

博士論文

論文題目 がん浸潤におけるCD44を介した
MT1-MMPの機能制御メカニズムの解明

氏 名 鈴木 隆

略語

ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
BMRB	biological magnetic resonance data bank
CAT	catalytic
CBB	coomassie brilliant blue
CD	cluster of differentiation
CSI	chemical shift index
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
HA	hyaluronan
HABD	hyaluronan binding domain
HADDOCK	high ambiguity driven protein-protein docking
HEK	human embryonic kidney
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPX	hemopexin
HRP	horseradish peroxidase
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

ITC	isothermal titration calorimetry
K_D	dissociation constant
LB	lysogeny broth
2-ME	2-mercaptoethanol
mer	monomeric unit
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MMP	matrix metalloproteinase
MT	membrane-type
MWCO	molecular weight cut off
NMR	nuclear magnetic resonance
NS	number of scans
OD	optical density
O-state	ordered state
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank
PD-state	partially disordered state
PE	phycoerythrin
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
ppm	parts per million
PRE	paramagnetic relaxation enhancement
PVDF	polyvinylidene difluoride
sCD44	soluble CD44
SDS	sodium dodecyl sulfate

SW	spectral width
TBS	tris buffered saline
TCA	trichloroacetic acid
TCS	transferred cross-saturation
TD	number of data points
TFA	trifluoroacetic acid
THP	triple helical peptide
TROSY	transverse relaxation optimized spectroscopy

目次

略語.....	2
目次.....	5
第1章 序.....	8
1-1 がん浸潤における MT1-MMP の機能.....	8
1-2 CD44 による MT1-MMP の機能制御.....	9
1-3 MT1-MMP に関する知見.....	13
1-4 CD44 に関する知見.....	16
1-5 本研究の目的.....	18
第2章 実験材料および実験方法.....	19
2-1 試薬.....	19
2-2 哺乳細胞の培養培地組成.....	19
2-3 大腸菌の培養培地組成.....	19
2-3-1 LB 培地.....	19
2-3-2 重水 M9 最小培地.....	20
2-3-3 アミノ酸選択標識培地.....	21
2-4 バッファー組成.....	22
2-4-1 CD44 HABD 精製用のバッファー.....	22
2-4-2 MT1-MMP HPX 精製用のバッファー.....	24
2-4-3 ウェスタンブロット用のバッファー.....	25
2-5 CD44 HABD の発現・精製.....	25
2-6 MT1-MMP HPX の発現・精製.....	26
2-6-1 HPX 大腸菌発現コンストラクトの構築.....	26
2-6-2 HPX の発現・精製.....	26

2-7 ITC 測定	27
2-8 NMR 測定	28
2-8-1 HPX の主鎖連鎖帰属	28
2-8-2 Chemical shift index (CSI) の算出	29
2-8-3 滴定実験	29
2-9 哺乳細胞のトランスフェクション	29
2-9-1 哺乳細胞用発現コンストラクトの構築	30
2-9-2 トランスフェクション	30
2-10 共焦点顕微鏡解析	30
2-11 ウェスタンブロット解析	31
2-12 フローサイトメトリー解析	32
第3章 結果と考察	33
3-1 MT1-MMP HPX と CD44 HABD の相互作用解析	33
3-1-1 試料調製	33
3-1-2 ITC 実験	34
3-1-3 HABD を NMR 観測対象とした HPX 滴定実験	35
3-1-4 HPX を NMR 観測対象とした HABD 滴定実験	44
3-1-5 小括	48
3-2 CD44 の切断において HPX との相互作用が果たす役割の解明	49
3-2-1 MT1-MMP 発現細胞の性状解析	49
3-2-2 CD44 切断アッセイ系の構築	53
3-2-3 MT1-MMP による切断における HABD の構造依存性	55
3-3 考察	57
3-3-1 MT1-MMP による CD44 の切断制御機構	57
3-3-2 CD44 を介した浸潤先端への局在化との両立	59

第4章 総括と今後の展望.....	61
4-1 本研究より明らかとした知見.....	61
4-2 今後の展望.....	62
参考文献.....	65
謝辞.....	69

第 1 章 序

1-1 がん浸潤における MT1-MMP の機能

がんは、日本人の 2 人に 1 人が罹患する疾病であり、死因の第 1 位となっている。がんは良性腫瘍と異なり、がん細胞が原発巣から脱離して組織へ浸潤し、全身に転移するという特徴を有する。がん転移は生命を脅かす事象であり、実際、がん死の 9 割は転移巣によって生体の機能が障害されることによる。

がん転移の最初のステップであるがん浸潤は、がん細胞が周囲の細胞外マトリックス (ECM) を分解し、間質組織を運動することで達成される。この過程では、膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼである MT1-MMP (membrane type I matrix metalloproteinase) が重要な役割を果たす (Fig. 1-1) (Sato et al., 1994; Seiki, 2003)。MT1-MMP は、生理的には器官形成や創傷治癒の過程に関与するほか、肺がん等の固形がんに発現し、その発現量が予後不良と関連することが知られる。MT1-MMP は、ECM の成分である I 型、II 型、III 型コラーゲンやフィブロネクチン等の基質を分解する活性を有する (Ohuchi et al., 1997)。また、周囲の線維芽細胞が分泌する MMP-2 を活性化する機能を有し、これにより、MT1-MMP 自身では分解することができない IV 型コラーゲンの分解を間接的に促進する。このようにして、ECM の分解を直接、ないし間接的に促進し、がん細胞が浸潤するために必要な空間を切り拓く。さらに、細胞膜上に発現する接着分子を切断する活性を有し、これにより、ECM との接着を制御し、細胞の運動性を高める (Endo et al., 2003; Kajita et al., 2001)。結果として、ECM の分解と細胞運動を亢進させ、がんの浸潤を促進する。

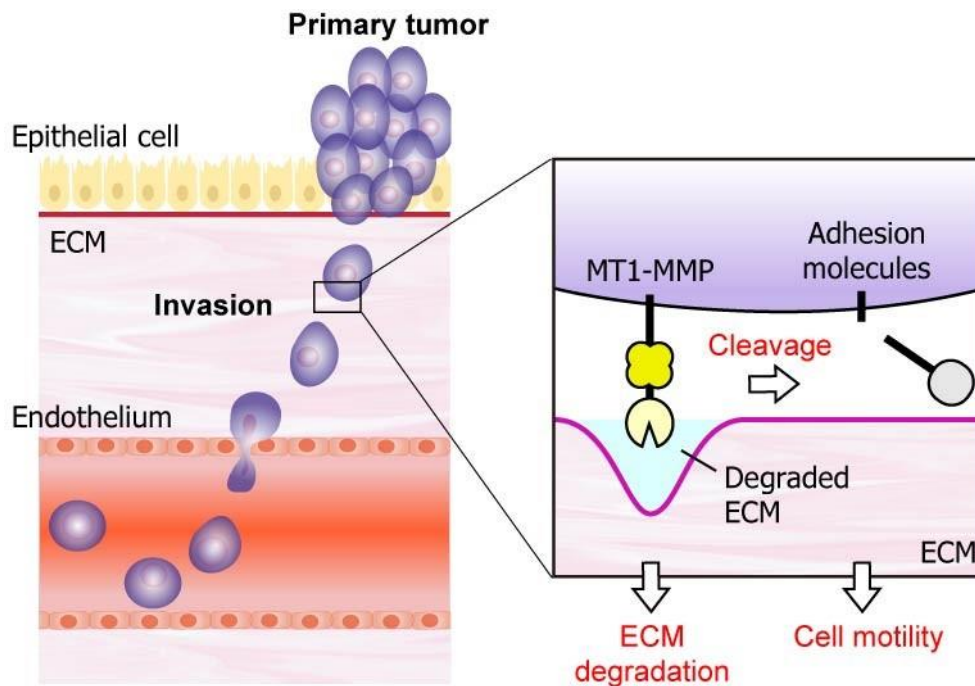


Fig. 1-1 がん浸潤における MT1-MMP の機能

MT1-MMP は、浸潤性がん細胞において、運動方向の ECM を分解する機能を有するほか、接着分子の切断により細胞の運動性を亢進させる機能を有する。

1-2 CD44 による MT1-MMP の機能制御

がん細胞は、浸潤の際に運動方向の先端部に浸潤突起を形成し、ECM との接着と分解を局所的に亢進させることが知られる。MT1-MMP は、浸潤突起に局在化することで、ECM の分解を効率的に達成する (Murphy and Courtneidge, 2011)。この局在化は、接着分子 CD44 との相互作用によって制御される (Fig. 1-2) (Mori et al., 2002)。CD44 は、ECM の成分であるヒアルロン酸 (HA) と結合する受容体である (Aruffo et al., 1990)。その細胞内領域は、エズリン (ezrin)、ラディキシン (radixin)、およびモエシン (moesin) から成る ERM ファミリータンパクと相互作用し、これらを介してアクチン骨格に連結する。MT1-MMP は CD44 と会合することで、間接的にアクチン骨格と連結し、アクチンの再構成によって浸潤先端へ局在化すると考えられている。

一方、MT1-MMP は CD44 の細胞外領域を切断する活性を有することも知られる (Fig. 1-2) (Kajita et al., 2001; Suenaga et al., 2005)。これにより、細胞の浸潤先端において CD44 と HA との結合を介した細胞接着が解除され、がん細胞の運動性を高める役割を果たす。

このように、がん浸潤の過程にて MT1-MMP は、CD44 を介して浸潤先端へ局在化する一方で、CD44 の細胞外領域を切断することでその機能を負に制御することが判明している。

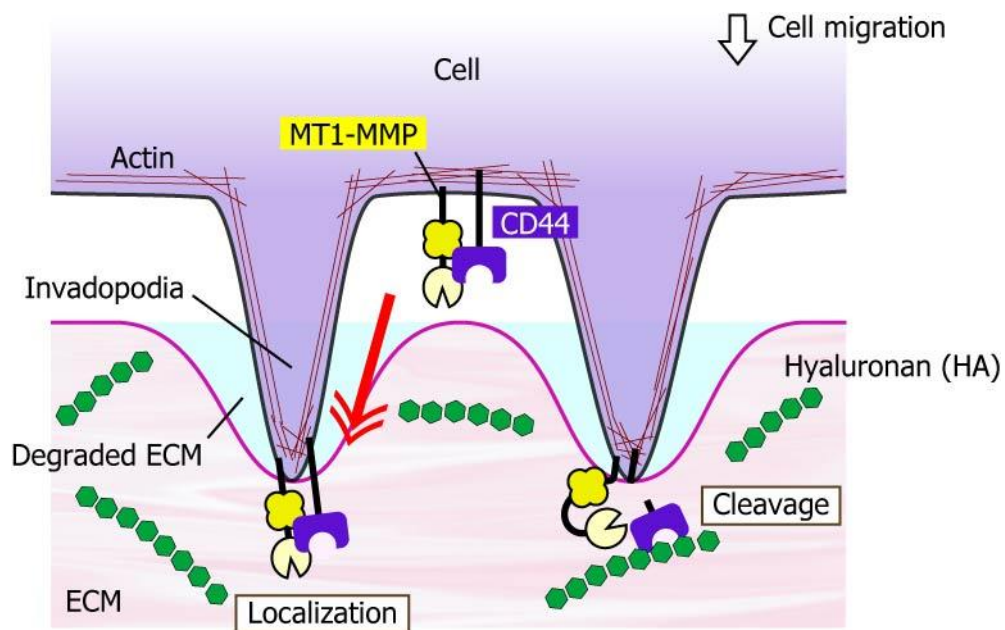


Fig. 1-2 CD44 による MT1-MMP の機能制御

MT1-MMP は、細胞上にて CD44 と複合体を形成することで、浸潤先端への局在化を達成する一方、CD44 の細胞外領域を切断することで、CD44-HA の相互作用を介した細胞接着を解除し、細胞の運動性を亢進させる。

MT1-MMP は、細胞外領域に基質分解活性を担う酵素 (CAT) ドメイン (以下 CAT) に加え、ヘモペキシン様 (HPX) ドメイン (以下 HPX) を有する (Fig. 1-3 A)。これまでに、上述した 2 つの機能発現における、HPX の役割について報告されている。たとえば、CD44 を介した MT1-MMP の浸潤先端への局在化における HPX の役割について、内在性 CD44 が発現するヒト繊維肉腫由来 HT1080 細胞に対し、野生型 MT1-MMP ないし HPX を deletion した Δ HPX を発現させ、浸潤先端における CD44 との共局在を解析することで調べられている (Fig. 1-3 B) (Mori et al., 2002)。その結果、野生型 MT1-MMP を発現させた細胞では、浸潤先端に主に分布する CD44 との共局在が観察されたのに対し、 Δ HPX を発現させた細胞では、浸潤先端への局在化が観察されなかった。また、MT1-MMP による CD44 の切断における HPX の役割について、ヒト乳腺管がん由来 ZR-75-1 細胞に対し、野生型 MT1-MMP ないし Δ HPX を CD44 と共発現させた際に、培地中に放出された可溶性 CD44 (sCD44) を解析することによって調べられている (Fig. 1-3 C) (Suenaga et al., 2005)。その結果、野生型 MT1-MMP を CD44 と共発現させた細胞では、MT1-MMP によって産生された sCD44 が検出されたのに対し、 Δ HPX を発現させた細胞では検出されなかった。以上の知見より、CD44 を介した浸潤先端への局在化と、CD44 の切断はいずれも、HPX を介した CD44 との相互作用が重要であると考えられる。しかしながら、これまでに MT1-MMP HPX と CD44 の相互作用様式は不明であり、CD44 を介した浸潤先端への局在化と、CD44 の切断という相異なる 2 つの機能がどのように制御され、両立するのかについては不明であった。

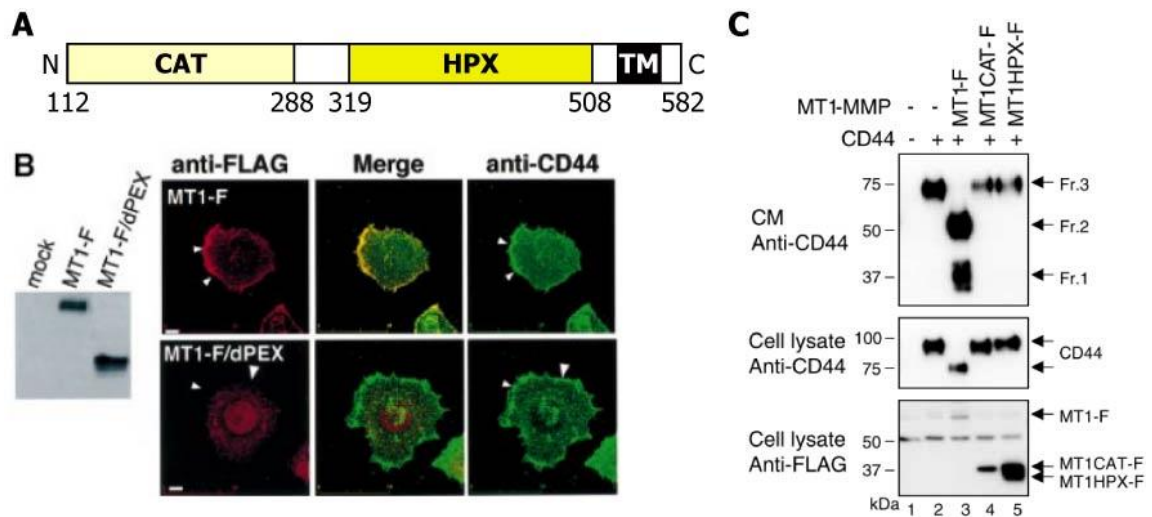


Fig. 1-3 CD44 による機能制御における HPX の役割

(A) MT1-MMP の 1 次構造。

(B) HT1080 細胞に対し、FLAG-tag を付加した MT1-MMP を発現させ、TPA 刺激により浸潤突起の形成を誘導した。上図では、野生型 MT1-MMP を発現させた際の CD44 との共局在の様子を、下図では、 Δ HPX を発現させたときの CD44 との共局在の様子を示す。

(C) ZR-75-1 細胞に対し、FLAG-tag を付加した MT1-MMP と CD44 を共発現させ、培地中 (CM) に放出された sCD44 をウェスタンブロットにより解析した。Fr.3 のバンドは、ADAM によって産生された sCD44 に対応し、Fr.1 および 2 のバンドは、MT1-MMP によって産生された sCD44 に対応する。

1-3 MT1-MMP に関する知見

MT1-MMP は一回膜貫通型の I 型膜タンパク質であり、プロペプチドが付加した酵素前駆体として産生される。その後、細胞内にてフーリン様プロテアーゼにてプロペプチドが切除され、活性型となって細胞膜上に発現する。活性型 MT1-MMP の細胞外領域は、①CAT (a.a. 112-288)、②Hinge 領域 (a.a. 289-318)、③HPX (a.a. 319-508) から成る (Fig. 1-3 A)。このうち、CAT は基質の切断を担い、HPX は基質認識とその特異性を決定づける役割を担う。

これまでに MT1-MMP CAT および HPX の結晶構造が報告されている (Fernandez-Catalan et al., 1998; Tochowicz et al., 2011)。CAT は、5 本のストランドから形成されたβシートを中心として、周囲にループやヘリックスが取り巻く構造を形成していた (Fig. 1-4 A)。また、HE_xGH_{xx}G_{xx}HD (x は任意) という MMP 間で保存された配列が活性中心を形成し、活性中心に位置する Zn²⁺イオンを、周囲に存在する 3 つの His 残基によって支持していた。一方、HPX は血中のヘムを結合する血清タンパク質ヘモペキシンと相同性を有するドメインであり、35-45 残基程度の単位から成る Blade I から Blade IV の 4 枚羽のβプロペラ構造を形成し、N 末端と C 末端が一組の S-S 結合により架橋されていた (Fig. 1-4 B)。

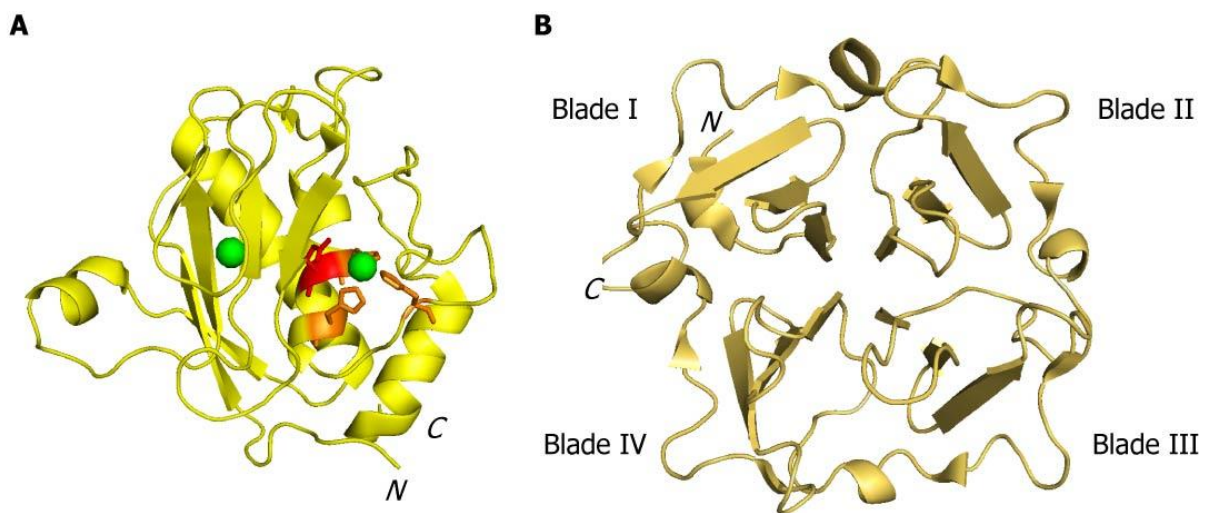


Fig. 1-4 MT1-MMP CAT および HPX の立体構造

(A) CAT の結晶構造 (PDB code: 3MA2)。活性中心に位置する Glu 残基を赤、亜鉛イオンを緑にて色付けた。また、活性中心に配位する亜鉛イオンを支持する His 残基を橙にて色付けた。

