

# アルツハイマー病病因タンパク質Presenilin 1のPALモチーフと第9膜貫通部位が $\gamma$ セクレターゼの活性中心ポアを形成することを発見

## ( $\gamma$ セクレターゼの機能・構造解明と創薬に向けた一歩)

JST基礎的研究事業の一環として、東京大学 大学院薬学系研究科の富田 泰輔 准教授、佐藤 千尋 博士研究員と岩坪 威 教授らは、アルツハイマー病病因タンパク質Presenilin 1 (PS1) のPALモチーフと第9膜貫通部位が $\gamma$ セクレターゼの活性中心ポアを形成することを突き止めました。

$\gamma$ セクレターゼはアルツハイマー病発症の原因となるアミロイド $\beta$ ペプチドを前駆体蛋白質から切断、産生するタンパク質分解酵素で、その切断メカニズムの解明は、アルツハイマー病治療薬の開発にも重要と考えられています。通常、酵素の活性中心は親水性環境にありますが、 $\gamma$ セクレターゼの活性中心アスパラギン酸は脂質二重膜内に位置しているため、基質である膜貫通型蛋白質がどのようなメカニズムで加水分解を受けるのかは謎でした。本研究グループは2006年、[substituted cysteine accessibility method \(SCAM\)](#) (注1)を用いて、 $\gamma$ セクレターゼの活性中心サブユニットであるPS1の機能構造解析を行い、活性中心アスパラギン酸を含む第6、7膜貫通部位が脂質二重膜内に親水性のポア構造を形成していることを明らかにしました。しかし基質タンパク質が疎水性の脂質二重膜内から親水性の活性中心ポアにどのようにして移動し、加水分解が行われるのか、またアルツハイマー病の治療薬として開発されている各種の $\gamma$ セクレターゼ阻害薬がどのようにして活性を阻害するのかは不明でした。

研究チームは今回SCAM法を用いた解析をさらに発展させ、活性中心アスパラギン酸よりもカルボキシ末端側に位置するPALモチーフと第9膜貫通部位が活性中心ポア構造の形成に関与することを突き止めました。またこれらの部位が代表的な阻害剤である「遷移状態模倣型」 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬の標的となることを示しました。さらに「基質模倣型」 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬を用いた実験から、第9膜貫通部位の一部が、活性中心への基質の進入を導く「ラテラルゲート」を構成する可能性を示唆しました。本研究の成果により、 $\gamma$ セクレターゼによる脂質二重膜内でのタンパク質分解機構の一端が明らかになり、アルツハイマー病の発症機構の解明につながるとともに、新規の根本的治療薬の開発にも有用な情報をもたらすことが期待されます。

本研究成果は、平成20年6月11日発行(米国東部時間)の北米神経科学会誌「The Journal of Neuroscience」に掲載されました。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

戦略的創造研究推進事業 チーム型研究 (CREST)

研究領域：「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」

研究総括：樋口 輝彦 (国立精神・神経センター 総長)

研究課題名：アルツハイマー病根本治療薬創出のための統合的研究

研究代表者：岩坪 威

研究期間：平成19年10月～平成 25年 3月

JSTはこの領域で少子化・高齢化・ストレス社会を迎えたわが国において社会的要請の強い認知・情動などをはじめとする高次脳機能の障害による精神・神経疾患に対して、脳科学の基礎的な知見を活用し予防・診断・治療法等における新技術の創出を目指しています。上記研究課題では、アルツハイマー病の分子病態を、 $\gamma$ セクレターゼによる病因タンパク質 $\beta$ アミロイド(A $\beta$ )の産生に着目して解明し、初期段階で改善する新機軸の治療方策を創出しようとするものです。

