

Matrix Metalloproteinases研究の経緯と新しい展開

The Past Research and Outlook for the Matrix Metalloproteinases

吉田 直樹 高林ふみ代 竹下誠一郎

Naoki Yoshida Fumiyo Takabayashi Seiichiro Takeshita

はじめに

1960年代初頭、オタマジャクシがカエルに変態する際の、尾ひれに、コラーゲンを分解吸収する活性が発見された。それ以前には、嫌気性細菌である *Clostridium histolyticum* が産生する菌体外コラーゲナーゼ（コラーゲン分解酵素）のみが知られていたので、脊椎動物がコラーゲナーゼを有する最初の報告であった¹⁾。

その後、ヒトの組織中にも、コラーゲナーゼ活性が検出された。ヒト組織としては、歯周炎患者の手術組織片が最初である²⁾。さらには、好中球にも、コラーゲナーゼが存在することが明らかにされた³⁾。

細胞外マトリックスは、コラーゲン、フィブロネクチン、エラスチン、ラミニン、プロテオグリカン等から成り立っている。コラーゲンを分解するコラーゲナーゼに続いて、種々の細胞外マトリックスを分解することができる金属イオン要求性プロテアーゼ：matrix metalloproteinases (MMPs)が、次々と発見され、その性質が研究されてきた。現在まで、20種類を超えるMMPsが報告されている⁴⁾ (図1)。

MMPsは、生理的な発生、組織の再構築において大切な役割をしており、その活性が組織由来の阻害物質（インヒビター）によって精密に調節されていることが明らかにされてきた⁵⁾。また、その調節の異常と病的な状態を結び付ける報告が数多くなされてきた⁶⁾。

本稿では、これまでに行われてきたMMPsに関する様々な研究の中で、特に、活性化に関する研究、活性の阻害に関する研究、構造に関する研究、クローニングに関する研究における重要な発見を概観し、さらに、近年、MMPsが細胞外マトリックスあるいは細胞外マトリックス以外の基質を切断した際に生じる産物が、細胞増殖、アポトーシス、細胞移動に影響を与えることが数多く報告されている⁷⁾ ことから、今後のMMPs研究に関する展望を行う（表1、表2）。

