

Functional Analysis of Human MT3-MMP DNA 5'-Flanking Region

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9353

MT3-MMP 遺伝子の転写制御領域の解析

金沢大学がん研究所腫瘍分子科学講座 (主任: 清木元治教授)

孟 暁 波

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-3 (membrane type matrix metalloproteinase-3, MT3-MMP) は既に報告された MT1-MMP と同様に細胞の表面に発現して細胞外基質分解に関与する酵素であるがその発現がどの様に制御されているのかは不明であった。今回、ヒト MT3-MMP 遺伝子の 5' 側上流 3.8kb の DNA を単離し、その塩基配列と転写制御機能を調べた。単離した上流域には MT3-MMP を発現している悪性黒色腫細胞株 A2058 で転写活性を示し、発現していない胃癌細胞株 TMK-1 では機能しない細胞種特異性を示すプロモーター領域が含まれていた。この領域に様々な系統的な欠失変異を導入することにより A2058 細胞で活性を示すのに必須の最小単位を -378 から -114 塩基の間に同定した。この領域は TATA ボックスを含まず、AP-1 結合配列も見られず、増殖因子やサイトカインで発現誘導される他のマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) 遺伝子のプロモーターとは異なる構造を持っていた。最小単位の中に存在する Z-DNA 様配列がエンハンサー機能を示し、その下流の配列が MT3-MMP 発現細胞でのみ機能する細胞種特異的なプロモーター活性を示した。本研究によって膜型 MMP 遺伝子発現制御の一端が初めて明らかになった。

Key words matrix metalloproteinases, membrane type matrix metalloproteinase-3, promoter, Z-DNA

細胞外マトリックスは多細胞生物が組織を構築する際に必須な構造体であり、各種のコラーゲン、糖蛋白、プロテオグリカンなど複雑な高分子成分によって構成されている。そして、その生成と分解は発生過程や組織の再構築に際して厳密な制御を受けている。さまざまな病気に伴う組織の異常の原因として細胞外マトリックスの分解系亢進があることが指摘されている。このような細胞外マトリックスの分解にかかわる重要な酵素系としてマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases, MMP) がある。メタロプロテアーゼは活性中心に亜鉛を保持する蛋白質分解酵素であるが、特に細胞外マトリックスの分解に関与する一群の酵素を MMP ファミリーと呼んでいる^{1)~4)}。現在までに15種類の酵素遺伝子が同定されている。それぞれの酵素は各種コラーゲンやラミニン、フィブロネクチンなどに対して異なる基質特異性を持ち、異なる発現の制御を受けている。間質のコラーゲン (I, II, III型) を切断するのはコラーゲナーゼであり、基底膜のIV型コラーゲンを切断するのはゼラチナーゼA (72-kDa IV型コラーゲナーゼ) とゼラチナーゼB (92-kDa IV型コラーゲナーゼ) である。ゼラチナーゼは変性コラーゲンであるゼラチンも効率よく分解する。基底膜の糖蛋白質であるフィブロネクチン、ラミニンはマトリライシンやストロムライシン1によって分解される^{5)~9)}。

MMPsの組織での発現は即座に酵素機能の発現を意味するものではない。MMPsは不活性な前駆体酵素として分泌され、酵素活性の発現にはN末端の約80アミノ酸が切断される必要が

ある。この活性化は他の蛋白質分解酵素 (活性化因子) によるN末端領域の部分的分解が引金となって起こる。従って、組織で発現したMMPが細胞外マトリックスの分解に使われるためには、同時に同じ場所でこれら前駆体酵素に対する活性化因子も発現している必要がある¹⁰⁾。細胞の浸潤に伴う限局された細胞外マトリックス分解には浸潤性細胞の表面で前駆体酵素の活性化が起こると都合がよい。このような活性化のシステムとして少なくとも2通りが知られている。一つはセリンプロテアーゼファミリーに属するウロキナーゼ型プラスミノゲン・アクチベーター (urokinase type plasminogen activator, uPA) による反応である¹⁰⁾。uPAは細胞の表面でプラスミノゲンを活性化してプラスミンを生じさせる。プラスミンは血栓中のフィブリン以外にフィブロネクチン、ラミニン、IV型コラーゲンなどにたいしても広い基質特異性を持つが細胞外マトリックスを直接分解する活性は強くはない。むしろ、コラーゲナーゼ、ストロムライシン、ゼラチナーゼBなどのMMPの前駆体酵素の活性化を誘導することによって細胞外マトリックス分解を制御している。しかし、ゼラチナーゼAの前駆体はプラスミンによっては活性化されない。その活性化にはプラスミン以外の細胞膜表面上の特異的なシステムが使われていると考えられていた¹¹⁾。最近、当研究室で発見された膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (membrane-type matrix metalloproteinase, MT-MMP) はゼラチナーゼAの特異的な活性化因子であることがわかり、癌の浸潤・転移に関与する酵素としても注目を集めている¹²⁾¹³⁾。

平成9年9月17日受付, 平成9年10月20日受理

Abbreviations: MMP, matrix metalloproteinase; MT3-MMP, membrane type matrix metalloproteinase; MOPS, 3-N-morpholinopropanesulfonic acid. uPA, urokinase type plasminogen activator

以上の二つの主要な経路によってMMPの細胞表面での活性化が制御されていると考えられるようになった。

最初のMT-MMPの報告に続いて、関連した膜型酵素が他に少なくとも3種類存在することが判り、これら膜型酵素はMMPファミリーの中でユニークなサブグループを形成していることが明らかになった¹⁰。最後に報告されたMT4-MMPを除いた3種類は、お互いによく保存されたアミノ酸配列を持ち(約50%ホモロジー)、共にゼラチナーゼAの活性化を誘導する。幾つかの細胞株でこれらMT-MMP遺伝子のmRNAを調べてみるとその発現パターンに相関はなく、独立して異なる発現制御を受けていることが明らかとなった。また、ヒトの臓器別発現も、MT1-MMPの発現が胎盤、肺、腎臓で高いのに対して、MT3-MMPは腎臓および肺での発現は低く、脳及び胎盤での発現が高かった¹⁰。MT1-MMPはマウスの発生過程で間葉系細胞である線維芽細胞、軟骨細胞、骨細胞、筋肉細胞等でゼラチナーゼAと共発現している¹⁰。しかし、上皮系の細胞での発現はまれであった。また、ラットの創傷治癒過程では創傷部位の線維芽細胞に特異的な発現誘導が起こることが観察されている¹⁰。上皮系細胞での発現は癌化した細胞で高頻度に見られ、特にヒト大腸癌や胃癌組織では周辺の線維芽細胞に加えて癌細胞自身に生体内局所ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization) 法にて陽性シグナルが観察された¹⁰。この時、線維芽細胞はゼラチナーゼAを発現するが癌細胞は発現しない。このことから、線維芽細胞が放出するゼラチナーゼAはがん細胞膜上のMT1-MMPによって活性化され、基底膜及び間質のコラーゲン分解に用いられると考えられる。

