Journal of Korean Association
of Cancer Prevention
1999; 4(1): 17-24

두툽상어에서 Membrane Type-3 Matrix Metalloproteinase (MT3-MMP) 유전자의 클로닝

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과

김명순 · 배문경 · 김지태 · 송현석 · 안미영
김종원 · 임운기 · 김규원 · 김영진

Cloning of Membrane Type-3 Matrix Metalloproteinase (MT3-MMP) Gene from *Scyliorhinus Torazame*

Myung-Soon Kim, Moon-Kyoung Bae, Ji Tae Kim, Hyun Seok Song
Mee-Young Ahn, Jong Won Kim, Woon Ki Lim
Kyu-Won Kim, and Yung-Jin Kim

Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-binding endopeptides that collectively degrade the constituent macromolecules of the extracellular matrix. Thus, the MMPs are thought to play important roles during organ morphogenesis, embryonic development and pathological processes. However, MMP genes, including MT-MMPs, were previously cloned and their functions were studied in mammalians such as human, mouse, and chick, but not yet in fishes. In this study, we cloned the 5'region and 3'region of shark MT3-MMP gene and analyzed their sequences in comparison with those of other species. The nucleotide sequence of the 450 bp PCR product by 5'RACE is 74% identical to MT3-MMP genes of human, rat, and chick, by the *Genbank* nucleotide data base search. Also, 5'region of shark MT3-MMP contains 37 bp 5'UTR (untranslated region), start codon (ATG), the putative signal peptide, and cystein switch domain (RXKR motif). The nucleotide sequence of the 1,400 bp 3'LD-PCR product shows 80% homologies to the MT3-MMP of them. 5'region of shark MT3-MMP contains stop codon (TGA) and 76 bp of the putative transmembrane domain.

Key Words: Membrane type matrix metalloproteinase, Shark

서 론

혈관신생(angiogenesis)은 종양의 성장 및 전이 등과 같은 병적인 과정을 유도하기도 하고, 착상, 배의 발생과 상처 치유 등 정상적 생리 활동에서도 중요한 역할을 담당한다. 이러한 혈관신생은 혈관내피세포의 증식 및 이동을 유도하는 활성인자와 저해인자의 균형에 의해 조절 받게 된다.[1)]

특히, matrix metalloproteinase (MMP)는 collagen이나 proteoglycan과 같은 세포외 기질 구성성분을 분해하는데 관여하는 효소로서 정상적으로는 척추동물의 배 발생과정과 조직의 재배열에 중요한 역할을 하는

책임저자 : 김영진, ㉾ 609-735, 부산시 금정구 장전동 30, 부산대학교 자연과학대학 분자생물학과
Tel: 051-510-2176, Fax: 051-513-9258, E-mail: yjinkim@hyowon.cc.pusan.ac.kr

효소군이다.[2,3] 그러나, 최근 이들 효소군은 악성 암세포가 이웃하는 세포들로부터 떨어져 나와 주변의 기질을 파괴하고 이동하여 혈관기저세포 안으로 침투하는 암 전이과정에서 세포외 기질성분들을 파괴하여 암세포의 전이가 용이하도록 하는데 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[4,5,7~10] MMP는 zymogen이라는 효소활성이 없는 상태로 만들어져 N말단 부위(약 10 kDa)를 제거함에 의해 활성을 갖게 되며, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)에 의해 효소활성이 저해되고 혈관신생의 균형을 조절하게 된다.

지금까지 많은 종류의 MMPs가 주로 soluble form으로 클로닝되었는데, 기질에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysin으로 구분할 수 있으며, 최근에는 membrane-type으로써 세포표면에 위치하는 membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP)가 클로닝되었고 progelatinase A (MMP-2)의 활성화를 매개하며 조직의 재배열에 관여하였다.[6]

MT-MMP를 포함한 MMPs 유전자는 주로 인간, 쥐, 닭과 같은 척추동물에서 cloning되어 그 기능이 연구되고 있고, 이들 대부분의 유전자가 특허 출원되어 있다. 하지만, 어류에서는 존재여부 및 그 연구결과가 전혀 보고된 바가 없었다.