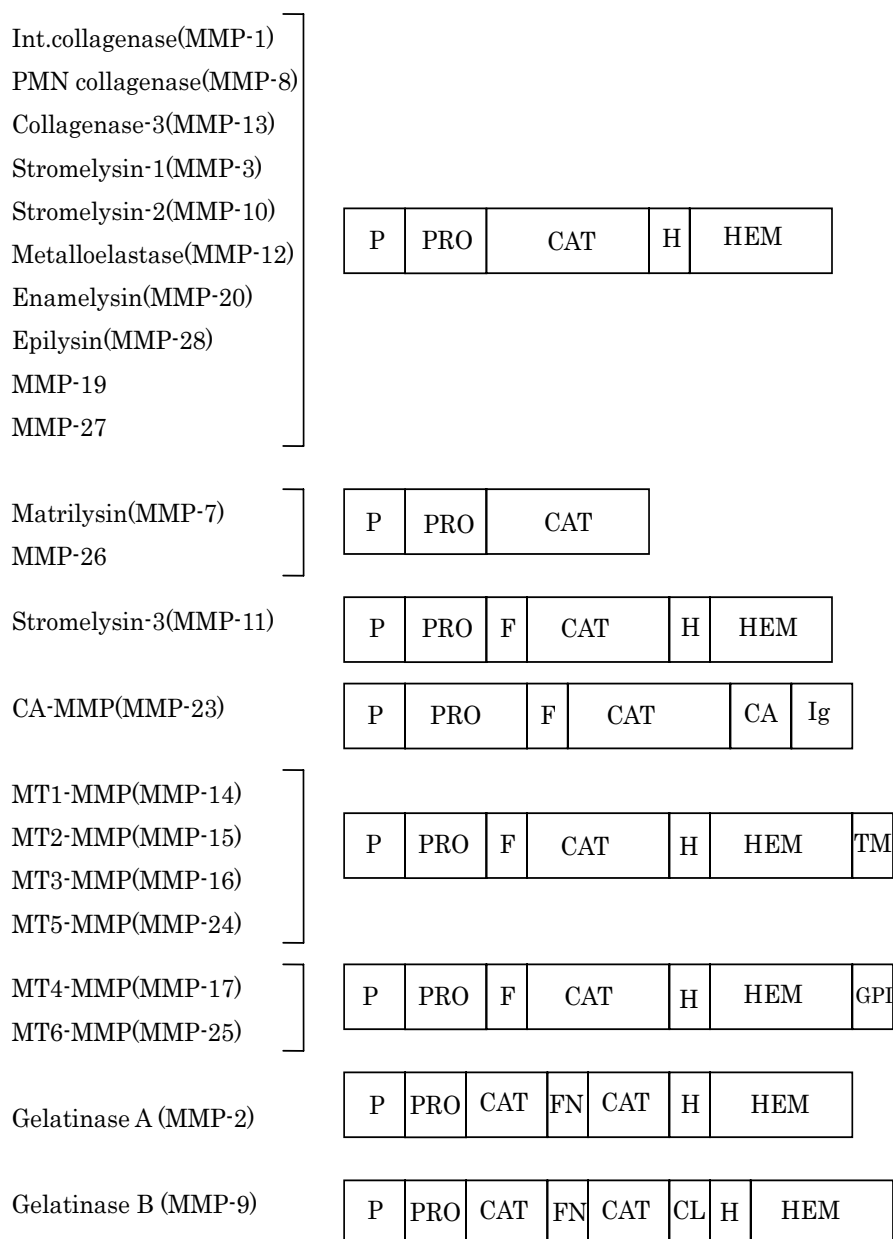


図1 MMPファミリーのドメイン構造 (文献4より引用)

CA, システインアレイ; CAT, 活性ドメイン; CL, コラーゲン様ドメイン; F, フェーリンによって切断される配列; FN, フィブロネクチン様繰返し配列; GPI, グリコシル・ホスファチジルイノシトール結合シグナル; H, ヒンジ・ドメイン; HEM, ヘモペキシン・ドメイン; Ig, イムノグロブリン様ドメイン; P, リーダー・配列; PRO, プロ・ドメイン; TM, 膜貫通ドメイン

表1 MMPsの基質(細胞外マトリックス成分)(文献7の表を改変)

MMP	細胞外マトリックスである基質
コラゲナーゼ群	
MMP-1/Collagenase-1	Collagen I/II/III/VII/X, gelatin, entactin, aggrecan, tenascin
MMP-8/Collagenase-2	
MMP-13/Collagenase-3	
ゼラチナーゼ群	
MMP-2/Gelatinase A	Gelatin, elastin, fibronectin, collagenI/IV/V/VII/X/XI, laminin, aggrecan, vitronectin
MMP-9/Gelatinase B	
ストロメリシン群	
MMP-3/Stromelysin-1	Proteoglycans, laminin, fibronectin, gelatin, collagenIII/IV/V/IX/X/XI,
MMP-10/Stromelysin-2	fibrin/fibrinogen, entactin, tenascin, vitronectin
MMP-11/Stromelysin-3	Laminin, fibronectin, aggrecan
最小ドメイン	
MMP-7/Matrilysin	Proteoglycans, laminin, fibronectin, gelatin, collagenIII/IV/V/IX/X/XI,
	fibrin/fibrinogen, entactin, tenascin, vitronectin
MMP-26/Matrilysin-2/Endometase	Gelatin, collagenIV, fibronectin, fibrinogen
膜結合型	
MMP-14/MT1-MMP	Gelatin, fibronectin, vitronectin, collagen, aggrecan
MMP-15/MT2-MMP	
MMP-16/MT3-MMP	
MMP-24/MT5-MMP	
MMP-17/MT4-MMP	Gelatin
MMP-25/MT6-MMP	Gelatin, collagenIV, fibrin, fibronectin, Laminin-1
MMP-23	Gelatin
その他のMMPs	
MMP-12/Metalloelastase	Elastin, fibronectin, fibrin/fibrinogen, laminin, proteoglycan
MMP-19/RASI	Gelatin, tenascin, fibronectin, collagenIV, laminin, entactin, fibrin/fibrinogen, aggrecan,COMP
MMP-20/Enamelysin	Amelogenin, Aggrecan, COMP
MMP-28/Epilysin	

表2 MMPsの基質(細胞外マトリックス成分ではないもの)(文献7の表を改変)

