

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 田邊千晶

アルツハイマー病 (AD) は、アミロイドβタンパク質 (Aβ) の脳内の蓄積により生じる老人斑を特徴とする神経変性疾患である。Aβは、アミロイド前駆体 (APP) から、βセクレターゼとγセクレターゼによる連続的な切断によって生じる。一方、Aβ非産生経路ではαセクレターゼがAβ配列中を切断するため、Aβを産生しない。

αセクレターゼとして、ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) ファミリーに属するADAM9、ADAM10、ADAM17が同定されている。本論文提出者は、ADAM19の過剰発現によってαセクレターゼ活性が上昇し、発現抑制によってαセクレターゼ活性が減少することを修士課程において示した。これを受けて、本論文では、ADAM19とAPPの結合を共免疫沈降法によって示し、ADAM19がAPPを直接基質として認識しているかを明らかにすることを目的とした。共免疫沈降法による結果から、ADAM19とAPPは相互作用することが示された。しかし、APPのαセクレターゼ切断部位近傍アミノ酸配列に対する抗体 (6E10) での免疫沈降では、ADAM19が共沈してこなかった。これらの結果と、αセクレターゼ切断において、APPの膜近傍のαヘリックス構造が重要であるという報告から、ADAM19は、APPの細胞外側の膜近傍配列を接合面としてAPPと結合していることが示唆された。修士課程において示した結果とあわせて、ADAM19が新たなαセクレターゼとして機能していることが示唆された。

また、αセクレターゼ経路の生理機能を明らかにするためには、APP以外の基質に対する作用を考慮する必要がある。ADAM9、10、17にはAPPの他にも多くの基質が存在するが、ADAM19の基質は比較的わずかしは見つかっていない。また、ADAM19の活性を調節する因子も明らかになっていない。そこで、まず、ADAM19の新たな相互作用分子を探索することが必要であると考えた。ADAMがどのような分子認識機構で基質特異性や結合特性を決めているのか、現在のところ全く明らかになっていない。そこで本論文提出者は、ADAM19の分子認識機構や活性調節メカニズムを明らかにすることを第二の目的とし、酵母 two-hybrid system を用いて、ヒト胎児脳 cDNA から、ADAM19の細胞外ドメインに相互作用するタンパク質を探索した。その結果、CRIP2 (cysteine-rich protein 2)、TESK1 (testis-specific kinase 1)、VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2) が候補として得られた。それらは、ADAM19のディスインテグリンドメインやシステインリッチドメインという、メタロプロテアーゼドメイン近傍の配列を認識して結合していた。

まず、VAMP2については、過剰発現の系において共免疫沈降法によってADAM19との結合が確認され、免疫染色による共局在も確認された。VAMP2はADAM19の基質ではなかったが、ニューログリオーマ細胞にVAMP2を過剰発現させるとアポトーシスが誘導されることがわかった。また、カスパーゼ3活性を測定すると、ADAM19の結合部位と考え

られる VAMP2 の細胞外 3 残基を欠失させたものよりも、全長の VAMP2 を発現させたときにカスパーゼ 3 の活性化が見られた。ADAM19 の自己切断により分泌される分泌型 ADAM19 は、VAMP2 と顆粒状に共局在することから、分泌型 ADAM19 が VAMP2 と結合することによって、脂質ラフトに輸送されるのではないかと考えた。そこで、COS-7 細胞に ADAM19-V5 と、メタロプロテアーゼ不活性型変異 E346A をもつ ADAM19EA-V5 を HA-VAMP2 と共発現させた結果、ADAM19 の活性依存的に VAMP2 の脂質ラフト局在が増加する傾向がみられた。ADAM19 による APP 切断は、非脂質ラフトで起こるが、分泌型 ADAM19 は脂質ラフトへと運ばれ、おそらく全長型 ADAM19 とは異なる機能を脂質ラフト中でもつのではないかと考えられる。全長型 ADAM19 は、APP の $\alpha$ 切断により sAPP $\alpha$  を分泌し、sAPP $\alpha$  が神経保護作用へと働くが、分泌型 ADAM19 が VAMP2 によって脂質ラフトへ運ばれることによって、神経保護作用の逆であるアポトーシスを誘導しているのではないかと考えられた。