본 연구에서는 이미 보고된 상어 MT3-MMP의 부분적 염기서열을 바탕으로 전체 염기서열을 얻기위해 RACE와 LD-PCR을 수행하였다.[11]

재료 및 방법

1) 재료

본 연구에 사용된 두툽상어(*Scyliorhinus torazame)*를 자갈치 창녕상회에서 구입하였다. 구입한 상어를 빨리 필요한 조직별로 절단한 다음, 액체 질소로 동결시켜서 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

2) 두툽상어 뇌에서부터 total RNA 분리

두툽상어 뇌로부터 total RNA를 분리하기 위하여 TRIZOL reagent (GIBCO BRL)를 사용하였다. 두툽 상어로부터 뇌를 분리한 다음 5 ml의 TRI ZOL reagent 내에서 homogenization을 한 후 상온에서 5분간 방치한다. 그 다음 1 ml의 chloroform을 첨가하고 15초간 강하게 흔들어 준 후 상온에서 2~3분 방치한다. 4°C, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층을 새 tube에 옮기고 여기에 0.5 ml isopropyl alcohol을 첨가한다. 그 다음 10분간 상온에서 방치하고 4°C, 15,000 rpm에서 원심분리하면 tube바닥에 흰색의 침전물이 생기는데 이 침전물이 total RNA이다. Total RNA 침천물을 75% ethanol로 간단하게 씻어주고 상온에서 5~10분간 말려 준 후 적정량의 DEPC-D.W로 total RNA를 녹인다. 그리고, 2.5 M LiCl를 넣은 후, 상온에서 1시간 동안 침전시킨다. 그후, RNA를 다시 70% ethanol로 2번정도 씻어주고, 상온에서 말린 다음 적정량의 DEPC-D.W에 녹인다.

3) 3'LD-PCR (Long distance RT-PCR)

두툽상어 MT-MMP의 3'부위를 클로닝하기 위하여 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 방법을 사용하였다. 먼저, 5 μg의 두툽상어 뇌의 total RNA와 SuperScript II RT (reverse transcriptase)를 사용하여 역전사 반응을 실시하였다 (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD). 그 결과, first strand cDNA를 획득하였다.

두툽상어 뇌 cDNA와 PCR 반응액 [10X PCR 완충용액, 2.5 mM $MgCl_2$, 1 uM $MMPsS_2$, 1 uM $MMPsAs_2$, 200 M each dNTP, 2.5 units Taq DNA polymerase]를 혼합하고, 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C, 3분의 순서로 30 cycle의 long-distance PCR (LD-PCR) 반응을 수행하여, DNA단편을 얻었다.

4) 5'RACE (rapid amplification of cDNA ends)

두툽상어 MT-MMP의 5말단 부위를 클로닝하기 위하여 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL)을 사용하였다. 5 μg의 두툽상어 뇌조직 total RNA를 사용하여 SuperScript II RT와 AP (Adaptor primer)로 역전사 반응을 수행하였다. 그 결과 first strand cDNA를 합성하였고, 이를 분리하여 5말단에 TdT를 사용하여 여러 개의 dCTP를 첨가하였다. 이렇게 준비된 상어 뇌 cDNA로 5'GSP1 (MMPs5'R-1)과 AAP를 사용하여 PCR반응을 수행하였다. 그리고, 생성된 PCR단편을 분리하여 이를 주형으로 하여, nested 5'GSP2 (MMPs5'R-2)와 AUAP로 다시 PCR을 수행하여 증폭하였다. 그 결과 생성된 5'RACE단편을 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 sequencing하였다.

