

いないことが多く、この点についてはさらなる解析が必要である。

SIRT6の代謝への影響

高脂肪食を摂取したマウスで見られる肥満などの代謝疾患をSIRT6が抑制する結果は、Sirt6-Tgマウスを使った初期の解析結果です。すでに明らかになっていたり。今回の実験では、通常の食餌を摂取したマウスを用いている。ブ

ドウ糖負荷テスト（ヒトでも糖尿病の診断に行われる。マウスでは、グルコース注射後に血中グルコースを処理・低下させる能力を調べる）を行ったところ、若いマウス（4～7カ月齢）では野生型マウスと差がなかったものの、加齢マウス（19カ月齢）ではSirt6-Tgマウスでグルコースの処理能力が改善していた。血中グルコース恒常性が改善していることを示す結果ではあるが、この傾向はオス、メスどちらでも見られ、SIRT6の延命効果がオスだけで見ら

れることを説明できるものではなかった。そこで、Sirt6-Tgマウスでの“オス特異的”な寿命延長のメカニズムを理解するために、次に遺伝子発現量を測定する全ゲノムDNAマイクロアレイ解析を行った。つまり、野生型オスマウス、野生型メスマウス、Sirt6-Tgオスマウス、Sirt6-Tgメスマウスから肝臓を取り出し、遺伝子発現の違いを解析したのである。その結果、野生型オスマウスとSirt6-Tgオスマウスの遺伝子発現に有意な差が見られ、代謝に関

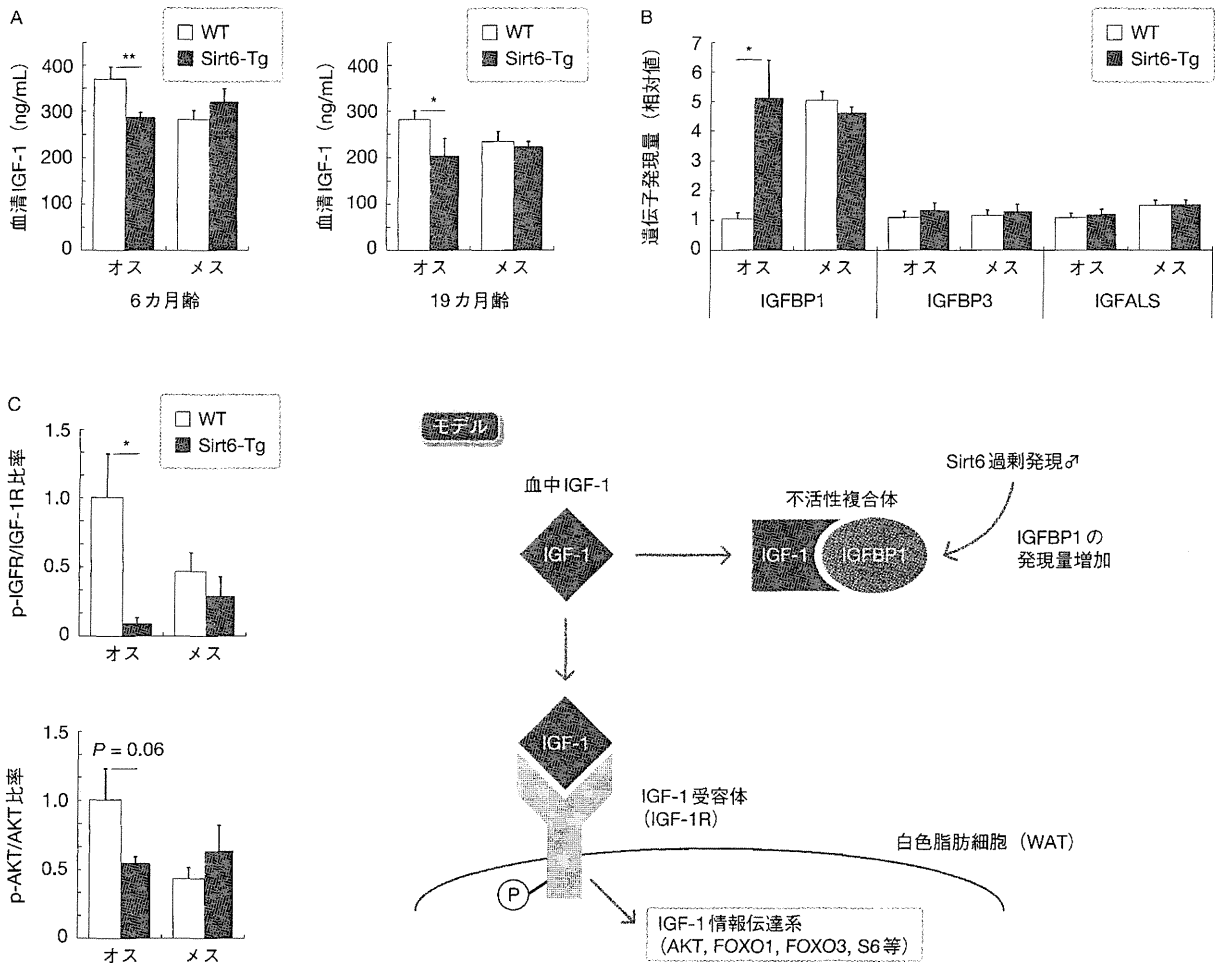


図2 Sirt6-Tg マウスにおけるIGF-1-AKT情報伝達経路の変化

A: それぞれのマウスで血清中のIGF-1の量を測定した結果、Sirt6-Tgオスマウスで、野生型マウスよりもIGF-1の量が減少していた
B: 肝臓でのIGFBP1の遺伝子発現量を、定量PCR法で測定した。IGFBP1には、ほかにIGFBP3やIGFALSが知られているが、Sirt6-Tgオスマウスでは、IGFBP1の遺伝

子発現量だけが野生型マウスに比べて著しく増加していた

C: 白色脂肪細胞 (WAT) でのIGF-1受容体 (IGF-1R) やAKTのリン酸化レベルをウエスタンブロットで定量した結果、Sirt6-Tgオスマウスだけでリン酸化効率の低下が見られた。同様のリン酸化効率の低下は、肝臓でも見られた

連する遺伝子が多くみつかった（これらの遺伝子のうち、約3割はカロリー制限食給餌によっても同様の変化を示すものであった）。一方、野生型メスマウスとSirt6-Tgメスマウスでは、ほとんど差が見られなかった。

Sirt6-Tg オスマウスでは IGF-1 情報伝達系が不活性化している

Sirt6-Tg オスマウスで発現に変化が見られた遺伝子のうち、何が重要な因子なのだろうか？ 著者たちは、IGFBP1 [インスリン様成長因子 (IGF-1) 結合タンパク質] に注目している。IGF-1 は、細胞表面の IGF-1 受容体を介して細胞内に情報を伝達するが、この IGF-1 情報伝達経路が寿命の調節に関与することはすでに知られていた [図2 (モデル)]。IGF-1 受容体に変異をもつ線虫・ハエや、IGF-1 受容体遺伝子が破壊されたマウスで寿命が延びることが知られていた。また、寿命を延ばす効果のあるカロリー制限食を給餌されたマウスでは、血清中の IGF-1 レベルが低下する一方、IGFBP1 の遺伝子発現が増加す

