Recent Advances in Matrix Metalloproteinase Research

マトリックスメタロプロテアーゼ研究の最近の進歩

Christopher Mark OVERALL

Faculty of Dentistry, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, Canada, FAX: 1-604-822-3562

Abstract

Several homologous connective tissue matrix degrading metalloproteinases, termed matrix metalloproteinase(MMPs), are secreted by resident tissue cells, infiltrating inflammatory cells, and tumor cells as inactive proenzymes that, upon activation, can degrade many of the connective tissue components. cDNA sequence analysis has revealed that these proteinases are composed of several modules, some of which appear to have been derived from matrix proteins. A family of specific tissue inhibitors of MMP(TIMPs) regulates the extracellular activity of MMPs. MMPs and TIMPs are differentially regulated in cells by growth factors, hormones and cell shape changes. Recent work has shown that lectins also stimulate MMP expression and suppresses TIMP levels in human fibroblasts indicating that naturally present lectins may also participate in regulating MMP and TIMP gene expression *in vivo*.

Key Words: connective tissue/metalloproteinases/collagenase/TIMP/growth factor

要 旨

マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)と名付けられた、互いに性質のよく似た幾つかの結合組織分解金属プロテアーゼは、組織に存在する細胞や、炎症時の炎症細胞や腫瘍細胞から、活性のないプロ酵素として分泌され、活性化を受けてから多くの結合組織成分を分解出来るようになる。cDNA配列の分析から、これらのプロテアーゼが数個のモジュールからなり、その中の幾つかはマトリックスタンパクから由来していることが明らかとなった。MMPsに対して特異的な一群の組織性阻害物質(TIMPs)がMMPsの細胞外での活性を調節している。細胞に於けるMMPsとTIMPsは成長因子類、ホルモン、細胞の形態変化などによって別々に調節されている。最近、レクチンもまたヒト線維芽細胞の系で、MMP発現を励起し、TIMP量を抑制することが示された。この結果は、天然に存在するレクチンもまたin vivoでMMPとTIMP遺伝子発現の調節にたずさわっているかも知れないことを示している。

A. Introduction

The connective tissue matrix enmeshing cells is composed of extracellular matrix molecules including collagens, elastin, acidic glycoproteins, and proteoglycans. The varied structural and functional characteristics of different connective tissues are reflected, in part, by differences in the composition of the constituent macromolecules. Although most matrix components contribute to the physical characteristics of connective tissues, the collagen fibres, through their tensile strength, are particularly important in providing structural stability. To date, 14 collagen types have been recognized and characterized to varying degrees(reviewed by Burgeson, 1988), but all collagen types contain one or more regions in which the three constituent α -chains form a triple helical collagen fold that is highly resistant to proteolysis. However, despite the important consequences of connective tissue destruction in pathology and normal tissue turnover, the mechanisms of connective tissue degradation, the proteinases involved, and their cellular sources are not well understood(Sodek and Overall, 1988).

Several homologous matrix degrading neutral metalloproteinases, termed matrix metalloproteinases(MMPs), are thought to participate in the degradation of the extracellular matrix and are secreted by resident tissue cells and infiltrating

A. 序 論

細胞の周囲をとり囲んでいる結合組織マトリックスは、コラーゲン、エラスチン、酸性糖タンパク、プロテオグリカンなどの細胞外マトリックス分子で構成されている。異なる結合組織が示す構造的、機能的性質の違いは、それを構成している高分子の組成の違いを少くとも一部は反映している。多くのマトリックス成分が結合組織の物性的性質に関わっているが、強い張力をもつコラーゲン線維は、構造を安定化させるのに特に重要な働きをしている。今日まで14の型のコラーゲンが見出され、性質が調べられている(Burgesonによる総説、1988)。全ての型のコラーゲンには、構成している3本の α -鎖が互いに巻いて三重らせん鎖を形成し、そのためにタンパク分解に対して抵抗性が極めて高い領域が1つ又は、それ以上存在する。しかしながら、正常な組織の代謝や病気の時の結合組織の破壊は、重要な影響を与えるにも関わらず、結合組織分解のメカニズム、分解に関与しているプロテアーゼ類、さらにそれらを分泌する細胞などについては十分に判っていない(SodekとOverall, 1988)。

マトリックス金属タンパク分解酵素(MMPs)と名付けられた数種の互いによく似た構造をもつ中性のマトリックス分解酵素が、細胞外マトリックスの分解にたずさわっていると考えられている。そしてそれらの酵素は、組織の細胞や炎症時の炎症細胞によって分泌される(表1)。この総説では、MMPsとその阻

inflammatory cells (Table I). This review will focus on the structure, characteristics, and regulation of MMPs and their inhibitors.

B. Types of MMPs

B-1. The Collagenases

Latent interstitial collagenase (MMP-1) is present as two forms having M_r s of 57,000 and a 52,000 that, on activation, convert to 47- and 42-kD active enzymes, respectively (Stricklin *et al.*, 1977, 1978). The two M_r species differ only by the presence of *N*-linked oligosaccharide chains in the higher M_r species (Nagase *et al.*, 1981, 1983; Wilhelm *et al.*, 1986; Goldberg *et al.*, 1986). Interstitial collagenase is synthesized by a variety of cells including fibroblasts, chondrocytes, endothelial cells, keratinocytes, and macrophages. Leukocyte collagenase (MMP-8) is released from storage granules in polymorphonuclear leukocytes (Hasty *et al.*, 1984; 1986), but although the enzyme cleaves the identical scissile bonds in collagens as interstitial collagenase, it has a different M_r (75-kD), substrate kinetics (Hasty *et al.*, 1987), and antigenic properties (Hasty *et al.*, 1984).

B-2. The Gelatinases/Type IV Collagenases

Two forms of gelatinase that efficiently degrade dena-

害物質の構造、性質、調節に焦点をあてようと思う。

B. MMPsの種類

B-1. コラゲナーゼ

潜在型間質コラゲナーゼ (MMP-1) には分子量が57,000と52,000である2種の酵素が存在し、それらは活性化されて、それぞれ47 kD及び42 kDの活性型酵素に変る (Stricklinら, 1977, 1978)。この2種類の酵素の違いは、*N*-結合型オリゴ糖が大きい方の分子についているという点のみである (Nagaseら, 1981, 1983; Wilhelmら, 1986; Goldbergら, 1986)。間質コラゲナーゼは線維芽細胞、軟骨細胞、内皮細胞、ケラチン細胞、マクロファージなど多種の細胞が産生している。白血球のコラゲナーゼ (MMP-8) は、多形核白血球の貯蔵顆粒から分泌される (Hastyら, 1984; 1986)。この酵素のコラーゲンの切断部位は間質コラゲナーゼと同じであるが、分子量(75 kD)、基質の反応速度論的解析 (Hastyら, 1987)、抗原性 (Hastyら, 1984) が異なっている。

B-2. ゼラチナーゼ/Ⅳ型コラゲナーゼ

変性コラーゲンの α 鎖(ゼラチン)とⅣ型コラーゲンの未変性の三重らせん鎖部位を効率よく分解する2種類のゼラチナーゼが報告されている。72 kDaゼラチナーゼ (MMP-2) は結合組織細胞 (Murphyら, 1981; Collierら, 1988) と腫瘍細胞から分泌さ

Table I The Matrix metalloproteinase family

Name	M_r^1	Substrates
Interstitial collagenase MMP-1	52,000 57,000*	I, II, III, VII, X collagens, casein
Leukocyte collagenase MMP-8	70-75,000	I, II, III collagens, casein
72-kD gelatinase/type IV collagenase MMP-2	70-72,000	IV, V, VII, XI collagens, gelatins, fibronectin, elastin
92-kD gelatinase/type IV collagenase MMP-9	92,000*	V, IV, VII collagens, gelatins, elastin
Stromelysin MMP-3	57,000 60,000*	proteoglycan core protein, laminin, fibronectin, type I collagen
Stromelysin-2 MMP-10		<i>N</i> -propeptide, type IV, V, IX collagens, gelatins, elastin, activates procollagenase
Stromelysin-3 MMP-11	53,000	fibronectin, gelatins, type II, IV, V collagens
PUMP-1 MMP-7	28,000	gelatins, fibronectin, proteoglycan core protein, transferrin
Telopeptidase MMP-4	35,000	collagen C-propeptide

¹ The M_r of the latent human MMPs were determined by electrophoresis under reduced conditions.

* M_r of glycosylated forms of the MMPs.

tured collagen α -chains(gelatin) and type IV collagen in the native triple helical region have been described. The 72-kD gelatinase(MMP-2) is secreted by connective tissue cells (Murphy *et al.*, 1981; Collier *et al.*, 1988) and tumor cells and closely resembles the larger 92-kD gelatinase secreted by polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and macrophages (Murphy *et al.*, 1982; Mainardi *et al.*, 1984) and some transformed cells(Wilhelm *et al.*, 1989). Although the 72-kD and 92-kD gelatinases are immunologically distinct, they are similar in that they both contain a fibronectin-like collagen binding domain(Fig.1). Unlike the 72-kD gelatinase, the 92-kD gelatinase is glycosylated and contains a 53-amino acid sequence that shows some similarity with a segment of the $\alpha 2(V)$ collagen chain (Collier *et al.*, 1988; Wilhelm *et al.*, 1989).

B-3. The Stromelysins

Stromelysin occurs both as an unglycosylated 57-kD protein and as a minor 60-kD N-linked glycosylated protein (Wilhelm *et al.*, 1987; Okada *et al.*, 1988). Stromelysin has a wide substrate specificity(Table I), which includes proteoglycan core protein and fibronectin and can also degrade basement membrane components including the nonhelical regions of type IV collagen and the laminin A chain. Three additional stromelysin-like MMPs(stromelysin-2, -3, and PUMP-1) have recently been identified by cDNA cloning(Breathnach *et al.*, 1987; Muller *et al.*, 1988). PUMP-1(putative metallopro-

tease, これに性質のよく似てもっと高分子の92 kDゼラチナーゼは、多形核白血球、単球、マクロファージ(Murphyら、1982; Mainardiら、1984)、およびある種の形質転換細胞(Wilhelmら、1989)が分泌する。72 kD及び92 kDゼラチナーゼは免疫学的には異なるが、どちらもフィブロンectin様コラーゲン結合ドメインを持つという点では共通している(図1)。72 kDゼラチナーゼとは違って92 kDゼラチナーゼには糖鎖がついていて、さらに $\alpha 2(V)$ コラーゲン鎖の一部と類似した53アミノ酸配列がある(Collierら、1988; Wilhelmら、1989)。

B-3. ストロムライシン

ストロムライシンは大部分が糖のつかない57 kDタンパクで、そのほかに少量の60 kDのN-結合型糖タンパクが見出されている(Wilhelmら、1987; Okadaら、1988)。ストロムライシンはプロテオグリカンのコアタンパクやフィブロンectinなどを分解し、基質特異性は広い(表1)。さらにIV型コラーゲンの三重らせん鎖以外の領域や、ラミニンのA鎖などの基底膜成分を分解出来る。ストロムライシンによく似た3種のMMPs(ストロムライシン-2、-3、およびパンプ1)が、最近cDNAのクローニングによって確認された(Breathnachら、1987; Mullerら、1988)。パンプ1(推定上のメタロプロテアーゼ1)は、ストロムライシンのN-末領域に49%類似し、C末領域のヘモペクシン様ドメインの欠如した短いMMP(267アミノ酸)である(Mullerら、1988)。パンプ1とストロムライシンはプロコラーゲナーゼを活性化することが

Fig. 1. Schematic representation of MMP mosaic structure. Proteinases are represented as globular domains in the active form after removal of the N-terminal pro-domain. C, C-terminal hemopexin-like domain; Zn, Zn^{2+} ion in MMP active site (white cleft); CAT, catalytic domain; Fn, fibronectin type II motif-like domain; $\alpha 2V$, $\alpha 2$ type V collagen-like domain.

teinase-1) is a truncated MMP(267-amino acids) that is 49% similar to the N-terminal region of stromelysin, but it lacks the C-terminal hemopexin-like domain(Muller *et al.*, 1988). PUMP-1 and stromelysin can activate procollagenase(Murphy *et al.*, 1987; Ito and Nagase, 1988).

