

배초향으로부터 Grb2-Shc domain 결합저해 물질의 분리

이은숙, 안병태, 이새봄, 김혜경, 복성해, 정태숙*

생명공학연구소

Isolation of Grb2-Shc Domain Binding Inhibition Component from *Agastache rugosa*

Eun-Sook Lee, Byung-Tae Ahn, Sae-Bom Lee, Hyea-Kyeong Kim,
Song-Hae Bok and Tae-Sook Jeong*

Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology,
P.O. Box 115, Taejeon 305-600, Korea

Abstract – SH2 domains and their associated catalytic or noncatalytic proteins constitute critical signal transduction targets for drug discovery. Grb2 associates with phosphotyrosine sites of the activated receptors or Shc via their SH2 domain to link receptor tyrosine kinases to ras signalling. Blocking of the Grb2-Shc complex may be to intervene the oncogenic signal transduction pathways and to develop a new antitumor drug. In the search for blockers of Grb2 SH2-Shc interaction, Lutein, a family of carotenoids, was isolated from the extract of the leaf of *Agastache rugosa* O. Kuntze as SH2 domain antagonists. The IC₅₀ of Lutein against Grb2-Shc binding was 6.8 μM.

Key words – Grb2(Growth factor receptor binding protein 2); SH2(Src homology 2); *Agastache rugosa*; lutein.

암이 세포의 성장, 분화 등에 관여하는 신호전이과정의 이상으로 인해 생긴다는 사실이 밝혀지면서,^{1,2)} 최근 신호전이과정 분야에서 가장 각광 받는 연구는 SH2(Src-homology region 2) 및 SH3(Src-homology region 3)에 관한 연구이다.³⁾ SH2, SH3 domain은 자체로서는 효소기능을 보유하지 않는 domain으로서, cytoplasm 혹은 membrane에 존재하는 다양한 종류의 단백질에 존재하며, 주로 세포내 신호전달에 관계하는 단백질간의 결합에 관여한다.⁴⁾ 그 중 Shc은 다양한 단백질과 결합하여 수용체 또는 세포내 타이로신 인산화효소에 의해 활성화되는 신호전달 과정의 선택성을 결정하는데 중요한 역할을 하며,⁵⁾ 인산화된 Shc은 Grb2의 SH2 domain과 결합함으로써 Shc-Grb2-SOS의 복합체를 형성하여 ras 단백질을 활성화시킨다.^{2,5)} 따라서, SH2 domain-dependent protein-protein interaction의 방해작용은 세포내에서 특정한 신호전달 경로를 억제하는 새로운 치료제의 개발 차원에서 유망한 신약 탐색 정책으로 대두되고 있으며, NMR 혹은 X-ray 구조결정학 분야에서는 SH2 domain의 3차

원적 구조연구를 통해 암치료를 필두로 하여 면역조절제, 골다공증, allergy, 천식, 염증질환, AIDS 등의 약제개발에 중요한 정보를 제공하고 있다.^{4,6-7)}

이러한 사실을 바탕으로 천연자원으로부터 Grb2-Shc 결합을 저해하는 활성물질을 탐색하였으며, 그 중 강한 저해활성을 갖는 배초향(*Agastache rugosa*)을 선별하였다. 배초향은 순형과(Labiatae)에 속하는 다년초로서 민간에서는 배초향의 연한 지상부를 식용으로 하고, 성숙한 것은 약용으로 쓰이며, 특히 뿌리는 담석용해제로서, 연한 지상부는 항암제로 민간에서 널리 쓰이고 있다. 배초향의 약리작용으로는 抗真菌作用, 抗螺旋菌作用이 있고, 한방에서는 風水毒腫, 催乳, 心腹痛, 口臭, 肺虛, 傷食, 胃病등에 이용되고 있다.⁸⁾ 배초향의 n-hexane 추출물로부터 Grb2-Shc 결합저해활성을 나타내는 carotenoid계 물질을 분리, 동정하였으며, 본 식물에서는 처음 보고되는 성분이다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용한 배초향(*Agastache*

*교신저자 : Fax-042-861-2675

rugosa)은 1998년 3월 부산 일대에서 재배된 것을 농협을 통해 구매하여 지상부를 그늘에서 건조한 후 사용하였다.