MMP	通例とは異なる基質	切断の結果生じた働きを持った産物
コラゲナーゼ群		
MMP-1/Collagenase-1	Perlecan IGFBP-2,3 α 1-antichymotrypsin α 1-proteinase inhibitor Pro-MMP-1,2 Pro-TNF α	Bioavailable FGF Bioavailable IGF Inactive serpin Inactive serpin MMP-1,2 Bioavailable TNF α
MMP-8/Collagenase-2	α 1-proteinase inhibitor Pro-MMP-8	Inactive serpin MMP-8
MMP-13/Collagenase-3	α 1-antichymotrypsin Pro-MMP-9,13	Inactive serpin MMP-9,13
ゼラチナーゼ群		
MMP-2/Gelatinase A	Decorin Pro-TGF-B2 Pro-IL1-B MCP-3 IGFBP-3/5 ProTNF α FGF-R1 Pro-MMP-1,2,13	Bioavailable TGF β TGF- β 2 active IL1- β inactive chemoattractant Bioavailable IGF TNF α Bioavailable FGF-R1 ectodomain MMP-1,2,13
MMP-9/Gelatinase B	Unknown Pro-TGF-B2 Pro-IL1-B Cell-surface bound IL-2Ra Plasminogen α 1-proteinase inhibitor Pro-TNF α	Bioavailable VEGF TGF- β 2 IL1- β Release of IL-2R α Angiostatin Inactive serpin TNF α
ストロメリン群		
MMP-3/Stromelysin-1	Perlecan Decorin Pro-HB-EGF Pro-IL1-B Plasminogen E-cadherin IGFBP-3 α 1-antichymotrypsin α 1-proteinase inhibitor Pro-MMP-1,3,7,8,9,13 Pro-TNF α	Bioavailable FGF Bioavailable TGF β HB-EGF IL1- β Angiostatin Bioactive E-cadherin ectodomain Bioavailable IGF Inactive serpin Inactive serpin MMP-1,3,7,8,9,13 Bioavailable TNF α
MMP-10/Stromelysin-2	Pro-MMP-1,8,10	MMP-1,8,10
MMP-11/Stromelysin-3	α 1-proteinase inhibitor IGFBP-1	Inactive serpin Bioavailable IGF
最小ドメイン		
MMP-7/Matrilysin	Pro-a-defensin Decorin Cell surface bound Fas-L B4 integrin E-cadherin Plasminogen Pro-TNF α Pro-MMP-2,7	α -Defensin Bioavailable TGF β Active soluble Fas-L Inactive soluble Fas-L Release of B4 integrin Bioactive E-cadherin ectodomain Angiostatin Bioavailable TNF α MMP-2,7
MMP-26/Matrilysin-2/Endometase	α 1-proteinase inhibitor MMP-9	Inactive serpin Pro-MMP-9
膜結合型		
MMP-14/MT1-MMP	Pro-MMP-2,13 Cell surface bound CD44 Cell surface bound tissue transglutaminase(tTG) Cell surface bound tTG	MMP-2,13 Release of CD44 Release of tTG
MMP-15/MT2-MMP	Cell surface bound tTG	Release of tTG
MMP-16/MT3-MMP	Pro-MMP-2 Cell surface bound tTG	MMP-2 Release of tTG
MMP-24/MT5-MMP	Pro-MMP-2	MMP-2
MMP-17/MT4-MMP	Pro-MMP-2	MMP-2
MMP-25/MT6-MMP	Pro-MMP-2	MMP-2
MMP-23		
その他のMMPs		
MMP-12/Metalloelastase	Plasminogen	Angiostatin
MMP-19/RASI		
MMP-20/Enamelysin		
MMP-28/Epilysin		

MMPsの活性化

MMPsは、潜在型酵素として産生される特徴を持つ。潜在型酵素が、活性型酵素に活性化されるメカニズムに関してNagaseらのグループが詳細に研究し報告している⁸⁾。プラスミンや、カリクレインによってMMP-1は潜在型(分子量52,000)から活性型(分子量43,000)に変換するが、活性は完全に活性化されたものに比して15%である。MMP-1が完全に活性化されるには、さらに、ストロメリシン-1(MMP-3)によって、Gln 80-Phe 81の結合が切断されることが必要であった。そうして得られた活性型MMP-1の分子量は41,000であった。

MMP-2の活性化に関しては、不明な部分があったが、後に、MMP-1、MMP-3等とは、全く異なった形式で行われていることが報告された。Seikiらのグループは、細胞膜に固定された、新規のMMPをクローニングした。MT 1-MMP(MMP-14)である。MMP-14は細胞表面で潜在型MMP-2を活性化できることが明らかになった⁹⁾。Itohらは、この活性化のメカニズムがMMP-14、TIMP-2、MMP-2の3種類の分子による細胞表面における、非常に統合された相互作用であることを示した¹⁰⁾。

さらに、新しいMMPの活性化の方式が発見された。Arg-Arg-Lys-Argの配列がストロメリシン-3(MMP-11)のプロペプチドの後ろに存在し、その配列は、プロホルモン転換酵素であるfurinによって特異的に切断される配列であった。つまり、MMP-11は細胞内で活性化され、活性型が分泌される方式をとるのである¹¹⁾。同様の配列と活性化の方式が、MT-MMPs(膜型MMPs)においても存在することが明らかにされた。そして、この、細胞内でMT-MMPsが活性化されるということは、MMP-2の活性化の一連の流れの中で、最初の反応と考えられる¹⁰⁾。

MMP活性の阻害に関して

MMPの活性は内在性のインヒビターによって調節されている。始めにファイibroblast・アンチ・コラゲナーゼとして精製された¹²⁾。後に、それを、1985年に他のグループが配列を決定した時に、以前に報告されていたEPA(erythroid-potentiating factor)と、同一のものであることが、明らかになった¹³⁾。現在ではTIMPs(tissue inhibitors of metalloproteinases)の中の、TIMP-1として知られている。TIMPsは、活性化されたMMPsの触媒部位のZnイオンと1:1の複合体を形成することによって活性を阻害する。この、MMP-TIMPの相互作用の詳細はしばらく、謎であったが、Wolfram BodeのグループがMMP-3の活性部位とTIMP-1との複合体の結晶構造を解析した¹⁴⁾。驚くべきことに、これら二つのタンパク分子間の接触部位は、TIMP-1のアミノ末端の最初の5つのアミノ酸がMMP-3の活性部位に基質のように結合している部分に限定していた。

