有機合成の力と技で アルツハイマー病に挑む

菅 敏幸*
福山 透**

Tackling Alzheimer's Disease by Means of Original Synthetic Methodologies in Organic Chemistry

Toshiyuki Kan* and Tohru Fukuyama**

It is widely believed that the production and deposition of amyloid β -peptides ($A\beta$) play a key role in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). These $A\beta$ are generated through a sequence of proteolytic cleavages of the amyloid precursor protein (APP) by membrane-bound aspartic proteases, β -secretase and γ -secretase. It is believed that the direct inhibition of β - and γ -secretases would reduce the production of $A\beta$ and served as an important therapy for AD. Furthermore, in the view of the direct implication of γ -secretase in the generation of $A\beta_{42}$ peptide, which has been shown to aggregate senile plaques, the γ -secretase was considered as a more important therapeutic target for the pathogenesis of AD. Thus, we started to screen potent inhibitors of γ -secretase by modification of DAPT (13) derivatives and develop a functional analysis of these inhibitors. During the course of our investigation of potential inhibitors for γ -secretases, we found that the our original synthetic methodologies (Ns-strategy and efficient immobilization of our resin 7) would enable efficient syntheses of inhibitors and photoaffinity probe molecule (28). Furthermore, our synthetic probe (28) clarified that the major direct target molecules for the DAPT (13) are PS 1 CTFs, which were discovered from the genetically investigation of familial AD. In this report, we described our synthetic methodology and its medicinal chemistry as well as chemical biology applied to for the pathogenesis of AD.

Key words: amyloid β -peptides ($A\beta$), Alzheimer's disease (AD), β -secretase, γ -secretase, DAPT, Ns-strategy, resin, photoaffinity probe, PS 1 CTFs, familial AD

はじめに：アルツハイマー病発症におけるアミロイド

仮説^{1,2)}

現在、日本の総人口の1割以上が75歳以上となり超高齢化社会に突入し、それに伴う認知症の増大は介護を始めとする大きな社会問題も引き起こしている。これまでの認知症は脳梗塞などの後遺症として発症される脳血管性のものが大部分であったが、1990年頃からアルツハイマー病(AD)型の患者が増大し、現在では約6割がADである。また、血管性の疾患と比較して、ADには有効な予防や治療の方法がない難病であることも知られている。1907年にドイツの神経医師のアルツハイマーが、老人斑の形成と神経細胞が小さくなることで脳が萎縮する特徴を明らかにした。この偉大な発見に対してアルツハイマー病という名前がつけられたが、現在ほどの

症例がなかったこともあり、その後約70年間の進展はなかった。しかし、近年の革新的なライフサイエンスの進歩により、この難病の原因が解明されてきた。1986年には、生化学者グレナー博士らの長年の挑戦の末、老人斑は40個ほどのアミノ酸からなるペプチド([アミロイド β ペプチド($A\beta$)]の蓄積によることが明らかにされた。さらに、病理学研究により老人斑の蓄積が神経細胞の死や脳全体の萎縮を引き起こし、痴呆へとつながることも明らかとなった。これらのことから、ADの発症には $A\beta$ の産出が鍵を握ると信じられてきた。

さらに、遺伝学ならびに分子生物学の研究からも $A\beta$ がADの原因であるとする「 $A\beta$ 仮説」は支持されてきた。通常の老齢化とともに発症するADの他に、遺伝により若年の患者にも発症する家族性アルツハイマー病(FAD)も知られている。このFADの原因となる遺伝子の広範な調査により、FAD患者にはヒト染色体の21と14番目に変異があることが判明した。さらに、それらの染色体には、1回膜貫通型の $A\beta$ 前駆体の膜タンパク(APP)と7回膜貫通型のプレセニリン(PS)をコードする2つの遺伝子が含まれることも明らかとなった。APPは $A\beta$ の前駆体であり、PSは後述する γ -セクレターゼ

* 静岡県立大学薬学部 (422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)

* School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka (52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan)

