ORIGINAL ARTICLE

부위-특이적 억제제에 의한 26S와 20S Proteasome의 억제

우기민

순천향대학교 의과대학 생화학교실

Inhibition of the 26S and 20S Proteasomes by the Site-specific Inhibitors

Kee-Min Woo

Department of Biochemistry, Soonchunhyang University College of Medicine, Cheonan, Korea

Objective: The study was performed to establish the purification processes of both 26S and 20S proteasomes, also to investigate the inhibitory properties and patterns of two different proteasome inhibitors on the isolated proteasomes.

Methods: The 26S and 20S proteasomes were purified respectively using liquid chromatographies and glycerol density gradient fractionation. The inhibitory patterns and kinetics of two different proteasome inhibitors were investigated using purified 26S and 20S proteasomes.

Results: The purity of the isolated proteasomes were determined by their biochemical properties and electrophoretic patterns. 3-nitro-4-hydroxy-5-indophenylacetyl-leucyl-leucyl-leucyl-vinylsulfone (Nip-L₃-VS) inhibited exclusively the chymotrypsin-like peptidase activities of the 26S and 20S proteasomes. On the other hand, dansyl-phenylleucyl-boronic acid (DFLB) inhibited chymotrypsin-like, trypsin-like, and caspase-like peptidase activities of both proteasomes with different sensitivity.

Conclusion: The proposed purification method provides efficient separation and isolation of the 26S and 20S proteasomes. Nip-L₃-VS and DFLB were shown to have different inhibitory effects and kinetics on the peptidase activities of the isolated proteasomes. These studies are suggested to be applied to the researches on proteasome inhibitors as therapeutic reagents for many related diseases.

Keywords: Proteasome; Peptide-hydrolyzing activities; Proteasome inhibitors; Solid tumor; Bortezomib

서론

진핵세포의 대표적 단백질 분해효소인 proteasomes은 세포가 활동하는 동안 발생할 수 있는 유전자의 돌연변이, 합성 도중의 변이, 합성 후의 변성으로 인한 비정상적인 단백질을 제거하는 대표적인 분해효소이다[1-3]. 또한 proteasome은 세포의 정상적 활동에 필요한 여러 주요 과정들, 발생 도중의 기관의 생성, 세포 주기 및 분열[4,5], 유전자 발현 및 돌연변이의 복구[6], 혈관생성[7], 항원표지[8] 등에 직접 또는 간접적으로 작용할 뿐만 아니라 신경 및 근육의 퇴화과정, 세포 자살현상(apoptosis), 바이러스 감염과정, 세포의 암화 과정 등의 여러 질병 발병에도 밀접하게 관여한다[9,10]. Proteasome은 2,000 kD 크기의 26S 복합체와 700 kD의 20S 복합

체의 두 가지 형태로 존재하며, 26S proteasome은 20S 복합체의 양쪽 또는 한쪽에 19S 크기의 adenosine triphosphase (ATPase) 활성을 가진 조절복합체가 결합되어 있는 구조로 존재한다[11,12].

20S proteasome은 원통모양의 복합체로 22-35 kD 크기의 7가지 단백질들이 모인 고리가 4겹으로 포개어진 구조를 이룬다. 바깥쪽 2개의 고리는 α 구성성분들로서 구조적 안정화와 19S 조절복합체와의 상호작용에 관여하고, 안쪽 2개의 고리는 β 구성성분들로서 원통구조의 내부공간에서 단백질을 분해하는 활성을 지니고 있다($\alpha 7$ - $\beta 7$ - $\beta 7$ - $\alpha 7$). Proteasome의 크리스탈 구조연구와 돌연변이, 그리고 여러 화학적 분석을 통하여 proteasome은 β 구성성분의 N-말단의 threonine 기가 효소 촉매를 일으키는 활성부위인 'threonine protease'로 밝혀졌다. 진핵세포의 20S proteasome의 3개의 β 구성

Correspondence to: Kee-Min Woo

Department of Biochemistry, Soonchunhyang University College of Medicine, 31 Suncheonhyang 6-gil, Dongnam-gu, Cheonan 31151, Korea

Tel: +82-41-570-2443, E-mail: kmwoo1@sch.ac.kr

Received: May 6, 2018 / Accepted after revision: May 8, 2018

© 2018 Soonchunhyang Medical Research Institute

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

성분들이 서로 다른 기질 특이성의 분해활성을 지니고 있으며 [13,14], 각각 chymotrypsin-유사성, trypsin-유사성, 그리고 caspase-유사성 분해활성들이다. Chymotrypsin-유사성 분해활성은 소수성 아미노산의 C-말단을 절단하며, trypsin-유사성 활성은 염기성 아미노산의 C-말단을, caspase-유사성 활성은 산성 아미노산의 C-말단을 절단한다. 또한 20S proteasome은 특정 조건에서는 여러 단백질과 펩타이드들을 adenosine triphosphate (ATP)-비의존적으로 분해하는 활성을 지니고 있다. 그러나 초기 정제 후 20S proteasome은 활성이 없는 잠재적인 형태로 존재하므로 생체 내에서 이러한 기능에 대해서는 많은 의문점이 있다[15].