MT3-MMPの組織レベルでの発現は詳しく調べられていないが、ヒト乳癌組織でのMT-MMPの発現はMT1-MMPがほぼ全例に発現しているのに対してMT3-MMPの発現は約20%に認められるのみであった¹⁰。また、組織レベルでのゼラチナーゼAの活性化とMT1-MMPの発現は相関するがMT3-MMPの発現との相関は認められなかった。以上のことから、MT-MMPは転写レベルで厳密な制御を受けていると考えられるがその発現制御機構については明らかではない。本研究ではMT3-MMP遺伝子の5'上流領域のゲノムを単離し、プロモーター領域の基本的な性質を調べると共にDNA配列を解析して既知のMMP遺伝子プロモーターとの比較を試みた。

対象および方法

I. 細胞培養

本研究では金沢大学がん研究所ウイルス部清水教授より供与された悪性黒色腫由来A2058細胞株、胃癌由来TMK-1細胞株、肝癌由来Hep3B細胞株、骨肉腫由来MG63細胞株、乳癌由来HS578細胞株を用いた。これらの細胞は全て5%牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (BioWhittaker, Walkersville, USA) を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM) (日水, 東京) で37°C, 5% CO₂存在下で培養した。

II. ヒトMT3-MMP遺伝子の5'上流領域のクローニングと塩基配列の決定

1. プローブの作製

当研究室でクローニングしたMT3-MMP cDNAより5'末端の220塩基対 (base pair, bp) の断片を調整した。25ngのDNA断片をマルチプライマーラベリングキット (アマシヤム株式会

社, 東京) にて50 μCi [α -³²P]-dCTP (アマシヤム株式会社) を用いてクレノフレグメント (klenow fragment) によって標識し、セファデックス (Sephadex) G-50カラム (ファルマシアバイオテック株式会社, 東京) にて遊離 [α -³²P]-dCTP を除去し、>10⁶cpm/μgの比活性を持つプローブを得た。

2. ヒトゲノムDNAライブラリーのスクリーニング

ヒトゲノムDNAのλファージライブラリー (遺伝子バンク, 東京) を4×10⁶プラーク形成単位/15cmプレートの濃度に懸浮溶液 (suspension medium, SM) (100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl pH7.5, 0.01%ゼラチン) にて希釈した。大腸菌LE392に希釈ファージを37°Cで15分間吸着感染させた後、0.7%アガロースを加えたLenox培地 (Lenox broth, LB) (1%トリプトン, 0.5%酵母エキス, 0.5% NaCl) と混和し、15cm LB寒天培地上にまいて37°Cで12時間培養した。ファージをハイポドンNメンブラン (アマシヤム株式会社) に転写し、転写後のメンブランを室温にて変性溶液 (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) で1分間処理し、中和溶液 (1.5M NaCl, 1M Tris pH7.5) にて5分間処理した。処理後のメンブランをUVクロスリンカー (Stratagene, New York, USA) を用いて波長254nmの紫外線1200マイクロジュール照射して固定した。ラビッドハイブリタッファー (アマシヤム株式会社) にて3時間プレハイブリダイゼーションした後、プローブを加えて65°Cで12時間ハイブリダイゼーションを行った。メンブランは2倍濃度SSC-0.1% SDS (300mM NaCl, 30mM クエン酸ナトリウム, 0.1% SDS) にて室温で洗浄し、0.2倍濃度SSC-0.1% SDSにて55°Cで30分間の洗浄を2回行った。-80°Cで12時間のオートラジオグラフィを行った。一次スクリーニングの結果から得られた陽性プラークのファージを10-100プラーク形成単位/10cmプレートの濃度にSM溶液にて希釈し、一次スクリーニングと同様な方法で再スクリーニングを行った。プレート上に単独のプラークを形成している陽性クローンを目的のファージクローンとして単離した。

3. ファージDNAの調整

ファージの大量調整には大腸菌のファージ感染溶菌液250mlを用いた。沈殿物を遠心にて除去した後に上清を10%ポリエチレングリコール-6000 (和光純薬, 大阪), 1M NaClに調整し、1時間氷冷した。生成した沈殿物を遠心にて回収し、少量のSM溶液に溶解して濃度勾配塩化セシウム溶液に重層し、ベックマンSW40Tiローターにて4°C, 35,000回転/分, 4時間遠心した。遠心後、ファージ分画を回収し、SW50ローターにて35,000回転/分2時間の遠心により沈殿として回収した。沈殿をSM溶液にて溶解し、フェノール抽出、アルコール沈殿によってファージDNAを抽出した。

4. ファージDNAの解析

陽性クローンのファージDNAから目的の領域を同定するために、λ-gt11とMT3-MMP cDNAの制限酵素サイトを利用し、幾つかの酵素にてファージDNAを切断し、サザンブロットを行った。ひとつのファージDNAからMT3-MMP遺伝子の5'側を含む3.8kbのDNA断片をpBluscriptプラスミドベクターにサブクローニングした。キロシークエンス・キット (宝酒造, 京都) を用いて、エクソヌクレアーゼ (exonuclease) IIIの二本鎖特異的な3'エクソヌクレアーゼ活性を利用し、DNAを一本化した。マングビーンヌクレアーゼ (mung bean nuclease) により一本鎖DNAを分解し、挿入配列の5'側と3'側からそれぞれ

様々な長さの欠失変異を導入した。これら欠失変異体のDNA配列をABI PRISM Dye プライマー (Applied Biosystems Inc, Foster city, USA) を用いた反応の後ABI 373 シークエンサー (Applied Biosystems Inc) を用いて決定した。塩基配列は両相補鎖を独立に解読して確認した。

Ⅲ. MT3-MMP mRNA の発現

1. 培養細胞からの全RNAの抽出¹⁹⁾

直径15cmの培養皿に細胞が増殖してコンフルエントになった時点で、培養上清を除去し、10mlのグアニジン溶液 (4M グアニジンチオシアネート, 25mM クエン酸ナトリウム, 0.1M 2-メルカプトエタノール, 0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム) を加えて十分に溶解した。溶解液に1/10容量の2M 酢酸ナトリウム溶液 pH4.0, 1容量の水飽和フェノール, 1/5容量のクロロホルム-イソアミルアルコール 49:1 を順次加え、混和した。15分間氷冷の後、フェノール抽出を行った。水層に等量のイソプロパノールを加え、RNAを沈殿させ、遠心にて回収した。RNA沈殿はグアニジン溶液に溶解し、等量のイソプロパノールを加えて再沈殿させて回収した。沈殿を更に蒸留水で溶解し、フェノール抽出とアルコール沈殿を繰り返して精製した。沈殿を蒸留水に溶解し、260nmの吸光度の測定によってRNA濃度を測定した。

