

β 淀粉样前体蛋白分泌酶的研究进展

朱粹青 孙凤艳

(复旦大学医学院医学神经生物学国家重点实验室 上海 200032)

Alzheimer 型老年痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 的脑病理变化主要为老年斑、神经原纤维缠结和神经元缺失。大量的研究证据表明 β 淀粉样蛋白 (β-amyloid protein, βAP) 是老年斑的主要结构物质, 并且 βAP 还具有对神经元细胞毒性作用, βAP 被认为是 AD 发生的早期触发因素。βAP 是一种 4kD 的小肽, 为 β 淀粉样前体蛋白 (β-amyloid precursor protein, APP) 上酶切下来的片段^[1]。多年来国际上许多研究机构致力研究 APP 分泌酶, 以便于寻找抑制 βAP 形成的有效措施。最近这方面研究终于有了较重要的进展, 克隆了 APP 分泌酶的基因。

一、跨膜蛋白 APP

定位于 21 号染色体的 APP 基因, 通过 mRNA 水平的不同剪辑, 最终形成脑内 3 种含 βAP 氨基酸序列的多肽, 长度分别为 770、751、695 个氨基酸。APP 裂解至少有两途径, 即所谓 βAP 形成途径, 和非 βAP 形成途径。如图 1 所示, 前者通过 β 分泌酶 (β-secretase) 与 γ 分泌酶的先后作用下, 形成的酶解产物除 βAP (包括膜外得 28 个氨基酸序列和 12-15 个跨膜序列) 外, 还有 sAPP-β 分泌片段和 P7。

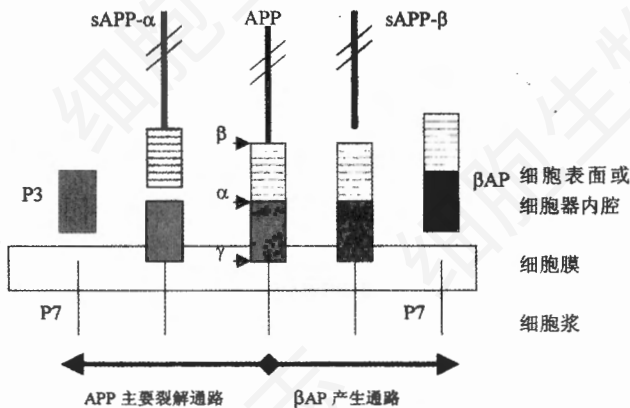


图 1 APP 蛋白裂解通路
APP: β 淀粉样前体蛋白, βAP: β 淀粉样蛋白。

非 βAP 形成途径经 α 分泌酶与 γ 分泌酶先后酶解形成 sAPP-α 分泌片段, P3 和 P7。βAP 肽段内虽然含 α 位点, 但是通常 βAP 不被 α 分泌酶裂解。酶解产物 sAPP-α, sAPP-β, βAP, P3 将被释放出细胞。在生理条件下 APP 的酶解以非 βAP 形成途径为主。如在某些病理情况下非 βAP 形成途径被抑制、βAP 形成途径激活或 APP 表达增加都将导致 βAP 形成增多^[2]。另外, 新近的研究表明在细胞凋亡过程中 APP 胞浆内的 C-末端还可被 Caspase-6, Caspase-8 酶切, 但是它们的酶切位点与上述几个分泌酶的酶切位点无关^[3]。

APP 酶切下来的 βAP 是脑内老年斑的主要成分。另外, βAP 聚集后有明显的细胞毒性作用, 表现为导致细胞的凋亡并促进神经元在兴奋性毒素诱导下的凋亡, 此机制一般认为与 βAP 可引起细胞的氧化应激反应 (Oxidative stress) 和钙稳态的破坏有关^[4]; 而 Nakagawa^[5] 的研究表明 βAP 的细胞毒性机制在于 βAP 主要通过 caspase-12 介导的内质网应激反应途径引起细胞凋亡。Busciglio 还发现 βAP 可导致神经元 Tau 蛋白的磷酸化, 而超磷酸化的 Tau 蛋白是 AD 的神经纤维缠结的主要结构物质^[6]。

