

Human 92-kD type IV Collagenase (Gelatinase B)의 분리와 특성

이대희

고신대학교 의과대학 약리학교실

Isolation and Characterization of Human 92-kD type IV Collagenase (Gelatinase B)

Dae-Heui Lee

Department of Pharmacology, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background : Human 92-kD type IV collagenase (gelatinase B), a family of matrix metalloproteinases (MMP), play important roles in the degradation of the basement membrane and the migration of leukocytes and metastatic tumor cells during inflammation and invasion, respectively.

Methods : To investigate the biochemical and enzymatic characteristics of human neutrophil type IV collagenase, the enzyme was extracted from human leukocytes and purified by a combination of Ultrogel AcA 54 and Bio-Rex 70 chromatographies.

Results : The purified enzyme showed a single band of molecular weight: 92-kD on the sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Human neutrophil type IV collagenase degraded gelatin at the specific cleavage site, but did not affect intact type I collagen. Human 92-kD type IV collagenase was inhibited by EGTA, EDTA and tetracycline. These inhibitory effects may be related to the chelation effect of these agents since 92-kD type IV collagenase is a metalloenzyme.

Conclusion : Tetracycline showed the strongest inhibition effect on the gelatinolytic activity of the 92-kD type IV collagenase, and this strong effect of tetracycline among these agents might be associated with the amide group of tetracycline, besides the chelation effect of tetracycline. The carbonyl group of the amide group may be coordinated to the active site zinc atom as a fourth ligand in a way that blocks the active site.

Key words : Gelatinase B, Ultrogel AcA 54, Bio-Rex 70, Metalloenzyme, Tetracycline

서 론

염증과 재순환(recirculation)에서 기저막은 백혈구의 일출(extravasation)에 대한 가장 중요한 장벽이며, 이러한 백혈구의 일출에서 내피 세포 아래에 있는 기저막의 분해가 반드시 동반되어야 한다.¹⁾ 이 때 침습 해오는 종양에 대한 첫번째 장벽인 기저막은 type IV collagen으로

구성된 견고한 망상 구조물로서, 이 교원질(collagen) 분자들이 type IV collagenase에 의해서 분해되는 과정은 종양 세포의 침습과 전이에 대한 연구의 초점이 되어 왔다.²⁾ 이러한 type IV collagenase들 중 92-kD type IV collagenase는 종양의 침습 및 전이와 백혈구의 일출 이외에도 배아 발생(embryonic development)³⁾과 치근막 주위염(periodontitis)⁴⁾등에 관여하고 있다.

이처럼 염증이나 종양 세포의 침습 및 전이 과정에서의 세포외 기질의 분해와 조직 형태 발생 (tissue morphogenesis)중 조직의 재구성에 중요한 역할을 하는 효소로서 matrix metalloproteinase(MMP)들이 있다.^{5,6)}

교신저자 : 이 대 희

주소: 602-703, 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 약리학교실
TEL. 051-990-6493 FAX. 051-241-5458
E-mail: dhlee@ns.kosinmed.or.kr

· 본 연구는 고신대학교 의과대학 연구비 일부 지원에 의해 이루어짐

사람의 matrix metalloproteinase(MMP)들은 그들의 기질 특이성에 따른 유사성과 polypeptide chain의 구성에 따라 크게 4개의 범주로 구분되는데 이에는 interstitial collagenase, gelatinase 또는 type IV collagenase, stromelysin과 putative metalloproteinase(PUMP)가 있다.⁷⁾

1972년 Harris와 Krane⁸⁾은 변성된 간질성 교원질(interstitial collagen)들을 분해할 수 있는 metalloendopeptidase를 사람의 류마치양 관절염에 걸린 활막의 체외 이식 조직(rheumatoid synovium explant)에서 분리 했다. 1974년 Sopata와 Dancewicz⁹⁾가 보고한 이래로 많은 연구실에서 human neutrophil gelatinase를 연구해 왔는데^{10,11)} 1985년 Hibbs¹²⁾등은 human neutrophil에서 92-kD의 gelatinase를 분리 동정했고 그 이후의 연구에서 이 효소가 기저막(basement membrane)을 구성하는 type IV collagen을 기질로 하는 type IV collagenase라는 것이 밝혀지게 되었다.^{13,14)} 이 효소는 사람의 중성구¹⁵⁾ 외에도 macrophage,¹⁶⁻¹⁸⁾ polymorphonuclear leukocytes,^{11,19)} trophoblast,²⁰⁾ keratinocyte²¹⁾ 그리고 T-lymphocyte²²⁾에서도 분리 동정되어서 human 92-kD type IV collagenase(gelatinase B)로 명명되었다. 또한 여러 종류의 전이성 종양 세포도 92-kD type IV collagenase를 분비한다.^{23,24)}

또한 기저막이 풍부한 양막(amnion)과 Matrigel(기저막 성분이 강화된 종양 세포 추출물)을 사용한 실험에서 악성 종양의 침습 정도는 바로 type IV collagenase의 활성과 비례한다고 보고된 바 있고²⁵⁾ 그외 여러 실험계에서 type IV collagenase의 활성 증가는 metastatic phenotype과 상관성이 있다고 밝혀지고 있다.^{23,26)} 그러므로 이 type IV collagenase의 활성을 억제시키는 약제는 악성 종양의 전이나 침습을 억제할 수 있다고 생각할 수 있다.

현재까지 밝혀진 92-kD type IV collagenase의 특성으로는 촉매 작용은 active center의 아연(zinc)에 의존하며 이들 효소는 전효소(zymogen) 형태로 분비되어서 단백질 가수 분해 효소나 유기 수은제에 의해 활성화 될 수 있다는 것을 들 수 있으나 이 효소를 순수하게 다량 분리하는데 있어서는 어려움이 많다.^{5,11)} 초기 세포 배양에서 human skin fibroblast가 빠르고 간단하게 정제가 가능한 procollagenase를 분비한다고 발표됐을때^{27,28,29)} 이 세

포의 배지에는 1-2 $\mu\text{g/ml}$ 의 효소가 포함되어 있어서 배양액 1 l 당 1 mg의 효소를 얻을 수 있을 정도였다.²⁸⁾ 1985년 Hibbs¹²⁾등은 효소 정제를 용이하게 하기 위해서 중성구의 배양 상층액으로부터 분리를 시도했는데 이때 초기 시료의 단백질 양이 1,498 mg이었으나 정제후의 효소는 2.85 mg에 불과했다. 이처럼 효소의 분리 수율이 낮은 이유는 백혈구 내에 이 효소가 극히 미량¹¹⁾으로 존재하기 때문이기도 하지만 더 큰 이유는 주로 중성구들만을 분리하는 과정³⁰⁾에서나 액체 크로마토그래피를 하는 동안 효소의 유실이 많았기 때문이라고 생각된다.

중성구와 연관된 제1, 2, 3형 교원섬유(type I,II,III collagens)의 가수분해에 대한 tetracycline의 억제에는 많은 연구의 초점이 되어 왔다. 1983년 초에 Golub등³¹⁻³⁴⁾은 in vitro와 in vivo에서 tetracycline이 제1, 2, 3형 교원섬유의 분해를 억제하고 이러한 억제는 이들 항생제가 Ca^{2+} 과 Zn^{2+} 모두와 결합하기 때문임을 시사하는 증거를 제시했다. 이러한 tetracycline의 약리 효과는 소세포 폐암(small cell lung cancer) 세포에서 기원된 human 72-kD type IV collagenase(gelatinase A)가 tetracycline에 의해 억제되는 연구에서도 밝혀진 바 있다.³⁵⁾

본 연구에서는 사람의 백혈구 추출물(human leukocytes extract)로부터 가능한 한 최소의 정제 단계를 거쳐서 동질성의 순수한 92-kD type IV collagenase를 최대의 수율로 분리 정제할 수 있는 방법을 모색하였으며 분리된 효소에 대해 chelating agent 및 tetracycline에 의한 효소 활성도 억제 실험을 함으로서 이 효소의 약리학적 특성의 일부를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

Ultrogel AcA 54는 LKB사(Uppsala, Sweden), Bio-Rex 70은 BioRad사(Hercules, Calif. USA), sodium acetate, aminophenylmercuric acetate (APMA), bovine serum albumine, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol-bis (β -amino ethyl ether) N,N,N', N'-tetraacetic acid (EGTA), tetracycline, Brij 34, n-succinyl-ala-ala-ala-p-nitroanilide (SANA), n-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide (SAPNA), Tris base 그리고 calcium

chloride는 Sigma사(St. Louis, Mo. USA), HMW and LMW electrophoresis calibration kits는 Pharmacia사(Brussels, Belgium), SDS-PAGE용 시약은 BioRad사 제품을 사용하였고 그외 모든 시약은 특급을 사용하였다. 그리고 투석용 막(Spectrapor dialysis membrane)은 Spectramedical사(Houston, Tx. USA) 제품을 초 여과막(PM 10 concentration membrane)은 Amicon사(Beverly, MA. USA) 제품을 사용하였다. 혈액은 고신 의료원 혈액 은행에 저장된 전혈을 사용하였다.

