

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 渡邊 直登

$\gamma$ 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、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。そこで申請者は $\gamma$ 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。

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(TM<sub>X</sub>mt)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、TM<sub>3</sub>mt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、TM<sub>4</sub>mtではPen-2との結合が失われ、TM<sub>1</sub>mt、TM<sub>5</sub>mt、TM<sub>8</sub>mt、TM<sub>9</sub>mt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、TM<sub>2</sub>mt、TM<sub>6</sub>mt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TM<sub>2</sub>mt、TM<sub>6</sub>mt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。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。

$\gamma$  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。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 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。

$\beta$  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。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。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する一方、触媒部位への影響はこれらの 2つ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。

申請者は 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出し、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期待される。

これらの成果はアルツハイマー病の病態解明と治療法創出に大きな知見を加えるものであり、博士 (薬学) の学位に相応しいものと判定した。