

(続紙 1)

京都大学	博 士 (薬 学)	氏名	相根 康司
論文題目	神経系特異的 ADAM 分子の機能解析研究		
(論文内容の要旨)			
ADAM (a disintegrin and metalloprotease) は、メタロプロテアーゼ (MP) ドメインおよびディスインテグリン (DIS) ドメインを有する 1 回膜貫通型タンパク質の総称であり、哺乳類では約 20 種類からなる ADAM 分子ファミリーを形成していることが知られている。ADAM 分子は、MP ドメインを介した基質タンパク質の限定分解機能および DIS ドメインを介したリガンド認識機能を有することが知られており、炎症性サイトカイン TNF- α のセクレターゼ(TACE)である ADAM17 や、アミロイド前駆体タンパク (APP) の α セクレターゼである ADAM10 をターゲットとした、炎症性疾患やアルツハイマー型認知症の治療薬開発の研究が進められている。著者は、機能未知の新規 ADAM 分子が新しい切り口の創薬ターゲットになると考えて、神経系に発現する新規 ADAM 分子の同定をおこない、それらの生理的機能を解析した結果、以下の新知見を得た。			
第一章 ADAM11、ADAM22、ADAM23 遺伝子の同定ならびに発現解析			
著者は、ヒト ADAM11 と相同性を有する Expressed Sequence Tag (EST)を GenBank データベース上に見出した。この DNA 配列を元に、古典的な cDNA ライブラリ・スクリーニングと RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法を組み合わせることにより、新規ヒト ADAM 分子 (ADAM22、ADAM23) と、それらのマウスオルソログの遺伝子配列を明らかにした。ADAM11、ADAM22、ADAM23 のアミノ酸配列を解析したところ、いずれもメタロプロテアーゼ活性に必須である亜鉛結合モチーフを欠いていた為、プロテアーゼ機能を有していないことが示唆された。一方、DIS ドメインの配列は高度に保存されていた。次に、ノザンブロット解析によって、ADAM11、ADAM22、ADAM23 の遺伝子発現部位を解析した結果、これらの ADAM 遺伝子がいずれもヒトおよびマウスの脳に高発現していることが明らかになった。以上の結果から、ADAM11、ADAM22、ADAM23 は神経系組織の細胞表面に発現し、DIS ドメインを介して何らかのリガンドを認識するレセプター様の分子として機能していることが示唆された。			
第二章 ADAM22 ノックアウトマウスの作製ならびに表現型解析			
著者は ADAM22 の生理的機能を明らかにするために、ADAM22 ノックアウトマウス (ADAM22-KO) を作製し、表現型解析をおこなった。その結果、ADAM22-KO は生後すぐには異常を認めなかったものの、生後 1 週目から顕著な体重増加の遅延およ			

び重度の運動失調を呈して、離乳前に例外なく死亡してしまうことを明らかにした。さらに、坐骨神経・三叉神経において重度のミエリン形成不全が起こっていることを見出した。以上の結果から、著者は ADAM22 が正常な神経機能に必須であり、末梢神経のミエリン形成に重要な役割を担っていることを明らかにした。

第三章 ADAM22 の分子機能解析

著者は、マウス脳から免疫沈降法・プロテオミクス解析によって ADAM22 結合分子の探索をおこなった結果、ヒト遺伝性てんかん ADLTE の原因分子である LGI1 を見出した。次に、著者は ADAM と LGI の分子間結合測定法を開発し、先天性末梢ミエリン形成不全マウス claw paw の原因分子である LGI4 が ADAM22 と結合することを明らかにした。また、著者は ADAM22 分子の変異体解析をおこない、プロセッシング効率を低下させるタイプの変異が、LGI4 結合能を減弱させることを示した。

