

Characterization of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases2(TIMP-2) from Human Hepatoma Cell Line(HLE Cells) and it's Interaction with Gelatinase A and Inactivation

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8568

ヒト肝癌細胞 (HLE細胞) 株由来 マトロプロテアーゼインヒビター (TIMP-2) の性質, ゼラチナーゼAとの相互作用および不活性化

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

河村 公二

マトリックスマトロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) の活性は、3種類の分子種からなるマトロプロテアーゼインヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP), TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 によって厳重に調節されている。本研究では TIMP-2 を精製し、活性型の MMP-1 (間質コラゲナーゼ), MMP-2 (72kDa ゼラチナーゼ, ゼラチナーゼA), MMP-3 (ストロムライシン-1), MMP-9 (92kDa ゼラチナーゼ, ゼラチナーゼB) に対するインヒビター活性, MMP-2 との相互作用, セリンプロテアーゼと活性酸素種による不活性化について調べ、TIMP-1 の結果と比較・検討した。TIMP-2 はヒト肝癌細胞 (HLE細胞) 株培養液より4種のカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製した TIMP-2 は、電気泳動上還元状態で分子量25,000の単一のバンドとして観察された。TIMP-2 のインヒビター活性は90°C, 30分間の熱処理や pH1.7, 30分間処理でも極めて安定であったが、2-メルカプトエタノールによる還元処理で失活し、この性質は TIMP-1 と同様であった。活性型の MMP-1 (分子量42,000), MMP-2 (分子量67,000), MMP-3 (分子量45,000) 活性に対して、TIMP-1 は TIMP-2 より2.5倍から7.8倍強く阻害した。一方、MMP-9 (分子量67,000) に対しては TIMP-2 の方が1.2倍強い阻害活性を示した。潜在型 MMP-2 は TIMP-2 とのみ複合体を形成し、その複合体は活性型 MMP-2 に対してインヒビター活性を有していた。また、TIMP-2 は p-アミノフェニル酢酸第二水銀 (p-aminophenylmercuric acetate, APMA) による潜在型 MMP-2 の活性化に伴う低分子化を TIMP-1 より7.6倍強く阻害した。TIMP-2 の各ドメインに対する特異的モノクローナル抗体 (アミノ末端ドメインの最初のループに対する抗体, 3番目のループに対する抗体, およびカルボキシル末端ドメインに対する抗体) を用いた実験から、TIMP-2 は潜在型 MMP-2 とはカルボキシル末端ドメインで結合し、アミノ末端ドメインの3番目のループが MMP-2 活性の阻害中心であると推定された。TIMP-2 のインヒビター活性はトリプシン (50 μ g/ml), α -キモトリプシン (50 μ g/ml), 好中球エラスターゼ (50 μ g/ml) 処理で不活性化された。また、カテプシンG (50 μ g/ml) によっても部分的に不活性化された。しかし、プラスミンやトロンビンにその作用はみられなかった。TIMP-2 分子をトリプシン, α -キモトリプシン, 好中球エラスターゼおよびカテプシンGでインキュベーションすると、その分子は小さいフラグメントに分解された。これらの所見は TIMP-1 で報告されている性質とはほぼ同様であった。一方、TIMP-2 は血漿カリクレイン (1, 10 μ g/ml) によって完全に分解・失活したが、TIMP-1 には全く作用しなかった。また、TIMP-2 は HOCl (0.1mM) によって完全に失活し、H₂O₂ (0.2~5mM) によっても部分的に不活性化された。TIMP-1 は HOCl (2mM) でのみ不活性化されることから、これらの活性酸素種に対しては TIMP-2 の方が影響されやすいと考えられる。以上の結果は、TIMP-2 が酵素活性の阻害と潜在型酵素の活性化の阻害の両面から、MMP-2 活性調節に重要な役割を果たすことを示している。また、病的状態では TIMP による MMP の活性調節は、病変部に浸潤した多核白血球や血清に由来するセリンプロテアーゼや活性酸素種によって修飾されることを示唆している。

Key words matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of metalloproteinases, inhibition of enzymic activities, inhibitor, inactivation

金属依存性蛋白分解酵素であるマトリックスマトロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) は、悪性腫瘍の浸潤・転移や関節疾患における組織破壊に重要な役割を果たしている¹⁻⁴。MMP 遺伝子ファミリーは、一次構造の異なる9種類の酵素から構成されており、いずれも潜在型で分泌され細胞外で活性化を受ける⁵。生体内においては、それらの活性は共通のインヒビターであるマトロプロテアーゼインヒビター (tissue

inhibitor of metalloproteinases, TIMP) によって厳重に調節されており、MMP と TIMP 間に量的不均衡が生じた場合に組織破壊が進行すると考えられている²⁻⁴。TIMP にはアミノ酸配列の異なる3種類の分子種が区別されており、TIMP-1, 2, 3と名付けられている^{2-4,6}。これらのうち TIMP-3 は細胞外マトリックス成分中に沈着して存在し、その性質についてはほとんど解明されていない⁵。一方、TIMP-1⁶と TIMP-2⁷はアミノ酸

平成6年5月20日受付, 平成6年7月14受理

Abbreviations: APMA, p-aminophenylmercuric acetate; DIFP, diisopropyl fluorophosphate; MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases

配列において約40%の相同性を持ち、ともに1:1のモル比で MMP 活性を阻害する⁸⁹⁾。しかし、個々の MMP 活性に対する TIMP-1 と TIMP-2 のインヒビター活性の強さに関しては一定した見解がない¹⁰¹⁾。TIMP-1 と TIMP-2 は、それぞれ潜在型の MMP-9 (ゼラチナーゼ B, 92kDa ゼラチナーゼ) と MMP-2 (ゼラチナーゼ A, 72kDa ゼラチナーゼ) との間に複合体を形成する¹²¹⁾。また、Okada ら¹⁴⁾はこの複合体形成により TIMP-1 が潜在型 MMP-9 の活性化を阻害することを実証した。同様に、TIMP-2 は潜在型の MMP-2 のみならず MMP-1 (間質コラーゲナーゼ), MMP-3 (ストロムライシン-1), MMP-9 の活性化を阻害することがあいついで報告されている¹⁰¹⁾。しかし、TIMP による潜在型 MMP の活性化に対する阻害力を詳細に比較した報告はこれまでみられない。近年、MMP に対して作用する TIMP 分子のドメインが徐々に明らかとなってきた。TIMP-2 では、アミノ末端ドメインの3つのループ構造にインヒビター活性ドメインがあり、カルボキシル末端ドメインが潜在型 MMP-2 と結合すると推定されている¹⁰⁾。TIMP による MMP 活性の調節は、局所で産生された TIMP 量にはば支配されると思われる。しかし、慢性関節リウマチをはじめとする炎症性疾患においては、炎症局所で多種類の酵素や活性酸素種の産生がみられる。従って、これら因子によって TIMP のインヒビター活性が修飾される可能性があり、実際 TIMP-1 は好中球エラスターゼやカテプシン G で失活することが報告されている⁸⁾。

本研究においてはヒト肝癌細胞 (HLE 細胞) 株より TIMP-2 を単一標品として精製し、その生化学的性質を明らかにするとともに、潜在型 MMP-2 の活性化に対する影響とセリンプロテアーゼや活性酸素種による不活性化機構について調べ、TIMP-1 のそれと比較・検討した。

材料および方法

I. 実験材料

EDTA, SDS, 次亜塩素酸ナトリウム (sodium hypochlorite solution) は和光純薬 (大阪) より購入した。H₂O₂ は三菱瓦斯化学 (東京) より購入した。P-アミノフェニル酢酸第二水銀 (p-aminophenylmercuric acetate, APMA), ジイソプロピルフルオロリン酸 (diisopropyl fluorophosphate, DIFP), 2-メルカプトエタノール, プラスミノーゲン, 好中球エラスターゼ, トリプシン, α -キモトリプシン, トロンビン, プラズマカリクレイン, クーマシイブリリアントブルー R250 は Sigma (St. Lois, U. S. A.) より購入した。カテプシン G は ICN Biochemicals (Cleveland, U. S. A.) より購入した。YM-10 メンブレン, 限外濾過装置と GreenA Dyematrix ゲルはアミコン製 (Danvers, U. S. A.) を用いた。また、ウルトラゲル AcA44 は Pharmacia (Uppsala, Sweden), DEAE セルロースは Whatman (Maidstone, England) より購入した。¹⁴C-無水酢酸, ¹²⁵I および ³H プロリンはアマナム・ジャパン (東京) より購入した。潜在型の MMP-1 と MMP-9 はヒト線維肉腫細胞 (HT1080 細胞株) 培養液より Okada ら¹⁴⁾の方法で精製した。また、潜在型の MMP-2 と MMP-3 は慢性関節リウマチ滑膜細胞培養液より精製した¹⁷⁾。TIMP-1 は抗 (TIMP-1) IgG-セファロースカラムを用いて、ヒト胎盤抽水液より精製した¹⁰⁾。ヒト肝癌細胞 (HLE 細胞株) はリサーチ・リソース細胞バンク (東京) より提供を受けた。

