

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580138

研究課題名（和文）腸上皮代謝回転におけるMT-SP1の役割解明とその活性化を制御する食品成分の探索

研究課題名（英文）Elucidation of the role of MT-SP1 in the intestinal epithelial turnover and exploration of food components that control the activation of the molecule.

研究代表者

都築 巧（TSUZUKI SATOSHI）

京都大学大学院・農学研究科・助教

研究者番号：50283651

研究成果の概要（和文）：膜結合性セリンプロテアーゼ MT-SP1 が小腸上皮由来の IEC-6 細胞の剥離とアポトーシスを起こすことを明らかにした。またリコンビナント型偽前駆体 MT-SP1 がプロテアーゼ活性を有し、145 mM NaCl 存在下で活性が消失することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We found that a membrane-bound serine protease MT-SP1 induces detachment and apoptosis of intestinal epithelial IEC-6 cells. Also, we found that a recombinant form of MT-SP1 pseudozymogen exhibits a protease activity and that the activity is not seen in the presence of NaCl.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

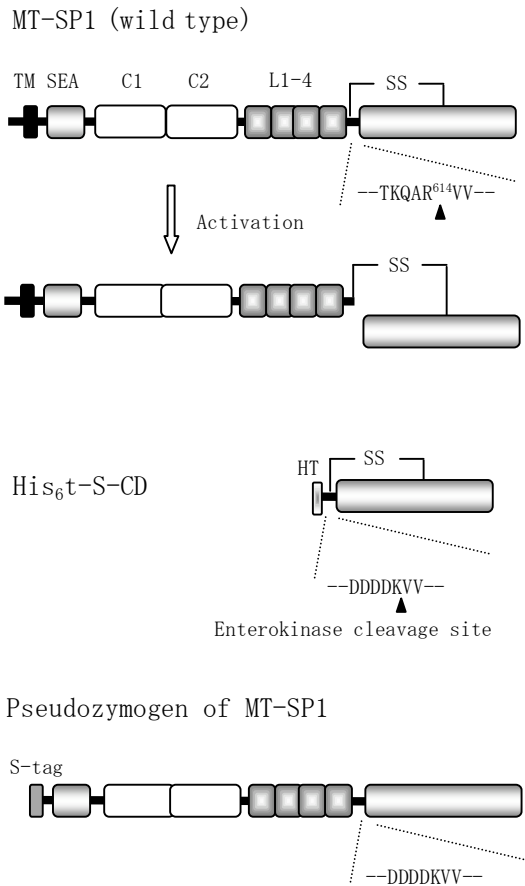
キーワード：腸上皮、代謝回転、基底膜、MT-SP1、活性化制御

1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜の上皮細胞は生体内で最も代謝回転（再生と死滅）の速い細胞として知られている。小腸上皮においてクリプト底部で派生した細胞は絨毛に沿って先端部へと押し出されるように移動していく。絨毛先端に達した細胞はアポトーシスを起こし管腔へと脱落していく。先端部における細胞の死滅（アポトーシス）は基底膜を構成する細胞外マトリックス蛋白質のプロテアーゼによる

分解・修飾が必須であると考えられている。

Membrane-type serine protease 1 (MT-SP1)（ゼラチン分解活性をもつので matriptase とも呼ばれている）は脊椎動物の上皮細胞（特に腸管上皮細胞）で発現する膜結合性のセリンプロテアーゼである（図1）。我々は本酵素が、正常ラット小腸の絨毛先端部の上皮細胞で強く発現すること、側底部膜に局在すること、フィブロネクチン、ラミニンといった基底膜構成因子を分解、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターを



TM: Transmembrane domain
 SEA: SEA domain
 C1 and C2: CUB domains
 L1-4: LDL receptor class A domain repeats
 CD: Catalytic domain
 HT: Hexahistidine tag

図2 天然型 MT-SP1 とリコンビナント MT-SP1 (His₆t-S-CD), 偽前駆体のドメイン構造
 スペーサー領域とプロテアーゼドメインに形成されるジスルフィド結合は SS で示される。天然型 MT-SP1 と His₆t-S-CD の活性化開裂配列とエンテロペプチダーゼ切断部位を矢印で示す。

