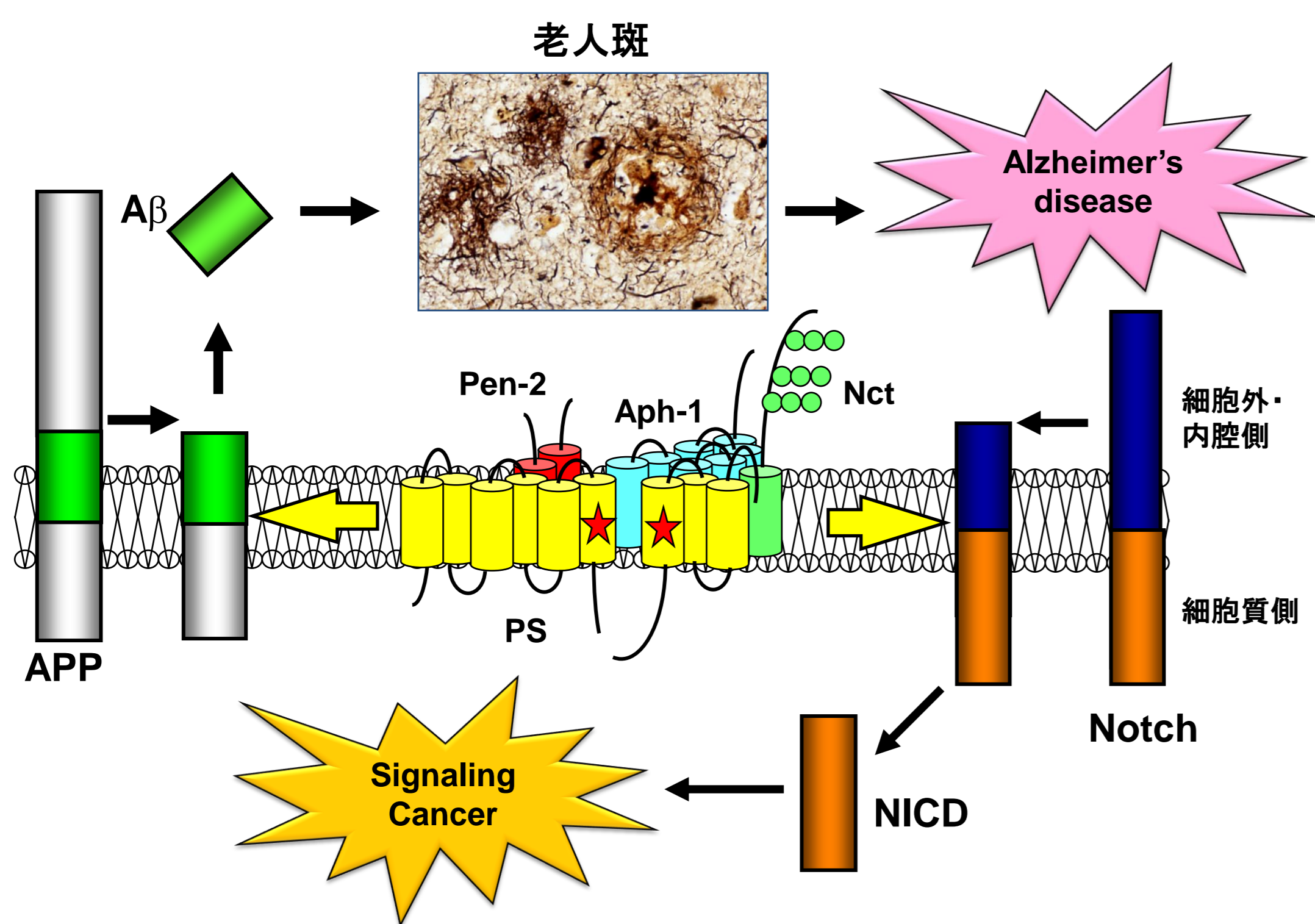


# アルツハイマー病治療薬創出に向けた $\gamma$ セクレターゼの構造解析と機能制御

富田 泰輔<sup>1</sup>、岩坪 威<sup>1</sup>、福山 透<sup>1</sup>、高木 淳一<sup>2</sup>、佐藤 主税<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東京大学大学院薬学系研究科、<sup>2</sup>大阪大学蛋白質研究所、<sup>3</sup>産業技術総合研究所