TIMP-2 のアミノ末端部 (DSGNDIYGNIPIKRIQ, P30-44), 中

央部 (DTLSTTQKKSLNHRYQQ, P108-124), カルボキシル末端部 (YRGAAPPKQFLDIED, P178-193) を特異的に認識するモノクローナル抗体 (68-6H4, 69-10B11, 67-4H11) は、金沢大学医療技術短期大学部岡田保典助教授と富士薬品工業岩田和土博士より提供を受けた。また、これらを用いて抗体カラムを作製し、そのカラムフラクション中の TIMP-2 量をサンドイッチイムノアッセイ法で測定した²⁰⁾。

II. 酵素活性の測定

MMP-1 活性はモルモット皮膚由来の I 型コラーゲンを Gisslow ら²¹⁾の方法により ¹⁴C-無水酢酸で標識し、Cawston ら²²⁾の方法で測定した。MMP-2 と MMP-9 活性は同コラーゲンを熱変性 (60°C, 30 分処理) し、Harris ら²³⁾の方法に従って測定した。また、MMP-3 活性は Okada ら²⁴⁾の方法に従い ³H-カルボキシメチル化トランスフェリンを基質として測定した。これら酵素に対する TIMP-1 と TIMP-2 の阻害活性は、酵素と TIMP を 23°C, 45 分間インキュベーション後、37°C, 1 時間で測定した。

III. 潜在型 MMP-2 と TIMP-1, TIMP-2 のヨウ素化

精製した潜在型 MMP-2, TIMP-1 および TIMP-2 を Fraker ら²⁵⁾の方法に従って ¹²⁵I で標識した。標識後未結合の ¹²⁵I をスピニング法を用いて除去した²⁴⁾。

IV. SDS-PAGE 法

試料を 1% 2-メルカプトエタノールによる還元あるいは非還元状態で Laemmli²⁶⁾の方法に従って電気泳動した。泳動後ゲルを 50% メタノールで固定し、Wray ら²⁷⁾の方法で銀染色を施し観察した。TIMP インヒビター活性の不活性化および潜在型 MMP-2 の活性化に伴う分子量の変化は SDS-PAGE 後のオートラジオグラフィーにて観察した。また、イムノブロットに際しては、TIMP-2 を 12.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後ニトロセルロース膜に転写し、このニトロセルロース膜を抗 TIMP-2 抗体 (68-6H4, 69-10B11, 67-4H11) と反応させ、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法により発色した。

V. TIMP-2 の精製

TIMP-2 精製の最初の 2 段階は Okada ら²⁴⁾によって報告された MMP-3 精製法に準じて行った。精製過程で各フラクション中に溶出された TIMP-2 は、MMP-9 に対する阻害活性を測定するとともに、SDS-PAGE によってその蛋白バンドを確認した。また精製はすべて 4°C で行った。

1. 第 1 段階

無血清 BT563 培地で 14 日間培養した HLE 細胞培養液 (250ml) を、YM-10 メンブレンを装着した限外濾過装置で 36ml に濃縮した。プロテオグリカンを除去する目的で、培養液を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 8.0/0.15M NaCl/5mM CaCl₂/0.02% NaN₃) で平衡化した DEAE-セルロースカラム (2.5×6 cm) にかけた。

2. 第 2 段階

TIMP-2 分画を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15M NaCl/10mM CaCl₂/0.02% NaN₃) で平衡化した Green A Dyematrix ゲルカラム (2.5×7.5cm) にかけた。カラムを同緩衝液で洗浄後、緩衝液中に 0.05% Brij 35 を加え 0.15M から 2M の NaCl で勾配溶出した。

3. 第 3 段階

TIMP-2 分画を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15M NaCl/10mM CaCl₂/0.05% Brij 35/0.02% NaN₃) で平衡化した抗

(TIMP-1) IgG-セファロースカラム (1×7.5cm) に通した。

4. 第4段階

抗 (TIMP-1) IgG-セファロースカラムで得られた TIMP-2 分画を YM-10 メンブレンを装着した限外濾過装置で濃縮後、更に AcA 44 カラム (1.2×115cm) による精製を行った。精製された TIMP-2 は SDS-PAGE 後、ゲルを銀染色すると単一のバンドからなること確認され、この試料を以下の実験に用いた。

成 績

1. TIMP-2 の精製とモノクローナル抗体による同定

ヒト肝癌細胞培養液から TIMP-2 を4種のカラムクロマトグラフィで精製した。各精製ステップの推移を表1に示す。TIMP-2 は Green A Dyematrix Gel に吸着し、1.25M NaCl で溶出された (図1)。このステップにより TIMP-2 と同様の分子量をもつ他の蛋白が除去され、最終ステップの AcA 44 ゲル濾過法により TIMP-2 は容易に精製された。また、抗 (TIMP-1) IgG セファロースカラムにより分子量28,000の TIMP-1 は完全に除去された。精製された TIMP-2 は、SDS-PAGE 上単一のバンドとして観察され、非還元および還元状態で分子量はそれぞれ23,000と25,000であった (図2)。最終的な回収率は、培養液中の全インヒビター活性を100%とすると19%であった。ま

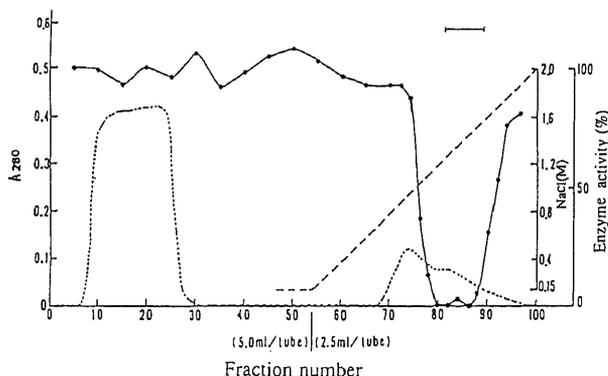


Fig. 1. Green A Dyematrix gel chromatography (step 2). The unbound fractions obtained from DEAE-cellulose column (96 ml) were applied to a column of Green A Dyematrix gel (2.5×7.5 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15 M NaCl/10 mM CaCl₂/0.02% NaN₃. The inhibitor activities monitored by gelatinase assay using active MMP-9 were eluted with a linear gradient of NaCl (0.15-2 M) in the buffer containing 0.05% Brij 35. The fractions indicated (—) were combined and used for further purification. Fraction volume: fraction numbers from 1 to 54, 5.0 ml/tube; from 55 to 98, 2.5 ml/tube. ·····, A₂₈₀; -----, molar concentration of NaCl; ●, enzymic activity.

た、DEAE セルロースカラム分画に対して精製率は84倍であった (表1)。精製した蛋白が TIMP-2 であることを証明するために、TIMP-2 分子のアミノ酸配列に対応したペプチドに対する3種類の特異抗体を用いてイムノブロットを行なった。その結果、精製した TIMP-2 はこれら3種類の抗体によって認識された。

II. TIMP-2 の安定性

精製された TIMP-2 と TIMP-1 を用いて、熱や酸および還元処理に対する安定性を比較・検討した。TIMP-1 と TIMP-2 はともに熱に対して極めて安定であり、90℃、30分間処理においても活性の失活は認められなかった。100℃、15分間処理でも両活性は保持されたが、30~60分間処理では TIMP-1 は安定なのに対し、TIMP-2 活性は約70%となった。また TIMP-1 と TIMP-2 は強酸性下 (pH 1.7)、30分間処理においてもその活性は安定であった。一方、TIMP-1 と TIMP-2 のインヒビター活

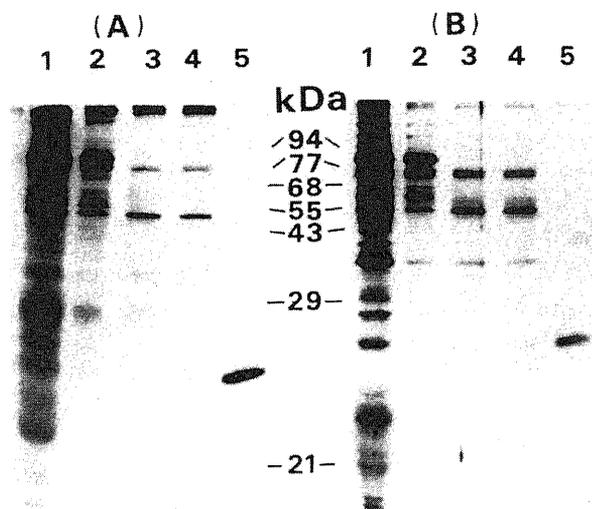


Fig. 2. SDS-PAGE of the fractions from each purification step. (A) Non-reduced fractions of each purification step. Lanes 1-5 are concentrated culture medium from HLE cells, DEAE-cellulose, Green A Dyematrix gel, anti-(TIMP-1) IgG-Sepharose, and AcA44 column chromatography step, respectively. (B) Reduced fractions of each purification step. Lanes 1-5 are the same purification steps as in (A). Molecular weight standard proteins are used phosphorylase b (94 kDa), transferrin (77 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), heavy chain of immunoglobulin G (55 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa) and soybean trypsin inhibitor (21 kDa).