**東京大学大学院薬学系研究科

(113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

**Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo (7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033)

を構成するタンパク質のため、遺伝・分子生物学研究からも $A\beta$ は AD 発症原因として認識された。具体的には FAD の患者は、 $A\beta$ に切れやすくなるように APP に変異があり、PS の変異は APP を異常に切断する機能があるため $A\beta$ が大量に発現し、発症しやすくなるといわれている。さらに、 $A\beta$ は前駆体膜タンパク (APP) から、膜外領域の切断を司る β -セクレターゼと、膜内領域の γ -セクレターゼの 2 段階のプロテアーゼ作用により生成されるため、両プロテアーゼ阻害剤は AD の有効な治療ターゲットにつながる。また、 $A\beta$ にはアミノ酸残基数により $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ の 2 種類があり、老人斑の初期の蓄積には少量成分の $A\beta_{42}$ が中心となる。 $A\beta_{40}$ だけでは老人斑を形成しないため、 $A\beta_{42}$ の選択的な生成抑制も創薬の重要なターゲットとなる。APP の切断に関与するタンパクのうち、後半の切断を担う γ -セクレターゼは $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ との切り分けにも関与している。これらの背景から、 γ -セクレターゼは AD の治療に有効なターゲットとなると考え、研究を行ってきた。本稿で紹介する γ -セクレターゼ阻害剤の探索と機能解明研究は、東京大学大学院薬学系研究科にて、天然物合成化学教室(福山研)、臨床薬学教室(岩坪研)、創薬理論科学教室(夏莉研)の共同研究として、2001 年から開始したものである。

1. Ns-strategy と新規トリチル型固相によるハチ毒フィラントキシンの合成

これまで筆者らは、生理活性天然物の全合成研究を中心とした有機合成化学に従事しており、特に医薬品として期待される含窒素天然物の合成研究を行ってきた。その過程において、ニトロベンゼンスルホニル(Ns)基が、*N*-アルキル化反応の活性化基として非常に有効に機能し(2→3)、かつ穏和な条件にて脱保護可能(3→5)なことを見出した(スキーム 1)³⁾。

Scheme 1 Ns-strategy: Synthesis of secondary amine (5) from primary amine (1).

Fig. 1 Novel trityl-type resin.

この 2 級アミン合成法(Ns-strategy)は、発表以来多くの化学者に使われる有用な方法となり、我々も生理活性天然物の全合成へと展開してきた^{4,5)}。また、本方法論のポリアミントキシシン合成への展開過程で、我々は市販のクロトリチルレジジン(6)よりも充填効率の高い固相(7)の開発に成功し、高極性な最終化合物を得るのに一切の精製操作を必要としない合成方法論の開発に成功した。本稿で紹介するアルツハイマー病への挑戦は、これらの Ns-strategy と新規固相(有機合成の力と技)が有効となった。そこで背景となる、固相(7)上での Ns-strategy を用いることで、精製操作を一切必要としない PhTX-343(8)の合成を紹介する。

1.1 PhTX-343(8)の固相合成⁷⁾

PhTX-343(8)は、猿人バチの毒線から単離された PhTX-344 の人工誘導体で、脳神経細胞の働きと関わる Ach や Glu などの受容体に強く結合することから、医薬品のリード化合物として期待されている。我々は、スキーム 2 に示したルートにて合成した。

まず、固相 7 にジアミノプロパンを連結させた後、遊離のアミンを Ns 基で保護し Ns アミド 9 とした。さらに、ジプロモブタン、Ns 基と Alloc 基でそれぞれ保護されたジアミノプロパンを順次アルキル化することにより、保護かつ固相に連結されたスぺルミン誘導体 10 を簡便に合成した。この方法は、様々なジアミンやハライ

Scheme 2 Solid-phase synthesis of PhTX-343 (8).

ドの組み合わせが可能であり、ハライドの代わりにアルコールとの光延反応も用いることができる。そのため、ポリアミン鎖の長さや種類を変えたライブラリーも容易に合成可能である⁹⁾。また、10のAlloc基を選択的に除去した11は、その末端アミンへのアルキル化やアシル化が容易であるため、スベルミン連結体の合成にも有用な中間体である。PhTX-343(8)の合成は、11にチロシン誘導体(12)を導入した後、Ns基などの脱保護を行い固相から切り出し、固相7を基にして9段階、総収率75%にて全合成を達成した。

図2には、最終段階の溶媒を留去しただけの合成品のPhTX-343(8)の¹H NMRを示した。本合成は、すべての段階に一切の精製を行っていないにもかかわらず、高純度の8が得られる。一般に、固相合成では過剰の試薬などを洗浄するだけで除去できるため最終生成物の精製の必要がないが、多段階合成の場合には、全工程で反応が定量的に進行しない限り最終生成物を純品で得ることが困難であることも知られている。我々の固相樹脂7は、充填効率が高いだけでなく種々の条件に安定であり、さらにNs-アミドのアルキル化反応が定量的に進行し、副生成物を一切与えないことが、この合成を可能にしたと考えている。

Fig. 2 ¹H NMR spectra of synthetic PhTX-343 (8).

