

## 論文の内容の要旨

論文題目 全長アミロイドβオリゴマーの物性改善を指向した化学選択的修飾法の開発

氏名 阿部 純平

**【背景・目的】**アルツハイマー病は高齢者に多く発症し、世界的な高齢化傾向も相まって2050年には患者数が約7000万人に達するとされている。しかしながら現在のところその根治法は開発されていない。アルツハイマー病はアミロイドβペプチド(Aβ)が脳内に凝集して発症すると想定されるため、Aβ凝集阻害剤は治療薬・予防薬として有望視される[a]。合理的な凝集阻害剤の設計・開発には、標的タンパク質であるAβの原子レベルの三次元構造情報が必要になるが、Aβは高い凝集性から動的に不安定な凝集体を形成するため、その溶液NMR解析・X線結晶構造解析は困難を極める。そこで私はAβの構造情報獲得につながるような低凝集性Aβ誘導体の創成を目的とし、Aβの化学選択的修飾法の開発と、その化学修飾型全長Aβの物性(凝集性・会合状態・二次構造)の評価に着手した。

**【方法】**Aβの凝集性と低溶解度は一次配列の中央部(Aβ(17-21), LVFFA)とC末端部(Aβ(30-42))の疎水性による影響が大きい(図1)。タンパク質結晶化には一般的に高い濃度(5~20 mg/mL)が必要だが、全長Aβは水にわずかししか溶けない(0.14mg/mL, TFA塩)ため、これが結晶化による構造解析を阻む一因となっている。

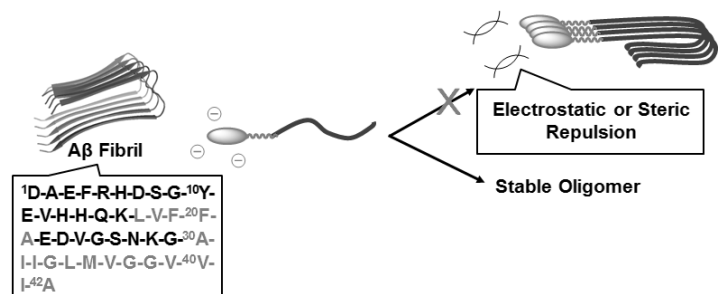


図1. Aβの一次配列と末端修飾の戦略概要図

そこで私はAβに親水性基を導入し、水溶性の向上と最終凝集体(線維)の形成を抑制することを計画した。また、導入する親水性基に立体

障害や静電反発を持たせることで、構造解析に適したサイズのオリゴマーを安定化させることも視野に入れることができる。親水性基導入部位としてはAβの末端を選択した。Aβのアミノ酸配列に手を加えないことで、なるべくネイティブの全長Aβに近い構造情報の取得を意図している(図1)。

本研究では生理的条件下でのAβの構造解明を目標としているため、pH 7.4でAβ修飾体を評価する必要がある。Aβなどのいくつかの凝集性タンパク質は等電点で最も溶解性が下がり、最も凝集性が上がるとされている[b]。Aβの等電点はおよそ5であるため、酸性基を導入して等電点を酸性側に偏らせるとpH 7.4におけるAβの水溶性の向上と凝集性の低下を狙えると考えた(図2)。

Aβをそのまま修飾しようとする、高すぎる凝集性が固相合成・化学修飾過程の両方で数々の問題を引き起こす。これを回避するため、私は26-O-アシルイソAβ(以下、isoAβ)[c]を修飾対象として用いることにした(図3)。これはpH 7.4にすることでネイティブAβに変換できる低凝集性の前駆体であるため、上述の戦略の実現に適していると考えた。

Aβを化学修飾するためには高い化学選択性と温和な反応条件が必要になる。その中で私は当研究室で開発された2つの反応を検討した。1つ目は酸化的ニトロソカップリング反応[d, e]、2つ目はTrp修飾反応[f]である(図4)。どちらもAβには存在しない構造を標的とするため、Aβ配列への影響を最小限にした化学選択的変換を実現できると考えた。種々条件検討の

