

## 論文の内容の要旨

論文題目 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP)の 細胞内領域  
に結合するタンパク質 MTCBP-1 の *aci-reductone dioxygenase*(ARD)  
ホモログとしての同定と機能の解析

指導教官 清木元治教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 平野稚子

### [背景]

マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases, MMPs) は細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) を分解する金属要求性タンパク質分解酵素であり、分泌型 MMP と膜型 MMP (membrane-type MMP, MT-MMP) に分類される。分泌型 MMP は細胞外に分泌され、組織内の比較的広範囲において作用する一方、細胞膜上に発現する MT-MMP は細胞周辺の ECM を分解することで発現細胞の微小環境を調節すると考えられている。MT-MMP は現在までに 6 種類が同定され、特に MT1-MMP は腫瘍細胞の悪性化に伴いその発現が亢進する例が多く報告されていることから、癌細胞の浸潤や転移に重要な役割を果たしていると考えられている。MT1-MMP を含む 4 つの MT-MMP は細胞外領域と膜貫通領域に加え、20 アミノ酸からなる細胞質領域を持つ。細胞質領域は他の MMP には存在しないため、これらの MT-MMP 特異的な制御を仲介する可能性が考えられる。当研究室では MT1-MMP の細胞質領域に結合する因子の探索を行い、新規因子 MT1-MMP cytoplasmic tail binding protein-1 (MTCBP-1) を同定した。MTCBP-1 は推定 179 アミノ酸からなる機能未知のタンパク質であり、これまでに当研究室において MT1-MMP の細胞質領域に直接結合し、細胞内でも複合体を形成することが示されている。また MTCBP-1 の過剰発現が MT1-MMP 依存的な細胞の運動や浸潤を抑制したが、現在その作用機序は不明である。

一方 MTCBP-1 はグラム陰性菌 *Klebsiella pneumoniae* においてメチオニン代謝系の MTA 経路で働く *aci-reductone dioxygenase* (ARD) とアミノ酸配列において高い相同性を示した。メチオニン代謝過程の中間代謝物であるメチルチオアデノシン (MTA) の蓄積

はメチル基転移反応などを阻害するため、細胞内の MTA は速やかに代謝され最終的にメチオニンに再生される。この経路をメチオニン再生経路と呼び、細菌からヒトまで存在することが知られている。また、ARD は最近新たに分類された cupin スーパーファミリーに属している。このファミリーは立体構造の相同性をもとにグループ化されており、そのメンバーは cupin ドメインが形成する2つのβ鎖(β strand) が折りたたまれたコンパクトな、たる (cupin) 状の立体構造を持っている。しかし、構造は類似ながらもメンバーには酵素・非酵素タンパク質両方が含まれ、その生化学的機能も多種多様である。MTCBP-1 にも cupin ドメインが認められ、ドメイン内に保存されている金属イオン結合モチーフも完全に一致するため、cupin ファミリーに属すると考えられる。よって、MTCBP-1 は ARD ホモログである可能性が予測されるが、多様な機能因子を含むファミリーであることから、アミノ酸配列の相同性だけでは ARD ホモログと断定できず、また MTCBP-1 がメチオニン再生経路で機能する因子であるかも不明である。実際、酵母 2 ハイブリッドシステムによる網羅的タンパク質間相互作用データベースでは MTCBP-1 の出芽酵母ホモログをコードすると思われる遺伝子 (*YMR009w*) との結合因子として pre-mRNA スプライシング調節因子 SNP1 が報告されていることから、MTCBP-1 が核内でスプライシング機構に関連した何らかの役割を果たしていることも予想される。さらにヒトでは、作用機序は現在のところ不明であるが、MTCBP-1 の 1-63 アミノ酸が欠失した遺伝子産物が C 型肝炎ウイルス (HCV) の複製を促進する因子 SipL としても同定されている。以上の知見から、MTCBP-1 が様々な機能を持ち、それらを異なる細胞内領域で発揮している事が推察された。

