

Characterization and Activation Mechanisms of Matrix Metalloproteinase 2 (Gelatinase) from Human Rheumatoid Synovial 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/2297/8052

慢性関節リウマチ滑膜細胞由来 matrix metalloproteinase 2 (ゼラチナーゼ) の性質と活性化機構

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任:野村 進教授)

安 井 厚

(昭和63年7月6日受付)

Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) の性質と活性化機構を解明するために、マクロファージ調整培地で処理した RA 滑膜細胞培養液より4つのカラムクロマトグラフィーによって潜在型 MMP-2 を精製した。精製された潜在型 MMP-2 は、還元、非還元状態にかかわらず、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において分子量74,000の単一なバンドとして観察された。MMP-2 の活性は ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1, 10-フェナンスロリン及び tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) により阻害されたが、システインプロテイナーゼ、セリンプロテイナーゼ及びアスパラギン酸プロテイナーゼ阻害剤では阻害されなかった。1 μ g の MMP-2 は37°CでI型ゼラチンを 25.5 μ g/min 分解する他、プロテオグリカンとエラスチンをそれぞれ 20ng/min と 8ng/min 分解した。さらに、32°CにおいてIV型及びV型コラーゲンを、また、37°Cでラミニンを分解した。しかし、フィブロネクチンやI型コラーゲンに対する活性はみられなかった。これらの結果は、MMP-2 がコラーゲナーゼとの協同作用により間質性コラーゲンを分解するばかりでなく、基底膜構成成分の破壊にも重要な役割を演じている可能性のあることを示唆している。潜在型 MMP-2 は 1.0mM $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ と37°Cで5分間作用させることにより最も強く活性化された。 $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ による活性化後その活性は不安定であり、 $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ を除去後も同様であった。1.0mM $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ による活性化後、潜在型 MMP-2 は還元状態で分子量67,000の活性型 MMP-2 に低分子化し、次いでより小さなフラグメントに分解された。 $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ による潜在型 MMP-2 の低分子化は温度依存性であり、EDTA の存在により完全に阻害された。また、トリプシン、プラスミン、トロンビン、好中球エラスターゼ及び好中球カテプシンGなどの蛋白分解酵素は潜在型 MMP-2 を活性化しなかった。これらのデータは、潜在型 MMP-2 の活性化が蛋白分解酵素による限定分解では行われず、酵素蛋白のコンフォメーションを変化させる何らかの因子により生ずることを強く示唆している。

Key words metalloproteinase, characterization, activation, rheumatoid arthritis, synovial cells

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は、抗原-抗体複合体を起炎物質として慢性増殖性滑膜炎を生じ、その結果関節軟骨や関節周囲組織が破壊される疾患である。RAにおける関節軟骨破壊には、炎症性細胞に由来する活性酸素や荷重による機械的ストレスなど種々の因子が関与するが、その細胞間マトリックス構成成分の分解には蛋白分解酵

素が主役を演じると考えられている¹⁾。これらの蛋白分解酵素のうち金属依存性蛋白分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP) は、培養滑膜細胞により合成・分泌されることや、関節構成組織に存在するほとんどすべての細胞間マトリックス成分を分解し得ることから、RAにおける関節破壊に重要な役割を果たすと推定されている。培養 RA 滑膜

Abbreviations: DIFP, diisopropyl fluorophosphate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EHS, Engelbreth-Holm-Swarm; MMP, matrix metalloproteinase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis;

細胞に由来する MMP には現在までに3種類が区別されており、MMP-1 はコラーゲナーゼ²⁹⁾、MMP-2 はゼラチナーゼ⁴⁰⁾、MMP-3⁹⁾ は proteoglycanase⁷⁾ あるいは stromelysin⁸⁾ と呼ばれる酵素に相当する。MMP-3 は軟骨プロテオグリカンやフィブロネクチンのほか基底膜構成成分であるIV型コラーゲンやラミニンを分解することが報告されている⁶⁷⁾。一方、MMP-1 は間質性コラーゲンである I、II、IIIコラーゲンをその分子のアミノ末端から3/4の部位で特異的に分解するほか、軟骨に存在する X 型コラーゲンを2カ所で分解すると報告されている⁹⁾。これらコラーゲンの分解産物は、37°C (体温) でそのらせん構造を失いゼラチンに変性する。MMP-2 は、このゼラチンを小さいペプチドに分解することによりコラーゲン分子の分解に重要な役割を演じると報告されている¹⁰⁾。

MMP-2 は、これまでヒト皮膚⁴⁾、ヒト好中球¹¹⁾及びウサギ骨⁵⁾の培養液より精製されその性質の一部が明らかとなっているが、RA 滑膜細胞由来の MMP-2 はいまだ精製されておらず、その性質については十分に解明されていない。また、MMP-2 は潜在型酵素として分泌され細胞外で活性化を受けるが、その活性化機構については全く不明である。

本研究では、RA 滑膜細胞培養液から潜在型 MMP-2 を単離精製し、本酵素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 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、ヨードアセトアミド及び sodium dodecylsulfate (SDS) は和光純薬より購入した。4-aminophenylmercuric acetate (NH₂-Ph-Hg-Ac)、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、2-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プラスミノゲン、ストレプトキナーゼ、トリプシン、トリプシンインヒビター、トロンビン及びトランスフェリン (ヒト) は Sigma 社 (St. Lois, U. S. A.) より購入した。YM-10メンブラン、限外濾過装置と GreenA Dyematrix ゲルはアミコン社製 (Danvers,

U. S. A.) のものを使用した。また、Sephadex G-10、DEAE-セルロース及び Affi-Gel-10 はそれぞれ Pharmacia Fine Chemical 社 (Sweden)、Whatman 社 (England) 及び Bio-Rad 社 (Richmond, U. S. A.) より購入した。[1-C¹⁴] 無水酢酸、¹²⁵I 及び [2, 3-³H] プロリンは Amersham Japan 社 (Tokyo) より、また [³H] ヨード酢酸は New England Nuclear 社 (U. S. A.) より購入した。

プロテオグリカン、エラスチン及びラミニンは Dr. Nagase (Kansas Medical School, 米国) より、Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 肉腫由来IV型コラーゲンは Dr. Kurkinen (RWJ-Medical School, 米国) より、好中球エラスターゼとカテプシンGは Dr. Travis (Georgia 大学, 米国) より提供を受けた。また、Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) 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河原栄先生より恵与された。

マクロファージ調整培地は、Mainardi ら¹²⁾の方法に従い作製した。すなわち成熟ウサギ (2~2.5Kg) の耳介静脈に 0.2ml の Freund 完全アジュバンドを注射2週後に屠殺し、肺胞中に遊走したマクロファージをハンクス液で肺胞を洗浄することにより採取した。このマクロファージを0.2%水酸化ラクトアルブミン (Gibco, New York, U. S. A.) を含む無血清 Dulbecco's modified Eagle's medium [D-MEM (Flow Laboratories)] で培養し、この培養液をアミコン限外濾過装置で50~70倍に濃縮してマクロファージ調整培地として用いた。

ラット卵黄嚢由来IV型コラーゲンの標識は胎齢14日のラット卵黄嚢を [2,3-³H] プロリン (70μCi/ml) を含む無血清 DMEM 培地 (0.1mM アスコルビン酸、500μg/ml フマル酸ベータアミノプロピオニトリル及び0.2%水酸化ラクトアルブミンを含む) で12時間培養して行ない、この培養液を硫酸沈殿法 (30%飽和度) で濃縮して用いた。

