

암 증식과 전이 돕는 단백질 발견했다

글 | 임동수 _ 한국생명공학연구원 책임연구원 imdongsu@kribb.re.kr

단백질의 유비퀴틴화에는 보통 3종류의 효소가 필요하다. E1 효소는 싸이오에스테르 결합을 통하여 유비퀴틴 단백질과 결합하고, E2 효소는 E1-유비퀴틴으로부터 유비퀴틴을 전달받아 기질 단백질에 다시 전달하는 기능을 하고, E3 효소는 E2에서 전달받은 유비퀴틴을 기질 단백질에 접합하는 기능을 한다. E1, E2 및 E3 효소들이 함께 작용을 해야만 단백질의 유비퀴틴화가 일어나 프로테아좀에 의해 분해된다. 단백질의 유비퀴틴-프로테아좀 경로의 이상은 암을 포함한 많은 질병 발생의 원인이 된다.

VHL 기능 소실시 신장암, 혈관종 잘 걸려

E2-EPF UCP(이하 UCP)는 단백질의 상동성을 근거로 E2효소 계로 분류된다. UCP는 1992년에 사람의 각질세포에서 발견된 유전자로서 세균으로부터 얻은 재조합 UCP 단백질은 E3 유비퀴틴 리가제 의존적 혹은 비의존적인 유비퀴틴 접합 활성을 나타내는 것으로 알려졌다. UCP는 환자의 각종 암 조직에서 정상조직에 비해 많이 발현되는 것으로 밝혀졌다. 그러나 UCP 효소의 특이적인 기질, 파트너 E3, 세포내 기능, 암 발생 혹은 진행과의 상관성은 전혀 연구된 바 없었다.

VHL(von Hippel-Lindau) 유전자의 변이에 의해 VHL의 기능이 소실된 사람은 신장암, 중추신경계의 혈관종과 같은 암에 잘 걸려 암 억제 유전자로서 알려져 있다. VHL 단백질은 엘롱긴 B, 엘롱긴 C, Cul2, Rbx1 단백질들과 복합체를 형성하여 E3 유비퀴틴 리가제 활성을 나타내는데, 이 때 VHL은 기질단백질을 인지하는 기능을 한다. VHL E3 유비퀴틴 리가제의 대표적인 기질은 저산소 유도성인자(HIF-1 α)이다. HIF-1 α 는 산소가 있는 조건에서 프롤릴 하이드록실라제에 의해 하이드록실화하고 VHL E3 유비퀴틴 리가제에 의해 유비퀴틴화해 분해되는 단백질이다. HIF-1 α 는 산소분

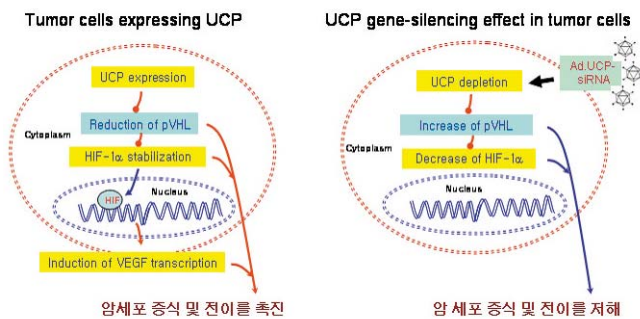
압이 낮은 조건에서는 안정화되고, 세포 안에서 항상 발현되는 HIF-1 β 와 결합하여 HIF1 복합체를 형성한 다음 세포의 핵 안에서 혈관생성증식인자(VEGF) 등과 같은 유전자의 발현을 유도한다. VEGF는 혈관생성을 유도하여 암 세포의 증식을 촉진한다. HIF-1 α 및 VEGF 모두 항암제 개발에 분자 표적으로 활용되고 있다. VHL단백질 역시 유비퀴틴-프로테아좀 경로에 의해 분해되는 것으로 알려져 있으나, VHL의 유비퀴틴화를 유도하는 E3효소는 알려진 바 없었다.

