

ケミカルバイオロジーによる アルツハイマー病治療薬創製を目指した分子基盤解明

Discovery for mechanism-based drugs for
Alzheimer's disease by chemical biology

富田 泰輔 (TOMITA TAISUKE)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授



研究の概要

本研究の目的は、アルツハイマー病治療薬開発において重要な創薬標的分子の一つである γ セクレターゼの活性を基質特異的に制御するための分子基盤解明である。そのために種々の γ セクレターゼ阻害剤をケミカルバイオロジー的に応用し、 γ セクレターゼの構造活性相関と各化合物の作動機序の理解を目指して研究を遂行する。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：脳神経疾患、薬学、酵素、生理活性

1. 研究開始当初の背景

γ セクレターゼは、アルツハイマー病 (AD) 発症機構に決定的な役割を果たす A β ペプチドの産生の最終段階を担うプロテアーゼである。しかし単純な γ セクレターゼ活性阻害では他の基質の切断阻害による副作用が生じることが明らかとなっており、AD 治療においては A β 産生特異的な γ セクレターゼ活性の制御法開発が求められている。

2. 研究の目的

現在までにいくつかの基質特異性を持つ低分子化合物が同定されているが、その分子機構は明らかではない。申請者はこれまで低分子化合物を用いたケミカルバイオロジーをとり入れ、 γ セクレターゼの生化学・分子生物学さらには構造生物学的研究を展開してきた。本研究課題においては、これらの方法論を生かし、 γ セクレターゼに基質特異性を付与する分子機構の解明を目的とする。

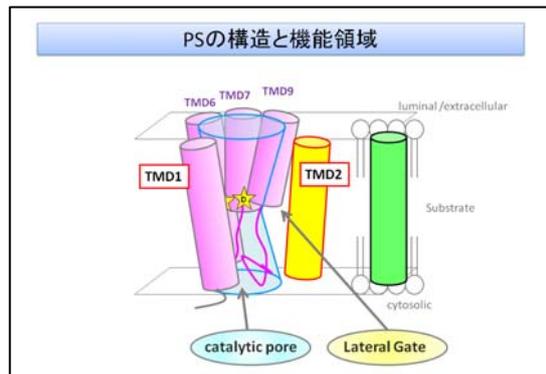
3. 研究の方法

既知の基質特異性を持つ γ セクレターゼ阻害剤 (GSI)、モジュレーター (GSM) の作用機序を酵素構造生物学的見地から明らかにし、さらに化合物の分子プローブ化・光親和性標識実験によってその標的分子を同定する。そして再構成系を用いて化合物の作用機序を明らかにし、最終的には γ セクレターゼ活性のラショナルな特異的制御法開発の分子的基盤の確立を目指す。

4. これまでの成果

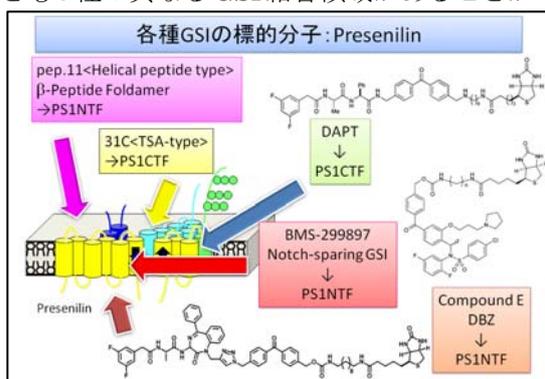
本研究においては、 γ セクレターゼに基質特異性を付与する分子機構について明らかにすべく、基質特異性を与える GSI、GSM の薬理学的基盤に基づき、 γ セクレターゼ活性中心サブユニットであるプレセニリン (PS) について、システインケミストリーを利用した構造生物学的検討を行い、これら化合物の標的分子および分子内領域の同定を、光親和性標識実験および蛋白化学的同定により試みた。

研究申請時には、システインスキヤニング法を用い、PS の第 6 膜貫通領域 (TMD6)、TMD7 が「活性中心ポア構造」を形成していることを明らかにしていた。その後 PS の N 末端側も含めてほぼすべての解析を行い、ポア構造に TMD1、TMD9 の細胞質側が直接関わっている一方で、TMD9 の内腔側が基質をポア内に取り込む「ラテラルゲート」として