II. RA 滑膜細胞培養液の調整

RA 滑膜細胞は、金沢大学医学部付属病院とその関連病院の RA 患者より、人工関節置換術や滑膜切除術の際に採取した。Dayer ら¹³⁾の方法に従い、RA 滑膜組織より初代培養細胞を得た。すなわち、摘出した RA 滑膜組織をすみやかに無菌的にハサミで細切し、4mg/ml の細胞分散用コラーゲナーゼ [coll-

PMSF, phenyl-methanesulfonyl fluoride; RA, rheumatoid arthritis; SDS, sodium dodecylsulfate; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases.

genase (和光純薬)] で37°C 1時間処理後、さらに0.2%トリプシン液 [Trypsin-EDTA (Gibco)] 中で室温1時間処理した。この細胞浮遊液をステンレス製メッシュで濾過し、得られた細胞を $10^6 \sim 10^7$ 個/25cm²組織培養フラスコの濃度で、15%牛胎児血清 (Gibco) を含む DMEM 液で単層培養した。

初代培養細胞がコンフルエントに達した後にトリプシンで剝離し、初代培養と同様な条件で組織培養用フラスコ内に継代培養した。継代第一代の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0.2%水酸化ラクトアルブミンを含む無血清 DMEM 培地に換え、濃縮したマクロファージ調整培地を100倍希釈で添加した。マクロファージ調整培地添加5日後に培養液の一部を採取し、ゼラチン分解活性を測定した。十分なゼラチン分解活性の認められた培養液を-20°Cで凍結保存し、潜在型 MMP-2 の精製材料とした。

III. 酵素活性の測定

各精製過程において、コラーゲナーゼ活性、ゼラチナーゼ活性及びトランスフェリン分解活性 (MMP-3 活性) を測定した。コラーゲナーゼとゼラチナーゼ活性は、それぞれ Cawston ら¹⁰⁾ と Harris ら¹⁰⁾ の方法に従ってアッセイした。モルモット皮膚より I 型コラーゲンを精製し、Gisslow ら¹⁰⁾ の方法により¹⁴C-無水酢酸で標識したコラーゲンとその熱変性 (60°C 30分間処理) したゼラチンを基質として用いた。また、MMP-3 活性は Okada ら⁹⁾ の方法に従いヒトトランスフェリンを [³H] ヨード酢酸で標識した [³H] 標識カルボキシメチル化トランスフェリン (Cm-Tf) を基質としてアッセイした。ゼラチナーゼ活性は 1.0mM NH₂-Ph-Hg-Ac の存在下でアッセイした。また、コラーゲナーゼ活性とトランスフェリン分解活性は 1.5mM の NH₂-Ph-Hg-Ac の存在下でアッセイした。1単位のゼラチナーゼ、コラーゲナーゼ及びトランスフェリン分解活性は、それぞれの基質を37°Cにおいて1分間に1μg分解することを意味する。

IV. 基質特異性の検討

精製された潜在型 MMP-2 を 1.0mM NH₂-Ph-Hg-Ac 処理 (37°C 5~10分間) で活性化し、37°Cにおけるプロテオグリカンとエラスチン分解活性をそれぞれ Nagase ら¹⁰⁾ と Yu ら¹⁰⁾ の方法で測定した。また、酵素を同様の方法で活性化後、32°Cで、IV型とV型コラーゲンに作用させてその分解産物を SDS-polycrylamide gel electrophoresis (PAGE) にて分析した。さらに、ラミニンとフィブロネクチンの37°Cにおける分解活性を同様の方法で検討した。

V. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 法

各精製段階の試料につき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 Laemmli ら¹⁰⁾ の方法に従って電気泳動した。泳動後ゲルを50%メタノールで固定後、Wray ら¹⁰⁾ の方法で銀染色を施し観察した。また、精製された潜在型 MMP-2 を Fraker ら²⁰⁾ の方法に従って ¹²⁵I でラベルし、活性化に伴う分子量の変化を SDS-PAGE 後のオートラジオグラフィーで観察した。

VI. 潜在型 MMP-2 の精製

精製はすべて4°Cで行い、ゼラチン分解活性は 1.0mM NH₂-Ph-Hg-Ac 存在下で37°Cで3時間アッセイした。また、MMP-1 と MMP-3 活性は ¹⁴C コラーゲンと [³H] -カルボキシメチル化トランスフェリンを基質として 1.5mM NH₂-Ph-Hg-Ac の存在下で37°Cで2-5時間アッセイした。潜在型 MMP-2 精製のための最初の3段階は、Okada ら⁹⁾ 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：RA 滑膜細胞培養液 (240ml) を、YM-10 メンブレンを装着したアミコン限外濾過装置で 37ml (6.5倍) に濃縮した。この濃縮した培養液からグルコサミノグリカンを除去する目的で、試料を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 8.0/0.15M NaCl/

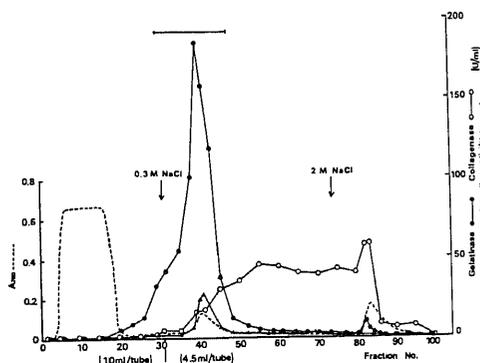


Fig. 1. GreenA Dymatex gel chromatography (step2). The unbound fractions obtained from DEAE-cellulose column (133ml) were pooled and applied to a column of GreenA Dymatex gel chromatography (2.5×8cm) equilibrated with 50mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15M NaCl/10mM CaCl₂/0.02% NaN₃. The enzymes were eluted with 0.3M NaCl and 2M NaCl in the column buffer containing 0.05% Brij35. The distribution of A₂₈₀ (···), gelatinolytic (●), collagenolytic (○) and Cm-Tf-degrading activity (▲) are shown. The fraction indicated were combined for further purification.

5mM CaCl₂/0.02% NaN₃ で平衡化した DEAE セルロースカラム (2.5×8cm) 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-1, 潜在型 MMP-2 及び潜在型 MMP-3 は素通り分画中に回収され、潜在型 MMP-2 の回収率は91%であった。

第2段階: DEAE セルロースカラムの素通り分画 (133ml) を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15M NaCl/10mM CaCl₂/0.02% NaN₃) で平衡化した GreenA Dymatex ゲルカラムクロマトグラフィー (2.5×8cm) にかけた。図1に示す如く、ほとんどの蛋白はこのカラムに結合しないが、潜在型 MMP-1, 潜在型 MMP-2 及び潜在型 MMP-3 の3つの酵素は吸着した。カラムを同緩衝液で洗浄後、0.3M NaCl と 2M NaCl を含む緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 7.5/10mM CaCl₂/0.05% Brij35/0.02% NaN₃) により順次これら酵素を溶出した。潜在型 MMP-2 と潜在型 MMP-3 の大部分は 0.3M NaCl により溶出された。また、潜在型 MMP-1 活性は 0.3M NaCl で徐々に出現し、2M NaCl によって完全に溶出された。前者の溶出分画分 (フラクション30-48, 86ml) を合わせて次の精製段階の材料とした (図1)。この段階での潜在型 MMP-2 の回収率は86%であり、22倍に精製された (表 I)。