(B) HPX の結晶構造 (PDB code: 3C7X)。

また最近、MT1-MMP HPX と I 型コラーゲンペプチド (THP) の相互作用様式に関する NMR 解析が報告された (Zhao et al., 2015)。この中で、HPX に対する THP 滴定実験が行なわれ、HPX の Blade I に位置する残基にて、顕著なシグナルの広幅化と僅かな化学シフト変化が観測された (Fig. 1-5 A and B)。これより、HPX Blade I が THP との相互作用に関与することが示唆された。このことは、THP にスピンラベルを導入した PRE 解析からも支持された。PRE による距離情報に基づき、HADDOCK によって複合体のモデル構造が提案された (Fig. 1-5 C)。

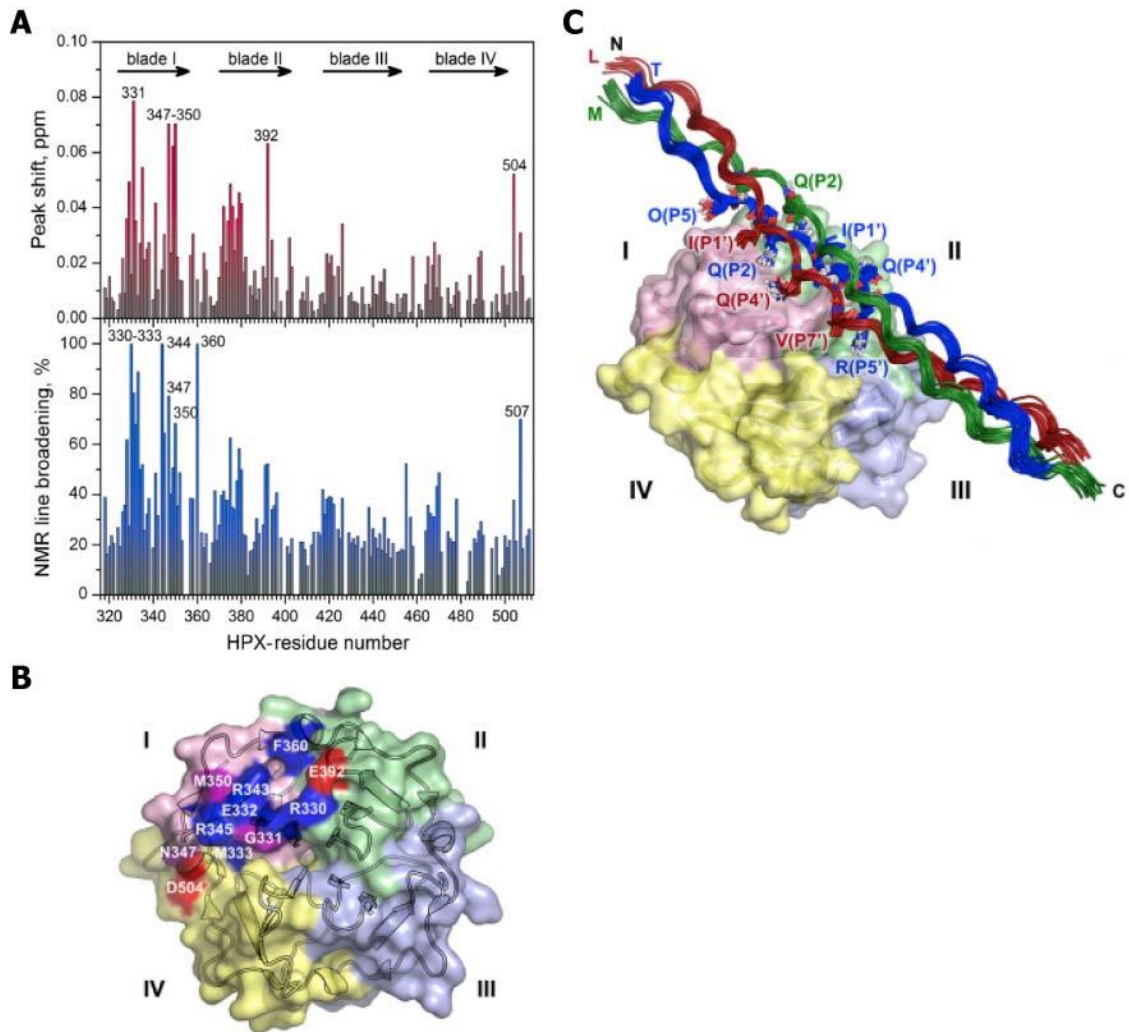


Fig. 1-5 MT1-MMP HPXによるI型コラーゲン認識様式

(A) MT1-MMP HPX に対し 1.5 等量の THP を添加したことで誘起された化学シフト変化量（上段）およびシグナル強度減少率（下段）。

(B) (A) にて顕著な化学シフト変化が観測された残基を赤、顕著なシグナル強度減少が観測された残基を青、その両方が観測された残基を紫にて、HPX の構造上にマッピングした。

(C) PRE 解析に基づいて構築された複合体モデル (PDB code: 2mq5)。エネルギー的に安定な 15 個の構造の重ね合わせを示す。I-IV は HPX の各 Blade を、T, L, M はそれぞれ THP の trailing chain (青), leading chain (赤), middle chain (緑) を示す。THP の残基番号は、切断部位 (Gly-Ile) からの残基数で表記されており、たとえば Q(P2) は切断部位前の 2 残基目であることを示す。また、切断部位後の残基にはプライム (') が付加されており、たとえば I(P1') は切断部位直後の残基であることを示す。

1-4 CD44 に関する知見

CD44 は MT1-MMP と同様に一回膜貫通型の I 型膜タンパク質である。近年、乳がん、大腸がん、膵臓がんなどの固形がんにおいて、CD44 陽性のがん細胞集団を免疫不全マウスに移植すると高い腫瘍形成能力を示し、がん幹細胞様の性質を有することが報告されている (Al-Hajj et al., 2003; Dalerba et al., 2007; Li et al., 2007)。このことから、CD44 はがん幹細胞マーカーとして認識されており、その機能解明は、がん幹細胞を標的とした新規治療法の開発につながるとして注目されている (Zöller, 2011)。

CD44 の HA 認識は、細胞外領域に存在する HA 結合ドメイン (HABD) が担う (Fig. 1-6 A)。HABD は、C 末端領域が一定の構造を形成した Ordered state (O-state) と (Fig. 1-6 B) (Takeda et al., 2003; Teriete et al., 2004)、T153 以降の C 末端領域がランダムコイル化した Partially disordered state (PD-state) の 2 状態が存在する (Fig. 1-6 C) (Takeda et al., 2006)。HABD は溶液中において O-state と PD-state の間の構造平衡にあり、単独状態では O-state に平衡が偏っているのに対し (Fig. 1-6 D and E)、HA 結合に伴って PD-state へ平衡が偏ることが判明している (Fig. 1-6 F and G) (Ogino et al., 2010)。また、HABD の T47 と N164 にシステイン変異を導入し、分子内 S-S 結合を形成させることで O-state に構造を固定した変異体が、また、Y161 をアラニンに変異させることで PD-state に構造を固定した変異体がそれぞれ作製されている (Ogino et al., 2010; Suzuki et al., 2015)。両変異体を用いた HA との相互作用解析の結果、O-state の HA 親和性は解離定数にして 53 μM であったのに対し、PD-state の HA 親和性は解離定数にして 3 μM であった。これより、O-state は HA 低親和性、PD-state は HA 高親和性であることが判明している。さらに、交差飽和実験によって T76-G80 および I96-A99 から成る領域が HA 結合界面であることが同定されている (Takeda et al., 2003)。また、その後の結晶構造解析により、HA との相互作用は主に水素結合や疎水性相互作用によって形成されることが判明している (Banerji et al., 2007)。

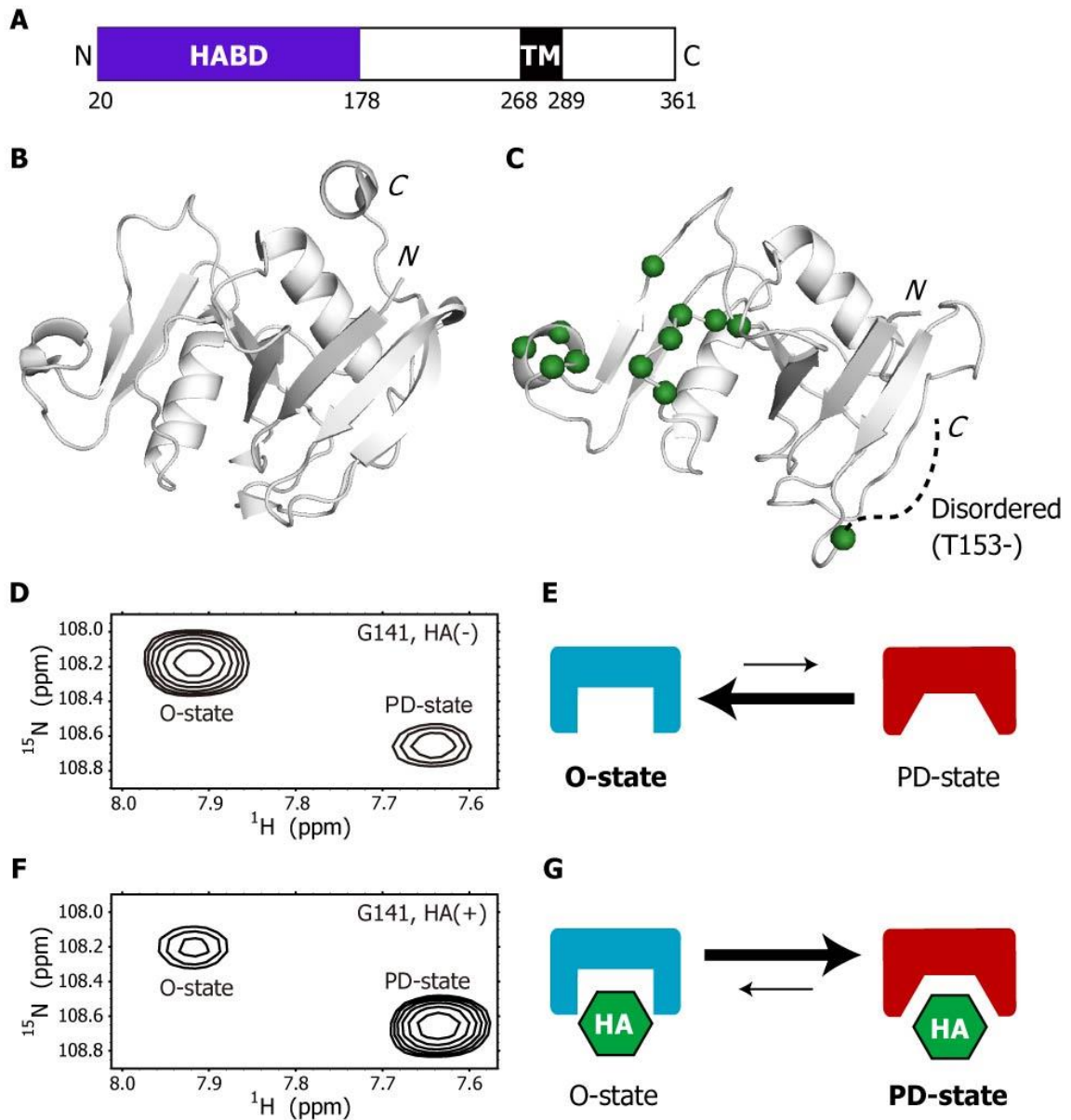


Fig. 1-6 CD44 HABD の構造生物学的知見

(A) CD44 の 1 次構造。

(B) HA 非存在下にて O-state にある HABD の結晶構造 (PDB code: 1UUH)。

(C) HA 存在下にて PD-state にある HABD の NMR 構造 (PDB code: 2I83)。交差飽和実験によって HA 結合界面と同定された残基の C α 原子を緑の球で示した。

(D) 2 状態のシグナルが観測される G141 の、HA 非存在下におけるスペクトルの拡大図。

(E) HA 非存在下における HABD の 2 状態平衡の模式図。

(F) 2 状態のシグナルが観測される G141 の、HA 存在下におけるスペクトルの拡大図。

(G) HA 存在下における HABD の 2 状態平衡の模式図。

1-5 本研究の目的

1-2 節で述べたように、がん浸潤の過程にて MT1-MMP は、CD44 と複合体を形成することで、浸潤先端への局在化を達成する一方、CD44 の細胞外領域を切断することで HA との接着を解除し、がん細胞の運動性を亢進させることが明らかとなっている。しかしながら、このように相異なる 2 つの機能が、どのように制御されているかは不明であった。

これまでの研究より、CD44 を介した MT1-MMP の浸潤先端への局在化と、CD44 の細胞外領域の切断はいずれも、HPX を介した CD44 との相互作用が重要であることが明らかとなっている。従って、HPX と CD44 の相互作用様式を解明することで、CD44 を介した浸潤先端への局在化と、CD44 の切断という 2 つの機能が両立するメカニズムを解明できると考えた。そこで本研究では、がん浸潤において MT1-MMP の機能発現が CD44 によってどのように制御されるか解明することを目的として、MT1-MMP HPX と CD44 の相互作用様式を構造生物学的に明らかとすることとした。

第 2 章 実験材料および実験方法

2-1 試薬

特に断らない限り、安定同位体標識試薬は Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL) より、哺乳細胞の培養製品は Gibco より、制限酵素は Takara より購入し、その他の試薬はナカライテスクあるいは和光純薬工業より購入した。また、水は MilliQ 水を用いた。

2-2 哺乳細胞の培養培地組成

ヒト胎児腎細胞由来 HEK 293T の培養は DMEM 培地を用いた。いずれの培地にも、10% FBS (Biowest)、50 Unit/mL Penicillin、50 µg/mL Streptomycin、2 mM GlutaMAX、1 mM Sodium Pyruvate、10 mM HEPES、10 mM Non-essential amino acids (Glycine, L-Alanine, L- Asparagine, L-Aspartic acid, L-Glutamic Acid, L-Proline, L-Serine) を添加した。

2-3 大腸菌の培養培地組成

2-3-1 LB 培地

以下の組成の培地をオートクレーブにより滅菌した。また、LB 培地プレートには、以下の組成の培地に Agar 10 g/L を加えた。

Tryptone	10 g/L
Yeast extract	5 g/L
NaCl	10 g/L

室温にて放冷後、0.22 μm のフィルター (Millipore) を用いてろ過滅菌したアンピシリン溶液を、終濃度 100 mg/L にて添加した。

2-3-2 重水 M9 最小培地

均一 ^2H , ^{15}N 標識体を調製する際は、以下の試薬を重水に溶解し、0.22 μm のフィルターを用いてろ過滅菌した。

Na_2HPO_4	6.0 g/L
KH_2PO_4	3.0 g/L
NaCl	0.5 g/L
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	1.0 g/L
^2H , ^{15}N -celtone	1.0 g/L

室温にて放冷後、0.22 μm のフィルターを用いてろ過滅菌した、以下の溶液を加えた。

40% w/v glucose	10 ml/L
1 M MgSO_4	2 ml/L
10 mM FeCl_3	100 $\mu\text{l/L}$
1 mg/mL Biotin	1 ml/L
50 mg/mL Thiamine	100 $\mu\text{l/L}$
0.1 M CaCl_2	1 ml/L
0.5 M ZnSO_4	100 $\mu\text{l/L}$
10 mg/mL Choline Chloride	100 $\mu\text{l/L}$

10 mg/mL Folic Acid	100 μ l/L
10 mg/mL Niacinamide	100 μ l/L
10 mg/mL Pyridoxal	100 μ l/L
1 mg/mL Riboflavin	100 μ l/L
100 mg/mL Ampicillin	1 ml/L

なお、培地調製の際に使用する器具は、オートクレーブを行なった上で 80 °C の乾熱器にて乾燥させたものを用いた。また、均一 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識体を調製する際は、 ^2H , ^{15}N -celtone の代わりに ^2H , ^{13}C , ^{15}N -celtone を、40% w/v glucose の代わりに粉末の $^{13}\text{C}_6$ -glucose を終濃度 3 g/L にて培地に添加した。

2-3-3 アミノ酸選択標識培地

アミノ酸選択標識培地は、celtone を除いた M9 培地を基本に、以下に示す量のアミノ酸を添加した。1- ^{13}C , ^{15}N 標識アミノ酸は、以下に示した量の半量を誘導直前に添加した。また、 NH_4Cl は ^{15}N 標識されていない試薬を用いた。

Alanine	400 mg
Arginine	400 mg
Aspartic Acid	250 mg
Cystine	50 mg
Glutamic Acid	400 mg
Glycine	400 mg
Histidine	100 mg
Isoleucine	100 mg

Leucine	100 mg
Lysine	150 mg
Methionine	50 mg
Phenylalanine	50 mg
Proline	150 mg
Serine	1000 mg
Threonine	100 mg
Tryptophan	50 mg
Tyrosine	100 mg
Valine	100 mg

2-4 バッファー組成

各種バッファーは、以下の組成のものを用いた。

2-4-1 CD44 HABD 精製用のバッファー

PBS

137 mM NaCl、8.1 mM Na₂HPO₄、2.7 mM KCl、1.47 mM KH₂PO₄、pH 7.4

封入体洗浄バッファー

0.5% Triton X-100、50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、pH 8.0

封入体可溶化バッファー

6 M Guanidine-HCl、50 mM MES、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、pH 6.5

リフォールディングバッファー

100 mM Tris-HCl、250 mM L-arginine、2.5 mM 還元型グルタチオン、2.5 mM 酸化型グルタチオン、
2 mM EDTA、1 mM PMSF、pH 8.5

