

氏 名	お ね だ ひろ し 小 根 田 洋 史
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1166 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Studies on the Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinase 7 (Matrilysin) (ヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ7, マトリライシンの構造と機能に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 井 上 國 世 教 授 佐 々 木 隆 造 教 授 池 田 篤 治

論 文 内 容 の 要 旨

マトリックスメタロプロテイナーゼは動物の細胞外マトリックスタンパク質を分解する亜鉛金属プロテイナーゼであり、スーパーファミリーを形成している。本酵素群は生理学的には細胞の発生、分化および組織の形成、修復等に関与することが知られている。一方、組織破壊を伴う炎症や癌細胞の転移と浸潤に対する関与が示唆されている。マトリックスメタロプロテイナーゼ7（以下、マトリライシン）は大腸癌をはじめ前立腺癌、脳腫瘍等における過剰発現が認められており、これらの癌の転移と浸潤に関与する可能性がある。本研究はマトリライシン活性の阻害が癌の転移抑制に有効であると考え、阻害剤開発を視野に入れて構造と機能の相関性を明らかにしようとしたものである。その主な成果は以下のとおりである。

1. ヒト大腸癌由来プロマトリライシン遺伝子を大腸菌に発現させ、形成されたインクルージョンボディから簡便なプロマトリライシンの再生方法を開発した。インクルージョンボディを塩酸グアニジンで可溶化後、非イオン性界面活性剤またはアルギニンを添加した中性かつ低温の緩衝液に対して希釈することによりプロマトリライシンの再生量が顕著に増大することを明らかにした。再生溶液から一段階の陽イオン交換 HPLC により電気泳動的に均一なプロマトリライシン標品を得た。本法はグルタチオンを含む従来法よりも安価であり、再生効率が70%高いことが示された。

2. マトリライシンに4個存在するトリプトファン残基の蛍光特性を指標として、その存在状態と変性剤によるマトリライシンの変性を検討した。消光剤を用いたトリプトファン蛍光の消光から、トリプトファン残基は全て疎水的環境に埋もれて存在することが示された。蛍光を指標とした変性曲線から水中での変性の自由エネルギー変化を求めた。さらに変性剤によるマトリライシンの変性過程において不活性な中間体の存在が示唆された。

3. マトリライシンのペプチド性基質加水分解活性に対する有機溶媒、温度及び塩の効果を検討した。マトリライシン活性は本基質の溶剤として用いるジメチルスルホキシド (DMSO) により阻害され、その阻害様式は拮抗型と判断された。マトリライシンと基質および DMSO との結合はともにエントロピー駆動であることが示され、これらの結合における疎水的相互作用の重要な関与が示唆された。マトリライシン活性は塩濃度の増大に伴い指数関数的に増大し、この活性化はミカエリス定数 K_m の減少にのみ依存し、分子活性 k_{cat} には依存しないことが示された。このことから、塩は酵素・基質複合体の安定化に寄与することが示唆された。この塩による活性化と DMSO による阻害は互いに独立であることが示された。

4. マトリライシンとその活性中心の亜鉛に1価で配位するチオール型阻害剤 thiorphan および2価で配位するヒドロキサム酸型阻害剤 R-94138 との相互作用を検討した。阻害物質定数 K_i の温度依存性からマトリライシンと thiorphan との結合はエンタルピー駆動、一方、R-94138 との結合は基質と同じエントロピー駆動と判断され、疎水的相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。マトリライシン活性 k_{cat}/K_m と両阻害剤の K_i の pH 依存性は一致し、酵素活性と阻害剤の結合において同じ解離基が関与することが示唆された。 k_{cat}/K_m の pH 依存性は K_m の pH 依存性に由来することが示唆され、この解離基の候補として亜鉛ルイス酸またはグルタミン酸残基およびチロシン残基が考えられた。

5. マトリライシン活性に対する緑茶カテキン類およびその誘導体の効果を検討した。マトリライシン活性はガレート基

を有するカテキン類により顕著に阻害された。阻害様式からこれらのカテキンは、カテキン濃度に対して阻害が1相で起こり、高濃度域においても30%の活性が残存する(－)-カテキンガレートおよび(－)-エピカテキンガレートと阻害が2相で起こり、高濃度域において活性が完全に阻害される(－)-ガロカテキンガレートおよび(－)-エピガロカテキンガレートとの2つに分類された。これらはマトリライシン活性に対して0.3~0.6 μ Mの K_i を示し、緑茶の飲用は大腸癌をはじめとする癌の抑制に有効である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

マトリックスメタロプロテイナーゼは動物の細胞外マトリックスタンパク質を分解する亜鉛金属プロテイナーゼである。本酵素群は生理学のみならず病理学的にも重要であることが示唆されており、特に組織破壊を伴う炎症や癌の細胞の転移と浸潤に対する関与が示唆されている。本研究は有効な阻害剤の探索及び設計を視野に入れて、マトリライシンの構造と機能の相関性をタンパク質化学、反応速度論、分光学的手法を用いて分子レベルで解明したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 大腸菌発現系により形成されたインクルージョンボディからのプロマトリライシンの再生方法を検討し、非イオン性界面活性剤またはアルギニンを用いる簡便かつ高収率な再生方法を開発した。これにより本酵素の大量調製が可能となり、詳細な研究遂行の為の材料調製法が確立された。

2. トリプトファン残基の蛍光特性を指標にして、その存在状態とマトリライシンの安定性を検討した。蛍光特性および消光剤分子との反応性からマトリライシンの変性過程における不活性中間体の存在が示された。

3. マトリライシン活性を速度論的および熱力学的に検討した。基質の結合はエントロピー駆動であることが示され、結合における疎水的相互作用の重要な役割が示唆された。マトリライシン活性は塩濃度の増大に伴い指数関数的に増大し、この活性化はミカエリス定数 K_m の減少にのみ依存することが示された。これによりマトリライシンの塩による活性化は酵素・基質複合体の安定化に起因することが示唆された。

4. マトリライシンと阻害剤との相互作用を検討した。酵素活性 k_{cat}/K_m と阻害物質定数 K_i のpH依存性は一致し、これらは同じ解離基に支配され、 k_{cat}/K_m のpH依存性は K_m のpH依存性に由来することが示された。解離基の候補として亜鉛ルイス酸またはグルタミン酸残基およびチロシン残基が考えられた。

5. マトリライシン活性に対する緑茶カテキン類の阻害様式を検討した。マトリライシン活性は緑茶カテキン類の主成分である(－)-エピガロカテキンガレートをはじめ、ガレート基を有するカテキン類により強く阻害されることが示され、緑茶の飲用が大腸癌の抑制に有効である可能性が示唆された。

以上のように、本論文はマトリライシンの構造と機能および阻害機構について重要な多くの知見を示したものであり、酵素化学、生体情報応答学、生体機能化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年1月18日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。