2. プローブの調整

次の条件でシングル・プライマーPCR反応を行う際に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ を取り込ませて標識し、 $>10^6\text{cpm/mg}$ の比活性を持つ単鎖DNAプローブを得た。20ngのMT3-MMP cDNAを鋳型として25 μl のPCRプレミックス溶液 (25mM TAPS pH8.0, 50mM KCl, 2mM MgCl_2 , 1mM 2-ME, 200 μM 各 dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 1U Ex Taq)

(宝酒造) 中、50 μCi の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ とMT3-MMP cDNAの3'末端側に相補的な30bのオリゴプライマー (5' ACTGGAACACAGTGTAAACCAATACAAGGA-3') を用い、94 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$, 72 $^{\circ}\text{C}$ 各一分間の反応を30回反復した。標識したプローブは微量セファデックス G-50 カラムによって遠心純化した。

3. ノーザンプロットイング²⁰⁾

1検体あたり15 μg の全RNAを取り、50%ホルムアミド, 17.5%ホルムアルデヒド (和光純薬) を含む2%モルホリノールプロパンスルホン酸 (morpholino-propanesulfonic acid, MOPS) (シグマアルドリッチ ジャパン, 東京) pH7.0に溶解し、55 $^{\circ}\text{C}$ で10分間変性した後、1.0%アガロースゲルにて2%MOPS緩衝液中で電気泳動を行った。泳動終了後のゲルをハイボンDNメンブランに対して転写した。メンブラン上のRNAをUVクロスリンカーを用いて固定した。紫外線照射固定したメンブランをハイブリダイゼーション溶液 (10mM Tris pH7.5, 1M NaCl, 1mM EDTA, 5% SDS) と共にプラスチックバッグに入れ、65 $^{\circ}\text{C}$ で2時間プレハイブリダイゼーションを行った。前項で調整したプローブを加えて更に16時間ハイブリダイゼーションを行った。反応後のメンブランは2倍濃度SSCで室温10分間4回洗浄し、0.1倍濃度のSSC-0.1%SDSを含む溶液にて54 $^{\circ}\text{C}$ で20分間の洗浄を3回繰り返した。乾燥したフィルター上の放射活性をバイオイメージアナライザー (BAS1000) (富士フイルム, 東京) で読みとり、解析に用いた。

Ⅳ. プライマー伸長分析²¹⁾

31bのオリゴヌクレオチド

(5' -AGGGTCAGCAGTAGTTCCTGTTCCACCATCCT-3', 図2の+88から+58までに対応する) をDNA合成機 (Model 391) (ABI ジャパン, 東京) にて調整し、プライマーとして用いた。5'末端は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ (6,000Ci/mmol) を用いてT4ポリヌクレオチド・キナーゼにて標識した。標識したプライマーはセファデックス G-50 カラムによって精製した。鋳型のRNAとしては黒色素腫瘍細胞A2058と胃癌細胞TMK-1から単離した全RNAを用いた。10 ^6cpm の標識プライマーと50 μg の全RNAを15 μl ハイブリダイゼーション溶液 (10mM Tris pH 8.3, 150mM KCl, 1mM EDTA溶液) 中で65 $^{\circ}\text{C}$ 90分間反応させた後、30 μl 逆転写反応液 (30mM Tris pH 8.3, 15mM MgCl_2 , 5mM DTT, 0.1mM 各 dATP, dTTP, dCTP, dGTP) と100単位逆転写酵素 (Gibco, Grand Island, USA) を加えて42 $^{\circ}\text{C}$ で60分間更に反応させた。反応液から核酸をフェノール-クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿して回収した後、6%のポリアクリルアミド・シーケンシング・ゲルにて電気泳動して反応生成物をバイオアナライザー (富士フイルム) で読みとり、解析した。

Ⅴ. 転写活性の測定

1. レポーター遺伝子の構築

MT3-MMP 遺伝子のプロモーター活性は発光酵素ルシフェラーゼ (luciferase, LUC) 遺伝子をレポーターとして測定した²²⁾。レポーターベクターとしてはマルチクロニング部位の下流に発光遺伝子を持つpGL3 (Promega, Wadison, USA) を用いた。陰性コントロールとしてはプロモーター配列を組み込まないプラスミドを用い、陽性コントロールとしてはSV40の初期遺伝子プロモーター配列を有するプラスミドを用いた。MT3-MMP 遺伝子ゲノムの5'上流域を含む様々な長さのDNA断片をPCR法にて増幅してマルチクロニング部位に組み込んだ。

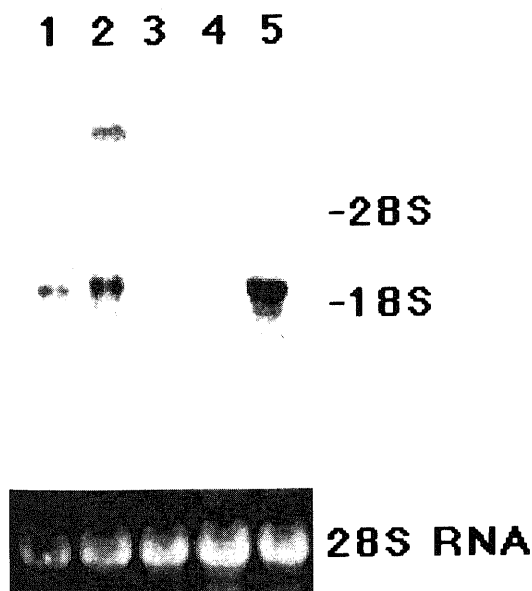


Fig. 1. Northern blot analysis of MT3-MMP RNA expression in various tumor cell lines. Fifteen micrograms total RNA from each cell line was used for hybridization with a single strand MT3-MMP cDNA probe. Lane 1 to 5 represent osteosarcoma MG63, breast cancer HS578, gastric cancer TMK-1, hepatoma Hep 3B, and melanoma A2058 respectively. The 28S ribosomal RNA from the same gel were used as control.

