

課程博士

末永直子（すえなが なおこ）

博士（薬学）

博薬 第 1076 号

平成 16 年 3 月 25 日

CD44 を介した細胞機能制御における膜型マトリックスメタロプロテアーゼ・
ヘモペキシン様ドメインの関与

（主査）東京大学	教授	竹縄	忠臣
	教授	新井	洋由
	教授	堅田	利明
	教授	入村	達郎
	教授	岩坪	威

使用文書ファイル 末永直子審査結果.pdf Adobe Acrobat Mac 9.0

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) は癌細胞の細胞外基質分解に関与するプロテアーゼファミリーの総称であり、中でも膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP) はその発現が浸潤・転移能とよく相関することから、癌の進展に重要な分子と考えられている。ヘモペキシン様 (HPX) ドメインは MMP ファミリーに特徴的な構造であることから、酵素機能制御に重要なドメインであると考えられている。近年、MMPs は細胞外基質にとどまらず細胞膜タンパク質の切断に関わることも明らかとなっている。例えば細胞接着分子 CD44 が挙げられるが、MT1-MMP は CD44 切断を介して癌細胞の運動を亢進させる。また MT1-MMP は細胞運動に際して運動先進部に局在し、この分子集積が HPX ドメインと CD44 との結合に依存することも知られている。本研究では、CD44 切断における HPX ドメインの役割を検討すると共に、さらに MT1-MMP と相同なドメイン構造を有する他の MT-MMPs と CD44 との関係について明らかにすることを試みている。また HPX ドメインの強制発現が MT1-MMP と CD44 との結合、CD44 切断を競合阻害することにより、HPX ドメインが CD44 を介した細胞機能を制御する可能性についても言及している。

始めに、CD44 と結合能を有するドメインを検討するため、欠損変異体を用いた免疫沈降法を行い、HPX ドメインを介して結合していることを明らかにした。また CD44 切断における HPX ドメインの必要性を検討し、HPX ドメインを介した結合がその酵素活性・機能の発現に必要であると推測した。

次に、現在までに MT-MMPs は 6 種類が同定されているが、MT1-MMP と相同なドメイン構造を有する他の MT-MMPs と CD44 との関係について明らかにすることを試みている。MT1-MMP の基質特異性は触媒ドメインの切断活性と HPX ドメインの基質認識性の協調した結果であったことから、MT-MMPs の CD44 を介した機能制御の解明は、触媒ドメイン、HPX ドメインに分けて詳細に解析する必要性を考えている。そこで各 MT-MMPs の触媒ドメインの CD44 切断活性、HPX ドメインの CD44 への結合能をそれぞれ独立に解析するために、MT1-MMP の触媒ドメインを他の MT-MMPs の触媒ドメインと置換したキメラ変異体、および MT1-MMP の HPX ドメインを他の MT-MMPs の HPX ドメインに置換したキメラ変異体を作製した。各キメラ変異体の CD44 への結合能および CD44 切断能を評価した結果、CD44 の切断活性は MT1-MMP、MT2-MMP、MT3-MMP、MT5-MMP の触媒ドメインに存在し、CD44 との結合能は MT1-MMP、MT2-MMP、MT3-MMP、MT5-MMP、MT6-MMP の HPX ドメインに存在することを明らかにした。

さらに、触媒ドメインを欠失した変異体 (MT1HPX) の強制発現が MT1-MMP の CD44 への結合、切断を競合的に阻害する可能性を考え、これを検討し、HPX ドメインを介した CD44 への結合は MT1-MMP による CD44 切断に必須であることを確認している。また HPX ドメインのアミノ酸配列上の高い保存性から、CD44 への結合は MT-MMPs 間では類似した様式をとることを考え、MT1HPX の強制発現が HPX 置換キメラ変異体の CD44 切断能を競合阻害するか検討した。この結果より、MT1HPX の過剰発現が他の MT-MMPs の HPX ドメインを介した複合体形成をも阻害することを示唆している。

本研究により、MT1-MMP が CD44 を切断するには HPX ドメインを介した結合が必要であることを明らかにした。また本研究において確立したキメラ変異体を用いた系は、MT-MMPs の機能制御においてドメインごとの性質をそれぞれ独立して詳細に検討ができる点で優れており、今後の MT-MMPs の機能解析における有力な手段になると考えられる。キメラ変異体を用いた解析の結果、CD44 切断において野生型 MT-MMPs の基質特異性は HPX ドメインを介した結合が保証されたもとで、触媒ドメインに依存し決定されていることを明らかにした。また CD44 との結合様式は MT-MMPs 分子間で機能的に保存されたモチーフを利用することを示唆した。本研究は、MT1HPX が MT-MMPs の広範な機能を競合的に阻害する可能性を指摘しており、癌治療にも応用できる可能性が高く評価できることから、博士 (薬学) の学位の授与に値すると判定した。