

생체내 정보 전달계 효소인 Phospholipase C 활성을 저해하는 Anguillosporal의 작용기전

이준원*, 김보연**, 안종석**

요약

곰팡이로부터 분리한 PLC inhibitor인 anguillosporal은 *in vitro* 뿐 만 아니라 EGF에 의해 활성화된 A431세포에서 PLC γ 1의 활성을 저해하고 α -thrombin에 의해 활성화된 CCL39세포에서 PLC β 1의 활성을 저해함을 알 수 있었다. 그러나, anguillosporal은 EGF에 의해 활성화된 A431 세포에서 EGFR의 자가 인산화와 PLC γ 1의 tyrosine 인산화를 감소시키지 못하였다. 이러한 결과들로 보아 anguillosporal은 phospholipase C의 특이적 저해제임을 알 수 있다.

Mechanism of Anguillosporal Inhibitory Activity for Phospholipase C as the Signal Transducer in the Biological Networking

Jun-Won Lee*, Bo-Yeon Kim**, Jong-Seog Ahn**

ABSTRACT

Anguillosporal dose-dependently inhibited phospholipase C (PLC) γ 1 activity in A431 cells in response to epidermal growth factor (EGF). The compound also inhibited PLC β 1 activity in α -thrombin-stimulated CCL39 cells. In accordance with this, PLC γ 1 and PLC β 1 activities were also decreased by anguillosporal *in vitro*. However, anguillosporal did not reduce the auto-phosphorylation of EGFR and the tyrosine phosphorylation of PLC γ 1 in EGF-stimulated A431 cells. Also anguillosporal did not inhibit the tyrosine kinase activity of EGFR. From these results, it is suggested that anguillosporal is a specific inhibitor of phospholipase C.

Key Words : Anguillosporal, phospholipase C, tyrosine phosphorylation, tyrosine kinase e

* 배재대학교 생명유전공학과의 junwon@pcu.ac.kr

** 한국생명공학연구원

· 제1저자(First Author) : 이준원 · 교신저자(Correspondent Author) : 안종석

· 접수일(2010년 5월 20일), 수정일(1차 : 2010년 6월 21일), 게재확정일(2010년 6월 28일)

I. 서 론

세포의 성장 및 증식과 같은 세포반응들은 여러 가지 자극인자들이 세포막 수용체에 결합함으로써 유도되며, 일련의 세포내 신호전달과정을 거친다. 이 신호전달과정에서 중요한 역할을 하는 효소중의 하나인 phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC)는 세포내 미량 인지질인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP₂)를 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃)와 diacylglycerol (DAG)로 분해시킨다[1]. 생성된 IP₃는 IP₃ receptor와 결합하여 세포질내의 저장소로부터 Ca²⁺를 유리시키며, DAG는 protien kinase C (PKC)를 활성화 시킨다[2]. 이런 PLC는 조직이나 세포의 종류에 따라 분자량이 150-154 kd의 PLCβ (β1~4), 145-148 kd의 PLCγ (γ1,2), 85-88 kd의 PLCδ (δ1~4)의 세 종류의 isoform으로 나뉘어지며, 각각 특이한 자극인자에 의해 활성화된다[3]. 세포성장인자에 의한 tyrosine kinase와 PLCγ1 매개 신호전달과정은 상피세포성장인자 (epidermal growth factor, EGF)[4], 혈소판유래성장인자 (platelet-derived growth factor, PDGF)[5]등이 세포막의 수용체와 결합하여 특정한 부위의 tyrosine기가 인산화되면서 시작되며, 인산화된 부분에는 SH2 domain을 갖는 PLCγ1이 결합함으로써 일련의 신호전달과정이 활성화된다[6][7].

