

두툽상어에서 tissue inhibitor of matrix
metalloproteinase-1 (TIMP-1) 유전자의 클로닝

김차순 · 배수경 · 김규원 · 김영진†

부산대학교 분자생물학과

Cloning of a Tissue Inhibitor of Matrix
Metalloproteinase-1 (TIMP-1) from a *Scylliorhinus torazame*

Cha-Soon Kim, Su-Kyoung Bae, Kyu-Won Kim and Yung-Jin Kim†

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

Abstract

Angiogenesis is a fundamental process by which new blood vessels are formed. It is essential in embryo development, and wound healing. Furthermore, malignant tumor growth and metastasis are also angiogenesis-dependent. In the catilage tissue, normal angiogenesis process is suppressed. In fact, it was reported that angiogenesis-inhibitory substances were isolated from the extracts of cow and shark catilage tissue.

In order to isolate genes involved in the regulation of angiogenesis from a catilage fish, we constructed a shark cDNA library from *Scylliorhinus torazame*. We then screened the library using human tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene as a probe.

Among the 4×10^4 plaques screened, we isolated 2 positive clones (T-1, T-2). Restriction enzyme analysis revealed that the T-1 clone contains 0.8 kb cDNA insert, and the T-2 clone contains 1.2 kb and 2.2 kb inserts, respectively. Further DNA sequence analysis shows that the DNA sequence of the T-1 clone is 53% homologous to that of the human TIMP-1 gene.

Key words : Angiogenesis, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, shark

서 론

Angiogenesis(혈관형성)¹⁾은 악성종양의 증식과 전이, 심
유성 혈관종, 동정맥 기형, 관절염, 죽상 동맥 경화증, 혈관

중, 당뇨병성 망막증, 만성염증, 과립성 결막염 등과 같은
여러 종류의 질병을 유발하는데 깊이 관련되어 있을 뿐 아
니라 동물의 배발생과 같은 정상적인 성장과 분화 상태의
유지에도 필수적으로 요구가 되며, 또한 손상조직의 회복

† Corresponding author

에도 새로운 혈관형성은 필수적으로 요구된다^{2,3,4,5}). 따라서 손상된 상처회복을 위해서는 혈관형성을 촉진시키는 물질 (angiogenesis stimulators)을 처리하고, 그 반대로 악성종양이나 염증같은 급속히 자라는 세포에서는 혈관형성을 억제하는 물질 (angiogenesis inhibitor)을 적용함으로써 세포 성장을 조절할 수 있다⁶). 특히 악성종양은 지속적으로 증식을 하고, 다른 조직으로의 전이를 일으키기 위하여 혈관형성 과정을 반드시 필요로 한다.

혈관형성 인자에 의해 혈관의 내피세포들이 자극을 받으면, 이 세포들로부터 효소 matrix metalloproteinases (MMPs)가 분비되어 혈관벽과 기초막(extracellular matrix)을 분해시켜 내피세포가 관통할 수 있는 통로를 만들게 된다. 이렇게 혈관을 빠져 나온 내피세포들은 종양이 분비하는 인자들에 의해 종양부위로 이동하기 시작한다. 종양으로 이동하면서 이 내피세포들은 도관을 형성하며 그 끝이 서로 연결이 되어 혈관이 흐를 수 있는 고리(loop)를 형성하게 된다. 이러한 고리로부터 또 새로운 혈관형성 과정이 반복되어 복잡한 모세혈관의 네트워크를 종양 주변에 구성할 수 있다.

혈관형성 인자인 MMP 계열은 14종이 알려져 있으며, metal에 의존적인 효소들로서 extracellular matrix의 요소들을 분해한다. MMP들은 proenzyme형태로 분비되어 불활성 효소로 유지되다가 autolytic 분해작용에 의해 효소 활성을 가지게 된다⁷). MMP의 활성은 natural metalloproteinase inhibitors인 α_2 -macroglobulin⁸)과 TIMP (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase)⁹) 들에 의해 다르게 영향을 받는다.

혈관형성 저해인자인 TIMP 계열(TIMP-1, -2, -3)^{10,11})중 TIMP-1은 분자량이 약 28 kDa인 분비성 당단백질이며, MMP와 1 : 1 complex¹²)을 이루어 MMP를 불활성 효소로 유지시켜 MMP의 기능을 저해시킨다.