参与 AD 的脑病理改变的因素是多元的, βAP 在其中起着主轴机制的作用。干预 βAP 的设想很多, 包括抑制 βAP 的聚集及毒性, 加速 βAP 的代谢, 抑制 βAP 的前体 APP 的表达, 调节 APP 的酶解通路以减少 βAP 形成 (如上调 α 分泌酶活性) 等。其中最后这种方式似乎更具预防 AD 的意义。因此 APP 相关的分泌酶成了 AD 研究领域中的热点。

二、α 分泌酶

α 分泌酶在其被克隆或提取纯化以前, 人们已

国家重点基础研究项目基金资助, 项目号 G1999054007。

对这类假定的酶进行了大量的研究^[2]。APP 肽 α 位裂解过程主要在细胞表面和高尔基体上进行。APP 上 α 分泌酶的作用位点主要在 Lys¹⁶-Leu¹⁷ (以 β AP 肽的 N-端第一个氨基酸编号为 1, 下文不再重复)。研究发现 α 分泌酶对 APP α 位的氨基酸序列要求并不十分严格^[7], 但对 APP 的 α 位点至膜的距离有相对严格的要求。另外, 发现用去垢剂处理可有效地抑制 α 酶切, 而一种锌螯合剂 (1, 10-phenanthroline) 也可明显抑制该活性, 提示 α 分泌酶可能是一种或一类膜结合的金属蛋白酶^[2]。 α 分泌酶活性受细胞的信号机制的调节, PKC, PKA 和 MAPK 活性的上调或磷酸酯酶的抑制都将促进 α 酶切的作用^[7], 而 APP 的 N 端和 C-末段氨基酸序列对 α 位裂解也有调节作用^[8]。

膜结合的 TNF 前体和 APP 一样同属 I 型跨膜蛋白, 其裂解释放分泌型 TNF α 的过程与 APP 的 α 位裂解并释放 APP α 的形式非常接近, 这种生化过程也称胞外域释放 (ectodomain shedding)。TNF 裂解依赖于一种 ADAM (a disintegrin and metalloprotease family) 家族的蛋白酶 ADAM17, 也称 TACE (tumor necrosis factor α converting enzyme)^[9]。用 ADAM 抑制剂 IC3 (Immunx compound 3) 可抑制 APP α 形成。根据这一线索 Buxbaum^[10] 和 Lamich^[11] 分别在 98 和 99 年报道了 TACE、ADAM10 具 α 分泌酶活性。但目前尚不能确认 α 分泌酶是否仅此两种, 以及 ADAM 家族是否涵盖所有的 α 分泌酶。

三、 β 分泌酶

β 分泌酶是 β AP 形成的限速酶, 直接参与 β AP 的形成。关于形成 β AP 的酶切过程的细胞器, 曾有人认为主要在溶酶体中进行, 但由于亮抑肽酶 Leupeptin (一种溶酶体酶抑制剂) 并不能抑制其 β AP 形成, 而溶酶体缺陷细胞株仍能形成 β AP, 并且在纯化的溶酶体中未能检出 β AP, 因此溶酶体可能不是形成 β AP 的主要的细胞器。而用干扰高尔基体功能的 monensin 和 brefeldin-A, 以及能破坏早期内质网 NH₄Cl, 都能抑制 β AP 形成^[7]。因此, 高尔基体相关结构可能是 β AP 形成的主要细胞器。

用重组技术在 β 和 α 酶切位点之间插入或缺失氨基酸, 使 β 位点至膜的距离增加或减少, 结果不能抑制 β AP 形成。提示 β 分泌酶没有 α 分泌酶样的“酶切点至膜距离”的依赖性。但如去除 APP 肽羧基端胞浆序列, 只要保留的跨膜序列能使 APP 锚定

于质膜, 那么就仍能进行 β 位裂解。这提示 β 分泌酶可能存在于细胞膜上^[7]。以后的研究表明 β 分泌酶可能是一种膜结合的天冬氨酸蛋白酶, 最适 pH 5.5, 但是该酶活性不被典型的天冬氨酸蛋白酶抑制剂抑胃酶肽 pepstatin 所抑制。 β 分泌酶对 APP 的 β 位点氨基酸序列的要求比较严格, β 位点附近的大部分突变都会抑制 β 分泌酶的作用。不过也有例外, 例如 Met⁻¹→Leu (瑞典 APP 双突变 AD 家族) 或 Asp¹→Glu 将上调分泌 β AP 活性。