第3段階: GreenA Dymatex ゲルカラムクロマトグラフィーによって得られた試料 (86ml) を、50mM Tris-HCl, pH 8.0/0.6M NaCl/5mM CaCl₂/0.05% Brij35/0.02% NaN₃ の緩衝液で平衡化した Affi-Gel-ゼラチンカラム (1×8cm) にかけた。ほとんどの潜在型 MMP-1 と MMP-3 活性は素通りするのに対し、潜在型 MMP-2 はこのカラムに吸着された (図2)。潜在型 MMP-2 は5%のジメチルスルフォキシドを含む同緩衝液で溶出され、潜在型 MMP-3 と完全に分離された (図2)。潜在型 MMP-2 分画分 (フラクション37-41, 9.5ml) の回

収率は75%で415倍に精製された (表 I)。

第4段階: Affi-Gel-ゼラチンクロマトグラフィーにより得られた潜在型 MMP-2 分画分 (9.5ml) を 20mM Tris-HCl, pH 7.5/20mM NaCl/5mM CaCl₂/0.05% Brij35/0.02% NaN₃ の緩衝液に十分透析後、同緩衝液で平衡化した DEAE セルロースカラム (0.7×10cm) にかけた。図3 A に示すように、カラムに吸着した潜在型 MMP-2 を、0.02M NaCl から 0.6M NaCl の濃度勾配をもつ緩衝液で溶出した。潜

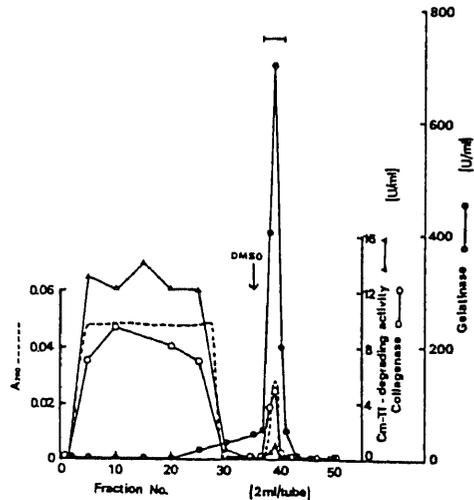


Fig. 2. Affi-Gel-gelatin chromatography (step3). The pool from GreenA Dymatex column (86ml) was chromatographed on a column of Affi-Gel-gelatin (1×8cm) equilibrated with 50mM Tris-HCl, pH 8.0/0.6M NaCl/5mM CaCl₂/0.05% Brij35/0.02% NaN₃. The absorbed gelatinolytic activity (●) was eluted with the column buffer containing 5% dimethylsulfoxide (DMSO) (v/v). The distribution of A₂₈₀ (•••), collagenolytic (○) and Cm-Tf-degrading activity (▲) are shown. The fractions indicated were combined for further purification.

Table I. PURIFICATION OF PROMMP-2

Step	Total protein (A ₂₈₀)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Concentrated medium	—	6081	—	—	100
DEAE-cellulose	100	5534	55	1	91
Green A Dymatex	4.4	5230	1189	22	86
Affi-Gel-gelatin	0.2	4561	22805	415	75
DEAE-cellulose	0.1	2554	25540	464	42

Concentration of protein was taken from the absorbance at 280 nm assuming that 1A₂₈₀=1mg/ml.

在型 MMP-2 活性は単一のピークをもつ曲線としてえられた。フラクション26-40の材料 (40 μ l) を SDS-PAGE 後銀染色し、フラクション27-29が単一のバンドの蛋白からなることを確認した (図3 B)。これらの分画を合わせて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-2 の精製

RA 滑膜細胞由来潜在型 MMP-2 の精製結果を表 I に示す。最終ステップの DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーは、図3 B に示すように SDS-PAGE 上分子量65,000, 30,000及び18,000の蛋白の除去に必要であった。また、このステップによってごく少量存在していた潜在型 MMP-1 活性は完全に除去された。

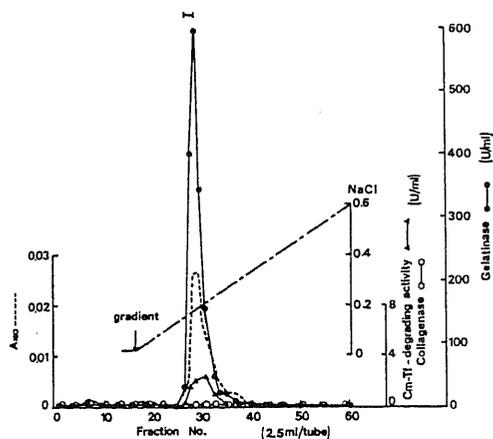
精製された潜在型 MMP-2 は還元の有無にかかわらず SDS-PAGE 上分子量74,000の位置に単一なバンドとして泳動された。また、ゼラチンに対する比活性は 1.0mM NH₂-Ph-Hg-Ac による活性化後で 25,540単位/mg 蛋白であった。最終的な回収率は培

Table 2. INHIBITORS

Inhibitors	Concentration	Inhibition (%)
EDTA	5.0 mM	96
	10.0 mM	100
1,10-Phenanthroline	1.0 mM	100
1,4-Dithiothreitol	0.5 mM	100
PMSF	2.0 mM	18
DIFP	2.0 mM	5
N-ethylmaleimide	10.0 mM	0
Pepstatin A	0.5 mM	19
Iodoacetamide	10.0 mM	0
	20.0 mM	0
Cysteine	1.0 mM	73
	2.0 mM	89
2-Mercaptoethanol	0.5 %	100
SDS	0.1 %	100
TIMP	0.32 IU	100

ProMMP-2 (2.1 units) was incubated with 1.0mM NH₂-Ph-Hg-Ac for 5min at 37°C and the enzymic activity was assayed at 37°C for 1h against ¹⁴C-gelatin in the presence of inhibitors indicated and 10mM Ca²⁺.

A



B Fraction No.

SB2627 28 29 30 31 33 36 40

kDa

94—
77—
68—
55—
43—
29—

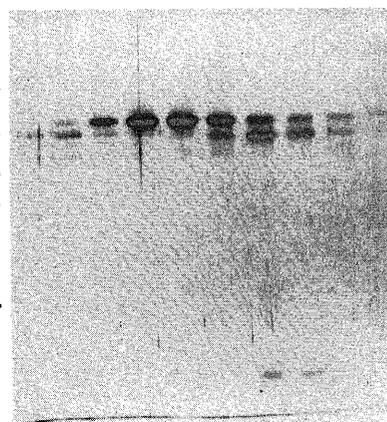


Fig. 3. DEAE-cellulose chromatography (step4) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the column fractions. (A) The combined fractions (9.5ml) from Affi-Gel-gelatin column were dialysed against 20mM Tris-HCl, pH 7.5/20mM NaCl/5mM CaCl₂/0.05% Brij35/0.02% NaN₃ and applied to a column of DEAE-cellulose (0.7×10cm) equilibrated with the same buffer. The gelatinolytic activity (●) was eluted with a linear gradient of NaCl (0.02M-0.6M) and the column eluate was monitored for A₂₈₀ (•••), collagenolytic (○) and Cm-Tf-degrading activity (▲). The peak fractions indicated were pooled as pure proMMP-2. (B) The samples from DEAE-cellulose column fractions (40 μ l) were analyzed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% total acrylamide) under the reduced conditions. The gel was stained with silver nitrate after the fixation with 50% methanol. SB, SDS-gel electrophoresis sample buffer without the sample from a column fraction.