ゲルろ過精製バッファー

20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、pH 8.0

HPLC 精製バッファー

Buffer A: 0.1% TFA

Buffer B: 0.1% TFA in アセトニトリル

凍結乾燥品可溶化バッファー

6 M Guanidine-HCl、100 mM Tris、0.1 mM EDTA、pH 8.4

透析バッファー

10 mM HEPES-NaOH、50 mM NaCl、pH 6.8

ITC 測定バッファー

10 mM HEPES-NaOH、2.5 mM CaCl₂、pH 7.0

NMR 測定バッファー

10 mM HEPES-NaOH、50 mM NaCl、10% D₂O、pH 7.0

2-4-2 MT1-MMP HPX 精製用のバッファー

封入体洗浄バッファー

1% Triton X-100、50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、pH 8.0

封入体可溶化バッファー

6 M Guanidine-HCl、50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、10 mM CaCl₂、pH 8.0

His-select 精製バッファー

8 M Urea、50 mM Tris-HCl、200 mM NaCl、pH 8.0

透析バッファー①

2 M Urea、20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、10 mM CaCl₂、5 mM 2ME、1 mM 2-hydroxyethyl disulfide、
pH 7.4

透析バッファー②

0.5 M Urea、20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、10 mM CaCl₂、5 mM 2ME、pH 7.4

透析バッファー③

10 mM HEPES-NaOH、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂、5 mM 2ME、pH 7.0

陽イオン交換精製バッファー

10 mM HEPES-NaOH、5 mM CaCl₂、pH 7.0

2-4-3 ウェスタンブロット用のバッファー

細胞可溶化バッファー

20 mM Tris、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton、0.1% NP-40、pH 7.4

SDS-PAGE サンプルバッファー

123 mM Tris-HCl、20% v/v glycerol、4% w/v SDS、0.002% w/v bromophenol blue

転写バッファー

25 mM Tris-HCl、192 mM Glycine、10% v/v MeOH

TBS

20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、pH 7.4

ブロッキングバッファー

5% スキムミルク (Cell signaling technology)、0.05% Tween20 in TBS

2-5 CD44 HABD の発現・精製

pET11a にクローニングされたヒト CD44 HABD (a.a. 20-178) 発現プラスミドは、当研究室にて構築されているものを用いた。HABD202 発現プラスミドは、当研究室にて作製されている pET19b-CD44 細胞外全長 (a.a. 20-268) を鋳型とし、Quikchange 法により P203-E268 を deletion することで構築した。PCR 産物の精製は、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いた。HABD の発現・精製法は、当研究室にてこれまでに構築された方法を用いた (Takeda et al., 2003)。また、

当研究室ではこれまでに野生型 H ABD、O-state 変異体、PD-state 変異体の主鎖連鎖帰属が行なわれており、NMR 解析でのシグナルの帰属は、以前の帰属結果を移行することで行なった。

2-6 MT1-MMP HPX の発現・精製

2-6-1 HPX 大腸菌発現コンストラクトの構築

N 末端に His-tag、および Factor Xa 切断サイトを付加した、ヒト MT1-MMP HPX (a.a. 313-511) 発現プラスミドの構築を行なった。当研究室ではこれまでに、pcDNA3.1/V5-His にクローニングされた MT1-MMP 全長の発現プラスミドが構築されている。これを鋳型とし、以下に示す配列を有するプライマーにより PCR 反応を行なうことで、インサートを増幅した。得られたインサートは NcoI, XhoI により double digestion した。組み込むベクターは pET15b とし、同様に制限酵素処理を行ない、さらに仔ウシ腸管由来 alkaline phosphatase (New England Biolabs) による脱リン酸化を行なった。インサートおよびベクターを、2 × Ligation Mix (ニッポンジーン) と共に混合して 16 度にて 5 分間ライゲーション反応を行ない、大腸菌株 XL-1 Blue により増幅した。QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) にてプラスミドを精製し、DNA シーケンサーにより目的の配列であることを確認した。

Sense 鎖 : CATGCC ATG GGC CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC ATC GAA
GGT CGT ACC TAT GGG CCC AAC ATC TGT GA

Antisense 鎖 : CCGCTCGAGCGG TTA TCC CGA TGG GCA GCC CAT CCA

2-6-2 HPX の発現・精製

大腸菌株 BL21 (DE3) codonplusRP を発現宿主として選択し、37 °C にて培養を行なった。OD₆₀₀=0.6 程度まで上昇した時点にて IPTG を添加し、そのまま 37 °C にて終夜培養を行なうことで不溶画分に発現させた。得られた菌体は PBS に懸濁し、-80 °C にて凍結保存した。精製では、ソニケーションにて菌体を破碎し、15,000 g にて 20 分遠心し沈殿画分を回収した。得られた封入体は、封入体洗浄バッファーにて 3 度洗浄し、封入体可溶化バッファーにて可溶化した。可溶化溶液は、100,000 g 30 分にて遠心することで不溶物を除去し、得られた上清を His-select nickel affinity gel (Sigma-Aldrich) を用いて精製した。His-select 精製バッファーにて洗浄後、His-select 精製バッファーに 300 mM imidazole を添加することで溶出させた。溶出液は、0.1 mg/mL に希釈し、20 mM Cystamine dihydrochloride を添加した。これを透析内液として、透析バッファー①にて半日、透析バッファー②にて半日、透析バッファー③にて半日、透析することでリフォールディングを行なった。さらに、陽イオン交換精製のため、陽イオン交換精製バッファーにて透析を行なうことで脱塩を行なった。最後に、SP sepharose (GE Healthcare) を用いて陽イオン交換精製を行ない、最終精製を行なった。

2-7 ITC 測定

サンプルは、ITC 測定バッファーにバッファー交換し、さらにサンプル間のバッファー条件を高度に均一化するため 3 度透析を行なった。透析では、サンプルは MWCO 7 kDa の透析カセット (Thermo Fisher Scientific) に封入した。透析後のサンプル濃度は、HPX 2.25 mM、野生型 HABD 566 μM、PD-state 変異体 152 μM であった。このうち、野生型 HABD については透析外液を用いて 150 μM に希釈した。ITC 実験は、MicroCal iTC200 (GE Healthcare) を用いて行なった。測定温度を 20 °C とし、セル側に HABD を、シリンジ側に HPX を導入した。HPX の滴定は、一回に 0.9 μL ずつ 42 度滴定し、最終的に 3 等量を添加するまでの熱量変化を解析した。希釈熱など相互作用以外に起因する熱量変化の大きさを差し引くため、透析外液に対し HPX を滴定するコントロール実験を行なった。

HABD202 を用いた実験では、調製した HABD202 を MWCO 7 kDa の透析カセットに、HPX を MWCO 10 kDa の透析カセットに、それぞれ封入した。5 mM HEPES (pH 6.7), 1.2 mM CaCl₂ から成る組成のバッファーにて 2 度透析を行ない、サンプル間のバッファーを均一化した。透析後のサンプル濃度は、HABD202 が 199 μM、HPX が 1.1 mM であった。このうち、HABD202 については透析外液を用いて 100 μM に希釈した。測定温度は 20 °C とし、セル側に HABD を、シリンジ側に HPX を導入した。HPX の滴定は、最初から 6 回目までは 0.2 μL ずつ、その後は 0.4 μL ずつ行ない、合計 78 回行なった。

2-8 NMR 測定

2-8-1 HPX の主鎖連鎖帰属

三重共鳴実験を行なうため、¹³C₆-Glc 3 g/L, ¹⁵NH₄Cl 1 g/L を含む重水 M9 培地を用いて、均一 ²H, ¹³C, ¹⁵N 標識 HPX を調製した。調製した HPX は、NMR 測定バッファーにて 1.0 mM に濃縮した。NMR 測定は、クライオプローブを装備した Avance 800 (Bruker Biospin) を用いて行なった。測定温度は 25 °C とし、TROSY タイプの各種測定 (trHNCACB, trHNCOCACB, trHNCACO, trHNCO, trHNCA, trHNCOCA) を行なった。測定のパラメーターを以下に示す。

Experiment	Major parameters				
	TD ¹ H / ¹⁵ N / ¹³ C	SW (ppm) ¹ H / ¹⁵ N / ¹³ C	Offset (ppm) ¹ H / ¹⁵ N / ¹³ C	NS	Exp. time
¹ H- ¹⁵ N TROSY-HSQC	2048 / 256	14 / 31	4.7 / 118	32	2.5 hrs
trHNCACB	1024 / 36 / 90	14 / 31 / 56	4.7 / 118 / 42	36	1 day 15 hrs
trHNCOCACB	1024 / 36 / 90	14 / 31 / 56	4.7 / 118 / 42	32	1.5 days
trHNCACO	2048 / 36 / 100	14 / 31 / 14	4.7 / 118 / 174	36	1 day 21 hrs

trHNCO	2048 / 36 / 110	14 / 31 / 14	4.7 / 118 / 174	16	22 hrs
trHNCA	2048 / 36 / 120	14 / 31 / 29	4.7 / 118 / 52.5	16	1 day
trHNCOCA	2048 / 36 / 120	14 / 31 / 29	4.7 / 118 / 52.5	16	1 day

2-8-2 Chemical shift index (CSI) の算出

残基番号 i の CSI の算出は、 $C\alpha$ および $C\beta$ の化学シフト値の、ランダムコイル状態における基準値との差分 (ΔC^{α} , ΔC^{β}) を用いて、以下の式に基づいて算出した (Wishart and Sykes, 1994)。なお、 $C\beta$ を有さないグリシンは、 $\Delta C^{\beta}=0$ とした。

$$CSI = \frac{(\Delta C_{i-1}^a - \Delta C_{i-1}^b) + 2(\Delta C_i^a - \Delta C_i^b) + (\Delta C_{i+1}^a - \Delta C_{i+1}^b)}{4}$$

2-8-3 滴定実験

NMR 滴定実験は、クライオプローブを装備した Avance 600 を用いて行なった。測定温度は 20 °C とし、滴定毎に 1H - ^{15}N TROSY-HSQC 測定を行なった。野生型 HABD を観測対象とする実験では積算回数 (NS) を 32、 ^{15}N 方向のポイント数を 256、スペクトル中心を 116.5 ppm、スペクトル幅を 31 ppm と設定した。HABD 変異体を観測対象とする実験では NS=36、 ^{15}N 方向のポイント数を 256、スペクトル中心を 118 ppm、スペクトル幅を 31 ppm とした。HPX を観測対象とする実験では NS=48、 ^{15}N 方向のポイント数を 256、スペクトル中心を 118 ppm、スペクトル幅を 31 ppm と設定した。HA を添加した条件下における NMR 解析では、レンサ球菌由来の HA_{12mer} (Iduron) を野生型 HABD に対し 2 等量加え、測定を行なった。

2-9 哺乳細胞のトランスフェクション

2-9-1 哺乳細胞用発現コンストラクトの構築

N 末端に FLAG-tag、C 末端に HA-tag を付加したヒト MT1-MMP は、pcDNA3.1/Zeo(+) にクローニングした。ヒト CD44 は、近畿大学の早坂晴子先生よりご供与いただいた pCAGIpuro にクローニングすることとし、C 末端に V5-tag および His-tag を付加した。

2-9-2 トランスフェクション

細胞をプレーティングする 6 ウェルプレートは、予め I 型コラーゲン (新田ゼラチン) を 0.15 mg/mL の濃度にてコーティングした。HA 存在下での解析では、コラーゲンフィルムを形成させたプレートに対し、さらにヒトへその緒由来の高鎖長 HA (Sigma-Aldrich) を 0.5 mg/mL の濃度にてコーティングした。このプレートに対し、1 ウェルあたり 2.5×10^5 個の HEK 293T 細胞をプレーティングした。翌日、Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いたトランスフェクションにより、各ウェルに対して MT1-MMP および CD44 の発現プラスミドを 1 μ g ずつ導入した。

2-10 共焦点顕微鏡解析

共焦点顕微鏡は、Fv10i (オリンパス) を用いた。トランスフェクション翌日、I 型コラーゲン (新田ゼラチン) を 0.15 mg/mL の濃度にてコーティングしたガラスディッシュ (底面ガラス部直径 27 mm, IWAKI) に対し細胞をリプレーティングし、終夜 37 °C にてインキュベートすることで接着させた。翌日、4% パラホルムアルデヒドによって細胞を固定し、0.5% Triton X-100 にて透過処理を行なった。MT1-MMP の染色は、ラビット抗 MT1-MMP Hinge 抗体 (#AB6004, Millipore) またはマウス抗 FLAG-tag 抗体 (和光純薬工業) とインキュベーションすることで行なった。また、CD44 の染色では IM7 ラット抗 CD44 抗体 (eBioscience) またはマウス抗 V5-tag 抗体 (Invitrogen) とインキュベーションすることで行なった。

2-11 ウェスタンブロット解析

培地中に放出された可溶性 CD44 (sCD44) を検出する実験では、トランスフェクション翌日に培地を無血清培地に交換し、さらに 2 日間の培養後、培地を回収した。ウェスタンブロットでは、まず終濃度 10% TCA によって培地を濃縮し、20 mM DTT を含む SDS-PAGE サンプルバッファーにてサンプル化を行なった。次に、アクリルアミド濃度 10% の SDS-PAGE を用いた電気泳動、PVDF 膜への転写を行ない、ブロッキングバッファーを用いてブロッキングを行なった。続いて、1 次抗体として、CD44 の HABD 領域に位置する Leu135 近傍を認識する抗 CD44 ラビットポリクローナル抗体 (#3578, Cell signaling technology) を TBST にて 1:625 に希釈し、4 °C にて終夜インキュベーションを行なった。次いで、HRP 標識された抗ラビット IgG (R&D systems) ヤギポリクローナル抗体を TBST にて 1:20,000 に希釈し、室温にて 1 時間半インキュベーションを行なった。検出は、ECL select (GE Healthcare) にて行なった。泳動マーカーは、プレジジョン Plus プロテイン WesternC スタンダード (Bio-rad) を用いた。また、メタロプロテアーゼ阻害剤を添加する実験では、BB94 (cayman chemical) を DMSO に溶解し、終濃度 5-10 μ M となるように培地に添加した。

細胞破碎液のウェスタンブロットでは、培地回収後の細胞に対し、細胞可溶化バッファーを各ウェルに対して 100 μ L ずつ添加することで可溶化し、20 mM DTT を含む SDS-PAGE サンプルバッファーにてサンプル化を行なった。MT1-MMP を検出する実験では、HRP 標識された M2 抗 FLAG マウスモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) を TBST にて 1:20,000 に希釈し、室温にて 1 時間インキュベーションを行なった。また、CD44 を検出する実験では、1 次抗体として抗 CD44 ラビットポリクローナル抗体 (#3578) を TBST にて 1:625 に希釈し、4 °C にて終夜インキュベーションを行ない、次いで、2 次抗体として HRP 標識された抗ラビット IgG ヤギポリクローナル抗体を TBST にて 1:20,000 に希釈し、室温にて 1 時間半インキュベーションを行なった。

2-12 フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析は、CytoFLEX (Beckman Coulter) を用いた。トランスフェクション翌日の細胞を、Enzyme Free Cell Dissociation Solution PBS Based (Millipore) にて剥離し、細胞を回収した。回収した細胞は4%パラホルムアルデヒドにて37°C、20分インキュベーションすることで固定した。MT1-MMPの染色では、1次抗体としてラビット抗MT1-MMP Hinge抗体をPBSにて1:150希釈してインキュベーションし、2次抗体としてAlexa488標識ヤギ抗ラビットIgG抗体を1:150希釈してインキュベーションすることで染色した。また、CD44の染色では、PE標識IM7ラット抗CD44抗体をPBSにて1:400に希釈してインキュベーションすることで染色した。

第3章 結果と考察

3-1 MT1-MMP HPX と CD44 HABD の相互作用解析

3-1-1 試料調製

HPX の調製

ヒト MT1-MMP HPX は、結晶構造に基づいて残基番号 313 から 511 の領域を用いた (Tochowicz et al., 2011)。N 末端に His-tag を付加した HPX は、大腸菌を用いて不溶画分に発現させ、可溶化後に Nickel アフィニティ精製により粗精製を行なった。その後、透析法によりリフォールディングを行ない、陽イオン交換精製により最終精製を行なった。SDS-PAGE による解析により、十分な精製度を達成していることが確認された (Fig. 3-1 A)。収量は 1 L 培養あたり 13.4 mg であった。

HABD の調製

ヒト CD44 HABD は、残基番号 20 から 178 の領域を用いることとし、当研究室にて確立された方法によって発現・精製を行なった (Takeda et al., 2003)。SDS-PAGE による解析により、十分な精製度を達成していることが確認された (Fig. 3-1 B)。収量は 1 L 培養あたり 6.6 mg であった。

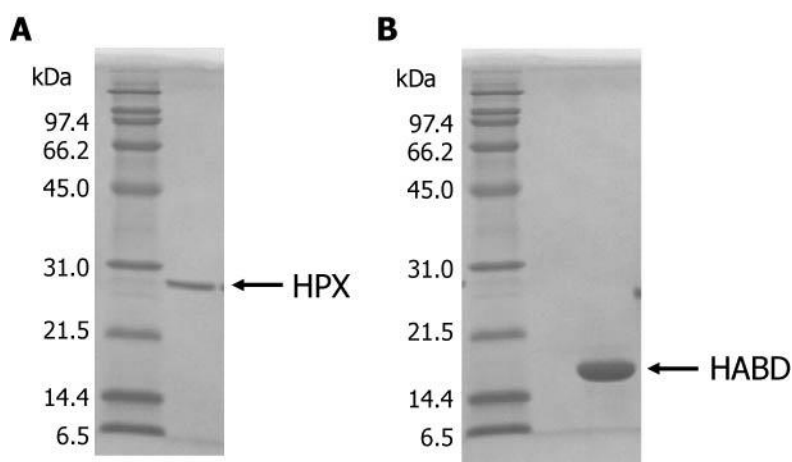


Fig. 3-1 HPX および HABD の調製
精製後の (A) HPX、および (B) HABD の SDS-PAGE 解析。
15% SDS-PAGE, CBB stain

3-1-2 ITC 実験

MT1-MMP HPX が CD44 HABD と相互作用するか否か調べるため、等温滴定カロリメトリー (ITC) 法による相互作用解析を行なった。野生型 HABD を 150 μM の濃度にて調製しセル側へ、HPX を 2.25 mM の濃度にて調製しシリンジ側へ導入し、HABD に対し HPX を滴定した。このとき観測された熱量変化を one-site モデルにより解析した。その結果、両者の解離定数は 13 μM と算出された (Fig. 3-2 A)。このことから、HPX は HABD を認識することが判明した。

次に、HPX による HABD の認識において、HABD の構造依存性が存在するか調べるため、HA 高親和性の PD-state に構造を固定した変異体を用いて同様の解析を行なった。その結果、PD-state 変異体と HPX の解離定数は 153 μM と算出され、野生型 HABD と比べ 10 倍以上増大した (Fig. 3-2 B)。HA 非存在下にて、野生型 HABD は O-state に平衡が偏っていることを考慮すると、HPX は PD-state よりも O-state にある HABD を強く認識することが判明した。