C. Domain Structure of MMPs

C-1. The Amino-terminal 'Pro'domain

Sequence analysis has revealed that the MMPs are structurally related, with conserved regions of significant homology. MMPs have a 17-19-amino-acid residue N-terminal leader sequence, rich in hydrophobic amino acid residues, that is proteolytically removed after insertion of the nascent protein into the endoplasmic reticulum. The ~180-amino-acid residue N-terminal region of the MMPs forms the propeptide, its site of cleavage from the protein core, and a segment containing the N-linked glycosylation sites. The prodomain is typically ~80 amino acid residues in length and contains a highly conserved sequence, PRCGVPDV, in which is located an unpaired cysteine residue. In the latent enzyme this cysteine is thought to coordinate with the Zn^{++} ion in the active site, thus blocking the catalytic activity of the enzyme(see below).

C-2. The Metal Ion Binding Catalytic Domain

The MMPs are metal-dependent proteinases, requiring a Zn^{++} ion for catalysis and Ca^{++} ions for stability and full activity. Collagenase contains a region of 110 amino acids that is 25.5% identical to the zinc-binding region of the *Serratia* metalloproteinase(McKerrow, 1987). Moreover, within this sequence lies a stretch of 11 amino acids, HELGHSLGLSH, nine of which are identical and two are chemically similar to the putative zinc-binding site in the *Serratia* proteinase (McKerrow, 1987). The catalytic Zn^{++} ion is complexed with three amino acid residues, the fourth coordination site being occupied by a water molecule in the active enzyme that is essential for catalysis.

C-3. The Carboxyl-Terminal Hemopexin-Like Domain

The ~192-amino-acid C-terminal domain is less well conserved than the other domains, it is present in all MMPs except PUMP-1, and it appears to be involved in conferring substrate specificity to the MMPs and is involved in TIMP binding. Interestingly, the C-terminal is ~20% identical with the heme-binding serum protein hemopexin(Matrisian *et al.*, 1986) and contains four short(38-amino-acid residue) stretches that show a high degree of homology with complement S-protein/vitronectin. Of note, these motifs include part of the glycosaminoglycan- and heparin-binding sites of S-protein which may account for the binding of collagenase and MMP-2 to heparin.

C-4. Extracellular Matrix-Like Domains

The 72-kD and 92-kD gelatinases are distinguished from the other MMPs by the presence of extra amino acid se-

出来る(Murphyら, 1987; ItoとNagase, 1988)。

C. MMPsのドメイン構造

C-1. アミノ末端“前駆体”ドメイン

配列分析からMMPsは、非常によく似た領域が保存された構造上関係の深い酵素群であることが明らかとなった。MMPsには、疎水性アミノ酸に富む17~19アミノ酸残基のN-末のリーダー配列があり、これは小胞体に合成されたばかりのタンパクが入りこんだ後にタンパク分解されて除かれる。約180アミノ酸残基からなるMMPsのN末部分は前駆体ペプチドを形成し、そこでタンパクコアからの切断が行なわれる。この部分には糖の結合するアスパラギンが存在する。前駆体ドメインは、約80アミノ酸残基の長さで、相手のないシステイン残基を含むPRCGVPDVという配列が保持されている。潜在型酵素では、このシステインは Zn^{++} と共役していて、その為に触媒活性が妨げられていると考えられている(後述)。

C-2. 金属イオン結合触媒ドメイン

MMPsは触媒反応の為に Zn^{++} イオンを必要とし、安定性と十分な活性発揮のために Ca^{++} イオンを必要とする金属依存性酵素群である。コラゲナーゼのこの領域は110アミノ酸残基からなり、これは*Serratia*の金属タンパク分解酵素の亜鉛結合領域と25.5%同じである(McKerrow, 1987)。さらにこの配列の中には、HELGHSLGLSHというアミノ酸11個の配列があり、このうち9アミノ酸は、*Serratia*のタンパク分解酵素の恐らく亜鉛結合部位と思われる配列と全く同一で、残りの2残基も化学的性質のよく似たアミノ酸である(McKerrow, 1987)。触媒中心の Zn^{++} イオンは、活性酵素中の3個のアミノ酸と結合し、第4番目の共役部位は水分子に占められるということが触媒反応には必須である。

C-3. C末のヘモペキシン様ドメイン

約192アミノ酸からなるC-末ドメインは他のドメイン程保存されていないが、パンプ1以外の全てのMMPsに存在する。そしてこのドメインがMMPsの基質特異性を決めているらしいし、またTIMPとの結合に関与している。面白いことには、C末はヘム結合血清タンパクであるヘモペキシンと約20%同じ構造をしていて(Matrisianら, 1986)、補体Sタンパク/ビトロネクチンと高い相同性をもつ短い(38アミノ酸残基)配列を4個含んでいる。注目すべきは、これらのモチーフはSタンパクのグリコサミノグリカン結合部位及びヘパリン結合部位の一部を含むことで、それがコラゲナーゼやMMPsがヘパリンに結合するのに役立っているらしい。

C-4. 細胞外マトリックス様ドメイン

他のMMPsと違って、72 kD及び92 kDゼラチナーゼには触媒ドメインのすぐ隣に余分のアミノ酸配列が存在する(Collierら, 1988; Wilhelmら, 1989)。どちらのゼラチナーゼにも、触媒ドメインのN末側に58アミノ酸残基からなるフィブロネクチン様II型コラーゲン結合モチーフが3回繰り返されて存在してい

quences lying adjacent to the catalytic domain(Collier *et al.*, 1988; Wilhelm *et al.*, 1989). Both gelatinases contain three copies of a 58-amino acid residue fibronectin-like type II collagen binding motif lying N-terminal to the catalytic site. This 175-amino-acid region is thought to be involved in the high affinity binding of these MMPs to gelatin.

In addition to the fibronectin-like region, the 92-kD gelatinase, but not the 72-kD gelatinase, contains a 53-amino-acid proline rich sequence located C-terminal to the Zn²⁺-binding domain. This region is 42% identical to a segment of the $\alpha 2(V)$ collagen chain and may be a structural motif involved in intermolecular interactions that form a collagen fold, linking 92-kD gelatinase dimers and trimers. 92-kD gelatinase also has significant type V collagenolytic activity, a function in which this domain may participate.

D. Zymogen Form and Activation

MMPs are secreted as latent inactive proenzymes that must be first activated for proteolytic activity. Although sequence comparisons between the MMPs that have been cloned has provided some insights into the biochemical nature and physiological mechanisms of activation, the nature of MMP latency and activation is still incompletely understood. MMPs can be activated by a variety of reagents and methods in vitro including treatment with organomercurials(eg. p-aminophenylmercuric acetate, APMA)(Sellers and Reynolds, 1977; Stricklin *et al.*, 1983; Springman *et al.*, 1990), chaotropic ions (Abe and Nagai, 1972; Springman *et al.*, 1990), proteolytic cleavage by trypsin and plasmin (Vaes 1972; Bauer *et al.*, 1975; O'Grady *et al.*, 1981; Okada *et al.*, 1988), detergents(Birkedal-Hansen and Taylor, 1982), and Au(I) salts (Lindy *et al.*, 1986).

In both the glycosylated(57 kD) and the nonglycosylated(52 kD) forms of collagenase, cleavage of the N-terminal propeptide from the protein core occurs at one of three peptide bonds within the sequence QFVL at the boundary between the prodomain and the rest of the molecule. However, the organomercurial, APMA, is incapable of peptide bond scission and an N-terminal valine is inconsistent with the specificity of trypsin. Thus, it is thought that the initial reaction product of trypsin and APMA-activated MMPs is unstable and autolytic cleavage of the propeptide then occurs to generate a more stable, active form of the enzyme. In most MMPs, this results in an ~10 kD loss in M_r , but the actual decrease in M_r is dependent on the MMP. However, it remains to be resolved whether the final activation step of MMPs is indeed the result of autocatalysis, as shown for collagenase, or through the activity of activation intermediates, as shown for stromelysin (see below).

The highly conserved sequence, PRCGVDPV, immediately precedes the N-terminus of the cleaved and activated MMPs except in MMP-9, where the PRCGVDP element occurs C-terminal to the Met₉₄ activation cleavage site (Wilhelm

る。この175アミノ酸残基の作る領域は、これらのMMPsがゼラチンに強く結合するのに関係しているのであろう。

フィブロネクチン様領域以外に、92 kDゼラチナーゼにはZn²⁺結合ドメインのC末側に53個のアミノ酸からなるプロリンに富む配列が存在する。これは72 kDゼラチナーゼにはない。この領域は $\alpha 2(V)$ コラーゲン鎖の一部と42%の相同性を示した。この領域は分子間結合に関与した構造モチーフで、この分子間結合により92 kDゼラチナーゼ二量体や三量体がつながってコラゲナーゼ様おりたたみ構造を形成するのであろうか。92 kDゼラチナーゼはV型コラーゲンを分解する活性も持っており、これにはこのドメインが関与しているのであろう。

D. プロ酵素と活性化

MMPsは潜在型酵素、つまりまだ不活性のプロ酵素として分泌されるので、まず最初にタンパク分解をうけて活性化されなければならない。クローニングされたMMPs間の配列の比較から活性化について生化学的性質や生理的機構がある程度判ってきたが、MMPsの潜在性と活性化はまだ完全には解明されていない。MMPsはin vitroでは、有機水銀(例えば、パラアミノフェニル水銀-酢酸、APMA)(Sellers and Reynolds, 1977; Stricklin *et al.*, 1983; Springman *et al.*, 1990)、カオトロピックイオン(AbeとNagai, 1972; Springman *et al.*, 1990)、トリプシンやプラスミンによるタンパク分解(Vaes, 1972; Bauer *et al.*, 1975; O'Grady *et al.*, 1981; Okada *et al.*, 1988)、界面活性剤(Birkedal-HansenとTaylor, 1982)、Au(I)塩(Lindy *et al.*, 1986)など多くの試薬や方法によって活性化される。