Table 1. Purification of TIMP-2

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Concentrated medium	—	180,000	—	—	100
D E A E -cellulose	51.65	137,143	2,655	1	76
Green A Dyematrix	3.07	76,800	25,000	9	43
Anti (TIMP-1) IgG-Sepharose	2.68	68,088	25,396	10	38
A c A 44	0.15	33,333	222,220	84	19

性は還元処理で全活性の15%にまで失活した。

III. MMP に対するインヒビター活性

潜在型の MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 を APMA で活性化し, これら MMP 活性に対する TIMP-1 と TIMP-2 の阻害活性を検討した. 実験に用いた活性型 MMP-1, 2, 3, 9 の分子量は, それぞれ43,000, 67,000, 45,000, 67,000であった. 図3の如く, MMP-2 と MMP-9 に対する TIMP-1 と TIMP-2 の阻害パターンは類似しており, MMP-1 と MMP-3 の阻害には高濃度の TIMP-2 を必要とする点で異なっていた. TIMP-1 と TIMP-2 の阻害活性を各 MMP 活性の50%阻害時の濃度で比較すると, MMP-1, 2, 3 の阻害には TIMP-1 に比較しそれぞれ7.8倍, 2.5倍, 6.4倍高濃度の TIMP-2 が必要であった(図3, 表2). また, MMP-9 活性の50%阻害は TIMP-1 の法が1.2倍高濃度であった. これらの結果は MMP-1, MMP-2, MMP-3 に対しては TIMP-1 がより強いインヒビターであり, MMP-9 に対しては TIMP-2 が優れていることを示唆している. 実際, TIMP-1 と TIMP-2 の K_i の比率は MMP-1, MMP-2 および MMP-3 に対して9.6倍, 2.5倍, 6.7倍であるのに対し, MMP-9 では逆に TIMP-2 が1.3倍であった(表2).

Table 2. Inhibition of MMP-1, 2, 3, 9 by TIMP-1, 2

MMP	TIMP-1/TIMP-2 (50%-inhibition)	TIMP-1/TIMP-2 (K_i ratio)
MMP-1	7.8 : 1	9.6 : 1
MMP-2	2.5 : 1	2.5 : 1
MMP-3	6.4 : 1	6.7 : 1
MMP-9	1 : 1.2	1 : 1.3

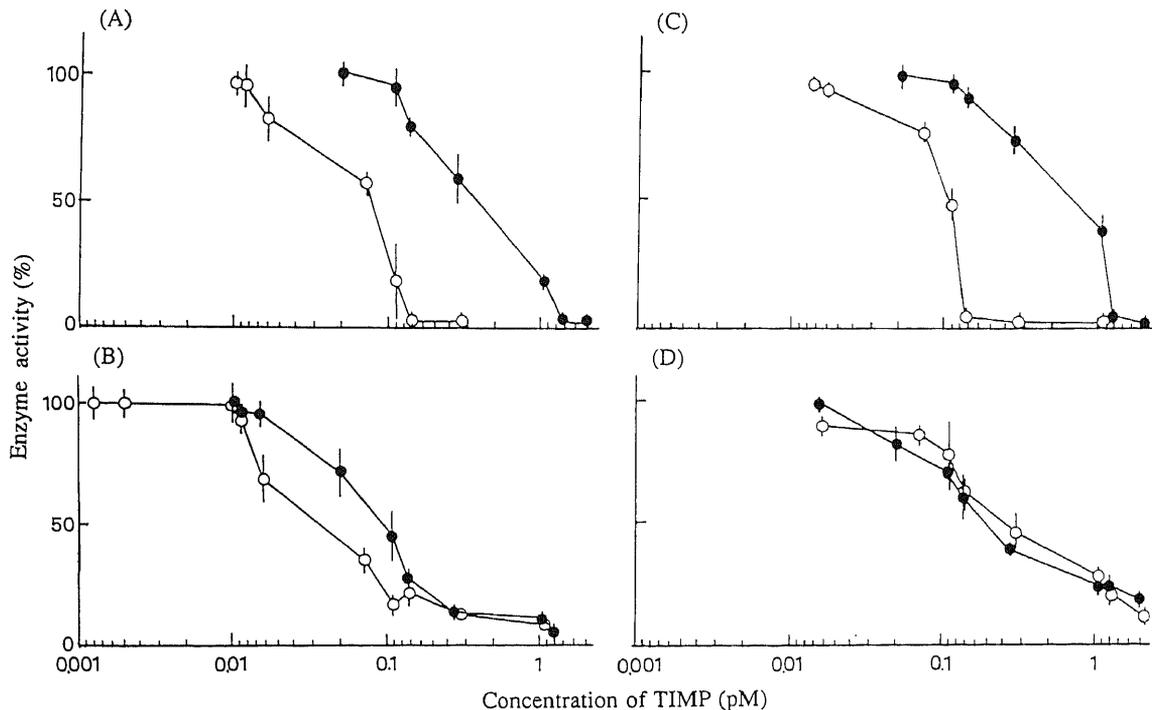


Fig. 3. Enzyme activity of MMP-1 (interstitial collagenase) (A), MMP-2 (72 kDa gelatinase, gelatinase A) (B), MMP-3 (stromelysin-1) (C) and MMP-9 (92 kDa gelatinase, gelatinase B) (D) to TIMP-1 and TIMP-2. The each activity was measured against ^{14}C -collagen for MMP-1, ^{14}C -gelatin for MMP-2 and MMP-9, and ^3H -Cm-Tf for MMP-3 for 1 hr at 37°C after incubation with TIMP-1 (○) or TIMP-2 (●) for 45 min at 23°C. Each point represents mean \pm SD (n=3).

IV. TIMP-2 と MMP-2 の相互作用

1. 潜在型 MMP-2 との結合

^{125}I で標識した潜在型 MMP-2 と TIMP-2 とを 4°C で 20 時間インキュベーション後ゲル濾過法によって展開し, 各分画の放射活性をガンマシンチレーションカウンターにて測定した. 図4の如く, 標識された MMP-2 のピークはフラクション38にみられるが, TIMP-2 とインキュベーションした試料ではフラクション35にピークが観察された. 一方, TIMP-1 を用いて同様の実験を行なったが, このような現象は観察されなかった. また, ^{125}I で標識した TIMP-1 と TIMP-2 を潜在型 MMP-2 とインキュベーション後に同様の方法で検討すると, TIMP-2 と反応した試料でのみピークの高分子量への移動が観察された. これらの結果は, TIMP-2 が潜在型 MMP-2 と結合することを示唆している. そこで, 一定量の TIMP-2 に潜在型 MMP-2 (モル比で 1~8 倍量) を 4°C, 20 時間インキュベーションすることで複合体を形成させ, 活性型 MMP-2 に対するインヒビター活性を測定した. その結果, 潜在型 MMP-2 の濃度に関係なく TIMP-2 のインヒビター活性は維持されていた(図5).

2. TIMP-2 と MMP-2 との相互作用に対するモノクロナール抗体の影響

TIMP-2 の各ドメインに対する特異的モノクロナール抗体 (68-6H4, 69-10B11, 67-4H11) を用いて, 潜在型 MMP-2-TIMP-2 複合体形成と, MMP-2 活性に対する TIMP-2 のインヒビター活性に及ぼす影響を検討した. TIMP-2 は上記の3種類のモノクロナール抗体を用いた IgG-セファロースカラムに吸着した. しかし, 潜在型 MMP-2-TIMP-2 複合体をこれらのカラムに通すと, カルボキシル末端ドメインに特異的な抗体

(67-4H11) のカラムでのみ吸着されなくなった (図 6). 一方, TIMP-2 とこれら抗体とを反応させた後に MMP-2 の阻害活性を測定すると, アミノ末端ドメインの 3 番目のループに対する抗体 (69-10B11) でのみ TIMP-2 阻害活性は約 30% までに低下した (図 7).