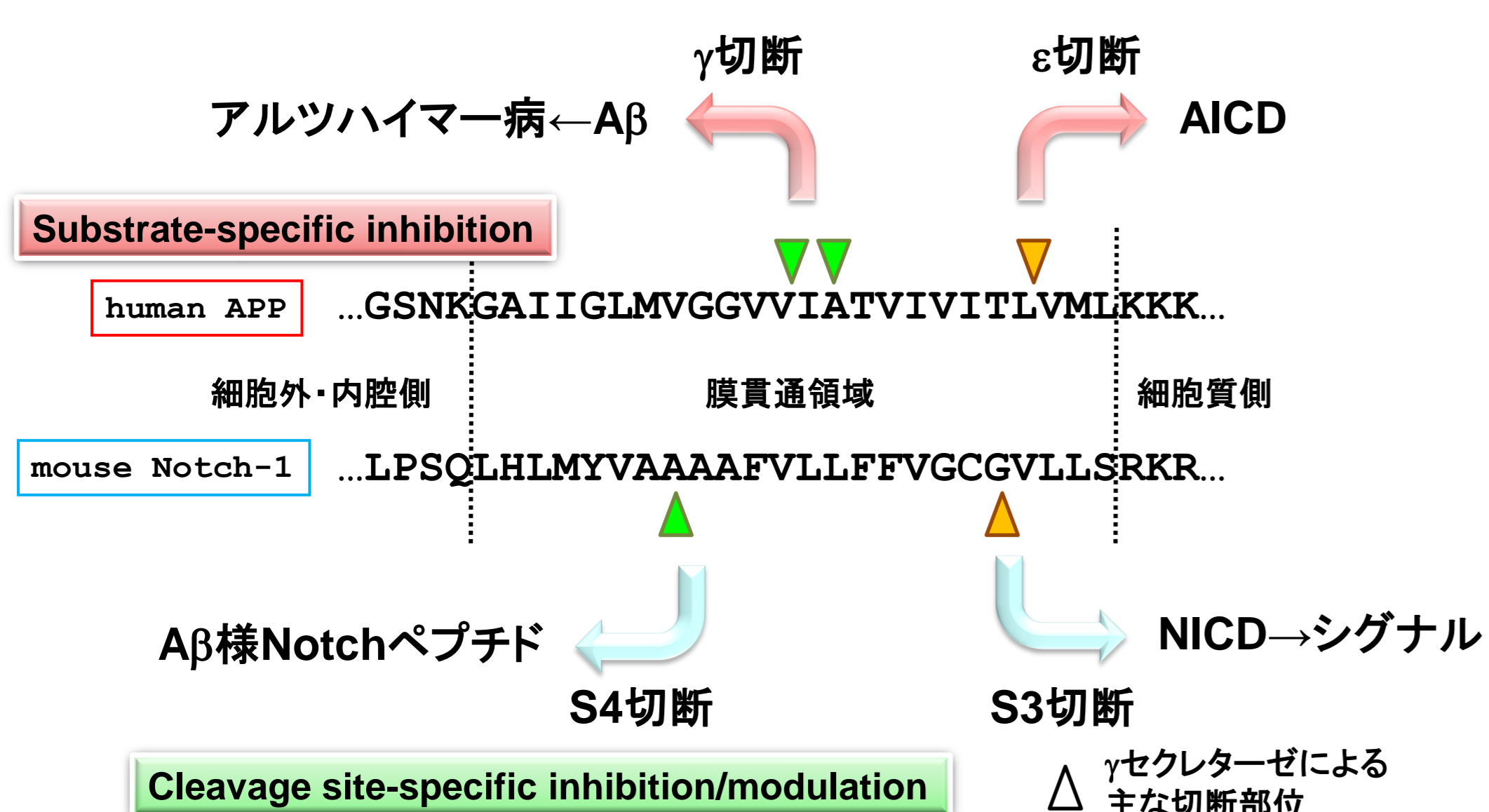
## イントロダクション



高齢化社会を迎え、認知症の克服は大きな社会問題となっている。認知症の中で最も頻度の高いアルツハイマー病 (AD) の発症原因として、アミロイド $\beta$ ペプチド (A $\beta$ ) を主成分とする老人斑の蓄積が考えられている。したがってA $\beta$ 産生に関与する $\gamma$ セクレターゼは重要な創薬標的分子として研究が進められている。

$\gamma$ セクレターゼは、Presenilin (PS)、Nicastrin (Nct)、Aph-1、Pen-2を基本構成因子とする高分子量膜蛋白複合体を分子実態とし、PSの膜貫通領域内に存在する二つのアスパラギン酸 (赤星) を活性中心とするアスパラギン酸プロテアーゼである。 $\gamma$ セクレターゼは幹細胞の維持に関与し発生過程に重要な役割を果たすNotchも切断し、そのシグナル伝達に関与している。Notchは様々ながんの発症や増殖にも関連することから、 $\gamma$ セクレターゼ活性を特異的に制御する手法の開発は、ADやがんの根本治療法となる可能性があり注目されている。

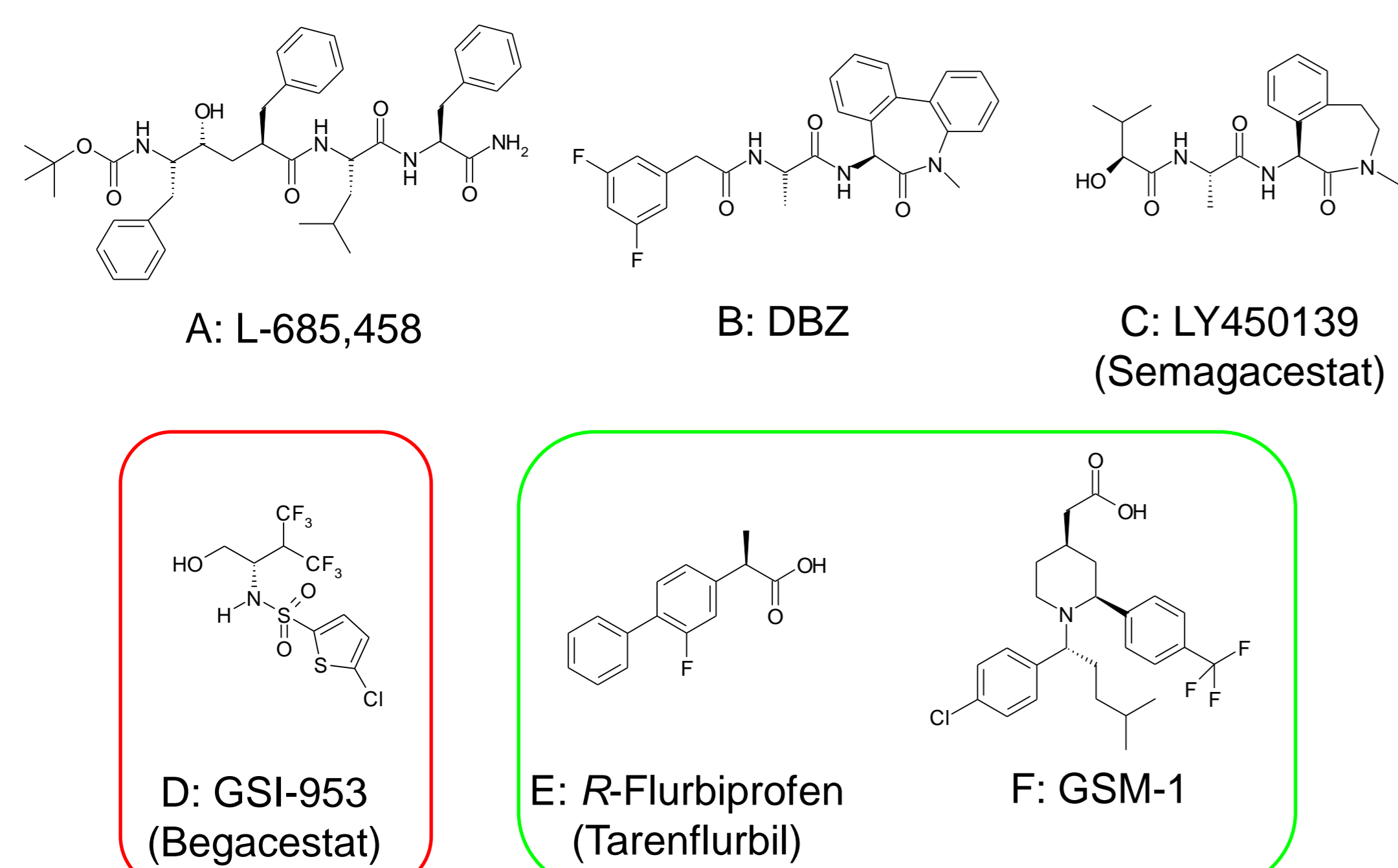
## $\gamma$ セクレターゼは膜内配列を「Dual Cleavage」する、新奇アスパラギン酸プロテアーゼである