기기 및 시약 - NMR 측정은 Bruker DMX 600 (KBSI), Bruker AMX 500 spectrometer를 사용하였으며, ¹H-, ¹³C-NMR의 chemical shift는 TMS로부터 δ치(ppm)로 나타내었다. 질량분석은 VG high resolution GC/MS spectrometer(Autospec-Ultima)를 이용하여 HR-EI mode로 측정하였고, UV/Visible 흡광도는 Shimadzu UV-265 spectrophotometer로 측정하였다. Phosphopeptide는 Analytical Biotechnology Services(Boston)로부터 구입하여 ³H-propionyl group으로 labeling하여 사용하였다. GST-Grb2 재조합 단백질은 면역조절 연구그룹과 공동연구를 통해 대량 발현시켜 정제하여 사용하였다. SPA PVT antibody-binding beads(Cat. No. RPNQ 0019)는 Amersham으로부터 구입하여 사용하였고, Anti-GST, rabbit IgG(Cat. No. A5800)는 Molecular Probes로부터 구입하였다. Flash 컬럼 크로마토그래피용 실리카겔은 Merck Kieselgel 60(230-400 mesh)을 사용하였고, 역상 크로마토그래피용 C18은 Merck Lichroprep^R RP-C18(Art. 13900)을 사용하였다. HPLC용 유기용매는 Boxter 제품(Burdick and Jackson, Inc.)을 사용하였고, 기타 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다.

Grb2-Shc 결합활성의 측정 - Grb2-Shc 결합 저해제 탐색을 위한 방법은 Grb2에 GST가 결합되어 있는 단백질과 트리튬으로 표지되어 있는 표적 펩타이드를 이용하여 근접 섬광 분석법(Scintillation proximity assay)⁹⁾을 이용하여 다음과 같이 실시하였으며, SPA-Grb2 SH2 분석방법을 도식화하면 Fig. 1과 같다. Grb2-Shc 결합활성의 측정은 1.5 ml 용량의 eppendorf tube를 이용하여 측정하였다. 반응액에는 0.5 μg GST-Grb2 단백질 10 ml, 0.2 m Ci [³H] labeled peptide 10 ml, 6 μg anti-GST rabbit IgG 10 ml,

순수 DMSO 10 μl를 첨가하여 전체 반응액이 200 ml가 되게 하였으며, 완충용액은 20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 0.1 % BSA, pH 7.4인 용액을 사용하였다. 반응액을 혼합한 후 실온에서 3 시간 동안 진탕 반응하였다. 반응 종료 후 eppendorf tube를 counting rack에 꽂은 다음 1 시간 방치하여 평형상태로 만든 후 액체섬광 계수기(Liquid scintillation counter, 1450 Microbeta Trilux, Wallac Co.)를 이용하여 방사능을 cpm(count/min) 단위로 측정하였다. 측정하고자 하는 시료는 10 μl의 DMSO에 용해한 후 위와 같은 방법으로 활성을 검색하였다. Blank치는 GST-Grb2 단백질을 넣지 않은 상태로 반응시켜 얻었으며, Grb2-Shc 결합 저해 활성도는 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

$$\% \text{Inhibition} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{Sample(cpm)} - \text{Blank(cpm)}}{\text{Control(cpm)} - \text{Blank(cpm)}} \right]$$

추출 및 분리 - 배조항 10 kg을 acetone으로 추출하여 감압, 농축한 후 용매 분획 방법으로 각각 *n*-hexane 분획, ethyl acetate 분획, 물분획으로 나누었다. 각 분획의 Grb2-Shc 결합 활성 측정 결과 *n*-hexane 분획이 최종 반응농도 25 μg/ml에서 90%의 강한 저해 활성을 보였다. *n*-Hexane 분획은 Silica gel column chromatography상에서 *n*-hexane-acetone의 용매제로 순차 용출시켜 활성분획(hexane/acetone=9:1) 330 mg을 분리하였다. 이 활성 분획을 ODS gel column chromatography를 실시하여 소분획 1-7를 얻고, 이중 활성분획 2(MeOH/H₂O=9:1)로부터 HPLC(J'sphere ODS-H80, 250×20 mm, 224 nm, MeOH/H₂O=98:2, 4 ml/min)를 이용하여 화합물 1(14 mg)을 분리하였다. 화합물 1은 진한 적색을 띠었으며 TLC plate(Kiesel gel 60F₂₅₄, Art. 5715, Merck)상에서 hexane/acetone(7:3)으로 전개하였을 때 R_f 치는 0.2였다.

