Characterization and Activation Mechanisms of Matrix Metalloproteinase 9 (92 kDa Gelatinase/Type Ⅳ Collagenase) from Human Fibrosarcoma (HT 1080) Cells

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/2297/8355

金沢大学十全医学会雑誌　第100巻　第5号　933－947（1991）

ヒト線維肉腫（HT 1080）細胞由来 matrix metalloproteinase 9（92KDa ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ）の性質と活性化機構

金沢大学医学部整形外科学講座（主任：富田勝郎教授）
五之治　行　雄

（平成3年9月13日受付）

Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) の性質と活性化機構を解明するために，腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor α, TNF α; 100 units/ml) で処理したヒト線維肉腫 (HT 1080) 細胞培養液より5つのカラムクロマトグラフィーによって潜在型 MMP-9 を精製した．精製された潜在型 MMP-9 は sodium dodecyl sulfate (SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上還元状態で分子量92,000の単一なバンドとして観察された．MMP-9 の活性は etylendiamine tetraacetic acid (EDTA)，1, 10-フェナンスロリン及び組織由来メタロプロティナーゼインヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP) により阻害されたが，セリンプロティナーゼ，システインプロティナーゼ，アスパラギン酸プロティナーゼに対する阻害剤では阻害されなかった．MMP-9 は37°CでI型ゼラチンに対し著しい分解活性 (12,700 μg/分/mg 酵素蛋白) を示した．また，27°CにおいてI型コラーゲンの α 2鎖を特異的に分解するほか，32°CにおいてIV型，V型コラーゲンを，25°CにおいてIII型コラーゲンを分解した．潜在型 MMP-9 は 1.0mM p-aminophenylmercuric acetate (APMA) で37°C，24時間反応させることにより最大に活性化され，その後活性は徐々に低下した．活性化に伴い，潜在型 MMP-9 は分子量83,000の中間型を経て，67,000の活性型に低分子化した．N末端アミノ酸配列とモノクローナル抗体を用いたイムノブロット法のデータから，活性型 MMP-9 は潜在型酵素のN末端とC末端ペプチドの除去により出現することが明かとなった．TIMP を結合させた潜在型 MMP-9 を APMA で活性化すると，中間型 MMP-9 (分子量83,000) から活性型酵素 (分子量67,000) への移行が阻害された．このことから TIMP は MMP-9 活性を不活化するのみならず，活性化自体の阻害により MMP-9 活性調節に二重の役割を果たしていることが明かとなった．カテプシンG，トリプシン，α-キモトリプシンも潜在型 MMP-9 を活性化したが，好中球エラスターゼ，プラスミン，トロンビン，プラズマカリクレインでは活性化されなかった．また，活性酸素種の1つである HOCl により分子量83,000の中間型 MMP-9 が活性化された．これらの結果から，MMP-9 は好中球由来の蛋白分解酵素や活性酸素などにより活性化され，生体内の種々の細胞外マトリックス分解に重要な役割を果たすことが示唆された．

Key words metalloproteinase, characterization, activation, active oxygen, tissue inhibitor of metalloproteinases

金属依存性蛋白分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) は生体内の種々の細胞外マトリックス分解能を有し，炎症性疾患や悪性腫瘍の浸潤・転移に伴う細胞外マトリックスの分解に関与することが知られている．MMPs は現在までに10種類が報告されており，いくつかの共通した特性とそのアミノ

Abbreviations: APMA, p-aminophenylmercuric acetate; DIFP, di-isopropyl fluorophosphate; EDTA, etylendiamine tetraacetic acid; MMP, matrix metalloproteinase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PMSF, phenylmethan sulfonyl fluoride; RPMI 1640,

酸配列における相同性から一種の遺伝子ファミリーと考えられている[1,2]．これらは基質特異性から間質性コラゲナーゼ，ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼおよびストロムライシンの3つのサブクラスに分けられている．これらのうちゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼにはMMP-2 (72kDa ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ)とMMP-9 (92kDa ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ)が区別されている．

MMP-9は好中球[3,5]やマクロファージ[6]などの炎症細胞や軟骨細胞[5]及び腫瘍細胞[7-13]によって分泌されるのに対し，MMP-2も線維芽細胞[14]，骨芽細胞[15,16]及び腫瘍[7,9,12,17,18]によって合成，分泌されることが知られている．しかし，腫瘍細胞においては高転移性細胞株のみにMMP-9が発現されることから，MMP-9が癌細胞の浸潤・転移に特に重要と考えられている[7,9]．また，MMP-9は12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate, epidermal growth factor, interleukin-1β，腫瘍壊死因子α (tumor necrosis factor α，TNF α)などの腫瘍プロモーター，増殖因子およびサイトカインで発現されるのに対し[10,12]，MMP-2の分泌量はこれらの因子で全く影響を受けないことが知られている[10,14]．このことは両者が少なくともその発現においてはきわめて異なることを示しており，生化学的性質や活性化機構についても相違点が存在する可能性が考えられる．最近，Okadaら[14]はMMP-2を精製しその性質と活性化機構を詳細に報告した．しかし，MMP-9に関しては好中球[3,4]やラット腫瘍細胞[13]より精製した報告はみられるが，ヒト腫瘍細胞由来の酵素を単一標品に精製した報告はない．また，潜在型MMP-9の性質や活性化機構についてはなお不明な点が多く，MMP-2との比較検討は全く行われていない．

本研究においてはヒト線維肉腫 (HT 1080) 細胞株より潜在型MMP-9を単一標品に精製し，その性質と活性化機構の解明を試みた．

材料および方法

I．実験材料

アクリルアミド，ジチオスレイトール，エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム (ethylendiamine tetra-acetic acid, EDTA)，ヨードアセトアミド，次亜塩素酸ナトリウム (sodium hypochlorite solution, NaOCl) 及びドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) は和光純薬より購入した．P－アミノフェニル酢酸第二水銀 (p-aminophenylmercuric acetate, APMA)，1，10－フェナンスロリン，ジイソプロピルフルオロリン酸，ジメチルスルフォキシド，N－エチルマレイミド，β－メルカプトエタノール，ペプスタチンA，フェニルメタンスルホニルフルオリド，プラスミノーゲン，好中球エラスターゼ，カテプシンG，トリプシン (TPCK処理)，α－キモトリプシン，トロンビン，プラズマカリクレイン，クーマシーブリリアントブルー R 250はSigma社 (St. Lous, U. S. A.) より購入した．Roswell Park Memorial Institute Media 1640 (RPMI 1640) 培地は日水製薬 (Tokyo)，ラクトアルブミン (水解物) はGibco社 (New York, U. S. A.) より購入した．YM-10 メンブラン，限外濾過装置とGreen A Dyematrex ゲルはアミコン社製 (Danvers, U. S. A.) を用いた．また，Sephadex G-10，ゼラチンセファロース，ウルトラゲル AcA 44はPharamacia社 (Uppsala, Sweden)，DEAE-セルロースはWhatman社 (Maidstone, England)，Affi-gel 10はBio-Rad社 (Richmond, U. S. A.)，さらに^{14}C-無水酢酸，^{125}Iおよびオーロダイは Amersham Japan社 (Tokyo) より購入した．

ラミニンとEngelbreth-Horm-Swarm (EHS) 肉腫由来IV型コラーゲンは丹沢和比古博士 (三共株式会社，発酵研究所) より，VI型コラーゲンはRupert Timpl博士 (MaxPlanck-Institut fur Biochemie, Germany) より，またヒト胎盤由来III型，V型コラーゲンは源利成博士 (本学がん研究所，外科) より提供を受けた．また，慢性関節リューマチ滑膜細胞由来の組織由来メタロプロティナーゼインヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP) とTIMPに対するモノクローナル抗体[19]は愛知学院大学歯学部早川太郎教授より，ヒト血清由来フィブロネクチンは本学第一病理学教室河原栄博士より恵与された．TNF αは大日本製薬株式会社 (Suita) より供与された．潜在型MMP-9のN末端部とC末端部をそれぞれ特異的に認識するモノクローナル抗体 57-13D8と56-2A4は金沢大学医療技術短期大学部岡田保典助教授より提供を受けた．また，これらのモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素抗体法[20]による潜在型MMP-9の測定は富士薬品工業岩田和士博士の協力を得て行った．

II．HT 1080 細胞培養液の調整

HT 1080細胞を15%牛胎児血清 (Gibco Lab.) を含む

Roswell Park Memorial Institute Media 1640; SDS, sodium dodecyl sulfate; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; TNF α, tumor necrosis factor α

