molecular weight markers are shown on the left.

2-5 CD スペクトルによる解析

8の生理的条件下での二次構造がどのように変化するかをCDスペクトルにより評価した (Figure 2-8)。**8**(10 μM) のリン酸緩衝溶液 (pH 7.4) を 37 °C で所定の時間 (インキュベート直後、1時間、6時間、24時間) インキュベートした後、CDスペクトルを測定した。37 °C インキュベート直後では**8**はランダムコイルを示すスペクトルを与えたが、1時間後

には 217 nm 付近に極小値をとる β -シート構造へと変化した。さらに、**8** は 24 時間後においても β -シート構造を維持した。一方で、ラクタムリンカーを持たない **6** はインキュベート 6 時間まではランダムコイルを維持したが、24 時間後には β -シート構造へと変化した。これらの結果より、Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖をラクタム結合で連結させることにより、一定の二次構造である β -シート構造を速やかに与えることが分かった。

前章で述べたように、オキシムリンカーで結合させた誘導体 **2** はインキュベート直後の時点で β -シート構造の存在を支持する CD スペクトルを与えたのに対し、ラクタムリンカーで結合させた誘導体 **8** はインキュベート直後ではランダムコイルを支持する CD スペクトルを与えた。このことから、オキシムリンカーで連結させた誘導体 **2** の方がラクタムリンカーの誘導体よりも β -シート構造の形成速度が速いことが示唆された。

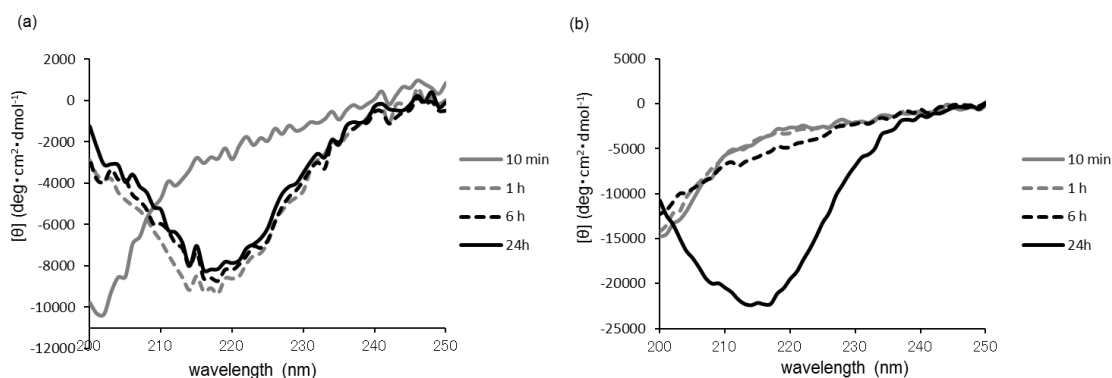


Figure 2-8. CD spectra. **8** (10 μ M) and **6** (10 μ M) were incubated at 37 $^{\circ}$ C for indicated hours. (a) CD spectra of **8**. (b) CD spectra of **6**.

2-6 チオフラビン T アッセイ

チオフラビン T (ThT) を用いた蛍光強度アッセイにより **8** の凝集性を評価した (Figure 2-9)。**8** の 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) を 37 $^{\circ}$ C でインキュベートし、インキュベート直後、1、3、6、24 時間後に ThT 蛍光強度を測定した。**8** の蛍光値は 1 時間後に 10 a.u.、3 時間後に 17 a.u.、6 時間後に 18 a.u. と緩やかな上昇を示し、24 時間後に 8 a.u. と蛍光値の減少が確認された。このことから、**8** のクロス β -シート量は比較的速やかに増加するものの、一定時間後は増加しないことから、全インキュベート時間を通してクロス β -シート量の変化が比較的少ないことが示唆された。また、前章で述べたオキシムリンカーを有する **2** の蛍光強度変化と比較すると、**8** の蛍光強度は **2** の蛍光強度より大きな値を示している。これらの結果は、AFM 解析の結果と一致しており、**8** では **2** より大きな凝集体が観察されていることと一致している。

一方で、ラクタムリンカーを持たない **6** は前章で述べたように、ラグフェーズの後に ThT の蛍光値が大きく上昇し、その蛍光値は **8** の値より大きな値を示した。すなわち、**6** のクロス β -シート量は一定時間後まで増加せず、一定時間後に急激に増加するものであり、**8** とは

対照的であった。

8 の蛍光強度変化は、速やかにオリゴマーを形成し、その後、高分子量オリゴマーまたはプロトフィブリル状のものを維持するという AFM、SDS-PAGE そして CD の結果と一致していると考えられる。アミロイドのプロトフィブリルの ThT 蛍光値は線維と比べ小さい値をとることが報告されている^[33]ことから、**8** はアミロイドに特徴的なクロス β -シート構造を保持している安定な高分子量オリゴマーおよびプロトフィブリルと考えられる。

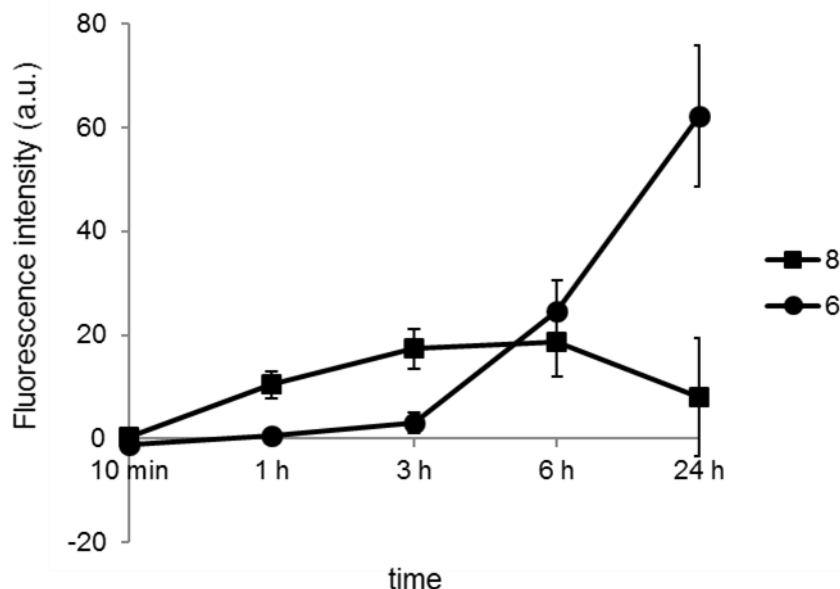


Figure 2-9. ThT assay ($\lambda_{ex} = 440 \pm 5$ nm, $\lambda_{em} = 480 \pm 10$ nm). **8** (10 μ M) or **6** (10 μ M) was incubated at 37 °C in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for the indicated times. Mean \pm S.D., $n = 3$).

2-7 サイズ排除クロマトグラフィーによる解析

8 の会合状態の変化をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により分析を行った。(Figure 2-10)。**8** (10 μ M) のリン酸緩衝溶液 (pH 7.4) を 37 °C で所定の時間(インキュベート直後、3 時間、9 時間) インキュベートした後、サイズ排除クロマトグラフィーにて分析した。インキュベート直後の時間帯 (10 分) においては 14.9 mL の溶出容量時にピーク (モノマー / 低分子量オリゴマーに相当) が観察された。一方、インキュベート 3 時間、および 9 時間後では、インキュベート直後と同じ溶出用量時 (14.9 mL) にピークが観察された。しかし、インキュベート 3 時間後、9 時間後のピーク面積値は、インキュベート直後のピーク面積値と比較し明らかに減少し、ピーク形状も変化していた。これは、会合・凝集に伴いモノマー / 低分子量オリゴマーが減少し、別の化学種のオリゴマーが生成したためと考えられる。

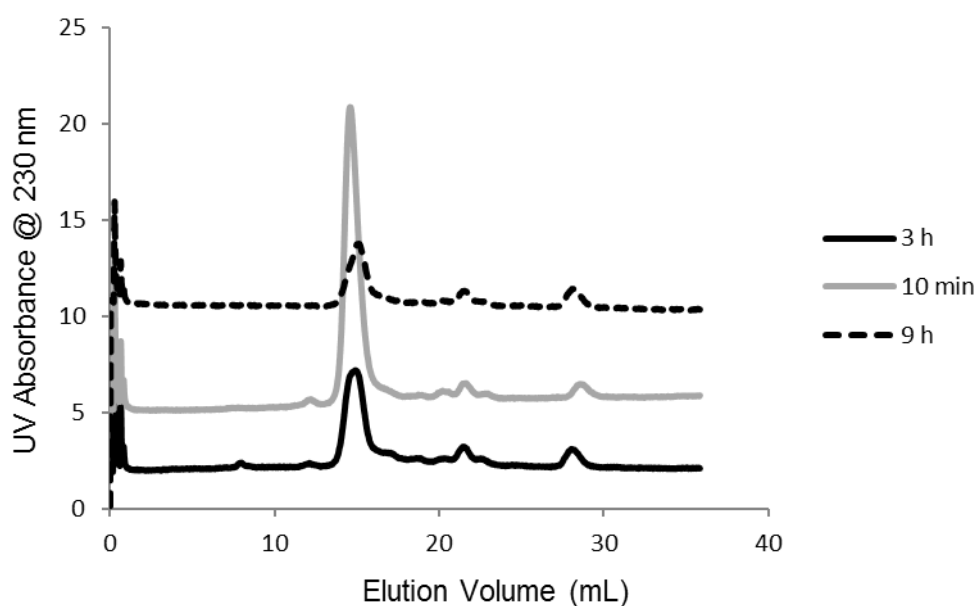


Figure 2-10. SEC spectra (UV absorbance was detected at 230 nm). **8** (10 μ M) was incubated at 37 $^{\circ}$ C for indicated hours.