화합물 1 - 적색 분말 : C₄₀H₅₆O₂, mp 180-183°C, EI-MS *m/z*(rel. int.) 568[M]⁺(83), 550[M-H₂O]⁺(100), 532(10), 175(56), 163(29), 135(68), 121(84), 109(68) ; UV λ_{max}(MeOH) 472, 444 nm ; ¹H-NMR, ¹³C-NMR(Table I).

결과 및 고찰

화합물 1의 구조결정 - 화합물 1은 anisaldehyde-H₂SO₄ 발색시 진한 보라색을 띠는 무정형의 적색 분

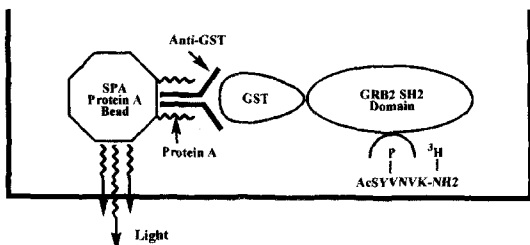


Fig. 1. Schematic of Grb2-Shc binding scintillation proximity assay.

Table I. ^1H -and ^{13}C -NMR data of compound 1

Carbon No.	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$, (mult, J, Hz) ^b	Carbon No.	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$, (mult, J, Hz) ^b
1	37.1	1.77(1H, <i>m</i> , 11.9),	1'	34.0	1.84(1H, <i>dd</i> , 5.9, 13.2),
2	48.4	1.48(2H, <i>t</i> , 11.9)	2'	44.6	1.36(1H, <i>dd</i> , 6.8, 13.1)
3	65.1	4.00(1H, <i>m</i>)	3'	65.9	4.25(1H, <i>m</i>)
4	42.5	2.39(1H, <i>dd</i> , 5.2, 16.9), 2.04(1H, <i>dd</i> , 9.8, 16.9)	4'	124.5	5.54(1H, <i>bs</i>)
5	126.1		5'	138.0	
6	137.8		6'	54.9	2.40(1H, <i>d</i> , 10.0)
7	125.6	6.10(1H, <i>d</i> , 16.4)	7'	128.7	5.43(1H, <i>dd</i> , 9.9, 15.4)
8	138.5	6.14(1H, <i>d</i> , 15.5)	8'	137.7	6.14(1H, 14.9)
9	135.7		9'	135.0	
10	131.3	6.15(1H, <i>d</i> , 10.9)	10'	130.8	6.14(1H, <i>d</i> , 12.7)
11	124.8	6.65(1H, <i>dd</i> , 11.0, 14.5)	11'	124.9	6.61(1H, <i>dd</i> , 11.0, 14.5)
12	137.5	6.36(1H, <i>d</i> , 15.0)	12'	137.5	6.37(1H, <i>d</i> , 15.0)
13	136.4		13'	136.5	
14	132.6	6.25(2H)	14'	132.6	6.25(2H)
15	130.1	6.48(1H)	15'	130.0	6.65(1H)
16	30.2	1.07(3H)	16'	24.3	0.85(3H)
17	28.7	1.07(3H)	17'	29.5	1.00(3H)
18	21.6	1.74(3H)*	18'	22.9	1.62(3H)
19	12.8	1.96(3H)*	19'	13.1	1.91(3H)
20	12.7	1.97(3H)*	20'	12.8	1.96(3H)*

^a(CDCl₃, 125.75 MHz); ^b(CDCl₃, 500 MHz); *May be reversed.

말로 CHCl₃, MeOH, acetone에는 가용성이며, H₂O와 *n*-hexane에는 불용성이다. UV spectrum(MeOH)의 λ_{max} (log ϵ) 472(4.79)와 444(4.82) nm의 pattern은 carotenoid의 특징적인 conjugated double bond의 존재를 예시한다.¹⁰⁾ ^{13}C -NMR의 정량분석에서 40개의 carbon을 나타내었으며, 그 중에서 δ 124.5-138.5의 olefinic 영역에서 22개의 carbon과 ^1H -NMR spectrum의 aliphatic영역에서 10개의 methyl기에 기인한 peak를 확인할 수 있었다(Table I). 또한 DEPT spectrum에서 δ 42.5, 44.6, 48.4의 3개의 methylene carbon과 δ 65.1, 65.9에서 산소가 결합된 2 개의 methine carbon, δ 54.9에서 allylic methine carbon, 37.1, 34.0, 126.1, 135.0, 135.7, 136.4, 136.5, 137.8, 138.0의 9개의 quaternary carbon이 관찰되었으며, ^1H - ^{13}C COSY spectrum에서 δ 2.40 (1H, *d*, $J=10$ Hz)의 signal이 δ 54.9의 allylic methine carbon에 연결되어 있음을 알 수 있었다. HREI-MS

