

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 上北 尚正

本研究は癌細胞の浸潤・転移の過程において重要な役割を果たしていると考えられている細胞外基質(ECM)分解酵素の1つである膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1(MT1-MMP)の細胞質ドメインの機能を明らかにするため、MT1-MMP の細胞質ドメインの変異体を作製し、細胞内への取り込みと細胞の運動性及び、浸潤能の解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

[1] MT1-MMP の触媒ドメインの N 末端に FLAG-tag を付けた同分子を CHO-K1 細胞に発現させ、¹²⁵I 標識した FLAG 抗体を用いて MT1-MMP の細胞内への取り込みを検証した結果、MT1-MMP が 30 分で約 40%細胞内に取り込まれることを確認した。また、MT1-MMP の各ドメイン欠失体を作製し、同様に細胞内への取り込みを検討したところ、細胞質ドメインの Leu-Leu-Tyr⁵⁷³ 領域によって MT1-MMP が細胞内に取り込まれることが示唆された。

[2] MT1-MMP の細胞内への取り込みに関与する分子を同定するため、膜型タンパク質の細胞内への取り込みに関与するクラスリン被覆小胞の被覆成分である AP-2 複合体の構成因子である μ 2 鎖と MT1-MMP の細胞質ドメインとの結合の有無を Yeast two-hybrid 法により検証した。その結果、 μ 2 鎖は MT1-MMP の細胞質ドメインの Leu-Leu-Tyr⁵⁷³ 領域を認識している可能性が示された。さらに、クラスリン被覆小胞と MT1-MMP との局在を免疫染色で観察したところ、両者の局在が細胞先進部近傍の小胞で一致することを見出した。以上の結果、MT1-MMP は細胞先進部でクラスリン被覆小胞を介して細胞内に取り込まれることが強く示唆された。

[3] MT1-MMP の細胞内への取り込みと細胞機能との関係について検証を試みた結果、潜在型 MMP-2 の活性化及び、MT1-MMP の細胞表面の量には影響を及ぼさないが、TIMP-2 の細胞内への取り込みには重要であることが示唆された。また、細胞運動の制御に MT1-MMP の細胞質ドメインを介した細胞内への取

り込みが関与する可能性を検証するため各細胞質ドメイン変異体を発現させた細胞を用いて金コロイド法による細胞運動性の解析をおこなった結果、細胞に取り込まれない変異体では、Mock と同程度の運動性しか見られなかったが、取り込まれる変異体や野生型では運動性が亢進することを見出した。また、再構成基底膜を用いた浸潤実験から、細胞の運動性の解析同様に、細胞内に取り込まれない変異体では、浸潤能がほとんど見られず、取り込まれる変異体や野生型では、浸潤能が亢進することを見出した。以上の結果から、細胞質ドメインによる MT1-MMP の細胞内への取り込みが細胞の運動性や浸潤能に重要な役割を担っていることが示唆された。

以上、本論文は、細胞運動や癌細胞の浸潤・転移の分子機構に関与する MT1-MMP の中で機能がほとんど明らかになっていなかった細胞質ドメインの 1 つの機能を明らかにした。MT1-MMP が細胞膜近傍の ECM を分解することで細胞の運動や癌細胞の浸潤に関与しているというこれまでの見解に加えて、MT1-MMP が細胞先進部で適切に機能するためには同分子の細胞内への取り込みと新しく産生された同分子への置換が細胞の運動性に必要であること、それが細胞の浸潤能にも関与すること、という新たな興味深い知見を見出した。

これらの結果より、本研究は細胞の運動性及び、癌細胞の浸潤・転移機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値する物と考えられる。