

Alzheimer 病 (AD) の患者脳に蓄積する老人斑の主要構成成分である amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) は、 $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) から、連続した 2 段階の切断を受けて切り出される。特に C 末端側の切断を行う  $\gamma$ -secretase は、 $A\beta_{40}$  と凝集性の高い  $A\beta_{42}$  の切り分けを決定しており、 $A\beta$  産生機構を対象とする AD 治療薬の開発において重要なターゲットである。 $\gamma$ -Secretase は presenilin N 末端断片 (PS NTF)、presenilin C 末端断片 (PS CTF)、nicastrin (NCT)、APH-1、PEN-2 の 4 分子から構成される高分子量蛋白複合体からなる。 $\gamma$ -Secretase は APP のみならず、Notch などさまざまな I 型膜蛋白の膜内配列を切断することから、signal peptide peptidase (SPP) などとあわせて I-CLiPs (intramembrane cleaving proteases) と総称されている。 $\gamma$ -Secretase の基質の多様性から、阻害剤を AD 治療薬として用いる場合、APP 以外の基質の切断阻害や、他の I-CLiPs の阻害による副作用が問題となる。したがって低分子化合物による阻害機構の理解は、 $\gamma$ -secretase 阻害剤の開発にあたり重要である。そこで申請者は、*in vitro*  $\gamma$ -secretase 活性測定系を用い、有機化学系研究室により構築された種々の化合物の合成中間体を含む低分子化合物ライブラリー、ならびに市販の化合物ライブラリーを用いて、新規骨格を持つ  $\gamma$ -secretase 阻害剤の screening を行った。さらに、光親和性標識プローブ化した  $\gamma$ -secretase 阻害剤を用いて、低分子化合物による  $\gamma$ -secretase 活性の阻害機構について解析を行った。

$\gamma$ -Secretase の基質となる APPC 末端に相当するリコンビナント C100 蛋白質を基質とし、温和な界面活性剤である CHAPSO で可溶化した HeLa 細胞の膜画分を酵素源とする *in vitro* 活性測定系を用いて、計 707 個の化合物の阻害活性を低濃度 (5  $\mu$ M) と高濃度 (200  $\mu$ M) の 2 点で評価した。低濃度で  $A\beta$  産生を 20% 以上低下させた化合物を選択し、さらに広い濃度域で阻害活性を調べたところ、強い  $\gamma$ -secretase 活性阻害能を有する化合物が 2 個見出された (GS155、GS416)。これらの化合物は共に  $A\beta_{40}$  産生と  $A\beta_{42}$  産生を同程度に阻害し、 $IC_{50}$  はそれぞれ 0.5  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M であった。これらの化合物はともに六員環 enone であり、隣接する 2 つの芳香環を有するという構造上の共通性がみられた。そこでこれらの化合物において  $\gamma$ -secretase 阻害能を発揮する構造を同定するため、誘導体を作成し、構造活性相関を検討したところ、阻害能を保持していた誘導体の大部分が enone であり、GS155 と GS416 では enone が  $\gamma$ -secretase 阻害能発揮に関与していると考えられた。

GS155、GS416 は培養細胞に投与した場合には、阻害効果を示さなかった。そこで APP を過剰発現した HEK293 細胞の膜画分を 37°C でインキュベートし、産生された  $A\beta$  量を測定する cell-free assay において効果を検討すると、反応液中に CHAPSO を含まない場合には阻害活性が見られなかったのに対し、0.25% CHAPSO 存在下では  $A\beta$  産生は阻害された。したがって GS155 および 416 の  $\gamma$ -secretase 阻害活性には、CHAPSO の存在が必要

と考えられた。さらにこれらの阻害剤の酵素反応全般に対する非特異的な効果を検討する中で、 $\beta$ -galactosidase の活性は阻害されないが、luciferase の活性は阻害されることを見出した。この結果から、 $\gamma$ -secretase と luciferase の酵素活性発現機構には何らかの共通性が存在し、これに対して GS155 および 416 が阻害能を発揮する可能性が考えられた。