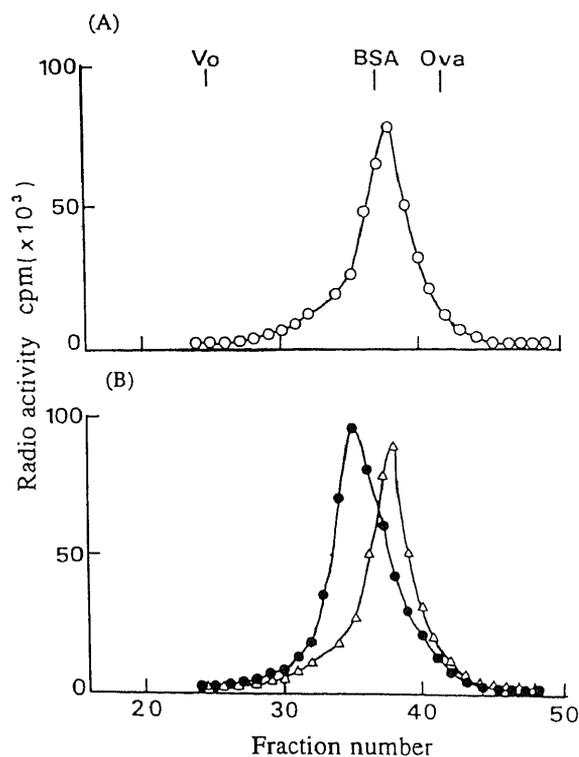


Fig. 4. Complex formation of proMMP-2 with TIMP-2. ¹²⁵I-labeled proMMP-2 (100 ng) was incubated with buffer alone (A) or TIMP (300 ng) (B) for 20 hr at 4°C. The samples were then mixed with 5 mg ovalbumin and chromatographed on the Ultrogel AcA44 column (1.5×115 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.4 M NaCl/10 mM CaCl₂/0.05% Brij 35/0.02% NaN₃. Radio activity was measured by a gammacounter. ○, no addition; △, TIMP-1 added; ●, TIMP-2 added.

V. 潜在型 MMP-2 の活性化に対する TIMP-2 の影響

潜在型 MMP-2 は, APMA 処理により活性化をされ低分子化する. この活性化に及ぼす TIMP-1 と TIMP-2 の影響を調べる目的で, ¹²⁵I で標識した潜在型 MMP-2 を種々のモル比で TIMP-1, TIMP-2 と 4°C, 13時間インキュベーション後, 1.0mM APMA 処理 (37°C, 1時間) により活性化し低分子化の状態を, SDS-PAGE で展開したのちオートラジオグラフィーにて検討した. 図 8 の如く, TIMP-1, TIMP-2 とともに活性化に伴う低分子化を阻害したが, 低分子化を完全に阻害するインヒビ

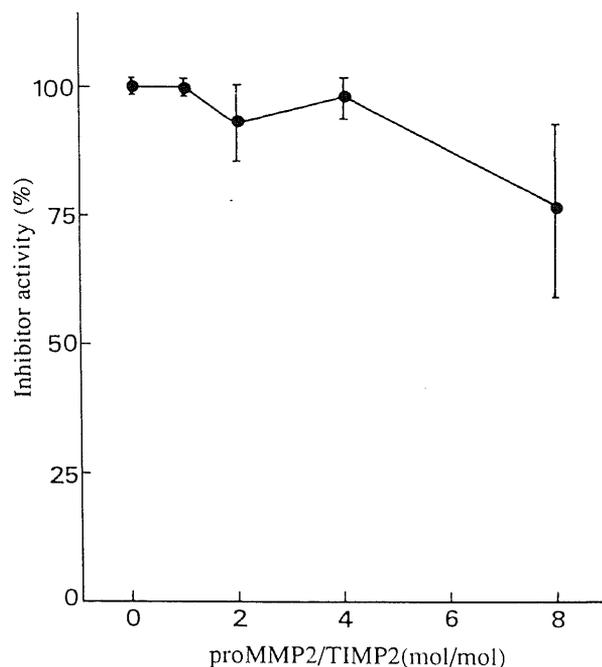


Fig. 5. Inhibitor activity of TIMP-2 against MMP-2 in the presence of proMMP-2. TIMP-2 was incubated with different amounts of proMMP-2 up to an 8-fold molar excess for 20 hr at 4°C. The inhibitor activity against MMP-2 was then determined by measuring the inhibition of MMP-2 activity in the ¹⁴C-gelatin assay for 1 hr at 37°C. Each point represents mean ± SD (n=3).

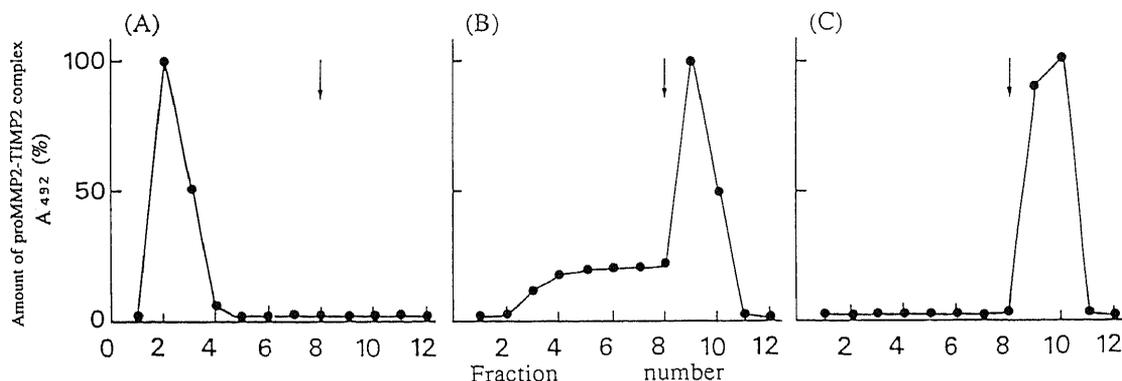


Fig. 6. Effects of the TIMP-2 domain-specific monoclonal antibodies on the proMMP-2-TIMP-2 complex formation. TIMP-2 was incubated with proMMP-2 for 15 hr at 4°C and subjected to anti-(TIMP-2) IgG (67-4H11) (A), (68-6H4) (B), and (69-10B11) (C)-Sepharose columns. Elution was performed with 0.2 M glycine-HCl buffer, pH 2.5. TIMP-2 in each column fraction was measured by a sandwich enzyme immunoassay²⁰. Clones 67-4H11, 68-6H4, and 69-10B11 are monoclonal antibodies specific to the carboxy-terminal domain, the first and third loops of the amino-terminal domain, respectively. A₄₉₂ (%), relative absorbance at 492 nm. Arrows indicate the starting point of elution.

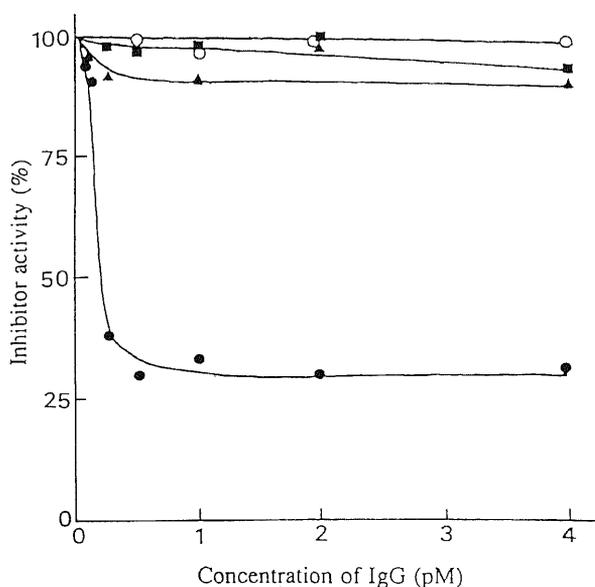


Fig. 7. Effects of the domain-specific monoclonal antibodies on TIMP-2 inhibitor activity to MMP-2. TIMP-2 was incubated with each antibody (0 to 4 pM) for 45 min at 4°C and then MMP-2 activity was measured against ^{14}C -gelatin for 1 hr at 37°C. ■, 67-4H11; ▲, 68-6H4; ●, 69-10B11; ○, non-immune.

