京都大学	博士（医学）	氏　名	大村　彰
論文題目	RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits MMP-catalyzed cleavage of fibronectin. （RECK はカウベル型の二量体を形成し、MMP によるファイブロネクチンの切断を阻害する）		

（論文内容の要旨）

RECK（Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs）は *v-K-ras* 遺伝子により悪性転換した線維芽細胞株に形態的正常復帰を誘導するヒト cDNA として単離された。本遺伝子はセリン・プロテアーゼ・インヒビター様配列を含む分子量約 110 kDa の GPI アンカー型糖タンパク質をコードする。RECK の発現は、ヒトの多くの正常組織において認められるが、様々ながん遺伝子によって抑制される。RECK はマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）ファミリーのうち、MMP-2、MMP-9、および MT1-MMP を負に制御することが報告されている。また *Reck* ノックアウトマウスが細胞外マトリックス（ECM）の減少を伴う胎性致死形質を示すことから、RECK は ECM の分解を抑制する作用をもつと考えられる。がん細胞で RECK を強制発現させると、その悪性形質（血管新生、浸潤、転移など）が抑制される。また、様々な固形腫瘍において RECK の発現と良好な予後との間に相関が見られる。しかし、これら生物活性の生化学的基礎は十分には理解されていない。

本研究では、分泌型組換え体 RECK タンパク質 RECK-His を高度に精製し、その構造と活性を検討した。RECK-His は全長 RECK 配列から GPI アンカーシグナルを除去し、精製に利用するための His-tag を付加したタンパク質で、3 つの内在性遺伝子（MMP-2、 MT1-MMP、 RECK）を欠損させた変異マウス胚由来線維芽細胞株で発現させた。この細胞の培養上清より 4 段階の液体クロマトグラフィーによって RECK-His を精製（純度>90%）する方法を確立した。この RECK-His タンパク質は、ジスルフィド結合や糖鎖付加の状況から、正常に近い folding をもち、十分に糖修飾を受けたタンパク質と予測された。非変性 RECK-His は、ブルー・ネイティブ PAGE やゲル濾過クロマトにおける挙動から、二量体を形成することが示唆された。RECK を強制発現させたヒト線維肉腫細胞株（HT1080）を用いた解析から、全長 RECK も二量体として存在することが示唆された。

次に、透過型電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析（解像度 25.2Å）を試み、RECK-His 二量体が中空をもつ鈴状の構造をもつことが見出された。精製 RECK-His を用いた酵素学的解析からは、RECK-His が高濃度の MMP-2 や MMP-7 により切断されるが、低濃度の MMP-2 や MMP-7 には抵抗性で、これらの酵素による血清ファイブロネクチン（pFN）の切断を拮抗阻害することが見出された。MMP-7 は、プロテアーゼ・ドメインのみからなる MMP ファミリー中最小のメンバーであり、このことから RECK が多くの MMP ファミリー・メンバーを阻害する可能性が示唆された。また、HT1080 で RECK を強制発現させると、培養上清中および細胞溶解物中のファイブロネクチン（FN）量が増加した。この時、FN mRNA や FN 受容体（インテグリン $\alpha 5 \beta 1$）の発現上昇は見られず、低分子量 MMP インヒビターの添加によって同様の FN 増加が見られることから、RECK 発現に伴う FN 増加は、MMP 阻害による結果と考えられた。

本研究によって得られた組換え体 RECK タンパク質の産生系および精製法、RECK 二量体の立体構造の概要、また RECK が MMP-7 によるファイブロネクチンの切断を阻害するという知見は、今後の RECK 研究にとって有用な基礎を与えるものと考えられる。

（論文審査の結果の要旨）

悪性形質抑制因子 RECK は、3 種のマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP-2、MMP-9、MT1-MMP)を負に制御する GPI アンカー型糖タンパク質であり、多くの固形がんで発現が低下していること、転移・浸潤・血管新生抑制活性を持つこと、マウス発生に必須であることなどが知られている。

本研究において、申請者らは、分泌型組換え体 RECK タンパク質(RECK-His)をマウス線維芽細胞で発現させ、その培養上清から 4 段階の液体クロマトグラフィーによって高度に精製する方法を確立し、これを活用した実験から以下の知見を得た:

1)RECK タンパク質は生理的条件下では二量体を形成する。
2)RECK-His 二量体は中空な鈴状形態を持つ。
3)RECK-His は高濃度の MMP-2 や MMP-7 により切断されるが、低農度の酵素では切断されない。
4)RECK-His は MMP-2 や MMP-7 によるファイブロネクチンの切断を拮抗阻害する。
5)RECK の強制発現は細胞に結合したファイブロネクチン量を増加させる。

これらの結果より「RECK が MMP の拮抗阻害を介してファイブロネクチンを保護する」という新たな作用経路が示唆された。

以上の研究は、RECK の構造と機能の解明に貢献し、分子腫瘍学の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成 21 年 2 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降