

審査の結果の要旨

論文題目 Dipeptide 型 γ -secretase 阻害剤 DAPT の標的蛋白質同定およびその阻害機構の解析

氏名 諸橋 雄一

γ -secretase は β -amyloid precursor protein (APP) の膜貫通部位内を切断し、amyloid β -peptide ($A\beta$) 産生の最終段階を担うプロテアーゼである。 $A\beta$ はアルツハイマー病 (AD) 患者脳に蓄積する老人斑の主要構成成分であり、AD 発症に深く関与していると考えられていることから、 γ -secretase による膜内配列切断機構の研究は AD 発症機構の解明と治療薬の開発にとって重要である。 γ -secretase は家族性 AD 病因遺伝子産物 presenilin (PS) に加えて、nicastrin (NCT), APH-1, PEN-2 の 4 種類の膜蛋白質を含む複合体と考えられている。このうち PS は遷移状態アナログ阻害剤により直接標識されることから、活性中心となるアスパラギン酸残基をもつサブユニットであると想定されている。しかしながら、 γ -secretase は従来のアスパラギン酸プロテアーゼとは異なる性質を持つ特殊な酵素であることが示唆されている。また、遷移状態アナログ以外の構造をもつ各種の阻害剤による γ -secretase 阻害の分子機構は、その標的蛋白質・結合部位を含めほとんど明らかにされていない。本研究で申請者は、代表的な dipeptide 型 γ -secretase 阻害剤の一つであり、遷移状態アナログとは異なりその構造から結合部位を予測することが困難であった DAPT (N-[N-(3,5-difluoro phenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine *t*-butyl ester) の誘導体を用いて、その標的蛋白質の探索及び DAPT による γ -secretase 阻害機構を解析した。

DAPT の化学的構造はフェニル酢酸、アラニン、フェニルグリシンの 3 つのセグメントからなる dipeptide 型である。まず DAPT の γ -secretase 阻害特性について、 γ -secretase の基質である APP もしくは APP の C 末端断片 (C100) と Notch の C 末端断片 (N Δ E) を過剰発現する培養細胞を用いて分泌 $A\beta$ ・基質である C83/99 の蓄積・NICD 産生に与える影響を検討した。その結果、DAPT 処理により濃度依存的な $A\beta$ 分泌、NICD 産生の阻害、それに伴う基質 C83/99 の蓄積が観察されたほか、低濃度域における $A\beta$ 分泌の上昇相が認められた。次に、フェニル酢酸およびフェニルグリシンセグメントに様々な改変を加えた誘導体を合成し、その阻害活性について、フェニル酢酸セグメント、およびフェニルグリシンセグメントのフェニル基に対する改変は大幅な活性減弱をもたらした一方、一部の DAPT 誘導体では低濃度域における $A\beta_{40}$ ・ $A\beta_{42}$ 分泌上昇効果が観察された。このとき NICD 産生の上昇は観察されなかった。C 末端側エステル部位の改変体は阻害活性に大きな影響を与えなかった他、アミド結合で benzophenone を導入した誘導体 D23 に関しては大幅な活性増強が観察された。

次に、光親和性標識法を応用して DAPT の標的分子を同定するため、ここまでの検討から

改変可能な部位と判明した C 末端側エステル部位にアミド結合を介して、光感応基として benzophenone、アフィニティータグとして biotin を導入した誘導体 DAP-BpB を合成した。*in vitro* γ -secretase assay により DAP-BpB の阻害能を検討したところ、リード化合物である DAPT とほぼ同等の阻害能 ($IC_{50} = \sim 100$ nM) を示していた。これより、DAP-BpB は γ -secretase に対して DAPT と同等の親和性を保持しているものと考えられた。