一方で、**6**は37 $^{\circ}$ Cインキュベート直後(10分)、および3時間後では溶出容量時(14.2 mL)にピークが観察されたが、9時間後にはピークが完全に消失した(Figure 2-11)。また、3時間後のピーク強度およびピーク形状がインキュベート直後のものと同程度であることから、同じ化学種(モノマー/低分子量オリゴマー)が生成していることが示唆される。したがって、**6**は3時間程度まではモノマーおよびオリゴマーの存在を支持するが、9時間後には凝集が進行し、SECでは溶出されない大きな凝集体に変化していると考えられる。これは、チオフラビンTでの蛍光強度の変化がインキュベート3時間後から24時間後にかけて大きく変化していることから、この時間帯に小さなオリゴマー化学種をきっかけとして大きな凝集体に変化していることを裏付けている。

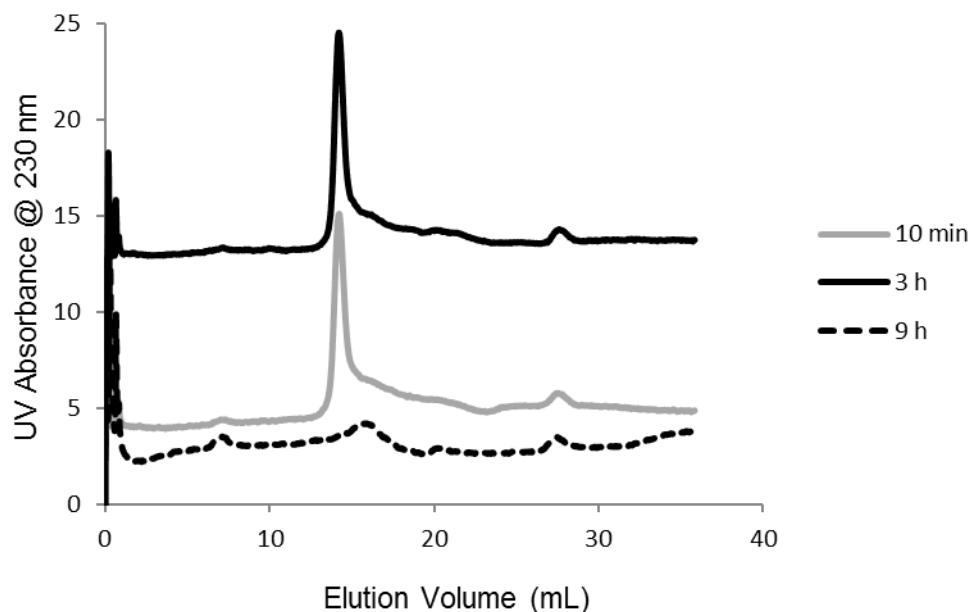


Figure 2-11. SEC spectra (UV absorbance was detected at 230 nm). **6** (10 μ M) was incubated at 37 $^{\circ}$ C for indicated hours.

2-8 細胞毒性評価

次に、**8**の神経毒性に与える影響について、ラット副腎褐色細胞腫であるPC12細胞を用いて検証した (Figure 2-12)。ウマ血清を1%含むHEPES-DMEM培地中の細胞に対し、**8** (10 μ M)、**6** (10 μ M)をそれぞれ、37 $^{\circ}$ Cで72時間インキュベートした後、WST-8試薬により生細胞数を定量した。

溶媒投与群の細胞生存率を100%としたとき、**8**は約50%程度の細胞生存率の低下が見られ、**6**と同程度であった。また、顕微鏡での観察により、**8**を添加した細胞群では**6**を添加した細胞群と同様の形態変化が観察された (Figure 2-13)。

これらの結果より、**8**の細胞毒性は**6**とほぼ同程度であると考えられる。したがって、**8**により形成される化学種のオリゴマーは、ラクタムリンカーを持たない**6**が有する細胞毒性をミミックしているものと考えられる。

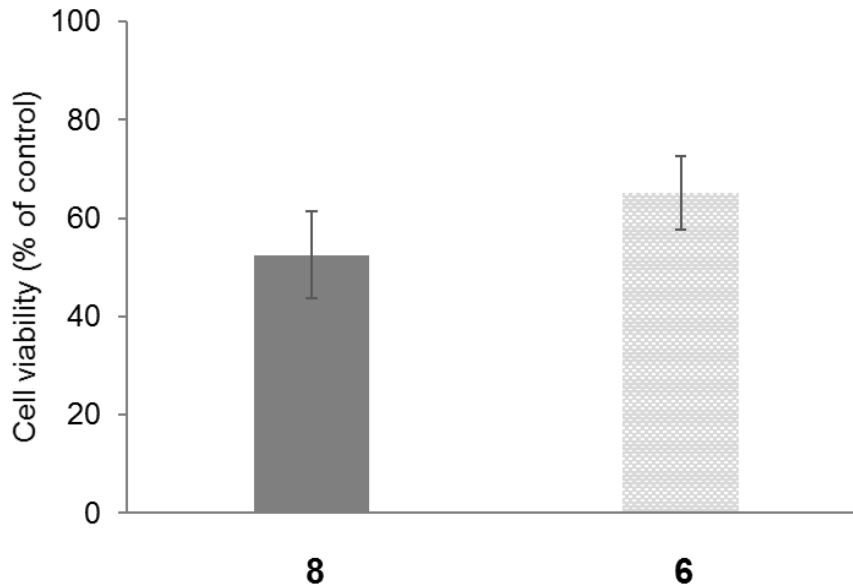


Figure 2-12. Cell viability assay. Well-seeded PC12 cells were treated with **8** (derived from **10**) or **6** at 37 °C under 5% CO₂ for 3 d. Mean ± SEM, *n* = 6).

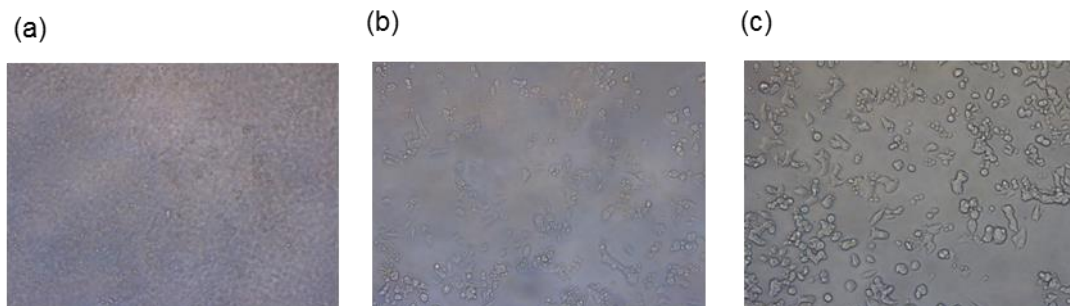


Figure 2-13. Photographs of PC12 cells. (a) **8**, (b) **6**, (c) only solvent (0.1% aqueous TFA).

2-9 塩橋構造の違い

これまでに述べてきたように、Aβ₄₂ の Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖をラクタム結合で連結した誘導体 **8** は、アミロイドに特徴的なクロス β-シート構造や神経毒性を有する高分子量オリゴマー、プロトフィブリルの形成を促進した。他方、Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖をラクタム結合で連結した Aβ₄₀ 誘導体は、線維の形成を促進する^[24]ことが報告されていることから、Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖の塩橋構造は Aβ₄₀ における高次構造の形成に重要な役割を有していると考えられる。

今回の結果から、Aβ₄₂ における Asp²³ と Lys²⁸ の塩橋構造は、線維化に至らない安定オリゴマーを速やかに形成するものであり、Aβ₄₀ における Asp²³ と Lys²⁸ の塩橋構造は線維形成を促進するものであると考えられた。このことから、Asp²³ と Lys²⁸ の塩橋構造は Aβ₄₂ と Aβ₄₀ ではその性質が異なることが示唆された。

2-10 先行研究との違いに関する考察（検討データを含む）

前章でも述べたが、Härd らは全長 A β 42 に対して Ala²¹ と Ala³⁰ を Cys に置換し、それぞれの側鎖をジスルフィド結合で環化させるという化学修飾により、生成したオリゴマーの解析を行っている^[10c]。これらの研究は、今回の研究における、側鎖をラクタムリンカーで環化させオリゴマーを安定化するという点と似ている。そこで、本節において、Härd らの研究^[10c]との比較を行いたい。

・リンカーで架橋している位置の違いについて

Härd らが報告している A β 42CC ではオリゴマー／プロトフィブリル状の化学種を形成しているという点で、本研究における **8** の結果と共通している。共有結合で連結させるアミノ酸側鎖が異なるものの、同様の化学種が生成しているというのは興味深い。しかし、オリゴマー形成という観点で見ると、A β 42CC と **8** では以下の点において異なっていると考えられる。

Härd らは、調製した A β 42CC の溶液を濃縮し、SEC により分析した結果、 β -sheet oligomer (100 kDa) をメインとするピークを検出している (Figure 2-14a,b) ^[10c]。さらに、 β -sheet oligomer に相当するフラクションを回収し、濃縮することによってプロトフィブリル (650 kDa) を形成している (Figure 2-14c) ^[10c]。したがって、A β 42CC では化学修飾したサンプルの溶液を濃縮することにより、オリゴマー化を促進していると考えられる。