RPMI 1640 培養液中で培養した．培養細胞がコンフルエントに達する直前に培養液を捨てハンクス液で3回洗浄した．次いで Okada ら[12]の方法に従い，0.2%ラクトアルブミンを含む無血清 RPMI 1640 培養液に換え 100 units/ml の TNF α を添加した．TNF α 添加7日後の培養液を回収し，−20°Cで冷凍保存し潜在型 MMP-9 の精製材料とした．

Ⅲ．酵素活性の測定

精製過程においては各カラムクロマトグラフィー分画中のゼラチン分解活性をゼラチンサブストレートゲル法で検討した．さらに，TIMP の濃度をサンドイッチ酵素抗体法[20]で測定した．また，精製した MMP-9 についてはコラゲナーゼ活性，ゼラチナーゼ活性，トランスフェリン分解活性及びプロテオグリカン分解活性を測定した．コラゲナーゼ活性とゼラチナーゼ活性はそれぞれ Cawston ら[21]と Harris ら[22]の方法に従ってアッセイした．これらのアッセイではモルモット皮膚由来のⅠ型コラーゲンを，Gisslow ら[23]の方法により ^{14}C-無水酢酸で標識したコラーゲンとその熱変性 (60°C，30分処理) したゼラチンを基質として用いた．また，トランスフェリン分解活性は Okada ら[24]の方法に従いヒトトランスフェリンを ^{3}H-ヨード酢酸で標識した ^{3}H-カルボキシメチル化トランスフェリンを基質としてアッセイした．さらにプロテオグリカン分解活性は Nagase ら[25]の方法に従ってアッセイした．これらの分解活性は潜在型 MMP-9 を 1.0mM APMA で 37°C，24時間活性化後に測定した．

Ⅳ．潜在型 MMP-9 と TIMP のヨウ素化

精製した潜在型 MMP-9 と TIMP を Fraker ら[26]の方法に従って ^{125}I と結合させた．ラベル後未結合の ^{125}I を Okada ら[24]の方法に従い“スピンカラム”を用いて除去した．

Ⅴ．SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE) 法とゼラチンサブストレートゲル法

試料を1%β−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 Laemmli ら[27]の方法に従って電気泳動した．泳動後ゲルをクーマシーブリリアントブルーあるいは銀染色を施し観察した．また，ゼラチンサブストレートゲル法は Hibbs ら[3]の方法に従い行った．即ち，ゼラチン (0.2mg/ml) を含むポリアクリルアミドゲル (8，9%アクリルアミド) に試料を非還元状態で4°Cで電気泳動し，SDS を緩衝液 (50mM Tris-HCl，pH 7.5/10mM $CaCl_2$/2.5% Triton X/0.02% NaN_3) で洗浄，除去後37°Cで反応した．次いで，ゲルをクーマシーブルー染色してゼラチン分解パターンを調べた．また，活性化に伴う潜在型 MMP-9 分子の変化を調べる目的で，クーマシーブルー染色したゲルあるいはそのオートラジオグラフィー後のフィルムをデンシトメトリーにより検討した．

Ⅵ．N末端アミノ酸配列の同定

潜在型と活性型 MMP-9 のN末端アミノ酸配列は 6600 ProSequencer (MilliGen/Biosearch，Burlington，U. S. A.) を用いて決定した．活性型 MMP-9 (分子量 67,000) は潜在型酵素を 1.0mM APMA (37°C，18時間) で活性化し，ウルトラゲル AcA 44 カラムクロマトグラフィーにより分離・精製した．潜在型と活性型酵素を 20mM EDTA で処理し，10mM triethylamine acetate 緩衝液，pH 7.0で透析後に遠心濃縮した試料を分析した．

Ⅶ．基質特異性の検討

精製された潜在型 MMP-9 を 1.0mM APMA (37°C，24時間) で活性化し27°CでⅠ型，Ⅱ型コラーゲン，25°CでⅢ型コラーゲンに作用させてその分解産物を SDS-PAGE にて分析した．Ⅳ型コラーゲン，Ⅴ型コラーゲンについては32°Cで，Ⅵ型コラーゲン，ラミニン及びフィブロネクチンについては37°Cで作用させ同様の方法で分析した．

Ⅷ．潜在型 MMP-9 の精製

精製はすべて4°Cで行った．潜在型 MMP-9 精製の最初の3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．

第1段階：HT 1080 細胞培養液 (500ml) を YM-10 メンブレンを装着したアミコン限外濾過装置で 50ml (10倍) に濃縮した．この濃縮した培養液からグルコースアミノグリカンを除去する目的で，緩衝液 (50mM Tris-HCl，pH 8.0/0.15M NaCl/5 mM $CaCl_2$/0.02% NaN_3) で平衡化した DEAE セルロースカラム (2.5×8 cm) にかけた．このカラムクロマトグラフィーにより潜在型 MMP-9 は素通り分画中に回収され，サンドイッチ酵素抗体法による潜在型 MMP-9 の回収率は88%であった．

第2段階：DEAE セルロースカラム素通り分画を緩衝液 (50mM Tris-HCl，pH 7.5/0.15M NaCl/10mM $CaCl_2$/0.02% NaN_3) で平衡化した Green A Dyematrex ゲルカラムクロマトグラフィー (2.5×8 cm) にかけた．ほとんどの蛋白はこのカラムに結合しないが，潜在型の MMP-9，MMP-2，MMP-1 (コラゲナーゼ) および TIMP は吸着した (図1)．カラムを同緩衝液で洗浄後，0.3M NaCl と 2 M NaCl を含む緩衝液 (50mM Tris-HCl，pH 7.5/10mM $CaCl_2$/0.05% Brij35/0.02%

NaN_3) により順次酵素を溶出した．潜在型 MMP-9 と TIMP の大部分は 0.3M NaCl で溶出された (図1)．(潜在型 MMP-9 の回収率75%)

第3段階：Green A Dyematrex ゲルカラムクロマトグラフィーの 0.3M NaCl 溶出画分を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 8.0/0.6M NaCl/ 5 mM $CaCl_2$/0.05% Brij35/0.02% NaN_3) で平衡化したゼラチンセファロースカラム (1×8 cm) にかけた．潜在型 MMP-9 と少量の潜在型 MMP-1, 2 が吸着され，5%ジメチルスルフォキシドで溶出された．潜在型 MMP-9 の回収率は59%であった．ゼラチンサブストレートゲル上分子量72,000の潜在型 MMP-2 は MMP-9 より遅れて溶出され，両者を分離することは可能であった．

第4段階：ゼラチンセファロースカラムで得られた試料を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15M NaCl/10mM $CaCl_2$/0.05% Brij35/0.02% NaN_3) で透析後，抗 (MMP-1) IgG セファロースカラムにかけた．潜在型 MMP-1 はこのカラムに吸着され，潜在型 MMP-9 は素通り分画中に回収された．(回収率58%)

第5段階：抗 (MMP-1) IgG セファロースカラムの素通り分画に回収された潜在型 MMP-9 は TIMP と結合した状態で存在していた (図2)．この試料を緩衝液 (30mM Tris-HCl, pH 7.5/0.2M NaCl/ 5 mM $CaCl_2$) で平衡化した抗 (TIMP) IgG セファロースカラムにかけると，潜在型 MMP-9 は素通り分画中に回収され TIMP は完全に除去された (回収率36%)．精製された潜在型 MMP-9 は SDS-PAGE 後銀染色すると，単一の蛋白バンドからなることが確認された (図2)．この

