

# 論文内容の要旨

## 論文題目 フェニルピペリジン型 $\gamma$ セクレターゼモジュレーター的作用標的と機序の解明

氏名 大木 優

### [序論]

アルツハイマー病 (AD) は、進行性の認知機能障害を伴う神経変性疾患であり、脳内でのアミロイド $\beta$ ペプチド ( $A\beta$ ) の凝集・蓄積が重要な病因因子であると考えられている。 $A\beta$ は、アミロイド前駆体蛋白質である APP が最初に $\beta$ セクレターゼによる切断を受け、

その C 末端断片 (APP-CTF) が $\gamma$ セクレターゼの直接の基質となり産生される。そのため、 $\gamma$ セクレターゼ活性を抑制する低分子化合物が AD の根本治療・予防につながると期待され開発が進められてきた。しかしながら、 $\gamma$ セクレターゼは APP のみならず Notch を始めとする多様な基質を切断するため、 $\gamma$ セクレターゼを全般的に阻害する薬剤は副作用が危惧され、現実には、 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤 Semagacestat の第 3 相治験は最近中止された。 $\gamma$ セクレターゼの産出する  $A\beta$ には C 末端長の異なる様々な分子種が知られており、そのなかでも 42 アミノ酸からなる  $A\beta_{42}$  が最も病原性の高い分子種と考えられている。現在、 $A\beta_{42}$  の産生を特異的に抑制し、他の基質の切断を阻害しない $\gamma$ セクレターゼ

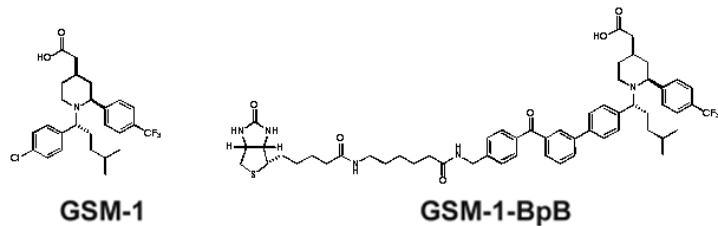


図1. GSM-1とGSM-1-BpBの化学構造式

モジュレーター（GSM）と呼ばれる一連の化合物が、副作用の少ないアルツハイマー病の根本的治療薬として期待されている。GSM は $\gamma$ セクレターゼ活性を完全に抑制することなく  $A\beta_{42}$  産生を低下させる一方で、 $A\beta_{38}$  産生を上昇させるが、その標的分子及び作用機序は明らかではなかった。そこで本研究において私は、フェニルピペリジン骨格を有し、脳移行性が比較的高い強力な GSM である化合物 GSM-1 に着目し、ケミカルバイオロジック的手法を用いその標的分子の同定、およびその作用機序の解明を目的として、研究を遂行した。

## [方法・結果]

### 1. フェニルピペリジン型 $\gamma$ セクレターゼモジュレーターGSM-1の標的分子の同定

$\gamma$ セクレターゼは Presenilin (PS)、Nicastrin (Nct)、Aph-1、Pen-2 の4種の膜タンパク質により構成される膜タンパク質複合体である。活性型 $\gamma$ セクレターゼ複合体において PS は断片化され、N 末端断片 (NTF) と C 末端断片 (CTF) になる。まず Sf9 細胞より精製した $\gamma$ セクレターゼ複合体および $\gamma$ セクレターゼ基質である APP-CTF を用いた *in vitro* assay を行ったところ、GSM-1 が  $A\beta_{42}$  産生を抑制した。そこで光親和性標識法により GSM-1 の標的分子の同定を試みた。光親和性標識法は、UV 照射により近傍のアミノ酸と共有結合を形成するベンゾフェノン基と、アビジン-ビオチン結合を利用した精製に適するビオチン基を導入し、低分子化合物の標的分子を同定する手法である。我々は GSM-1 の構造活性相関解析を行い、光感応基ベンゾフェノンとビオチンを組み込んだ光親和性標識法に適する分子プローブ GSM-1-BpB を作出した (図 1)。マウス脳および PS1/2 ノックアウト MEF (DKO) 細胞膜画分に、GSM-1-BpB を用いて光親和性標識実験を行い、PS1 NTF が GSM-1-BpB の特異的な標的分子であることを明らかにした (図 2)。

### 2. GSM-1 の結合領域の同定

PS1 NTF 内の GSM-1 結合部位を同定する目的で、PS1 の N 末端側および膜貫通領域 (TMD) の間にトロンビンプロテアーゼにより特異的に切断される配列 (LVPRGS) を組み込んだ変異 PS1 (Th60N、Th1、Th3) を作成した。これらの変異体はいずれもトロンビン処理により特異的な切断を受け、またいずれの変異体も $\gamma$ セクレターゼ活性を有し、GSM-1 に対して感受性