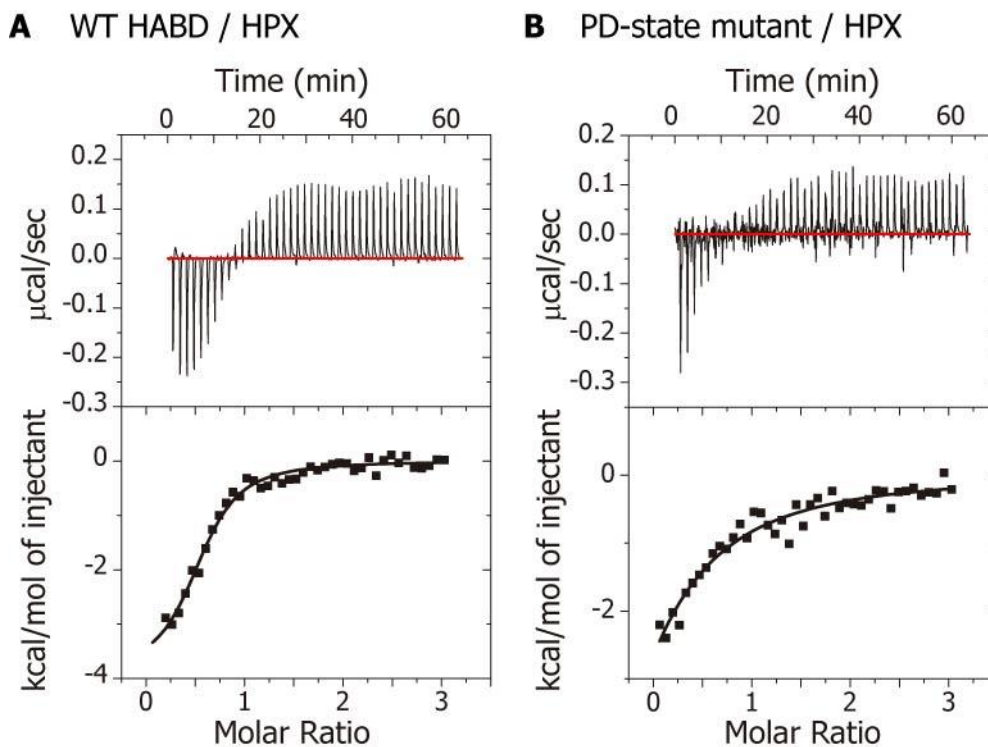


Fig. 3-2 ITC 法による HPX と HABD の相互作用解析

(A) 野生型 HABD (a.a. 20-178)、および (B) PD-state 変異体に対し HPX を滴定したときの、ITC データ (上) および等温滴定曲線 (下)。

3-1-3 HABD を NMR 観測対象とした HPX 滴定実験

HABD による HPX 認識様式について、NMR 法を用いて解析した。均一 ^2H , ^{15}N 標識を施した野生型 HABD に対し、非標識の HPX を最大 2 等量滴定し、野生型 HABD の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの変化を解析した。その結果、HPX の滴定に従って、一部のシグナルにおいてシグナルの広幅化が観測された (Fig. 3-3 A)。HPX を HABD に対し 0.6 等量滴定した時点での、残基毎のシグナル強度減少率および化学シフト変化量を解析した。その結果、T27, C28, K38, G40, R41, S43, I44, R78, Y79, G80, H85, H92, I96, C97, A99, N101, R150, Y169, S171, N172, T174, D176, D177, V178 において 0.01 ppm 以上の化学シフト変化が (Fig. 3-3 B)、K38, R41, R78, Y79, G80, I96, C97, A98, A99, N100, N101, Y169, S171, N172, T174, D175, D176, D177, V178 において 50%以上のシグナル強度減少が観測された (Fig. 3-3 C)。顕著な化学シフト変化を示した残基と、顕著なシグナル強度減少を示した残基は概ね一致したことから、HPX 結合状態と遊離状態の間を、化学シフト差と同程度の速度にて交換していることが示唆された。

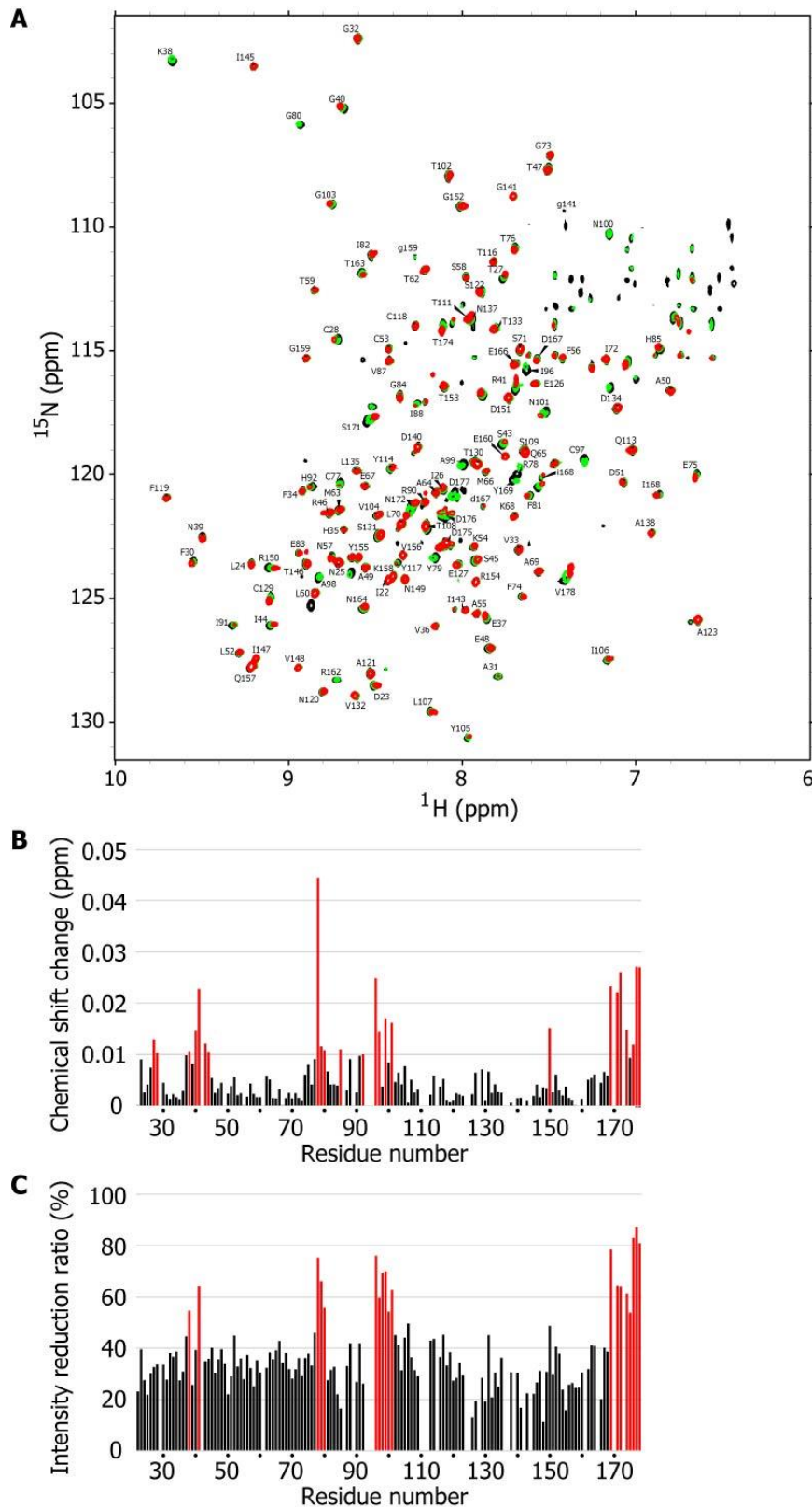
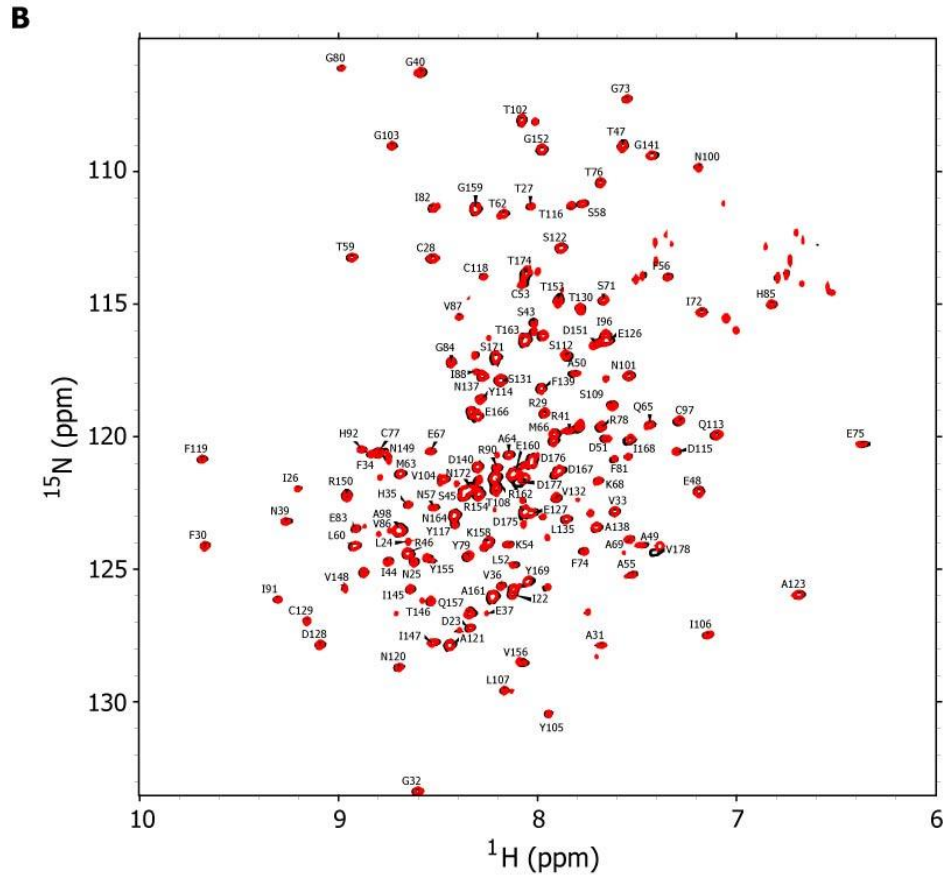
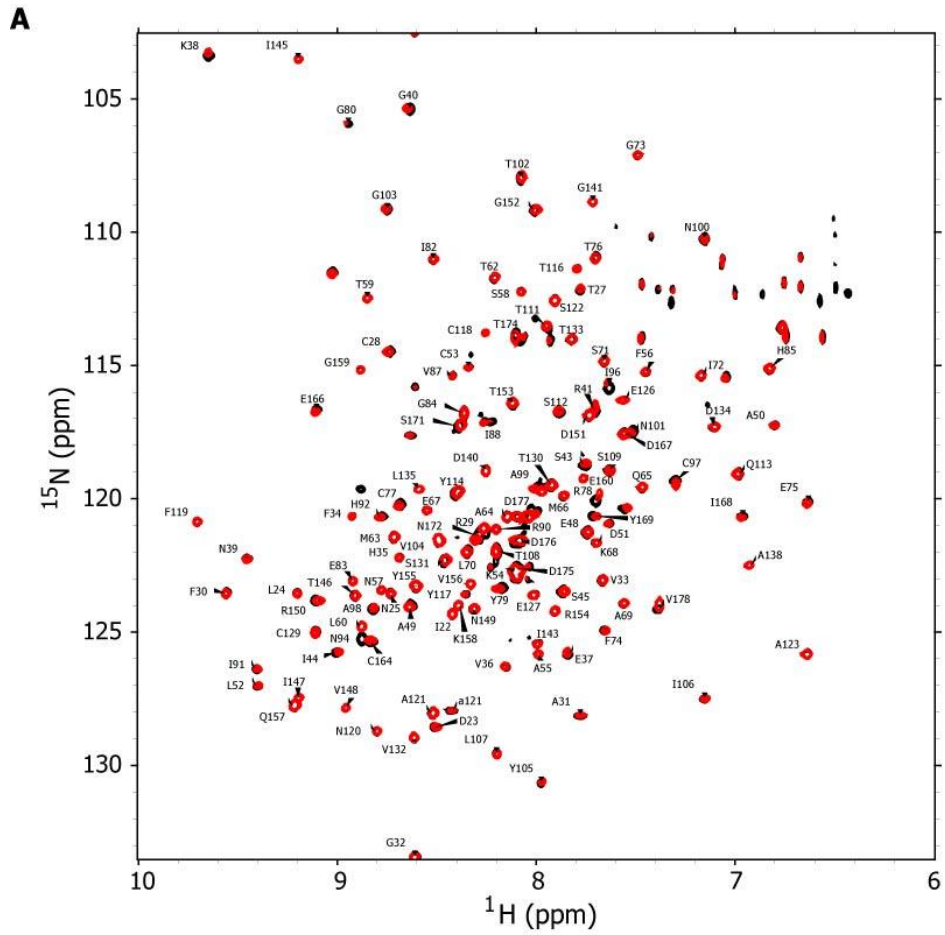


Fig. 3-3 野生型 HABD に対する HPX 滴定実験

(A) 野生型 HABD 単独 (黒)、非標識 HPX を 0.6 等量滴定時 (緑)、および 2 等量滴定時 (赤) における ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC スペクトルの重ね合わせ。

(B-C) HPX を 0.6 等量滴定した時点での (B) 残基毎の化学シフト変化量、および (C) シグナル強度減少率のプロット。(B) では、0.01 ppm 以上の化学シフト変化が観測された残基を赤にて、(C) では 50%以上のシグナル強度減少が観測された残基を赤にて、それぞれ色づけた。

同様の実験を O-state 変異体および PD-state 変異体でも行なった。まず、O-state 変異体に対して HPX を 0.6 等量滴定したところ、一部の残基において顕著な化学シフト変化と顕著なシグナル強度減少が観測された (Fig. 3-4 A, C, D)。野生型の結果と比較すると、顕著な化学シフト変化およびシグナル強度減少を示した領域は共通していた。これより、O-state 変異体は野生型と同様の様式にて HPX と相互作用を形成することが判明した。一方、PD-state 変異体に対し HPX を滴定したところ、構造を形成しない C 末端領域を除いて、残基特異的な顕著な化学シフトやシグナル強度減少は観測されなかった (Fig. 3-4 B, E, F)。以上の結果は、HPX が O-state にある HABD を強く認識することを示しており、ITC 実験結果とよく一致する。



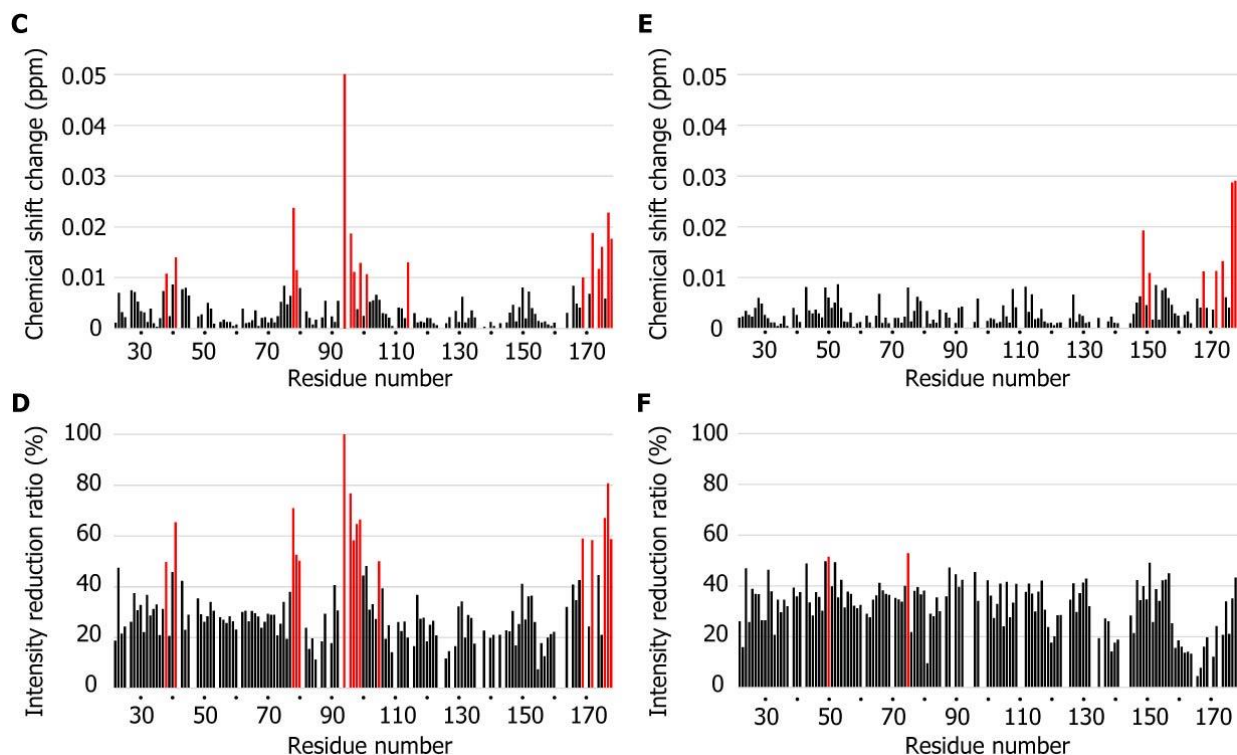


Fig. 3-4 O-state 変異体、および PD-state 変異体に対する HPX 滴定実験

(A) O-state 変異体単独（黒）と非標識 HPX を 0.9 等量滴定時（赤）における ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC スペクトルの重ね合わせ。

(B) PD-state 変異体単独（黒）と非標識 HPX を 0.9 等量滴定時（赤）における ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC スペクトルの重ね合わせ。

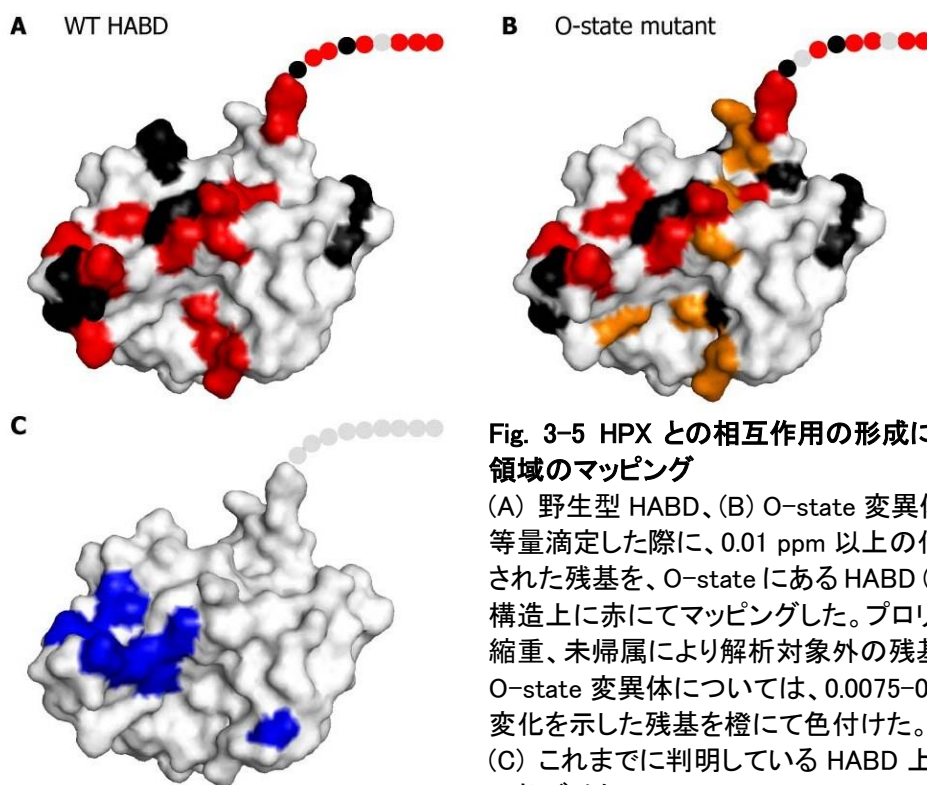
(C-D) O-state 変異体に対して HPX を 0.6 等量滴定した時点での、(C) 残基毎の化学シフト変化量、および (D) シグナル強度減少率のプロット。

