

## 論文の内容の要旨

論文題目： 膜内配列切断酵素  $\gamma$  セクレターゼの基質認識機構に関する研究

氏名： 渡邊 直登

### 【序論】

$\gamma$  セクレターゼは様々な I 型 1 回膜貫通蛋白質の膜貫通領域 (TMD) を切断する、膜内配列切断アスパラギン酸プロテアーゼである。 $\gamma$  セクレターゼ基質の一つ Amyloid Precursor Protein (APP) 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アミロイド  $\beta$  ペプチド ( $A\beta$ ) の前駆体蛋白質であり、 $\gamma$  セクレターゼの触媒サブユニットである Presenilin (PS) の遺伝子変異は家族性 AD (FAD) に連鎖している。 $\gamma$  セクレターゼによる APP の切断過程において、主として 40 アミノ酸からなる  $A\beta_{40}$  が産生されるが、FAD に連鎖した PS 変異はその切断様式を変化させ、凝集性の高い  $A\beta_{42}$  の産生を上昇させる。 $A\beta_{42}$  の蓄積は AD 発症に深く関与すると考えられることから、 $\gamma$  セクレターゼは AD の創薬標的分子として注目されている。 $\gamma$  セクレターゼは、イオン化した水分子の存在を必要とする加水分解反応を疎水性環境下の脂質二重膜内において行うという点でも類例のないプロテアーゼであり、酵素学的観点からもその切断機構の理解は重要である。 $\gamma$  セクレターゼは PS に加えて、Nicastrin、Aph-1、Pen-2 の 4 種類の膜貫通蛋白質からなる複合体であり (図 1)、各  $\gamma$  セクレターゼ構成因子の TMD は、複合体形成のみならず基質認識・切断過程において重要な役割を果たすことが予想される。またこれまでにケミカルバイオロジー的解析から、PS には基質結合部位と触媒部位が別個に存在することが指摘されている (図 2)。そこで

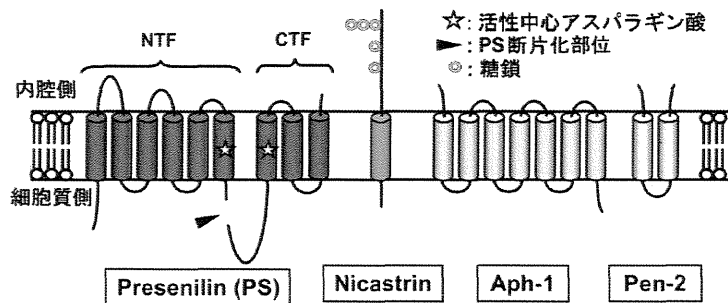


図 1  $\gamma$  セクレターゼ複合体構成因子

私は  $\gamma$  セクレターゼによる基質タンパク質の TMD 認識機構を解明することを目的に、PS の TMD に注目した分子生物学的検討、ならびに基質結合部位を標的とした阻害剤の作製とその阻害機構の解明を行った。

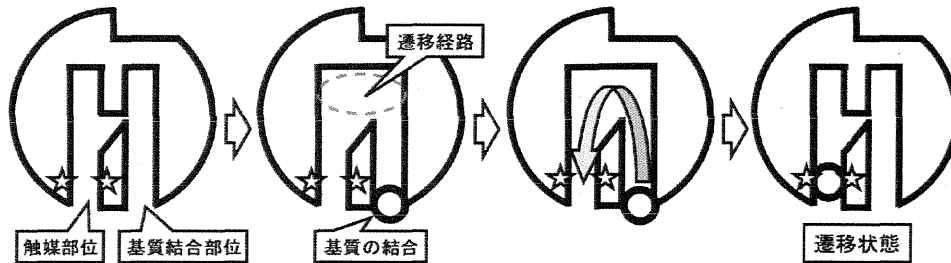


図2  $\gamma$  セクレターゼによる基質切断モデル図

【方法と結果】

**PS TMD の  $\gamma$  セクレターゼ活性獲得における役割**

PS は 9 回膜貫通蛋白質であり、活性型  $\gamma$  セクレターゼ複合体においては分子内切断を受けて N/C 末端断片 (NTF/CTF) として存在する。9 個の TMD のうち、TMD7 以外の 8 個の TMD のうち 1 つを  $\gamma$  セクレターゼとは無関係な蛋白質 (CLAC-P または CD4) の TMD に置換した TMD-swap 変異体 (TMXmt) を作製し、PS1/PS2 ダブルノックアウトマウス由来線維芽細胞に発現させたところ、TM3mt 以外の変異体では  $\gamma$  セクレターゼ活性は検出されなかった。次に各 TMD の置換が他の  $\gamma$  セクレターゼ複合体構成因子との相互作用および複合体の安定性に及ぼす影響を検討すると、TM4mt では Pen-2 との結合が失われ、TM1mt、TM5mt、TM8mt、TM9mt は  $\gamma$  セクレターゼ複合体を形成するものの、その安定性が失われていた。一方、TM2mt、TM6mt は安定な複合体を形成するが、酵素活性は失われていることが分かった。