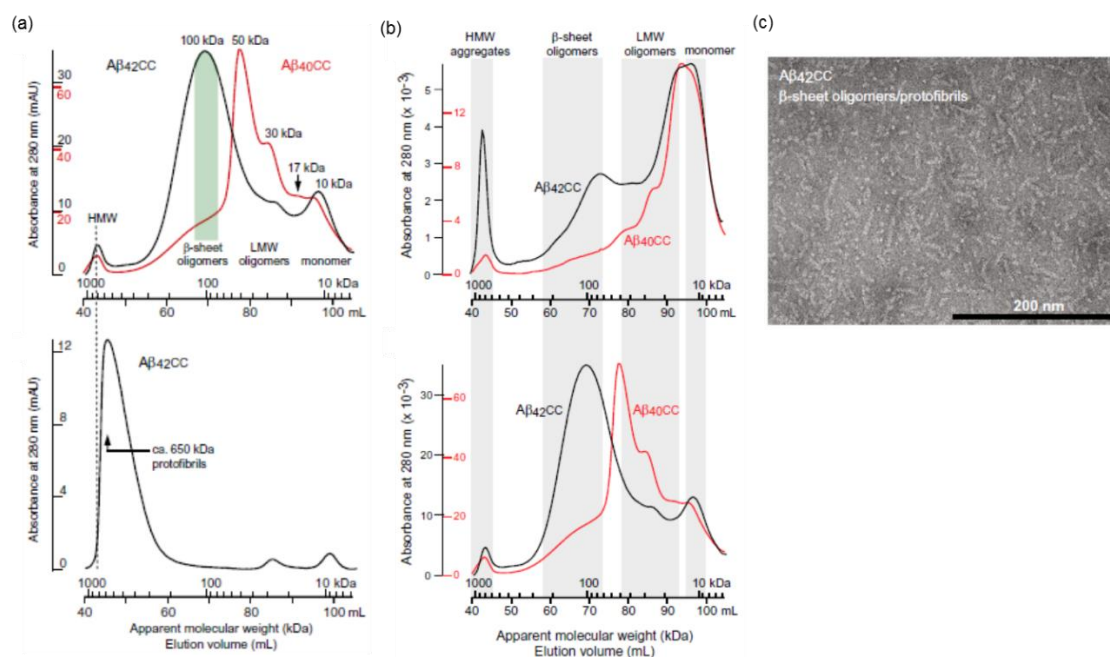


Figure 2-14. The pictures of (a), (b), (c) are cited from ref. 10c. (a) Biophysical and biochemical characterization of A β CC oligomers and protofibrils. (upper) Formation and separation of A β 42CC (black) and A β 40CC (red) oligomers during SEC on a Superdex 200 PG 16/600 column. Monomer peptide samples were loaded in denaturing buffer and eluted with native phosphate buffer at pH 7.2.

Apparent molecular weights and classification of eluted oligomers have been indicated. HMW aggregates elute with the void volume.

(b) Concentration dependence of formation of A β CC oligomers from denatured A β CC during SEC in native buffer on a Superdex 200 PG 16/60 column. (upper) Diluted and (down) ~5 times more concentrated A β 40CC and A β 42CC samples. The experiments in B are the same as in A. Monomer peptide samples were loaded in denaturing buffer containing 7 M GdmCl and eluted with native phosphate buffer at pH 7.2, resulting in oligomer formation. Shaded zones indicate approximate elution volumes for different aggregates. The column was calibrated using globular protein standards. Sample amounts: (upper) 0.5 mg A β 40CC and 0.3 mg A β 42CC; (down) 2.7 mg A β 40CC and 1.7 mg A β 42CC.

(c) TEM micrograph of a concentrated sample of A β 42CC β -sheet oligomers (190 μ M monomer concentration) showing assembly of β -sheet oligomers into protofibrils.

一方で、本研究におけるラクタムリンカーで環化させた誘導体 **8** では、化学合成した *O*-アシルイソペプチド **10** の溶液をアッセイの直前に中性条件下で **8** を生成し、生理的条件下でのインキュベーション直後にオリゴマー形成を確認した (Figure 2-5)。このことから、オリゴマー形成のしやすさという点では **8** と A β 42CC は異なっている。**8** では、A β 42 オリゴマーに観察されている Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖間の相互作用を共有結合で代替していることから、オリゴマー形成という点において、A β 42CC よりも顕著になったと考えられる。

プレリミナリーなデータであるが、**8** も SEC で検出されたオリゴマーに相当するピークを単離した後に、その安定性を評価した。すなわち、Figure 2-10 で示した **8** のオリゴマーに相当するピークのフラクションを回収し、その溶液を遠心分離によって濃縮した。その濃縮した直後の溶液を SEC にて分析したところ、ピーク強度は小さくなっているものの、**8** のオリゴマーと同じ溶出体積にピークを与えた。また、濃縮した溶液を室温にて 3 日間インキュベーションした後に、SEC にて分析したところ、**8** のオリゴマーと同じ溶出体積にピークを与え、濃縮直後に分析したものとほぼ同じピーク強度を示した (Figure 2-15)。このことから、**8** のオリゴマーは濃縮後も安定に存在し、少なくとも室温で 3 日間は安定であることが示唆された。濃縮したサンプルの二次構造や AFM 解析を検討していないため、得られた結果から、**8** と同じオリゴマーが維持されているのかは確認できていない。

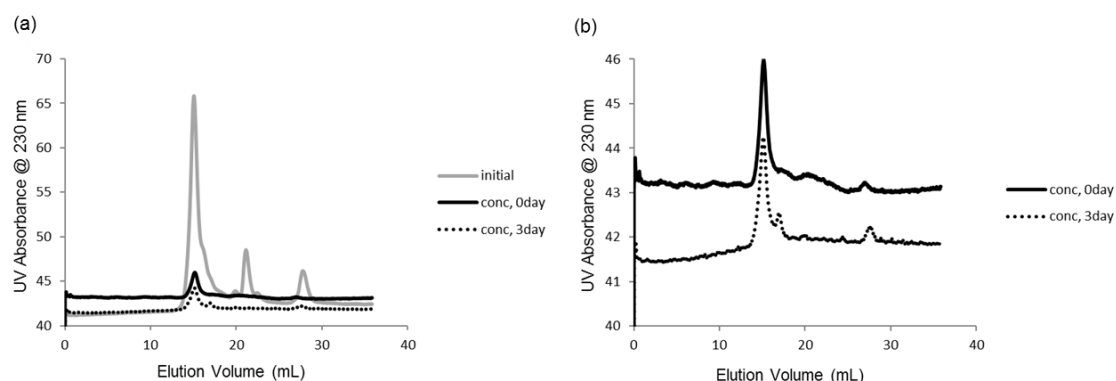


Figure 2-15. Concentration dependences of formation of **8**.

・メチオニンスルホキシドの影響について

A β 42CC はメチオニンスルホキシド体ではなく、メチオニン体であるが、 β -シート構造を有し、形態学的解析において、高分子量オリゴマー／プロトフィブリルを形成している^[10c]ことを確認されている。一方で、本研究におけるメチオニンスルホキシド体 **8** でも、高分子量オリゴマー／プロトフィブリルを形成することが明らかとなった。このことから、架橋しているアミノ酸残基の位置が異なるものの、A β のメチオニンがスルホキシド体になっているかどうかは、オリゴマー形成に与える影響は小さいのかもしれない。

本研究において、**8** のメチオニンスルホキシド体を還元したラクタム誘導体 (Figure 2-16) の合成を検討したが、アッセイに共試できるのに十分な純度のサンプルを得ることができなかった。すなわち、*O*-アシルイソペプチド **10** のメチオニンスルホキシド体を還元反応に付したが、生成物のピークがブロード化しており、逆相 HPLC により最終目的物のピークを回収したが、副生成物などのピークを除去することが困難であり、合成検討を断念した。

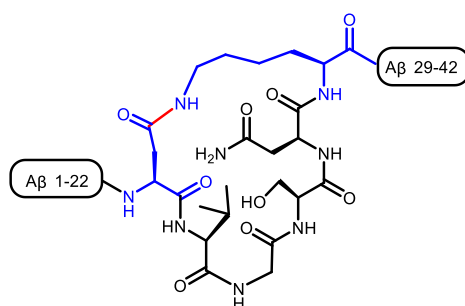


Figure 2-16. Lactam derivative of A β 1-42.

2-11 オキシムリンカーを有する誘導体 **2** との違いに関する考察

・リンカー構造の違いについて

2 と **8** では Asp²³ と Lys²⁸ に導入したリンカーの長さおよび構造ともに違いがあり、一概に比較することはできないが、ラクタムリンカーを有する **8** の方が、オキシムリンカーを有する **2** と比較して大きなオリゴマーを形成し、クロス β -シート量も多いということが明らか

かとなった。このことに関して、以下の通り考察する。

・リンカーの長さに関して

2 のオキシムリンカーを構成する原子数は9原子であるのに対し、**8** のラクタムリンカーを構成する原子数は7原子である。**2** および **8** において、AFM で観察されるオリゴマーの大きさに違いがあることから、オリゴマーの大きさの違いがリンカーの長さ由来のものであるかどうか検証するためには、リンカーの長さを **2**、または **8** のどちらかにそろえる必要があると考えられる。

上記の検証も含め、オリゴマーの性質におけるリンカーの長さの影響を比較するため、まずは、ラクタムリンカーの長さを変えた A β 42 誘導体の合成を計画した (Figure 2-17)。すなわち、Scheme 2-1 と同様なスキームにて、Asp²³ と Lys²⁸ に対応するアミノ酸残基をそれぞれ Glu または Orn に替えて合成検討を行った。しかし、最終目的物の粗物質において目的物と非常に近い保持時間の副生成物を除去することが困難であり、最終目的物を十分な純度で単離・精製することができなかつた。精製が困難であった原因として考えられるのは、ラクタム環化反応の変換率が低下したこと、さらに、その後の固相合成における副生成物の蓄積と推定している。これらを解決するためには、ラクタム環化反応の変換率 (収率) を向上するための反応条件の詳細な検討が必要であると思われる。

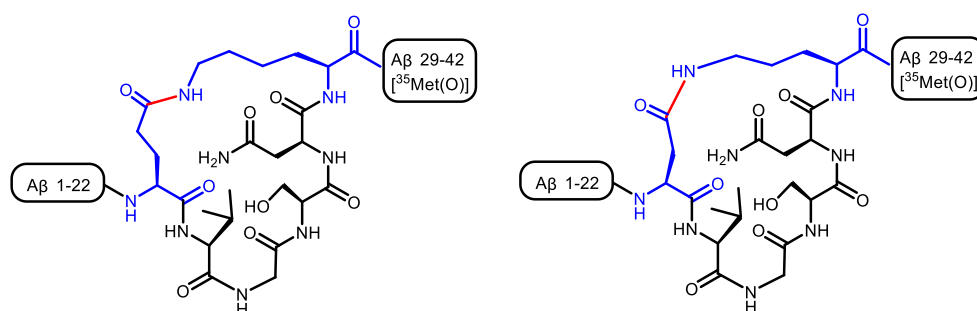


Figure 2-17. Lactam derivatives which linker length is changed.

