

新しい膜型マトリックスメタロプロテナーゼ(MT-MMP)の遺伝子単離と機能の解析

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: 滝野, 隆久 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9108

新しい膜型マトリックスメタロプロテナーゼ (MT-MMP) の遺伝子単離と機能の解析

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任: 山本悦秀教授)

滝野隆久

マトリックスメタロプロテナーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) は癌の浸潤や転移において細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) を分解する重要な酵素である。現在までに9種の異なる遺伝子によってコードされる MMP が知られている。しかし、ECM の複雑な構成要素が効果的に分解されるには、さらに未知の MMP が関与している可能性もある。また、不活性型前駆体 MMP-2 (前駆体 MMP-2) の活性因子として細胞膜結合性の MMP が想定されている。その様な未知の MMP 遺伝子を単離するために、MMP 間でよく保存されているアミノ酸配列に対応する混合プライマーを用いて逆転写 PCR (reverse transcribed-PCR, RT-PCR) 法を行うことにより、様々な組織で発現している MMP 遺伝子の増幅を行った。増幅された DNA 断片をプラスミドベクターに挿入し、168クローンの DNA 配列を解析した。112クローンは既知の MMP 遺伝子であり、胎盤組織より得られた5クローンは MMP 遺伝子と相同性を持つ新しい遺伝子の cDNA 断片と思われた。この cDNA 断片をプローブとしてヒト胎盤 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、3.4k 塩基対 (base pair, bp) の cDNA を得た。3.4kbp の cDNA からは582アミノ酸からなる蛋白質がコードされるオープンリーディングフレームが見い出された。予想される遺伝子産物は既知の MMP と同様なドメイン構造を持ち、カルボキシル末端付近に細胞膜を貫通するのに十分な24の疎水性アミノ酸が連続した領域 (細胞膜貫通構造) を有していた。この様な細胞膜貫通構造は既知の分泌型 MMP には存在しない。ゆえに、この遺伝子産物を膜型 MMP (membrane type-MMP, MT-MMP) と命名した。MT-MMP 遺伝子産物は遺伝子導入細胞から 63kDa の蛋白として検出され、実際に免疫染色により細胞表面に発現することが確認された。MT-MMP が膜結合性であることから前述の前駆体 MMP-2 活性化因子としての機能を検索した。その結果、MT-MMP 発現により前駆体 MMP-2 (66kDa) は活性化中間体 (64kDa) を経て活性型 MMP-2 (62kDa) に変換されることから、MT-MMP がこの前駆体 MMP-2 活性化因子であることが示された。

Key words extracellular matrix (ECM), cancer metastasis, matrix metalloproteinases (MMP), membrane type-MMP (MT-MMP), gelatinase A (MMP-2)

細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) は癌細胞が周辺組織へと浸潤する際の物理的障壁として働いている。特に ECM の一形態である基底膜は癌細胞の間質への浸潤、血管内への侵入、血管外への浸出の際に重要な障壁となっている^{1)~4)}。癌細胞の基底膜浸潤にはまず癌細胞が基底膜構成成分に接着し、続いて基底膜構成成分を分解し最後に癌細胞が移動するという3段階説⁵⁾⁶⁾が唱えられている。

ECM 構成成分を分解する酵素は数多く報告されているが、なかでもマトリックスメタロプロテナーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) ファミリーと呼ばれる酵素群が癌転移に重要であると考えられている⁷⁾⁸⁾。MMP は不活性型前駆体酵素 (前駆体 MMP) として細胞外に分泌される。そのうち前駆体 MMP-1/間質コラゲナーゼ⁹⁾、前駆体 MMP-3/ストロメライシン-1¹⁰⁾、前駆体 MMP-9/ゼラチナーゼ B¹¹⁾はプラスミン、トリプ

シン等のセリンプロテナーゼなどにより活性型酵素に変換されることが報告されている¹²⁾。しかし、前駆体 MMP の生体内における活性化機構にはまだ不明な点が残されたままである。

現在、MMP は異なる遺伝子によってコードされているものが9種報告されている¹³⁾。しかし、ECM 構成要素の複雑性を考えると、ECM を効果的に分解するにはさらに新しい MMP が関与している可能性もある。また、実際に MMP 活性として報告されていても遺伝子は未同定なものも存在する¹⁴⁾。そこで著者は以下のような方法で新しい MMP 遺伝子の同定を試みた。すなわち、MMP 間で特徴的にアミノ酸配列が保存されている領域に着目し、この領域に対応する混合オリゴヌクレオチドを作製した。これをプライマーに用いて逆転写 PCR (reverse transcribed-PCR, RT-PCR) 法¹⁵⁾を行い、MMP 遺伝子を増幅することにより新しい MMP 遺伝子を検索した。

平成6年12月14日受付, 平成7年1月10日受理

Abbreviations: BBS, BES-buffered saline; BES, N, N-bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid; bp, base pair; BPB, bromophenol blue; BSA, bovine serum albumin; Con A, concanavalin A; DEPC, diethyl pyrocarbonate; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; DTT, dithiothreitol; ECM, extracellular matrix; FCS, fetal calf serum; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate

対象および方法

1. 細胞培養

1. 使用細胞とその培養条件

使用した培養細胞のうちヒト口腔扁平上皮癌 OSC-19 細胞は当教室より、ヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞、ヒト骨肉腫由来 U-20S 細胞、SK-ES-1 細胞、ヒト膀胱癌 T24 細胞、ヒト喉頭癌 HEp-2 細胞、ヒト胃癌由来 KKLS 細胞、NKPS 細胞、MKN28 細胞、ヒト肺癌 PC-3 細胞、ヒト悪性黒色腫由来 A375 細胞、ヒト単核球白血腫由来 U937 細胞、ヒト胎児線維芽細胞 HEL 細胞、マウス線維芽細胞 NIH3T3 細胞、SV40 にて形質転換されたアフリカ緑サル腎臓細胞 COS-1 細胞は全て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。以上の細胞は全て 5% 牛胎仔血清 (fetal calf serum, FCS, Hyclone, Utah, USA) 加ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM) (日水, 東京) にて 37°C, 5%CO₂ 存在下で培養した。

II. RT-PCR 法

1. 全 RNA の抽出

直径 15cm の細胞培養用ディッシュ (FALCON, New Jersey, USA) にて細胞がほぼ一面に増殖した時点で、10mM リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) にて 2 回洗浄し、10ml の D 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) を加えて十分に懸濁した。懸濁した材料に、1/10 容量の 2M 酢酸ナトリウム, 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 混合液を順次加え、添加ごとに混和して 15 分氷冷した。遠心分離した水層 (上層) に等量のイソプロパノールを加え、よく混和して -20°C で 1 時間放置した。4°C, 10,000rpm, 20 分遠心して上清を捨てた後、沈殿を 0.5ml の D 液で十分溶解して等量のイソプロパノールを加えて前述のように RNA を沈殿させた。沈殿をジエチルピロカルボネート (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 処理蒸留水にて溶解し、フェノール抽出、エタノール沈殿を行った。RNA の沈殿を DEPC 処理蒸留水で溶解して 260nm の吸光度を測定し総 RNA 濃度を測定した。

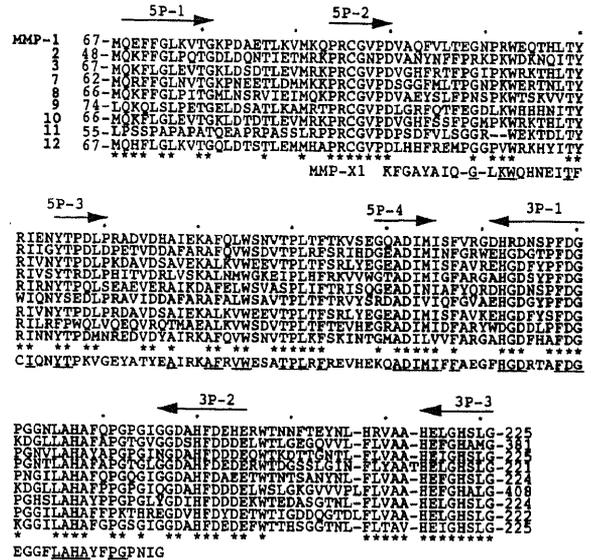
2. 試験管内 cDNA 合成

II-1. で抽出した RNA を鋳型として cDNA 合成を行った。すなわち、RNA 2μg を 70°C で 10 分変性させた後、[50mM Tris-HCl, pH8.3, 75mM 塩化カリウム (KCl), 3mM 塩化マグネシウム (MgCl₂), 0.5mM デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP), 5mM ジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT), 50ng ランダムヘキサマー, 10 単位 RNase 阻害剤, 200 単位 スーパー スクリプト (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA)] 20μl の中で室温にて 10 分、続いて、37°C で 1 時間逆転写反応を行い cDNA を作製した。

3. PCR 反応

II-2. の試料 1μl を鋳型とし PCR 法にてヒト MMP 遺伝子断片の増幅を行った。図 1 に示すようなプライマーと Taq

DNA ポリメラーゼ (Promega, Madison, USA) を用い PCR 反応を行った。一検体 50μl にて熱変性を 93°C で 1 分、アニーリング反応を 55°C で 1 分、伸長反応を 72°C で 1 分行い、これを 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返した。なお、効果的なサブクローニングを行うため、cDNA の 5' 側オリゴ DNA プライマーには BamHI 認識配列を、3' 側オリゴ DNA プライマーには EcoRI 認識配列を 5' 末端に持つように DNA 合成機 (Model 391 DNA Synthesizer, ABI ジャパン, 東京) にて作製



Degenerate primers were designed as follows.
 5P-1, 5'-CAGARTTYYYWYGGVYTRVMNVWRACDGG.
 5P-2, 5'-CCMMGVGTGYSGVVRWBCCWGA.
 5P-3, 5'-TAYACDCVAGAYTTGCC.
 5P-4, 5'-SGNVVNGCWGAYATMRTSAT.
 3P-1, 5'-RTCAAADGGRTANNHGTCBCCATG.
 3P-2, 5'-YTCRTSNTCRTCRAARTGRRHRTCYCC.
 3P-3, 5'-CCCADVGMRTGGCCRADYTCATG.