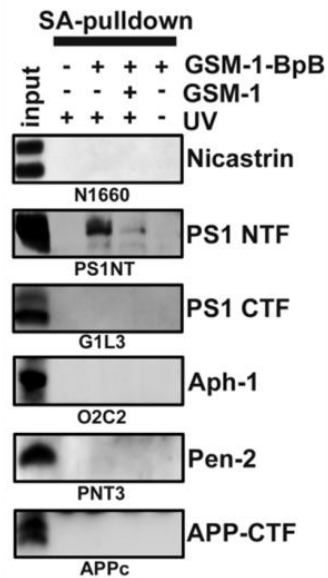


図2. GSM-1-BpBを用いた光親和性標識実験

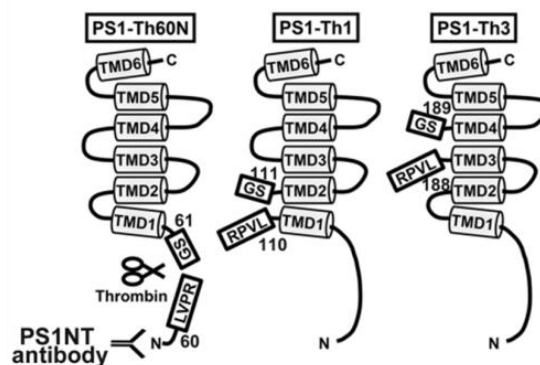


図3. トロンビン切断配列を組み込んだPS1変異体の模式図

であった。またこれらの切断断片は PS1 の最 N 末端を含むため、N 末端を認識する抗体による検出が可能である (図 3)。これらの変異体 PS1 を発現させた DKO 細胞の膜画分を用い、GSM-1-BpB による光親和性標識実験を行った後、トロンビン処理により部位特異的な切断を行い、アビジンビーズにより標識されたタンパク質断片の精製を行った。その結果 Th1 および Th3 の切断断片は精製されたが、Th60N の切断断片は回収されなかった。すなわち、61-110 番残基の間に GSM-1-BpB の結合領域があると考えられた

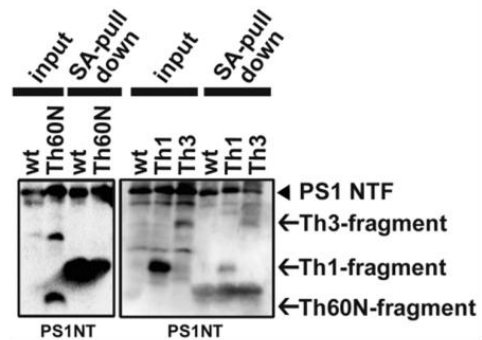


図4. GSM-1-BpBを用いた光親和性標識実験後のトロンビン切断実験

(図 4)。さらに N 末端領域の 79 アミノ酸を欠失した PS1 変異体 ( $\Delta 2-79$ ) でも GSM-1 作用が観察されたことから、GSM-1 の標的が第 1 膜貫通領域 (78 から 100 番目のアミノ酸で構成される) に存在すると考えられた。そこで第 1 膜貫通領域を同じ配向性を持つ他の膜タンパク質である CLAC の TMD に置換した変異体を用い、光親和性標識実験を行ったところ、GSM-1-BpB との結合が失われた (図 5A、5B)。更に、TMD1 を含む大腸菌由来精製リコンビナントタンパク質が GSM-1-BpB と結合したことから、TMD1 が GSM-1 の結合部位であると結論した。

### 3. GSM-1 の構造に与える効果の解析

PS1 は活性中心構造と基質結合部位を有する  $\gamma$ セクレターゼの触媒サブユニットである。GSM-1 がこれらの機能部位へ与える影響を評価することを目的とし、活性中心に結合する光親和性プローブである L-852,646 および基質結合部位に結合する pep.11-Bt による光親和性標識実験を行った。GSM-1 存在下において、いずれのプローブも PS1 との結合の減弱が観察された。すなわち GSM-1 がこれらの化合物と同じ部位に結合しているか、結合部位の構造変化を惹起している可能性が示唆された。そこでこれらのプローブの親化合物である L-685,458 や pep.11 存在下で GSM-1-BpB を用いた光親和性標識実験を行ったところ、GSM-1-BpB と PS1 の結合に影響は見られなかった。すなわち GSM-1 が直接活性中心や基質結合部位に結合しているのではなく、アロステリックにこれらの機能部位の構造を変化させるものと考えた。

