

## 두툽상어 matrix metalloproteinase 유전자 cDNA의 클로닝

김종원 · 조원진 · 천광호 · 김규원 · 김영진 · 이상준\* · 신혜자\*\* · 임운기†

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과  
\*국립수산진흥원 생물공학과  
\*\*동서대학교 환경공학과

## Cloning of a matrix metalloproteinase cDNA from *Scylliorhinus torazame*

Jong Won Kim, Won Jin Cho, Kwang Ho Chun, Kyu-Won Kim, Yung-Jin Kim,  
Sang-Jun Lee\*, Hae-Ja Shin\*\* and Woon Ki Lim†

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea  
\*Division of Biotechnology, National Fisheries Research and Development Agency, Pusan, 626-900  
\*\*Department of Environmental Engineering, DongSeo University, Pusan 616-010

### Abstract

Matrix metalloproteinases(MMPs) are a group of zinc enzymes responsible for degradation of the matrix components such as collagen and proteoglycans in normal embryogenesis and remodeling and in many disease processes such as arthritis, cancer, periodontitis, and osteoporosis. Genetically distinct MMPs have been characterized and their genes have been cloned thus far from a variety of species but not from fishes.

In this study, a mmp cDNA fragment was cloned by using RT-PCR(reverse transcriptase dependent polymerase chain reaction) from *Scylliorhinus torazame*(shark), a group of cartilaginous fish, abundant in the coast of Pusan, Korea. It has 74% base homologue with membrane type matrix metalloproteinase-3 genes(mt3-mmps) from human, rat and chick, and also shows more than 90% residue homologue with them. In addition, it has cysteine switch domain, zinc binding domain(HEXGH motif), propeptide cleavage site, and RRKR motif, which are present in MMPs.

This result indicates that cDNA fragment cloned here may be mt3-mmp or its analogous gene cDNA fragment of *Scylliorhinus torazame*.

Key words : matrix metalloproteinase, shark, mt3-mmp

### 서 론

Matrix metalloproteinases(MMP)는 collagen이나 proteoglycan과 같은 세포외기질의 구성성분을 분해하는 효소 군이다<sup>1,2)</sup>. 정상적으로는 척추동물의 배 발생과정과 조직의

재배열에 중요한 역할을 한다. 또한, 이들 효소는 암전이과정에서 암세포가 이웃하는 세포들로부터 혈관기저세포안으로 침투가 용이하도록 세포외기질성분을 파괴한다<sup>3,5-8)</sup>.

MMP 유전자는 endothelial 또는 epithelial cell을 비롯하여 여러 다양한 세포들에서 발견되며, cytokines, growth

† Corresponding author

factors, oncogenes, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)와 같이 protein kinase를 활성화시킬 수 있는 물질들에 의해 조절된다<sup>2,4,5,9,10</sup>). MMP는 효소활성이 없는 zymogen 상태로 합성되어 약 10kDa 크기의 아미노말단 도메인이 제거되면서 활성을 갖게 되며, tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)에 의해 효소활성이 저해된다<sup>11, 12</sup>). MMP의 활성부위는 시스테인 잔기와 결합한 zinc이며, chaotropic agent, HOCl, 수산화합물, 트립신과 plasmin과 같은 효소 등에 의해 활성화될 수 있다<sup>13, 15</sup>).

MMP는 기질에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysin 세 종류로 구분된다<sup>4</sup>). collagenase는 type I, II, III, X와 같은 fibril를 형성하는 collagen만을 기질로 사용한다. gelatinase는 A와 B 형이 있으며, 각기 72와 92kDa type IV collagenase로 불리기도 하는데 변성된 collagen(gelatin)을 분해하고 basement membrane collagen type IV와 laminin 등의 세포외기질도 분해한다. stromelysin는 거의 모든 결합조직의 기질성분을 분해하며 다른 종류의 MMP의 활성화에도 관여하여 결합조직의 분해와 remodeling에 중요한 역할을 할 것이라 추정되고 있다<sup>16</sup>).

지금까지 많은 mmp가 클로닝되고 그 기능이 연구되어 왔지만 어류에서는 아직 보고된 연구 결과가 없다. 본 연구에서는 reverse transcriptase dependent polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법으로 두툽상어(*Scylliorhinus torazame*)의 뇌로부터 mmp cDNA 일부를 클로닝하였다.