ター濃度で比較すると, TIMP-2 は TIMP-1 より7.6倍強い活性を示した。

VI. TIMP-2 インヒビター活性の不活性化

1. セリンプロテアーゼによる不活性化

TIMP-2 をそれぞれトリプシン, α -キモトリプシン, 好中球エラスターゼ, カテプシンG, プラスミン, トロンピン, 血漿

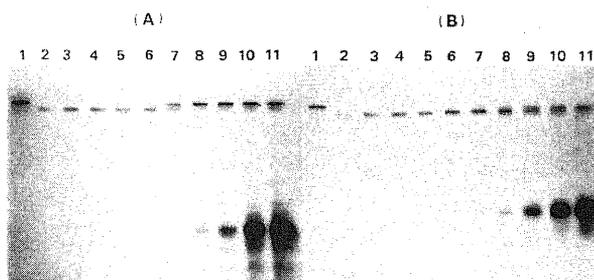


Fig. 8. Effects of TIMP-1 and TIMP-2 on proMMP-2 conversion to active form by APMA. ^{125}I -labeled proMMP-2 (1.4 pM) was incubated with ^{125}I -TIMP-2 (A) or ^{125}I -TIMP-1 (B) for 13 hr at 4°C and then activated with 1.0 mM APMA at 37°C for 1 hr. The samples were subjected to SDS-PAGE (12.5% total acrylamide) under the reducing conditions and the gel was autoradiographed. Lanes 1 and 2, proMMP-2 incubated with APMA for 0 and 1 hr, respectively. Lanes 3-11, proMMP-2 incubated with each TIMP at molar ratios 0.01, 0.02, 0.04, 0.07, 0.14, 0.28, 0.55, 1.07, 2.14, respectively and then activated with APMA.

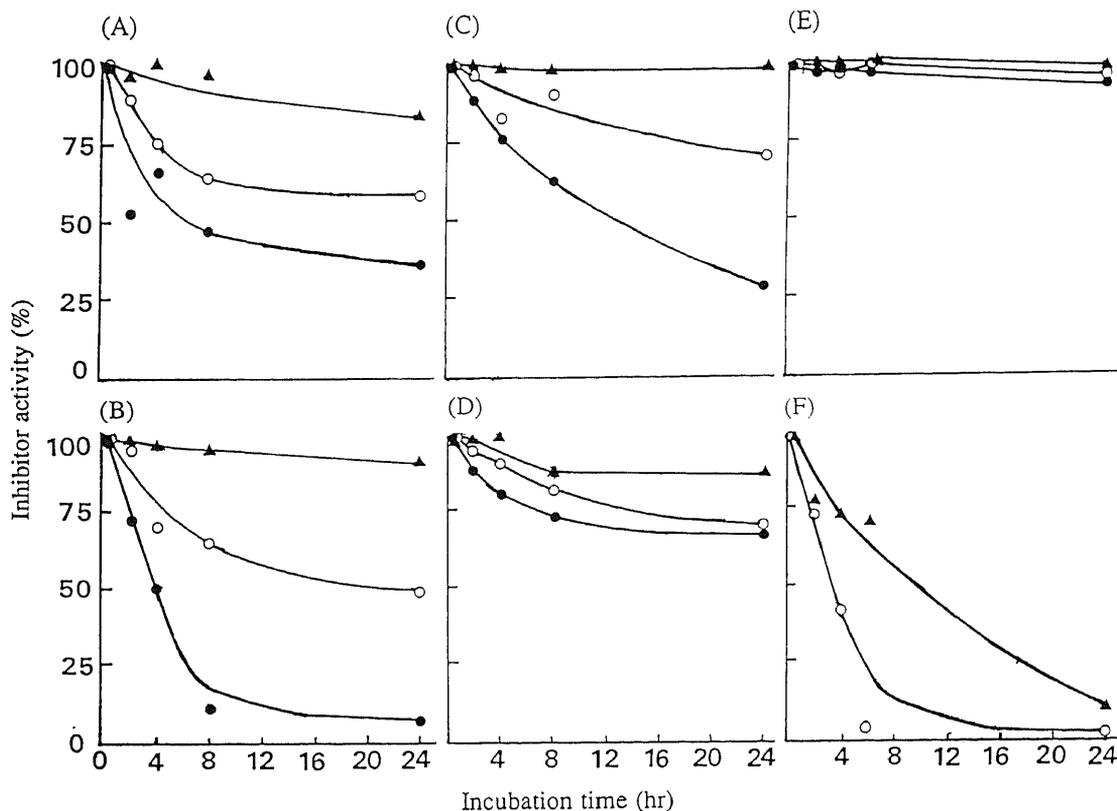


Fig. 9. Inactivation of TIMP-2 inhibitor activity by trypsin (A), α -chymotrypsin (B), leukocyte elastase (C), cathepsin G (D), plasmin (E), kallikrein (F). TIMP-2 (250 ng) was incubated with each serine proteinase at 37°C for 2, 4, 8 and 24 hr, at concentrations of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (▲), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (○) and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (●). TIMP-2 activity against MMP-3 was measured by ^3H -Cm-Tf assay for 1 hr at 37°C after termination of the serineproteinase activity with 2 mM diisopropyl fluorophosphate.

Table 3. Inactivation of TIMPs by active oxygen

TIMP	Inhibitor activity (%)													
	HOCl (mM)					H ₂ O ₂ (mM)								
	0.02	0.025	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5	0.2	0.5	1	2	5
1	100	98	81	35	10	ND	ND	0	ND	100	100	100	100	100
2	100	54	27	0	0	ND	ND	0	ND	100	98	92	81	68

ND, not determined.

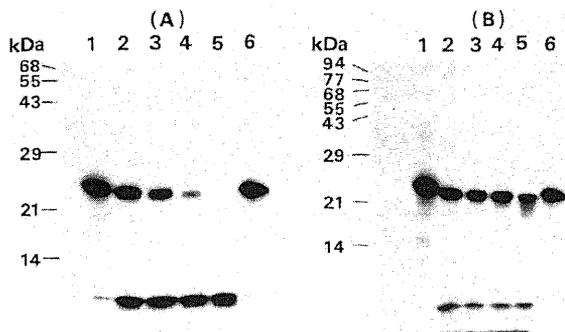


Fig. 10. Degradation of TIMP-2 by leukocyte elastase and cathepsin G. A mixture of unlabeled and ¹²⁵I-labeled TIMP-2 was incubated with leukocyte elastase (50 μg/ml) (A) or cathepsin G (50 μg/ml) (B). The samples were subjected to SDS-PAGE under non-reducing conditions after inactivation of the serine proteinases by diisopropyl fluorophosphate and the gel was autoradiographed. Protein standards are the same as Fig. 2 except lysozyme (14 kDa). Lanes 1 and 6, TIMP-2 incubated without enzyme for 0 and 24 hr; lanes 2-5, TIMP-2 treated with the enzyme for 2, 4, 8 and 24 hr, respectively.

カリクレインと37°Cで2~24時間反応後、これら酵素活性をジイソプロピルフルオロリン酸で失活させ、MMP-3に対するインヒビター活性を測定した。図9の如くTIMP-2のインヒビター活性は、α-キモトリプシンによって著しく低下し、高濃度(50 μg/ml)ではほぼ完全に失活した。また、トリプシン、好中球エラスターゼ、カテプシンGによってもそのインヒビター活性は全体の約30~70%にまで低下した(図9)。さらに血漿カリクレインは(1, 10 μg/ml)でTIMP-2阻害活性を完全に失活させたが、TIMP-1活性は全く影響を受けなかった。プラスミンとトロンビンはTIMP-2のインヒビター活性に影響しなかった。

¹²⁵Iで標識したTIMP-2を7種類のセリンプロテアーゼ(50 μg/ml)で37°C、2~24時間インキュベーションし、その分子量の変化をオートラジオグラフィーで観察した。α-キモトリプシン処理では、TIMP-2分子は非還元状態で分子量21,500, 18,000, 15,300のフラグメントに分解され、これらは還元状態で分子量24,700, 15,800, 15,000の位置に泳動された。これらのフラグメントは、24時間処理にて更に完全に分解され消失した。トリプシンはTIMP-2を非還元状態で20,700と15,400, 還元状態で分子量17,700と13,000のフラグメントに分解した。一方、好中球エラスターゼとカテプシンG処理では、TIMP-2分子は非還元状態で分子量22,500に変換し、切断されたペプチドはゲルのフロントに泳動された(図10)。分子量22,500のフラグメントは好中球エラスターゼで24時間処理すると更に小さいフ

ラグメントに分解されたが、カテプシンGでは24時間後でも残存した。血漿カリクレイン処理ではTIMP-2は非還元、還元とも4時間後に既にペプチドにまで分解された。一方、TIMP-1分子は24時間処理後においても全く変化は認められなかった。プラスミン処理では還元状態でのみ分子量19,000の分解産物が観察された。トロンビンではTIMP-2分子の分解は認められなかった。