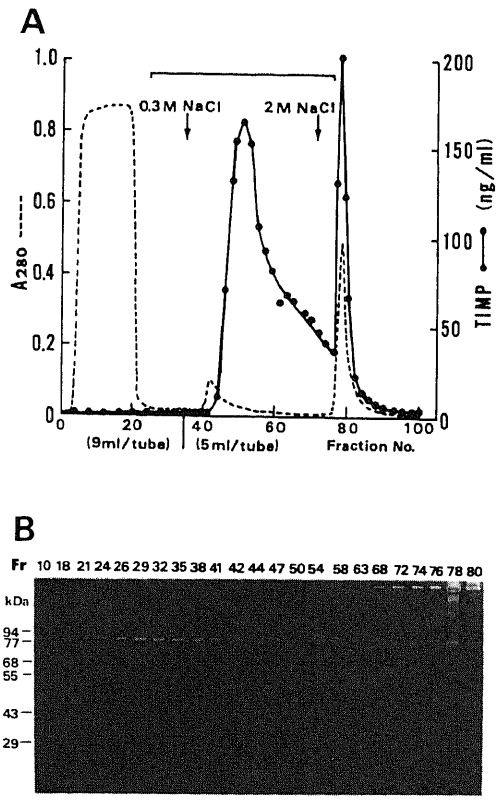

Fig. 1. Green A Dyematrex gel chromatography and SDS-gelatin substrate gel electrophoresis of the column fractions. (A) The unbound fractions obtained from DEAE-cellulose column (157ml) were applied to a column of Green A Dyematrex gel chromatography (2.5×8cm). As the majority of proMMP-9 together with TIMP was eluted with 0.3M NaCl, the fractions indicated were combined for further purification. The distribution of A_{280} (···) and TIMP (●) is shown. (B) The samples from Green A Dyematrex gel column fractions (40 μl each) were run on a SDS-gelatin substrate gel (8% total acrylamide) under the unreducing conditions. The gel was incubated in 50mM Tris-HCl, pH 7.5/10mM $CaCl_2$/1.0% Triton X/0.02% NaN_3 for 6hr at 37°C after removal of SDS and stained with Coomassie Brilliant Blue R250.

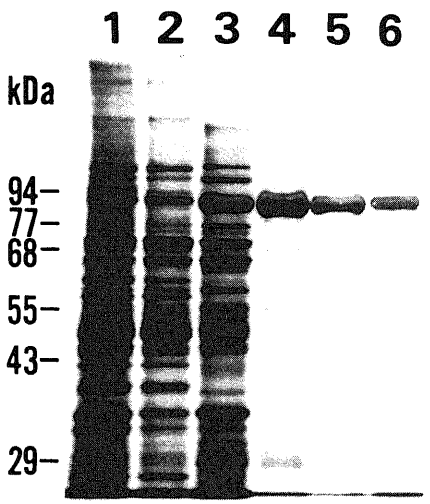

Fig. 2. SDS-PAGE of the samples from each purification step. The samples were subjected to SDS-PAGE (9% total acrylamide) under the reducing conditions and the gel was stained with silver nitrate. Lanes: 1, concentrated culture medium from HT 1080 cells (10 μl); 2-6, DEAE-cellulose (18 μl), concentrated Green A Dyematrex gel (10 μl), Gelatin-Sepharose (20 μl), Anti (MMP-1) IgG-Sepharose (20 μl), and Anti (TIMP) IgG-Sepharose column chromatography (30 μl), respectively.

試料を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 7.5/0.2M NaCl/10mM $CaCl_2$/0.05% Brij35/0.02% NaN_3) に溶解した状態で保存し，本酵素の性質と活性化機構の実験に用いた．

成　　績

I．潜在型 MMP-9 の精製

ヒト線維肉腫細胞由来潜在型 MMP-9 は5つのカラムクロマトグラフィーにより精製された．各精製ステップにおける分子量の推移を図2に示す．ゼラチンセファロースカラム溶出分画中に少量混在していた潜在型 MMP-1 活性は抗 (MMP-1) IgG セファロースカラムにより除去された．さらに最終ステップの抗 (TIMP) IgG セファロースカラムは潜在型 MMP-9 と結合している分子量28,000の TIMP の除去に必須であった．

精製された潜在型 MMP-9 は SDS-PAGE 上単一なバンドとして泳動され，非還元及び還元状態でそれぞれ分子量は89,000と92,000であった．抗 (MMP-1) IgG セファロースカラムにより得られた TIMP 結合型の潜在型 MMP-9 は電気泳動上，非還元状態では分子量250,000, 125,000, 89,000および26,500のバンドとしてみられたが，還元状態では分子量92,000と28,000の2本のバンドのみが観察された．最終的な回収率は培養液中の MMP-9 蛋白を100%とすると36%であった．

II．MMP-9 の安定性

潜在型 MMP-9 を未処理あるいは 1.0mM APMA で37°C, 24時間インキュベートにより活性化し，緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 7.5/0.2M NaCl/10mM $CaCl_2$/0.05% Brij35/0.02% NaN_3) に溶解した状態で4°Cで14週間まで保存した．その結果，潜在型 MMP-9 の自然活性化率は14週でも5%以内であり，活性型 MMP-9 は14週においても活性の低下は認められなかった．また，SDS-PAGE 上潜在型及び活性型 MMP-9 の分子量に著変はみられなかった．一方，緩衝液中に Brij35 が含まれていない場合には，4週で潜在型 MMP-9 (分子量92,000) のほかに分子量83,000のバンドの出現がみられ，自然活性化率は8週で12～15%を示した．また，活性型 MMP-9 の活性も12週で61%に低下した．

III．各種阻害剤の影響

潜在型 MMP-9 を 1.0mM APMA で37°C, 24時間活性化後，各種阻害剤の存在下で37°C, 1時間ゼラチ

Table 1. Inhibitors of MMP-9

Inhibitor	Concentration	Inhibition (%)
EDTA	5.0mM	55
	10.0mM	97
1,10−Phenanthroline	0.5mM	98
	1.0mM	100
1,4−Dithiothreitol	0.5mM	76
	1.0mM	87
DIFP	2.0mM	3
PMSF	1.0mM	6
	2.0mM	10
N−Etylmaleimide	10.0mM	9
Pepstatin A	0.5mM	0
	1.0mM	0
Cysteine	1.0mM	90
	2.0mM	98
Iodoacetamide	20.0mM	0
β−Mercaptoethanol	0.125%	81
	0.25%	95
SDS	0.01%	50
	0.05%	100
TIMP	12.5ng	57
	37.5ng	100

MMP-9 (60ng) was assayed at 37℃ for 1hr against ^{14}C-gelatin in the presence of inhibitors indicated and 10mM Ca^{2+}

ナーゼアッセイを行った．表1の如く EDTA や1，10－フェナンスロリンなどのキレート剤，ジチオスレイトールなどのチオール基化合物によって MMP-9 活性はほぼ完全に阻害された．さらに MMP-9 の活性は TIMP により化学量論的に1：1で阻害された．また，SDS や2－メルカプトエタノールなども活性を阻害した．しかし，セリンプロティナーゼ，システインプロティナーゼ，アスパラギン酸プロティナーゼに対する阻害剤では阻害されなかった．これらの結果は，本酵素が MMP-1, 2, 3 と同様に金属依存性蛋白分解酵素に属することを示している．

Ⅳ．MMP-9 の基質特異性

表2に示すように1mg の活性型 MMP-9 はⅠ型ゼラチンを1分間に 12,700μg 分解した．SDS-PAGE では，ゼラチンのα1鎖とα2鎖は同じ割合で分解された (図 3A)．^{14}C-Ⅰ型コラーゲンを基質としたアッセイでは活性は認められなかった．しかし，SDS-PAGE ではⅠ型コラーゲンのβ1，2鎖が特異的に分解され，α2鎖は低分子化した．活性型 MMP-9 はⅣ型コラーゲンのプロα鎖も分解し，新たに分子量125,000のバンドが出現した (図 3B)．また，Ⅴ型コラーゲンも分解され，α鎖は92,000から29,500の間の数本のバンドに低分子化した (図 3C)．さらに，Ⅲ型コラーゲンも分解され分子量74,000，52,000，28,500のフラグメントが認められた (図 3D)．また，1mg の活性型 MMP-9 は1分間当たり4μg のプロテオグリカンと 26μg のカルボキシメチル化トランスフェリンを分解した．しかし，Ⅱ型，Ⅵ型コラーゲン，ラミニン及びフィブロネクチンは分解されなかった．

Table 2. Substrate specificity of MMP-9

Substrate	
Type Ⅰ collagen	+
Type Ⅱ collagen	−
Type Ⅲ collagen	+
Type Ⅳ collagen	+
Type Ⅴ collagen	+
Type Ⅵ collagen	−
Fibronection	−
Laminin	−
Type Ⅰ gelatin	12,700μg/min/mg
Proteoglycan	4μg/min/mg
Carboxymethylated transferrin	26μg/min/mg

Various extracellular matrix components including collagen types Ⅰ－Ⅳ, fibronectin and laminin were incubated with MMP-9 and the degradation products were analyzed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Enzymic activity of MMP-9 against type Ⅰ gelatin, proteoglycan and carboxymethylated transferrin was assayed at 37℃ and the specific activity was determined. +, definite degradation of the substrate; −, no digestion.

