

## Hop 유래 Xanthohumol 화합물에 의한 Proteasome계의 유도발현

이향림 · 이용록\* · 곽미경#

영남대학교 약학대학, \*영남대학교 디스플레이 화학공학부  
(Received August 23, 2010; Revised November 5, 2010; Accepted November 10, 2010)

### Induction of the Proteasome Subunits by Xanthohumol Compounds from Hops

Hyang-Rim Lee, Yong Rok Lee\* and Mi-Kyoung Kwak#

College of Pharmacy, Yeungnam University,

\*College of Engineering, Yeungnam University, 214-1 Dae-dong, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 712-749, Korea

**Abstract** — The proteasome plays a major role in the degradation of abnormal proteins within the cell. Therefore, repressed proteasome function is accepted as one of factors contributing the pathogenesis of multiple degenerative diseases. In the present study, we have observed that xanthohumol C, which is one of prenylated flavonoids from hops, increases the expression of the proteasome subunits through the Nrf2 pathway. Treatment of murine renal epithelial TCMK-1 cells with xanthohumol C and its methoxymethoxy-derivative elevated the expression of the Antioxidant Response Element (ARE)-driven reporter gene, as well as Nrf2-target genes including NAD(P)H: quinoneoxidoreductase 1 (Nqo1). Transcript levels for the catalytic subunits of the proteasome Psmb5 and Psmb6 were increased by these compounds. The activation of the *psmb5* promoter by xanthohumol C was abolished when the ARE in this promoter was mutated, indicating that proteasome induction was mediated by the Nrf2-ARE pathway. These results suggest that xanthohumol compounds from hops have a potential benefit on various oxidative stress-associated human diseases through the induction of the proteasome.

**Keywords** □ xanthohumol, proteasome, Nrf2

Erythroid NF-E2 계열의 bZIP 전사인자인 Nrf2는 small Maf 및 다른 bZIP 단백질과 이종결합체를 이루어 antioxidant response element(ARE)를 활성화함으로써 다양한 항산화인자 및 효소들의 발현을 조절한다.<sup>1)</sup> 따라서 현재 Nrf2는 항산화 시스템의 유지 및 적절한 증가를 주도함으로써 산화적 스트레스에 대해 세포보호 기능을 담당하는 것으로 받아들여지고 있다. Nrf2 시스템에 의해 조절되는 하위 유전자군들을 규명하는 작업은 여러 그룹에서 시도되어 왔으며 현재 catalase 및 glutathione (GSH) peroxidase 등을 포함한 직접 활성산소종을 제거하는 효소군들, GSH 및 thioredoxin(Txn) 등 thiol 함유인자들, NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1(NQO1) 및 glutathione-S-transferases(GSTs) 등을 대표로 하는 해독화 효소군들, 그리고 26S proteasome계의 구성단백질 등이 주된 하위유전자로 밝혀져 있다.<sup>2,3)</sup> Nrf2 경로를 통한 이들 하위유전자군들의 발현증가

는 다양한 친전자성 물질 및 활성산소종들을 효과적으로 제거하고 세포 내 환원능을 유지하며 손상 결과물을 제거하는데 기여한다. 실제로 *nrf2* 유전자가 소실된 마우스를 이용한 다양한 실험결과들은 Nrf2 경로가 화학물질 유발성 암예방효과, 독성물질 및 약물에 대한 조직독성 및 섬유화 예방작용, 염증유발 조직손상에 대한 보호작용 등 면에서 매우 중요한 인자임을 증명하고 있다.<sup>4,5)</sup>

26S proteasome계는 19S 및 20S proteasome 단위체로 구성되어 있으며, 20S proteasome 내부에 존재하는 세 종류의 catalytic subunit 즉 Psmb5, Psmb6 및 Psmb7이 각각 chymotrypsin-, caspase- 및 trypsin-유사 효소활성을 담당하여 세포 내 단백질을 분해한다.<sup>6,7)</sup> 세포주기 관련 단백질 및 전사인자 등의 적절한 분해는 세포생리 및 기능조절을 담당하는데, 최근 proteasome이 손상된 단백질을 제거하는데 주된 시스템임이 밝혀지면서 관심을 받고 있다. 비정상적 구조를 가지는 단백질들은 소수성 잔기의 노출 등으로 인해 세포 내에서 수용성을 잃고 영긴 부산물을 생성하며 궁극적으로 세포생리를 저해하고 세포사를 일으킨다. 이러한 일반적인 단백질의 독성에 대한 세포반

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 053-810-2823 (팩스) 053-810-4654  
(E-mail) mkwak@yumail.ac.kr

응이 이해되면서 특히 산화적 스트레스 상태에서 변성된 구조를 가지는 단백질의 축적이 스트레스에 의한 세포사의 원인 중 하나로 제시되고 있다.<sup>8,9)</sup> 따라서 26S proteasome의 기능을 적절하게 유지하는 것은 산화적 스트레스에 대해 세포가 손상을 복구하고 생존을 도모하는데 필수적이다. 그러나, 생체 내 많은 상황에서 26S proteasome의 기능이 저하될 수 있다는 보고들과 이러한 현상이 산화적 스트레스 관련 퇴행성 신경질환들의 발생과 연관성이 있음이 제시되면서 proteasome계의 기능을 유지 또는 증가시킬 수 있는 방법에 대한 관심이 고조되고 있다.<sup>10-13)</sup>

