

＜シンポジウム 2—3＞神経変性疾患研究の焦点—新たな病的因子の登場と臨床への展望—

アルツハイマー病治療を目指した γ -セクレターゼの 構造活性相関の理解

富田 泰輔

要旨：遺伝学・生化学的解析から、アミロイド β 蛋白 ($A\beta$) 産生および蓄積過程がアルツハイマー病発症機序に深く関与していることが示唆されており、脳内における $A\beta$ の存在量および蓄積過程の制御は、発症機序に基づいた disease-modifying therapy となることが期待されている。 γ -セクレターゼは $A\beta$ 産生経路において C 末端側の切断に関与し、 $A\beta$ の凝集性を決定することから、重要な創薬標的分子と考えられてきた。近年になり、 γ -セクレターゼの分子的な実態が明らかとなり、その酵素学的な解析と相まって、特異的な阻害剤が AD 治療薬として開発され始めている。したがって γ -セクレターゼの構造活性相関の理解は特異的な活性を持つ化合物のラショナルデザインにつながる可能性があると考えられる。

(臨床神経, 48 : 907—909, 2008)

Key words : アルツハイマー病, アミロイド β ペプチド, アミロイド β ペプチド前駆体, γ -セクレターゼ阻害剤, γ -セクレターゼモジュレーター

はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer's Disease ; AD) の病理学的特徴としては大脳皮質における神経細胞の脱落, 老人斑, 神経原線維変化などが挙げられる。とくに老人斑は疾患特異性が高く, その主要構成成分は β アミロイド蛋白 ($A\beta$) である。 $A\beta$ は前駆蛋白 Amyloid β precursor protein (APP) の細胞外側から膜貫通領域の一部までに相当する 40 アミノ酸前後のペプチドであり, APP が β -, γ -セクレターゼによって段階的な切断を受けることによって産生される (Fig. 1)。さらに γ -セクレターゼによる切断の際, $A\beta$ の C 末端長に多様性を生じ, 主に $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ が産生される。 $A\beta_{42}$ は $A\beta_{40}$ にくらべ凝集性が高く, AD 患者脳においては $A\beta_{42}$ が初期より優位に蓄積することなどから, $A\beta$, とくに $A\beta_{42}$ の産生と蓄積が AD 発症機序においてもっとも重要であることが予測され, 「アミロイド仮説」として提示された¹⁾。

AD の 90% 近くは孤発例であるが, 一部に家族性 AD (FAD) の存在が知られている。遺伝学的解析の結果, APP, Presenilin (PS) 1, 2 の 3 つの遺伝子上の変異に連鎖することが明らかとなり, いずれも $A\beta_{42}$ 産生・蓄積機序に影響を与えることが明らかとなった。そして, FAD 変異型 APP 遺伝子を過剰に発現させたトランスジェニックマウス脳において加齢とともにアミロイド斑の沈着が観察され, FAD 変異型 PS により, その沈着が亢進すること, さらにこれらのマウスにおいて, 記憶学習障害が観察された。すなわち, FAD に連鎖する遺伝子変異が, マウスにおいても記憶学習に影響を与えるアミロイド沈着を亢進するというスキームが完全に確立

し, AD 発症機序におけるアミロイド仮説が真の病因論として広く支持されるようになった。

γ -セクレターゼ

疎水性環境にある膜内配列に相当するペプチドを, 複数の箇所加水分解するという既知の酵素にはみられない特性を示す γ -セクレターゼの分子の実態は長らく不明であった。しかし近年の遺伝学・分子生物学的な検討により, PS, Nicastrin, Aph-1, Pen-2 の 4 種類の膜蛋白 (Fig. 2) が γ -セクレターゼ活性に必要であることが示された²⁾³⁾。様々な解析から, これら 4 者すべてが会合した 0.5~2MDa の巨大な膜蛋白複合体が γ -セクレターゼの基本骨格を構成し, PS はその活性中心サブユニットであると考えられている。 γ -セクレターゼを AD 治療薬の標的分子として考える上で最大の問題点は, 多様な基質の存在である。とくに発生・分化に重要な役割を果たしている Notch シグナルにおいては, この γ -セクレターゼによる切断が必須であることから, γ -セクレターゼ阻害剤 (γ -secretase inhibitor ; GSI) を AD 治療薬としてもちいる際, 薬物体内動態や投与法の制御による治療可能濃度域がみいだされるかどうか重要であると考えられる。またこの Notch シグナル阻害による副作用を回避するため, $A\beta$ 産生を優位に阻害する第二世代化合物「Notch-sparing GSI」が開発されつつあり, 期待されている。さらに AD 発症リスクを低下させることが疫学的に示されてきた非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) の一部が, とくに凝集性の高い $A\beta_{42}$ 産生のみを特異的に阻害する一方で, その他の $A\beta$ 分子種の産生や Notch シグナルを遮断しないことが報告された。このような