5) cDNA 클로닝 및 유전자의 염기서열 분석

PCR반응을 통해 얻은 DNA단편들을 pGEM-T easy vector system (Promega, Madison, WI)을 이용하여, pGEM-T easy vector에 클로닝하였다. 그리고, *Pst1*과 *Apa1*의 제한효소를 이용하여 그 결합여부를 조사한 후, 확인된 재조합 plasmid를 Taq DyeDeoxy Terminator Cycle sequencing kit (ABI)를 이용하여 dideoxynucleotide chain termination method로 Automatic DNA sequencing을 수행하였다. DNA 서열 분석은 BLAST database program (NCBI)과 DNASIS program (Hitachi)을 이용하였다.

결 과

1) MT3-MMP primer제작

연골어류인 두툽 상어에서 MT3-MMP의 전체 염기서열을 얻기 위해 먼저, MMPs family들간 공통적으로 존재하는 구조적 특징을 살펴보면, 이들은 모두 보존성이 높은 Cystein switch domain과 Zinc-binding domain을 지니며, 그 외 signal peptide, prodomain, catalytic domain, hemopexin domain을 지닌다.[13] 그리고, MT-MMP는 다른 MMPs들과는 달리 membrane에 붙어있는 구조를 지니는데, 이는 N-말단부위에 공통적으로 존재하는 소수성(hydrophobic) 잔기가 많은 transmembrane domain때문이다. 이런 특징들과 이미 보고된 두툽 상어 MT3-MMP 염기서열을 기초로 하여 필요한 primer들을 제작하였다.[11] 이렇게 제작된 primer를 사용하여 5'RACE와 3'LD-PCR을 수행하였다. 본 실험에 사용한 primer들을 Table 1에 나타내었다.

2) 두툽상어 MT3-MMP 유전자의 5'부분 클로닝과 그 염기서열 분석

먼저, 제작된 유전자 특이적 primer들 (MMPs5'R- 1, MMPs5'R-2)를 사용하여 5'RACE를 수행하였다. 그 결

Table 1. Used primer sequence for RT-PCR and 5' RACE

Primers		Sequences	References
Primers for MT-MMPs cDNA	MMPsS1 MMPsAs1	5'-CCGCGGTGTGGGGTGCCGGA-3 5'-TGGCCGAGTTCGTGGGCGGCGAC-3'	*Korean J. Life Science*, 8, 235 (1998).
5' RACE gene specific primer	MMPs5'R-1 MMPs5'R-2	5'-CCAGGTCCAGGGAAATAAGCATGTGC-3' 5'-CCACTTCTGCCCAGTTAATGCG-3'	Result of PCR with sepecific primer set
Gene specific 3' primer for LD-PCR	MMPsS2 MMPsAs2	5'-CGTGCCTTTGATGTGTGGCAGAATG-3' 5'-TCACACCCACTCTTGCATAGAGCG-3'	Result of PCR with sepecific primer set
Adaptor Primer	*AP*	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC TTTTTTTTTTTTTTTT-3	Protocol of 3', 5' RACE system for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0 (GIBCO BRL)
Abridged Universal Amplification Primer	*AUAP*	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3	Protocol of 3', 5' RACE system for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0 (GIBCO BRL)
Abridged Anchor Primer	*AAP*	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGII GGGIIGGGIIG-3'	Protocol of 5' RACE system for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0 (GIBCO BRL)