または、全て固相合成で A β ペプチド鎖を構築するのではなく、ライゲーションを用いた合成法に変えて検討することも考えられる。すなわち、A β 42 を以下の3つのユニットに分け、それぞれのユニットをライゲーションにより合成する^[36]収束的な合成法である (Figure 2-18)。この合成法により、ラクタム部分を有する A β 21-30 を以下の通り設計することで、ラクタムリンカーの長さを変えた誘導体を様々に合成することが可能である。また、ライゲーションを行う前に、それぞれのユニットを精製することができ、最終目的物を得る際の精製の負担が軽減できる可能性がある。しかし、**10** を下記ライゲーションによる合成法により検討したが、合成を達成することができなかつた。詳細な合成検討はできていないが、中間体であるラクタムユニットを所望の純度で得ることができなかつたことから、ラクタムユニットのチオエステルの構造、または、O-アシルイソペプチド構造のアミノ基の保護基、

およびラクタム環化する前駆体となるカルボキシル基とアミノ基の保護基の選択について、詳細に合成検討する必要があると考えられる。

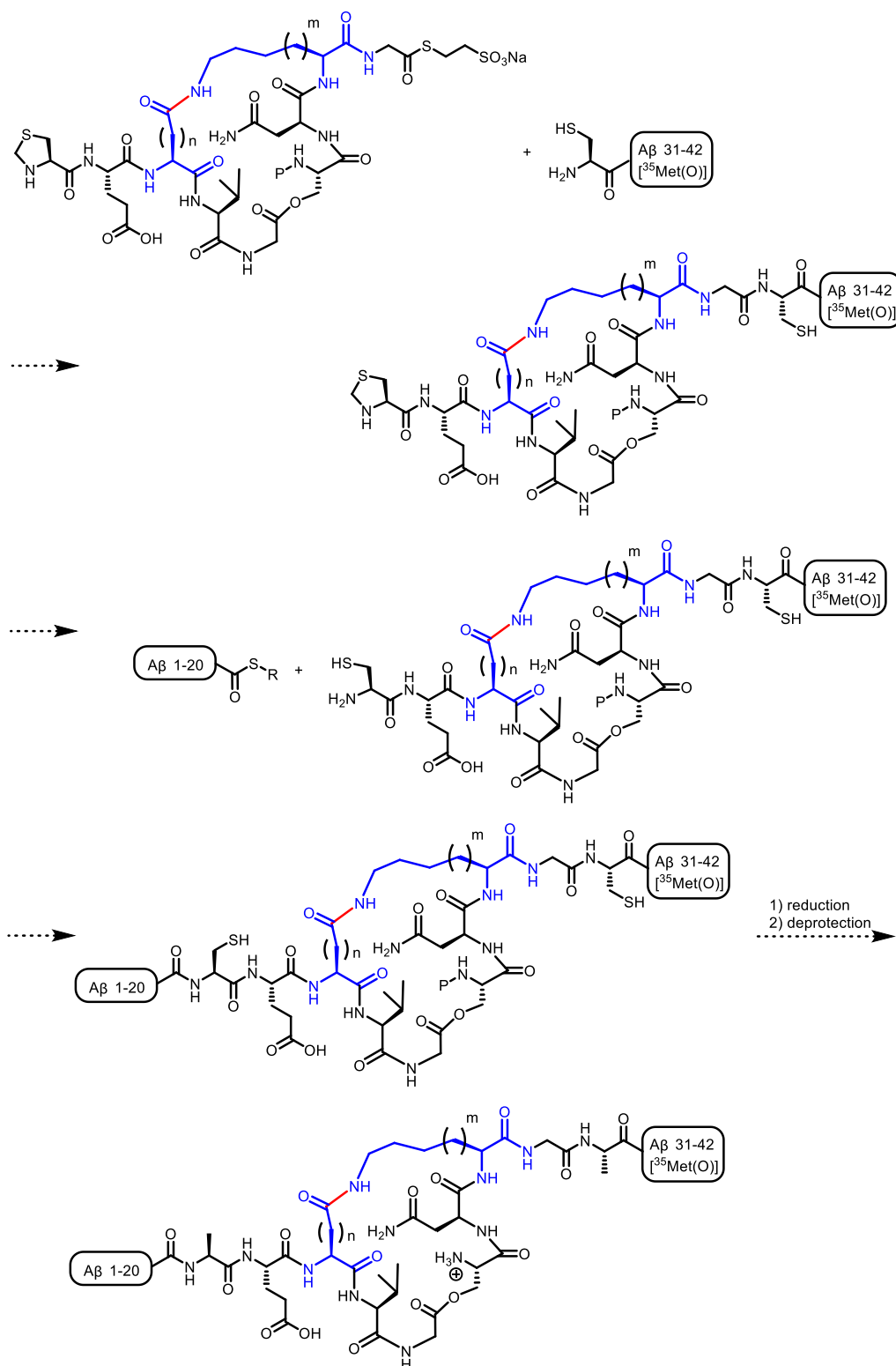


Figure 2-18. Ligation of lactam derivatives.

また、ラクタムリンカーを有する誘導体は、ラクタム環化反応を含めて全て固相合成にて合成を行い、最後に最終目的物を精製するという工程にて合成を行っている。一方で、オキシムリンカーを有する誘導体 **3** は、オキシム環化反応の前駆体であるアミノアルコール体 **4** で一度精製し、その後、オキシム環化反応を行い、再度、最終目的物であるオキシム誘導体 **3** を単離・精製する。すなわち、オキシム誘導体は2回精製することにより、全収率は低下するものの、最終目的物 **3** を所望の純度で単離することが可能である。また、オキシム環化反応は樹脂から切り出した後にペプチドの溶液状態にて行うため、環化反応における収率の影響も少ないと考えられる。したがって、合成検討は行っていないが、オキシムリンカーの長さを変えた誘導体、例えばラクタムリンカーと同じ長さのオキシム誘導体を合成して、**8** と比較する方がよいかもしれない。

・リンカーの構造の違いに関して

次に、リンカーの結合のタイプに着目して考察する。**2** のオキシムリンカーは **8** のラクタムリンカーと異なり、可逆性を有する結合である。オキシムリンカーは本アッセイ系で用いている水系中性条件下 (pH=7.4) ではオキシム体とアミノアルコール体との平衡が存在する (Figure 2-19)。すなわち、オキシムリンカーを有する環化体とオキシムリンカーに水が付加して開裂した加水分解体の混合物の可能性がある。しかし、**2** が有する環状構造は可逆性を有するオキシムリンカーであるため、エネルギー状態の高いコンフォメーションを取る分子種が生成した時には、オキシムリンカーが加水分解で切断され、もとの非環状構造に戻ることが期待できる。逆に、エネルギー状態の低い安定なコンフォメーションを有する分子種が生成した時には、オキシムリンカーを介した環状構造を維持することができると考えられる。このことから、**2** では **8** よりもエネルギー状態が低いオリゴマー化学種を形成することにより、さらにリンカーの加水分解を受けながら均一性の高いオリゴマー化学種を形成したと思われる。

一方で、**8** のラクタムリンカーは、不可逆結合であるアミド構造である。すなわち、**8** のモノマーのラクタム構造は不可逆的なラクタム結合によって固定化され、加水分解などで結合が開裂することなく、オリゴマー化すると考えられる。この時、Asp²³ と Lys²⁸ のラクタム環部分以外のペプチド鎖の分子間相互作用の影響により、A β ペプチドのコンフォメーションが複数存在する可能性があり、生成したラクタム体のオリゴマーの中にはエネルギー状態の高い分子種も含まれていると考えられる。ラクタムリンカーを有する **8** はオキシムリンカーを有する **2** と比較して、エネルギー状態の高いオリゴマーが一部生成し、それを核にして会合・凝集した結果、高分子量オリゴマー/プロトフィブリルを形成した可能性が考えられる。

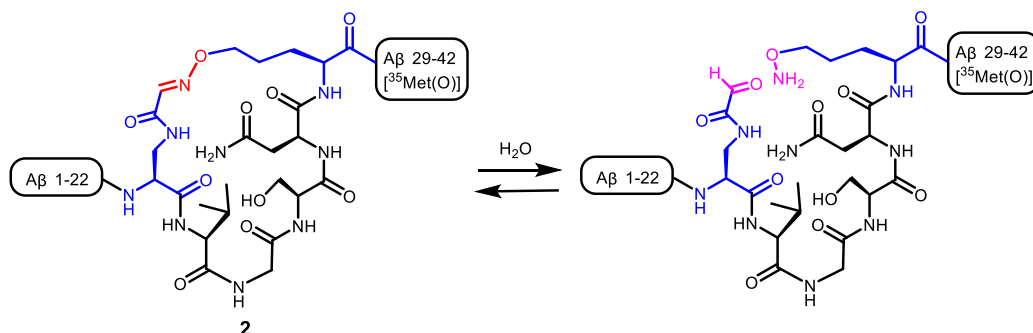


Figure 2-19. Hydrolysis of **2**.

