

## 学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 薬物治療学Ⅱ研究室  
職・氏名 教授・福森 亮雄

研究テーマ：  
アルツハイマー病治療を目指す基質結合機構の解明

研究期間：  
2020 年 4 月 1 日 ~ 2022 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 福森 亮雄（大阪医科薬科大学・薬学部・教授）  
研究分担者 柳田 寛太（大阪医科薬科大学・薬学部・講師）  
研究分担者 岡田 健（大阪医科薬科大学・薬学部・特任研究員）  
研究分担者 丸山 理気（大阪医科薬科大学・薬学部・研究補助員）

<共同研究機関>

研究分担者 ハラルド・シュタイナー（ミュンヘン大学・医学部・教授）  
研究分担者 渡邊 淳（国立長寿医療研究センター・研究推進基盤センター・室長）

研究目的：

本研究の目的は  $\gamma$  セクレターゼのエクソサイトと呼ばれる基質結合部位への結合機構を解明し、副作用の少ないアルツハイマー病（AD）治療薬開発につなげることである。

アルツハイマー病の病原物質アミロイド  $\beta$  (A $\beta$ ) を産生する酵素である  $\gamma$  セクレターゼには、多くの生理的な基質が存在する。そのため、通常の蛋白分解酵素のように酵素触媒部位を標的とし、酵素阻害すると、A $\beta$  産生を抑制することで AD に対して治療となるものの、他の基質が有する生理的機能をも阻害してしまい、副作用が起こる（図 1）。申請者らが発見したエクソサイトは基質を選別

図1 従来の酵素触媒部位標的戦略

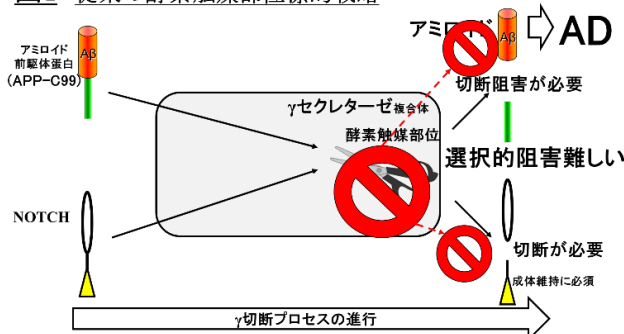
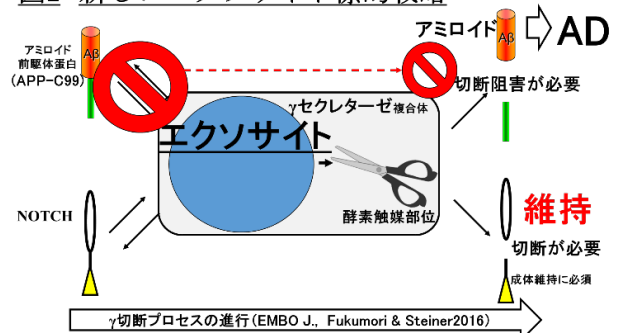


図2 新しいエクソサイト標的戦略



する部位であることから、その選別を制御できれば、Aβ 産生のみを抑制できる可能性があると考えている（図 2）。本研究課題では、そのエクソサイトへの多様な基質の結合メカニズムを調べることで、その阻害法開発へ向けた基盤構築を行う。

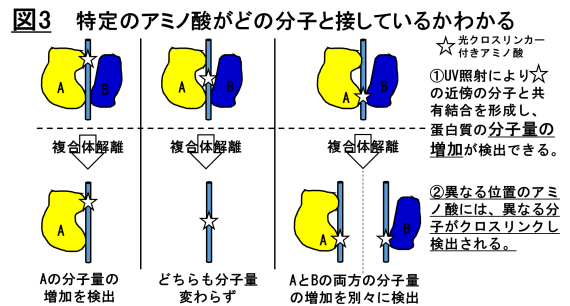
研究内容および研究成果：

アミロイド前駆体基質 (APP-C99 および APP-C83) の  $\gamma$ セクレターゼのエクソサイトへの結合の可視化は、ケミカルバイオロジーの技術のひとつである部位特異的光親和性クロスリンク法（図 3）を用いた。この手法により、分子の相互作用をアミノ酸レベルで検出できる。具体的には非天然アミノ酸 (para benzoyl phenylalanine) の遺伝的取り込み法（図 4）を用いて、

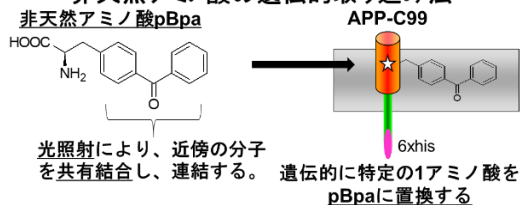
分子中の任意の 1 アミノ酸をクロスリンク可能な側鎖を持つ非天然アミノ酸に置き換えたアミロイド前駆体基質を大腸菌に発現させ C 末端に HIS タグにより精製する。その精製基質を  $\gamma$ セクレターゼを含む細胞溶解液と混合し、インタクトな結合状態で、光照射しクロスリンクさせる。その後、変性条件で、複合体を解離し、HIS タグを用いてプルダウンし、ウェスタンブロットする。基質と共有結合した酵素分子は分子量が増加する（黄矢頭が赤矢頭となる。図 5）。このようにして、基質分子中の各アミノ酸に接触する酵素分子を検出した。

