論文の内容の要旨

論文題目　γセクレターゼ : LC-MS/MS によるトリペプチド仮説の検証

指導教員　辻　省次　教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 16 年 4 月進学
医学博士課程
脳神経医学専攻
髙見　真子

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) は、初老期から老年期にかけて発症する進行性の認知症を特徴とする。神経病理学的特徴としては、無数の老人斑、神経原線維変化の出現と神経細胞の脱落がある。老人斑の構成成分であるアミロイドβタンパク質 (amyloid β-protein ; Aβ) は、分子量約 4,000 の凝集性の高いタンパク質であり、アミロイド前駆体タンパク質 (β-amyloid precursor protein ; APP) がβおよびγセクレターゼと呼ばれる 2 種類のプロテアーゼによって切断されて産生される。まず、βセクレターゼが APP の細胞外領域を切断することでAβの N 末端側が生じ、つづいてγセクレターゼが膜貫通ドメインの中心部を切断 (γ切断) することにより Aβが産生され、細胞外に分泌される。この時、同時に膜貫通ドメインの細胞質側も切断 (ε切断) されることがわかり、C 末端断片が APP intracellular domain (AICD) として細胞質内に放出される。γ切断、ε切断ともに、γセクレターゼ阻害剤によって阻害され、また、ほとんどの場合、AICD 産生が阻害される状況下では Aβの産生も阻害され、AICD の産生が増加する場合は、Aβ産生も増加することから、γ切断とε切断の間には密接な関連があると思われた。われわれの研究室では、培養細胞やトランスジェニックマウス (Tg2576) の脳内において Aβ1-43、45、46、48 の存在を明らかにし、γ切断部位とε切断部位の間にもいくつかの切断部位が存在することを示した。また、培養細胞をγセクレターゼ阻害剤の一種である DAPT で処理すると、Aβ40 の減少とともに Aβ43 が、遅れて Aβ46 が、細胞内に蓄積することを見いだした。一方、Aβ1-52、50、49 を発現させた細胞では、Aβ40 の産生が多いのに対し、Aβ1-51、48 を発現さ

せた細胞では Aβ42 の産生が多くなること、Aβ40 を多く産生する細胞では AICD50-99 が多いのに対し、Aβ42 を多く産生する細胞では AICD49-99 が多くなることを観察した。これらの結果から、Aβ40、43、46 が相互に関係し、Aβ42、45、48 が相互に関係しているのではないかと考えられた。

そこで、以上の観察に基づき、われわれはトリペプチド仮説を提唱した。それは、γセクレターゼによる APP の切断は、ε切断が起こったあとに、膜貫通ドメインのαヘリックス構造 (1 ターンは 3.6 残基) にそって 3 残基ごとに連続的に起こるという仮説である。しかしながら、これまでの研究では、産生された Aβ の種類をウエスタンブロット法で確認し、AICD の種類をマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析法 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ; MALDI-TOF MS) によって検出し、その関係をみているだけであり、これらの結果からだけでは、間接的証明と言わざるを得ない。そこで、本研究では、このトリペプチド仮説を検証するために、liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いてトリペプチドを反応液中に直接的に検出、定量する方法を確立し、APP の膜貫通ドメインから遊離されると想定される 5 種類のトリペプチド (IAT、VIV、ITL、TVI、VIT) の存在を証明しようと試みた。

まず、LC-MS/MS を用いて夾雑物の多いサンプル中の微量のトリペプチドを検出できる条件を確立した。この条件を用いて、無細胞 Aβ産生系で 5 種類のトリペプチドを検出、定量した。

CHO 細胞にγセクレターゼの基質であるβCTF を発現させた細胞の膜画分を 37°C で 20 分間インキュベーションしたところ、インキュベーション前とくらべて、予想した 5 種類のトリペプチドはすべて著しく増加した。このトリペプチドの増加がγセクレターゼによる産生であることを確認するため、γセクレターゼ阻害剤を添加したサンプルについて解析した結果、VIT 以外は約 50%抑制された。これらのことから、37°C でインキュベーションすることで確認された IAT、VIV、ITL、TVI の増加の少なくとも一部は、βCTF がγセクレターゼにより切断されることによって産生されたと考えられた。しかし、γセクレターゼは、それ以外の部分での切断をしないのかどうかを確認する必要がある。そこで、1 残基ずつずらしたトリペプチドを含む、7 種類のトリペプチド (VVI、ATV、IVI、TLV、GVV、VIA、LVM) についても LC-MS/MS を用いて検出、定量した。その結果、すべてのトリペプチドが 37°C インキュベーションによって増加した。そのうち、

GVV、VVI、ATV、TLV の増加は、γセクレターゼ阻害剤を添加しても減少しないので、γセクレターゼによるものではないと結論した。それ以外の VIA、LVM、IVI は 20 分間のインキュベーションで増加し、γセクレターゼ阻害剤の添加で産生が抑制されることから、γセクレターゼにより切断されて生じたペプチドの可能性は否定できない。CHO 細胞の膜画分には、βCTF、γセクレターゼ以外にも多くのタンパク質、おそらくプロテアーゼも夾雑しているため、βCTF 以外のタンパク質からγセクレターゼ以外のプロテアーゼによって分解された同じ配列をもつトリペプチドも検出してしまう可能性があると考えられた。そこで、γセクレターゼの CHAPSO 可溶化・再構成 Aβ産生系を用いて、検討をおこなうことにした。CHAPSO 可溶化・再構成 Aβ産生系では、基質は精製したβCTF のみであり、酵素源としては、CHO 細胞に存在するγセクレターゼを CHAPSO 可溶化後に、ニカストリンに対する抗体で免疫沈降したものを使用する。したがって、ほとんど夾雑物のない、酵素と基質のみが存在する系を構築することが可能である。この系でも時間依存的に AICD50-99、49-99 と、Aβ1-40、42、43、45、48、49 が産生されるので、γセクレターゼの基本的な性質は保存されていると考えた。そこで、これらのサンプルを LC-MS/MS で解析したところ、インキュベーション前のサンプルでは、IVI 以外のトリペプチドはほとんど検出されなかった。37°C で 1 時間インキュベーションしたサンプルでは、予想した 5 種類のトリペプチドはすべて著しく増加するのに対して、それ以外の 7 種類のトリペプチドはほとんど増加しなかった。また、この系にγセクレターゼ阻害剤である L685,458 または DAPT を添加して 1 時間インキュベーションしたサンプルについては、これら 5 種類のトリペプチド産生はほぼ完全に抑制された。これらの結果から、γセクレターゼによってβCTF から産生されるトリペプチドは、IAT、VIV、ITL、TVI、VIT の 5 種類であることが明らかとなった。