## <研究の背景と経緯>

アルツハイマー病では脳内に蓄積したアミロイド $\beta$ ペプチド(A $\beta$ )が神経障害の原因となることが示唆されており、A $\beta$ 産生機構の解明がアルツハイマー病の予防法・治療法の確立に重要と考えられています。A $\beta$ は $\gamma$ セクレターゼによって前駆体蛋白質から切断されることが明らかとなっており、 $\gamma$ セクレターゼはアルツハイマー病の創薬ターゲットとして重視されています(図1)。一方、 $\gamma$ セクレターゼをはじめとする膜プロテアーゼが脂質二重膜内で基質の膜内配列を加水分解する「膜内タンパク質分解」(intramembrane proteolysis)の分子機構にも注目が集まっています。そのメカニズムの解明と、効果的な阻害薬の開発には、 $\gamma$ セクレターゼの構造情報に関する研究が必須です。しかし $\gamma$ セクレターゼは複数の膜蛋白質から構成される巨大な膜蛋白質複合体であるため、結晶構造解析などのスタンダードな方法の適用は極めて困難であり、その構造の全貌は明らかになっていません。

2006年、本研究チームは、 $\gamma$ セクレターゼの活性中心サブユニットであるPresenilin 1 (PS1)タンパク質について、生化学的手法(SCAM法)を用いた機能・構造解析を行い、PS1の活性中心アスパラギン酸残基を含む第6、7膜貫通部位が、脂質二重膜内に親水性のポア構造を形成していることを報告しました。同年、 $\gamma$ セクレターゼと同様の「膜内タンパク質分解」を担うプロテアーゼ(I-CLiPs)である「ロンボイド」の、翌2007年には「サイト2プロテアーゼ」の結晶構造解析が実現され、これらのI-CLiPsが $\gamma$ セクレターゼと同様に、活性中心に親水性環境を有していることが明らかになりました。またロンボイドの機能・構造解析から、基質タンパク質が疎水性の脂質二重膜内から親水性の活性中心に移動する際に、側方から基質タンパク質と相互作用し、その進入をみちびく「ラテラルゲート」の存在が示唆されました。しかし $\gamma$ セクレターゼについては、基質の結合・進入にかかわるメカニズムはまったく知られていませんでした。

研究チームは今回、PS1のC末端側に存在するPALモチーフと第9膜貫通部位が活性中心ポアを構成していること、また第9膜貫通部位の一部がラテラルゲートを構成することを明らかにしました。

## <研究の内容>

本研究では、substituted cysteine accessibility method (SCAM)を用いて、 $\gamma$ セクレターゼの活性中心サブユニットである9回膜貫通型タンパク質PS1の第8膜貫通部位からカルボキシ末端までの構造を解析しました(図2)。まず、PS1の内因性のシステインを全てセリンに置換した変異体を作製し、これを鋳型に、1箇

所だけをシステインに変えた変異体を全アミノ酸配列について作製しました。これらを発現するPS1/2ダブルノックアウトマウス由来の線維芽細胞を樹立し、発現したシステイン変異型PS1タンパク質を、チオール基に特異的に反応するMTS試薬（注2）と反応させました。MTS試薬は親水性環境のみにおいてチオール基と反応するので、システイン導入部位の親水性環境の有無を評価できます（図3）。このような検討を当該部位の全アミノ酸について進めた結果、PS1の第8膜貫通部位は疎水性環境にあること、それに引き続くPALモチーフ周辺は親水性環境にあることが明らかになりました。また第9膜貫通部位にシステインを置換した変異体のいくつかがMTS試薬と反応し、陽性を示す位置が周期性を示したことから、第9膜貫通部位は $\alpha$ ヘリックスを形成し、その一面が親水性環境に面していることが推定されました（図4）。つぎに、各膜貫通部位の間の距離を明らかにするため、PS1の2つの膜貫通部位にそれぞれ1個のシステインを置換した変異体を作製し、MTSを両端に持つ架橋剤を用いたクロスリンク実験を行いました。その結果、PALモチーフならびに第9膜貫通部位のそれぞれが、活性中心アスパラギン酸を含む第6膜貫通部位と近接していることが示されました。以上の結果から、PALモチーフと第9膜貫通部位が活性中心ポアの形成に加わるものと考えられました。

通常、酵素分子内で、触媒作用部位と基質結合部位は一致するのが普通です。しかし従来の酵素学的検討から、 $\gamma$ セクレターゼには基質結合部位と触媒部位が別個に存在し、基質は前者から後者に向かって移動すると予想されています。それぞれの部位を阻害する $\gamma$ セクレターゼ阻害薬の存在下でMTS試薬の結合実験を行うことにより、触媒部位や基質結合部位の同定を試みた結果、遷移状態模倣型 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬がPALモチーフと第9膜貫通部位の一部に結合することを示し、これらが触媒部位を構成することを示しました。また基質模倣型 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤を用いた競合実験から、第9膜貫通部位の一部が「ラテラルゲート」を構成する可能性を示しました。

