

研究種目：若手研究 (S)

研究期間：2007～2011

課題番号：19679001

研究課題名 (和文) 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

研究課題名 (英文) Discovery for mechanism-based drugs for Alzheimer's disease by chemical biology

研究代表者

富田 泰輔 (TOMITA TAISUKE)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：30292957

研究代表者の専門分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脳神経疾患、薬学、酵素、生理活性

## 1. 研究計画の概要

高齢化社会を迎え、認知症の原因として最も頻度が高いアルツハイマー病 (AD) に対する根本的治療・予防薬の必要性が高まっている。 $\gamma$ セクレターゼは、AD 発症機構に決定的な役割を果たす  $A\beta$  ペプチドの産生を担うプロテアーゼであり、その活性制御による  $A\beta$  産生抑制は根治的 AD 治療法として最も有望な方法と考えられている。このため  $\gamma$ セクレターゼの切断機構の理解と、その分子基盤に基づいた低分子阻害剤の開発は、画期的な AD 治療・予防薬に至ることが期待されている。当該研究においては、薬学というマルチディシプリナリーな研究背景を生かし、低分子化合物を分子プローブとして利用するケミカルバイオロジーを基点とし、生化学・分子細胞生物学・薬理学・構造生物学を駆使し、 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤の作用点と分子機構を明らかにすることを目的として研究を進める。

## 2. 研究の進捗状況

本研究においては、 $\gamma$ 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、 $\gamma$ 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質化学的同定により試みた。

研究申請時には、システインスクヤニング法を用い、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ク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、 $\beta$ 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  $\gamma$ 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  $\beta$ 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

ホニ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。

### 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。  
(理由)

当初、システインケミストリーによる構造解析と化合物を組み合わせ、 $\gamma$ セクレターゼに対して基質特異性を付与する分子機構を明らかにすることを研究目的としていた。その目的に対しては、PS のシステインスキヤニングについては順調に進められており、そのほぼ全容が明らかになりつつある。一方光親和性標識についても、当初の研究目的で上げられていたスルホニアミド型 GSI に加えて、GSM を解析することが可能となった他、全く新しい骨格を持つ GSM の創成に成功し、その誘導体化も既に開始している。さらに GSI のラショナルデザイン、 $\gamma$ セクレターゼ活性制御機能抗体の開発に成功し、ともに世界的に類を見ない研究展開であり、かつペプチド合成、遺伝子工学を利用し人工改変が可能な阻害剤デザインである。今後これらの新規 GSI・GSM を嚆矢とし、ケミカルバイオロジー研究に加えて、新たに構造生物学的解析を加えて良く予定であり、これらの研究を有機的に進めていくことで、新たな研究成果・創薬研究展開が期待される。

### 4. 今後の研究の推進方策

シ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 $\gamma$ セクレターゼ再構成系での検討を行う。

また 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と考えている。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

① 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

② Tomita T: Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease treatment. *Expert Rev Neurotherapeutics* 5:661-679, 2009

③ 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

④ 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

[学会発表] (計 37 件)

① Tomita T: Structure and function relationship of the  $\gamma$ -secretase toward development of treatment of Alzheimer's disease. October 28, 2009, International Proteolysis Society 2009, Gold Coast, Australia

[図書] (計 14 件)

① 富田泰輔: アルツハイマー病治療薬創出に向けた $\gamma$ セクレターゼの構造解析と機能制御 蛋白質核酸酵素 54(12):1684-1689, 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称:  $\gamma$ セクレターゼ活性調節因子

発明者: 富田泰輔ら

権利者: 東京大学

種類: 特願

番号: 2009-277604

出願年月日: 平成 21 年 12 月 7 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neurops/in dex.html>