TIMP-1 유전자 염기서열은 다른 종들 사이 즉 원숭이¹³), 쥐¹⁴), 토끼¹⁵)와 인간¹⁶)에서 높은 유사성이 있다. TIMP 계열의 유전자와 단백질의 특징으로 몇가지를 들 수 있다^{14,15,16,17}). 1) 유전자 서열이 유사하다. 2) matrix metalloproteinase의 저해 역할을 하며, 세포 밖으로 분비된다. 3) 12개의 cystein잔기가 보존되어 있으며, N-말단에 분비를 위한 신호 서열이 존재한다.

정상적인 상황에서 혈관형성이 차단되고 있는 조직으로

연골을 들 수 있는데 이 조직에서 혈관형성이 일어나지 않는 주 요인은 기질분해의 기능을 담당하는 MMP와 같은 단백질 분해효소들에 대한 저해 단백질들이 많이 발견되고 있기 때문으로 여겨지고 있다. 이미 상어연골 추출물에 의한 혈관형성 억제활성에 대한 보고¹⁸)가 있었고 또한 소의 연골에서 TIMP-1, 2와 아미노산 서열이 거의 유사한 두 종류의 collagenase inhibitor가 발견되었으며^{19,20}) 이들은 강력한 혈관형성 저해효과를 나타내고 있다고 보고되었다. 그리고 growth factor인 TGF- β family 중에 연골형성에 관여하는 activin A가 혈관형성을 저해한다고 보고되었다²¹). 이와같은 growth factor외에도 thrombospondin, SPARC (secreted protein, acidic and rich in cystine), protamine, ECM (extracellular matrix) proteins, integrin과 같은 혈관형성 저해기능을 나타내는 물질들도 연골 조직에 포함되어 있다^{22,23}).

본 논문에서는 우리나라 근해에 서식하여 손쉽게 구할 수 있는 연골 어류인 두툽상어(*Scylliorhinus torazame*)로부터 새로운 혈관형성 관련 유전자들을 분리하고자 인간 TIMP-1 cDNA를 탐침으로 하여 두툽상어 cDNA library를 검색하였다. 그 결과 인간 TIMP-1 유전자와 53% 상동성을 나타내는 TIMP-1과 유사한 유전자를 분리하였다.

재료 및 방법

cDNA library의 제조

먼저 두툽상어의 연골과 피부조직으로부터 total RNA를 Single-Step²⁴)의 방법에 준하여 추출하였다. Total RNA를 추출하기 위하여 사용되는 Tris buffer를 제외한 모든 용액은 0.4% diethylpyrocarbonate를 처리하여 RNase의 작용을 억제시켰다. Total RNA의 추출은 시료중의 RNase를 변성, 불활성화 시키는 guanidine-isothiocyanate 방법을 사용하였고, CsCl₂를 이용하여 초원심분리한 뒤 원심관의 기벽에 남아있는 RNA를 분리하였다. 그리고 total RNA용액을 oligo dT column에 처리하여 total RNA로부터 mRNA를 분리하였다.

cDNA 합성 (Stratagene, Gigapack 11 XL Packing Extract)하기 위해 먼저 mRNA를 first strand methyl nucleotide mixture와 reverse transcriptase로 first strand를 합성하고 first strand nucleotide mixture와 DNA polymeraseI로 처리하여 반응시켜 second strand를 합성하여 cDNA를

을 얻었다. 그리고 이 cDNA들을 dNTP혼합물과, klenow enzyme으로 cDNA말단을 blunting하고 *EcoRI* adaptor의 ligation blunting이 끝난 cDNA에 *EcoRI* adaptor, ATP와 T4 DNA ligase를 차례로 섞은 뒤 8°C에서 반응시켜 *EcoRI* adaptor의 ligation을 하였다. 다음날 70°C에서 30분간 열처리하여 DNA ligase를 불활성화하였다. 열처리가 끝난 반응물에 ATP, T4 polynucleotide kinase를 각각 처리하여 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 70°C에서 30분간 열처리하여 *EcoRI* 말단을 kination하였고 Kination반응이 끝난 반응물에 *XhoI*를 첨가한 뒤 37°C에서 2시간 반응시켰다. 그리고 여기에 10 X STE를 첨가하여 *XhoI* 효소를 이용한 5' 말단의 digestion하여 cDNA 합성과정이 종료된다.