そこで TM2mt、TM6mt 変異体を含む  $\gamma$  セクレターゼ複合体が、酵素活性に必要な触媒部位および基質結合部位を形成できているか否かについて、光親和性標識反応を利用したケミカルバイオロジー的手法により検討した。分子プローブとしては、触媒部位に結合する遷移状態模倣型アナログ (TSA)、または基質結合部位に結合する  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib) を含むヘリカルペプチド型阻害剤 pep.11 を基にし、光反応性官能基であるベンゾフェノン、検出のためのビオチン基を含む L-852,646 と pep.11-Bt を用いた。その結果、いずれの変異体も L-852,646 との結合は見られず、触媒部位が形成されていないものと考えられた (図 3)。一方

触媒活性中心アスパラギン酸をアラニンに置換した不活性型 PS (D257A、D385A) においては pep.11-Bt との結合が検出されたが、TM2mt、TM6mt はともに pep.11-Bt との結合が見られなかった。これらの結果から、PS 分子内に基質結合部位が触媒部位とは別個に形成されること、TMD2 および TMD6 は触媒部位のみならず基質結合部位の形成にも必須の役割を果たすと考えられた。

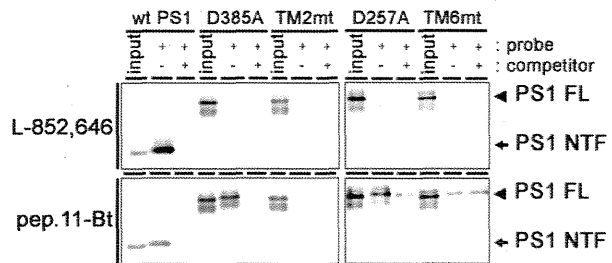


図3 TMD-swap 変異体を用いた光親和性標識実験

## 基質結合部位を標的とした $\gamma$ セクレターゼ阻害剤の探索

$\gamma$  セクレターゼは、TMD 中に存在するアスパラギン酸を活性中心残基として基質の TMD を切断することから、 $\gamma$  セクレターゼ-基質間のヘリックスの相互認識は酵素活性の発揮と制御にも重要と予想される。

$\alpha$  アミノ酸のカルボニル基とアミノ基の間に炭素を追加した構造を有する、 $\beta$  アミノ酸からなる“ $\beta$  ペプチド”は、その側鎖の選択により、容易に二次構造を制御可能であり、特定の高次構造を固定する「フォルダマー」としての活用が注目を浴びている。近年、 $\beta$  ペプチドの形成するヘリックス構造が $\alpha$ ヘリックスを模倣することが可能であることが明らかになっており、 $\gamma$  セクレターゼにおいては、ヘリックス型 $\beta$ ペプチドが基質 TMD 模倣型阻害剤となりうると考えられた。そこで側鎖としてシクロペン

タンを有し、 $2.5_{12}$ ヘリックス（12ヘリックス）を形成する *trans*-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) からなる  $\beta$  ペプチドを作製し、*in vitro* assay にて  $\gamma$  セクレターゼ活性阻害能を有するかどうかを検討した（図4）。その結果、ペプチド鎖長が長く、12ヘリックス形成能の高い $\beta$ ペプチドほど高い $\gamma$ セクレターゼ阻害能を示した。最も高い阻害能を示した6（ $IC_{50}$ : 5.2 nM）の配列中に(R,R)-ACPCを導入し12ヘリックス形成能を低下させると、

阻害能は著しく低下するか、もしくは完全に失われた。つまり、 $\beta$  ペプチドは12ヘリックス構造を介し $\gamma$ セクレターゼ阻害能を発揮することが明らかになった。

続いて、 $\beta$  ペプチドの $\gamma$  セクレターゼ活性阻害機構を明らかにするため、各種 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤に基づく光親和性プローブを用いた標識実験において、 $\beta$  ペプチドの競合能を検討した。その結果、基質結合部位に結合する pep.11-Bt による PS1 NTF の標識に対し、 $\beta$  ペプチドは親化合物である Aib ペプチド型阻害剤 (pep.11) と同程度に標識を競合した（図5A）。すなわち $\beta$ ペプチドも pep.11 と同様

に、基質結合部位を標的とすると考えられた。一方、TSA 阻害剤型プローブである 31C-Bpa の PS1 に対する標識は、pep.11 の添加により増加したが、 $\beta$  ペプチドの添加により減少した（図5B）。TSA 型阻害剤プローブに対する $\beta$ ペプチドの競合は、親化合物である 31C による競合に比較して弱く、 $\beta$  ペプチドは触媒部位には結合せず、アロステリックに触媒

peptide	sequence	$IC_{50}$ (nM)
1	Ac-X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> -NH <sub>2</sub>	>3.0x10 <sup>4</sup>
2	Ac-X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> -NH <sub>2</sub>	2.9x10 <sup>3</sup>
3	Ac-X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> X <sup>R</sup> -NH <sub>2</sub>	9.8x10 <sup>2</sup>
4	Ac-X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> -NH <sub>2</sub>	>3.0x10 <sup>4</sup>
5	Ac-X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> -NH <sub>2</sub>	20
6	Ac-X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> -NH <sub>2</sub>	5.2
7	Ac-X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>R</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> -NH <sub>2</sub>	6.9x10 <sup>3</sup>
8	Ac-X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>R</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> X <sup>R</sup> X <sup>S</sup> X <sup>S</sup> -NH <sub>2</sub>	>3.0x10 <sup>4</sup>