Ⅴ．潜在型 MMP-9 の活性化機構

1．APMA による潜在型 MMP-9 の活性化

1）活性化の経時的変化

潜在型 MMP-9 を 1.0mM APMA と37℃で150時間までインキュベートし，活性化された MMP-9 活性を^{14}C-ゼラチンを基質として37℃，1時間アッセイした．MMP-9 の活性化は図 4A に示すように4時間で約75%，10時間で90%，そして24時間で100%の活性を認めた．その後，100時間では60%，150時間では38%に漸減した．

次いで活性型 MMP-9 が潜在型 MMP-9 を活性化するかを検討した．潜在型 MMP-9 を 1.0mM APMA で37℃，1.5時間処理により全活性の25%活性化し，“スピンカラム”で APMA を除去後試料を37℃で20時間反応させた．その後試料を 1.0mM APMA の存在および非存在下でさらに36時間インキュベートした．その結果，APMA 除去後には活性の上昇は認められないが，APMA の再添加により活性化が再び観察された (図 4A)．このデータから，潜在型 MMP-9 の活性化には常時 APMA を必要とし，活性型 MMP-9 は潜在型 MMP-9 を活性化しないと考えられた．また，潜在型 MMP-9 を 10mM と 20mM のヨードアセトアミドで22℃，20分間処理し，次いで 1.0 mM APMA 処理 (37℃，5時間) により活性化を行ったところ活性化は全く阻害されなかった．このことは，APMA による活性化に酵素蛋白のチオール基が関与しない可能性を示唆している．

2）活性化に伴う潜在型 MMP-9 の分子量の変化

潜在型 MMP-9 を図 4A と全く同じ条件で活性化し，活性化に伴う分子量の変化を SDS-PAGE (還元状態) にて観察した．その結果，潜在型 MMP-9 (分子量92,000) は分子量は83,000を経て，分子量67,000に低分子化した (図 4B)．このゲルを用いてデンシトメトリーを行うと，分子量67,000の蛋白バンドの経時的変化は APMA による活性化曲線 (図 4A) にほぼ一致し，分子量67,000の蛋白が活性型 MMP-9 と考えられた．実際，ゼラチンサブストレートゲル上分子量67,000の蛋白バンドに著しいゼラチン分解活性が認められた．

APMA による活性化の際に MMP-9 活性を50%および200%阻害する外来性の TIMP を加えると，潜在型 MMP-9 (分子量92,000) は分子量83,000の中間型には低分子化するが，活性型 MMP-9 (分子量67,000) への移行は完全に阻止された (図5)．

2．セリンプロティナーゼによる潜在型 MMP-9 の活性化

潜在型 MMP-9 をトリプシン (0.1，1，10μg/ml) と37°Cで60時間まで反応させ，MMP-9 を ^{14}C-ゼラチンを基質としてアッセイした．その結果，10μg/ml，2時間インキュベーションで完全な活性化 (100%) がみられ，その活性は時間とともに急速に低下した (図 6A)．また，1μg/ml では8時間で最大の活性 (73%) が得られ，0.1μg/ml では24時間で全活性の29%までしか活性化されなかった (図 6A)．トリプシン (10μg/ml) による活性化に伴い，潜在型 MMP-9 は分子量78,000，73,000，65,000のバンドに低分子化し，24時間後にはこれらのバンドは消失した．活性化曲線との比較から分子量65,000のバンドが活性型酵素と考えられた．

α-キモトリプシンによる活性化では 10μg/ml，6時間処理で最大の活性 (95%) が得られた (図 6B)．また，10μg/ml のカテプシンGでは24時間で最大の活性 (100%) を示した (図 6C)．α-キモトリプシン (10μg/ml) とカテプシンG (10μg/ml) による活性化では分子量65,000，66,000の蛋白バンドがそれぞれ活性型 MMP-9 と考えられた．プラスミン，トロンビン，好中球エラスターゼ，プラズマカリクレインによる活性化を同様の条件にて行ったが，これらの酵素では潜在型 MMP-9 は活性化されず，分子量88,000～77,000の数本のバンドに分解されていた．

3．活性酸素種による潜在型 MMP-9 の活性化

潜在型 MMP-9 と中間型 (分子量83,000) が混在した試料を NaOCl (0.2，1.0，5.0mM) と37°Cでインキュ

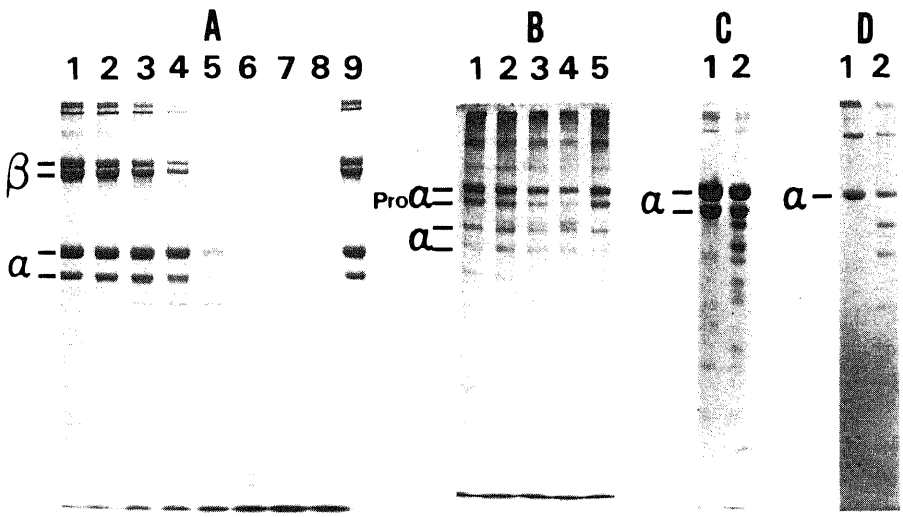

Fig. 3. Digestion of type I gelatin and collagen types IV, V, III with MMP-9. (A) Type I gelatin (18μg) was incubated with MMP-9 (1.3ng) at 37°C. The reaction was terminated with 30mM EDTA and the degradation products were analyzed on SDS-PAGE (7.5% total acrylamide) under the reducing conditions. Lanes 1 and 9, the substrate incubated with buffer alone for 0 and 24hr, respectively. Lanes 2-8, the substrate incubated with MMP-9 for 10, 30min, 1, 2, 4, 8 and 24hr, respectively. (B) Type IV collagen (18μg) was reacted with MMP-9 (600ng) at 32°C and the products were run on SDS-PAGE (6% total acrylamide) as described in Fig. 3A. Lanes 1 and 5, the substrate incubated with buffer alone for 0 and 24hr, respectively. Lanes 2-4, the substrate incubated with MMP-9 for 4, 8 and 24hr, respectively. (C) Type V collagen (15μg) was incubated with buffer alone (lane 1) and MMP-9 (600ng) (lane 2) for 24hr at 32°C and the products were analyzed on SDS-PAGE (7% total acrylamide). (D) Type III collagen (15μg) was reacted with buffer alone (lane 1) and MMP-9 (lane 2) for 24hr at 25°C and the products were subjected to SDS-PAGE (7.5% total acrylamide).

ベートすると1時間以内に全活性の36%まで活性化された(図7). しかし, 中間型を含まない潜在型MMP-9の試料においては活性化は認められなかった. 5.0mM NaOCl処理に伴う分子量の変化をSDS-PAGEで観察すると潜在型MMP-9(分子量92,000)の蛋白バンドには変化はみられず, 中間型MMP-9(分子量83,000)のバンドのみが時間とともに消失し, 分子量55,000のバンドが新たに観察された. ゼラチンサブストレートゲルでは分子量69,000の位置にゼラチン分解活性を示すバンドがみられたが, 分子量55,000のバンドにはゼラチン分解活性は認められなかった. これらのデータより分子量69,000のバンドが活性型酵素と考えられた.

一方, 上記の2種類の試料につき過酸化水素(0.002, 0.02, 0.2, 2.0mM)を用いて同様の方法で活性化を試みたが活性化は全く観察されなかった.