以上の結果から、 $\gamma$ セクレターゼの基質はまずPS1の第9膜貫通部位に結合し、その後PALモチーフと第9膜貫通部位の一部を含む活性中心ポアに移動し、切断されるというメカニズムが推定されます（図6）。このように $\gamma$ セクレターゼの詳細な機能・構造解析は、今後 $\gamma$ セクレターゼによる基質切断の分子機構を解明し、有効な治療薬を開発する上で重要な一歩と考えられます。

## <今後の展開>

$\gamma$ セクレターゼは、アルツハイマー病の根本治療を目指した創薬のターゲットタンパク質であり、その機能・構造解析は効果的な治療薬の開発に重要な知見をもたらします。本研究グループによって行われたPS1のSCAM解析の一連の結果は、 $\gamma$ セクレターゼの構造およびその切断様式についての理解を格段に押し進めました。将来的に $\gamma$ セクレターゼの結晶構造解析が実現した暁にも、SCAMから推定された構造情報は、脂質二重膜を可溶化しないnativeな状態で、活性を保った $\gamma$ セクレターゼの構造を反映する、重要な意義を有します。今後、 $\gamma$ セクレターゼの全般的阻害薬に加えて、基質や切断部位に選択性をもつ「 $\gamma$ セクレターゼモジュレーター薬」の開発も進むものと予想されますが、SCAM法による解析は、 $\gamma$ セクレターゼを標的とする治療薬の作用機序の解明と根本治療法の樹立に、引き続き重要な情報をもたらすものと期待されます。

## <参考図>

### 図1 $\gamma$ セクレターゼとアルツハイマー病

アミロイド $\beta$ ペプチド ( $A\beta$ ) は前駆体蛋白質から $\gamma$ セクレターゼによって切断、産生されます。 $A\beta$ は凝集、蓄積する過程でアルツハイマー病発症の引き金を引くと考えられることから、 $\gamma$ セクレターゼがアルツハイマー病の創薬ターゲットとして注目されています。

### 図2 Presenilin 1 (PS1) の活性中心ポアと今回の研究で解析した部位

PS1は $\gamma$ セクレターゼの活性中心サブユニットをなす9回膜貫通型タンパク質と考えられており、第6、7膜貫通部位に活性中心アスパラギン酸 (黄色星) を有します。今回の研究では保存されたPALモチーフ (紫) を含む、PS1の第8膜貫通部位から最C末端まで (I408-I467) を解析しました。数字はアミノ酸番号を示します。

### 図3 Substituted cysteine accessibility method (SCAM)を用いたPS1の構造解析ストラテジー

本研究で用いた生化学的な構造解析法の説明です。任意の1アミノ酸をシステインに置換したシステイン変異型PS1を発現する細胞にMTS試薬を投与します。システイン置換部位が疎水性環境にある場合は、チオール基がイオン化せず、MTS試薬とは反応しません (白丸)。一方、システイン置換部位が脂質二重膜の外側、あるいはポアのような親水性環境に面している場合は、チオール基がイオン化してMTS試薬と反応します (桃丸)。

### 図4 SCAMによって明らかにされたPS1第8膜貫通部位以降の構造

A. PS1 I408-I467のシステイン変異体の標識結果を示します。第8膜貫通部位にシステインを置換した変異体はいずれもMTS試薬によって標識されず、PALモチーフ周辺 (緑) のシステイン変異体は連続して標識されました。また第9膜貫通部位 (青) から最C末端 (紫) にかけては、標識されるアミノ酸残基の位置が、周期性を示しました。B. 第9膜貫通部位以降が $\alpha$ ヘリックス構造を有していると仮定した場合の構造模式図です。数字はアミノ酸番号を示し、システイン置換によって活性を失った変異体を灰色で示します。第9膜貫通部位の数個のアミノ酸 (青) と最C末端の数個のアミノ酸 (紫) は同じ親水性環境に面していることが示唆されます。C. 第8膜貫通部位以降の構造模式図を示します。第8膜貫通部位は疎水性環境に、PALモチーフ周辺 (緑) は親水性環境に、第9膜貫通部位 (青) と最C末端 (紫) はそれぞれ親水性環境に面したヘリックス構造をとると予想されます。

