

## γセクレターゼのエクソサイトを標的とするアルツハイマー病の治療薬の開発

福森亮雄

国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター 分子基盤研究部 認知症病態解析室

### 【研究の背景】

認知症、特に患者数の多いアルツハイマー病(AD)の対策が急務である。現在、AD 患者の脳に蓄積するアミロイドβ 蛋白(Aβ)を除去する Aβ 抗体療法がフェーズ III 治験中で、有望視されている。ただ、抗体療法により Aβ を除去しても、Aβ は生理的に産生され続けるため、引き続き維持療法が必要となる。維持療法としては、一旦産生された毒性 Aβ を分解する抗体療法(高価、静注)よりも、毒性 Aβ の産生自体を止める化合物ベースの薬(安価、経口)が望まれるだろう。これまでに開発された Aβ 産生阻害薬の一つにγセクレターゼ阻害薬があるが、Aβ 産生阻害に伴い、発生や成体で必須の Notch の切断阻害による副作用がおり、臨床応用できていない。これは一般的な蛋白分解酵素阻害薬と同様に、酵素触媒部位を標的としている為、特定の基質(酵素に切断される分子)のみを選択して阻害出来なかったからだと考えられる(図 1)。それに対して、我々が発見した基質の結合部位(エクソサイト、図 2)は、酵素触媒部位よりも上流に位置し、直ちに触媒反応を起こす酵素触媒部位とは異なり、酵素触媒部位へ輸送されない基質を再放出していると考えられる。そのため、エクソサイトでは基質の選別がおこると考えられ、この部位へのアミロイド前駆体基質のみの結合を阻害する(図 2、左上赤のストップマーク)ことで Notch による副作用を回避する創薬ができる可能性がある<sup>1)</sup>。

### 【目 的】

様々な基質がγセクレターゼのエクソサイトへ結合する機序の解明とその結合阻害因子を探索し、Aβ 選択的阻害薬の開発を目指す。今回、Aβ の前駆体である APP-C99 および APP-C83 が、γセクレターゼのエクソサイトへ結合する機序の解明に焦点を当て報告する。

### 【方 法】

アミロイド前駆体基質(APP-C99 および APP-C83)のγセクレターゼのエクソサイトへの結合の可視化は、ケミカルバイオロジーの技術のひとつである部位特異的光親和性クロスリンク法(図 3)を用いた<sup>2, 3, 4)</sup>。この手法により、分子の相互作用をアミノ酸レベルで検出できる。具体的には非天然アミノ酸(para benzoyl phenylalanine)の遺伝的取り込み法(図 4)を用いて、分子中の任意の 1 アミノ酸をクロスリンク可能な側鎖を

図1 従来の酵素触媒部位標的戦略

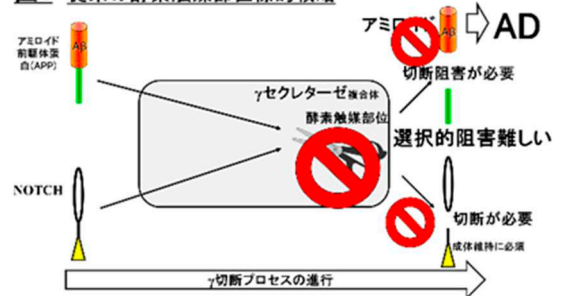


図2 新しいエクソサイト標的戦略

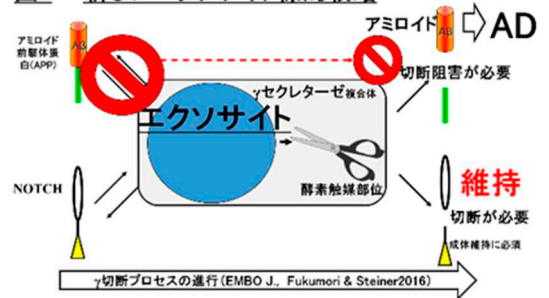
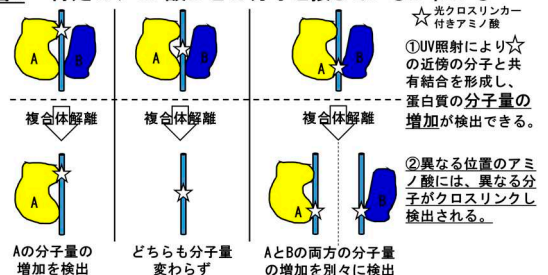
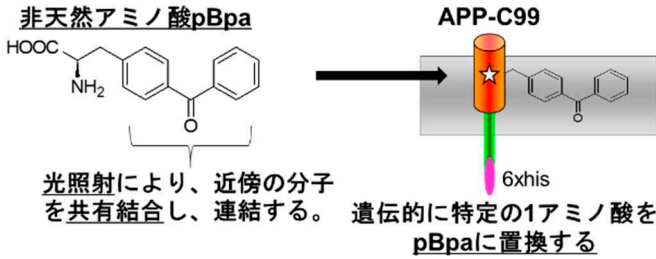


図3 特定のアミノ酸がどの分子と接しているかわかる

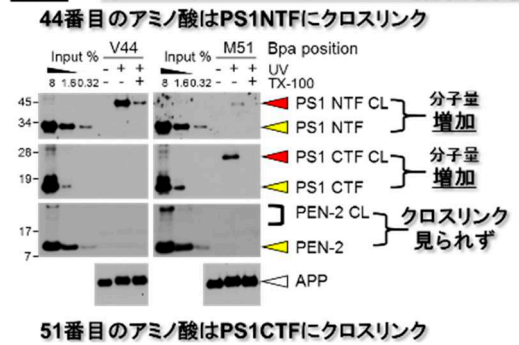


持つ非天然アミノ酸に置き換えたアミロイド前駆体基質を大腸菌に発現させ C 末端の HIS タグにより精製する。その精製基質を  $\gamma$  セクレターゼを含む細胞溶解液と混合し、インタクトな結合状態で、照射しクロスリンクさせる。その後、変性条件で、複合体を解離し、HIS タグを用いてプルダウンし、ウェスタンブロットする。基質と共有結合した酵素分子は分子量が増加する(黄矢頭が赤矢頭となる。図 5)。このようにして、基質分子中の各アミノ酸に接触する酵素分子を検出した。