이와 같이 세포내 신호전달과정에서 PLC의 중요성이 밝혀짐에 따라, PLC의 역할을 규명하기 위한 연구와 이를 이용한 새로운 의약품 개발을 위하여 PLC 저해물질을 탐색하였다. 더욱이 폐암 세포에서 PLC효소의 발현이 증가되었다고 보고 되었고, PLC 저해제가 폐암세포의 과도한 세포분열을 조절하는 새로운 약물개발의 타겟이 될 수 있을 것이다. 현재까지 PLC를 저해하는 물질들은 대부분은 PLC 효소에 대한 저해활성이 낮은 단점이 제

기되어 왔다. PLC 저해물질의 탐색연구 중 토양에서 분리한 곰팡이로부터 새로운 anguillosporal (Fig. 1)이 분리되었다[8]. 따라서 본 연구에서는 anguillosporal이 EGFR의 활성화 및 *in vitro*와 세포내에서 PLC의 활성화에 미치는 영향을 조사함으로써, anguillosporal이 PLC의 저해제임을 증명하고자 하였다.

II. 재 료 및 방 법

2.1 Anguillosporal의 분리

곰팡이 분리주 MT51005를[7] 15일간 배양한 배양액 10 l를 6,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 배양 상등액을 Diaion HP-30에 통과시켜 흡착시킨 뒤 40% MeOH을 사용하여 세척하였다. 용출시켜 농축시킨 acetone추출액을 물에 용해시킨 후 BuOH로 용매추출하여 silica gel을 넣어 흡착시켜 농축하였다. CHCl₃/MeOH = 10/1을 전개 용매로 하여 silica gel column chromatography로 분획하고 PLC 활성을 조사하여 저해활성이 강한 분획을 모아 농축한 뒤 60% MeOH을 전개용매로 Lobar RP-18 column chromatography하였다. CHCl₃/n-hexane/MeOH = 2/2/1을 전개용매로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 2회 동일하게 실시하였다. 저해활성을 보이는 분획들을 모아 Prep. HPLC를 실시하여 retention time (RT) 20분대에 해당하는 anquillosporal (480 mg)을 분리하였다.

2.2 세포배양

A431와 CCL39 세포를 fetal bovine serum (FBS)를 10%로 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)으로 37°C의 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2.3 PLC γ 1과 PLC β 1의 활성 측정

효소의 반응은 20 μ Ci의 [3 H]-PI가 포함된 50 μ M PI, 50 mM HEPES (pH 7.0), 3 mM CaCl₂, 1 mM EGTA를 포함한 반응액에 PLC γ 1과 PLC β 1을 첨가함으로써 시작된다. anguillosporal을 처리한 반응액 200 μ l을 37°C에서 10분간 반응시키고 CHCl₃:MeOH:HCl (50:50:0.3, v/v) 혼합액 1 ml을 넣어 반응을 중지시킨다. 다시 0.3 ml의 1 N HCl/3 mM EGTA용액을 넣고 섞은 후 수용액층의 radioactivity를 측정하였다[9].

2.4 전체 inositol phosphate (IP_i)양의 측정

A431, CCL39세포를 배양한 후 1 μ Ci/ml의 myo-[2- 3 H]-inositol이 첨가된 inositol-free DMEM으로 24시간 배양하였다. Phosphate-buffered saline (PBS)로 세포를 세척 후, 30 mM LiCl이 포함된 inositol-free DMEM에 20분간 배양한 후 anguillosporal을 20분간 처리하여 각 세포에 대한 agonist인 EGF, α -thrombin으로 50분간 반응시켰다. HClO₄ 5%로 4°C에서 반응을 정지시키고 세포를 용해시켰다. 상등액을 AG 1 \times 8 anion exchange column으로 ammonium formate의 농도구배가 최종 1.0 M이 될 때까지 용출시켜 Scintillation Counter로 [3 H]로 표식된 IP_i양을 측정하였다[10].

