

本論文は、家族性アルツハイマー病 (AD) の原因遺伝子産物であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) のプロテオリシスを担う α -セクレターゼの同定及び解析を行ったものである。本研究は、APP のプロテオリシスの解明に必須な基盤を明らかにした研究である。

本論文の内容は以下のようにまとめられる。

シェディングとは膜タンパク質が切断・分泌されることである。これまで、I型の膜タンパク質 APP のシェディングを担う α -セクレターゼとして、 Zn^{2+} 依存的なメタロプロテアーゼ、A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM)ファミリーのメンバーである ADAM9、10、17 が報告されていたが、他のプロテアーゼも含めてリダンドントに働いている可能性が示唆されていたため、他の ADAM ファミリーについて α -セクレターゼ活性の検討を行った。

まず、当研究室で α -セクレターゼ活性を報告した ADAM9 の新たなスプライシングバリエーション ADAM9 short (ADAM9s) に注目した。ADAM は I 型の膜タンパク質であるが、ADAM9s は膜貫通ドメインから細胞質ドメインを欠くスプライシングバリエーションである。ADAM9 は広範に mRNA の発現が報告されているが、ヒトの mRNA ライブラリーを用いて RT-PCR を行ったところ、ADAM9 全長および ADAM9s のバンドが検出され、シーケンスを確認した。これにより、ADAM9s が生体内でも発現している可能性を示した。次に、COS 細胞で ADAM9s を発現させたところ、培地中に分泌されていた。APP の α -セクレターゼ活性を検討するために、以前に ADAM9 の α -セクレターゼ活性を報告した方法に沿って検討を行った。COS 細胞中に APP と ADAM9s を一過性に共発現させ、培地中に切断・分泌された APP の断片である sAPP α 量を検討したところ、シェディング活性化剤である PMA を加えた時のみ、APP と空ベクターを導入した場合に比べて有意に増加が見られた。この結果より、ADAM9s が刺激応答性の調節的な α -セクレターゼ活性を持つ可能性が示された。AD 医療戦略の 1 つとして α -セクレターゼ活性を上昇させるという考え方があるが、細胞外に分泌されているプロテアーゼの方がターゲットにしやすい可能性がある。また、ADAM9 の調節的な α -セクレターゼ活性には、細胞質ドメインが必要不可欠ではないことがわかった。

次に、ADAM12 と 19 を用いて α -セクレターゼ活性の検討を行った。この 2 分子は、報告されている ADAM の中で Zn^{2+} 結合配列を持ち、ヒトの体細胞で mRNA の発現とシェディング活性が報告されているメンバーの中で、最も相同性の高い 2 分子である。この 2 分子を比較検討することによって α -セクレターゼ活性の検討を行うだけでなく、ADAM の APP 認識機構についても検討を行うことを考えた。検討方法について、COS 細胞中に APP

と ADAM を共発現させる方法では形質転換効率や発現量に違いが出やすいとの懸念から、HEK293 細胞を用いて ADAM のみを一過性に発現させ、内在性の APP に対して α -セクレターゼ活性を示すかどうかを検討した。培地中に分泌された sAPP α 量を検討したところ、ADAM19 を発現させた時のみ、空ベクターを導入したものに比べて有意に増加が見られた。また、ADAM19 の Zn²⁺結合配列中の E を A に置換した不活性型変異体では sAPP α 量の増加は見られなかったため、ADAM19 のみが α -セクレターゼ活性を持つことが明らかになった。この ADAM12 と 19 の活性の違いが何に依存しているのかを検討するために、まず蛍光免疫染色法を用いて細胞内局在の検討を行った。その結果、ADAM12 と 19 は主に細胞内に局在し、一部は細胞表面上に存在した。また、APP との共局在も認められ、大きな違いはないと考えられた。

そこで、活性の違いが構造に起因すると考え、ADAM12 と 19 のドメインを交換したキメラ変異体を作成し α -セクレターゼ活性の検討を行った。その結果、ADAM19 の開始 Met からメタロプロテアーゼドメインまで（活性領域）を含む変異体において有意に sAPP α 量の増加が見られた。また、細胞内局在を確認したところ、どの変異体においても大きな違いは見られなかった。これらの結果から、ADAM12 と 19 の APP に対する活性の違いは、活性領域の構造の違いに起因することが明らかになった。

AD 発症機構の解明や医療の開発には、APP のプロテオリシスの解明が欠かせない。APP のプロテオリシスの大部分を担う α -セクレターゼについては、複数のプロテアーゼがリダグメントに働いていると考えられているが、1 つ 1 つのプロテアーゼを同定し活性の解析を行うことが全体の詳細な理解につながるものと考えられる。また、共通な構造を持つ複数の ADAM がいかに棲み分けを行っているのかを解明することで、シェディングを通した様々な生体反応がいかに調節されているのかを理解するために有用な知見を得られものと考えられる。

以上のように、保戸田二香さんの学位申請論文は、APP のプロテオリシスの大部分を担う α -セクレターゼ候補を新たに示し、基質認識機構の一部を明らかにしたもので、APP のプロテオリシスの解明、ひいては AD 発症機構の解明および医療の発展に貢献するものである。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定した。