적절한 크기의 cDNA들을 얻기 위하여 sephacryl S-400 spin column을 이용하여 size fractionation을 하였고 fractionation된 cDNA와 ATP, Uni-ZAP™XR vector, T4 DNA ligase로 Uni-ZAP™XR vector와 cDNA를 ligation하였다. 최종적으로 *in vitro* packaging은 ligation mix를 freeze-thaw lysate에 첨가하여 얼음에서 반응시킨 후 sonic extract를 freeze-thaw tube에 첨가하여 22°C에서 2시간 반응시켰다. SM buffer와 chloroform을 각각 첨가한 뒤 몇 초동안 원심분리하여 debris를 가라 앉힌 후 4°C에서 보관하였다.

인간 TIMP-1 cDNA의 분리 및 탐침 제작

인간 TIMP-1 plasmid는 일본 Kanazawa 대학 암연구소의 M. Seiki 교수로부터 제공받았으며 pBluescript(stratagene, La Jolla CA)의 *ClaI*과 *BamHI* 사이에 인간 TIMP-1 cDNA가 들어 있다.

TIMP-1 cDNA가 삽입되어 있는 vector plamid DNA를 *ClaI*과 *BamHI*으로 37°C에서 digestion하여 agarose gel상에서 전기영동을 한 후 TIMP-1 cDNA의 크기 0.6 kb의 부분을 잘라서 투석방법으로 TIMP-1 cDNA를 분리하여 증류수에 녹였다.

탐침제작은 증류수에 TIMP-1 cDNA를 넣어 100°C에서 5분동안 끓인 후 random primer labelling kit (Rediprime, Amersham) (20mM NaCl, 20mM Tris · HCl, 0.2% SDS, Klenow enzyme)에 넣어 잘 섞은 다음 [α -³²P] dCTP (25μCi)을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응을 시킨 후 0.2 mM EDTA를 첨가하여 반응을 종결시켰다.

cDNA library screening

OD₆₀₀값이 0.5의 host bacteria cell MRF' XL-1 blue (200μl)에 1×10³ CPU의 phage(1μl)을 넣어 37°C에서 15분간 배양시킨 후 0.7% 한천배지(3μl)에 첨가 한 뒤 1.5% 한천배지가 있는 100mm plate상에 부어 37°C에서 6-8시간동안 키운 뒤 nitrocellulose membrane에 transfer하고 UV로 cross-linking하였다. 이 membrane은 ³²P로 labelled한 인간 TIMP-1 cDNA를 probe로 하여 hybridization solution (2x PIPES buffer, 0.5% SDS, denatured sonicated salmon sperm DNA(100μg/ml), 50% deionized formamide)내에서 42°C, 16시간 동안 반응시켰다. Hybridization 반응이 끝난 filter는 washing solution (0.1x SSC, 0.1% SDS)으로 65°C에서 30분동안 씻어준 다음 X-ray film에 감광시켜 양성반응 plaques를 동정하였다.

동정된 phage의 *In vivo* excision

OD₆₀₀의 값이 0.4가 되도록 조절된 400μl의 host bacteria cell(MRF' XL-1 blue)에 1μl의 양성 phage와 1μl의 ExAssit helper phage를 섞어서 37°C, 15분간 배양한 후 3ml의 LB배지를 첨가하여 2시간 배양하였다. 배양액을 원심분리(2,000×g, 15분)하여 상층액만 모아 70°C에서 15분간 방치한 후 다시 원심분리(2,000×g, 15분)하여 상층액을 취하여 4°C에 보관하였다. 또한 OD₆₀₀의 값이 1 이하가 될 때까지 배양한 SOLR cell 200μl와 phage stock 10 μl를 섞어서 37°C에서 15분간 배양한 뒤 ampicillin이 포함된 LB plate에 도말하여 16시간동안 배양하였다. 다음날 ampicillin에 저항성을 보이며 자라고 있는 bacteria colonies를 ampicillin이 포함된 LB 배양액에 첨가하여 하루동안 배양하였다.