(E-F) PD-state 変異体に対して HPX を 0.6 等量滴定した時点での、(E) 残基毎の化学シフト変化量、および (F) シグナル強度減少率のプロット。

化学シフト変化量のプロットでは、0.01 ppm 以上の摂動が生じた残基を赤にて、シグナル強度減少率のプロットでは、50%以上の強度減少が観測された残基を赤にて、それぞれ色づけた。

野生型、O-state 変異体にて、0.01 ppm 以上の化学シフト変化が観測された残基を赤にて HABD の結晶構造上にマッピングした。また、O-state 変異体については、0.0075-0.01 ppm の化学シフト変化が観測された残基を橙にて、同様に色づけした。その結果、両者いずれも、分子表面の概ね共通する領域に分布を示した (Fig. 3-5 A and B)。これより、この領域が HPX との相互作用の形成に重要な役割を果たすことが示唆された。尚、O-state 変異体における化学シフト変化量が、野生型と比べやや減弱した原因として、O-state 変異体では分子内に S-S 結合を導入したことに由来する摂動により、HPX との親和性がやや低下したことが考えられる。しかしながら、両者とも同様の領域に顕著な化学シフト変化を示していることから、同様のモードにて相互作用するものと考えた。色づけされた領域は、主に疎水性残基および塩基性残基によって構成されており、疎水性相互作用や静電相互作用によって HPX との相互作用が形成されることが示唆された。

さらに、これまでに判明している HA 結合界面と比較したところ、重複する領域が存在した (Fig. 3-5 C) (Takeda et al., 2003)。これより、HABD は HPX および HA を共通の領域にて認識することが示唆された。PD-state 変異体において HPX 親和性が低下した原因として、O-state と PD-state で HA 結合部位に生じる構造変化が考えられる。



HPX と HABD の相互作用に対する HA の影響を調べるため、野生型 HABD に対する HPX 滴定実験を、HA 存在下にて行なった。HPX を 0.6 等量滴定した時点での、残基毎の化学シフト変化量およびシグナル強度減少率を調べた。その結果、HA 結合界面を中心に、HPX の滴定に伴う化学シフト変化やシグナル強度減少が顕著に抑制された (Fig. 3-6 A and B)。これより、HA 存在下では HPX と HABD の相互作用が抑制されることが判明した。HA 存在下にて両者の相互作用が減弱した原因として、HABD の構造平衡が HPX 低親和性の PD-state へ偏ることに加え、HABD 上の HPX 結合面と HA 結合面が重複するため、HPX の結合が競合的に阻害されたためであると考えられる。

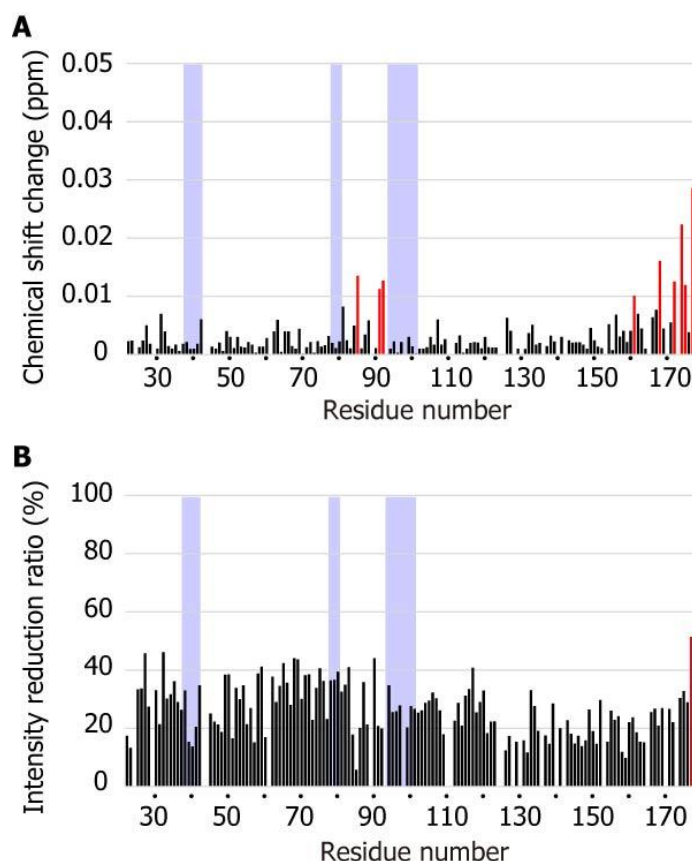


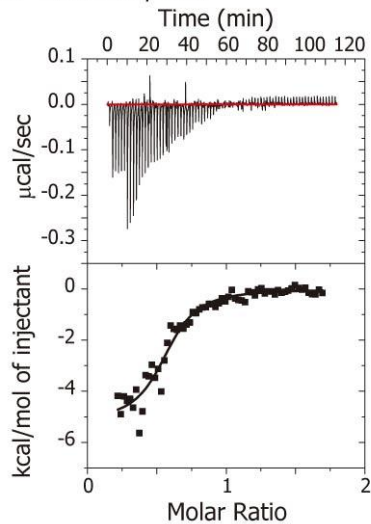
Fig. 3-6 HA 存在下における野生型 HABD に対する HPX 滴定実験

HPX を 0.6 等量滴定した時点での (A) 残基毎の化学シフト変化量、および (B) シグナル強度減少率のプロット。(A) では、0.01 ppm 以上の化学シフト変化が観測された残基を赤にて、(B) では 50% 以上のシグナル強度減少が観測された残基を赤にて、それぞれ色づけた。また、HA 結合に関与する領域について、バックグラウンドを青で色づけた。

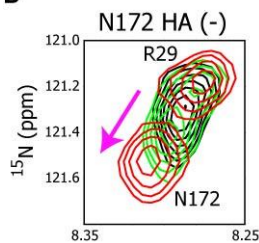
HPX 滴定実験において、化学シフト変化が観測された H ABD 上の領域は、HA 結合面と共通する部位に加えて、構造を形成しない C 末端領域にも及んでいた (Fig. 3-5 A and B)。この化学シフト変化は C 末端の V178 まで及んでいたことから、C 末端領域を延長することで HPX との相互作用が強くなる可能性が考えられた。そこで、C 末端を H202 まで延長した H ABD202 を作製し、HPX との相互作用について ITC 実験を行なった。H ABD202 を 100 μ M の濃度にて調製しセル側へ、HPX を 1.1 mM の濃度にて調製しシリンジ側へ導入し、H ABD に対し HPX を滴定した。その結果、両者の解離定数は 2.5 μ M と算出され、C 末端を V178 とするコンストラクトと比べやや低下した (Fig. 3-7 A)。これより、H ABD の C 末端領域も HPX との相互作用の形成に関与することが示唆された。

C 末端領域における化学シフト変化は、HPX との相互作用が減弱する PD-state 変異体や、HA 存在下における野生型 H ABD でも観測された (Fig. 3-4 E, Fig. 3-6 A)。PD-state 変異体や HA 存在下における野生型の、HPX の滴定に伴う化学シフト変化の方向は、N172、T174、D177 のシグナルにおいて類似しており、両者は同様の様式にて HPX と相互作用を形成することが示唆された (Fig. 3-7 C and E)。これに対し、HA 非存在下における野生型 H ABD の N172、T174、D177 のシグナルは、HPX の滴定に伴って、PD-state 変異体や HA 存在下における野生型におけるスペクトル変化とは異なる方向に化学シフト変化を生じていた (Fig. 3-7 B)。一方、HA 非存在下における野生型の化学シフト変化は、O-state 変異体の化学シフト変化と類似していた (Fig. 3-7 D)。以上のことから、H ABD の C 末端領域は、O-state、PD-state のいずれの状態においても HPX と相互作用を形成するものの、H ABD が O-state にある場合と PD-state にある場合で、HPX との相互作用様式が異なることが示唆された。

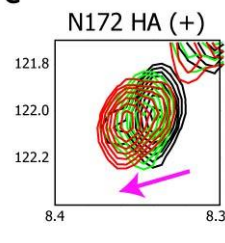
A H ABD202 / HPX



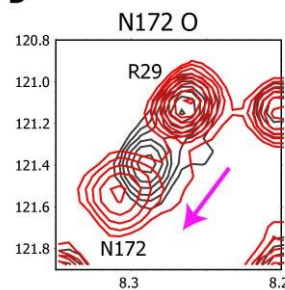
B



C



D



E

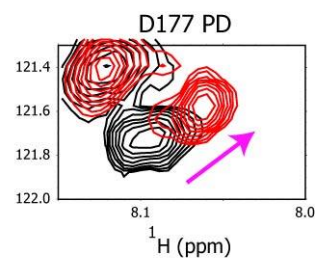
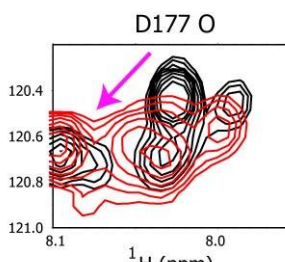
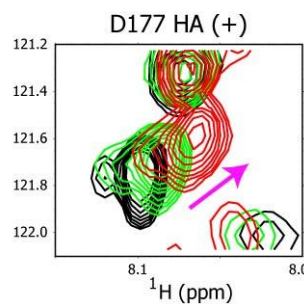
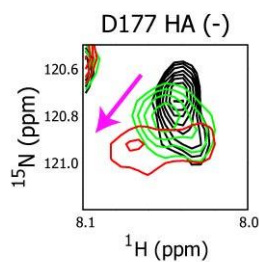
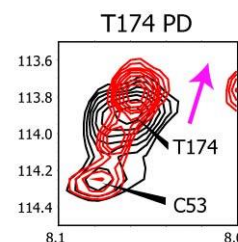
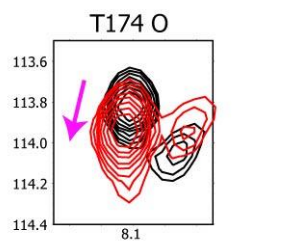
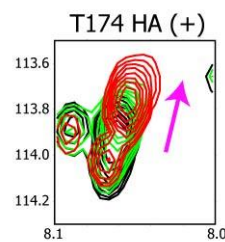
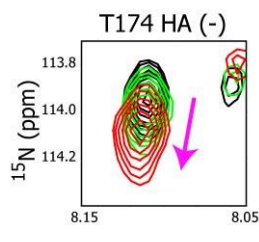
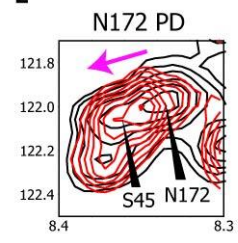


Fig. 3-7 HPX との相互作用における H ABD の C 末端領域の役割

(A) H ABD202 (a.a. 20-202) に対し HPX を滴定したときの、ITC データ (上) および等温滴定曲線 (下)。

(B-E) H ABD の C 末端領域の残基 (N172、T174、D177) における、HPX の滴定に伴うスペクトル変化の拡大図。(B)は HA 非存在下における野生型のスペクトル、(C)は HA 存在下における野生型のスペクトル、(D)は O-state 変異体のスペクトル、(E)は PD-state 変異体のスペクトルを示す。(B)、(C)では、単独状態でのスペクトルを黒、HPX を 0.3 等量滴定した際のスペクトルを緑、1 等量滴定した際のスペクトルを赤にて重ねて示した。また、(D)、(E)では、単独状態でのスペクトルを黒、HPX を 0.9 等量滴定した際のスペクトルを赤にて重ねて示した。

3-1-4 HPX を NMR 観測対象とした HADB 滴定実験

HPX のシグナルの帰属

HPX による HADB 認識様式について、NMR 法を用いて解析を行なうにあたり、最初に三重共鳴実験によって HPX の主鎖アミド基のシグナルの帰属を行なった。まず、均一 ^{15}N 標識体を用いて N 末端に付加した His-tag を切除した HPX と、切除しない HPX の ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行なったところ、大半のシグナルの化学シフトが殆ど変化しなかった。これより、N 末端に付加した His-tag は、HPX の構造に摂動を与えないと判断し、三重共鳴実験は His-tag を切除せずに行なった。均一 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識した HPX は 1.0 mM の濃度にて調製し、TROSY タイプのパルスプログラムを用いて HNCACB, HNCOCACB, HNCOC, HNCACO, HNCA, HNCOCA の測定を行なった。

また、主鎖連鎖帰属において起点をつくること、および帰属の確認を行なうため、 $[1\text{-}^{13}\text{C K}, ^{15}\text{N F}]$ 標識体、 $[1\text{-}^{13}\text{C F}, ^{15}\text{N Y}]$ 標識体、 $[1\text{-}^{13}\text{C H}, ^{15}\text{N W}]$ 標識体、 $[1\text{-}^{13}\text{C L}, ^{15}\text{N K}]$ 標識体、および、 $[1\text{-}^{13}\text{C W}, ^{15}\text{N R}]$ 標識体の 5 種の標識体を調製し、 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 測定および H(NCO)測定を行なった。

以上の実験データに基づき、主鎖連鎖帰属を行ない、アミドプロトンが存在しないプロリン残基を除く観測可能な 185 残基に対し、170 残基 (91.9%) についてシグナルのアサインを行なった (Fig. 3-8 A)。帰属を行なった残基の $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ の化学シフト値を用いて、ランダムコイル中の $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ の基準値と比較して Chemical Shift Index (CSI) を算出した (Wishart and Sykes, 1994)。一般に、正の CSI は α -helix 構造の形成を、負の CSI は β -sheet 構造の形成を示唆する。算出した値に基づき、これまでに報告されている MT1-MMP HPX の結晶構造との比較を行なった (Fig. 3-8 B) (Tochowicz et al., 2011)。その結果、結晶構造において β -sheet 構造の形成に関与していた残基の殆どは負の CSI を有し、 α -helix 構造の形成に関与していた残基の多くは正の CSI を有していた。このことから、帰属の妥当性が支持された。さらに、本帰属結果は他のグループより最近報告された帰属結果ともほぼ一致した (BMRB entry: 25048) (Zhao et al., 2015)。

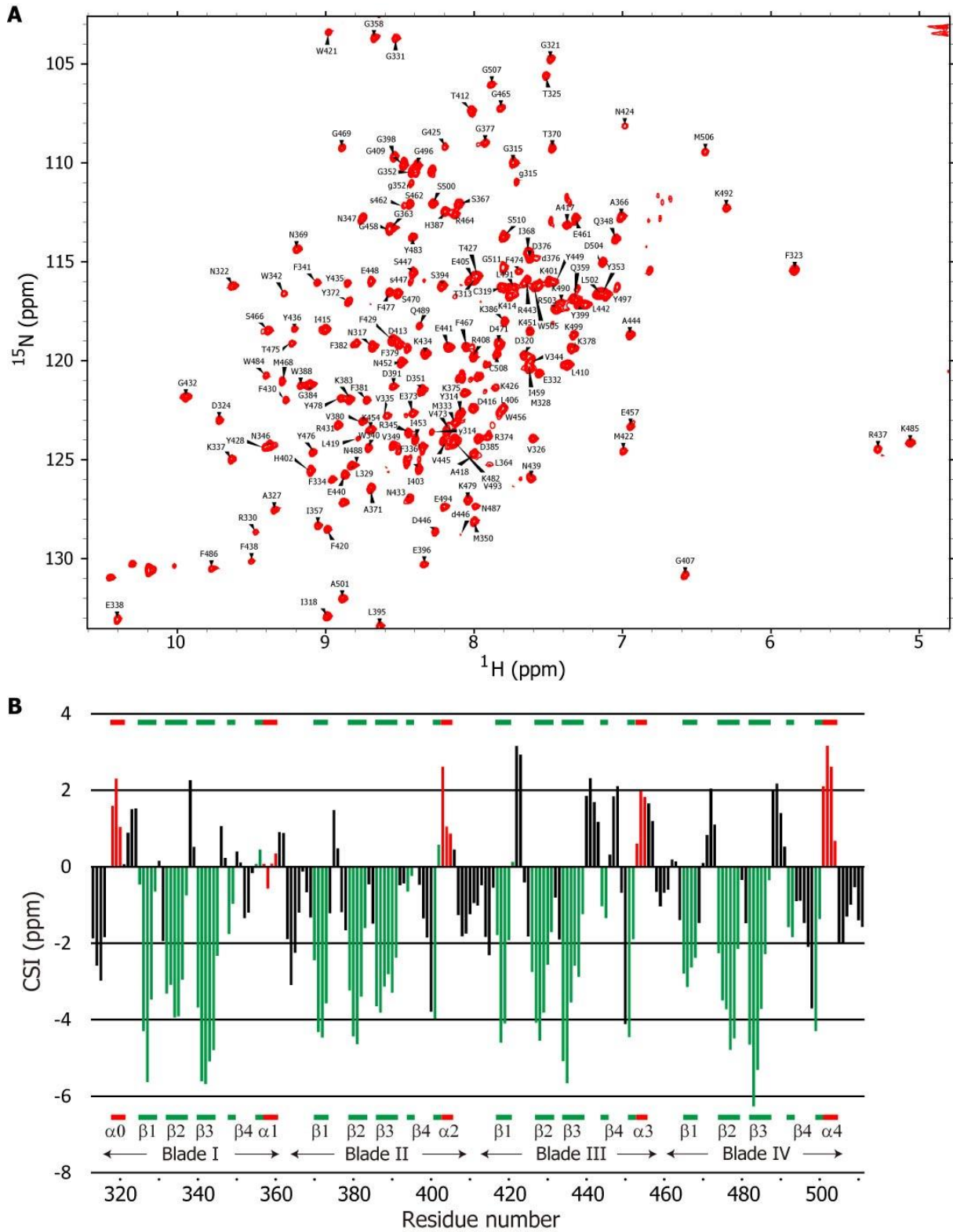


Fig. 3-8 HPX の帰属結果

(A) ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC スペクトルにおける HPX のアサインの結果。

(B) HPX の残基毎の chemical shift index (CSI) のプロット。結晶構造中にて α -helix を形成する領域を赤、 β -sheet を形成する領域を緑にてそれぞれ色づけた。