養液中の活性を100%とすると42%であり、精製率は第1ステップの DEAE-セルロースカラムの分画分に対し464倍であった。

II. 潜在型 MMP-2 の安定性

精製した酵素を最終ステップの DEAE-セルロースカラムの緩衝液中で20°C、1～5週間保存しその活性を検討した。その結果、活性は5週間後に約80%に低下を示したが、保存中に自然活性化はみられなかった。

III. 各種阻害剤の影響

潜在型 MMP-2 (2.1単位) を 1.0mM NH₂-Ph-

Hg-Ac で37°C、5分間インキュベート後、37°C、1時間各種阻害剤の存在下でゼラチナーゼアッセイを行った。表II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及び TIMP によって MMP-2 活性は完全に阻害された。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、セリンプロテイナーゼ、システインプロテイナーゼ、アスパラギン酸プロテイ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 や MMP-3 と同様に金属依存性蛋白分解酵素に属す

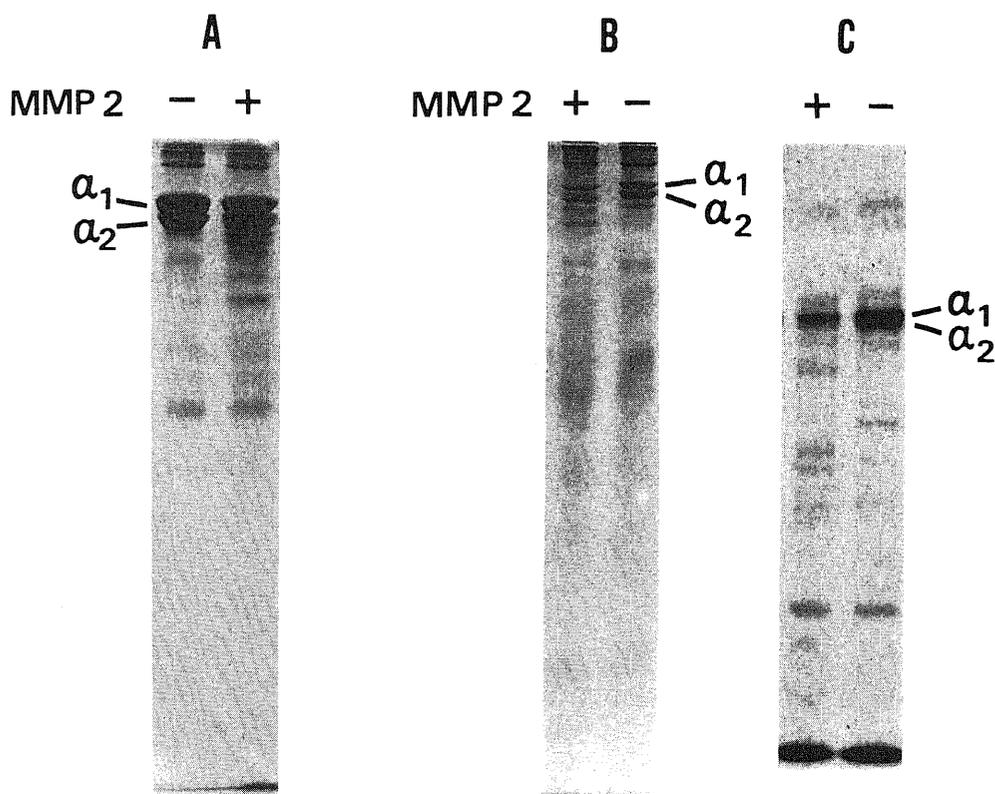


Fig. 4. Digestion of type V and IV collagens with MMP-2. (A) Type V collagen (20 μ g) from human placenta was incubated with MMP-2 (2.0 units) at 32°C for 20h. The reaction was terminated with 30mM EDTA and reaction products were run on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% total acrylamide) under the reduced conditions. (B) Type IV collagen (15 μ g) from mouse EHS sarcoma was incubated with MMP-2 (2.0 units) at 32°C for 20h. The reaction products were analyzed by the same way as described in Fig. 4A. (C) [³H] proline-labeled type IV collagen prepared by the culture of rat yolk sac was incubated with MMP-2 (3.1 units) at 32°C for 24h. The reaction was terminated with 30mM EDTA and the products were analyzed by fluorography after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (6% total acrylamide) under the reduced conditions. α_1 and α_2 chains of each collagen are shown on the gels. +, in the presence of MMP-2; -, in the absence of MMP-2.

ることを示している。

IV. MMP-2 の基質特異性

表 I で示したように、 $1\mu\text{g}$ の活性型 MMP-2 は I 型ゼラチンを 1 分間に $25.5\mu\text{g}$ 分解した。また SDS-PAGE ではゼラチンの α_1 鎖と α_2 鎖はともに同じ割合で分解された。また、同様に $1\mu\text{g}$ の活性型 MMP-2 は 1 分間当たり 20ng のプロテオグリカンと 226ng のカルボキシメチル化トランスフェリンを分解した。しかしエラスチンの分解はきわめてわずかであり、 $1\mu\text{g}$ の活性型 MMP-2 は 1 分間当たり 8ng のエラスチンを分解するにすぎない。また、I 型コラーゲンに対する活性は認められなかった。

活性型 MMP-2 は V 型コラーゲンを分解し、SDS-PAGE ではその α 鎖 (分子量 $\alpha_1 = 170,000$,

$\alpha_2 = 140,000$) は分子量 $135,000 \sim 80,000$ の数本のフラグメントに低分子化した (図 4 A)。また、IV 型コラーゲン (マウス EHS 肉腫由来) も分解された。 α 鎖はその分子量がおよそ $10,000$ 低分子化し、また分子量 $160,000$ と $140,000$ の二つの主要なフラグメントの出現が認められた (図 4 B)。また、ラット卵黄嚢由来 IV 型コラーゲンの α 鎖は分子量 $155,000$ 、 $110,000$ と $100,000$ の 3 種類のフラグメントに分解された (図 4 C)。さらに、MMP-2 の作用によりラミニンの A 鎖の部分的消化と B 鎖の低分子化がみられた (図 5)。しかし、フィブロネクチンは分解されなかった。

V. 潜在型 MMP-2 の活性化機構

1. $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$ による潜在型 MMP-2 の活性化

1) 活性化の経時的变化

潜在型 MMP-2 (2.1 単位) を、 0.1 、 0.5 、 1.0 及び 1.5mM $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$ と 37°C で 5 分から 24 時間インキュベートし、活性化された MMP-2 活性を ^{14}C -ゼラチンを基質として 37°C 、90 分間アッセイした。図 6 に示すように、潜在型 MMP-2 の活性化は 1.0mM までは $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$ の濃度に依存性で、 1.0mM 、5 分間処理で 100% の活性化が認められた。しかし、 1.5mM では 80% までしか活性化されなかった。また $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$ による活性化後 MMP-2 活性はきわめて不安定であった。すなわち、 1.0mM

