

審査の結果の要旨

氏名 高見 真子

本研究では、 γ セクレターゼによる $A\beta$ 産生経路の機序としてトリペプチド仮説を提唱し、これを検証するために、LC-MS/MS によるトリペプチドの検出、定量を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. LC-MS/MS によるトリペプチドの測定条件について検討した。その結果、無細胞 $A\beta$ 産生系サンプルでは、目的とするピークの合成標品の溶出時間とサンプル内のトリペプチドの溶出時間がずれるという現象が観察された。また、同じ前駆イオン、プロダクトイオンをもつピークが、定量すべきピーク付近に複数みられるという問題も生じた。これらの問題点は次の 2 種類の方法を用いて確認することで解決した。第一には、無細胞 $A\beta$ 産生系サンプルに合成標品を加えた溶液を LC-MS/MS にかけて正確な溶出時間を確認する方法で、第二の方法は、1 つのトリペプチドの前駆イオンに対して、プロダクトイオンを 2 つ選択し、その 2 つのプロダクトイオンの比を求める方法である。これらの方法によって、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。
2. LC-MS/MS を用いて、無細胞 $A\beta$ 産生系サンプルを解析した結果、トリペプチド仮説に基づいて遊離してくると予想される 5 種類のトリペプチド (IAT、VIV、ITL、TVI、VIT) を検出、定量することができた。37°C で 20 分間インキュベーションすると、5 種類のトリペプチドはインキュベーション前に比べて大幅に増加し、この増加は、VIT 以外の IAT、VIV、ITL、TVI では、 γ セクレターゼ阻害剤である L685,458 と DAPT により大きく阻害された。以上の結果は、これら IAT、VIV、ITL、TVI のトリペプチドの遊離が γ セクレターゼ依存的であることを強く示唆している。
3. トリペプチド仮説に基づいて遊離してくると予想した 5 種類のトリペプチドが、 γ セクレターゼによって特異的に産生されているのかを調べるため、1 残基ずつずらしたトリペプチドなど異なる 7 種類のトリペプチドについても測定をおこなった。ウエスタンブロットで検討した結果では、無細胞 $A\beta$ 産生系においては、 $A\beta_{40}$ 、42、43、45、46、48 しか同定されず、少なくとも 1 残基ずれた位置では γ セクレターゼによる切断が起こらないはずである。しかし、LC-MS/MS による定量の結果、予想以外の 7 種類すべてのトリペプチドが検出された。ただ、これらのトリペプチドはインキュベーションによって増加しない、L685,458 または DAPT によって抑制されない、前の 5 種類のトリペプチドよりも量が少ない等の理由から、おそらく γ セクレターゼによる β CTF の切断によって出現したものではないと考えられた。

4. LC-MS/MS を用いて、CHAPSO 可溶化・再構成 A β 産生系サンプルを解析した結果、トリペプチド仮説に基づいて遊離してくると予想されるトリペプチド 5 種類を検出、定量することができた。この系でも、37°C でインキュベーションすることにより 5 種類のトリペプチドの著しい増加がみられた。特に、この系では、予想された切断部位から 1 残基ずれたトリペプチドはほとんど検出されず、また γ セクレターゼ阻害剤によってトリペプチドの産生がほぼ完全に抑制されたので、CHAPSO 可溶化・再構成 A β 産生系で観察された 5 種類のトリペプチドは、 γ セクレターゼによる β CTF の切断によって産生されたものであると結論した。

以上、本論文は LC-MS/MS を用いて、トリペプチド仮説に基づいて遊離されてくるトリペプチドを検出、定量し、これらが γ セクレターゼによる切断によって産生されてきたものであることを明らかにした。本研究は、LC-MS/MS を用いることにより、これまでに検出できなかった微量のトリペプチドの存在を証明し、今後 γ セクレターゼの切断機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。