Plasmid DNA의 분리

Bacteria로부터의 phagemid분리는 alkaline lysis 방법²⁵⁾을 이용하였다. 먼저 ampicillin이 포함된 LB 배양액에 첨가하여 하루동안 배양한 bacteria들은 4,000g에서 20분 동안 원심분리하여 침전시키고, 침전된 bacteria들에 solution I (50mM glucose, 25mM Tris-Cl, 10mM EDTA)을 첨가하여 vortexing하고, solution II (0.2N NaOH, 1% SDS)을 첨가하여 2-3번 inverted vortexing하고, solution III (5M potassium acetate, glacial acetic acid)을 첨가하여 4°C에서 5분간 방치한 후 13,500rpm에서 20분간 원심분

리시커 상층액만 취해 동량의 phenol을 처리하여 13,500 rpm에서 15분간 원심분리시킨다. 침전된 plasmid DNA와 RNA들은 ethanol을 넣어 침전시키고 RNA는 RNase로 처리하여 제거한다.

분리한 phagemid내 cDNA 삽입유무를 확인하기 위하여 *EcoRI*과 *XhoI*으로 자른 다음 1% agrose gel상에서 전기영동을 하였다.

염기서열의 분석

DNA sequencing은 sequenase version 2.0 DNA sequencing kit(U. S. Biochemical Corp.)²⁶⁾를 사용하여 수행하였다. 먼저 plasmid DNA 3-5µg(8µl)을 2M NaOH(1µl), 2mM EDTA(1µl)를 첨가하여 37°C에서 30분동안 반응시켜 denaturation시킨다. 그리고 3M sodium acetate(pH 4.5-5.5)(1µl)를 첨가하여 중화시키고 ethanol로 DNA를 침전시킨다. 이 DNA에 T₃ 혹은 T₇ Primer 1pmol {T₃ primer(5'-ATTAACCCCTCACTAAAG-3')와 T₇ primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'), reaction buffer를 넣어 37°C에서 25분동안 반응을 시킨 뒤 [³⁵S] dATP(0.5µl), 0.1M DTT(1µl), diluted sequenase polymerase {sequenase dilution buffer(7µl) : sequenase T 7 DNA polymerase(1µl)} (2µl), dNTPs(3µM)를 첨가시켜 실온에서 5분동안 labeling 반응을 시킨다. labeling된 반응물들을 각각의 ddNTP(2.5µl)에 분주 시켜 37-42°C에서 5분동안 종결반응을 유도시킨 후 stop solution을 넣어 반응을 종결시킨다.

이 생성물들을 75°C에서 2분동안 가열한 후 6% polyacrylamide gel상에서 전기영동을 하고, 감광된 X-ray film 으로부터 얻어진 염기서열을 DNasis (Hitachi Software Engineering America, Ltd.)를 이용하여 DNA 상동성을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 상어 cDNA library로부터 TIMP-1 유전자의 검색

본 실험에 사용한 탐침은 Fig. 1과 같이 vector의 *BamHI*과 *ClaI*사이에서 위치한 0.6 kb인 인간 TIMP-1 cDNA 이고 이것을 상어 cDNA library screening에 이용하였다.

Fig. 2의 A에서 보는 바와 같이 1차 screen에서 여러개의 X-ray film상의 spot들이 탐침인 TIMP-1과 결합하는 것으

로 나타나 보였고, 각각의 spot들과 plate상의 phage들을 비교하여 양성반응을 보인 phage들을 순수 분리하여 비교군인 negative control과 2차, 3차 screen을 수행한 결과, 두개의 양성반응을 보인 phages (a, T-1. b, T-2)를 얻었다 (Fig. 2, B).

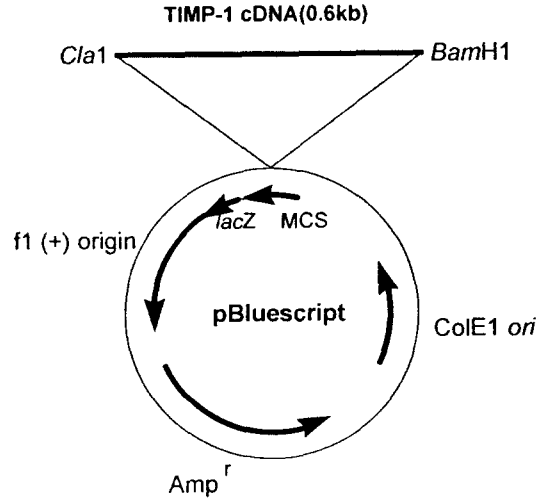


Fig. 1. Structure of pBluescript-derived plasmid containing human TIMP-1 cDNA.