2. 培養細胞への遺伝子導入

A2058, TMK-1, Hep3B, MG63 と HS578 細胞株を 35mm 培
養皿に 1.0 × 10⁶ 個/ml の濃度で 5% FBS 添加 DMEM 2ml にて
37℃, 24 時間培養後, Chen ら²⁰ のリン酸カルシウム法変法に
て遺伝子導入を行った. レポータープラスミド 4 μg に pSV-β-
ガラクトシダーゼ (Promega) プラスミドを 1 μg の割合で加えて
120 μl CaCl₂ (250mM) 溶液に混合した. 更に 125 μl の反応液
(50mM N, N-ピペリス (2-ヒドロキシエチル) -2 アミノエタン
スルホン酸, 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄) を加え, 室温で
15 分間反応させた後, 培養中の細胞に加え, 3% の CO₂ の存在
下に 37℃ で 8 時間培養した. トランスフェクションした培養細胞
はハンクス溶液で二回洗った後, 新鮮な培地に交換して, 更
に 36 時間培養した.

3. レポーター遺伝子発現の測定

遺伝子導入した細胞をラバーで剥がして回収し, 0.25M のト
リス (pH8.0) 溶液に懸濁した. 細胞を氷冷下で超音波破碎して
細胞溶解液を調整した. 細胞溶解液は不溶性成分を遠心により除
いた後, 上清画分を回収した. ルシフェラーゼ活性とガラクト
シダーゼ活性は次の様に測定した. 5 μl 細胞分画液と 20 μl
CCLR 溶液 (25mM トリス-リン酸 pH7.8, 2mM DTT, 2mM
1,2-ジアミノシクロヘキサン N, N, N', N'-四酢酸, 10% グリ
セリン, 1% トリトン X-100) (Promega) を混和し, 25 μl ルシフ
ァラーゼ基質液を加えた後, すみやかにルミノメーター (Lumat

LB 9507) (ベルトールドジャパン, 東京) を使用して 10 秒間測
定した.

成 績

I. MT3-MMP mRNA の発現

MT3-MMP 遺伝子が恒常的に発現している細胞と発現してい
ない細胞を選び出す目的で, 5 種類のヒト癌細胞株 (骨肉腫由
来 MG63, 乳癌由来 HS578, 胃癌由来 TMK-1, 肝癌由来 Hep3B,
悪性黒色腫由来 A2058) での発現をノーザンブロットング法を
用いて調べた (図 1). HS578 と A2058 細胞ではこれまでに報告
されている MT3-MMP mRNA に相当する 3 本のバンド (12, 7,
2.5kb) が観察された. 2.5kb のバンドのシグナルが最も強く,
12kb, 7kb の順で弱くなった. MG63, Hep3B 細胞では MT3-
MMP の弱いシグナルが観察されたが TMK-1 細胞ではシグナル
を検出することはできなかった.

2. MT3-MMP ゲノム DNA のクローニング

ヒト MT3-MMP 遺伝子の転写制御領域を得るために 5' 上流域
のゲノム DNA をラムダファージのヒトゲノム遺伝子ライブラ
リーから単離した. ライブラリーをスクリーニングするための
プローブとしては, ³²P 標識した MT3-MMP の 5' 側の cDNA 断
片 220bp を用いた. 約 10⁶ 個のファージプラークをスクリー
ニングした結果, 5 個の陽性クローンを得た. 各陽性クローンか
らファージ DNA を抽出して, 各種制限酵素で切断した後にサ

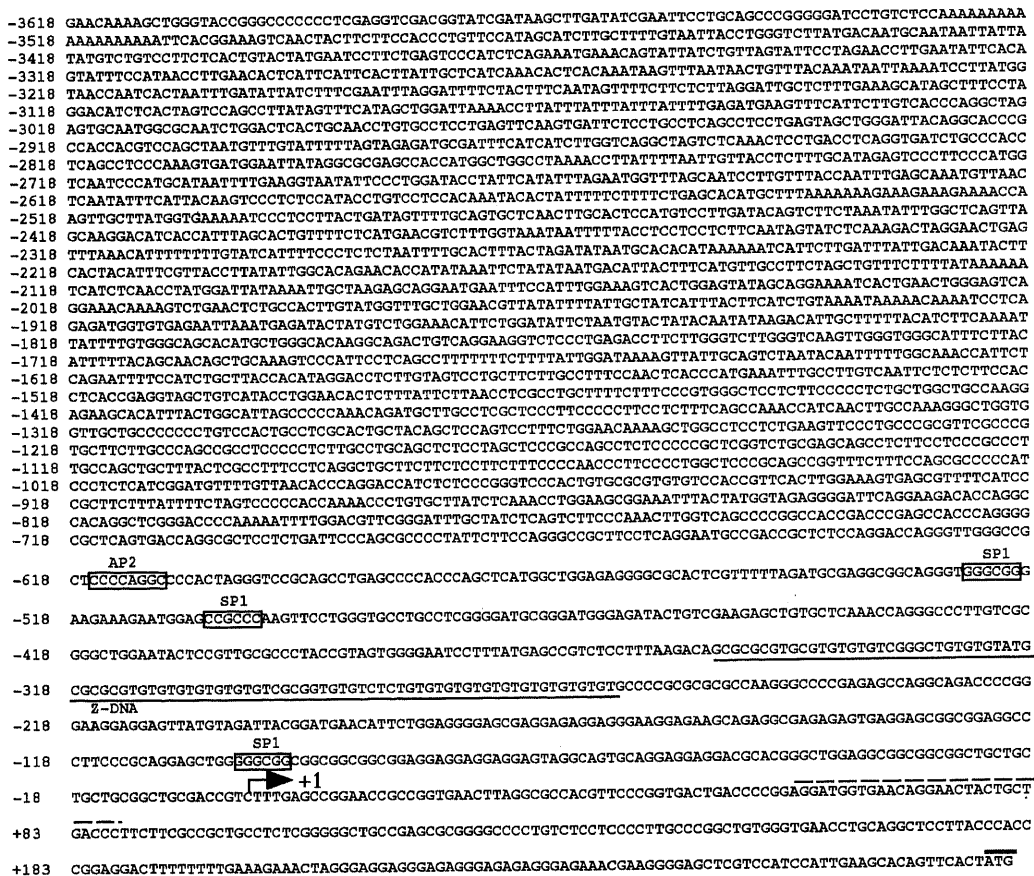


Fig. 2. Nucleotide sequence of the 5'-flanking region of human MT3-MMP gene. The transcription start site is indicated by a arrow and named +1. The potential transcriptional factors binding sites, including Ap2 and Sp1, are represented by boxes. A Z-DNA like sequence is underlined. The primer used for the primer extension analysis is marked with dotted line.