**図4 光親和性クロスリンク可能な非天然アミノ酸の遺伝的取り込み法**

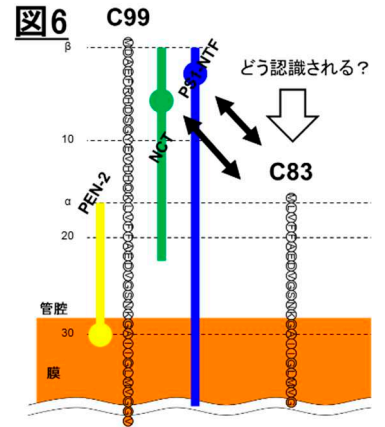


**図5 ウェスタンブロットでの結合評価**



**【結 果】**

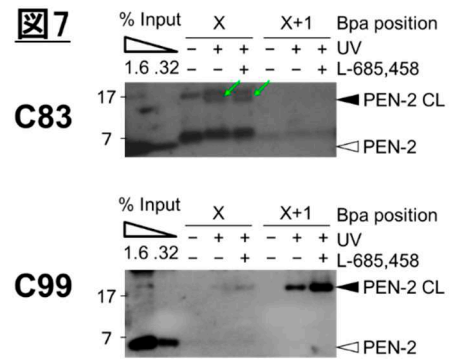
今回は  $\gamma$  セクレターゼの代表的な基質 APP-C83 に絞り、APP-C83 のエクソサイト結合の検出系を確立した。APP-C83 は、A  $\beta$  の直接の前駆体である APP-C99 と同じく、アミロイド前駆体蛋白 (APP) 由来の  $\gamma$  セクレターゼの基質であるが、APP-C99 とは異なり、アミノ末端の 16 アミノ酸が欠けている。この欠損 16 アミノ酸残基には、APP-C99 がエクソサイトと相互作用する主要なアミノ酸が含まれており、エクソサイトへの結合メカニズムについてなんらかの洞察が得られると考え、APP-C83 に焦点を当て解析した(図 6)。APP-C83 の部位特異的光クロスリンク法を用いて、単一アミノ酸レベルでの  $\gamma$  セクレターゼとの相互作用を直接調べた。図 7 はその代表的結合部位 X 番残基と X+1 番残基における結合を示した。 $\gamma$  セクレターゼのサブユニット蛋白である PEN-2 は X 番残基が強く相互作用した。それに対して、APP-C99 の PEN-2 との相互作用は X+1 番残基で強かった<sup>3)</sup>。このように、相互作用アミノ酸残基が異なっていた。



**【考 察】**

今回、APP-C83 もエクソサイト構成蛋白と相互作用することを示した。また、その相互作用するアミノ酸は、APP-C99 とは異なることを明らかにした。これらのことから、エクソサイトの結合にはアミノ酸配列の異なる基質を認識する柔軟性がある事がわかった。今後この柔軟性を回避できるようなエクソサイト阻害剤を探さなければならない。

**図7**



**【臨床的意義・臨床への貢献度】**

日本社会の超高齢化により、認知症患者数が著しく増え、大きな社会問題となっている。また認知症それ自体だけでなく、他の成人病にかかった人が認知症を併発し、治療が困難になるケースも増加している。本研究課題での成果をもとに、A  $\beta$  選択的阻害薬の開発が出来れば、これまで開発されてきた  $\gamma$  セクレターゼ阻害剤の問題点を克服した新規のアルツハイマー病治療薬開発につながり、多くの認知症患者さんを治療することが可能になるだろう。加えて、定期的な注射が必要な A  $\beta$  抗体療法に比べ、患者さんへの侵襲の少ない治療法となるだろう。さらに、それにより、認知症の患者だけでなく、その家族の負担を大幅に軽減できる可能性がある。

また、エクソサイトを標的とする治療法は、酵素が原因となる様々な病気に対する基質選択的な酵素阻害薬の開発に応用できる可能性がある。癌をはじめ多くの病気の治療薬開発において、病気の原因となる特定の分子のみを選択して阻害する

事が望まれるが、多くの場合うまくいっていない。本研究により、エクソサイトを標的とすることで特定の基質のみを選択して阻害できれば、その手法を応用し、酵素の特定の基質のみが原因となる他の多くの病気の治療法開発に貢献するだろう。

【参考・引用文献】

1. Steiner H, Fukumori A, Tagami S, Okochi M, Making the final cut: pathogenic amyloid- $\beta$  peptide generation by  $\gamma$ -secretase, Cell stress, review article 2, 282 - 331, 2018
2. Fukumori A, Johannes Trambauer, Lukas Feilen, Harald Steiner, Identifizierung von Substratbindestellen in der  $\gamma$ -Sekretase., BioSpektrum, 24(1):34-36, 2018.
3. Fukumori A. and Steiner H: Substrate Recruitment of  $\gamma$ -Secretase and Mechanism of Clinical Presenilin Mutations Revealed by Photoaffinity Mapping. EMBO J. 35(15):1628-43. 2016
4. Trambauer J, Fukumori A, Kretner B, Steiner H.: Analyzing Amyloid- $\beta$  Peptide Modulation Profiles and Binding Sites of  $\gamma$ -Secretase Modulators. Methods Enzymol. 584:157-183. 2017