2-12 小活

本章では、第 1 章で述べた、オキシムリンカーを有する A β 42 誘導体 **2** のオキシム構造を、不可逆的な共有結合であるラクタム構造で代替した誘導体 **8** の設計、合成、性質評価を検討した。その結果、**8** は高分子量オリゴマーおよびプロトフィブリル状を形成し、線維化に至らない化学種を与えることが分かった。また、**8** が形成するオリゴマーは一定の二次構造を形成し、その二次構造はクロス β -シート構造であることが判明した。また、細胞毒性評価より **8** はラクタムリンカーを持たない **6** とほぼ同等の神経毒性を有することが分かった。したがって、**8** が形成するオリゴマーはアミロイド特有の性質であるクロス β -シート構造および神経毒性を維持した。

A β 42 における Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖の塩橋構造はオリゴマーのみに観察されていることが報告されている。今回、A β 42 の Asp²³ と Lys²⁸ の側鎖をラクタムリンカーで連結させた誘導体 **8** の性質評価より、Asp²³ と Lys²⁸ の塩橋構造は線維化に至らない高分子量オリゴマーおよびプロトフィブリルの形成を促進するものであると考えられる。一方で、A β 40 における Asp²³ と Lys²⁸ の塩橋構造は線維形成を促進することが知られている。したがって、本研究によって得られた知見では、Asp²³ と Lys²⁸ の塩橋構造は A β 42 と A β 40 ではその性質が異なることが示された。

また、**8** が **9** と比較して高分子量オリゴマーおよびプロトフィブリルで安定化したという点は、A β 42 が A β 40 に比較して神経毒性が高いことを裏付ける結果と考えることができる。

Experimental section

Materials and Methods

General

Analytical HPLC charts were obtained by using a SHIMADZU HPLC system equipped with a UV-2075 spectrometer, PU-2080 pumps, a DG-2080-54 degasser, and an MX-2080-32 mixer (JASCO International, Co., Ltd., Tokyo, Japan), or a HITACHI HPLC system equipped with an L-4200 UV-vis detector, an L-6210 pump or L-6200/L-6000 pumps, and an ERC-3510 or L-5090 degasser (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan). Preparative HPLC were conducted by using a SHIMADZU HPLC system equipped with a UV-2075 spectrometer, PU-2086 pumps, a DG-2080-53 degasser, and an MX-2080-32 mixer (JASCO International, Co., Ltd.). LC/MS analysis was conducted by using a Agilent Technologies LC/MS (ESI-Q) system equipped with a 1260 Infinity High Performance Degasser, a Agilent 1260 Infinity Binary Pump, a 1260 Infinity Standard Autosampler, a 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment, a 1260 Infinity Variable Wavelength Detector, and an Agilent 6120 Single Quadrupole LC/MS (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, U. S. A.). MALDI-TOF MS was measured on a Shimadzu Biotech Axima-ToF2 TM spectrometer (Shimadzu, Co., Kyoto, Japan) using α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, U. S. A.) as a matrix. ESI-Q-MS spectra were measured on a Waters ZQ4000 (Waters, Co., Milford, MA, U. S. A.) spectrometer (for LRMS). NMR spectra were recorded on JEOL ECX500 (500 MHz for ^1H NMR) and JEOL ECS400 (400 MHz for ^1H NMR) spectrometers in the solvent indicated (JEOL, Ltd., Tokyo, Japan). Chemical shifts (δ) are given in ppm relative to residual solvent peak and coupling constants (J) are reported in Hz. Multiplicities are described by the following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet. Water was purified in advance using a Millipore Milli-Q water purification system (Merck KGaA, Co., Darmstadt, Germany) to obtain filtered deionized water and distilled water.

Materials

All protected amino acids were purchased from Watanabe Chemical Industries, Ltd. (Hiroshima, Japan) and Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japan). Fmoc-Ala-TrtA-PEG resin (100-200 mesh) was purchased from Watanabe chemical industries, Ltd. (Hiroshima, Japan). 1-Hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt \cdot H₂O), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) and *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) were obtained from Watanabe Chemical Industries, Ltd. Triisopropylsilane (TIS) were purchased from Sigma-Aldrich, Inc. Piperidine was purchased from Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan). Thioanisole was purchased from Fluka chemical corp. *m*-cresol was purchased from Tokyo chemical industry. Trifluoroacetic acid (TFA) was from Tokyo Chemical Industry, Co., Ltd. (Tokyo,

Japan). Tris (2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate [Ru(bpy)] was purchased from Fluka Tokyo chemical industry, Co., Ltd. Ammonium persulfate was purchased from Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan). *N,N*-Dimethylformamide (DMF), tetrahydrofuran (THF), Et₂O, CH₂Cl₂, and 1,2-dichloroethane, acetonitrile (MeCN) were obtained from Kanto Chemical Co., Inc. and Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), and used without further manipulation unless otherwise stated. *O*-Acyl isopeptide of Aβ1–42 or *O*-Acyl isopeptide of **6** was purchased from Peptide Institute, Inc. Other chemicals were purchased from the following commercial suppliers: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Nacalai Tesque, Inc., Kanto Chemical, Co., Inc., and Sigma-Aldrich, Inc. Flash column chromatography was performed using Kanto Chemical silica gel (spherical, 40–63 μm). Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck Kieselgel 60 F254 (0.25 mm) plates.

Analytical HPLC

Analytical HPLC was performed using a C18 reverse phase column (4.6 × 150 mm; YMC-Triart C18; YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan) with a linear gradient of 0–100% MeCN in 0.1% aqueous TFA over 25 min or 40 min at room temperature or 40 °C at a flow rate of 1 mL/min, detected at 230 nm. LC/MS grade solvents were used.

Preparative HPLC

Preparative HPLC was carried out using a C18 reverse phase column (10 × 250 mm; YMC-Triart C18; YMC Co., Ltd.) with a linear gradient of 0–100% MeCN in 0.1% aqueous TFA over 80 min at 40 °C at 3.5 mL/min, detected at 230 nm. LC/MS grade solvents were used.

LC/MS analysis

LC/MS analysis was performed using a C18 reverse phase column (2.0 × 50 mm; YMC-Triart C18; YMC Co., Ltd.) with a linear gradient of MeCN in 0.1% aqueous HCO₂H at 37 °C at a flow rate of 0.2 mL/min, detected at 230 nm. LC/MS grade solvents were used.

General protocol for solid phase peptide synthesis (SPPS)

Generally, the peptide chains were assembled by the sequential coupling of activated *N*α-Fmoc-amino acid (5 eq.) in DMF in the presence of DIC (5 eq.) and HOBt·H₂O (5 eq.) with a reaction time of 1 h or 2 h at room temperature. The resins were washed with DMF (× 5), and then *N*α-Fmoc deprotection was carried out by treatment with 20% piperidine/DMF (v/v) (1 min × 1 and 10 min × 1), followed by washing with DMF (× 10). The coupling and deprotection cycles were repeated. The peptide-resins were washed with MeOH (× 5) and dried for at least 2 h in vacuo. The peptides were cleaved from the resins with TFA in the presence of *m*-cresol, thioanisole and distilled water (92.5:2.5:2.5:2.5) for 90 min at room temperature, concentrated in vacuo, and precipitated with

Et₂O at 0 °C. The resulting precipitate was collected by filtration, dissolved with 0.1% aqueous TFA/MeCN (1:1), and lyophilized for at least 12 h to give the crude peptide. If necessary, the crude peptide was purified by preparative reverse phase HPLC with 0.1% aqueous TFA/MeCN system as an eluent, immediately frozen using liq. N₂, and lyophilized at least 1 d to afford the desired peptide.

Preparation of peptide stock solution

The powder of **3**, **10**, *O*-acyl isopeptide of **1**, *O*-acyl isopeptide of **5** or *O*-acyl isopeptide of **6** was dissolved in 0.1% aqueous TFA. These solutions were treated with an ultracentrifugation (100,000 rpm) at 4 °C for 3 h on an ultracentrifuge Optima™ TLX (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) with a rotor TLA100 or TLA120.2 (Beckman Coulter, Inc.). The upper three-quarters fraction of the solution was collected, and an absorbance at 280 nm was measured by UV spectrometer (UV-1800, SHIMADZU, Co., Ltd.), and the concentration was decided to obtain the following stock solutions: 120–200 μM of **10**, 200 μM of **3**, *O*-acyl isopeptide of **1**, **5** or **6**. Stock solutions of *O*-acyl isopeptide of Aβ1–42 in 0.1% aqueous TFA were prepared as described^[32]. These solutions were stocked at –80 °C until use.

Thioflavin-T (ThT) fluorescence assay

A stock solution of **3**, **10** or *O*-acyl isopeptide of **6** was thawed and diluted with an equal volume of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4), and additional phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) was added to obtain a solution of **2** (10 μM), a solution of **8** (10 μM), or **6** (10 μM), respectively. The prepared samples were incubated at 37 °C without agitation for the desired time periods (0, 1, 3, 6, 24 h). Aliquots (10 μL) of these samples were mixed with 3.7 μM ThT in 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 8.5) and the mixture was subjected to ThT fluorescence assay. The fluorescence was measured at an emission wavelength of 480 ± 10 nm and an excitation wavelength of 440 ± 5 nm. The fluorescence intensity was measured on a spectrofluorophotometer RF-5300PC (Shimadzu, Co.) using a rectangular quartz cell (3 mm pathlength).