ザンプロット解析する事により、プローブと相補性配列を含むDNA断片の同定を行った。その結果、*Kpn* Iと*Sac* Iによる3.8kbのDNA断片中にプローブとハイブリダイズする領域とその上流域が含まれることが判ったので、pBluscriptプラスミドベクターにサブクローニングして翻訳開始点の上流約3800塩基対の配列を決定した(図2)。cDNAの5'端の上流域の塩基配列にはTATAボックス等のプロモーター領域に特徴的なコンセンサス配列を見いだすことはできなかったが、転写制御にかかわると思われる左手螺旋(Z-DNA)ようなDNA構造、転写因子Sp1結合配列に類似する配列を含んでGCペアーの豊富な配列、AP2結合配列類似構造が見いだされた。

3. 転写開始点の同定

プロモーター領域を明らかにする為に、逆転写酵素を用いてmRNAを鋳型としたプライマー伸長法による解析によって転写開始点の同定を行った。MT3-MMP cDNAの5'側の31ヌクレオチドに相当するオリゴヌクレオチドを合成して用いた(図2)。プライマー伸長法による反応生成物を同じプライマーを用いたゲノムDNAのシーケンス反応のバンドと平行して電気泳動して転写開始部位を求めた(図3)。伸長反応の鋳型として、MT3-MMPを発現しているA2058細胞と発現していないTMK-1細胞から抽出したRNAを用いた。A2058細胞のRNAを鋳型とした場合には88塩基のバンドが見られた。一方、MT3-MMPを発現していないTMK-1細胞を鋳型として用いた場合にはA2058細胞で見られたバンドに相当するシグナルは検出されなかった。以上の結果から、A2058細胞のバンドはMT3-MMP発現細胞に特異的であり、MT3-MMP mRNAの5'末端に対応するプライマー伸長反応産物であると結論した。反応産物の長さとし

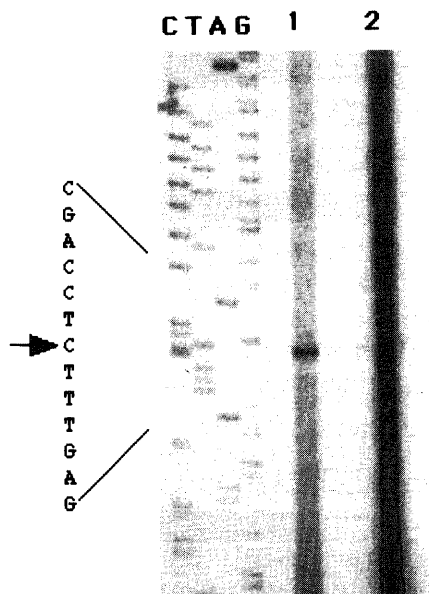


Fig. 3. Primer extension analysis. ³²P-labeled 31 bases oligo, corresponding +88 to +57 of the 5'-flanking sequence, was hybridized to 50μg of total RNA from A2058 and TMK-1 respectively (lane 1 and lane 2) and extended by reverse transcriptase. The reaction products were analyzed through electrophoresis on a 6% sequence gel. A sequence ladder, derived from the same primer, was subjected on the side. An arrow indicates the site of the band.

ケンスラダーとの対応から転写開始点は図2の矢印(+1)に示すチミジン残基であると推定された。

4. プロモーター活性の検出

単離した3.8kbのDNA断片中に細胞の中で転写を開始させるに十分な情報を含んでいるかどうかを確認するために、蛍光発光蛋白であるルシフェラーゼをコードする遺伝子をレポーターとした転写活性測定実験を行った。転写活性は培養細胞にレポーター遺伝子を持つプラスミドpGL3を一過性に遺伝子導入して、発現したルシフェラーゼ活性を測定することによって行った。遺伝子導入する細胞としてはA2058とTMK-1細胞を用いた。pGL3はレポーター遺伝子のみでプロモーター配列を上流に持たず、何れの細胞に遺伝子導入してもレポーター遺伝子の発現は観察されなかった(図4)。プロモーター配列としてSV40の初期遺伝子プロモーター配列を上流に組み込んだ

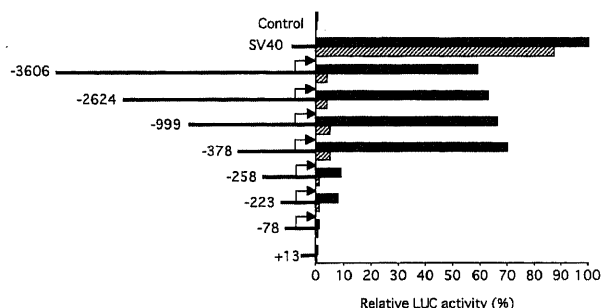


Fig. 4. 5'-Deletion analysis of the human MT3-MMP gene promoter. A set of 5'-deletion constructs were transiently transfected into A2058 and TMK-1 respectively. The numerical names of the plasmid indicate the number of 5' end nucleotides from the transcription start site. The relative luciferase activity of pGL3-control transfected A2058 was arbitrarily set equal to 100%. The relative luciferase activity of each sample was obtained by comparison of its activity with pGL3-control. Solid column (■) indicates A2058 and shade column (▨) represents TMK-1.

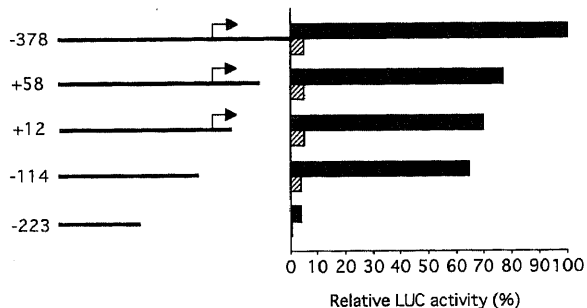


Fig. 5. 3'-Deletion analysis of the human MT3-MMP gene promoter. A set of 3'-deletion constructs was transiently transfected into A2058 and TMK-1 respectively. The relative luciferase activity of pGL3-378 transfected A2058 was arbitrarily set equal to 100%. The relative luciferase activity of each sample was obtained by comparison of its activity with pGL3-378. Solid column (■) indicates A2058 and shade column (▨) represents TMK-1.

pGL3/SV40は両細胞でルシフェラーゼの高い発現が得られた。このことから、pGL3のルシフェラーゼの発現は遺伝子上流のプロモーター活性に依存している事が明らかであり、MT3-MMP遺伝子5'上流域のプロモーター活性の測定に用いることができると結論された。細胞への遺伝子導入効率は、同時に遺伝子導入した β -ガラクトシダーゼ発現ベクターからの酵素発現量で標準化した。

MT3-MMP遺伝子の5'上流域-3606塩基を含む3.8kbのDNA断片をpGL3に組み込んでpGL3/-3606を構築し、2種類の細胞に遺伝子導入してプロモーター活性の有無を調べた。pGL3/-3606はMT3-MMPを発現しているA2058細胞でSV40プロモーターの約59%のルシフェラーゼ活性を示した。しかし、MT3-MMPを発現していないTMK-1細胞での活性は低く、3.5%であった。従って、-3606から+251までの領域にプロモーターとA2058での発現の特異性を決めるエレメントが存在すると考えられた(図4)。この領域を逆向きに挿入してもルシフェラーゼの発現は起こらず、プロモーター活性は方向依存性であった。