活性型MMPsとそのインヒビターの量のバランスがタンパク分解活性を調節しているという考え方は魅力的であるが、実際のMMP-TIMPの関係はそれほど単純なものではないようである。TIMP-2は阻害活性に加えて、潜在型MMP-2に結合することができる¹⁵⁾。そして、その結合が、MMP-2の活性化に必須のものである。TIMP-1は、また、潜在型ゼラチナーゼB(MMP-9)のカルボキシル末端領域に結合して、MMP-3によるMMP-9の活性化を防いでいる¹⁶⁾。TIMP-1においては、erythroid-potentiating activityに加えて、その他の増殖促進活性も確認されている¹⁷⁾。TIMPsはMMPsの活性と関連付けられて評価されてきたが、

複雑な生化学系における、多機能分子であることが明らかになってきた。生化学的な過程におけるTIMPsの数多くの効果は、MMPs活性の阻害では説明できない。TIMPsのMMP阻害以外の機能に関しては、これからの解明を待つところが多い。

構造に関して

MMPsの様々なドメインの構造と働きについて、1990年代を通して研究者の精力が注がれた。第一回MMPsゴードン会議において、Agouron PharmaceuticalsのKrystof Appeltが提示したMMP-3の活性部位の結晶構造を「三次元めがね」で観察したことは、最も重要なものの1つといえる。

1994年のヒトコラゲナーゼ活性ドメインの結晶構造の発表が、多くの構造解析の報告の最初であった¹⁸⁾が、その後の報告も、ほとんどが合成MMPインヒビターを含んでいるものである。それは、MMPの酵素活性の機構を明らかにしていくことにつながるものだからである。MMPsの活性ドメインは五つの β シートと三つの α ヘリックスから成り、球状のトポロジーを形成している。それは、MMPファミリーのメンバー間でよく保存されている。基質が結合する溝は、狭くなり輪郭のはっきりとしたポケットとなっている。そして、このポケットを形成しているアミノ酸残基の違いが、それぞれのMMPの個性となっている。

しかし、MMPファミリーのメンバーの基質特異性は、活性ドメインの特性だけで決まるのではない。それは、他のドメインの影響を強く受ける。例をあげると、Gill Murphyのグループは、MMP-1のコラーゲンに対する基質特異性には、カルボキシ末端のヘモペキシン・ドメインが関与していることを、(MMP-3との)ドメイン交換実験によって、示した¹⁹⁾。Hiroseらは、好中球コラゲナーゼ(MMP-8)のドメイン交換実験によって同様の結果を得た²⁰⁾。ヘモペキシン・ドメインの四枚羽根、 β プロペラ構造は、1995年に明らかにされた²¹⁾。MMP活性に対する様々なドメインの関与を調べる研究は、活発である。MMPsの中でも最も複雑なものの一つであり、プロペプチド、活性ドメイン、ヘモペキシンドメイン、三つのフィブロネクチン様ドメインからなる、全長プロMMP-2の構造は、1999年にKarl Tryggvasonのグループが発表した²²⁾。興味あることに、フィブロネクチン様ドメインは、活性ドメインの途中に挿入されているのであるが、活性ドメイン全体の立体構造には、変化を与えていないということが示された。

MMPsのクローニング

1980年代半ば、遺伝子クローニングは、技術的にはまだまだ旧式であったが、だんだん一般的なものとなってきていた。そのような中で、ほぼ同時期に数種類のMMPsのクローニングが報告された(ラット・トランジン、ヒトおよびラビット・コラゲナーゼ、ヒト・ストロメリシン)^{23) 24) 25) 26)}。最初にMMPの全長cDNAが、(それはトランジンであったのだが)クローニングされたとき、「形質転換誘導」遺伝子として同定されたものであり、MMPとして知られていたのではなかった。しかし、そのシーケンスをヒト・コラゲナーゼと比較してみると、その正体が明らかにされ、その次の研究によって、ヒト・ストロメリシンとの相同性が確認された²⁶⁾。そして、トランジン/ストロメリシン-1の発現がマウス皮膚ガン発症モデルにおい

て、腫瘍の発達と関連があるという発見が、MMPsとガンとの間に強い関連があるという考えを促進した²⁷⁾。

その後、新しいMMPファミリーのメンバーを探す方法として、シーケンスの類似性が利用され、さらに多くのMMPのcDNAがクローニングされた。遺伝子ファミリーの概念が明らかになり始め、それを支持する遺伝子クローンが、報告された。1987年には、トランジーン1 (MMP-3)とトランジーン2 (ストロメリシン2 /MMP-10) の遺伝子が比較され、非常に類似していることが明らかになった²⁸⁾。他のMMPファミリーのメンバーと同様、これらの遺伝子も長さ約10 kbで、10個のエクソンと11個のイントロンを含み、第11染色体q 22.23のクラスター (現在では、MMPs-1,-3,-7,-8,-10,-12,-13,-20,-27の遺伝子がそこにあることがわかっている) に存在することが確認された²⁹⁾。しかし、ファミリーは多様性を示している。例えば、ゼラチナーゼである、MMP-2とMMP-9はフィブロネクチン様反復配列をコードする三つの余分のエクソンを含み、MMP-2は第16染色体にMMP-9は第20染色体にそれぞれ局在している³⁰⁾。