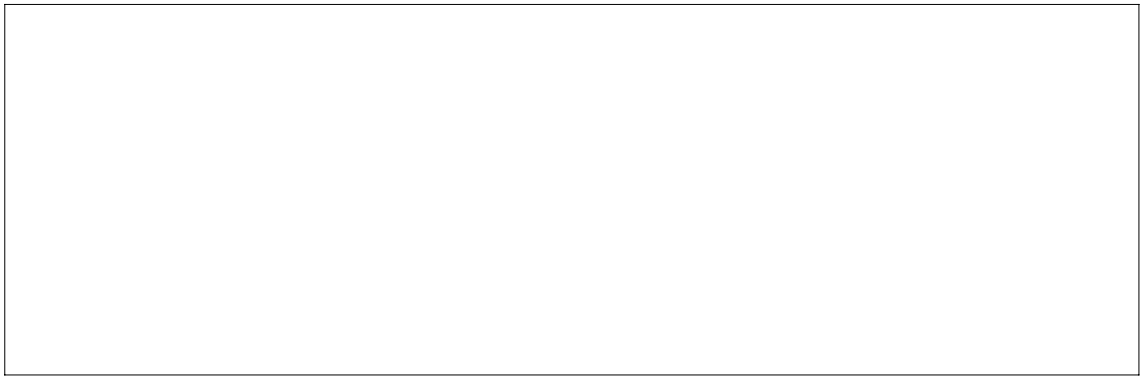

Fig. 1. Cloning of MT3-MMP 5'region in shark by 5' RACE. (A) amplified PCR products of 450 bp and 350 bp. (B) These PCR products are cloned into pGEM-T easy vector. 350 bp product is the partial region of 450 bp product. First lane shows 1kb size makers.

과, Fig. 1에서와 같이 350 bp와 450 bp PCR단편을 얻을 수 있었고, 이를 gel에서 분리하여, pGEM-T easy vector에 클로닝하였다. 각 클론을 제한 효소인 *Pst1*과 *Apa1*으로 잘라본 후, gel에 걸어 확인해본다. 확인된 재조합 plasmid를 sequencing하여, 각 클론의 염기서열을 분석하였다. 이 단편들은 모두 MT3-MMP와 상당한 유사성을 가지며, 350 bp 단편은 450 bp의 한 부분임을 확인하였다. 그리고, 5'부분에 시작 코돈(ATG)을 확인할 수 있었고, 37 bp의 5'비번역 부위(UTR: untranslated region)가 존재함을 확인하였다. 또한, 시작부위의 약 80 bp의 염기서열이 다른 부위에 비해 종간 다양성을 가짐을 확인할 수 있는데, 이 부분이 신호 펩티드(signal peptide)라 예상되어진다. 신호 펩티드는 모든 MMPs family에서 보여지나 아직 그 기능에 대해서는 보고된 바가 없다. 그리고, 말단부위에 cystein switch domain (RXKR motif: AGAAGAA-AGCG T)으로 예상되는 부분이 보인다. 이 domain은 MMP들간, 종간에도 굉장히 보존된부분으로 furin-type protease에 의해 인지되어 신호 펩티드와 catalytic domain사이에 존재하는 prodomian이 잘려나감으로써 활성화된다고 보고되어 있다.[12)]

상어 MT3-MMP 유전자의 5'부위의 DNA염기서열을 다른 종의 MT3-MMP와 비교한 결과, 약 74%의 유사성을 나타내었다(Fig. 2). 또한 아미노산 서열을 비교하면, 인간, 쥐, 닭의 MT3- MMP와 80%의 유사성을 보임을 알 수 있다(data not shown).

3) 두툽 상어 MT3-MMP 유전자의 3'부분 클로닝과 그 염기서열 분석

두툽 상어의 MT3-MMP 3'부위를 얻기 위해서, 인간, 쥐, 닭의 MT-MMP 유전자의 염기서열중 진화적으로 매우 보존성이 높은 부분의 primer (MMPsS_2, MMPsAs_2)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 약 1400 bp의 PCR 단편을 얻었고, 이를 역시 gel로부터 분리하여 pGEM-T easy vector에 클로닝한 다음, Pst1과 Apa1 제한효소로 잘라 확인한 후, 이중 10개의 클론을 sequencing하였다. 이렇게 얻은 염기서열을 여러 데이터 분석 프로그램으로 분석한 결과, 이 PCR 단편들이 다른 종의 MT3-MMP와 역시 상당히 높은 약 80%의 유사성을 보였으며, 이로써 두툽 상어의 MT3-MMP 3'말단부분 유전자임을 확인할 수 있었다(Fig. 4). C말단부위에 정지 코돈(TGA)을 확인할 수 있고, 5'RACE의 단편보다 종 간에 더 높은 유사성을 나타내었다. 그리고, 이 부분에 MMPs간 보존성이 높은 부분인 catalytic domain과 zinc-binding domain이 일부 포함되어있을 것이라고 예상되며, 말단 부위에는 putative transmembrane domain으로 보이는 76개의 DNA 염기서열(473 ~ 548)을 확인할 수 있었다.

