

Autotaxin의 암세포 이동 촉진 활성은 phosphodiesterase catalytic site에 연결 되어있다

이 회영¹, 장 기철¹, 강 영진¹, Mary L. Strack²

¹경상대학교 의과대학 약리학교실, 진주 660-280, Korea, ²Lab of Pathology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD20892, USA

암환자의 생명을 가장 위협하는 암세포의 전이는 숙주와 암세포의 상호작용을 포함하는 여러단계의 연쇄적인 과정이다(1). 전이의 발생은 하나의 세포나 집단의 암세포가 첫번째 암발생 부위에서 분리되어 국소적으로 침투하고 순환기계에 들어가 다른곳에 흡착 후 다른 장기의 interstitium과 parcnchyma에 입출(extravasate)하게 되며 2차적 colony로서 자라나 stroma나 basement membrine과 같은 생물학적 울타리를 파괴한다. 전이의 각단계에서 암세포는 면역세포의 공격을 피하여야만 한다.

세포의 이동은 태아의 생성(embryonic events), 성장세포의 재조형(remodeling), 상처치유(wound healing), 맥관형성(angiogenesis), 면역방어(immune defence)의 경우에 아주 중요한 역할을 한다(2). 정상적인 경우에 세포의 이동은 잘 통제되지만 암세포의 이동은 비정상적으로 통제가 되거나 자체내에서 통제가 된다. 암세포는 숙주에서 생산되는 scatter factors, growth factor, extracellular matrix components, 그리고 암세포에서 발생하는 autocrine motility factors를 포함한 여러가지 인자에 의해 영향을 받는다.

1986년 처음으로 미국 NIH의 Dr. Liotta에 의해 보고된 이후로 여러가지 암세포에서 autocrine motility factor가 생산된다고 보고되는데 그들은 암세포 자체에서 생산되어 자신 혹은 다른 암세포의 이동을 촉진한다(3). Autocrine motility factor들은 어떤 주어진 암세포에만 그에 활성이 국한되는것이 아니라 여러종류의 암세포에 영향을 끼친다. 하지만 정상적인 fibroblast나 leukocyte에는 활성이 없다고 보고되었다. Autocrine motility factor들은 세포표면의 수용체를 통하여 불규칙적 혹은 직접적인 세포의 이동을 촉진한다. 여러가지의 autocrine motility factor들이 각종의 암세포에서 생산된다고 보고되었으나 오직 3가지 요인만이 정제되고 그의 cDNA sequence가 밝혀졌다. 그것은 insulin-like growth factor-II, hepatocyte growth

factor/scatter factor, 그리고 최근에 새로이 발견되어 autotaxin이라 명명된 cytokine phosphodiesterase (4-6)가 있다.

Autotaxin(ATX)은 미국 NIH의 Lance Liotta의 그룹에 의해 처음 인간의 melanoma cell line, A2058의 배양액으로부터 정제되었다. ATX는 125KDa의 당단백질 (glycoprotein)로써 높은 picomolar 농도에서 ATX를 분비하는 A2058 melanoma 세포를 포함한 각종 암세포의 chemotactic 그리고 chemokinetic 이동을 강력히 촉진한다. 여러가지 형태의 암세포로부터 이 autocrine motility factor의 분비는 암세포 전이에 가장 결정적인 암세포 자신의 이동을 유발시키고 조절하는 기전을 제공하는 것으로 추측된다. 1994년에 ATX의 cDNA는 동일 그룹에 의해 분리되었으며 그의 sequence가 보고되었다. 추출된 cDNA clone은 3251 base pairs 를 함유하고 있었으며 mRNA의 크기는 약 3.3 Kb이었다. 최근에 ATX의 cDNA가 teratocarcinoma cell line, NTera2D1에서 추출되었는데 amino acid sequence가 melanoma cell line, A2058에서의 ATX와 약 94% 유사함을 보여주었다. ATX의 cDNA sequence는 plasma cell activation protein (PC-1) (7), rat brain nucleotide pyrophosphatase (PD-I α) (8), 그리고 rat neural differentiation antigen (gp130^{RB13-6}) (9)를 포함한 세포표면 단백질군에 상당한 유사성을 보여준다. 이들 단백질들의 추론된 amino acid sequence는 이들 단백질들이 짧은 N-terminal intracellular domain을 갖고 있으며 하나의 transmembrane domain, 그리고 긴 extracellular domain을 갖음을 보여준다. 긴 extracellular domain은 cysteine이 많이 있는 somatomedine B domain과 type I phosphodiesterase (PDE) 활성부위, 그리고 칼슘이 붙을수 있는 EF hand loop domain을 함유하고 있다 (Figure 1). PC-1은 주로 호주의 연구팀에 의해 오래전부터 연구되어 왔으나 생리학적 역할은 아직 알려지지 않았으나 최근에 PC-1이 insulin receptor tyrosine kinase를 억제함으로써 type II 당뇨병 (non-insulin-dependent diabetes; NIDDM)에 관련한다고 추측되었다. PD-I α 는 일본의 코베대학 연구자들에 의해 cDNA가 보고되었고 ATX와 90%의 동일한 amino acid를 갖고 있다고 알려졌으나 생체내에서의 기능은 모르고 있다. 다만 이들 단백질들의 연구자들은 ATX와 비슷한 구조와 sequence를 함유하므로 ATX와 같은 역할을 할 것이라고 추측할 뿐이다.

