

審査の結果の要旨

氏名 阿部 純平

阿部 純平 は、「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」というタイトルで、以下の研究を行った。

アルツハイマー病は根治療法が存在せず世界的に対策の望まれる典型的なアンメットメディカルニーズである。本疾病はアミロイド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。合理的な凝集阻害剤の設計・開発には、Aβ毒性本体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。阿部は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)の評価を行なった。

Aβの凝集性と低溶解度は一次配列中央部とC末端部の疎水性残基による影響が大きい。そこで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られる。

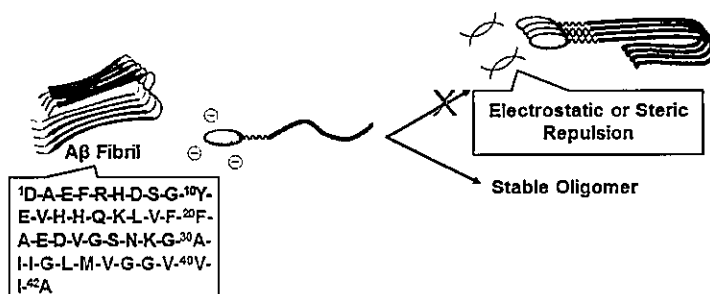


図1. Aβの一次配列と末端修飾の戦略概要図

のオリゴマーを安定化させることも視野に入れられる。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鎖に近い構造情報の取得を意図した。また、いくつかの凝集性タンパク質は等電点で最も凝集性が上がることが知られている。Aβの等電点はおよそ5であるため、酸性基(アニオン部位)を導入して等電点を酸性側に偏らせると、生理条件下(pH 7.4)におけるAβの水溶性向上・凝集性低下を狙えると考えた(図1)。

修飾標的としては当研究室所属の相馬洋平博士によって開発された、pH 7.4に伏すとネイティブAβに変換される低凝集性Aβ前駆体・26-O-アシルイソAβ(isoAβ)を用いることとした(Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Tetrahedron Lett.* 2004, 45, 5965.)。化学反応としては当研究室で開発されたトリプトファン(Trp)選択的タンパク質修飾反応(Y. Seki, T. Ishiyama, D. Sasaki, J. Abe, Y. Sohma, K. Oisaki, M. Kanai, *JACS*, 2016, 138, 10798.)を活用することとした。Trp残基はAβ一次配列に存在しないため、Aβ主鎖

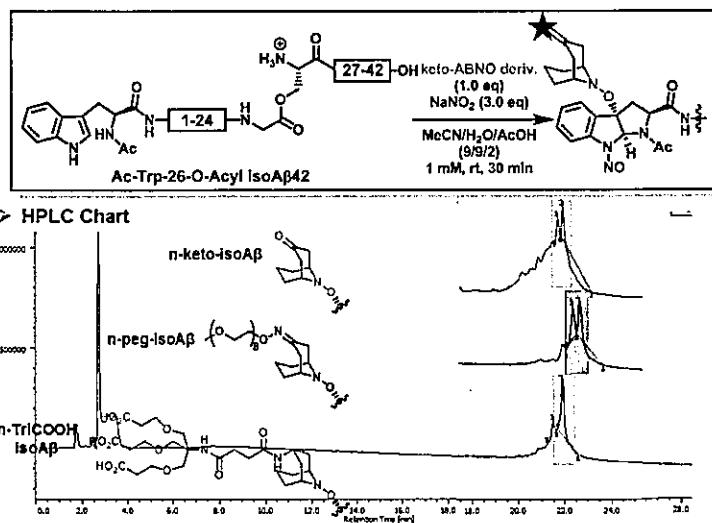


図2. isoAβの化学修飾反応とHPLCチャート

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ためである。

親水性基として peg 鎖を備える peg-ABNO と、上述の等電点戦略を踏まえトリカルボン酸を備えた TriCOOH-ABNO を合成し、Trp 結合型 isoAβ 鎖 (N 末端、C 末端それぞれに Trp を付与している) で反応を行った。C 末修飾では isoAβ 修飾体が HPLC 上でブロードピークとなり精製困難であるか、

溶解度が低いかのいずれかであり、後続のアッセイに用いることは困難であった。一方の N 末修飾ではそれぞれの官能基を備えた n-peg-isoAβ, n-TriCOOH-isoAβ を HPLC で良好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 2)。

各 N 末修飾サンプルにお

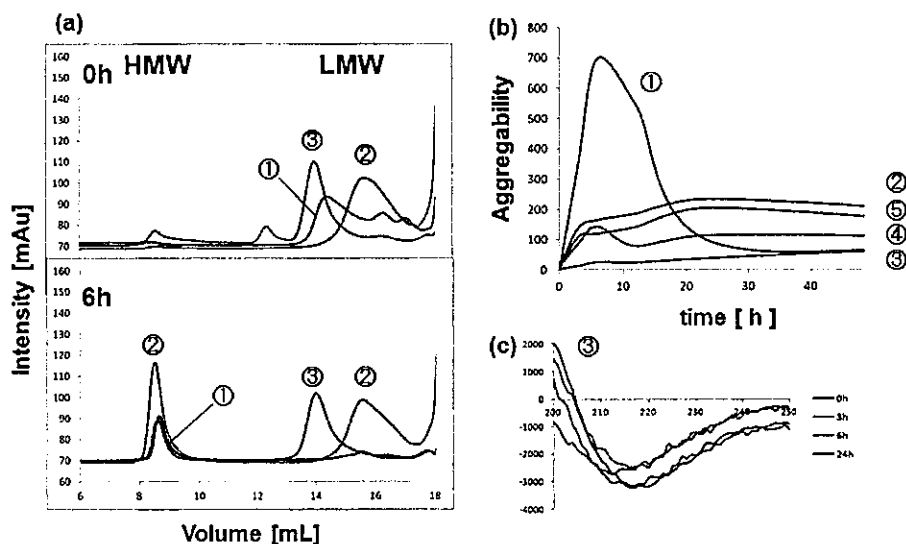


図 3. N 末端修飾体のアッセイ結果

(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

ける凝集性確認 (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。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、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ものだとわかった。また凝集体に由来する細胞毒性も確認できており、本サンプルを用いた構造解析研究が、Aβ の毒性本体構造を反映した構造取得につながる可能性が示唆される。

このように阿部は、当研究室で開発した Trp 修飾反応を用いることで、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、結晶化検討に取り組む予定である。

以上の業績は、難治性疾患であるアルツハイマー型認知症への創薬化学の進歩に不可欠となる科学的知見を、有機合成化学の立場から提供しうる成果と言える。博士 (薬科学) の学位論文として合格と認められる。