

제 목	Farnesyl protein transferase 방해제 연구를 통한 항암제의 개발
연구자	이상규, 박세연, 백영진, 최희정, 양철학
소 속	서울대학교 화학과
내 용	<p>Farnesyl protein transferase는 Ras precursor의 C-terminal에 있는 cystein residue에 farnesyl group을 결합시키는 효소다. 이 효소를 bovine testis에서 30-50% ammonium sulfate fractionation, DEAE-sephacel ion exchange, Sephacryl s-300 gel filtration, hexapeptide(KKCVIM) affinity chromatography를 통해 30000 배로 분리하였다. 분리된 효소는 gel filtration시 약 100kDa으로, SDS-polyacrylamide 전기영동시 50kDa의 인접한 두 bands로 나타났고 이것은 <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> subunits으로 생각되었다. <math>\alpha</math> subunit을 encoding하는 RAM2 유전자를 site directed mutagenesis로 145번의 histidine을 aspartate로, 140번의 aspartate를 asparagine으로 바꾸었더니 optimal pH와 <math>K_m</math> 값이 변했다. Diethyl pyrocarbonate로 histidine residues를 chemical modification시켰을때 효소의 활성이 저하되었다. 145번 histidine이 aspartate로 바뀐 돌연변이효소에서 비교적 느리게 활성이 저하되므로 145번 histidine이 이 효소의 active site에 있을것으로 추측된다.</p> <p>Ras precursor의 C-terminal modification는 여러단계로 일어나는데 그 중 farnesyl protein transferase가 첫 단계를 촉매하기때문에 이 효소의 방해제를 찾는 연구가 매우 활발하다. 항암효과가 있다고 알려진 천연물을 대상으로 이 효소의 assay 방법을 통해 억제효과를 조사한 결과 마늘과 영지의 추출물이 이 효소를 억제하는 것으로 나타났다.</p> <p>껍질을 벗긴 마늘과, 용매로서 물과 ethylacetate를 1:1로 섞어 blender에 넣고 himogenize시킨후 원심분리로 ethylacetate층을 얻었다. Ethylacetate로 2회 더 추출한후 추출액을 모두 모으고 농축했다. 수용액층과 ethylacetate 추출액을 assay했을때 ethylacetate 추출액만 효소의 활성을 억제하였고 추출액중에서 어느 성분이 방해제인지 알아보기 위해 Si-TLC를 한후 각 spot을 추출하여 assay를 하였다. 확인된 방해제는 silica gel column으로 분리되었고 원소분석결과 sulfur를 함유하고 있었다.</p> <p>영지버섯에서 단백다당류와 triterpene성분을 따로 추출하여 assay를 했을때 triterpene성분만 억제효과를 보여 이 성분을 분리하였다. blender로 같은 영지버섯을 5ml/g의 chloroform에 넣고 16일 후에 추출하고, 4ml/g의 chloroform을 넣고 6일 후에 다시 추출했다. 추출액을 농축한후 sodium bicarbonate로 추출하고 pH를 3-4로 맞춘후 chloroform으로 다시 추출했다. Silica gel column으로 추출액을 분리하여 assay를 하였을때 5가지 방해제를 얻을수 있었고 모두 triterpene으로 생각되었다.</p>