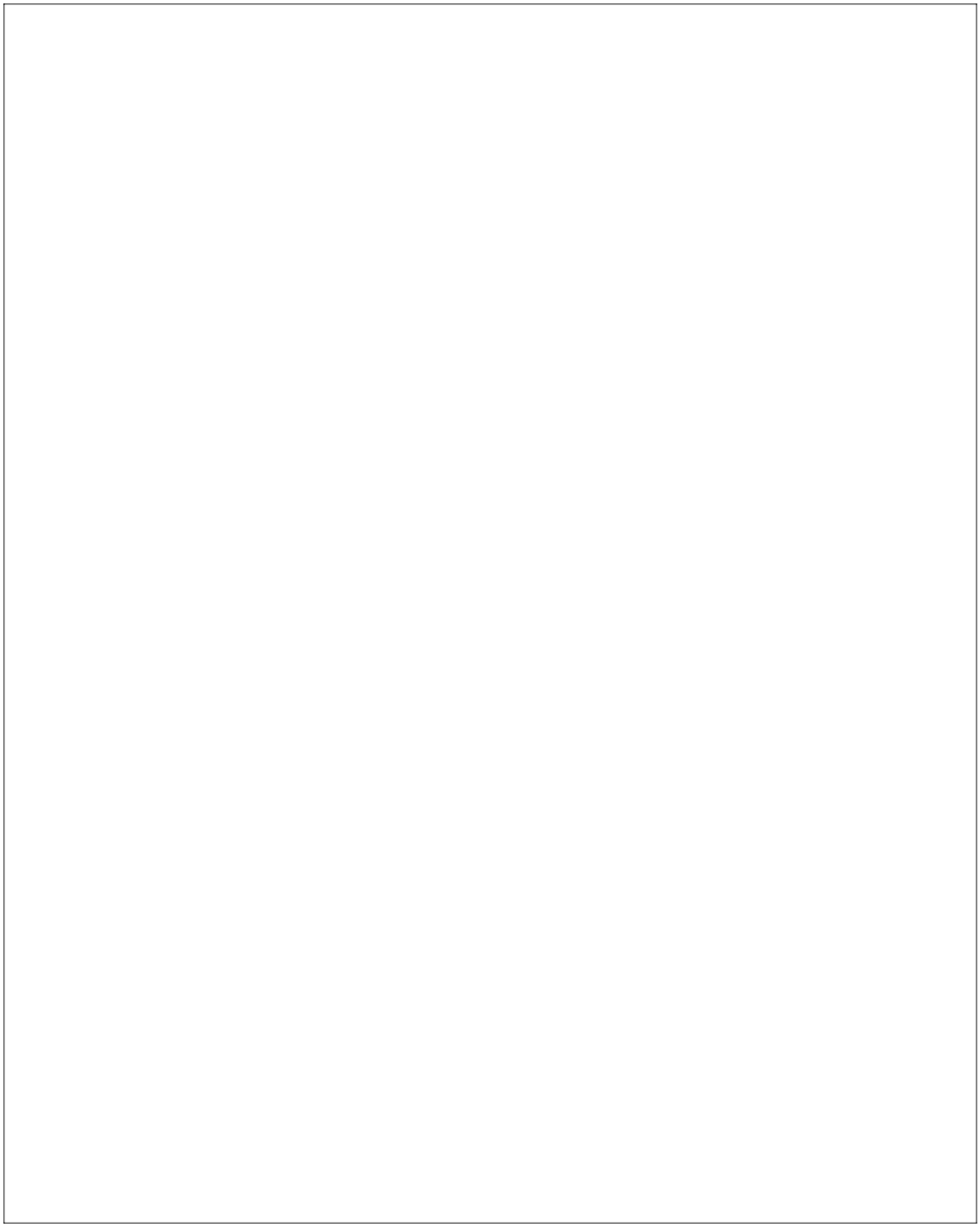

Fig. 2. Comparison of shark MT3-MMP 5'region with human, rat, chicken. Sequences in box are start codon (ATG) and Cystein switch domain (RXKR motif). Shark MT3-MMP gene is 74% identical to those of human, rat, and chick.

