

アミロイドベータペプチドおよびアミリンの凝集機構解明を目指した *O*-アシルイソペプチドの利用

京都薬科大学 ○相馬洋平, Hui Wang, 山崎 萌, 平山雄太, 谷口敦彦, 川島浩之, 比嘉彩乃, 吉矢 拓, 向井秀仁, 木曾良明

「*O*-アシルイソペプチド法」は、セリンまたはスレオニン残基のβ-ヒドロキシル基においてネイティブのアミド結合をエステル結合へと異性化した *O*-アシルイソペプチドを合成し、その後 *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応により目的ペプチドへと変換するものである¹⁾。我々はさらに、アルツハイマー病に関連するアミロイドβペプチド (Aβ) において、25 位グリシン-26 位セリン部位のアミド結合をエステル結合へと異性化した *O*-アシルイソペプチドを開発した。本イソペプチド(クリックペプチドと命名)は pH 変換などにより、*O*-to-*N* 分子内アシル転位反応を経て Aβへと化学変換することができ、Aβ本来の凝集過程を研究できるツールとして期待している (図 1)^{2,3)}。

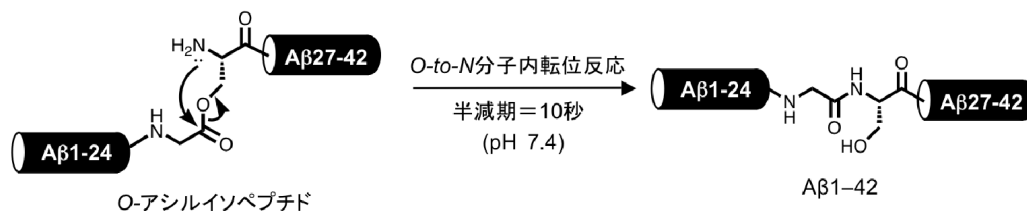


図 1. *O*-アシルイソペプチド(25 位グリシンと 26 位セリン間においてアミド結合がエステル結合へと異性化した構造)から Aβ への化学変換

今回、本手法を E22Δ 変異型 Aβ (22 位 Glu が欠損) へ応用した。Aβ1-40(E22Δ)はモノマーまたは低分子量オリゴマー状態においてランダムコイルからβシート構造へと変換するというユニークな性質が示唆された。一方、Aβ1-42(E22Δ)は Aβ1-42(WT)と比べ、顕著に速いオリゴマー化およびβシート構造変換が観察された。

ところで、Aβ1-42 は一般的に水溶性が低く、非特異的に凝集するため、本来の病的な凝集過程を実験的に再現することが難しい。PyroGlu-Aβ3-42 や pyroGlu-Aβ11-42 (N 末端側 2 残基 もしくは 10 残基が欠損し、3 位もしくは 11 位グルタミン酸がピログルタミン酸に変換した構造)は Aβ1-42 よりもさらに水溶性が低く、実験上の取扱いが特に困難である。そこで、*O*-アシルイソペプチド法を N 末端に pyroGlu (ピログルタミン酸)を有する Aβ に適用した (図 2)。*O*-アシルイソペプチドから産生した pyroGlu-Aβ の CD スペクトル評価から、

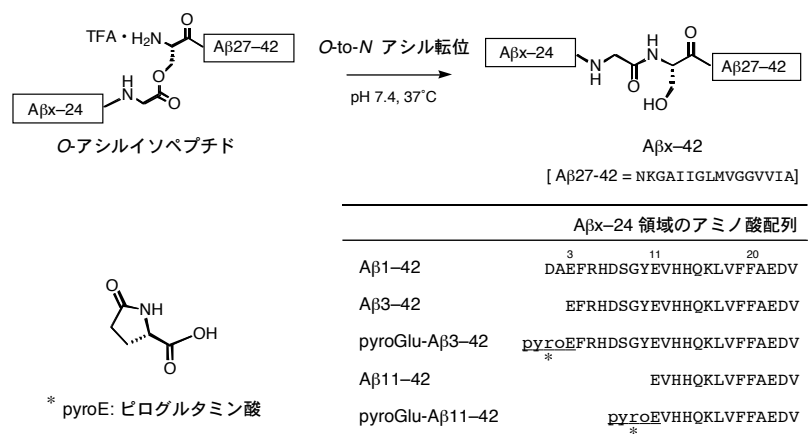


図 2. N 末端に(ピロ)グルタミン酸を有する *O*-アシルイソペプチドの化学構造と *O*-to-*N* 分子内アシル転位反応を経たネイティブ Aβx-42 への変換。

pyroGlu-A β 11-42 は A β 1-42 および pyroGlu-A β 3-42 よりも比較的速く β -シート構造に変化することが示唆された。チオフラビン T 蛍光アッセイによるアミロイド線維形成能の評価では、蛍光強度（アミロイド線維量に相関）は全ての分子種において経時的に増大した。このうち、pyroGlu-A β 3-42 の蛍光強度は A β 1-42 より高く、pyroGlu-A β 11-42 は低かった。神経成長因子（NGF）により分化した細胞に対する毒性の評価では、pyroGlu-A β 3-42 は A β 1-42 とほぼ同程度の細胞毒性を示し、pyroGlu-A β 11-42 の毒性はやや低かった。