26S proteasome은 2,000 kD의 크기로 ubiquitin이 결합된 단백질들을 ATP-의존적으로 분해하는 거대 단백질 분해복합체이다. 구조적으로 20S proteasome의 양 끝에 두개의 19S ATPase 조절복합체가 비공유적으로 결합되어 있는 형태이다[11]. PA700 또는 19S-cap 복합체로도 불리는 19S ATPase 복합체는 서로 다른 18개 정도의 구성성분으로 이루어져 있으며, 그 중 6개의 구성성분이 ATPase 활성을 가져 20S proteasome과의 결합, ubiquitin이 연결된 단백질 기질의 결합, 단백질 기질로부터 ubiquitin의 제거, 단백질 기질의 구조 풀림, 단백질 기질의 20S 복합체로의 이동 등에 작용하는 것으로 여겨진다[16-18]. 특정 개체로부터 19S ATPase 복합체가 정제되었으며, 자체 ATPase 활성을 가지고 정제된 20S proteasome과의 복합체 형성도 가능하다고 보고된 바가 있다[19]. 효모를 이용하여 19S 복합체의 ATPase 구성성분의 조건적인 돌연변이를 제작하여 정제된 proteasome의 활성과 세포의 변화를 연구한 결과와 순수정제된 26S proteasome을 이용한 생화학적 분석을 통하여 19S ATPase 복합체의 다양한 역할들이 부분적으로 증명되었지만[20], 분해될 단백질 기질의 선별과정으로부터 최종 분해산물인 펩타이드가 만들어지는 전체 단백질 분해기작에 대해서는 아직 많은 부분이 해결되어야 할 연구과제이다.

Ubiquitin-proteasome system (UPS)을 통한 세포 내 단백질의 분해는 매우 복잡하고 정교하게 조절받으며 세포 내의 여러 중요한 과정의 조절에 작용하므로, UPS의 이상이나 잘못된 조절은 암, 신경퇴행, 자가면역, 유전적 및 대사의 이상 등을 통한 다양한 질병들을 유발하게 된다. 세포주기 조절, 혈관생성, 유전자 발현, 세포 자살에 관련된 주요 단백질들이 UPS에 의하여 분해되어 조절되며, 세포주기를 조절하는 cyclin A, B, D와 cyclin의 활성을 조절하는 cyclin-dependent kinase inhibitor인 p21 단백질[21], nuclear factor kB를 억제하는 IκB 단백질[22], p53 tumor suppressor 단백질[23], c-fos/c-jun, c-myc 등의 암유전자 단백질들, 세포죽음 조절단백질인 Bcl-2와 Bax [24] 등이 현재까지 밝혀진 UPS의 세포 내 단백질 기질들이다. Proteasome 활성의 억제는 이러한 단백질 기질들의 축적을 유발하여 세포 내 단백질의 항상성이 파괴되고, 세포주기가 무너지며, 세포의 성장이 멈추어 세포 자살현상이 유발된다. 물론

proteasome 억제를 통한 암세포의 파괴는 전반적인 세포 내 단백질들이 표적이므로 특이성과 선별성이 낮지만, 종양세포가 정상세포보다 훨씬 더 민감하게 작용하므로 현재 질병 치료의 새로운 장으로 proteasome을 억제하는 방법이 여러 암세포와 다양한 질병들을 대상으로 연구 중에 있다[25,26].

다양한 종류의 proteasome 억제제들이 합성되거나 발견되어 최근 몇 년 동안 여러 질병과 암들의 치료효과가 세포 배양이나 동물 실험을 통하여 검증 중에 있으며, 2004년 Bortezomib (PS-341)이라는 boronic acid 계열의 억제제가 임상실험을 거쳐 미국 식품의약국(Food and Drug Administration)으로부터 다발성 골수종(multiple myeloma) 치료제로 공식적으로 승인받았다[27,28]. 그러나 Bortezomib는 정상세포의 proteasome 활성도 억제하므로 엄격한 처방과 각별한 관리가 필요하고 다양한 후유증과 약에 대한 내성을 유발하므로, 이후 보다 효과적인 억제제 개발을 목적으로 많은 연구들이 진행 중에 있다[29,30]. 현재 다양한 종류의 proteasome 억제제가 개발되고 동물실험과 임상실험 단계에서 연구되고 있지만[31,32], proteasome의 구조적 복잡성과 순수분리의 어려움 때문에 정제된 26S와 20S proteasome에 대한 억제제들의 생화학적 연구는 상대적으로 저조하다. 본 연구는 동물조직으로부터 26S와 20S proteasome을 보다 효과적으로 정제하는 방법을 개발하고, 생화학적인 특성을 연구하였으며, proteasome 억제제들 중 boronic acid계열과 vinyl sulfone계열의 두 가지 억제제들의 기본적인 역학(kinetics)을 정제된 26S와 20S proteasome을 사용하여 규명함을 목적으로 수행하였다.