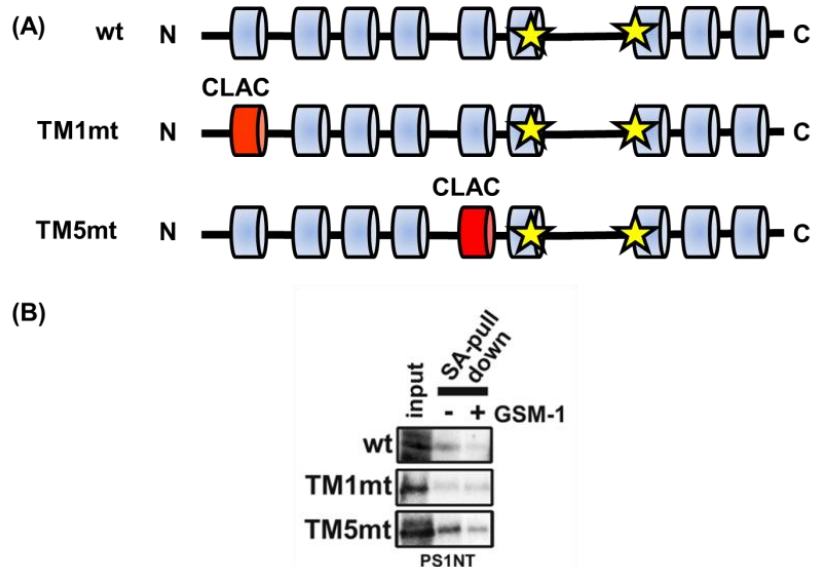


図5. (A)実験に使用したTMD swap変異体の模式図 (B)上記変異体のGSM-1-BpBを用いた光親和性標識実験

#### 4. GSM-1 作用メカニズムの生化学的解析

現在 $\gamma$ セクレターゼによる切断機構として細胞質側で切断が開始し生じた「長い」 $A\beta$ が段階的に切断を受けていくという“Successive cleavage”モデルが想定されている。このモデルでは、 $A\beta_{42}$  が産生される場合には APP-CTF から  $A\beta_{48} \rightarrow A\beta_{45} \rightarrow A\beta_{42} \rightarrow A\beta_{38}$  と段階的に切断され、一方  $A\beta_{40}$  は  $A\beta_{49} \rightarrow A\beta_{46} \rightarrow A\beta_{43} \rightarrow A\beta_{40}$  の別経路により産生されると考えられている。GSM-1 は  $A\beta_{42}$  量を減少させ、 $A\beta_{38}$  量を増加させる作用を有する。このモデルに従い GSM-1 の作用点を明らかにすることを目的に、私は *in vitro*  $\gamma$ セクレターゼアッセイを用いて APP-CTF からの  $A\beta_{42}$  産生過程を経時的に追跡した。その結果、GSM-1 は  $A\beta_{42}$  産生を減少させ  $A\beta_{38}$  産生を増加させるが、 $A\beta_{45}$  の産生に影響を与えないことを明らかにした (図 6)。また、 $A\beta_{40}$  や  $A\beta_{43}$ 、 $A\beta_{46}$  産生にも影響は生じなかった。以上の結果から、GSM-1 は、 $A\beta_{42}$  が切断を受けて  $A\beta_{38}$  を産生する過程に直接的に作用していると考えた。

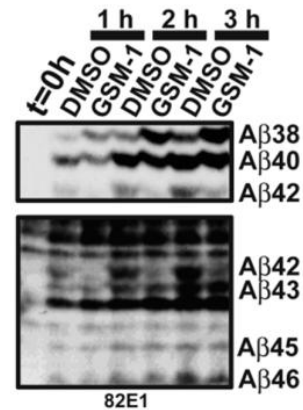


図6. GSM-1の $A\beta$ 切断へ与える影響

#### [まとめ・考察]

本研究において私は、フェニルピペリジン型 $\gamma$ セクレターゼモジュレーターである GSM-1 が PS1 の TMD1 を標的とし、活性中心および基質結合部位の構造をアロステリックに変化させることにより、 $A\beta_{42}$  産生を抑制し、且つ  $A\beta_{38}$  産生を上昇させることを見出し、 $\gamma$ セクレターゼを標的とする低分子化合物の作用部位を初めて明らかにした。今後は、 $A\beta_{42}$  産生制御の分子メカニズムを解明し、新たな観点から $\gamma$ セクレターゼモジュレーター作出を目指したい。

#### [謝辞]

本研究を遂行するにあたり、GSM-1 誘導体である光親和性標識プローブ GSM-1-BpB の合成にご協力頂いた東京大学大学院薬学系研究科天然物合成化学教室 横島 聡准教授、福山 透教授に深く感謝致します。

#### [参考文献]

Ohki Y., *et al.* Phenylpiperidine-type  $\gamma$ -secretase modulators target the transmembrane domain 1 of presenilin 1. *The EMBO Journal* 2011 Oct 14. doi: 10.1038/emboj.2011.372.