

審査の結果の要旨

氏名 蔡 哲夫

【序論】

認知症患者数は全世界で4600万人を超えると見積もられ、その予防・治療法の確立は急務である。アルツハイマー病（AD）は高齢者の認知症を最も多くを占める神経変性疾患である。これまでの研究から、ADの病理学的特徴である老人斑を形成するアミロイドβペプチド（Aβ）の凝集及び蓄積がAD発症に寄与するとする、「アミロイド仮説」が広く支持されている。

AβのC末端長には多様性があり、中でもAβ42は最も凝集性と毒性が強い。その為、C末端側の切断を行う膜内配列切断酵素であるγ-secretaseの反応機構の解明は注目されている。特に、毒性種Aβ42産生時に生じる構造ダイナミクスの変化は活性制御法の開発に重要であると考えられる。近年、電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析技術の向上により、その立体構造が解明されつつあるが、酵素を構成する各タンパクドメインなどの生体膜内の動的な変化の追跡は依然難しく、構造ダイナミクスの変化の理解を深める障壁となっている。そこで本研究では、生化学的手法を用いることでγ-secretaseの構造活性相関にアプローチする着想に至り、研究を遂行した。

【方法と結果】

1. PS1のTMD3は活性中心ポアを構成するドメインである

γ-secretaseの活性中心サブユニットであるpresenilin 1 (PS1)は内部に活性中心ポアを保持し、そこで基質を切断する。またPS1の第3膜貫通領域（TMD3）は多くの家族性AD（FAD）変異が報告されており、Aβ42産生制御に関与すると考えられている。そこで、親水性環境下でSubstituted Cysteine Accessibility Methods（SCAM）を用い、TMD3が活性中心ポアに面するかを確かめる為、生細胞と膜画分に発現したPS1に対して標識実験を行った。SCAMは親水性環境下のCys基と特異的にジスルフィド結合を形成するMTSEA-biotinを用いることでタンパク質の構造や環境変化を検出する方法である。その結果TMD3の複数の残基で標識が確認され、標識残基の多くがヘリックスモデル上で片面に並んだ。これらの結果はTMD3が活性中心ポアを形成することを示唆している。

2. TMD3の膜内領域の決定

引き続き、TMD3の膜内領域の特定を試みた。膜内領域の特定を行ったのは、TMD3の細胞質側と内腔側の境界を知ること、今後のTMD3の構造や機能解析を細胞質側と内腔側両方から網羅的に行うことを考えたからである。まずTMD3細胞質側の境界残基を特定する為、各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現するDKO細胞のmicrosome画分を用いたSCAMを行った。Microsome画分はright-side-outとinside-outの両配向性が混合する為、intact cellとは異なり通常はaccess不可能な細胞質側親水性環境に面するcysteineも標識することが可能になる。その結果、K160Cから大幅な標識の減少が確認された。実際K160CはCys(-)に比して多少のラベルが確認されており、構造的には部分的に細胞膜内に埋もれていると考えられ、K160がTMD3細胞質側末端残基であるとされる。

続いて引き続きTMD3の内腔側の境界残基の特定も行った。ここでは3種類のMTS試薬（MTSES、MTSET、MTS-TEAE）を用いた。これらのMTS試薬はMTSEA-biotin同様Cys残基に結合するため標的アミノ酸のbiotin標識に対して競合するが、化合物の大きさや電荷によって狭い親水性環境には入り込めず、膜外領域の残基のラベルのみを競合減弱させることが可能である。特にMTS-TEAEはその嵩高さから細胞膜外領域の親水性環境に位置するCys基のみに反応し、結合するとされている。この標識競合実験の結果、G183Cのラベルが3種類のMTS試薬全てによって減弱されることが確認された。即ち、G183からTMD3の内腔領域が始まり、その直前のL182が内腔側境界に位置するアミノ酸であることが判明した。以上の結果より、TMD3の膜内配列はK160からL182までであることが明らかとなった。