AD治療を考える上で、単純な $\gamma$ セクレターゼ活性の抑制はA $\beta$ 産生のみならずNotchシグナルをも阻害するため、重篤な副作用を惹起することが知られている。また現在までに $\gamma$ セクレターゼの基質として50種類以上の膜蛋白が知られている。生化学的解析から、 $\gamma$ セクレターゼは基質となる膜内配列のほぼ中央部と細胞質側近傍の主に2か所で切断する、「Dual Cleavage」を行うプロテアーゼであることが明らかとなっている。そこでAPP切断のみを抑制するような基質特異的活性阻害 (Substrate-specific inhibition)、もしくはA $\beta$ 産生に関わる $\gamma$ 切断のみに影響を与える切断部位特異的活性制御 (Cleavage site-specific inhibition/modulation)、というような、A $\beta$ 産生特異的な $\gamma$ セクレターゼ活性制御法の開発が求められている。

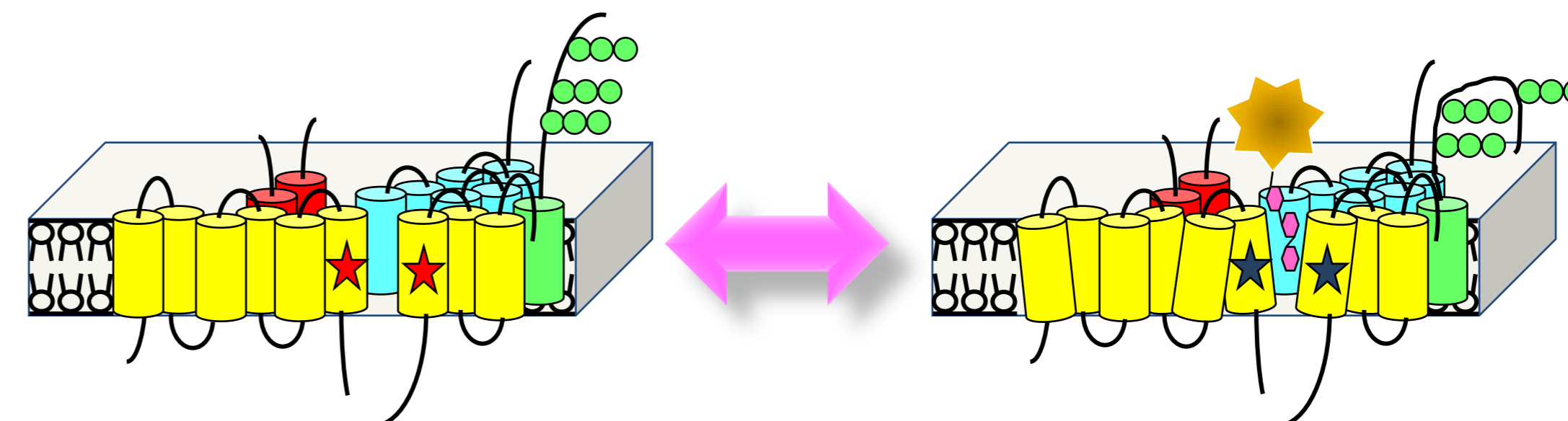
しかし脂質二重膜という「疎水性」環境に、安定な $\alpha$ ヘリックスとして存在する膜貫通領域を、複数個所において「加水」分解するメカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。