2.5 A431세포에서 EGF receptor의 준비와 immunoprecipitation

150 mm dish 3개에 A431 세포를 preconfluent state까지 배양한 후 serum free DMEM으로 24시간 배양한다. 세포를 모아 lysis buffer (20 mM HEPES, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM Na₃VO₄, 10 μ g/ml leupeptin)을 넣고 얼음위에서 1시간 용해 시키고, 4°C, 12,000 rpm에서 원심분리하여 immunoprecipitation을 위한 상등액을 얻었다. 상등액에 Pansorbin 30 μ l을 첨가하여 4°C에서

30분간 섞어준 후, 원심분리하여 얻은 상등액에 human EGF의 monoclonal antibody 20 μ g을 넣어 4°C에서 2시간 섞어준다. 여기에, 이차 항체인 rabbit anti-mouse IgG 25 μ g으로 2시간 precoating한 Pansorbin 90 μ l을 첨가하여 4°C에서 2시간 섞어준다. 원심분리하여 얻은 Pansorbin이 결합한 EGF receptor를 HNG buffer (50 mM HEPES, pH 7.6, 125 mM NaCl, 10% glycerol)로 4번 세척한 후 100 μ l의 HNG buffer를 넣어 재현탁 한다[7].

2.6 EGF receptor tyrosine kinase의 활성 조사

Immunoprecipitated EGF를 1 mg/ml의 histone f_{2b}와 200 μ M genistein과 anguillosporal을 전처리한다. 효소반응은 25 mM HEPES, pH 7.4, 62.5 mM NaCl, 12.5 mM MgCl₂, 2.5 mM MnCl₂, 1 mM Na₃VO₄를 포함한 buffer에 [γ - 32 P]ATP 10 μ Ci (20 μ M)을 처리함으로써 시작된다. 37°C에서 15분간 반응 후 gel-loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenolblue, 10% glycerol)를 첨가하여 반응을 정지시킨다. 혼합액을 5분간 끓인 후 12% SDS-PAGE로 전개시킨다. Autoradiography로 tyrosine phosphorylation된 EGFR와 exogenous substrates를 관찰한다[7].

2.7 Western blots에 의한 세포내에서 단백질의 tyrosine잔기의 인산화 조사

A431세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지로 preconfluent state까지 배양한 후 serum-free DMEM으로 바꾸어 37°C에서 24시간 배양하였다. Trypsin을 처리하여 세포를 eppendorf-tube로 옮긴 후 anguillosporal을 처리하여 37°C에서 15분간 배양하고 EGF 100 ng/ml을 A431세포에 처리하여 5분간 배양하였다. 원심분리하여 얻은 침전물에 300

μl의 lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.2, 1% Triton X-100, 8% glycerol, 1 mM Na₃VO₄, 10 μg/ml leupeptin)를 첨가하여 얼음위에서 1시간 용해시켰다. 4°C, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 얻어 단백질을 정량한 후 10% SDS-PAGE를 시행하고, 전개된 protein을 nitrocellulose membrane으로 옮긴 후 anti-phosphotyrosine antibody (4G10)로 blotting하였다. Tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 10분씩 3회, 20분씩 1회 세척 후 peroxidase-conjugated antimouse IgG로 conjugation하였다. Immunoreactive band는 E.C.L western blotting detection system으로 확인하였다[11].

III. 결과 및 고찰

3.1 Anguillosporal이 *in vitro*에서 PLC γ 1과 PLC β 1의 활성에 미치는 영향

Anguillosporal (Fig. 1)이 PLC isozyme 각각에 대한 영향을 조사하기 위해 PLC γ 1과 PLC β 1에 대한 *in vitro*에서 효소활성을 조사하였다.

