

RAS inhibitor를 이용한 항암제의 개발에 관하여

어 미 숙

고려대학교 자연과학대학 생물공학과

서 론

ras gene은 원래 Harvey(HaSV)와 Kirsten(Ki) rat sarcoma virus의 oncogene으로서 처음 발견되었으나 최근들어서 췌장암의 90% 그리고 대장암의 50%를 포함한 사람의 암세포에서 30% 이상의 원인이 활성화된 ras gene이라는 것이 밝혀짐에 따라 더욱 여러 연구분야의 연구자들의 주목을 받게 되었다(1). Oncogenic ras gene과 높은 유사성을 가진 분자량 20 kDa의 세계의 cellular counterpart; N-, H-(Harvey) 그리고 K-(Kirsten)은 p21ras라고 종합적으로 칭하며 이들은 모두 growth control에 있어서 중심 역할을 하고 있다. ras protein은 현재 알려진 50여의 small monomeric GTP-binding protein들과 30% 이상의 sequence homology를 보이는 superfamily를 이루고 있으며 이들은 모두 GTP-binding과 hydrolysis의 switching cycle을 거쳐 on-off 기능을 나타낸다. 이들 superfamily의 member들은 growth regulation과 differentiation의 기능을 수행하는 ras와 intracellular trafficking을 담당하는 rab, 그리고 cytoskeletal control을 담당하는 rho protein의 세가지로 크게 구분할 수 있다. ras는 활성화 형태인 GTP bound form과 비활성화 형태인 GDP bound form의 두 형태로 존재하며 두 형태를 매개하는 regulatory protein들에 의해 그 activity가 조절된다. 또한 ras는 GTP와 GDP에 강한 친화성이 있으며 세포내에는 GTP보다 GDP가 더 많이 있어서 평소에는 ras가 GDP와 결합하고 있다가 활성화될때만 GTP와 결합하는 것으로 추정된다. GDP bound ras는 guanine nucleotide exchange protein(GEP)에 의해 활성화된 GTP bound form으로 전환되며 ras의 기능이 발휘된 후에는 GTPase activating protein(GAP)에 의해 비활성화된다. Yeast의 경우

IRA1과 2의 product가 GAP의 역할을 하는 것으로 알려져 있고 CDC25 gene의 product가 GEP의 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다. NF1 gene은 Von Recklinghausen Neurofibromatosis Type I 질병을 가진 환자에서 발견되었는데 부분적으로 sequencing한 결과에 따르면 yeast의 IRA1/2, mammalian GAP gene product와 protein homology가 높은 것으로 나타났다. Yeast의 경우 IRA1/2 gene의 손실이나 mammalian ras gene의 transformation으로 인한 heat shock sensitivity가 NF1gene(2,3) 혹은 GAP(4)의 expression으로 suppression된 것으로 보아 NF1이 GAP protein으로서 ras를 불활성화시킨다는 것이 판명되었다. 결론적으로 ras의 활성화는 GTP bound 혹은 GDP bound의 양쪽형태를 이동하면서 조절되는데 이 기능은 GAP과 GEP 또는 그의 유사 protein들에 의해 수행되며 이러한 regulatory protein들은 growth factor, cytokine 그리고 protein kinase 같은 signal에 의해 활성화된다고 생각된다. 본 총설에서는 ras protein의 여러가지 성질보다는 ras의 modification과 관련하여 항암제로 사용할 수 있는 ras에 specific한 약품개발의 가능성과 현재 알려진 ras의 inhibitor를 중심으로 논하고자 한다.

ras의 modification과정과 그에 관련된 효소

활성화된 ras는 그 activity를 나타내기 위해서 plasma membrane의 inner surface에 위치하는 것이 필수적인데(5-7) ras protein 자체는 membrane과의 상호작용을 설명할 수 있을만한 특별히 hydrophobic한 sequence들을 가지고 있지 않다(8). 이제는 ras의 membrane에의 attachment가 몇 단계의 post-

translational modification을 거쳐 protein의 hydrophobicity를 높임으로서 가능해진다는 것이 밝혀졌으므로 각 modification과정을 중개하는 enzyme을 연구함으로써 가능한 항암제개발의 시발점으로 삼을 수 있을 것이다. ras의 modification은 모든 ras protein에 공통적으로 존재하는 C-terminal의 CA₁A₂X motif에서 일어나는데 (C=Cys, A=alphatic acid, X=any amino acid) 일어나는 순서로는 1) Cysteine의 farnesylation 2) AAX 잔기의 cleavage 3) Cysteine의 carboxymethylation 4) CA₁A₂X 보다 upstream에 위치한 근처 cysteine의 palmitoylation으로 일어나며 모두 각 단계의 specific enzyme에 의해 일어난다.