## これまでに報告されている $\gamma$ セクレターゼ阻害剤及びモジュレーター



これまでに報告されている $\gamma$ セクレターゼ阻害剤及びモジュレーターの構造式。Aは遷移状態模倣型阻害剤、BおよびCはジペプチド型阻害剤、Dはスルホンアミド型阻害剤、EはNSAIDs型モジュレーター、Fは非NSAIDs型モジュレーターの代表的な化合物。A、B、CはA $\beta$ 産生とNotch切断活性を同様に阻害する。DはNotch切断よりもA $\beta$ 産生を優位に抑制するNotch-sparing効果を持つ $\gamma$ セクレターゼ阻害剤。EおよびFは $\gamma$ 切断のみに影響を与え、凝集性の高いA $\beta$ 42産生を特異的に抑制する $\gamma$ セクレターゼモジュレーター。これらのうち、CおよびDは現在試験が行われている。Aは活性中心に直接結合することが予測されているが、他の化合物については作用機序の詳細は不明である。

## 本研究課題の目的とアプローチ

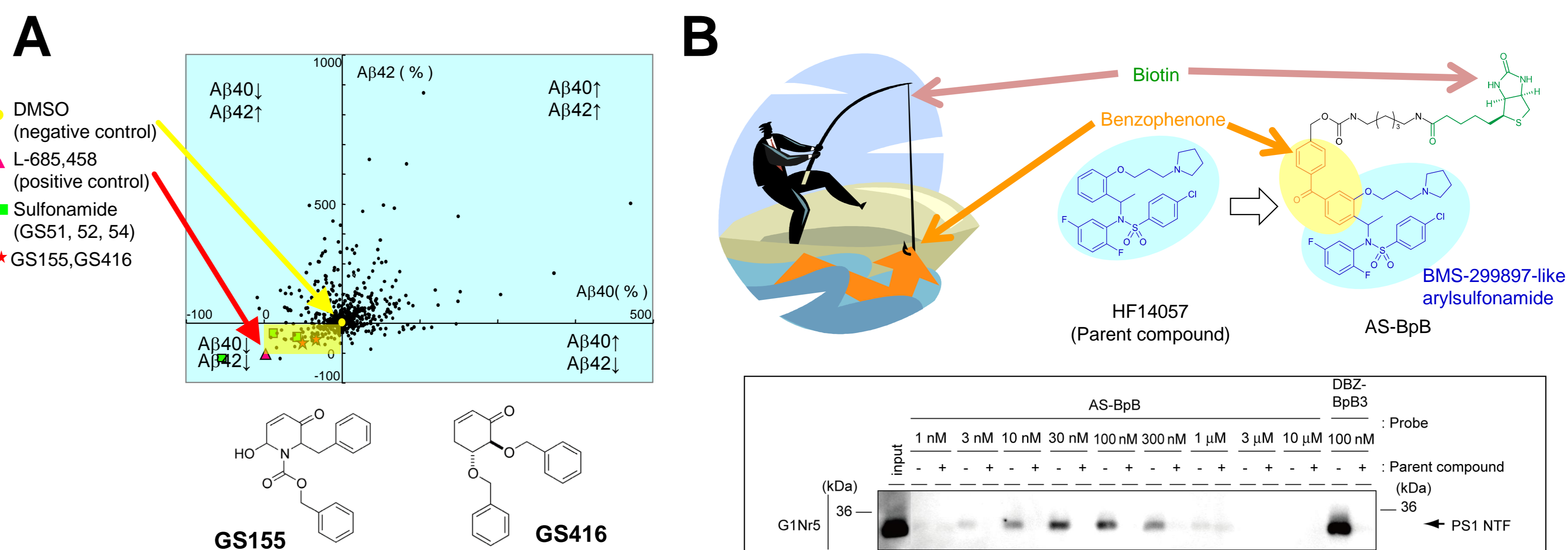


AD治療薬開発を目指し、Notch-sparing効果を持つ $\gamma$ セクレターゼ阻害剤やモジュレーターのラショナルデザインが求められている。