## 재료 및 방법

### RNA 분리

본 실험에 사용된 두툽상어 성체는 부산 자갈치 시장에서 산 상태로 구입하였으며 실험에 이용하기 직전에 희생시켜 원하는 부위를 떼어내어 총 RNA를 guanidium thiocyanate-phenol chloroform 추출방법<sup>17</sup>)을 이용하여 분리하였다. 뇌조직 1g당 10ml 용액 D(4M guanidine thiocyanate, 25mM NaCitrate, pH 7.0, 0.5% sodium lauryl sarcosinate, 0.2M  $\beta$ -mercaptoethanol)을 넣고 Dounce hand homogenizer로 잘게 부순 후 homogenate를 50ml polypropylene tube에 옮겼다. 1ml 2M NaAcetate(pH 4.0), 10 ml water saturated phenol, 3.6ml chloroform-isoamyl alcohol(49 : 1, v/v)을 차례로 넣고 섞은 후 최종 용액을

10초간 강하게 섞어 15분간 얼음에 두었다. 시료를 10,000 g에서 20분간 원심분리하고 상층액을 새 튜브에 옮겨 동량의 isopropanol을 넣고 1시간 동안 -20°C에 둔 후 재차 10,000g에서 20분간 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. 75% ethanol로 두 번 씻은 후 실온에서 건조한 후 2ml 0.1% DEPC 처리된 순수물에 녹여 이후 실험에 사용하였다.

총 RNA의 정량은 260nm에서의 흡광도로 측정하였고, 230nm와 280nm에서의 흡광도에 대한 260nm에서의 흡광도 비가 1.9이상인 시료를 즉시 사용하거나 -70°C에 보관하였다가 사용하였다.

### RT-PCR

PCR에 사용된 primer는 MMP에서 아미노산 서열이 가장 잘 보존된 cysteine switch domain인 PRCG(N/V)PD에 해당하는 CCI(A/C)GI TG(C/T) GGI(A/G)(A/T)I CCI GA와 zinc binding domain인 VA(A/V)HE(F/L/L)GH에 해당하는 TG ICC IA(A/T/G)(C/T)TC(A/G)TG I(A/G)C IGC IAC이며, 합성 구입하여 사용하였다.

RT-PCR은 분리된 총 RNA의 1 $\mu$ g을 65°C에서 5분간 열처리한 후 25 $\mu$ M random hexamer(Pharmacia Biotech, Inc), 25 unit Monoley murine leukemia virus reverse transcriptase(BioLabs), 50mM TrisHCl, pH 8.3, 10mM MgCl<sub>2</sub> 및 1mM dNTP(20 $\mu$ l)를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켜 cDNA를 얻었다. 역전사된 cDNA용액 중 1 $\mu$ l를 취하여 앞에서 언급한 primer와 Taq polymerase(Pharmacia Biotech, Inc)를 써서 PCR 증폭시켰다. PCR 증폭은 DNA가닥 분리를 위해 95°C에서 1분, primer와 주형 cDNA의 결합을 위해 60°C에서 30초, DNA 복제에 72°C에서 1분으로 처리하였으며, 이를 35회 반복하여 증폭하였다. 증폭 산물은 1.5% agarose gel에서 전개시켜 분리하였다.

### cDNA 클로닝 및 DNA 염기서열 결정

agarose gel에서 분리된 증폭산물은 QIAEX II gel extraction kit(QIAGEN)를 사용하여 정제하여 pGEM-T vector(Promega)에 클로닝하였다. 클로닝을 위해 대장균 DH5 $\alpha$ 를 사용하였다. 클로닝된 vector는 WiZard Plus SV miniprep DNA purification kit(Promega)로 분리하였고, 이의

염기서열은 dye terminator cycle sequencing ready reaction kit(PEApplied Biosystem)와 377 DNA automatic sequencer(Perkin Elmer)를 이용하여 결정하였다.

유전자의 염기서열 분석

클로닝된 유전자의 염기서열 분석은 BLAST/FASTA database 프로그램을 사용하였으며, GenBank/EMBL database에 저장된 mmp유전자 염기서열을 활용하여 유사성을 조사하였다.