る。IGFBP1 は IGF-1 と結合することにより、不活性な複合体になると考えられている [図2 (モデル)]。

Sirt6-Tg マウスで血清中の IGF-1 量を調べてみたところ、オスマウスでだけ減少傾向が見られた。この効果は若いマウス (6カ月齢) ですでに見られ、加齢マウス (19カ月齢) でも継続した (図2A)。また、肝臓での IGFBP の発現を調べたところ、マイクロアレイの結果と同様に、Sirt6-Tg オスマウスでのみ増加が見られた (図2B)。IGF-1 が減少して IGFBP1 が増加したということは、すなわち、IGF-1 情報伝達系が不活性化することを示唆している。実際に、IGF 情報伝達経路を構成する因子の活性化レベル、すなわちリン酸化レベルを解析したところ、白色脂肪細胞 (WAT) での IGF-1 受容体、AKT などのリン酸化レベルは Sirt6-Tg オスマウスでのみ減少しており (図2C)、IGF-1 情報伝達経路の減弱が証明された。しかし、Sirt6-Tg メスマウスでは変化が見られなかった。“オス特異的”な寿命延長のメカニズムとは、IGF-1 情報伝達系なのであろう。

今回、サーチユイン SIRT6 が哺乳類

でも延命効果を示すこと、その延命効果が IGF-1 伝達系への作用であることが初めて報告された。しかし、SIRT6 の IGF-1 への作用がなぜオスマウスでだけ見られたのであろうか？ SIRT6 の効果はメスマウスではブロックされているのか？ それとも、オスマウスで促進されているのであろうか？ 今回の論文では、それを直接説明できるようなデータは示されていない。この疑問点を解決するためには、さらなる解析が必要である。

カロリー制限が寿命延長効果をもたらすことは証明されており、ヒトでも効果を検討すべく臨床試験が行われている。カロリー制限がもたらす寿命延長効果には、IGF-1 情報伝達経路が関与する可能性が強く示唆されており、今回の実験結果もこれを裏づけることになった。

[文 献]

- 1) Kanfi, Y., Peshti, V., Gil, R., Naiman, S., Nahum, L. *et al. Aging Cell*, **9**, 162 - 173 (2010).

二井 勇人 *Eugene Futai*

東北大学 大学院農学研究科 准教授



記憶力を良くしたい!

—インスリン様成長因子II (IGF-II) のはたらき

Nature 誌 2011年1月27日号掲載記事を読む

Chen, D. Y., Stern, S. A., Garcia-Osta, A., Saunier-Rebori, B., Pollonini, G., Bambah-Mukku, D., Blitzer, R. D., Alberini, C. M. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature*, 469, 491-497 (2011).

記憶力を高めるくすりがあると言われれば、そのような物質を欲しいと思う人がほとんどではないだろうか？ 私が受験勉強をする学生だったころには、集中力を高める物質として、カフェインに効果があると聞いてコーヒーを飲んでたことを思い出す。最近では、さまざまな精神治療薬に記憶力を高める効果があるのでは？ と考え、臨床でも役立つような記憶薬の開発に取り組んでいる人たちもいる。これから紹介する *Nature* 誌の1月27日号では、Dilon Y. Chenらが、インスリン様成長因子II (IGF-II) というポリペプチドに記憶力を高める働きがあることを報告している。

抑制性忌避学習実験とは？

この論文では、ラットを使った学習実験で、記憶のメカニズムについて研究している。図1に示したように、ラットを入れる実験用の箱の中には、安全な場所（壁は白色で明るい）と床から軽微な電気ショックを与える場所（壁は黒色で暗い）を作り、仕切りで区切っておく。実験では、はじめにラットを安全な場所に置き、仕切りを開ける。そうすると、何も知らない哀れなラットは10～20秒で暗い電気ショック領域に入り、電気ショック（0.6 mAで2秒