しかし $\gamma$ セクレターゼは重要な創薬標的分子でありながらも、高度に糖鎖付加されたNctを含む複数の膜貫通型蛋白によって構成される高分子量膜蛋白複合体であるため、ほとんど構造生物学的解析はなされていない。そのため $\gamma$ セクレターゼの作動機序・既知の阻害剤の作用点についてはほとんど未解明である。本研究においては、

1. アカデミア発の新規骨格を持つ $\gamma$ セクレターゼ阻害剤・モジュレーターの同定と構造活性相関解析
2. ケミカルバイオロジー的手法を利用した各種 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤・モジュレーターの標的分子同定
3. 切断プロセスの完全な理解と、構造解析を指向した切断機構に必要な分子内ドメインの同定と解析
4. 単粒子解析を利用した $\gamma$ セクレターゼ複合体全体構造の理解
5. 各種 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤・モジュレーターが $\gamma$ セクレターゼの構造に及ぼす影響の理解

を行い、最終的に $\gamma$ セクレターゼによる膜内配列切断機構の詳細を明らかにすることを目標として研究を遂行する。

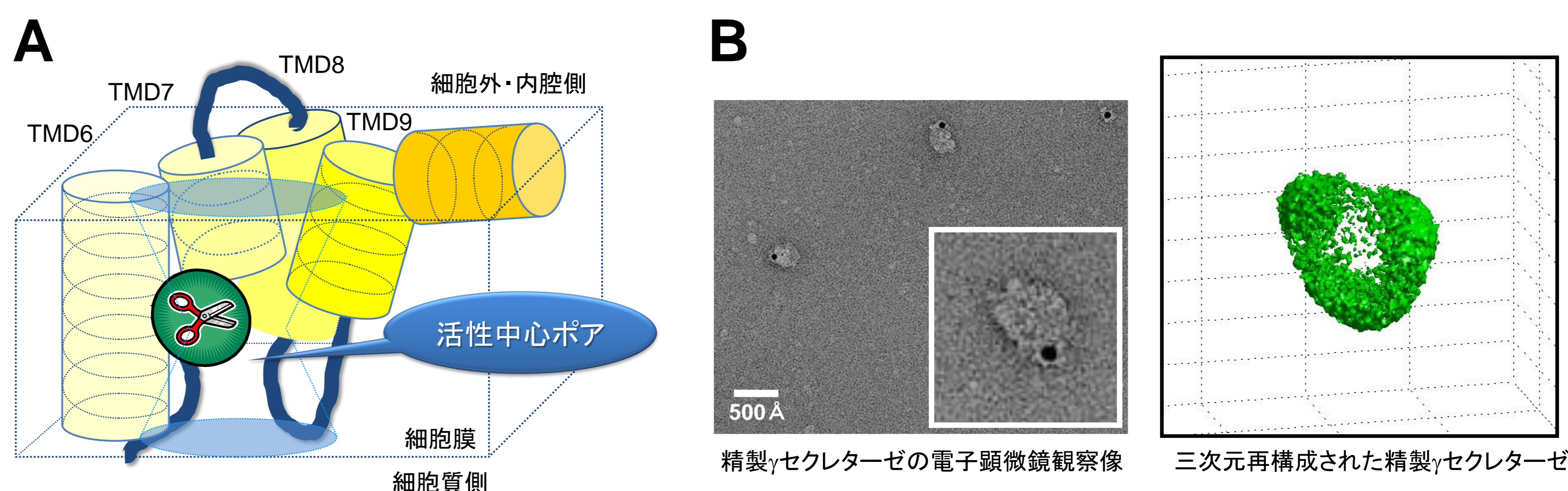
## ケミカルバイオロジー: 新規阻害剤・モジュレーターの同定とその作動機序の解明