2. γ-セクレターゼ阻害剤 DAPT(13)誘導体の液相合成と構造活性相関¹⁰⁾

前述したように、γ-セクレターゼはADの治療に有効なターゲットと考えられるため、その阻害剤は治療薬として期待される。現在では、数多くのγ-セクレターゼ阻害剤が報告されている¹¹⁾が、我々の研究の開始当初は、Elan社のDAPT(13)が最も強力な阻害剤として知られていたのみであった¹²⁾。我々は、別のプロジェクトで開発した光学活性アリアルグリシン類の新規合成法¹³⁾による、13のフェニルグリシン部分の改変も期待して合成研究を開始した。まず、標品となる13は、スキーム3に示した通常のペプチド合成法に従い合成した。すなわち、フェニルグリシン(14)の*t*-ブチルエステル化、

Scheme 3 Synthesis of DAPT (13) and its derivatives (18a-f).

Cbz-アラニンとの縮合、Cbzの脱保護、15へのジフルオロフェニル酢酸(16)の導入により、13を合成した。また、同様のルートにて、N末端のフェニル酢酸部改変体(18a-f)も、13の合成中間体のジペプチド15に種々のフェニル酢酸誘導体(17a-f)を縮合し合成した。しかし、13のN端を可変した誘導体18a-fのγ-セクレターゼ阻害活性は、DAPT(13)に比べて著しく低下することが明らかとなった¹⁴⁾。

ジフルオロフェニル酢酸体13を超える誘導体を見出せなかったため、次にフェニルグリシンの芳香環の可変を行ったところ、これらにも顕著な活性の低下がみられた。そこで、13のフェニルグリシンのC末端の誘導体化を試みた。スキーム4に示したように、13と同様の手法にて合成したメチルエステル体19aに、Seebach法によるエステル交換を行い、アリルエステル体19bおよびベンジルエステル体19cを得た。これらエステル誘導体のうち19cはDAPT(13)に比べ弱いながらも、十分なγ-セクレターゼ阻害活性を保持していた。次にエステルよりも安定なアミド誘導体の合成を試みた。しかし、13より得られるカルボン酸19dとアミンとの縮合

Scheme 4 Synthesis of DAPT derivatives (19a, b, c and 20a).

反応は顕著なエピマー化が伴った。唯一、Piv-Cl による混合酸無水物法が、エピマー化することなくベンジルアミド誘導体 20a を与えた。さらに、20a には DAPT (13) と同等の阻害活性を保持していることも明らかとなった。また、13 の C 末端への芳香環の導入で活性が増強されるため、多様なベンジルアミド誘導体の合成と探索により、さらに活性の増強された化合物の発見が大きく期待された。多様な化合物の迅速合成には、固相合成の威力が絶大である。幸運なことに、我々の開発した固相樹脂 (7) にて窒素原子を担持する固相合成は、通常のペプチド合成と逆の伸長も可能となり、13 の誘導体のコンビナトリアル合成が可能となった。

3. 固相合成による DAPT(13) 誘導体のパラレル合成と構造活性相関

スキーム 5 に示したように、我々が開発した固相樹脂 (7) を用い、DAPT (13) の C 末端が多様なアミド化合物のパラレル固相合成を行った。まず、C 末端がアリルエステルで保護されたジペプチド 21 を合成し、N 末端を 7 に担持した。さらに、固相上でアリルエステルを除去してカルボン酸 22 とした。引き続き、各種アミン (23a-o) との縮合は過剰の HOBt 存在下 DCC を用いることにより、円滑にエピマー化することなく進行した。

Scheme 5 Parallel synthesis of DAPT derivatives (20a-o).

通常、Merrifield 法に代表されるペプチドの固相合成は、C 末端を固相に連結し N 保護アミノ酸との縮合と脱保護を繰り返し行われる。それに対し、本合成法は N 末端を連結させた N-アシルアミノ酸にもかかわらず、 α 位のエピマー化を伴うことなく縮合反応が進行した。この幸運の理由は、固相による立体障害がエピマー化の原因となるオキサゾロン中間体の形成を阻害することによるものか、あるいは過剰量の HOBt がアミド化反応を加速することによるものか明らかではない。しかし、樹脂 (7) による固相合成は N 末端から C 末端へのペプチド鎖の伸長も可能な新規合成方法論となった。続いて、酸性条件下にてジペプチド誘導体を固相樹脂より切り出

し、ジフルオロフェニル酢酸セグメントをペンタフルオロフェノール活性エステル法にて導入した。反応終了後、粗生成物の結晶のろ取と引き続き酢酸エチルによる洗浄で、目的とする DAPT (13) の C 末端を種々のベンジルアミドに変換した 15 種類の誘導体 (20a-o) の簡便な合成に成功した。

Table 1 Yields of 20a-o and their γ -secretase inhibitory activity.