대상 및 방법

1. 재료

동결된 토끼 골격근은 Pel-Freez Biologicals (Rogers, AK, USA)로부터 구입하였다. DEAE-Affigel blue와 UnoQ2 FPLC column은 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)로부터 구입하였으며, 펩타이드 분해 활성 측정을 위한 기질 펩타이드들은 Bachem (Bubendorf, Switzerland)에서, 3-nitro-4-hydroxy-5-indophenylacetyl-leucyl-leucyl-leucyl-vinylsulfone (Nip-L₃-VS)와 dansyl-phenyllyl-leucyl-boronic acid (DFLB)는 BIOMOL international (Hamburg, Germany)에서 구입하였고, 이 외의 모든 시약과 시료는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Proteasome 정제를 위한 크로마토그래피는 Bio-Rad의 HR Workstation을 사용하였으며, 펩타이드 분해활성은 Shimadzu의 RF5301PC (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 측정하였다.

2. 26S and 20S proteasome의 정제

26S와 20S proteasome의 정제는 본 연구자의 지난 보고서에 제

시한 방법을 기본적으로 이용하였으며[33], 보다 높은 해상도와 순수를 위하여 아래와 같은 개선된 과정을 거쳐 시행하였다.

1) Preparation of crude extracts

토끼의 근육을 잘게 자른 후 TBS (Tris-buffered saline)로 여러 번 씻어 피를 제거하고 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM dithiothreitol [DTT], 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], 0.25 M sucrose, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP)를 질량 대비 2 배의 부피로 넣어 믹서기로쇄균화하였다.쇄균액을 10,000×g의 원심력으로 4°C에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 다시 100,000×g에서 1시간 동안 초고속 원심분리하였다.

2) Ultracentrifugal precipitation

상층액을 다시 150,000×g에서 6시간 원심분리하여 proteasome을 함유하는 침전물을 얻은 후, 침전물을 완충액 A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP)에 잘 녹인 후 완충액 A로 총 3번 교환하며 투석하였다.

3) DEAE-Affigel blue chromatography

투석한 ultracentrifugation 침전물을 완충액 A로 equilibration 되어 있는 DEAE-Affigel blue column에 올리고 40 mM NaCl이 함유된 완충액 A로 column 부피의 20배로 씻어준 후, 150 mM NaCl을 함유한 완충액 A로 proteasome을 부분 정제하였다.

4) Uno Q-2 chromatography

DEAE-Affigel blue에서 유출된 proteasome 분획물을 150 mM NaCl로 equilibration된 Uno Q-2 column에 올리고 충분히 씻어준 후 총 200 mL의 NaCl 농도구배(150–450 mM)로 분획하였다. 이 과정에서 20S와 26S proteasome은 서로 분리되어 수확되며, 다음 과정을 통해 최종적으로 정제된다.

5) Glycerol density gradient centrifugation

Uno Q-12 column으로부터 나온 26S proteasome 용액을 Centricon-30으로 1 mL로 농축하고 총 38 mL의 23%–37% glycerol 농도구배 용액(25 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM DTT, 0.5 mM ATP, 5 mM MgCl₂)에 조심스럽게 올려 100,000×g로 22시간 원심분리하였다. 원심분리한 용액을 분획하였다. 분획물에 대한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)와 펩타이드 분해활성을 측정하여 26S와 20S proteasome의 분리를 확인하고, 활성과 정제도가 높은 분획들을 각각 모아 다시 농축하여 -70°C에 보관하며 이후의 모든 활성 측정에 사용하였다. 이때 proteasome의 변성을 억제하기 위하여 보관액은 10% glycerol을 함유하도록 하였다.

3. Adenosine triphosphate-depletion of the 26S proteasome

정제된 26S proteasomes으로부터의 ATP 제거는 Sephadex G-25 resin이 함유된 Nick-spin column을 이용하였다. 우선 column을 원하는 완충액으로 채운 후 500×g에서 5분간 원심분리를 하고, 적당량의 26S proteasome을 resin의 중앙에 조심스럽게 올리고 다시 같은 조건에서 원심분리를 하여 수집한다. 이 방법은 70% 이상의 단백질과 활성의 회복율을 보인 반면, ATP는 95% 이상 제거되는 것으로 나타났다(결과 생략).

4. Peptide-hydrolyzing activity assays

적당량의 정제된 proteasome을 100 μL의 반응액(100 μM succinimidyl-leucyl-leucyl-valyl-tyrosyl-7-amino-4-methylcoumarin [suc-LLVY-AMC] in 50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM DTT, 1% Me₂SO, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP)에 넣고 37°C에서 일정 시간 동안 반응시킨다. 900 μL의 1% SDS 용액을 넣어 반응을 종료하고 해리된 AMC의 형광(fluorescence)을 측정한다(excitation, 380 nm; emission, 460 nm). 20S와 26S proteasome을 구분하기 위하여 ATP 대신 0.02% SDS를 첨가하여 활성을 측정하고 비교한다.

