

KESYSVYVYKV로부터 변형된 펩타이드 기질을 이용한 항바이러스제의 타깃이 되는 UL97 단백질 인산화 효소의 기질 특이성

백 문 창[#]

경북대학교 의과대학 분자의학교실

(Received September 22, 2008; Revised October 27, 2008)

Substrate Specificity of Protein Kinase UL97, an antiviral target, on Mutant Peptide Substrates Derived from a Peptide, KESYSVYVYKV

Moon-Chang Baek[#]

Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Kyungpook National University, 101 Donggin-dong, Jung-gu, Daegu 700-422, Korea

Abstract — Human cytomegalovirus expresses an unusual protein kinase UL97, a member of H_VU_L family of protein kinase. UL97 can phosphorylate nucleoside analogs such as ganciclovir as well as protein/peptide. It has previously been reported that UL97 is able to phosphorylate a KESYSVYVYKV peptide and that P+5 position (**K**) is important. We examined the extent of contribution of other positions (P-4 through P+6) of the peptide to be substrate of UL97 using alanine substituted peptides (Ala scanning) and deleted peptides. The result suggested that the E (P-2) is negative effect and P+5 (**K**) is still important. The peptide YSVYVYK is the shortest substrate enough to show high activity, which could be a starting point to develop peptidomimetic drug. This study would give important information to deeply understand the substrate specificity of UL97 and develop an antiviral drug using the small peptide identified here.

Keywords □ alanine scanning, deleted peptide, protein kinase UL97

세포가 여러 가지 생물학적인 과정을 전달하는 신호전달체계는 주로 단백질 인산화 효소에 의해 조절되고 있고, 이들은 아주 많은 종류가 밝혀져 있다. 이들은 기질을 인식하기 위해서 각 효소마다 기질 특이성을 가지고 있으므로 이들에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. Human cytomegalovirus (HCMV)는 면역력이 약한 사람이나 신생아에서 아주 치명적인 질병을 일으키는 바이러스로써 UL97이라는 단백질 인산화 효소를 가지고 있다.^{1,2)} 이 효소는 바이러스 복제시 nucleocapsid가 핵을 빠져나가는 시기에 중요한 역할을 하고 관련된 여러 가지 단백질들을 인산화 시키는 것으로 알려져 있다.^{3,4)} 이 과정을 억제시키는 항바이러스제는 현재까지 알려져 있지 않다. 여러 가지 약들이 HCMV의 감염을 치료하는 데 이용되고 있으나 여러 가지 독성들의 문제들로 인해 사용이 제한되고 있다. UL97은 특이한 인산화 효소이고 작용 기전이 특이하여 이를 타깃으로 하여 약물을 개발하는 것은 아주 장점이 있다.

실제로 maribavir라는 약이 개발되어,⁵⁾ 이는 세포 배양 시에 HCMV 복제를 선택적으로 억제시킬 수가 있고, 그 타깃은 UL97이 되는 것으로 보고되어 있다. 이는 UL97이 새로운 항바이러스제를 개발하는 데 있어서 중요한 타깃이 될 수 있음을 보여주는 것이다.

UL97은 ganciclovir와 같은 핵산 유도체를 인산화 시킬 수 있으며^{1,6)} 또한 UL44, histone H2B와 같은 단백질과 펩타이드 들을 인산화 시킬 수 있는 독특한 성질을 가지고 있다.⁷⁻⁹⁾ 이 효소는 세포 배양 시에 HCMV 복제에 있어서 필수적이다.^{9,10)} UL97의 기질 특이성을 알아보기 위해 이 효소에 대한 기질로서 calf thymus의 히스톤 H2B를 발견하였고, 이들로부터 5 군데의 인산화 효소 위치를 밝혔다. 이들 모두 serine 잔기였다. 특히 가장 활성이 높은 펩타이드로 KESYpSVYVYKV임을 확인하였다.⁷⁾ 이 펩타이드는 cyclic AMP-dependent protein kinase(PKA)에 의해서도 인산화 되었으나 인산화 되는 위치가 다름을 확인할 수 있었다. UL97은 이 효소는 H_VU_L 단백질 인산화 효소계에 속하며, N 말단에 300 잔기 이상의 긴 아미노산으로 이루어진 도메인이 존재하고 여러 가지 부분이 변형되어 있는 동시에, 기존에 알려져 있는 단백질 인산화 효소가 가지고 있는 여러 가지 모티프를 또한 가지고 있다.^{11,12)} 따라서 이 효

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-420-4948 (팩스) 053-426-4944
(E-mail) mcbaek@knu.ac.kr

소에 대한 기질 특이성을 알아보는 것은 아주 중요한 연구가 된다. 본 연구에서는 이 펩타이드를 이용하여 여러 가지 변형된 펩타이드 시리즈를 이용하여 UL97 인산화 단백질의 기질 특이성을 자세히 밝힘과 동시에 기질로 가능한 작은 펩타이드를 찾아 내어 펩타이드 유사 약물(peptidomimetic drug)의 기반이 될 수 있는 가능성을 보여주었다.