Compound	R =	Yield (%)	Activity ^{a)}
20a	CH ₂ Ph	57	1.0
20b	n-C ₄ H ₉	26	0.3
20c	CHPh ₂	26	1.0
20d	CH ₂ C ₆ H ₄ -o-OMe	27	0.2
20e	CH ₂ C ₆ H ₄ -m-OMe	43	0.1
20f	CH ₂ C ₆ H ₄ -p-OMe	12	0.4
20g	CH ₂ C ₆ H ₄ -o-Cl	42	0.1
20h	CH ₂ C ₆ H ₄ -m-Cl	25	0.1
20i	CH ₂ C ₆ H ₄ -p-Cl	26	0.6
20j	CH ₂ C ₆ H ₄ -o-Br	32	0.3
20k	CH ₂ C ₆ H ₄ -m-Br	19	0.1
20l	CH ₂ C ₆ H ₄ -p-Br	36	0.6
20m	CH ₂ C ₆ H ₄ -p-F	17	0.1
20n	CH ₂ C ₆ H ₄ -p-CO ₂ Me	28	0.6
20o	CH ₂ C ₆ H ₄ -p-COPh	48	30.0

a) The relative inhibition activity was determined by dividing the IC₅₀ of DAPT (13) by that of each compound.

表 1 に、共通中間体 22 から 20a-o の 3 段階の収率と誘導体の γ -セクレターゼ阻害活性を示した。特筆すべきことに、それらの中で、ベンゾフェノンメチル基を有する 20o が、DAPT (13) の約 30 倍強力な活性を有していた。また、ベンゾフェノンはフォトアフィニティラベリングの光反応性基として多用される。通常、生理活性を有する化合物にベンゾフェノンなどのプローブユニットを導入すると、標的タンパク質との親和性が低下することが多い。しかし、20o が示した 13 の約 30 倍強力な γ -セクレターゼ阻害活性は、ベンゾフェノン部分が標的タンパク質との結合に重要な役割を果していることも示唆しており、以下のフォトアフィニティプローブへの展開が大きく期待された。

4. フォトアフィニティプローブの固相合成¹⁵⁾

家族性アルツハイマー病の近年の研究により、疾患原因遺伝子の 1 つとしてプレセニリン (PS) がクローニングされ、さらに詳細な分子生物学的な研究により、PS 遺伝子が産出する膜タンパクを中心とする巨大複合体が γ -セクレターゼの本体であることも明らかとなった。この γ -セクレターゼの構造や機能の情報は AD 疾患の医薬品開発に重要となると考えられるが、膜タンパク質の構造解析ならびに生化学的な解析は非常に困難なことが知られている。現在のところ、膜タンパク質の解析には、プローブ分子を用いたフォトアフィニティラベリング法が数少ない有効な解析手段として知られている¹⁶⁾。プローブの合成には、タンパクと高い親和性(強い活性)を有するリガンド分子に、光照射によりタンパク質と架

橋する光反応性基とビオチンのようなタグを導入する必要がある。ビオチンタグはアビジンとの高い親和性を利用することで、簡便なタンパクの検出や精製が可能となる¹⁷⁾。しかし、リガンド分子に光反応性基やビオチンなどのプローブユニットを導入すると親和性が低下することも多い。本研究の場合、リガンドとなる13にベンゾフェノンを導入することで活性がかえって向上したことは幸運であった。そこで、20oにリンカーを介してビオチンを導入したフォトアフィニティプローブを合成することにした。しかし、有機溶媒や水にも難溶性のペプチド化合物へのビオチンの導入より、さらに溶解性が低くなる大きな懸念があった。実際に、プローブ28は種々の溶媒に不溶となり、NMR測定も重DMSOが唯一可能な溶媒であった。プローブ28は、その不溶性から、順相あるいは逆相のどちらのカラムによる精製も困難だったため、再び最終段階に精製を必要としない固相合成を利用することにした。そこで、ベンゾフェノンとビオチンを同時に、かつ簡便に導入可能な固相樹脂(27)を設計した。スキーム6に示した方法にて、DAPT(13)をリガンドとするフォトアフィニティプローブ(28)を合成した。文献既知のベンゾフェノン誘導体24の一方の水酸基をアジドへと変換後、もう一方の水酸基に、我々が開発したモノNsジアミン(25)¹⁸⁾をリンカーとして光延反応により導入した。さらに、26のBoc基を除去し、次いでビオチンをペンタフルオロフェノール活性エステル法により縮合後、Ns基の脱保護により第2級アミンへと変換し、固相樹脂7に担持した。我々の知る範囲内では、第2級アミン部分で担持可能な固相樹脂は、7以外

Scheme 6 Solid phase synthesis of photoaffinity probe (28).