〈実験装置〉

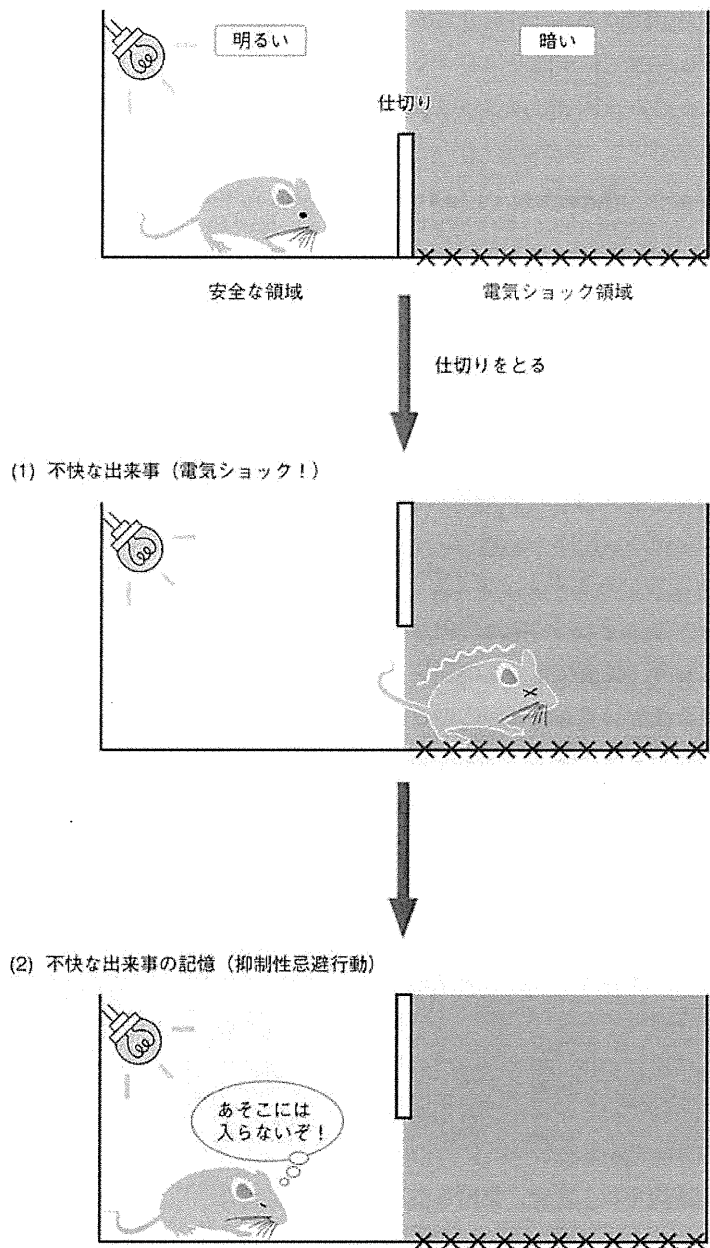


図1 抑制性忌避学習実験

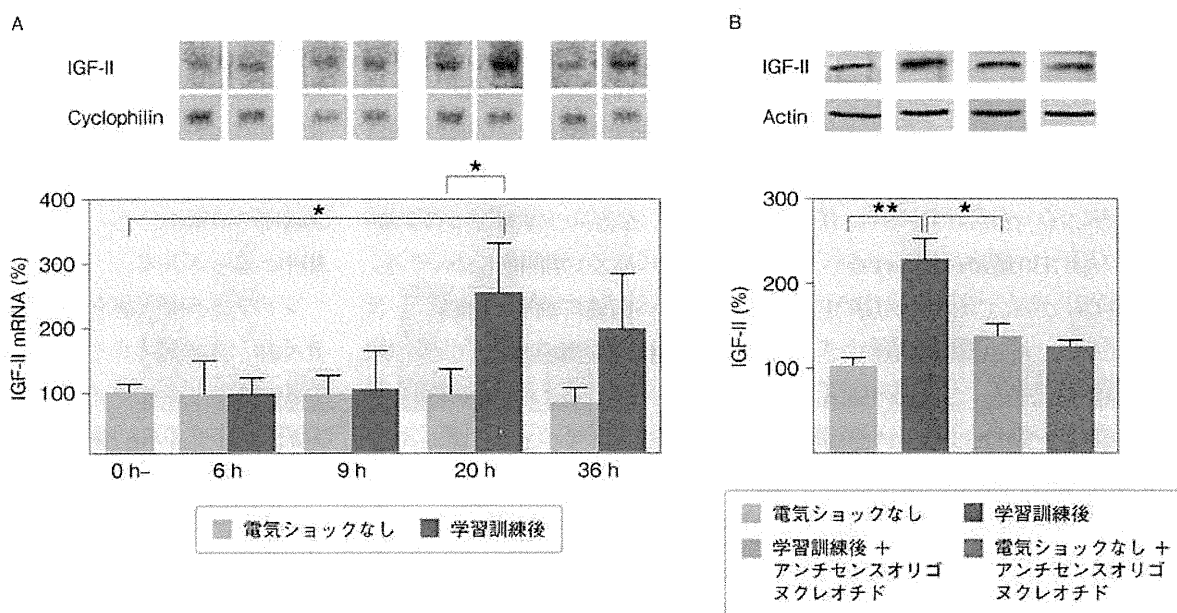
間)を受けてしまう。ラットは、習性として暗い所を好むのである。しかし、この不快な“学習訓練”を受けた後では、ラットは危険な領域を認識して避けるようになる。つまり、電気ショックを受けたことを「記憶」しているかについて、実験装置に入れたときに、何秒後に電気ショック領域に入るかを計測して判定するというのが、この学習実験(「抑制性忌避学習」という)の概略だ。“訓練”の1日後に実験すると、ラットは約5分間、電気ショックを受けた場所に入ろうとしない。しかし、日が経つにつれて、段々電気ショックのことを忘れてしまい、3~4週間て元の状態に戻って、また電気ショック領域に入ってしまう。

記憶にはタンパク質合成が必要である

さて、ノーベル賞学者E. Kandelは、アメフラシ(軟体動物)を使った神経回路の研究から、“記憶”には遺伝子の転写誘導とタンパク質の合成が必要であることを明らかにした。神経細胞が活性化されると、神経細胞間の情報伝達効率が変化する。その変化が固定化されて長期にわたって継続する“記憶”になるためには、新たに作り出されたタンパク質がシナプスの変化を引き起こすことが必要なのである〔活性化された神経細胞では、必要な遺伝子(DNA)が転写因子に選り出されて、メッセージャーRNAへと転写され、タンパク質が合成される〕。そこで重要な役割を果たすのは、必要な遺伝子を選び

出す転写因子である。記憶に関連する転写因子としては、これまでに、cAMP応答因子結合タンパク質(CREB)とCCAATエンハンサー結合タンパク質(C/EBP)が知られている。論文では、このうち、C/EBPについて調べられている。C/EBPは記憶の固定化に働くことが知られていたが、転写誘導する遺伝子については、実際に何が必要なのかはよくわかっていなかった。

この研究では、インスリン様成長因子II(IGF-II)が重要であることが明らかになる。その名前のおり、これまでは成長因子としての役割に光が当てられてきたが、このIGF-IIは脳内に多く存在する分子で、加齢とともに量が減っていくことが知られている。また、ニジマスのIGF-II遺伝子についての解析(1998年)から、遺伝子の内部(プロ



A: 学習実験後のラットの脳内では、20時間後をピークにIGF-II mRNAの量が増加していた(ノーザンブロット解析)
 B: タンパク質の量を見ても(ウェスタンブロット解析)、学習実験をしたラットの脳ではIGF-IIが増えていた。しかし、C/EBPのアンチセンスオリゴヌクレオチドを

脳に投与したラットでは、この増加が見られなかった
 Cyclophilinとactinは量に変化がない対照として示されている
 [*印は統計的に有意な差であることを示している(*P値<0.05, **P値<0.01)]
 (Chenらの図より改変)

図2 学習実験後のラット脳内におけるC/EBPのIGF-II転写誘導

モーター領域)にC/EBPが結合するDNA配列があることがわかっており、記憶に関連する新たな遺伝子として著者たちは興味をもった。

学習によって ラットの脳内で起こる変化

著者たちは、学習訓練を行った後のラットの脳を解剖して、海馬(脳の記憶装置)での遺伝子発現を解析した。その結果、転写因子C/EBPの量が増加することを発見した。C/EBPの量は、訓練の後、約20時間をピークに増加して48時間後には元に戻る。ここで、彼らは、IGF-IIについても調べたところ、C/EBPと同じように、学習実験の20時間後をピークにして増加が見られた(図2A)。では、IGF-IIはC/EBPによって発現誘導されるのか? IGF-IIとC/EBPの関係を証明するために、彼らは海馬のC/EBPをなくす実験を行った。アンチセンスオリゴヌクレオチドという物質を海馬に注入してC/EBP遺伝子の発現をブロックしたところ、海馬のC/EBPがなくなっただけではなく、学習訓練後のIGF-IIの増加が見られなくなった(図2B)。また、C/EBPはIGF-II遺伝子のプロモーター領域に結合していることも確認された。これらの結果から、学習訓練を受けたラットの海馬ではC/EBPの量が増加し、C/EBPがIGF-II遺伝子を転写誘導することが明らかになった。

IGF-IIは記憶力を高める

学習訓練の後に量が増えていることがわかったIGF-IIは、記憶に必要な分

子なのだろうか? この疑問について、今度は、海馬内でIGF-IIをなくす実験とIGF-IIの量を増やす実験を行っている。

まず、先ほども出てきたアンチセンスオリゴヌクレオチドを使って海馬内のIGF-IIをなくす実験を行った(図3A)。その結果、学習訓練後24時間までにIGF-IIの発現をブロックすると、電気ショックを記憶できなくなった。IGF-IIをブロックするタイミングは重要で、実験後4日経った後だと、記憶を抑える効果はなくなる。つまり、IGF-IIは、ラットが“不快な出来事”を記憶する際、4日後までに脳内で起こる変化に重要な働きをするということがわかる。

また、驚くべきことに、IGF-II(タンパク質)を海馬内に注入すると、記憶が改善することも明らかになった(図3B、図3C)。IGF-IIは細胞の外に分泌されて、他の細胞に作用するポリペプチドである。脳内に注入されて神経細胞に影響を与えると考えられる。学習実験の直後にIGF-IIを注入(両方の海馬に25 ngずつ)すると、ラットが電気ショックを避ける行動が強まり(1日後の回避行動は通常5分程度のものが15分程度に上昇)、なおかつ普通は学習実験の効果なくなる3週間後においても、ラットは高い回避行動を“記憶”していた。IGF-IIは“記憶を強化”して、“物忘れ”を防いだと言える。数週間もその効果が続くということは、驚くべきことである。