실험 방법

세포 및 바이러스

Spodoptera frugiperda 9 cells(Sf9)은 American Type Culture Collection으로부터 구입하였고, 10% fetal bovine serum(Atlanta Biologicals), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin B를 포함하는 Grace's insect medium(In vitrogen)를 이용하여 27도에서 suspension 방법을 이용하였고,¹³⁾ multiplicity of infection (MOI) 5를 이용하여 Sf9 세포(2×10^6 cells/ml)를 감염시켰다.

Baculovirus 발현 GST-UL97의 정제

모든 칼럼용 시약은 Amersham Bioscience에서 구입하였다.

Glutathione S-transferase(GST)-UL97은 전에 발표된 방법처럼 baculovirus를 이용하여 발현 시켰다.^{7,9,14)} Baculovirus에 의해 발현된 GST-UL97 glutathione-Sepharose affinity 칼럼을 이용하여 1차 정제를 하였고, 간단히 설명하면 lysis buffer($1 \times$ phosphate-buffered saline, 10 mM EDTA, 2 mM DTT, 10 % glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, protease inhibitors from Sigma)로 3 ml glutathione affinity column을 세척하고, GST-UL97 단백질은 elution buffer(50 mM Tris[pH 8.0], 10% glycerol, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 50 mM NaCl, 10 mM reduced glutathione)을 이용하여 분리해 내었다. 2차 정제를 위해 이온교환칼럼인 Q-Sepharose 칼럼을 이용하였고, 친유성(hydrophobic)칼럼인 phenyl-Sepharose 칼럼을 3차 정제를 위해 이용하였다. 최종 얻어진 단백질을 Centricon-30을 이용하여 농축하였다. 얻어진 단백질은 10% SDS-PAGE를 통하여 순수하게 분리되었음을 확인하였다.^{7,9,14)} GST-UL 97의 농도는 150 µg/ml 이었다.