Fig. 3. Cloning of MT3-MMP 3'region in shark by LD-PCR (Long distance RT-PCR). (A) amplified PCR product of 1400 bp. (B) This product is cloned into pGEM-T easy vector. First lane shows 1kb size makers.

고 찰

Matrix metalloproteinases (MMPs)는 세포외 기질의 구성성분을 분해하는 효소로 이들은 정상적으로는 배발생, 상처 치유등의 과정에 관여하지만, 관절염, 암전이 및 종양의 성장같은 병적인 과정에도 관여한다.[10,13] 그래서, 생체내에서 이들의 작용을 적절히 조절하는 기작은 필수적이다. 먼저, MMPs의 억제자(inhibitor)로 알려진 TIMPs에 의해 MMPs의 효소활성을 조절할 수 있다. 그리고, 모든 MMPs는 비활성 상태로 만들어지는데, 그래서 이들의 활성화에 관여하는 MT-MMPs도 MMPs의 활성조절에 있어 중요한 역할을 할 것이다. 특히, MT-MMPs는 progelatinase A (proMMP-2)의 활성화에 관여함으로써 조직의 재배열이나 혈관 형성 등에 크게 작용한다고 보고되고있다.[14-16]

본 연구에서는 연골어류인 상어의 뇌 조직에서 MT-MMP family 중 하나인 MT3-MMP를 동정하였다. 상어는 대표적인 연골어류로 다른 종에 비해 혈관형성이 매우 제한적으로 일어나고 있다. 특히, 이들의 연골조직은 혈관 신생 억제 작용을 나타내는 것으로 이미 많은 보고가 되어지고있다.[17] 이러한 사실로 미루어보면 상어에서는 혈관 형성의 조절 기작이 조직 특이적이며 종 특이적인 면을 지니고 있음을 짐작할 수 있다. 그래서, 이런 종의 혈관형성은 어떤 기작에 의해 조절되어지는지 의문시되고 있다.

먼저, 보고된 상어 MT3-MMP의 부분적 염기서열을 바탕으로 해서[11] 5'RACE를 실시하여 유전자의 5'부분을 획득하였다(Fig. 1). 획득된 5'부위의 염기서열은 총 389 bp였으며, 37 bp의 5'비번역 부위(UTR)가 존재하였다(Fig. 1). 그리고, 다른 종, 인간, 쥐, 닭의 MT3-MMP유전자와 염기서열을 비교 분석해본 결과 약 74%의 유사성을 보였으며, 보존성이 높은 부위인 Cystein switch domain도 확인할 수 있었다(Fig. 2).

상어 MT3-MMP유전자의 3'부분은 3'LD-PCR을 실시하여 획득하였다(Fig. 3). 3'부분의 유전자는 총 1,400 bp의 염기서열로 구성되어 있었으며, 다른 종과 약 80%의 유사성을 보였다. 그리고, 이들 역시 MT-MMP유전자의 특이적인 부분인 transmembrane domain을 지녔으며, 말단부위에서는 정지 신호(TGA)를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

결과적으로 두툽 상어에서 동정한 MT3-MMP유전자는 다른 종의 유전자와도 높은 유사성을 보이며, 유사한 구조를 지님을 확인하였다. 그러므로, 이들의 기능 역시도 다른 종의 MT-MMP유전자와 유사할 것이라 예상된다. 상어의 혈관형성관여 유전자에 대한 앞으로의 연구들은 혈관형성의 기작에 대한 구체적인 이해를 촉진할 것이며, 또한 혈관형성이 어떻게 조절되어지는지에 대해서도 그 조절 기작을 예측할 수 있게 해 준다. 그래서, 혈관형성의 조절 기작을 이해하게 되면 결국은 혈관신생에 관계된 여러 질병의 치료방법을 개발하는데, 일익을 할 것으로 기대된다.