2. 방법

1) Human 92-kD type IV collagenase의 분리 및 정제

a) Leukocyte extract

전혈을 22°C에서 200 g 속도로 30분간 원심 분리하여 백혈구층을 얻었다. 여기서 분리된 백혈구를 1.5 M NaCl과 50 mM CaCl₂ 및 50 mM Tris-HCl을 포함하고 pH 7.3으로 조절된 용액 내에서 세포 분쇄기(Polytron ; Kinematica CH-6010, Kriens-Luzern, Brikmann사)를 이용하여 최대 속도에서 15 초 동안 3 회 분쇄한 후, 30,000 g 속도로 60 분간 원심 침전시켜서 상층액을 취하여 백혈구 추출물(leukocyte extract)로 사용하였다.

b) Ultrogel AcA 54 gel filtration column chromatography

백혈구 추출물(leukocyte extract)을 Tris-HCl 용액(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.1% Brij 35, pH 7.3)으로 평형된 2.5 x 100 cm 길이의 Ultrogel AcA 54 column을 사용하여 chromatography를 시행하였다. 이때 실험 온도는 4°C로 유지하였다. 유속은 8 ml/15 min. 이었고 8 ml을 1 분획으로 하였으며 각 분획을 gelatin과 37°C에서 4 시간 동안 incubation시켜서 gelatin을 분해시킨 후 반응 산물을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 하여 gelatinolytic activity가 있는 분획을 확인하였으며, gelatinolytic activity가 있는 분획만 모아서 같은 부피의 50 mM sodium acetate 용액(50 mM sodium acetate, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM CaCl₂, 0.1% Brij 35)으로 1:1로 희석시킨후 다음 정제 과정에 사용하였다.

c) Bio-Rex 70 ion exchange chromatography

Bio-Rex 70 ion exchange matrix로 충전된 column(3.0 x 27 cm)을 50 mM sodium acetate 용액(50 mM sodium acetate, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM CaCl₂, 0.1% Brij 35)으로 평형시킨 다음 Ultrogel AcA 54 column chromatography에서 분리한 시료를 column에 통과시켜 수지에 부착시킨 다음 부착되지 않은 단백질이 완전히 column을 빠져 나간 후 sodium acetate 농도를 0.05 M에서 0.7 M까지 선형 농도 구배(linear gradient)로 chromatography를 시행하였다. 유속은 7 ml/5 min으로 하였으며 한 시험관당 7 ml씩 모은 각각의 분획에 대한 gelatinolytic activity를 SDS-PAGE로 확인해서 효소 활성도를 나타내는 분획들을 모아서 PM 10 membrane으로 농축시킨 후 50 mM sodium acetate 용액(50 mM sodium acetate, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM CaCl₂, 0.1% Brij 35) 내에서 하룻밤 동안 투석시킨 후 다음 실험에 사용될 때까지 -20°C에 보관 하였다.

2) Gel electrophoresis

SDS-PAGE는 Laemmli³⁶⁾의 방법으로 시행하였으며 대부분의 실험에서 10% running gel과 4% stacking gel을 사용하였다. SDS-PAGE 후의 gel은 coomassie 염색 용액(0.1% coomassie brilliant blue R-250, 25% methanol, 10% acetic acid) 내에서 23°C에서 하룻밤 동안 염색시킨 후 탈색 용액(25% methanol, 10% acetic acid)에서 탈색시켜 band를 확인하였다.

3) 효소 활성화 및 활성도 억제 시험

정제된 효소에 최종 농도가 3 mM이 되도록 aminophenylmercuric acetate(APMA)를 넣고 37 °C에서 3 시간 동안 방치하여 활성화시켰다. 이 효소에 최종 농도가 20 mM되도록 EGTA, EDTA, tetracycline을 각각 넣고 37°C에서 30 분간 반응시킨 다음 denatured type I collagen gelatin)과 17 시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 SDS-PAGE로 기질의 분해 정도와 반응 산물을 control과 비교해서 효소 활성도를 측정했다.

결 과

1. Ultrogel AcA 54 chromatography에 의한 92-kD type IV collagenase의 일차 분리

백혈구 추출물 132 mg에 대한 Ultrogel AcA 54 size exclusion chromatography를 시행해서 얻은 chromatogram은 Fig. 1에서 보는 바와 같으며, 효소 활성도를 SDS-PAGE에 의하여 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 42 번 ~48 번 분획이 92-kD type IV collagenase의 활성도를 포함한 분획이었으며 27 번과 39 번 분획 사이에는 hemoglobin등을 포함한 고분자의 단백질이 존재했고 60 번과 63 번 분획 사이에는 elastase가, 66 번과 69 번 분획 사이에는 cathepsin G가 포함되어 있었다.