そこで、申請者は DAP-BpB を用いて DAPT 標的蛋白質同定を試みた。HeLa S3 細胞から調製した膜画分を 1 % CHAPSO で可溶化して 100 nM DAP-BpB を加え、40 分間 UV (~ 365 nm) 照射を行った。クロスリンクされた蛋白質を streptavidin sepharose でアフィニティー沈降させ、抗 biotin 抗体を用いたウェスタンブロット解析により DAPT-BB の標的蛋白質を探索した。その結果、DAP-BpB 存在下で光親和性標識され、過剰量 (10 μ M) の DAPT 添加により消失する約 23 および 26 kDa のバンドを検出した。これらのバンドパターンは PS1 の C 末端断片 (CTF) のそれに類似していたので、抗 PS1 CTF 抗体を用いてウェスタンブロット解析したところ、これらの 2 本のバンドの分子量は完全に一致することが確認された。この結果から DAPT の標的蛋白質は PS1 CTF と考えられた。また、哺乳類においては PS1 の相同分子であり生体内で γ -secretase 活性の一部を担っていることが示唆されている PS2 が存在するが、この PS2 の CTF にも DAPT が結合するか否か、同サンプルを抗 PS2 CTF 抗体を用いてウェスタンブロット解析したが、PS2 CTF の標識は観察されなかった。

次に、DAPT がどのような状態の PS1 蛋白質に結合するのかが検討した。 γ -secretase の活性中心サブユニットと考えられる PS は、まず約 50 kDa の全長蛋白質として生合成され、他のサブユニットと会合して高分子量複合体を形成した後に分子内切断を受け、約 30 kDa の N 末端断片 (NTF) と約 20 kDa の CTF のヘテロダイマーとなる。従って、全長型が酵素前駆体 (zymogen)、断片型が活性型酵素と考えられている。全長型と断片型が同レベルに発現している PS1 過剰発現細胞の膜画分に対し DAP-BpB による標識を行ったところ、DAP-BpB は断片型である PS1 CTF のみを特異的に標識した。また、活性中心と考えられている第 385 番のアスパラギン酸残基をアラニンに置換した dominant negative 型変異 PS1 は DAP-BpB により標識されなかった。さらに、細胞膜画分を CHAPSO 可溶化後にゲル濾過し、分子量別に分取した画分を DAP-BpB で標識すると、約 700 kDa 以上の γ -secretase 活性の見られる画分においてのみ PS1 CTF が標識された。これらの結果から、DAPT は活性型 γ -secretase に特異的に結合すると考えた。

次に申請者は DAPT の γ -secretase 阻害機構について解析を行った。DAPT と構造が類似する、あるいは異なる各種 γ -secretase 阻害剤を DAP-BpB 標識の競合阻害剤として用いることにより、これらの化合物の作用機構と DAPT 作用機構との異同について検討した。DAPT と共通の dipeptide 構造を持つ compound E、LY411575 などの化合物、ならびに sulfonamide 型化合物 HF14057 は DAP-BpB によるラベルを DAPT 同様に阻害し、これらの化合物は同一の部位に結合していることが示唆された。一方、遷移状態アナログであり、触媒部位に結合すると予想される L-685,458、ならびに基質結合部位に結合すると予想されるヘリックスペプチド型化合物 peptide 15 は DAPT よりも弱い標識阻害効果を示した。これらの結果から DAPT の結合部位は触媒部位や基質結合部位に近接しているが、異なるものと考えた。

以上本研究において申請者は、①DAPT の標的分子は PS1 CTF であること、②DAPT は活性型 γ -secretase に選択的に結合すること、③ γ -secretase における DAPT の結合部位は触媒部位、基質結合部位とは異なること、を見出した。これらの結果は、 γ -secretase には触媒部位とも基質結合部位とも異なる位置に活性に重要な阻害剤結合ドメインが存在することを示唆する。これらの結果は γ -secretase の構造と機能に関する新知見を与えるものであり、 γ -secretase 阻害によるアルツハイマー病の予防ならびに根本治療方策に道を開くものであり、博士（薬学）の学位に値するものと判定した。