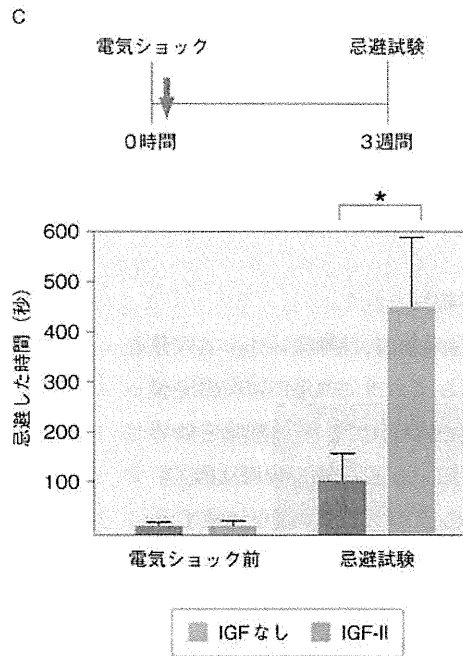
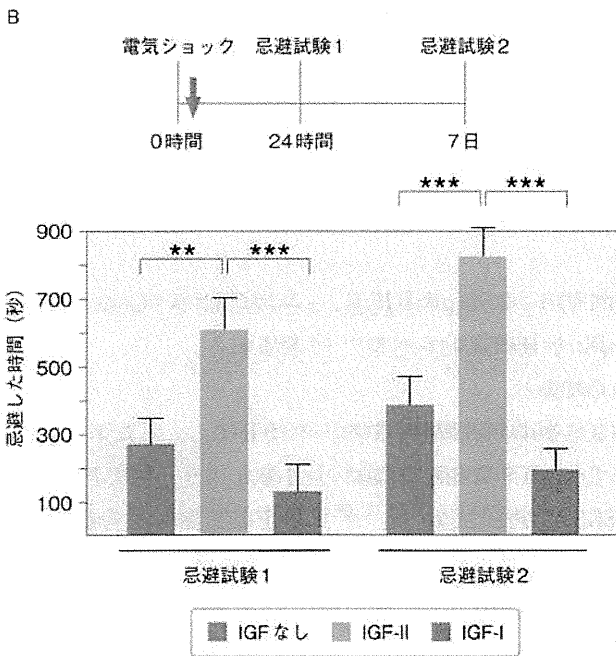
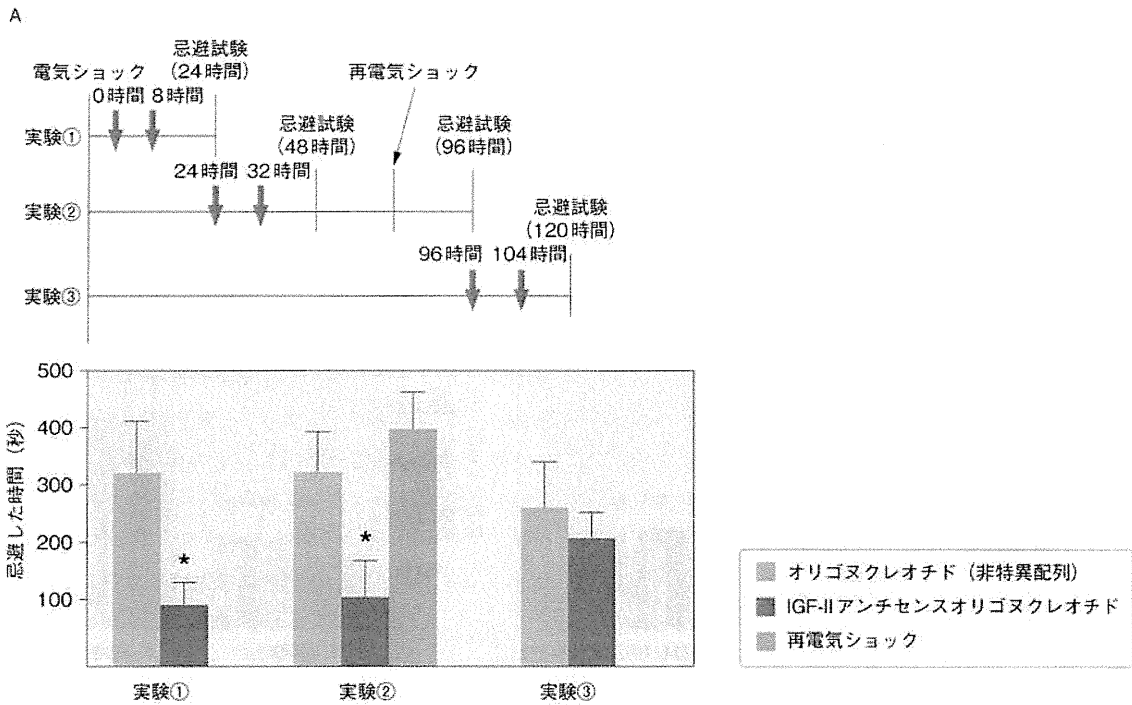
IGF-IIの脳内投与が記憶への効果を示すのは、学習訓練の直後に投与したときに限られていた。しかし、訓練が終わってしばらく経ってからでも効果が見られた条件があった。学習訓練の1日後にラットを実験装置に入れて(このときには電気ショックは与えない)、その直後にIGF-IIを注入すると、その

後の忌避行動が著しく改善したのである。実際の不快な出来事ではなくて、その記憶を“想起”した(思い出した)とき(「記憶の再固定化」と言う)でも、投与されたIGF-IIによって記憶の保持が強化されたのである(図4)。記憶の再固定化は、人間も日常的に行っている。昔の記憶が消えていくのを防ぐことができるとしたら、非常に魅力的なことであろう。

IGF-IIの作用機構

さて、IGF-IIは脳内の何に作用して、記憶力を高めているのだろうか? そのメカニズムについても、論文では報告している。IGF-IIは細胞の外に分泌されて他の細胞に作用するが、IGF-IIの作用には、神経細胞表面でIGF-IIと結合するIGF-II受容体が必要だった。IGF-IIが受容体に結合すると、情報伝達経路を介して細胞内でさまざまな変化が起こる。そのうちで記憶の固定に重要なのは、シナプスの構造変化ではないかと考えられる。シナプスは神経細胞同士が結合して、情報を交換する場所になっている。

シナプスの構造変化への作用を示唆する第一の証拠として、IGF-IIの記憶への作用にはシナプスでのタンパク質合成に関与するArc(細胞骨格関連タンパク質)が必要であった。第二に、海馬のシナプスを分離して解析したところ、IGF-IIを投与して“記憶力の上昇したラット”のシナプスでは、GSK3(グリコーゲンシンターゼキナーゼ)という調節タンパク質の活性が大幅に活性化し、AMPA(「 α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メソオキソザール-4-プロピオン酸」の略)受容体の量が増加している