HABD 滴定実験

均一 ^2H , ^{15}N 標識を施した HPX に対し、非標識の O-state 変異体を最大 2 等量滴定した。その結果、HABD の滴定に従って、一部のシグナルにおいて顕著なシグナルの広幅化や化学シフト変化が観測された (Fig. 3-9 A)。HABD を HPX に対し 0.6 等量滴定した時点での、残基毎の化学シフト変化量およびシグナル強度減少率を解析した。その結果、R330, R374, M422, F429, F438, L442, W456, G469, D471, F474, L502 において、広幅化によりシグナルが検出限界以下となった。また、L119, F420, G425, K426, R437, N439, D446, Y449, M468, T475, Q489 において 0.04 ppm 以上の化学シフト変化が (Fig. 3-9 B)、R345, V349, K375, N424, G425, D446, M468, S470, T475, G507 において 75%以上のシグナル強度減少が観測された (Fig. 3-9 C)。広幅化によりシグナルが観測されなくなった残基と、0.04 ppm 以上の化学シフト変化が生じた残基を、HPX の結晶構造上にマッピングしたところ、Blade III および Blade IV を中心とした分子片側の領域に集中した分布を示した (Fig. 3-9 D)。これより、この領域が HABD との相互作用の形成に重要な役割を果たすことが示唆された。この領域は、主に疎水性残基および酸性残基によって構成されていた。一方、前節に記した通り、HABD 側の相互作用界面は疎水性残基および塩基性残基によって構成されており、両者は疎水性相互作用および静電相互作用によって相互作用を形成するものと考えられた。

興味深いことに、最近報告された I 型コラーゲン認識様式と比較すると、I 型コラーゲンとの相互作用では Blade I を中心とした領域が重要とされており、CD44 認識様式と異なることが判明した (Fig. 3-9 E) (Zhao et al., 2015)。HPX は多数の基質を認識する機能を有することが知られており、基質ごとに異なる領域を用いて相互作用を形成することで、基質認識の多様性を獲得していることが示唆される。

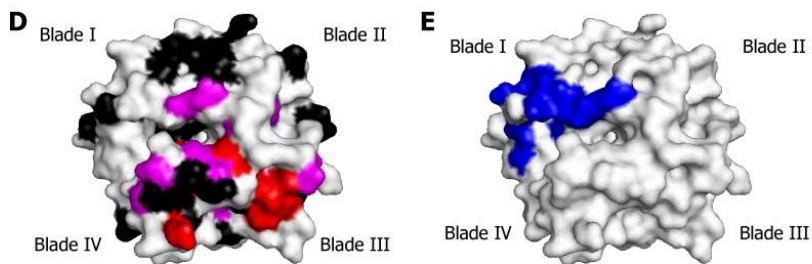
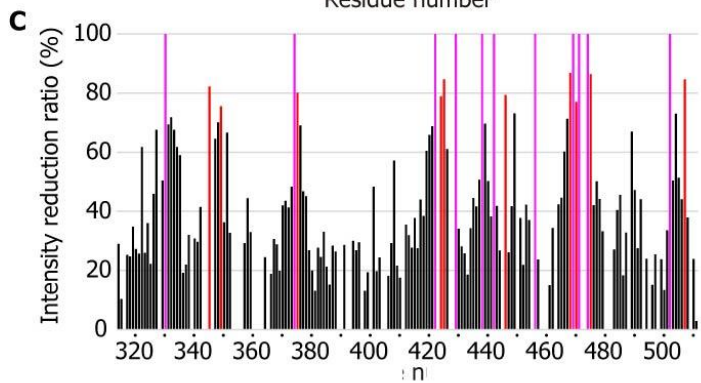
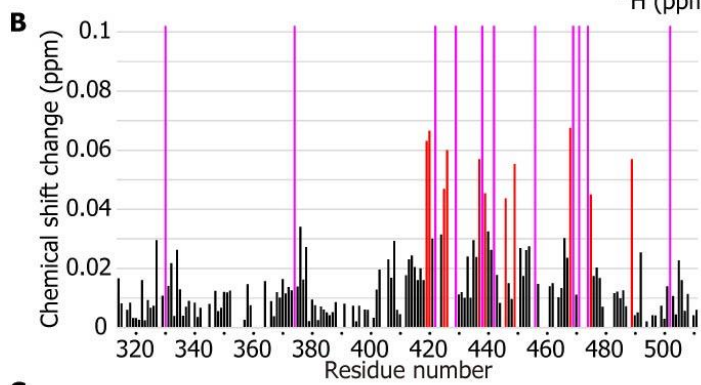
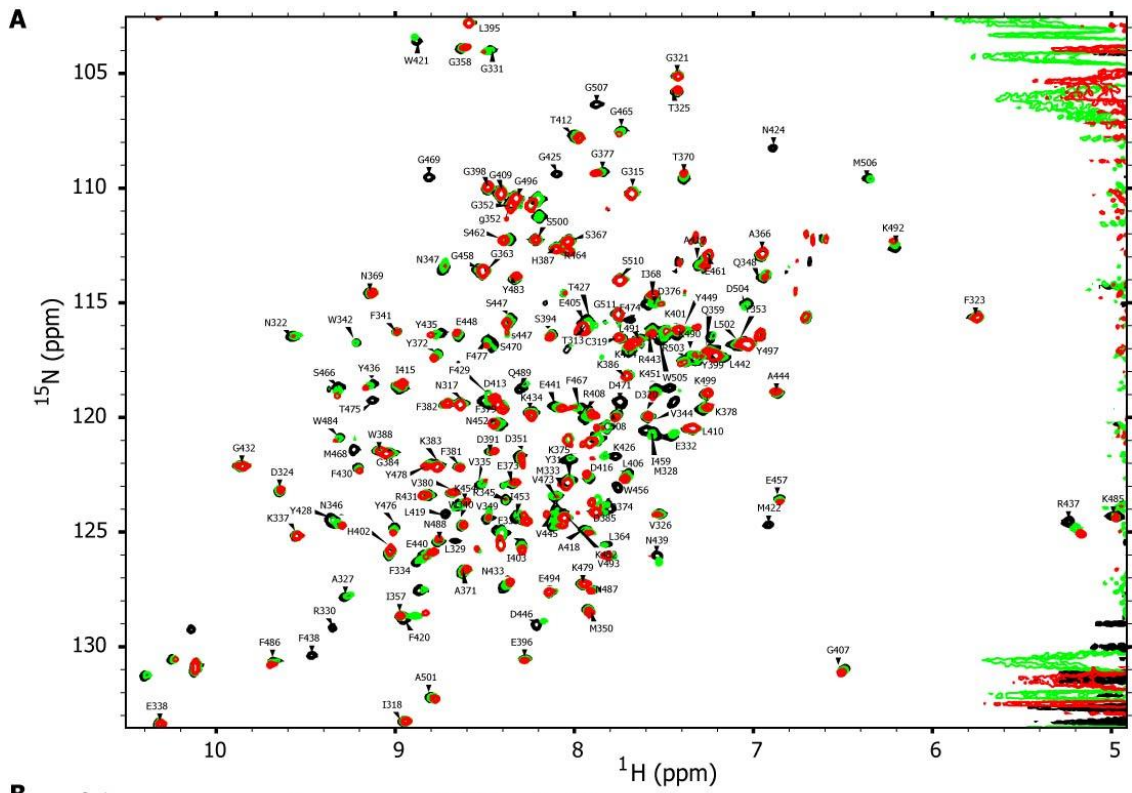


Fig. 3-9 HPX に対する H ABD O-state 変異体滴定実験

(A) HPX 単独 (黒)、非標識 O-state 変異体を 0.6 等量滴定時 (緑)、および 2 等量滴定時 (赤) における ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC スペクトルの重ね合わせ。

(B-C) O-state 変異体を 0.6 等量滴定した時点での (B) 残基毎の化学シフト変化量、および (C) シグナル強度減少率のプロット。(B) では、0.04 ppm 以上の化学シフト変化が観測された残基を赤にて、(C) では 75%以上のシグナル強度減少が観測された残基を赤にて、それぞれ色づけた。また、広幅化によってシグナルが観測されなくなった残基はマゼンタで色づけた。

(D) O-state 変異体を 0.6 等量滴定した際に、広幅化によってシグナルが観測されなくなった残基をマゼンタ、0.04 ppm 以上の化学シフト変化が観測された残基を赤にて、HPX の構造上 (PDB code: 3G7X) にマッピングした。プロリン残基やシグナルの縮重、未帰属により解析対象外の残基は黒にて色付けた。

(E) I 型コラーゲン模倣ペプチドを滴定することで NMR シグナルに摂動が生じる領域を、HPX の構造上に青でマッピングした (Zhao et al., 2015)。

3-1-5 小括

ITC 法および NMR 法を用いて、MT1-MMP HPX と CD44 H ABD の相互作用解析を行なった。その結果、HPX は HA 低親和性の O-state にある H ABD と強く相互作用する一方、HA 高親和性の PD-state にある H ABD に対しては相互作用が減弱することが判明した。また、化学シフト摂動法により、H ABD 上の HPX 結合面は HA 結合面と重複していることが示唆された。これより、HA 存在下では、H ABD の平衡が PD-state へ偏ることに加えて、HA と結合が競合することによって、HPX との相互作用が減弱するものと考えられた。

3-2 CD44 の切断において HPX との相互作用が果たす役割の解明

前節において、O-state にある HABD は HA に対し低親和性かつ HPX に対し高親和性であり、PD-state にある HABD は HA に対し高親和性かつ HPX に対し低親和性であることが判明した。本節では、このような HABD の構造依存的な HPX との相互作用が、MT1-MMP による CD44 の切断に与える影響について調べた。

3-2-1 MT1-MMP 発現細胞の性状解析

解析には、内在性 CD44 と MT1-MMP の発現がいずれも少ないことが知られるヒト胎児腎細胞 HEK 293T 細胞を用いることとした。最初に、HEK 293T 細胞上に一過性発現させた MT1-MMP の性状について解析した。MT1-MMP は、N 末端にプロペプチドを有する酵素前駆体として発現することが知られており、プロペプチドを有する状態は不活性型である。そこで、プロペプチド (a.a. 26-111) を除いた発現コンストラクトと、プロペプチドを有する発現コンストラクトの両方を用いて、両者の細胞上での発現について共焦点顕微鏡観察による解析を行なった (Fig. 3-10 A)。まず、プロペプチドを除いた MT1-MMP を発現させた細胞の観察を行なった。最初に、CD44 を染色したところ、細胞周囲に染色像が観察され、細胞膜上に発現していることが確認された。次に、MT1-MMP を染色したところ、細胞内部に染色像が観察され、細胞周囲には染色が観察されなかった (Fig. 3-10 B)。これより、プロペプチドを除いた MT1-MMP は細胞膜上に発現せず、細胞質に分布することが示唆された。続いて、プロペプチドを有する MT1-MMP を発現させた細胞の観察を行なった。その結果、CD44、MT1-MMP いずれも、細胞周囲に染色像が観察された (Fig. 3-10 C)。これより、プロペプチドを除いた MT1-MMP は細胞膜上へ発現しないのに対し、プロペプチドを有する MT1-MMP は細胞膜上に発現することが判明した。従って、以降の解析ではプロペプチドを有する MT1-MMP 発現コンストラクトを用いることとした。プロペプチドを除いた MT1-MMP が細胞膜上に発現しなかった原因として、MT1-MMP のシグナル配列の一部が不足し

ていた可能性が考えられる。今回用いた、プロペプチドを除いた発現コンストラクトでは、残基番号 25 までをシグナル配列と想定し、残基番号 26 以降を deletion した。しかしながら、シグナル配列は残基番号 30 までであるとの報告例があり (Pavlaki et al., 2002)、プロペプチドを除いた発現コンストラクトでは、膜輸送が正しく制御されなかったため、細胞質内に蓄積した可能性が考えられる。

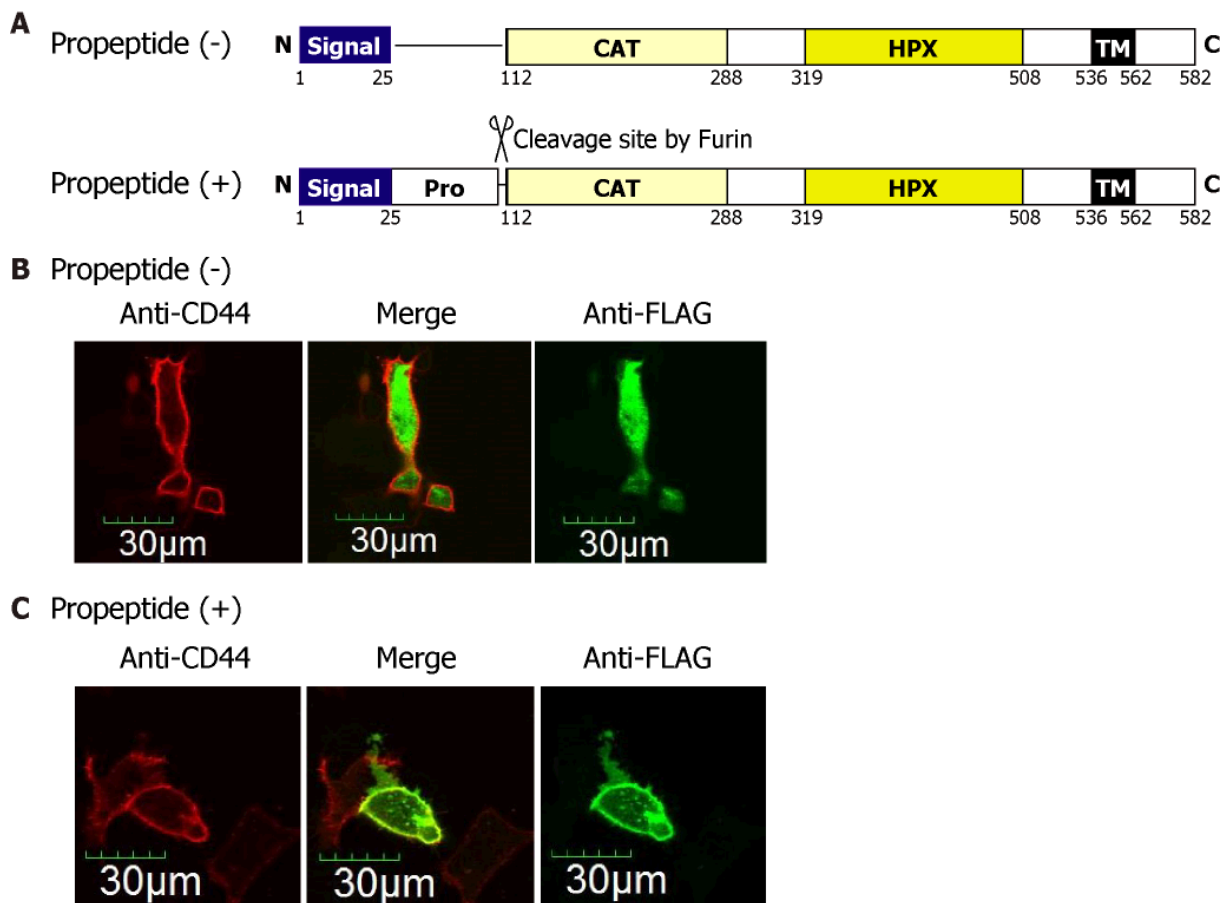


Fig. 3-10 HEK 293T 細胞上での MT1-MMP の発現の解析

(A) トランスフェクションに用いた、プロペプチドを除いた MT1-MMP 発現ベクター (上)、およびプロペプチドを有する MT1-MMP 発現ベクター (下)。

(B-C) (B)プロペプチドを除いた発現ベクター、および (C)プロペプチドを有する発現ベクターをトランスフェクションした細胞の共焦点顕微鏡解析。いずれの条件でも、Triton X-100 による透過処理を行なった。CD44 の染色像を赤にて、MT1-MMP の染色像を緑にて色付けし、両者の重ね合わせを中央に示した。

次に、トランスフェクションにより MT1-MMP と CD44 のいずれかあるいは両方を発現する細胞を調製し、それらの細胞上への発現をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、MT1-MMP、CD44 いずれもトランスフェクションしていない細胞では両者が内在的に発現していないのに対し (Fig. 3-11 A)、MT1-MMP のみをトランスフェクションした細胞では、全細胞のうち 6.5%程度に MT1-MMP の発現が認められた (Fig. 3-11 B)。一方、CD44 のみをトランスフェクションした細胞では、全細胞のうち 60%程度に CD44 の発現が認められた (Fig. 3-11 C)。また、MT1-MMP、CD44 を両方トランスフェクションした条件でも、MT1-MMP 陽性細胞が 2.6%、CD44 陽性細胞が 54%であり、いずれか片方を発現させた場合と比べて発現細胞の割合は同程度であった (Fig. 3-11 D)。以上より、MT1-MMP は細胞膜上に発現するものの、MT1-MMP を発現する細胞の割合は、顕著に低いことが判明した。MT1-MMP は、細胞膜上での半減期が 30 分以内に抑えられ、クラスリン依存的なエンドサイトーシスによって細胞内へ内在化することが知られる (Anilkumar et al., 2005; Jiang et al., 2001)。トランスフェクションにより発現した MT1-MMP は、エンドサイトーシスにより細胞膜上への発現が抑制されているものと考えられた。

続いて、抗 FLAG 抗体および抗 MT1-MMP Hinge 抗体を用いて、MT1-MMP 発現細胞のウェスタンブロット解析を行なった。まず、プロペプチドと CAT の間に付加した FLAG-tag を用いて解析したところ、60 kDa 付近に 2 本のバンドが検出された (Fig. 3-11 E)。分子量の大きいバンドはプロペプチドが切断される前の不活性型、分子量の小さいバンドはプロペプチド切断後の活性型に対応すると判断した。次に、CAT と HPX の間の Hinge 領域を認識する抗体を用いて解析した。その結果、MT1-MMP 全長に対応するバンドに加えて、これより強度の強いバンドとして、36 kDa および 40 kDa の位置にバンドが検出された (Fig. 3-11 F)。MT1-MMP は自己切断によって G284-G285 間および A255-I256 間が切断され、その機能が制御されることが知られている (Toth et al., 2002)。36 kDa のバンドは G284-G285 間の自己切断によって、また、40 kDa のバンドは A255-I256 間の自己切断によって、それぞれ細胞膜側に残った切断産物であると判断した。さらに、MT1-MMP の活性と自己切断の亢進は相関することが知られていることから (Cho et al., 2008)、トランスフェクションによって細胞膜上に発現した MT1-MMP は活性を有すると判断した。