연속적인 proteasome의 활성을 측정하기 위해서는 0.02–1 μg의 정제된 proteasome을 500 μL의 반응액에 넣고 37°C로 온도가 유지되는 형광광도계속에서 지속적으로 해리되는 자유 AMC의 형광값을 실시간으로 기록한다. 연속적인 활성 측정 동안 분해산물인 자유 펩타이드는 proteasome의 단백질 분해활성을 경쟁적으로 억제하기 때문에 정확한 초기 속도를 측정하기 위하여 기질의 분해는 최종 1%를 넘지 않도록 한다.

5. Radiolabeling of ¹²⁵I-Nip-L₃-VS on the 26S and 20S proteasomes

10 μL의 반응액(50 mM Tris, pH 8, 5 mM MgCl₂ mM)에 정제 후 ATP가 제거된 26S proteasome 또는 정제된 20S proteasome을 다양한 조건에서 ¹²⁵I-Nip-L₃-VS와 함께 4°C에서 45분간 반응시킨 후, SDS-PAGE를 시행하고 Coomassie-blue 시약으로 염색한다. 염색 후 전기영동 젤을 건조시키고 autoradiography를 실시하고 농도 측정기(densitometer)를 사용하여 각 band의 면적을 계산한다.

결 과

1. Effects of Nip-L₃-VS on the peptidase activities of the proteasome

정제된 26S proteasome과 20S proteasome에 여러 농도의 Nip-L₃-VS를 처리하여 15분간 chymotrypsin-유사성 펩타이드 분해활성을 측정한 결과, 26S와 20S proteasome의 활성이 모두 민감하게

Fig. 1. Dose effects of Nip-L₃-VS on the peptidase activities of the 26S and 20S proteasomes. 0.8 µg of 20S proteasomes (○) in 0.1 mL buffers containing various concentrations of Nip-L₃-VS were assayed at 37°C for 15 minutes. The peptidase activities of the 26S proteasomes (●) were measured in a same manner but in addition of 0.2 mM ATP. The activities were shown as percent compared to those without Nip-L₃-VS. Nip-L₃-VS, 3-nitro-4-hydroxy-5-indophenylacetyl-leucyl-leucyl-leucyl-vinylsulfone; suc-LLVY-AMC, succinimidyl-leucyl-leucyl-valyl-tyrosyl-7-amino-4-methylcoumarin.

Table 1. Effects of Nip-L₃-VS on three different peptidase activities of the 26S proteasomes

Peptides used	Hydrolysis of peptides (%) with Nip-L ₃ -VS		
	0 nM	250 nM	1,000 nM
suc-LLVY-AMC	100	20	4.6
z-LRR-AMC	100	101	100
Bz-LLE-βNA	100	95	104

Various concentrations of Nip-L₃-VS were added into 0.4 µg of the 26S proteasomes, and the peptidase activities were assayed with the different fluorogenic peptide substrates at 37°C. The activities were expressed as percent compared to those without the proteasome inhibitor.

Nip-L₃-VS, 3-nitro-4-hydroxy-5-indophenylacetyl-leucyl-leucyl-leucyl-vinylsulfone; suc-LLVY-AMC, succinimidyl-leucyl-leucyl-valyl-tyrosyl-7-amino-4-methylcoumarin; z-LRR-AMC, benzyl-Leu-Arg-Arg-AMC; Bz-LLE-βNA, benzoyl-Leu-Leu-Glu-β-naphthylamide.

억제되었다(Fig. 1). Proteasome 활성의 50%를 억제하는 Nip-L₃-VS의 K_i값은 대략 100 nM였으며, 26S proteasome이 20S proteasome보다 약간 더 민감하게 반응하였다.

Nip-L₃-VS에 의한 억제현상이 trypsin-유사성과 caspase-유사성 펩타이드 분해활성에서도 나타나는지 조사하기 위하여 Nip-L₃-VS를 농도별로 처리하여 26S proteasome의 펩타이드 분해활성을 측정하였다(Table 1). Nip-L₃-VS는 chymotrypsin-유사성 펩타이드 분해활성을 억제하였으나, benzyl-Leu-Arg-Arg-AMC (z-LRR-AMC)를 기질로 이용한 trypsin-유사성 펩타이드 분해활성과

Fig. 2. Radiolabeling of ¹²⁵I-Nip-L₃-VS on 26S and 20S proteasomes. Proteasomes were incubated with ¹²⁵I-Nip-L₃-VS and various additions of a (none), b (ATP), c (AMPPNP), d (ADP), e (MG132 and ATP), f (suc-LLVY-AMC and ATP into 26S proteasome), g (none), and h (0.02% SDS into 20S proteasomes) at 4°C for 45 minutes. The reactants were subjected to SDS-PAGE followed by Coomassie-blue staining (A) and autoradiography (B). Nip-L₃-VS, 3-nitro-4-hydroxy-5-indophenylacetyl-leucyl-leucyl-leucyl-vinylsulfone; ATP, adenosine triphosphate; AMPPNP, adenylyl imidodiphosphate; ADP, adenosine diphosphate; suc-LLVY-AMC, succinimidyl-leucyl-leucyl-valyl-tyrosyl-7-amino-4-methylcoumarin; SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

benzoyl-Leu-Leu-Glu-β-naphthylamide (Bz-LLE-βNA)를 기질로 이용한 caspase-유사성 펩타이드 분해활성은 높은 농도에서도 전혀 억제하지 않았다. 이 결과로 Nip-L₃-VS는 26S proteasome과 20S proteasome의 chymotrypsin-유사성 펩타이드 분해활성만 선택적으로 억제함을 알 수 있다.