Hop에서 유래하는 다양한 xanthohumol(XH) 유도체들은 prenylation된 chalcone 구조를 공통으로 하며 hop의 총 건조중량 중 0.1~1%를 차지할 정도로 많은 양이 존재하는 것으로 알려진다. 이러한 XH 유도체들의 다양한 생리활성이 밝혀지고 있는데 특히 에스트로젠 유사효과, 항균작용 및 암예방 작용 등이 관심을 끌고 있다.<sup>14,15)</sup> 특히 암예방 작용으로서의 가능성은 해독화 효소인 Nqo1의 증가작용 및 Nrf2 활성화 작용에 근거한 것으로서 특히 Dietz 등<sup>16)</sup>은 hop에서 분리된 다양한 XH 물질들이 Nrf2의 억제성 단백질인 Keap1의 cysteine 잔기를 알킬화하는 기전을 통해 Nrf2를 활성화시킴을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 천연에 다량으로 존재하는 이러한 XH 물질들이 Nrf2의 활성화 작용을 통해 proteasome계를 증가시킬 수 있는지 확인하고자 하였다. 마우스 유래 신장 상피세포주(TCMK-1)에서 hop의 xanthohumol C(Hop6) 및 그의 유도체는(Hop7)는 ARE 포함 리포터 유전자 발현을 증가시켰으며 Nrf2 하위 유전자(Nqo1, glutamylcysteine ligase의 catalytic subunit(Gclc)의 발현을 증가시켰다. 또한 proteasome의 catalytic subunit인 Psmb5의 발현을 효과적으로 증가시켰으며, 특히 Psmb5의 프로모터를 이용한 결과 리포터 유전자 분석 결과 이러한 증가는 Psmb5의 프로모터 상 ARE를 통해 매개되는 현상임을 확인하였다. 본 결과는 hop 유래 천연물들이 Nrf2 경로를 통해 proteasome의 핵심 catalytic subunit의 발현을 증가시킬 수 있으며 이러한 작용이 산화적 스트레스 상태에서 발생하는 손상 단백질을 효율적으로 제거하고 세포독성을 막을 수 있는 새로운 가능성을 제시하고 있다.

## 실험방법

### 시약

실험에 사용된 hop 화합물인 xanthohumol C(Hop6) 및 그 유도체(Hop5, Hop7)들은 이전 보고에서와 같이 합성되어 공급되었다.<sup>17,18)</sup> 세포배양을 위한 배지 및 시약들은 Hyclone사(Utah, USA)에서 구입하였으며 RT-PCR 분석용 시약 및 효소들은 Invitrogen사(CA, USA) 및 Epicentere사(WI, USA)에서 구입하였다. 그 외 시약들은 Sigma사(MO, USA)에서 구입 하였다.

### 세포배양

마우스 유래 신장 상피세포주(TCMK-1, ATCC, USA)는 10% fetal bovine serum(Hycone)과 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 Minimum Essential Medium with Earle's Balanced Salts 배지(Hycone)에서 배양하였다. 세포에 Hop 화합물을 DMSO에 녹여 25~100 mM 농도로 24시간 동안 반응시키고 이하 실험을 진행하였다.

### 플라스미드

실험에 사용한 ARE 및 XRE 리포터 플라스미드는 미국 Johns Hopkins 대학의 Wakabayashi 박사로부터 공급 받아 사용했으며, 마우스 유래 Psmb5 프로모터(1 kb 길이의 proximal 프로모터) 및 ARE 부분이 제거된 mutation형 프로모터의 리포터 플라스미드는 이전연구에서 확립되어 사용되었다.<sup>19)</sup>

### RNA 추출 및 RT-PCR 분석

Hop 화합물(50, 100 mM)을 세포에 24시간 동안 반응시킨 후 Trizol(Invitrogen) 용액을 이용해 RNA를 추출하였다. cDNA를 합성하기 위해서 100 ng/20 μl 농도의 RNA를 사용하였으며 생성된 cDNA를 이용하여 PCR분석을 수행하였다. PCR은 30s-95°C, 30s-56°C and 40s-72°C에서 27~30 cycles의 조건으로 이루어졌다. 다음과 같은 primer들을 Integrated DNA Technology 사 또는 Bioneer사(Daejeon, South Korea)를 통해 합성하여 사용하였으며, primer 염기배열은 다음과 같다. GCLC, 5'-ATGATGCCAACGAGTCTGAC-3' and 5'-CGCCTTTGCAGATGTCTTTC-3'; NQO1, 5'-ATCCTTCCGAGTCATCTCTA-3' and 5'-CAACGAATCTTGAATGGAGG-3'; PSMB5, 5'-GCTGGCTAACATGGTGTAGC-3' and 5'-AAGTCAGCTACATTGTCACTGG-3'; PSMB6, 5'-GAGGGCAGGTGTACTCTG-TT-3' and 5'-CAAAGCACCTGCCGCTCTA-3'. Visi Doc-It™ Imaging system(UVP, CA, USA)을 이용하여 이미지를 얻고 Image J 소프트웨어를 이용하여 정량하였다.