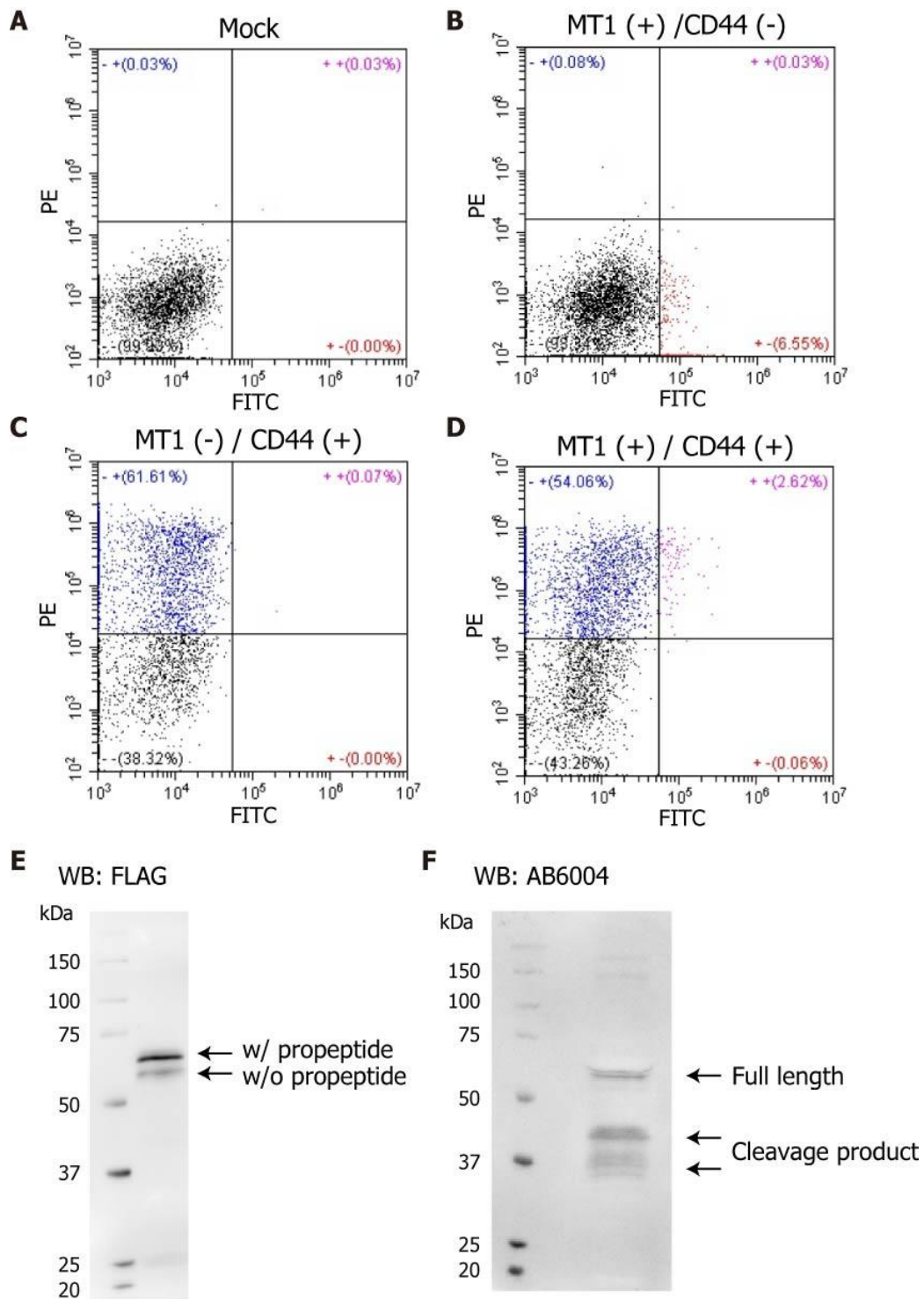


Fig. 3-11 HEK 293T 細胞上での MT1-MMP の発現の解析

(A-D) プロペプチドを有する MT1-MMP をトランスフェクションした HEK 293T 細胞のフローサイトメトリック解析。(A)は、MT1-MMP と CD44 いずれも空ベクターを導入した条件、(B)は MT1-MMP のみを発現させた条件、(C)は CD44 のみを発現させた条件、(D)は MT1-MMP および CD44 の両方を発現させた条件における結果を示す。

(E-F) MT1-MMP を発現させた HEK 293T 細胞のウェスタンブロット解析。(E)では、抗 FLAG 抗体にて、(F)では MT1-MMP Hinge 抗体を用いた結果を示す。

3-2-2 CD44 切断アッセイ系の構築

CD44 の構造依存的な HPX との相互作用が、MT1-MMP による CD44 の切断に与える影響について調べた。内在性 MT1-MMP および CD44 の発現が少ない HEK 293T に対し、N 末端に FLAG-tag を付加した MT1-MMP と CD44 を共発現させた系にてアッセイを行なった。アッセイでは、MT1-MMP および CD44 をトランスフェクションした翌日に、培地から血清を除き、さらに 48 時間のインキュベーションによって培地中に放出された可溶性 CD44 (sCD44) について、ウェスタンブロットにより検出した。まず、野生型 CD44 のみ発現させ、MT1-MMP を発現させない条件にて、培地中に放出された sCD44 を解析したところ、ウェスタンブロットにより 65 kDa 程度の分子量のバンドが検出された (Fig. 3-12 lane 1)。CD44 は、MT1-MMP と近縁のメタロプロテアーゼである ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) に属する ADAM10 および ADAM17 によって、S249-Q250 間が切断させることが知られる (Murai et al., 2004; Nagano et al., 2004; Nakamura et al., 2004)。この切断サイトによって産生される sCD44 の分子量は 65-70 kDa であり、検出されたバンドとよく対応した。これより、CD44 のみ発現させた条件では、内在性の ADAM によって切断されることが判明した。

次に、野生型 CD44 を MT1-MMP と共発現させ、解析した。その結果、65 kDa 程度の分子量のバンドに加え、37 kDa 程度の分子量のバンドが検出された (Fig. 3-12 lane 2)。このバンドは、MT1-MMP による切断によって G192-Y193 間で切断されることで生じる sCD44 の分子量とよく対応した。これより、MT1-MMP を共発現させたことで CD44 の切断が生じたことが判明した。

メタロプロテアーゼ阻害剤である BB94 を添加した条件では、65 kDa 程度の分子量のバンドと 37 kDa 程度の分子量のバンドは、いずれも著しく減弱した (Fig. 3-12 lane 3)。これより、今回検出されたバンドが ADAM および MT1-MMP によって産生された sCD44 であることが確かめられた。

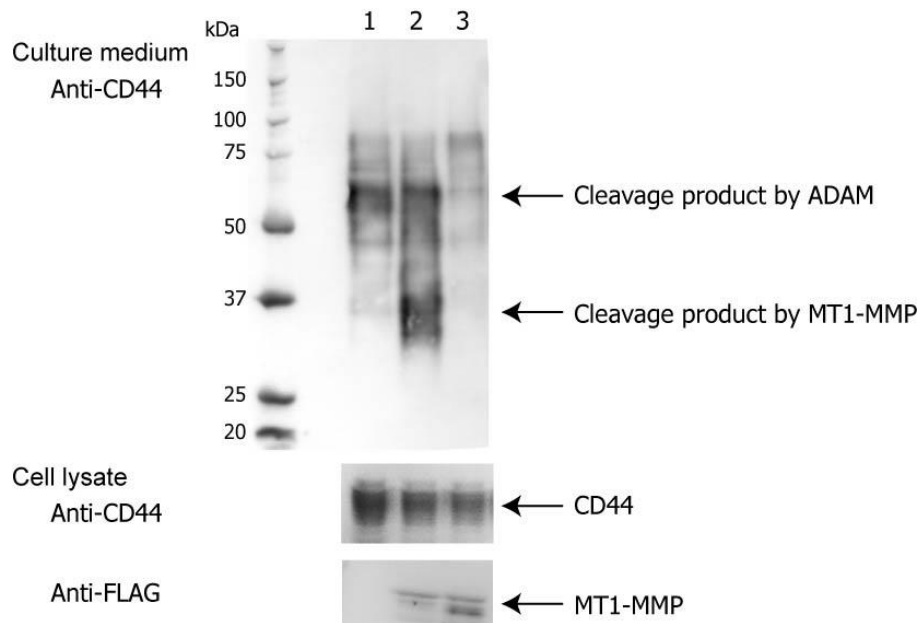


Fig. 3-12 野生型 CD44 発現細胞が放出した sCD44 の解析

野生型 CD44 のみを細胞に発現させた条件 (lane 1)、野生型 CD44 と MT1-MMP を細胞に共発現させた条件 (lane 2)、野生型 CD44 と MT1-MMP を共発現させ、メタロプロテアーゼ阻害剤 BB94 を終濃度 10 μ M にて培地に添加した条件 (lane 3) における、培地中の sCD44 のウェスタンブロット解析。培地中の sCD44 と細胞破碎液中の CD44 は、抗 CD44 抗体にて、細胞破碎液中の MT1-MMP は抗 FLAG 抗体にて検出した。

3-2-3 MT1-MMP による切断における HABD の構造依存性

HPX と HABD の相互作用が、MT1-MMP による CD44 の切断に与える影響を調べた。具体的には、CD44 の構造を O-state あるいは PD-state に固定した変異体を MT1-MMP と共発現させ、sCD44 の産生量を野生型 CD44 と比較した。まず、細胞破碎液の解析より、CD44 と MT1-MMP がそれぞれ適切に発現していることを確認した (Fig. 3-13 A)。続いて、sCD44 の産生量を、まず HPX との相互作用が減弱した PD-state 変異体について解析した。その結果、PD-state 変異体では、MT1-MMP と共発現させることにより切断産物が検出されたものの、野生型と比較し、その産生量は顕著に低下した (Fig. 3-13 A)。これより、HPX との相互作用が減弱した PD-state 変異体では MT1-MMP による切断が低下することが判明した。

同様の解析を、HPX と強く相互作用する O-state 変異体でも行なった。その結果、O-state 変異体でも野生型と比較し、MT1-MMP による切断産物の産生量が顕著に低下した (Fig. 3-13 A)。これより、HPX と高親和性の複合体を形成する O-state 変異体でも MT1-MMP による切断が低下することが判明した。

以上の結果より、CD44 が O-state あるいは PD-state のみを形成する場合は、MT1-MMP による切断が抑制され、CD44 の切断には、CD44 が O-state と PD-state の 2 状態を形成することが重要であることが明らかとなった。

さらに、HPX と競合する HA が存在する条件にて、MT1-MMP による CD44 の切断が影響を受けるか否か調べた。具体的には、高鎖長 HA が底面にコーティングされたディッシュと、コーティングされていないディッシュ上に HEK 293T 細胞をプレーティングし、MT1-MMP と CD44 を共発現させた際に培地中に放出された sCD44 を解析した。その結果、HA をコーティングした条件では、コーティングしない条件と比較し、MT1-MMP による sCD44 の産生が上昇した (Fig. 3-13 B)。これより、HA 存在下では MT1-MMP による CD44 の切断が亢進することが示唆された。

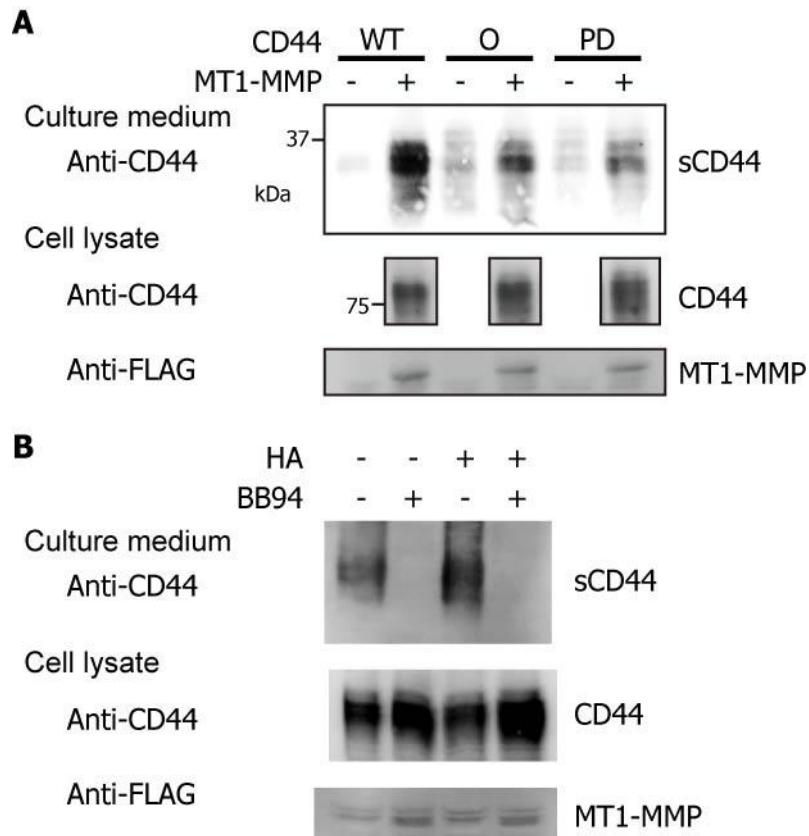


Fig. 3-13 sCD44 産生における HABD の構造依存性の解析

(A) 野生型 CD44、O-state 変異体、PD-state 変異体を MT1-MMP と共発現させた際の、MT1-MMP による sCD44 の産生量の比較。

(B) プレート底部に高鎖長 HA をコーティングした条件と、コーティングしていない条件における、sCD44 の産生量の比較。

3-3 考察

3-3-1 MT1-MMP による CD44 の切断制御機構

本研究の結果に基づき、MT1-MMP による CD44 の切断メカニズムについて考察した。

まず、HPX と高親和性の複合体を形成する O-state 変異体では切断が抑制された。これより、O-state にある CD44 と MT1-MMP の複合体は、切断に不利な配向であると考えられる (Fig. 3-14 A)。一方、PD-state 変異体では、切断可能な配向をとることができるものの、HPX との親和性が弱いため、細胞膜上で MT1-MMP と十分に近接が生じず、効率的な切断が抑制されたと考えられる (Fig. 3-14 B)。これに対し、2 状態を形成することが可能な野生型 CD44 では、まず O-state にて HPX と複合体を形成し、MT1-MMP と近接した後に、構造平衡によって PD-state へ移行することで、切断に不利な状態が一過的に解消され、切断が生じたと考えられる (Fig. 3-14 C)。また、HA をコーティングした条件では、細胞底部にて HA と近接し、HPX と競合する。ここで、PD-state における HPX 親和性は解離定数にして $153 \mu\text{M}$ であるのに対し、HA との解離定数は $3 \mu\text{M}$ であり、HA との親和性の方が 50 倍以上強い。そのため、構造平衡によって PD-state へ移行した CD44 は、HA と結合し、HPX との再結合が阻害される。その結果、HPX との結合に伴う切断に不利な状態が不安定化し、切断が亢進したと考えられる (Fig. 3-14 D)。

3-1-3 節における NMR 滴定実験より、HABD の C 末端領域は、O-state と PD-state にある場合では異なる様式にて HPX と相互作用を形成することが示されている。この結果は、O-state と PD-state で HPX に対する配向が異なることを示唆しており、それぞれが切断に対して不利および有利な配向をとるという上記の仮説と矛盾しない。HABD の C 末端領域には、残基番号 175 から 177 にアスパラギン酸が 3 残基連続する配列が存在し、負電荷に富んだクラスターとして存在する。一方、HPX は Blade I を中心とした分子表面の領域に、アルギニンを多く含む領域が存在する。これより、PD-state においては、HABD の C 末端領域と HPX との間に一過的な静電相互作用が生じ、結果として CD44 の切断サイト近傍が CAT へ受け渡され、切断が促進するというモデルが考えられる。

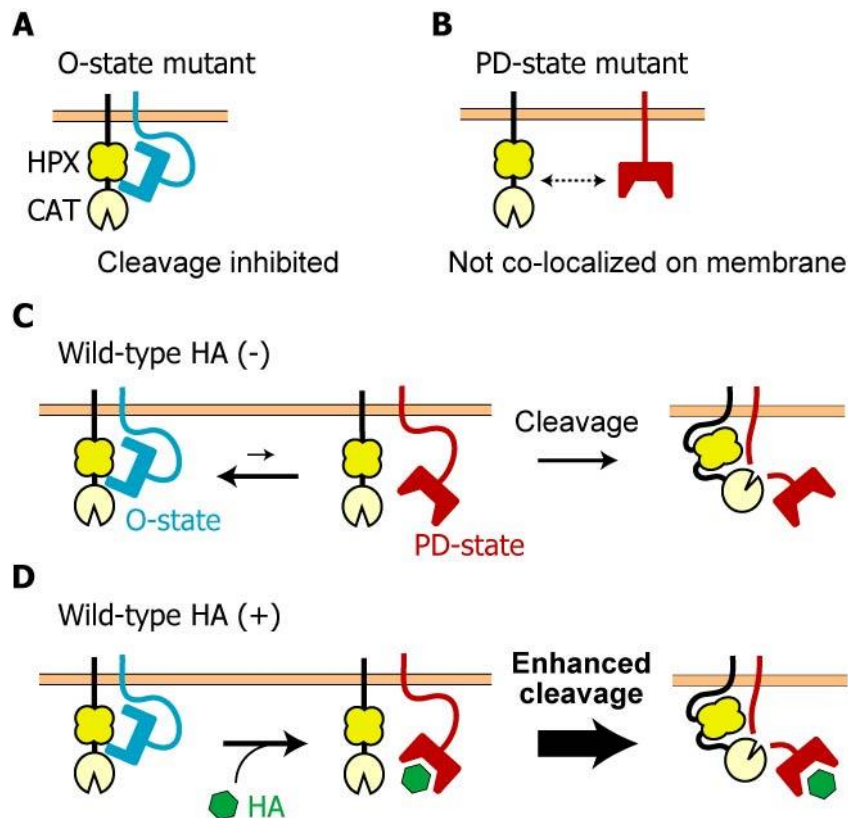


Fig. 3-14 HPX と HABD の相互作用を介した CD44 の切断制御モデル

- (A) O-state 変異体は、HPX と複合体を形成することで切断が抑制される。
- (B) PD-state 変異体は、MT1-MMP による切断が可能な配向をとることができるものの、HPX との親和性が低いため細胞膜上での MT1-MMP との近接が抑制され、効率的な切断が達成されない。
- (C) 野生型 CD44 は、2 状態平衡にあるため、O-state にて HPX と複合体を形成することで MT1-MMP と近接したのち、構造平衡によって PD-state へ移行することで HPX を介した切断抑制的な複合体が解除される。その結果、O-state 変異体や PD-state 変異体と比べて効率的に切断が生じる。
- (D) 底面に HA をコーティングした条件では、O-state にて HPX と複合体を形成したのち、構造平衡によって PD-state へ移行した際に、HPX と結合面が共通する HA が結合し、HPX との再結合が抑制される。その結果、HPX を介した切断抑制的な状態が不安定化し、切断が亢進する。

3-3-2 CD44 を介した浸潤先端への局在化との両立

CD44 を介した MT1-MMP の浸潤先端への局在化と、MT1-MMP による CD44 の切断という 2 つの機能が両立するメカニズムについて考察した。

細胞膜上に発現した MT1-MMP は、HPX を介して CD44 と複合体を形成する (Fig. 3-15 A)。このとき CD44 は、HA 低親和性の O-state と、HA 高親和性の PD-state との間の 2 状態平衡にあり、O-state にある CD44 は切断が抑制された配向にて HPX と強く相互作用を形成する。ここで、ECM は細胞周囲に遍く存在するものの、浸潤先端以外の部位では周囲の ECM との接着が亢進しないため、CD44 の平衡は O-state に偏っている。よってこの条件下では、構造平衡によって一過的に PD-state へ移行して切断可能な配向をとることができるものの、大半は切断が抑制された O-state にて MT1-MMP と複合体を形成しているため、浸潤先端以外の部位での切断効率は低く、複合体を保持したまま、細胞内のアクチン骨格の再構成によって浸潤先端へリクルートされる。

