

## 論文内容の要旨

### 論文題目

#### Study on the shedding activity of amyloid precursor protein by ADAM family metalloproteases

(ADAM ファミリーメタロプロテアーゼによる  
アミロイド前駆体タンパク質のシェディング活性の解析)

氏名 保戸田 二香

プロテオリシスは様々な生理機能に関与し、生体を維持するために必要不可欠な現象である。なかでも、成長因子やサイトカイン、細胞接着因子といった膜タンパク質の切断・分泌はシェディングと呼ばれ、細胞の成長や炎症反応、細胞移動などを調節している。シェディングには通常働いている構成的な活性以外に、PKC (プロテインキナーゼ C) の活性化剤である PMA などのフォルボールエステルをはじめ、様々な刺激に応じて促進される調節的な活性がある。このシェディングを担うプロテアーゼとして、ADAM (a disintegrin and metalloprotease) ファミリーが注目されている。ADAM は共通のドメイン (シグナルペプチド、プロドメイン、メタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、システインリッチドメイン、EGF 様ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質ドメイン) 構造を持つ I 型の膜タンパク質で、これまでに 30 以上の分子がファミリーを構成しており、受精、筋融合、細胞 - 細胞外マトリックス間相互作用など、様々な生理機能において重要な役割を担っていることが報告されている。ADAM のいくつかは、Zn<sup>2+</sup> 結合配列 (HEXGHXXGXXHD) を持ち、シェディング活性を有する。シェディングは様々な生理機能を調節する一方、ガンや関節炎といった病気への関与が報告されている。このようなシェディングが関与する病気にアルツハイマー病 (AD) がある。

AD は進行性の痴呆であるが、病理学的には脳内における老人斑と神経原線維変化によって特徴付けられる。老人斑の主要構成成分であるアミロイドβ (Aβ) は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) からβ-, γ-セクレターゼと称されるプロテアーゼによって切断・分泌さ

れることが知られている。家族性 AD において APP の変異が報告され、また他の遺伝子変異によって発症する家族性 AD においても凝集しやすい A $\beta$  産生の上昇が報告されたことから、A $\beta$  の産生が AD 発症に重要な役割を担っていると考えられている。一方、APP の主要な代謝経路は、A $\beta$  が産生されない  $\alpha$ -セクレターゼによって切断・分泌されるものである。この  $\alpha$ -セクレターゼ候補として、これまでに ADAM9、10、17 が報告されている。細胞を用いた過剰発現系では、ADAM10、17 は構成的、調節的両方の活性を示し、ADAM9 は調節的な活性のみ、あるいは僅かに構成的な活性を示す。一方、ADAM17 ノックアウトマウス由来の細胞では調節的な活性の抑制は見られるが構成的な活性は完全に抑制されず、ADAM9、10 ノックアウトマウス由来の細胞では  $\alpha$ -セクレターゼ活性の抑制は見られない。これは ADAM がリダグナントに働いているか、他の  $\alpha$ -セクレターゼの存在が考えられる。AD 発症機構の解明には APP プロテオリシスの解明が重要であり、またシェディング活性調節機構の解明という点からも、私は ADAM による  $\alpha$ -セクレターゼ活性の解析を行うこととした。

ADAM9 の  $\alpha$ -セクレターゼ活性は当研究室で報告したものだが、私はまず当研究室でクローニングしたヒト ADAM9 のスプライシングバリエーション hADAM9s (s: short) に注目した。hADAM9s はエクソン 18 が欠損し、終止コドンの出現によって膜貫通および細胞質ドメインを欠く。RT-PCR の結果、検討を行った脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、気管の 6 器官全てにおいて、mRNA レベルでの発現を確認した。ADAM のプロテアーゼとしての活性化にはプロドメインの切断が必須であるが、C 末端側に *myc* エピトープおよび (His)<sub>6</sub> を付加した hADAM9s を COS 細胞中に発現させると、全長およびプロドメインが切断された活性型と思われるタンパク質両方とも培地中に分泌されていた。そこで、 $\alpha$ -セクレターゼ活性を検討するために、COS 細胞中で hADAM9s と APP を共発現し、培地中に分泌される APP 断片 (sAPP $\alpha$ ) の量を検討したところ、PMA を加えた時のみ mock (空ベクター) と APP のものと比べて有意に増加が見られた。このことから、hADAM9s は  $\alpha$ -セクレターゼとして調節的な活性を有することが示された。また、分泌されたタンパク質が  $\alpha$ -セクレターゼとして働く可能性を示した。PMA による活性化には ADAM の細胞質ドメインのリン酸化が関与しているとの報告もあるが、hADAM9s はそれとは異なる機構によって活性化されたものと考えられる。AD 治療の一方法として  $\alpha$ -セクレターゼ活性を上昇させることが挙げられるが、hADAM9s は新たなターゲットの 1 つと考えられた。