2. 活性酸素種による不活性化

TIMP-1とTIMP-2をHOCl(20 μM~2 mM)で37°C、90分間処理し、MMP-3に対するインヒビター活性を測定した。TIMP-2は20 μMでは活性の低下は認めなかったが、25 μMで約50%に低下し、100 μM以上では完全に失活した。一方、TIMP-1は25 μMでは活性にほとんど変化はなく、100 μMで約35%活性を有し、200 μMでも約10%の活性がみられた(表3)。¹²⁵Iで標識したTIMPを用いて分子量の変化を観察すると、インヒビター活性の不活性化に対応してTIMP-1とTIMP-2のバンドの消失が確認された。また、同様の所見は未標識のTIMPを用いたSDS/PAGEでも観察された。TIMP-1とTIMP-2をH₂O₂(0.2 mM~5 mM)で同様に処理して、そのインヒビター活性の変化を測定した。表3のように、TIMP-2は2~5 mMの高濃度で、20~30%の活性低下を示すが、それ以下の濃度では活性の変化は認められなかった。一方、TIMP-1ではH₂O₂による不活性化は測定した範囲内では認められなかった。また、H₂O₂処理によってTIMP-1とTIMP-2の分子量に変化は観察されなかった。

考 察

TIMP-2はこれまでの報告では、牛関節軟骨抽出液²⁸⁾、牛大動脈内皮細胞培養液²⁹⁾、HLE細胞培養液³⁰⁾および慢性関節リウマチ関節液³¹⁾より精製されているが、いずれも高速液体クロマトグラフィーを用いて精製されており、その回収率も0.75~15%と低い。しかし、本研究ではヒト肝癌細胞培養液から通常のカラムクロマトグラフィーにより19%の回収率をもって単一標品として精製することが可能であった。本インヒビターの精製に用いた4種のカラムクロマトグラフィーのうち、特にGreen A Dyematrix ゲルとAcA 44による分画が重要であった。TIMP-2はGreen A Dyematrix ゲルに吸着し、NaClによる溶出過程でTIMP-2と同様の分子量をもつ蛋白が除去され、最終段階のAcA 44ゲル濾過法により容易に精製された。本インヒビターがTIMP-2であることは、その分子量と合成ペプチドを用いたTIMP-2に対する特異的モノクローナル抗体で認識されることから明白である。TIMP-1と同様、TIMP-2は熱や酸処理に対して著しい耐性を示した。TIMP-1は分子中の12個のシステインが6個のジスルフィド結合を形成しており³²⁾、そ

の分子構造が TIMP-1 の熱や酸に対する耐性の理由と考えられている。TIMP-2 の二次構造についてはまだ報告はないが、TIMP-1 と同位置にシステインの配列をもつことと⁷⁾、熱や酸耐性能からみて TIMP-1 と同様のジスルフィド結合が存在すると推定される。実際還元処理でジスルフィド結合を切断するとインヒビター活性が消失することは、そのことを支持している。

MMP-1, 2, 3, 9 に対する TIMP-1 と TIMP-2 の阻害活性については、Ward ら¹⁰⁾ と Howard ら¹¹⁾ が報告している。本研究では、MMP-1 と MMP-3 に対するインヒビター活性は TIMP-1 の方が優れており、両グループの報告にはほぼ一致する。Howard ら¹¹⁾ は MMP-2 と MMP-9 に対して TIMP-2 は TIMP-1 より 7~10 倍阻害活性が強いと報告している。しかし、著者の実験では、TIMP-2 の阻害活性は MMP-9 に対して TIMP-1 の 1.2 倍であるのに対し、MMP-2 に対してはむしろ TIMP-1 の方が 2.5 倍強い活性を示した。このような阻害活性に関する矛盾した結果は、実験に用いた活性型の MMP-2 と MMP-9 の違いに基づくと推定される。MMP-2 と MMP-9 については、分子量の異なるいくつかの活性型酵素の存在が近年報告されている^{17,18,20)}。Howard らの実験¹¹⁾ では、MMP-2 はアミノ末端とカルボキシル末端ドメインの消失した分子量 42,500 の活性型を、また MMP-9 はアミノ末端ドメインのみを欠失した分子量 83,000 の活性型を用いている。一方、本研究においては、アミノ末端ドメインを消失した分子量 67,000 の活性型 MMP-2 とアミノ末端とカルボキシル末端の両ドメインのない分子量 67,000 の MMP-9 を用いている。Ward ら¹⁰⁾ も本実験と同様な活性型を用いており、TIMP による阻害も本研究と類似した結果を示している。従ってこれらのことから、TIMP-2 は MMP-9 に対しては TIMP-1 より優れたインヒビターであるが、MMP-2 に対してはアミノ末端とカルボキシル末端の欠失した特殊な活性型に対してのみ強く作用すると推定される。

TIMP-1 と TIMP-2 の MMP に対するインヒビター活性がアミノ末端ドメインの 3 個のループ構造に存在することは、カルボキシルドメインを欠失したリコンビナント TIMP の実験から既に知られている^{18,25)}。また、カルボキシル末端ドメインを失った分子量 13,500 の TIMP-2 にインヒビター活性があることから、TIMP-2 活性ドメインがアミノ末端ドメインにあることを DeClerck ら²⁶⁾ は示している。しかし、このループ構造のうち活性に直接関与する部位についてはこれまで知られていない。本研究では、TIMP-2 の各ドメインに対する特異的モノクロナール抗体を用いた実験から、アミノ末端ドメインの 3 番目のループ構造が MMP-2 活性阻害に重要であることを実証した。本研究データは、このドメインに対する合成ペプチドやリコンビナント蛋白が有用なインヒビターとして作用する可能性を示唆している。

TIMP-1 と TIMP-2 は、潜在型の MMP-9 と MMP-2 との間にそれぞれ複合体を形成する^{12,13)}。本研究においても、潜在型 MMP-2 は TIMP-2 とのみ結合し、その複合体は活性型 MMP-2 に対してインヒビター活性を有していた。この実験結果は、TIMP-2 の潜在型 MMP-2 との結合部位とインヒビター活性部位が異なることを示している。リコンビナント TIMP-2 を用いた Willenbrock らの実験では¹⁹⁾、カルボキシル末端にある 9 個のアミノ酸残基が潜在型 MMP-2 との結合部位であることが示されている。本研究においても、潜在型 MMP-2-TIMP-2 複合体はカルボキシル末端ドメインに対する特異的モノク

ロナール抗体で認識されなくなることから、カルボキシル末端ドメインが潜在型 MMP-2 との結合部位であると結論される。

潜在型酵素として分泌される MMP の活性化は、これら酵素が生体内で作用するために不可欠のステップである。TIMP-1 と TIMP-2 はこのプロセスに作用し、活性化に伴う潜在型 MMP の低分子化を阻害すると報告されている^{10,11,15)}。Ward ら¹⁰⁾ は潜在型 MMP-2 に対しては TIMP-1 の方が TIMP-2 より強く活性化を阻害すると報告している。しかし、本研究では逆に TIMP-2 の方がその阻害力は強かった。この矛盾した結果の理由については明らかではないが、本実験では活性化に先立ち、潜在型 MMP-2 を TIMP と 4℃ で 13 時間インキュベートしているのに対し、彼らの実験では 25℃、30 分間しか反応していない点異なる。本実験条件では TIMP-2 は潜在型 MMP-2 と完全な複合体を形成することから、複合体形成の有無がこのよう異なる結果を生じると推測される。

Okada ら⁸⁾ は TIMP-1 がトリプシンや好中球エラスターゼなどのセリンプロテアーゼ処理により不活性化されることを報告している。本研究においては、TIMP-2 はトリプシン、 α -キモトリプシン、好中球エラスターゼで著しく不活性化されることが明らかとなった。また、カテプシン G によってもインヒビター活性は約 30% 失活した。これらのセリンプロテアーゼ処理による TIMP-2 分子の変化とインヒビター活性を比較すると、 α -キモトリプシンは TIMP-2 を多段階的にペプチドにまで分解することで完全な失活へと導くことが明らかとなった。一方、トリプシン処理では TIMP-2 分子は 2 つの主要フラグメントに分解され、インヒビター活性は分子量 17,700 (還元状態) のフラグメントの推移と相関した。前述の如くインヒビター活性ドメインはアミノ末端の 3 つのループ構造に存在することから、このフラグメントにアミノ末端ドメインが含まれると推定される。好中球エラスターゼとカテプシン G 処理による TIMP-2 分子の変化はきわめて類似しており、いずれも非還元状態で分子量 24,500 の大きなフラグメントに分解された。そのフラグメントの推移とインヒビター活性が相関することや分子量の低下の程度から考えると、このフラグメントはカルボキシル末端の遊離状となったドメインの切断で出現したと推定される。分子量 24,500 のフラグメントは還元状態ではより小さいいくつかのフラグメントとして泳動されることから、そのフラグメントは複数の切断を受けた TIMP-2 分子がジスルフィド結合で連結したものと考えられる。一方、これらのセリンプロテアーゼとは対照的に、血漿カリクレインは TIMP-2 を完全に不活性化するのにに対し、TIMP-1 インヒビター活性は全く影響を受けなかった。電気泳動上 TIMP-2 分子は短時間で分解消失するのにに対し、TIMP-1 分子に全く変化がみられないことは上記の所見を支持している。カリクレインの TIMP に対する酵素作用の違いは、相互に約 40% の相同性をもつ TIMP-1 と TIMP-2 のアミノ酸配列の相違に基づくと考えられるが、その詳細な機序は不明である。血漿カリクレイン、好中球エラスターゼおよびカテプシン G が TIMP-2 を不活性化することは、生体内における MMP 活性調節の上で重要な意味をもっている。血漿カリクレインはプレカリクレインとして血中に存在し、ハーゲマン因子の作用で活性化される²⁷⁾。実際、活性型カリクレインは慢性調節リウマチなどの炎症局所にみられ、潜在型の MMP-1 や MMP-3 を活性化することが知られている^{19,28)}。また、好中球エラスターゼやカテプシン G は好中球によって産生され、好中球