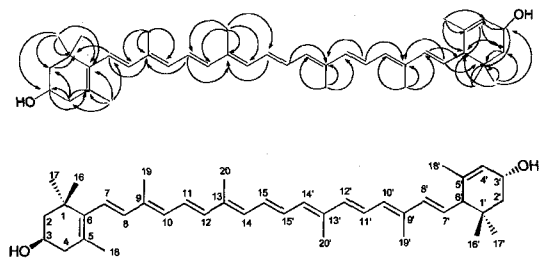


Fig. 2. ^1H - ^{13}C long range couplings detected by HMBC experiments and structure of lutein.

spectrum으로부터 분자량은 568이고, 분자식 C₄₀H₅₆O₂임을 알 수 있었고, 말단 원자단이 β , ϵ 의 구조로 되어 있으며 각각의 말단 원자단에 OH기를 하나씩 가진 xanthophyll 계통의 화합물인 것을 알 수 있었다. ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC의 2D NMR spectrum을 이용한 long range coupling을 Fig. 2에 표시하였다. NMR, MS, UV/Visible spectra를 이용한

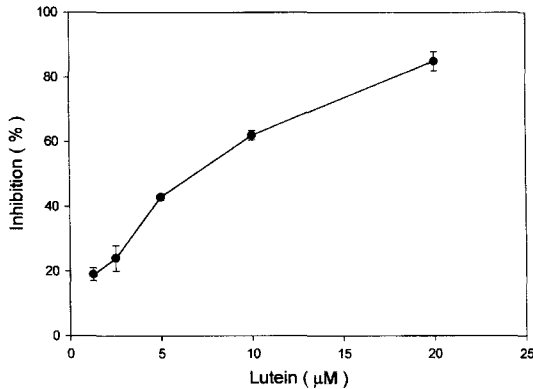


Fig. 3. Inhibitory effect of Lutein for Grb2-Shc interaction. Standard conditions are described under "Material and Methods". These results are representative of three independent experiment.

종합적인 해석과 문헌의 data를 비교하여 화합물 1은 lutein으로 확인되었다.¹¹⁻¹⁴⁾

Lutein의 Grb2-Shc 결합 저해활성 - SH2 domain binding assay를 통한 Grb2-Shc 결합 활성에서 lutein의 농도별 저해효과를 측정된 결과는 Fig. 3에 나타내었으며 IC₅₀ 값은 6.8 μM이었다. Lutein을 animal cell lines에 처리했을 때 세포 성장에 미치는 영향과 *in vitro*에서 보여주었던 Grb2-Shc 결합저해 활성효과가 cell lines에서도 나타나는지를 알아보기 위하여 NIH3T3(normal mouse fibroblast), B104-1-1(neu* transformed NIH3T3), K-Ras, H-Ras 세포주를 이용하여 활성을 검증하였으나(data not shown), lutein은 control인 정상세포 NIH3T3뿐만 아니라 B104-1-1(neu* transformed NIH3T3)과 K-Ras, H-Ras 세포주의 세포 성장에 거의 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 lutein은 10 μg/ml의 농도에서 cell line에 대한 세포독성이 없음을 알 수 있었으나, lutein의 cell membrane에 대한 투과성을 관찰하여 *in vitro*와 상반되는 세포주에 대한 활성을 규명해야 할 것이다.

본 실험에서 분리한 lutein은 식물체에 널리 분포하는 carotenoid의 일종으로 암의 예방 활성에 대한 동물실험의 한정적인 보고가 있었으며,¹⁵⁻¹⁷⁾ carotenoid가 암의 병인에 영향을 준다는 증거는 많은 실험을 통해 밝혀져 왔다. Ziegler 등은 혈청이나 혈장에서의 낮은 베타카로틴 수준은 폐암의 발생과 관계가 있다고 보고하였다.¹⁸⁾ 또한 Nichino 등은 암 예방약제로서 광범위하게 실험되어져 온 β-carotene보다 α-carotene이 동물실험에서 발암유전자를 억제하는데 있어 더 나은

효과를 보인다고 보고하였는데,¹⁹⁾ 본 실험에서 분리한 lutein은 α-carotene의 양 말단에 OH기가 붙은 구조로서 Nichino 등의 보고와 일맥상통한다.