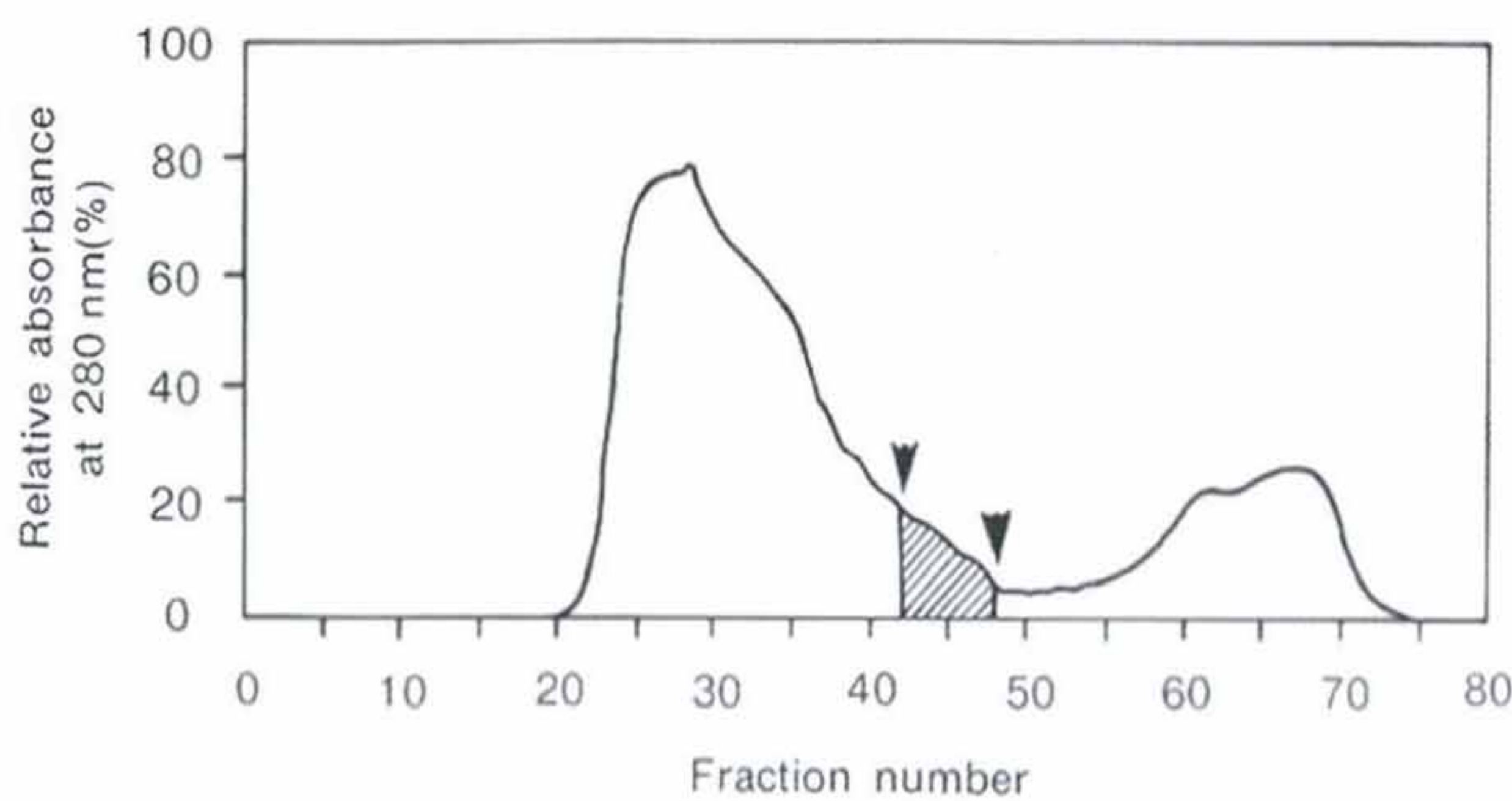
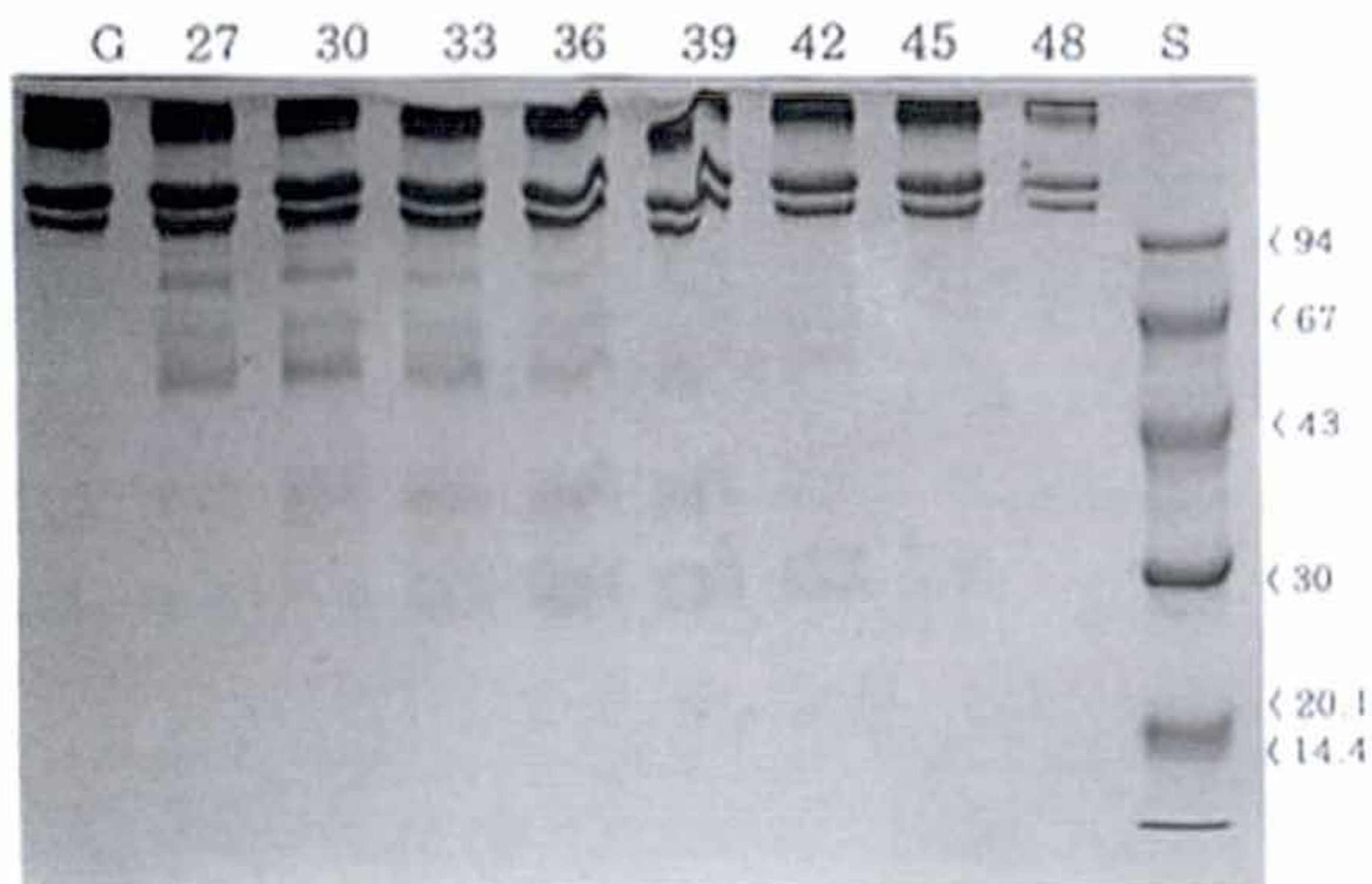


Figure 1. Purification of 92-kDa type IV collagenase by Ultrogel AcA 54 chromatography. The column (2.5 x 100 cm) was equilibrated with 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.3, containing 0.15 M of NaCl, 5 mM CaCl_2 and 0.1% Brij 35. The sample from leukocyte extract was applied and 8ml of fractions were collected at a flow rate of 8 ml/15 min. All chromatographic procedures were performed at 4°C. ∴ protein profile.