결과 및 고찰

연골어류인 두툽상어의 mmp cDNA를 PCR로 클로닝하기 위하여 먼저 이미 알려진 mmp의 염기서열의 특징에 대해 조사하였다. Fig. 1은 여러 종류의 mmp의 기본적인 구조를 보여주고 있다. signal peptide와 zinc domain은 모든 mmp에서 보여지며, fibronectin domain은 92kDa gelatinase와 72kDa gelatinase에서 나타나는 구조로 기질인 gelatin과의 결합에 관여하며, hemopexin domain은 PUMP-1을 제외한 다른 mmp들에서 관찰되는 구조로 기질특이성에 관계할 것으로 생각되는 부위이다. α2(V) collagen domain은 아직 그 기능이 잘 알려져 있지 않으며 92 kDa gelatinase에 존재한다. RT-PCR의 primer로 이용된 부분(Fig. 1, 상단의 굵은 문자)은 cysteine switch domain의 PRCG(N/V)PD와 putative zinc binding domain인 VA(A/V)HE(F/L/L)GH이다<sup>4,13)</sup>. cysteine switch

domain은 MMP가 활성화될 때 절단되는 부위이며, putative zinc binding domain은 효소의 활성부위이다. 따라서 이들 두 부분에 해당하는 primer로 사용하여 PCR을 수행할 경우 두툽상어에서 발견되는 다양한 종류의 mmp들을 클로닝할 수 있을 것으로 예측된다.

두툽상어의 뇌, 연골과 근육에서 총 RNA를 분리하였다. 이 중에서 뇌와 근육에서 분리된 총 RNA의 pattern을 Fig. 2A에 보여주고 있다. 이들로부터 cDNA를 합성하고, 두 개의 mmp 특이 primer를 써서 PCR 증폭하여 약 300bp에서 900bp 크기의 11개 PCR 단편(뇌와 근육과 연골에서 각각 4개, 4개, 3개씩)을 얻었다. Fig. 2B는 두툽상어의 뇌로부터 증폭된 PCR 단편을 보여주고 있다. PCR 증폭된 단편들은 pGEM T-vector에 클로닝하여 염기서열을 결정하였다. 이 중 mmp의 cDNA로 보이는 PCR 단편을 확인하였다(Fig. 3).

RT-PCR에 의해 클로닝된 유전자 단편의 길이는 455 bp이며, 염기서열은 인간,<sup>1)</sup> 쥐<sup>1)</sup> 및 닭<sup>2)</sup>에서 발견되는 membrane type matrix metalloproteinase-3(mt3-mmp)의 염기서열과 유사성이 74%로 가장 높게 나타났으며(Fig. 3), mt2-mmp, mt1-mmp, mmp-14, mmp-15, mmp-16를 비롯한 다른 mmp와도 50% 이상의 높은 유사성을 보였다(data not shown).

아미노산 서열을 비교하면 두툽상어의 RT-PCR 단편은 인간, 쥐, 닭의MT3-MMP와 90% 이상의 동일한 아미노산 서열을 보였다(Fig. 4). 또한 두툽상어의 RT-PCR 단편에는 cysteine switch domain, zinc binding domain(HEXGH

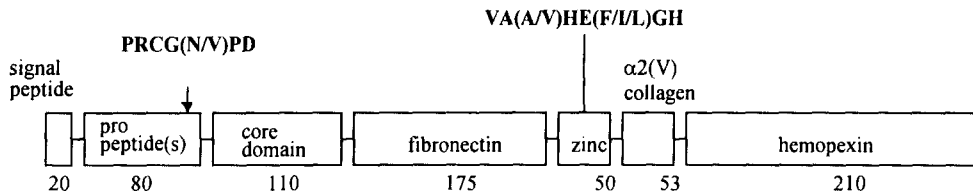


Fig. 1. Schematic structure of matrix metalloproteinase family<sup>4)</sup> and two highly conserved regions. The explanation of each domain is referred to "Results and Discussion". The residue length is indicated under each domain. PRCG(N/V)PD called cysteine switch region, is at the amino terminal end of the active MMPs formed after cleaved(arrow for cleavage site). VA(A/V)HE(F/L/L)GH is in the catalytic region and has two of the three histidine residues that make coordinate bonds with the Zn<sup>2+</sup> atom.

