

氏 名	よこ ぜき とも いち 横 関 智 一
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3068 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科分子医学系専攻
学位論文題目	Meltrin $\beta$ /ADAM19 Mediates Ectodomain Shedding of Neuregulin $\beta$ 1 in the Golgi Apparatus: Fluorescence Correlation Spectroscopic Observation of the Dynamics of ectodomain Shedding in Living Cells (メルトリン $\beta$ はニューレグリン $\beta$ 1 の分子内切断をゴルジ装置にて行う: 蛍光相関分光法を利用した生細胞内における細胞外ドメイン切断の観察)
論文調査委員	(主 査) 教授 松田道行 教授 影山龍一郎 教授 永田和宏

### 論 文 内 容 の 要 旨

ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) ファミリーは、ディスインテグリンドメインとメタロプロテアーゼドメインを有する膜蛋白質である。その生理的機能はプロテアーゼとして膜型増殖因子や接着因子などの切断、インテグリンと細胞外マトリックスとの結合制御による受精や種々の形態形成への関与が示唆されている。プロテアーゼ活性を有する ADAM には TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE/ADAM17), Kusbaniyan (ADAM10) などが知られるが、その基質特異性や切断制御機構には未解明な点が多い。申請者の所属する研究室においてメルトリン  $\beta$  (ADAM19) は発生段階の後根神経節や脊髄に強く発現し、膜蛋白質であるグリア増殖因子を切断し Erb B レセプターの可溶性リガンドを産生することが示された。ErbB レセプターは乳癌や肺癌をはじめ、種々の疾病に関与することが示されている。ここで、メルトリン  $\beta$  によるグリア増殖因子切断反応の時間的、空間的特異性がどのように制御されているかは不明である。そこで本研究では、グリア増殖因子の切断制御におけるメルトリン  $\beta$  の役割を明らかにするため、以下の研究を行った。

まず、メルトリン  $\beta$  は、後根神経節の初代培養細胞の抗体染色によって主にゴルジ装置もしくはその周辺にいることが分かった。この結果を下に、メルトリン  $\beta$  はその基質であるグリア増殖因子の切断をゴルジ装置にて行っているのではないか、という仮説を立てた。

グリア増殖因子の切断が主にゴルジ装置にて起こることを、生きた細胞において実証するために、蛍光相関分光法 (Fluorescent Correlation Spectroscopy: FCS) を利用した。FCS は、共焦点顕微鏡によって作られた微小空間内のブラウン運動を測定することが出来るので、生きた細胞内でグリア増殖因子の切断の現場を観察することが出来ると考えた。ミドリザル腎臓由来繊維芽細胞 (COS7 細胞) にメルトリン  $\beta$  とグリア増殖因子を共発現させた系において FCS 測定を行うと、確かにゴルジ装置でのグリア増殖因子の切断が確認された。また、プロテアーゼ活性を失った点変異体 (EQ 変異体) では、ゴルジ装置における切断が抑制されていた。この結果は、細胞内の逆行性膜輸送阻害薬 (Bafilomycin A) を用いても確認された。

さらに、FCS による測定結果の検証のため、マウス神経芽細胞株もしくは、COS7 細胞にメルトリン  $\beta$  とグリア増殖因子を共発現させ、密度勾配超遠心法によって、ゴルジ画分及び小胞体画分の成分の分離を行った。その結果、確かにゴルジ画分にてグリア増殖因子が切断を受けていることが分かった。一方、EQ 変異体では、ゴルジ画分における切断が抑制されていた。ここで、TACE もこのグリア増殖因子を切断することが分かっている。そこで TACE の KO マウス胎仔由来繊維芽細胞を用いた同様の実験を行うと、メルトリン  $\beta$  による基質のゴルジ画分での切断が確認された。さらに、TACE とグリア増殖因子を共発現させた系では、基質の切断はメルトリン  $\beta$  の場合よりも軽い膜画分で起こっていることが示唆された。

以上から、本研究によって、下記2点のことが明らかとなった。

1. メルトリン $\beta$ は基質であるグリア増殖因子をゴルジ装置にて切断を行う。その効果は、TACEに非依存的である。
2. 同一の基質を少なくとも2種類のプロテアーゼが切断していることから、これらは切断反応の場を住み分けることによって、時間的、空間的に異なるリガンド産生制御を行っている可能性が考えられる。癌細胞や再生過程における種々の膜型増殖因子の過剰発現や活性化が知られていることから、癌治療や再生医療に繋がる有用な知見が得られたと考える。

### 論文審査の結果の要旨

メルトリン $\beta$ は、受精や発生、様々な疾病への関与が知られるADAMファミリーに属するプロテアーゼである。申請者は、膜型グリア増殖因子の切断制御におけるメルトリン $\beta$ の役割に関して以下の研究を行った。

メルトリン $\beta$ は初代培養神経細胞において、ゴルジ装置とその周辺に局在した。そこで蛍光相関分光法を利用し、メルトリン $\beta$ が基質であるグリア増殖因子をゴルジ装置で切断することを、生きた細胞で捉えることを試みた。COS7細胞にメルトリン $\beta$ とグリア増殖因子を共発現させ蛍光相関分光測定を行うと、ゴルジ装置でのグリア増殖因子の切断が観察され、それに対しプロテアーゼ活性を失った点変異体(EQ変異体)では、ゴルジ装置における切断が抑制される結果を得た。この結果は細胞内の逆行性膜輸送阻害薬(Bafilomycin A1)を用いても確認された。さらに、神経芽細胞およびCOS7細胞にメルトリン $\beta$ とグリア増殖因子を共発現させ、密度勾配超遠心法によってゴルジ及び小胞体画分の成分の分離を行うと、確かにゴルジ画分にて基質が切断され、EQ変異体ではゴルジ画分における切断が抑制された。グリア増殖因子を切断するもう一つのプロテアーゼADAM17の欠損細胞でもメルトリン $\beta$ による基質切断はゴルジ画分で見られ、さらにADAM17はメルトリン $\beta$ よりも軽い膜画分で基質を切断することが示唆された。以上から、メルトリン $\beta$ はADAM17と時間的・空間的に異なるリガンド産生制御に関与すると考えられた。癌細胞や再生過程では種々の膜型増殖因子の過剰発現や活性化が知られており、医療に繋がる有用な知見が得られたと考えられる。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値のあるものと認める。なお、学位授与申請者代平成19年1月10日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。