Fig. 1. PCR primers for MMP gene amplification. Partial amino acid sequences of MMP family members are aligned and conserved amino acids are indicated by asterisks. MMP-1, interstitial collagenase; MMP-2, gelatinase A; MMP-3, stromelysin 1; MMP-7, matrilysin; MMP-8, neutrophil collagenase; MMP-9, gelatinase B; MMP-10, stromelysin 2; MMP-11, stromelysin 3; MMP-12, human macrophage metalloelastase (HME). Numbering of amino acids were as they appeared in the original papers and only N- and C-terminal amino acid numbers are indicated. The amino acid sequence deduced from the MMP-X1 fragment is indicated at the bottom and conserved amino acids with other MMPs are underlined. Conserved regions were selected and degenerate PCR primers (indicated by horizontal arrows) were designed. Four were the 5'-primers (5P-1 to 5P-4) corresponding to the sequences surrounding the conserved PRCGVPD, and three were the 3'-primers (3P-1 to 3P-3) corresponding to the catalytic enzyme portions. Abbreviations: R=A or G; Y=C or T; W=A or T; S=C or G; M=A or C; B=C or G or T; D=A or G or T; H=A or C or T; V=A or C or G; N=A or C or G or T.

dehydrogenase; HRP, horseradish peroxidase; MMP, matrix metalloproteinase; MOPS, 3-N-Morpholinopropanesulfonic acid; PBS, phosphate-buffered saline; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; RT-PCR, reverse transcribed-PCR; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TE, Tris EDTA; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-type 1

し、260nmの吸光度を測定して20 μ Mに調製したものを使用した。

Ⅲ. RT-PCR 産物の検討

1. サブクローニング

RT-PCR 産物 20 μ l を 10% PAGE により分離し、MMP 遺伝子から増幅されることが予想される長さの cDNA をゲルより抽出した。この cDNA を制限酵素 EcoRI (制限酵素類はすべて宝酒造, 京都を用いた), BamHI で処理し, 同じく EcoRI, BamHI で切断されたプラスミドベクターブルースクリプト (東洋紡, 大阪) に挿入した。

2. プラスミドの少量調製

Ⅲ-1. で得られたプラスミドで形質転換された大腸菌 HB101 株を 2 倍濃度 YT 培地 [トリプトン 16g, イーストエキストラクト 10g, 塩化ナトリウム (NaCl) 5g, アンピシリン 50mg/l, pH7.6] 3ml にて 37 $^{\circ}$ C, 12時間培養した。培養終了後, 遠心にて集菌し, 沈殿を [50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100 μ g/ml RNase, pH8.0] 0.3ml で懸濁した。懸濁液にアルカリ溶液 [200mM 水酸化ナトリウム (NaOH), 1% SDS] 0.3ml を加えて室温で 5 分間放置して細胞質を溶解した。この混合液に 3M 酢酸カリウム, pH5.5, を 0.3ml 加えて 10 分氷冷して液を中性化し, 遠心して沈殿を除去した後, 上清を QIAGEN-tip20 (QIAGEN, Chatsworth, USA) カラムに重層した。プラスミドが吸着したカラムを 1M NaCl, 50mM 3-N-モルホリノ-プロパンスルホン酸 (3-N-Morpholino-propanesulfonic acid, MOPS), 15% エタノール, pH7.0 にて 2 回洗浄後, 1.25M NaCl, 50mM Tris-HCl, 15% エタノール, pH8.5 にてプラスミドを溶出した。プラスミド溶出液に等量のイソプロパノールを加えて良く混和し, 15,000rpm, 30分遠心してプラスミドを沈殿させた。プラスミドの沈殿を Tris EDTA (TE) (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) で 1mg/ml の濃度に溶解した。

3. DNA シーケンス

上記のごとく調製したプラスミド DNA をアルカリ変性し, [³²S] dATP (Amersham, Buckinghamshire, UK) とシーケナーゼ・バージョン 2.0 キット (USB, Cleveland, USA) を用いてジデオキシン法で塩基配列を決定した。

Ⅳ. MMP-X1 遺伝子のクローニング

1. プロープの作製

PCR 法で増幅された MMP-X1 遺伝子断片 25ng をマルチプライム・ラベリング・キット (Amersham) にて [³²P] dCTP (Amersham) を用いて標識し, 2.0-5.0CPM/ μ g の比活性を持つプロープを得た。

2. 一次スクリーニング

ヒト胎盤 λ gt11 cDNA ライブラリー (Clontech, Palo Alto, USA) を 4 \times 10⁴ プラーク形成単位/15cm プレートの濃度に SM (100mM NaCl, 10mM 硫酸マグネシウム, 50mM Tris-HCl, 0.01% ゼラチン, pH7.5) にて希釈した。希釈ファージ溶菌液を 37 $^{\circ}$ C で 12 時間培養した大腸菌 Y1090 株に 37 $^{\circ}$ C で 15 分間感染させ, 0.7% アガロース-2 倍濃度 YT 培地と混和し, 15cm プレートに予め播いておいた LB 培地上に播いて 37 $^{\circ}$ C で 12 時間培養した。ファージ DNA をハイボンド N メンブラン (Amersham) に転写し, 転写後のメンブランを室温にて変性溶液 (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) で 1 分間処理し, 続いて室温にて中和溶液 (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH7.5) で 15 分間処理した。処理後のメンブランをラピッドハイブリッドバッファ

(Amersham) にて 3 時間プレハイブリダイゼーションした。プレハイブリダイゼーション後, N-1 のプロープを加え, 65 $^{\circ}$ C で 12 時間反応させた。反応の終了したメンブランをまず 2 倍濃度 SSC-0.1% SDS にて室温で洗浄し, 0.2 倍濃度 SSC-0.1% SDS にて 55 $^{\circ}$ C で 30 分間の洗浄を 2 回行った。洗浄後のメンブランは -80 $^{\circ}$ C で 12 時間のオートラジオグラフィーを行った。

3. 二次スクリーニング

一次スクリーニングの結果から, 陽性プラークを 10-100 プラーク形成単位/10cm プレートの濃度に SM にて希釈し, 一次スクリーニングと同様な方法でスクリーニングを行った。

4. ファージ DNA の大量調製

二次スクリーニングの結果から, 陽性プラークのファージ DNA の大量調製を行った。すなわち, 陽性プラークのファージを N-2 で行ったように LB 培地上に播き 37 $^{\circ}$ C で 12 時間培養した。培養後, SM でファージを溶出して高濃度のファージ溶菌液を得た。このファージ溶菌液に 37 $^{\circ}$ C で 12 時間培養した Y1090 株を感染させ, 250ml の 2 倍濃度 YT 培地に 12 時間振盪培養した。培養液を 10,000rpm, 10 分遠心して沈殿物を除去し, この上清を 10% ポリエチレングリコール-6,000, 1M NaCl となるよう調製し, 1 時間氷冷した。氷冷後, 10,000 rpm, 30 分遠心して上清を捨て, 沈殿物を SM で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 20 $^{\circ}$ C, 35,000rpm, 4 時間遠心した。遠心後, ファージ DNA 分画を慎重に回収し, ベックマン SW50i ローターにて 20 $^{\circ}$ C, 35,000rpm, 2 時間遠心した。沈殿を SM にて溶解後, フェノール抽出, エタノール沈殿を行いファージ DNA を TE で溶解した。

5. ファージ DNA の解析

上記で得られたファージ DNA をクローニング部位である EcoRI で切断すると 3.4k 塩基対 (base pair, bp) の cDNA が得られた。この DNA 断片をプラスミドベクターブルースクリプトへ挿入しシーケンス反応を行った。

