Journal of Life Science **2008** Vol. 18. No. 3. 422~425 ©JLS / ISSN 1225-9918

- Note -

PANC-1세포에서 발현된 재조합 MT1-MMP의 효소 활성

김혜난 · 정혜신*

한남대학교 생명공학과

Received February 22, 2008 / Accepted March 15, 2008

Activities of Recombinant MT1-MMP Expressed in PANC-1 Cells. Hye-Nan Kim and Hye-Shin Chung*. *Department of Biotechnology, Hannam University, Daejon 305-811, Korea* - Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is a membrane-associated zinc-dependent endoproteinase involved in extracellular matrix remodeling. MT1-MMP hydrolyzes ECM proteins like collagen and is involved in cancer cell migration and metastasis. Caveolins are integral membrane proteins and play a role in formation of caveolae, specialized membrane microdomains involved in clathrin-independent endocytosis. Recombinant MT1-MMP was transiently expressed in PANC-1 cells. Cells expressing recombinant MT1-MMP were able to hydrolyze collagen and migrate on collagen coated trans-well. Both subjacent collagen degradation and the cell migration conferred by recombinant MT1-MMP were inhibited by co-transfection of plasmids containing caveolin-1 cDNA. The results support that MT1-MMP is localized in lipid raft of the membrane and MT1-MMP activities in invasive cells could be inhibited by caveolin.

Key words : MT1-MMP, caveolin, MMP-2 activation, collagen degradation, cell migration

서 론

Matrix metalloproteinase (MMP)는 아연 금속에 의존하는 단백질 가수분해효소족으로서 세포내 다양한 세포 외 기질 단백질(ECM)들을 분해한다[1]. 특히 Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)는 막결합 단백질 분해효소로서 피브로넥틴, 콜라젠, 젤라틴, 라미닌, 티내신(tenascin), 비트로넥틴(vitronectin) 등을 분해할 수 있으며, 세포의 침투와 침윤에 역할을 담당하여 종양 세포의 전이에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[2-4]. 막표면에서 발현된 MT1-MMP의 중요한 역할 중의 하나는 젤라티네이스 A라고도 알려진 MMP-2 전구효소의 활성화이다[5]. MT1-MMP에 의해 활성화된 MMP-2는 세포로부터 분리되어 ECM을 빠르게 분해하여 세포의 형태변화를 야기시킬 뿐 아니라 세포가 침윤 및 이동이 용이한 공간을 만들어줌으로써 암 전이능력을 촉진시켜 준다[6]. 카베올래(caveolae)는 막 단백질의 세포 내 이동이나 막에서의 세포 신호 전달에 관여하고 있다고 알려진 막의 특수한 부위이다[7]. 카베올래를 구성하는 주요 단백질 중의 하나인 카베올린-1(caveolin-1)은 막 내재 단백질로서 카베올래 형성을 유도하며 막 단백질의 세포내부로 이동(internalization)을 촉진하며, 카베올린-1의 발현이 MT1-MMP에 의한 세포의 이동(migration)을 저해한다고 보고되어 있다[8,9].

본 연구에서는 MT1-MMP를 거의 발현하지 않는 췌장암 유래 PANC-1세포주[10]를 사용하여 재조합 MT1-MMP를 발현시키고 활성을 확인하였다. 활성 측정 방법으로서는 MMP-2 전구효소(pro-MMP-2)의 절단에 의한 MMP-2의 생성, 세포막에서 MT1-MMP의 발현에 의한 세포와 접촉되어 있는 콜라젠의 분해 및 재조합 효소에 의한 세포 이동을 각각 측정하였다. 또한 재조합 카베올린-1의 발현에 의한 이들 활성의 변화를 살펴보았다.

*Corresponding author
Tel : +82-42-629-8773, Fax : +82-42-629-8769
E-mail : hschung@hnu.kr

재료 및 방법

시약

DMEM를 비롯한 동물세포 배양에 필요한 시약은 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)에서, 송아지 혈청은 Biowhittaker (Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. Lipofectamine 2000은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서, Fugene 6는 Roche에서, GM6001는 Chemicon (Temecula, CA, USA)에서 구입하였다. 그 외 일반 시약은 Sigma (St. Louis, Mo, USA)와 덕산 케미칼(Seoul, Korea)에서 구입하였다.