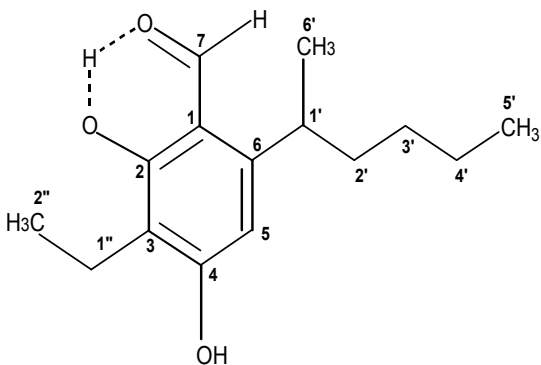


그림 1. Anguillosporal의 화학구조
Fig. 1. Chemical structure of anguillosporal.

Anguillosporal을 1 μM에서 50 μM까지 농도를 변화시키면서 PLC γ 1과 PLC β 1에 대한 효소활성저해를 분석했다. Anguillosporal을 첨가하지 않았을 때의 PLC 효소활성을 100으로 하여 anguillosporal을 처리하였을 때의 효소활성을 상대적으로 환산하여 Fig. 2에 표시하였다. 그 결과 anguillosporal은 농도 의존적으로 PLC γ 1과 PLC β 1 모두의 효소활성을 저해함을 보이며, PLC γ 1에 대한 IC₅₀값은 14 μM, PLC β 1에 대한 IC₅₀값은 6 μM로 조사되었다 (Fig. 2). 즉, anguillosporal은 PLC γ 1 뿐 아니라 PLC β 1에도 저해활성을 보임을 알 수 있었다.

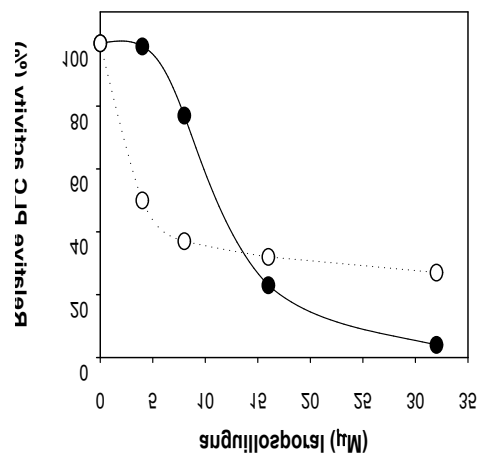


그림 2. Anguillosporal에 의한 PLC 활성의 저해

Fig. 2. Inhibition of PLC activity by anguillosporal. After 10 min, the enzyme reaction were terminated by mixing with CHCl₃:1 N HCl (1:1, v/v). The water soluble, upper layer was withdrawn and counted for the measurements of [³H]-IP. (● : PLC γ 1, ○ : PLC β 1)

3.2 Anguillosporal이 세포내에서 PLC활성에 미치는 영향

Anguillosporal이 intact cell에서 PLC의 활성을 저해하는지 조사하기 위하여 A431세포와 CCL39세

포를 이용하여 PLC 활성화에 따른 분해 산물인 IP_1 양을 측정하였다. A431세포는 human epidermal carcinoma 세포로 세포막 표면에 EGFR가 과다발현된 특징을 가지고 있는 세포주이다. 이 세포를 이용하여 EGF 처리 시 $PLC\gamma_1$ 의 활성화에 따른 IP_1 생성을 조사하였다. 그 결과 anguillosporal에 의해 세포내의 IP_1 생성량이 농도에 의존적으로 감소하는 것이 관찰되었으며, 22 μM 의 IC_{50} 값을 가지는 것으로 조사되었다 (Fig. 3).

또한 CCL39세포는 α -thrombin 처리 시 $PLC\beta_1$ 이 활성화되는 세포로 이 세포를 이용하여 anguillosporal에 의한 세포내에서의 PLC활성저해에 따른 IP_1 생성량을 조사하였다. 그 결과 anguillosporal의 농도에 의존적으로 IP_1 생성량이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, IC_{50} 값이 10 μM 로 조사되었다 (Fig. 3). 즉 anguillosporal은 *in vitro* 뿐 아니라 세포내에서도 PLC에 대해 저해활성을 가짐을 시사한다.