外に知られていない。さらに、アジド基の還元によりアミノ基への変換を行い、リガンドのカルボン酸と縮合が可能なるプローブ前駆体27を合成した。ベンゾフェノン-ビオチン-体型である固相樹脂27とDAPT誘導体のカルボン酸19を縮合後、酸性条件下固相から切り出すことにより、フォトアフィニティプローブ28の合成に成功した。また、28はフェニルグリシンの α 位でのエピマー化が観測されたが、十分な活性を保持していた。また、この場合もDAPT誘導体20a-oの合成の場合と同様、最終段階での一切の精製を必要としなかった。

5. プローブ28によるフォトアフィニティラベリング

5.1 標的タンパク質の解明¹⁹⁾

前述したように、ベンゾフェノンを導入したDAP-Bp(20o)はDAPT(13)の約30倍強力な γ -セクレターゼ阻害活性を有していた。ビオチンユニットを有しているフォトアフィニティプローブ分子(DAP-BpB:28)は活性が低下したが、DAPT(13)とほぼ同等の阻害活性(図3の左グラフ)を有していた。そのため、プローブ28と γ -セクレターゼは十分な親和性が期待でき、以下の手順でフォトアフィニティラベリングの実験を行った。まず、HeLa S3細胞の膜画分を遠心分離により濃縮し、CHAPSOを加えて可溶化した後、DAP-BpB(28)を加えて、DAPT存在下と非存在下にてUV lightの照射を行った。その後、ビオチン化されたタンパク質をstreptavidin sepharose beadsにより精製した後、SDS-PAGEにより分析した。図4(右SDS-PAGE)に示したように、抗ビオチン抗体(α -biotin)による検出では、DAPT(13)存在下にて消失する23および26kDaのタンパク質を確認した。この特異的に阻害される結果より、このタンパク質はDAPTの標的であることが明らかとなった。さらに、 γ -セクレターゼを構成する種々のタンパク質の抗体による検出を行ったところ、図4(左のSDS-PAGE)に示したように、 α -PS1 CTF抗体により

Fig. 3 Inhibition activity of 13 and 28.

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of photo-labeling.

検出された。これらのことから、DAPT(13)は、PS 1 CTF を標的タンパク質として作用し活性を発現することが分子レベルで明らかとなった。

家族性アルツハイマー病の疾患原因遺伝子の1つとして見出されたプレセニリン PS 1 は、全長 50kDa のタンパク質である。しかし、PS 1 はそれ自身では活性をもたず、Nicastrin, Aph-1, Pen-2 などの他のコンポーネントと巨大複合体を形成後、さらに NTF (N 末端) と CTF (C 末端) の 2 つに切断され、活性を発現することが知られている²⁰⁾。我々の合成した DAP-BpB(28) は、全長の 50kDa のプレセニリン (PS 1) を標識せずに、23 および 26kDa の PS 1 CTF を標識することから、DAPT (13) は活性型の γ -セクレターゼを特異的に認識して、活性を発現していることも明らかとなった。

5.2 阻害競合フォトアフィニティラベリング

さらに詳細な結合様式の解明を目的として、図 5 に示した構造の異なる γ -セクレターゼ阻害剤 (29, 30, 31, 32, 33) と DAP-BpB(28) との競合的フォトアフィニティラベリングの実験を行った。

図 6 に示したように、ジペプチド型の阻害剤 (29, 30)²¹⁾ とスルホンアミド型の阻害剤 (31) では DAPT(13)

Fig. 5 Structure of γ -secretase inhibitors (29-33).

Fig. 6 Competitive labeling experiments with inhibitors.

と同様に、DAP-BpB(28)と標的タンパク質 (PS1 CTF) とのラベリングが阻害された。構造の全く異なるスルホンアミド型の阻害剤 (31) が、DAPT(13)と同様の標的に作用して活性発現を引き起こすことは大変興味深い。それに対して、遷移状態モデル型の (32) と基質類似型のヘリックスペプチド型の (33) では、 IC_{50} の 100 倍量を添加しても阻害されなかった。アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤の探索により 32 の開発に成功したメルク社の Shearman らは、32 にベンゾフェノンを導入したプローブを合成し、フォトアフィニティラベリングを行っている。その結果、C 末端に導入した化合物は CTF を、N 末端の化合物は NTF をそれぞれ標識する。その結果を基に、32 は通常のアスパラギン酸プロテアーゼと同様に、 γ -セクレターゼの触媒部位に作用すると結論している²²⁾。また、ハーバード大学医学部の Wolfe 教授らは、ヘリックスペプチドの 33 が基質結合部位と結合し阻害活性を発現していることも明らかにしている^{23,24)}。DAP-BpB(28) はこれらの阻害剤と競合しなかったため、DAPT(13) は触媒部位や基質結合部位とは異なる部分と結合して阻害活性を発現していることが示唆される。さらに、DAPT(13) と類似の構造を有するジペプチド型の阻害剤 (29, 30) により競合阻害が起るのに対して、構造の全く異なるスルホンアミド型の阻害剤 (31) により阻害されるのは、興味深い結果である。