2. Binding of Nip-L₃-VS on the proteasomes

Nip-L₃-VS의 억제현상과 비가역적 결합현상을 조사하기 위하여 ¹²⁵I-Nip-L₃-VS를 여러 가지 조건에서 정제된 26S 또는 20S proteasome과 일정 시간 반응시키고 SDS-PAGE와 autoradiography를 실시하였다(Fig. 2). SDS-PAGE 후 Coomassie로 염색한 결과 26S와 20S proteasome의 단백질 band 양상은 매우 높은 정도로 순수 분리되었음을 알 수 있다(Fig. 2A). 또한 방사능 표지 검출결과 Nip-L₃-VS가 26S 및 20S proteasome에 Nip-L₃-VS가 공유결합을 형성하여 비가역적으로 억제함을 알 수 있다. Nucleotide가 결합된 26S proteasome도 ATP, adenylyl imidodiphosphate (AMPPNP), ADP (adenosine diphosphate)가 첨가된 경우와 큰 차이를 보이지 않은 것으로 보여, 억제제의 결합에 nucleotide는 영향을 미치지 않음을 알 수 있다(Fig. 2B, lane a-d). Proteasome에 대한 또 다른 억제제인 MG132는 Nip-L₃-VS의 proteasome과의 결합을 완전히 억제하는 것으로 보아 두 억제제들은 모두 proteasome의 같은 부위에 경쟁적으로 반응한다는 것을 알 수 있다(Fig. 2B, lane e). 반면에

예상과 다르게 펩타이드 기질인 suc-LLVY-AMC는 억제제의 결합에 영향을 미치지 않았다(Fig. 2B, lane f). 또한 활성화되지 않은 20S proteasome은 26S proteasome보다는 약하게 억제제가 결합하였지만(Fig. 2B, lane g), 0.02% SDS를 첨가하여 활성화된 20S proteasome의 경우 표지되는 억제제의 양이 크게 증가하였으며(Fig.

Fig. 3. Inhibition of the peptidase activities of 26S proteasomes by DFLB. 0.4 μ g of 26S proteasomes in 0.1 mL buffers containing various concentrations of Nip-L₃-VS (○) or DFLB (▲) were assayed at 37°C for 15 minutes. DMSO (●), which is the solvent for DFLB solubilization, had little effects on the activities. The activities were shown as percent compared to those without any reagent. Nip-L₃-VS, 3-nitro-4-hydroxy-5-indophenylacetyl-leucyl-leucyl-vinylsulfone; DFLB, dansyl-phenylleucyl-leucyl-boronic acid; DMSO, dimethyl sulfoxide; suc-LLVY-AMC, succinimidyl-leucyl-leucyl-valyl-tyrosyl-7-amino-4-methylcoumarin.

2B, lane h), 농도계(densitometry)를 통하여 분석한 결과 10–12배 증가한 것으로 계산되었다.

3. Effects of DFLB on the proteasomes

Bortezomib과 같은 boronic acid를 작용기로 가지는 proteasome 억제제로 알려져 있는 dansyl-phenylleucyl-boronic acid (DFLB)의 정제된 proteasome에 대한 억제 양상을 Nip-L₃-VS와 비교실험을 하였다. 다양한 농도의 DFLB와 Nip-L₃-VS를 26S proteasome에 처리하여 chymotrypsin-유사성 펩타이드 분해활성을 조사해본 결과 DFLB의 K_i 값은 약 40 nM로 100 nM의 K_i 를 가지는 Nip-L₃-VS보다 더 민감하게 proteasome을 억제하였다(Fig. 3). DFLB의 proteasome에 대한 억제현상은 온도가 일정하게 유지되는 형광광도계에서의 연속적인 활성측정법에서 더욱 뚜렷하게 나타났다(Fig. 4), 20S proteasome은 10 nM의 억제제 농도에서 약 67% 억제되었고, 26S proteasome은 동일 농도에 의하여 86%의 억제현상이 나타났다. 억제제에 대한 두 proteasome 간의 민감성의 차이는 Nip-L₃-VS에 의한 결과와 유사한 것으로 보이며, 이러한 차이는 비활성화되어 있는 20S proteasome은 분해될 기질이 효소의 활성부위에 들어갈 수 있는 경로가 구조적으로 닫혀있는 반면, 26S proteasome은 19S 조절복합체에 의해 구조적으로 열려 있다는 것은 증명한다.

