

◆序論

アミロイドβペプチド (Aβ) の産生及び蓄積は、Alzheimer 病 (AD) の発症に関与している。前駆体タンパク質 APP よりβおよびγセクレターゼによる段階的切断によって産生される Aβには C 末端長の多様性が知られ、特に凝集性の高い Aβ42 が AD 発症に深く関与する。γセクレターゼは、Aβの C 末端側の切断に関わる一方、シグナル分子である Notch 分子などの種々の基質も切断するため、AD の治療・予防薬として考慮する場合、単純な活性阻害のみでは副作用が問題となる。このため、γセクレターゼによる切断メカニズムと構造情報に基づく、特異的活性制御法の開発が求められている。γセクレターゼは、活性中心サブユニット Presenilin1 (PS1) に加え、Aph-1、Nicastrin、Pen-2 の 4 者からなる膜タンパク質複合体である。PS1 は 9 回膜貫通型タンパク質であり、その第 6、7 膜貫通領域 (TMD6、7) の中央に活性中心アスパラギン酸が存在する。当研究室では、脂質二重膜内で活性を保持した状態の構造を検出できる Substituted Cysteine Accessibility Method (SCAM) とクロスリンキング法を用いて、PS1 の構造解析を行ってきた。SCAM とは、任意のアミノ酸残基にシステイン変異を導入し、親水性環境下でシステイン特異的に反応する MTS 試薬を反応させることで、親水性環境を検出する手法である。これまでに PS1 の TMD1、6、7、9 が『活性中心ポア』構造を形成していることが明らかになっている。申請者は修士課程において、Pen-2 との結合領域として知られている TMD4 の親水性領域を特定した。本研究では TMD4 と他の TMD の位置関係を明らかにし、その構造と Aβ42 産生との関係を検討するとともに、家族性アルツハイマー病 (FAD) 変異が多く知られている TMD5 の解析も行った。

◆方法・結果

【1】 システイン変異体を作製し、活性が保持されることを確認した

G217C から Y240C までの TMD5 周辺のアミノ酸残基について、内在性システインをセリンに置換した Cys less PS1 に対して各アミノ酸残基に 1 つずつシステインを置換した単独システイン変異体を作製し、Aβ産生と Notch 切断 (NICD) を ELISA と Western blotting 法により確認した。その結果、今回作出した全ての変異体において、活性が保持されていることを確認し、これらの変異体を用いて以下の実験を行った。

【2】 TMD5 は親水性環境に面し、γセクレターゼによる切断に関連するアミノ酸残基を含む
TMD5 に関して、親水性環境に面する残基を特定するために、SCAM による解析を行った。その結果、L226 と V236 が膜内で親水性環境に面し、これら以外の L221 から F237 までのアミノ酸残基は疎水性環境に存在していることが明らかとなった。次にγセクレターゼ阻害剤 (GSI) を用い、SCAM における競合実験を行った。L-685,458 は遷移状態模倣型の GSI であり、活性中心に直接結合する。pep15 は、基質が最初に結合する時のαヘリックス構造を模倣し、基質結合部位に結合する。I213 と L226 の標識は L-685,458 で競合された。V236 は L-685,458 と pep15 処理によってラベル量が増加し、より親水性環境に露出する構造変化を示した。I238 の標識は L-685,458 と pep15 により競合された。ラベルの競合が生じた原因として、GSI の直接の結合部位である可能性、アロステリックな構造変化による可能性などを想定した。以上より、TMD5 に存在するこれらのアミノ酸残基はγセクレターゼによる切断に関連しているアミノ酸であることが示唆された。

【3】 TMD4 の細胞質側と TMD5 は、活性中心ポアに面していた

これまでに解析したアミノ酸の中で、親水性環境に面し GSI 処理によって周辺環境に変化が見られた TMD4 の M210、I213、そして TMD5 の L226、V236、I238 に関して、クロスリンキング法を用いて活性中心や他の TMD との位置関係を調べた。クロスリンキング法には、リンカー長の異なる MTS クロスリンカー (M2M、M17M など) もしくは直接架橋を促す触媒 (CuPNT) を用いた。検討を行ったアミノ酸残基は、いずれも活性中心ポアに面する既知のアミノ酸残基 (活性中心モチーフに含まれる L383、TMD7 の細胞外側の I387、TMD9 の細胞質側の L435) とクロスリンクされたことから、TMD4、TMD5 はともに活性中心ポアに面していることが明らかとなった。特に I213、L226 は CuPNT によりクロスリンクされたことから活性中心構造に近接していると推測された。また TMD5 の細胞外側に存在する I238 は、同様に pep15 で競合する D450 とクロスリンクされ、pep15 の結合部位、すなわち基質結合部位を構成しているアミノ酸残基であると考えられた。

【4】 Aβ42 切断の亢進時には TMD4 の I213 と活性中心近傍の L383 が近接する構造をとる

TMD4 の疎水性環境と親水性環境の境界部分に存在する 2 つのグリシン残基には、多くの FAD 変異が同定されている。また、活性中心ポアに面し、L-685,458 処理により MTSEA-biotin のラベルが減少する I213 にも多くの FAD 変異が知られている。今回 SCAM による検討から、TMD4 の細胞質側は細胞膜内のポア構造に入り込み、活性中心構造に寄与していることが明らかとなった。そこで、FAD で増加し、病因タンパク質と考えられている Aβ42 の産生比率と、I213 と L383 間の距離の関係を検討した。まず、γセクレターゼに作用し Aβ42 の産生比率を低下させることが報告されている化合物 GSM-1 による処理後、I213 と L383 間の距離をクロスリンク実験の結果から推定した。GSM-1 処理により Aβ42 産生が低下したとき、クロスリンクのバンド強度が増加し、I213 と L383 の 2 つのアミノ酸残基の距離が近接することが明らかとなった。一方、Aβ42 産生比率を増加させる FAD 変異を導入し、同様に検討すると、クロスリンクのバンドが減少し、これらのアミノ酸残基の距離が離れることが示唆された。これらの結果から、Aβ42 産生活性の変化に呼応して、I213 と L383 間の距離が変化することが示された。

◆考察

本研究において、申請者は SCAM により PS1 の TMD4 と TMD5 の構造情報を収集し、TMD4 の細胞質側アミノ酸残基は膜内ポア構造に入り込んで活性中心構造を形成していること、TMD5 は細胞質側も細胞外側も活性中心ポア構造を形成することを明らかにした。特に、TMD4 の細胞質側において、Aβ42 産生と協調して変動する構造変化を同定した。TMD5 に関しては、作用機序の異なる 2 種類の GSI が、その細胞外側部分周辺の親水性環境に同様な変化を惹起したことから、基質切断の過程において重要な領域であると考えられた。これらの結果から、ヘリックス構造をもつ基質が、TMD5 と TMD9 の細胞外側に結合した状態で活性中心ポアに入り込み、TMD4 や TMD5、そして TMD1、TMD7、TMD9 の細胞質側領域により形作られた広い親水性環境の中で、細胞質側のヘリックスがほどけると同時に切断されると想定された。またこれらの領域によって形作られるポア構造の変化が、Aβ分子種の切り分けを制御するものと考えた。今後、切断メカニズムの詳細をさらに明らかにすることにより、γセクレターゼをはじめとする、膜内配列切断酵素の制御機構の解明が期待される。以上の通り、本研究は AD の治療薬開発に大きく資するものであり、博士 (薬学) の学位に相応しいものと考えられる。