浸潤を伴う生理的あるいは病的状態で見られる。これらの酵素は潜在型の MMP-3 や MMP-9 を活性化することから¹⁷⁾³⁹⁾, TIMP のインヒビター活性の不活性化と潜在型 MMP の活性化により MMP 活性調節に二重の意味で重要な役割を果たすと考えられる。これらのセリンプロテアーゼに加えて, HOCl が TIMP インヒビター活性を失活させることは注目すべき所見である。HOCl による TIMP 分子への作用機序は不明であるが, HOCl 処理で TIMP 分子が消失することから TIMP 分子の破壊が生じることは明らかである。HOCl は好中球で産生される強力な活性酸素種の 1 つで, 潜在型 MMP-9 と MMP-8 (好中球コラゲナーゼ) を部分的ではあるが活性化することが知られている¹⁷⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾。従って, 炎症の場で発生する HOCl も生体内での MMP 活性の調節に重要な役割を果たすと考えられる。

結 論

ヒト肝癌細胞 (HLE 細胞) 株培養液より TIMP-2 を単離精製し, その生化学的性質と潜在型 MMP-2 の活性化に対する影響および不活性化機構について調べ, TIMP-1 のそれと比較・検討し以下の結果を得た。

1. TIMP-2 は 4 種のカラムクロマトグラフィーによって精製され電気泳動上, 非還元および還元状態でそれぞれ分子量 23,000 と 25,000 の単一な蛋白バンドとして泳動された。また, その回収率は 19% であった。

2. TIMP-1 および TIMP-2 のインヒビター活性は熱 (100°C, 15 分間) や酸 (pH 1.7, 30 分間) 処理では安定であったが, 2-メルカプトエタノールによる還元処理で著しく失活した。

3. MMP-1 (分子量 43,000), MMP-2 (分子量 67,000), MMP-3 (分子量 45,000), MMP-9 (分子量 67,000) に対する TIMP-1 と TIMP-2 の阻害活性は, MMP-1, MMP-2, MMP-3 に対しては TIMP-1 の方が TIMP-2 よりそれぞれ 7.8 倍, 2.5 倍, 6.4 倍強く阻害した。一方, MMP-9 に対しては TIMP-2 の方が 1.2 倍強い阻害活性を示した。

4. TIMP-2 は潜在型 MMP-2 と結合し, その複合体は活性型 MMP-2 に対してインヒビター活性を有していた。また, TIMP-2 は APMA 処理による潜在型 MMP-2 の活性化に伴う低分子化を TIMP-1 より 7.6 倍強く阻害した。

5. TIMP-2 の各ドメインに対する特異的モノクローナル抗体を用いた実験から, 潜在型 MMP-2-TIMP-2 複合体形成には TIMP-2 のカルボキシル末端ドメインが関与し, アミノ末端ドメインの 3 番目のループが MMP-2 活性の阻害中心であることが推定された。

6. TIMP-1, TIMP-2 のインヒビター活性はトリプシン, α -キモトリプシン, 好中球エラスターゼ, カテプシン G で不活性化されたが, 血漿カリクレインは TIMP-2 のみを特異的に不活性化し, また, プラスミン, トロンビンにはそのような作用はみられなかった。これら酵素によって不活性化された TIMP-2 分子は低分子量のフラグメントに分解された。活性酸素種の 1 つである HOCl は TIMP-1 と TIMP-2 を不活性化したが, H_2O_2 は TIMP-2 のみを部分的に不活性化し, これら活性酸素種の作用は TIMP-2 の方が TIMP-1 より強くうけると考えられた。

以上の結果は, TIMP-2 が酵素活性の阻害と潜在型酵素の活性化の阻害の両面から MMP-2 の活性調節に重要な役割を果た

すことを示している。また病的状態では TIMP による MMP の活性調節は病変部に浸潤した多核白血球や血清に由来するセリンプロテアーゼや活性酸素種によって修飾されることを示唆している。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を直接御指導, 御教授戴きました金沢大学医療技術短期大学部岡田保典助教授に深く感謝の意を表します。さらに, 本稿の御校閲を賜りました金沢大学医学部第一病理学講座中西功夫教授, ならびに本研究に御協力頂きました第一病理学教室教室員の方々に心より感謝いたします。また, モノクローナル抗体の作製とサンドイッチイムノアッセイ法による測定に御協力戴きました富士薬品工業岩田和士博士に厚く感謝致します。

なお, 本論文の要旨は第 8 回日本整形外科学会基礎学術集会において発表した。

文 献

- 1) Liotta, L. A.: Tumor invasion and metastasis-role of the extracellular matrix. *Cancer Res.*, **46**, 1-7 (1986).
- 2) Woessner, J. F. Jr.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, **5**, 2145-2154 (1991).
- 3) 岡田保典: RA 関節組織破壊における中性プロテアーゼの役割. *医学のあゆみ*, **161**, 597-602 (1992).
- 4) Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G. I., Bodden, M. K., Windson, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. & Engler, J. A.: Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **4**, 197-250 (1993).
- 5) Pavloff, N., Staskus, P. W., Kishnani, N. S. & Hawkes, S. P.: A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: chIMP-3. A third member of the TIMP family. *J. Biol. Chem.*, **267**, 17321-17326 (1992).
- 6) Docherty, A. J. P., Lyons, A., Smith, B. J., Wright, E. M., Stephen, P. E., Harris, T. J. R., Murphy, G. & Reynolds, J. J.: Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*, **318**, 66-69 (1985).
- 7) Stetler-Stevenson, W. G., Krutzsch, H. C. & Liotta, L. A.: Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2). A new member of the metalloproteinases inhibitor family. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17374-17378 (1989).
- 8) Okada, Y., Watanabe, S., Nakanishi, I., Kishi, J., Hayakawa, T., Watorek, W., Travis, J. & Nagase, H.: Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. *FEBS Lett.*, **229**, 157-160 (1988).
- 9) Fridman, R., Bird, R. E., Hoyhtya, M., Delkuct, M., Komarek, D., Liang, C-M., Berman, M. L., Liotta, L. A., Stetler-Stevenson, W. G. & Fuerst, T. R.: Expression of human recombinant 72kDa gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2): characterization of complex and free enzyme. *Biochem. J.*, **289**, 411-416 (1993).
- 10) Ward, R. V., Hembry, R. M., Reynolds, J. J. & Murphy, G.: The purification of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 from its 72kDa progelatinase complex.

Biochem. J., 278, 179-187 (1991).

11) Howard, E. W., Bullen, E. C. & Banda, M. J.: Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. J. Biol. Chem., 266, 13070-13075 (1991).

12) Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A. & Goldberg, G. I.: 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).

13) Goldberg, G. I., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z., Wilhelm, S. & He, C.: Human 72-kilodalton type IV collagenases forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, 8207-8211 (1989).

14) Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K. & Hayakawa, T.: Matrix metalloproteinase 9 (92kDa gelatinase/Type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. J. Biol. Chem., 267, 21712-21719 (1992).

15) DeClerck, Y. A., Yean, T. D., Lu, H. S., Ting, J. & Langley, K. E.: Inhibitor of autoproteolytic activation of interstitial procollagenase by recombinant metalloproteinase inhibitor MI/TIMP-2. J. Biol. Chem., 266, 3893-3899 (1991).