VI. 外来性 TIMP と潜在型 MMP-9 との結合

潜在型MMP-9とTIMPとの結合性を以下の2つの方法で検討した. Affi-gel 10にカップリングした潜在型MMP-9と^{125}Iで標識したTIMPを4°Cで16時間インキュベートし, ゲルを洗浄後, 6M尿素を含む緩衝液で溶出した. これらの洗浄液と溶出液中の放射活性をγシンチレーションカウンターで測定すると全活性に占める割合はそれぞれ17%と78%であり, 潜在型

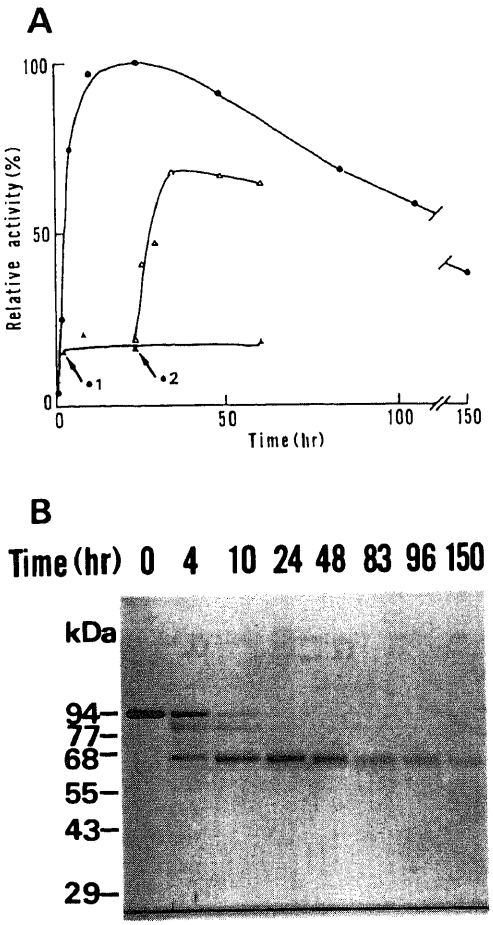

Fig. 4. Time course of proMMP-9 activation with APMA (A) and conversion of proMMP-9 during its activation (B). ProMMP-9 (33μg) was incubated at 37°C with 1.0mM APMA for up to 150hr. At the incubation time indicated, the samples were sugested to the assay using ^{14}C-gelatin for 1hr at 37°C (●) and also analyzed on SDS-PAGE (9% total acrylamide). In order to examine whether APMA is continuously required for proMMP-9 activation, APMA was removed from the reaction mixtures by spin column of Sephadex G-10 at the point of 25% of the full activity (*1) and the sample was incubated at 37°C for an additional 20hr (▲). A half of this sample was again treated with 1.0mM APMA (*2) and the further activation of proMMP-9 was monitored (△).

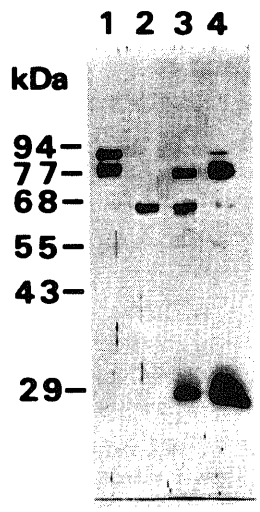

Fig. 5. Effects of TIMP on proMMP-9 conversion during APMA activation. ProMMP-9 (1.5μg)which contains an intermediate species of Mr 83,000 emerged during atorage at 4°C (lane 1) was activated with 1.0mM APMA at 37°C for 24hr (lane 2). ProMMP-9 (1.5μg) reacted with TIMP (0.2μg, lane 3; 1.0μg, lane 4) at 4°C for 16hr was also incubated with 1.0mM APMA at 37°C for 24hr. The samples were subjected to SDS-PAGE (9% total acrylamide) under the reducing conditions and the gel was stained with silver nitrate.

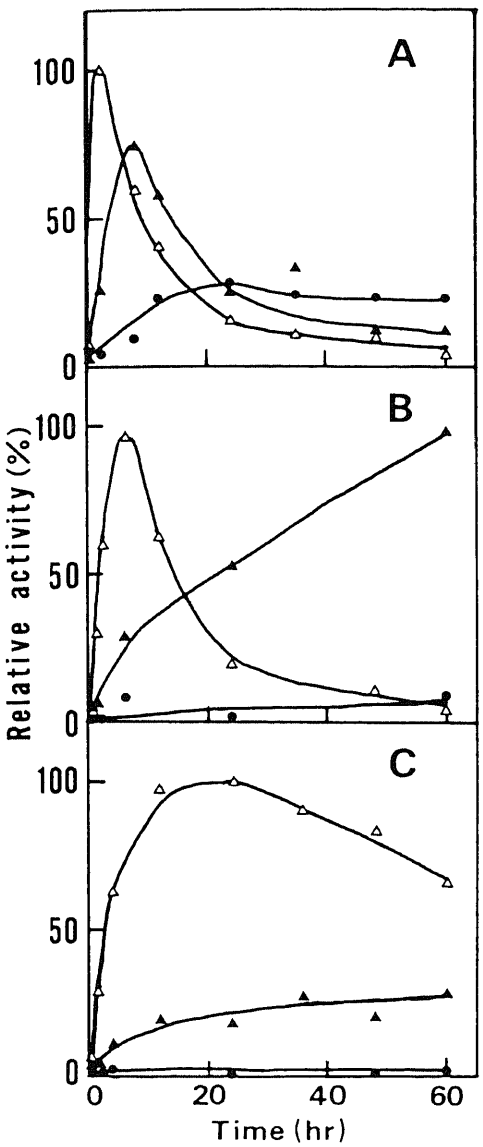

Fig. 6. Activation of proMMP-9 by trypsin, α-chymotrypsin and neutrophil cathepsin G. ProMMP-9 (86ng) was incubated with trypsin (A), α-chymotrypsin (B) and neutrophil cathepsin G (C) at 37°C at 10μg/ml (△), 1μg/ml (▲) and 0.1μg/ml (●). The MMP-9 activity was measured against ^{14}C-gelatin for 1hr at 37°C after termination of the activation reaction with 2mM di-isopropyl fluorophosphate. Activity achieved by the incubation of pro-MMP-9 with 1.0mM APMA for 24hr at 37°C was taken as 100% activity.

MMP-9 に TIMP が結合することが示された.

次に, 潜在型 MMP-9 と ^{125}I で標識した TIMP を 4°C, 16時間反応し, 0.5mg の卵白アルブミン添加後ウルトラゲル AcA 44 カラムで蛋白を分離した. また同一の条件で ^{125}I で標識した TIMP のみを AcA 44 カラムにかけた. 各フラクションの放射活性を測定すると, TIMP 単独の場合では分子量29,500の位置にそのピークがみられるのに対し, 潜在型 MMP-9 と反応させた場合には分子量125,000の部位に観察された (図8). このことは潜在型 MMP-9-TIMP 複合体がゲル濾過法で分離されないことを示している. しかし, 同一の条件で形成された潜在型 MMP-9-TIMP 複合体は, SDS-PAGE 上非還元状態で分離して泳動された.

Ⅶ. イムノブロット法とN末端アミノ酸分析

潜在型 MMP-9 を 1.0mM APMA と37°Cで2, 4, 24時間活性化し, 試料を SDS-PAGE 後ニトロセルロース膜に転写した. このニトロセルロース膜を潜在型 MMP-9 のN末端部とC末端部を認識する特異抗体 (57-13D8 と 56-2A4) を用いて, 仲の方法[29]に従ってイムノブロットした. その結果, 57-13D8 抗体では潜在型 MMP-9 (分子量92,000) のみが認識され, 56-2A4 抗体は潜在型と中間型 MMP-9 (分子量83,000) を認識した. しかし, 活性型 MMP-9 (分子量

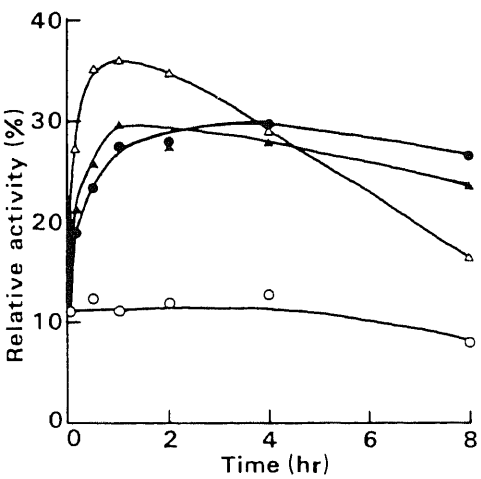

Fig. 7. Activation of proMMP-9 by NaOCl. ProMMP-9 (86ng) which contains an intermediate species of Mr 83,000 was incubated at 37°C with different concentrations of NaOCl: (△), 5.0mM; (▲), 1.0mM; (●), 0.2mM (○), buffer alone. Activity achieved by the incubation of proMMP-9 with 1.0mM APMA for 24hr at 37°C was taken as 100% activity.