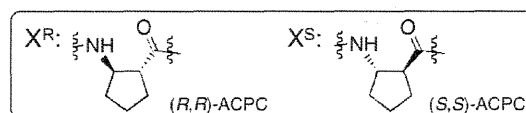


図4 合成したペプチド

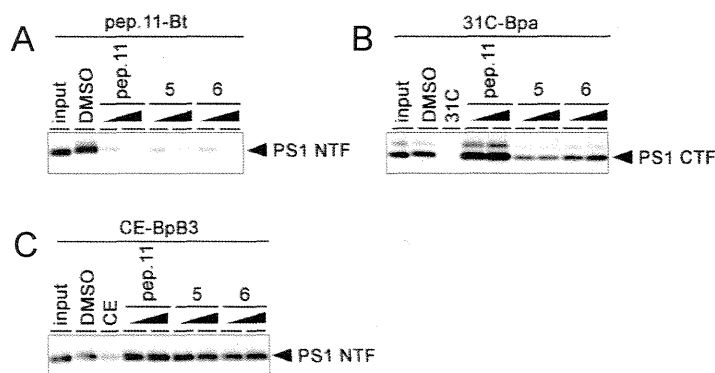


図5 pep.11-Bt (A)、31C-Bpa (B)、CE-BpB3 (C) を用いた光親和性標識実験

部位に影響する可能性が考えられた。一方 TSA 型阻害剤プローブに Aib ペプチドを添加するとその標識が増加し、同一の部位に結合する Aib ペプチドと  $\beta$  ペプチドが触媒部位に対して異なった影響を示すことが明らかとなった。続いて、遷移経路を標的とする阻害剤プローブ (CE-BpB3) を用いて検討を行った (図 5C)。興味深いことに Aib ペプチド型阻害剤、 $\beta$  ペプチドの添加によって標識の増加が見られた。この結果は Aib ペプチド、 $\beta$  ペプチドが遷移経路を標的としないことを示すのみならず、これらのペプチドの結合が遷移経路を開いた状態であることを示す結果であり、 $\gamma$  セクレターゼにおいては基質結合と共に遷移経路が開くのかもかもしれない。このように  $\beta$  ペプチドは 12 ヘリックス構造を介して  $\gamma$  セクレターゼ活性を阻害し、その作用機構として、Aib ペプチドと同様に基質結合部位を標的とし、遷移経路を開く作用を有すると考えられた。一方、触媒部位への影響はこれらのペプチドで異なり、Aib ペプチドと  $\beta$  ペプチドの阻害様式が異なることが示唆された (図 6A、B)。

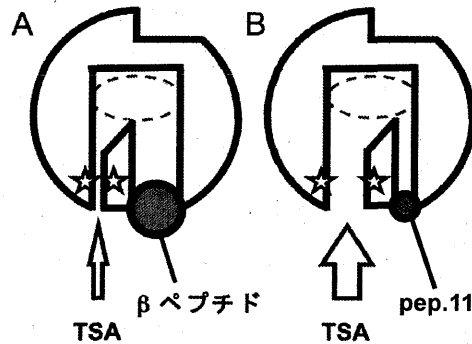


図 6A.  $\beta$  ペプチドによる阻害機構

B. pep.11 による阻害機構

#### 【まとめ】

私は TMD-swap 変異体を用いた検討から、PS1 の TMD2、6 が  $\gamma$  セクレターゼの基質結合部位を形成する可能性を提示した。さらに、12 ヘリックスを形成する  $\beta$  ペプチドが、基質結合部位を標的とする新規の  $\gamma$  セクレターゼ阻害剤として機能することを明らかにした。今後  $\beta$  ペプチド型阻害剤を基にした光親和性プローブを作成し、その結合部位と TMD2、6 の関係を生化学的に明らかにすることにより、 $\gamma$  セクレターゼによる基質認識の分子機構が明らかになるものと考えられる。また、APP TMD 内の側鎖を有する 12 ヘリックスペプチドを作成し、基質特異的な阻害剤の探索を行っていきたい。

近年、構造解析技術の進歩とともに TMD 間相互作用とそれに引き続く TMD のダイナミックな動きが様々な膜貫通蛋白質の機能に重要な役割を果たすことが明らかになっている。しかし親水性環境の蛋白質間相互作用に比べ、脂質二重膜内でのヘリックス面の認識による TMD 間相互作用の分子基盤はほとんど明らかになっていない。ヘリックス構造を安定に作り出し、かつアミノ酸側鎖を人工的に同一ヘリックス面に配置することが可能な  $\beta$  ペプチドをフォルダマーとして用いることにより、TMD 間相互作用の分子機構が明らかになるものと期待される。