A) 新規 $\gamma$ セクレターゼ活性制御化合物の同定を目指した低分子化合物ライブラリースクリーニング。ピンプラスチンやストリキニーネなど、生物活性を有する各種天然物全合成過程において作製された合成中間体を収集し、オリジナルin houseライブラリーを確立した。本ライブラリーは独創性の高い全合成経路において得られた化合物より構成されるため、非常にユニークな骨格を多く含むのが特徴である。これまでに新規骨格を持つ $\gamma$ セクレターゼ阻害剤GS155およびGS416の同定に成功している (Takahashi et al., BMCL 2006)。

B) 光親和性標識を利用した化合物標的分子の生化学的同定。各種 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤・モジュレーターに光官能基であるベンゾフェノンやジアジリンをタンパク質精製に用いるビオチン基とともに導入し、それぞれ釣り針・釣り竿のようにして標的分子を同定する。これまでに本手法を用い、ジペプチド型 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤DAPT、Compound E、DBZの標的分子がPSであることが明らかになった (Morohashi et al., JBC 2006; Fuwa et al., ACS Chem Biol 2007)。最近、Notch-sparing効果を持つ阻害剤であるBMS-299897と類似した構造を持つ分子プローブAS-BpB (Fuwa et al., BMCL 2006) の標的分子がPS1であることが明らかとなり、結合部位の詳細な解析を進めている。

## 構造生物学: 様々な手法論を駆使して膜蛋白複合体の構造活性相関を解明



A) Substituted Cysteine Accessibility Method (SCAM) を利用したPSの構造解析。SCAMはシステインの反応特異性を利用し、各アミノ酸をシステインに置換した後にその微小環境の親水性をMTS試薬によって検討する手法で、各種トランスポーターやチャネルの生化学的構造解析に用いられている。特に脂質二重膜に存在するネイティブな構造とその動的変化を理解することが可能である。SCAMを用い、PSの第6、7、9膜貫通領域によって脂質二重膜中にポア構造が形成されており、その中に構成された親水性環境に活性中心が面していることを明らかにした (Sato et al., J Neurosci 2006, 2008)。

B) 精製 $\gamma$ セクレターゼ複合体の単粒子解析による構造解析。バキュロウイルス-Sf9細胞発現系により大量発現させた再構成 $\gamma$ セクレターゼを1%CHAPSO可溶性条件下で精製し、ウラン染色による電子顕微鏡観察を行った。 $\gamma$ セクレターゼ活性が検出される1 MDa以上の画分にPS (金コロイド) を含む巨大な粒子が観察された。これら電子顕微鏡観察像を収集し、 $\gamma$ セクレターゼ複合体の構造を三次元再構成した (Ogura et al., BBRC 2006)。現在クライオ電子顕微鏡による観察、解析を進めている。

## 今後の展望

今後、既知および新規阻害剤・モジュレーターの標的分子を同定し、同時にSCAMおよび単粒子解析に応用することで、これら低分子化合物が活性中心サブユニットであるPSおよび全体構造に及ぼす影響を詳細に検討していく。また同時に $\gamma$ セクレターゼ複合体の各部分構造の解析を目指し、各種機能ドメインの同定と発現を試みるほか、新規創薬標的分子機構の可能性を探索する。最終的には全体構造解析と組み合わせ、各阻害剤の影響を検討することで、膜内配列切断機構の詳細を明らかにする。

$\gamma$ セクレターゼの作動機序に関する構造生物学的基盤を明らかにすることで、副作用のないAD治療薬開発を目指した $\gamma$ セクレターゼ阻害剤・モジュレーターのラショナルデザインが可能となることが期待される。