### Transfection 및 리포터 유전자 분석

세포를 12-well plate에서 배양 후 ARE 또는 XRE 포함의 firefly luciferase 리포터 플라스미드를 transfection하였다. Transfection을 위해서는 Welfect-Ex Plus transfection 시약(Welgene, Daegu, South Korea)을 사용하였으며, well 당 0.7 mg DNA, Welfect reagent 1 ml 및 Welfect Plus reagent 0.5 ml로 만든 transfection complex를 가하고 18시간 동안 transfection을 지속하였다. Transfection complex를 제거하고 정상배지에서 6~8시간 동안 안정화시킨 후 Hop 화합물을 24시간 동안 반응시키고 Dual Luciferase 방법을 통해 측정하였다. 즉 측정된 firefly luciferase 활성은 함께 co-transfection시킨 대조

플라스미드에서 생성되는 renilla luciferase 활성을 측정하여 보정하였다.

### 실험결과 및 고찰

#### Hop 화합물에 의한 Nrf2-ARE 경로 활성화 작용

Hop 유래의 prenylation된 flavonone 중 대부분은 chalcone 형태로 존재한다. 이들 chalcone 화합물들은  $\alpha$ ,  $\beta$ -불포화 ketone 구조를 함유하며 이러한 화학적 구조가 phase 2 해독화 효소들을 증가시킬 수 있는 물질임을 Talalay 등에 의해 오래 전부터 제시한 바 있다.<sup>20</sup> 또한 최근 이들 XH 계열 화합물들이 Nrf2의 억제단백질인 Keap1을 알킬화하여 그 기능을 억제함으로써 Nrf2를 활성화시킬 수 있음이 보고된 바 있다.<sup>16</sup> 이러한 작용에 근거

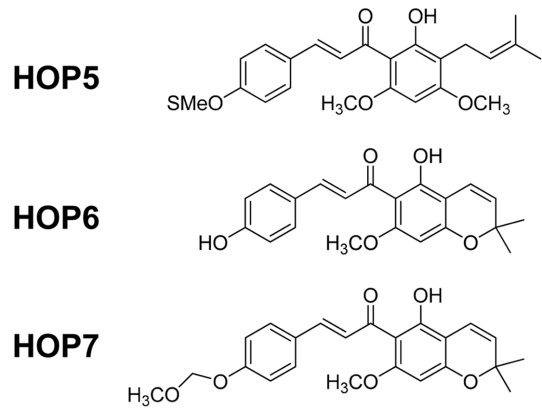


Fig. 1 – Chemical structure of xanthohumol C (Hop6) and its methylthiooxy- (Hop5) and methoxymethoxy- (Hop7) derivatives.