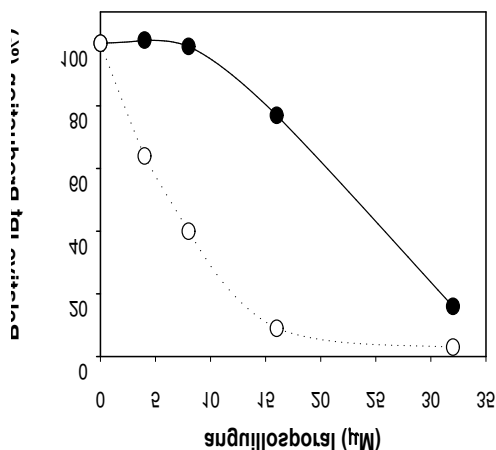


그림 3. A431 세포와 CCL39 세포가 생산하는 IP_1 에 대한 anguillosporal의 농도 구배 영향

Fig. 3. Dose-dependent effects of anguillosporal on IP_1 production in A431 cells and CCL39 cells. Cells were

labeled with myo-[2- 3H]-inositol for 24 hr, and treated with various concentration of anguillosporal for 15 min in the presence of 20 mM LiCl. Cells were stimulated with EGF (100 ng/ml) or α -thrombin (0.001 unit/ml) for 30 min.

The intracellular total inositol phosphate (IP_1) were extracted and eluted by Biorad anion exchange colum. (● : A431, ○ : CCL39)

3.3 Anguillosporal이 EGFR tyrosine kinase 활성화에 미치는 영향

EGF가 수용체인 EGFR에 결합시 EGFR의 tyrosine 잔기에 autophosphorylation이 유도되며 이것은 $PLC\gamma_1$ 의 활성화에 매우 중요하다. 즉 EGFR의 autophosphorylation된 부위에 $PLC\gamma_1$ 의 SH2 domain이 결합하며 $PLC\gamma_1$ 또한 인산화가 일어나고, 활성화 된다. 따라서 $PLC\gamma_1$ 을 활성화시키는데 필요한 EGFR의 tyrosine 잔기의 인산화 정도를 살펴봄으로써, 세포내에서 anguillosporal에 의한 $PLC\gamma_1$ 의 활성저해가 EGFR의 tyrosine kinase의 활성을 저해하여 생기는 간접적인 영향에 의한 것 인지를 A431세포를 이용하여 조사하였다.

A431 세포에서 EGFR antibody를 이용한 immunoprecipitation에 의해서 EGFR를 얻어 EGFR의 인산화 정도를 조사하였다. 그 결과 genistein에 의해서는 200 μM 에서 EGFR의 인산화가 현저히 감소되는 것을 볼 수 있으나, anguillosporal에 의해서는 80 $\mu g/ml$ 즉 320 μM 농도까지 처리하여도 EGFR의 인산화가 저해되지 않음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4).

즉 anguillosporal는 EGFR의 tyrosine kinase 활성을 저해하지 않으며, 세포 내에서 anguillosporal에 의한 $PLC\gamma_1$ 의 저해활성에 따른 IP_1 의 생성감소는 EGFR의 tyrosine kinase 저해에 의한 영향이 아님을 확인하였다.

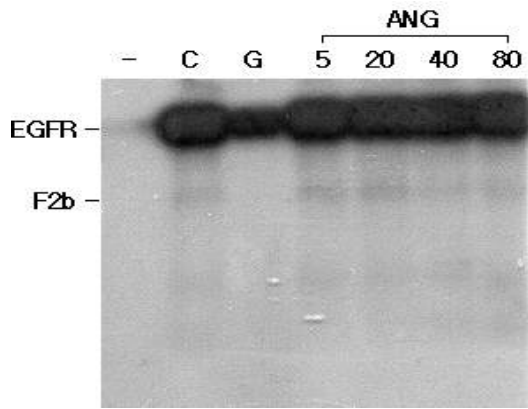


그림 4. PTK 효소에 대한 anguillosporal의 영향

Fig. 4. Effect of anguillosporal on PTKs *in vitro*.