1990年にNicky Partridgeはラット・間質型コラゲナーゼのクローニングを行ったのであるが、これは、ファミリーにおける謎とも言えるものであった³¹⁾。これまでの類似性に対して、このラットの遺伝子は、ヒトおよびラビットのコラゲナーゼ1 (間質型コラゲナーゼ) とは、非常にわずかな一致しか、認められなかったのである。いったい、このラットのコラゲナーゼは、何であるのか?それは、1994年になって、明らかになった。Carlos Lopez-OtinのグループによってヒトMMP-13遺伝子がクローニングされ、それが、ラット/マウス・間質型コラゲナーゼと圧倒的な類似性があったのである³²⁾。もう一つのヒトコラゲナーゼ (コラゲナーゼ3 =MMP-13) が発見されたことによって、げっ歯類とヒトのコラゲナーゼの間に存在していた食い違いが解決されたのであった。2001年には、ヒトMMP-1 (コラゲナーゼ1) に対するげっ歯類における相同物と考えられるものがクローニングされた³³⁾。しかし、アミノ酸レベルでの相同性がわずか58%であることから、それが、マウスにおける、ヒトMMP-1の相同物であったとしても、どうも遠縁である。

次に、われわれのMMPファミリーに関する認識を大きく変えたのは、Motoharu Seikiのグループによる、膜結合型MMPであるMT 1-MMP(MMP-14)のクローニングであった⁹⁾。その後、続けざまに、数種の膜結合型MMPsが発見された。六つのMT-MMPsのうち、MT 1-MMP(MMP-14) , MT 2-MMP(MMP-15), MT 3-MMP(MMP-16) , MT 5-MMP(MMP-24) ³⁴⁾ の四つは、細胞表面に膜貫通ドメインによって固定されている。一方、MT 4-MMP(MMP-17) ^{35) 36)} とMT 6-MMP(MMP-25)³⁷⁾ は、細胞膜に対して、グリコシル・ホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーによって固定されていることが明らかにされ、ファミリーは、またもや、分岐した。

次に、分子の進化に関してであるが、MMPファミリーのメンバーのシーケンスと構造に関する広範囲にわたる分析から、活性ドメインとヘモベキシン様ドメインが会合して、マルチドメイン酵素になったのは、進化の過程の初期におこっていることが示された。MMP-7やMMP-26のようなシンプルな酵素が、大きな複雑な酵素から生じてきたという可能性が高いようだ²⁹⁾。

MMPsに切断された結果生じた産物の生物学的重要性

matrix metalloproteinases (MMPs)の機能として以前から考えられてきたものは、間質や、基底膜に存在する、コラーゲン、フィブロネクチン、エラスチン、ラミニン、プロテオグリカン・コアプロテインを基質として分解することによって、細胞外マトリックスの構成成分の再構築や、分解に関与するというものであった。

近年、通例とは異なる基質と、基質が切断された結果生じる産物、結果として起こってくる細胞の機能への影響が注目されてきている⁷⁾。

MMPsの基質が切断された結果が、細胞増殖に影響を与えることがわかってきた。

ひとつのメカニズムは、マトリックスタンパクを切断することによって、そこに結合している増殖因子 (growth factor) を解き放つというものである。fibroblast growth factor (FGF) やtransforming growth factor- β (TGF- β) は、細胞外マトリックス成分に強固に結合しているが、MMP-1 やMMP-3がプロテオグリカン・パルカンを切断することによってFGFを解き放つ³⁸⁾。同様に、MMP-2 やMMP-3やMMP-7がデコリンを切断することによってTGF- β を解き放つ³⁹⁾。

その他、MMPsは、growth factorに結合している非マトリックスタンパクも切断する。Insulin-like growth factor-binding proteins (IGF-BP) がMMPsによって分解されることによって、活性型IGFリガンドが生じる^{40) 41) 42)}。

また、Heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) は、膜結合型の増殖因子であるが、MMP-3によって膜から遊離される⁴³⁾。

MMPsは、直接growth factorの活性化も行う。MMP-2 とMMP-9は、proTGF- β 2を切断することによって活性型のTGF- β 2を生じる⁴⁴⁾。MMP-2 とMMP-3とMMP-9は、IL-1 β の前駆体を、切断することによって活性型IL-1 β に変換する⁴⁵⁾。