첫번째 과정인 farnesylation인 경우 15-carbon인 farnesyl isoprenoid가 farnesyltransferase (이하 FTase로 약칭)에 의해 X가 Ser, Met 혹은 Ala인 경우에 부착된다. Farnesylation은 다른 과정보다 ras의 membrane attachment에 가장 필수적인 단계로서 만약 이 단계가 일어나지 못하면 ras는 plasma membrane이 아닌 cytoplasm에서 검출되고 ras의 oncogenic activity도 현저히 감소된다 (9). ras 이외의 다른 G protein의 modification을 살펴보면 farnesyl 대신 geranylgeranyl transferase (이하 GGase로 약칭) I/II에 의해 X 잔기가 leu, Phe, Iso, Asn 혹은 Gln인 경우에 의해 geranylgeranyl isoprenoid가 결합되는데 두 isoprenoid moiety 모두는 흥미롭게도 잘 알려진 cholesterol 합성의 중간산물이다. 실제 HMGCoA synthase나 HMGCoA reductase의 mutation으로 인해 sterol 합성이 차단된 *S. cerevisiae*의 mutant에서는 ras protein의 unprocessed form이 cytosol에서 발견되었다(10). Farnesylation과 geranylgeranylation의 sequence requirement는 CAAX motif의 마지막 잔기만 다른데 실제로 보고된 바에 의하면 ras의 C-terminal X를 leucine으로 site directed mutagenesis에 의해 치환했을때 farnesyl 대신 geranylgeranyl isoprenoid가 결합된다는 것이 알려졌다(11, 12).

일단 farnesylation된 ras는 cysteine뒤의 AAX잔기가 *S. cerevisiae*에서 검출된 바로는 수용성의 metalloenzyme인 carboxypeptidase Y에 의해 Cleavage가 이루어 지는데(13) 이 modification은 farnesylation된 ras가 membrane과 결합할 때 일어날

수도 있는 steric hinderance를 방지하는 역할을 한다고 생각된다. 이 단계의 modification은 cysteine 앞의 어떤 sequence motif도 필요치 않는 것으로 추측된다. Carboxymethylation 역시 ras가 membrane에 결합되는 것을 도와주는데 이 사실은 *S. cerevisiae*의 methyltransferase가 결합된 ste14 null mutant에 ras2 protein을 expression 시켰을 때 methylation되지 않은 ras protein이 membrane에 아주 미약한 정도로 결합되었다는 것을 발견한후 부터이다(13).

Palmitoylation 또한 membrane attachment에 필수적인 단계인데 Hancock et al.이 보인바에 의하면 p21 H-ras protein에 palmitoylation을 제외한 모든 modification을 가능하게 했을 때 membrane에 매우 미약하게 결합한 것을 알 수 있었다(14). 이 사실은 언뜻 불합리한 것 처럼 보이는데 그 이유는 wild type의 p21 K-ras protein은 palmitoylation되지 않고도 membrane에 high affinity로 binding해 있기 때문이다. 그러나 wild type ras인 경우는 oncogenic ras와 달리 C-terminal에 연속적으로 여섯개의 lysine잔기가 있어서 이 lysine의 양전하가 membrane의 lipid 음전하를 중화하는 것으로 생각된다. 실제로 이 가정은 lysine 잔기를 하전을 띠지 않는 glutamine으로 치환했을 때 ras가 cytosol에서 더 검출되었다는 것과(15) lysine 대신 양전하를 띠는 arginine으로 치환했을 때 ras의 membrane결합이 다시 증가한 것으로 보이며(16) 사실로 판명이 되었다.

이상 ras protein의 modification들은 거의 기전이 밝혀진 상태이므로 ras의 modification을 specific하게 억제할 수 있다면 ras로 인한 발암성의 효과를 충분히 억제할 수 있을 것이다. Modification중 ras protein의 membrane attachment를 증가시켜 발암성을 띠게 하는 주요인은 prenylation을 담당하는 farnesytransferase(FTase)로서 이 효소는 rat, bovine 그리고 yeast 등에서 gene의 확인과 cloning이 된상태이다. Yeast FTase는 ras2 mutation시의 현상인 증가된 heat/cold sensitivity와 starvation시에 viability를 잃는 성질을 suppress하는 mutant를 얻은데서 비롯되었다(17). FTase는 zinc metalloenzyme(18)으로서 alpha와 beta의 heterodimer로 구성되어 있는데 beta subunit은 protein substrate에 결합하는 반면(17,19,20) alpha subunit의 역할은