を活性型に変換することを明らかにしてきた。これらの結果から MT-SP1 が腸管上皮のアポトーシスを誘導し細胞の代謝回転に寄与すると考えられたが、その実験的証拠は得られていなかった。

MT-SP1 は一本鎖前駆体中 614 番目のアル

ギニン残基のカルボキシル末端側で限定分解を受けることによりジスルフィド結合を介した二本鎖の活性体となる (図1)。興味深いことに MT-SP1 は自己触媒的に活性化されることが知られている。これまで二分子の前駆体が相互作用し、互いを活性体へと変換させる transactivation 機構が想定されている。しかしながら MT-SP1 前駆体にプロテアーゼ活性があることは知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究では MT-SP1 が小腸上皮のアポトーシスを引き起こすかを調べる目的でリコンビナント MT-SP1 が小腸上皮のモデル細胞である IEC-6 のアポトーシスを引き起こすかどうかを検討した。また、偽前駆体型のリコンビナント MT-SP1 を作製し、このものがプロテアーゼ活性を有するかどうかを検討した。

3. 研究の方法

酵母 *Pichia Pastoris* を宿主とし、リコンビナント MT-SP1 触媒ドメイン (図1, His₆t-S-CD) を大量に調製した。His₆t-S-CD は精製後、市販のエンテロペプチダーゼで処理することによって活性体へと変換させた。IEC-6 細胞を活性型 His₆t-S-CD を含んだ培地で培養することで、アポトーシスが引き起こされるかについて検討した。また、ハムスター卵巣由来の CHO-K1 細胞を宿主として、偽前駆体型のリコンビナント MT-SP1 (図1, Pseudozymogen of MT-SP1) を調製した。このものが合成基質 Ac-KTKQLR-MCA 基質を加水分解するかどうかを検討した。

4. 研究成果

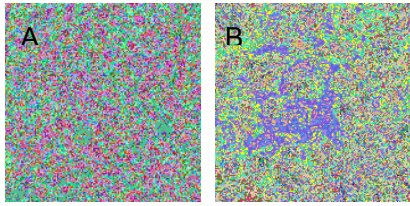


図 2 His₆t-S-CD による IEC-6 細胞の剥離
無血清培地 (A) または 300 nM His₆t-S-CD を含む無血清培地で (B) で 72 時間インキュベートした IEC 細胞の顕微鏡像。

エンテロペプチダーゼで処理した His₆t-S-CD は天然型の MT-SP1 と同等の活性を有していた。このものが細胞外マトリックスゲル上で培養した IEC-6 細胞の剥離 (図 2) とアポトーシスを引き起こすことを明らかにした。His₆t-S-CD による細胞の剥離は細胞をラミニンでコートした培養皿で培養した場合には見られたが、フィブロネクチンまたはコラーゲン IV でコートした培養皿で培養した場合にはみられなかった。また His₆t-S-CD による IEC-6 細胞の剥離がマトリックスプロテアーゼ 2 によって仲介されることが明らかになった。これらの結果は MT-SP1 が古くなった小腸上皮細胞の除去に寄与するという我々の仮説を支持した。His₆t-S-CD は腎尿管上皮細胞のモデル細胞である Madin-Darby canine kidney 細胞に対しても剥離とアポトーシスを起こすことを明らかにした。このことから MT-SP1 による上皮細胞の剥離は小腸特異的なものではないことが示唆された。

Pseudozymogen of MT-SP1 が合成基質 Ac-KTKQLR-MCA 基質を加水分解することを明らかにした。これは前駆体 MT-SP1 が実際にプロテアーゼ活性をもつことの初めての例証である。また pseudozymogen of MT-SP1 による Ac-KTKQLR-MCA の加水分解は 145 mM NaCl の存在下でみられなかった。従って、多量の塩化ナトリウム摂取によって小腸での