以上、著者は、神経系特異的に発現する ADAM 分子、ADAM11、ADAM22、ADAM23 の遺伝子クローニングをおこない、それぞれの生体内における遺伝子発現パターンを明らかにした。続いて、ノックアウトマウスを用いた表現型解析から、ADAM22 が末梢神経のミエリン形成に重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、分子レベルの機能解析によって、ADAM22 が LGI1 および LGI4 と結合することを見出したことから、ADAM22 がこれらの分子を介して、てんかん発症またはミエリン形成へ関与している可能性を示唆した。本研究の成果は、LGI 分子の変異を原因とする神経疾患の発症メカニズムの解明、LGI 分子と ADAM 分子間の相互作用モジュレーションを作用メカニズムとする神経疾患治療薬の開発研究において重要な基礎的知見を提供するものである。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ADAM (a disintegrin and metalloprotease) は、メタロプロテアーゼドメインおよびディスインテグリンドメインを有する 1 回膜貫通型タンパク質の総称であり、哺乳類では約20種類からなるADAM分子ファミリーを形成する。ADAM分子のメタロプロテアーゼドメインは基質タンパク質の限定分解機能に関与し、ディスインテグリンドメインはリガンド認識機能に関与することが報告されている。炎症性サイトカイン TNF- α のセクレターゼであるADAM17や、アミロイド前駆体タンパクの α セクレターゼであるADAM10は、それぞれ炎症性疾患やアルツハイマー型認知症に関与しており、これらの疾患の治療薬開発の研究における重要な標的となっている。申請者は、新規ADAM分子の発見と生理機能の解析が新しい切り口の疾患治療薬の創出につながると考え、神経系に発現する新規ADAM分子の同定をおこない、それらの生理的機能を解析し、以下の新知見を得た。

第一章 ADAM11、ADAM22、ADAM23遺伝子の同定ならびに発現解析

ヒトADAM11と相同性を有するExpressed Sequence Tag (EST)をGenBankデータベース上に見出した。このDNA配列を元に、古典的なcDNAライブラリ・スクリーニングとRACE (rapid amplification of cDNA ends) 法を組み合わせることにより、新規ヒトADAM分子 (ADAM22、ADAM23) と、それらのマウスオルソログの遺伝子配列を明らかにした。ADAM11、ADAM22、ADAM23のアミノ酸配列を解析したところ、いずれもメタロプロテアーゼ活性に必須である亜鉛結合モチーフを欠いていたことから、これらのADAM分子はプロテアーゼ機能を有していないと推定された。一方、ディスインテグリンドメインの配列は高度に保存されていた。次に、ノザンブロット解析によって、ADAM11、ADAM22、ADAM23の遺伝子発現部位を解析した結果、これらのADAM遺伝子がいずれもヒトおよびマウスの脳に高発現していることが明らかになった。以上の結果から、ADAM11、ADAM22、ADAM23は神経系組織の細胞表面に発現し、ディスインテグリンドメインを介して何らかのリガンドを認識するレセプター様の分子として機能していることが示唆された。

第二章 ADAM22ノックアウトマウスの作製ならびに表現型解析

ADAM22の生理的機能を解明するために、ADAM22ノックアウトマウス (ADAM22-KO) を作製し、表現型解析をおこなった。その結果、ADAM22-KOは生後すぐには異常を認めなかったものの、生後 1 週目から顕著な体重増加の遅延および重度の運動失調を呈して、離乳前に例外なく死亡してしまうことが明らかになった。さらに、坐骨神経・三叉神経において重度のミエリン形成不全が起こっていることを見出した。以上の結果より、ADAM22が正常な神経機能に必須であり、末梢神経のミエリン形成に重要な役割を担っていると結論された。

第三章 ADAM22の分子機能解析

マウス脳から免疫沈降法・プロテオミクス解析によってADAM22結合分子の探索をおこなった結果、ヒト遺伝性てんかんADLTEの原因分子であるLGI1が見出された。ADAMとLGIの分子間結合測定法を開発し、先天性末梢ミエリン形成不全マウスclaw pawの原因分子であるLGI4がADAM22と結合することを明らかにした。さらに、ADAM22分子の変異体解析を行い、プロセッシング効率を低下させるタイプの変異が、LGI4結合能を減弱させることを示した。

以上、申請者は、神経系特異的に発現するADAM分子、ADAM11、ADAM22、ADAM23の遺伝子クローニングを行い、それぞれの生体内における遺伝子発現パターンを明らかにし、ノックアウトマウスを用いた表現型解析からADAM22が末梢神経のミエリン形成に重要な役割を担っていることを示した。さらに、分子レベルの機能解析からADAM22がLGI1およびLGI4と結合することを示し、ADAM22がこれらの分子を介しててんかん発症またはミエリン形成へ関与することを示唆した。本研究の成果は、LGI分子の変異を原因とする神経疾患の発症メカニズムの解明、LGI分子とADAM分子間の相互作用モジュレーションを作用メカニズムとする神経疾患治療薬の開発研究において重要な基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成22年5月17日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降