コラゲナーゼでは、糖のついている型(57 kD)もついていない型(52 kD)のどちらでも、前駆体ドメインと残りの分子の境界にあるQFVLという配列内の3ペプチド結合のうちの1つで、N末の前駆体ペプチドが残りの部分から切断される。しかし、有機水銀であるAPMAがペプチド結合を切ることは不可能であるし、N末のバリンで切れることはトリプシンの特異性と適合しない。従って、トリプシンやAPMAで活性化されて最初に来る反応生成物は不安定で、続いて自己分解が起こってより安定な活性型酵素が生成されると考えられている。この結果、MMPsの多くで分子量として約10 kDが失われるがその分子量の減少量はMMPによって異なっている。しかしながら、MMPsの活性化の最終段階が本当にコラゲナーゼにみられるような自己触媒の結果なのか、ストロムライシンにみられるように(後述)活性をもつ活性化中間体を通していくものなのか、解明されるべき問題が残されている。

高度に保存されているPRCGVPDVという配列は、切断されて活性化されたMMPsのN末のすぐ上流にある。MMP-9では例外的に、PRCGVPD配列は活性化切断部位であるMet94よりC末側にある(Wilhelm *et al.*, 1989)。PRCGVPDV配列中にあるシステイン残基は対(S-S結合)をつくらずに、水分子と置きかわって触媒中心のZn²⁺イオンと共役し、このため酵素を不活性化してい

et al., 1989). The cysteine residue found in the PRCGVDPV element is unpaired and coordinates with the catalytic Zn^{++} ion, displacing a water molecule, thus rendering the enzyme inactive. Activation by sulphhydryl-modifying reagents *in vitro* occurs when this cysteine residue is transiently dissociated from the Zn^{++} and reacts with the modifying reagent, thereby preventing reassociation of the cysteine with the Zn^{++} ion (Springman *et al.*, 1990). Likewise, proteolytic cleavage within the prodomain, the use of sodium dodecyl sulphate and chaotropic agents may also displace the cysteine residue, exposing the Zn^{++} ion to the solvent and activating the enzyme (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990).

D-1. Stromelysin/Procollagenase Activator

'Procollagenase activators' that can either react with procollagenase nonproteolytically (Tyree *et al.*, 1981; Vater *et al.*, 1983, 1986) or proteolytically (Ishibashi *et al.*, 1987) appear essential for full collagenase activation. Without the procollagenase activator, collagenase is not activated even though both trypsin and APMA produce a decrease in the M_r of the collagenase (Vater *et al.*, 1983, 1986). The cDNA of rabbit and human synovial procollagenase activators have been cloned (Fini *et al.*, 1987; Okada *et al.*, 1986) and identified as stromelysin.

The mechanism of action of stromelysin as a collagenase activator is not clear, but it appears that stromelysin produces a small decrease in the M_r of collagenase that markedly enhances the specific activity of the enzyme (Murphy *et al.*, 1987; He *et al.*, 1989). Although stromelysin does not efficiently activate procollagenase, activated stromelysin does reduce the M_r of plasmin- or trypsin-activated collagenase from 42 kD by ~2 kD through the removal of the C-terminal ~15 amino acid residues. This cleavage "superactivates" the enzyme with a 5- to 8-fold increase in specific activity.

E. MMP Inhibitors

E-1. TIMP

Activated MMPs are inhibited by a number of inhibitors, the most extensively characterized is TIMP, the tissue inhibitor of MMPs. Recently, additional members of the TIMP family have been identified and characterized to various degrees. MMPs are also inhibited by α_2 -macroglobulin (Abe and Nagai, 1972; Sottrup-Jensen and Birkedal-Hansen, 1989) and a low M_r cationic inhibitor present in cartilage (Kuettner *et al.*, 1976; Horton *et al.*, 1978). However, recent attempts at isolating this low M_r inhibitor have not been successful in confirming the presence of a unique inhibitor, distinct from the TIMPs.

The cDNA for human TIMP has been cloned (Docherty *et al.*, 1985; Carmichael *et al.*, 1986). TIMP is synthesized by many tissue cells (Vater *et al.*, 1979; Murphy *et al.*, 1977; Pettigrew *et al.*, 1980; Cawston *et al.*, 1981; Welgus and Stricklin, 1983) and has been isolated from amniotic fluid (Murphy *et al.*,

1989). SH試薬による *in vitro* での活性化は、このシステインが Zn^{++} から一時的に外されて修飾試薬と反応し、そのためにシステインと Zn^{++} イオンの再結合が妨げられる時におこる (Springman *et al.*, 1990). 同様に前駆体ドメイン内でのタンパク分解や、ドデシル硫酸ナトリウムやカオトロピック試薬の使用も、同様にシステイン残基を置換して Zn^{++} イオンを溶媒にさらし酵素を活性化しているのであろう (Van Wart と Birkedal-Hansen, 1990).

D-1. ストロムライシン/プロコラゲナーゼ活性化物質

'プロコラゲナーゼ活性化物質'は、プロコラゲナーゼをタンパク分解しないもの (Tyree *et al.*, 1981; Vater *et al.*, 1983, 1986) であっても、するもの (Ishibashi *et al.*, 1987) であっても、コラゲナーゼを完全に活性化するのに必須であるようにみえる。プロコラゲナーゼ活性化物質なしには、コラゲナーゼの分子量がたとえトリプシンと APMA によって減少しても、コラゲナーゼは活性化されないものである (Vater *et al.*, 1983, 1986). ウサギとヒトの滑膜のプロコラゲナーゼ活性化物質の cDNA がクローニングされ (Fini *et al.*, 1987; Okada *et al.*, 1986)、それがストロムライシンであることが確認された。

コラゲナーゼ活性化物質としてのストロムライシンの作用機構は明らかではないが、ストロムライシンによるコラゲナーゼの分子量の減少は小さいけれども、これにより酵素活性は著しく増大する (Murphy *et al.*, 1987; He *et al.*, 1989). ストロムライシンはプロコラゲナーゼを効率よく活性化できないが、活性化されたストロムライシンはプラスミンやトリプシンで活性化した 42 kD のコラゲナーゼに働いて C 末の約 15 アミノ酸残基を除去して約 2 kD 減少させる。この切断により酵素はさらに活性化され、比活性は 5~8 倍上昇する。

E. MMP 阻害剤

E-1. TIMP

活性化された MMPs は多くの阻害物質で阻害をうける。その中で最もよく調べられているのは組織中に存在する MMPs 阻害物質である TIMP である。最近、TIMP 族の新しいメンバーの存在が確認され、ある程度まで性質が調べられている。MMPs は、 α_2 マクログロブリン (Abe と Nagai, 1972; Sottrup-Jensen と Birkedal-Hansen, 1989) や、軟骨に存在する低分子の陽イオン性阻害剤 (Kuettner *et al.*, 1976; Horton *et al.*, 1978) によっても阻害される。しかし最近この低分子阻害物質の単離が試みられたが TIMP とは異なる新しい阻害物質の存在を確かめることには成功しなかった。

ヒト TIMP の cDNA はクローニングされている (Dockerty *et al.*, 1985; Carmichael *et al.*, 1986)。TIMP は多くの組織細胞で合成されている (Vater *et al.*, 1979; Murphy *et al.*, 1977; Pettigrew *et al.*, 1980; Cawston *et al.*, 1981; Welgus と Stricklin, 1983) し、羊水 (Murphy *et al.*, 1981; Welgus と Stricklin, 1983)、血清 (Welgus と Stricklin, 1983)、唾液 (Drouin *et al.*, 1988) から単離されている。また血小板 (Cooper *et al.*, 1985) やマクロファージ (Welgus *et al.*, 1985) の分泌物としても確認されてい

1981; Welgus and Stricklin, 1983), serum(Welgus and Stricklin, 1983), saliva(Drouin *et al.*, 1988), and identified as a secretory product of platelets(Cooper *et al.*, 1985) and macrophages(Welgus *et al.*, 1985). TIMP specifically blocks the activity of all MMPs investigated by forming an essentially irreversible, 1:1 stoichiometric complex with the activated MMPs(Fig.2) (Welgus *et al.*, 1979; Cawston *et al.*, 1981, 1983), the K_D having been determined for active collagenase to be 1.4×10^{-10} M (Welgus *et al.*, 1985). Thus, the TIMP to MMP balance is critical in determining the net level of MMP activity. TIMP has no effect on the activity of other proteinases, including the bacterial collagenases, thermolysin, and serine, thiol, and aspartic proteinases.

The 184-amino-acid TIMP core protein has a predicted M_r of 20,685 and contains two potential *N*-glycosylation sites, both of which appear to be utilized(Stricklin 1986; Carmichael *et al.*, 1986), to give the mature secreted product an M_r of ~28.5 kD. However, neither of the *N*-linked oligosaccharide chains appears to be essential for inhibitory activity(Murphy *et al.*, 1985; Stricklin 1986). TIMP contains six disulphide bonds and is highly resistant to pH and temperature extremes(Welgus *et al.*, 1979; Cawston *et al.*, 1980, 1981). It was initially thought that TIMP was sensitive to APMA and trypsin. However, when highly purified TIMP and collagenase were prepared, Cawston *et al.*(1983) found that TIMP was resistant to APMA and trypsin; that TIMP/collagenase complexes could not be chromato-

る。TIMPはいままで調べられた全てのMMPsの活性を、活性型MMPsと化学量論的に1:1の不可逆的な複合体を形成して特異的に阻害する(図2)(Welgusら, 1979; Cawstonら, 1981, 1983)。活性型コラゲナーゼに対する K_D は 1.4×10^{-10} Mと算定されている(Welgusら, 1985)。このようにMMPにたいするTIMPの量比は、MMP活性の強さを決める上で決定的に重要である。TIMPは、細菌のコラゲナーゼ、サーモライシン、セリンー、チオールーおよびアスバラギン-タンパク分解酵素などの他のタンパク分解酵素の活性に対しては阻害効果を示さない。

184個のアミノ酸からなるTIMPのコアタンパク部分は、分子量が20,685と計算される。この中には糖のつき得るアスバラギンが2個あり、そのどちらにも糖がついているらしく(Stricklin, 1986; Carmichaelら, 1986)、このため出来上がった分泌産物の分子量は約28.5 kDaとなる。しかし、どちらのN-結合型糖鎖も阻害活性には必須でないらしい(Murphyら, 1985; Stricklin, 1986)。TIMPは6個のジスルフィド結合をもち、pHや温度の変化に抵抗性が高い(Welgusら, 1979; Cawstonら, 1980, 1981)。以前は、TIMPはAPMAやトリプシンに感受性が高いと考えられていた。しかし精製されたTIMPやコラゲナーゼが得られるようになって、TIMPがAPMAやトリプシンに抵抗性があり、TIMP/コラゲナーゼ複合体はクロマトグラフィーで分離させることが出来ないこと、TIMP/コラゲナーゼ複合体をAPMA、トリプシンやプラスミンで活性化することが出来ないことがCawstonら(1983)により見出された。

Fig. 2. Regulation of MMP activity by activators and TIMPs. proMMP, represents all MMPs except MMP-2 and MMP-9. The activation of proMMP-2 and proMMP-9 are represented separately since these MMPs, in the latent form, can be complexed with either TIMP-2 or TIMP-1 as appropriate. The activation pathway for MMP-9 is thought to be similar to MMP-2 other than that MMP-9 complexes with TIMP-1(see text).

graphically dissociated; and that TIMP/collagenase complexes could not be activated by APMA, trypsin, or plasmin.