확실치는 않으나 아마도 farnesyl pyrophosphate에 결합하는 것으로 추측되고 있다. FTase가 활성화되려면 두 subunit이 같이 발현되어야 하는것도 이미 발표된바 있다(21,22). Geranylgeranyl transferase (GGTase)는 substrate에 따라 I, II형이 있는데 두 가지 type모두 geranylgeranyl pyrophosphate를 cysteine잔기에 부착시키는데 bovine brain에서 분리된 GGTaseI은 FTase를 구성한 것과 동일한 alpha subunit이 두 subunit중의 하나로 구성되어 있다. GGTaseII는 C-terminal에 CAAX와 다른 motif(CC 혹은 CXC)를 갖는 rab, YPT1 protein등에 geranylgeranyl기를 부착시킨다. 이 효소 역시 cysteine 이전의 다른 sequence를 필요로 하지 않는점이 FTase와 동일하다. GGTaseII는 현재 세가지 subunit으로 구성되어 있다고 알려져 있으나 gene의 sequencing은 덜된 상태이다.

ras modification의 inhibitor

ras의 활성화를 억제함으로써 항암효과를 얻고자 하는 노력의 성과로 현재까지 몇 가지의 ras modification과 관련된 inhibitor가 발견되었으며 그외에도 ras specific inhibitor를 얻으려는 노력이 진행중이다.

d-Limonene은 원래 오렌지 껍질의 기름에서 검출된 성분으로 화학적인 carcinogen에 의해 생성된 쥐의 유방암이 투여된 *d*-Limonene의 양에 비례하여 감소시키는 것으로 발표되었다(23). *d*-Limonene은 분자량 21-26 kD의 protein들의 isoprenylation을 선택적으로 억제하는 것으로 나타났고 암세포에서는 활성화된 ras protein이 원인이었으므로 이 물질이 선택적으로 ras protein의 farnesylation을 억제하는 inhibitor라고 볼 수 있다. *d*-Limonene은 cholesterol 합성시의 중간산물인 geranylphosphate가 식물세포에서만 cyclization되어 생기는 물질인데 그 대사산물인 perillic acid나 dihydroperillic acid는 더 강한 억제제인 것으로 나타났다(23). Cholesterol 합성은 이 억제제와 직접적인 관련이 없으므로 *d*-Limonene 사용시 sterol이나 vitamin A 등의 생산에 영향이 없으나 분자량 21-26 kD protein들의 farnesylation과 geranylgeranylation 중 어떤 것이 선택적으로 억제되는지는 아직 연구 중이다.

다음으로 알려진 prenylation의 억제제로는 FTase가 ras protein의 C-terminal의 CAAX motif에 결합하는 것을 이용하여 CAAX의 잔기를 치환하여 ras의 farnesylation을 관찰한 결과 합성 tetrapeptide가 FTase의 경쟁적인 억제제로 나타난 경우이다. CAAX motif에 여러 mutation을 해본 결과 세번째 아미노산 (CA₁A₂X의 A₂)을 방향성 아미노산으로 치환할 경우 mutation된 ras는 FTase를 인식하여 결합은 하나 farnesyl group이 결합되지는 않기 때문에(24) 순수한 경쟁적인 억제제로 사용할 수 있다. CAAX motif에서 cysteine의 끝에서 네번째 위치는 필수적이어서 만약 cysteine을 다섯번째나 세번째로 옮기게 되면 역시 이 ras도 farnesyl isoprenoid가 결합되지 않는다(25,26). 더우기 흥미로운 것은 cysteine의 양전하가 farnesyl group을 받아들인데 있어서 필수적인 요소라는 적이다. 이 결론은 cysteine의 양전하를 acylation시켜 중화했을때에도 FTase와 결합은 하였지만 farnesyl group에 대해 저항성을 띠게 된 것에서 비롯되었다(26). 실험결과에 의하면 cysteine, A₂ 그리고 X는 지정된 아미노산을 고수하는 경향이 있어서 A₂ 잔기는 하전을 띠지 않은 것이어야 하고 X에는 Met 혹은 Ser이 강하게 선호된다고 한다. 현재 알려진 가장 강력한 억제제로는 CVFM의 tetrapeptide로서 원래 ras motif인 CVIM에 비해 25 nM의 농도로 50% 이상의 억제 효과가 있다(27).

최근에는 Tamanoi와 그 group에 의하여 식물과 토양을 screening한 결과 토양중의 *Streptomyces sp.*에서 FTase를 specific하게 억제하는 세 물질 (UCF 1-A,B,C)을 발견하였다(28). 이 중에서 UCF1-C라고 명명된 억제제는 이미 알려진 항생제인 manumycin과 동일한 물질로 밝혀졌고 UCF1-A, B는 manumycin과 구조상 유사한 물질로서 세가지 모두 FTase를 억제하는 것으로 나타났다. 이중 UCF1-C는 가장 강력한 억제제로서 기질인 farnesylpyrophosphate와 경쟁적으로 효소와 결합하고 Ki-ras로 transform된 fibrosarcoma의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 이것은 HMGC_oA reductase를 억제하므로 isoprenoid의 전반적인 합성 경로를 차단하여 FTase를 억제하는 비특이성 억제제인 compactin (29)과 비교할 때 FTase에만 특이적으로 반응하는 억제제이므로 효과적인 항암제로서의 전망이 매우