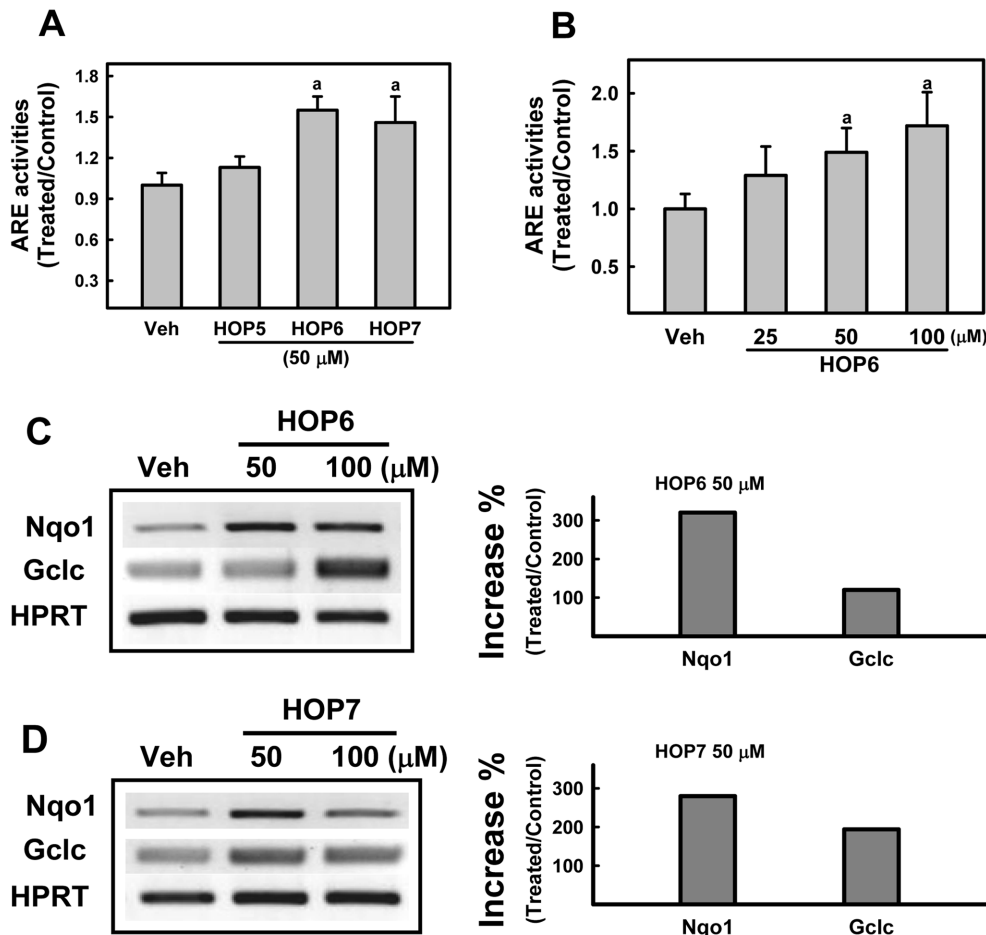


Fig. 2 – Activation of the Nrf2-ARE system by the XH compounds. (A) Murine renal epithelial cells (TCMK-1) were transfected with ARE-luciferase plasmid and luciferase activity was measured following incubation with vehicle (DMSO), 50 mM Hop5, Hop6, or Hop7 for 24 h. (B) Reporter plasmid transfected TCMK-1 cells were treated with Hop 6 (25~100 mM) for 24 h and ARE-driven luciferase activity was measured by using Dual Luciferase system. Values are mean  $\pm$  SD from 4 samples. <sup>a</sup>,  $P < 0.05$  compared with DMSO vehicle group. (C) Transcript levels for Nqo1 and Gclc following treatment with Hop 6. TCMK-1 cells were incubated with Hop6 (50 and 100 mM) for 24 h and RT-PCR analysis was performed. (D) Transcript levels for Nqo1 and Gclc following treatment with Hop 7. Level for hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) was used to normalize the measured Nqo1 and Gclc levels as a housekeeping control gene.

하여 본 연구에서는 hop 유래 XH 화합물(xanthohumol C, Hop6)을 합성하고 그의 methylthiooxy 유도체(Hop5) 및 methoxymethoxy 유도체(Hop7)을 합성하였으며, 이들이 Nrf2 활성화 작용을 경유하여 proteasome계의 증가를 유도할 수 있는지 확인하고자 하였다. 합성된 Hop 화합물들의 구조는 Fig. 1과 같으며, 이들을 DMSO를 용매에 녹인 후 마우스 신장 상피세포에 처치하고 ARE를 활성화시킬 수 있는지 확인하였다. 신장의 상피세포는 외인성 물질에 대한 노출위험이 높은 세포이다. 그러므로 이 세포를 대상으로 proteasome계의 증가 가능성을 확인하는 것은 산화적 스트레스에 대한 위험성을 줄일 수 있는 방안을 제시하는데 도움이 될 것으로 기대된다. ARE는 Nrf2와 타 bZIP계열의 전사인자들이 이중결합체 상태로 작용하는 cis-acting element로서 다양한 Nrf2 하위 조절 유전자의 프로모터상에서 발견되는 전사활성화 부위이다. 따라서 ARE 포함 luciferase 리포터 분석을 수행함으로써 Nrf2의 활성화 정도를 알아보았다. Fig. 2A와 같이 50 mM의 Hop 화합물을 24시간 동안 반응시킨 결과, Hop6 및 Hop7 화합물은 ARE 활성을 DMSO 처리군인 대조군에 비하여 유의성 있게 증가시켰다. 또한 Hop6를 대상으로 농도 의존성을 살핀 결과 25~100 mM의 구간에서 ARE 활성이 농도의존적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 2B). 이때 ARE 리포터 유전자 증가폭이 작게 나타나는 현상이 관찰되었는데 100 mM Hop6의 처치는 ARE-luciferase 활성은 2배 이내로 증가시켰다. 이는 이전 연구에서도 나타난 현상으로서 TCMK-1 세포주 확립과정에서 사용한 SV-40에 의해 플라스미드가 과도하게 증폭된 때문으로 파악된다. 실제로 TCMK-1 세포에서는 무자극 상태의 luciferase 활성이 매우 큰 것으로 나타났는데 이와 같이 비정상적으로 높은 플라스미드의 증폭이 세포 내에서 Nrf2를 고갈시키는 현상을 유도하고 유도형 활성 증가현상을 방해하는 것으로 해석된다. ARE 활성화 작용을 확인하는 결과로서 Hop6 및 Hop7 화합물(50, 100 mM)을 24시간 동안 반응시킨 후, RNA를 추출하고 RT-PCR 분석을 통해 살펴본 Nqo1 및 Gclc의 mRNA 수준은 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2C, 2D). 즉 100 mM의 Hop6 처치는 DMSO 대조군에 비해 Nqo1 발현을 3배 이상 증가시켰으며 Gclc의 수준 역시 1.5배 정도 증가시켰다(Fig. 2C). 또한 Hop7의 처치는 Nqo1 및 Gclc를 각각 3배 및 2배 증가시키는 것으로 확인되었다.