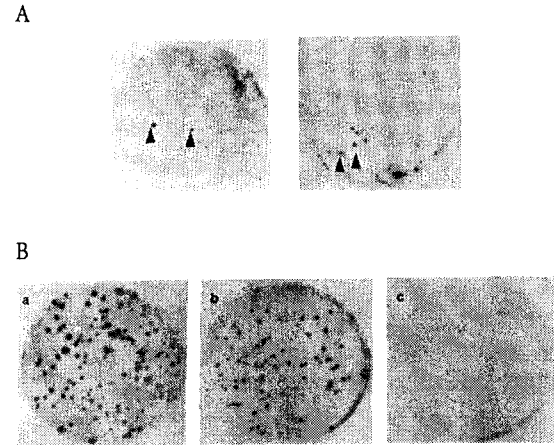


Fig. 2. Screening of shark cDNA library using human TIMP-1 cDNA probe.

A, first screening, putative positive plaques are represented by arrows. B, tertiary screening (a and b were arbitrarily named as T-1 and T-2, respectively ; c, negative control).

1차 screen에서 많은 false positive 결과들이 많이 나타났다. 그리고 plaque를 순수분리하기 위하여 2차, 3차 screening을 수행하였다.

2. 분리한 Plasmid에서 삽입 cDNA의 확인

3차 screening에서 양성으로 판명된 2개의 phage의 pB-luescript부분을 *in vivo* excision을 통해 λ DNA로부터 분리하고 분리한 plasmid들을 *EcoRI*과 *XhoI*으로 자른 다음 agarose gel상에서 전기영동을 한 결과, T-1의 cDNA insert의 크기는 0.8 kb이며, T-2의 cDNA insert는 1.2 kb와 2.2 kb로 두개의 조각으로 나누어져 있다(Fig. 3). 이 논문에는 결과를 나타내지 않았지만 T-2 clone을 *EcoRI*만으로 잘라 보았을때 5.1 kb와 1.2 kb DNA절편으로 나누어지고, *XhoI*으로 잘랐을때 4.1 kb와 2.2 kb로 나누어짐으로 미루어 T-2 clone에는 2개의 cDNA(1.2 kb, 2.2 kb)가 *XhoI-EcoRI* linker DNA로 연결되어 있을 것으로 추정된다.

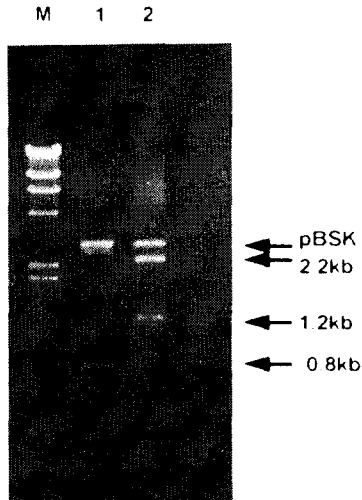


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmids isolated from positive plaques.

The plasmids were digested with *EcoRI* and *XhoI* prior to electrophoresis. M, λ /*HindIII* marker DNA; 1, plasmid isolated from T-1 plaque; 2, plasmid isolated from T-2 plaque.

3. 어류 TIMP-1 유사 유전자의 염기서열 분석

Double strand DNA sequencing은 양쪽 즉 *EcoRI*쪽의 T₃ primer 방향과 *XhoI*쪽의 T₇ primer방향에서 sequencing을 수행하였다. 먼저 T-2의 sequence는 T₃ primer와 T₇ primer에서 sequencing을 수행한 결과 이 논문에는 결과를 나타내지 않았지만 TIMP-1 염기서열과는 다른 염기서열임을 확인하였다.

T-1은 T₃ primer로 sequencing을 수행하였다. 그 결과 T-1의 partial sequence(308 bp)(아래 줄)와 TIMP-1의 염기서열 331 bp에서 627 bp(윗줄)까지 53%의 상동성을 가지고 있다(Fig. 4).

본 논문에서는 혈관형성 저해 단백질들을 대량 발현하는 연골어류 중 우리나라 근해, 특히 부산지역에서 쉽게 구입할 수 있는 두툼상어(*Scylliorhinus torazame*)을 선택하여 혈관형성 저해 유전자인 TIMP-1으로 검색하여 2개의 cDNA를 찾아 sequencing 한 결과, T-1 일부의 염기서열에서 TIMP-1과 유사성이 있는 것을 확인하였다.