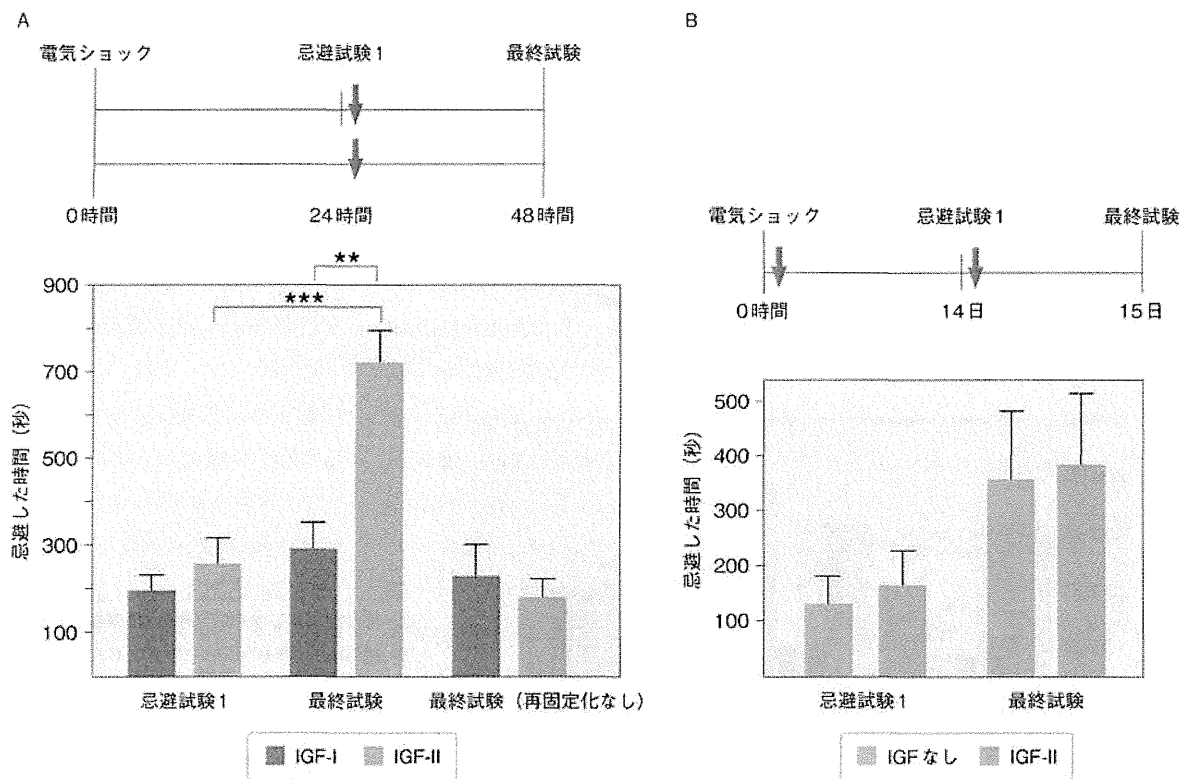
A: IGF-IIを脳内からなくすと、学習効果が見られなくなった。3つの実験(①~③)において、↓で示したタイミングでIGF-IIアンチセンスオリゴヌクレオチドを海馬に投与して学習効果による忌避時間の増減を測ったところ、実験①と実験②では電気ショックを忘れて忌避時間が短くなった。IGF-IIアンチセンスオリゴヌクレオチドを96時間経った後に加えた実験③では、効果が見られなかった。また、再度電気ショックを与えると学習して忌避行動の時間が長くなるため(実験②の結果)、アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果は可逆的なものであることがわかる

B, C: IGF-IIの脳内での量を増やすと、記憶が強化された。電気ショックを与えた直後(↓)のラットの海馬にIGF-IIを投与すると忌避行動の時間が長くなり(通常の倍)、またラットがほとんど実験のことを忘れてしまう3週間後にもIGF-II投与群は忌避行動を忘れずにいた。対照として投与したIGF-Iでは効果が見られなかった

(*印は統計的に有意な差であることを示している (*P値<0.05, **P値<0.01, ***P値<0.001))

(Chenらの図より改変)

図3 学習実験を使ったIGF-IIの効果の実証



A: 上に図示したスケジュールで実験を行った。回避行動を試験した直後のラットの脳(海馬)にIGF-IIを投与したところ(1), 回避行動が大きく改善された。回避行動試験では電気ショックは与えていないことに注意してほしい。ラットが記憶を“再固定化”した直後のIGF-IIに効果があったということである。再固定化なしに、24時

間後にIGF-IIを投与するだけでは、効果は見られない

B: ラットの脳内で記憶を再固定化できる時間には限りがあるようで、Aと同様の実験を14日後に行った場合は、IGF-IIの効果は見られなかった

(Chenらの図より改変)

図4 IGF-IIの記憶の再固定化に対する効果

ことが観察された。

記憶の基盤を、神経細胞レベルで解明する試みは、これまで海馬の切片を使った実験で行われてきた。神経細胞を電氣的に刺激すると、細胞間の情報交換、すなわちシナプス伝達の効率を測定することができる。神経細胞を高頻度で刺激して活性化すると、シナプスの伝達効率が増強される。これをLTP(長期増強)という。先に述べたAMPA受容体は、グルタミン酸と結合する受容体型イオンチャネルで、LTPで重要な役割を果たすチャネルである。では、海馬の切片にIGF-IIを添加するとどうなるか？著者たちの解析の結果、IGF-IIを添加した海馬の切片では、LTPが促進され

た。動物実験で明らかになったIGF-IIの記憶への作用が、神経細胞レベルでも確認されたのである。

現時点で考えられるIGFが作用するメカニズムとしては、IGF-IIの添加によってArcやGSK3が活性化され、シナプスでのAMPA受容体の量が増加し、シナプス伝達の効率を向上させ、記憶力を高めたと考えられる。

IGF-II(インスリン様成長因子II)については、その名前にもあるように、細胞の成長因子としての機能に焦点が当てられてきた。今回のIGF-IIの効果についても、IGF-IIによって新しい神経細胞が成長してできた可能性も完全に否定できない。記憶力を高めるメカ

ニズムについては、さらなる研究が期待される。

IGF-IIは、インスリンに似た比較的小さなポリペプチドである。IGF-IIやIGF-II受容体は、今後の研究次第では、認知機能増強治療、記憶薬開発のための新しいターゲットになるかもしれない。糖尿病の患者にインスリンを注射するように、認知機能が低下した患者にIGF-IIを注射して記憶力治療ができるとしたら、こんなにすばらしいことはない。

二井 勇人 Eugene Futai

東北大学 大学院農学研究所 准教授

プロテアーゼ依存性細胞シグナリングと生理・病態

膜結合型メタロプロテアーゼ (MMP, ADAM) ファミリー

ふたいゆうじん いしうらしょういち | 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系 (〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1)
二井 勇人, 石浦 章一 | E-mail: futai@bio.c.u-tokyo.ac.jp

SUMMARY

膜結合型メタロプロテアーゼには、MT-MMP (Membrane Type- Matrix Metalloprotease) と ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) が知られている。このうちの ADAM は、プロテアーゼ活性中心を担うメタロプロテアーゼドメイン以外に、複数のドメイン構造を持ち、細胞表面で重要な機能をはたす多機能調節因子として注目されている。膜型成長因子、細胞接着因子など膜タンパク質の細胞外領域を切断する反応は、細胞外ドメイン “シェディング” (ectodomain shedding) と呼ばれ、限定分解された基質は細胞内シグナリングにおいて新しい機能を獲得する。本章では、特に ADAM ファミリーに焦点を当て、シグナリングにおける機能・病態における役割を紹介する。