一方、Islet amyloid polypeptide (IAPP、別名アミリン) は、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞からインスリンと共に放出される 37 残基のペプチドホルモンである。IAPP は A β と同様に高い凝集性を持ち、II 型糖尿病患者などの膵島においてアミロイド沈着を形成する。その凝集過程で形成されるオリゴマーやアミロイド線維は β 細胞に対して毒性を持ち、II 型糖尿病の進行段階における β 細胞の機能不全や壊死に関与すると考えられている。

しかしながら IAPP を用いた生物学的・物理化学的実験においては、その高い自己会合性のためにペプチドの保存中・操作中に凝集が起こり、均一なモノマー状態の IAPP を調製することは難しい。

そこで、クリックペプチド戦略を IAPP に対して応用した (図 3)。すなわち、IAPP の 8 位アラニン-9 位スレオニンおよび 19 位セリン-20 位セリンにおいてエステル構造を導入した O-アシルイソペプチドを、2 段階のセグメント縮合法⁴⁾により合成した。まず Ser¹⁹-Ser²⁰間にイソペプチド構造を有する[Gln¹⁰-Ser²⁰]を、塩基存在下、ウロニウム型縮合剤である HATU により[Asn²¹-Tyr³⁷]-樹脂と反応させた。さらに Ala⁸-Thr⁹にイソペプチド構造、Cys²-Cys⁷にジスルフィド結合を有する[Lys¹-Thr⁹]を反応させた後、TFA による脱樹脂・脱保護を経て IAPP の O-アシルイソペプチドを得た。

合成したイソペプチドについて、CD スペクトル測定による二次構造評価およびチオフラビン T アッセイ

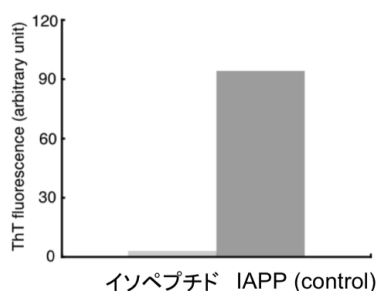


図 4. イソペプチドおよび native IAPP のチオフラビン T 蛍光強度 (incubation pH: 2.5)。

以上、変異型 A β やピログルタミン酸を有する A β における O-アシルイソペプチドを合成し、種々の物理化学的・生化学評価を行うことにより、A β の凝集における新しい知見を得ることができた。また、本イソペプチド戦略を 2 型糖尿病における IAPP へ応用した。

References: 1) Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Chem. Commun.* 124-125 (2004); 2) Y. Kiso, A. Taniguchi, Y. Sohma, *Click Peptides: Design and applications. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* (ed. Tadhg P. Begley) Vol. 1, 379-383 (2009); 3) Y. Sohma, Y. Hirayama, A. Taniguchi, H. Mukai, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 1729-1733 (2011); 4) T. Yoshiya, Y. Sohma, Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Tetrahedron Lett.* 47, 7905-7909 (2006).

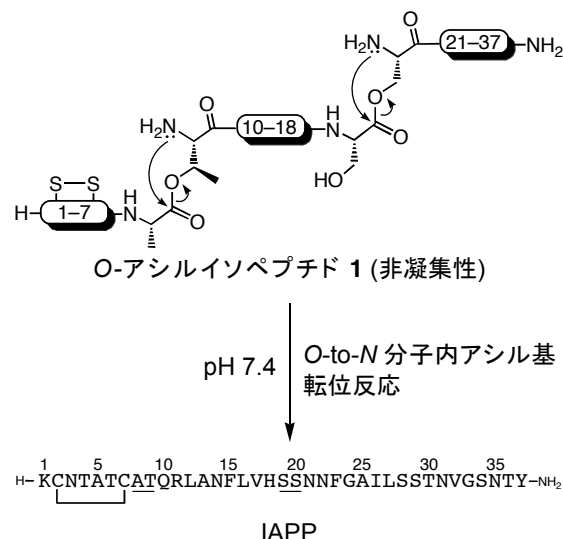


図 3. O-to-N 分子内アシル基転位反応による O-アシルイソペプチドから IAPP への化学変換。

によるアミロイド線維形成能評価を行った。イソペプチドは、酸性条件下において特定の二次構造を示さず、チオフラビン T の蛍光強度は上昇しなかった。一方 IAPP においては、同条件下、二次構造形成およびチオフラビン T 蛍光強度の上昇が観察された (図 4)。このことから、本イソペプチドはネイティブの IAPP と比べてアミロイド線維形成能や二次構造形成能が低いことが示された。さらに、中性条件下、本イソペプチドは O-to-N 分子内アシル基転位反応によりほぼ定量的に IAPP に変換された。In Situ にて産生した IAPP は、ランダムコイル構造から α -ヘリックス/ β -シートへと経時的に変化し、アミロイド線維量の増加が観察された。