실험에서 측정된 Nqo1은 quinone 화합물들의 two-electron reduction 반응을 매개하여 hydroquinone으로 변환시킴으로써 semiquinone 및 활성산소종의 생성을 방지하는 해독화 효소로서의 기능을 담당한다.<sup>21,22</sup> 또한 Nqo1은 외인성물질들 뿐만 아니라 생체 내 주된 항산화 인자인 tocopherol과 coenzyme Q 등을 환원상태로 유지하는 기능을 담당하며, p53 단백질의 조절에도 관여함이 밝혀지면서 산화적스트레스 대응 세포반응에 중요한 기여를 하는 것으로 받아들여지고 있는 효소이다. 또한 Gclc는

GSH의 생합성 과정의 rate-limiting 효소인 *glytamylcysteine ligase*의 catalytic subunit 으로서, 세포 내 가장 주된 thiol 인자인 GSH 양을 결정하는 효소이다. 즉 이상의 결과는 chalcone 계열의 XH 화합물이 마우스의 신장 상피세포에서 Nrf2-ARE 경로를 활성화시키고 Nrf2 하위 항산화 단백질들의 발현을 효과적으로 증가시킬 수 있음을 보여주고 있으며 이를 통해 상피세포의 보호에 관여할 가능성을 제시한다.

### Hop 화합물의 XRE를 통한 Nqo1 발현증가 가능성

Nqo1의 발현은 그 프로모터상의 ARE에 의해 증가할 수 있는 한편 Xenobiotic Response Element(XRE)에 의해서도 조절될 수 있음이 알려져 있다.<sup>22</sup> XRE는 소위 bifunctional inducer들에 의해 활성화될 수 있는 염기서열로서 cytochrome P450 1A와 같은 효소의 유도발현에 관련하는 부위이다.<sup>23</sup> 흔히 bifunctional inducer들은 ARE 및 XRE를 동시에 활성화시킬 수 있는 물질군으로 알려지며 이는 단순한 Nrf2 활성화제 즉 monofunctional inducer들에 비해 외인성물질들의 활성화에 관여하는 cytochrome P450 1A 효소 등을 함께 증가시켜 결과적으로 발암화에 깊은 연관성을 나타낸다. 즉 Nqo1의 발현이 ARE 및 XRE를 통해 monofunctional 및 bifunctional inducer들에 의해 모두 증가될 수 있음을 의미한다. 따라서 Nqo1 유도발현능을 가진 hop 화합물들이 XRE를 통해 작용할 가능성을 확인하고자 XH 화합물이 XRE 매개 luciferase 리포터 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴 보았다. XRE-luciferase 플라스미드를 TCMK-1 세포에 도입 후 50 mM의 Hop6 및 Hop7을 24시간 동안 반응시키고 luciferase 활성을 측정하였다. 실험결과, 이들 화합물들은 XRE 활성화 작용을 나타내지 않는 것으로 나타나 이들 물질들이 monofunctional inducer로서 작용함을 확인하였다(Fig. 3).

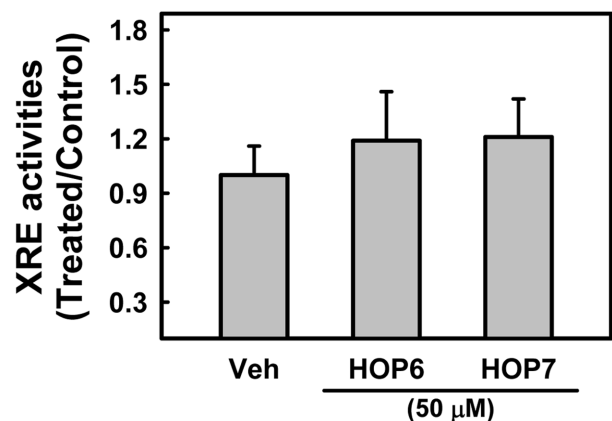


Fig. 3 – Effect of XH on XRE activation. TCMK-1 cells were transfected with XRE-luciferase plasmid and luciferase activity was assessed following incubation of cells with Hop 6 or Hop7 for 24 h. Values are mean±SD from 4 samples. <sup>a</sup>,  $P < 0.05$  compared with DMSO vehicle group.