最近 Amgen 公司的研究小组和另三家单位在 Science、Nature 等杂志先后报道了他们筛选到的同一种具有准确的 β -位酶切作用的蛋白^[12-15]。这是一种具有一次跨膜结构的天冬氨酸酶, 称为 BACE (beta-site APP-cleaving enzyme)。该酶在组织中广泛存在, 在脑内的海马, 皮层和小脑表达较高。脑内 BACE 主要在神经元内表达, 而在胶质细胞内较少表达或没有。在细胞内 BACE 定位于参与分泌途径的细胞器, 包括高尔基体, 高尔基体外侧网络 (trans-Golgi network), 分泌囊泡和内体 (endosomes), 而在内质网和溶酶体很少。并观察到用 BACE 的反意寡聚核苷酸可明显抑制 APP 的 β 位裂解, 如给予的 APP 含瑞典 AD 家族的双突变, BACE 对 APP 的 β 位裂解作用明显加强。进一步研究还发现 BACE 是一种糖基化的跨膜蛋白, 它像 APP 一样胞浆内的 C-末端较短。BACE 氨基酸序列与胃蛋白酶家族的天冬氨酸酶有 30% - 37% 的同源性, 其胞外域含有的三对二硫键的结构特征。

四、 γ 分泌酶

APP 经 β 位裂解后的羧基片段, 进一步经 γ 分泌酶的作用形成 β AP。 γ 分泌酶的作用的位点会有两个氨基酸的位移, 从而产生 β AP 1-42 或 β AP 1-40, 前者较后者更易聚集并具更明显的神经毒性。APP 的 γ 位酶切比较特别, 因为 γ 位点在 APP 的跨膜序列之间。APP 的 γ 位裂解可以在细胞内进行, 也可在细胞表面进行, 不同的细胞可能有所不同。

由于曾发现一种 Calpain 的抑制剂 MDL28170 可非常明显抑制 β AP 和 P3 产生的作用, 因此认为 Calpain 可能参与 γ 分泌酶作用, 不过至今尚没有证据表明 Calpain 直接参与 γ 位酶切作用^[16]。另一 γ 分泌酶候选者为 S2P (sterol regulatory element-binding protein site 2 protease) 酶, 这是根据其底物 SREBP (sterol regulatory element-binding protein) 的裂解和 APP 形成 β AP 过程一样经过两次酶解, 并且

后一次在跨膜序列内,但是最终 S2P 被实验否定^[17]。

自 95 年早老蛋白(Presenilin PS)-1,-2 被克隆后不久,有作者发现早发性家族性 Alzheimer 病相关的 PS 基因突变可导致 β AP1-42/1-40 的比例升高,这一现象使人联想到 PS 与 γ 分泌酶的关联。PS1 基因敲除研究发现 β AP 和 P3 的产生受到明显抑制^[18],进一步提示 PS 可能参与 APP 的 γ 位酶切。PS 蛋白是多次跨膜的多肽,由于 PS1 的 TM6 和 TM7 两个跨膜序列中的各有一个与 γ 分泌酶活性相关的天冬氨酸^[19],因此一些作者相信 PS 蛋白就是 γ -分泌酶。Octave 用一种没有内源性 γ 分泌酶活性的昆虫细胞 Sf9,导入人 PS1 和 APP₆₉₅基因,结果没有观察到 APP₆₉₅肽 γ 位裂解^[20]。但是根据这一研究要否定“PS 蛋白就是 γ 分泌酶”的设想似乎有些不够,也许 γ 分泌酶的作用需要某些协同因子,而这些因子恰好 Sf9 细胞所不具备。直至去年九月, Yu 等终于在 Nature 报道发现 PS1 通过与 Nicastrin 的协同作用参与 β AP 形成中的 γ -分泌酶的作用^[21],基本肯定了 PS1 的 γ -分泌酶作用。