A



B

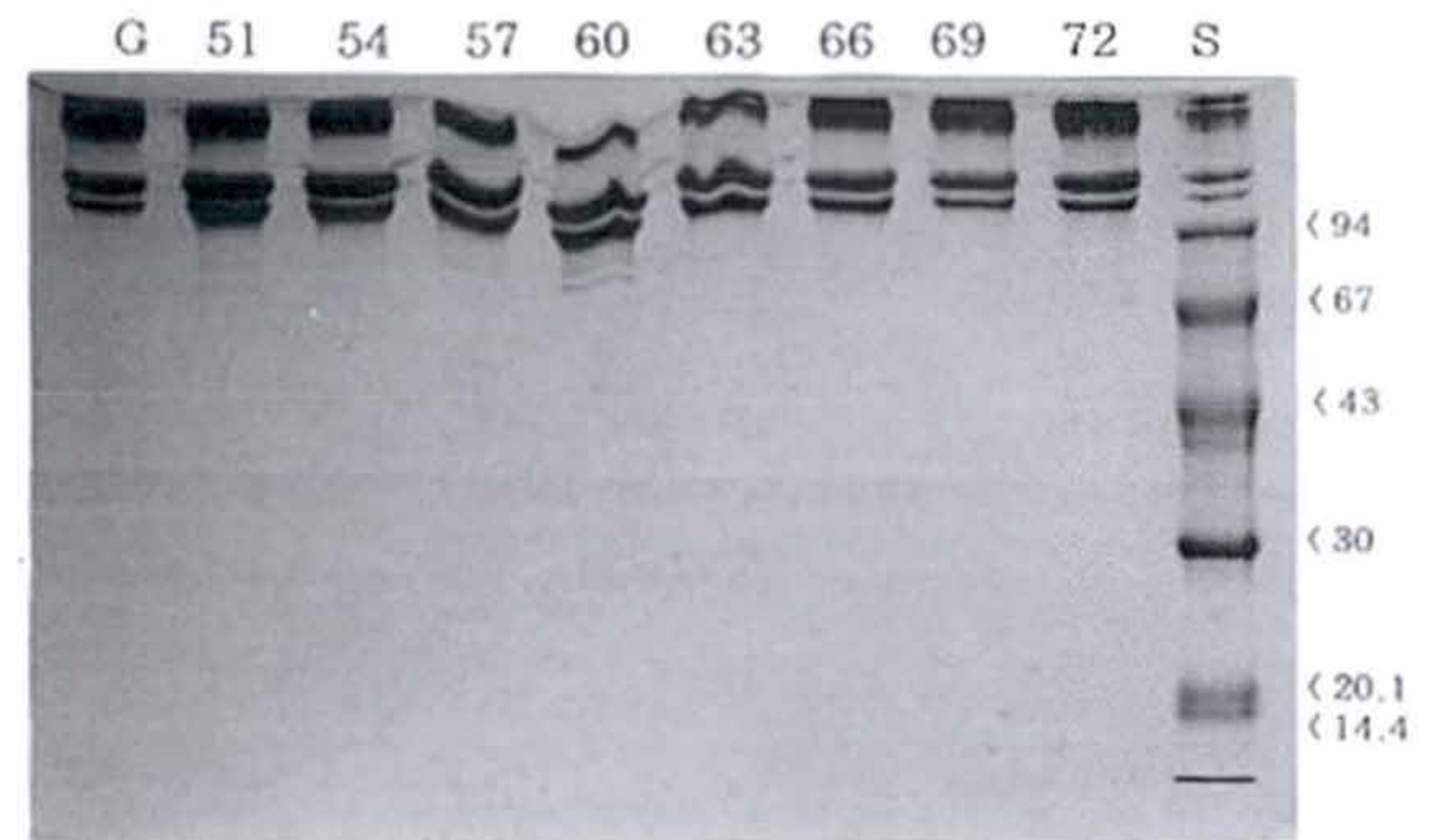


Figure 2. SDS-PAGE of fractions isolated by Ultrogel AcA 54 chromatography. Lane G: denatured type I collagen; lanes of the fraction 27-72: 45 (μg of denatured type I collagen were incubated with 70 μl of aliquots of sample isolated by Ultrogel AcA 54 chromatography for 17 h at 25°C. Reaction products were separated on 10% polyacrylamide gel (panels A and B). The positions of degradation products of collagen are marked. Lane S, molecular mass markers were run on a separate tract of the same gel and are indicated.

2. Bio-Rex 70 ion exchange chromatography에 의한 92-kD type IV collagenase의 분리

다음 정제 과정으로서 Bio-Rex 70 ion exchange chromatography를 수행해서 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다. gradient를 시작한 후 10 번~31 번 분획까지 gelatinolytic activity가 없는 상당량의 단백질이 분리되어 나온 후 sodium acetate 농도 0.5~0.7 M 사이에서 92-kD type IV collagenase가 유출되어 나왔다. 55 번~58 번 분획은 cathepsin G였다.

Bio-Rex 70 ion exchange chromatography에 의해 분리한 92-kD type IV collagenase의 효소 활성도를 SDS-PAGE에 의하여 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 32 번~44 번 분획에서 92-kD type IV collagenase의 활성도가 나타났으며 이 중 38 번 ~44 번 분획을 모아서 농축시킨 후의 총 부피는 3.5 ml 이었고 protein 농도는 1.1 mg/ml으로서 3.85 mg의 효소를 얻었다.

3. 92-kD type IV collagenase의 분자량 측정과 활성도 시험

정제한 효소를 SDS-PAGE한 결과 lane 2에서와 같이 92-kD의 단일 band를 확인할 수 있었다. 이 효소를

denatured type I collagen (gelatin)과 반응시켜 효소 활성도를 시험한 결과 lane 3에서와 같이 분자량 124,000, 112,000의 gelatin이 분해되어 적은 분자량의 100,000, 94,000, 92,000, 60,000의 분해 산물이 나타났으며 lane G와 비교해보면 lane 3의 분자량 124,000, 112,000의 gelatin은 현저히 그 양이 감소한 것을 알 수 있다.

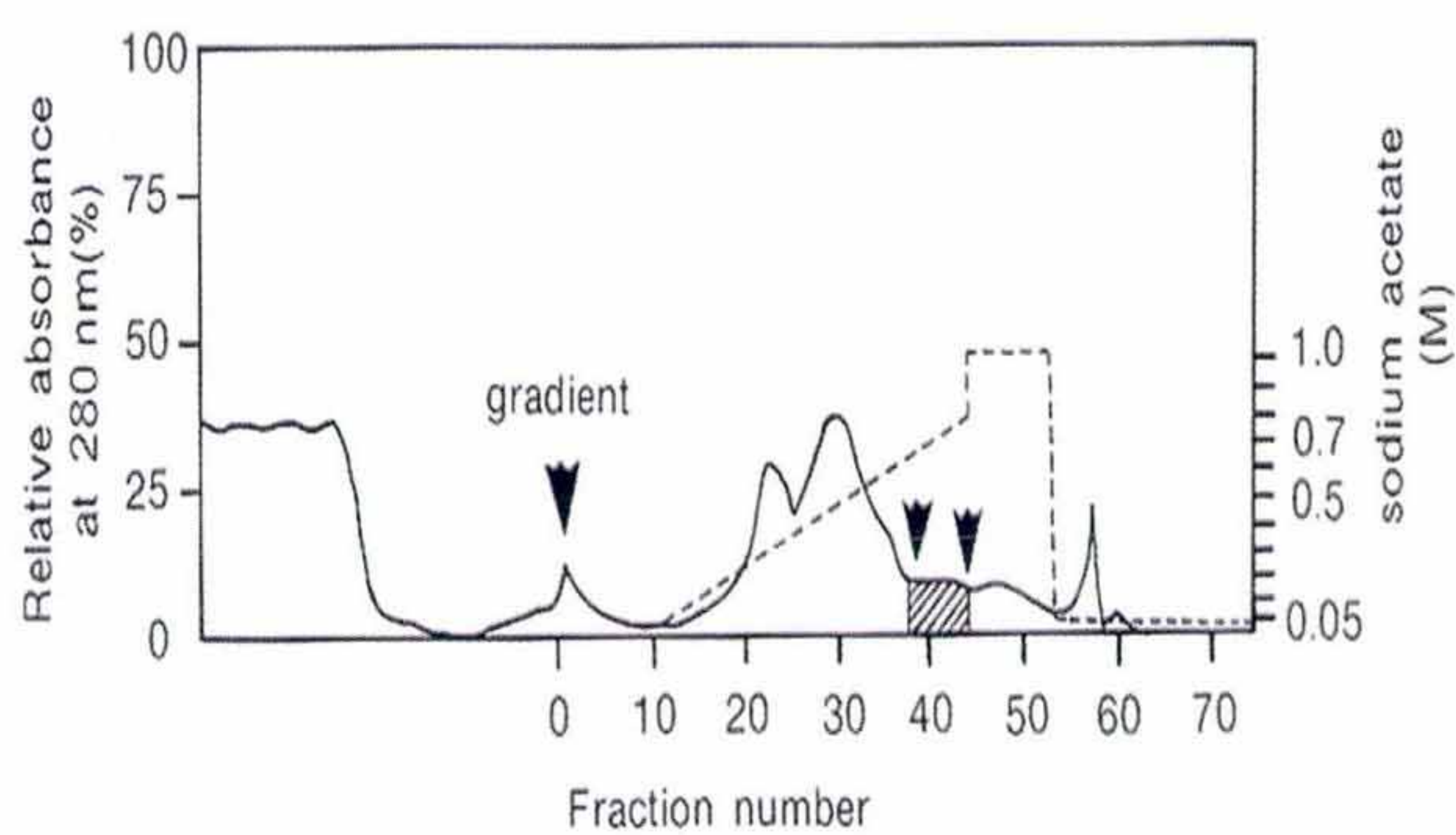
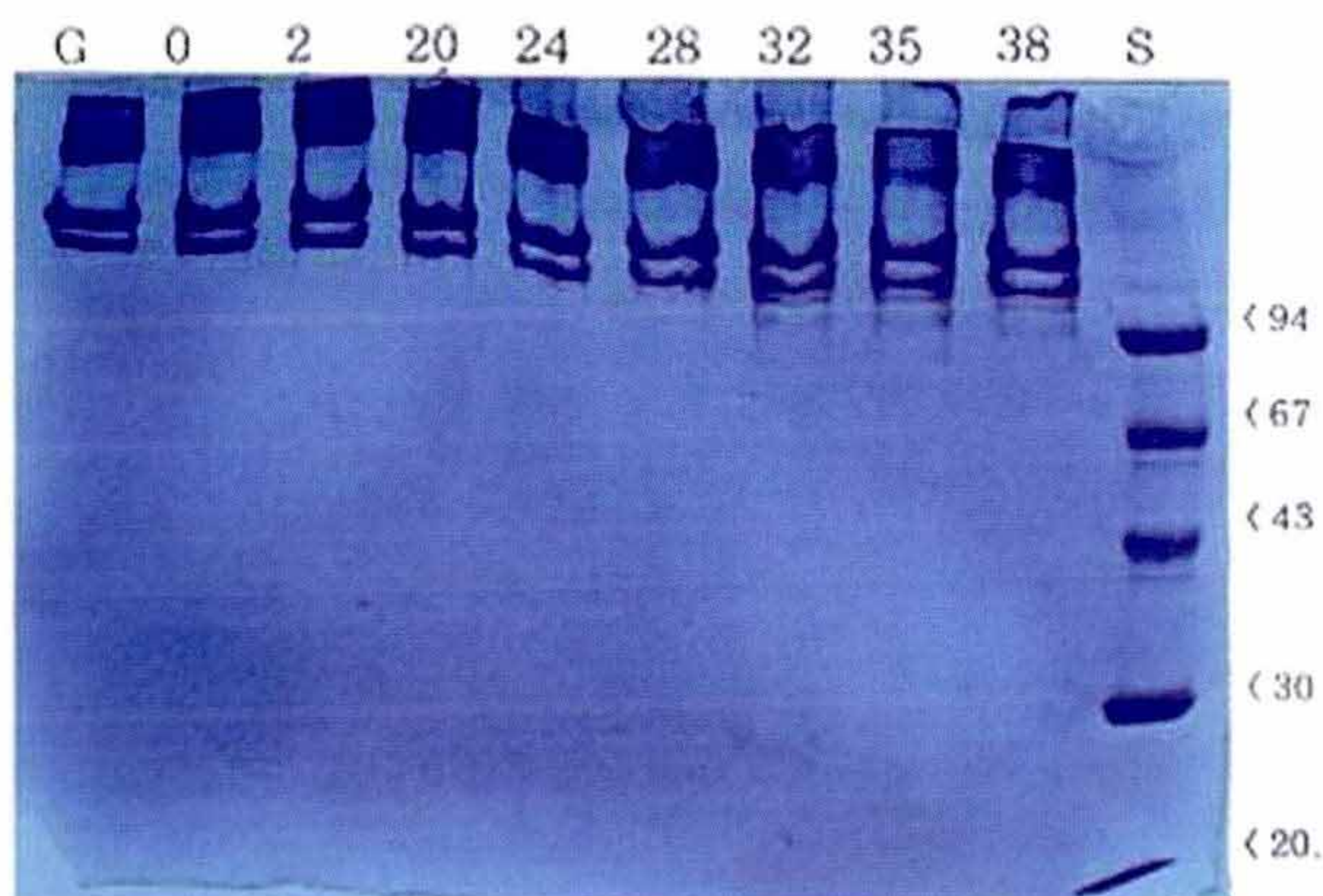