과학기술부는 21C 프론티어 인간유전체기능연구사업을 통하여 환자 조직으로부터 간암, 위암관련 많은 후보유전자들이 발굴되었다. 필자연구팀은 후보 유전자들이 혈관 생성 촉진인자의 유전자 발현조절 부위에서 유래한 저산소반응요소(HRE) 조절하에 루시페라제 표지 유전자의 활성에 미치는 효과를 일회적 유전자 발현 시험을 통하여 조사하였다. 그 결과 UCP가 HRE 조절하에 표지 유전자의 발현을 정상산소조건에서 재현성 있게 증가시키는 것을 발견하였다. 이 결과는 UCP가 VHL의 단백질 분해를 유도하고, 이에 따라 HIF-1 α 단백질이 안정화된다는 가능성을 제시했으며, 연구팀은 그 가능성을 입증하였다.

VHL과 결합 UCP, VHL 유비퀴틴화 유도·분해

UCP가 VHL과 서로 결합하나, VHL E3 유비퀴틴 리가제 복합체 구성성분인 엘롱긴 B, 엘롱긴 C, Rbx1 단백질들과는 결합하지 않는 것을 발견하였다. 또한, UCP가 VHL E3 유비퀴틴 리가제 복합체와 결합하지 않는 것을 검증하였다.

UCP를 많이 발현시켰을 때 정상산소 조건에서 세포내 VHL수준이 감소하고 HIF-1 α 단백질이 안정화되는 것을 확인하였다. 프로테아좀 저해제인 MG132 존재하에서 UCP 과다 발현에 의한



〈그림 1〉 UCP의 암세포 증식 및 전이에서의 기능

VHL의 감소가 관찰되지 않았다. 이러한 UCP 과다 발현에 의한 VHL수준의 감소와 HIF-1 α 의 증가가 번역 후에 단백질 수준에서 일어난다는 것을 노던블롯으로 확인하였다. 이 조건에서 안정화된 HIF-1 α 의 생물학적 활성은 HRE 표지 유전자 시험과 VEGF 전사체량의 증감여부 조사를 통하여 확인하였다.

UCP가 VHL의 유비퀴틴화를 유도하는 것을 배양세포 및 재조합 단백질을 이용한 시험관내 유비퀴틴화 시험을 통하여 검증하였다. 또한, UCP 유비퀴틴 접합효소활성이 VHL의 유비퀴틴화의 유도에 필수적이라는 것을 UCP 유비퀴틴 접합효소 활성을 갖지 않은 변이체를 제작하여 검증하였다.

UCP가 생쥐의 간 조직에서 VHL의 분해를 유도하는지를 알아보기 위해서 UCP 유전자를 함유하고 있는 아데노바이러스 유전자 전달체를 생쥐 꼬리정맥에 주사한 후 3일 만에 생쥐 간 조직에서 UCP, VHL, HIF-1 α 단백질들의 존재를 이뮤노블롯 및 면역형광 기법으로 조사하였다. 그 결과 UCP가 존재할 경우 대조군에 비해 VHL수준이 감소되어 있었으며, HIF-1 α 를 검출할 수 있었다. 대조군인 Ad.GFP(GFP 유전자를 함유하고 있는 아데노바이러스 유전자 전달체) 혹은 인산원충액을 주사한 생쥐의 경우 내인성 UCP 및 HIF-1 α 는 검출되지 않았다. 이 결과는 UCP가 생쥐 간 조직에서도 VHL를 분해시키고, HIF-1 α 를 안정화시킨다는 것을 제시한다. 또한 UCP가 정상 간 조직에는 거의 발현이 되지 않고 있다는 것을 암시한다.

원발성 암·전이암에서 UCP와 HIF-1 α 함께 검출

고형암은 저산소 영역을 갖고 있으며, HIF-1 α 의 발현이 수많은 환자의 원발성 암 및 전이암 조직에서 확인되었다. HIF-1 α 단백질이 암세포괴사가 일어나거나 혈관에서 멀리 떨어진 암세포에서 검

출되어 HIF-1 α 의 존재는 저산소 때문일 것으로 추정되고 있다. 그러나 혈관에서 가까이 존재하는 암세포에서 HIF-1 α 가 검출되기도 한다. 이는 저산소 이외에 다른 기작이 HIF-1 α 의 안정화를 유도할 가능성을 제시한다. 실제로 환자의 암조직에서 UCP 단백질이 HIF-1 α 단백질 안정화를 유도하는지를 조사하기 위해 간암, 대장암, 유방암이 심어져 있는 티슈-어레이를 수행하였다. 그 결과 원발성 및 전이암조직의 UCP 면역형광 패턴과 HIF-1 α 의 면역형광 패턴이 거의 일치되게 나타났으며, 이 경우 VHL은 UCP와 반비례하여 나타나거나 검출되지 않았다. 헤마톡실린 및 에오신 염색 결과 UCP 및 HIF-1 α 는 암세포 안에 함께 존재한다는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 인체 암세포에서 UCP가 HIF-1 α 의 안정화의 원인 인자일 수 있음을 제시한다.