5. プロモーター活性を制御するエレメントの解析

プロモーター活性に必要な最小領域を決定するためにpGL3に挿入するDNA断片に5'側からと3'側からそれぞれ異なる大きさの欠失変異を導入してプロモーター活性への影響を調べた。5'上流から-378塩基までの欠失の導入は両細胞でのプロモーター活性にほとんど影響を及ぼさなかったが更に-258塩基までの欠失を導入するとA2058およびTMK-1細胞でのプロ

モーター活性は約1/6に減少した。また、欠失を更に-78塩基まで導入すると何れの細胞でもほとんどプロモーター活性が検出できなくなった。以上の結果から、両細胞で機能しているエンハンサーとプロモーターが-378塩基までの間に存在し、プロモーター機能は-78塩基まで削り込むと機能しないことが判った(図4)。

プロモーター機能に必要な3'側境界領域を明らかにするために系統的欠失変異を同様に導入してプロモーター活性を調べた。欠失変異導入に用いたのはA2058細胞での活性発現に必要な十分なpGL3/-378を用いた。転写開始点上流の-114まで欠失してもpGL3/-378の約70%の活性を保持していた。更に-223塩基まで欠失を進めるとほぼプロモーター活性が見られなくなった(図5)。

以上の結果から、MT3-MMP遺伝子上流にはA2058細胞で機能するプロモーターとエンハンサーがあり、これらの要素が-378と-114の間に存在すると結論された。

6. Z-DNA様エレメントのプロモーター活性への影響

MT3-MMP遺伝子のプロモーター活性が5'上流からの欠失によって変化する-378から-258塩基の間には-351から始まり-261に至る領域にZ-DNA構造をとる可能性がある配列が存在する。Z-DNAは様々な遺伝子のプロモーター領域に存在し、転写活性を調節している。-378から-258塩基への欠失でのプロモーター活性の消失はこのZ-DNA様配列の効果を見ている可能性がある。-378から-258までのエレメントの機能を調べるために、この領域のDNAをPCRで増幅して

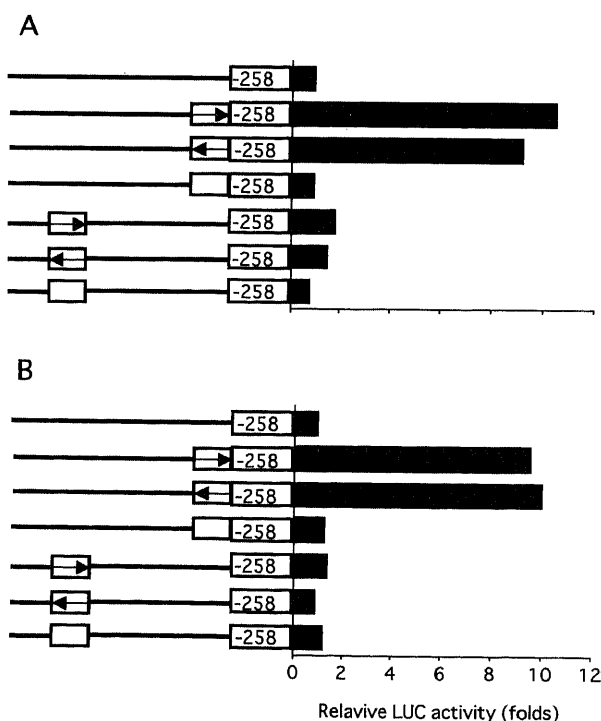


Fig. 6. Transcriptional activity of the Z-DNA like fragment. (A) A2058. (B) TMK-1. The Z-DNA like element (-378 to -258) was subcloned into pGL3-258 with different orientation and position. Transfection analysis was carried out. The values represent the ratio fold of each sample to pGL3-258. The arrow indicated the orientation. The empty box represent a control DNA element from MT3-MMP cDNA.

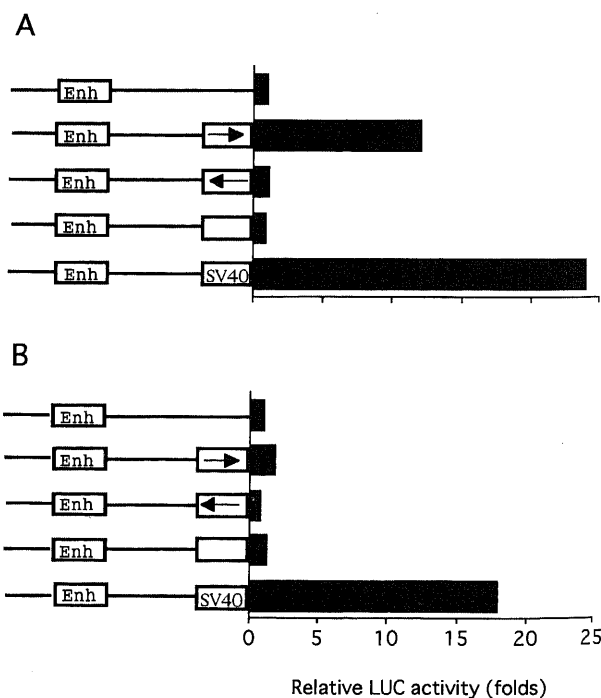


Fig. 7. The activity of cell specific MT3-MMP promoter. (A) A2058. (B) TMK-1. The 110 bp fragment between -223 and -114 was inserted into pGL3-enhancer containing SV40 enhancer but promoter-less. Arrow indicated the orientation, open box represents the a control DNA element from MT3-MMP cDNA. The values represent the ratio fold of each sample to pGL3-enhancer.

pGL3/-258へ方向と距離を置いて組み込んだ。

Z-DNA様断片がpGL3/-258のすぐ上流に位置する場合には方向性に関係なく、A2058とTMK-1の両細胞で転写活性の促進効果が観察された(図6)。しかし同じ配列を-258より2.8kb上流に挿入すると何れの方向でも転写の促進は見られがその強さは著しく減弱した。挿入配列のコントロールとしてはZ-DNA構造をとらないMT3-MMP cDNAのATGから下流132塩基までの配列を用いたが転写活性への影響は見られなかった。Z-DNA様配列はTMK-1細胞でも働かせることからエンハンサー機能はあるがA2058細胞での発現の特異性を決めているエレメントは別にあると考えられた(図6)。