I. ADAM ファミリープロテアーゼのドメイン構造

ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) は、名前からも分かるように、Disintegrin ドメインとメタロプロテアーゼドメインをひとつずつ有している。加えて、アミノ末端のシグナルペプチドと Pro ドメイン、そして Cysteine-rich ドメインと EGF 様ドメインを持つ。Disintegrin と Cysteine-rich ドメインは、インテグリン等の蛋白質との相互作用において機能する (図 1)。プロテアーゼドメインによるタンパク質限定分解だけでなく、細胞外でのタンパク質相互作用による細胞間、細胞マトリックス間の接着に重要な役割を果たしている。MT-MMP と比較しても、これらの多ドメイン構造による多機能性は、ADAM ファミリーにおいて顕著な特徴である。これまでに ADAM1 ~ ADAM40 まで、40 個の ADAM が見出されている¹⁾ (http://www.people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html 参照)。このうち約 6 割が、プロテアーゼ活性を持つと考えられているが、残りはプロテアーゼ活性中心を持たず、Disintegrin と Cysteine-rich ドメインを介した細胞接着機能をもつと考えられる。プロテアーゼ不活性化型 ADAM の生理機能は、遺伝子破壊マウスを用いた解析等からも解明されている (表 1-2, ADAM2, 3, 11, 22, 23 はプロテアーゼ不活性)。ADAM は種々の生

KEY WORDS

ADAM
シェディング
細胞内シグナリング
RIP
アルツハイマー病

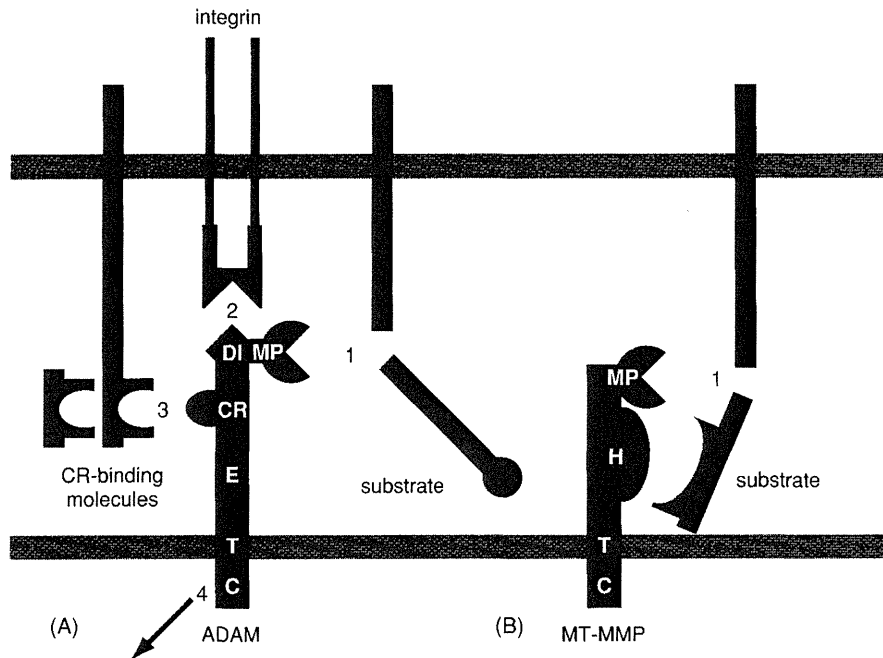


図1 ADAMとMT-MMPのドメイン構造

A : ADAMの各ドメインの機能に付いて, (1) メタロプロテアーゼ (MP) ドメインの触媒部位による基質の切断 (2) disintegrin ドメイン (DI) とインテグリンヘテロ二量体との結合 (3) Cytein-rich ドメイン (CR) を介した他の蛋白質との相互作用 (4) いくつかのADAMにおいて見られる細胞質ドメイン (C) を経由した細胞内情報伝達を示している. 以上の機能ドメインと膜貫通領域 (T) に加えて, EGF様ドメイン (E) を有する分子も見つかっている. B : MT-MMPの各ドメインでは, ADAMと同様に (1) MPドメインを介した基質の切断の他に, ヘモベキシンドメイン (H) を介した他の蛋白質 (CD44等の基質) との相互作用が知られている. (文献1)より改変)

物種から同定が試みられており, ヒトから *Drosophila*, 線虫まで全ての多細胞生物で存在が見出されている. また, *Aspergillus* 等の菌類や, 単細胞生物では分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* にもADAMと相同性を有するADAM様プロテアーゼが存在する. (出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には, ホモログは存在しない.) 分裂酵母のMde10は, 孢子形成に必須である事が知られている⁴⁾.

II. ADAMの活性制御機構

ADAMの活性制御機構についてであるが, ADAMは, MT-MMP等と同様, プロテアーゼ不活性な前駆体として合成される. 輸送過程で, アミノ末端のProドメインがエンドペプチダーゼ (Furin等) により切断されて, はじめて活性を持つ. ADAM8とADAM28では, 自己消化によってもProドメインが切除され

る. また, ADAMによる蛋白分解には, 構成的なシェディングに加え, G蛋白質共役型受容体リガンド, PKC活性化剤 (PMA : phorbol myristate acetate), カルシウムイオノフォアなどで誘導される調節的シェディングが知られている⁵⁾. しかし, ADAMの細胞内ドメインが修飾を受けて活性化を受ける機構にはまだ良く分かっていない点が多い.

III. シェディングの生理的意義

近年, ADAMによりシェディングを受ける基質は多数見つかってきている (表1-1). 以下では, その生理的意義について, 例を挙げて解説する.

シェディングがもたらす機能は, 基質により大きく異なり, 以下の4つの機能が考えられる. (1) シェディングによるサイトカインや成長因子 (TNF α , EGFRリガンドなど) の切断・放出は, 分泌細胞自身や近接

する細胞への情報伝達を引き起こす。(2) 反対に、受容体の切断は、シグナリングの不活性化をもたらし、放出された可溶性受容体はデコイ受容体 (リガンドの効果を中和する) として機能する事も考えられる。ADAMには、リガンドと受容体双方を基質とする例が多く知られている (表 1-1)。(3) シェディングに続いて膜内切断 (RIP: regulated intramembrane proteolysis) が起こり、切断された細胞内領域による細胞内情報伝達を開始する。(4) 細胞間もしくは細胞とマトリックス間の接着に機能する接着因子が切断されると、結合が解離して細胞機能へと影響を与える。*Xenopus* ADAM13は、発生過程で神経細胞の移動に必要であることが明確に示されている⁹⁾。

1. シェディングによる情報伝達: EGF シグナリング系

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の活性化に伴う EGF シグナリング系の活性化 (transactivation) には、ADAM の活性が必要である事が知られている。EGF 受容体