MMP-9がTリンパ球表面のIL-2 receptor type- α を分解することによってIL-2依存性の細胞増殖を抑制することが報告されている⁴⁶⁾。

さらには、MMP-2が、FGF receptor type Iを細胞表面から、遊離することができることも報告されている⁴⁷⁾。

また、MMPsの基質が切断された結果として、アポトーシスの調節へも関与していることがわかってきた。

基底膜には、細胞のサバイバルシグナルが含まれており、MMPsによる基底膜の分解によって細胞のサバイバルシグナルが無くなってしまうことが、乳腺の退縮時のアポトーシスにおいて重要と考えられる⁴⁸⁾。また、細胞死誘導物質を直接に切断することによっても、影響を受ける。MMP-7は、細胞膜に結合しているFas ligandを可溶性の活性型Fas ligandに変える⁴⁹⁾。

また、ある種の化学療法剤においては、膜結合型のligandとreceptorの相互作用が重要であると考えられている⁵⁰⁾。理由としては、ある種のcell lineでは、MMP-7によって細胞表面のFas ligandが取り除かれてしまうと、化学療法剤に対して、耐性になってしまうことがわかったからである。

これらのことから、MMPsは、種々の基質を切断することによって、細胞増殖とアポトーシスの間のバランスを調節することができると考えられる。

また、MMPsが基質を切断した結果として、細胞の移動にも影響を与えることが、明らかにされてきた。

MMPsが細胞外マトリックスを分解することは、直接的に、細胞-マトリックスの接着を調節できると考えられる。それは、接着部位を除去したり、結合部位を露出させることによるものである。

MMP-2がlaminin-5を切断することによってケラチノサイトの移動を引き起こす⁵¹⁾。また、MT 1-MMPがlaminin-5を切断することによって様々な細胞の移動を可能にする⁵²⁾。

MMPsは、さらに、直接、細胞-細胞接着に関与するレセプターや、細胞-マトリックス接着に関与するレセプターを切断することによっても、接着や移動の制御に関わっている。たとえば、MMP-7は、 β 4インテグリンを分解することが報告されている⁵³⁾、MMPsによるE-カドヘリンの除去も示されている^{54) 55)}。MMP-3とMMP-7による、E-カドヘリンの切断は、接着結合を途絶えさせただけでなく、ドミナント-ネガティブ細胞外領域断片を遊離することによって細胞移動とコラーゲンゲル内への侵入を促進することがわかった⁵⁵⁾。

細胞移動は化学走化因子によっても起こるが、ここにも、MMPsが関与している。MMP-9は、長管骨の発達における、VEGF (vascular endothelial growth factor)の遊離を引き起こし、その、VEGFが骨芽細胞集積のための化学走化因子となるわけである⁵⁶⁾。

また、MMPsは、化学走化反応を失わせる役割もする。例えば、MMP-2は、monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3)を分解、不活化して、化学走化性と炎症反応を減じることが明らかにされた⁵⁷⁾。

今後の展望

20種類を越えるMMPsが存在し、それぞれのMMPsにいくつもの基質（それは細胞外マトリックス成分であるものもあれば、細胞外マトリックス成分以外のものもある）が存在する。生理的な発生や、組織の再構築の過程において、数多くの酵素と基質が実際に生体内で反応し、恒常性が保たれている。

数多くの重要な事実が発見された中、生理的な発生や、組織の再構築の過程における、どの時期にどのMMPsがどれだけの量が発現され、その後どのくらいの時間で、どこで、どれだけの潜在型のMMPsが何によって活性化されているのか、数多くある中のどの基質をどれだけの量だけ切断しているのか。さらに、その切断の結果生じた産物が、次に、どのような効果を与えているのか。実際に起こっていることの解明に、興味を持たれるところである。

同様に、病的な状況下では、正常時とはどのように異なっているのか。今後、詳細に明らかにされていくと思われる。

in vitroで、MMPsが基質のタンパクを分解できるということとは別に、in situで、の解明は、まだまだ、充分であるとはいえない。in situでの遺伝子発現、タンパク産生、のみならず、様々な酵素が、様々なactivatorによって活性化され、様々な基質を分解しているところを捉え、さらには、分解産物が機能している様子も捉え、その量までもが測定できることが、今後、可能になっていくのであろう。

