

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601

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

研究成果の概要（和文）：

$\gamma$ セクレターゼはアルツハイマー病発症に決定的な役割を果たす A $\beta$  ペプチドの産生を担う膜内配列切断プロテアーゼであり、その活性制御法は根本的治療法に結び付くことが期待されている。申請者は低分子化合物を用いたケミカルバイオロジー・構造生物学的研究を駆使し、その活性を制御する新たな分子機構を見出し、阻害薬のラショナルデザインに成功した。本研究成果は、将来的に新規アルツハイマー病治療薬の創薬の礎となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

$\gamma$ -Secretase is an intramembrane protease that is responsible for the generation of amyloid- $\beta$  peptide linked to the pathogenesis of Alzheimer disease. Thus, modulation of  $\gamma$ -secretase activity is a plausible therapeutics for Alzheimer disease. We have unveiled the novel molecular mechanisms of the  $\gamma$ -secretase cleavage, and established the novel  $\gamma$ -secretase inhibitors by rational design based on the mechanism. These developments offer a promise for development of a disease-modifying drug for Alzheimer disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	17,600,000	5,280,000	22,880,000
2008年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2009年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
2010年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
2011年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
総計	88,600,000	26,580,000	115,180,000

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

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γ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。

## 2. 研究の目的

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と脂質二重膜内に存在する膜タンパク質の構造を解析可能なシステムスキニングを基点とし、生化学・分子細胞生物学・薬理学・構造生物学を駆使し、基質特異性を与えるγセクレターゼ阻害剤 (GSI) およびモジュレーター (GSM) の作用点と分子機構を明らかにし、分子メカニズムに基づいた新たな活性制御薬のラショナルデザインを目的として研究を進めた。

## 3. 研究の方法

(1) ケミカルバイオロジー：γセクレターゼに基質特異性を付与する分子機構を解明すべく、GSI・GSMの誘導体化と薬理的解析を進めてプローブ化を行い、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。

(2) システインスキニング：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解析 (Substituted Cysteine Accessibility Method: SCAM) を行い、PSの構造に対してこれらの低分子化合物が与える影響を明らかにした。

(3) ラショナルデザイン：薬理的解析から得られたγセクレターゼの切断メカニズムと、上記解析から明らかとなったγセクレターゼの分子情報に基づき、新たなGSI・GSMの標的領域を同定し、新規活性制御薬の開発を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ケミカルバイオロジー

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、PS1 N 末端側フラグメント (NTF) に直接結合することを見出した。さらにシステインスキニング法との組み合わせにより、第6膜貫通領域 (TMD6) から第6親水性ループ領域 (HL6) 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、PS1 NTF 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。

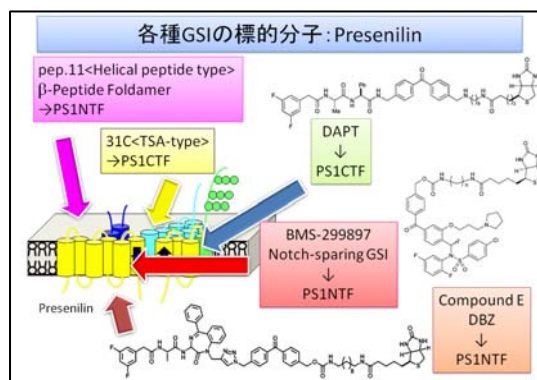


図1 GSIの結合部位

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。

毒性分子種であるAβ42産生のみを特異的に抑制し、Notchシグナルを遮断しないGSMについては、フェニルピペリジン骨格を持つGSM-1と、フェニルイミダゾール骨格を持つST1120をベースに誘導体化を進め、それぞれ光親和性標識プローブの創成に成功した。またAβ42産生を上昇させるフィブラート系GSMであるFenofibrateについても同様にFen-BpBを合成した。これらの化合物の結合分子を解析した結果、GSM-1およびFenofibrateはPS1 NTFのTMD1に直接結合することが、一方ST1120はPS1 NTFのみならずAph-1にも結合することが明らかとなった。

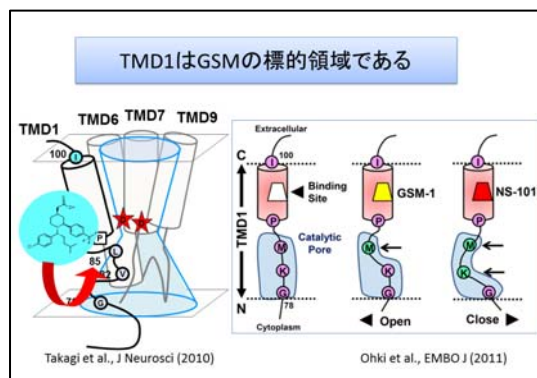


図2 GSM-1の結合部位

また基質側のγセクレターゼ認識機構に関わる領域についても解析を開始し、Aβ配列にして17から21に相当するAPPの内腔側に存在するショートヘリックス領域が重要であることを見出した。この17-21ペプチドがγセクレターゼ活性を阻害すると同時に、