67,000) はこれらの抗体とは反応しなかった (図9).

抗 (MMP-1) IgG セファロースカラムより得られた TIMP 結合型の潜在型 MMP-9 を 57-13D8 抗体と抗 (TIMP) 抗体を用いて同様の方法でイムノブロットすると，非還元試料でみられた分子量125,000のバンドに MMP-9 と TIMP の存在が観察された.

潜在型 MMP-9 のN末端アミノ酸配列は Ala-Pro-Arg-Gln-Arg-Gln-Ser-Thr-Leu-Val-Leu-Phe-Pro で，潜在型 MMP-9 のアミノ酸配列[10]に一致した．一方，APMA 処理を受けた活性型 MMP-9 のアミノ酸配列は Met-Arg-Thr-Pro-Arg-(Cys)-Gly-Val-Pro-Asp-Leu-Gly-Arg-Phe-Gln-Thr-Phe-Glu であった．活性化に伴い除去されたN末端部ペプチドの分子量は8,925であり，活性型 MMP-9 は計算上中間型酵素の分子量に近似していた.

考　　察

本研究では，HT 1080 細胞培養液から5つのカラムクロマトグラフィーにより36%の高い回収率をもって潜在型酵素が単離精製された．本酵素は分子量が92,000で，I型ゼラチンに対して著しい活性 (12,700 μg/分/mg 蛋白) を示した．酵素活性は EDTA や1，10－フェナンスロリンなどのキレート剤や TIMP で阻害されるのに対し，セリンプロティナーゼ，システインプロティナーゼ，アスパラギン酸プロティナーゼに対する阻害剤では阻害されなかった．これらの結果と潜在型 MMP-9 に対する特異的モノクローナル抗体との反応性及びN末端アミノ酸配列のデータから，精製された本酵素が MMPs 遺伝子ファミリー中の潜在型 MMP-9 であることは明白である.

潜在型 MMP-9 は TIMP 複合体として存在することが報告されている[10][11]．本研究においても，精製途中の試料では SDS-PAGE 上潜在型酵素は TIMP と結合した状態で泳動された．この結合は非還元状態でのみ観察され，還元すると両者は完全に分離された．同様の所見は Moll ら[11]によっても報告されており，彼らは潜在型 MMP-9 と TIMP の結合はジスルフィド結合と報告した．しかし，潜在型 MMP-9 に結合した TIMP が抗 (TIMP) IgG セファロースカラムで容易に分離することは，その結合が非共有結合であることを示している．また，外来性 TIMP と再構成された潜在型 MMP-9 が非還元状態でも SDS-PAGE 上分離する

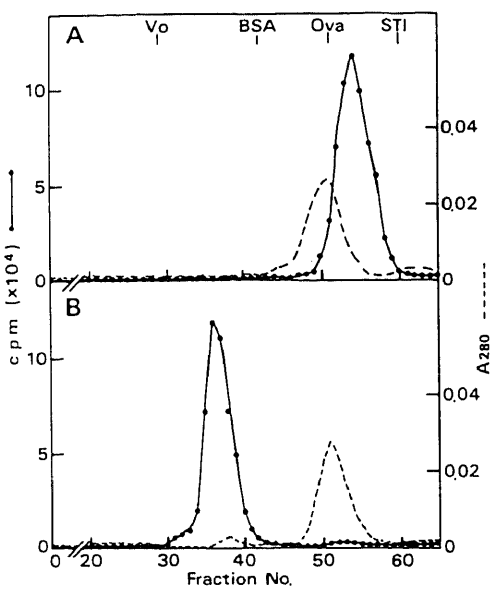

Fig. 8. Complex formation of proMMP-9 with TIMP. ^{125}I-labeled TIMP (530ng) was incubated with buffer alone (A) or proMMP-9 (86 μg) (B) at 4°C for 16hr. The samples were then mixed with 5mg ovalbumin and chromatographed on the Ultrogel AcA 44 column (1.5×115cm) equilibrated with 50mM Tris-HCl, pH 7.5/0.4M NaCl/10mM $CaCl_2$/0.05% Brij35/0.02% NaN_3. A_{280} (···) and radioactivity (●) are indicated. Vo, blue dextran; BSA, bovine serum albumin (68kDa); Ova, ovalbumin (43kDa); STI, soybean trypsin inhibitor (21kDa).

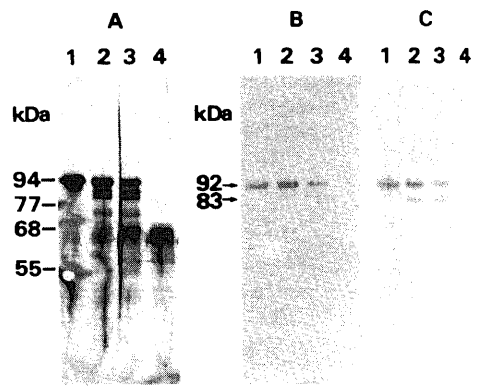

Fig. 9. Immunoblotting analysis of MMP-9 species during activation with APMA. Pro-MMP-9 (lane 1) and that activated with 1.0mM APMA at 37°C for 2, 4 and 24hr (lanes 2-4, respectively) were electrophoresed on 8% SDS (reducing) gel and transferred to nitrocellulose membranes. The membanes were then stained with AuroDye (A), or reacted with monoclonal antibodies, 57-13D8 (B) and 56-2A4 (C), and biotinylated anti-mouse IgG antibody followed by ABC method for immunoblotting.

ことはこのことを支持している．潜在型 MMP-9 と TIMP の結合機序に関しては不明である．しかし，ゲル濾過法でははずれず，抗 (TIMP) IgG セファロースカラムや還元剤および SDS の作用で分離することから，その結合は酵素とインヒビターの立体構造に基づく相互作用と考えられる．

MMP-9 がIV型，V型コラーゲンやゼラチンを分解することに関しては既にいくつかの報告がある[3,4,6,9,10,11,13]．このような性質は MMP-2[14)-17)]と類似しており，これまで両酵素の基質に差異がないと考えられてきた[10]．しかし，基質特異性に関しては上記の基質のみが共通しており，MMP-9 と MMP-2 が分解する基質はきわめて異なることが本研究で明かとなった．MMP-2 はIV型，V型コラーゲン，ゼラチンのみならずフィブロネクチンとラミニンを分解し[14,15,17]，基底膜成分の分解に適すると考えられる．一方，MMP-9 はI型，III型コラーゲンを分解しうる点で注目される．I型コラーゲンの α 鎖のN末端部非ヘリックス部には架橋が存在することから，MMP-9 による β 1，2鎖の分解と α 2鎖の低分子化は α 2鎖の同部位での特異的な切断によると考えられる．MMP-9 はコラーゲン分子の3本鎖ヘリックス部位を切断できないと考えられることから，III型コラーゲンもおそらく同分子中の非ヘリックス部で分解されると推定される．