### 図5 予想される $\gamma$ セクレターゼによる膜内配列切断機構

基質はまずA. 第9膜貫通部位 (灰色) の一部によって構成されるラテラルゲートに結合し、B. 触媒部位を含む活性中心ポアに移動し、C. 主に第6、7膜貫通部位 (灰色) から形成される触媒部位にて加水分解されます。基質は緑で示し、活性中心アスパラギン酸を黄色の星印で示します。

## <用語解説>

### 注1) Substituted cysteine accessibility method (SCAM)

システインケミストリーを用いた生化学的な蛋白質機能構造解析法。蛋白質の任意の1アミノ酸をシステインに置換し、チオール基特異的の反応試薬を用いて検出する。トランスポーターやチャネルの機能構造解析に広く用いられ、親水性環境に面したアミノ酸を特定できる。SCAMによって得られた構造は、X線結晶構造解析から得られた結果ともよく対応する。

### 注2) MTS試薬

Methanethiosulfonate試薬の略。チオール基に特異的に反応する。イオン化したチオール基に対する反応性が非イオン化基に対して $10^9$ 倍大きいため、親水性環境でのみチオール基と反応する試薬として用いる。

## <論文名>

"The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of Presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the  $\gamma$ -secretase"

(プレセニリン1のC末端のPALモチーフと第9膜貫通部位は $\gamma$ セクレターゼの活性中心ポア形成に関与す

る) Sato C, Takagi S, Tomita T, Iwatsubo T *Journal of Neuroscience* 28: 6264-6271 (2008)