위 내용과 같이 T-1 유전자가 또 다른 TIMP 계열 중에 하나인지, 아니면 또 다른 matrix metalloproteinase의 저해 유전자인지 알아보기 위해서 앞으로, 클론된 T-1 cDNA (0.8 kb) 전체의 염기서열을 밝히고 T-1 cDNA를 expression vector에 클로닝하여 T-1 단백질을 발현시킨 다음 metalloproteinase inhibitor로 작용하는 지에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

요 약

혈관형성은 새로운 혈관을 만들기위한 기본적인 과정이며 배발생, 손상조직의 회복 그리고 악성종양의 성장이나 전이 등에 필수적이다. 혈관형성이 억제되고 있는 조직으로는 연골조직을 들 수 있다. 실제 소나 상어의 연골 추출물에서 혈관형성 억제활성이 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 연골어류로부터 혈관형성의 조절에 관여하는 혈관형성 인자들의 유전자를 분리하기 위하여 연골어류인 상어의 cDNA library를 제조하고, 혈관형성 저해물질인 인간 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1)의 유전자 일부를 탐침으로 사용하여 cDNA library screening을 수행하였다.

331	GGAAAACTGCAGGATGGACTCTTGCACAT-CACTACCTGCAGTTTGTGG	380
0	.G-----GCACGA-GG--TCA-GCA-ATGC-CT-CCTGTA-----	49
381	CTCCCTGGAACAGCCTGAGCTTAGCTCAGCGCCGGGGCTTCACCAA-GAC	430
50	C-CAC-G-AACTGCCTC-GCTC--CTCTG-GCCAAAG-T-CATCAATGAC	99
431	CTACACTGTTGG---C-TGTGA-G----GAATGCAC-AGTGTTTCCTGT	480
100	--A-AGT-TTGGGATCAT-TGAAGCTCTGA-TG-ACCACCGT--CCATGC	149
481	TTATC-CATCC-CCTGCA-AACTG-CAGAG--TGG-CAC-TC----ATTG	530
150	CTA-CACAGCCACC--CAGAA--GACAGTGGATGGGCCCCCTCCGGGAAAG	199
531	CT-TGTG-GAC--GG-ACCAG--CTCC--TC-----CA--AGGCT-CTGA	580
200	CTATGGGAGAGATGGTAG-AGGGCGCCCATCAGAAACATTATTCTGCTTC	249
581	AAA-GG-GCTTCCA-GTCCCGT---CACC-T--TGCCTGC-CTGCCTCGG	630
250	AACTGGAGCTGCCAAGGCT-GTGGGCAAAGTCAT-CCTGAACTGA-T-GG	299
631	GAGCC-A--GG--GCT-G-TGCAC-CTGGCAGTCCCTGCGGTCCAGGA-T	680
300	GAGCTGACTGGATGCTCGGTGCACTCTA-C-GTT--TGTG-TGACTGACT	349
681	AGC-CTGAATC--CTGCCC.....	730
350	-GCGCTG--TCAGCTGC.....	399

Fig. 4. Comparison of nucleotide sequence of T-1 partial sequence with human TIMP-1 cDNA.
Upper row : human TIMP-1 cDNA sequence(331 bp-627 bp) ; lower row : T-1 sequence(1 bp-308 bp)

screening한 4×10^4 plaque 중에서 2개의 양성적인 클론 (T-1, T-2)를 얻은 다음 제한 효소 분석 결과 T-1에서 0.8 kb, T-2에서 1.2, 2.2 kb cDNA insert를 각각 확인하였으며, DNA sequencing 결과 T-1 DNA 염기서열이 인간 TIMP-1 DNA 염기서열과 53% 상동성이 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기성회비지원 학술연구조성비와

1994년도 한국학술진흥재단의 대학부설 연구과제 연구비의 지원에 의해 수행되었음을 밝히며, 아울러 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. Folkman, J. and Yen Shing. : Angiogenesis. *J. Bio. Chem.*, 26716, 109311-10934(1992).
2. Moses, M. A. and Langer, R. : Inhibitors of angiogenesis. *Biotechnology*, 9, 630-634(1991).
3. Pelleter, J. P. Mineau, F., Faure, M. P., and Martel-Pelletier, J. : Imbalance between the mechanisms of