一方、細胞接着が亢進する浸潤先端では、MT1-MMP と CD44 の複合体は、HA を含む ECM に近接する (Fig. 3-15 B)。ここで、CD44 が構造平衡によって PD-state へ移行すると HPX との相互作用が減弱し、代わりに HA が結合する。PD-state にある CD44 の HA 親和性は、HPX 親和性と比べ 10 倍以上高いため、一度 HA と結合した CD44 は、HPX への再結合が抑制される。その結果、MT1-MMP は CD44 と十分近接した状態で、切断が抑制された配向が解除され、MT1-MMP は CD44 を切断することが可能となり、HA との接着を解除する。以上の機構により、MT1-MMP による CD44 の切断は時空間的に制御され、CD44 を介した浸潤先端への局在化との両立を達成していると考察した。

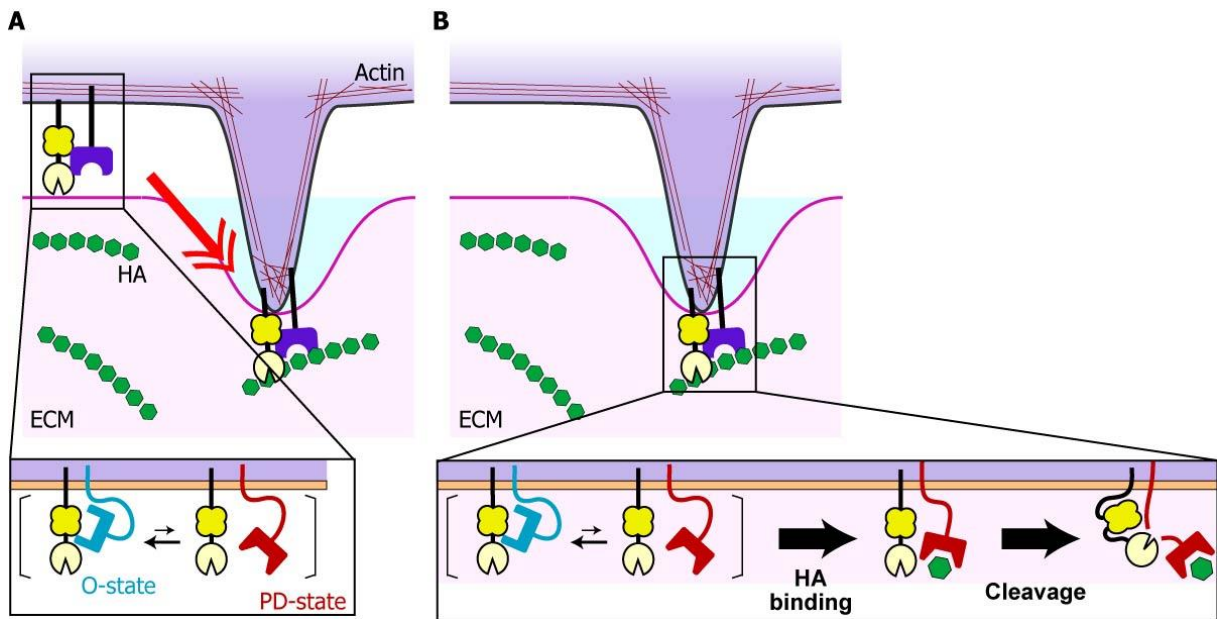


Fig. 3-15 CD44 の 2 状態平衡を介した MT1-MMP の機能制御モデル

(A) 細胞膜上に発現した MT1-MMP は、HPX を介して CD44 と複合体を形成する。HA 非存在下では、CD44 の平衡は HPX 高親和性の O-state に偏っており、複合体を保持したまま、MT1-MMP を浸潤先端へリクルートする。

(B) 浸潤先端では、HA を含む ECM と近接する。CD44 が、構造平衡によって HPX 低親和性の PD-state へ移行すると、HPX と結合面が共通する HA が結合し、HPX との再結合が阻害される。その結果、切断抑制的な状態が解除され、MT1-MMP による CD44 の切断が誘起される。

第 4 章 総括と今後の展望

4-1 本研究より明らかとした知見

本研究では、がん浸潤において MT1-MMP の機能発現が CD44 によってどのように制御されるか解明することを目的として、以下の成果を得た。

まず、ITC 法により CD44 HABD に対する MT1-MMP HPX 滴定実験を行ない、HPX は HABD と相互作用を形成することが判明した。また、HABD の構造平衡を HA 高親和性の PD-state に固定した変異体は、HPX 親和性が 10 倍以上低下することが判明し、HPX は HA 低親和性の O-state にある HABD を主に認識することが明らかとなった。

次に、NMR 法により両者の相互作用様式の解析を行ない、HABD は HA 結合面と共通する領域を介して HPX と相互作用を形成することが示唆された。HA 存在下では、HABD の構造平衡が PD-state へ偏ることに加え、HABD 上の結合面が HA と重複することで、HPX と HABD の相互作用が減弱するものと考えられた。また、O-state および PD-state にある HABD のいずれにおいても C 末端領域が HPX との相互作用に関与するものの、その相互作用様式は異なることが示された。

続いて、HABD の構造依存的な HPX との相互作用が、MT1-MMP による CD44 の切断に与える影響について解析した。その結果、HABD の構造平衡を O-state あるいは PD-state に固定した変異体では切断が抑制され、O-state ならびに PD-state の 2 状態を形成する野生型における切断が最も効率良く達成されることが判明した。特に、HPX と高親和性の複合体を形成する O-state 変異体にて切断が抑制されたことから、HABD と HPX の複合体は、切断が抑制された配向であると考えられた。以上の結果より、CD44 はまず O-state にて HPX と複合体を形成することで、MT1-MMP を浸潤先端ヘリクルートし、その後、HA を含む ECM と近接する浸潤先端にて構造平衡を PD-state へ偏らせることで HPX から解離し、MT1-MMP による切断を受けやすくなるものと解釈した。

4-2 今後の展望

HPX と HABD の複合体モデルの構築

本研究では、化学シフト摂動法により、相互作用に重要な役割を果たす HPX 上の残基群、および HABD 上の残基群を見出した。今回見出された残基群は、構造上の一部の領域に局限して存在していたことから、相互作用への直接的な関与が考えられる。一方、化学シフトは観測核周囲の化学的環境によって定まるパラメーターであるため、直接の相互作用による影響のほか、相互作用に伴う構造変化によっても変化し得る。今回の実験にて観測された残基毎の化学シフト変化が、直接の相互作用による影響による摂動であるか、相互作用に伴う構造変化の影響による摂動であるかについては区別できていない。また、本研究では、HPX と HABD がどのような配向にて複合体を形成するかについて、実験的に明らかにするには至っていない。このような課題は、転移交差飽和 (TCS) 法や常磁性緩和促進 (PRE) 法を用いた、より詳細な相互作用様式の検討によって解決できると考えられる。このうち TCS 法は、ラジオ波照射によって相互作用相手のプロトンを飽和させると、観測対象の分子に対し交差飽和が距離依存的に伝播することを利用して、結合界面を同定する手法である。交差飽和を遊離状態のシグナルの強度減少として観測するため、結合状態のシグナルを観測する必要がなく、相互作用相手の分子量の制限を受けないという特徴を有する。これまでに、TCS 法を用いて HPX を観測対象とする実験、および HABD を観測対象とする実験について、予備的な検討を行なっている。しかしながら、いずれの実験についても残基特異的なシグナル強度減少は明瞭に観測されなかった。予備的な検討では中性の pH 条件下にて測定を行なったが、pH を下げ H/D 交換が抑制された条件にて測定を行なうことで、より明瞭な結果が得られる可能性が考えられる。また PRE 法は、常磁性プローブの近傍に存在する観測核の緩和速度が増大することを利用して、原子間の距離情報を得る手法である。たとえば、HABD を観測対象とした NMR 測定において、常磁性プローブを分子表面に導入した HPX を添加すると、常磁性プローブから約 30 Å 以内に位置する残基の NMR シグナルが PRE 効果によって広幅化するた

め、シグナル強度の減少を指標として HPX 上の残基からの距離情報を得ることができる。これにより、HPX と HABD の配向を決定し、精密な複合体モデルを構築することができると思う。

また、相互作用に関与すると考えられる残基に変異導入を行ない、変異体を用いた相互作用解析等を行なうことにより、モデルの妥当性について検証する必要がある。

MT1-MMP による CD44 切断メカニズム

本研究にて、O-state にある HABD と HPX との複合体は、切断が抑制された配向であり、MT1-MMP による CD44 の切断では、CD44 が構造平衡によって PD-state へ移行することが重要であるという切断制御機構を提唱した。今後の課題として、O-state にある CD44 において切断が抑制される構造メカニズム、および MT1-MMP による CD44 切断の構造メカニズムを明らかにする必要がある。現時点での仮説として、O-state にある CD44 が HPX と形成する複合体では、MT1-MMP CAT の活性中心が、CD44 の切断サイト近傍から隔離された配向にあり、PD-state へ移行することで解除されることが考えられる。この仮説の妥当性について検証するためには、CAT を含む MT1-MMP 細胞外全長を用いた解析について検討を行なう必要があると考えられる。MT1-MMP の CAT と HPX は、約 30 残基から成るフレキシブルな Hinge 領域にて隔てられており、CAT と HPX がどのような配向で存在するかに関する知見は乏しい。今後、MT1-MMP 細胞外全長と CD44 の相互作用解析を行ない、CD44 との相互作用における CAT の関与の有無や、CD44 との相互作用による CAT と HPX の配向の変化の有無等について調べることで、MT1-MMP による CD44 切断制御機構の構造メカニズムに関する知見が得られると考えられる。

ADAM による CD44 切断メカニズム

本研究における研究手法は、今後、ADAM10 や ADAM17 による CD44 の切断メカニズムの解明にも応用可能であると考えられる。ADAM は、細胞外領域にメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、およびシステインリッチドメインを有する。酵素活性はメタロプロテアーゼドメインが有するのに対し、基質の認識はディスインテグリンドメイン、およびシステ

インリッチドメインが担うと考えられている (Janes et al., 2005)。ADAM の細胞外領域は、多数の分子内 S-S 結合によって構造が安定化されているため、MT1-MMP のように大腸菌にて発現することが困難である。従って、ADAM を調製する場合は、昆虫細胞発現系や哺乳細胞発現系を適用する必要がある。当研究室ではこれまでに、昆虫細胞発現系を用いた選択標識法や、NMR シグナルを先鋭化するための重水素標識法が確立されており、昆虫細胞を用いて調製した試料を高感度にて測定することが可能となっている (Kofuku et al., 2012; Kofuku et al., 2014)。また、プロテインスプライシングを利用した区分同位体標識法が確立されており (Minato et al., 2012)、これにより ADAM のようなマルチドメインにて機能する分子について、観測したいドメインのみを標識することが可能となっている。以上の手法を用いることにより、ADAM と CD44 の相互作用様式を明らかとし、ADAM による CD44 の切断メカニズムを解明することが可能であると考えられる。

参考文献

- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3983-3988.
- Anilkumar, N., Uekita, T., Couchman, J.R., Nagase, H., Seiki, M., and Itoh, Y. (2005). Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration. *FASEB J* *19*, 1326-1328.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., and Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* *61*, 1303-1313.
- Banerji, S., Wright, A.J., Noble, M., Mahoney, D.J., Campbell, I.D., Day, A.J., and Jackson, D.G. (2007). Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 234-239.
- Cho, J.A., Osenkowski, P., Zhao, H., Kim, S., Toth, M., Cole, K., Aboukameel, A., Saliganan, A., Schuger, L., Bonfil, R.D., *et al.* (2008). The inactive 44-kDa processed form of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) enhances proteolytic activity via regulation of endocytosis of active MT1-MMP. *J Biol Chem* *283*, 17391-17405.
- Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., *et al.* (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 10158-10163.
- Endo, K., Takino, T., Miyamori, H., Kinsen, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., and Sato, H. (2003). Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem* *278*, 40764-40770.
- Fernandez-Catalan, C., Bode, W., Huber, R., Turk, D., Calvete, J.J., Lichte, A., Tschesche, H., and Maskos, K. (1998). Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *EMBO J* *17*, 5238-5248.
- Janes, P.W., Saha, N., Barton, W.A., Kolev, M.V., Wimmer-Kleikamp, S.H., Nievergall, E., Blobel, C.P., Himanen, J.P., Lackmann, M., and Nikolov, D.B. (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* *123*, 291-304.
- Jiang, A., Lehti, K., Wang, X., Weiss, S.J., Keski-Oja, J., and Pei, D. (2001). Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 13693-13698.

- Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., and Seiki, M. (2001). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 153, 893-904.
- Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Maeda, M., Tsujishita, H., and Shimada, I. (2012). Efficacy of the β_2 -adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nat Commun* 3, 1045.
- Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Mizumura, T., Suzuki, S., and Shimada, I. (2014). Functional dynamics of deuterated β_2 -adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl* 53, 13376-13379.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67, 1030-1037.
- Minato, Y., Ueda, T., Machiyama, A., Shimada, I., and Iwai, H. (2012). Segmental isotopic labeling of a 140 kDa dimeric multi-domain protein CheA from *Escherichia coli* by expressed protein ligation and protein trans-splicing. *J Biomol NMR* 53, 191-207.
- Mori, H., Tomari, T., Koshikawa, N., Kajita, M., Itoh, Y., Sato, H., Tojo, H., Yana, I., and Seiki, M. (2002). CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *EMBO J* 21, 3949-3959.
- Murai, T., Miyazaki, Y., Nishinakamura, H., Sugahara, K.N., Miyauchi, T., Sako, Y., Yanagida, T., and Miyasaka, M. (2004). Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration. *J Biol Chem* 279, 4541-4550.
- Murphy, D.A., and Courtneidge, S.A. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 413-426.
- Nagano, O., Murakami, D., Hartmann, D., De Strooper, B., Saftig, P., Iwatsubo, T., Nakajima, M., Shinohara, M., and Saya, H. (2004). Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca^{2+} influx and PKC activation. *J Cell Biol* 165, 893-902.
- Nakamura, H., Suenaga, N., Taniwaki, K., Matsuki, H., Yonezawa, K., Fujii, M., Okada, Y., and Seiki, M. (2004). Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 64, 876-882.
- Ogino, S., Nishida, N., Umemoto, R., Suzuki, M., Takeda, M., Terasawa, H., Kitayama, J., Matsumoto, M., Hayasaka, H., Miyasaka, M., *et al.* (2010). Two-state conformations in the hyaluronan-binding domain regulate CD44 adhesiveness under flow condition. *Structure* 18, 649-656.

Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., and Okada, Y. (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 272, 2446-2451.

Pavlaki, M., Cao, J., Hymowitz, M., Chen, W.T., Bahou, W., and Zucker, S. (2002). A conserved sequence within the propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is critical for function as an intramolecular chaperone. *J Biol Chem* 277, 2740-2749.

Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., and Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370, 61-65.

Seiki, M. (2003). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett* 194, 1-11.

Suenaga, N., Mori, H., Itoh, Y., and Seiki, M. (2005). CD44 binding through the hemopexin-like domain is critical for its shedding by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Oncogene* 24, 859-868.

Suzuki, T., Suzuki, M., Ogino, S., Umemoto, R., Nishida, N., and Shimada, I. (2015). Mechanical force effect on the two-state equilibrium of the hyaluronan-binding domain of CD44 in cell rolling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 6991-6996.

Takeda, M., Ogino, S., Umemoto, R., Sakakura, M., Kajiwara, M., Sugahara, K.N., Hayasaka, H., Miyasaka, M., Terasawa, H., and Shimada, I. (2006). Ligand-induced structural changes of the CD44 hyaluronan-binding domain revealed by NMR. *J Biol Chem* 281, 40089-40095.

Takeda, M., Terasawa, H., Sakakura, M., Yamaguchi, Y., Kajiwara, M., Kawashima, H., Miyasaka, M., and Shimada, I. (2003). Hyaluronan recognition mode of CD44 revealed by cross-saturation and chemical shift perturbation experiments. *J Biol Chem* 278, 43550-43555.

Teriete, P., Banerji, S., Noble, M., Blundell, C.D., Wright, A.J., Pickford, A.R., Lowe, E., Mahoney, D.J., Tammi, M.I., Kahmann, J.D., *et al.* (2004). Structure of the regulatory hyaluronan binding domain in the inflammatory leukocyte homing receptor CD44. *Mol Cell* 13, 483-496.

Tochowicz, A., Goettig, P., Evans, R., Visse, R., Shitomi, Y., Palmisano, R., Ito, N., Richter, K., Maskos, K., Franke, D., *et al.* (2011). The dimer interface of the membrane type 1 matrix metalloproteinase hemopexin domain: crystal structure and biological functions. *J Biol Chem* 286, 7587-7600.

Toth, M., Hernandez-Barrantes, S., Osenkowski, P., Bernardo, M.M., Gervasi, D.C., Shimura, Y., Meroueh, O., Kotra, L.P., Gálvez, B.G., Arroyo, A.G., *et al.* (2002). Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cells surface inactivation of active enzyme. *J Biol Chem* 277, 26340-26350.

Wishart, D.S., and Sykes, B.D. (1994). The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *J Biomol NMR* 4, 171-180.

Zhao, Y., Marcink, T.C., Sanganna Gari, R.R., Marsh, B.P., King, G.M., Stawikowska, R., Fields, G.B., and Van Doren, S.R. (2015). Transient collagen triple helix binding to a key metalloproteinase in invasion and development. *Structure* 23, 257-269.

Zöller, M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* 11, 254-267.

鈴木美穂 博士論文

謝辞

がん浸潤における MT1-MMP と CD44 の相互作用という生物学的に重要なテーマを与えてくださり、研究を行なう上でこの上ない環境を用意していただき、研究の方向性に関してご指導いただいたのみならず、サイエンスの発展に貢献するための研究を行なう上で研究者としてあるべき精神に関しても常々ご指導くださりました、東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 嶋田 一夫教授に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究を進めていく上での考え方、研究の展開の仕方やまとめ方、実験結果の考察などを直接親身にご指導くださり、研究が円滑に進められるよう常に心配りをしていただきました、東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 西田 紀貴先生に心から御礼申し上げます。

本研究に関して多くのご助言をしていただき、貴重なお時間を割いてくださいました、慶應義塾大学薬学研究科 生命機能物理学研究室 大澤 匡範教授、東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 上田 卓見先生、東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 幸福 裕先生に感謝いたします。

本研究を行なうにあたり、哺乳細胞での発現系構築についてご助言くださいました、近畿大学理工学部・総合理工学研究科生命科学科 免疫分子機能研究室 早坂 晴子准教授、ならびに大阪大学未来戦略機構 宮坂 昌之特任教授に感謝申し上げます。

本研究テーマ原案を提案し、2 年間にわたり直接ご指導いただき、気を配りサポートしてくださいました、東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室卒 鈴木 美穂博士に感謝します。

本研究を進め、研究生を送る上で、様々な形でお世話になりました、東京大学大学院薬学系
研究科 生命物理化学教室の皆さまに感謝します。

研究生を送るにあたり、私の支えとなり、常に励ましてくださった家族に感謝します。