V. 膜型 MMP (membrane type-MMP, MT-MMP) 遺伝子発現の解析

1. ノーザンブロット法¹⁶⁾

一検体につき 10 μ g の RNA を用い, これを 50% ホルムアミド (ナカライテスク, 京都), 17.5% のホルマリンを含む 2% MOPS, pH7.5 に溶解し 65 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた後, 1.0% アガロースゲルで 2% MOPS 中に電気泳動を行った。泳動終了後のゲルをハイボンド N メンブラン (Amersham) に転写した。転写後のメンブランは UV ストラターリンカー 1800 (フナコシ, 東京) を用いて波長 254nm の紫外線 1200 マイクロジュールを照射し, RNA をメンブランに固定した。このメンブランとヒト組織ノーザンブロットメンブラン (Clontech) を 50% ホルムアミド, 4 倍濃度 SSC, 5 倍濃度デンハルト液 [0.2% ポリビニールピロリドン, 0.2% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA), 0.2% フィコール], 0.1% SDS, 20 μ g/ml 変性サケ精子 DNA (ベーリンガー・マンハイム山之内, 東京) からなるプレハイブリダイゼーション液 10ml と 42 $^{\circ}$ C で 6 時間反応させた。反応後この液を捨て, EcoRI で切り出される 3.4kbp の MT-MMP cDNA を上記の方法で標識したプロープを 1ml のプレハイブリダイゼーション液に加えたものとメンブランを 16 時間反応させた。反応終了後, フィルターを 2 倍濃度 SSC-0.1% SDS にて室温で洗浄し, 0.2 倍濃度 SSC-0.1% SDS

にて 55℃ で30分間の洗浄を2回行い、12時間のオートラジオグラフィを行った。

VI. MT-MMP 遺伝子産物の同定

1. 遺伝子導入

EcoRI で切り出される 3.4kbp の MT-MMP cDNA を発現プラスミド pSG-5 (東洋紡) に組み込み、プラスミドの少量調製と同じ方法で2倍濃度 YT を 250ml で、QIAGEN-tip500 を使いプラスミドの大量調製を行った。プラスミドの沈殿は TE にて 1mg/ml の濃度に溶解した。

遺伝子産物の解析に用いる細胞は 35mm プラスチックディッシュ (FALCON) に約 1.0×10^6 個/ml の濃度で 5% FCS 加 DMEM 2ml にて 37℃, 24時間培養後、Chen らのリン酸カルシウム法変法¹⁹⁾ にて遺伝子導入を行った。すなわち、MT-MMP, I 型メタロプロテナーゼ組織阻害因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase type-1, TIMP-1) 発現プラスミド DNA および対照として pSG-5 プラスミド DNA 計 2 μ g を 0.25M 塩化カルシウム (CaCl₂) 60 μ l に混和し、その混合液に2倍濃度 N, N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノ-エタンスルホン酸 [N, N-bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethanesulfonic acid, BES] 緩衝液 (BES-buffered saline, BBS) (280mM NaCl, 50mM BES, 2.8mM リン酸水素二ナトリウム, pH7.9) 62.5 μ l を加え、室温で15分間静置した後、上記培養細胞に加え CO₂ 濃度3% の条件下にて 37℃, 24時間培養した。培養後、ハンクス液 (Hanks balanced salt solution) にて2回洗浄し、5% FCS 加 DMEM 2ml で 37℃, 24時間培養した。

2. 免疫沈降法

MT-MMP, TIMP-1 発現プラスミドおよび対照として pSG-5 プラスミドを遺伝子導入した COS-1 細胞をハンクス液で2回洗浄し、メチオニン無 DMEM に [³⁵S] 標識メチオニンを加えた培養液で3時間培養してその産生物を標識した。細胞を PBS にて洗浄後、細胞溶解液 [50mM Tris-HCl, pH7.4, 5mM EDTA, 50mM NaCl, 2.25mM DTT, 0.02% アジ化ナトリウム (NaN₃), 0.5% ノニデット (Nonidet P-40, NP-40), 5 μ g/ml フッ化フェニルメチルスルホニル (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)] にて溶解し、10,000rpm, 10分遠心により不溶物を除去した。培養上清も遠心により沈殿物を除去した。遠心にて精製した細胞溶解質および培養上清を抗 MT-MMP 抗体 (113-5B7, 114-1F2, 118-3B1), 抗 TIMP-1 抗体 (α -TIMP-1) (富士薬品工業, 高岡) あるいはコントロールの抗体を用い 4℃ で16時間免疫沈降させた。免疫複合体をプロテイン A セファロース粒子 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) に吸着させ、洗浄した後、試料溶解液 [50mM Tris-HCl, pH6.5, 10% グリセロール, 2% SDS, 2% 2-メルカプトエタノール, 0.1% ブロモフェノールブルー (bromophenol blue, BPB)] で溶出して 10% SDS-PAGE を行った。泳動後、ゲルを乾燥して12時間オートラジオグラフィを行い、細胞産生物を検査した。

3. 免疫染色

MT-MMP 発現プラスミドおよび対照として pSG-5 プラスミドをチャンバースライド (Nunc, Naperville, USA) 上で培養した COS-1 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入後の細胞を PBS-3% BSA にて3回洗浄し、抗 MT-MMP 抗体 (113-5B7) を 5 μ g/ml 含む PBS-3% BSA にて 37℃, 40分間培養した。培養後、細胞を PBS-3% BSA で3回洗浄してアセトンにて固定し、1,500倍希釈のフルオレセインイソチオシアネート

(fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗マウス IgG (Cappel, West Chester, USA) で 37℃, 30分間反応させて MT-MMP の発現を観察した。

VII. MT-MMP のゼラチナーゼへの影響

1. ゼラチンゼイモグラフィ

材料を試料溶解液 (50mM Tris-HCl, pH6.5, 10% グリセロール, 2% SDS, 0.1% BPB) と混和して 0.1% ゼラチンを含むゲルで SDS-PAGE を行った。泳動終了後、ゲルを 2.5% トライトン-X にて30分間室温で2回洗浄し、反応液 (50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, 0.02% NaN₃) にて 37℃, 24時間反応させた。反応後、ゲルを染色液 [30% エタノール, 10% 酢酸, 0.3% コーマスプリリアントブルー G-250 (Sigma, St. Louis, USA)] にて室温で5時間染色し、30% エタノール, 10% 酢酸にて脱色してゼラチン分解能を観察した。

VIII. MT-MMP 遺伝子導入細胞の膜分画の解析

1. 細胞膜分画の調製

MT-MMP 発現プラスミドおよび対照として pSG-5 プラスミドを遺伝子導入した COS-1 細胞を PBS にて2回洗浄し混和液 (25mM Tris-HCl, pH7.4, 50mM NaCl, 8.5% ショ糖) にて回収し、ホモジナイザーにて細胞を破壊した。細胞溶解液をベックマン SW50i ローターにて 4℃, 40,000rpm, 2時間遠心した後、沈殿を混和液にて混和した。この混和液を濃度勾配ショ糖溶液に重層してベックマン SW40Ti ローターにて 4℃, 40,000rpm, 12時間遠心した。細胞膜分画を採取し、ベックマン SW50i ローターにて 4℃, 40,000rpm, 2時間遠心後、沈殿を 25mM HEPES/KOH, 0.1mM CaCl₂ にて溶解した。

2. ウェスタンブロット法

Ⅷ-1. で得た細胞膜分画 20 μ g を Ⅷ-2 の試料溶解液で溶解し、SDS-PAGE を行った。泳動後のゲルをハイボンド-ECL フィルター (Amersham) に転写し、TBS (20mM Tris-HCl, pH7.6, 137mM NaCl) 加 3% BSA にて室温で1時間ブロッキングした。続いて、フィルターを抗 MT-MMP 抗体を 5 μ g/ml 含む TBS-3% BSA にて室温で12時間反応させた。反応後、フィルターを PBS-3% スキムミルク (Gifco, Detroit, USA) で洗浄して西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 結合抗マウス IgG (Cappel) 5 μ g/ml を含む PBS-3% スキムミルクで室温にて1時間反応させた。フィルターを PBS-3% スキムミルクで洗浄した後、ECL ウェスタンブロットング検知液 (Amersham) で反応させ、1分間オートラジオグラフィを行った。

成 績

I. MT-MMP 遺伝子の単離

1. プライマーの設計

MMP 間でアミノ酸配列の保存性が高いプロペプチド、キャタリティックエンザイムドメインに着目し、その中で最も保存性の高い7部位を選択した。この7部位に対応する混合プライマーを図1のように設計し、DNA 合成機にて合成した。

2. MMP 遺伝子の増幅

ヒト生検材料 (胎盤, 口腔悪性黒色腫, 肺腺癌) とヒト細胞株 [HT1080 細胞, 12-O-テトラデカノイルホルボル-13-アセテート (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) 24時間処理 U937 細胞] より抽出した RNA から作製した cDNA を鋳型として7通りのプライマーの組み合わせ (5P-1/3P-2, 5P-2/3P-1,