機能していること、を明らかにした。また変異体解析の結果から、TMD2、TMD6 と TMD9 が近傍に存在することも明らかとなっており、ラテラルゲートにはこれらの TMD が関わっていることが明らかとなった。

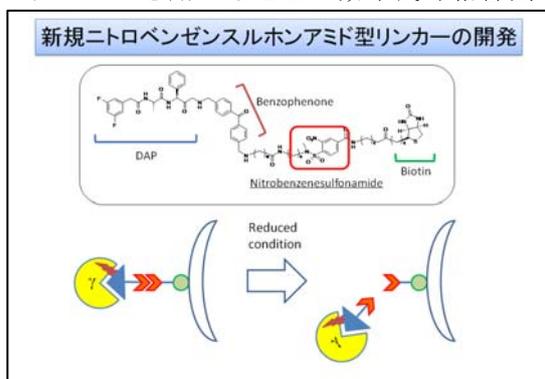
一方、光親和性標識実験により、基質特異性を持つスルホンアミド型 Notch-sparing GSI である HF14057 の誘導体である AS-BpB について検討し、PS の N 末端領域に直接結合することを見出した。さらにシステインスキヤニング法との組み合わせにより、TMD6-HL6 領域が Notch-sparing GSI の標的領域であることを明らかにした。また競合実験より、PS の N 末端領域には少なくとも3種の異なる GSI 結合領域があることが



明らかとなった。

一方、基質特異的な GSI/GSM のラショナルデザインを目指し、βアミノ酸を利用したフォルダマーによる GSI のデザインを試みた。特にγセクレターゼはヘリックス構造をとる TMD を基質とすることから、自在にヘリックス構造やその面を制御できるβアミノ酸 ACPC からなるポリペプチド Peptide 6 を検討したところ、非常に強力な GSI となることを見出した。

光親和性標識実験において得られた標的分子内での結合ドメインをアミノ酸レベルで理解するためには化合物が結合した分子の高効率精製法が必要である。そのためリンカー部分の改変を試み、ニトロベンゼンスルホンアミド型リンカーの開発に成功した。このリンカーを用いることで効率良く結合蛋



白の精製を行うことが可能となった。

5. 今後の計画

ステインスキヤニングを完了させて PS の構造についての全容を明らかにする。また Notch-sparing GSI を元とした AS-BpB が直接 PS の N 末端領域に結合したことから、今後その結合部位の詳細を解析する。同時にシステインスキヤニングへの応用を行い、阻害剤が PS 内で占める立体空間を明らかにする。最終的にはγセクレターゼ再構成系での検討を行う。

同時に GSI および GSM のスクリーニング及びラショナルデザインを推し進め、様々な薬理作用を持つ化合物の収集・解析を行う。そしてシステインスキヤニングへの応用や、改変可能なものについてはプローブ化を目指した構造活性相関解析を行う。各種化合物の薬理作用と構造活性相関解析から明らかとなるファーマコフォア、そして結合部位との相関から、基質特異性のある GSI の開発につなげていきたい。

6. これまでの発表論文等

Yokoshima S, Abe Y, Watanabe N, Kita Y, Kan T, Iwatsubo T, Tomita T, Fukuyama T: Development of photoaffinity probes for gamma-secretase equipped with a nitrobenzenesulfonamide-type cleavable linker. *Bioorg Med Chem Lett* 19:6869-6871, 2009

Imamura Y, Watanabe N, Umezawa N, Iwatsubo T, Kato N, Tomita T, Higuchi T: Inhibition of gamma-secretase activity by helical beta-peptide foldamers. *J Am Chem Soc* 131:7353-7359, 2009

Tomita T: Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease treatment. *Expert Rev Neurotherapeutics* 5:661-679, 2009

Sato C, Takagi S, Tomita T, Iwatsubo T: 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. *J Neurosci* 28:6264-6271, 2008

Fuwa H, Konno Y, Takahashi Y, Sasaki M, Yokoshima S, Kan T, Fukuyama T, Natsugari H, Tomita T, Iwatsubo T: Divergent synthesis of multifunctional molecular probes to elucidate the enzyme specificity of dipeptidic gamma-secretase inhibitors. *ACS Chem Biol* 2:408-418, 2007

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neuropsch/index.html>