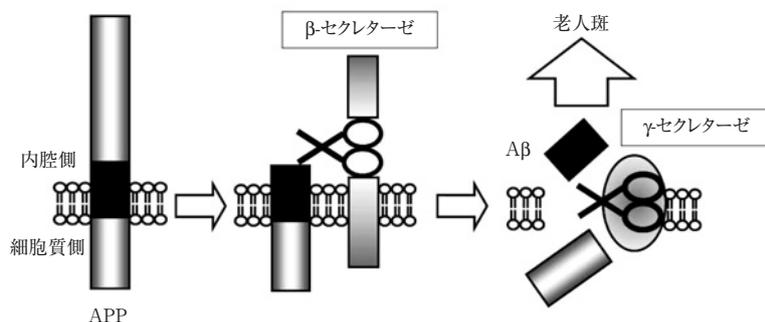


Fig. 1 APPの代謝とアルツハイマー病

Aβ (黒四角) はAPPの細胞外部分から膜貫通領域の一部に相当する。まずβ-セクレターゼによって内腔側・細胞外側で切断を受けたのち、APPのC末端断片がγ-セクレターゼによって切断を受け、Aβが分泌される。

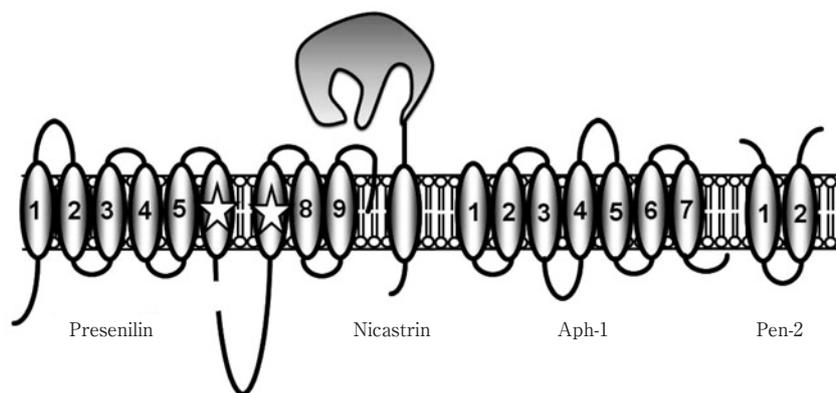


Fig. 2 γ-セクレターゼ構成因子

γ-セクレターゼの基本構成因子として、PS, Nct, Aph-1, Pen-2が知られている。PSは複合体形成後フラグメント化を受ける。星印は活性中心であるアスパラギン酸を示す。

化合物はγ切断部位特異的にγ-セクレターゼ活性を調節することから、γ-セクレターゼモジュレーター(γ-secretase modulator: GSM)と呼ばれ、Notch阻害による副作用を完全に回避できる治療薬となることが期待されている⁴⁾⁵⁾。

このように特異的なGSI, GSMの開発においては、切断機構に基づいた阻害剤のラショナルデザインが求められている。しかしγ-セクレターゼは脂質二重膜という疎水性領域に存在する、様々な膜内配列を加水分解するという類型のない性質をもつプロテアーゼであり、切断機構の詳細については明らかではない。そのためにはγ-セクレターゼの構造解析が不可欠であるが、巨大な膜蛋白複合体であるということから通常の構造解析はほとんど報告されていなかった。しかしわれわれは精製γ-セクレターゼをもちいた、電子顕微鏡観察および単粒子解析法による構造解析や⁶⁾、従来チャネルやトランスポーターにおける親水性ポア領域の同定にもちいられてきたCysteine Scanning Accessibility Methodと呼ばれる方法をPSに応用し、γ-セクレターゼの活性中心が脂質二重膜内に存在する親水性ポア領域に面していることなどを明らかにした⁷⁾⁸⁾。さらにGSIやGSMの作用点を検索するため、われわれは各種化合物を分子プローブとしたケミカルバイオロジーに