Figure 3. Purification of 92-kDa type IV collagenase by Bio-Rex 70 ion exchange chromatography. The column (2.5 x 100 cm) was equilibrated with 50 mM sodium acetate containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM CaCl_2 and 0.1 % Brij 35. After sample (the gelatinolytic enzyme partially purified by gel chromatography on Ultrogel AcA 54) was applied, the column was washed with the same buffer until the absorbance at 280 nm reached base-line. Elution was performed at pH 7.4 with linear gradient of sodium acetate from 0.05 M to 0.7 M. 7 ml fractions were collected at a flow rate of 7 ml/5 min.

A



B

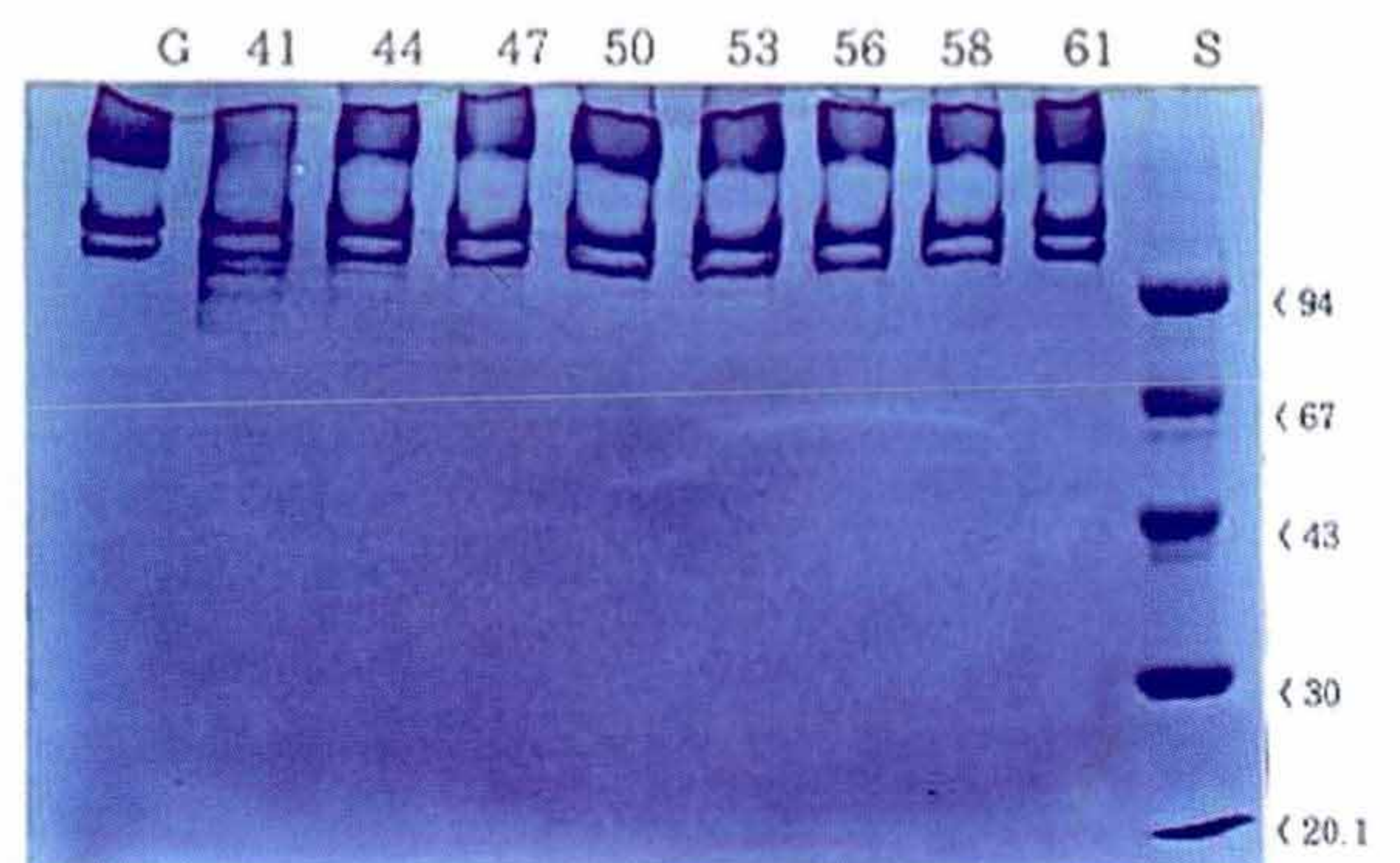


Figure 4. Enzyme activity of fractions isolated by Bio-Rex 70 ion exchange chromatography. Lane G: denatured type I collagen; lanes of the fraction 0-61: 73.5 μg of denatured type I collagen were incubated with 70 μl of aliquots of sample isolated by Bio-Rex 70 ion exchange chromatography for 17 h at 37°C. Reaction products were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel (panels A and B). The positions of degradation products were marked. Lane S, molecular mass markers were run on a separate tract of the same gel and are indicated.