6. フォトアフィニティプローブのコンビナトリアル合成²⁵⁾

フォトアフィニティラベリングで標識されたタンパク質の MS/MS 分析などにより得られるアミノ酸レベルでの構造情報は、医薬品開発に非常に重要である。我々の合成したプローブ 28 のラベリングでは、抗体を用いた分析により標的タンパク質の解明には成功したものの、アミノ酸分析や MS/MS 分析に十分な量のタンパク質は得られなかった。そこで、さらに効率的なプローブの探索が必要になった。前述したように、活性を有するリガンド分子に光反応性基を含むプローブユニットを付与すると、標的タンパクとの親和性が低下することが多い。そのため、現状では標的タンパク質の配列がわかったとしても、最適な (親和性を保持した) プローブを論理的に予想することは困難である。そこで我々は、プローブ分子の最適化も医薬品開発と同様に、ライブラリーによる探索が有効な手段と考えた。固相合成は多様

Fig. 7 Structures of synthetic probes and their inhibition activities.

な化合物を簡便に合成できるために、コンビナトリアルケミストリーに汎用される。そのため、我々の固相合成戦略は好都合となった。スキーム 6 に示した 28 の合成と同様の合成戦略により、光反応性基とリンカーの異なる 5 種類のプローブ (34, 35, 36, 37, 38) の合成を行った (スキーム 7)。合成したプローブの構造 (略語はスキーム

7 を参照) と阻害活性の値とを図 7 に示した。

また図 8 に、PS 1-CTF 抗体によるフォトアフィニティラベル化能 (SDS-PAGE) の結果を示した。本研究のフォトアフィニティラベリングでは、光反応性基のベンゾフェノン 28 とジアジリジン 34 ではラベル化能に大きな違いがみられなかったが、疎水性、親水性のリンカーを有する 34, 35 の比較では、疎水性のプローブの方がラベル化の効率が良かった。また、ジスルフィド結合を有するプローブ (36, 37) のラベル化の効率は低く、さらには 38 では阻害活性も有していなかった。ジスルフィド結合を有するプローブは、その S-S 結合の gauche 効果によりリンカー部分が折畳み構造をとり、分子全体のコンフォメーションが変化するため、クロスリ

Scheme 7 Synthesis strategy for photoaffinity probes.

a -: absence of 13, +: presence of 13.

Fig. 8 Labeling results of synthetic probes.

ンクの効率や阻害活性を低下させているものと考えている。

目的とした 28 よりラベル化能の高いプローブを見出せなかったが、固相上でリガンド分子にプローブユニットを付与する新しい合成戦略を提供できた。近年、大きな注目を集めているケミカルバイオロジーの分野では、フォトアフィニティプローブに限らず、活性を有するリガンド分子にビオチンや蛍光タグを導入することが求められている。これまでに種々の合成の報告があるが、本研究のように固相上でプローブユニットを導入する報告例はほとんどない。固相合成のコンビナトリアルケミストリーへ容易に応用できることと最適なプローブ分子の予想が困難であることを考え合わせると、本方法論は極めて有用である。

おわりに

本研究では、我々が天然物を簡単に合成することを目的として開発してきた方法論(Ns-strategy, 新規固相樹脂)が、医薬品の探索や生命現象解明のツールとなるプローブ分子の合成にも役立つことを示すことができた。もしかすると、若い研究者のなかには天然物の全合成は古くてやり尽くされた学問で、ケミカルバイオロジーやメディシナルケミストリーが新しく世の中の役に立つサイエンスであると思っている方もいるかもしれない。我々はこの研究を通して、物質化学を基盤とする学問は、「モノづくり」(有機合成化学)が重要で、力強い方法論(力と技)により困難を突破できることを示した。現在、本セクレターゼの機能解明の研究は、他の阻害剤の探索とプローブ分子の設計・合成^{27,28)}を基盤とした機能解析²⁹⁾に展開されている。

謝 辞 本研究の推進に御尽力いただいた、天然物合成化学教室(福山研究室)、臨床薬学教室(岩坪研空室)と創薬理論科学教室(夏莉研究室)の学生を始めとする多くの共同研究者に感謝いたします。また、天然物全合成の研究経験しかなかった不器用な筆者(特に、T. K.)に、メディシナルケミストリーやケミカルバイオロジー研究に接する機会を与えていただき、御指導頂いた夏莉英昭教授(現、帝京大学薬学部)、岩坪威教授(現、東京大学大学院医学系研究科)、富田泰輔准教授に、心より感謝申し上げます。

(2008 年 3 月 31 日受理)