本研究では未だ機能未知である MTCBP-1 が多機能性因子である可能性に着目し、これまでに予想された機能に関し、出芽酵母を用いて検討することを計画した。

#### [方法と結果]

本研究では遺伝子欠損株の作製が容易に可能な出芽酵母実験系を用いて MTCBP-1 の生理機能を検討した。MTCBP-1 の出芽酵母ホモログと考えられる *YMR009w* の遺伝子ターゲティングコンストラクトを PCR 法により作製して酵母細胞に導入し、遺伝子相同組み換えによって *YMR009w* 欠損株を得た。*YMR009w* 欠損株は栄養に富んだ通常の培養条件では野生型と比べ顕著な表現型が見られなかったが、メチオニンの供給がメチオニン再生経路依存的な培養条件下では増殖不全を示した。この欠損株に *YMR009w* 及び MTCBP-1 の cDNA を導入すると増殖不全が回復した。また *YMR009w* 遺伝子産物 (Ymr009p) の触媒部位を形成すると推定されるグルタミン酸をアラニンに置換した変異体は *YMR009w* 欠損株の増殖不全を回復できなかった。

MTCBP-1 及び Ymr009p は ARD 活性を持つ他に、N 末端側のアミノ酸配列に依存し

て細胞内での局在が制御されている可能性が考えられた。Ymr009p のアミノ酸 1-85 番目部分の連続欠損変異体を作製、*YMR009w* 欠損株に導入し、この可能性を検証した。細胞分画を行い、各 Ymr009p 変異体の細胞内局在を検討した。野生型、及び N-末端から 20 残基まで欠損させた変異体は細胞質画分と粗核画分の両方に検出されたが、30 残基以上欠損させた変異体は粗核画分のみを検出された。次にこの局在が *YMR009w* 欠損株の表現型相補に影響をあたえるかどうかを検討した。メチオニン再生経路依存的な環境下において N-末端から 20 残基欠損した変異体は野生型と同程度の回復活性を示したが、30 残基以上欠損した変異体では *YMR009w* 欠損株の増殖不全を回復させることが出来なかった。Ito、Fromont-Racine らが酵母 2-ハイブリッドシステムを用いて行った、出芽酵母のタンパク質間相互作用を網羅的に同定する試みの中で Ymr009p に親和性を示した因子が 4 つ同定されていた。その内 3 つは機能未知の因子であり、1 つは pre-mRNA スプライシングの調節因子 SNP1 であった。Snp1 タンパク質 (Snp1p) との関係を検討した結果、Ymr009p と Snp1p は酵母 2-ハイブリッドアッセイにおいて結合が再現され、さらに Snp1p の欠失変異体を用いた解析から Ymr009p は Snp1p の RNA 認識領域より上流の N-末端側領域で必要かつ十分に結合することが明らかになった。

#### [結論]

MTCBP-1 は MT1-MMP の細胞内領域結合因子として見出された。多細胞においては MT1-MMP と結合して細胞膜周辺に存在し、細胞運動に関わることが示唆されている一方で、細胞質や核にも局在することが示されている。本研究によって、真核生物単細胞の出芽酵母では MTCBP-1 ホモログである *YMR009w* が ARD ホモログ (*yARD*) として酵母の MTA 経路で機能していることが明らかとなった。さらに MTCBP-1 も *yArd* タンパク質 (*yArdp*) と同等の活性を持つヒト ARD であることが示された。また出芽酵母の系では *yArdp* を細胞質-核間で相互輸送させるような制御の存在が予想された。*yArdp* は pre-mRNA スプライシング調節因子 SNP1 の N 末端側領域で結合することが示され、核における役割りとして mRNA スプライシング機構に関与する可能性が示唆された。

ARD は原核生物ではメチオニン代謝酵素として報告されているが、類似の立体構造によって多様な機能を担いうる cupin ファミリーのメンバーでもある。本研究の結果から、MTCBP-1、及び出芽酵母ホモログ *YMR009w* は ARD 活性を持つことが明らかとなると共に、これらが原核生物から真核、多細胞生物への進化の過程で多様な機能を獲得し、それらを異なる細胞内区画で発揮する因子である可能性が示唆された。また、これまで真核生物ホモログの ARD 活性が示された報告はなく、本研究の結果は *YMR009w* 及び MTCBP-1 が真核生物 ARD であることを初めて報告するものである。