ATX는 PC-1에서 보이는 PDE, nucleotide pyrophosphatase의 활성들이 있다고 보고되었다. 또한 ATX는 [α -³²P]ATP (adenosine triphosphate)에 의해 threonine기에 인산화된다는 것이 최근에 밝혀졌다 (Figure 2). 그러나 이러한 효소활성들, 그리고 인산화가 ATX의 암세포 이동촉진에 어떻게 영향을 미치는지는 알려지지 않았다. CEPH YAC library를 polymerase chain reaction 을 이용하여 screening하여본 결과

autotaxin의 gene이 인간의 chromosome 8q23-24에 위치함을 밝혔으며 여러가지의 인간 장기에대한 비교적인 ATX mRNA의 양을 조사하여 본 결과 뇌와 태반, 자궁 그리고 작은 창자에 많이 있었고 간과 콩팥등에서는 아주 작은 양의 ATX mRNA 발현이 관측되었다(Figure 3).

최근에 exophosphodiesterase 계통의 단백질중 하나인 ATX에 있어서 phosphodiesterase catalytic site, 201YMRPVYPTKTFPN213,가 이 단백질의 세포이동 촉진 활성에 필수적임을 발견하였다. ATX는 extracellular nucleotides를 분해하며, 중성과 알칼리성에서 phosphodiesterase activity를 갖고 있으며 ATP와 결합하는 다기능의 단백질이다. Recombinant ATX를 Cos-1 세포로부터 추출하여 분석하여본 결과 ATX가 함유하는 모든 생물학적 생화학적 활성을 갖고 있었다. Phosphodiesterase catalytic site의 site-directed mutagenesis를 통하여 210번 위치의 threonine을 alanine이나 aspartic acid로 변형시켰을때 recombinant 변형 단백질의 세포 이동 촉진, phosphorylation, 그리고 phosphodiesterase 활성 모두가 한꺼번에 없어짐을 관찰할수 있었다. 210번 위치의 threonine을 serine으로 변형시켰을때 중간의 세포 이동 촉진, 중간의 phosphodiesterase 활성, 그리고 아주 작은 phosphorylation을 관찰할수 있었다. 209번의 lysine을 leucine으로 변형시키는 다른 실험을 통하여서는 정상적인 세포 이동 촉진과 phosphodiesterase 활성을 갖고 있으면서 threonine에 phosphorylation이 안되는 변형 단백질을 관찰할수 있었다. 이러한 변형은 phosphorylation 반응을 ATX의 세포 이동촉진 활성에서 분리 시킬수 있었으며 최소한 dephosphorylation 상태가 ATX의 활성을 나타내는 상태이라는 것을 추측할수 있었다. Phosphodiesterase 효소 자리가 세포 이동촉진에 관련됨을 밝힘으로써 이러한 데이터는 exo/ecto-효소군들의 상상치 못한 역할을 밝혀주는 계기가 될 것이다.