さらに既知の酵素阻害剤ライブラリーからのスクリーニングにより、2 種の PKC 阻害剤と 2 種の ATPase 阻害剤を  $\gamma$ -secretase 阻害能を有する新規化合物として同定し、ATP と  $\gamma$ -secretase の結合が新たな  $\gamma$ -secretase 阻害剤の標的となる可能性を指摘した。

代表的な dipeptide 型  $\gamma$ -secretase 阻害剤である DAPT、Compound E 及び LY411,575 は、全て difluorophenyl 基を有しており、類似した構造をもっている。にもかかわらず、酵素特異性の点で異なっており、DAPT は SPP を阻害しないが、Compound E と LY411,575 は SPP を阻害する。またこれまでに DAPT を光親和性プローブに改変した誘導体の解析から、DAPT は PS CTF に直接結合することが知られていたが、Compound E、LY411,575 についての詳細は不明であった。これら阻害剤間の阻害特性の差を生み出す分子機構について検討を加えるため、申請者はこれら 3 種類の阻害剤に光感応基とビオチンを結合した 10 種類の光親和性プローブを、1% CHAPSO で可溶化した HeLa 細胞膜画分に添加して UV 照射を行い、ストレプトアビジンビーズで吸着された蛋白質を解析した。その結果、DAPT 型プローブと異なり、Compound E 型プローブ、LY411,575 型プローブは PS1 NTF を特異的に標識し、さらに SPP をも標識した。この結果から、これらの阻害剤は  $\gamma$ -secretase 複合体中で PS1 に作用して阻害能を発揮すること、また PS1 と SPP に共通する構造ないし酵素反応機構を標的としていることが示唆された。

また既知の  $\gamma$ -secretase 阻害剤のうち sulfonamide 型阻害剤はその阻害機構・標的分子ともに不明である。そこで代表的な sulfonamide 型阻害剤である BMS-299897 を元に構造活性相関解析を行い、その結果に基づいて光親和性プローブを作出した。この sulfonamide 型プローブは既知の  $\gamma$ -secretase 複合体構成因子を標識しなかったことから、全く新しい分子機構を標的としている可能性が示唆された。

以上のごとく申請者は、有機化学研究者の手により構築された compound library から、新規構造を有する  $\gamma$ -secretase 阻害剤 GS155 と GS416 を見出した。これらの化合物の誘導体に対する構造活性相関の検討から、enone と  $\gamma$ -secretase 阻害能との関連性を示唆した。Enone のような  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合物は、求核剤に対してマイケル付加をすることが知られており、この化学反応が  $\gamma$ -secretase 阻害を担っている可能性がある。 $\gamma$ -Secretase 阻害能をもつ kinase 阻害剤、ZM449829 も enone であり、その  $\gamma$ -secretase 阻害には、ATP などのヌクレオシドの PS に対する結合阻害に関わる可能性が想定されて

いること、GS155 および GS416 が ATP 要求性酵素である luciferase 活性を阻害したことから、これら一群の化合物は、ATP 結合部位への不可逆的な結合を介して $\gamma$ -secretase 阻害活性を発揮している可能性がある。酵素阻害剤ライブラリーのスクリーニングから ATP 要求性酵素の阻害剤が $\gamma$ -secretase 阻害剤として同定されたことは、ATP との結合が $\gamma$ -secretase 活性を調節することに符合する。さらに申請者は代表的な $\gamma$ -secretase 阻害剤である Compound E や LY411,575 を基本骨格に含む光親和性プローブを用いた標識実験から、これらの阻害剤が PS1 NTF 及び SPP と結合することを示した。一方、DAPT は、PS1 CTF のみに特異的に結合することが明らかにされている。今回の結果はこれらの阻害特性の相違が、各阻害剤の標的分子の違いに対応することを示す。また、PS1 NTF と SPP には共通する活性化機構が存在する可能性が示唆される。以上のごとく本研究はアルツハイマー病と膜内蛋白質分解の鍵分子 $\gamma$ -secretase に対する新規阻害剤同定の方法論を示し、化学生物学的手法を駆使して $\gamma$ -secretase の作動機構を明らかにしたものであり、博士（薬学）の学位に相応しいものと判定した。