플라즈미드 제작 및 동물세포 배양

인간 MT1-MMP의 cDNA는 미시간대학의 와이스(Stephen Weiss) 교수로부터 얻었으며 카베올린-1의 cDNA는 경상대학교 김충원교수로부터 얻었다. 세포에서 발현하기 위한 벡터는 각 cDNA를 pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 삽입하여 만들었다. MT1-MMP의 돌연변이형 △CT는 세포질에 있는 부위(cytoplasmic tail)를 제거한 것이고, E240은 효소의 활성부위인 240번 글루탐산을

아스파르트산으로 치환한 것이며, MT1-MMP의 돌연변이형은 프라이머를 제작하여 PCR에 의해서 만들었다. 동물 세포는 항생제와 송아지 혈청(FBS)이 10% 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 벡터를 세포 내 주입하기 위한 시약은 Lipofectamine (Invitrogen)을 사용하였다.

젤라틴 zymography

Zymography는 2 mg/ml 젤라틴이 포함된 8.4% 폴리아크릴아마이드 SDS 젤을 사용하였다. 전기 영동한 젤을 2.5% Triton X-100에 넣어 30분간 흔들어 SDS를 제거한 후 5 mM $CaCl_2$와 1 μM $ZnCl_2$이 포함된 50 mM Tris-HCl, pH 7.6에 넣어 37°C에서 반응시키고 0.1% Coomassie용액에서 1시간 염색한 다음 염색액을 제거한 후 관찰하였다.

콜라젠 분해 활성 측정

쥐꼬리에서 분리하여 동결건조를 시킨 콜라젠을 0.2% 아세트산에 녹여 2.8 mg/ml되게 녹여 콜라젠 용액을 준비하였다. 콜라젠 코팅된 표면은 콜라젠 용액, 0.34 N NaOH와 10x 농축된 DMEM를 8:1:1 비율로 섞은 용액으로 12-well 표면에 얇게 바른 후 37°C에서 2시간 동안 건조시켜 준비하였다. 건조된 콜라젠 코팅된 표면을 증류수로 세척한 후 1×10^4 세포를 콜라젠 막표면 중앙에 떨어뜨리고 밤새 배양하였다. 배양접시에 Opti-MEM을 넣은 후 Lipofectamine을 이용해서 벡터를 넣고 4일간 배양한 후, 트립신으로 세포를 떨어뜨린 후 Coomassie 염색 용액으로 콜라젠을 염색하고 염색액을 제거하여 세포에 의한 콜라젠 분해에 의해 염색되지 않은 부위를 관찰하였다. 콜라젠 분해의 정량은 Gel Doc XR system (Bio-rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 Quantity One®에 의해서 계산하였다.

세포 이동(cell migration) 측정

Trans-well (8 μm pore size, Costar) 표면을 1 mg/ml 콜라젠 용액으로 막을 입힌 후, 혈청이 첨가된 DMEM에 30분간 담가 둔 후 웰의 안 쪽에 4×10^4개 세포를 첨가하고 밤새 배양하였다. Fugene 6 (Roche)를 사용하여 세포에 벡터를 주입하여 5일간 배양한 후, Hematoxylin과Eosin Y를 사용하여 세포를 염색하고 증류수로 세척 후, 막을 슬라이드 유리에 놓고 canada balsam을 넣은 후 커버글래스를 덮고 세포를 계수하였다.

결과 및 고찰

재조합 MT1-MMP의 발현에 의한 pro-MMP-2의 활성화

MT1-MMP의 역할 중 하나는 pro-MMP-2를 활성화시켜 MMP-2로 성숙시키는 것이다. MT1-MMP의 재조합 유전자를 포함하는 벡터를 넣은 세포에서 활성을 가진 재조합 MT1-MMP가 발현되는 것은 zymography에 의해 되었다 (Fig. 1). Pro-MMP-2는 재조합 MT1-MMP의 활성에 의해 성숙한 효소인 MMP-1로 전환되는 것을 알 수 있다. 이러한 활성은 세포질에 위치한 부위의 도메인을 제거한 돌연변이 효소인 △CT 에서 더 높게 나타났다. 이는 세포질에 위치한 부위가 막 단백질의 세포 내 이동에 필요한데, 세포질 부위가 없는 효소는 세포질 내로 이동이 저해되므로 막에 더 오래 머무르기 때문인 것으로 보인다. 효소 활성부위를 치환시킨 돌연변이(E240A) 효소는 예상대로 전혀 활성을 나타내지 않는 것을 관찰되었으며, 재조합 MT1-MMP에 의한 pro-MMP-2 활성화는 MMP 저해제인 GM6001에 의해 완전히 저해되는 것을 볼 수 있다. 이와 같은 결과에 의해 재조합 유전자에 의해 MT1-MMP가 세포막에서 발현되며, 발현된 MT1-MMP는 효소 활성을 지니고 있다는 것이 확인되었다. 한편 재조합 MT1-MMP의 활성은 카베올린의 발현에 의해 저해되는 것을 볼 수 있다(Fig. 1). 돌연변이 효소인 △CT의 경우에도 야생형 MT1-MMP의 활성과 마찬가지로 카베올린의 발현에 의해 효소 활성이 약 30% 정도 저해되는 것이 확인되었다. 이는 카베올린의 발현이 세포 표면에서 작동하는 MT1-MMP를 세포 내로 이동시킴으로써 pro-MMP-2 활성화가 저해되는 것으로 분석된다.