doi:10.1523/JNEUROSCI.1163-08.2008

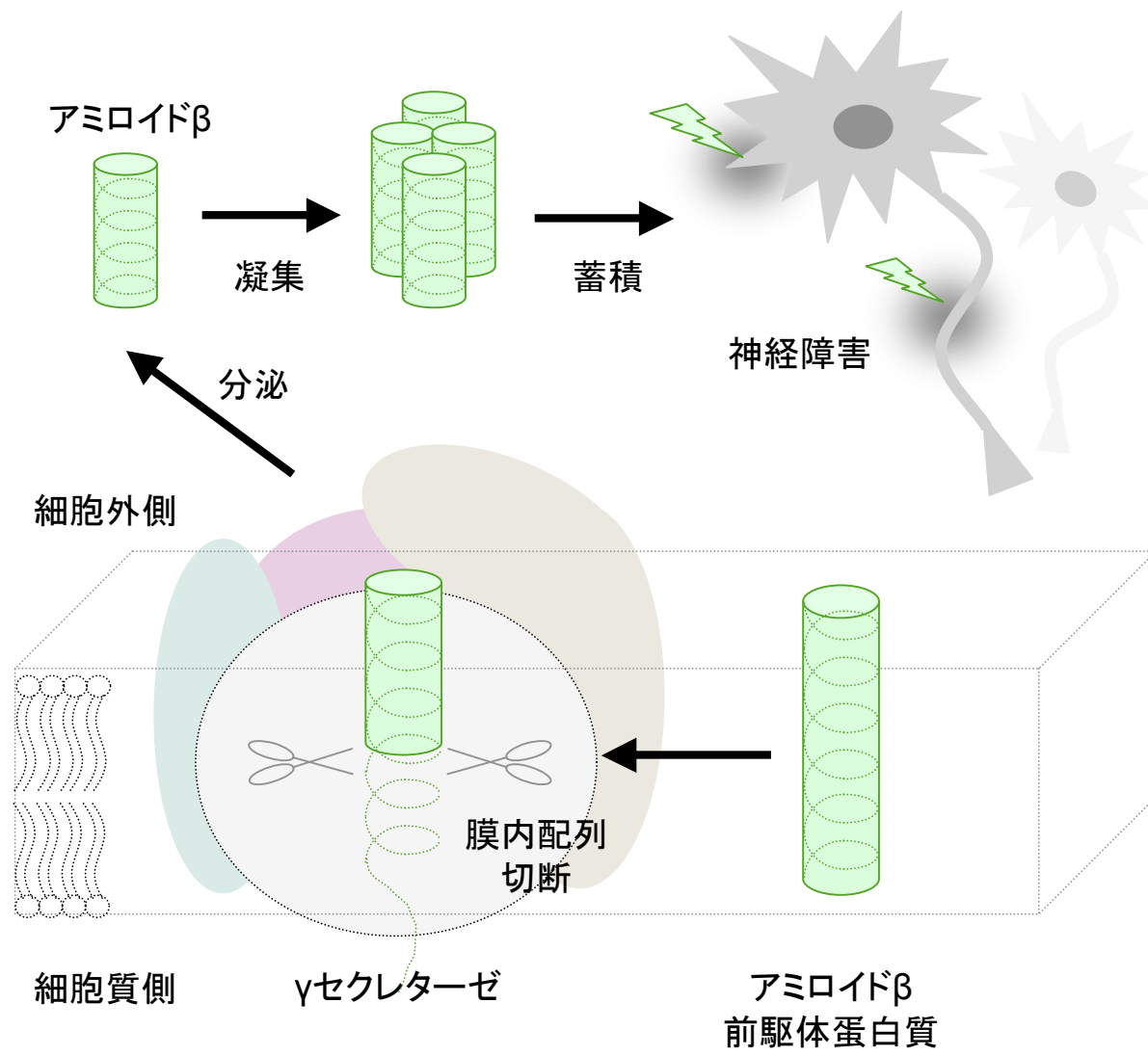


図1 γセクレターゼとアルツハイマー病