MT-SP1 の活性化が阻害される可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Mochida S, Tsuzuki, S, Inouye K, Fushiki T. A recombinant catalytic domain of matriptase induces detachment and apoptosis of small-intestinal epithelial IEC-6 cells cultured on laminin-coated surface. *J. Biochem.*, **148**, 721-732 (2010) doi: 10.1093/jb/mvq108 査読有
2. Tsuzuki S, Murai N, Miyake Y, Inouye K, Fushiki T. The structural requirements of matriptase in its ectodomain release in polarized epithelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1295-1297 (2010) doi: org/10.1271/bbb.100074 査読有
3. Miyake Y, Tsuzuki S, Fushiki T, Inouye K. Matriptase does not require hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 for activation in an epithelial cell expression model. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 848-850 (2010) doi: org/10.1271/bbb.90696 査読有
4. Inouye K, Yasumoto M, Tsuzuki S, Mochida S, Fushiki T. The optimal activity of a pseudozymogen form of recombinant matriptase under the mildly acidic pH and low ionic strength conditions. *J. Biochem.*, **147**, 485-492 (2010) doi: 10.

- 1093/jb/mvp190 査読有
5. Miyake Y, Tsuzuki S, Mochida S, Fushiki T, Inouye K. The role of asparagine-linked glycosylation site on the catalytic domain of matriptase in its zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 156-165 (2010) doi: org/10.1016/j.bbapap.2009.09.025 査読有
 6. Tsuzuki S, Miyake Y, Inouye K, Fushiki T. The occurrence of matriptase C-terminal fragments on the apical and basolateral sides of Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2538-2540 (2009) doi: org/10.1271/bbb.90431 査読有
 7. Miyake Y, Tsuzuki S, Yasumoto M, Fushiki T, Inouye K. Requirement of the activity of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 for the extracellular appearance of a transmembrane serine protease matriptase in monkey kidney COS-1 cells. *Cytotechnology*, **60**, 95-103 (2009) doi: 10.1007/s10616-009-9219-7 査読有
 8. Murai N, Miyake Y, Tsuzuki S, Inouye K, Fushiki T Involvement of the cytoplasmic juxtamembrane region of matriptase in its exclusive localization to the basolateral membrane domain of Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Cytotechnology* **53**, 169-176 (2009) doi: 10.1007/s10616-009-9205-0 査読有
 9. Mochida S, Tsuzuki S, Yasumoto M, Inouye K, Fushiki T, Secreted expression of pseudozymogen forms of recombinant matriptase in *Pichia Pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* **45**, 288-294 (2009) doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.06.008 査読有
 10. Miyake Y, Yasumoto M, Tsuzuki S, Fushiki T, Inouye K, Activation of a membrane-bound serine protease matriptase on the cell surface. *J. Biochem.*, **146**, doi: 10.1093/jb/mvp066783-790 (2009) 査読有
- [学会発表] (計6件)
1. 都築 巧 小腸上皮細胞の剥離を促すセリンプロテアーゼと硫酸化多糖による阻害 Hindgut Club JAPAN シンポジウム (招待講演) 2011.12.17 東京 (専修大学)
 2. 友石 満里絵ら マトリプターゼ前駆体活性発現における LDL 受容体ドメインの意義の解明 日本農芸化学会 2011.3.27 京都 (京都女子大学)
 3. 安元 誠ら Matriptase の stem 領域において HAI-1 (hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1) との相互作用を容易にする部位の同定 日本農芸化学会 2010.3.28 東京 (東京大学)
 4. 持田 誠也ら Matriptase は MMPs を介してラット小腸由来 IEC-6 細胞のアポトーシスを誘導する 日本農芸化学会 2010.3.28 東京 (東京大学)
 5. 都築 巧ら 肝細胞増殖因子アクチベーター阻害物質 I 型 (HAI-1) によるマトリプターゼ阻害機構 日本生化学会 2009.10.24 神戸 (神戸国際会議場)
 6. 安元 誠ら Matriptase の stem 領域において HAI-1 (hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1) との相互作用を促進する部位の同定 日本生化学会 2009.10.23 神戸 (神戸国際会議場)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都築 巧 (TSUZUKI SATOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：50283651

(2) 研究分担者

井上 和生 (INOUE KAZUO)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：80213148

(3) 連携研究者

井上 國世 (INOUE KUNIYO)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：10223249