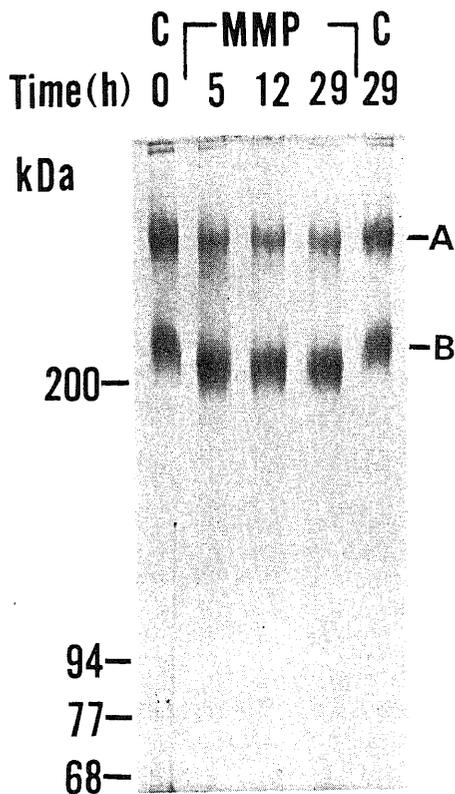


Fig. 5. Degradation of laminin with MMP-2. Laminin ($15\mu\text{g}$) was incubated with MMP-2 (3.1units) for 0-29h at 37°C . The reaction products were analyzed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (5% total acrylamide) under the reduced conditions after the termination of the reaction with 50mM EDTA. A, A chain; B, B chain.

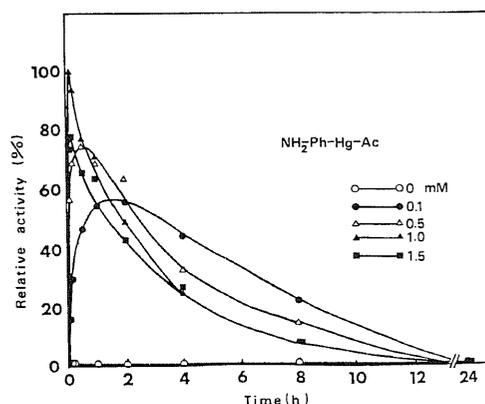


Fig. 6. Time course of proMMP-2 activation with $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$. proMMP-2 (2.1units) was incubated at 37°C with different concentrations of $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$: 0mM (\circ); 0.1mM (\bullet); 0.5mM (\triangle); 1.0mM (\blacktriangle); 1.5mM (\blacksquare). The enzymic activity of activated proMMP-2 was assayed against ^{14}C -gelatin ($750\mu\text{g/ml}$) for 1.5h at 37°C .

$\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ による活性化の場合では、2時間の処理でその活性は最大活性化時の約半分となり、7時間で10%、24時間反応で活性は完全に消失した(図6)。このような活性の不安定性は、活性化後“スピнкаラム”²⁰⁾によるゲル濾過で $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ を除去しても全く変化は認められなかった。

次いで、 $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ により活性化された活性型 MMP-2 が潜在型 MMP-2 を活性化するかどうかを検討した。潜在型 MMP-2 を 1.0mM $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ で 25°C、10分間処理することにより全活性の9%だけ活性化し、 $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ を“スピнкаラム”で除去後試料をさらに37°Cで反応した。その結果、活性型 MMP-2 による潜在型 MMP-2 の活性化は観察されなかった。

また、 $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ の活性化に酵素蛋白のチオール基が関与するかを検討した。まず、潜在型 MMP-2 (2.1単位) を 10mM と 20mM ヨードアセトアミドで処理 (22°C、20分間) し、チオール基を化学的に修飾した。次いで、1.0mM $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ 処

理 (37°C、30分間) により活性化を行った所、活性化は全く阻害されなかった。

2) 活性化に伴う潜在型 MMP-2 の分子量の変化
潜在型 MMP-2 を ¹²⁵I で標識し、活性化に伴う分子量の変化を SDS-PAGE 後のオートラジオグラフィで検討した。¹²⁵I での標識に伴う酵素活性の失活や自然活性化は認められなかった(図7)。

活性型 MMP-2 の分子量を知るために、図6と全く同様の条件で潜在型 MMP-2 を 1.0mM $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ で活性化し、オートラジオグラフィ像と活性化曲線(図6)とを比較した。図8に示す如く、潜在型 MMP-2 (分子量74,000) は $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ で5分から1時間処理後分子量67,000(還元状態)に低分子化し、4時間以後67,000の分子は徐々に消失し分子量34,000と30,000のフラグメントへと分解された。非還元材料においても同様で、まず分子量70,000に低分子化し、次いで分子量36,000と26,000の2つのフラグメントに変化した。図6の活性化曲線との比較から分子量が還元状態で67,000、非還元

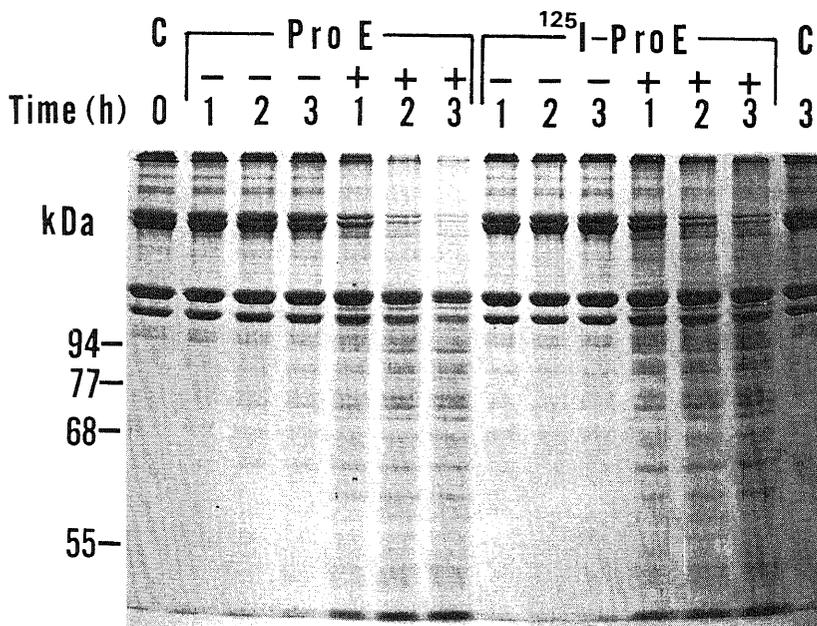


Fig. 7. Effects of radioiodination on proMMP-2. Type I gelatin (20 μ g) was incubated for 1-3h at 37°C with 0.007 units of proMMP-2 (ProE) or ¹²⁵I-labeled proMMP-2 (¹²⁵I-ProE) with (+) or without (-) activation by 1.0mM $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$. After terminating the reaction with 30mM EDTA, the samples were applied to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% total acrylamide) under the reduced conditions. Lanes C-0 and C-3 are the same amount of gelatin incubated without enzyme for 0 and 3h, respectively.