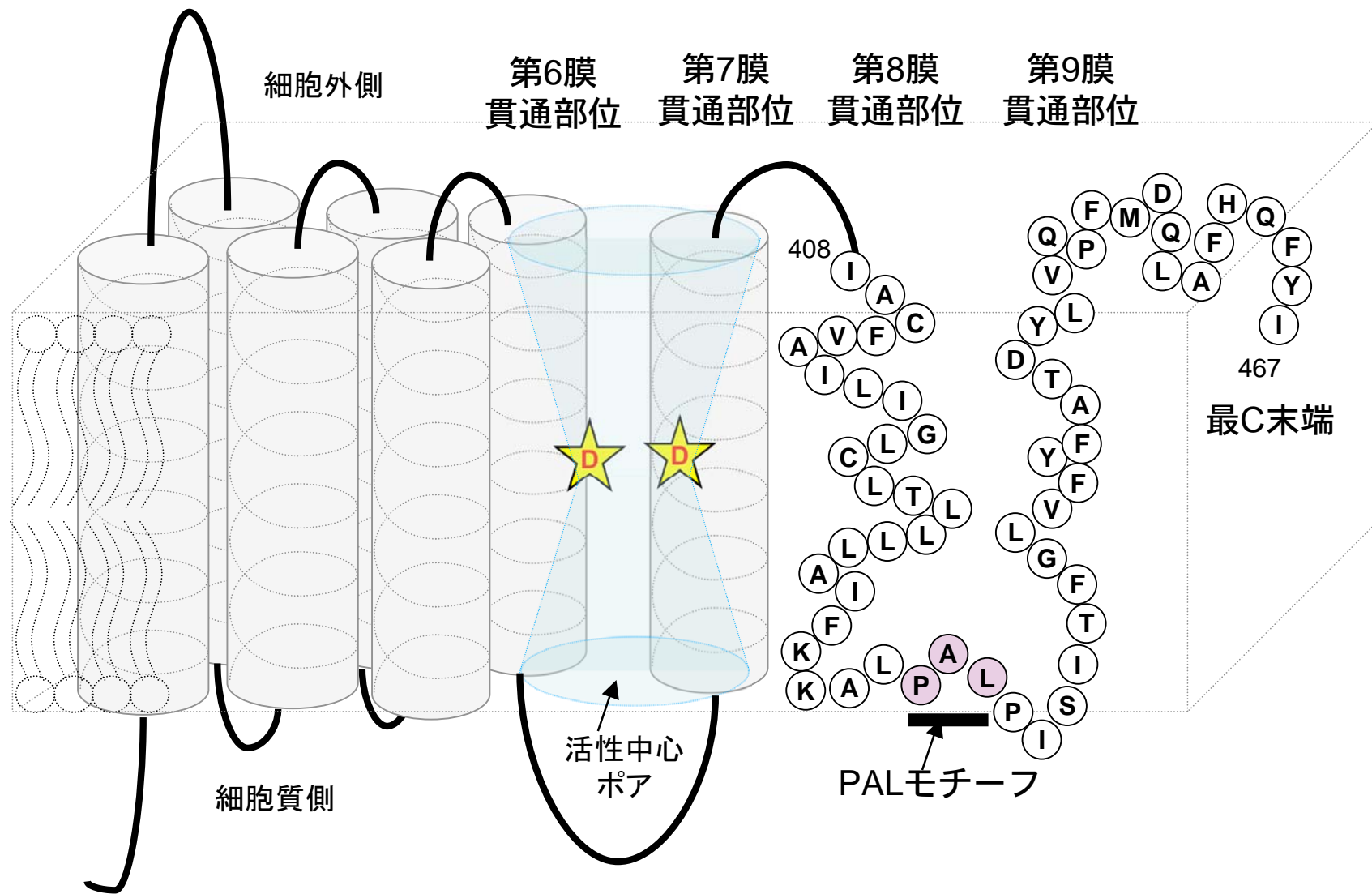


図2 Presenilin 1 (PS1) の活性中心ポアと今回の研究で解析した部位

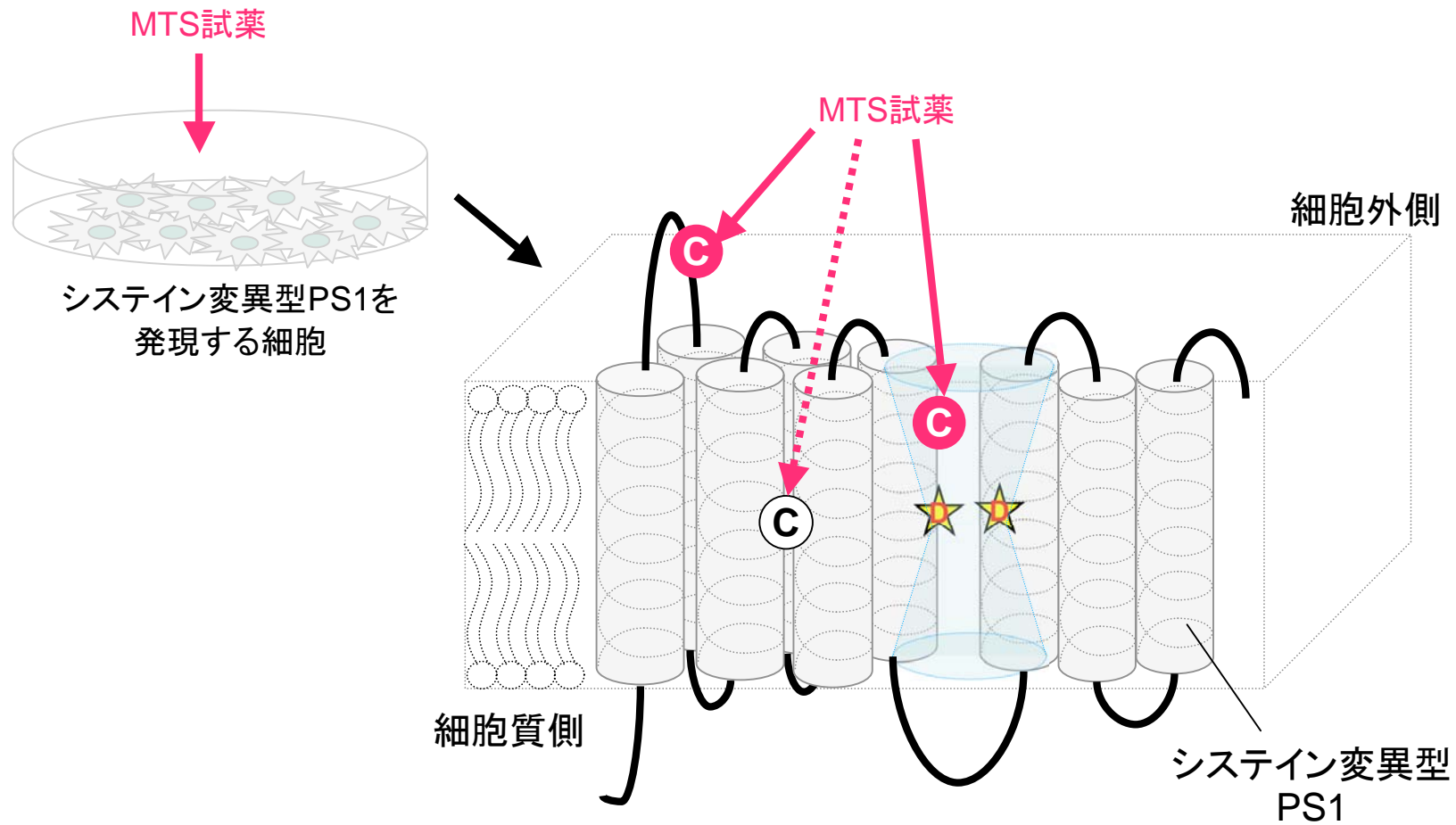