文献

- 1) 永井 裕：コラーゲン研究のあゆみ. コラーゲン代謝と疾患. 永井裕、藤本大三郎編，講

- 談社, 東京, 1982, 6-8.
- 2) Fullmer, H.M. and Gibson, W.: Collagenolytic activity in gingivae of man. *Nature* 209:728-729, 1966.
 - 3) Lazarus, G.S., Brown, R.S., Daniels, J.D. and Fullmer, H.M.: Human granulocyte collagenase. *Science* 159:1483-1484, 1968.
 - 4) Brinckerhoff, C.E. and Matrisian, L.M.: Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3:207-214, 2002.
 - 5) Woessner, J.F., Jr.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5:2145-2154, 1991.
 - 6) Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. and Engler, J.A.: Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 4:197-250, 1993.
 - 7) McCawley, L.J. and Matrisian, L.M.: Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13:534-540, 2001.
 - 8) Suzuki, K., Enghlid, J.J., Morodomi, T., Salvesen, G. and Nagase, H.: Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 29:10261-10270, 1990.
 - 9) Sato, H., Takino, Y., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. and Seiki, M.: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370:61-65, 1994.
 - 10) Itoh, Y., Takamura, A., Ito, N., Maru, Y., Sato, H., Suenaga, N., Aoki, T. and Seiki, M.: Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J.* 20:4782-4793, 2001.
 - 11) Pei, D. and Weiss, S.J.: Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375:244-247, 1995.
 - 12) Welgus, H.G., Stricklin, G.P., Eisen, A.Z., Bauer, E.A., Cooney, R.V. and Jeffrey, J.J.: A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 254:1938-1943, 1979.
 - 13) Docherty, A.J.P., Lyons, A., Smitn, B.J., Write, E.M., Stephans, P.E., Harris, T.J.R., Murphy, G. and Reynolds, J.J.: Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 318:66-69, 1985.
 - 14) Gomis-Ruth, F.X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H. and Bode, W.: Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 389:77-81, 1997.
 - 15) Goldberg, G.I., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z., Wilhelm, S. and He, C.S.: Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8207-8211, 1989.

- 16) Goldberg, G.I., Strongin, A., Collier, I.E., Genrich, L.T. and Marmer, B.L.: Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J. Biol. Chem.* 267:4583-4591, 1992.
- 17) Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. and Iwata, K.: Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. *FEBS Lett.* 298:29-32, 1992.
- 18) Lovejoy, B., Cleasby, A., Hassell, A.M., Longley, K., Luther, M.A., Weigl, D., McGeehan, G., McElroy, A.B., Drewry, D., Lambert, M.H. et al.: Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Science* 263:375-377, 1994.
- 19) Murphy, G., Allan, J.A., Willenbrock, F., Cockett, M.I., O'Connell, J.P. and Docherty, A.J.P.: The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J. Biol. Chem.* 267:9612-9618, 1992.
- 20) Hirose, T., Patterson, C., Pourmotabbed, T., Mainardi, C.L. and Hasty, K.A.: Structure-function relationship of human neutrophil collagenase: identification of regions responsible for substrate specificity and general proteinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2569-2573, 1993.
- 21) Bode, W. and Maskos, K.: Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol. Chem.* 384:863-872, 2003.
- 22) Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U., Isupov, M., Lindqvist, Y., Schneider, G. and Tryggvason, K.: Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science* 284:1667-1670, 1999.
- 23) Gross, R.H., Sheldon, L.A., Fletcher, C.F. and Brinckerhoff, C.E.: Isolation of a collagenase cDNA clone and measurement of changing collagenase mRNA levels during induction in rabbit synovial fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1981-1985, 1984.
- 24) Matrisian, L.M., Glaichenhaus, N., Gesnel, M.C. and Breathnach, R.: Epidermal growth factor and oncogenes induce transcription of the same cellular mRNA in rat fibroblasts. *EMBO J.* 4:1435-1440, 1985.
- 25) Goldberg, G.I., Wilhelm, S.M., Kronberger, A., Bauer, E.A., Grant, G.A. and 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.
- 26) Whitham, S.E., Murphy, G., Angel, P., Rahmsdorf, H.J., Smith, B.J., Lyons, A., Harris, T.J., Reynolds, J.J., Herrlich, P. and Docherty, A.J.P.: Comparison of human stromelysin and collagenase by cloning and sequence analysis. *Biochem. J.* 240: 913-916, 1986.
- 27) Matrisian, L.M., Bowden, G.T., Krieg, P., Furstenberger, G., Briand, J.P., Leroy, P. and Breathnach, R.: The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed

- more abundantly in malignant than in benign tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9413-9417, 1986.
- 28) Breathnach, R., Matrisian, L.M., Gesnel, M.C., Staub, A. and Leroy, P.: Sequence coding for part of oncogene-induced transin are highly conserved in a related rat gene. *Nucleic Acids Res.* 15:1139-1151, 1987.
- 29) Massova, I., Kotra, L.P., Fridman, R. and Mobashery, S.: Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* 12:1075-1095, 1998.
- 30) Collier, I.E., Bruns, G.A.P., Goldberg, G.I. and Gerhard, D.S.: On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics* 9:429-434, 1991.
- 31) Quinn, C.O., Scott, D.K., Brinckerhoff, C.E., Matrisian, L.M., Jeffrey, J.J. and Partridge, N.C.: Rat collagenase. Cloning, amino acid sequence comparison, and parathyroid hormone regulation in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 265: 22342-22347, 1990.
- 32) Freije, J.M., Diez-Itza, I., Balbin, M., Sanchez, L.M., Blasco, R., Tolivia, J. and Lopez-Otin, C.: Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J. Biol. Chem.* 269:16766-16773, 1994.
- 33) Balbin, M., Fueyo, A., Knauper, V., Lopez, J.M., Alvarez, J., Sanchez, L.M., Quesada, V., Bordallo, J., Murphy, G. and Lopez-Otin, C.: Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. *J. Biol. Chem.* 276:10253-10262, 2001.
- 34) Llano, E., Pendas, A.M., Freije, J.P., Nakano, A., Knauper, V., Murphy, G. and Lopez-Otin, C.: Identification and characterization of human MT 5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase A overexpressed in brain tumors. *Cancer Res.* 59:2570-2576, 1999.
- 35) Puente, X.S., Pendas, A.M., Llano, E., Velasco, G. and Lopez-Otin, C.: Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res.* 56:944-949, 1996.
- 36) Itoh, Y., Kajita, M., Kinoh, H., Mori, H., Okada, A. and Seiki, M.: Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT 4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J. Biol. Chem.* 274:34260-34266, 1999.
- 37) Velasco, G., Cal, S., Merlos-Suarez, A., Ferrando, A.A., Alvarez, S., Nakano, A., Arribas, J. and Lopez-Otin, C.: Human MT 6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res.* 60:877-882, 2000.
- 38) Whitelock, J.M., Murdoch, A.D., Iozzo, R.V. and Underwood, P.A.: The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of boud basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J. Biol. Chem.*