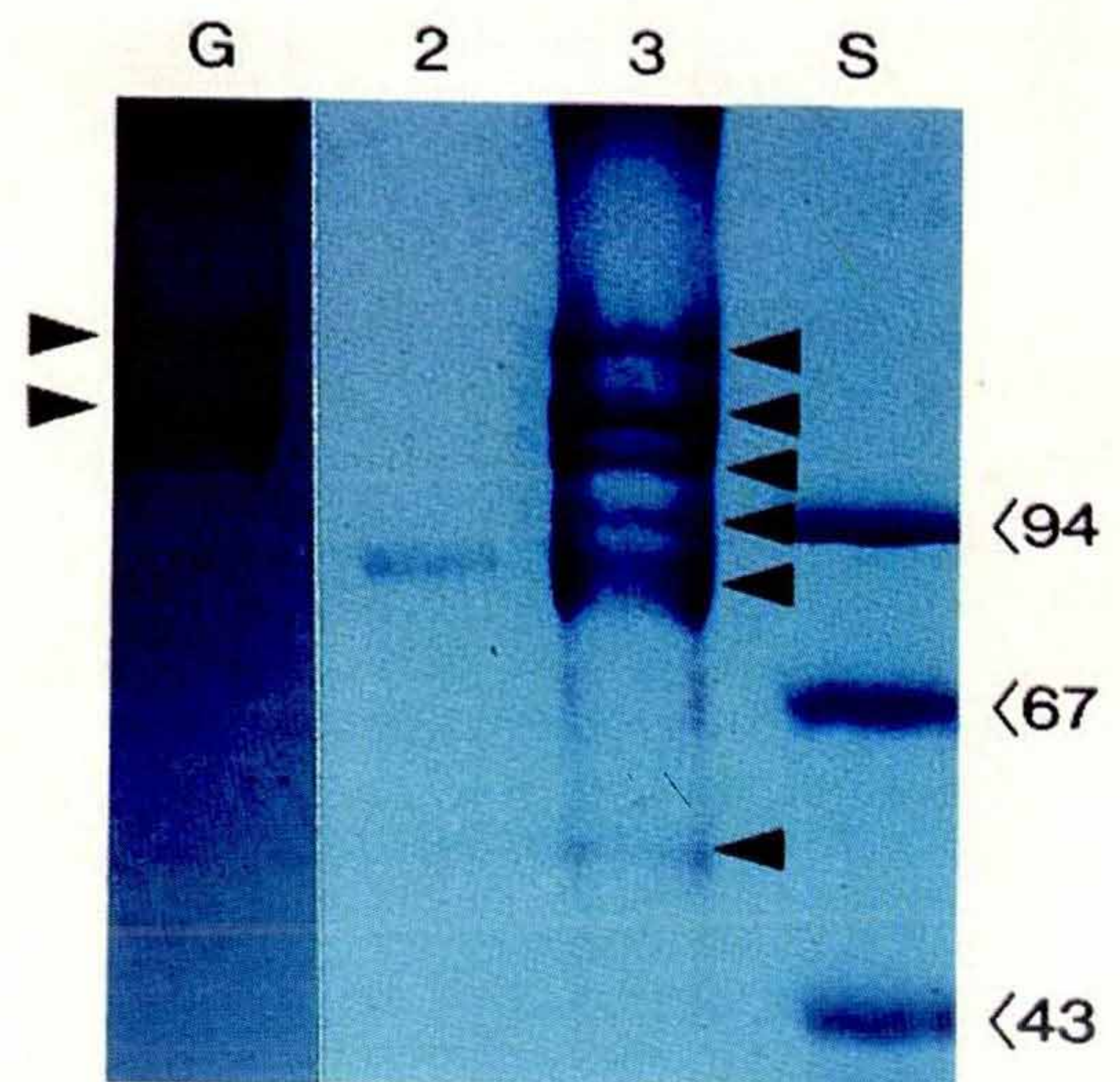


Figure 5. Analysis of purified enzyme and its gelatinolytic activity on the SDS-PAGE. Lane G: denatured type I collagen; lane 2: purified enzyme; lane 3: 73.8 μg of denatured type I collagen was incubated with 200 μg of purified enzyme for 4 h at 37°C. Reaction products were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Molecular mass markers were run on a separate tract of the same gel and are indicated.

4. 효소 활성화 및 활성도 억제 검사

3 mM APMA로 37°C에서 preincubation된 92-kD type IV collagenase에 최종 농도가 20 mM되도록 EGTA, EDTA 그리고 tetracycline을 각각 넣고 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 denatured type I collagen(gelatin)과 37°C에서 17 시간 동안 반응시킨 후 반응 산물을 SDS-PAGE한 결과는 Fig. 6과 같다.

EGTA(lane 5), EDTA(lane 6) 그리고 tetracycline(lane 7)에 의해서 효소의 활성이 모두 억제되었고 그 중에서 tetracycline에 의한 억제가 가장 강하였다.

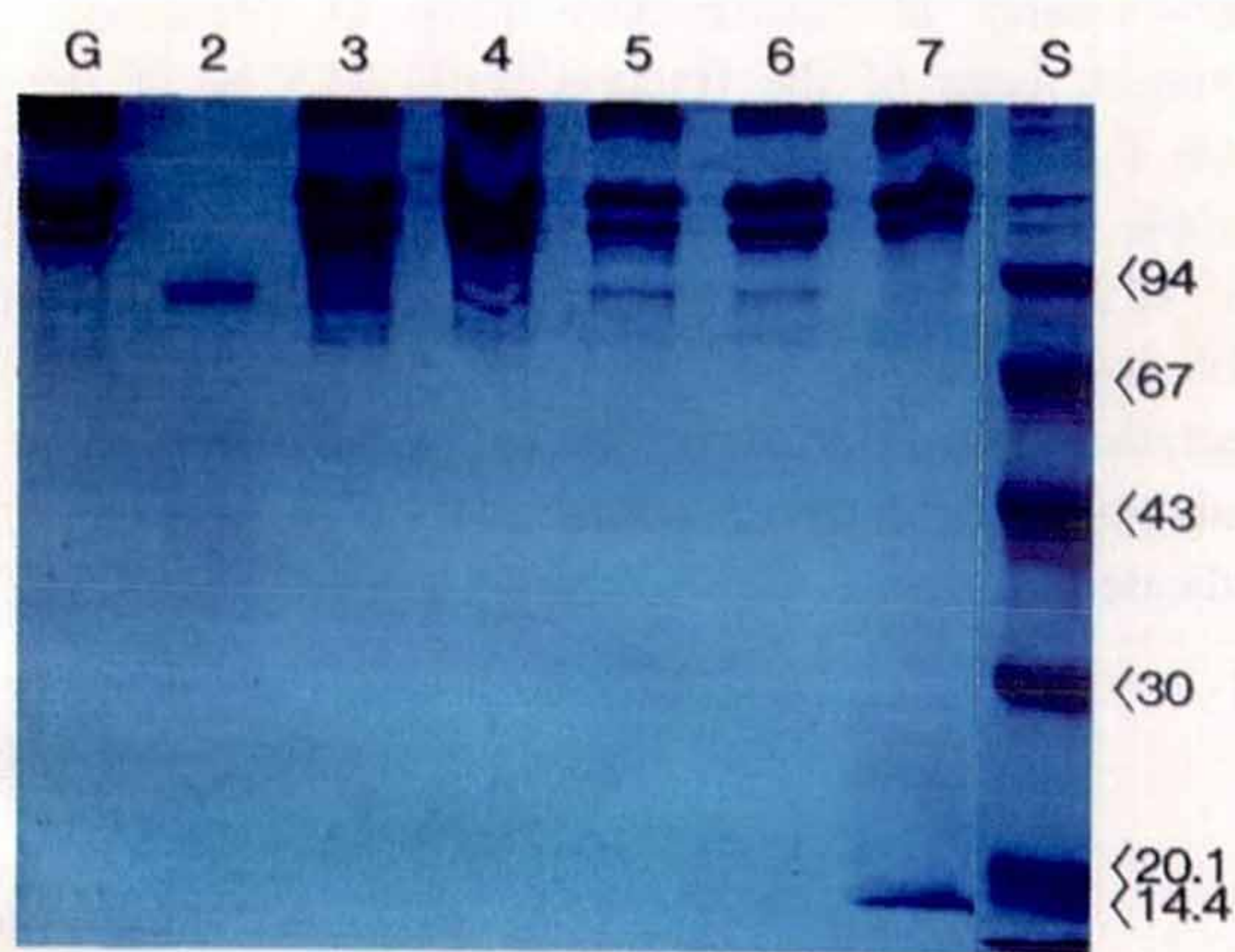


Figure 6. Inhibition of 92-kDa type IV collagenase by EGTA, EDTA and tetracycline. Lane G, 14.7 μ g of denatured type I collagen, lane 2: purified enzyme; lane 3-4, 14.7 μ g of denatured type I collagen were incubated with 2.2 μ g of purified enzyme for 17 h at 37°C; lane 5-7: 14.7 μ g of denatured type I collagen were incubated with 2.2 μ g of purified enzyme in the presence of 20 mM EGTA (lane 5), 20 mM EDTA (lane 6) and 20 mM tetracycline (lane 7), respectively, for 17h at 37°C. Reaction products were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Molecular mass markers were run on a separate tract of the same gel and are indicated.