E-2. TIMP-2

Recently, a number of other MMP inhibitors that are closely related to TIMP(-1) have been described. Reverse zymography and immunoabsorbance were used by Herron *et al.* (1986) to demonstrate the presence of three inhibitors of MMPs (IMPs) that were secreted by capillary endothelial cells. In addition to TIMP, two novel IMPs, IMP-1(M_r 22 kD, non-reduced) and IMP-2(M_r 19 kD, nonreduced) were identified, but not fully characterized. Three groups have reported the sequence and properties of a new MMP inhibitor, termed TIMP-2, that has different chromatographic properties, M_r , antigenicity, and N-terminal sequence to TIMP (Stetler-Stevenson *et al.*, 1989; De Clerck *et al.*, 1989; Goldberg *et al.*, 1989). The cDNAs for human and bovine TIMP-2 were recently cloned (Boone *et al.*, 1990; Stetler-Stevenson *et al.*, 1990).

Human TIMP-2 consists of 194 amino acid residues with a 26-amino-acid residue leader sequence and shows ~65% similarity and ~38% identity with TIMP, but is not glycosylated. Importantly, the positions of the 12 cysteines and 3 of 4 tryptophan residues are conserved. Similar to TIMP, TIMP-2 inhibits active collagenase and active MMP-2 by forming an irreversible 1:1, noncovalent complex with the enzyme. TIMP-2 is also heat and pH stable, shows resistance to trypsin treatment, and loses activity following reduction and alkylation. The M_r reported for human TIMP-2 is 21-24 kD (Stetler-Stevenson *et al.*, 1989; Goldberg *et al.*, 1989).

A surprising property of TIMP-2 is that, in addition to the inhibition of active MMP-2, TIMP-2 forms noncovalent complexes with latent MMP-2 in a stoichiometric manner (Stetler-Stevenson *et al.*, 1989; Goldberg *et al.*, 1989). Thus, inhibition of one mole of active MMP-2 requires two moles of TIMP-2. Although it has been long known that TIMP does not form complexes with latent collagenase (Welgus *et al.*, 1979) TIMP has recently been found to form noncovalent 1:1 molar ratio complexes with latent 92-kD gelatinase (Goldberg *et al.*, 1989; Wilhelm *et al.*, 1989). The function and physiologic significance of TIMP and TIMP-2 bound to latent gelatinases is not clear. Goldberg *et al.* (1989) reported that TIMP-2, bound to latent MMP-2, did not have any apparent effects on the activation of MMP-2 with APMA or the activity of MMP-2 following APMA activation. However, 92-kD gelatinase that is free of TIMP is released from polymorphonuclear leukocytes and has been found to exhibit an ~10-fold higher gelatinolytic and type IV collagenolytic activity than when complexed with TIMP (Wilhelm *et al.*, 1989). Similarly, in TIMP-2 depleted environments, such as that following Concanavalin A (ConA) stimulation of human fibroblasts (Overall and Sodek, 1990), a low M_r (61-kD), high specific activity, activated form of 72-kD gelatinase is produced. This indicates that TIMP-2 bound to the

E-2. TIMP2

最近TIMP(-1)とよく似た別のMMP阻害物質が数多く報告されている。逆転ザイムグラフィと免疫吸収の方法を用いて、Herronら(1986)は毛細血管内皮細胞が分泌する3種のMMPs阻害物質(IMPs)の存在を示した。それらは、TIMP以外に2種の新しいIMPsで、IMP-1(分子量は非還元で22 kD)とIMP-2(分子量は非還元で19 kD)と確認されたが、まだ充分に性状が調べられていない。クロマトグラフィ上での性質、分子量、抗原性、N末の配列がTIMPとは異なる新しいMMP阻害物質TIMP-2の構造配列と性質が3つのグループから報告された(Stetler-Stevensonら, 1989; De Clerckら, 1989; Goldbergら, 1989)。ヒトとウシのTIMP-2のcDNAが最近クローニングされた(Booneら, 1990; Stetler-Stevensonら, 1990)。

ヒトTIMP-2は194アミノ酸残基からなり、これに26アミノ酸残基からなるリーダー配列がついていて、TIMP-2はTIMPと約65%の類似性と約38%の相同性を示すが、糖はついていない。重要な点としては、12個のシステインの位置と4個のトリプトファンのうち3個の位置が、TIMPと同じ位置に保存されていることがあげられる。TIMPと同様に、TIMP-2は活性化されたコラゲナーゼやMMP-2を阻害するが、この際酵素と1:1の量比で不可逆的な非共有結合による複合体を形成する。TIMP-2もまた熱やpHに安定で、トリプシン処理にも抵抗性を示すが、還元およびアルキル化によって阻害活性は失われる。ヒトTIMP-2の分子量は21-24 kDと報告されている(Stetler-Stevensonら, 1989; Goldbergら, 1989)。

TIMP-2の驚くべき性質は、活性型MMP-2を阻害すること以外に、TIMP-2は化学量論的方法で潜在型MMP-2と非共有結合で複合体を形成するという点である(Stetler-Stevensonら, 1989; Goldbergら, 1989)。従って、活性型MMP-2の1モルを阻害するのに2モルのTIMP-2が必要となる。長い間、TIMPについては潜在型コラゲナーゼと複合体を形成しない(Welgusら, 1979)と考えられてきたが、最近になってTIMPが潜在型92 kDゼラチナーゼと1:1の量比で非共有結合複合体を形成することが見出された(Goldbergら, 1989; Wilhelmら, 1989)。潜在型ゼラチナーゼにTIMPやTIMP-2が結合するという機能や生理的意味は不明である。Goldbergら(1989)は、潜在型MMP-2にTIMP-2が結合しても、APMAによるMMP-2の活性化や、APMAによる活性化によって生じたMMP-2の活性に対して何ら影響を与えないと報告している。しかしTIMPのついていない92 kDゼラチナーゼが多形核白血球から放出されるが、このゼラチン及びIV型コラーゲン分解活性はTIMPと複合体を形成している時と比較すると約10倍高いことが見出された(Wilhelmら, 1989)。同様に、ヒト線維芽細胞をコンカナバリンA(conA)で刺激した時のようなTIMP-2の欠亡した環境においては、低分子の(61 kD)高い比活性をもった72 kDゼラチナーゼの活性型が産生される(OverallとSodek, 1990)。このことは、TIMP-2は潜在型酵素に結合していると立体障害によりMMPの完全な活性化を妨げるのか、或いは完全に

latent enzyme reduces enzymic activity either by preventing the complete activation of the MMP or by partially inhibiting the activity of the fully activated enzyme, perhaps by steric means.

F. Regulation of MMP and TIMP expression

F-1. MMP and TIMP Induction

Normally the constitutive expression of MMPs by cells is very low or absent. The degree of stimulation of MMPs by an inducing agent varies between cells and culture conditions and is dependent upon the basal level of expression, which is cell and tissue specific. Regardless of the constitutive level of expression, maximal induction of collagenase by the potent collagenase inducer 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) appears to be relatively constant, $\sim 3\text{--}7 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}/24 \text{ h}$, for cells derived from a variety of sources (Wilhelm *et al.*, 1986). In contrast, the constitutive expression of TIMP is not high, but TIMP mRNA can nonetheless be demonstrated in various tissues. Embryonic tissues in general, but particularly those tissues undergoing matrix deposition and remodeling, such as intramembranous and endochondral bone, contain low but detectable amounts of the TIMP transcript (Nomura *et al.*, 1989).

Studies on the regulation of TIMP have not been as extensive as studies on collagenase and stromelysin. TIMP gene expression is induced by serum, the growth factors EGF, PDGF, and FGF (Edwards *et al.*, 1985, 1986; Gewert *et al.*, 1987), and the tumor promoter TPA (Edwards *et al.*, 1986; Murphy *et al.*, 1985; Clark *et al.*, 1985). However, the co-ordinate increase in both MMPs and TIMP by these stimuli appears contradictory to the achievement of a resorptive phenotype.

Transcription of MMP genes is up-regulated by a variety of biologically active agents. Oncogenic viruses and tumor promoters such as TPA, mitomycin, and UV light induce the expression of collagenase (Aggeler *et al.*, 1984; Brinkerhoff *et al.*, 1979; Murphy *et al.*, 1985; Angel *et al.*, 1986). Collagenase synthesis is also stimulated by cytokines and growth factors including IL-1 (Murphy *et al.*, 1985; Dayer *et al.*, 1986; Richards and Rutherford, 1990), PDGF (Bauer *et al.*, 1985; Chua *et al.*, 1985), EGF (Chua *et al.*, 1985; Edwards *et al.*, 1987), and TNF α (Dayer *et al.*, 1985; Brenner *et al.*, 1989). Other collagenase stimulatory agents include steroids (Clark *et al.*, 1987), PGE $_2$ (Dayer *et al.*, 1976, 1978; Wahl *et al.*, 1977), endotoxin (Wahl *et al.*, 1974), ConA (Hurum *et al.*, 1982; Overall and Sodek, 1990) and phagocytosis (Werb and Reynolds, 1974). Cell shape changes, actin depolymerization (Harris and Krane, 1971; Unemori and Werb, 1986; Werb *et al.*, 1986), and cellular interaction with connective tissue components through integrins (Werb *et al.*, 1989) also stimulate the induction of collagenase and stromelysin expression.

Stromelysin mRNA levels are also elevated by IL-1 (Frisch and Ruley, 1987), EGF and PDGF (Matrisian *et al.*,

活性化した酵素の活性を部分的に阻害するかのいずれかによって酵素活性を低下させていることを意味している。

F. MMPとTIMP発現の調節

F-1. MMPとTIMPの誘導

細胞によるMMPタンパクの構成的発現は、通常はないか極めて低い。誘導物質によるMMP産生増大の程度は、細胞の種類や培養条件によって変り、細胞や組織に特異的な発現の構成的な水準に依存している。構成的な発現のレベルがどうであっても、強力なコラゲナーゼの誘導物質である12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)でコラゲナーゼを最大レベルに誘導すると、どの組織から由来する細胞でもほぼ一定で、 $\sim 3\text{--}7 \mu\text{g}/10^6 \text{ 細胞}/24\text{h}$ である (Wilhelmら, 1986)。これとは対照的にTIMPタンパクの構成的発現は高くないが、それにも関わらずTIMP mRNAは種々の組織で検出可能である。低いけれども、しかし検出可能な量のTIMPの転写が一般的には胎児の組織や、皮膚形成や軟骨内骨化のようなマトリックスが堆積したりつくりかえられたりしている組織で見出される (Nomuraら, 1989)。

TIMPの調節に関する研究は、コラゲナーゼやストロムライシンについての研究ほど十分にはなされていない。TIMP遺伝子の発現は血清、EGF、PDGFやFGFなどの成長因子 (Edwardsら, 1985, 1986; Gewertら, 1987)、腫瘍促進剤TPA (Edwardsら, 1986; Murphyら, 1985; Clarkら, 1985)によって誘導される。しかし分解系であるMMPsとその阻害剤であるTIMPがこれらの刺激剤により共に増大するということは、組織が吸収されていくという現象としては矛盾しているようにみえる。