リガンドには、ヘパリン結合型 EGF (HB-EGF), proTGF α , amphiregulin 等が知られているが、GPCR の活性化に伴い、これらの膜結合型成長因子がシェディングを受けて細胞外に放出され、近傍の細胞もしくは自身の細胞表面にある EGFR を活性化するというのがこの情報伝達系の概要である (図 2A)。HB-EGF, proTGF α , amphiregulin のシェディングには複数の ADAM (9, 10, 12, 15, 17, 19) が関与する事が、培養細胞等を用いた解析から明らかになっている⁷⁾。しかし、遺伝子欠損マウスを用いた解析から (表 1-2), ADAM17 欠損マウス (生後約 17.5 日で死亡する) に眼瞼形成不全、毛髪・皮膚形成不全、複数の臓器での上皮組織成熟不全がみられ、これらの全てが、EGFR 欠損マウスおよび EGF リガンド欠損マウスの表現型と似通ったものである事から、生体内では ADAM17 が主要な HB-EGF の切断酵素であろうと考えられるようになった⁸⁾。GPCR による活性化が ADAM の活性化を引き起こす機

表 1-1 ADAM の基質

ADAM	Substrates
8	CD23, CD30-ligand (CD153), CHL1, L-selectin, ADAM8 (prodomain cleavage)
9	pro-EGF, proHB-EGF, FGF-receptor2, Kit ligand, p75 neutrophin receptor (NTR), Insulin B chain, Delta-1, IGFBP-5, APP, oxytocinase, collagen XVII, fibronectin, laminin, ADAM10
10	proTNF α , proEGF, proHB-EGF, probetacellulin, proTGF α , pro-betacellulin, TRANCE/RANKL, IL-6R, Notch, Delta1, fractalkine (CX3CL1), CXCL16, LAG-3, desmoglein-2, klotho, ephrin-A2, c-Met, Fas-ligand, erbB2/HER2, Thyrotropin Receptor (TSHR), CD23, CD30, CD44, L1 adhesion molecule, N-cadherin, E-cadherin, Proto-cadherin γ C3 and B4, VE-cadherin, APP, Prion Protein Cellular (PrPc), collagen XVII
12	proHB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-5, oxytocinase, fibronectin, collagen IV, gelatin, Delta-1, Scarboxymethylated transferrin
13	fibronectin, ADAM13 (cysteine-rich domain)
15	pro-HB-EGF, proamphiregulin, proTGF α , CD23, E-cadherin, collagen IV
17	proTNF α , proHB-EGF, proTGF α , proamphiregulin, proepiregulin, proneuregulin α 2c, epigen, CD30, CD40, p55 TNFR, p75TNFR, p75 NTR, TrkA, TRANCE/RANKL, c-Kit, Kit ligand-1 and 2, erbB4/HER4, GHR, IL-1R, IL-6R, IL-15R α , M-CSFR, Notch, Delta-1, CX3CL1, CX3CL1, LAG-3, CSF-1, CD30, CD40, CD44, L-selectin, nectin-4, MUC1, VCAM-1, L1-CAM, N-CAM, PTP-LAR, Pref-1, ACE2/SARS-CoV Receptor, Semaphorin 4D, neuronal pentraxin receptor (NPR), ALCAM, Desmoglein, Klotho, Vps10, GP1b- α , APP, Ebola Glycoprotein, PrPc, Vibrio cholera cytotoxin, collagen XVII
19	proTNF α (in ADAM17 deficient cells), neuregulin, TRANCE/RANKL, ADAM19 (cysteine-rich domain)
28	CD23, IGFBP-3, ADAM28 (prodomain)
33	kit-ligand 1, CD23, APP

表 1-2 ADAMノックアウトマウス

ADAM	Phenotype
1a	Male infertility, defect in sperm migration
2	Male infertility, defect in sperm migration and adhesion, defect in migration of neuroblasts to olfactory bulb
3	Male infertility, defect in sperm migration and adhesion
8	Viable, fertile, no pathology (reduced CHL-1 shedding in brain)
9	Viable, fertile, no pathology
10	Early lethality (E9.5), defective CNS and heart development, somite formation and vasculogenesis. Phenocopied to Notch deficiency (severe than presenilin 1 and 2 double knockouts).
11	Viable, fertile, impaired hippocampal-dependent spatial learning and altered nociception responses.
12	Viable, fertile, 30% embryonic lethality, brown adipose abnormalities, no muscle defect.
15	Viable, fertile, tumor neovascularization reduced, age onset osteoarthritis.
17	Perinatal lethality, probably due to heart defects; pulmonary hypoplasia; problems with epithelial tissue maturation. Phenocopies defects seen in EGFR, TGF α , HB-EGF and amphiregulin knockout mice.
19	80% postnatal lethality, multiple cardiovascular defects.
22	Postnatal lethality, multiple cardiovascular defects.
23	Postnatal lethality, multiple cardiovascular defects.
33	Viable, fertile, no pathology.

(文献2,3)より引用, 改変)

構についても, Ras-ERK 経路, PKC, p38MAP キナーゼ等によるシェディングの誘導が知られ, ADAM17の細胞質ドメインのリン酸化についての解析が進んでいる。図 2A には GPCR の活性化後, Src, PI3-kinase と PI-dependent kinase-1 (PDK1) が順に活性化され, ADAM17 をリン酸化する事を示した Zhang らによる結果を示した⁸⁾。

2. シェディングから RIP への段階的切断: Notch シグナリング系

ADAM によるシェディングを受ける膜蛋白質のうち多くは, シェディングに引き続き γ -セクレターゼによって膜内切断 (RIP) を受ける。 γ -セクレターゼは, presenilin1 と presenilin2 が活性中心となるアスパラギン酸プロテアーゼである。代表的な基質である Notch は, 細胞膜への輸送過程で pro-protein convertase (Furin) により切断された後, 細胞表面でヘテロ 2 量体を形成する。そして, Notch リガンド (Delta や Jagged 等) の結合により活性化され, ADAM によるシ

ェディング, γ -セクレターゼによる膜内切断を段階的に受ける。切断された細胞内領域は, 核に移行して下流の遺伝子の転写活性化に機能する²⁾ (図 2B)。Notch のシェディングに関与する ADAM については, 複数の ADAM が Notch を切断する事が分かっているが (表 1-1), 遺伝子欠損マウスを用いた解析から, ADAM10 が主要な Notch 切断酵素であろうと考えられている。ADAM10 欠損マウスは, 胚性致死 (E9.5) となり, 神経系, 循環器系, 体節の形成不全を示すが, これは Notch/Delta 情報伝達を欠損するマウスで見られる表現型ととても良く似ている (表 1-2)。 *Drosophilla* の Kuzbanian や線虫の Sup-17 等, 遺伝的手法で Notch との関連が同定された遺伝子も, ADAM-10 のホモログである事から, この情報伝達系が種を超えて保存されている事が分かる。シェディングに続いて RIP を受ける蛋白質としては, Notch の他に Notch のリガンドの Delta があげられる。Delta のシェディングは, リガンドの除去により Notch シグナリングの空間的制御を

する一方、RIPを引き起こし、細胞内断片は核内に移行する事も知られている。他にも CD44, L1, erbB4, amyloid precursor protein (APP) は、細胞内領域に転写活性化能を持つ蛋白質で Notch と同様の転写誘導が示唆されている。N-カドヘリンでは、細胞内領域と結合する β -カテニンがシェディングに伴い核へ移行し、遺伝子の転写を制御する。