DFLB의 caspase-유사성 펩타이드 분해활성에 대한 영향을 연속적인 활성측정법을 통하여 조사하기 위하여 chymotrypsin-유사성 펩타이드 분해활성의 다른 기질인 z-glycyl-glycyl-leucyl-AMC (z-GGL-AMC)와 caspase-유사성 분해활성의 기질인 Bz-LLE- β NA를 사용하여 측정하여 비교한 결과, DFLB는 protea-

Fig. 4. Dose effects of DFLB on the peptidase activities of the 26S and 20S proteasomes. 0.4 μ g of 26S proteasome (A) or 0.8 μ g of 20S proteasome (B) in 0.1 mL buffers containing various concentrations of DFLB were assayed at 37°C for 15 minutes. The activities were shown as percent compared to those without DFLB. DFLB, dansyl-phenylleucyl-boronic acid; suc-LLVY-AMC, succinimidyl-leucyl-leucyl-valyl-tyrosyl-7-amino-4-methylcoumarin.

Fig. 5. Inhibition of different peptidase activities of 26S proteasomes by Nip-L₃-VS and DFLB. The peptidase activities of 0.4 μg of 26S proteasome with 10 nM of DFLB or 100 nM of Nip-L₃-VS were assayed continuously at 37°C in 1 mL reaction mixture in the presence of Z-GGL-AMC (A) or Bz-LLE-βNA (B). The activities were shown as arbitrary units from a spectrofluorometer. Nip-L₃-VS, 3-nitro-4-hydroxy-5-indophenylacetyl-leucyl-leucyl-vinylsulfone; DFLB, dansyl-phenylleucyl-boronic acid; DMSO, dimethyl sulfoxide; z-GGL-AMC, z-glycyl-glycyl-leucyl-AMC; Bz-LLE-βNA, benzoyl-Leu-Leu-Glu-β-naphthylamide.

some의 2가지 펩타이드 분해활성을 모두 억제하였다(Fig. 5). 민감도에서는 약간의 차이를 보였으며, caspase-유사성 펩타이드 분해활성이 상대적으로 낮은 민감도로 억제되었다(Fig. 5B). 반면, Nip-L₃-VS는 연속적 활성측정법에서 chymotrypsin-유사성 펩타이드 분해활성을 DFLB보다는 약하게 억제하였으며, caspase-유사성 펩타이드 분해활성은 거의 억제하지 않았다. 이상의 결과들을 통하여 Nip-L₃-VS와 DFLB는 26S와 20S proteasome의 펩타이드 활성 부위에 결합하는 억제제이지만, Nip-L₃-VS는 chymotrypsin-유사성 펩타이드 분해활성에 특이적으로 작용하는 반면, DFLB는 Nip-L₃-VS보다 더 낮은 농도에서 활성을 억제하며, proteasome이 가지는 세 종류의 펩타이드 분해활성에 모두 작용하는 억제제임을 알 수 있다.

고 찰

1980년대 말 ubiquitin과 proteasome에 의한 ubiquitin-의존적 단백질 분해현상이 알려진 이후 여러 조직에서 proteasome이 연구되어 세포 내의 작용과 기능들이 계속적으로 밝혀지고 있다. *Archaeobacteria*로부터 사람에 이르기까지 광범위하게 존재하는 proteasome은 개체에 따라 구조와 생화학적 성질이 약간의 차이는 있지만[34,35], 대개 26S와 20S proteasome의 형태로 존재하며 정제와 분석과정 도중 구조적 변화와 활성의 변화가 쉽게 일어나는 매우 불안정한 복합체들이다. 특히, 20S proteasome은 *in vitro*상에서 시간이 흐름에 따라 낮은 농도의 SDS, 적당한 가열, 약산 등의 여러 가지 요인에 따라 자체 펩타이드 분해활성이 서서히 증가하는 현상

을 보이므로[15], 가장 안정된 조건에서 빠른 시간 내에 정제하는 것이 세포 내 존재하는 형태 그대로 정제할 수 있는 요건이다. 26S proteasome은 20S proteasome과 19S 조절복합체의 비공유적 결합으로 이루어진 불안정한 구조를 가지고 있어, 20S proteasome보다 외부 요인에 더 민감하게 변성되어 활성을 잃어버리는 성질이 있으므로, 정제와 분석 시 더 각별한 주의를 요하는 단백질 분해효소이다. 따라서 각 proteasome들을 가능한 이러한 변화가 없이 순수정제하는 것이 proteasome에 대한 모든 생화학적 연구에 우선적으로 필요한 작업이다. 본 연구에서는 기존 발표된 방법을 개선하여 토끼의 골격근으로부터 26S와 20S proteasome을 분리하고 각각 정제하였으며, 전기영동과 활성측정을 통한 생화학적 분석으로 각 proteasome들은 고유의 구조와 성질을 가지는 원형 그대로의 복합체로 정제되었음을 판단할 수 있었다.