현재까지의 연구결과를 바탕으로 완전한 MT3-MMP 전체 염기서열을 얻기 위해 계속 연구 중이며, 그 유전자의 기능을 밝히기 위해 단백질 발현 연구도 진행 중에 있다.

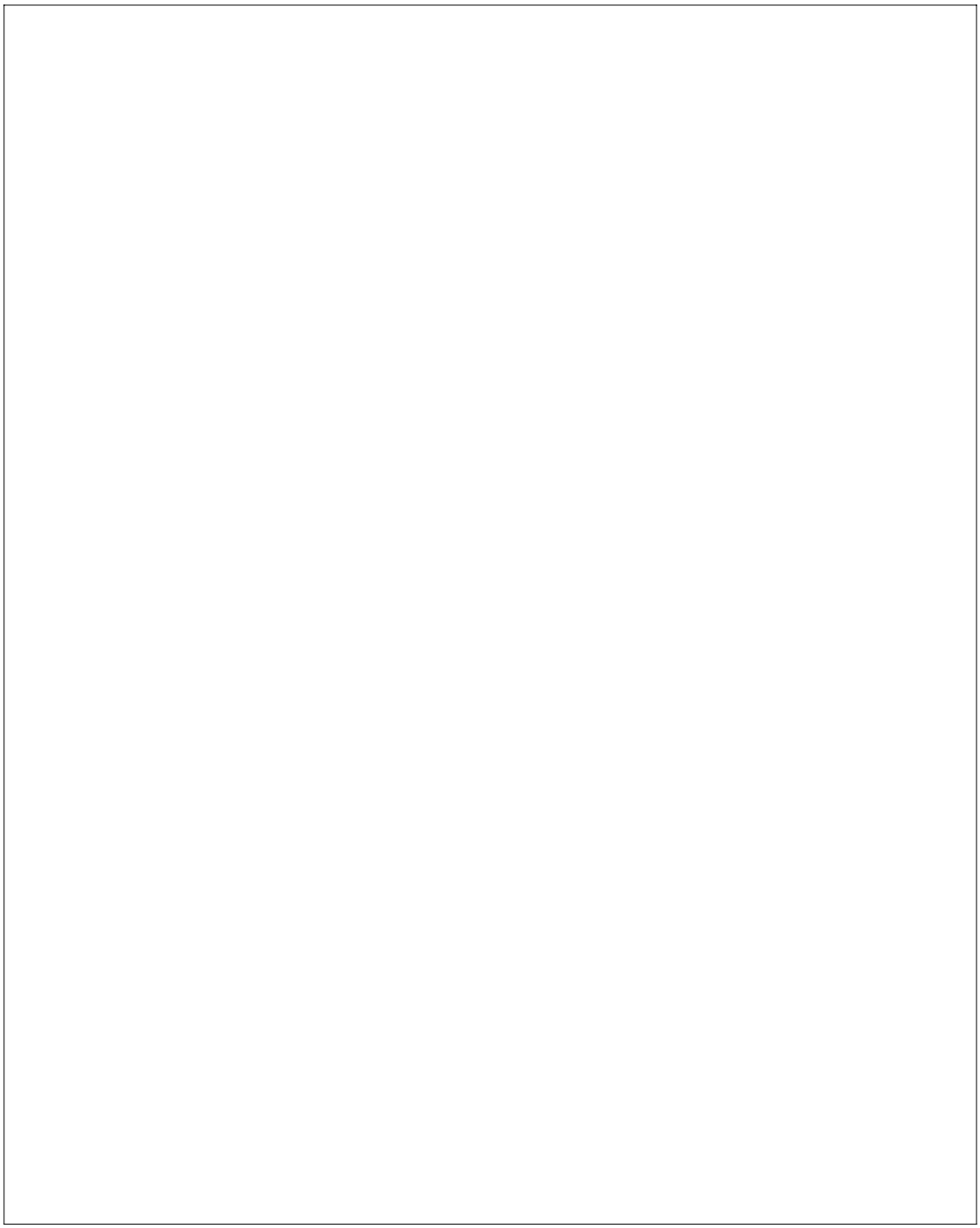

Fig. 4. Comparison of shark MT3-MMP 3'region with human, rat, chicken. Stop codon (TGA) is sequences which are in box. The putative transmembrane domain is underlined. Shark MT3-MMP 3'region is about 80% homologous to those of human, rat, and chick.