五、结 语

在 Alzheimer 的脑病理进展中, β AP 是一种最为重要的可导致神经元损伤的多肽。通过对分泌酶的调节,抑制 β AP 的产生,是防治 AD 研究的重要方向之一。由于有 HIV 蛋白酶抑制剂成功地进入临床用于 AIDS 治疗的先例,因此 APP 分泌酶调制剂的巨大的市场前景为许多生物制药公司所重视,纷纷介入该领域。事实上在没有克隆 APP 分泌酶以前,已有公司掌握了这些酶的抑制剂^[22],但是这些酶的发现为筛选出更特异的酶抑制剂提供了基础,并且可以通过对酶与抑制剂结合的复合体的 X 光衍射分析,对新的抑制剂的设计提供资料。当然这类酶抑制剂最终是否能用于临床,尚有待研究。比如就 BACE 而言,它的特性,功能还不明了,BACE 抑制是否会有意想不到的副作用;其次,如果真的筛选到 BACE 特异性抑制剂,那么该药物除了必须能透过血脑屏障外,还需跨越两层质膜到达高尔基体或内体的内腔起作用^[23]。最后值得一提的是,APP 相关分泌酶的研究和发现的意义并非仅仅是药物开发,事实上它无论对我们更深入地了解 Alzheimer 的脑病理机制,还是 APP 至 β AP 的生化通路都是至关重要的。

摘 要

β 淀粉样蛋白(β AP)在 Alzheimer 型老年痴呆的脑的病理改变机制中起着重要的作用。 β AP 不仅是老年斑的主要结构物质,而且还具有对神经元细胞毒性作用,因此它被认为是 AD 早期发生的触发因素。 β AP 是由 β 淀粉样蛋白前体蛋白(APP)上酶切下来的 4kD 的小肽片段。APP 可通过不同的途径裂解,形成 β AP 的裂解途径是其中之一。因此寻找参与 APP 裂解酶, α 、 β 、 γ 分泌酶成为 AD 研究领域的一个热点。近期这方面的研究有了较重要的进展,克隆了这些酶的基因。APP 相关分泌酶的研究不仅有利于开发抑制 β AP 形成的药物,而且对进一步研究 AD 的病理机制也将产生影响。

参 考 文 献

- [1] Masters C. L., et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**:4245 - 4249.
- [2] Selkoe D. J., 1996, *J. Biol. Chem.*, **271**:18295 - 18298.
- [3] Yang A., et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, **274**: 20650 - 20656.
- [4] Mattson M., et al., 1993, *TINS*, **16**:409 - 414.
- [5] Nakagawa T., et al., 2000, *Nature*, **403**:98 - 103.
- [6] Busciglio J., et al., 1995, *Neuron*, **14**:879 - 888.
- [7] Hooper N. M., et al., 1997, *Biochem. J.*, **321**: 265 - 279.
- [8] Tomita S., et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**: 19304 - 19310.
- [9] Moss M., et al., 1997, *Nature*, **385**:733 - 736.
- [10] Buxbaum J., et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**:27765 - 27767.
- [11] Lammich S., et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**:3922 - 3927.
- [12] Vasser R., et al., 1999, *Science*, **286**:735 - 741.
- [13] Yan R., et al., 1999, *Nature*, **402**:533 - 537.
- [14] Sinha S., et al., 1999, *Nature*, **402**:537 - 540.
- [15] Lin X., et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**: 1456 - 1460.
- [16] Zhang L., et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, **274**: 8966 - 8972.
- [17] Ross SL., et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**: 15309 - 15312.
- [18] De Strooper B., et al., 1998, *Nature*, **391**:387 - 390.
- [19] Wolfe M. S., et al., 1999, *Nature*, **398**:513 - 517.
- [20] Octavv J., et al., 2000, *J. Biol. Chem.*, **275**: 1525 - 1528.
- [21] Yu G. et al., 2000, *Nature*, **407**:48 - 54.
- [22] Pennisi E., 1999, *Science*, **286**:650 - 651.
- [23] Strooper B., et al., 2000, *Nature*, **402**:471 - 472.