IV. 病態における役割

これまでに、ADAM は、がん、炎症 (リウマチなど)、喘息、アルツハイマー病など、種々の病態における機能が示唆されている。

1. がん細胞の増殖、転移

腫瘍組織またはがん細胞では、ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 28 の発現の上昇が報告されている⁹⁾。また、ADAM12 は、乳癌の原因遺伝子としても同定され、変異により細胞表面への輸送異常がおり、基質の切断が阻害される事が確認されている¹⁰⁾。今後はどの基質の切断が腫瘍の増殖と転移において重要であるかを明確にしていく必要があると考えられる。メタロプロテアーゼ阻害によるがんの治療は、これまでにその特異性の低さが問題になってきたが、ADAM 特異的メタロプロテアーゼ阻害剤による治療が期待される。

2. アルツハイマー病でのアミロイド (A β) 産生への関与

アミロイド前駆体蛋白質 (APP) は、細胞内での代

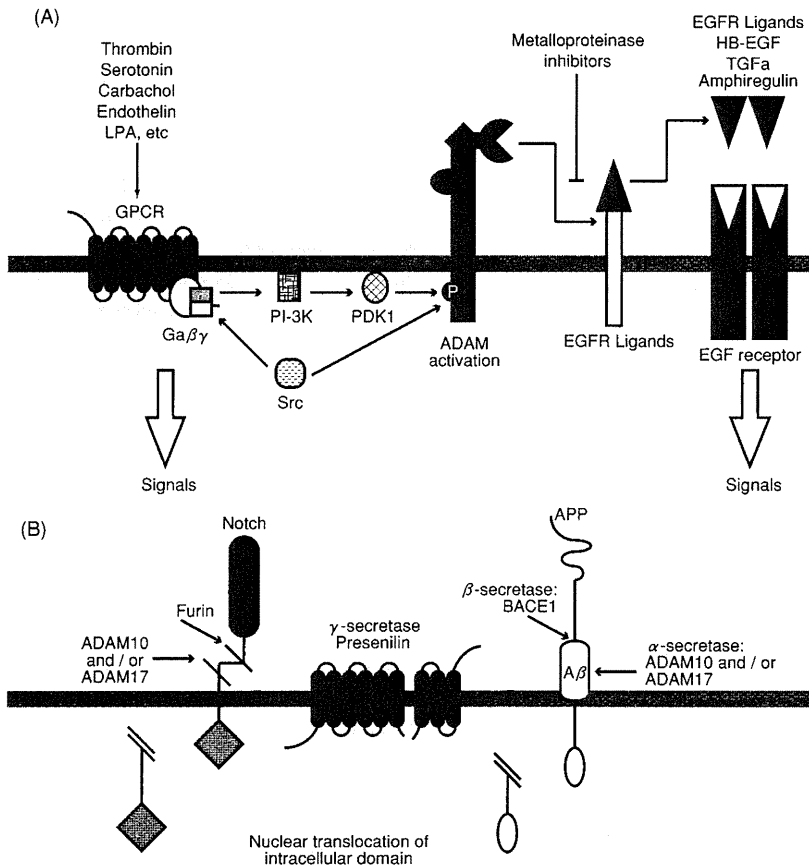


図 2

(A) EGFR リガンドのシェディングによる活性化と GPCR 経路のクロストーク。Zhang らの解析 (8) により示唆されたモデルである。(B) Notch とアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の膜内切断 (RIP: Regulated intramembrane proteolysis)。詳細は本文を参照。(文献 2) より改変

謝経路が二通り知られている (図2)。A β 産生経路においては、まず β セクレターゼ (BACE1) によってAPPが切断され、N末端側から細胞外断片sAPP β が分泌される。さらに、膜に残った断片C99が γ セクレターゼによって切断を受け、A β が産生される。一方、非A β 産生経路では、 α セクレターゼ (ADAM) によるシェディングを受けるが、 α セクレターゼによる切断部位は、 β セクレターゼよりも16アミノ酸残基だけC末端側にずれている。A β 領域内で α セクレターゼの切断が起こるため、続く γ セクレターゼによる切断後もA β が産生されないことになる。APPのプロセシングに関与する α セクレターゼは、ADAM9やADAM10、ADAM17がその活性を担っているものと考えられている¹¹⁾。最近、当研究室のTanabeらによって、ADAM19にも α セクレターゼ活性のあることが示唆された¹²⁾。アルツハイマー病のモデルマウスに、ADAM10を過剰発現させると、マウス脳内の老人斑が減少し学習障害が改善したという報告¹³⁾が知られ、アルツハイマー病の発症に対抗するいくつかのADAMの機能に注目が集まっている。

3. その他の病態

これまでに、ADAM33の一塩基多型 (SNPs) と喘息との関連が明らかになっている¹⁴⁾。ADAM33は、発現部位が炎症細胞よりも平滑筋に多く発現が見られ、喘息発症における機能 (シェディング基質) はまだよく分かっていない。また、ADAM近縁蛋白質であり、膜貫通領域のかわりにトロンボスポンジン繰り返し配列を有すADAMTS13は、血栓性血小板減少性紫斑病の原因遺伝子である事が知られている¹⁵⁾。血小板を接着させるフォンウィルブランド因子 (VWF) のADAMTS13による切断が起らなくなるとVWFの巨大凝集体が血液中に蓄積し、血栓となる発症機構が明らかとなっている。

▶ おわりに

以上、簡単にはあるがADAMをめぐる情報伝達関連の知見を紹介した。ADAMの基質についての情報は膨れ上がってきているが、実際に生体内でどの時

期に、どこでその切断がなされているかについては未知の部分が多い。ADAMによるシェディングの生理機能、そして病態における役割を解明することが、今後の課題である。

参考文献

- 1) Yang PK, et al : The ADAMs Family: Coordinators of nervous system development, plasticity and repair. *Progress in Neurobiol* **79** : 73-94, 2006.
- 2) Edwards DR, et al : The ADAM metallo proteinases. *Mol. Aspects Med* **29** : 258-289, 2008.
- 3) Hooper NM, Lendekel U : The ADAM family of protease. published by Springer, 2005.
- 4) Nakamura T, et al : ADAM family protein Mde10 is essential for development of spore envelopes in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* **3** : 27-39, 2004.
- 5) Huovila, et al : Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* **30** : 413-422, 2005.
- 6) Alfandri D, et al : Xenopus ADAM13 is a metallo protease required for cranial neural crest-cell migration. *Curr Biol* **11** : 918-930, 2001.
- 7) Brobel CP : ADAMs: Key components in EGFR signaling and development. *Nat Rev Mol Cell Bio* **6** : 32-43, 2005.
- 8) Zhang Q, et al : Phosphorylation of TNF- α converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **103** : 6901-6906, 2006.
- 9) Murphy G : The ADAMs: signaling scissors in the tumor microenvironment. *Nat Rev Cancer* **8** : 929-941, 2008.
- 10) Dyczynska E, et al : Breast cancer-associated mutations in metalloprotease disintegrin ADAM12 interfere with intracellular trafficking and processing of protein. *Int J Cancer* **122** : 2634-2640, 2008.
- 11) Asai M, et al : Putative function of ADAM9, ADAM10, ADAM17 as APP α -secretase. *Biochem. Biophys. Res Commun* **301** : 231-235, 2003.
- 12) Tanabe C, et al : ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP α -secretase in A172 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **352** : 111-117, 2006.
- 13) Postina R, et al : A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* **113** : 1384-1387, 2004.
- 14) Van Eerdewegh P, et al : Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* **418** : 426-430, 2004.
- 15) LEVY GG, et al : Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* **413** : 488-494, 2001.