Atomic Force Microscopy (AFM)

A stock solution of **3**, **10**, *O*-acyl isopeptide of **5** or *O*-acyl isopeptide of **6** was thawed and diluted with 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 0.1 M NaCl to obtain 10 μM of the **2**, **8**, **5** or **6** solution, respectively. The prepared samples were incubated at 37 °C for the desired time periods (0, 3, 24 h). Aliquots (10 μL) of these samples were spotted on freshly cleaved mica (Nilaco, Co., Tokyo, Japan), incubated at room temperature for 3 min, rinsed with 20 μL of filtered water for three times and dried in air. Samples were imaged by an intermittent contact mode in air at room temperature on a NanoWizard III (JPK instruments, AG, Berlin, Germany).

Circular dichroism (CD) spectroscopy

A stock solution of **3**, **10**, *O*-acyl isopeptide of **5** or *O*-acyl isopeptide of **6** (10 μ M) was prepared in the same way shown in the protocol of the ThT assay. The prepared samples were incubated at 37 $^{\circ}$ C for the desired time periods (0, 3, 6, 24 h). CD spectra were measured at room temperature on a stopped flow circular dichroism spectrometer Model 202SF (AVIV Biomedical, Inc., Lakewood, NJ) using a rectangular quartz cell (1 mm pathlength). Blank spectra were subtracted, respectively.

Size Exclusion Chromatography (SEC)

A stock solution of **10**, and *O*-acyl isopeptide of **6** (10 μ M) was prepared in the same way shown in the protocol of the ThT assay. The prepared samples were incubated at 37 $^{\circ}$ C for the desired time periods (0, 3 or 9 h), and an aliquot (100 μ L) of these samples were injected to SEC. SEC was performed on an ÄKTATM pure M1 system (GE Healthcare Japan, Co., Tokyo, Japan) using a SuperdexTM 75 10/300 GL (GE Healthcare Japan, Co.) column with an isocratic solvent system: phosphate buffer (pH 7.4) at a flow rate of 0.5 mL/min (column temperature: room temperature), detected at 230 nm.

Cell viability assay with PC12 cells

Rat pheochromocytoma PC12 cells (Riken BioResource Center, Ibaraki, Japan) were cultured on a collagen-I-coated 75 cm² vented flask (Becton, Dickinson and Co., Franklin, NJ) in 25 mM HEPES buffered Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies, Co., Carlsbad, CA) containing 5% (v/v) horse serum (HS) (Life Technologies, Co.) and 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, Co.) at 37 $^{\circ}$ C under 5% CO₂. For cell viability assays, the cells were seeded at a density of 8000 cells/100 μ L/well on a poly-D-lysine-coated 96-well plate (Becton, Dickinson and Co.) and incubated at 37 $^{\circ}$ C under 5% CO₂ for 3 days. After removal of the medium, the cells were washed with 150 μ L of serum-free 25 mM HEPES buffered DMEM, and incubated in 100 μ L of 25 mM HEPES buffered DMEM containing 0.1% (v/v) HS for 1 day. After removal of 50 μ L of the conditioned medium from the wells, an aliquot (50 μ L) of sample solutions (6 or 20 μ M of **2** ; 10 or 20 μ M of **6** ; 20 μ M of **8**) was added to the wells (final volume: 100 μ L, **2**: 3, 10 μ M, **6**: 5 or 10 μ M; 10 μ M of **8**), and incubated at 37 $^{\circ}$ C under 5% CO₂ for 3 d. Photography of cells was taken by the use of inverted microscope DMI6000 B (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Germany) equipped with a digital camera DFC360 FX (Leica Microsystems, GmbH). To each well, 10 μ L of a cell count reagent SF including WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) (Nacalai Tesque, Inc.) was added, and incubated at 37 $^{\circ}$ C under 5% CO₂ for 2-3 h. The absorption values at 450 nm (reference: 655 nm) were measured on a microplate reader iMarkTM (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

SDS-PAGE and silver stain of **1**, **2** or **6**

A stock solution of **3**, *O*-acyl isopeptide of **1** or *O*-acyl isopeptide of **6** was thawed and diluted with an equal volume of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4), and additional phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) was added to obtain 20 μ M of the peptide solution. The prepared sample was incubated at 37 °C for the desired time periods (0, 3, 24, 72 h). 5 μ L of sample were periodically crosslinked using the PICUP reaction [46]. Briefly, 0.8 μ L of 0.25 mM Tris (2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate [Ru(bpy)] was added to the sample followed by addition of 0.8 μ L of 5 mM ammonium persulfate in 10 mM phosphate buffer. The sample then was irradiated for 1 s with white visible light using a high-intensity illuminator (Valore, Kyoto, Japan). The reaction was quenched immediately with 0.8 μ L of 0.5 M DTT in water and 2 μ L of (5 \times) Tris-glycine SDS sample buffer (Invitrogen) to each sample. The mixture solution was analyzed on Novex® 15% Tris-glycine gel (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) with Tris-glycine SDS running buffer under non-reducing condition. Molecular weight was estimated with Precision Plus Protein Standards dual color (Bio-Rad, California, USA). The gel was silver-stained with Silver Xpress silver staining kit (Invitrogen, California, USA) according to a manufacture's protocol.

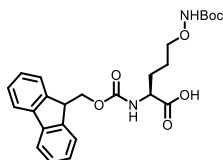
SDS-PAGE and Western Blotting of **1**, **8** or **6**

A stock solution of **10**, *O*-acyl isopeptide of **1** or *O*-acyl isopeptide of **6** was thawed and diluted with an equal volume of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4), and additional phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) was added to obtain 20 μ M of the peptide solution. The prepared sample was incubated at 37 °C for the desired time periods (0, 3, 24, 72 h). 5 μ L of sample were periodically crosslinked using the PICUP reaction [46]. Briefly, 0.8 μ L of 0.25 mM Tris (2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate [Ru(bpy)] was added to the sample followed by addition of 0.8 μ L of 5 mM ammonium persulfate in 10 mM phosphate buffer. The sample then was irradiated for 1 s with white visible light using a high-intensity illuminator (Valore, Kyoto, Japan). The reaction was quenched immediately with 0.8 μ L of 0.5 M DTT in water and 2 μ L of (5 \times) Tris-glycine SDS sample buffer (Invitrogen) to each sample. The mixture solution was analyzed on Novex® 15% Tris-glycine gel (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) with Tris-glycine SDS running buffer under non-reducing condition. Molecular weight was estimated with Precision Plus Protein Standards dual color (Bio-Rad, California, USA). Each sample of the gel were transferred onto a 0.20 μ m poly (vinylidene difluoride) (PVDF) membrane at 90 V for 60 min. The membrane was blocked with 10% non-fat skim milk in TBS-T [Tris buffered saline (TBS); 20 mM Tris and 150 mM NaCl (pH 7.4) with 0.05% (v/v) Tween 20] for 1 h at room temperature. After washing, the membrane was reacted with monoclonal mouse anti-A β antibody 6E10 (Covance, Princeton, NJ) at a 1:1000 dilution in TBS-T with 3% BSA for overnight at 4 °C. After washing, the membrane was incubated with the anti-mouse HRP conjugated antibody (GE Healthcare, U.K. Limited) at a 1:5000 dilution in TBS-T with 3% BSA for 1 h at room temperature.

After washing, the membrane was visualized by means of the Quant LAS 4000 Mini (GE Healthcare, Buckinghamshire, U.K.).

2. Synthesis and Characterization of Compounds

Synthesis of (S)-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-(((tert-butoxycarbonyl)amino)oxy) pentanoic acid (**11**)



This compound was synthesized following the literature procedure^[33] and characterized by comparison with reported spectroscopic data, respectively.

Synthesis of **10**

Fmoc-Ala-TrtA-PEG resin (500 mg) was taken to the manual solid phase reactor and **10** was synthesized by the general protocol of standard Fmoc-based SPPS, including coupling with Boc-Ser-OH instead of N α -Fmoc-amino acids. To construct *O*-acyl structure, the resin was washed with CH₂Cl₂ (\times 5) and then subjected to the coupling with Fmoc-Gly-OH (15.0 eq.) in the presence of DIC (15.0 eq.) and DMAP (0.2 eq.) in CH₂Cl₂ (2.0 mL) for overnight, twice. (When reagents did not dissolve completely, a few volume of DMF (about 10 drops) was added). After washing with CH₂Cl₂ (\times 5) and DMF (\times 5), the resin was subjected to general protocol of SPPS.

After Asp²³ had been incorporated into the chain (R-Fmoc group remaining on Asp²³), The Alloc and allyl protecting groups were removed by shaking the resin with Pd(PPh₃)₄ (23.1 mg, 0.020 mmol) and PhSiH₃ (0.147 mL, 1.2 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) under nitrogen atmosphere for overnight. After washing with CH₂Cl₂ (\times 10) and DMF (\times 10), the cyclization step was carried out using *N*-methyl morpholine (54.9 μ L, 0.500 mmol), HATU (190 mg, 0.500 mmol), and HOAt (13.6 mg, 0.100 mmol) in DMF (4 mL). After shaking overnight, the resin was subjected to general protocol of SPPS (removal of resin and protecting groups, and purification by preparative reverse-phase HPLC, sequentially) to obtain **10** (2.31 mg, 1.3% from the loading value in SPPS) as a white amorphous.

10: MALDI-MS (TOF): *m/z* calcd for C₂₀₃H₃₀₉N₅₅O₆₀S [M+H]⁺ 4513.0, found 4512.9. Retention time: 20.9 min. Purity > 95% (based on HPLC analysis at 230 nm with a linear gradient of 0–100% MeCN in 0.1% aqueous TFA over 25 min).