MT1-MMP를 발현하는 세포에 부착된 콜라젠의 분해

MMP-2와 같이 세포에서 발현되어 세포 밖으로 분비되는 수용성 효소들과는 달리 MT1-MMP는 세포막에 부착된 상

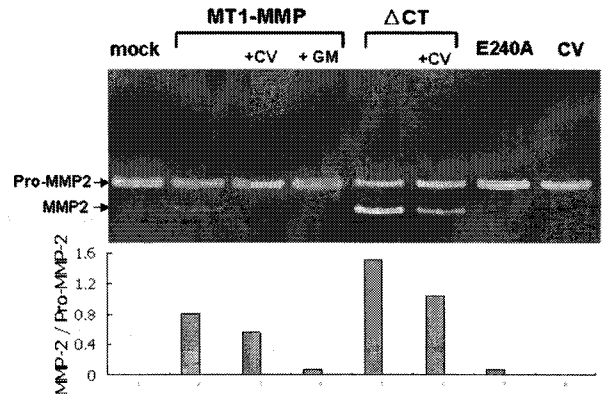

Fig. 1. Gelatin zymography showing pro-MMP-2 activation. PANC-1 cells transfected with MT1-MMP or caveolin-1 (CV) were incubated for 24 hr and exogenous pro-MMP-2 was added to the cell culture media. HT-1080 cultured media were used as a source for exogenous pro-MMP-2. Pro-MMP-2 activation by MT1-MMP was inhibited by GM6001 (GM), a MMP inhibitor. Ratio of mature MMP-2 and pro-MMP-2 was determined with the zymogram using Quantity One software (Bio-Rad) and shown below.

태로 세포와 접해 있는 ECM을 분해할 수 있다. MT1-MMP 결핍 쥐는 콜라젠의 파괴와 생성을 통한 콜라젠의 리모델링이 저해되어 심각한 발육 이상을 보이는 것이 관찰되었으며, 이는 MT1-MMP가 콜라젠의 파괴에 직접적으로 관여한다는 것을 증명한다[11].

MT1-MMP를 발현하는 세포에 의한 콜라젠 분해 활성을 측정하기 위해 콜라젠 코팅된 표면을 만들어 그 위에 세포를 부착시킨 후 부착된 세포에 의해 콜라젠이 분해되는 것을 관찰하였다(Fig. 2). 세포가 부착된 콜라젠 표면에서 세포를 제거한 후 표면을 염색하였을 때에 세포에 의해 콜라젠이 분해된 부위는 염색되지 않는 것을 볼 수 있다. 이러한 콜라젠 분해는 콜라젠과 부착된 부위의 세포막에서 발현되는 MT1-MMP의 활성에 의한 것이며, 세포질 부위 도메인이 결여된 돌연변이 효소인 △CT의 경우 더 왕성하게 나타냈으며 E240A 돌연변이 효소는 활성을 전혀 나타내지 않는 것을 볼 수 있다. 한편 MT1-MMP에 의한 세포부착 콜라젠 분해활성은 카베올린의 발현에 의해 약간 감소되는 것이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 앞에서 살펴본 pro-MMP-2 활성화의 결과와 유사하게 카베올린이 MT1-MMP의 세포 내 이동을 돕기 때문인 것으로 해석된다.

MT1-MMP를 발현하는 세포의 이동(migration)

ECM을 통한 세포의 이동은 매트릭스 리모델링이나 종양세포의 침윤에 필수적인 기능으로서 MMP들이 그 역할을 담당하며 특히 MT1-MMP의 역할이 중요하다고 알려져 있다[2]. MT1-MMP가 세포 이동에 있어서의 역할과 카베올린의 영향을 살펴보기 위해 콜라젠 매트릭스를 사용한 세포 이동