MMPs に共通した重要な特徴の1つは，これらの酵素が潜在型酵素として分泌され細胞外で活性化を受けることである．従って，活性化の過程はこれらの酵素が生体内で作用を発現するための不可欠のステップである．潜在型 MMP-1, 2, 3 の活性化機序に関しては多数の報告があり，これらの MMPs は APMA に代表される水銀化合物によって容易に活性化を受けるとされている[14,15,17,29)-34)]．潜在型 MMP-9 の APMA 処理による活性化曲線は MMP-3[33]のそれにきわめて類似しており，急速な活性化と失活を示す MMP-2[14]とは対照的であった．活性化により，潜在型 MMP-9 は中間型 (分子量83,000) を経て活性型酵素 (分子量67,000) に低分子化するが，中間型酵素ではN末端ペプチドが欠失し，活性型酵素ではさらにC末端ペプチドも欠損することがイムノブロットで示された．また，このことは活性型酵素のN末端アミノ酸配列の分析によっても確かめられた．従って，潜在型 MMP-9 の活性化はN末端ペプチドとC末端ペプチドが順次切断されておこることが明かとなった．活性型 MMP-9 のN末端アミノ酸配列の検討では，MMPs でよく保存された Pro-Arg-Cys-Gly-Val-Pro-Asp のアミノ酸配列より4アミノ酸上流の Ala^{74}-Met^{75} のペプチド結合が切断されていた．最近，Nagase らと彼のグループ[31,34]は潜在型 MMP-1 と MMP-3 を APMA で処理するとそれぞれ Val^{67}-Met^{68} と Glu^{68}-Val^{69} のペプチド結合の切断により中間型酵素が生じ，次いで，Pro-Arg-Cys-Gly-Val-Pro-Asp から3アミノ酸下流の切断により活性化が完了すると報告している．MMP-2 の活性化に関しても，中間型酵素の存在が確かめられていない点を除けば MMP-1, 3 と同様である[14]．これらのことから，MMP-1, 2, 3 では Pro-Arg-Cys-Gly-Val-Pro-Asp のアミノ酸配列直後での切断がその活性化に必須のプロセスと考えられる．これと比較して，N末端ペプチドとC末端ペプチドの除去により活性化をきたす MMP-9 はきわめて特徴的な活性化機序を有するといえる．また，C末端ペプチドの切断が TIMP の存在により阻止されることは興味深い所見である．これまでの報告で活性型 MMP-9 の分子量が誤って83,000と報告されたのは[9,10]，TIMP 結合型 MMP-9 で検討されたためと考えられる．実際，TIMP 産生能のないラット乳癌細胞由来の活性型 MMP-9 は分子量69,000と報告されている[13]．

活性酸素種の1つである HOCl が MMP-9 を1時間という短時間で活性化することは注目すべき所見である．好中球由来のコラゲナーゼ (MMP-8)[35]とゼラチナーゼ (MMP-9)[36,37]が HOCl で活性化されることは既に報告されている．潜在型 MMP-9 は最大活性の36%までしか活性化されないが，Peppin ら[36]の報告でも30%でありほぼ同等の活性化率であった．HOCl によるこれら MMPs の活性化機序に関してはこれまで全く不明であったが，本研究では HOCl は潜在型 MMP-9 (分子量92,000) に作用せず，中間型 MMP-9 (分子量83,000) のみを活性化することが明かとなった．近年，HOCl が TIMP を不活性化することが報告されている[38]．従って，組織に浸潤した好中球に由来する HOCl は TIMP の不活性化と MMP-9 の活性化により本酵素活性の調節に重要な役割を果たす可能性が考えられる．

潜在型 MMP-1 と MMP-3 はプラスミンをはじめとする種々のセリンプロティナーゼによる限定分解を受けると活性化されることが知られている[29,31,33,34]．潜在型 MMP-9 もトリプシン，キモトリプシン，カテプシンGにより最大活性にまで活性化され，いずれも分子量65,000前後の活性型 MMP-9 を生じた．Nagase ら[34]は潜在型 MMP-3 の好中球エラスターゼ，プラズマカリクレイン，キモトリプシン，プラスミンによる活性化を詳細に検討し，その活性化がセリンプロティナーゼによる限定分解後の分子間自己触媒反応で完了

し，いずれも分子量約45,000の活性型 MMP-3 になることを報告した．MMP-9 に関しても同様な機序が推定され，今後検討されるべき課題と考えられる．一方，潜在型 MMP-9 がプラスミンによって活性化されないことは重要な所見である．これまで癌細胞の浸潤・転移に関する多くの研究では，IV型コラーゲン分解酵素と名付けられた MMP-9 や MMP-2 がプラスミンにより活性化されることを前提とした報告が多い[39)41)]．しかし，本研究や Okada ら[14)]の報告で明らかなように，プラスミンによる MMP-9 や MMP-2 の活性化は不可能であり，生体内ではカテプシンGやHOCl などの他の活性化剤の関与が必要と考えられる．

MMP-9 は高転移性細胞株で特異的に発現されることから，癌細胞がもつ転移能の1つの指標と考えられている[7)-9)13)]．実際，MMP-9 がIV型コラーゲンのみならず細胞間質に広く存在するI，III，V型コラーゲンを分解することから，本酵素のみで癌細胞は周囲結合組織への浸潤と血管内侵入を果たすことが可能と考えられる．しかし，TIMP は MMP-9 活性の阻害だけでなく，活性化そのものを阻止することから生体内における本酵素活性は TIMP による厳重なコントロール下にあると推定される．従って，Khokha ら[42)]の報告にあるように，腫瘍細胞の転移能は TIMP の発現レベルで決定される可能性も考えられる．いずれにしても，癌の浸潤・転移機構を研究する際には MMP-9 の産生能だけでなく TIMP との不均衡の有無を検討することがきわめて重要と考えられる．一方，MMP-9 は好中球やマクロファージなどの炎症細胞によっても合成，分泌されており，これらの細胞の組織内浸潤にも作用している[40)45)]．また，仲[28)]は本酵素が破骨細胞に局在し骨吸収に関与する可能性を示している．このように，MMP-9 は癌細胞の浸潤・転移や炎症に伴う組織破壊に広く関与する可能性が考えられる．

結　　論

HT 1080 細胞培養液より潜在型 MMP-9 を単離精製し本酵素の性質と活性化機構について検討し，以下の結果を得た．

1．潜在型 MMP-9 は5つのカラムクロマトグラフィーによって精製され，非還元及び還元状態でそれぞれ SDS-PAGE 上分子量89,000と92,000の単一な蛋白バンドとして泳動された．本酵素の回収率は36%であった．

2．MMP-9 の活性は各種キレート剤によって阻害され，TIMP により化学量論的に1：1で阻害された．また，MMP-9 特異抗体との反応性とN末端アミノ酸配列のデータから精製された本酵素が MMP-9 と断定された．

3．本酵素はゼラチンに対して高い分解活性を示した．また，I型，III型，IV型及びV型コラーゲンが本酵素によって分解されたが，VI型コラーゲン，ラミニン及びフィブロネクチンに対する分解活性は認められなかった．

4．潜在型 MMP-9 は 1.0mM APMA で37°C，24時間処理により最も強く活性化され，その後活性は漸減した．APMA 処理により，潜在型 MMP-9 は中間型(分子量83,000) を経て，活性型 MMP-9 (分子量67,000) に低分子化した．イムノブロット法と活性型酵素のN末端アミノ酸配列のデータから，APMA による潜在型 MMP-9 の活性化はN末端とC末端ペプチドの除去により生じることが明かとなった．APMA による活性化の際に TIMP を加えると潜在型 MMP-9 は分子量83,000の中間型に低分子化するが，活性型 MMP-9 (分子量67,000) への移行が阻止された．このことは TIMP が活性型 MMP-9 の活性を阻害するばかりでなく潜在型 MMP-9 の活性化も阻害することを示している．

5．潜在型 MMP-9 はトリプシン，α-キモトリプシン，好中球カテプシンGによる部分消化によっても活性化された．しかし，プラスミン，トロンビン，好中球エラスターゼ，プラズマカリクレインでは全く活性化されなかった．また，活性酸素種の1つである HOCl により36%まで活性化された．これらのことは好中球由来の蛋白分解酵素や活性酸素が潜在型 MMP-9 の活性化に関与する可能性を示唆している．

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，御教示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心より謝意を表します．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．

文　　献

1) **Matrisian, L. M.:** Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. Trends Genet., **6,** 121-125 (1990).

2) **Nagase, H., Barrett, A. J. & Woessner, F. Jr.:** Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. Matrix (Suppl.), in press.

3) **Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. H. & Mainardi, C. L.:** Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. J. Biol. Chem., **260,** 2493-2500 (1985).

4) **Murphy, G., Ward, R., Hembry, R. M., Reynolds, J. J., Kuhn, K. & Tryggvason, K.:** Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. A metalloproteinase resembling tumour type IV collagenase. Biochem. J., **258,** 463-472 (1989).

5) **Murphy, G., Hembry, R. M., McGarrity, A. M., Reynolds, J. J. & Henderson, B.:** Gelatinase (type IV collagenase) immunolocalization in cells and tissues: use of an antiserum to rabbit bone gelatinase that identifies high and low Mr forms. J. Cell Sci., **92,** 487-495 (1989).

6) **Mainardi, C. L., Hibbs, M. S., Hasty, K. A. & Seyer, J. M.:** Purification of a type V collagen degrading metalloproteinase from rabbit alveolar macrophages. Collagen Relat. Res., **4,** 479-492 (1984).