光親和性標識化したプローブが PS1 の C 末端フラグメントに結合することを見出した。

## (2) システインスキャンニング

研究申請時には、システインスキャンニング法を用い、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、TMD3、TMD4、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。さらに TMD1 が切断プロセスにおいて細胞膜内でピストン様のモーションを行なっていることを明らかにした。

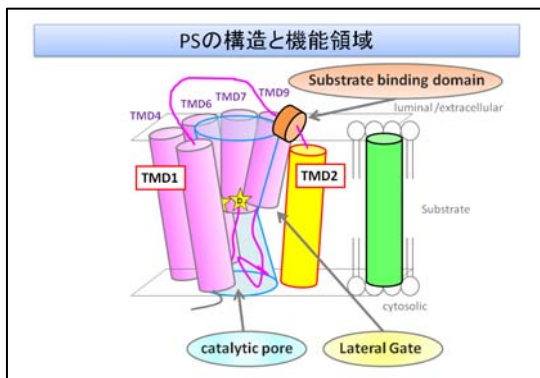


図 3 SCAM による PS の構造機能解析

さらに PS の中でも比較的長いループ領域である細胞外・内腔側の HL1 および細胞質側の HL6 についても SCAM 解析を行った。その結果、HL1 はその C 末端側がショートヘリックス構造をとり、膜にゆるく相互作用して基質認識に直接関わっていることが明らかとなった。すなわち、HL1 は「基質認識部位」の一部となっていると考えられた。

一方 HL6 についてはその N 末端側の領域が

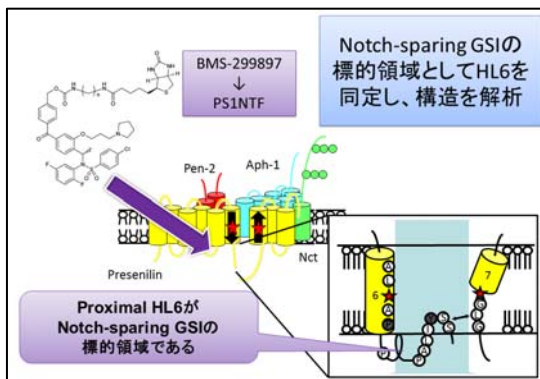


図 4 Notch-sparing GSI の結合部位

ショートヘリックス構造をとり、C 末側が活性中心に近い、reentrant loop を作っていること、その領域が Notch-sparing GSI の標的部位であり、活性中心構造の中で切断特異性を制御している部位であることが明らかとなった。

Aβ42 産生と PS の構造変化の関連については、各種 GSM 存在下で SCAM を施行することでその構造への影響を明らかにした。特に TMD1 の内腔側に結合する GSM-1、TMD1 の細胞質側に結合する Fenofibrate が、ともに TMD1 の細胞質側の活性中心ポア構造に影響を与えていることを明らかにした。そこで TMD1 の機能についてさらに検討するため、リコンビナントタンパクを用いた *in vitro* binding assay を確立し Aβ の前駆体である long Aβ との結合を検討したところ、特に Aβ42 の前駆体である Aβ45 との結合が観察された。以上より、PS1 の TMD1 は GSM の主要な標的分子領域であり、Aβ42 産生量を決定する重要なドメインであることが明らかとなった。

## (3) ラショナルデザイン

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。そこでこの peptide 6 を更に誘導体化し、その第 3 位および 6 位のアミノ酸が特に阻害能に重要であること、一方第 9 位および 12 位のアミノ酸が疎水性であることも重要であることが示された。また同時に本化合物の光親和性標識プローブ化にも成功し、PS1 NTF に結合することを明らかにした。さらに PPARγ アゴニスト誘導体ライブラリーから、基質特異性を持つ新規 γセクレターゼ阻害剤の開発に成功した。