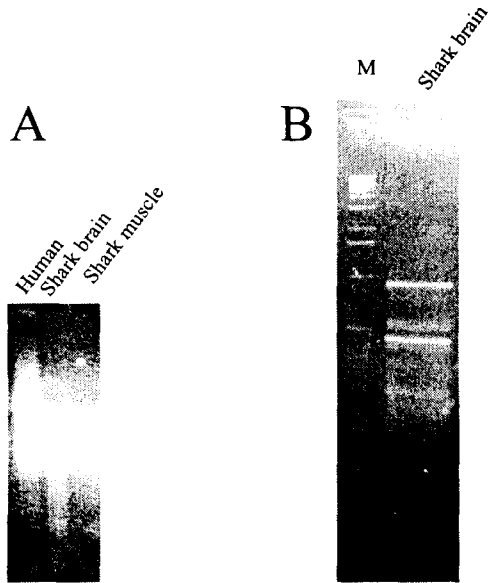


Fig. 2. Total RNAs and RT-PCR products from *Scylliorhinus torazame*.

(A) total RNAs isolated from human(lane 1), shark brain(lane 2) and muscle(lane 3). (B) RT-PCR amplification products from shark brain. Several cDNAs(300-900bp) were produced by RT-PCR amplification from total RNA of shark brain using the mmps-specific degenerate primers (see "Materials and Methods"). Lane M indicates DNA size marker(1kb ladder from Boehringer Mannheim).

motif)<sup>13)</sup>, propeptide가 잘리는 부위가 존재하였다. RRKR motif는 세포내 단백질분해 효소 중 류린 family에 의한 분해되는 위치인데 이들의 위치 또한 두툽상어에서 클로닝한 PCR단편에서도 확인되었다.

이 결과는 본 연구에서 클로닝된 RT-PCR단편이 두툽상어의 mt3-mmp 유전자 또는 이와 유사한 유전자의 cDNA 일 가능성을 암시하고 있다. 또한 MT3-MMP의 활성부위가 진화론적인 관점에서 두툽상어에서도 매우 잘 보존되어 있다는 것을 뒷받침해 준다. 인간과 쥐와 닭의 MT3-MMP와 잘 일치하는 두툽상어 MT3-MMP의 활성부위의 부분에 서도 매우 높은 아미노산 동일성을 보임으로 두툽상어의

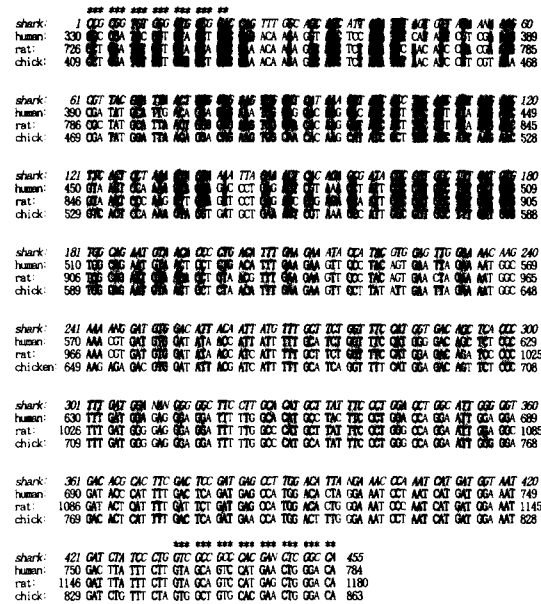


Fig. 3. Nucleotide sequence of RT-PCR product from shark and its alignment with those of mt3-mmps from human, rat and chicken.

The nucleotide sequence of RT-PCR fragment from the shark(*Scylliorhinus torazame*) is compared with those of mt3-mmps(membrane type metalloproteinase 3) from human(*Homo sapiens*), rat(*Rattus rattus*) and chicken(*Gallus gallus*). Nucleotides identical to those of RT-PCR from the shark are in gray box. The shark RT-PCR fragment has 74% base homologue with three mt3-mmps. N indicates unidentified nucleotide. Two primers used for amplification are indicated as '\*' above the sequences.

전체 MT3-MMP도 이들 유전자와 아미노산 구성이 유사할 것으로 추정된다.

