

論文の内容の要旨

論文題目

フェニルイミダゾール型 γ セクレターゼモジュレーターの 標的と作用機序に関する解析

氏名

竹尾 浩史

【序論】

認知症の代表的な原因疾患であるアルツハイマー病(AD)の発症には、アミロイド β ペプチド($A\beta$)の凝集・蓄積が寄与すると考えられている。 $A\beta$ は前駆体タンパク質である APP が β 及び γ セクレターゼによって切断を受け産生される。特に γ セクレターゼは膜内配列を切断する特異なプロテアーゼであり、その切断機構として、まず基質の細胞質側で切断が生じ(ϵ 切断)、後にヘリックス面に沿って3ないし4アミノ酸ごとに基質の N 末端方向に順に切断が進行する(γ 切断)という「段階的切断」モデルが考えられている。 γ 切断の切断部位には多様性が存在し、様々な C 末端長をもつ $A\beta$ が産生、分泌される(図1A)。特に42アミノ酸からなる $A\beta_{42}$ は凝集性・毒性が高く、 $A\beta_{42}$ の産生を抑制する薬物が AD の治療や予防につながると期待されている。 γ セクレターゼモジュレーター(γ -secretase modulator, GSM)は基質の総切断量を変えずに、 γ 切断に影響を与え、 $A\beta_{42}$ などの長い $A\beta$ の産生を減少させ、短い $A\beta$ の産生を増加させる性質をもつ(図1B)。 γ セクレターゼは Presenilin(PS)、Nicastrin、Aph-1、Pen-2 の4つの膜タンパク質からなる複雑な構造を有する特異な膜内配列切断酵素であることから、GSM の分子機構の理解は従来困難であった。そのため、私は光親和性標識という化合物を起点とした手法を用いて、GSM の分子機構の解明を目標に研究を行った。

【結果・考察】

1. フェニルイミダゾール型 GSM は γ セクレターゼ複合体の PS NTF、Aph-1 に結合する

本研究ではフェニルイミダゾール骨格とトリアゾール環を有する GSM である ST1120 を用いた。ST1120 は、精製した γ セクレターゼ複合体を用いた *in vitro* 反応においても薬理作用を有したことから、

γ セクレターゼ複合体に直接作用していることが予想された。そこで天然物合成化学教室との共同研究により誘導體化と構造活性相関の解析を行い、UV 照射によって近傍の分子と共有結合を形成する光反応基ベンゾフェノンと、精製を可能にするビオチン基を有する光親和性標識プローブ ST2038 を作出した(図1C)。

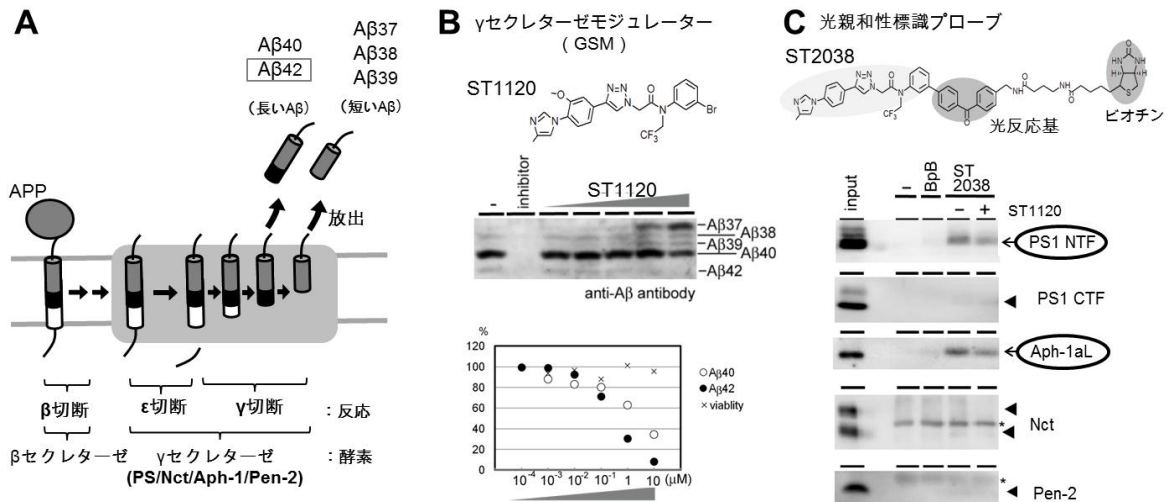


図1. GSMの薬理作用と作用標的

A. A β 産生の模式図。 γ セクレターゼは段階的の切断によって多様なA β を産生する。このうちA β 42は毒性が高い。B. 本研究に用いたGSMの薬理作用。HEK293細胞に基質を発現させた上清中のA β をウェスタンブロットとELISAで検出した。C. 光親和性標識プローブによりマウス脳画分中の結合分子を検出した。