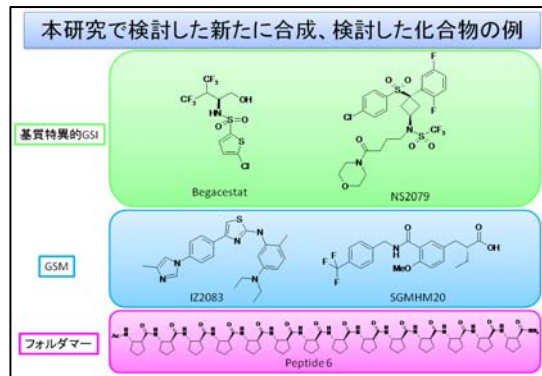


図 5 新規 GSI・GSM の開発

基質結合部位として、既にニカストリンの

細胞外領域が知られていた。この領域に対して $\gamma$ セクレターゼ活性中和抗体を得ていたが、その性状解析を進め、基質結合ポケットと推測される領域近傍にそのエピトープがあることを明らかにした。また別の抗ニカストリン抗体の単鎖抗体化にも成功し、培養細胞に intrabody として発現させた結果、 $\gamma$ セクレターゼ複合体形成時に取り込まれることで最終的に活性型 $\gamma$ セクレターゼの量を低下させることを見出した。

一方本研究成果より、切断プロセス中に TMD1 がピストン様モーションをしていることを明らかにした。そこで TMD1 直後のループ領域に対するモノクローナル抗体を作出したところ、このモーションを抑制すること、同時に $\gamma$ セクレターゼ活性を低下させる活性中和抗体であることが明らかとなった。既知の低分子 GSI を利用した光親和性標識実験における競合実験より、この抗体は基質認識やラテラルゲート、活性中心に影響を与えないことが明らかとなり、TMD1 のモーションの制御は新規阻害機構となることが示された。

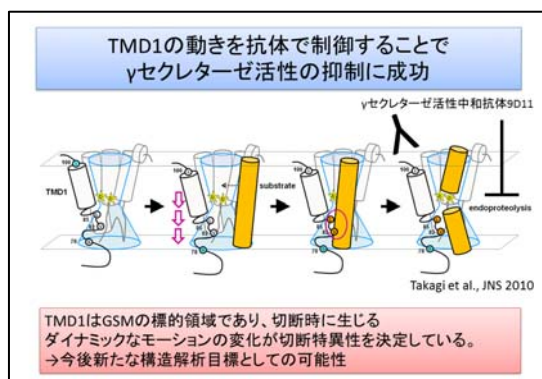


図6 TMD1のモーションと阻害抗体

### (3) 本研究のインパクトと今後の展望

本研究においては、アルツハイマー病治療薬の創出を目指し、特に $\gamma$ セクレターゼの構造活性相関を理解することで基質・切断特異性を持つ活性制御法の開発を進めた。特に活性中心サブユニット PS は家族性アルツハイマー病の変異が集中し、かつほぼ全ての阻害剤の標的分子である。その PS の構造について SCAM により解析を進め、ほぼすべてのアミノ酸についての情報を得た。また本研究成果により、基質認識部位としての HL1 の同定に至った。同時に様々な低分子化合物の結合部位も同定し、TMD1、HL6 が創薬標的分子となることを明らかにした。

現在までに PS の構造情報はほとんど得られておらず、世界的に見ても「活性中心ポア構造」の提唱も含めて研究代表者の研究のみが進められている。本研究はアルツハイマー病創薬のみならず、膜内配列切断酵素の分子

メカニズム解明という意味でも酵素学的に大きなインパクトを持っている。

活性制御法の確立という点では、ランダムスクリーニングにより得られ、阻害機序が未知であった各種化合物の標的分子とメカニズムを同時に解明した。創薬プロセスにおいて化合物の標的分子同定はさらなる化合物の最適化に重要であるが、本研究においては膜タンパクという生化学的に扱いの困難な標的について様々な手法論を開発できた。一方、構造機能活性相関に基づく阻害剤のラショナルデザインとして、非天然アミノ酸とモノクローナル抗体という二種類のアプローチにより成功した。低分子化合物でない新たな創薬スキフォールドの利用は大きな注目を浴びている。特に抗体医薬は抗がん分子標的薬としての他、最近ではアルツハイマー病治療薬としても開発が進められている。実際、本研究において確立した $\gamma$ セクレターゼ活性中和抗体は抗がん作用を持つことを確認している。本研究成果は $\gamma$ セクレターゼの構造を理解し、その機能との関連を明らかにした上で活性制御薬を作出できたという意味で、これまでにない新たなアルツハイマー病創薬の礎を築くことができたと考えられる。

### 5. 主な発表論文等

(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 31 件)

- ① Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Miyake Y, Takagi J, Sakata-Yanagimoto M, Iwanari H, Osawa S, Morohashi Y, Li T, Wong PC, Chiba S, Kodama T, Hamakubo T, Tomita T, Iwatsubo T: Neutralization of the  $\gamma$ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin. *Oncogene* 31:787-798, 2012 査読有 doi: 10.1038/onc.2011.265
- ② Ohki Y, Higo T, Uemura K, Shimada N, Osawa S, Funamoto S, Ihara Y, Berezovska O, Yokoshima S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: Phenylpiperidine-type  $\gamma$ -secretase modulators target the transmembrane domain 1 of presenilin 1. *EMBO J* 30:4815-24, 2011 査読有 doi: 10.1038/emboj.2011.372
- ③ Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y, Shimada N, Higo T, Yokoshima S, Fukuyama T, Lee VMY, Trojanowski JQ, Tomita T,

- Iwatsubo T: BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate in neurons. *J Neurosci* 31:6850-6857, 2011 査読有 <http://www.jneurosci.org/content/31/18/6850.long>
- ④ Takagi S, Tominaga A, Tomita T, Iwatsubo T: Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the  $\gamma$ -secretase. *J Neurosci* 30:15943-15950, 2010 査読有 <http://www.jneurosci.org/content/30/47/15943.long>
- ⑤ Watanabe N, Takagi S, Tominaga A, Tomita T, Iwatsubo T: Functional analysis of the transmembrane domains of presenilin 1: PARTICIPATION OF TRANSMEMBRANE DOMAINS 2 AND 6 IN THE FORMATION OF INITIAL SUBSTRATE-BINDING SITE OF  $\gamma$ -SECRETASE. *J Biol Chem* 285:19738-19746, 2010 査読有 <http://www.jbc.org/content/285/26/19738.long>
- ⑥ Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Iwanari H, Isoo N, Osawa S, Fukuda MA, Kodama T, Hamakubo T, Li T, Wong PC, Tomita T, Iwatsubo T: Single chain variable fragment against Nicastrin inhibits the  $\gamma$ -secretase activity. *J Biol Chem* 284:27838-27847, 2009 査読有 <http://www.jbc.org/content/284/41/27838.long>
- ⑦ 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 査読有 <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja9001458>
- ⑧ Tomita T: Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease treatment. *Expert Rev Neurotherapeutics* 5:661-679, 2009 査読有 <http://www.expert-reviews.com/doi/pdf/10.1586/ern.09.24>
- ⑨ 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 査読有 <http://www.jneurosci.org/content/28/24/6264.long>
- ⑩ 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 査読有 <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cb700073y>
- [学会発表] (計 81 件)
- ① Tomita T: Structure and function relationship of the  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases toward development of treatment of Alzheimer disease. October 5-7, 2011, 7th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology: Regulated Intramembrane Proteolysis in Cancer Development and Neurodegenerative Diseases. Potsdam, Germany
- ② Tomita T: Structure-function relationship of  $\gamma$ -secretase. September 22-24, 2011, 2011 International Conference on Molecular Neurodegeneration. Shanghai, China
- ③ Tomita T: Alzheimer Drug Mechanisms. November 18, 2010, 2010 FIP Pharmaceutical Science World Congress (PSWC)/AAPS, New Orleans, Louisiana, USA, USA
- ④ Tomita T: Molecular mechanism of action of  $\gamma$ -secretase inhibitors and modulators. July 12, 2010, AAICAD2010, Honolulu, Hawaii, USA
- ⑤ 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2件）

名称：アルツハイマー病および癌の治療薬

発明者：富田泰輔ら

権利者：東京大学

種類：PCT

番号：JP2007/000438

取得年月日：平成19年4月25日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

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

新聞報道

$\beta$ ・ $\gamma$ セクレターゼ活性制御によるアルツハイマー治療薬の開発 薬事日報 2010年9月10日

予防薬研究 酵素にも注目 信濃毎日新聞 2010年10月8日

アルツハイマー病 原因タンパク蓄積 脂質が関係 信濃毎日新聞 2011年6月20日

「モジュレーター」機能の一端解明 信濃毎日新聞 2011年12月5日

表彰歴

ポスター発表「 $\gamma$ セクレターゼモジュレーターGSM-1はプレセニンN末端断片を標的とする」

学会奨励賞（基礎研究部門） 第29回日本認知症学会にて受賞

第48回2011年度ベルツ賞二等賞「アルツハイマー病- $\beta$ アミロイドをめぐる分子病態と先制医療への展望」 2011年11月25日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富田 泰輔 (TOMOTA TAISUKE)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：30292957

### (2) 研究分担者

特になし

### (3) 連携研究者

特になし