

論文の内容の要旨

論文題目 Presenilin 1 の構造活性相関解析に基づく γ -secretase 活性制御法の開発

氏名 高木 穂香

【序論】

アルツハイマー病 (AD) の発症機構においては、脳内に出現する老人斑の主要構成成分である amyloid β ペプチド ($A\beta$) の産生と蓄積が深く関与すると考えられている。そのため $A\beta$ 産生を行う酵素の 1 つである γ -secretase の活性制御は、AD の治療薬開発につながる方策として期待されている。一方 γ -secretase は、疎水性環境に存在する膜内配列を「加水分解」する新奇のアスパラギン酸プロテアーゼであり、その分子機構の詳細は明らかになっていない。さらに γ -secretase は 4 種の膜蛋白質から構成される巨大な複合体であり、構造生物学的に高難度の標的分子であるため、アミノ酸レベルでの構造機能連関の研究はほとんど進んでいないのが現状である。当研究室

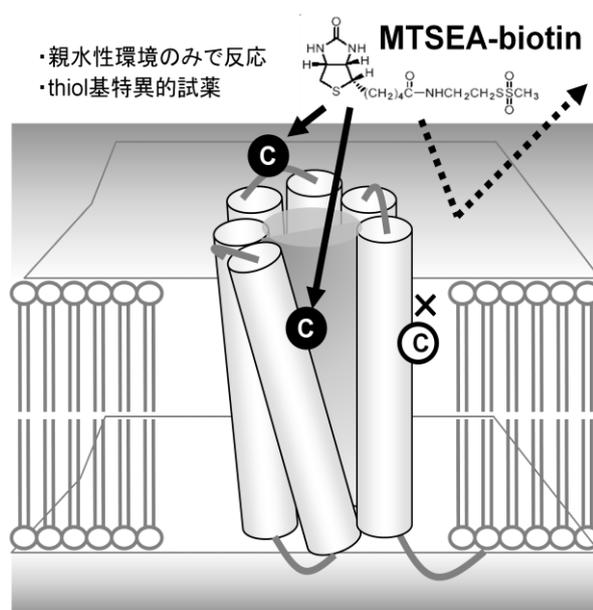


Fig. 1 SCAMによる構造解析の原理

膜外および膜内の親水性環境に存在するCysは標識される(黒丸)。一方、膜内の疎水性環境に存在するCysは標識されない(白丸)。

M139C の標識に対しては競合が生じた (Fig. 2b)。これらの結果から、TMD1 は G78 から I100、HL1 は K101 から M139 のアミノ酸から形成されることが明らかになった。さらに、酵素活性発揮時の構造変化を検出するべく、触媒部位を標的する遷移状態模倣型阻害剤 L-685,458、および基質結合部位に結合するヘリカルペプチド型阻害剤 pep15 の存在下で SCAM を施行した。特に脂質二重膜の境界に位置する G78 および I100 に着目すると、各阻害剤の存在下で G78C の標識が増加する一方、I100C については減少した (Fig. 2c)。これらの結果は、PS1 に基質が結合した際に、TMD1 が細胞質側へ動くことを示唆するものと考えた。

2. HL1 の一部は α -helix 構造をとり、基質結合部位の形成に重要である

HL1 のアミノ酸について SCAM による解析を行った結果、C 末端側に存在する領域 (T122 から S132) において、開いた親水性環境に面しているアミノ酸が 3 ないし 4 アミノ酸ごとに周期的に検出された。HL1 配列に相当するペプチドの CD スペクトルを測定したところ、 α -helix 構造を有することが示された (Fig. 3a 実線)。この α -helix 構造は二重プロリン変異 L130P/L134P の導入により消失した (Fig. 3a 点線)。そこで α -helix 構造の重要性を確認するため、L130P/L134P 変異型 PS1 の性状を解析した。その結果、この変異型 PS1 は γ -secretase 複合体を形成するが、酵素活性を欠いていた。そこで PS1 内の触媒部位および基質結合部位が形成されているか否かを、光親和性標識反応を利用して評価した。分子プローブとして、光反応性官能基であるベンゾフェノンおよび検出用ビオチン基を、触媒部位に結合する遷移状態模倣型阻害剤 (31C)、基質結合部位に結合するヘリカルペプチド型阻害剤 (pep11) に結合した、31C-Bpa および pep11-Bt を用いた (Fig. 3b)。その結果、L130P/L134P 変異型 PS1 は 31C と結合したが、pep11 との結合は見られなかった (Fig. 3c)。すなわち、L130P/L134P 変異型 PS1 では基質結合部位が正しく形成されないことが明らかとなり、HL1 中の α -helix 構造は基質結合部位形成に必須の役割を果たすものと考えられた。