## Hop 화합물에 의한 proteasome 구성단백질의 발현증가

26S proteasome이 단백질 분해작용을 나타내는 과정은 먼저 19S proteasome이 ubiquitin 단위로 표식된 단백질을 인식하고 단백질의 3차 구조를 풀어 20S proteasome의 내부로 전달하는 과정으로 시작된다.<sup>7)</sup> 이와 같이 proteasome에 의해 분해될 수 있는 단백질은 특정방식으로 표식된 것으로 알려져 있었으나 최근 비정상적으로 산화된 단백질들의 경우에는 이러한 19S proteasome의 작용이 필요 없이 20S proteasome으로 직접 분해될 수 있음이 보고되었다.<sup>24)</sup> 또한 20S proteasome을 구성하는 다양한 구성단백질들의 발현은 외부자극 상황에서 증가될 수 있으며 이러한 증가현상이 어떤 생리적 기능을 담당할 가능성이 꾸준히 제기되어 왔다. 특히 다수의 그룹이 경한 정도의 산화적 스트레스가 20S proteasome의 기능을 증가시키는 현상을 보고하고 있으나, 심한 정도의 산화적 스트레스 상태에서는 proteasome의 catalytic subunit 들의 활성이 오히려 감소하여 손상 단백질들의 제거과정에 문제를 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>25,26)</sup> 이러한 산화적 스트레스에 대한 상반된 반응성은 proteasome이 스트레스 상황에서 어떤 중요한 기능을 담당하고 있음을 역설하고 있다. 더욱이 노화와 퇴행성 뇌질환 진행과정에서 20S proteasome의 발현 수준 및 활성이 정상에 비해 감소하는 현상이 관찰되면서 proteasome 기능의 감소가 단백질 독성 관련 질환의 공통된 원인 중 하나일 가능성이 제기된다.<sup>10,13)</sup>

이러한 보고들은 proteasome의 기능을 적절히 조절하는 것이 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하고 각종 퇴행성 질환의 진행을 막을 수 있는 방안이 될 수 있다는 가설을 지지한다. 실제로 이전연구 결과 Nrf2 경로를 활성화시킬 수 있는 물질들이 ARE를 통해 proteasome의 구성단백질 특히 Psmb5의 발현을 증가시킬 수 있음이 밝혀졌다. 이러한 결과는 Nrf2의 효과적인 활성화제가 proteasome의 발현을 조절하고 그 결과 산화적 스트레스에 대한 세포저항성을 증가시킬 수 있음을 제시하며 따라서 효과적인 Nrf2 활성화제의 개발에 대한 필요성을 제기하게 된다.<sup>19,27)</sup>

앞서 hop의 주된 활성성분인 XH가 Nrf2 경로를 증가시킬 수 있음을 확인한 결과에 이어 이들 물질들이 proteasome 구성 단백질의 발현을 증가시킬 수 있는지 확인하고자 하였다. Psmb5와 Psmb6는 core catalytic subunit이며 Psma1는 20S proteasome의 원통형 구조를 구성하는 단백질이다. Hop6의 처치는 TCMK-1 세포에서 Psmb5 및 Psmb6의 발현을 증가시켜 각각 250% 및 200% 증가폭을 나타냈다(Fig. 4A). Hop7의 처치 역시 Psmb5의 발현을 증가시켜 200% 증가를 보인 반면 Psmb6 및 구조 구성형 단백질인 Psma1의 경우에는 Hop7의 처치가 효과적인 증가현상을 이끌지 못했다(Fig. 4B). 이러한 결과는 Nrf2 활성화제이자 monofunctional inducer로 밝혀진 XH 물질들이 proteasome 구성 단백질들의 발현을 증가시키며 이러한 증가가 proteasome 기능의 증가현상으로 이어질 가능성을 제시한다. 이