높다고 볼 수 있다. 이와 구조가 다른 화합물로서 FTase의 억제효과가 더 강하다고 여겨지는 UCF 2000에 대한 연구도 현재 이 group에서 연구 중이다. UCF1에 이어 ras의 modification을 특이적으로 억제하므로써 항암효과를 유도하고 궁극적으로 신약을 개발하려는 노력은 앞으로도 계속될 것이며 이 목적을 위해 점차 밝혀질 ras의 작용기전과 관련된 지식을 함께 응용해야 된다고 본다.

참고문헌

1. Bos, J. L. (1989) *Cancer Res.* **49**, 4682-4689.
2. Ballester, R., Marchuk, D., Boguski, M., Saulino, A., Letcher, R., Wigler, M. and Collins, F. (1990) *Cell* **63**, 851-859.
3. Xu, G. F., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., White, R. and Weiss, R. (1990) *Cell* **62**, 599-608.
4. Ballester, R., Michaeli, T., Ferguson, K., Xu, H. P., McCormick, F. and Wigler, M. (1989) *Cell*, 681-886.
5. Willingham, M. C., Pastan, I., Shih, T. Y. and Scoinick, E. M. (1980) *Cell* **19**, 1005-1014.
6. Willumsen, B. M., Christensen, A., Hubbert, N. L., Papageorge, A. G. and Lowy, D. R. (1984) *Nature* **310**, 583-586.
7. Willumsen, B. M., Norris, K., Papageorge, A. G., Hubbert, N. L. and Lowy, D. R. (1984) *EMBO J.* **3**, 2581-2585.
8. Barbacid, M. (1987). *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 779-827. Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 6403-6408.
9. Kitayama, H., T. Matsuzaki, Y. Ikawa and M. Noda, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4284-4288.
10. Schafer, W. R., Kim, R., Sterne, R., Thorner, J. S. -H. and Rine, J. (1989) *Science* **245**, 379-384.
11. Seabra, M. C., Reiss, Y., Casey, P. J., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1991) *Cell* **65**, 429-434.
12. Cox, A. D., Hisaka, M. M., Buss, J. E. and Der, C. J. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2606-2615.
13. Hrycyna, C. A., Sapperstein, S. K., Clarke, S. and Michaelis, S. (1991) *EMBO J.* **10**, 4033-4039.
14. Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E. and Marshall, C. J. (1989) *Cell*, **57**, 1167-1177.
15. Hancock, J. F., Paterson, H. and Marshall, C. J. (1990) *Cell* **63**, 133-139.
16. Hancock, J. F., Cadwallader, K., Paterson, H. and Marshall, C. J. (1991) *EMBO J.* **10**, 4033-4039.
17. Powers, S., Michaelis, S., Broek, D., Anna-A., S. S., Field, J., Herskowitz, I. and Wigler, M. (1986) *Cell* **47**, 413-422.
18. Reiss, Y., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 6403-6408.
19. Goodman, L. E., Perou, C. M., Fujiyama, A. and Tamanoi, G. (1988) *Yeast* **4**, 271-281.
20. Reiss, Y., Seabra, M. C., Armstrong, S. A., Slaughter, C. A., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10672-10677.
21. Chen, W. -J., Andres, D. A., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11368-11372.
22. Chen, W. -J., Andres, D. A., Goldstein, J. L., Russell, D. W. and Brown, M. S. (1991) *Cell* **10**. Schafer, W. R., Kim, R., Sterne, R., Thorner, J. S. -H. and Rine, J. (1989) *Science* **245**, 379-384.
23. Crowell, P. L., Chang, R. R., Ren, Z., Elson, C. E. and Gould, M. N. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 17679-17685.
24. Reiss, Y., Seabra, M. C., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1990) *Methods Comp. Methods Enzymol.* **1**, 241-245.
25. Reiss, Y., Goldstein, J. L., Seabra, M. C., Casey, P. J. and Brown, M. S. (1990) *Cell* **62**, 81-88.
26. Brown, M. S. Goldstein, J. L., Paris, K. J., Brunier, J. and Marsters, Jr. J. C. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8313-8316.
27. Reiss, Y., Stradley, S. J., Gierasch, L. M., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 732-736.
28. M. Hara, K. Akasaka, S. Akinoga, M. Okabe, H. Nakano, R. Gomez, D. Wood, M. Uh and F. Tamanoi. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2281-2285.
29. Schafer, W. R., Kim, R., Stern, R., Thoner, J., Kim, S. -H. and Rine, J. (1989) *Science* **245**, 379-385.