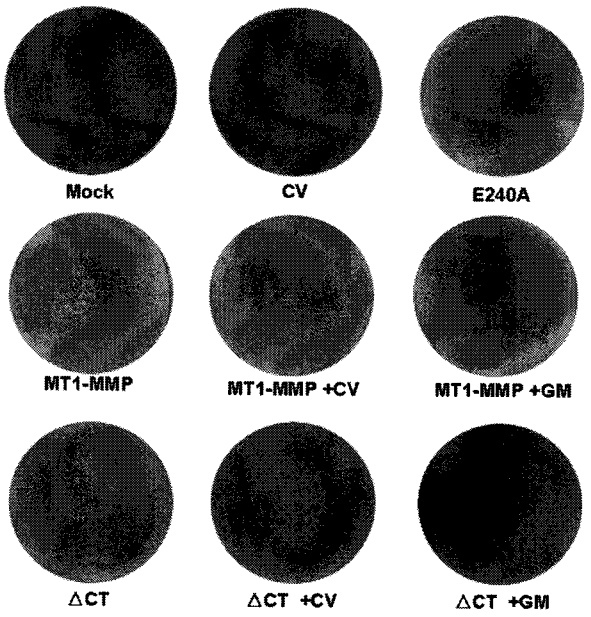

Fig. 2. Subjacent collagen degradation by the transfected cells. See materials and method for details.

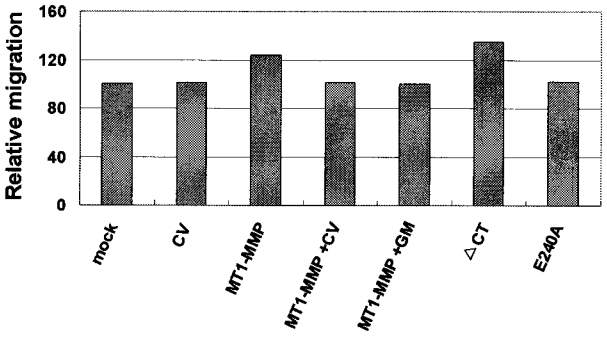

Fig. 3. Migration of transfected cells. See materials and method for details.

실험의 결과는 Fig. 3에 나타나 있다. 세포의 이동성은 MT1-MMP의 발현에 의해 증가되었으며, 이러한 증가는 카베올린에 의해 완전히 저해되는 것을 볼 수 있다, 세포질 도메인이 결여된 △CT 돌연변이의 경우에도 동일한 결과를 보였다. 이는 ECM을 통한 세포의 이동은 MT1-MMP에 의해 적어도 일부 의존되며, 이러한 기능은 세포 내 이동을 담당하는 카베올래에 의해 완전히 저해된다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 앞서 살펴본 MT1-MMP에 의한 pro-MMP-2 활성화나 콜라젠 분해가 카베올린에 의해 일부만이 저해되는 결과와 대비된다. 이러한 결과를 더 조사하기 위한 실험이 진행 중이다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 한남대학교 교비학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음. MT1-MMP와 카베올린 유전자를 보내 주신 와이스 교수와 김충원 교수에게 감사드리며, 돌연변이 제작을 도와준 강태극 씨에게도 감사드립니다.

References

1. Ohuchi, E., K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki and K. Okada. 1997. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J. Biol. Chem.* **272**, 2446-2451.
2. Hottary, K. H., E. Allen, A. Punturieri, I. Yana and S. J. Weiss. 2000. Regulation of Cell Invasion and Morphogenesis in a Three-dimensional Type I Collagen Matrix by Membrane-type Matrix Metalloproteinases 1, 2, and 3. *J. Cell Biol.* **149**, 1309-1323.
3. Egenlad, M. and Z. Werb. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161-174.
4. Seiki, M. 2002. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 624-632.
5. Stanton, S., J. Gavrilovic, S. J. Atkinson, M. d'Ortho, K. M.

Yamada, L. Zardi and G. Murphy. 1998. The activation of proMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP14) to a 45kDa form. *J. Cell Sci.* **111,** 2789-2798.

6. Atkinsoon, S. J., M. L. Patterson, M. J, Butler and G. Murphy. 2001. Membrane type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A synergistically degrade type I collagen in a cell model. *FEBS Lett.* **491,** 222-226.
7. Liu, P., M. Rudick and R. G. W. Anderson. 2002. Multiple functions of Caveolin-1. *J. Biol. Chem.* **277,** 41295-41298.
8. Krajewska, W. M. and I. Maslowska. 2004. Caveolins: Struture and function in signal transduction. *Cell Mol. Biol. Lett.* **9,** 195-220.
9. Annabi, B., M. Lachambre, N. Bousqet-Gagnon, M.. Page, D. Gingras and R. Belivau. 2001. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domain. *Biochem. J.* **353,** 547-553.
10. Lieber M., J. Mazzetta, W. Nelson-Rees, M. Kaplan and G. Todaro. 1975. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int. J. Cancer* **15,** 741-747.
11. Holmbeck, K., P. J. Bianco, S. Caterina, S. Yamada, M. Kromer, S. A. Kuznetsov, M. Mankani, P. G. Robey, A. R. Poole, I. Pidoux, J. M. Ward and H. Birdedal-Hansen. 1999. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* **99,** 81-91.