MMP遺伝子の転写は種々の生物学的試薬によって促進的制御を受けている。腫瘍原性ウイルス、TPAやマイトマイシンや紫外線のような腫瘍促進剤はコラゲナーゼ発現を誘導する (Aggelerら, 1984; Brinkerhoffら, 1979; Murphyら, 1985; Angelら, 1986)。コラゲナーゼ合成はIL-1 (Murphyら, 1985; Dayerら, 1986; RichardsとRutherford, 1990)、PDGF (Bauerら, 1985; Chuaら, 1985)、EGF (Chuaら, 1985; Edwardsら, 1987)、TNF α (Dayerら, 1985; Brennerら, 1989)などのサイトカインや成長因子によってもまた励起される。他のコラゲナーゼ励起剤としては、ステロイド (Clarkら, 1987)、PGE $_2$ (Dayerら, 1976, 1978; Wahlら, 1977)、エンドトキシン (Wahlら, 1974)、ConA (Hurumら, 1982; OverallとSodek, 1990)、食食作用 (WerbとReynolds, 1974)などがある。細胞の形の変化、アクチンの脱重合 (HarrisとKrane, 1971; UnemoriとWerb, 1986; Werbら, 1986)、細胞がインテグリンを介して結合組織成分と結合すること (Werbら, 1989)もまたコラゲナーゼやストロムライシンの発現の誘導を励起する。

ストロムライシンのmRNA量もまたIL-1 (FrischとRuley, 1987)、EGFおよびPDGF (Matrisianら, 1985a; Kerrら, 1988b)、NGF (Machidaら, 1989)、腫瘍への形質転換 (Matrisianら, 1985a; Kerrら, 1988b)、TPA (Chinら, 1985; Kerrら, 1988a)によって上昇する。コラゲナーゼとストロムライシンの調節は細胞や組織に

1985a; Kerr *et al.*, 1988b), NGF(Machida *et al.*, 1989), oncogenic transformation(Matrisian *et al.*, 1985a; Kerr *et al.*, 1988b), and TPA(Chin *et al.*, 1985; Kerr *et al.*, 1988a). The regulation of collagenase and stromelysin is cell and tissue specific and not necessarily coordinated(Wilhelm *et al.*, 1987; Overall *et al.*, 1989; 1991; Overall and Sodek, 1990). However, coordinate expression of stromelysin and collagenase is common(Aggeler *et al.*, 1984; Chin *et al.*, 1985; Frisch *et al.*, 1987; Murphy *et al.*, 1985).

In contrast with other MMPs, MMP-2 appears relatively uninducible. Salo *et al.*(1985) reported that human fibroblasts in the early log phase of growth produced type IV collagenase (MMP-2), but the levels of expression declined to be undetectable by late log phase, at which point the enzyme was now inducible by TPA. However, Collier *et al.*(1988) and Overall and Sodek(1990) have found that type IV collagenase is not induced by TPA. Indeed, the MMP-2 promoter does not have a TRE box(Frisch *et al.*, 1990). In response to other agents, the regulation of MMP-2 also appears distinct(Collier *et al.*, 1988). MMP-2 is induced by TGF- β 1(Overall *et al.*, 1989; 1991, see below) but not by IL-1 or TPA and thus differs from the regulation of collagenase and stromelysin which are coordinately regulated by TPA and IL-1(Aggeler *et al.*, 1984; Murphy *et al.*, 1985; Chin *et al.*, 1985). Of note, active and latent 72 kD gelatinases are found in high amounts in developing tooth enamel, at sites shown to also contain abundant levels of TGF- β 1 mRNA(Overall and Limeback, 1988). Although many cells constitutively synthesize MMP-2, the 92-kD gelatinase is only secreted by some tumor cells, macrophages, and epidermal keratinocytes. However, EGF, TPA, and IL-1 induce the expression of 92-kD gelatinase, but not MMP-2, in U937, HT1080 cells, and SV40-transformed fetal lung fibroblasts(Wilhelm *et al.*, 1989).

Collagenase synthesis and mRNA levels are repressed by dexamethasone and retinoic acid(Brinkerhoff *et al.*, 1980; Saus *et al.*, 1988), although retinoic acid stimulates collagenase induction in rat bone cells(Otsuka *et al.*, 1984). Interferon- γ (IFN- γ) has also been shown to reverse the stimulation of bone cell collagenase by 1, 25-dihydroxy vitamin D₃ [1, 25-(OH)₂D₃], parathyroid hormone, IL-1, PGE₂, and TNF α (Shen *et al.*, 1988). Recent studies have established a regulatory role for TGF- β 1 in the expression of fibroblast and osteoblast collagenolytic activity. TGF- β 1 was found to suppress collagenase activity directly, by decreasing collagenase transcription and synthesis, and indirectly, by differentially increasing TIMP and PAI-1 synthesis(Edwards *et al.*, 1987; Overall *et al.*, 1989; 1991). The general reduction in proteolytic activity by TGF- β 1 would augment the synthesis of extracellular matrix, a process stimulated by TGF- β 1(Wrana *et al.*, 1986, 1991). However, TGF- β 1 increases the expression of 72-kD gelatinase(Overall *et al.*, 1989; 1991) and, in contrast to the effects on TIMP, TGF-

特異的で、必ずしも共役していない(Wilhelmら, 1987; Overallら, 1989, 1991; OverallとSodek, 1990)。しかしストロムライシンとコラゲナーゼの共役した調節が普通である(Aggelerら, 1984; Chinら, 1985; Frischら, 1987; Murphyら, 1985)。

他のMMPsと異なり、MMP-2は比較的誘導されにくいようにみえる。Saloら(1985)によると、ヒト線維芽細胞が対数増殖期の初期にIV型コラゲナーゼ(MMP-2)を産生するが、対数増殖期の後期には発現量は減少して検出できなくなる。この時期にTPAで処理すると酵素が誘導されると言う。しかしながら、Collierら(1988)とOverallとSodek(1990)はIV型コラゲナーゼはTPAによって誘導されないことを見出している。たしかに、MMP-2プロモーターはTREボックスをもっていない(Frischら, 1990)。他の試薬に対する応答でも、MMP-2の調節は異なっているようだ(Collierら, 1988)。MMP-2はTGF- β 1(Overallら, 1989, 1991, 後述)によって誘導されるがIL-1やTPAでは誘導されない。このように、TPAやIL-1で共役的に調節をうけるコラゲナーゼやストロムライシンの調節とは違っている(Aggelerら, 1984; Murphyら, 1985; Chinら, 1985)。注目すべきことに、活性型及び潜在型72 kDゼラチナーゼは発達しつつある歯のエナメル質の、特にTGF- β 1 mRNAを豊富に含有している所に非常に多く存在する(Overall, Limeback 1988)。多くの細胞がMMP-2を構成的に合成するが、92 kDゼラチナーゼはある種の腫瘍細胞、マクロファージ、表皮のケラチン細胞によってのみ分泌される。しかし、U937、HT1080細胞、SV-40で形質転換した胎児の肺線維芽細胞に於ては、EGF、TPA、IL-1は92 kDゼラチナーゼの発現を誘導するが、MMP-2は誘導されない(Wilhelmら, 1989)。

コラゲナーゼの合成とmRNAレベルはデキサメタゾンとレチノイン酸によって抑制される(Brinkerhoffら, 1980; Sausら, 1988)がレチノイン酸はラットの骨細胞ではコラゲナーゼ誘導を励起する(Otsukaら, 1984)。またインターフェロン γ (IFN- γ) は、1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃[1, 25-(OH)₂D₃]、パラサイロイドホルモン、IL-1、PGE₂、TNF α による骨細胞コラゲナーゼの増大を抑えることが示されている(Sehenら, 1987)。最近の研究で、TGF- β 1が線維芽細胞や骨細胞のコラーゲン分解活性の発現の調節に関わっていることが明らかとなった。TGF- β 1は、直接にはコラゲナーゼの転写と合成を減少させ、間接的にはTIMPとPAI-1合成を差次的に増大させることによって、コラゲナーゼ活性を抑制していることが見出された(Edwardsら, 1987; Overallら, 1989, 1991)。TGF- β 1によってタンパク分解活性が一般に減少するということは、細胞外マトリックス合成がTGF- β 1の刺激によって増大しているようにみせることになる(Wranaら, 1986)。しかしながら、TGF- β 1は72 kDゼラチナーゼの発現を増加させ(Overallら, 1989, 1991)TIMPに対するのとは異なりTIMP-2の発現を減少させる(Stetler-Stevensonら, 1990)ので、MMP-2の活性は増強される。長期間培養したMRC-5線維芽細胞でも、TGF- β 1はEGFやFGFによって誘導されるコラゲナーゼ量を減少させ、EGFやFGFによって誘導されるTIMP量を増

B1 decreases the expression of TIMP-2(Stetler-Stevenson *et al.*, 1990), an action that would potentiate the activity of MMP-2. TGF- β 1 also reduces the level of collagenase expression induced by EGF and FGF in late passage MRC-5 fibroblasts and amplifies the induction of TIMP by EGF and FGF(Edwards *et al.*, 1987). The EGF induction of stromelysin mRNA is also repressed by TGF- β 1(Matrisian *et al.*, 1986b, Machida *et al.*, 1988; Kerr *et al.*, 1988a), serum(Matrisian *et al.*, 1985a), and dexamethasone(Frisch and Ruley, 1987).

In all cases examined, the increase in MMP expression results from transcriptional activation with increases in the collagenase and stromelysin mRNA levels occurring within 5-8 h of TPA stimulation(Brinkerhoff *et al.*, 1982; Gross *et al.*, 1984; Frisch *et al.*, 1987). After collagenase induction, corresponding increases in the synthesis and export of the collagenase protein soon follows, with no storage of the enzyme within the cell (Valle and Bauer, 1979). MMP-2 is upregulated by TGF- β 1 through increased transcription and through increased mRNA stability(Overall *et al.*, 1991). In rabbit synovial cells, collagenase mRNA degradation is decreased following TPA stimulation, but the decreased mRNA levels following retinoic acid or dexamethasone treatment did not result from reduced mRNA stability(Brinkerhoff *et al.*, 1986). Similarly, the decrease in collagenase mRNA levels following TGF- β 1 treatment does not result from decreased mRNA stability (Overall *et al.*, 1991).

F-2. Intracellular pathways

TPA stimulation of collagenase(Angel *et al.*, 1986, 1987a,b) and stromelysin(Kerr *et al.*, 1988b) gene transcription involves FOS, the product of c-fos, which is transiently induced following TPA stimulation(Angel *et al.*, 1987a). The activator protein-1(AP-1) complex is a FOS/JUN heterodimer which binds to the nucleotide sequence TGAg/cTCA, termed the TPA response element(TRE), in the collagenase promoter(Lee *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1987a, b).