ち有望な結果が得られた2つ目のTrp修飾反応の結果について、本要旨・研究業績発表会では主に紹介する。

**【結果・考察】** 私はN末端、C末端にTrp残基を結合させたisoAβ鎖(Ac-isoAβ(1-42)-Trp-OH、Ac-Trp-isoAβ(1-42)-OH)を基質とし、keto-ABNOを用いたTrp選択的な化学修飾反応を行った。その結果、C末端、N末端ともに良好に反応が進行することがわかった。そこで親水性基としてpeg鎖を有するpeg-ABNOと、上述の等電点の戦略に乗っ取ったトリカルボン酸を有するTriCOOH-ABNOを合成し、Trp結合型isoAβ鎖で反応を行った。図5にpeg-ABNO、TriCOOH-ABNOの合成スキームを載せる。

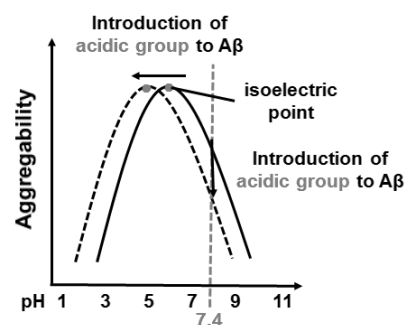


図2. 等電点と凝集性の関係

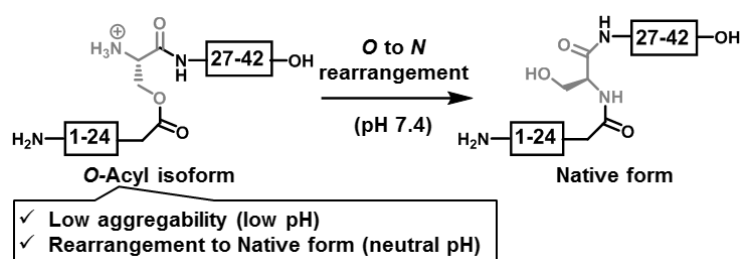
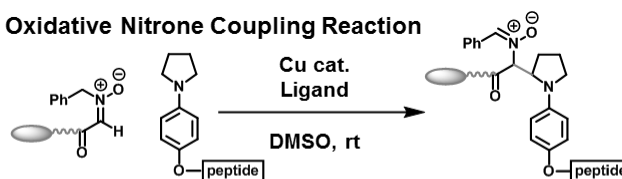


図3. 26-O-Acyl isoAβ

1. Oxidative Nitroso Coupling Reaction



2. Trp Modification Reaction

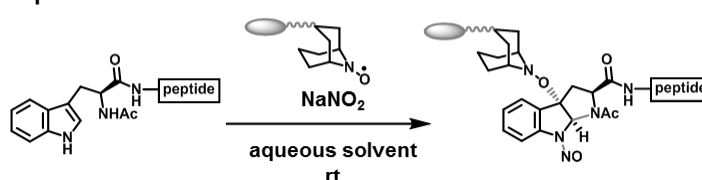


図4. 検討した化学修飾反応 {peg-ABNO (up), TriCOOH-ABNO (down)}

C 末修飾体では TriCOOH-ABNO-isoAβ 修飾体 (c-TriCOOH-isoAβ) が HPLC 上でブロードピークとなり精製困難となった。これは HPLC 溶