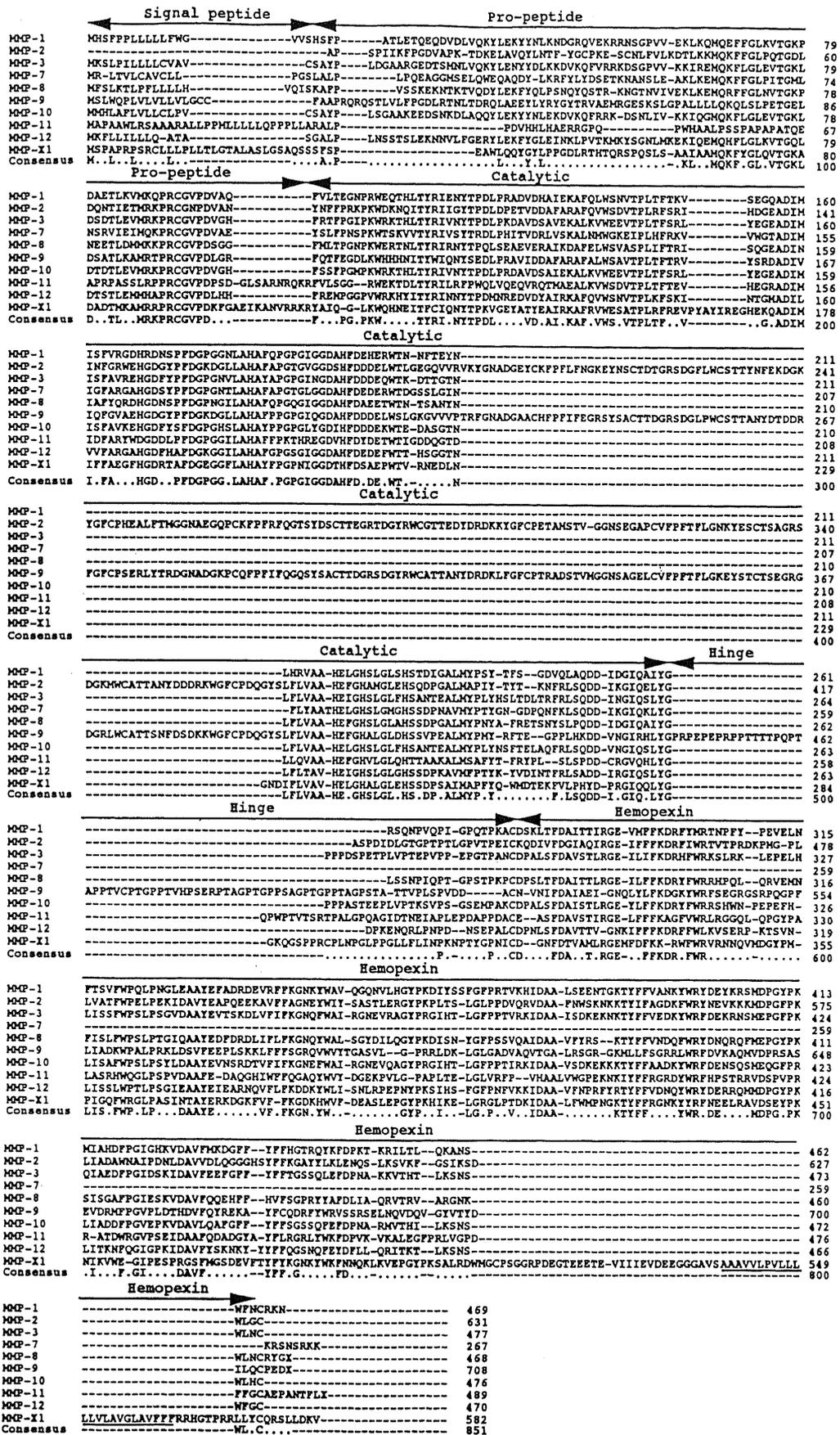


Fig. 3. Alignment of MMP amino acid sequences. All the reported human MMPs are listed and aligned with the deduced MMP-X1 protein. The hydrophobic stretch at the C-terminus of MMP-X1 protein is underlined.

からなる蛋白質がコードされるオープンリーディングフレームが認められた(図2)。予想されるこの遺伝子産物には MMP に特徴的なアミノ酸配列が保存されているだけでなく、MMP ファミリーに共通なドメイン構造も存在していた。しかも、そ

のカルボキシル末端付近に既知の MMP には存在しない、24の疎水性アミノ酸が連続した細胞膜貫通構造と予想される領域を有していた(図3)。この遺伝子産物は分泌型である既知の MMP には存在しない細胞膜貫通構造を持つことから、膜介在

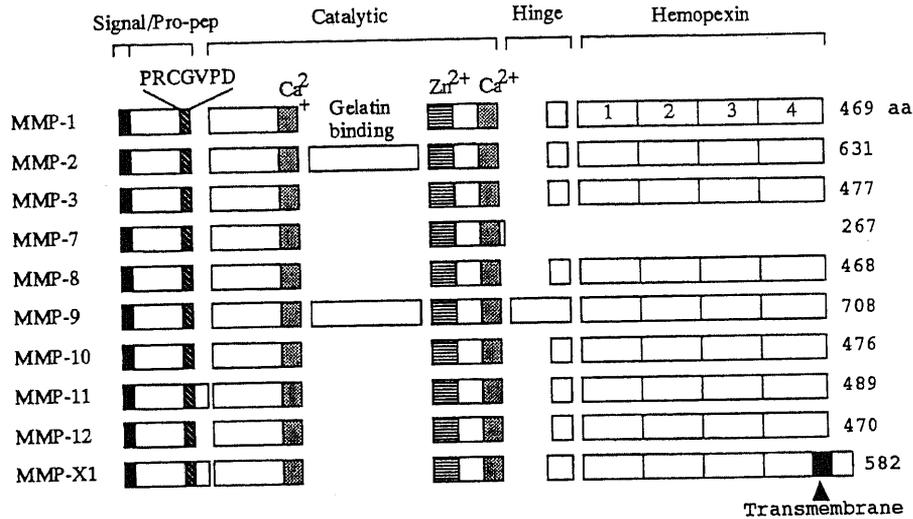


Fig. 4. Schematic illustration of the domain structures of MMPs. Signal, signal peptide; Pro-pep, pro-peptide domain that is necessary to keep enzymes latent; PRCGVPD, essential and most conserved sequence in the propeptide domain that is necessary to mask the active site of enzymes; Catalytic, core domain essential for enzymatic activity; Ca²⁺, deduced Ca²⁺-binding sites; Zn²⁺, Zn²⁺-binding site; Gelatin binding, gelatin binding domains of two gelatinases (MMP-2 and-9); Hinge, Proline-rich sequence potentially functioning as a hinge region; Hemopexin, hemopexin-like repeat; TM, potential transmembrane domain characteristic of MMP-X1 protein.

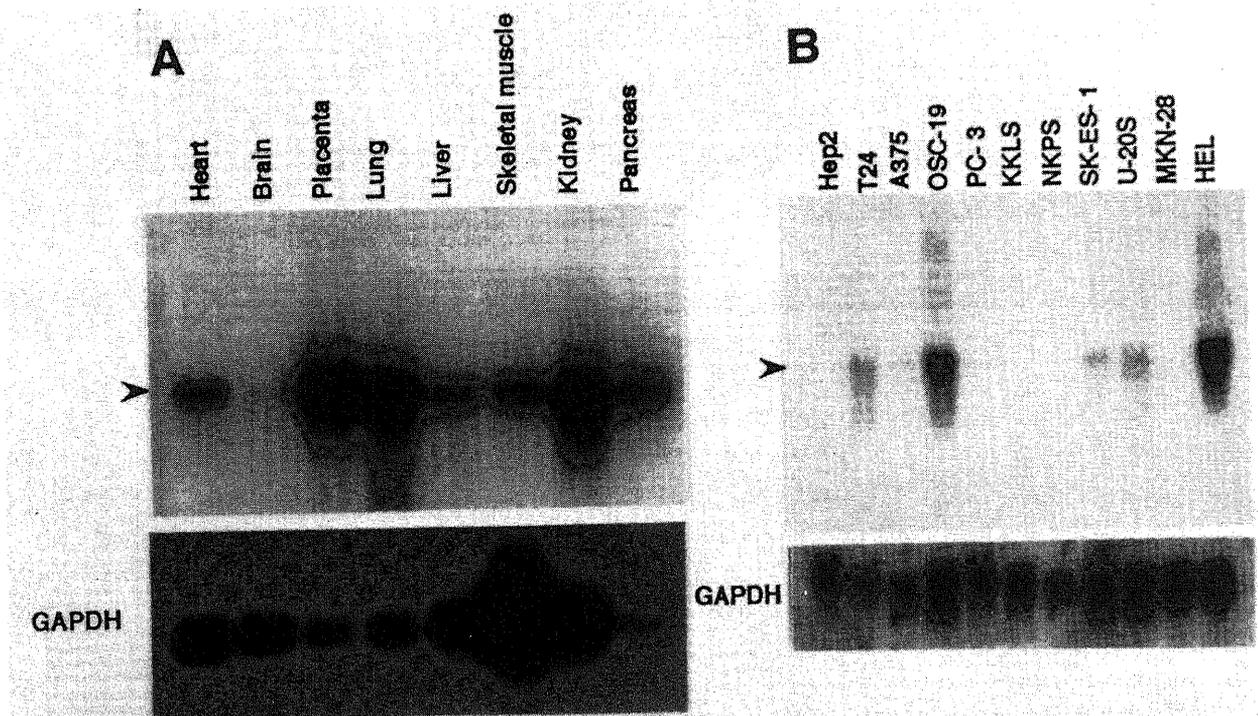


Fig. 5. Expression of the MMP-X1 gene. (A) Expression in human tissue. A northern blot was obtained from Clontech Ltd., and probed with ³²P-labeled MT-MMP cDNA according to the manufacturer's instructions. The tissues from which samples were extracted, are indicated. Specific signals at 4.5 kbp are marked by an arrow. The blot was reprobed with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-encoding gene fragment. (B) Expression in cultured cells. RNA samples (10 μg) obtained from cultured cells were electrophoresed and transferred to membrane as described in "Materials and Methods". HEp2, larynx carcinoma cells; T24, bladder carcinoma cells; A375, melanoma cells; OCS-19, squamous cell carcinoma cells; SK-ES-1 and MKN-28, gastric carcinoma cells; HEL, fibroblast cells.

