

審査の結果の要旨

氏名 佐藤 千尋

γ セクレターゼはアルツハイマー病 (AD) 患者脳に老人斑として蓄積するアミロイド β ペプチド ($A\beta$) を前駆体である 1 回膜貫通蛋白質 APP から切断するプロテアーゼであり、Presenilin 1 (PS1) はその活性中心サブユニットである。 γ セクレターゼは、凝集性が高く AD の発症に関与の大きい $A\beta_{42}$ と凝集性のより低い $A\beta_{40}$ と分子種の切り分けを担い、家族性 AD の原因となる PS1 遺伝子の点突然変異はいずれも $A\beta_{42}$ 産生を特異的に上昇させることから、AD 治療薬開発の重要な標的分子と考えられている。また γ セクレターゼは疎水性環境である脂質二重膜内で基質の加水分解を行なうというユニークな性質を有する。従って γ セクレターゼの構造解析は、膜内蛋白質切断の解明と、mechanism-based な治療薬のデザインの両面から重要である。しかし γ セクレターゼは、PS 以外に 3 種類の膜貫通型蛋白質を結合した巨大な膜蛋白質複合体であり、構造解析は困難である。

そこで本研究で申請者は、substituted cysteine accessibility method (SCAM) を用いて、PS1 の活性中心部位周辺の構造解析を行った。SCAM は任意の 1 アミノ酸がシステイン (Cys) に置換された変異体を作製し、イオン化された水分子の存在下においてのみ Cys のチオール基と特異的に反応する MTS (methanethiosulfonate) 試薬を用いて、Cys 置換部位の親水性環境を検出する方法であり、これまでに様々なトランスポーターやイオンチャネルの機能構造解析に用いられている。SCAM の最大の利点は、膜を可溶化せずに蛋白質の構造情報が得られることであり、脂質二重膜内で起こる膜内配列切断という現象の解析にきわめて適していると考えられる。

申請者は PS1 の (1) 活性中心アスパラギン酸 (Asp) と、その近傍に存在し種間で高度に保存された GxGD モチーフを含む第 6、7 膜貫通部位 (transmembrane domain (TMD) 6, 7)、ならびに (2) 活性に必須であり保存性の高い PAL モチーフを含む TMD8 からカルボキシ (C) 末端の SCAM 解析を行い、脂質二重膜内における膜内蛋白質切断機構の解明を試みた。

ヒト PS1 が有する 5 個の Cys をセリン (Ser) に置換した Cys-less 変異型 PS1 を作製し、これを鋳型に、TMD6 及び 7 以降最 C 末端までの各アミノ酸を Cys に置換した約 110 種類の Cys 変異体を作製した。まずこれらの変異体を PS1・2 ダブルノックアウトマウス由来の線維芽細胞に発現させ、 $A\beta$ 産生能の回復を指標に機能回復実験を行った。その結果、約 81% の Cys 変異体が活性を保持することが確認された。

次にこれらの変異体の恒常発現細胞株を取得し、MTS 試薬の一種である MTSEA-biotin と反応させた。MTSEA-biotin は膜非透過性のため、① 6 well プレートに蒔き込んだ intact cells を MTSEA-biotin と反応させることによって細胞外からのみアクセス可能な親水性環境に面する Cys を (intact 細胞を用いた解析)、② 膜画分をバッファー中に懸濁した、right-side-out 及び inside-out の混合した膜画分と反応させることによって、細胞外、細胞質の両側からアクセス可能な親水性環境に存在する Cys を (microsome を用いた解析)、各々標識した。MTSEA-biotin によって標識された PS1 は streptavidin ビーズで沈降後、抗 PS1 抗体によって検出した。この方法により、各アミノ酸残基周囲の親水性・疎水性を評価すると同時に、PS1 の膜配向性の検討を行った。また 2 個のアミノ酸を Cys に置換した double Cys 変異体を作製し、様々なリンカー長を持つ MTS クロスリンカーを用いたクロスリンク実験を行うことにより、2 個のアミノ酸残基が同一の親水性環境で、一定距離の範囲内に位置しているかを検討した。さらに γ セクレターゼ阻害剤を利用し、膜内配列切断機構における各残基の生理的意義について検討し