3. PS1 の TMD3 周りの活性中心ポアは酵素活性によって変動する

酵素学的解析から、 γ -secretase 活性が部分的に抑制されると A β 42 の産生量が上昇し、活性化すると A β 42 の産生量が低下することが示されている。これらの活性変化と TMD3 周囲の活性中心ポアの相関関係に迫る為、A β 42 産生変動時に引き起こされる活性中心ポアの変化を SCAM で解明した。まず A β 42 産生比率を増加させる FAD 変異 (P117L、M139V、F177L、E184D) を PS1 に導入し、TMD3 周辺の親水性の変動を SCAM にて解析した。その結果、TMD3 の細胞質側 F177 残基のラベルが特に強く減弱することが共通の現象として確認された。

一方、A β 42 産生を減少させる人工遺伝子変異として見出した V236S や、 γ -secretase modulator である ST1120 を用いた結果、いずれも L166C と F177C 両方のラベルの著しい増強が認められた。即ち、 γ -secretase 活性化時には TMD3 周囲の活性中心ポアの拡張を通じて A β 42 の更なる切断が促進されることが考えられ、特に A β 42 の産生が減少する時には TMD3 周囲の活性中心ポアが全体的に増加することが示唆された。

4. TMD3 の細胞質側の構造変化が γ -secretase 活性を制御する

これまでの検討で、A β 42 産生の変動と TMD3 の面する活性中心ポアの関係性を明らかにした。しかしながら、SCAM で用いた MTSEA-biotin は水分子の存在下で cysteine の thiol 基と反応することから、標識率増加は正確には活性中心ポアの増大ではなく水分子の存在量の増加、及び親水性の増強を反映しているに過ぎない。そこで本研究では続いて A β 42 の産生を制御する TMD3 の構造変化そのものに焦点を当て、検討した。ここでは、クロスリンカー存在下の γ -secretase 活性の変化を測定した。クロスリンカーは 2 つの Cys 基を架橋させ、これら Cys 基が存在するドメイン間の位置関係を固定することができる。本研究では TMD7 に位置する活性中心 D385 に近い L383 と I387 と選択し、それぞれ L166 と F177 と架橋させた。クロスリンカーは、L383-L383 間と F177-I387 間の距離を最短距離で結べる Cupper-Phenanthroline (Cu-PNT) 触媒もしくはクロスリンカー M8M を用いた。それぞれの残基間を最短距離で結ぶと残基間で拡大する構造変化が阻害される。その為、仮に標的残基間の拡大が A β 42 産生減少に重要なものであれば、その動きを阻害した場合に化合物等による A β 42 産生減少効果が無くなるだろうと考えた。

本検討では A β 42 産生を減少させる γ -secretase modulator である E2012 を用い、*in vitro* 再構成系で産生した A β を測定した。その結果、L166 と L383 を Cu-PNT で直接架橋させた場合に E2012 の A β 42 減弱効果が無くなることを見出した。すなわち、L166 と L383 の間の距離を固定した場合に γ -secretase 活性は上昇しなくなることが明らかとなり、 γ -secretase 活性は TMD3 の細胞質側の構造変化によって制御を受けていることが示唆された。

【総括】

本研究で、AD 発症の契機となる毒性種 A β 42 の産生制御はその切断を担う γ -secretase の PS1 の構造変化を伴っていることを明らかにした。特に、PS1 の TMD3 が面する活性中心ポアが拡大し、TMD3 と活性中心の距離が増大することによって γ -secretase 活性の亢進と A β 42 産生の低下が引き起こされることが明らかとなった。

近年、クライオ電子顕微鏡によって γ -secretase と基質の複合体の構造が解かれ、TMD3 の細胞質側が、基質の切断部位近傍に位置していることが明らかとなっている。一般的に基質となる膜貫通領域は脂質二重膜中では α ヘリックス構造をとり安定であるため、加水分解を受けるメカニズムは不明であった。しかし γ -secretase による切断時に活性中心ポアに取り込まれている基質の切断部位周辺の α ヘリックス構造は解かれているとされており、このプロセスに TMD3 が関与していることが推測される。今後は生化学的手法やシミュレーション等を合わせて複合的に解析し、TMD3 の構造変化や切断部位付近の親水性環境の変化が酵素活性や A β 42 切断効率を制御する詳細なメカニズムについて検討を進め、ゆくゆくは TMD3 を標的とするより強力な AD 治療薬の創出に貢献したい。

以上の通り、本研究は AD の治療薬開発に大きく貢献するものであり、よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。