文 献

- 1) D. J. Selkoe, *Arch. Neurol.*, **62**, 192 (2005)
- 2) T. Tomita, T. Iwatsubo, *Curr. Pharm. Des.*, **12**, 661 (2006)
- 3) (a) T. Fukuyama, C.-K. Jow, M. Cheung, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 6373 (1995); (b) W. Kurosawa, T. Kan, T. Fukuyama, *Org. Synth.*, **79**, 186 (2002)

- 4) Ns-strategy の総説: (a) T. Kan, T. Fukuyama, *J. Syn. Org. Chem., Jpn.*, **59**, 779 (2001); (b) T. Kan, T. Fukuyama, *Chem. Commun.*, **2004**, 35
- 5) A. Fujiwara, T. Kan, T. Fukuyama, *Synlett*, **2000**, 1667; (b) T. Kan, H. Kobayashi, T. Fukuyama, *ibid.*, **2002**, 697; (c) T. Kan, A. Fujiwara, H. Kobayashi, T. Fukuyama, *Tetrahedron*, **58**, 6267 (2002); (d) W. Kurosawa, T. Kan, T. Fukuyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8112 (2003); (e) W. Kurosawa, H. Kobayashi, T. Kan, T. Fukuyama, *Tetrahedron*, **60**, 9615 (2004)
- 6) (a) Y. Hidai, T. Kan, T. Fukuyama, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 4711 (1999); (b) *idem*, *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1570 (2000)
- 7) T. Kan, H. Kobayashi, T. Fukuyama, *Synlett*, **2002**, 1338
- 8) A. T. Eldefrawi, M. E. Eldefrawi, K. Konno, N. A. Mansour, K. Nakanishi, E. Oltz, P. N. Usherwood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4910 (1988)
- 9) Ns-strategy の固相合成の総説: Bennet, W. D.; "Combinatorial Chemistry A practical Approach", ed. by H. Fenniri, Oxford University Press, p. 139
- 10) T. Kan, Y. Tominari, K. Rikimaru, Y. Morohashi, H. Natsugari, T. Tomita, T. Iwatsubo, T. Fukuyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 1983 (2004)
- 11) β -secretase と γ -secretase 阻害剤の総説: B Schmidt, S. Baumann, H. A. Braun, G. Larbig, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **6**, 377 (2006)
- 12) H. F. Dovey, V. John, J. P. Anderson, L. Z. Chen, P. de Saint Andrieu, L. Y. Fang, S. B. Freedman, B. Folmer, E. Goldbach, E. J. Holsztynska, K. L. Hu, K. L. Johnson-Wood, S. L. Kennedy, D. Kholodenko, J. E. Knops, L. H. Latimer, M. Lee, Z. Liao, I. M. Lieberburg, R. N. Motter, L. C. Mutter, J. Nietz, K. P. Quinn, K. L. Sacchi, P. A. Seubert, G. M. Shopp, E. D. Thorsett, J. S. Tung, J. Wu, S. Yang, C. T. Yin, D. B. Schenk, P. C. May, L. D. Altstiel, M. H. Bender, L. N. Boggs, T. C. Britton, J. S. Clemens, D. L. Czilli, D. K. Dieckman-MacGinty, J. J. Droste, K. S. Fuson, B. D. Gitter, P. A. Hyslop, E. M. Johnstone, W. Y. Li, S. P. Little, T. E. Mabry, F. D. Miller, J. E. Audia, *J. Neurochem.*, **76**, 173 (2001)
- 13) (a) S. Tohma, A. Endo, T. Kan, T. Fukuyama, *Synlett*, **2001**, 1179; (b) S. Tohma, K. Rikimaru, A. Endo, T. Kan, T. Fukuyama, *Synthesis*, **2004**, 909
- 14) γ -Secretase 阻害活性測定の詳細: Y. Takahashi, I. Hayashi, Y. Tominari, K. Rikimaru, Y. Morohashi, T. Kan, H. Natsugari, T. Fukuyama, T. Tomita, T. Iwatsubo, *J. Bio. Chem.*, **278**, 18664 (2003)
- 15) フォトアフィニティラベリングの総説: (a) F. Kotozyba-Hilbert, I. Kapfer, M. Goeldner, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 1296 (1995); (b) S. A. Fleming, *Tetrahedron*, **51**, 12479 (1995); (c) G. Dorman, G. D. Prestwich, *Biochemistry*, **33**, 5661 (1999)
- 16) (a) K. Hofmann, Y. Kiso, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3516 (1976); (b) K. Hofmann, M. Finn, Y. Kiso, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3585 (1978); (c) B. A. Gilbert, R. R. Rando, *ibid.*, **117**, 8061 (1995); (d) Y. Hatanaka, H. Hashimoto, Y. Kanaoka, *ibid.*, **120**, 453 (1998)
- 17) T. Kan, Y. Tominari, Y. Morohashi, H. Natsugari, T. Tomita, T. Iwatsubo, T. Fukuyama, *Chem. Commun.*, **2003**, 2244
- 18) (a) T. Fukuyama, M. Cheung, T. Kan, *Synlett*, **1999**, 1301; (b) 菅敏幸, 福山透, TCI メール No.128
- 19) Y. Morohashi, T. Kan, Y. Tominari, H. Fuwa, Y. Okamura, N. Watanabe, H. Natsugari, T. Fukuyama, T. Iwatsubo, T. Tomita, *J. Biol. Chem.*, **281**, 14670 (2006)
- 20) N. Takasugi, T. Tomita, I. Hayashi, M. Niimura, Y. Takahashi, G. Thinakaram, T. Iwatsubo, *Nature*, **422**, 438 (2003)
- 21) H. Fuwa, Y. Okamura, Y. Morohashi, T. Tomita, T. Iwatsubo, T. Kan, T. Fukuyama, H. Natsugari, *Tetrahedron Lett.*, **45**, 2323 (2004)
- 22) Y. M. Li, M. Xu, M.T. Lai, Q. Huang, J. L. Castro, J. M. DiMuzio, T. Harrison, C. Lellis, A. Nadin, J. G. Neduvilil, R.

