

동 · 물 · 학 · 논 · 단

Proteolysis, for What?



정진하

1969~1973 서울대학교 동물학과 (이학사)
 1975~1979 미국 알라바마대학교 생물학과 (이학석사, 이학박사)
 1979~1983 미국 하버드의과대학 생리학과 (연구원)
 1983~현재 서울대학교 분자생물학과 (조교수, 부교수, 교수)

Proteolysis, 단백질 분해에 관한 연구는 약 30여년 전만 해도 주로 pancreas에서 분비되는 소화효소인 trypsin, chymotrypsin, elastase 등에 대한 것이 주를 이루었다. 즉, 단백질 분해는 peptide bond를 자르는 단순한 반응으로 인식되어, 복잡하고도 절묘하게 조절되는 단백질 합성 과정에 대한 연구에 비해 그다지 많은 관심을 불러일으키지 못했다. 그러나, 1960년대 초에 이르러, Pine과 Mandalstam 박사 등이 세포 내에서 일어나는 단백질 분해 과정에 에너지가 필요하다는 보고와 1970년대 말에 Hershiko 박사 등이 단백질 분해 과정에 ubiquitin이 필요하다는 보고와 함께 proteolysis에 관하여 새로운 관심을 불러일으키기 시작을 하였다. 다시 말해, peptide bond의 절단은 발열반응임에도 불구하고 ATP를 필요로 하며, 또한 동 반응이 소화 과정에서처럼 항상 무절제하게 일어나는 것이 아니라, ubiquitination이라는 과정을 통하여 특이하게 조절된다는 것이 밝혀진 셈이다. 이러한 보고에 뒤이어, bacteria에서는 ATP-dependent protease들이 발견되었고 진핵세포에서는 26S proteasome이라고 하는 ubiquitin/ATP-depen-

dent protease가 발견되었다. 이들 중에서 대장균의 세포질에 존재하는 ATP-dependent protease들로는 protease La, protease Ti 및 Hsl protease가 있는데 이들은 모두 본인의 실험실에서 처음으로 발견된 것들이다. 그러나, 이 글은 동물학회를 위한 것이니, 대장균의 효소들에 관한 얘기는 꺼내지 않고, 진핵세포에 존재하는 ubiquitin-mediated proteolytic pathway에 관해서만 얘기를 진행토록 한다.

26S proteasome은 그 이름이 나타내는 바와 같이 하나의 polypeptide로 구성된 것이 아니라 적어도 25개의 polypeptide로 구성된 거대 단백질 분해 효소이다. 즉, 2개의 multimeric component로 구성이 되어 있는데, 그 중의 하나는 20S proteasome으로 불리며, 서로 다른 14개의 subunit가 2층의 heptamer ring으로 구성되어 있고 단백질 분해를 위한 catalytic core로서 기능을 한다. 또 다른 component는 19S regulatory complex라고 불리는데, 그 subunit의 수는 아직 확실히 밝혀지지 않았지만 적어도 10개 이상이며, ATPase의 활성을 나타내고, 또한 ubiquitination된 단백질 기질을 인식하는 역할을 한다.

이와 같이 복잡한 구조를 가지고 있는 26S proteasome에 대한 생리적 기능은 최근에 들어 많이 밝혀지고 있는데, 그 대표적인 예로는 세포의 물질 대사에 관여하는 효소들의 분해에 의한 metabolic rate 조절, T-cell의 세포질로 유입된 항원들의 분해에 의한 MHC-class I antigen presentation, cyclin 단백질 분해에 의한 cell-cycle의 조절, 전사조절 단백질의 분해에 의한 유전자 발현 조절, 특히 I κ B의 분해에 의한 여러 면역반응과 세포의 분화 조절 등을 들 수 있다. 한마디로 세포내의 단백질 분해작용은 세포의 생리적 기능 전반에 걸쳐 기여하는 바가 매우 크다고 하겠다. 이러한 26S proteasome에

의한 단백질 분해에 공통적인 특징은 분해되고자 하는 단백질이 분해에 앞서 ubiquitination 된다는 점이다.

Ubiquitin은 76개의 아미노산으로 구성된 매우 작은 단백질로서, 모든 진핵세포에 ubiquitous하게 존재한다(즉, 그 이름이 ubiquitous한 protein이라는 데서 유래된 것이다). 이러한 특징을 가진 ubiquitin은 여러 종의 E1, E2, E3라고 명명된 효소들의 작용에 의하여 분해되고자 하는 단백질에 covalent하게 결합되는데, 단백질 기질에 ubiquitin 분자가 하나만 결합되는 것이 아니라 여러 개가 결합된다. 즉, 이 E1, E2, E3라는 효소들은 26S proteasome의 protein substrate들을 ubiquitination시키는 "marking step"에 관여한다. 따라서, 세포 내에서의 ubiquitin의 농도(dynamic pool)는 단백질의 poly-ubiquitination 과정에 직접적인 영향을 줄 것이어서 그 또한 매우 섬세하게 조절되어야 할 것이다. Ubiquitin은 두 종류의 유전자로부터 유래되는데, 그 어느것도 monomeric ubiquitin을 생성하지 않는다. 이들 중, 하나는 ubiquitin 분자가 head-to-tail 형식으로 결합된 poly-ubiquitin을 생성하고, 다른 하나는 ubiquitin의 C-말단에 하나의 ribosomal 단백질이 결합된 ubiquitin-fusion protein의 형태로 만들어진다. 따라서, free form의 ubiquitin이 생성되기 위해서는 ubiquitin과 ubiquitin 사이 및 ubiquitin과 ribosomal protein 사이를 절단하는 단백질 분해효소가 필수적으로 존재해야 한다. 이러한 역할을 수행하는 단백질 분해효소가 ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH)이다.

