

論文の内容の要旨

論文題目 蛋白質分解酵素 MT1-MMP による膜蛋白質 Lu の切断とその意義

指導教員 清木元治 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月 入学

医学博士過程

病因・病理学専攻

氏名 新谷大悟

癌細胞は組織内では細胞外マトリックスに囲まれており、浸潤の際にはそれを分解する。この、細胞外マトリックスを主な基質とする一群の酵素としてマトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP)がある。MMPは活性中心に亜鉛イオンが結合する一群のエンドペプチダーゼであり、今日まで 20 数種が見出されている。MMPはコラーゲンやエラスチン、ラミニン、フィブロネクチンなどほとんどの ECM 成分に対して幅広い分解活性をもち、且つ、中性の pH において高い生理活性を有している。これらの MMP はその構造から大きく 2 つの型に分類することができ、1 つは分泌型 MMP、もう 1 つは膜型 MMP(membrane-type matrix metalloproteinase; MT-MMP)である。

Membrane-type-1 MMP(MT1-MMP)は MT-MMP の基本形であり、1994 年に HT1080 ヒト線維肉腫細胞の細胞表面で MMP-2 を活性化する因子として同定され、MMP の基本ドメインに加えて C 末端側に疎水性の細胞膜貫通部位をもつ膜型の MMP である。MT1-MMP は、それ自体が直接 I、II、III 型コラーゲン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、ラミニン、フィブリン、アグリカンといった広範な細胞外マトリックス成分を分解することに加えて、基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンの分解酵素である MMP-2 や MMP-13 を細胞表面上で効率的に活性化し、細胞周囲の微小環境の制御を行い、癌細胞の増殖や浸潤・転移に関与していると考えられている。また、MT1-MMP は腫瘍における発現亢進が示されている。しかしながら、MT1-MMP を介した癌細胞浸潤の分子メカニズムの理解はいま

だ十分ではない。以上の背景から、MT1-MMP の基質となりうる分子の同定・機能解析は、腫瘍進展の機序の理解につながる可能性があると考えられた。

当研究室における、ヒト類上皮細胞株 A431 を用いたプロテオミクス解析にて、MT1-MMP と相互作用する分子が網羅的に解析され、163 種類同定された。とくに、MT1-MMP の直接の機能部位である細胞膜上で相互作用しうる膜蛋白質 64 種類含まれており、細胞機能に深く関わる可能性があった。同定された膜蛋白質のいくつかで検証した結果、すべての分子は MT1-MMP との結合分子であること、半数が MT1-MMP により切断を受ける基質候補であることが示された。将来的に、これらの基質候補それぞれについて解析をすすめることで、MT1-MMP を介した細胞機能制御の理解が深まるものと考えられた。

そこで、基質候補膜蛋白質の 1 つである Lu(Lutheran blood group protein)の解析を通じて、他の基質候補にも応用可能な実験法を模索することにした。この分子は、細胞外に 5 つの Ig 様ドメインをもつ、免疫グロブリンスーパーファミリーの膜蛋白質であり、腫瘍では卵巣癌や皮膚癌での発現亢進が報告されている。Lu はラミニン $\alpha 5$ の特異的レセプターであり、細胞と基底膜の接着に関与すると考えられるが、特に腫瘍における Lu の機能の条件、分子メカニズムの詳細は明らかでない。そこで、MT1-MMP と Lu の相互作用の意義について検証することは、腫瘍進展のメカニズム、Lu の機能の理解において有意義と考えられた。

本研究ではまず、Lu が MT1-MMP によって切断されることを確認した。培養細胞に Lu と MT1-MMP を発現させると、細胞側、培養上清中にそれぞれ Lu の断片が出現することが確認された。次に、MT1-MMP による Lu 切断部位の同定を試みた。C 端側断片の N 末端配列解析、合成 Lu ペプチドの MT1-MMP 活性ドメインによる切断実験により、切断箇所が、Lu 第 5 ドメインと膜貫通領域の間に存在することが示された。切断部位の 3 アミノ酸 N 端側はプロリンであり、これは既知の MT1-MMP 切断のコンセンサス配列の情報に漏れない箇所であった。切断部位の両端をアラニン酸置換した変異体を作製したところ、MT1-MMP 存在下でも、MT1-MMP 依存性 Lu 断片が出現しないことが確認された。このことから、MT1-MMP 特異的な Lu 切断部位が、1 箇所存在することがわかった。

前述のとおり、Lu の機能における情報は、ラミニン $\alpha 5$ 鎖を介した接着という、ほぼ一件に限られているといっても過言ではない。そこで、ラミニン $\alpha 5$ 鎖を含む、ラミニン 10($\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$)を精製し、細胞表層の Lu に結合させる実験系を試みた。用いた細胞は A431 であったが、Lu とおなじくラミニン $\alpha 5$ 鎖を認識するインテグリンをも発現していた。しかしながら、Lu 発現を shRNA によってノックダウンすると、ラミニン 10 の結合が著しく抑制され、この結果は Lu がラミニン 10 との結合に大きな役割を果たしていることを示すものであった。さらに、MT1-MMP を siRNA によってノックダウンすると、細胞の Lu 表面量が増加し、ラミニン 10 の結合も増加した。この結果は、Lu のラミニン 10 認識部位が第 2 ドメインと第 3 ドメインの間にあるという既知の情報と、MT1-MMP による切断部位が第

5 ドメインと膜貫通領域の間にあることを考えれば、MT1-MMP による Lu 切断は、ラミニン 10 を認識する有効な受容体数を減少させるという可能性を示唆するものであった。

今回我々は、Lu が切断を受けることを初めて見出し、さらにその責任酵素に MT1-MMP が含まれており、MT1-MMP 特異的な Lu 切断が存在することを示した。また、Lu の MT1-MMP による切断部位を同定し、その部位はドメイン 5 と膜貫通領域の間であることをつきとめた。これまで、赤血球以外の細胞で、内因性に発現した Lu に着目してラミニン 10 との相互作用を検証した報告はなく、癌に関連した病態生理的条件下での Lu の機能を示した点で有意義と考えられた。

MT1-MMP が、癌が浸潤、転移をする際に重要な役割をするという背景を考えれば、MT1-MMP により修飾される現象は、癌の浸潤、転移に有利にはたらく可能性を孕んでいる。今回明らかになった、MT1-MMP の発現が細胞の Lu の表面発現を減少させ、ひいては基底膜の重要な構成成分であるラミニン 10 との結合を抑制するという事実は、一見すると癌が局所で強固な足場を作り増殖するというメカニズムには不利に思える。しかし逆に、MT1-MMP による直接的、間接的 ECM 分解により細胞が基底膜を貫通すると同時に、基底膜との相互作用をまぬかれて、局所にとどまらずに自由に散布する機会をふやしているとも考えられる。

さらなる詳細な検討が必要であるが、本研究により、MT1-MMP が、Lu 切断を介して癌細胞の基底膜への接着を制御している可能性が示された。このことは、MT1-MMP の浸潤・転移における多彩な機能を理解するうえで重要な所見であると考えられる。

総括すると、本報告は、①タンデムマス解析が、相互作用膜蛋白質の探索のスクリーニングとして有用なアプローチであること、②MT1-MMP により切断される他の新規基質の同定にも応用可能な実験法を示したこと、③ほぼ機能未知の膜蛋白質 Lu が、MT1-MMP による切断をうけ、ラミニン 10 との結合を調節されている可能性があること、を示した点で有意義と考えられた。