두툽상어 mt3-mmp 유전자의 발현양을 보고자 두툽상어의 근육과 뇌와 연골에서 총 RNA를 분리하여 본 연구에서 클로닝된 mt3-mmp PCR 단편을 probe로 Northern blot를 하였으나 밴드가 나타나지 않았다(data not shown). 이

## 두툽상어 matrix metalloproteinase 유전자 cDNA의 클로닝

Human	1	MILLTFSTGR	RLDVHRHSGV	FFLQTLWIL	CATVCGTEQY	FNVEVWLDKY	GYLPPTDRM	60
Rat	1	MILLAFSSGR	RLDVHRHSGV	FFQTLWIL	CATVCGTEQY	FNVEVWLDKY	GYLPPTDRM	60
chick	1	MILLKLSSTG	RLDVHRSQSV	FLQTLVWIL	CATVCKAEQY	FNVEVWLDKY	GYLPPTDRM	60
shark		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Human	61	SVLRSAAETMQ	SALAAHQGFY	GINMTGKVD	NTIDIMMKPR	CVFDDTRGS	SKFN1-RRKY	120
Rat	61	SVLRSAAETMQ	SALAAHQGFY	GINMTGKVD	NTIDIMMKPR	CVFDDTRGS	SKFN1-RRKY	120
chick	61	SVLRSAAETMQ	SALAAHQGFY	GINMTGKVD	NTIDIMMKPR	CVFDDTRGS	SKFN1-RRKY	120
shark		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
					PR	CVFDDQF-GS	SIRFSVRRKY	
					##	####	****	
Human	121	ALTGQKWHK	HITYSIKNVT	PKVGPETRK	AIRRAFVDVQ	NVPLTFEEV	PYSELENGR	180
Rat	121	ALTGQKWHK	HITYSIKNVT	PKVGPETRR	AIRRAFVDVQ	NVPLTFEEV	PYSELENGR	180
chick	121	ALTGQKWHK	HITYSIKNVT	PKVDAETRK	AIRRAFVDVQ	NVPLTFEEV	PYSELENGR	180
shark		ALTGQKWHK	HITYSIKNVT	PKVGLKETHR	AIRRAFVDVQ	NVPLTFEEI	PYSELENGK	
Human	181	DVDITIFAS	GFHGDSSPFD	GEGFLAHAY	FPFGIGGDT	HFSDEPWTL	GNPNHDGNDL	240
Rat	181	DVDITIFAS	GFHGRSSPFD	GEGFLAHAY	FPFGIGGDT	HFSDEPWTL	GNPNHDGNDL	240
chick	181	DVDITIFAS	GFHGDSSPFD	GEGFLAHAY	FPFGIGGDT	HFSDEPWTL	GNPNHDGNDL	240
shark		DVDITIFAS	GFHGDSSPFD	GEGFLAHAY	FPFGIGGDT	HFSDEPWTL	GNPNHDGNDL	
Human	241	FLVAVHELGH	ALGLEHSDP	TAIMAPFYQ	METDNFKLNP	DOLGIGQIKY	GPPKIPPTP	300
Rat	241	FLVAVHELGH	ALGLEHSDP	TAIMAPFYQ	METDNFKLNP	DOLGIGQIKY	GPPKIPPTP	300
chick	241	FLVAVHELGH	ALGLEHSDP	TAIMAPFYQ	METDNFKLNP	DOLGIGQIKY	GPPKIPPTP	300
shark		SLVAHVHLLG	-----	-----	-----	-----	-----	
Human	301	RPLPTVPHR	SIPPADPRKN	DRPKPPRPT	GRPSYGAKP	NICDGNFTL	AILLRREMFV	360
Rat	301	RPLPTVPHR	SIPPADPRKN	DRPKPPRPT	GRPSYGAKP	NICDGNFTL	AILLRREMFV	360
chick	301	RPLPTVPHR	SIPPADPRKN	DRPKPPRPT	GRPSYGAKP	NICDGNFTL	AILLRREMFV	360
shark		-----	-----	-----	-----	-----	-----	
					TGDKPSYGA	KPNICDGNFN	TLVILLRREMF	360
Human	361	KDQFWWRV	NRVMDGYPMQ	ITYFWRGLPP	SIDAVYENS	GNFVFKGAK	YVVKDITLQ	420
Rat	361	KDQFWWRV	NRVMDGYPMQ	ITYFWRGLPP	SIDAVYENS	GNFVFKGAK	YVVKDITLQ	420
chick	361	VFKDQFWWRV	RNRVMDGYTP	MQITTFWRGL	PSISDAVYEN	SEGNVFKGAK	NKRVFKDITQ	420
shark		-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Human	421	PGYPHDLITL	GSGIPPHGID	SAIWEADVQ	TYFVKGRVY	RYSEEMKMD	PGYKPIITW	480
Rat	421	PGYPHDLITL	GSGIPPHGID	SAIWEADVQ	TYFVKGRVY	RYSEEMKMD	PGYKPIITW	480
chick	421	LQPCPHDLITL	TLGSGIPSHG	ISAIVWEADV	OKTYFKGRV	YRVYGEEMRS	MQYKPIITW	480
shark		-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Human	481	KGIPESPGGA	FVHKENGFTY	FYKGEKVKF	NGILKVEPG	YPRSLIKDFM	GGDGPDRK	540
Rat	481	KGIPESPGGA	FVHKENGFTY	FYKGEKVKF	NGILKVEPG	YPRSLIKDFM	GGDGPDRK	540
chick	481	TKGIPESPGQ	GAFVHKENGFTY	TYFVKEKSTG	NSTKMLRVEP	GYPRSLIKDF	MCGDGPDRD	540
shark		-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Human	541	EGHSPPDDVD	IVIKLDNTAS	TV	-----	-----	-----	600
Rat	541	EGHSPPDDVD	IVIKLDNTAS	TV	-----	-----	-----	600
chick	541	KDRHSPPDDV	DIIVIKLDNTA	ST	-----	-----	-----	600
shark		-----	-----	-----	-----	-----	-----	600
Human	601	RSMQEWEV	-----	-----	-----	-----	-----	
Rat	601	RSMQEWEV	-----	-----	-----	-----	-----	
chick	601	KRSMQEWEV	-----	-----	-----	-----	-----	
shark		-----	-----	-----	-----	-----	-----	