Synthesis of **3**

Fmoc-Ala-TrtA-PEG resin (500 mg) was taken to the manual solid phase reactor and oxime was

synthesized by the general protocol of standard Fmoc-based SPPS, including coupling with Boc-Ser-OH instead of N α -Fmoc-amino acids, with Fmoc-Dap{(t-Bu)Ser-Boc}-OH instead of Fmoc-Asp²³-OH, with **11** instead of Fmoc-Lys²⁸-OH. To construct *O*-acyl structure, the resin was washed with CH₂Cl₂ (\times 5) and then subjected to the coupling with Fmoc-Gly-OH (15.0 eq.) in the presence of DIC (15.0 eq.) and DMAP (0.2 eq.) in CH₂Cl₂ (2.0 mL) for overnight, twice. (When reagents did not dissolve completely, a few volume of DMF (about 10 drops) was added). After washing with CH₂Cl₂ (\times 5) and DMF (\times 5), the resin was subjected to general protocol of SPPS (removal of resin and protecting groups, and purification by preparative reverse-phase HPLC, sequentially) to obtain **4** (2.24 mg, 0.89% from the loading value in SPPS) as a white amorphous.

4 (2.24 mg, 0.488 μ mol) in MeCN/0.1% aqueous TFA (1:1, 4.8 mL) was treated with NaIO₄ (0.31 mg, 1.46 μ mol) for over night at room temperature. The reaction mixture was lyophilized at least 1 d to afford the crude peptide then purification by preparative reverse-phase HPLC to obtain **3** (0.51 mg, 23%) as a white amorphous.

3: MALDI-MS (TOF): m/z calcd for C₂₀₃H₃₁₀N₅₆O₆₂S [M+H]⁺ 4542.1, found 4541.9. Retention time: 20.8 min. Purity > 95% (based on HPLC analysis at 230 nm with a linear gradient of 0–100% MeCN in 0.1% aqueous TFA over 25 min).

Synthesis of *O*-acyl isopeptide of **5**

Fmoc-Ala-TrtA-PEG resin (500 mg) was taken to the manual solid phase reactor and oxime was synthesized by the general protocol of standard Fmoc-based SPPS, including coupling with Boc-Ser-OH instead of N α -Fmoc-amino acids, with Fmoc-Dap{(t-Bu)Ser-Boc}-OH instead of Fmoc-Gln¹⁵-OH, with **11** instead of Fmoc-Gly³⁷-OH. To construct *O*-acyl structure, the resin was washed with CH₂Cl₂ (\times 5) and then subjected to the coupling with Fmoc-Gly-OH (15.0 eq.) in the presence of DIC (15.0 eq.) and DMAP (0.2 eq.) in CH₂Cl₂ (2.0 mL) for overnight, twice. (When reagents did not dissolve completely, a few volume of DMF (about 10 drops) was added). After washing with CH₂Cl₂ (\times 5) and DMF (\times 5), the resin was subjected to general protocol of SPPS (removal of resin and protecting groups, and purification by preparative reverse-phase HPLC, sequentially) to obtain amino alcohol (2.67 mg, 1.2% from the loading value in SPPS) as a white amorphous.

Amino alcohol (2.67 mg, 0.574 μ mol) in MeCN/0.1% aqueous TFA (1:1, 5.7 mL) was treated with NaIO₄ (0.147 mg, 0.689 μ mol) for over night at room temperature. The reaction mixture was lyophilized at least 1 d to afford the crude peptide then purification by preparative reverse-phase HPLC to *O*-acyl isopeptide of **5** (0.52 mg, 19%) as a white amorphous.

O-acyl isopeptide of **5**: MALDI-MS (TOF): m/z calcd for C₂₀₆H₃₁₁N₅₆O₆₃S [M+H]⁺ 4599.1, found 4599.9. Retention time: 21.5 min. Purity > 95% (based on HPLC analysis at 230 nm with a linear

gradient of 0–100% MeCN in 0.1% aqueous TFA over 25 min).

Oxime exchange reaction of **2** to convert to **7**

3 in 0.1% aqueous TFA was diluted with 0.1 M phosphate buffer (final **3**: 0.1 mM) and the solution was incubated for 1 h at room temperature. To the solution, MeONH₂ hydrochloride in water was added to the final concentration of 0.3 mM, 1 mM, or 10 mM, and hydrogen chloride was added to adjust pH 4. The solution was incubated at room temperature for 24 h. As a control experiment, MeNH₂ hydrochloride was used instead of MeONH₂. For AFM analysis, HEPES buffer containing 0.1 M NaCl was used instead of phosphate buffer. MALDI-MS (TOF): see Figure 1-31, 1-32.

Removal of methoxyamine

A stock solution of **3** was thawed and diluted with 6 M GnHCl/0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) to obtain 100 μM of the solution. The prepared samples were incubated at room temperature for 1 h, then NH₂OMe hydrochloride in MilliQ (100 mM) was added to this solution to adjust pH (pH 4), and then incubated at room temperature for 16 h. After reaction, the reaction mixture was ultrafiltrated by centrifuge 5424R (Eppendorf Japan, Tokyo, Japan) with 6 M GnHCl/0.1 M phosphate buffer. TFA was added to the solution to adjust 1% v/v, the solution was incubated at room temperature for 16 h.

Oxime closed reaction

A stock solution of **3** was thawed and diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) to obtain 100 μM of the solution. The prepared samples were incubated at room temperature for 1 h, NH₂OMe hydrochloride in MilliQ (100 mM) was added to this solution, to appropriate pH (pH 4), and then incubated at room temperature for 24 h. After reaction, the reaction mixture was injected to analytical reverse-phase HPLC and the fraction was collected to obtain **7**, and was lyophilized at least 1 d as a white amorphous. The amorphous of **7** was dissolved in 100 μL of 1% aqueous TFA and the solution was incubated at room temperature for 16 h.

References

- [1] Holtzman, D. M.; Morris, J. C.; Goate, A. M. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 77sr1.
- [2] Brookmeyer, R.; Johnson, E.; Ziegler-Graham, K.; Arrighi, H. M. *Alzheimer's & Dementia* **2007**, *3*, 186–191.
- [3] (a) Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* **2002**, *297*, 353–356; (b) Cras, P.; Kawai, M.; Lowery, D. D.; Gonzalez-Dewhit, P.; Greenberg, B.; Perry, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7552–7556.
- [4] (a) Petkova, A. T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16742–16747; (b) Lührs, T.; Ritter, C.; Adrian, M.; Riek-Loher, D.; Bohrmann, B.; Döbeli, H. Schubert, D. Riek, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *99*, 17342–17347.
- [5] Selkoe, D. J. *Behav. Brain Res.* **2008**, *192*, 106–113.
- [6] Chimon, S.; Shaibat, M. A.; Jones, C. R.; Calero, D. C.; Aizezi, B.; Ishii, Y. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1157–1164.
- [7] (a) Iwatsubo, T.; Odaka, A.; Suzuki, N.; Mizusawa, H.; Nukina, N.; Ihara, Y. *Neuron* **1994**, *13*, 45–53; (b) Younkin, S. G. *Ann. Neurol.* **1995**, *37*, 287–288.
- [8] Selkoe, D. J. *Science* **2002**, *298*, 789–791.
- [9] Balducci, C.; Beeg, M.; Stravalaci, M.; Bastone, A.; Scip, A.; Biasini, E.; Tapella, L.; Colombo, L.; Manzoni, C.; Borsello, T.; Chiesa, R.; Gobbi, M.; Salmona, M.; Forloni, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 2295–2300.
- [10] (a) Yu, L.; Edalji, R.; Harlan, J. E.; Holzman, T. F.; Lopez, A. P.; Labkovsky, B.; Hillen, H.; Barghorn, S.; Ebert, U.; Richardson, P. L.; Miesbauer, L.; Solomon, L.; Bartley, D.; Walter, K.; Johnson, R. W.; Hajduk, P. J.; Olejniczak, E. T. *Biochemistry*, **2009**, *48*, 1870–1877; (b) Ono, K.; Condrón, M. M.; Teplow, D. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2009**, *106*, 14745–14750; (c) Sandberg, A.; Luheshi, L. M.; Söllvander, S.; Barros, T. P.; Macao, B.; Knowles, T. P. J.; Biverstål, H.; Lendel, C.; Ekholm-Pettersson, F.; Dubnovitsky, A.; Lannfelt, L.; Dobson, C. M.; Härd, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2010**, *107*, 15595–15600; (d) Yamin, G.; Huynh, T.-P. V.; Teplow, D. B. *Biochemistry* **2015**, *54*, 5315–5321; (e) Murakami, K.; Suzuki, T.; Hanaki, M.; Monobe, Y.; Akagi, K.; Irie, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *466*, 463–467; (f) Kreutzer, A. G.; Yoo, S.; Spencer, R. K.; Nowick, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 966–975.
- [11] Met (O) isoform of A β is naturally-occurring species in Alzheimer's disease patient; see: Hou, L.; Kang, I.; Marchant, R. E.; Zagorski, M. G. *J. Biol. Chem.* **2002**, *27*, 40173–40176.
- [12] Lu, J.-X.; Qiang, W.; Yau, W.-M.; Schwieters, C. D.; Meredith, S. C.; Tycko, R. *Cell* **2013**, *154*, 1257–1268.
- [13] (a) Parthasarathy, S.; Inoue, M.; Xiao, Y.; Matsumura, Y.; Nabeshima, Y.; Hoshi, M.; Ishii, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6480–6483; (b) Lendel, C.; Bjerring, M.; Dubnovitsky, A.; Kelly, R. T.;