7) **Ballin, M., Gomez, D. E., Sinha, C. C. & Thorgeirsson, U. P.:** Rasoncogene mediated induction of a 92kDa metalloproteinase; strong correlation with the malignant phenotype. Biochem. Biophys. Res. Commun., **154,** 832-838 (1988).

8) **Yamagata, S., Ito, Y., Tanaka, R. & Shimizu, S.:** Gelatinases of metastatic cell lines of murine colonic carcinoma as detected by substrate-gel electrophoresis. Biochem. Biophys. Res. Commun., **151,** 158-162 (1988).

9) **Yamagata, S., Tanaka, R., Ito, Y. & Shimizu, S.:** Gelatinases of murine metastatic tumor cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., **158,** 228-234 (1989).

10) **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).

11) **Moll, U. M., Youngleib, G. L., Rosinski, K. B. & Quigley, J. P.:** Tumor promoter-stimulated Mr 92,000 gelatinase secreted by normal and malignant human cells: isolation and characterization of the enzyme from HT 1080 tumor cells. Cancer Res., **50,** 6162-6170 (1990).

12) **Okada, Y., Tsuchiya, H., Shimizu, H., Tomita, K., Nakanishi, I., Sato, H., Seiki, M., Yamashita, K. & Hayakawa, T.:** Induction and stimulation of 92-kDa gelatinase/type IV collagenase production in osteosarcoma and fibrosarcoma cell lines by tumor necrosis factor α. Biochem. Biophys. Res. Commun., **171,** 610-617 (1990).

13) **Lyons, J. G., Birkedal-Hansen, B., Moore, W. G. I., O'Grady, R. L. & Birkedal-Hansen, H.:** Characteristics of a 95-kDa matrix metalloproteinase produced by mammary carcinoma cells. Biochemistry, **30,** 1449-1456 (1991).

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

15) **Murphy, G., McAlpine, C. G., Poll, C. T. & Reynolds, J. J.:** Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and type IV and V collagen. Biochem. Biophys. Acta, **831,** 49-58 (1985).

16) **Rifas, L., Halstead, L. R., Peck, W. A., Avioli, L. V. & Welgus, H. G.:** Human osteoblasts in vitro secrete tissue inhibitor of metalloproteinases and gelatinase but not interstitial collagenase as major cellular products. J. Clin. Invest., **84,** 686-694 (1989).

17) **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. & Goldberg, G. I.:** H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. J. Biol. Chem., **263,** 6579-6587 (1988).

18) **Monteagudo, C., Merino, M. J., San-Juan, J., Liotta, L. A. & Stetler-Stevenson, W. G.:** Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. Am. J. Pathol., **136,** 585-592 (1990).

19) **Kodama, S., Yamashita, K., Kishi, J., Iwata, K. & Hayakawa, T.:** A sandwich enzyme immunoassay for collagenase inhibitor using mono-

clonal antibodies. Matrix, **9**, 1-6 (1989).

20) Kodama, S., Iwata, K., Iwata, H., Yamashita, K. & Hayakawa, T.: Rapid one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases. An application for rheumatoid arthritis serum and plasma. J. Immunol. Methods, **127**, 103-108 (1990).

21) Cawston, T. E. & Barrett, A. J.: A rapid and reproducible assay for collagenase using [1-^{14}C] acetylated collagen. Anal. Biochem., **99**, 340-345 (1979).

22) Harris, E. D. Jr. & Krane, S. M.: An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. Biochem. Biophys. Acta, **258**, 566-576 (1972).

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

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) Nagase, H. & Woessner, J. F. Jr.: An improved assay for proteinases and polysaccharidase employing a cartilage proteoglycan substrate entrapped in polyacrylamide particles. Anal. Biochem., **107**, 385-392 (1980).

26) 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).

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

28) 仲 克巳: 骨吸収における matrix metalloproteinase 9 (92kDa ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ) ―その性質と破骨細胞での局在に関する研究―. 十全医会誌 (印刷中).

29) Stricklin, G. P., Jeffrey, J. J., Roswit, W. T. & Eisen, A. Z.: Human skin fibroblast procollagenase: mechamisms of activation by organomercurials and trypsin. Biochemistry, **22**, 61-68 (1983).

30) Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H. & Van Wart, H. E.: Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys^{73} active-site zinc complex in latency and a "Cysteine switch" mechanism for activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **87**, 364-368 (1990).

31) Suzuki, K., Enghild, J. J., Morodomi, T., Salvesen, G. & Nagase, H.: Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). Biochemistry, **29**, 10261-10270 (1990).

32) Stetler-Stevenson, W. G., Krutzsch, H. C., Wacher, M. P., Margulies, I. M. K. & Liotta, L. A.: The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. J. Biol. Chem., **264**, 1353-1356 (1989).

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

34) Nagase, H., Enghild, J. J., Suzuki, K. & Salvesen, G.: Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl) mercuric acetate. Biochemistry, **29**, 5783-5789 (1990).

35) 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).

36) 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).

37) Shah, S. V., Baricos, W. H. & Basci, A.: Degradation of human glomerular basement membrane by stimulated neutrophils. Activation of a metalloproteinase (s) by reactive oxygen metabolites. J. Clin. Invest., **79**, 25-31 (1987).

38) Stricklin, G. P. & Hoidal, J. R.: Oxidant-mediated inactivation of TIMP. Matrix (Suppl.), in press.

39) Wang, B. S., McLoughlin, G. A., Richie, J. P. & Maunick, J. A.: Correlation of the production

of plasminogen activator with tumor metastasis in B 16 mouse melanoma cell lines. Cancer Res., **40**, 288-292 (1980).

40) **Carlsen, S. A., Ramshaw, I. A. & Warrington, R. C.:** Involvement of plasminogen activator production with tumor metastasis in a rat model. Cancer Res., **44**, 3012-3016 (1984).

41) **Mignatti, P., Robbins, E. & Rifkin, D. B.:** Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. Cell, **47**, 487-498 (1986).

42) **Khokha, R., Waterhouse, P., Yagel, S., Lala, P. K., Overall, C. M., Norton, G. & Denhardt, D. T.:** Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. Science, **243**, 947-950 (1989).

Characterization and Activation Mechanisms of Matrix Metalloproteinase 9 (92 kDa Gelatinase/Type Ⅳ Collagenase) from Human Fibrosarcoma (HT 1080) Cells

Yukio Gonoji, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med Soc., **100**, 933－947 (1991)

Key words metalloproteinase, characterization, activation, active oxygen, tissue inhibitor of metalloproteinases

Abstract

In order to study the properties and activation mechanisms of the zymogen of matrix metalloproteinase 9 (proMMP-9), proMMP-9 was purified by the five chromatographic steps from the culture medium of HT 1080 cells treated with tumor necrosis factor α (100 units/ml). Purified proMMP-9 showed a single band of Mr 92,000 on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under the reducing conditions. The enzymatic activity was inhibited by etylendiamine teraacetic acid, 1-10-phenanthroline and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), but not by inhibitors for serine, cysteine or a spartic proteinases. The proteinase showed remarkable enzymic activity against type Ⅰ gelatin (12,700 μg/min/mg enzyme protein at 37℃) and cleaved specifically α2 chain of type Ⅰ collagen at 27℃. Collagen types Ⅳ and Ⅴ, and Ⅲ were also degraded at 32℃ and 25℃, respectively. The enzymatic activity of proMMP-9 was brought to the maximum by incubating with 1.0 mM p-aminophenylmercuric acetate (APMA) for 24 hr at 37℃ and, thereafter, declined gradually with incubation time. During activation with APMA, proMMP-9 was converted to the active form of Mr 67,000 through the intermediate form of Mr 83,000. The data of NH_2-terminal sequence and immunoblotting analyses demonstrated that the conversion of proMMP-9 to the active species was achieved by the removal of both amino- and carboxy-terminal peptides. When proMMP-9 complexed with TIMP was activated with APMA, the conversion of the intermediate to the active species was blocked. It is, therefore, obvious that TIMP plays a dual role in the regulation of the activity by inhibiting activation processes as well as the activity itself. Pro MMP-9 was also activated with neutrophil cathepsin G, trypsin and α-chymotrypsin, but not with neutrophil elastase, plasmin, thrombin or plasma kallikrein. In addition, HOCl, an active oxygen, activated the intermediate species of Mr 83,000. These results suggest that MMP-9, which is yielded by activation of the precursor with neutrophil-derived proteinases, active oxygens and others, play an important role in the degradation of extracellular matrix components in vivo.