펩타이드의 합성

KESYSVYVKV를 기본으로 하여 각 아미노산의 위치를 하나씩 Alanine으로 치환한 펩타이드(Fig. 1)를 합성하고, 또한 길이를

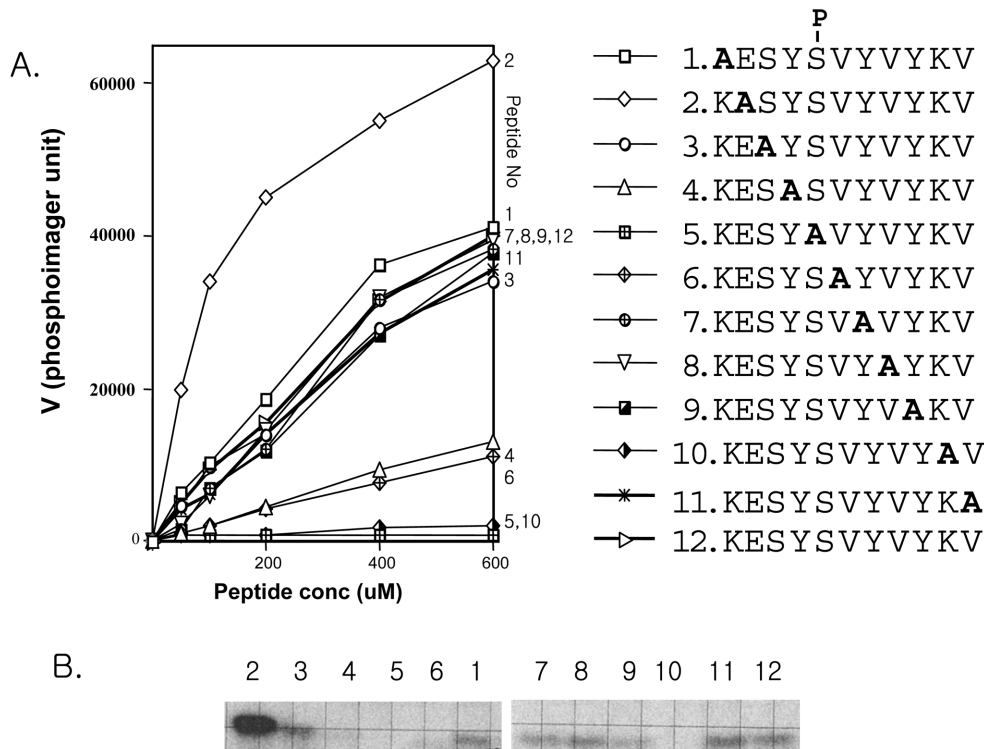


Fig. 1 – Alanine scanning of KESYSVYVKV peptide. (A) Twelve of synthetic peptides derived from the wild type peptide were incubated with GST-UL97 protein kinase in kinase buffer containing radioactive ATP. After 30 min incubation, the phosphopeptides were resolved on chimeric polyacrylamide gels, and the phosphorylated species were quantified by phosphoimager. X-axis indicates concentration (µM) of each peptide and y-axis indicates phosphoimager unit (left) and peptide numbers (right), respectively. (B) A phosphoimage result from a peptide gel when 600 nM of each peptide was used. The number of each lane corresponds to the peptide numbers on A panel.

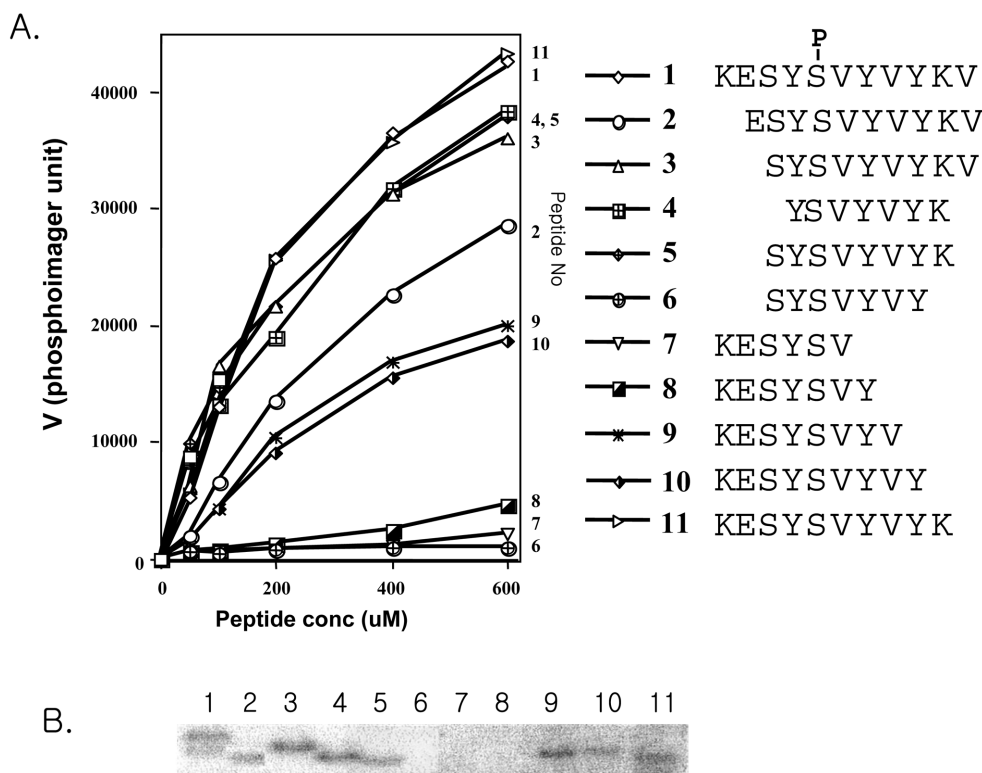


Fig. 2 – Deleted mutants derived from KESYSVYVYKV peptide. (A) Eleven of synthetic peptides derived from the wild type peptide were incubated with GST-UL97 and radioactive phosphopeptides were resolved on chimeric polyacrylamide gels. The phosphorylated species were quantified by phosphoimager. X-axis indicates concentration (μM) of each peptide and y-axis indicates phosphoimager unit (left) and peptide numbers (right), respectively. (B) A phosphoimage result from a peptide gel when 600 nM of each peptide was used. The number of each lane corresponds to the peptide numbers on A panel.