Enzyme reaction was initiated by the addition of [γ - 32 P]ATP and terminated by the addition of gel-loading buffer. The reaction mixture was boiled for 5 min, electrophoresed through 12% SDS-PAGE and autoradiographed. ANG: anguillosporal (μ g/ml), Gen : genistein 200 μ M

3.4 Anguillosporal이 A431 세포내에서 단백질의 tyrosine 인산화에 미치는 영향

세포내 신호전달에 관여하는 많은 단백질의 활성화는 tyrosine 잔기의 인산화와 밀접한 관계가 있으며, 이렇게 활성화된 단백질은 다른 단백질의 활성화에도 영향을 미칠 수 있다. 따라서 A431세포를 이용하여 세포내 단백질들의 tyrosine 잔기의 인산화를 조사함으로써 anguillosporal에 의한 세포내의 PLC γ 1의 활성저해가 다른 단백질의 인산화저해에 의한 영향인지를 조사하였다. 그 결과, tyrosine kinase의 저해제로 알려진 genistein을 200 μ M 처리하였을 경우 agonist인 EGF를 처리하지 않았을 때와 같이 tyrosine 잔기의 인산화가 현저히 감소된 것을 관찰할 수 있으나, anguillosporal에 의해서는 20 μ g/ml 즉 80 μ M농도에서도 인산화의 감소를 관찰할 수 없었다. 특히 180 kd의

EGFR와 145 kd의 PLC γ 1의 인산화에도 변화가 없음이 조사되었다. 따라서 anguillosporal은 세포내 단백질의 tyrosine 잔기의 인산화에 저해활성을 가지 않으므로, 이는 세포내에서 PLC γ 1의 저해는 다른 단백질의 tyrosine 인산화의 저해에 의한 영향이 아닌 직접적인 PLC γ 1의 활성저해에 의한 것임을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

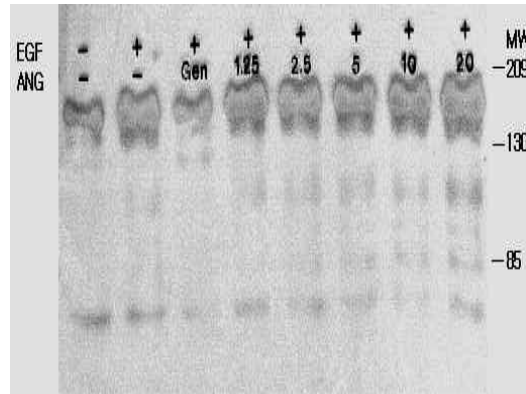


그림 5. Anguillosporal이 A431 세포내에서 EGF에 의해 유도된 단백질의 tyrosine 인산화에 미치는 영향

Fig. 5. Effect of anguillosporal on EGF-induced protein tyrosine phosphorylation in A431 cells.

Cells were pre-treated with various concentrations of anguillosporal for 5 min, stimulated with EGF (10 ng/ml) for another 5 min and lysed. Equal amounts of lysate proteins were electrophoresed through 8% SDS-PAGE and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody. ANG: anguillosporal (μ g/ml) Gen : genistein 200 μ M

Acknowledgement

본 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No.2010-0004620).

