

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

細胞接着分子 CADM1 の ADAM10 と  $\gamma$ セクレターゼによる分解

氏名 長柄 雄介

#### 【研究の背景と目的】

私の研究対象である CADM1(Cell adhesion molecule 1)は、多様な機能を持つ接着分子であり、アポトーシスの誘導、がんの抑制をはじめとした多くの現象への関与が報告されている。

非小細胞肺癌の 11 番染色体長腕上の LOH(Loss of heterozygosity)の発見を受け、ヌードマウスへの腫瘍形成を抑制する配列を同染色体領域から絞り込んだ結果、CADM1 遺伝子が同定された。以降、肺がんのほか、すい臓がん、前立腺がんなど多種のがんにおいて、CADM1 がプロモーターのメチル化などによって発現抑制されていることが報告されている。逆に、成人 T 細胞白血病の白血病 T 細胞において特に発現が強まる遺伝子としても見出され、CADM1 の過剰発現は白血球の血管内皮細胞への接着を強め、ヌードマウスで臓器への浸潤を促進するという報告もなされた。CADM1 というひとつの分子が、がんの種類によって抑制と悪化という逆方向に寄与するという点は興味深い。

CADM1 は肺、精巣、マスト細胞、脳などで強く発現しており、ノックアウトマウスがオスの精子形成不全により不妊となること、マスト細胞の生存に寄与し、マスト細胞と神経の結合を媒介すること、ニューロンのシナプス形成を誘導し、自閉症の家系において CADM1 遺伝子に変異が見られることなどが報告されており、不妊、アレルギーなどのマスト細胞機能や神経原性炎症、神経発生など、がん以外にも重要な分子と考えられている。

CADM1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型タンパク質であり、細胞レベルでの機能としては、細胞間接着能を持つこと、細胞増殖を遅くすること、カスパーゼによるアポトーシスを誘導することなどが示されている。細胞増殖や細胞死に関連する機能には CADM1 細胞内ドメインが必須とわかっており、細胞内ドメインへの結合タンパク質もいくつか見つかっている。がんに関しては、これら全体から、細胞外ドメイン同士の接着により上皮の接着状態を保持し、同時に細胞内ドメインからのシグナルにより増殖を抑制し細胞死を誘導することで、上皮性のがんの悪化を食い止めていると考えられてい

る。

しかし、これらの研究はこれまで、常に全長の CADM1 が接着因子として働くという観点でのみ研究されてきた。しかし、共同研究を行っている近畿大学医学部伊藤教授らの最近の研究により、CADM1 が Shedding されることがわかり、新たな生理機能が示唆された。

Shedding とは膜貫通型タンパク質がプロテアーゼによる切断を受けて細胞外ドメインを遊離する現象のことであり、活性型リガンドの分泌、細胞接着の抑制、Shedding に続いて起きるもうひとつのプロテオリシスである $\gamma$ セクレターゼによる切断を経た核へのシグナル伝達などを引き起こすことがわかっている。Shedding は発生や疾病に広く関与する重要な現象であり、欠損させると胎生致死となる Shedding 酵素もいくつか知られている。

Shedding を行う酵素としてよく知られているのはメタロプロテアーゼやセリンプロテアーゼであり、その中でも ADAM ファミリーメタロプロテアーゼに代表される膜貫通ドメインを持つメタロプロテアーゼは主要な Shedding 酵素として最もよく知られている。

CADM1 に起きる Shedding は、CADM1 の細胞接着能だけでなく、シグナル伝達を介してアポトーシス誘導などの機能も調節する可能性があるため、CADM1 の Shedding メカニズムの解明は CADM1 機能のより深い理解につながり、例えばプロテアーゼ阻害剤によるがん治療の研究にもつながる。Shedding により分泌される CADM1 細胞外ドメインの機能も未知であるが、CADM1 による細胞接着を競合的に阻害したり、生理活性断片としての新たな機能を獲得したりしている可能性がある。

以上のような背景で私は Shedding をはじめとする CADM1 のプロテオリシスに興味を持ち、プロテオリシスの機構とそれらを担う酵素の性質とを明らかにすることを目的として研究を行った。

## 【結果と考察】

本研究では、Shedding と $\gamma$ セクレターゼによる切断という、CADM1 の機能調節または機能発現に重要と考えられるプロテオリシス機構にはじめて着目し、その一端を解明した。また、 $\gamma$ 切断産物である CADM1-ICD を初めて見出し、その局在を調べ、細胞死誘導における機能を評価した。