UCP가 발현되는 세포주에서 HIF-1 α 가 검출되는지를 정상산소 조건하에서 조사하였다. 간암, 위암, 대장암, 폐암 및 정상섬유아 세포주를 포함하는 21종의 사람의 세포주에서 내인성 UCP, VHL, HIF-1 α 의 존재를 조사한 결과 UCP가 검출되는 15종의 암세포주 중 12개에서 HIF-1 α 가 검출되었다. UCP와 VHL 단백질 발현량은 반비례하여 나타났다. 이 결과는 정상산소조건하에서 검출되는 HIF-1 α 의 발현은 대부분의 경우 UCP의 발현에 기인한다는 것을 말한다.

UCP, 배양세포에서 암세포 증식·전이 촉진

Ad.F-UCP 유전자 전달체를 이용하여 신장암 세포주(CAKI)에 UCP를 많이 발현시켰을 때, VHL 단백질량이 감소하고 이에 따라 HIF-1 α 단백질량이 늘어나는 것이 관찰되었다. 이 경우 UCP가 과 발현될 경우 VEGF의 전사체량이 늘어나는 것이 관찰되었다. 이는 안정화된 HIF-1 α 가 활성이 있음을 제시한다. UCP의 많은 발현은 암 세포증식 속도 및 세포침투능을 유의하게 증가시켰다. UCP mRNA만을 특이적으로 분해시켜 단백질의 양을 적게 만드는 작은 간섭 리보핵산인 UCP-siRNA가 발현되는 아데노바이러스유전자 전달체 (Ad.UCP-siRNA)를 제작하고 UCP 발현의 차단이 효과적으로 일어나는지를 조사하였다. Ad.UCP-siRNA는 UCP 단백질량을 감소시켰고 동시에 VHL 단백질량을 증가시켰고, 이에 따라 HIF-1 α 단백질량이 감소되었다. UCP의 발현을 차단하였을 때 암 세포 증식 및 침투능이 유의하게 감소하였다. 이 결과들은 UCP가 암 세포 증식 및 침투를 촉진하며 UCP 발현의 차단은 암 세포 증식 및 침투를 저해한다는 것을 제시한다.

사람의 흑색종양세포(C8161)에 UCP를 많이 발현시킨 다음 누드생쥐피하에 주사하고 암 세포 성장을 21일 동안 조사한 후 암 결절을 적출하였다. UCP가 많이 발현된 경우 암세포 증식속도가 증가하였고, 적출된 암 결절을 면역조직화학적으로 분석하였을 때 HIF-1 α 및 혈관세포마커인 CD31의 발현이 대조군에 비해 증가되어 있었다.

흑색종양세포를 생쥐 피하에 이식한 후 Ad.UCP-siRNA를 암 결절에 직접 주사하였을 때 암 결절의 증식이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 흑색종양세포를 생쥐피하에 주사하여 암 결절을 형성한 후 Ad.F-UCP를 암 결절에 주사한 다음 9주 후에 폐로 전이한 암 결절을 헤아린 결과 UCP가 많이 발현될 경우 폐전이암이 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. Ad.F-UCP 혹은 Ad.UCP-siRNA로 처리한 흑색종양세포를 생쥐 꼬리정맥에 주사한 다음 4주 후에 생쥐 폐를 적출하여 폐 표면에 전이한 암 결절수를 헤아린 결과, UCP가 많이 발현되면 폐전이암이 유의하게 증가한 반면, UCP의 발현을 차단하면 폐전이암이 감소하였다. 이 결과들은 생쥐모델에서 UCP는 암 증식 및 전이를 촉진하며, UCP의 발현을 감소시키면 암 증식 및 전이를 제어할 수 있다는 것을 제시한다.