- activation of metalloproteases in the early lesions of experimental osteoarthritis. *Arth. & Rheum.*, 33, 1466-1476(1990).
4. Alexander, C. M. and Werb, Z. : cell Biology of Extracellular Matrix (Hay, E. D., ed) 2nd ED., *Plenum Press, New York*, 255-302(1991).
 5. Liotta, L. A. and Stetler-Stevensen, W. G. : Metalloproteinases and cancer invasion., *Semin. Canc. Biol.*, 1, 99-106(1990).
 6. Höckel, M., Schlenger, K., Doctrow, S., Kissel, T., Vaupel, P. : Therapeutic angiogenesis. *Arch. Surg.*, 128, 423-429(1993).
 7. Hiroshi Sato and Motoharu Seiki. : Membrane-Type Matrix Metallopro teinases (MT-MMPs) in Tumor Metastasis. *J. Biochem.*, 119, 209-215(1996).
 8. Bond, J. S. and Butler, P. E. : Intracellular proteases. *Annu. Rev. Biochem.*, 56, 333-364(1987).
 9. Matrisian, L. M. : Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.*, 6, 121-125(1990).
 10. Nadine Pavloff, Paul, W. S., Narendra, S. K., and Susan, P. H. : A new Inhibitor of Metalloproteinases from Chicken (ChIMP-3). *J. B. C.* 267, 17321-17326(1992).
 11. Suneel, S. A., Bjorn, R. O., and Gillian Murphy. : The gene structure of Tissue Inhibitor of Metallpro teinases (TIMP-3) and Inhibitory activaties define the distinct TIMP gene family. *J. B. C.*, 270, 14313-14318(1995).
 12. Welgus, H. G. and Stricklin, G. P. : Human skin fibroblast collagenase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 258, 12259-12264(1983).
 13. Reza Forough, Seppo, T. Nikkari, David Hasenstab, Holly Lea and Alexander W. Clowes. : Cloning and characterization of a cDNA encoding the baboon tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Gene*, 163, 267-271(1995).
 14. Edward, D. R., Rocheleau, H., Sharma, R. R., Wills, A. J., Cowie, A., Hassell, A. and Heath, J. K. : Involvement of AP-1 and PEA3 binding sites in the regulation of murine tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) transcription. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1171, 41-55(1992).
 15. Horowitz, S., Dafni, N. L., Shapiro, D. L., Holm, B. A., Notter, R. H., and Quible, D. J. : hyperoxic exposure alters gene expression in the lung. *J. Biol. Chem.*, 264, 7092-7095(1986).
 16. Carmichael, D. F., Sommer, A., Thompson, R. C., Anderson, D. C., Smith, C. G., Welgus, H. G. and Stricklin, G. P. : Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83, 2407-2411(1986).
 17. Freudenstein, J., Wagner, S., Luck, R. M., Einspanier, R. and Scheit, K. H. : mRNA of bovine tissue inhibitor of metalloproteinase sequence and expression in bovine ovarian tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 250-256(1990).
 18. Langer, R., Brem, H. and Folkman, J. : Isolation of a cartilage factor that inhibite tumor neovascularization. *Science*, 193, 70-72(1976).
 19. Lee, A. and Langer, R. : Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science*, 221, 1185-1187(1983).
 20. Moses, M. A., Sudhalter, J. and Langer, R. : Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science*, 248, 1408-1410(1990).
 21. McCarthy, S. A. and Bicknel, R. : Inhibition of Vascular Endothelial Cell Growth by Actinin-A. *J. B. C.*, 26831, 23066-23071(1993).
 22. Good, D. J. and Lemons, R.S. : A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Natl. Acad., Sci. U.S. A.*, 87, 6624-6628(1990).
 23. Taylor, S. and Folkman, J. : Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature*, 297, 307-312(1982).
 24. Piotr Chomczynski and Nicoletta Sacchi. : Singlestep method of RNA isolation guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analytic Biochemistry*. 162, 156-159(1987).
 25. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. : Extraction and purification of plasmid DNA. *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Lab, Cold Spring Harbor, NY 2nd Ed.), 1.21-1.32 (1989).
 26. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson. : DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74, 5463-5467(1977).