型の蛋白であることが示唆された (図 4). よって, この新しい MMP を膜型 MMP (membrane type-MMP, MT-MMP) と命名した²²⁾.

II MT-MMP 遺伝子発現の解析

実際に MT-MMP mRNA がヒト組織, 細胞株において発現しているか, ノーザンブロットハイブリダイゼーション法にて検討した. MT-MMP mRNA の発現は, 検討したほとんどの臓器で 4.5kbp のメッセージとして検出され, 胎盤, 肺, 腎臓では特に強い発現が認められた. また, 脳における発現は検討した臓器の中で最も弱かった (図 5 A).

細胞株においては, 扁平上皮癌 OSC-19 細胞, 胎児肺線維芽細胞 HEL 細胞で MT-MMP mRNA が比較的強く発現していた (図 5 B).

III. MT-MMP 遺伝子産物の同定

1. MT-MMP 遺伝子導入細胞の細胞産物の検討

MT-MMP 遺伝子産物を同定するため, MT-MMP 遺伝子を導入した COS-1 細胞を用いて抗 MT-MMP 抗体 (319-333 アミノ酸残基, CDGNFDTVAMLRGEM を認識する 113-5B7 抗体; 160-173 アミノ酸残基, REVVPYAYIREGHEK を認識する 114-1F2 抗体; 498-512 アミノ酸残基, PKSALRDWMGCPSGG を認識する 118-3B1 抗体) で免疫沈降実験を行った.

図 6A に示したように, MT-MMP 遺伝子導入細胞の細胞溶解液からのみ, アミノ酸配列から予想された分子量に相当する 63kDa の蛋白が検出された. この 63kDa の蛋白は認識するエピトープの異なる 3 種類の単クローン抗体によって共通に沈降することから, 63kDa の蛋白は MT-MMP 遺伝子産物であると結論した. また, 図 6B に示したように, 分泌型蛋白である

TIMP-1^{23,24)} が培養上清と細胞溶解液の両方から検出されたのに対し, MT-MMP は培養上清中からは検出されなかった.

2. 免疫染色

MT-MMP が細胞表面に発現していることを確認するため, MT-MMP 発現プラスミドおよび対照として pSG-5 プラスミドを遺伝子導入した細胞を未固定で抗 MT-MMP 抗体により蛍光抗体法にて免疫染色した.

図 7 に示したように, MT-MMP 発現プラスミドを遺伝子導入した未固定細胞はその細胞表面が染色されるのに対して, 対照群は染色されなかった. このことから MT-MMP が細胞表面に発現していることが確認された.

IV. MT-MMP の前駆体 MMP-2 活性化能

1. MT-MMP 遺伝子導入細胞による前駆体 MMP-2 活性化能
癌細胞の表面で活性化される前駆体 MMP-2 の活性化因子が膜結合型のメタロプロテナーゼであるという報告²⁵⁻²⁷⁾ をもとに, MT-MMP がこの前駆体 MMP-2 活性化因子である可能性を検討した.

MT-MMP 遺伝子導入によるゼラチナーゼ (MMP-2 と MMP-9) への影響を検討するため, 前駆体 MMP-2 と前駆体 MMP-9 産生細胞であるヒト線維肉腫 HT1080 細胞とマウス線維芽細胞 NIH3T3 細胞に MT-MMP 遺伝子を導入した. ゼラチナーゼの活性はゼラチンゲイモグラフィにて観察した^{28,29)}.

MMP-2 は他の MMP と同様に不活性化型 MMP-2 (前駆体 MMP-2) として細胞上清中に分泌される. この前駆体 MMP-2 の活性化はその産生細胞である HT1080 細胞をコンカナバリン A (concanavalin A, ConA) で処理することで起こることが知られている²⁸⁻³⁰⁾. 酵素活性をゼラチン分解能により検出するゼラ

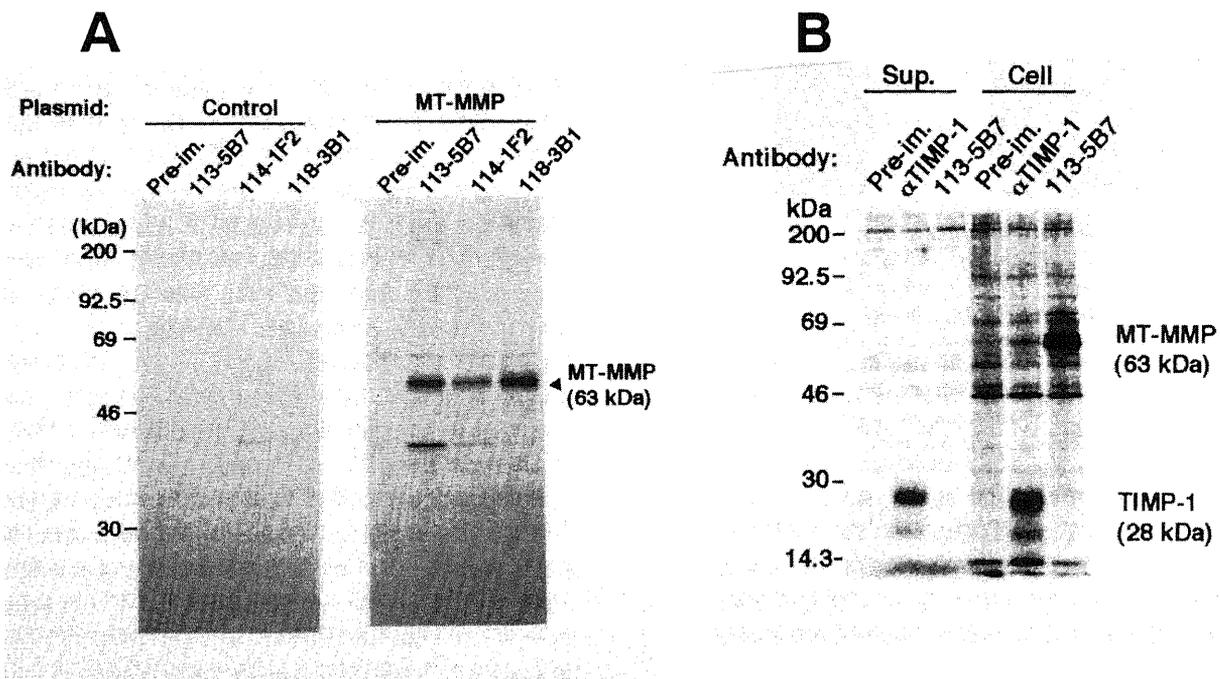


Fig. 6. Detection of the MT-MMP gene product. (A) COS-1 cells transfected with MT-MMP expression plasmid (MT-MMP) or vector plasmid (control) were labeled with [³⁵S]-methionine and analyzed by immunoprecipitation with monoclonal antibodies (antibodies 113-5B7, 114-1F2 and 118-3B1) raised against synthetic MT-MMP peptides or pre-immune mouse IgG (Pre-im.) as described in "Materials and Methods". (B) COS-1 cells were co-transfected with MT-MMP and TIMP-1 plasmid as a secretory protein. Culture supernatant (Sup) and cell lysates (Cell) were immunoprecipitated with antibodies against MT-MMP (113-5B7) and TIMP-1 (α TIMP-1), and with pre-immune IgG (Pre-im.).

