

論文提出者氏名 長柄 雄介

本論文の研究対象である CADM1(Cell adhesion molecule 1)は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子であり、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。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、がん以外においても重要な分子と考えられている。

この CADM1 が Shedding される可能性が最近明らかになり、新たな生理機能が示唆されている。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、そのメカニズムの解明は CADM1 機能のより深い理解につながる。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、論文提出者は Shedding をはじめとする CADM1 のプロテオリシス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。

本研究では、Shedding と γ 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、 γ 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。

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トティングにより 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 α CTF、 β 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、 β CTF の量は PMA 処理に依存しないのに対し、 α CTF 量は PMA 処理により増加した。また、培養上清中には α 切断により α CTF と同時に生じる α 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 α CTF と β CTF へと分解され、 α CTF と同時に α 切断により産生される α NTF は細胞外に分泌され、 α 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 β 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 β CTF 量への影響を評価した。しかし、 β CTF だけでなく CADM1 と α CTF も同様に細胞内に蓄積したため、 β 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かった。

次に、論文提出者は膜画分インキュベーションによる CADM1 Shedding 検出系を確立し、プロテアーゼ阻害剤感受性の検討から、CADM1 の α 切断はメタロプロテアーゼが担うことを明らかにした。また、培養細胞系を用いた siRNA によるノックダウン実験の結果、恒常的な Shedding と PMA 誘導性の Shedding は共に ADAM10 に依存することを発見した。

次に、 γ 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 α CTF の産生を刺激したあと、細胞を γ セクレターゼ阻害剤 DAPT または L-685,458 で処理したところ α 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、 γ 切断産物である ICD(intracellular domain)を検出した。ICD は γ セクレターゼ阻害剤により消失した。 γ セクレターゼ活性のない細胞においても α CTF の蓄積が観察されたことと合わせ、 α CTF は γ セクレターゼにより ICD へと切断されると結論付けた。

γ 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 γ 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。

以上の研究成果により、CADM1 が恒常的にも PMA 誘導性にも shedding され、細胞内と細胞外に断片を生じることと、CADM1 の shedding が膜画分でも再構成可能であることが明らかになった。また、ADAM10 が CADM1 の恒常的 shedding と PMA 誘導性 shedding を行うことが本研究により初めて明らかになった。さらに、CADM1 の α CTF が γ セクレターゼにより ICD へと分解され、ICD の一部が核に局在することも証明された。以上から、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。