Protein kinase C activity appears to be critically important in the induction of collagenase and stromelysin. The majority of the known effects of TPA are mediated through protein kinase C activity(see review by Nishizuka, 1988). In addition, the stimulation of collagenase expression by TNF α , which also stimulates protein kinase C activity, is blocked in the presence of a protein kinase C inhibitor(Brenner *et al.*, 1989). The TRE box is also present in the stromelysin promoter and growth factor induction of stromelysin expression utilizes this element (Kerr *et al.*, 1988b). Experiments utilizing c-fos antisense mRNA and protein kinase C depletion have revealed that PDGF induces stromelysin transcription through a FOS-dependent pathway that is independent of protein kinase C activity (Kerr *et al.*, 1988b). In contrast, EGF and TPA induction of stromelysin requires protein kinase C activity, but unlike TPA and PDGF, EGF does not induce stromelysin through FOS

強する(Edwardsら, 1987)。ストロムライシンmRNAのEGFによる誘導は、TGF- β 1(Matrisianら, 1986b; Machidaら, 1988; Kerrら, 1988a)、血清(Matrisianら, 1985)、デキサメサゾン(Frischと Ruley, 1987)によっても同様に抑えられる。

調べられている全ての場合に於て、MMP発現の増加は、TPA刺激後5～8時間でおこるコラゲナーゼやストロムライシン mRNA量の増加を伴う転写の活性化からもたらされている(Brinkerhoffら, 1982; Grossら, 1984; Frischら, 1987)。コラゲナーゼ誘導のあと、コラゲナーゼタンパクの合成と分泌の増加がすぐに続き、細胞内に酵素は貯えられることはない(Valleと Bauer, 1979)。MMP-2はTGF- β 1により転写の増加とmRNA安定性が増大することで、増加方向に調節を受けている(Overallら, 1991)。ウサギの滑膜細胞では、コラゲナーゼのmRNAの分解はTPA刺激の後減少する。しかし、レチノイン酸やデキサメサゾン処理後のmRNA量の減少は、mRNAの安定性が低下したためにもたらされたのではない(Brinkerhoffら, 1986)。同様に、TGF- β 1処理後のコラゲナーゼのmRNA量の減少は、mRNAの安定性の減少が原因ではない(Overallら, 1991)。

F-2. 細胞内経路

TPAによるコラゲナーゼ(Angelら, 1986, 1987a,b)とストロムライシン(Kerrら, 1988b)遺伝子の転写の励起は、c-fosの産物であるFOSが関係している。FOSはTPA刺激後一時的に誘導される(Angelら, 1987a)。アクチベータータンパク-1(AP-1)複合体はFOS/JUN異種二量体であってコラゲナーゼプロモーター中にあるTPA応答エレメント(TRE)と名付けられているTGAg/cTCAというヌクレオチド配列と結合する(Leeら, 1987; Angelら, 1987 a, b)。

プロテインキナーゼC活性がコラゲナーゼやストロムライシンの誘導に決定的に重要であるようにみえる。今までに知られているTPAの効果の大部分は、プロテインキナーゼC活性を介するものである(Nishizukaによる総説, 1988)。さらに、プロテインキナーゼCを励起できるTNF α によるコラゲナーゼの発現の増加はプロテインキナーゼC阻害剤の存在下では妨げられる(Brennerら, 1989)。TREボックスは、ストロムライシンのプロモーター中にも存在し、成長因子によるストロムライシン発現の誘導にはこのエレメントが用いられる(Kerrら, 1988b)。c-fosのアンチセンスmRNAを用いたり、プロテインキナーゼC欠損状態での実験から、プロテインキナーゼCとは無関係のFOS-依存性の経路によって、PDGFはストロムライシンの転写を誘導することが明らかとなった(Kerrら, 1988b)。これに対し、ストロムライシンのEGFやTPAによる誘導はプロテインキナーゼC活性を必要とするが、TPAやPDGFとは異なり、EGFはストロムライシンの誘導にFOSを介さない(Kerrら, 1988b)。

cAMPの量もTPAやIL-1によって著しく上昇するが、cAMP産生の増加には間接的にPGE2が介在している(Dayerら, 1978)。TPAはまた、PGE2の強力な励起剤でもあるが、インドメタシン存在下でもTPAはコラゲナーゼ発現を刺激し続ける(Brinkerhof

(Kerr *et al.*, 1988b).

cAMP levels are also markedly elevated by TPA and by IL-1, but the increase in cAMP production is indirectly mediated by PGE₂ (Dayer *et al.*, 1978). TPA is also a potent stimulator of PGE₂ synthesis, but TPA in the presence of indomethacin continues to stimulate collagenase expression (Brinkerhoff *et al.*, 1979) indicating that the TPA induction of collagenase is not mediated by PGE₂ or cAMP. Indeed, cAMP is involved in the repression of stromelysin expression (Kerr *et al.*, 1988a). However, TGF-β1 does not elevate cAMP levels, indicating that the TGF-β1 repression of stromelysin expression occurs through another pathway. Other second messenger systems have also been investigated for their possible involvement in collagenase induction. However, the addition of Ca⁺⁺ ionophores, cAMP, or arachidonic acid did not induce collagenase in human fibroblasts (Brenner *et al.*, 1989).

Recently, a TGF-β inhibitory element (TIE), GNNTTGGtGA, has been identified in the promoter regions of stromelysin and collagenase that is involved in the inhibition of gene transcription (Kerr *et al.*, 1990). Of interest, a FOS-containing complex was shown to bind to this element, implicating this transcription factor in both the stimulation and inhibition of stromelysin and collagenase transcription (Kerr *et al.*, 1990). Since a family of JUN proteins exists, different FOS/JUN complexes may recognize the TRE and TIE sequences which may account for this specificity.

F-3. MMP Regulation by Lectins

Receptor aggregation and endocytosis is thought to be an important aspect of some transmembrane signaling mechanisms. ConA is known to trigger fibroblast cell membrane capping and endocytosis (Rosenblith *et al.*, 1973) and may therefore mimic physiological pathways of cellular activation. Indeed, ConA is known to exert various stimulatory or inhibitory effects on cells (reviewed by Sharon and Liz, 1972). For example, ConA stimulates T lymphocyte proliferation and the release of a factor which increases collagenase synthesis by macrophages (Wahl *et al.*, 1975). In macrophages, ConA increases plasminogen activator synthesis (Vasali *et al.*, 1977) and has also been shown to release MCF/catabolin/IL-1, which is a potent stimulator of MMP production by rheumatoid synovial cells (Dayer *et al.*, 1977) and synovial tissue (Saklatvala and Dingle, 1980). ConA, but not the lectins pokeweed mitogen or wheat germ agglutinin, increases the synthesis of collagenase both in fibroblasts (Hurum *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 1983; Overall and Sodek, 1990) and osteoblasts (Otsuka *et al.*, 1984).

We have recently investigated the effects of ConA on fibroblast collagenolytic activity (Overall and Sodek, 1990). The actions of ConA were characterized by both an increased expression and activation of MMPs and a reduced expression of TIMP and TIMP-2. Although MMP synthesis was increased by ConA, different levels of stimulation of collagenase, MMP-

ら, 1979)ので、TPAによるコラゲナーゼの誘導はPGE₂やcAMPを介していないことがわかる。実際、cAMPはストロムライシン発現の抑制に関与している (Kerrら, 1988a)。しかし、TGF-β1はcAMP量を増加させないので、TGF-β1によるストロムライシン発現の抑制は別の経路を通っておきているのであろう。別の第二情報伝達系がコラゲナーゼ誘導に関与しているかどうかとも研究されているが、Ca⁺⁺イオノフォア、cAMP、アラキドン酸はヒト線維芽細胞の系ではコラゲナーゼを誘導しなかった (Brennerら, 1989)。

最近、TGF-β1阻害エレメント (TIE)、つまりGNNTTGGtGAがストロムライシンとコラゲナーゼのプロモーター領域にあり、遺伝子の転写の阻害をしていることが確認された (Kerrら, 1990)。面白いことには、FOSを含む複合体がこのエレメントに結合することが示された、この転写因子はストロムライシンとコラゲナーゼの転写の励起と阻害の両方に関与していることになる (Kerrら, 1990)。JUNタンパクにはファミリーがあるので、異なるFOS/JUN複合体がTREとTIE配列を認識するというので、この特異性が説明できるかも知れない。

F-3. レクチンによるMMPの調節

受容体の集合とエンドサイトーシスは、膜を通過する情報伝達機構を考える上で重要な現象であると思われる。ConAは線維芽細胞膜のキャッピングやエンドサイトーシスの引き金になることが知られているので (Rosenblithら, 1973)、細胞が活性化される時の生理的な経路を模倣するよい系となる。事実、ConAは細胞に対して様々の励起あるいは阻害の効果を及ぼすことが知られている (SharonとLizによる総説, 1972)。例えば、ConAはTリンパ球を刺激して増殖させ、マクロファージにコラゲナーゼ合成を盛んにさせるような因子の分泌を促進する (Wahlら, 1975)。マクロファージに対しては、ConAはプラスミノージェンアクチベーター合成を盛んにし (Vasaliら, 1977)、そしてMCF/カタボリン/IL-1を放出させることが示されていて、この物質はリウマチの滑膜細胞 (Dayerら, 1977) 及び滑膜組織 (SaklatvalaとDingle, 1980) によるMMP産生を強く励起させるものである。アメリカヤマゴボウレクチンや小麦胚凝集素では駄目だが、ConAは線維芽細胞 (Hurumら, 1982; Wangら, 1983; OverallとSodek, 1990) や骨細胞 (Otsukaら, 1984) どちらに対してもコラゲナーゼ合成を増加させる。

最近、我々は線維芽細胞のコラゲナーゼ活性に対するConAの効果について研究した (OverallとSodek, 1990)。ConAの作用はMMPsの発現の増加と活性化、TIMP-2発現の低下という極めて特徴的なものであった。MMP合成はConAによって増加するが、コラゲナーゼ、MMP-2、バンプ1に対する励起の程度はそれぞれ異なっていて、MMPsは個々別々に調節をうけていることを示す結果が得られた。MMP-2とTIMP、TIMP-2が逆方向に調節されているので、MMP発現のみの増加によって得られる結果より、その分解活性はずっと大きいものになる。この独特なConAの線維芽細胞に対する刺激は、他の成長因子やホルモ

2 and Pump-1 were observed indicating that the MMPs are regulated individually. The reciprocal regulation of MMPs and TIMP and TIMP-2 would achieve a greater degradative activity than that obtained by increases in MMP expression alone. This appears to be a unique feature of the ConA stimulation of fibroblasts that has not been previously demonstrated with other growth factors or hormones.

An additional aspect of the regulation of MMP expression by ConA was the endogenous activation of collagenase and MMP-2. This is significant because, although some active collagenase and MMP-2 are released from organ cultures active collagenase and MMP-2 have rarely been reported in short term cell cultures. Moreover, since the activation of collagenase and MMP-2 did not occur as a result of either plasmin or stromelysin activity, the presence of other MMP activators that may also be important *in vivo* is indicated. Since PUMP-1 can activate collagenase, the ConA induction of Pump-1 provides a possible explanation for the activation of collagenase and MMP-2 in these cultures.

α -Methyl mannoside blocked the effects of ConA on MMP and TIMP expression, thus ConA appears to initiate its effects by binding and crosslinking cell surface proteins and receptors. Since ConA interacts with many types of cell surface receptors and molecules, ConA may mimic the "multiple hits" that a cell responds to in the tissue *milieu*. Thus, although ConA is not a physiological cell activator, the receptor stimulation and intracellular signals induced by ConA *in vitro* may be more physiological than the "single hit" produced by a growth factor or hormone added alone to cell cultures.