결 론

본 연구에서는 정상적인 생체형성뿐 아니라, 관절염, 암 전이같은 병적인 과정에도 관여한다고 알려진 MT3-MMP를 두툽 상어에서 분리하였다. 두툽상어 MT3-MMP의 전체 염기서열을 획득하기 위해 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)과 rapid amplification of cDNA ends (RACE)기법을 수행하였다. 먼저, 5'RACE 결과로 얻은 DNA단편을 클로닝하여 sequencing한 결과 다른 종과 약 74%의 유사성을 나타내었다. 그리고, 종간에 보존성이 높은 부분으로 알려진 cystein switch (RXKR motif)를 확인하였으며, 시작부분에는 종 다양성을 나타내는 약 80 bp의 신호 펩티드 부분도 확인할 수 있었다.

LD-PCR로 획득한 3'부위는 약 1400 bp의 DNA염기서열로 구성되어 있었으며, 약 80%의 유사성을 나타내었다. 그리고, 말단부분에 약 76 bp의 putative transmembrane domain을 확인할 수 있었다.

이러한 결과, 본 연구에서 얻은 5'과 3'부위의 DNA 단편들로부터 상어 MT3-MMP 전체 염기서열을 예상할 수 있으며, 앞으로 그 기능연구도 용이하리라 생각된다.

감사의 글

이 논문은 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업으로 수행되었습니다.

참고 문헌

1) Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: What is its molecular basis? *Cell* 1996; 87: 1153.
2) Shouda K, Yasumitsu H, Nishihashi A, MiKi K, Miyazaki K. Expression of three membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMPs) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of MT3-MMPs with and without transmembrane domain. *J Biol Chem* 1997; 272: 9749.
3) Yang M, Hayashi K, Hayashi M, Fujii JT, Kurkinen M. Cloning and developmental expression of a membrane type-matrix metalloproteinase from chicken. *J Biol Chem* 1996; 271: 25548.
4) Moscatelli D, Rifkin DB. Membrane and matrix localization of proteinases: a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1988; 948: 67.
5) Seiki M. Membrane type-matrix metalloproteinase and tumor invasion. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 23.
6) Bjorn SF, Hastrup N, Lund LR, Dano K, Larsen JF, Pyke C. 1997. Co-ordinated expression of MMP-2 and its putative activator, MT1-MMP, in human placentation. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 713.
7) Emonard H, Grim JA. Matrix metalloproteinases. *Cell Mol Biol* 1990; 36: 131.
8) Birkedal-Hansen H. From tadpole collagenase to a family of matris metalloproteinase. *J Oral Pathol* 1988; 17: 445.
9) Docherty AJP, Murphy G. The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recommbinant proteins. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 469.
10) Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Triends Genet* 1990; 6: 121.
11) Kim JW, Cho WJ, Chun KH, Kim KW, Kim YJ, Lee SJ, Shin HJ, Lim WK. Cloning of a matrix metalloproteinase cDNA from Scyliorhinus torazame. *Korean J Life Science* 1998; 8: 235.
12) Sato H, Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in tumor metastasis. *J Biochem* 1996; 119: 209.
13) Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145.
14) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinases expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994; 370: 61.
15) Vassalli JD, Pepper MS. Tumour biology. Membrane proteases in focus. *Nature* 1994; 370: 14.
16) Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase A (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996; 271: 17124.
17) Lee A, Langer R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* 1983; 221: 1185.