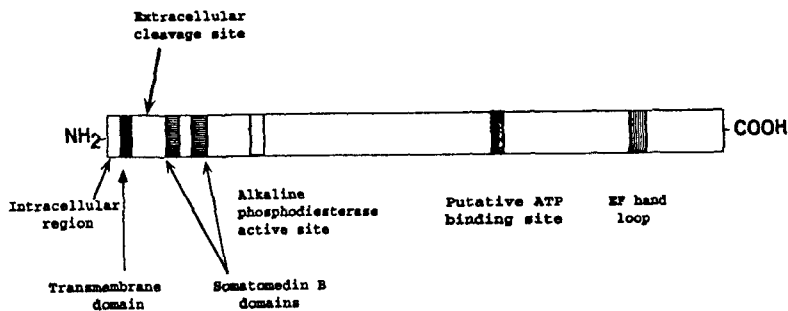


Figure 1. Domain structure of ATX

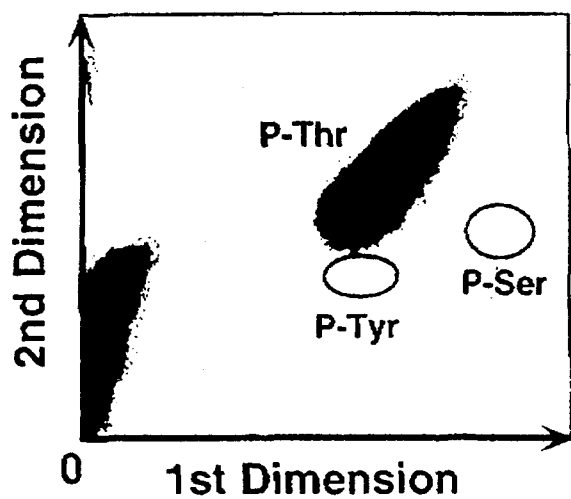


Figure 2. Amino acid phosphorylation of ATX



Figure 3. Differential tissue expression of ATX

참고문헌

1. Fidler, I.J., and Hart, I.R. 1982. Biologic diversity in metastatic neoplasma-origins and implications. *Science*. **217**, 998-1001.
2. Singer, S.J., and Kupfer, A. 1986. The directed migration of eukaryotic cells. *Ann. Rev. Cell Biol.* **2**, 337-365.
3. Liotta, L.A., and Schiffmann, E. 1988. Tumor motility factors. *Cancer. Surveys.* **7**, 631-652.
4. Strucke, M.L., Krutzsch, H.C., Unsworth, E.J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E., and Liotta, L.A. 1992. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J. Biol. chem.* **267**, 2524-2529.
5. Murata, J., Lee, H.Y., Clair, T., Krutzsch, H.C., Arestad, A.A., Sobel, M.E., Liotta, L.A., and Stracke, M.L. 1994. cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J. Biol. chem.* **269**, 30479-30484.
6. Lee, H.Y., Murata, J., Clair, T., Polymeropoulos, M.h., Torres, R., Manrow, R., Liotta, L.A., and Stracke, M.L. 1996. Cloning, chromosomal localization, and tissue expression of autotaxin from human teratocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.
7. Oda, Y., Kuo, M., Huang, S.S., and Huang, J.S. 1991. The plasma cell membrane glycoprotein, PC-1, is a threonine-specific protein kinase stimulated by acidic fibroblast growth factor. *J. Biol. chem.* **266**, 16791-16795.
8. Narita, M., Goji, J., Nakamura, H., and Sano, K. 1994. Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase (PD- I α) from rat brain. *J. Biol. chem.* **269**, 28235-28242.
9. Deissler, H., Lottspeich, F., and Rajewsky, M.F. 1995. Affinity purification and cDNA cloning of rat neural differentiation and tumor cell surface antigen gp130RB13-6 reveals relationship to human and murine P C-1. *J. Biol. chem.* **270**, 9849-9855.