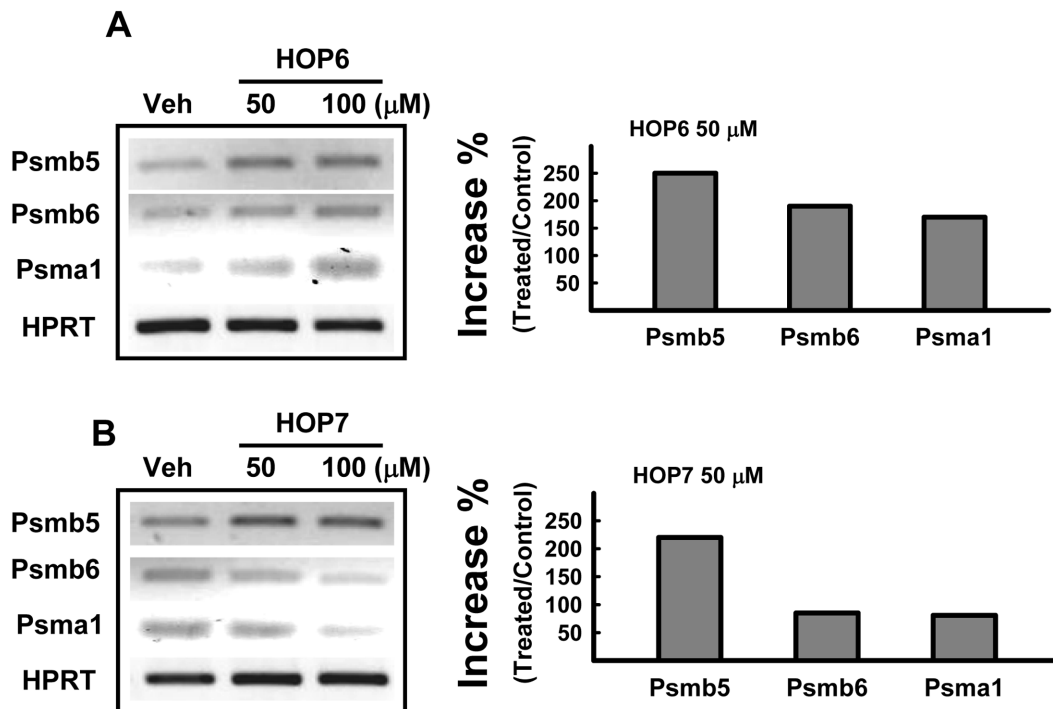


Fig. 4 – Increase in proteasome subunit expression by XH compounds. Transcript levels for Psmb5, Psmb6 and Psma1 following treatment with Hop6 (A) or Hop7 (B). TCMK-1 cells were incubated with Hop6 or Hop7 for 24 h and RT-PCR analysis was performed. Relative intensities were obtained following normalization of intensities of each PCR result by using HPRT housekeeping control gene expression.

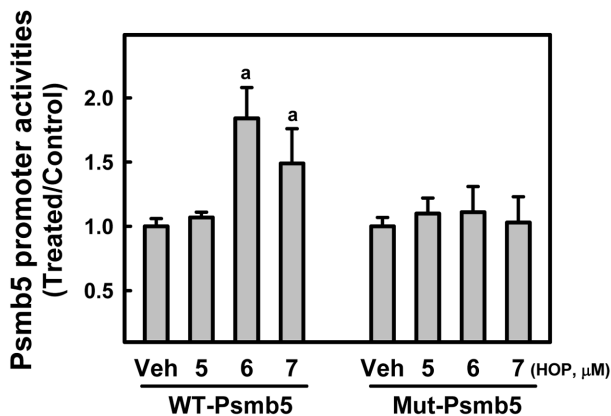


Fig. 5 – Activation of the Psmb5 promoter by XH through the ARE. TCMK-1 cells were transfected with luciferase reporter plasmids containing the wild-type (WT) Psmb5 promoter or ARE-mutated Psmb5 promoter. Then, cells were incubated with Hop6 or Hop7 for 24 h and luciferase activity was assessed. Values are mean±SD from 4 samples. <sup>a</sup>,  $P < 0.05$  compared with DMSO vehicle group.

러한 총 proteasome 기능에 대한 효과는 추후 연구를 통하여 밝혀져야 할 것이다.

#### Hop 화합물의 proteasome subunit Psmb5의 유도발현은 ARE를 통해 이루어짐

다음으로는 proteasome의 core catalytic subunit인 Psmb5의 발현증가 현상이 전사과정을 통한 것인지 확인하고 ARE의 기여도를 확인하기 위하여 마우스의 Psmb5 프로모터를 포함하는 luciferase 리포터 플라스미드를 이용하여 실험을 진행하였다. 기존 연구를 통하여 마우스의 Psmb5 프로모터 상에 존재하는 ARE가 Nrf2에 의한 유도발현을 매개함이 밝혀진 바 있다 [19, 28]. 이 리포터 플라스미드를 TCMK-1 세포에 도입하고 hop 화합물에 의한 활성 변화를 관찰한 결과, Hop6 및 Hop7은 프로모터 활성을 각각 1.8 및 1.5배 증가시켰다(Fig. 5). 반면 앞서 ARE 활성화 작용이 없었던 결과와 일관되게 Hop5 화합물의 처치는 Psmb5 프로모터 활성을 증가시키지 못했다. 이러한 프로모터 활성화 작용이 Nrf2-ARE 경로를 경유하는지 확인하기 위한 방법으로 ARE를 point mutation 방법으로 제거한 mutant Psmb5 프로모터를 이용하여 같은 실험을 진행하였다. 그 결과 ARE가 제거된 Psmb5 프로모터는 XH 화합물에 대한 반응성을 소실하였다. 이러한 결과는 Hop 화합물이 Nrf2-ARE 경로를 통하여 proteasome 구성 catalytic subunit Psmb5의 발현을 증가시킬 가능성을 확인하고 있다.

#### 결 론

비정상적인 단백질의 세포 내 축적과 이로 인한 세포기능의

저해 및 질환 발생 가능성이 최근 관심을 끌고 있다. 특히 세포 내 산화적 환경은 단백질 잔기를 산화시키고 3차 구조를 변형시켜 세포 내의 단백질 응집체를 축적시킨다. 이러한 현상은 산화적 스트레스 유발 세포사 및 질환 발생의 원인 중 하나로 간주된다. 그러므로 비정상적인 단백질을 제거하는 기능을 주되게 담당하는 proteasome계의 유지는 질환발생을 조절을 위해 매우 중요하다. 본 연구는 외인적으로 투여될 수 있는 proteasome 기능의 조절물질들이 산화적 스트레스성 각종 질환의 발생 또는 악화를 막을 수 있을 것을 것이라는 가설 하에 효과적인 proteasome 발현의 증가제를 검색하기 위하여 시도되었다. 특히 기존 연구 결과에서 밝혀진 Nrf2 경로의 활성화제가 proteasome 발현을 증가시킬 수 있음에 근거하여 천연물 특히 긍정적인 생리활성이 보고된 물질 중 하나인 hop 유래 XH 물질들이 proteasome 발현에 미치는 작용을 살펴보았다. 그 결과 XH 물질들은 Nrf2 활성화 작용을 통해 proteasome 구성 단백질 특히 catalytic subunit인 Psmb5의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 이러한 결과는 맥주에 함유된 hop 유래 물질들이 proteasome 기능이 저하될 수 있는 다양한 질환 특히 노화, 산화적 스트레스 관련 질환, 퇴행성 뇌질환 등에서 proteasome 발현을 증가시키고 결과적으로 그 기능을 유지하도록 하는 긍정적 기능에 대한 가능성을 제시하고 있다.