고 찰

본 연구에서는 백혈구 추출물 132 mg에서 약 3.85 mg의 92-kD type IV collagenase를 Ultrogel AcA 54 gel filtration column chromatography와 Bio-Rex 70 ion exchange chromatography의 두 단계 분리를 통하여 순수

한 단일 band로 분리할 수 있었다. 이것은 1985년 Hibbs 등¹²⁾이 중성구의 배양 상층액 1,498 mg에서 2.85 mg의 효소를 분리한 것에 비하면 효소의 단백질 양에 대한 단순 비교에서는 약 15 배 정도 수율이 높다. 1982년 Murphy 등¹¹⁾은 neutrophil에서 metalloproteinase를 분리하는데 있어서 기술적으로 어려운 이유 두 가지를 들고 있는데 첫째, metalloproteinase 성분이 상대적으로 적다는 것이고 둘째, azurophil granule에 많이 존재하는 serine proteinases 즉 elastase와 cathepsin G에 의해서 metalloproteinase가 분해되기 때문이라고 하였으며, 10⁹ neutrophils 내에 elastase와 cathepsin G가 각각 4 mg씩 있고 collagenase가 0.2 mg, gelatinase가 0.1 mg이 있다고 보고했다. 그런데 본 연구에서 이처럼 수율이 대폭 증가된 이유로서는 첫째, 이전의 분리 방법보다 분리 단계가 간소화되어서 분리 과정 중에 효소의 유실이 적었고 둘째, Hibbs등은 분비되지 않고 중성구 내에 있던 92-kD type IV collagenase를 분리하지 못하는데 비해서 본 연구에서는 중성구 내에 있던 92-kD type IV collagenase를 분리했고 셋째, Hibbs등이 chromatography에 의한 분리의 첫 단계로서 DEAE-cellulose ion exchange chromatography의 방법을 사용함에 따라 시작 시료(starting material) 내에 공존하는 다른 단백질들에 의해서 이온 교환 수지와 92-kD type IV collagenase의 결합이 경쟁적으로 억제될 수 있는 단점을 개선하기 위해서 본 정제 방법에서는 먼저 Ultrogel AcA 54 size exclusion chromatography에 의해서 92-kD type IV collagenase의 농도가 높은 분획만을 일 차로 분리한 후 ion exchange chromatography를 위한 시료로 사용함에 따라 이온 교환 수지와 92-kD type IV collagenase가 결합할 확률을 증가시켰으며 끝으로, Hibbs등은 음 이온 교환 수지인 DEAE-cellulose를 사용한 것에 비해서 본 정제 방법에서는 약 산성의 양 이온 교환 수지인 Bio-Rex 70을 사용함에 따라 중성 pH에서 92-kD type IV collagenase의 양 이온 교환 수지에 대한 부착력이 적절했던 결과로 생각할 수 있다. 그러므로 이 두 단계 분리 방법이 92-kD type IV collagenase의 분리에 매우 이상적인 방법이라고 생각된다.

분리된 효소에 대한 특성을 규명하기 위하여 metal chelator들에 의한 효소활성도 억제 시험을 해본 결과는

Fig. 6의 lane 5, 6, 7에 각각 나타난 바와 같이 20 mM의 EGTA, EDTA 그리고 tetracycline에 의해서 효소 활성이 현저하게 억제되었는데, 이는 상기의 이 chelater들에 의해 효소의 catalytic domain에 있는 Zn^{2+} 나 분자 내에 존재하는 Ca^{2+} 등의 금속 이온이 착화(chelation)되어서 효소의 conformation이 변화되거나 효소로부터 금속 이온이 유리되어서 가수분해 활성(hydrolytic activity)이 상실되기 때문으로 생각된다. tetracycline에 의한 효소 활성 억제가 같은 농도의 EGTA와 EDTA에 의한 억제보다 강했는데 이것은 1989년 Zucker 등³⁵⁾이 보고한 tetracycline과 de-dimethylaminotetracycline(tetracycline의 'A' ring의 C4 위치에서 dimethylamino 기가 제거된 것)에 의한 소세포 폐암(small cell lung cancer) 세포의 human 72-kD type IV collagenase(gelatinase A)의 억제 연구에서 보고된 결과와 일치하였다. Zucker 등은 이러한 결과가 단지 이전에 알려진 것처럼 tetracycline이나 de-dimethylaminotetracycline의 착화 효과(chelation effect)라고만 설명하고 있으나 이러한 착화 효과(chelation effect) 외에 EDTA나 EGTA와는 달리 또 다른 하나의 억제 기전이 존재할 것이라고 추정된다. 먼저 지금까지 제안된 metalloenzyme의 반응 기전을 기술한 두 종류의 이론을 살펴보면, 첫째 이론은 1990년 Vallee와 Auld³⁷⁾가 발표한 것으로서, 이들은 thermolysin³⁸⁾ 등 12개의 zinc metalloenzyme들에 대해 이미 보고된 x-ray에 의한 결정 구조(x-ray crystallographic structures)들^{39,40-42)}을 비교 연구한 결과 촉매 작용에 관여하는 아연 원자는 모두 효소 분자를 구성하는 세 아미노산의 side chain들과 배위 결합을 하고 있고, 네 번째 배위자로서 H_2O 가 Zn^{2+} 와 배위 결합을 하고 있으며, Zn^{2+} 와 결합하고 있는 물은 효소학적으로 활성인 zinc 부위에 있어서 결정적인 요소이고 이 Zn^{2+} 와 결합하고 있는 세 아미노산의 배위 결합 빈도는 histidine >> glutamate > aspartate = cysteine의 순서라고 밝혔다. 둘째 이론은 Springman과 Van Wart 등^{43,44)}이 제안한 것으로서, 모든 matrix metalloproteinase는 불활성 상태에서 propeptide domain에 있는 cysteine이 네 번째 배위자로서 활성 부위의 Zn^{2+} 와 배위 결합을 하고 있는데 APMA와 같은 유기 수은 제나 단백질 가수 분해 효소에 의해서 Zn^{2+} 와 배위 결합을 하고 있는 cysteine이 물 분자와 대치될때 이 효소가

활성화 된다고 하는 "cysteine switch" 설이다.

이 두 학설을 통합하여 추론해보면 tetracycline이나 de-dimethylaminotetracycline에 의한 92-kD type IV collagenase의 활성 억제에 있어서 금속의 착화 효과 외의 또다른 기전으로서, 이처럼 활성화 된 92-kD type IV collagenase의 Zn^{2+} 에 대한 제 4 배위자로서 물 분자보다 Zn^{2+} 의 d 궤도 (orbital)전자들에 대해 결정 장 분열 (crystal field splitting)^{45,46)}을 더 심하게 유발시키는 tetracycline이나 de-dimethylaminotetracycline의 amide기를 구성하는 carbonyl 기가 결합함으로써 92-kD type IV collagenase의 catalytic domain에 있는 Zn^{2+} 나 효소 전체 conformation을 그대로 두고서도 "cysteine switch"의 "off"와 같은 불활성화를 유발할 수 있기 때문이라고 추측된다. 이러한 추론을 검증하기 위해서 tetracycline이나 de-dimethylaminotetracycline의 amide 기를 구성하는 carbonyl 기와 그 외의 carbonyl 기나 작용 기(functional group)를 모두 또는 선택적으로 제거시키거나 치환시킨 상태에서 본 효소에 대한 억제 시험을 장차 더 해볼 필요가 있다.

결 론

1. Ultrogel AcA 54 액체 크로마토그래피와 Bio-Rex 70 이온 교환 크로마 토그래피의 두 단계 분리법을 통하여 백혈구 추출물(leukocyte extract)로부터 SDS-PAGE에서 92-kD의 단일 band를 나타내는 human 92-kD type IV collagenase를 효과적으로 분리 할 수 있었으며 효소의 단백질 양에 대한 단순 비교에서 이전의 방법보다 약 15배 수율이 증가했다.