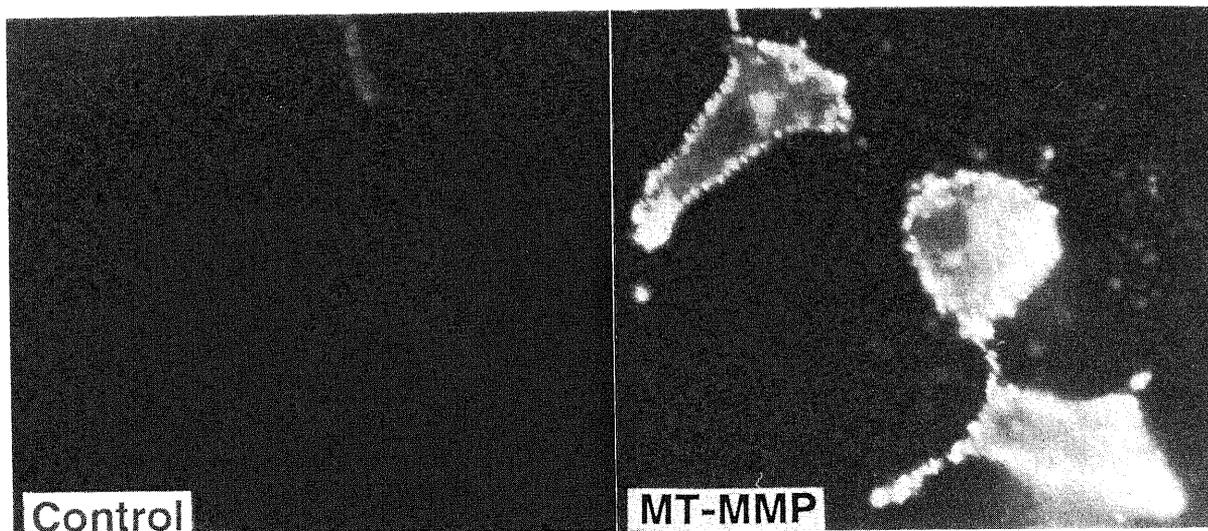


Fig. 7. Immunostaining. COS-1 cells transfected with MT-MMP (MT-MMP) or vector plasmid (Control) were stained without fixation using antibody 113-5B7 and goat anti-mouse IgG antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC).

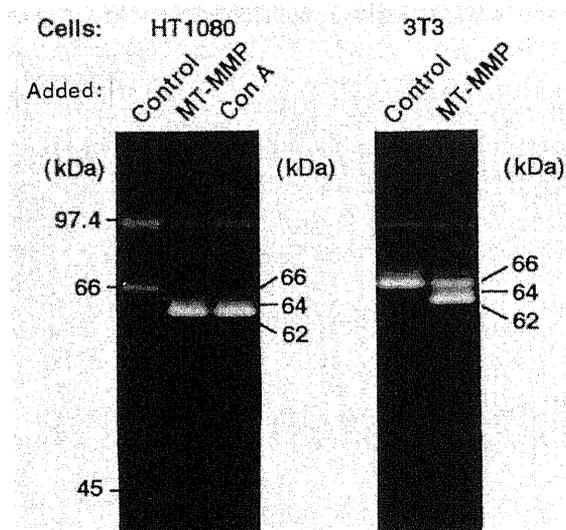


Fig. 8. Processing of latent MMP-2 by MT-MMP expression. Gelatin zymography of conditioned medium of HT1080 cells and NIH3T3 cells. HT1080 cells were transfected with MT-MMP plasmid (MT-MMP), vector plasmid (control), or treated with 100 μ g/ml ConA. NIH3T3 cells were also transfected with MT-MMP plasmid (MT-MMP), vector plasmid (control). Aliquots of conditioned medium were analyzed by gelatin zymography as described in "Materials and Methods".

チンゲイモグラフィーを用いて、実際に ConA 処理 HT1080 細胞による前駆体 MMP-2 の活性化を調べた。その結果、図 8 に示したように HT1080 細胞を ConA で処理すると前駆体 MMP-2 (66kDa) が活性化中間体 (64kDa) と活性型 (62kDa) の 2 本のバンドに変換された。

一方、MT-MMP 遺伝子を導入した HT1080 細胞からは MMP-2 活性化中間体と活性型にそれぞれ対応する 64kDa と 62kDa のバンドが検出された。しかし、対照として pSG-5 プラスミドを遺伝子導入した細胞からは前駆体 MMP-2 と前駆体 MMP-9 に相当するバンドは認められたが、活性化された

MMP-2 は検出できなかった。また、NIH3T3 細胞に MT-MMP 遺伝子を導入すると、66, 64, 62kDa と 3 本のバンドが認められるのに対し、対照としての pSG-5 プラスミド遺伝子導入細胞では前駆体 MMP-2 に相当する 66kDa のバンドのみが検出された。以上より、両細胞に MT-MMP 遺伝子を導入すると ConA 処理と同様の前駆体 MMP-2 の変化 (活性化) が誘導された。

2. MT-MMP 遺伝子導入細胞の膜分画による前駆体 MMP-2 活性化

ConA 処理によって起こる前駆体 MMP-2 の活性化作用は細胞膜分画に存在するとの報告^{25)~27)}から、MT-MMP 遺伝子導入細胞の細胞膜分画を調製し、細胞膜分画における前駆体 MMP-2 活性化能の存在を検討した。まず、MT-MMP 遺伝子を導入した COS-1 細胞の膜分画に MT-MMP が存在することをウエスタンブロット法を用いて検証した。

図 9A に示したように、MT-MMP 遺伝子を導入した COS-1 細胞の膜分画には 63kDa の MT-MMP が存在するのに対し、対照としての pSG-5 プラスミド遺伝子導入細胞の膜分画からは何も検出されなかった。

MT-MMP が細胞膜分画に存在することから、この膜分画が HT1080 細胞の培養上清中の前駆体 MMP-2 を活性化する可能性を検討した。ゼラチナーゼ活性はゼラチンゲイモグラフィーにて調べた。

図 9B に示すように、MT-MMP 遺伝子を導入した細胞の膜分画はゼラチン分解能を示さなかった。MT-MMP 遺伝子導入細胞の膜分画と HT1080 細胞の培養上清を反応させると 64kDa と 62kDa のバンドが認められた。このバンドは ConA 処理 HT1080 細胞により前駆体 MMP-2 が活性化される際に検出されるバンドに相当する。HT1080 細胞の培養上清単独でも、あるいは対照としての pSG-5 プラスミド遺伝子導入細胞の膜分画と培養上清を反応させてもこのバンドは検出されなかった。また、両細胞膜分画は前駆体 MMP-9 に影響を及ぼさなかった。以上の結果から、MT-MMP と前駆体 MMP-2 活性化因子が細胞膜分画に一致して共存することが示された。

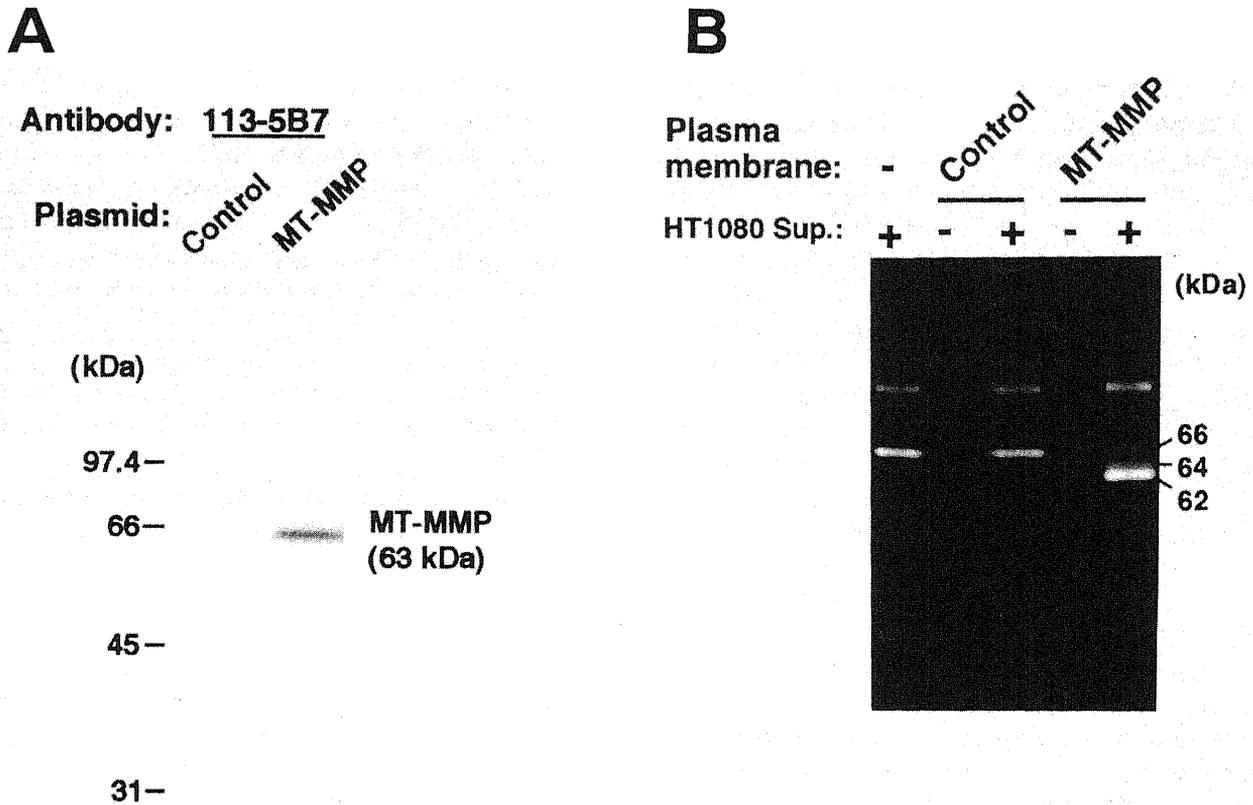


Fig. 9. Processing of latent MMP-2 with plasma membrane fraction of MT-MMP transfected cells. (A) Western blotting of plasma membrane fractions. The plasma membrane fractions were prepared from the COS-1 cells transfected with MT-MMP (MT-MMP) and vector (control) plasmid, and analyzed by western blotting as described in "Materials and Methods". (B) Gelatin zymography of plasma membrane preparations. Plasma membrane fractions of COS-1 cells transfected with MT-MMP (MT-MMP) or vector (control) plasmid were incubated with (+) or without (-) conditioned medium from HT1080 cells. After incubation, these samples were analyzed by gelatin zymography.