The regulation of MMP and TIMP gene expression by ConA indicates that naturally occurring lectins may also regulate MMP expression *in vivo*. Indeed, collagenase secretion by fibroblasts also occurs coincident with phagocytosis (Werb and Reynolds, 1974). In these processes the recognition processes are mediated, in part, through lectin-carbohydrate interactions. Indeed, lectin-induced phagocytosis in macrophages and polymorphonuclear leukocytes is recognized as a distinct process, lectinophagocytosis, and *N*-acetylgalactosamine- and mannose-specific lectins involved in lectinophagocytosis have been isolated from macrophages (Blackwell *et al.*, 1985; Kan and Bennett, 1988). Lectins have been isolated from a variety of transformed cells (reviewed by Raz and Lotan, 1987), and mannose specific lectins are involved in cell adhesion and implicated in the formation of metastatic emboli (Gabius *et al.*, 1985). Other mannose-specific lectins facilitate the binding of metastatic cells to endothelial surfaces, laminin, and type IV collagen (Dennis *et al.*, 1984). Thus, it is possible that tumor cell lectins and bacterial cell surface lectins may increase MMP expression in the surrounding normal tissue cells and thereby facilitate tissue invasion by tumor cells or bacteria.

ンで今までに示されたことのないものである。

さらにConAによるMMP発現調節を別の観点で見ると、コラゲナーゼとMMP-2が内在的に活性化されているということである。このことは重要なことである、というのは、活性型のコラゲナーゼやMMP-2は組織培養では分泌されるが、短期間の細胞培養での活性型コラゲナーゼやMMP-2は殆んど報告されていないからである。その上、コラゲナーゼとMMP-2の活性化がブラスミンやストロムライシンによってもたらされなかったもので、*in vivo*に於いて別のMMP活性化物質が存在して、その重要な働きをしているということが示されているからである。パンプ1はコラゲナーゼを活性化できるので、ConAがパンプ1を誘導すればこれらの培養系におけるコラゲナーゼとMMP-2活性化を説明することができよう。

α -メチルマンノシドを加えるとConAによるMMPとTIMPの発現の効果を阻止するので、ConAは細胞表面タンパクや受容体と結合して交差結合をすることでその効果を表わすのであろう。ConAは多くの種類の細胞表面受容体や分子と反応するので、ConAは組織環境内で細胞が応答している「マルチプルヒット」とよく似たものと考えてよいのではないだろうか。このように、ConAは生理的な細胞活性化物質ではないが、*in vitro*でConAによって惹き起こされる受容体の刺激や細胞内へのシグナル伝達は、成長因子やホルモンが培養系に単独に加えることによって生じる「シングルヒット」より、より生理的であるかもしれない。

MMPとTIMP遺伝子発現のConAによる調節は、天然に存在するレクチンが*in vivo*でMMP発現を調節している可能性を示している。実際、線維芽細胞によるコラゲナーゼの分泌は喰作用と同時に起こる (WerbとReynolds, 1974) が、喰作用の過程に於ける認識は、少くもある部分は、レクチン-炭水化物相互作用を介しているのである。事実、マクロファージと多形核白血球においてレクチンで誘導される喰作用は、レクチノファゴサイトーシスという別の過程と考えられていて、このレクチノファゴサイトーシスに関与しているN-アセチルガラクトサミン-及びマンノース-特異的レクチンがマクロファージから単離されている (Blackwellら, 1985; KanとBennett, 1988)。レクチンは種々の腫瘍形質転換細胞からも単離されていて (RazとLotanの総説, 1987)、マンノースに特異的なレクチンは細胞の接着に関与し、また転移性塞栓細胞塊の形成にも関与している (Gabiusら, 1985)。又、別のマンノース特異的レクチンは転移性細胞が血管内皮の表面や、ラミニン、IV型コラーゲンに結合することを促進させる (Dennisら, 1984)。このようにして、腫瘍細胞のレクチンや細菌の細胞表面のレクチンが周囲の正常組織細胞のMMP発現を増加させ、それによって、腫瘍細胞や細菌の組織へ浸潤が促進される可能性がある。

愛知県がんセンター研究所 病態学研究室
山形 貞子 訳

Acknowledgement

CMO is supported by a Centennial Fellowship from the Canadian Medical Research Council.

References

- Abe, S., and Nagai, S. (1972) *J. Biochem.* **71**, 919-922
- Aggeler, J., Frisch, S. M., and Werb, Z. (1984) *J. Cell Biol.* **98**, 1662-1671
- Angel, P., Poting, A., Mallinck, U., Rahmsdorf, H., Schorpp, M., and Herrlich, P. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1760-1766
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. (1987a) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2256-2266
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, and Karin, M. (1987b) *Cell* **49**, 729-739
- Bauer, E. A. and Vallee, K. J. (1982) *J. Invest. Dermatol.* **79**, 398-402
- Bauer, E. A., Stricklin, G., Jeffrey, J., and Eisen, A. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **64**, 232-240
- Bauer, E. A., Cooper, T. W., Hunag, J. S., Altman, J., and Deuel, T. F. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4132-4136
- Birkedal-Hansen, H. and Taylor, R. E. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **107**, 1173-1178
- Blackwell, J. M., Ezekowitz, R. A. B., Roberts, M. B., Channon, J. Y., Sim, R. B., and Gordon, S. (1985) *J. Exp. Med.* **162**, 324-331
- Boone, T. C., Johnson, M. J., DeClerk, Y. A., and Langley, K. E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2800-2804
- Breathnach, R., Matrisian, L., Gesnel, M., Staub, A., and Leroy, P. (1987) *Nucleic Acid Res.* **15**, 1139-1151
- Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M., and Karin, M. (1989) *Nature* **337**, 661-663
- Brinckerhoff, C. E., McMillan, R. M., Fahey, J. V., and Harris, E. D., Jr. (1979) *Arthritis Rheum.* **22**, 1109-1116
- Brinckerhoff, C. E., McMillan, R. M., Dayer, J. M., and Harris, E. D. Jr. (1980) *N. Engl. J. Med.* **303**, 432-235
- Brinckerhoff, C. E., Grass, N., Nagase, H., Sheldon, L. A., Jackson, R., and Harris, E. J. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* **241**, 26-45
- Brinckerhoff, C. E., Plucinska, I., Sheldon, L., and O'Connor, G. (1986) *Biochemistry* **25**, 6378-6384
- Burgeson, R. E. (1988) *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**, 551-577
- Carmichael, D. F., Sommer, A., Thompson, R. C., Anderson, D. C., Smith, C. G., Welgus, H. G., and Stricklin, G. P. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2407-2411
- Cawston, T. E., Galloway, W. A., Mercer, E., Murphy, G., and Reynolds, J. J. (1981) *Biochem. J.* **195**, 159-165
- Cawston, T. E., Murphy, G., Mercer, E., Galloway, W. A., Hazelman, B. L., and Reynolds, J. J., (1983) *Biochem. J.* **211**, 313-318
- Chin, R. J., Murphy, G., and Werb, Z. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 12367-12376
- Chua, C. C., Geiman, D. E., Keller, G. H., and Ladda, R. L. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 5213-5216
- Clark, S., Kobayashi, D. K., and Welgus, H. G. (1987) *J. Clin. Invest.* **80**, 1280-1288
- Clark, S. D., Wilhelm, S. H., Stricklin, G. P., and Welgus, H. G. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **241**, 36-44
- 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., and Goldberg, G. I. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6579-6587
- Cooper, T. W., Eisen, A. Z., Stricklin, G. P., and Welgus, H. G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 2779-2783
- Dayer, J., Krane, S., Russell, R., and Robinson, D. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 945-949
- Dayer, J. M. and Krane, S. M. (1978) *Clin. Rheum. Dis.* **4**, 517-537
- Dayer, J. M., Beutler, B., and Cerami, A. (1985) *J. Exp. Med.* **162**, 2163-2168
- Dayer, J. M., de Rochemonteix, B., Burrus, B., Demczuk, S., and Dinarello, C. A. (1986) *J. Clin. Invest.* **77**, 645-648
- De Clerk, Y. A., Yean, T. S., Ratzkin, B. J., Lu, H. S., and Langley, K. A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17445-17453
- Dennis, J. C., Waller, C. A., and Schirmacher, V. (1984) *J. Cell Biol.* **99**, 1416-1423
- Docherty, A. P., Lyons, A., Smith, B. J., Wright, E. M., Stephens, P. E., Harris, T. J., Murphy, G., and Reynolds, J. J. (1985) *Nature* **318**, 66-69
- Drouin, L., Overall, C. M., and Sodek, J. (1988) *J. Periodontal Res.* **23**, 370-377
- Edelson, P. J. and Cohn, Z. A. (1974) *J. Exp. Med.* **140**, 1364-1386
- Edwards, D. R., Parfett, C. L., and Denhardt, D. T. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3280-3288
- Edwards, D., Waterhouse, P., Holman, M. L., and Denhardt, D. T. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 8863-8878
- Edwards, D. R., Murphy, G., Reynolds, J. J., Whitham, S. E., Docherty, A. J. P., Angel, P., and Heath, J. K. (1987) *EMBO J.* **6**, 1899-1904
- Eeckhout, Y. and Vaes, G. (1977) *Biochem. J.* **166**, 21-29
- Fini, M. E., Plucinska, I., Mayer, A., Gross, R. H., and Brinckerhoff, C. E. (1987a) *Biochemistry* **26**, 6156-6162
- Frisch, S. M. and Ruley, H. E. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 16300-16304
- Frisch, S. M., Clark, E. J., and Werb, Z. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2600-2604
- Frisch, S. M., Reich, R., Collier, I. E., Genrich, L. T., Martin, G., and Goldberg, G. I. (1990) *Oncogene* **5**, 75-83
- Gabius, H. J., Engelhardt, R., Casper, J., Reile, D., Schumacher, S., Schmoll, J. H., Graupner, G., and Cramer, F. (1985) *Tumor Biol.* **6**, 471-482
- Gewert, D., Coulombe, B., Castelin, M., Skup, D., and Williams, B. R. (1987) *EMBO J.* **6**, 651-657
- Goldberg, G. I., Wilhelm, S. M., Kronberger, A., Bauer, E. A., Grant, G. A., and Eisen, A. Z. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 6600-6605
- Goldberg, G. I., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z., Wilhelm, S., and He, C. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8207-8211
- Gross, R. H., Sheldon, L. A., Fletcher, C. F., and Brinckerhoff, C. E. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1981-1985
- Harris, E. D. and Krane, S. M. (1971) *Arthritis Rheum.* **14**, 669-684
- Hasty, K. A., Hibbs, M. S., Kang, A. H., and Mainardi, C. L. (1984) *J. Exp. Med.* **159**, 1455-1463
- Hasty, K. A., Hibbs, M. S., Kang, A. H., and Mainardi, C. L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 5645-5650
- Hasty, K. A., Stricklin, G., Hibbs, M. S., Mainardi, C. L., and Kang, A. H. (1987) *Arthritis Rheum.* **30**, 695-700
- He, C., Wilhelm, S. M., Pentland, A. P., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z., and Goldberg, G. I. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2632-2636
- Herron, G. S., Banda, M. J., Clark, E. J., Gavrilovic, J., and Werb, Z. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2814-2818
- Horton, J. E., Wezeman, F. H., and Kuettner, K. E. (1978) *Science* **199**, 1342-1344
- Hurum, S., Sodek, J., and Aubin, J. E. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **107**, 357-366
- Ishibashi, M., Ito, A., Sakyō, K., and Mori, U. (1987) *Biochem. J.* **241**, 527-534