Fig. 4. Amino acid sequence of RT-PCR product from shark and its alignment with those of full length of MT3-MMPs from human, rat and chicken.

The amino acid sequence of RT-PCR fragment from the shark (*Scylliorhinus torazame*) was inferred from the nucleotide sequence of RT-PCR fragment (Fig. 3), and aligned for comparison with those of MT3-MMPs (membrane type metalloproteinase 3) from human (*Homo sapiens*), rat (*Rattus rattus*) and chicken (*Gallus gallus*). Amino acids of three MT3-MMPs, which are identical to those of shark, are in gray box. The shark RT-PCR fragment has more than 90% residue homologue with three MT3-MMPs. Cysteine switch domain (#), zinc binding domain (ˆ) and RRKR motif (\*) are also present. The black triangle indicates a putative signal peptide cleavage site. Sequences in black box are potential membrane-spanning domain. X indicates unidentified residue.

는 실험에 사용한 두툽상어가 발생과 분화의 과정을 이미 거친 성체임으로 MT3-MMP 유전자가 매우 적은 양 발현되기 때문인 것으로 추정된다.

이 단편은 MMPs 유전자의 중간부분에 해당됨으로 현재 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)의 방법<sup>18-20)</sup>으로 전체 cDNA를 클로닝하고 있으며, 나머지 10개의 PCR 단편에 대한 조사도 진행 중에 있다.

## 요 약

Matrix metalloproteinase (MMP)는 배발생 및 재조직화 등의 정상적인 생체형성과 관절염, 암전이, 치근막염, 골조송증 등의 질병과정에서 collagen이나 proteoglycan과 같은 세포외기질의 구성성분을 분해하는 아연(zinc) 효소군이다.

지금까지 다양한 종에서 mmp의 유전자가 클로닝되고 그 기능이 연구되어 왔지만 아직 어류에서는 연구결과가 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 한국의 부산연안에 많은 연골어류 두툽상어 (*Scylliorhinus torazame*)로부터 RT-PCR (reverse transcriptase dependent polymerase chain reaction)의 방법으로 mmp cDNA의 일부를 클로닝하였다. 이것은 염기서열에서 인간, 쥐 및 닭의 membrane type matrix metalloproteinase-3 (mt3-mmp)의 염기서열과 74% 동일성을 보이며, 아미노산서열에서는 90% 이상의 동일성을 갖고 있다. 또한 MMP에 나타나는 cysteine switch domain, zinc binding domain (HExGH motif), propeptide cleavage site, RRKR motif 등을 가지고 있다.