これまでの研究から、 $\alpha$ -セクレターゼは複数存在する可能性があること、ADAM においても基質特異性に差異があること、 $\alpha$ -セクレターゼ活性に ADAM の細胞質領域が必須でないことが示唆されていた。そこで私は、他の ADAM は  $\alpha$ -セクレターゼ活性を有するのか、ADAM の基質認識機構はどのようなものか、という 2 点に注目した。ADAM12、19 は、他の膜タンパク質においてシェディング活性が報告されている ADAM の中で、アミノ酸レベルで最も高い相同性 (44%) を示すことから、この 2 つの分子を用いて研究を行った。

より生理的活性に近いと思われる構成的な  $\alpha$ -セクレターゼ活性を検討するために、C 末端

側に V5 エピトープおよび(His)<sub>6</sub> を付加したヒト ADAM12、19 を HEK293 細胞中に発現させたところ、全長およびプロドメインが切断された活性型と思われるタンパク質が検出された。培地中における内在性 APP 由来の sAPP $\alpha$ 量を検討したところ、mock を導入したものと比べて ADAM19 のみ増加が見られた。また、Zn<sup>2+</sup>結合配列中の E346 を A に置換した不活性型の ADAM19E346A 変異体でも検討を行ったところ、プロドメインが切断されたタンパク質が検出されたものの sAPP $\alpha$ 量の増加が見られなかった。これらのことから、ADAM19 が構成的な $\alpha$ -セクレターゼ活性を有すると考えられた。これらの ADAM について免疫蛍光染色法を用いて細胞内局の検討を行ったところ、主としてゴルジ体や小胞体といった内膜系と思われる部位に局在し、一部は細胞表面上にも局在が観察された。また、内在性 APP と一部共局在を示し、コンストラクト間での大きな差異は観察されず、ADAM12 と 19 の活性の差異は局在によるものではないと考えられた。

ADAM12 と 19 の活性の差が構造によるものと考え、ADAM12、19 のドメインを交換したキメラコンストラクトを作成して $\alpha$ -セクレターゼ活性の検討を行うこととした。コンストラクトは、シグナルペプチドからメタロプロテアーゼドメインまでを置換したもの、ディスインテグリンドメインから EGF 様ドメインまでを置換したもの、膜貫通ドメインから細胞質ドメインを置換したものを作成した。全てのコンストラクトにおいて HEK 細胞中で発現を確認し、プロドメインが切断された活性型と思われるタンパク質が検出された。これらのキメラ変異体を用いて $\alpha$ -セクレターゼ活性の検討を行ったところ、ADAM19 のシグナルペプチドからメタロプロテアーゼドメインまで（触媒領域）を有した変異体においてのみ sAPP $\alpha$ 量の増加が検出された。また、免疫蛍光染色法を用いて細胞内局在の検討を行ったところ、野生型の ADAM12、19 と同様の局在を示し、大きな差異は観察されなかったことから、 $\alpha$ -セクレターゼ活性の差異は触媒領域の構造によって生じると考えられた。これまで構成的な $\alpha$ -セクレターゼ活性が報告されている ADAM10 と 17 のメタロプロテアーゼドメインには他の ADAM には見られない挿入配列があり、この配列が基質認識や活性に影響を及ぼす可能性が示唆されている。 $\alpha$ -セクレターゼにおいては ADAM19 が活性を示したことから、この配列は必要不可欠なものではないと考えられた。また、プロテアーゼ活性に影響を及ぼす可能性があるドメインとしてシステインリッチドメインが報告されているが、ADAM12 と 19 の $\alpha$ -セクレターゼ活性の差異には影響を与えなかった。これは基質認識が ADAM ごと、基質ごとに異なることを示唆しており、これらの差異を解明することがシェディング活性と様々な生体機能の関係を理解するために重要であると考えられた。

本研究では新たな $\alpha$ -セクレターゼ候補として hADAM9s と hADAM19 を示した。これまでの研究では個々の ADAM のシェディング活性について報告したものが多かったが、今後は細胞中でそれぞれの ADAM がどのような関係にあり活性の制御を受けているのかを検討することが重要である。また、APP のプロテオリシスに関して、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -セクレターゼの同定とそれに続いて三者の関係を解明することが、AD 発症機構の解明ならびにシェディング活性を含めた膜タンパク質のプロテオリシス機構の解明に重要であると考えられる。