より、その標的分子・ドメインの探索を進めている⁹⁾¹⁰⁾。今後γ-セクレターゼの構造活性相関の詳細な理解がその切断機構の理解、さらには特異的阻害剤の開発につながることを期待されている。

おわりに

セクレターゼ活性を直接制御する化合物によるdisease-modifying therapyは、根本的治療薬としての可能性が期待されている。そのなかでβ-, γ-セクレターゼの膜結合型アスパラギン酸プロテアーゼとしての分子の実体同定と特異的な阻害剤の開発は、AD研究に大きなブレークスルーをもたらした。今後有機化学・酵素生化学・分子細胞生物学・薬理学・構造生物学といった従来の解析に加え、ケミカルバイオロジー・バイオインフォマティクスなどの新しい研究を加えた、様々な観点からのアプローチにより、各セクレターゼの特異的阻害剤・AD治療薬の開発にいたることが期待されている。

文献

- 1) Haass C, Selkoe DJ: Soluble protein oligomers in neurode-

- generation: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 101—112
- 2) Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, et al: The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex. *Nature* 2003; 422: 438—441
 - 3) Selkoe DJ, Wolfe MS: Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell* 2007; 131: 215—221
 - 4) Tomita T, Iwatsubo T: γ -secretase as a therapeutic target for treatment of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 661—670
 - 5) Tomita T: At the frontline of Alzheimer's disease treatment: γ -secretase inhibitor/modulator mechanism. *Nannyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008; 377: 295—300
 - 6) Ogura T, Mio K, Hayashi I, et al: Three-dimensional structure of the γ -secretase complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 525—534
 - 7) Sato C, Morohashi Y, Tomita T, et al: Structure of the catalytic pore of γ -secretase probed by the accessibility of substituted cysteines. *J Neurosci* 2006; 26: 12081—12088
 - 8) Sato C, Takagi S, Tomita T, et al: The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the γ -secretase. *J Neurosci* 2008; 28: 6264—6271
 - 9) Morohashi Y, Kan T, Tominari Y, et al: C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic γ -secretase-specific inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). *J Biol Chem* 2006; 281: 14670—14676
 - 10) Fuwa H, Takahashi Y, Konno Y, et al: Divergent synthesis of multifunctional molecular probes to elucidate the enzyme specificity of dipeptidic γ -secretase inhibitors. *ACS Chem Biol* 2007; 2: 408—418

Abstract

Targeting the structure and function relationships of the γ -secretase for the development of Alzheimer's disease

Taisuke Tomita, M.D.

Department of Neuropathology and Neuroscience, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

Genetic and biological studies provide evidence that the production and deposition of amyloid- β peptides (A β) contribute to the etiology of Alzheimer's disease. Thus, β - and γ -secretases, that are involved in the A β generation, are plausible molecular targets for Alzheimer's disease treatment. γ -Secretase is an unusual aspartic protease that cleaves the scissile bond within the transmembrane domain. This unusual enzyme is composed of a high molecular weight membrane protein complex containing presenilin, nicastrin, Aph-1 and Pen-2. Drugs that regulate the production of A β by inhibiting or modulating γ -secretase activity could provide a disease-modifying effect on AD, although recent studies suggest that γ -secretase plays important roles in cellular signaling including Notch pathway. Thus, understanding the molecular mechanism whereby γ -secretase recognizes and cleaves its substrate is a critical issue for the development of compounds that specifically regulate A β -generating γ -secretase activity. I will review our structural studies on the γ -secretase complex, and envision the direction for developing effective and selective γ -secretase inhibitors as therapeutics for AD.

(*Clin Neurol*, 48: 907—909, 2008)

Key words: Alzheimer's disease, amyloid β protein, amyloid β protein precursor, γ -secretase inhibitor, γ -secretase modulator