참고문헌

- [1] Y. S. Bae, L. G. Cantley, C. S. Chen, S. R. Kim, K. S. Kwon, and S. G. Rhee, "Activation of phospholipase C-gamma by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate". J. Biol. Chem. Vol. 273, pp. 4465-4446, 1998.
- [2] O. F. Dajani, D. Sandnes, O. Melien, F. Rezvani, L. S. Nilssen, G. H. Thoresen, and T. Christoffersen, "Role of diacylglycerol (DAG) in hormonal induction of S phase in hepatocytes: the DAG-dependent protein kinase C pathway is not activated by epidermal growth factor (EGF), but is involved in mediating the enhancement of responsiveness to EGF by vasopressin, angiotensin II, and norepinephrine". J. Cell. Physiol. Vol. 180, pp. 203-214, 1999.
- [3] S. G. Rhee, and Y. S. Bae, "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes". J. Biol. Chem. Vol. 272, pp. 15045-15048, 1997.
- [4] K. Fletcher, P. G. Lord, T. C. Orton, J. K. Chipman, and A. j. Strain, "EGF-Induced receptor autophosphorylation in primary hepatocytes isolated from phenobarbitone-treated mice". Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 260, pp. 483-487, 1999.
- [5] C. H. Heldin, A. Ostman, and L. Ronnstrand, "Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors". Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1378, pp. 79-113, 1998.
- [6] N. Ito, C. Wernstedt, U. Engstrom, and L. Claesson-Welsh, "Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules". J. Biol. Chem. Vol. 273, pp. 23410-23418, 1998.
- [7] Lehr, S., J. Kotzka, A. Herkner, E. Klein, C. Siethoff, B. Knebel, V. Noelle, J. C. Bruning, H. W. Klein, H. E. Meyer, W. Krone, and D. Muller-Wieland. "Identification of tyrosine phosphorylation sites in human Gab-1 protein by EGF receptor kinase in vitro". Biochemistry. Vol. 38, pp. 151-159, 1999.
- [8] W. K. Oh, H. S. Lee, B. Y. Kim, S. C. Ahn, D. O. Kang, Y. H. Kim, T. I. Mheen, and J. S. Ahn, "CRM-51005, a new phospholipase C inhibitor produced by unidentified fungal strain MT51005". J. Antibiotics. Vol. 50, pp. 1083-1085, 1997.
- [9] Rhee, S. G., S. H. Ryu, and K. S. Cho. "Assays of phosphoinositide-specific phospholipase C and purification of isozymes from bovine brain" Method in enzymol. Vol. 197, pp. 502-510, 1991.
- [10] G. T. Snoek, C. P. Berrie, T. B. Geijtenbeek, H. A. van der Helm, J. A. Cadee, C. Iurisci, D. Corda, and K. W. Wirtz, "Overexpression of phosphatidylinositol transfer protein alpha in NIH3T3 cells activates a phospholipase A". J. Biol. Chem. Vol. 274, pp. 35393-35399, 1999.
- [11] C. M. Van Itallie, M. S. Balda, and J. M. Anderson. "Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation and reorganization of the tight junction protein ZO-1 in A431 cells". J. Cell. Sci. Vol. 108, pp. 1735-1742, 1995.



이준원 (Junwon Lee)

2001 연세대학교 생명공학과(공학박사)
2006 전남대학교 의과대학 연구교수

2008년~ 현재 배재대학교 교수

※ 관심분야: 생리활성대사산물, 골질병 억제 개발



김보연 (Bo-Yeon Kim)

1984 서울대학교 생물교육과(이학사)
1986 서울대학교 분자생물학과(이학석사)
1996 서울대학교 분자생물학과(이학박사)
1989년~ 한국생명공학연구원 책임연구원

1989년~ 현재 한국생명공학연구원 책임연구원

※ 관심분야: 생리활성대사산물, 항암제 개발, 의약활성물질



안종석 (Jong-seog Ahn)

1979년 서울대학교 생물교육과(이학사)

1981년 한국과학기술원 생물공학과(이학석사)

1985년 한국과학기술원 생물공학과(이학박사)

E-mail : kkits@kkits.or.kr

1985년~ 현재 한국생명공학연구원 책임연구원, 센터장

출연연 연구발전 협의회 회장

※ 관심분야: 생리활성대사산물, 미생물유전체, 의약활성물질