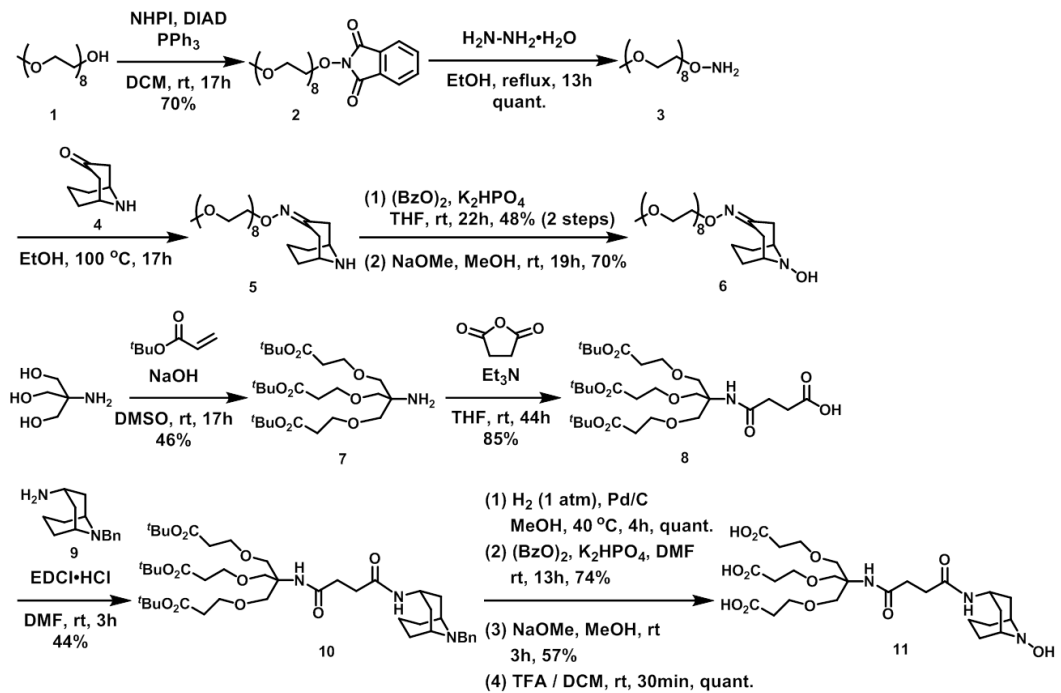


図 5. keto-ABNO 誘導体の合成法 {peg-ABNO (6) (up), TriCOOH-ABNO (11) (down)}

媒条件として 0.1%TFA 水溶液を使用していたため、TriCOOH のカルボン酸が脱プロトン化せず、疎水性部位として働いたためだと考えている (pH 7.4 以上の条件では使用している isoAβ が転位してしまうため検討は行っていない)。そこで HPLC で比較的きれいなピークが得られた c-peg-isoAβ を分析 HPLC で精製したものの、アッセイ用溶媒に溶けず、物性評価を行うことができなかった。一方の N 末修飾体では、n-TriCOOH-isoAβ を HPLC できれいなピークとして得ることができ、その後の精製も行えた (図 6)。図 7 に凝集性、会合状態、二次構造の結果を示す。凝集性はチオフラビン T アッセイ、会合状態はサイズ排除型クロマトグラフィー、二次構造は CD により評価を行った。チオフラビン T アッセイの結果、n-TriCOOH-Aβ が最も低い凝集性を示した (isoAβ → Aβ 転位はアッセイ用溶媒中で行っている)。サイズ排除型クロマトグラフィーでは、6 時間経過時点でネイティブ Aβ は完全に凝集してしまう一方、Ac-Trp-Aβ は高分子量オリゴマー (HMW) が優位に観測された。一方で n-TriCOOH-Aβ は長時間にわたり安定な低分子量オリゴマー (LMW) を形成することがわかった。また、Aβ はクロス β シート構造を形成して凝集することが知られているが、n-TriCOOH-Aβ においても β シートを形成することが CD 解析からわかり、n-TriCOOH-Aβ の低凝集性が二次構造の変化によらないのだとわかった。