7. 細胞種特異性に関与するエレメントの同定

MT3-MMP遺伝子のプロモーターがA2058細胞で働きTMK-1では機能しない特異性を決定しているエレメントがZ-DNA様配列の下流に位置する可能性を考えて、-114から-223塩基までの配列の機構を解析した。図4に示したようにpGL3/-223はエンハンサー配列を欠くために弱いプロモーター活性しか示さない。そこで、SV40由来の異種エンハンサーとの組み合わせでプロモーター活性の機能を測定した。SV40エンハンサーを持ちプロモーター機能を調べるためのベクターとしてpGL-エンハンサーを用いた。図7に示すごとく、プロモーター配列を下流に挿入しないプラスミドはA2058およびTMK-1の両細胞でほとんど転写活性を示さなかった。しかし、SV40の基本プロモーターとの組み合わせでは高い転写活性化を示し、両細胞での違いは見られなかった。MT3-MMPプロモーター由来配列を正の方向で挿入した場合にはA2058細胞でのみSV40プロモーターに比較して約50%の活性が見られた。しかし、TMK-1細胞では僅かの転写活性しか見られず、この領域にA2058細胞でのプロモーター活性の特異性を決める情報があると結論された。本プロモーター活性は方向依存性であり、逆向きの挿入ではA2058細胞においても転写活性は見いだせなかった。対照としてMT3-MMP遺伝子上流のATGから下流132塩基までの配列にはエンハンサーとの組み合わせで転写活性を示す能力はなかった。

考 察

MT3-MMPを発現しているA2058細胞で転写活性を示すヒトMT3-MMP遺伝子ゲノムの5'上流域を単離する事に成功した。転写活性は配列の方向に依存性であり、また、MT3-MMPを発現していないTMK-1細胞ではその活性は非常に弱かった。従って、MT3-MMPのA2058とTMK-1細胞での発現の相違を決定している制御ユニットが単離したゲノムの領域にある事が判った。転写活性を制御するエレメントは単離したゲノムDNA 3.8kbの転写開始点上流の-378から-114塩基の間に特定できた。

MT3-MMPプロモーター活性には転写開始点及びその上流の-113塩基までの配列は必要とされなかった。多くのプロモーターにおいては転写開始点の近くにイニシエーター配列が、また、上流の20-30塩基の部位にはTATAボックス構造を持つがMT3-MMP遺伝子上流にはこれに適合する配列は認められず、いわゆるTATAレスプロモーターに分類される。3'側から-114塩基まで欠失を持つプロモーターによる転写開始部位がどの様に決まるのかは今回の実験では明らかにできなかったが、図7に示したpGL-エンハンサーを用いたプロモーター活性

の測定結果に示されるように、-258から-114塩基までの配列に転写を開始させる為に必要な情報があることが示唆された。

転写開始点の上流には幾つかの転写因子の結合部位の候補となる配列が見受けられるが-609のAP2結合部位様配列、-520および-499のSp1結合部位様配列は少なくともA2058細胞での転写活性には必要ではなかった。5'側からの欠失の導入によって転写活性を失う領域(-378から-258まで)には90bpの左螺旋のZ-DNA様構造をとりうる配列が認められた。この領域の配列の特徴は(GT)_nと(GC)_nのプリンとピリミジンの重複配列構造が続くことであり、一般的にこのような繰返し配列はZ-DNAを形成しやすいと考えられている²⁰。Z-DNAはゲノム中に広範に存在することが知られており、TATAボックスのない遺伝子プロモーターの近くに存在すると転写制御に関与する可能性が指摘されている²⁴⁾²⁵⁾。実際にこの領域を欠失したために転写活性が消失したと考えられるpGL3/-258にZ-DNA様配列を正及び逆方向に組み込むと転写活性の促進効果があり、エンハンサー様に機能していると考えられた。しかし、更に上流部位に組み込んだ場合にはエンハンサー効果は著しく減弱した。Z-DNAが転写を促進する機構についてはあまり解明されていないが、左螺旋構造をとることによって近くのエンハンサーへの転写因子の結合をしやすくする可能性とZ-DNA配列に直接結合する因子による転写活性の修飾が考えられている。特に前者の可能性はMT3-MMPのZ-DNA様配列が自分自身のプロモーターとの組み合わせで本来の位置でのみ機能することと合致する。

一方でpGL3/-258にはエンハンサーは無いがプロモーターとしての基本構造を持つと考えられる。実際に、SV40エンハンサーを持ちプロモーター配列を欠く為に外来性のプロモーター配列の機能解析に用いることのできるpGL-エンハンサーに-258から-114塩基までの配列を挿入すると本来の方向へ挿入したときのみ転写活性が観察された。従って、この領域には異種のエンハンサーと協調して転写を開始させるためのユニットが含まれると考えられた。興味深いことにこのプロモーター活性はA2058細胞では観察されるがTMK-1細胞ではほとんど活性を示さなかった。従って、本領域がMT3-MMP遺伝子の両細胞における発現の特異性を決めていると考えられたが特徴的本領域には既存のプロモーター配列に見られる共通配列が無く、プリン残基に富む配列である。細胞種特異性を決めているのがプロモーターの基本ユニット自身なのか、あるいはそれと分離可能なエンハンサーによっているのかは今回の実験では明らかにできなかった。

MT3-MMPのmRNAには3種類が認められた。これらがスプライシングの相違によるのか、異なる転写終結による産物なのか、あるいは別々の転写開始点からスタートした転写産物なのかは明らかではない。しかし、3種類のmRNAが多少の割合の変化があっても同じように色々な細胞で観察され、別々に発現しているケースが無いことから同一の転写制御を受けていると考える事ができる。そうであれば、今回同定したMT3-MMPのプロモーター配列が3種類のmRNAの発現を制御することになるが、今後の検討課題である。

MMPの遺伝子はその種類によってそれぞれ異なった様式で制御されている。幾つかのMMP遺伝子の発現制御領域が解析され、遺伝子発現に関与するエレメントが同定されている²⁶⁾²⁹⁾。