UPS에 의한 세포 내 단백질들의 분해기작은 매우 정교하게 조절되어 세포 성장과 분화, 세포 주기 및 분열, 세포 죽음, 유전자 발현, 생체 신호전달 및 단백질 항상성의 조절에 직접 관여하므로 UPS의 이상이나 잘못된 조절은 직접 또는 간접적으로 질병들을 유발하는 결과를 초래한다. 최근 질병의 진단과 치료제 개발의 목적으로 여러 질병들의 원인과 현상을 proteasome과 UPS에 관련하여 연구하고, 다양한 proteasome 억제제를 개발하고 합성하여 치료효과들을 검증하고 있다. 특히, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 같은 신경퇴색증과[10] 류머티즘성 관절염 등의 자가면역증[36]을 비롯하여, 신장암, 위암, 간암, 유방암, 뇌종양, 자궁암, 방광암, 폐암, 전립선암, 골수암 등의 다양한 암[37]에 대하여 proteasome 억제제를 이용한 치료 또는 억제효과에 관한 보고들이 지속적으로 발표되

고 있다.

Proteasome 억제제들은 자연물과 합성물의 두 군으로 나누어진다. 합성 억제제들은 대개 펩타이드에 기원하고 작용기가 aldehyde, boronic acid, benzamide, vinyl sulfone, alpha-ketoaldehyde들이 다[26]. 가장 대표적인 Bortezomib (PS-341)는 boronic acid를 가지는 다이펩타이드(dipeptide) 변형체로 proteasome의 활성부위 threonine에 Bortezomib의 C-말단의 boronic acid가 가역적으로 작용하여 활성을 억제한다[38]. 2004년 다발성 골수종(multiple myeloma)에 대한 공식 치료제로 승인받은 Bortezomib는 전체 다발성 골수종 환자의 35% 정도에 뚜렷한 효과를 나타내지만, 독성을 보이고 약에 대한 저항성을 유발하는 부작용이 심하여, 많은 연구자들이 proteasome에 보다 특이적이고 효과적인 억제제를 개발하여 질병 치료에 도입하려는 노력들이 진행 중에 있다[30,32,39]. 그람 양성 actinomycete인 *Salinospora*의 발효 부산물인 Salinosporamide (Marizomib; NPI-0052)라는 자연물이 Bortezomib보다 강력한 proteasome 억제제로 *in vivo* 및 *in vitro*에서 더 높은 항암효과를 보이며, 섭취를 통하여서도 같은 약효를 보이므로 Bortezomib를 대체할 수 있는 항암치료제로 현재 임상 시험 중에 있다[40].

본 연구에서는 다양한 proteasome 억제제들 중 가장 많이 이용되는 vinyl sulfone 계열의 억제제인 Nip-L₃-VS와 boronic acid 계열 억제제인 DFLB의 억제작용을 정제된 20S와 26S proteasome을 이용하여 조사하였다. Proteasome의 세 가지 펩타이드 분해활성들 중 chymotrypsin-유사성 펩타이드 분해활성이 두 억제제에 의해 모두 nM 수준의 낮은 농도에서 억제되었으며, 26S proteasome이 20S proteasome보다 더 민감하게 반응하였다. 방사능으로 표지된 Nip-L₃-VS를 proteasome과 반응시켜 전기영동을 통한 autoradiography를 실시한 결과, 억제제는 proteasome의 beta 구성성분과 공유결합을 하며, proteasome 억제제의 한 종류인 MG-132에 의하여 결합이 경쟁적으로 일어나는 것으로 보아, chymotrypsin-유사성 펩타이드 활성을 가지는 β -5 구성성분의 threonine에 결합하였음을 알 수 있었다. 그러나 trypsin-유사성 펩타이드 분해활성과 caspase-유사성 펩타이드 분해활성은 동일 농도의 억제제에 의해 거의 영향을 받지 않았으므로 다른 일반적인 proteasome 억제제보다 선택성이 더 높은 억제제로 생각된다. DFLB는 Nip-L₃-VS보다 억제 특이성은 낮지만 더 강력하게 proteasome을 억제할 뿐만 아니라 다른 두 가지 펩타이드 분해활성도 억제하므로 proteasome의 활성 억제를 통한 질병의 조절이나 치료에 더 효과적으로 적용될 수도 있다. 이를 위해서는 Nip-L₃-VS와 DFLB의 세포 내 다른 단백질 분해현상에 대한 억제와 세포에 미치는 영향 등은 추가적인 연구를 통하여 밝혀져야 한다. 또한 Bortezomib와 Marizomib는 대부분의 연구가 정제된 20S proteasome이나 세포 수준에서 이루어졌으며, 순수정제된 26S proteasome을 이용한 억제역학은 아직 밝

혀진 바가 거의 없으므로, 본 연구에서 제안한 26S proteasome과 20S proteasome의 효율적인 정제방법은 이러한 억제제에 대한 보다 정확한 생화학적인 연구를 위한 기본적이고 필수적인 과정으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