- Filippov, A.; Antzutkin, O. N.; Nielsen, N. C.; Härd, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12756–12760.
- [14] Gremer, L.; Schölzel, D.; Schenk, C.; Reinartz, E.; Labahn, J.; Ravelli, R. B. G.; Tusche, M.; Lopez-Iglesias, C.; Hoyer, W.; Heise, H.; Willbold, D.; Schröder, G. F. *Science* **2017**, *358*, 116–119.
- [15] Xiao, Y.; Ma, B.; McElheny, D.; Parthasarathy, S.; Long, F.; Hoshi, M.; Nussinov, R.; Ishi, Y. *Nature Structural & Molecular Biology* **2015**, *22*, 499–505.
- [16] Roy, N.; Bruchmann, B.; Lehn, J.-M. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3786–3807.
- [17] (a) Cantrill, J. J.; Rowan, S. J.; Stoddart, J. F. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1363–1366; (b) Kidd, T. J.; Leigh, D. A.; Wilson, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1599; (c) Glink, P. T.; Oliva, A. I.; Stoddart, J. F.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1870–1875; (d) Rowan, S. J.; Stoddart, J. F. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1913–1916.
- [18] Rowan, S. J.; Cantrill, S. J.; Cousins, G. R. L.; Sanders, J. K. M.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 898–952.
- [19] (a) Oh, K.; Jeong, K. S.; Moore, J. S. *Nature* **2001**, *414*, 889; (b) 高田十志和, 大塚英幸, 有機合成化学協会誌, **2006**, *64* (39), 194–207.
- [20] (a) Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J. L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652–3711; (b) Haney, C. M.; Loch, M. T.; Horne, W. S. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10915–10917.
- [21] Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5965–5968.
- [22] Lelievre, D.; Bure, C.; Laot, F.; Delmas, A. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 235–238; (b) Pallin, T. D.; Tam, J. P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2021–2022.
- [23] Haney, C. M.; Loch, M. T.; Horne, W. S. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10915–10917.
- [24] Ahmed, M.; Davis, J.; Aucoin, D.; Sato, T.; Ahuja, S.; Aimoto, S.; Elliott, J. I.; Nostrand, W. E. V.; Smith, S. O. *Nature Structural & Molecular Biology* **2010**, *17*(5), 561–568.
- [25] Particles with 2-to-4 nanometer z-height are typically observed in oligomer states. See: Stine, W. B. J.; Dahlgren, K. N.; Krafft, G. A.; LaDu, M. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11612–11622.
- [26] (a) Roychaudhuri, R.; Lomakin, A.; Bernstein, S.; Zheng, X.; Condrón, M. M.; Benedek, G. B.; Bowers, M.; Teplow, D. B. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 2422–2441; (b) Bitan, G.; Lomakin, A.; Teplow, D. B. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35176–35184.
- [27] Bitan, G.; Teplow, D. B. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37* (6), 357–364.
- [28] In the case of **6**, the difference in the incubation time (t) required for the emergence of the large aggregates between AFM ($t = 24$ h, Figure 1-18) and SDS-PAGE ($t = 72$ h, Figure 1-18) experiments should be within the range of error. The large aggregates of **4** emerged at $t = 24$ h in a different batch of SDS-PAGE experiment.
- [29] (a) Stroud, J. C.; Liu, C.; Teng, P. K.; Eisenberg, D. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **2012**, *109*, 7717–7722; (b) Walsh, D. M.; Hartley, D. M.; Kusumoto, Y.; Fezoui, Y.; Condrón, M. M.; Lomakin,

- A.; Benedek, G. B.; Selkoe, D. J.; Teplow, D. B. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25945–25952; (c) LeVine III, H. *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 274–284.
- [30] (a) Ryan, D. A.; Narrow, W. C.; Federoff, H. J.; Bowers, W. J.; Neurosci., *J. Methods* **2010**, *190*, 171–179; (b) Arosio, P.; Cukalevski, R.; Frohm, B.; Knowles, T. P. J.; Linse, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 219–225.
- [31] Sciarretta, K. L.; Gordon, D. J.; Petkova, A. T.; Tycko, R.; R.; Meredith, S. C. *Biochemistry* **2005**, *44*, 6003–6014.
- [32] Seo, S. and Lim, D. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 906–909.
- [33] Jan, A.; Adolfsson, O.; Allaman, I.; Buccarello, A-L.; Magistretti, P. J.; Pfeifer, A.; Muhs, A.; Lashuel, H. A. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 8585–8596.
- [34] Taniguchi, A.; Sasaki, D.; Shiohara, A.; Iwatsubo, T.; Tomita, T.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1382–1385.
- [35] Liu, F.; Thomas, J.; Burke Jr., T. R. *Synthesis* **2008**, *15*, 2432–2438.
- [36] Kent, S. B. H. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 338-351.

総括

本研究では、 $A\beta$ の毒性本体と考えられている $A\beta_{42}$ オリゴマーの性質解析を目的とし、 $A\beta_{42}$ の化学修飾による安定オリゴマーの設計・合成に取り組んだ。 $A\beta$ オリゴマーの安定化戦略として、 $A\beta$ ペプチド鎖の安定化に寄与していると考えられている Asp^{23} と Lys^{28} の塩橋構造を利用し、それぞれの側鎖を共有結合で環化させることを計画した。さらに、共有結合としてオキシム構造を選択することにより、オキシム結合の切断・結合によるオリゴマー・線維の変換が可能になる $A\beta_{42}$ 誘導体の合成を行った。

第1章では、 $A\beta_{42}$ の Asp^{23} と Lys^{28} の側鎖を可逆的な共有結合であるオキシム結合で環化した誘導体の設計、合成、性質評価を検討した。その結果、オキシム誘導体は線維形成をしないオリゴマー化学種を与えることが分かった。また、そのオリゴマーはアミロイド特有のクロス β -シート構造を形成し、神経毒性を有することが分かった。さらに、オキシム結合の切断によるオリゴマー・線維の変換を検討したところ、オキシムリンカーを維持する誘導体ではオリゴマーとして存在し、オキシムリンカーを切断するとオリゴマーから線維へと変化することが判明した。また、オキシムリンカーが切断された誘導体は平衡状態の変化により、元のオキシムリンカーで結合した誘導体に戻ることが示され、リンカーのオキシム結合が可逆性を有することを見出した。

第2章では、 $A\beta_{42}$ の Asp^{23} と Lys^{28} の側鎖を不可逆的な共有結合であるラクタム結合で環化した誘導体の設計、合成、性質評価を検討した。その結果、ラクタム誘導体は高分子量オリゴマーおよびプロトフィブリルを形成し、線維化に至らない化学種を与えることが分かった。また、そのオリゴマーはアミロイド特有のクロス β -シート構造を維持し、神経毒性を有することが分かった。オキシムリンカーを有する $A\beta_{42}$ 誘導体の結果と合わせて考えると、 $A\beta_{42}$ の Asp^{23} と Lys^{28} の塩橋構造はオリゴマー化を促進するものであり、線維化を促進する $A\beta_{40}$ に観察される塩橋構造とは性質が異なることが示唆された。また、ラクタムリンカーを有する $A\beta_{42}$ 誘導体が高分子量オリゴマーおよびプロトフィブリルで安定化したという点は、 $A\beta_{40}$ ラクタム誘導体が線維化を促進するという点と比較して、 $A\beta_{42}$ の神経毒性が $A\beta_{40}$ より高いことを裏付ける結果を示唆していると考えられる。

本研究では、全長 $A\beta_{42}$ の化学修飾により、オリゴマーから線維へ変換可能な安定オリゴマーの取得に成功した。本研究で検討した $A\beta$ オリゴマーの安定化の手法は、今後の $A\beta_{42}$ オリゴマーの性質解析、さらには毒性本体の性質解析および構造解析に有用な知見であると考えられる。

以上のように、本研究では $A\beta_{42}$ の側鎖を環化させることにより、安定オリゴマーの取得に成功し、その性質解析を可能にした。本研究により得られた知見がネイティブ $A\beta$ オリゴマーの性質解析につながり、 $A\beta$ さらにはアミロイドが関与する病態の発症機構の解明やAD治療薬の開発に貢献できれば幸いである。

謝辞

本研究を行う機会を与えていただき、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科教授 金井求先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤な直接のご指導、ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科 JST-ERATO 金井触媒分子生命プロジェクトグループリーダー（講師相当）相馬洋平先生に深く感謝いたします。

大学への留学の機会を与えていただきました、元・東レ株式会社 医薬研究所 伊関克彦所長（現・東レ株式会社 技術センター）、東レ株式会社 医薬研究所 創薬化学研究室 河合孝治室長、元・東レ株式会社 医薬研究所 創薬化学研究室 青木拓実主任研究員、東レ株式会社 医薬研究所 創薬化学研究室 盛田康弘主任研究員に深く感謝いたします。また、留学中に様々な形でお世話になりました、東レ株式会社医薬研究所の皆様に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者であります、元・JST-ERATO 金井触媒分子生命プロジェクト研究推進主任 佐々木大輔博士（現・東京医科歯科大学高等研究院卓越研究部門細胞構造生理学研究室プロジェクト助教）、元・東京大学大学院薬学系研究科 篠田清道博士（現・中外製薬株式会社）、元・同プロジェクト特任研究員 Jizhi Ni 博士に深く感謝いたします。

折に触れ有益なご助言をいただきました、元・東京大学大学院薬学系研究科准教授 松永茂樹先生（現・北海道大学大学院薬学研究院教授）、元・JST-ERATO 金井触媒生命分子プロジェクトグループリーダー（准教授相当） 國信洋一郎先生（現・九州大学大学院総合理工学府教授）、同研究科講師 生長幸之助先生、同研究科特任講師 川島茂裕先生、同研究科助教 山次健三先生、元・同研究科助教 清水洋平先生（現・北海道大学大学院理学研究院講師）に深く感謝いたします。

公私にわたり御厚情賜りました、JST-ERATO 金井触媒生命分子プロジェクト 医薬機能グループの皆様をはじめ、東京大学大学院薬学系研究科有機合成化学教室、並びに同プロジェクトの皆様にご深く感謝いたします。特に、元・同プロジェクト特任研究員 谷口敦彦博士（現・東京薬科大学薬学部講師）には、日頃の実験手技・研究姿勢などの御指導ならびにディスカッションをしていただきました。深く感謝いたします。

最後に、私の研究生生活を常に応援し、支えて下さいました、私の家族、友人に深く感謝いたします。