た。

(1) 活性中心 Asp 残基と GxGD モチーフを含む TMD6, 7 の構造解析

intact 細胞を用いた解析の結果、TMD6 の Cys 変異体のうち A246C と L250C、TMD7 の変異体では I387C が標識された。またコンピュータ予測上、細胞外でループ構造をとると予測される K395C 以降のアミノ酸残基は連続して標識された。microsome を用いた解析の結果、これらの残基に加えて、TMD6 の A260C と、GxGD モチーフを含む TMD7 細胞質側のアミノ酸残基の Cys 変異体が連続して標識され、この部位が細胞質側からアクセス可能な親水性環境にあることが示唆された。これらの結果から、従来脂質二重膜内に埋まっていると予想されてきた TMD6, 7 が親水性環境に面していることが明らかとなった。TMD6 で標識された 3 アミノ酸残基は helix モデル上で活性中心の D257 と同じ側に位置しており、TMD6 が親水性環境に面した α -helix を形成していることが示唆された。また TMD6 および 7 に 1 個ずつの Cys を有する変異体を用いたクロスリンク実験を行ったところ、L250C/I387C が M4M (MTS-4-MTS : リンカー長約 7.8 Å) でクロスリンクされ、TMD6 と TMD7 がきわめて近接した距離に存在することが示唆された。

(2) PAL モチーフを含む TMD8, 9 と最 C 末端の構造解析

intact 細胞を用いた標識実験の結果、予想される TMD9 から最 C 末端まで 23 種の Cys 変異体中 10 種の Cys 変異体が標識され、TMD9 も脂質二重膜内の親水性環境に面していることが示唆された。さらに TMD9 の標識されたアミノ酸残基は α -helix の同じ面に存在し、TMD9 が親水性環境に面した α -helix を構成することが示唆された。microsome を用いた標識実験では、これに加えて PAL モチーフとその周辺のアミノ酸残基の Cys 変異体が標識され、この部位が細胞質側からアクセス可能な親水性環境にあることが示唆された。一方 TMD8 の Cys 変異体は、いずれの条件でも全く標識されなかった。また TMD6 および 9 に 1 個ずつ Cys を有する変異体を用いたクロスリンク実験では、L250C/L435C と L250C/L443C が M2M (リンカー長約 5.2 Å)、L250C/Y446C が M11M (リンカー長約 16.9 Å)、L250C/D450C が MTS-17-MTS (リンカー長約 24.7 Å) でクロスリンクされ、TMD6 と TMD9 が近接した親水性環境に存在することが示唆された。

(3) γ セクレターゼ阻害剤を用いた SCAM 解析

遷移状態模倣型 γ セクレターゼ阻害剤 L-685,458 は、 γ セクレターゼの活性中心 Asp に結合することが予想されてきたが、正確な結合様式は明らかでなかった。申請者は各種 Cys 変異体を L-685,458 と preincubation した後に MTSEA-biotin による標識を行うことにより、阻害剤結合部位の同定を試みた。その結果、TMD6 の A246C、L250C、TMD7 の L383C (GxGD モチーフ)、L381C、及び PAL モチーフ周辺の Cys 変異体の標識が競合された。これらの部位は活性中心 Asp にきわめて近接した位置に存在し、基質と結合する subsite を形成する可能性が示唆された。

申請者は本研究において、PS1 の活性中心を形成する 2 個の Asp 残基の存在する TMD6、7、及び PAL モチーフとそれに続く TMD9 が近距離に存在し、脂質二重膜内部に親水性ポア構造

を形成していることを明らかにした。またこのポアに面する TMD6 の細胞外側と GxGD モチーフ、及び PAL モチーフが基質の subsite を形成しており、この「活性中心ポア」構造が基質の膜内配列切断を担う触媒部位を構成することを示唆した。

最近、異なる作用機序を有する様々な γ セクレターゼ阻害剤や、 $A\beta_{42}$ の産生を特異的に阻害する γ セクレターゼモジュレーター化合物が報告されている。本研究ではそのうちいくつかの阻害剤を用いて SCAM 解析を行ない、それらが異なる Cys 変異体の標識競合パターンを呈することも明らかにしている。以上、本研究で明らかにされた γ セクレターゼの構造に関する情報は、アルツハイマー病新規治療薬の開発に重要な手掛かりをもたらすとともに、膜内タンパク質分解の生化学的理解をも進めるものであり、博士（薬学）の学位に相応しいものと判定した。