マウス脳膜画分に光親和性プローブ ST2038 を添加して UV を照射した後、プローブに共有結合したタンパク質をストレプトアビジンビーズにより回収し、 γ セクレターゼ構成因子に対する抗体を用いてウェスタンブロットで検出した。PS は活性型 γ セクレターゼにおいては自己断片化により N 末端断片 (NTF) と C 末端断片 (CTF) に分かれて存在するが、PS1 の NTF と Aph-1aL に ST2038 の特異的な標識が見られた(図 1C)。また PS1 の相同分子である PS2、および Aph-1aL のスプライスバリエントである Aph-1aS も標識されたことから、ST2038 は PS NTF と Aph-1 に結合することが示唆された。

2. フェニルイミダゾール型 GSM は PS の TMD2-6 に作用する

GSM の作用部位をさらに詳細に同定することを目的とし、生化学的・分子生物学的解析を行った。

2-1. PS1/2 キメラ分子に対する薬理作用からの絞り込み

PS1 と PS2 のアミノ酸配列は約 70% が共通している。しかし、PS1、PS2 のそれぞれに対する ST1120 の用量作用曲線を描くと、A β 40 や A β 42 産生に対する IC₅₀ は PS2 で 10 分の 1 程度低いことが分かった。そこで PS1、PS2 のキメラ分子を作成して GSM への応答性を比較した。その結果、PS1 の TMD1-6 を PS2 配列に置換した PS1-2-1 キメラ分子は PS2 に GSM 応答性が類似し、その逆である PS2-1-2 分子の応答性は PS1 に類似していた(図 2A)。このことから、ST1120 の薬効に重要な構造は TMD1-6 に存在することが示唆された。

2-2. 切断配列導入による標識部位の絞り込み

PS に thrombin 切断配列を導入し、光親和性標識後に切断することによって標識部位の絞り込みを行った。PS1 の第一ループに存在する第 111 番残基直下に切断配列を導入し、C 末端断片の検出のため、自己断片化を防ぐ M292D 変異を加えた(図 2B)。ST2038 にて標識後、thrombin を加えて PS を切断し、NTF、CTF に対する抗体で検出すると、C 末端側がより効率よく標識された(図 2A)。1.の結果と

合わせ、ST2038 は主に TMD2-6 を含む 112-292 アミノ酸残基の間に結合することが示された。

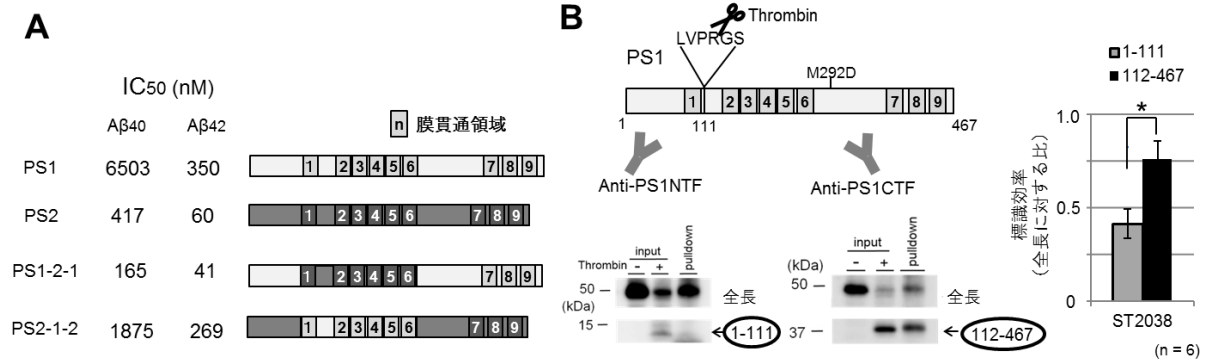


図2. PS 内の作用部位の探索

A. PS1,2 のキメラ分子を作製し、ST1120 による Aβ₄₀ 及び Aβ₄₂ に対する IC₅₀ を算出した。

B. PS1 に Thrombin 切断配列を導入し、標識した断片をウェスタンブロットで検出した。さらに標識効率を全長の標識に対する比として算出した。*, P < 0.05 (t 検定)。

3. フェニルイミダゾール型 GSM は γ セクレターゼの activator である

3-1. 遷移状態アナログの結合の増加

GSM の薬理学的作用機序を検討するために、各種 γ セクレターゼ阻害剤の結合に対する ST1120 の影響を調べた。その結果、ST1120 存在下では、遷移状態アナログ由来であり、活性中心に直接結合することが想定されている光親和性標識プローブ 31C-Bpa の結合が約 4 倍増加することが分かった(図 3A)。この結果から、ST1120 は遷移状態の形成を容易にすることが示唆された。

