

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)
複合体のプロテオミクス解析

指導教官 清木 元治 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成十三年度 四月入学

医学博士課程
病因・病理学専攻

氏名 泊 泰三

細胞表層には種々のサイトカインやその受容体，細胞と細胞外基質 (ECM; Extracellular matrix) を連結する接着分子，細胞同士を連結する細胞間接着分子，これらの活性を制御する膜蛋白質など多様な蛋白質が発現している．これらの表層分子は細胞外の情報を細胞内へ伝達することで，細胞増殖や分化，細胞死や運動性など様々な細胞機能を制御している．近年，これら細胞表層分子はプロテアーゼにより不可逆的な制御を受けることが明らかとなりつつある．細胞表層のプロテオリシスには ECM 分解，膜結合型リガンドの放出，接着分子や受容体分子の切断による機能変換などが知られ，主に膜型プロテアーゼが関与する．

このような表層分子のプロテオリシスを担う膜型メタロプロテアーゼは ADAMs (A disintegrin and metalloproteinases) ファミリーおよび MMPs (Matrix metalloproteinases) ファミリーの膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMPs ; Membrane type-matrix metalloproteinases) が知られている．

MT1-MMP は基底膜分解酵素である MMP-2 の活性化酵素として同定された膜型プロテアーゼであり，現在まで 6 種類のヒトホモログが報告されている．これまでの病理学的解析から，MT1-MMP は肺癌，胃癌や乳癌などの悪性腫瘍で発現が亢進し，癌組織の浸潤先進部に局在が認められている．また，癌細胞株を用いた解析から，MT1-MMP の活性阻害や発現抑制が運動や浸潤能を抑制することから，MT1-MMP を介したプロテオリシスは癌細胞の悪性形質発現に重要な役割を担うと考えられている．

また，MT1-MMP に関する近年の解析から，1) アクチンと連結した CD44H が MT1-MMP と結合することにより，MT1-MMP が運動先進部位へ局在化すること，2) 運動先進部位に局在化した MT1-MMP がホモ多量体を形成して，効率的に前駆型 MMP-2 を活性型へ変換することや I 型コラーゲンへの結合および分解を行うことで，細胞運動能を亢進することが明らかとなっている．これらの報告は，細胞表層で MT1-MMP が他の分子と相互作用を介して，プロテアーゼ活性を発現する新たな調節機構の一端を示すものと考えられるが，癌細胞の表層の MT1-MMP 活性に制御的な役割を担う相互作用分子や標的基質に関して，まだ十分に明らかになっていない．したがって，まず癌細胞に発現する MT1-MMP の相互作用分子を明らかにすることは，悪性形質発現に関与する新たな MT1-MMP 活性の制御分子や酵素基質への理解に繋がるものと考えられた．そこで本研究では，MT1-MMP に着目して，プロテオミクス解析により MT1-MMP を含む複合体の構成蛋白質を明らかにすることを目的とした．

方法として，テトラサイクリン発現誘導系を用いて，FLAG 標識した MT1-MMP，対照として，アミノ酸一次配列および機能的に MT1-MMP ホモログであるが MT1-MMP と遠類に位置する GPI アンカー型の MT4-MMP の各 MT-MMPs を発現するヒト悪性黒色腫細胞株 (A375) を樹立した．これらの細胞株より調製した細胞溶解液の可溶性画分から，発現誘導した FLAG 標識 MT-MMPs を抗 FLAG 抗体カラムに結合させ洗浄後，FLAG ペプチドで溶出を行い，各 MT-MMPs を含む溶出画分を回収した．FLAG ペプチド溶出画分に含まれる蛋白質を SDS-PAGE によって分離した後に，銀染色法で検出した．その結果，MT1-，MT4-MMP の発現誘導に依存して，MT1-，MT4-MMP を含む各画分に，それぞれ複数の蛋白質が検出された．

次に、MT1-、MT4-MMPのFLAGペプチド溶出画分に含まれる蛋白質の同定を試みるため、これらの画分の蛋白質をプロテアーゼ消化して回収したペプチド断片を、ナノ流路系の逆相液体クロマトグラフィーと連結したタンデム質量分析装置 (Nano Flow LC/MS/MS) にて解析を行った。独立して複数回のNano Flow LC/MS/MSで解析を行った結果、MT1-MMPを含む画分で161分子、MT4-MMPでは50分子の蛋白質を同定した。そのうちMT1-MMPとMT4-MMPを含む画分に共通の蛋白質は20分子であり、MT1-MMPを含む画分にのみ、既知のMT1-MMP結合分子である αv 、 $\beta 1$ インテグリン、CD63やTIMP-3が同定された。

さらに、MT1-MMPを含む画分で同定した分子がMT1-MMPの複合体を形成する分子なのか調べるため、免疫沈降法で既知のMT1-MMP結合分子であるCD63を含めた9種類の膜蛋白質に関して検討した。その結果、9分子のうち8分子はMT1-MMPと共に免疫沈降することが明らかとなった。さらに蛍光免疫染色法による検討から、それら8分子のうち、4分子 (EphA2, 5T4 antigen, IL13R α 2 chain, CD63) はMT1-MMPとラップリング膜領域で共局在が認められた。また、MT1-MMPと共局在を示すEphA2, 5T4 antigenは*in vitro*アッセイ法によりMT1-MMPで限定分解を受けることから、MT1-MMPの標的基質となり得る可能性が示唆された。

MT1-MMPによって、これら分子が切断された結果、細胞機能に与える影響は今後の検討課題である。また、本研究でMT1-MMPと複合体を形成した膜蛋白質の多くは、既報より癌の悪性化に抑制的あるいは促進的な役割を担うことが明らかになっている。したがって、今後これら分子とMT1-MMPがどのような機能的複合体を形成するのか解析することで、浸潤や運動時に形成される複合体として機能するMT1-MMPの活性制御に応用できる可能性が考えられる。

また本研究で同定した、機能未知分子を含めた複合体の候補分子を個別に解析することで、細胞表層で行われているMT1-MMPを介した分子間の相互作用が及ぼす細胞機能への影響や癌の悪性形質に関与するMT1-MMPの理解を深めることに繋がるものと期待される。