- Ito, A. and Nagase, H. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **267**, 211-216
- Kan, V. L. and Bennett, J. E. (1988) *J. Infect. Dis.* **158**, 407-414
- Kerr, L. D., Miller, D. M., and Matrisian, L. M. (1990) *Cell* **61**, 267-273
- Kerr, L. D., Olashaw, N. E., and Matrisian, L. M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 16999-17005
- Kuettner, K. E., Soble, L., Croxen, R. L., and Marczniska, D. (1977) *Science* **196**, 653-654
- Lee, W., Mitchell, P., and Tjian, R. (1987) *Cell* **49**, 741-752
- Lindy, S., Sorsa, T., Suomalainen, K., and Turto, H. (1986) *FEBS Lett.* **208**, 23-25
- Machida, C. M., Muldoon, L. L., Rodland, K. D., and Magun, B. E. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2479-2483
- Machida, C. M., Rodlan, K. D., Matrisian, L. M., Magun, B. E., and Ciment, G. (1989) *Neuron* **2**, 1587-1596
- Mainardi, C., Hibbs, M., Hasty, K., and Seyer, J. (1984) *Coll. Rel. Res.* **4**, 479-482
- Matrisian, L. M., Bowden, G. T., Krieg, P., Furstenberger, G., Briand, J. P., leRoy, P., and Breathnach, R. (1986a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 94113-9417.
- Matrisian, L. M., Glaichenhaus, N., Gesnel, M. C., and Breathnach, R. (1985) *EMBO J.* **4**, 1435-1440
- Matrisian, L. M., Leroy, P., Ruhlmann, C., Gesnel, M. C., and Breathnach, R. (1986b) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1679-1686
- McKerrow, J. H. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 5943
- Muller, D., Quantin, B., Gesnel, M.-C., Millon-Collard, R., Abecassis, J., and Breathnach, R. (1988) *Biochem. J.* **253**, 187-192
- Murphy, G., Cartwright, E., Sellers, A., and Reynolds, J. J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **483**, 493-498
- Murphy, G., Cawston, T. E., and Reynolds, J. J. (1981) *Biochem. J.* **195**, 167-170
- Murphy, G., Reynolds, J. J., Bern, U., and Baggiolini, M. (1982) *Biochem. J.* **203**, 209-221
- Murphy, G., McAlpine, C., Poll, C., and Reynolds, J. J. (1985a) *Biochim. Biophys. Acta* **831**, 49-58
- Murphy, G., Reynolds, J., and Werb, Z. (1985b) *J. Biol. Chem.* **260**, 3079-3083
- Murphy, G., Cockett, M. I., Stevens, P. E., Smith, B. J., and Docherty, A. J. P. (1987) *Biochem. J.* **248**, 265-268
- Nagase, H. and Barrett, A. J. (1981a) *Biochem. J.* **193**, 187-192
- Nagase, H., Jackson, R. C., Brinkerhoff, C. E., Vater, C. A., and Harris, E. D. Jr (1981b) *J. Biol. Chem.* **256**, 11951-11954
- Nishizuka (1988) *Science* **334**, 661-665
- Nomura, S., Hogan, B. L. M., Wills, A., Heath, J. K., and Edwards, D. R. (1989) *Development* **105**, 575-583
- O'Grady, R. L., Upfold, L. I., and Stephens, R. W. (1981) *Int. J. Cancer* **28**, 509-515
- Okada, Y., Nagase, N., and Harris, E. D., Jr. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 14245-14255
- Okada, Y., Harris, E. J., and Nagase, H. (1988) *Biochem J* **254**, 731-741
- Otsuka, K., Pitaru, S., Overall, C. M., Aubin, J. E., and Sodek, J. (1988) *Biochem. Cell Biol.* **66**, 167-176
- Otsuka, K., Sodek, J., and Limeback, H. F. (1984) *Eur. J. Biochem.* **145**, 123-129
- Overall, C. M., and Limeback, H. (1988) *Biochem. J.* (1988) **256**, 965-972
- Overall, C. M. and Sodek, J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 21141-21151
- Overall, C. M., Wrana, J. L., and Sodek, J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 1860-1869
- Overall, C. M., Wrana, J. L., and Sodek, J. (1991) *J. Biol. Chem.* in press
- Pettigrew, D. W., Ho, G. H., Sodek, J., Brunette, D. M., and Wang, H. M. (1978) *Arch. Oral Biol.* **23**, 767-777
- Richards, D. and Rutherford, R. B. (1990) *J. Periodont. Res.* **25**, 222-229
- Rosenblith, J. Z., Ukena, T. E., Yin, H. H., Berlin, R. D., and Karnovsky, M. J. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**, 1625-1629
- Saklatvala, J. and Dingle, J. T. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 1225-1231
- Salo, T., Liotta, L. A., and Tryggvason, K. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 3058-3063
- Saus, J., Quinones, S., Otani, Y., Nagase, H., Harris, E. J., and Kurkinen, M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6742-6745
- Sellers, A. and Reynolds, J. (1977) *Biochem. J.* **167**, 353-360
- Sharon, N. and Liz, H. (1972) *Science* **177**, 949-959
- Sharon, N. and Liz, H. (1989) *Science* **246**, 227-246
- Shen, V., Kohler, G., Jeffrey, J. J., and Peck, W. A. (1988) *J. Bone Mineral Res.* **3**, 657-666
- Sodek, J. and Overall, C. M. (1988) in *Biological Mechanisms of Tooth eruption and Root Resorption* (Davidovitch, Z. ed.) pp. 303-311, EBSCO Media, Alabama
- Sottrup-Jensen, L. and Birkedal-Hansen, H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 393-401
- Springman, E. B., Angelton, E. L., Birkedal-Hansen, H., and Van Wart, H. E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 364-368
- Stetler-Stevenson, W. G., Krutzsch, H. C., Wachter, M. P., Margulies, I. M. K., and Liotta, L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 1353-1356
- Stetler-Stevenson, W. G., Krutzsch, H. C., and Liotta, L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17374-17378
- Stetler-Stevenson, W. G., Brown, P. D., Onisto, M., Levy, A. T., and Liotta, L. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13933-13938
- Stricklin, G. P. (1986) *Coll. Rel. Res.* **6**, 219-228
- Stricklin, G., Bauer, E., Jeffrey, J., and Eisen, A. (1977) *Biochemistry* **16**, 1607-1615
- Stricklin, G., Eisen, A., Bauer, E., and Jeffrey, J. J. (1978) *Biochemistry* **17**, 2331-2337
- Stricklin, G. P., Jeffrey, J. J., Roswit, W. T., and Eisen, A. Z. (1983) *Biochemistry* **22**, 61-68
- Tyree, B., Seltzer, J. L., Halme, J., Jeffrey, J. J., and Eisen, A. Z. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **208**, 440-443
- Unemori, E. and Werb, Z. (1986) *J. Cell Biol.* **103**, 1021-1031
- Unemori, E. and Werb, Z. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 16252-16259
- Vaes, G. and Eeckhout, Y. (1975) *Protides Biol. Fluids* **22**, 391-397
- Valle, K.-J. and Bauer, E. A. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 10115-10122
- Van Wart, H. E. and Birkedal-Hansen, H. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5578-5582
- Vassalli, J.-D., Hamilton, J., and Reich, E. (1977) *Cell* **11**, 695-705
- Vater, C. A., Harris, E. D., and Siegel, R. C. (1979) *Biochem. J.* **181**, 639-645
- Vater, C. A., Nagase, H., and Harris, E. D. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 9374-9382
- Vater, C. A., Nagase, H., and Harris, E. D. (1986) *Biochem. J.* **237**, 853-858

- Wahl, L. M., Wahl, S. M., Mergenhagen, S. E., and Martin, G. R. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 3251-3255
- Wahl, L. M., Olsen, C. E., Sandberg, A. L., and Mergenhagen, S. E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 255-264
- Wang, H. M., Hurum, S., and Sodek, J. (1983) *J. Periodontal Res.* **18**, 149-155
- Welgus, H. G., Stricklin, G. P., Eisen, A. Z., Bauer, E. A., Cooney, R. V., and Jeffrey, J. J., (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 1938-1943
- Welgus, H. G. and Stricklin, G. P. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 12259-12264
- Welgus, H. G., Grant, G. G., Sacchettini, J. C., Roswit, W. T., and Jeffrey, J. J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 13601-13606
- Werb, Z. and Reynolds, J. J. (1974) *J. Exp. Med.* **140**, 1482-1497
- Werb, Z., Hembry, R. M., Murphy, G., and Aggeler, J. (1986) *J. Cell Biol.* **102**, 697-702
- Werb, Z., Tremble, P. M., Behrendtsen, O., Crowley, E., and Damsky, C. H. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 877-889
- Wilhelm, S. M., Eisen, A. Z., Teter, M., Clark, C. D., Konberger, A., and Goldberger, G. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3756-3760
- Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Kronberger, A., Eisen, A., Marmer, B. L., Grant, G., Bauer, E., and Goldberg, G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6725-6729
- Wilhelm, S., Collier, I., Marmer, B., Eisen, A., Grant, G., and Goldberg, G. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17213-17221
- Wrana, J. L., Sodek, J., Ber, R. L. and Bellows, C. G. (1986) *Eur. J. Biochem.* **159**, 915-924
- Wrana, J. L., Overall, C. M., and Sodek, J. (1991) *Eur. J. Biochem.* **197**, 519-528

GLYCONEWS

Dr. Makoto Ito and Dr. Hisao Nojiri won Japanese Biochemical Society's Shoureisho Awards of 1991

Dr. Makoto Ito, Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences won the Japanese Biochemical Society's Shoureisho Award of 1991 for his study "Discovery of Endoglycoceramidase and Its Activator Protein, Their Applications for Glycosphingolipid Research". Dr. Hisao Nojiri, Jichi Medical School won the same award for his study "Discovery of Leukemic Cell Differentiation-Inducing Activity of Gangliosides: A Novel Aspect for the Molecular mechanism of Cell Differentiation". That the two of five recipients of this award for 1991 are carbohydrate researchers is a good indication of a high level of activity of carbohydrate research in Japan.

平成3年度日本生化学会奨励賞は伊東信博士と野尻久雄博士に

三菱化成生命科学研究所 伊東信博士が"エンドグリコシダーゼ及びアクチベーターの発見と糖脂質研究への応用"、自治医科大学 野尻久雄博士が"細胞の増殖・分化における糖脂質糖鎖の特異的制御機構と機能: 酸性糖脂質ガングリオシドの白血病細胞分化誘導活性の発見に基づく新しい分化機構"で、それぞれ平成3年度日本生化学会奨励賞を受賞した。5件の受賞者の内2人が糖質研究者に関する研究で占められたのは日本の糖質研究の隆盛を物語るものである。