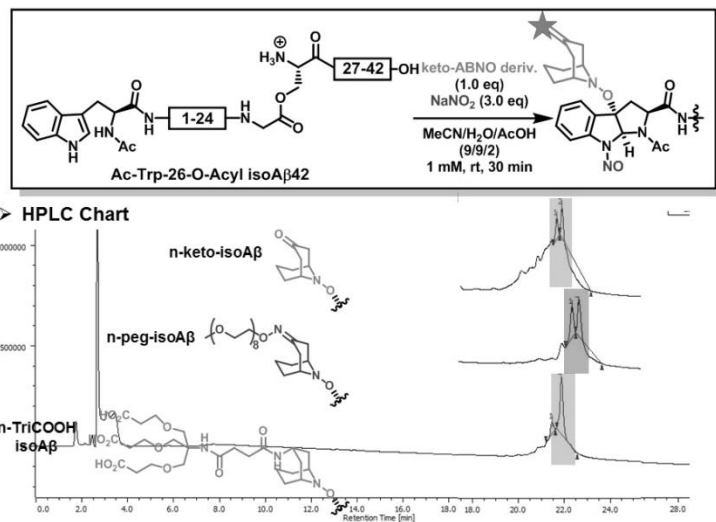


図 6. Aβ の N 末端修飾体の HPLC チャート

Figure 6 shows the HPLC chart for the N-terminal modification of Aβ. The chart displays intensity versus retention time, with peaks corresponding to n-keto-isoAβ, n-peg-isoAβ, and n-TriCOOH-isoAβ. Chemical structures are shown for each peak.

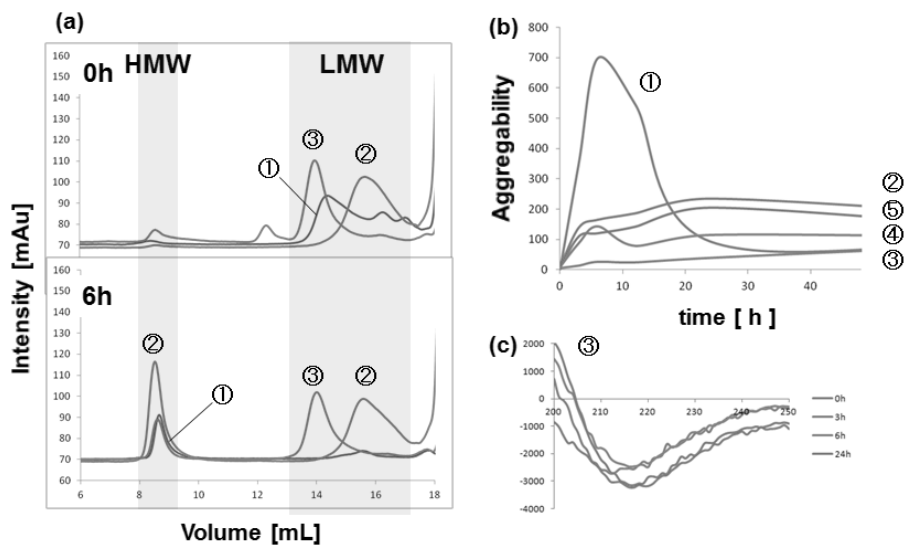


図 7. *N*末端修飾体のアッセイ結果

(a) サイズ排除型クロマトグラフィー、(b) チオフラビン T アッセイ、(c) CD

①Aβ、②Ac-Trp- Aβ、③n-TriCOOH- Aβ、④n-keto- Aβ、⑤n-peg- Aβ

**【結論】** 当研究室で開発したTrp修飾反応により、全長Aβ鎖の*N*末端・*C*末端に対する親水性基の導入を達成した。Aβの等電点に着目し、*N*末端にカルボン酸型親水基を導入することで、低凝集性Aβ修飾体を得ることができた。今後は本化学修飾型Aβの凝集性低下の要因の追及、毒性試験、結晶化検討に取り組む予定である。

#### 【参考文献】

(a) I. W. Hamley, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5147. (b) M. Guoa, P. M. Gormana, M. Ricob, A. Chakrabarttya, D.V. Laurentsb, *FEBS Letters*, **2005**, *579*, 3574. (c) Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5965. (d) S. Hashizume, K. Oisaki, M. Kanai, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4288. (e) S. Hashizume, K. Oisaki, M. Kanai, *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 2600. (f) Y. Seki, T. Ishiyama, D. Sasaki, J. Abe, Y. Sohma, K. Oisaki, M. Kanai, *JACS*, **2016**, *138*, 10798.