이러한 결과로부터 본 연구에서 클로닝된 RT-PCR 단편은 두툽상어의 mt3-mmp 또는 이와 유사한 유전자의 cDNA 이라 믿어진다.

## 감사의 글

이 논문은 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과입니다.

## 참 고 문 헌

- Shofuda, K., Yasumitsu, H., Nishihashi, A., Miki, K.

- and Miyazaki, K. : Expression of three membrane-type matrix metalloproteinases(MT-MMPs) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of MT3-MMPs with and without transmembrane domain from *J. Biol. Chem.*, **272**, 9749(1997).
2. Yang, M., Hayashi, K., Hayashi, M., Fujii, J. T. and Kurkinen, M. : Cloning and developmental expression of a membrane type-matrix metalloproteinase from chicken from *J. Biol. Chem.*, **271**, 25548(1996).
  3. Moscatelli, D., and Rifkin, D. B. : Membrane and matrix localization of proteinases : a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis from *Biochem. Biophys. Acta*, **948**, 67(1988).
  4. Woessner, J. F. Jr. : Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling from *FASEB J.*, **5**, 2145(1991).
  5. Emonard, H., and Grim, J.-A. : Matrix metalloproteinases from *Cell. Mol. Biol.*, **36**, 131(1990).
  6. Birkedal-Hansen, H. : From tadpole collagenase to a family of matrix metalloproteinase from *J. Oral. Pathol.*, **17**, 445(1988).
  7. Docherty, A. J. P., and Murphy, G. : The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP : a study using cDNAs and recombinant proteins from *Ann. Rheum. Dis.*, **49**, 469(1990).
  8. Matrisian, L. M. : Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling from *Triends Genet.*, **6**, 121(1990).
  9. Frisch, S. M., and Werb, Z. : Molecular biology of collagen degradation, pp. 85-108, Olsen, B. R., and Mimni, M. E.(eds), *Collagen : molecular biology*, Vol. IV, CRC Press, Boca Raton, Floride(1989).
  10. Werb, Z. : Proteinases and matrix degradation, pp. 34-41, Kelly, W. N., Harris, E. D., Jr., Ruddy, S., and Sledge(eds), *Textbook of Rheumatology*, 3rd ed, C.B.(1991).
  11. Carrel, R. W., and Boswell, D. R. : Serpins : the super-family of plasa serine proteinase inhibitors, pp. 430-420, Barrett, A. J., and Salvesen, G.,(eds) *Proteinase Inhibitors*, Elsevier, Amsterdam(1986).
  12. Cawston, T. E. : Protein inhibitors of metalloproteinases, pp. 589-610, Barrett A. J., and Salvesen, G., (eds), *Proteinase Inhibitors*, Elsevier, Amsterdam (1986).
  13. Valee, B. L., and Auld, D. S. : Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins from *Biochemistry* **29**, 5647(1990).
  14. Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H., and Van Wart, H. E. : Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase : evidence for the role of a Cys73 active site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation from *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 364 (1990).
  15. Weise, S. J. : Tissue destruction by neutrophils from *New Engl. J. Med.*, **320**, 365(1989).
  16. Suzuki, K., Enghild, J. J., Morodomi, T., Salvesen, G., and Nagase, H. : The mechanism of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) from *Biochemistry*, **29**, 10261(1990).
  17. Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction from *Anal. Biochem.*, **161**, 156(1987).
  18. Frohman, M. A. : Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs : thermal RACE from *Methods in Enzymology*, **218**, 340(1993).
  19. Rashtchian, A. : Novel methods for cloning and engineering genes using the polymerase chain reaction from *Current Opinion in Biotechnology*, **6**, 30 (1993).
  20. Carney, J. P., McKnight, C., Van Epps, S., and Kelly, M. R. : Random rapid amplification of cDNA ends (RRACE) allows for cloning of multiple novel human cDNA fragments containing(CAG)<sub>n</sub> repeats from *Gene* **155**, 289(1995).