달리하기 위하여 N 또는 C-말단으로부터 1개 아미노산이 감소된 펩타이드(Fig. 2)를 합성하였다. 또한 활성이 있는 가장 작은 펩타이드를 찾기 위해 N 및 C-말단의 양쪽에서 절단된 펩타이드(YSVYVYK, SYSVYVYK, SYSVYVY)도 합성하였다. 모든 펩타이드는 전형적인 Fmoc 방식을 이용하여 합성된 것을 Research Genetics(미국)사로 부터 구입하였다.

Protein kinase assay

합성된 펩타이드를 농도별(200, 400, 600 μM)로 GST-UL97 (100 ng)과 kinase buffer (0.2 mg/ml BSA, 100 mM NaCl, 50 M [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP(300 Ci/mmol))에서, 30분 동안 30도에서 반응시킨다. 반응 후, 이를 펩타이드용 젤⁶⁾을 이용하여 분리한다. 이를 phosphorimager(Molecular Imager)를 이용하여 radioactivity를 정량한다.

실험 결과 및 고찰

Alanine 치환된 펩타이드를 이용한 기질 특이성 연구

GST-UL97은 은 히스톤 H2B를 인산화 시킬 수 있었고, 몇 가

지 펩타이드를 합성하여 그 활성을 확인하였다. 그 중에서 KESYSVYVYKV라는 펩타이드가 활성이 가장 좋았다. 본 연구에서는 이들 펩타이드 중에서 활성에 중요한 역할을 하고 있는 잔기를 더욱 자세히 알아보기 위하여 각 아미노산의 위치를 Alanine(A)으로 치환하여 그 활성을 확인하였다. Fig. 1에서 보이는 것처럼, 대부분은 원래 골격이 되는 wild type(12번) 펩타이드와 거의 유사한 활성을 보였다. 하지만 두 번째 아미노산인 Glu를 Ala로 치환한 경우 그 활성이 2배 가까이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 음이온이 UL97과 상호작용하는데 있어서 억제 효과가 있다는 것을 보여주고 있다. 또한 인산화되는 위치와 가까운 P-1(Y)과 P+1(V)를 A로 치환한 펩타이드들(4번, 6번)은 그 활성이 3배 이상 감소하는 것을 확인하였다. 또한 인산화 위치를 A로 치환한 펩타이드(5번)는 예상한 대로 그 활성이 사라졌다. 또한 기존에 P+5의 K가 중요하다는 보고와 일치하게 본 연구에서도 10번 펩타이드는 그 활성이 거의 사라진 것으로 다시 한 번 확인하였다.

절단된 펩타이드를 이용한 기질 특이성 연구

단백질 인산화 효소의 기질은 인산화된 위치를 바꾸거나 일부

아미노산을 변형하여 단백질 인산화 효소와는 비가역적인 결합을 만들어 억제제 개발도 가능하다. 따라서 A로 치환된 펩타이드에 의한 연구와 더불어 활성을 갖는 펩타이드 중 가장 작은 크기가 되는 펩타이드를 찾는 연구는 약물 개발에 기초가 되는 연구가 될 수 있다. 따라서 기본형에 해당하는 펩타이드의 N 말단과 C 말단으로부터 아미노산 한 개씩을 줄여나가 그 펩타이드들의 활성을 확인하였다. N 말단으로부터 크기를 줄여든 펩타이드는 그 활성이 감소되는 현상을 보여주고 있다. 특히 N 말단에 E가 노출된 펩타이드(2번)는 그 활성이 현격히 감소됨을 볼 수가 있는데, 이는 앞의 Ala 치환 실험과 유사하게 음이온의 효과를 보여주고 있다. C 말단을 줄여가는 펩타이드들 중에, P+5번(K)가 제거된 펩타이드들(9번, 10번)의 경우 그 활성이 절반 가까이 감소되었고, 3개 이상 감소된 펩타이드들(7번, 8번)의 경우 그 활성이 거의 사라짐을 확인하였다. 또한, 가장 작은 크기의 펩타이드를 찾기위해 양쪽으로부터 크기를 줄인 펩타이드들(4번, 5번, 6번)중에서는 P+5번의 K가 제거된 6번 펩타이드는 그 활성이 거의 사라졌고, 나머지 4번, 5번 펩타이드들은 그 활성이 기본형에 비해서는 다소 감소했으나 그 활성은 여전히 잘 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 즉, N 말단의 아미노산들에 비해 C 말단의 아미노산들이 UL97 효소와 결합하여 활성을 나타내는 데 중요한 잔기임을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 해서 프로테이저에 의해 분해가 잘 되지 않는 화학구조로 변형하여 인산화 효소 UL97에 특이적으로 결합하는 펩타이드 유사 약물을 개발하는 데 이용 가능할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구 결과는 기존에 보고된 UL97의 기질 특이성을 더 자세히 알아보고 또한 펩타이드 유사 약물을 개발하기 위하여 활성이 충분하며 가장 작은 크기의 펩타이드 구조를 확인하는 데 목적을 두었다. 기존의 보고는 인산화 되는 Ser 으로부터 C 말단 쪽으로 5 번째 위치(P+5)에 K나 R을 포함하는 양이온기를 갖는 아미노산이 중요한 것으로 보고되었다. 본 연구에서 Ala 치환 및 가장 작은 펩타이드로 YSVYVK 인 것으로 보아, 인산화 되는 Ser 가가이의 N 말단 쪽에 양이온기, P+1 의 V, P+5 위치에 K가 중요한 역할을 하는 것을 알게 되었다. 이는 학문적으로 UL97의 기질 특이성을 이해하고 산업적으로는 펩타이드 유사 약물을 개발하는 데 기초가 되는 결과를 보여주었다.