- Hiller MM, Finger A, Schweiger M, Wolf DH. ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 1996;273:1725-8.
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996;65:801-47.
- Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 1996;30:405-39.
- Hershko A. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:788-99.
- Lanker S, Valdivieso MH, Wittenberg C. Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science* 1996;271:1597-601.
- Hermida-Matsumoto ML, Chock PB, Curran T, Yang DC. Ubiquitinylation of transcription factors c-Jun and c-Fos using reconstituted ubiquitinating enzymes. *J Biol Chem* 1996;271:4930-6.
- Rahimi N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2012;11:538-48.
- Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992;357:375-9.
- Naujokat C, Hoffmann S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 2002;82:965-80.
- Bronstein JM, Chou AP. Peripheral proteasome and caspase activity in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Neurology* 2006;67:182.
- DeMartino GN, Moomaw CR, Zagnitko OP, Proske RJ, Chu-Ping M, Afendis SJ, et al. PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J Biol Chem* 1994;269:20878-84.
- Kish-Trier E, Hill CP. Structural biology of the proteasome. *Annu Rev Biophys* 2013;42:29-49.
- Orlowski K, Cardozo C, Michaud C. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex: properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* 1993;32:1563-72.
- Cardozo C, Eleuteri AM, Orlowski M. Differences in catalytic activities and subunit pattern of multicatalytic proteinase complexes (proteasomes) isolated from bovine pituitary, lung, and liver. Changes in LMP7 and the component necessary for expression of the chymotrypsin-like activity. *J Biol Chem* 1995;270:22645-51.
- Tanaka K, Yoshimura T, Ichihara A. Role of substrate in reversible activation of proteasomes (multi-protease complexes) by sodium dodecyl sulfate. *J Biochem* 1989;106:495-500.
- Akashi T, Yokosawa H, Sawada H. Regulatory subunit complex dissociated from 26S proteasome: isolation and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1995;1245:331-8.
- DeMartino GN, Proske RJ, Moomaw CR, Strong AA, Song X, Hisamatsu H, et al. Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. *J Biol Chem* 1996;271:3112-8.
- Kohler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, Finley D. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase

- and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 2001;7: 1143-52.
19. Chu-Ping M, Vu JH, Proske RJ, Slaughter CA, DeMartino GN. Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *J Biol Chem* 1994;269:3539-47.
20. Rubin DM, Glickman MH, Larsen CN, Dhruvakumar S, Finley D. Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J* 1998;17:4909-19.
21. Zhu Q, Wani G, Yao J, Patnaik S, Wang QE, El-Mahdy MA, et al. The ubiquitin-proteasome system regulates p53-mediated transcription at p21waf1 promoter. *Oncogene* 2007;26:4199-208.
22. Scherer DC, Brockman JA, Chen Z, Maniatis T, Ballard DW. Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11259-63.
23. Camus S, Menendez S, Cheok CF, Stevenson LF, Lain S, Lane DP. Ubiquitin-independent degradation of p53 mediated by high-risk human papillomavirus protein E6. *Oncogene* 2007;26:4059-70.
24. Lang-Rollin I, Maniatis M, Jabado O, Vekrellis K, Papantonis S, Rideout HJ, et al. Apoptosis and the conformational change of Bax induced by proteasomal inhibition of PC12 cells are inhibited by bcl-xL and bcl-2. *Apoptosis* 2005;10:809-20.
25. Elliott PJ, Ross JS. The proteasome: a new target for novel drug therapies. *Am J Clin Pathol* 2001;116:637-46.
26. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 2001;8:739-58.
27. Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 1999;5:2638-45.
28. Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist* 2003;8:508-13.
29. Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC. A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy. *Br J Cancer* 2006;95:961-5.
30. Guo KY, Han L, Li X, Yang AV, Lu J, Guan S, et al. Novel proteasome inhibitor delanzomib sensitizes cervical cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis via stabilizing tumor suppressor proteins in the p53 pathway. *Oncotarget* 2017;8:114123-35.
31. Brayer J, Baz R. The potential of ixazomib, a second-generation proteasome inhibitor, in the treatment of multiple myeloma. *Ther Adv Hematol* 2017;8:209-20.
32. Levin N, Spencer A, Harrison SJ, Chauhan D, Burrows FJ, Anderson KC, et al. Marizomib irreversibly inhibits proteasome to overcome compensatory hyperactivation in multiple myeloma and solid tumour patients. *Br J Haematol* 2016;174:711-20.
33. Woo KM, Lee SH, Cho MH. Multiple roles of nucleotides in 26S proteasome from skeletal muscles. *Soonchunhyang Med Sci* 2004;10:129-42.
34. Lowe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 1995;268:533-9.
35. Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997;386: 463-71.
36. Wang J, Maldonado MA. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* 2006;3: 255-61.
37. Cardoso F, Ross JS, Picart MJ, Sotiriou C, Durbecq V. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2004;5: 148-57.
38. Groll M, Berkens CR, Ploegh HL, Ova H. Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. *Structure* 2006;14:451-6.
39. Ruiz S, Krupnik Y, Keating M, Chandra J, Palladino M, McConkey D. The proteasome inhibitor NPI-0052 is a more effective inducer of apoptosis than bortezomib in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1836-43.
40. Spencer A, Harrison S, Zonder J, Badros A, Laubach J, Bergin K, et al. A phase 1 clinical trial evaluating marizomib, pomalidomide and low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma (NPI-0052-107): final study results. *Br J Haematol* 2018;180:41-51.