状態で70,000の蛋白が活性型 MMP-2 と考えられた。

潜在型 MMP-2 の分子量の変化に対する温度の影響をみる目的で、 ^{125}I 標識潜在型 MMP-2 を 0°C 、 4°C 、 25°C 及び 37°C の各温度で $1.0\text{mM NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ とともにインキュベートした。その結果潜在型 MMP-2 の低分子化は温度依存性、つまり温度が高い程より速く低分子化することが明らかとなった (図9)。また、潜在型 MMP-2 分子の $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ による低分子化は 20mM EDTA 存在下で完全に阻害された。

2. 種々のセリンプロテイナーゼによる潜在型 MMP-2 の活性化

潜在型 MMP-1 や潜在型 MMP-3 を活性化するトリプシンについてまず検討した。潜在型 MMP-2 (2.1単位) を 0.1 、 1 、 10 、 $100\mu\text{g/ml}$ のトリプシンと5分間から30時間、 22°C で反応後、トリプシンの

活性を5倍量のトリプシンインヒビターで阻害しゼラチン分解活性を測定した。その結果トリプシンでは潜在型 MMP-2 の活性化は認められなかった。また、同様にプラスミン (0.1 、 1 、 10 、 $100\mu\text{g}$)、トロンビン (0.1 、 1 、 10 、 $50\mu\text{g/ml}$)、好中球エラスターゼ (0.1 、 1 、 10 、 $50\mu\text{g/ml}$)、及びカテプシンG (0.1 、 1 、 10 、 $50\mu\text{g/ml}$) のいずれによっても潜在型 MMP-2 は活性化されなかった。

考 察

RA 滑膜細胞は培養下で MMP-1 (コラゲナーゼ)、MMP-2 (ゼラチナーゼ) 及び MMP-3 (stromelysin) を合成・分泌する⁶⁾。これらのうち MMP-1 は Woolley ら³⁾により、MMP-3 は Okada ら⁹⁾によりすでに単離精製され、その性質に関してはかなり明らかにされている。MMP-2 についても、ヒ

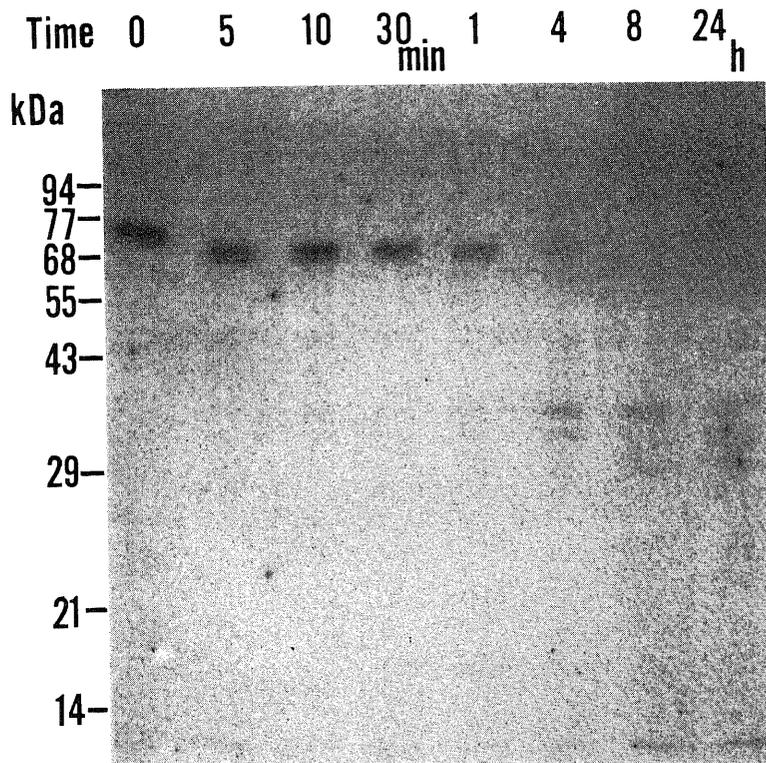


Fig. 8. Conversion of proMMP-2 during its activation with $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$. A mixture of ^{125}I -labeled proMMP-2 (0.4units) and unlabeled proMMP-2 (1.7units) was first incubated with $1.0\text{mM NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ at 37°C for 5min-24h. The samples were then incubated with type I gelatin ($750\mu\text{g/ml}$) for 1.5h at 37°C and analyzed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% total acrylamide) under the reduced conditions after the termination of the reaction with 40mM EDTA . The gel was dried and autoradiographed.

ト皮膚組織⁹⁾、ラット骨組織⁹⁾及びヒト好中球¹⁴⁾培養液より精製されている。しかし RA 滑膜細胞由来の MMP-2 はいまだ精製されていない。

本研究では、RA 滑膜細胞培養液より、4つのカラムクロマトグラフィーを組み合わせることによって、42%の高い回収率をもって潜在型のゼラチン分解酵素活性を単離精製した。精製された本酵素はその分子量が74,000で I 型ゼラチンに対する比活性は25,540単位/mg 蛋白である。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および TIMP により阻害されるのに対し、セリンプロテイナーゼ、システインプロテイナーゼおよびアスパラギン酸プロテイナーゼなどの阻害剤ではその活性は失われない。これらのデータより精製された本酵素がゼラチンに対し高い比活性をもつ金属依存性蛋白分解酵素、すなわち潜在型 MMP-2 (ゼラチナーゼ) であることは明白である。

関節軟骨、骨及び靭帯の主要コラーゲンである I, II, III型コラーゲンは MMP-1 と MMP-2 の協同作用によって分解されることが Harris ら¹⁰⁾によって提唱されてきた。すなわち、MMP-1 はこれらコラーゲンをその分子のアミノ基末端より 3/4 の部位で特異的に切断するのみで、その分解産物の熱変性したゼラチンに対してはきわめて低い活性しか示さないと報告されている²⁰⁾。これに対して、MMP-2 はゼラチンに対して高い比活性を有し、MMP-1 のコラーゲン分解活性は少量の MMP-2 活性の存在で著しく増強されることが報告されている⁹⁾。本研究においても MMP-2 の I 型ゼラチンに対する比活性はプロテオグリカンやエラスチンに対するその1300倍と3200倍を示し、I 型コラーゲンやフィブロネクチンに対しては全く活性は認められなかった。これらのデータは本酵素の生体内における主たる役割が、すでに Harris ら¹⁰⁾によって提唱されたようにゼラチンの分