감사의 말씀

이 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2006-003-E00082).

문 헌

- 1) Littler, E., Stuart, A. D. and Chee, M. S. : Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* **358**, 160 (1992).
- 2) Sullivan, V., Talarico, C. L., Stanat, S. C., Davis, M., Coen, D. M. and Biron, K. K. : A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* **358**, 162 (1992).
- 3) Krosky, P. M., Baek, M. C. and Coen, D. M. : The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *J. Virol.* **77**, 905 (2003).
- 4) Wolf, D. G., Courcelle, C. T., Prichard, M. N. and Mocarski, E. S. : Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 1895 (2001).
- 5) Biron, K. K., Harvery, R. J., Chamberlain, S. C., Good, S. S., Smith, A. A. 3rd, Davis, M. G., Talarico, C. L., Miller, W. H., Ferris, R., Dornsife, R. E., Stanat, S. C., Drach, J. C., Townsed, L. B. and Koszalka, G. W. : Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother* **46**, 2365 (2002).
- 6) Talarico, C. L., Burnette, T. C., Miller, W. H., Smith, S. L., Davis, M. G., Stanat, S. C., Ng, T. I., He, Z., Coen, D. M., Roizman, B. and Biron, K. K. : Acyclovir is phosphorylated by the human cytomegalovirus UL97 protein. *Antimicrob. Agents Chemother* **43**, 1941 (1999).
- 7) Baek, M. C., Krosky, P. M., He, Z. and Coen, D. M. : Specific phosphorylation of exogenous protein and peptide substrates by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase. Importance of the P+5 position. *J. Biol. Chem.* **277**, 29593 (2002).
- 8) Krosky, P. M., Baek, M. C., Jahng, W. J., Barrera, I., Harvey, R. J., Biron, K. K., Coen, D. M. and Sethna, P. B. : The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase. *J. Virol.* **77**, 7720 (2003).
- 9) Baek, M. C., Krosky, P. M. and Coen, D. M. : Relationship between autophosphorylation and phosphorylation of exogenous substrates by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase. *J. Virol.* **76**, 11943 (2002).
- 10) Prichard, M. N., Gao, N., Jairath, S., Mulamba, G., Krosky, P., Coen, D. M., Parker, B. O. and Pari, G. S. : A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency. *J. Virol.* **73**, 5663 (1999).
- 11) Chee, M. S., Lawrence, G. L. and Barrell, B. G. : Alpha-, beta- and gammaherpesviruses encode a putative phosphotransferase. *J. Gen. Virol.* **70**, 1151 (1989).

- 12) Hanks, S. K. and Hunter, T. : Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576 (1995).
- 13) Crossen, R. and Gruenwald, S. : *In Baculovirus Expression Vector System Manual*, 5th ed. Pharmingen, San Diego (1998).
- 14) He, Z., Kim, Y., Chu, L., Ohmstede, C., Biron, K. K. and Coen, D. M. : The human cytomegalovirus UL97 protein is a protein kinase that autophosphorylates on serines and threonines. *J. Virol.* **71**, 405 (1997).