考 察

未知の MMP 遺伝子を単離するために、RT-PCR 法によって様々な組織で発現している MMP 遺伝子の増幅を行った。解析した168クローンのうち112クローンは既知の MMP 遺伝子であった。単離された MMP 遺伝子は MMP-1 が 31%、MMP-2 が 37%、MMP-3 が 14% であり、大部分がこの3種の MMP 遺伝子で占められていた。この結果は多くの腫瘍や組織においてこの3種の MMP 遺伝子が最も多く発現しているという報告と一致する³⁰⁾。しかし、この方法では胎盤組織において大量に発現している MMP-11 遺伝子²⁰⁾は検出されなかった。また、好中球コラゲナーゼ/MMP-8 遺伝子³²⁾もこの方法で検出できなかった。

胎盤組織から得られた5クローンは MMP 遺伝子と相同性を持つ新しい MMP 遺伝子の cDNA 断片と思われた。この cDNA 断片をプローブとしてヒト胎盤 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、3.4kbp の cDNA の単離に成功した。この cDNA にコードされる蛋白質には MMP の間で特徴的なアミノ酸配列や共通なドメイン構造が存在していた。この蛋白質の特徴として3つの挿入配列を有していることが挙げられる。1つはプロペプチドドメインに MMP-11 と同様な10アミノ酸の挿入配列が、キャタリティックエンザイムドメインに

も8アミノ酸の挿入配列が存在していた。最も興味あるものがカルボキシル末端付近の約60アミノ酸からなる挿入配列で、この挿入配列は細胞膜を貫通するのに十分な24の疎水性アミノ酸が連続した細胞膜貫通構造と予想される領域を有していた。分泌型の既知の MMP には存在しない細胞膜貫通構造をこの蛋白質が有していることから、この新しい MMP を MT-MMP と命名した。

MT-MMP mRNA はヒト組織において 4.5kbp のバンドとして広範に発現が認められ、特に胎盤、肺、腎臓で強い発現が認められた。種々の細胞株においてもその発現が認められたが、由来臓器や細胞型等に特徴的な事項は認められなかった。組織浸潤の活発な胎盤組織で特に高く MT-MMP mRNA が発現していることから、MT-MMP は組織浸潤に重要な役割を担っていると思われた。

MT-MMP 遺伝子産物は遺伝子導入細胞で 63kDa の蛋白として検出されたが、膜蛋白であるとの予想通りに培養上清中からは検出されなかった。また、MT-MMP 遺伝子導入細胞を未固定で免疫染色することにより、MT-MMP が細胞表面で発現していることが確認された。

癌細胞の浸潤・転移に対する物理的障害である基底膜の主成分であるⅣ型コラーゲンを基質とするⅣ型コラゲナーゼ (MMP-2 と MMP-9) は、癌細胞の浸潤・転移に最も関係深い細

胞外マトリックス分解酵素と考えられている¹⁰³⁾。中でも MMP-2 の過剰発現は乳癌、大腸癌、胃癌など多くの悪性腫瘍組織で報告されてきた^{39)~37)}。その発現は浸潤した癌組織に近接した間質線維芽細胞に局在³¹⁾⁴³⁾しており、試験管内実験では癌細胞の浸潤偽足の細胞膜表面に MMP-2 が結合しているとの報告³⁸⁾³⁹⁾もある。また、高浸潤性の肺癌および乳癌組織では活性型 MMP-9 よりも活性型 MMP-2 が高頻度に見られることなどから、活性型 MMP-2 の増大は癌細胞の浸潤・転移能獲得と相関すると報告されている⁴⁰⁾⁴¹⁾。プラスミン、トリプシン、カテプシン G 等のセリンプロテナーゼは前駆体 MMP-1, 前駆体 MMP-3, 前駆体 MMP-9 を活性化するが前駆体 MMP-2 を活性化できないことから、前駆体 MMP-2 は異なった活性化機構を持つと想定されていた¹²⁾。また、前駆体 MMP-2 の活性化は癌細胞表面で起こることが報告されている²⁷⁾²⁸⁾。この前駆体 MMP-2 活性化因子は未知の膜結合型メタロプロテナーゼであると予想されていた^{25)~27)}。MT-MMP は細胞膜に存在する MMP であるから、MT-MMP がこの前駆体 MMP-2 活性化因子である可能性が考えられた。HT1080 細胞を ConA で処理すると、前駆体 MMP-2 が活性化中間体と活性型へと活性化されることが知られている。HT1080 細胞に MT-MMP を発現させると ConA 処理と同様な前駆体 MMP-2 の変化が誘導された。MT-MMP 発現による前駆体 MMP-2 の活性化は HT1080 細胞でのみ起こる現象ではなく、NIH3T3 細胞においても認められた。また、MT-MMP は細胞膜分面に存在しており、この細胞膜分面でも前駆体 MMP-2 の活性化が誘導されることから MT-MMP が新しい蛋白合成を介さずに直接前駆体 MMP-2 を活性化する反応に関与していると考えられる。この結果は、これまで、未同定の前駆体 MMP-2 活性化因子が細胞表面で発現する膜結合型メタロプロテナーゼと考えられていたことと一致する。このことから、筆者が単離に成功した MT-MMP はその存在が予測はされていたが、未同定のままであった前駆体 MMP-2 活性化因子であると結論した。

前駆体 MMP-2 活性化因子である MT-MMP の単離に成功したことにより、周囲の間質細胞が主として産生する前駆体 MMP-2³¹⁾⁴³⁾ を癌細胞が浸潤先端部の膜上^{25)~27)}で MT-MMP により活性化し、効果的に ECM を分解して浸潤する機構¹²⁾を具体的に捉えるための研究が可能となったと考えられる。

結 論

RT-PCR 法を用いた新しい MMP 遺伝子単離法を開発して以下のような結果を得た。

1. 胎盤組織から新しい MMP 遺伝子をコードする 3.4kbp の cDNA (MMP-X1 遺伝子) を得た。
2. MMP-X1 遺伝子産物は MMP ファミリーに共通なドメイン構造を有しながらも、そのカルボキシル末端付近に24の疎水性アミノ酸が連続した細胞膜貫通構造と予想される領域を有していた。よって、この新しい MMP を膜型 MMP (membrane type-MMP, MT-MMP) と命名した。
3. MT-MMP 遺伝子発現は 4.5kbp のメッセージとしてヒト組織においては特に胎盤、次いで肺、腎臓で強く発現していた。
4. MT-MMP 遺伝子産物は細胞膜表面に 63kDa の蛋白として検出された。
5. MT-MMP が発現することにより、前駆体 MMP-2 の活

性が認められた。

6. MT-MMP の前駆体 MMP-2 活性化能は細胞膜に共存することが明かとなった。

以上の結果から、MT-MMP は未同定のままであった前駆体 MMP-2 活性化因子であると結論された。

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山本悦秀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賜りました金沢大学がん研究所ウイルス部清木元治教授、佐藤 博博士に深謝致します。また、貴重な御助言を賜りました金沢大学がん研究所ウイルス部田中淳之助教授、藤井雅寛博士、単クローン抗体を供与して頂いた富士薬品工業株式会社岩田和士博士、さらに多大なる御協力を賜りました金沢大学医学部歯科口腔外科学教室ならびに金沢大学がん研究所ウイルス部の皆様に感謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は、第52回日本癌学会総会(1993年、仙台)、第53回日本癌学会総会(1994年、名古屋)、第5回国際転移研究会(1994年、Bethesda, USA)にて発表した。

文 献

- 1) Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M. & Shafie, S.: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, 284, 67-68 (1980).
- 2) Liotta, L. A.: Tumor invasion and metastasis-role of the basement membrane. *Am. J. Pathol.*, 117, 339-348 (1984).
- 3) Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S. & Liotta, L. A.: Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 9, 541-73 (1993).
- 4) Tryggvason, K., Hoyhtya, M. & Pyke, C.: Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res. Treat.*, 24, 209-18 (1993).
- 5) Liotta, L. A.: Tumor invasion and metastasis-role of the extracellular matrix. *Cancer Res.*, 46, 1-7 (1986).
- 6) Liotta, L. A., Steeg, P. S. & Stetler-Stevenson, W. G.: Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 64, 327-336 (1991).
- 7) Matrisian, L. M.: Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.*, 6, 121-125 (1990).
- 8) Frederick Woessner, J. Jr.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, 5, 2145-2154 (1991).
- 9) Goldberg, G. I., Wilhelm, S. M., Kronberger, A., Bauer, E. A., Grant, G. A. & Eisen, A. Z.: Human fibroblast collagenase: complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J. Biol. Chem.*, 261, 6600-6605 (1986).
- 10) Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Kronberger, A., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Grant, G. A., Bauer, E. A. & Goldberg, G. I.: Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 6725-6729 (1987).