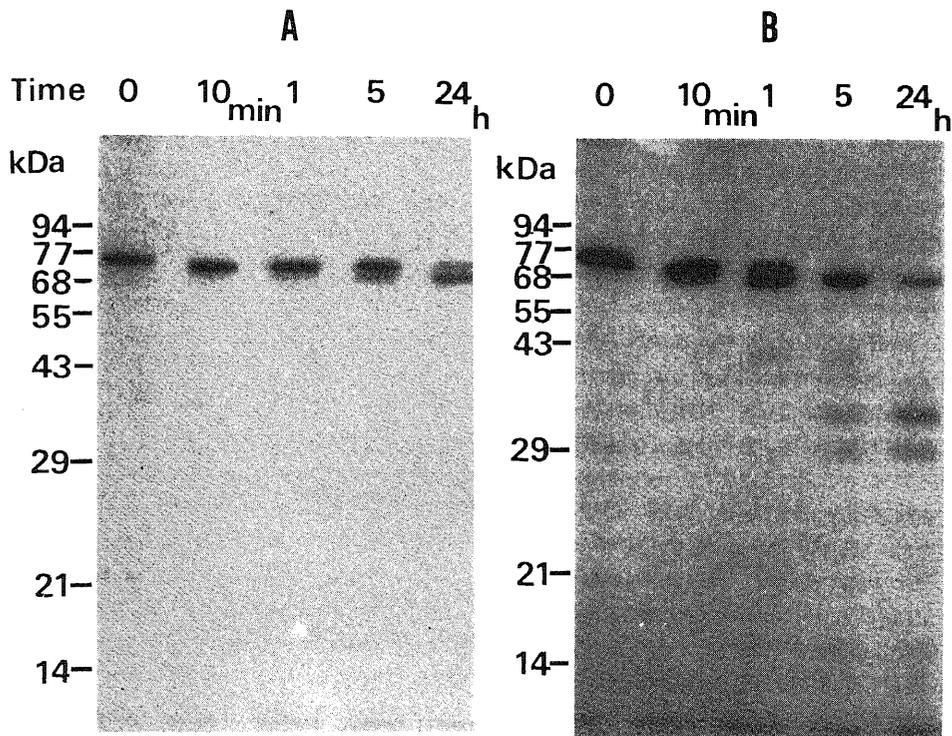


Fig. 9. Conversion of proMMP-2 during incubation with $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$ at 0 and 25°C. A mixture of ^{125}I -proMMP-2 (0.4unit) and unlabeled proMMP-2 (1.7units) was incubated with 1.0mM $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$ at 0°C (A) and 25°C (B) for 10min-24h. The reaction was stopped with 40mM EDTA and products were analyzed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% total acrylamide) under the reduced conditions. The gels were dried and autoradiographed.

解にあることを強く示唆している。しかし、Murphy ら⁹⁾はウサギ骨組織由来 MMP-2 がIV型及びV型コラーゲンを分解することを報告している。また、ウサギマクロファージ由来の金属依存性蛋白分解酵素がゼラチンとV型コラーゲンを分解することも知られている²⁰⁾。本研究においても MMP-2 はこれらのIV型とV型コラーゲンのみならず、ラミニンをも分解することが明らかとなった。IV型コラーゲンやラミニンは基底膜の主要構成成分であり²⁰⁾、V型コラーゲンは細胞表面や基底膜に近接して存在することが知られている²⁰⁾。従って、これらのことから MMP-2 は間質性コラーゲンのみならず基底膜の分解にも関与する可能性があるかと推定される。

MMP-1, 2, 3 に共通した重要な特徴の一つは、これら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、生体内で作用するためにはそれらの活性化は不可欠のステップである。潜在型 MMP-1 と潜在型 MMP-3 に関しては、二つの方法によって活性化されると報告されている^{20,27)}。まず第一の方法は、トリプシンやプラスミンなどの作用でこれら潜在型酵素が限定分解をうけて活性化される場合である。また、他の方法は $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ 処理による活性化である。潜在型 MMP-2 においては、本研究で示した如くトリプシンやプラスミンでは全く活性化されなかったが、このことは潜在型 MMP-1 や MMP-3 の活性化機序と著しく異なる点である。

潜在型 MMP-2 は $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ による短時間処理で容易に活性化され、活性化に伴い潜在型 MMP-2 蛋白は低分子化した。 $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ 自身には酵素活性がないことや酵素の低分子化の速度が温度依存性であること、さらにこの反応が EDTA によって完全に阻害されることは、 $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ による活性化が MMP-2 自身による自己活性化であることを示している。しかし、 $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ による潜在型 MMP-2 の分子レベルでの活性化機構については本研究ではなお十分明らかではない。潜在型 MMP-3 に対しては $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ はその分子中のチオール基と反応することにより自己活性化をきたすと考えられている²⁰⁾。しかし、潜在型 MMP-2 はヨードアセトアミドにより酵素中のチオール基を化学的に修飾した後でも $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ によって活性化されることから、その活性化にチオール基が関与する可能性は少ないと推定される。おそらく $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ は潜在型 MMP-2 分子とチオール基以外の何らかの方法で作用し、すでに潜在型の

MMP-1 や MMP-3 で示されているように、その酵素蛋白のコンフォメーションの変化を引き起こし自己活性化に至ると推測される。

$\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ による活性化に伴い潜在型 MMP-2 は低分子化するが、その活性と分子量の比較から活性型 MMP-2 の分子量が還元状態で 70,000、還元状態で 67,000、であることは明らかである。しかし、図 6 にみられる如く、MMP-2 は活性化後きわめて不安定であり、37°C で 24 時間反応するとその活性は完全に失活した。また、活性の失活は $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ の有無にかかわらず生じた。これらのデータは、MMP-2 が基質の少ない状態では活性型酵素として存在しにくいことを示唆している。潜在型 MMP-2 は 20°C、5 週間放置後もなお約 80% の活性を保持することから、生体内においては MMP-2 は潜在型酵素として存在し、コラーゲン分解の進行とともにその局所で活性化を受けるものと考えられる。生体内における潜在型 MMP-2 の活性化因子については現在のところ全く不明である。しかし、本研究における $\text{NH}_2\text{Ph-Hg-Ac}$ による活性化機構のデータより、潜在型 MMP-2 は活性酸素や何らかの物質の作用により酵素蛋白のコンフォメーションに変化をきたし自己活性化が生ずると推定される。実際、潜在型 MMP-1 を活性化させる蛋白の存在²⁸⁾や好中球コラゲナーゼが活性酸素によって活性化される^{29,30)}ことが報告されている。今後、生体内に存在する潜在型 MMP-2 活性化因子の検索がきわめて重要と考えられる。

結 論

RA 滑膜細胞培養液より潜在型 MMP-2 を単離精製して、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-2 は 4 つのカラムクロマトグラフィによって精製され、還元の有無にかかわらず SDS-PAGE 上分子量 74,000 の単一標品として泳動された。本酵素の精製率は 464 倍で回収率は 42% であった。

2. MMP-2 活性は各種キレート剤や TIMP によって阻害され、金属依存性蛋白分解酵素であることが示された。

3. 本酵素はゼラチンに対して著しい活性があり、その比活性はプロテオグリカンやエラスチンに対するその 1300 倍と 3200 倍に相当した。また、IV型とV型コラーゲン及びラミニンが本酵素によって分解された。しかし、I型コラーゲンとフィブロネクチ

ンに対する分解活性は認められなかった。

4. 潜在型 MMP-2 は 1.0mM $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$ で 37°C, 5 分間処理によって最も強く活性化され、活性化後は急速に失活した。 $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$ 処理に伴い潜在型 MMP-2 は還元状態で分子量 67,000 (非還元状態で 70,000) の活性型 MMP-2 に低分子化し、反応時間とともにより小さいフラグメントに分解された。活性化に伴う分子量の変化は温度依存性であり、EDTA 存在下で阻害された。これらのデータは $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$ による潜在型 MMP-2 の活性化が本酵素蛋白のコンフォメーションの変化に基づく自己活性化であることを強く示唆している。

5. 潜在型 MMP-2 はトリプシン、プラスミン、トロンビン、好中球エラスターゼ及び好中球カテプシン G によって全く活性化されなかった。

以上のデータより、本酵素はゼラチン分解酵素としてコラーゲンの分解に関与するのみならず、基底膜の破壊に何らかの役割を果すと考えられた。また、生体内においては潜在型 MMP-2 蛋白のコンフォメーションを変化させる因子の作用により活性化されると推定された。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師野村進教授に深甚なる謝意を表します。また、本稿の御校閲を賜りました金沢大学医学部第一病理学教室中西功夫教授、本研究を直接御指導、御教示頂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、御指導、御協力頂いた金沢大学医学部整形外科教室非常勤講師宗広忠平博士ならびに第一病理学教室教室員の方々へ心より感謝いたします。