次に、CRIP2 について調べると、過剰発現の系で共免疫沈降法により ADAM19 との結合が確認された。CRIP2 は膜タンパク質ではないが、心臓や脳において細胞表面に発現しているという報告があり、膜タンパク質である ADAM19 に結合することによって細胞表面に局在している可能性が示唆された。また、内在性の CRIP2 と ADAM19 の局在を観察した結果、CRIP2 は細胞の伸展する際の仮足に強く発現していた。しかし、その部位に ADAM19 はあまり発現しておらず、ゴルジ体において共局在していることが観察できた。また、ADAM19 が CRIP2 を細胞外に分泌する機能をもつことが明らかになった。分泌される CRIP2 の生理機能に関してはこれからの問題であるが、ゼブラフィッシュにおいて Wnt3a が CRIP2 の発現誘導し、心臓の神経堤細胞の発生に機能しているという報告と、Wnt シグナルが活性化することで A $\beta$  の神経毒性が抑えられるという報告から、CRIP2 が神経保護作用を持っている可能性を考えている。これらの ADAM19 の相互作用分子の探索においては、残念ながら新しい基質はみつからなかったが、結合するタンパク質の生理機能が明らかになった。

最後に、 $\alpha$ セクレターゼを活性化する物質の探索を試みた。近年、脂質と APP プロテオリシスとの関連について様々な報告があり、膜の脂質組成や流動性が、酵素と基質の反応効率に重要であることが示唆されている。そこで、PUFA (polyunsaturated fatty acid) または中鎖脂肪酸であるカプリル酸をアシル基としてもつトリグリセリドの、APP プロテオリシスに対する影響を検討し、酵素活性を変化させる脂質化合物を見つける研究を行った。サントリー株式会社が合成した種々の脂質を A172 細胞に添加し、 $\alpha$ セクレターゼ活性を上昇させる物質を探索した。その結果、sn-2 位にアラキドン酸と側鎖にカプリル酸をもつトリグリセリドである 8A8 が、 $\alpha$ セクレターゼ活性を約 18% 上昇させた。また、A $\beta$  40 生成を約 22% 抑制した。添加後 4 時間で作用したことから、脂質の組成が変化したことが考えられた。そこで、脂質ラフトを単離し、APP プロセッシングに関わる酵素の局在への影響を調べた結果、8A8 処理によって脂質ラフトの量が減少し、 $\alpha$ セクレターゼである

ADAM17 と ADAM19 が脂質ラフトから非脂質ラフトへと局在変化していた。以上の結果より、8A8 は  $\alpha$  セクレターゼを活性化する脂質として有用であると考えられた。

$\alpha$  セクレターゼ活性化物質はいろいろと報告されている。PACAP が  $\alpha$  セクレターゼを活性化するという報告があるように、AD で影響を受けやすい脳の部位において神経伝達物質や神経ペプチドに対する G タンパク質共役受容体を活性化することも、 $\alpha$  セクレターゼを活性化することにつながるといわれている。今回、8A8 というグリセロール骨格の sn-2 位にアラキドン酸をもつ化合物が、穏やかに  $\alpha$  セクレターゼ活性を上昇させ、 $A\beta$ 40 を減少させる効果があることを明らかにした。8A8 のカプリル酸が加水分解されるとできる 2AG はカンナビノイド CB1 受容体の内在性リガンドであり、カンナビノイド CB1 受容体も G タンパク質共役タンパク質である。また、8A8 処理によって脂質ラフトの量が減少した結果から、脂質ラフトに存在するコレステロールなどの脂質に作用し、非脂質ラフトで主に機能するといわれる  $\alpha$  セクレターゼの活性が上昇したのだと考えられた。

以上の研究成果によって、ADAM19 が APP  $\alpha$  セクレターゼとして機能することが明らかとなり、AD の治療における  $\alpha$  セクレターゼ活性化の標的が増えた。また、ADAM19 の相互作用分子である CRIP2 や VAMP2 の新たな生理機能が示唆された。そして、 $\alpha$  セクレターゼ活性化に関わる脂質を明らかにした。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する。