16) Willenbrock, F., Crabbe, T., Slocombe, P. M., Sutton, C. W., Decherty, A. J. P., Cockett, M. I., O'shea, M., Brodskelhurst, K., Phillips, I. R. & Murphy, G.: The activity of the tissue inhibitors of metalloproteinases is regulated by C-terminal domain interactions: A kinetic analysis of the inhibitor of gelatinase A. Biochemistry, 32, 4330-4337 (1993).

17) Okada, Y., Morodomi, T., Enghild, J. J., Suzuki, K., Yasui, A., Nakanishi, I., Salvesen, G. & Nagase, H.: Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts purification and activation of the precursor and enzymic properties. Eur. J. Biochem., 194, 721-730 (1990).

18) Okada, Y., Harris, E. D. Jr. & Nagase, H.: The precursor of a metalloendopeptidase from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and mechanisms of activation by endopeptidases and 4-aminophenylmercuric acetate. Biochem. J., 254, 731-741 (1988).

19) Kodama, S., Kishi, J., Obata, K., Iwata, K. & Hayakawa, T.: Monoclonal antibodies to bovine collagenase inhibitor. Collagen Rel. Res., 7, 341-350 (1987).

20) Fujimoto, N., Zhang, J., Iwata, K., Shinya, T., Okada, Y. & Hayakawa, T.: A one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 using monoclonal antibodies. Clin. Chim. Acta, 220, 31-45 (1993).

21) Gisslow, M. T. & McBride, B. C.: A rapid sensitive collagenase assay. Anal. Biochem., 68, 70-78 (1975).

22) Cawston, T. E. & Barrett, A. J.: A rapid and reproducible assay for collagenase using [14 C] acetylated collagen. Anal. Biochem., 99, 340-345 (1979).

23) Harris, E. D. Jr. & Krane, S. M.: An endopeptidase

from rheumatoid synovial tissue culture. Biochem. Biophys. Acta, 258, 566-576 (1972).

24) Okada, Y., Nagase, H. & Harris, E. D. Jr.: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. J. Biol. Chem., 261, 14245-14255 (1986).

25) Fraker, P. J. & Speck, J. C. Jr.: Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, 849-857 (1978).

26) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685 (1970).

27) Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P. & Hancock, R.: Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 118, 197-203 (1981).

28) Murray, J. B., Allison, K., Sudhalter, J. & Langer, R.: Purification and partial amino acid sequence of a bovine cartilage derived collagenase inhibitor. J. Biol. Chem., 261, 4154-4159 (1986).

29) DeClerck, Y. A., Yean, T. D., Ratzkin, B. J., Lu, H. S. & Langley, K. E.: Purification and characterization of two related distinct metalloproteinases inhibitors secreted by bovine endothelial cells. J. Biol. Chem., 264, 17445-17453 (1989).

30) Umenishi, F., Umeda, M. & Miyazaki, K.: Efficient purification of TIMP-2 from culture medium conditioned by human hepatoma cell line, and its inhibitory effects on metalloproteinases and in vitro tumor invasion. J. Biochem., 110, 189-195 (1991).

31) Osthuus, A., Knauper, V., Oberhoff, R., Reinke, H. & Tschesche, H.: Isolation and characterization of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) from human rheumatoid synovial fluid. FEBS Lett., 296, 16-20 (1992).

32) Williamson, R. A., Marston, F. A. O., Angal, S., Koklitis, P., Panico, M., Morris, H. R., Carne, A. F., Smith, B. J., Harris, T. J. R. & Freedman, R. B.: Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). Biochem. J., 268, 267-274 (1990).

33) Howard, E. W., Bullen, E. C. & Banda, M. J.: Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. J. Biol. Chem., 266, 13064-13069 (1991).

34) Fridman, R., Fuerst, T. R., Bird, R. E., Hoyhtya, M., Oelkuct, M., Kraus, S., Komarek, D., Liotta, L. A., Berman, M. L. & Stetler-Stevenson, W. G.: Domain structure of human 72kDa gelatinase/type IV collagenase. characterization of proteolytic activity and identification of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding regions. J. Biol. Chem., 267, 15398-15405 (1992).

35) Murphy, G., Houbrechts, A., Cockett, M. I., Williamson, R. A., O'shea, M. & Docherty, A. J. P.: The

N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry*, **30**, 8097-8102 (1991).

36) DeClerck, Y. A., Yean, T. D., Lee, Y., Tomich, J. M. & Langley, K. E.: Characterization of the functional domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2). *Biochem. J.*, **289**, 65-69 (1993).

37) Kozin, F. & Cochrane, C. G.: The contact activation system of plasma. In J. I. Gallin, I. M. Goldstein & R. Snyderman (eds.), *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2nd ed., p103-121, Raven Press, New York, 1992.

38) Nagase, H., Cawston, T. E., Silva, M. & Barrett, A. J.: Identification of plasma kallikrein as an activator of

latent collagenase in rheumatoid synovial fluid. *Biochim. Biophys. Acta*, **702**, 133-142 (1982).

39) Okada, Y. & Nakanishi, I.: Activation of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and matrix metalloproteinase 2 (gelatinase) by human neutrophil elastase and cathepsin G. *FEBS Lett.*, **249**, 353-356 (1989).

40) Peppin, G. J. & Weiss, S. J.: Activation of the endogenous metalloproteinase gelatinase by triggered human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 4322-4326 (1986).

41) Weiss, S. J., Peppin, G., Ortiz, X., Ragsdale, C. & Test, S. T.: Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science*, **227**, 747-749 (1985).

Characterization of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2 (TIMP-2) from Human Hepatoma Cell Line (HLE Cells) and its Interaction with Gelatinase A and Inactivation Kouji Kawamura, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **103**, 690—700 (1994)

Key words matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of metalloproteinases, inhibition of enzymic activities, inhibitor, inactivation

Abstract

The activities of matrix metalloproteinases (MMPs) are strictly regulated by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs), which comprise three different molecules, i.e. TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3. In the present study, TIMP-2 was purified and its inhibitor activity to MMP-1 (interstitial collagenase), MMP-2 (72 kDa gelatinase, gelatinase A), MMP-3 (stromelysin-1) and MMP-9 (92 kDa gelatinase, gelatinase B), the interaction with MMP-2 and inactivation by serine proteinases and active oxygen metabolites were examined in comparison with the data obtained with TIMP-1. TIMP-2 purified by the four chromatographic steps from the culture medium of a human hepatoma cell line (HLE cells) showed a single band of Mr 25,000 on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions. Like TIMP-1, activity of TIMP-2 was completely resistant to treatment with heat at 90°C for 30 min or acid at pH 1.7 for 30 min, but inactivated by reduction with 2-mercaptoethanol. TIMP-1 inhibited the activities of MMP-1 of Mr 42,000, MMP-2 of Mr 67,000 and MMP-3 of Mr 45,000 2.5- to 7.8-fold more preferentially than TIMP-2, whereas inhibition of MMP-9 of Mr 67,000 by TIMP-2 was 1.2-fold more efficient. TIMP-2 but not TIMP-1 could make a complex with the zymogen of MMP-2 (proMMP-2). TIMP-2 in the complex form functioned as an inhibitor to MMP-2 and suppressed the conversion of proMMP-2 during activation by p-aminophenylmercuric acetate 7.6-fold more effectively than TIMP-1. Experiments using three different monoclonal antibodies specific to the first and third loops of the NH₂-terminal domain and COOH-terminal domain of TIMP-2 (clones 68-6H4, 69-10B11 and 67-4H11, respectively) suggested that TIMP-2 binds to proMMP-2 via the COOH-terminal domain and the third loop of the NH₂-terminal domain is essential to the inhibition of MMP-2 activity. Inhibitor activity of TIMP-2 was significantly inactivated by trypsin (50 μg/ml), α-chymotrypsin (50 μg/ml) and leukocyte elastase (50 μg/ml) and partially by cathepsin G (50 μg/ml), while it was resistant to plasmin or thrombin. During incubation with trypsin, α-chymotrypsin, leukocyte elastase or cathepsin G TIMP-2 molecule was digested into small fragments. These data are similar to those reported with TIMP-1. On the other hand, plasma kallikrein (1 and 10 μg/ml), which had no effects on TIMP-1, completely inactivated TIMP-2 and digested it into small peptides. TIMP-2 was also completely inactivated by HOCl (0.1 mM) and partially by H₂O₂ (0.2 to 5 mM). Compared with TIMP-1 which was affected only by HOCl, TIMP-2 appeared to be more susceptible to these active oxygen metabolites. These results indicate that TIMP-2 plays a key role in the regulation of MMP-2 activity through inhibition of both activity and proMMP-2 activation, and suggest that inhibition of the activities of MMPs by TIMPs in vivo is modified through their inactivation by serine proteinases and active oxygen metabolites present at the local tissues under pathological conditions.