786-O 신장암 세포주는 야생형의 VHL이 없으므로 HIF-2 α 가 안정되어 있는 세포주다. 암세포증식 및 침투에서 UCP의 효과가 VHL에 의해 매개되는지를 알아보기 위해 VHL단백질이 항상 발현되는 786-O 세포주를 구축하고 UCP가 암세포의 증식 및 침투에 미치는 효과가 VHL-HIF 경로에 의해 일어나는지 조사하였다. 그 결과 UCP는 HIF-2 α 수준을 VHL수준을 통하여 조절하고, UCP수준이 적을 때에만 VHL수준이 증가함과 동시에 암 세포증식 억제 효과가 나타나며, HIF-2 α 수준은 배양 암세포의 증식에 영향을 주지 않았으나 침투능에 영향을 주었다.


VHL이 없는 786-O 암 세포를 생쥐피하에 이식한 경우 UCP는 암 세포 증식에 아무런 영향을 주지 않은 반면, VHL이 발현되는 세포주의 경우에 UCP의 존재는 VHL의 암 억제 효과를 감소시키고, UCP 발현을 차단하였을 경우 암세포 증식속도가 현저하게 감소되었다. HIF-2 α 는 생쥐모델에서 암세포 증식에 필수적이었다. 이 결과들은 암세포증식 및 침투에서 UCP의 효과가 VHL-HIF 경로에 의해 일어나고 있음을 제시한다.

분자 표적 암 치료제 개발 연구에 활용

이번 연구는 VHL 암 억제단백질이 UCP에 의해 유비퀴틴화되

고 프로테아좀을 통하여 분해돼 UCP가 VHL E3 유비퀴틴 리가제의 기질인 HIF-1 α 의 안정성을 증가시켜 VEGF 등과 같은 혈관생성 촉진인자의 발현을 유도한다는 것을 생화학적으로 입증한 것이다. 이러한 생화학적 현상의 생물학적 의미를 환자의 암 조직, 배양 암 세포 및 생쥐종양모델에서 조사한 결과 다음과 같이 요약할 수 있다. 첫째, UCP는 VHL-HIF-VEGF 경로의 상위조절인자다. 둘째, 배양 암세포에서 VHL의 암 억제기능의 부실은 UCP의 존재에 기인하고, 정상산소조건에서 HIF-1 α 의 안정화에 기여한다. 셋째, 환자의 암 조직에서 HIF-1 α 의 발현은 부분적으로 UCP 발현에 기인할 것으로 보인다. 넷째, UCP는 간암, 대장암, 유방암 등의 많은 종류의 암의 증식 및 전이에 보다 능동적으로 관여할 것으로 보인다. 따라서 UCP 발현의 차단 혹은 효소활성의 저해는 암 세포의 증식 및 전이를 제어할 수 있으며, UCP를 타깃으로 하는 분자 표적 암 치료제 개발에 연구 결과를 활용할 수 있을 것으로 보인다. 그러나 우리가 아직 알지 못하는 UCP의 새로운 기질과 세포 기능들이 있을 수 있음을 완전히 배제할 수 없다. 따라서 암 치료제 개발을 위한 분자 표적으로서의 UCP의 타당성, 유용성은 심도 있는 UCP기능 연구 및 임상적 유의성 검증을 통하여 제고될 수 있을 것이다.

UCP가 발현되고 있는 암세포에는 VHL 단백질 수준이 낮으므로 VHL E3 유비퀴틴 리가제가 적게 존재하고, 결과적으로 HIF-1 α 단백질이 안정화되어 VEGF 발현이 증가한다. 이러한 암 세포는 증식이 빨라지고, 전이가 증가하게 된다. UCP-siRNA를 함유하는 아데노바이러스 유전자 전달체를 이용하여 UCP의 발현을 감소시키면, VHL 단백질 수준이 증가하여 암 억제 효과가 나타나게 되고, HIF-1 α 단백질이 감소되어 암 세포의 전이가 저해된다.

이번 연구성과는 UCP단백질이 간암을 비롯해 대장암, 유방암 등 원발성 암 뿐 아니라 전이 암 치료제를 개발할 수 있는 표적으로 활용될 수 있음을 제시한 것으로 평가되고 있다. 



글쓴이는 서울대학교 약학대학 졸업 후 동대학원에서 석사학위를, 독일 괴팅겐 대학에서 박사학위를 받은 후 미국 뉴욕주립대학에서 박사후 연수를 거쳤다.