2. Human 92-kD type IV collagenase는 각각 20 mM의 EGTA, EDTA 그리고 tetracycline에 의해서 효소 활성이 억제되었는데, 이는 이 약제들에 의해서 92-kD type IV collagenase의 분자 내의 Zn^{2+} 가 착화되어서 92-kD type IV collagenase가 효소 활성을 상실한 것으로 생각된다.

3. Tetracycline이 금속 chelator인 EGTA나 EDTA보다 92-kD type IV collagenase에 대한 활성 억제가 강력한 이유는 tetracycline에 의한 착화효과(chelation effect) 외에

tetracycline의 amide 기를 구성하는 carbonyl 기가 92-kD type IV collagenase의 활성 부위(active site) 내에 있는 zinc에 제 4 배위자(ligand)로 결합함으로써 활성 부위를 불활성화 시키기 때문이라고 추정된다.

참고문헌

1. Springer TA : Adhesion receptors of immune system. *Nature* 346 : 425-434, 1990
2. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, He AKC, Bauer EA and Goldberg GI : H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 263(14) : 6579-6587, 1988
3. Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I and Tryggvason K : High expression of 92-kD type IV collagenase (Gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol* 124(6) : 1091-1102, 1994
4. Ingman T, Sorsa T, Lindy O, Koski H and Kontinen YT : Multiple forms of gelatinase/Type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 21 : 26-31, 1994
5. Docherty AJP and Murphy G : The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins. *Ann Rheu Dis* 49 : 469-479, 1990
6. Woessner JF : Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5 : 2145-2154, 1991
7. Netzel-Arnett S, Sang Q, Moore WGI, Navre M, Birkedal-Hansen H and Van-Wart HE : Comparative sequence specificities of human 72- and 92-kDa gelatinases(type IV collagenases) and pump(matrilysin). *Biochemistry* 32 : 6427-6432, 1993
8. Harris ED and Krane SM : An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochim Biophys Acta* 258 : 566-576, 1972
9. Sopata I and Danciewicz AM : Presence of gelatin-specific proteinase and its latent form in human leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 370 : 510-523, 1974
10. Murphy G, Bretz U, Baggiolini M and Reynolds JJ : The latent collagenase and gelatinase of human polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Biochem J* 192 : 517-525, 1980
11. Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U and Baggiolini M : Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem J* 203 : 209-221, 1982
12. Hibbs MS, Hastly KA, Seyer JM, Kang AH and Mainardi CL : Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 260(4) : 2493-2500, 1985
13. Morel F, Berthier S, Guillot M, Zaoui P, Massoubre C, Didier F and Vignaris PV : Human neutrophil gelatinase is

collagenase type IV. *Biochem Biophys Res Commun* 191 : 269-274, 1993

14. Murphy G, McAlpine CG, Poll CT and Reynolds JJ : Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and types IV and V collagen. *Biochim Biophys Acta* 831 : 49-58, 1985
15. Masure S, Proost P, Van Damme J and Opdenakker G : Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase, release by activating peptide interleukin-8. *Eur J Biochem* 198 : 391-398, 1991
16. Hibbs MS, Hoidal JR, Kang AH : Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophage. *J Clin Invest* 80 : 1644-1650, 1987
17. Pyke C, Ralfkiar E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K and Tryggvason K : Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res* 52 : 1336-1341, 1992
18. Pyke C, Ralfkiar E, Tryggvason K and Dano K : Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. *Am J Pathol* 142 : 359-365, 1993
19. Murphy G, Ward R, Hembry RM, Reynolds JJ, Kuhn K and Tryggvason K : Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leukocytes. *Biochem J* 258 : 463-472, 1989
20. Behrendtsen O, Alexander CM, and Werb Z : Metalloproteinase mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development* 114 : 447-456, 1992
21. Salo T, Lyons G, Rahemtulla F, Birkedal-Hansen H and Larjava H : Transforming growth factor- β 1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem* 266(18) : 11436-11441, 1991
22. Weeks BS, Schnaper HW, Handy M, Holloway E and Kleiman HK : Human T lymphocytes synthesize the 92 kDa type IV collagenase(Gelatinase B). *J Cell Physiol* 157 : 644-649, 1993
23. Moll UM, Youngleib GL, Rosinski KB and Quigley JP : Tumor promoter-stimulated Mr 92,000 gelatinase by normal and malignant human cells: isolation and characterization of the enzyme from HT1080 tumor cells. *Cancer Res* 50 : 6162-6170, 1990
24. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA and Goldberg GI : SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264 : 17213-17221, 1989
25. Albini A, Melchiori A, Santi L, Liotta LA, Brown PD and Stetler-Stevenson WG : Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. *J Natl Cancer Inst* 83 : 775-779, 1991
26. Bernhard EJ, Muschel RJ and Hughes EN : Mr 92,000 gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in

- transformed rat embryo cells. *Cancer Res* 50 : 3872-3877, 1990
27. Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, and Eisen AZ : Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 64(1) : 232-240, 1975
28. Stricklin GP, Bauer EA, Jeffrey JJ and Eisen AZ : Human skin collagenase: Isolation of precursor and active forms from both fibroblast and organ cultures. *Biochemistry* 16(8) : 1607-1615, 1977
29. Stricklin GP, Eisen AZ, Bauer EA and Jeffrey JJ : Human skin fibroblast collagenase: chemical properties of precursor and active forms. *Biochemistry* 17(12) : 2331-2337, 1978
30. Grisham MB, Engerson TD, McCord JM and Jones HP : A comparative study of neutrophil purification and function. *J Immunol Methods* 82 : 315-320, 1985
31. Gloub LM, Lee HM, Lehrer G, Nemiroff A, McNamara TF, Kaplan R and Ramamurthy NS : Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes: preliminary observation and a proposed new mechanism of action. *J Periodont Res* 18 : 516-526, 1983
32. Golub LM, McNamara TF, Angelo GD, Greenwald RA and Ramamurthy NS : A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. *J Dent Res* 66(8) : 1310-1314, 1987
33. Gloub LM, Ramamurthy N, McNamara TF : Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. *J Periodont Res* 19 : 651-655, 1984
34. Gloub LM, Wolff M and Lee HM : Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian source. *J Periodont Res* 20 : 12-23, 1985
35. Zucker S, Wieman J, Lysik RM, Imhof B, Nagase H, Ramamurthy N, Liotta LA and Golub LM : Gelatin-degrading type IV collagenase isolated from human small cell lung cancer. *Invasion Metastasis* 9 : 167-181, 1989
36. Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970
37. Vallee BL and Auld DS : Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 220-224, 1990
38. Matthews BW, Jansonius JN, Colman PM, Schoenborn BP and Dupourque D : Three-dimensional structure of thermolysin. *Nat (New Biol)* 238 : 37-41, 1972
39. Dideberg O, Charlier P, Dive G, Joris B, Frere JM and Ghuysen JM : Structure of a Zn²⁺-containing D-alanyl-D-alanine-cleaving carboxypeptidase at 2.5 Å resolution. *Nature(London)* 299 : 469-470, 1982
40. Horzanko RB, Crawford JL, Monaco HL, Ladner JE, Edward BFP, Evans DR, Warren SG, Wiley DC, Ladner RC and Lipscomb WN : Crystal and molecular structures of native and CTP-liganded aspartate carbamoyltransferase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 160 : 219-263, 1982
42. Rees DC, Lewis M and Lipscomb WN : Refined crystal structure of carboxypeptidase A at 1.54 Å resolution. *J Mol Biol* 168 : 367-387, 1983
41. Pauptit RA, Karlsson R, Picot D, Jenkins JA, Niklaus-Reimer A-S and Jansonius JN : Crystal structure of neutral protease from *Bacillus cereus* refined at 3.0 Å resolution and comparison with the homologous but more thermostable enzyme thermolysin. *J Mol Biol* 199 : 523-537, 1988
43. Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen, and Van Wart H E : Multiple mode of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 364-368, 1990
44. Van Wart HE and Birkedal-Hansen H : The cysteine switch : a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 5578-5582, 1990
45. Chang R. Physical chemistry with applications to biological systems. 2nd ed. New York : Collier Macmillan, 1984, 446-486
46. Huhe JE, Keiter EA and Keiter RL. Inorganic chemistry. 4th ed. New York : Harper Collins, 1993, 387-572