- 271:10079-10086,1996.
- 39) Imai,K.,Hiramatsu,A.,Fukushima,D.,Pierschbacher,M.D. and Okada,Y.: Degradation of decorin by matrix metalloproteinases:identification of the cleavage sites,kinetic analysis and transforming growth factor-beta 1 release.Biochem.J.322:809-814,1997.
 - 40) Fowlkes,J.L.,Enghild,J.J.,Suzuki,K. and Nagase,H.:Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures.J.Biol.Chem.269:25742-25746,1994.
 - 41) Fowlkes,J.L.,Suzuki,K.,Nagase,H. and Thrailkill,K.M.:Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 during rat pregnancy:a role for matrix metalloproteinases.Endocrinology.135:2810-2813,1994.
 - 42) Thrailkill,K.M.,Quarles,L.D., Nagase,H., Suzuki,K.,Serra,D.M. and Fowlkes,J.L.: Characterization of insulin-like growth factor binding protein-5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation.Endocrinology. 136:3527-3533,1995.
 - 43) Suzuki,M.,Raab,G.,Moses,M.A.,Fernandez,C.A. and Klagsbrun,M.:Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site.J.Biol.Chem.272:31730-31737,1997.
 - 44) Yu,Q. and Stamenkovic,I.:Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis.Genes Dev.14:163-176,2000.
 - 45) Schonbeck,U.,Mach,F. and Libby,P.:Generation of biologically active IL-1 β by matrix metalloproteinases:a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 β processing.J.Immunol.161:3340-3346,1998.
 - 46) Sheu,B.C.,Hsu,S.M.,Ho,H.N.,Lien,H.C.,Huang,S.C. and Lin,R.H.:A novel role of metalloproteinases in cancer-mediated immunosuppression.Cancer Res.61: 237-242,2001.
 - 47) Levi,E.,Fridman,R.,Miao,H.Q.,Ma,Y.S.,Yayon.A. and Vlodavsky,I.: Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.93:7069-7074,1996.
 - 48) Alexander,C.M.,Howard,E.W.,Bissell,M.J. and Werb,Z.:Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene.J.Cell.Biol.135:1669-1677,1996.
 - 49) Kayagaki,N.,Kawasaki,A.,Ebata,T.,Ohmoto,H.,Ikeda,S.,Inoue,S.,Yoshino,K., Okumura,K. and Yagita,H.:Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand.J.Exp.Med.182:1777-1783,1995.
 - 50) Mitsiades,N.,Yu,W.,Poulaki,V.,Tsokos,M. and Stamenkovic,I.: Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity.Cancer Res.61:577-581,2001.
 - 51) Giannelli,G.,Falk-Marzillier,J.,Schiraldi,O.,Stetler-Stevenson,W.G. and

- Quaranta, V.: Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science*. 277:225-228, 1997.
- 52) Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Miyazaki, K. and Quaranta, V.: Role of cell surface metalloproteinase MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J. Cell. Biol.* 148:615-624, 2000.
- 53) Von Bredow, D.C., Nagle, R.B., Bowden, G.T. and Cress, A.E.: Cleavage of $\beta 4$ integrin by matrilysin. *Exp. Cell. Res.* 236:341-345, 1997.
- 54) Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z. and Bissell, M.J.: Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 139:1861-1872, 1997.
- 55) Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H.C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruynell, E., Matrisian, L.M. and Mareel M.: Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J. Cell. Sci.* 114:111-118, 2001.
- 56) Engsig, M.T., Chen, Q.J., Vu, T.H., Pedersen, A.C., Therkidsen, B., Lund, L.R., Henriksen, K., Lenhard, T., Foged, N.T., Werb, Z. and Delaisse, J.M.: Matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J. Cell. Biol.* 151:879-890, 2000.
- 57) McQuibban, G.A., Gong, J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I. and Overall, C.M.: Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science*. 289:1202-1206, 2000.

(2004年11月4日受理)