文 献

- 1) Harris, E. D. Jr.: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **182**, 14-23 (1984).
- 2) Evanson, J. M., Jeffrey, J. J. & Krane, S. M.: Studies on collagenase from rheumatoid synovium in tissue culture. *J. Clin. Invest.*, **47**, 2623-2651 (1968).
- 3) Woolley, D. E., Glanville, R. W., Crossley, M. J. & Evanson, J. M.: Purification of rheumatoid synovial collagenase and its action on soluble and insoluble collagen. *Eur. J. Biochem.*, **54**, 611-622 (1975).
- 4) Seltzer, J. L., Adams, S. A., Grant, G. A. & Eisen, A. Z.: Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J. Biol. Chem.*, **256**, 4662-4668 (1981).
- 5) 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. *Biochim. Biophys. Acta.*, **831**, 49-58 (1985).
- 6) Okada, Y., Nagase, H. & Harris, E. D. Jr.: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14245-14255 (1986).
- 7) Galloway W. A., Murphy, G., Sandy, J. D., Gavrilovic, J., Cawston, T. E. & Reynolds, J. J.: Purification and characterization of a rabbit bone metalloproteinase that degrades proteoglycan and other connective-tissue components. *Biochem. J.*, **209**, 741-752 (1983).
- 8) Chin, J. R., Murphy, G. & Werb, Z.: Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12367-12376 (1985).
- 9) Schmid, T. M., Mayne, R., Jeffrey, J. J. & Linsenmayer, T. F.: Type X collagen contains two cleavage sites for a vertebrate collagenase. *J. Biol. Chem.*, **261**, 4184-4189 (1986).
- 10) Harris, E. D., Jr. & Krane, S. M.: An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochem. Biophys. Acta.*, **258**, 566-576 (1972).
- 11) 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**, 24930-24950 (1985).
- 12) Mainardi, C. L., Seyer, J. M. & Kang, A. H.: Type-specific collagenolysis: A type V collagen-degrading enzyme from macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 1108-1115 (1980).
- 13) Dayer, J. M., Krane, S. M., Russell, R. G. G. & Robinson, D. R.: Production of collagenase and prostaglandins by isolated adherent rheumatoid synovial cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*

USA, 73, 945-949 (1976).

- 14) **Cawston, T. E. & Barrett, A. J.:** A rapid and reproducible assay for collagenase using [^{14}C] acetylated collagen. *Anal. Biochem.*, 99, 340-345 (1979).
- 15) **Gisslow, M. T. & McBride, B. C.:** A rapid sensitive collagenase assay. *Anal. Biochem.*, 68, 70-78 (1975).
- 16) **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).
- 17) **Yu, S. Y. & Yosida, A.:** Amorphous [^{14}C] elastin as a substrate for assaying elastolytic enzyme in cellular and tissue extracts. *Biochem. Med.*, 21, 108-120 (1979).
- 18) **Laemmli, U. K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- 19) **Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P. & Hancock, R.:** Silver Staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 118, 197-203 (1981).
- 20) **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).
- 21) **Penefsky, H. S.:** Reversible binding P_i by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 252, 2891-2899 (1977).
- 22) **McCroskery, P. A., Wood, S., Jr. & Harris, E. D., Jr.:** Gelatin: A poor substrate for a mammalian collagenase. *Science*, 182, 70-71 (1973).
- 23) **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 Rel. Res.*, 4, 479-494 (1984).
- 24) **Timpl, R. & Dziadek, M.:** Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 29, 1-112 (1986).
- 25) **Konomi, H., Hayashi, T., Nakayasu, K. & Arima, M.:** Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung and skin. *Am. J. Pathol.*, 116, 417-426 (1984).
- 26) **Stricklin, G. P., Jeffrey, J. J., Roswit, W. T. & Eisen, A. Z.:** Human skin fibroblast procollagenase: Mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. *Biochemistry*, 22, 61-68 (1983).
- 27) **Okada, Y., Harris, E. D. & 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.* (投稿中).
- 28) **Tyree, B., Seltzer, J. L., Halme, J., Jeffrey, J. J. & Eisen, A. Z.:** The stoichiometric activation of human skin fibroblast procollagenase by factors present in human skin and rat uterus. *Arch. Biochem. Biophys.*, 208, 440-443 (1981).
- 29) **Weiss, S. J., Peppin, G., Drtiz, X., Ragsdale, C. & Test, S. T.:** Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science*, 227, 747-749 (1985).
- 30) **Burkhardt, H., Schwingel, M., Menninger, H., Macartney, H. W. & Tschesche, H.:** Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. Direct degradative effect on matrix components and indirect action via activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes. *Arthritis Rheum.*, 29, 379-387 (1986).

Characterization and Activation Mechanisms of Matrix Metalloproteinase 2 (Gelatinase) from Human Rheumatoid Synovial Cells Atsushi Yasui, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., 97, 750—763 (1988)

Key words: metalloproteinase, characterization, activation, rheumatoid arthritis, synovial cells

Abstract

In order to study properties and activation mechanisms of the zymogen of matrix metalloproteinase 2 (proMMP-2), proMMP-2 was purified by four chromatographic steps from the culture medium of rheumatoid synovial cells treated with macrophage conditioned medium. Purified proMMP-2 was homogeneous on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with $M_r=74,000$ under reduced or nonreduced conditions. The enzymic activity was inhibited by EDTA, 1,10-phenanthroline and tissue inhibitor of metalloproteinases, but not by inhibitors for cysteine, serine, or aspartic proteinases. The proteinase degraded type I gelatin ($27.6 \mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ enzyme protein at 37°C) and had a limited ability to digest proteoglycan ($20\text{ng}/\text{min}/\mu\text{g}$ enzyme protein at 37°C) and amorphous elastin ($8\text{ng}/\text{min}/\mu\text{g}$ enzyme protein at 37°C). Both type IV and V collagens were degraded by MMP-2 at 32°C , and laminin was also cleaved at 37°C , but type I collagen or fibronectin was not. These results suggest the possibility that MMP-2 plays important roles not only in the degradation of interstitial collagens synergistically with collagenase, but also in the breakdown of basement membrane components. proMMP-2 was activated maximally by incubation with 1.0mM aminophenylmercuric acetate ($\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$) for 5min at 37°C followed by the assay against ^{14}C -gelatin for 1.5h at 37°C . The activity was unstable after the activation with $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$ and the instability was not influenced by the presence or absence of $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$. During activation with 1.0mM $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$, proMMP-2 was converted to an active species of $M_r=67,000$ (under reduced conditions) and then into smaller fragments that have no enzymic activity. The conversion of the proMMP-2 molecule to a lower molecular weight species by the action with $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$ was temperature-dependent and prevented in the presence of EDTA. Endopeptidases including trypsin, plasmin, thrombin, neutrophil elastase and neutrophil cathepsin G did not activate proMMP-2. This suggests that proMMP-2 should be activated by factor (s) capable of perturbing the conformation of the molecule, but not by limited proteolysis by endopeptidases.