図3 Substituted cysteine accessibility method (SCAM)を用いたPS1の構造解析ストラテジー



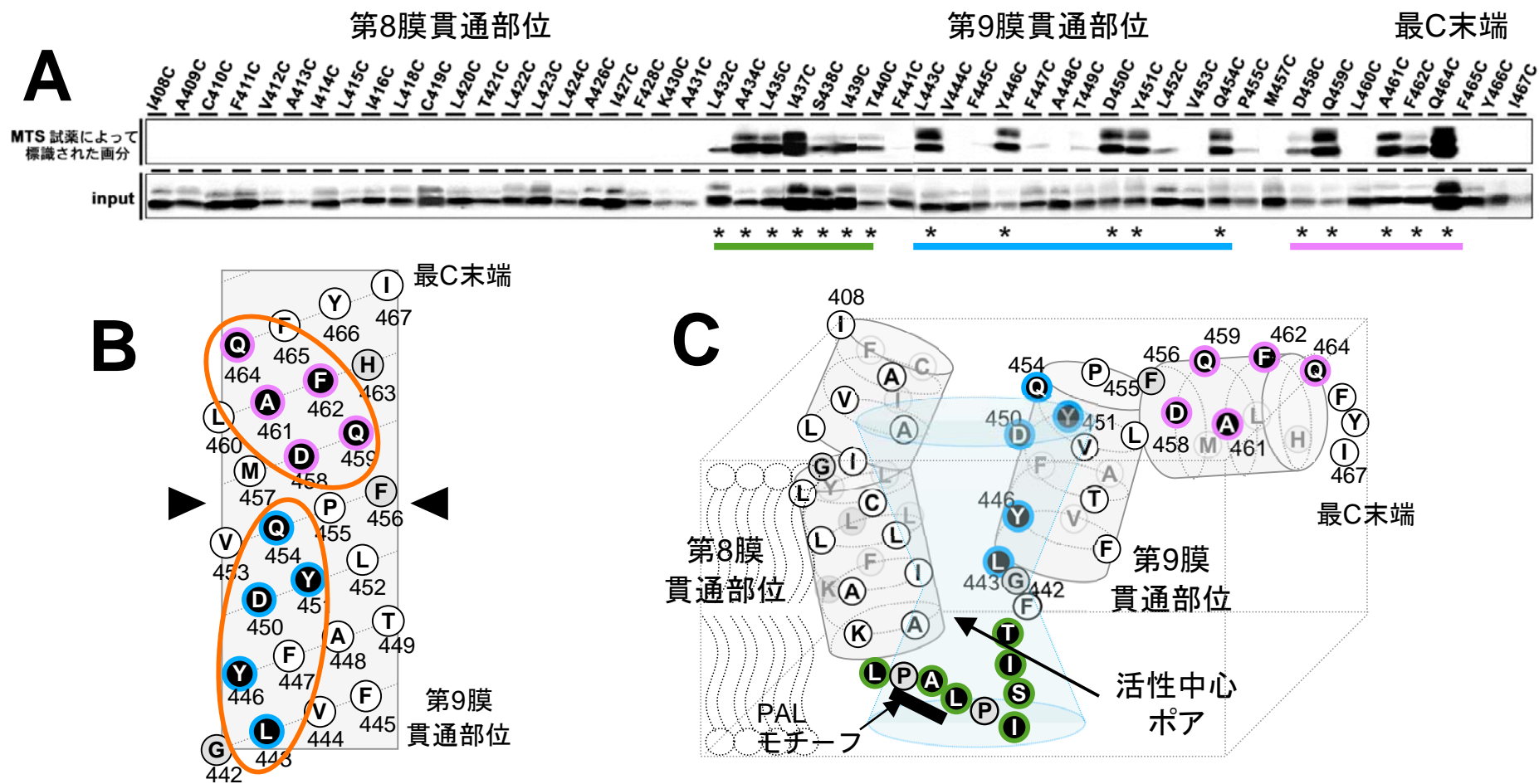