## CADM1 に起こるプロテオリシスの確認

まず、CADM1 にどのようなプロテオリシスが起きているかを調べるため、CADM1 発現細胞のウェスタンブロッティングにより CADM1 の断片を確認した。90 kDa 前後に現れる全長 CADM1 のほかに、17 kDa 付近と 35 kDa 付近に Shedding 産物のバンド(それぞれ $\alpha$ CTF、 $\beta$ CTF と呼ぶ。CTF; C-terminal fragment)が得られた。また、多くの膜タンパク質の Shedding を促進する薬剤としてフォルボールエステルである PMA が知られているが、 $\beta$ CTF の量は PMA 処理に依存しないのに対し、 $\alpha$ CTF 量は PMA 処理により増加した。また、培養上清中には $\alpha$ 切断により $\alpha$ CTF と同時に生じる

$\alpha$ NTF が分泌されることを確認した。

以上の結果から、CADM1 は Shedding により  $\alpha$ CTF と  $\beta$ CTF へと分解され、 $\alpha$ CTF と同時に  $\alpha$ 切断により産生される  $\alpha$ NTF は細胞外に分泌され、 $\alpha$ 切断は PMA 依存的に促進されることが示唆された。

また、CADM1 の  $\beta$ 切断とリソソーム分解経路の関連を検討するため、リソソーム酵素群の阻害剤を用いて細胞内の  $\beta$ CTF 量への影響を評価した。しかし、 $\beta$ CTF だけでなく CADM1 と  $\alpha$ CTF も同様に細胞内に蓄積したため、 $\beta$ 切断が特にリソソーム分解経路上で起こるとは考えにくい。

#### $\alpha$ 切断は膜画分系でも起こり、メタロプロテアーゼ阻害剤により阻害される

膜画分インキュベーションによる CADM1 Shedding 検出系を用いて、プロテアーゼ阻害剤感受性を検討した。CADM1 の  $\alpha$ 切断はメタロプロテアーゼが担うことがわかった。 $\alpha$ 切断は多くの膜貫通型タンパク質について知られているメタロプロテアーゼによる Shedding 様式をとっていると考えられる。

#### CADM1 の内在性の Shedding は ADAM10 に依存する

膜画分を用いた系の結果からメタロプロテアーゼによると考えられた  $\alpha$ 切断について、培養細胞系を用いてさらに検討した。siRNA を用いた実験の結果、恒常的な Shedding と PMA 誘導性の Shedding は共に ADAM10 に依存することが明らかになった。

#### CADM1 の $\alpha$ CTF は $\gamma$ セクレターゼにより ICD へと切断される

次に、 $\gamma$ セクレターゼ切断について、阻害剤とノックアウト細胞を用いて検討した。PMA による前処理で細胞質側  $\alpha$ 切断断片産生を刺激したあと、細胞を  $\gamma$ セクレターゼ阻害剤 DAPT または L-685,458 で処理したところ  $\alpha$ CTF の蓄積が観察された。この結果を受け、Tris-tricine SDS-PAGE とウエスタンブロットメンブレンのボイルを利用してさらに解析を続け、 $\gamma$ 切断産物である ICD (intracellular domain) を検出した。ICD は  $\gamma$ セクレターゼ阻害剤により消失した。 $\gamma$ セクレターゼ活性のない細胞においても  $\alpha$ CTF の蓄積が観察されたことと合わせ、 $\alpha$ CTF は  $\gamma$ セクレターゼにより ICD へと切断されると結論付けた。

#### ICD の一部は核に局在するが、細胞死を促進する機能は持たない。

$\gamma$ 切断産物はしばしば核に移行して転写調節を行うことが知られている。そこで、ICD が核にも局在するかどうかを細胞分画により調べた。その結果、ICD の一部は核に局在することがわかった。ここから、CADM1 も核移行して転写調節などの機能を果たす可能性が考えられた。

さらに  $\gamma$ 切断を介した CADM1 の機能メカニズムを探るために、CADM1 の既知の機能である細胞死の促進能を ICD が持つかどうかを検討した。全長 CADM1 を発現した細胞には

細胞死増強の傾向が見られたものの、ICD 発現細胞ではそれは見られなかった。細胞種の変更や、評価するフェノタイプを切り替えて、ICD の機能をさらに探索することが求められる。