3-2. FRET 基質の切断の増加

可溶化した精製 γ セクレターゼ複合体と短いペプチドからなる FRET 基質の反応を利用し、全酵素活性に対する ST1120 の影響を解析したところ、γ セクレターゼの酵素活性は ST1120 添加によって濃度依存的に最大約 4 倍まで増加することが分かった(図 3B)。これらの結果から、フェニルイミダゾール骨格を持つ GSM は γ セクレターゼの activator であることが示唆された。

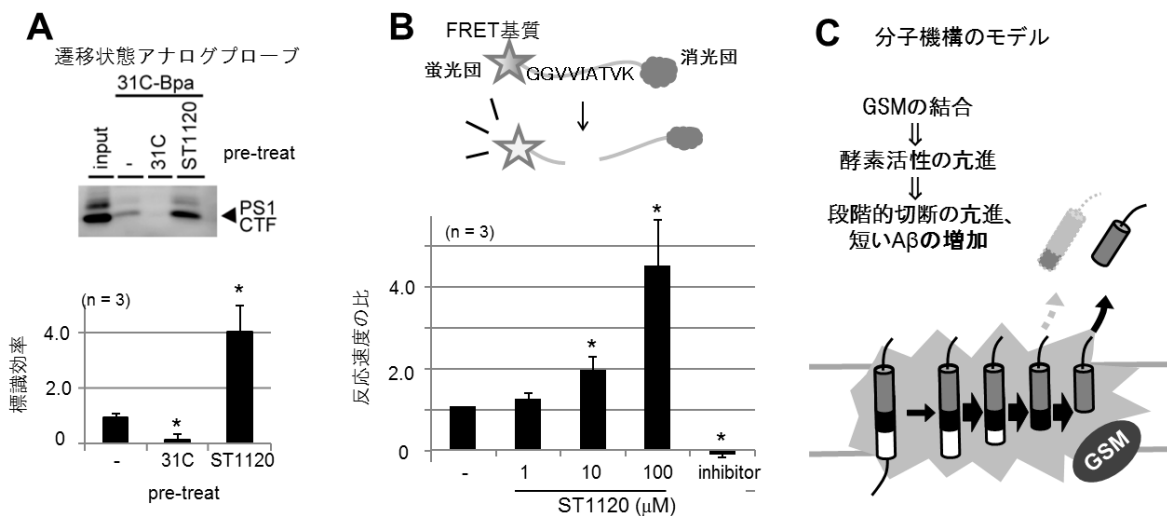


図3. GSM の酵素活性に対する影響

A. 遷移状態アナログ由来のプローブ 31C-Bpa の標識量に対する化合物の前処理の影響を比較した。B. 可溶化条件において精製 γ セクレターゼと FRET 基質を反応させた。A.B. 共に無処理群を 1 とし、溶媒添加群に対して t 検定を行った。*, P < 0.05。C. 分子機構のモデル。GSM は酵素活性を亢進させた結果、段階的切断が亢進し、短い Aβ の産生を増加させる。

【総括】

私は本研究において、ST1120 が PS タンパク質の TMD2-6 領域および Aph-1 分子に結合し、酵素活性を増加させることを示した。これらの結果から、フェニルイミダゾール骨格を持つ GSM の薬理作用として、アロステリックな機序により γ セクレターゼの触媒サブユニットである PS の活性中心構造に影響を与えて酵素活性を増加させた結果、 $A\beta$ (主に分泌される $A\beta_{40}$ や $A\beta_{42}$) の段階的切断がもう 1 段階多く生じ、 $A\beta_{37}$ や $A\beta_{38}$ などの短い $A\beta$ 分子種の産生が増加する、というモデルを想定した(図 3C)。本研究の成果は、アルツハイマー病の治療への応用が期待される GSM の作用メカニズムについて新しい知見を与えると同時に、化合物によるプロテアーゼのモジュレーションという新たな創薬標的を提示するものである。

【謝辞】

GSM の合成、誘導体化は天然物合成化学教室横島聡先生、福山透先生との、31C-Bpa は名古屋市立大学薬学部梅澤直樹先生、樋口恒彦先生との共同研究であり、ここに深謝いたします。

【発表論文】

K. Takeo, N. Watanabe, T. Tomita and T. Iwatsubo, *J Biol Chem* **287**, 25834-25843 (2012)