図4 SCAMによって明らかにされたPS1の第8膜貫通部位以降の構造

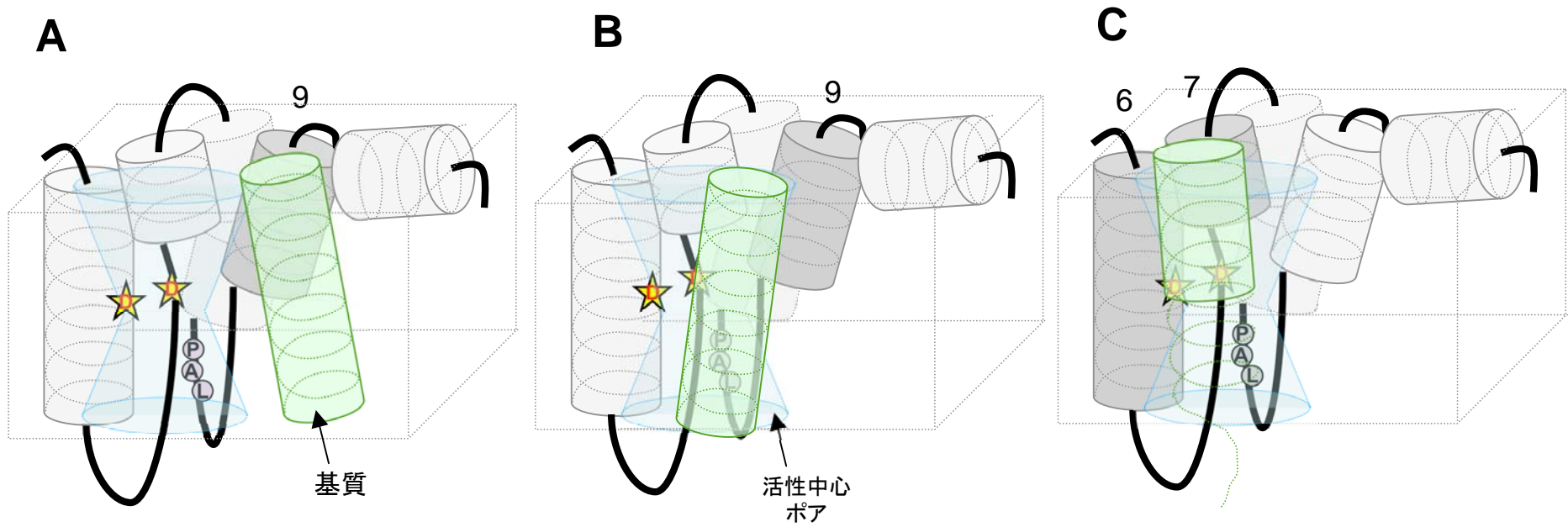


図5 予想される $\gamma$ セクレターゼによる膜内配列切断機構