#### 감사의 말씀

이 논문은 2006년도 정부의 재원으로 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-005-J01102).

#### 참고문헌

- 1) Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. : An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313 (1997).
- 2) Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M. and Kensler, T. W. : Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J. Biol. Chem.* **278**, 8135 (2003).
- 3) Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M. and Biswal, S. : Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* **62**, 5196 (2002).
- 4) Kensler, T. W., Wakabayashi, N. and Biswal, S. : Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-

- ARE Pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 89 (2007).
- 5) Kwak, M. K., Wakabayashi, N. and Kensler, T. W. : Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat. Res.* **555**, 133 (2004).
- 6) Glickman, M. H. and Ciechanover, A. : The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**, 373 (2002).
- 7) Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. : The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 1015 (1999).
- 8) Shastry, B. S. : Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochem. Int.* **43**, 1 (2003).
- 9) Stefani, M. and Dobson, C. M. : Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* **27**, 27 (2003).
- 10) Halliwell, B. : Hypothesis: proteasomal dysfunction: a primary event in neurodegeneration that leads to oxidative stress and subsequent cell death. *Ann. N Y Acad. Sci.* **962**, 182 (2002).
- 11) Hyun, D. H., Lee, M., Halliwell, B. and Jenner, P. : Proteasomal inhibition causes the formation of protein aggregates containing a wide range of proteins, including nitrated proteins. *J. Neurochem.* **86**, 363 (2003).
- 12) Keller, J. N., Dimayuga, E., Chen, Q., Thorpe, J., Gee, J. and Ding, Q. : Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **36**, 2376 (2004).
- 13) Poppek, D. and Grune, T. : Proteasomal defense of oxidative protein modifications. *Antioxid. Redox. Signal.* **8**, 173 (2006).
- 14) Gerhauser, C. A. A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H. R., Frank, N., Bartsch, H. and Becker, H. : Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 959 (2002).
- 15) Piersen, C. : Phytoestrogens in botanical dietary supplements: implications for cancer. *Integr. Cancer Ther.* **2**, 120 (2003).
- 16) Dietz, B. M., K. Y., Liu, G., Eggler, A. L., Yao, P., Chadwick, L. R., Pauli, G. F., Farnsworth, N. R., Mesecar, A. D., van Breemen, R. B. and Bolton, J. L. : Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* Inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 1296 (2005).
- 17) Lee, Y. R., Li, X., Lee, S. W., Yong, C. S., Hong, M. R. and Lyoo, W. S. : ChemInform abstract: Concise total synthesis of biologically interesting prenylated chalcone natural products: 4-O-methylxanthohumol (VIII), xanthohumol E (XII), and sericone (XIII). *Bull. Korean Chem. Soc.* **29**, 1205 (2008).
- 18) Lee, Y. R. and Xia, L. : ChemInform abstract: Concise total synthesis of biologically interesting pyranochalcone natural products: citrunobin (Ia), boesenbergin A (Ib), boesenbergin B (IIa), xanthohumol C (IIb), and glabrachromene (IIc). *Synthesis* 3240 (2007).
- 19) Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J. L., Yamamoto, M. and Kensler, T. W. : Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8786 (2003).
- 20) Dinkova-Kostova, A. T., Massiah, M. A., Bozak, R. E., Hicks, R. J. and Talalay, P. : Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3404 (2001).
- 21) Dinkova-Kostova, A. T. and Talalay, P. : Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 231 (2000).
- 22) Nioi, P. and Hayes, J. D. : Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutat. Res.* **555**, 149 (2004).
- 23) Prochaska, H. J. and Talalay, P. : Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.* **48**, 4776 (1988).
- 24) Davies, K. J. : Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie.* **83**, 301 (2001).
- 25) Gomes-Marcondes, M. C. and Tisdale, M. J. : Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett.* **180**, 69 (2002).
- 26) Merker, K., Sitte, N. and Grune, T. : Hydrogen peroxide-mediated protein oxidation in young and old human MRC-5 fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **375**, 50 (2000).
- 27) Kwak, M. K., Cho, J. M., Huang, B., Shin, S. and Kensler, T. W. : Role of increased expression of the proteasome in the protective effects of sulforaphane against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in murine neuroblastoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 809 (2007).
- 28) Kwak, M. K. and Kensler, T. W. : Induction of 26S proteasome subunit PSMB5 by the bifunctional inducer 3-methylcholanthrene through the Nrf2-ARE, but not the AhR/Arnt-XRE, pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1350 (2006).