その結果, MMP遺伝子プロモーター構造の特徴から2つに大別する事ができる. 最初のグループには間質コラーゲナーゼ(MMP-1), ストロメライシン(MMP-3), マトリライシン(MMP-7), ゼラチナーゼB(MMP-9)の遺伝子があり, 転写開始点上流にはプロモーターの基本配列に特徴的なTATAボックスがあり, そのすぐ上流に転写因子AP1の結合部位であるTRE(TPA responsive element)が存在することに特徴づけられる. もう一方のグループはそれに対して, 転写開始点上流に典型的なTATAボックスが無く, 対応する場所にTRE配列がない. それに代わって, 転写因子Sp1の結合配列が相当する領域に見いだされるグループであり, ゼラチナーゼAがこのグループに属する. 前者は増殖因子であるEGF, PDGF, FGFや炎症性サイトカインのIL-1やTNF- α によって発現が誘導される²⁹⁾. この時, 転写因子AP1へのシグナルが重要な役割を果たし, 近傍に結合するEtsファミリーの転写因子と協調しながら転写を促進する. 一方, ゼラチナーゼAはこれらの細胞刺激には応答しないがTGF- β によって発現誘導が起こることが知られている. MT3-MMPのプロモーターはTATAボックスを欠くことからゼラチナーゼAのプロモーターに近いと考えられる. これに一致して, 様々な癌細胞株を上記の増殖因子やサイトカインで処理しても明瞭な発現誘導は観察されなかった(未発表). しかし, TGF- β によっても発現誘導は無いことからゼラチナーゼAとも異なった制御を受けていると考えられる. また, MT3-MMPプロモーターの転写開始点の近傍(-496)にSp1結合部位様配列が存在するが転写活性には必要ではなかった. 今回同定したMT3-MMP遺伝子のプロモーターはMT-MMP遺伝子としては最初の報告であり, 他のMMP遺伝子の発現制御と比較して膜型酵素がどのような制御を受けているのかを明らかにする端緒を開くことができた.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました恩師清木元治教授に深甚なる謝意を表します. また終始直接の御指導を戴きました金沢大学がん研究所ウイルス部佐藤博士に深謝します. さらに貴重な御助言を賜り, 細胞を供与して頂いた金沢大学がん研究所化学療法遠藤良夫博士に深謝します. 最後に多大なる御協力を賜りました金沢大学がん研究所ウイルス部の皆様に感謝致します.

文 献

- 1) Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 6: 121-125, 1990
- 2) Alexander CM, Werb Z. Proteinases and extracellular matrix remodelling. *Curr Opin Cell Biol* 1: 974-982, 1989
- 3) Woessner JGJ. Matrix metalloproteinase and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB J* 5: 2145-2154, 1991
- 4) Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14: 455-463, 1992
- 5) Birkedal-Hansen H, Moore MGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix Metalloproteinases: A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197-250, 1993
- 6) Freiji JMP, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco T, Tolivia J, Lopez OC. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269: 16766-16773, 1994
- 7) Murphy G, Segain JP, O'Shea M, Cockett M, Ioannou C, Legevre O, Chambon P, Basset P. The 28-kDa N-terminal komain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *J Biol Chem* 268: 15441-15453, 1993
- 8) Pei D, Majmudar G, Weiss SJ. Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *J Biol Chem* 269: 25849-25855, 1994
- 9) Stetler-stevenson WG. Type IV collagenase in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 9: 289-303, 1990
- 10) Fazioli F, Blasi F. Urokinase type plasminogen activator and its receptor. *Trends pharmacol Sci* 15: 25-29, 1994
- 11) Strongin AY, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Plasma membrane dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. *J Biol Chem* 268: 14033-14039, 1993
- 12) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370: 61-65, 1994
- 13) Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase gene from a human placenta cDNA library. *J Biol Chem* 270: 23013-23020, 1995
- 14) Sato H, Seiki M. Membrane type matrix metalloproteinases in tumor metastasis. *J Biol Chem* 119: 209-215, 1996
- 15) Kinoh H, sato H, Tsunozuka Y, Takino T, kawashima A, Okada Y, Seiki M. MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. *J Cell Sci* 109: 953-959, 1996
- 16) Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, Bellocq JP, Rio MC, Basset P. Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. *J Cell Biol* 137: 67-77, 1997
- 17) Ohtani H, Motohashi H, Sato H, Seiki M, Nagura H. Dual over-expression pattern of membrane type metalloproteinase in cancer and stromal cells in human gastrointestinal carcinoma revealed by in situ hybridization and immunoelectron microscopy. *Int J Cancer* 68: 565-70, 1996
- 18) Ueno H, Nakamura H, Inoue M, Imai K, Noguchi M, Sato H, Seiki M, Okada Y. *Cancer Res* 57: 2055-2060, 1997
- 19) Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current protocols in molecular biology*, 2nd ed, p4. 2. 1-4. 2. 8, John Wiley & Sons Inc, New York, 1989
- 20) Cross FR, Tinkelenberg AH. A potential positive feedback loop controlling CLN1 and CLN2 gene expression at the start of the yeast cell cycle. *Cell* 65: 875-883, 1991
- 21) McKnight SL, Kingsbury R. Transcription control signals of a eukaryotic protein encoding gene. *Science* 217: 316-324, 1982
- 22) Wood KV. Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys Res Commun* 124: 592-586, 1984

- 23) Chen C, Okayama H. Calcium phosphate mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6: 632-638, 1988
- 24) Herbert A, Rich A. The biology of left-handed Z-DNA. *J Biol Chem* 271: 11595-11598, 1996
- 25) Schroth GP, Chou PJ, Ho PS. Mapping Z-DNA in the human genome. *J Biol Chem* 267: 11846-11855, 1992
- 26) Gaire M, Magbanus Z, McDonnell S, McNeil L, Lovett DH, Matrisian LM. Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. *J Biol Chem* 269: 2032-2040, 1994
- 27) Angel P, Baumann I, Stein B, Delius J, Herrlich P. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol* 7: 2256-2266, 1987
- 28) Gutman A, Wasylyk B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J* 9: 2241-2246, 1990
- 29) Sato H, Seiki M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8: 395-405, 1993

Functional Analysis of Human MT3-MMP DNA 5'-Flanking Region Xiao-Bo Meng, Department of Molecular Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, 920 — *J. Juzen Med Soc.*, **106**, 505 — 513 (1997)

Key words matrix metalloproteinases, membrane type matrix metalloproteinase-3, promoter, Z-DNA

Abstract

Membrane type 3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP) has been demonstrated to be an enzyme, like MT1-MMP, which is expressed on the cell surface and mediates the degradation of extracellular matrix. The transcriptional regulation mechanism of MT3-MMP is still unclear. In this study, we isolated a 3.8 kb length MT3-MMP 5'-flanking DNA, determined nucleotide sequence and examined the transcription regulation function. The isolated fragment contained the promoter region which functions positively in A2058 melanoma cell line which expressed the MT3-MMP gene and negatively in the TMK-1 gastric cancer cell line which does not express it. Through a series of deletion analyses, the minimum functional unit was mapped between -378 and -114. There was neither a TATA box nor AP-1 binding site. That suggested that the MT3-MMP promoter is different from that of other MMPs which can be induced by cytokines or growth factors. Two functional elements were identified in this region. One is a Z-DNA-like structure element, which was found to have the potential to enhance promoter activity. The other down stream element showed specific promoter activity in A2058 but not in the TMK-1 cell. These results suggest that cell type specific expression of MT3-MMP gene is mediated by the specific promoter and enhanced by a Z-DNA like element.