결 론

천연자원으로부터 새로운 저분자 항암활성 물질을 탐색하고자 Grb2-Shc 결합 저해활성실험을 수행하여 배초향을 선별하였다. 배초향의 *n*-hexane 추출물을 각종 column chromatography를 실시하여 carotenoid계의 Grb2-Shc 결합 저해물질을 분리하였으며, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-NMR, UV/Visible, Mass 등의 spectral data를 종합하여 Lutein으로 동정하였으며, 이 화합물은 배초향에서 처음으로 분리된 성분이다. Lutein에 의한 Grb2-Shc 결합저해능을 SPA 방법으로 측정된 결과, IC₅₀ 값이 6.8 μM로 강한 저해 활성을 나타내었다.

사 사

본 연구는 과학기술처(Star Project) 지원으로 수행된 연구결과와 일부이며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Heimbrook, D. C. and Koblan, K. S. (1994) Protein-protein interaction as therapeutic targets for cancer. *Curr. Med. Chem.* 1: 13-34.
2. Cussac, D., Frech, M. and Chardin, P. (1994) Binding of the Grb2 SH2 domain to phosphotyrosine motifs does not change the affinity of its SH3 domains for Sos proline-rich motifs. *EMBO J.* 13: 4011-4021.
3. Gram, H., Schmitz, R., Zuber, J. F. and Baumamm, G. (1997) Identification of phosphopeptide ligands for the Src-homology 2 (SH2) domain of Grb2 by phage display. *Eur. J. Biochem.* 246: 633-637.
4. Sawyer, T. K. (1998) Src homology-2 domains : structure, mechanisms, and drug discovery. *Bio-polymers(Peptide Science)*. 47: 243-261.
5. Rojas, M., Yao, S., Donahue, J. P. and Lin, Y. Z.(1997) An alternative to phosphotyrosine-containing motifs for binding to an SH2 domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243: 675-680.
6. Burke, T. R., Jr., Barchi, J. J., Geroge, C., Wolf, G., Shoelson, S. E. and Yan, X. (1995) Conformationally

- constrained phosphotyrosyl mimetic designed as monomeric Src homology 2 domain inhibitors. *J. Med. Chem.* 38: 1386-1396.
7. Botfield, M. C. and Green, J. (1995) SH2 and SH3 domains: Choresgraphers of multiple signaling pathways. *Ann. Rep. Med. Chem.* 30: 227-237.
 8. Han, D. S., Kim, Y. C., Kim, S. E., Ju, H. S. and Byun, S. J. (1987) Studies on the Diterpene constituent of the root of *Agastache rugosa* O. Kuntze. *Kor. J. Pharmacogn.* 18 : 99-102.
 9. Bosworth, N. and Towers, P. (1989) Scintillation proximity assay. *Nature* 341: 167-168.
 10. Goodwin, T. W. (1976) Chemistry and biochemistry of plants pigments. 2nd ed. Vol. 1, Academic Press, London.
 11. Largo, G., Jr., Rideout, J. A. and Ragasa, C. Y. (1997) A bioactive carotenoid from *Mimosa invisa*. *Philipp. J. Sci.* 126: 107-115.
 12. Pogson, B., Kelly, A., Macdonald, K. A., Truong, M., Britton, G. and DellaPenna, D. (1996) Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *The Plant Cell* 8: 1627-1639.
 13. Grung, M., D'Souza, F. M. L., Borowitzka, M. and Jensen, S. L. (1992) Algal carotenoids 51. Secondary Carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. *J. Appl. Phycol.* 4: 165-176.
 14. Conn, P. F., Schalch, W. and Truscott, T. G. (1991) The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J. Photochem. Photobiol. B.* 11: 41-47.
 15. Vainio, H. and Rautalahti, M. (1998) An international evaluation of the cancer preventive potential of carotenoids. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 7: 725-728.
 16. Park, J. S., Chew, B. P. and Wong, T. S. (1998) Dietary lutein from Marigold extract inhibits mammary tumor development in BALB/c Mice. *J. Nutr.* 128: 1650-1656.
 17. Park, J. S., Chew, B. P. and Wong, T. S. (1998) Dietary lutein from Marigold extract is rapid in BALB/c Mice. *J. Nutr.* 128: 1802-1806.
 18. Ziegler, R. (1989) A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *J. Nutr.* 119: 116-122.
 19. Nichino, H. (1998) Cancer prevention by carotenoids. *Mutat. Res.* 402: 159-163.

(1999년 8월 20일 접수)