- 11) Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A. & Goldberg, G. I.: SV-40 transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophage. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17213-17221 (1989).
- 12) Okada, Y., Morodomi, T., Enghild, J. J., Suzuki, K., Yasui, A., Nakanishi, I., Salvesen, G. & Nagase, H.: Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 721-730 (1990).
- 13) Birkedal, H. H., Moore, W. G., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal, H. B., DeCarlo, A. & Engler, J. A.: Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **4**, 197-250 (1993).
- 14) Amberger, V. R., Paganetti, P. A., Seulberger, H., Eldering, J. A. & Schwab, M. E.: Characterization of a membrane-bound metalloendoprotease of rat C6 glioblastoma cells. *Cancer Res.*, **54**, 4017-4025 (1994).
- 15) Saiki, R. K., Gelfand, D. H. & Stoffel, S.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491 (1988).
- 16) Sato, H., Kida, Y., Endo, Y., Mai, M., Sasaki, T. & Seiki, M.: Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene*, **7**, 77-83 (1992).
- 17) Chen, C. & Okayama, H.: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2745-2752 (1987).
- 18) Collier, I. E., Wilhelm, S. M., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Grant, G. A., Seltzer, J. L., Kronberger, A., He, C., Bauer, E. A. & Goldberg, G. I.: H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6579-6587 (1988).
- 19) Muller, D., Quantin, B., Gesnel, M. C., Millon-Collard, R., Abecassis, J. & Breathnach, R.: The collagenase gene family in humans consists of at least four members. *Biochem. J.*, **253**, 187-192 (1988).
- 20) Basset, P., Belloq, J. P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J. M., Podhajcer, O. L., Chenard, M. P., Rio, M. C. & Chambon, P.: A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*, **348**, 699-704 (1990).
- 21) Shapiro, S. D., Kobayashi, D. K. & Ley, T. J.: Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.*, **268**, 23824-23829 (1993).
- 22) Takino, T., Sato, H., Yamamoto, E. & Seiki, M.: Cloning of a gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a C-terminal transmembrane domain. *Gene*, in press.
- 23) Carmichael, D. F., Sommer, A., Thompson, R., Anderson, D. C., Smith, C. G., Welgus, H. G. & Stricklin, G. P.: Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2407-2411 (1986).
- 24) Docherty, A. J. P., Lyons, A., Smith, B. J., Wright, E. M., Stephens, P. E., Harris, T. J. R., Murphy, G. & Reynolds, J. J.: Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*, **318**, 66-69 (1985).
- 25) Murphy, G., Wilenbrock, F., Ward, R. V., Cockett, M. I., Eaton, D. & Docherty, A. J.: The C-terminal domain of 72 kDa gelatinase A is not required for catalysis, but is essential for membrane activation and modulates interactions with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biochem. J.*, **283**, 637-641 (1992).
- 26) Strongin, A. Y., Marmer, B. L., Grant, G. A. & Goldberg, G. I.: 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).
- 27) Kleiner, D. J. & Stetler-Stevenson, W. G.: Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5**, 891-897 (1993).
- 28) Brown, P. D., Kleiner, D. E., Unsworth, E. J. & Stetler-Stevenson, W. G.: Cellular activation of the 72 kDa type IV procollagenase/TIMP-2 complex. *Kidney Int.*, **43**, 163-70 (1993).
- 29) Azzam, H. S. & Thompson, E. W.: Collagen-induced activation of the Mr 72,000 type IV collagenase in normal and malignant human fibroblastoid cells. *Cancer Res.*, **52**, 4540-4504 (1992).
- 30) Overall, C. M. & Sodek, J.: Concanavalin A produces a matrix-degradative phenotype in human fibroblasts. Induction and endogenous activation of collagenase, 72-kDa gelatinase, and Pump-1 is accompanied by the suppression of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, **265**, 21141-21151 (1990).
- 31) Stetler-Stevenson, W. G., Liotta, L. A. & Kleiner, D. E. Jr.: Extracellular matrix 6: Role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.*, **7**, 1434-1441 (1993).
- 32) Hasty, K. A., Pourmotabbed, T. F., Goldberg, G. I., Thompson, J. P., Spinella, D. G., Stevens, R. M. & Mainardi, C. L.: Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, **265**, 6600-6605 (1986).
- 33) Poulos, R., Pignatelli, M., Stetler, S. W., Liotta, L. A., Wright, P. A., Jeffery, R. E., Longcroft, J. M., Rogers, L. & Stamp, G. W.: Stromal expression of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am. J. Pathol.*, **141**, 389-96 (1992).
- 34) Stearns, M. E. & Wang, M.: Type IV collagenase (Mr 72,000) expression in human prostate: benign and malignant tissue. *Cancer Res.*, **53**, 878-883 (1993).
- 35) Urbanski, S. J., Edwards, D. R., Maitland, A.,

- Leco, K. J., Watson, A. & Kossakowska, A. E.: Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. *Br. J. Cancer*, **66**, 1188-1194 (1992).
- 36) Campo, E., Merino, M. J., Tavassoli, F. A., Charonis, A. S., Stetler-Stevenson, W. G. & Liotta, L. A.: Evaluation of basement membrane components and the 72 kDa type IV collagenase in serous tumors of the ovary. *Am. J. surg. Pathol.*, **16**, 500-507 (1992).
- 37) Campo, E., Merino, M. J., Liotta, L., Neumann, R. & Stetler-Stevenson, W. G.: Distribution of the 72-kd type IV collagenase in nonneoplastic and neoplastic thyroid tissue. *Hum. Pathol.*, **23**, 1395-401 (1992).
- 38) Emonard, H. P., Remacle, A. G., Grimaud, J. A., Stetler-Stevenson, W. G. & Foidart, J. M.: Tumor cell surface-associated binding site for the Mr 72,000 type IV collagenase. *Cancer Res.*, **52**, 5845-5848 (1992).
- 39) Monsky, W. L., Kelly, T., Lin, C. Y., Yeh, Y., Stetler-Stevenson, W. G., Mueller, S. C. & Chen, W. T.: Binding and localization of Mr 72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia. *Cancer Res.*, **53**, 3159-3164 (1993).
- 40) Brown, P. D., Bloxidge, R. E., Anderson, E. & Howell, A.: Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis*, **11**, 183-189 (1993).
- 41) Brown, P. D., Bloxidge, R. E., Stuart, N. S. A., Gatter, K. C. & Carmichael, J.: Association between expression of activated 72-Kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **85**, 574-578 (1993).
- 42) Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. & Seiki, M.: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature*, **370**, 61-65 (1994).

Molecular Cloning and Function of a Novel Matrix Metalloproteinase (MMP), Membrane Type-MMP (MT-MMP) Takahisa Takino, Department of Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. *Juzen Med Soc.*, **104**, 2-14 (1995)

Key words extracellular matrix (ECM), cancer metastasis, matrix metalloproteinase (MMP), membrane type-MMP (MT-MMP), gelatinase A (MMP-2)

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMP) are important enzymes responsible for the dissolution of extracellular matrix (ECM) structure during tumor invasion and metastasis. There are nine known MMP that are encoded by different genes. However, the complexity of the ECM components suggests that there are more MMP involved in the efficient turn-over of ECM. In addition, a membrane-bound MMP is postulated as an activator for inactive latent MMP-2. Thus, to identify such new MMP genes, cDNA were prepared from various sources and MMP gene fragments were amplified by reverse transcribed-PCR (RT-PCR) with degenerate oligo primers corresponding to the highly conserved amino acid residues among MMP family. Fragments were subcloned into a plasmid vector and nucleotide sequences of 168 clones were analyzed. 112 clones were of the known MMP genes and 5 clones were cDNA fragments of a new MMP gene, which were homologous with the MMP genes. A 3.4 k base pair (bp) cDNA was obtained from human placenta cDNA library by screening with this cDNA fragment as a probe. A long open reading frame that potentially encodes 582 amino acids was identified. The deduced gene product had similar domain structures to the known MMP and a unique 24 hydrophobic amino acids stretch (transmembrane domain), which is sufficient to pass through the plasma membrane, at the carboxyl terminus. This predicted transmembrane domain at the carboxyl terminus does not exist in other MMP. Thus, we call this product membrane type-MMP (MT-MMP). The product of MT-MMP gene was detected as a 63 kDa protein from the cells transfected with MT-MMP plasmid. Actually, immunostaining of the cells transfected with MT-MMP plasmid using anti-MT-MMP antibody revealed that MT-MMP expressed on the cell surface. Working on the knowledge that the expression of MT-MMP on the cell surface consisted with the activator of latent MMP-2 described previously, we investigated the function of MT-MMP as such an activator. Expression of MT-MMP results in conversion a latent MMP-2 (66 kDa) to an active form (62 kDa) through an intermediate form (64 kDa). These results suggested that MT-MMP is the activator for latent MMP-2.