今回は  $\gamma$ セクレターゼの代表的な基質 APP-C83 に絞り、APP-C83 のエクソサイト結合の検出系を確立した。APP-C83 は、Aβ の直接の前駆体である APP-C99 と同じく、アミロイド前駆体蛋白 (APP) 由来の  $\gamma$ セクレターゼの基質であるが、APP-C99 とは異なり、アミノ末端の 16 アミノ酸が欠けている。この欠損 16 アミノ酸残基には、APP-C99 がエクソサイトと相互作用する主要なアミノ酸が含まれており、エクソサイトへの結合メカニズムについてなんらかの洞察が得られると考え、APP-C83 に焦点を当て解析した（図 6）。APP-C83 の部位特異的光クロスリンク法を用いて、単一アミノ酸レベルでの  $\gamma$ セクレターゼとの相互作用を直接調べた。図 7 はその代表的結合部位 X 番残基と X+1 番残基における結合を示した。 $\gamma$ セクレターゼのサブユニット蛋白である PEN-2 は X 番残基が強く相互作用した。それに対して、APP-C99 の PEN-2 との相互作用は X+1 番残基で強かった。このように、相互作用アミノ酸残基が異なっていた。また、本報告書の図には示していないが、その他の残基でも結合強度の違いがみられた。

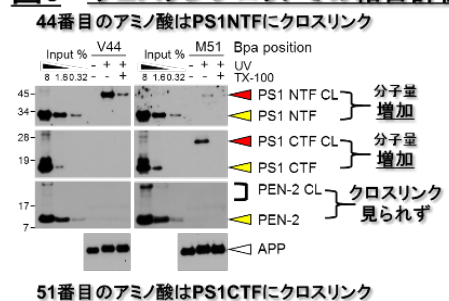
今回、APP-C83 もエクソサイト構成蛋白と相互作用することを示した。また、その相互作用するアミノ酸は、APP-C99 とは異なることを明らかにした。これらのことから、エクソサイトの結合にはアミノ酸配列の異なる基質を認識する柔軟性がある事がわかった。今後この柔軟性を回避できるようなエクソサイト阻害剤を探す必要がある。

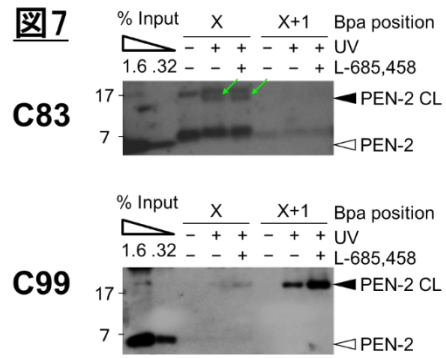
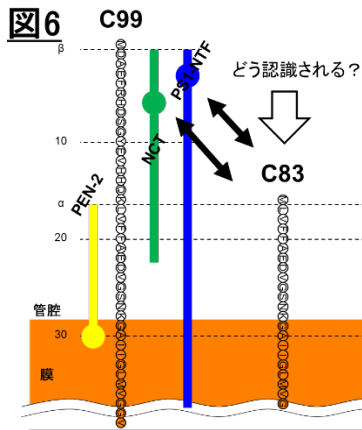


**図4 光親和性クロスリンク可能な非天然アミノ酸の遺伝的取り込み法**



**図5 ウェスタンブロットでの結合評価**





成果発表：

<原著論文>

- 1 ELISA Evaluation of Tau Accumulation in the Brains of Patients with Alzheimer Disease. Shinohara M, Hirokawa J, Shimodaira A, Tashiro Y, Suzuki K, Gheni G, Fukumori A, Matsubara T, Morishima M, Saito Y, Murayama S, Sato N. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 80:652-662. (2021)
- 2 Upregulated expression of a subset of genes in APP;ob/ob mice: Evidence of an interaction between diabetes-linked obesity and Alzheimer's disease. Shinohara M, Kikuchi M, Onishi-Takeya M, Tashiro Y, Suzuki K, Noda Y, Takeda S, Mukouzono M, Nagano S, Fukumori A, Morishita R, Nakaya A, Sato N. *FASEB Bioadv.* 2;3:323-333. (2021)
- 3 Deletion of B-cell translocation gene 2 (BTG2) alters the responses of glial cells in white matter to chronic cerebral hypoperfusion. Suzuki K, Shinohara M, Uno Y, Tashiro Y, Gheni G, Yamamoto M, Fukumori A, Shindo A, Mashimo T, Tomimoto H, Sato N. *J Neuroinflammation.* 18:86. (2021)

<学会発表>

- ・未発表

<その他>

- ・
- ・