- B. Register, M. K. Sardana, M. S. Shearman, A. L. Smith, X. P. Shi, K. C. Yin, J. A. Shafer, S. J. Gardell, *Nature*, **405**, 689 (2000)
- 23) W. P. Esler, W. T. Kimberly, B. L. Ostaszewski, T. S. Diehl, C. L. Moore, J. Y. Tsai, T. Rahmati, W. Xia, D. J. Selkoe, M. S. Wolfe, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 428 (2000)
- 24) W. P. Esler, W. T. Kimberly, B. L. Ostaszewski, W. Ye, T. S. Diehl, D. J. Selkoe, M. S. Wolfe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2720 (2002)
- 25) T. Kan, Y. Kita, Y. Morohashi, Y. Tominari, S. Hosoda, H. Natsugari, T. Tomita, T. Iwatsubo, T. Fukuyama, *Org. Lett.*, **9**, 2055 (2007)
- 26) H. Li, Y. Liu, K. Fang, K. Nakanishi, *Chem. Commun.*, **1999**, 365
- 27) Y. Takahashi, H. Fuwa, A. Kaneko, M. Sasaki, S. Yokoshima, H. Koizumi, T. Takebe, T. Kan, T. Iwatsubo, T. Tomita, H. Natsugari, T. Fukuyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 3813 (2006)
- 28) H. Fuwa, K. Hiromoto, Y. Takahashi, S. Yokoshima, T. Kan, T. Fukuyama, T. Iwatsubo, T. Tomita, H. Natsugari, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 4184 (2006)
- 29) H. Fuwa, Y. Takahashi, Y. Konno, N. Watanabe, H. Miyashita, M. Sasaki, H. Natsugari, T. Kan, T. Fukuyama, T. Tomita, T. Iwatsubo, *ACS Chemical Biology*, **2**, 408 (2007)

PROFILE

菅 敏幸 静岡県立大学薬学部・教授 理学博士

〔経歴〕1993年北海道大学大学院理学研究科博士課程修了（指導教官、白濱晴久）、1993年財団法人サントリー生物有機科学研究所研究員、1996年東京大学薬学部助手、2004年東京大学大学院薬学系研究科助教授、2005年より現職。2002年有機合成化学協会奨励賞、平成16年度日本薬学会薬学研究ビジョン部会賞。〔専門〕有機合成化学、医薬品化学、ケミカルバイオロジー。〔連絡先〕e-mail: kant@u-shizuoka-ken.ac.jp 菅研のホームページ <http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~yakuzo/>

福山 透 東京大学大学院薬学系研究科・教授 Ph.D.

〔経歴〕1971年名古屋大学農学部農芸化学科卒業、1977年ハーバード大学化学科 Ph.D. 取得、1977-78年同大学博士研究員、1978年ライス大学化学科助教授、1982年同准教授、1988年同教授、1995年より現職。1993年アメリカ化学会 Arthur C. Cope Scholar Award、2001年有機合成化学協会賞、2003年国際複素環学会 Senior Award、2004年アメリカ化学会 Award for Creative Work in Synthetic Organic Chemistry 賞、2006年日本薬学会賞。〔専門〕有機合成化学。〔連絡先〕e-mail: fukuyama@mol.f.u-tokyo.ac.jp 福山研のホームページ <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~fukuyama/index-j.htm>