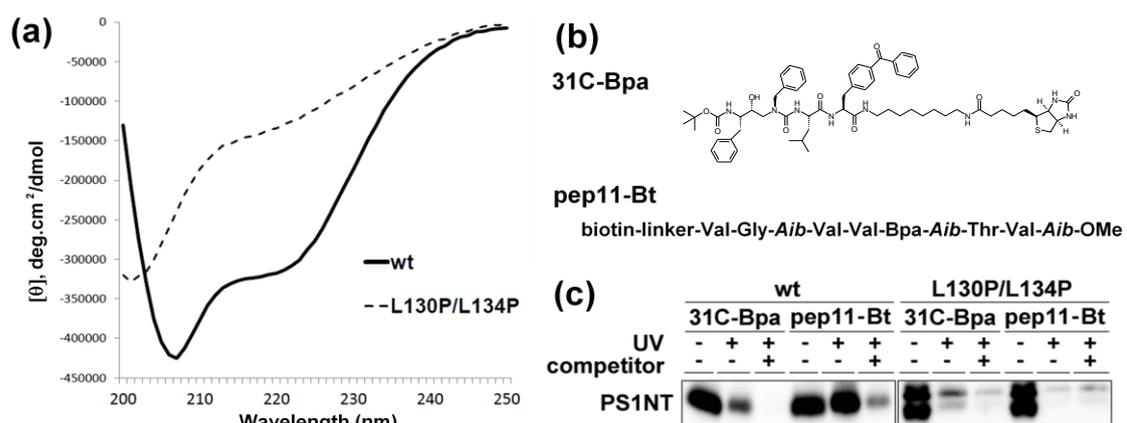


Fig. 3 PS1 HL1の構造機能解析

- (a) 野生型HL1ペプチドおよびプロリン変異型HL1ペプチドのCDスペクトル
- (b) 光親和性標識実験に使用した分子プローブ
- (c) 光親和性標識実験の結果 (抗PS1抗体で検出)

3. 抗 HL1 抗体は TMD1 の動きを制御し、 γ -secretase 活性を抑制する

近年、ループ領域に対するモノクローナル抗体が膜タンパク質の X 線結晶構造解析における結晶化リガンドとして頻用されている。上記の結果より、 γ -secretase 活性の発揮において TMD1 の動きと HL1 内の α -helix 構造が重要である可能性が示されたことから、抗 HL1 抗体を用いてこれらの領域を固定することにより、 γ -secretase 活性を制御しようと着想した。そこで、GST-HL1 を抗原としてラットモノクローナル抗体を作出し、培養細胞系において γ -secretase 活性を低下させる抗体 9D11 を取得した(Fig. 4a)。エピトープマッピングの結果、9D11 は、TMD1 の直後のアミノ酸 K101/S102(Fig. 4b)を認識することが明らかとなった。さらに 9D11 存在下で SCAM による解析を行った結果、MTSEA-biotin の反応性が G78C に対して上昇する一方、I100C に対しては減少したことから、9D11 は TMD1 の細胞質側への動きを誘発することが示唆された(Fig. 4c)。これらの結果から、抗 HL1 抗体を用いて TMD1 の動きを制御することにより、 γ -secretase 活性を制御可能であると考えられた。

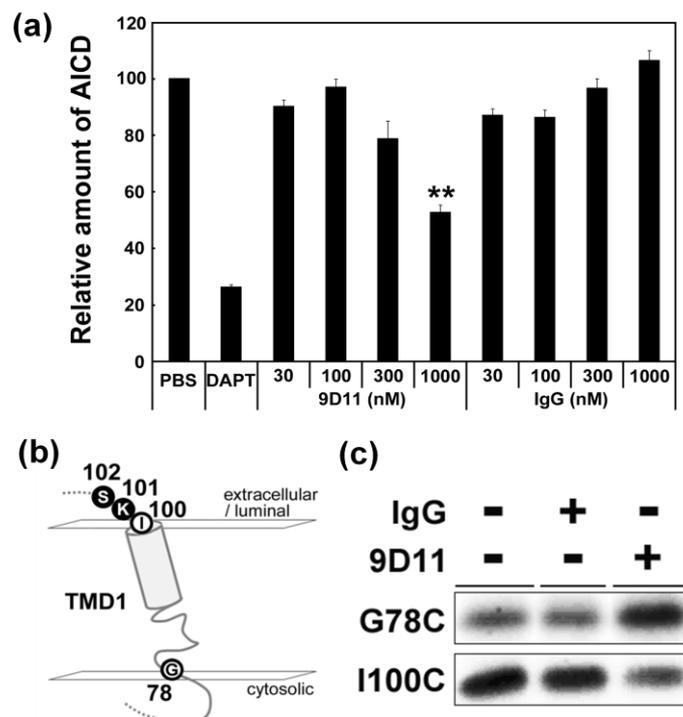


Fig.4 抗HL1抗体9D11の性状解析

- (a) 9D11が γ -secretaseにより産生されるAICD産生量に与える影響
 (b) エピトープマッピングの結果分かった9D11の認識部位(黒丸)と SCAMによる解析を行ったアミノ酸(白丸)
 (c) 9D11存在下でのSCAMによる解析結果(抗PS1抗体で検出)

【まとめ】

本研究において、私は PS1 TMD1 および HL1 の構造機能連関を明らかにし、それらの情報に基づいて抗 HL1 抗体による新規 γ -secretase 活性制御法を開発した。膜タンパク質の構造活性相関解析という観点から、脂質二重膜中で活性を保持した状態での構造情報の理解が可能である SCAM を解析法として用い、 γ -secretase 活性発揮時の TMD の動的挙動および基質結合部位形成に重要な領域を同定した。さらに本研究で作出した抗体は TMD1 の固定化を介して γ -secretase 活性を制御していると考えられ、膜内配列切断機構における TMD1 の動的挙動の重要性を示すものと考えた。本抗体は膜蛋白質の動きを制御することにより活性を変化させる中和抗体として、初めての報告例である。

【参考文献】

1. Takagi S, Tominaga A, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T. *J. Neurosci.*, 30, 15943-15950, 2010
2. Watanabe N, Takagi S, Tominaga A, Tomita T, Iwatsubo T. *J. Biol. Chem.*, 285, 19738-19746, 2010
3. Sato C, Takagi S, Tomita T, Iwatsubo T. *J. Neurosci.*, 28, 6264-6271, 2008