그러나 이러한 UCH들에 대한 연구는 상당히 더디게 진행되어 왔는데, 그 주된 이유는 UCH의 활성을 측정하기가 매우 어려웠기 때문이었다. 따라서, 본인의 실험실에서는 우선 쉽고 간단하게 UCH 활성을 측정할 수 있는 방법을 개발토록 하였다. 이 방법은, 현재 Johns Hopkins 의과대학에 박사후 연수원으로 가 있는 우승균 박사가 본인의 실험실에서 박사과정으로 연구하던 중에 개발한 것으로, 그 내용은 아래와 같다. Ubiquitin의 C-말단에 18개의 아미노산으로 구성된 "PEST"라는 peptide를 결합시키어

ubiquitin-PEST라는 fusion protein을 합성한 후, peptide 부분에 존재하는 tyrosine만을 선택적으로 방사능 표지를 시켰다. 따라서, UCH를 이 기질과 반응을 시키면 ubiquitin과 PEST 사이가 잘려 나갈 것이며, 여기에 acid를 처리하면 ubiquitin 단백질은 변성되어 침전을 할 것이고, peptide는 그 size가 작아 acid-soluble한 상태로 남아 있을 것임으로, 간단히 원심분리를 하여 얻은 상층액에 있는 방사능을 측정하면 그 값이 곧 UCH의 활성도를 나타내게 된다.

이와 같은 assay 방법을 사용하여, 우승균 박사는 이재일, 백성희 박사과정 학생과 함께, chick skeletal muscle에는 적어도 10종의 UCH가 존재함을 밝히어 UCH-1에서 -10으로 명명하였고, 이들 중 4개의 효소(UCH-1, -6, -8, -10)를 순수분리하였다. 더욱 흥미로웠던 것은 UCH-6라 명명된 효소는 배양 근원세포가 융합을 하는 시기에 그 활성이 급격히 증가한다는 점이며, 이러한 결과는 UCH-6의 발현이 근세포 분화와 밀접한 관련이 있음을 추측케 하였다. 이와 같은 UCH의 생리적 작용을 연구를 진행하기 위해서는, 먼저 UCH들의 유전자를 색출하는 일이 수행하는 것이었다. 따라서 본 실험실에서 백성희 학생은 UCH의 유전자 색출을 위한 방법을 고안하기 시작하였다.

이 방법에 대한 idea는 Varshavsky 박사 등에 의해 제창된 "N-end Rule" (즉, 세포 내에서 단백질들의 half-life가 N-말단의 아미노산이 결정한다는 rule)에서 유래된 것인데, 그들은 β -galactosidase의 N-말단에 methionine이 있을 경우에는 단백질 분해효소가 이를 잘 분해시키지 못하나, methionine을 arginine (R)으로 치환을 하였을 경우에는 단백질 분해효소에 의하여 잘 인식되어 매우 빠른 속도로 분해된다는 것을 밝힌 것이다. 따라서, 백성희 학생은 ubiquitin-R- β -galactosidase을 발현하는 대장균에 plasmid 형태의 chick muscle cDNA library를 형질전환시키어, 이들을 Xgal plate 상에서 배양을 하였다. 그러나 대장균 자체에는 UCH의 활성을 전혀 가지고 있지 않기 때문에, ubiquitin-R- β -galactosidase이 발현되면 Xgal 배지에서 blue color로 염색될 것이다. 그러나 UCH를 발현하

게 하는 plasmid가 함께 들어있는 경우에는 ubiquitin의 뒷부분이 잘리게 될 것이며, 유리된 R- β -galactosidase는 세포 내에서 half-life가 짧아 매우 빠르게 분해되어 없어지기 때문에 white color로 나타날 것이다. 즉, color의 selection으로 UCH cDNA를 포함한 colony를 얻을 수 있게 된 것이다. 이와 같은 방법을 사용하여, 백성희 학생은 최금숙 석사과정 학생과 함께, 동 library로부터 5개의 UCH cDNA clone을 얻는데 성공하였으며, 박경찬, 이재일 박사과정 학생은 민상원 석사과정 학생과 함께 rat liver와 rat muscle cDNA library로부터 4개의 UCH clone을 얻게 되었다.

현재까지 알려진 UCH 유전자들로는, 초파리의 눈 발생에 관여하는 *fat facets* 유전자, IL-3에 의해 induce되고 성장 억제에 관여하는 murine pro-B 세포의 *DUB-1*, 효모의 α -인자 분해과정에 관여하는 *DOA4*, 이와 아미노산 서열이 비슷한 인간의 *tre-2* oncogene, 그리고 신경 세포에 특이적인 *PGP9.5* 유전자로서, 여러 발

생 유전학적 측면에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다. 그러나 본 실험실에서 분리한 UCH의 cDNA의 염기서열을 결정한 바, 기존의 어느 것보다도 다르고 또한 서로가 모두 특이한 것으로 나타났다. 따라서 앞으로는 이들 UCH의 생리적인 기능을 밝히는 데 연구를 진행코자 한다.

기초학문의 목적은 연구 그 자체에 있다. 연구의 목적이 한 효소의 분자적 작용 기작으로부터 시작하여, 세포내에서, 조직에서, 그리고 하나의 organism에서 어떠한 생리적 작용을 하는가를 알고자 하는 것에 있다. 더도 아니고 덜도 아니다. 그러나 가끔 이런 질문을 받는다. “무슨 목적으로 단백질 분해효소에 대해 연구를 계속하오? 특히 bacteria에 있는 효소는 말이요. 요사이엔 산업적 또는 응용의 가치가 없는 연구는 돈 많은 나라에서나 하는 게지. 논문이 무슨 소용이 있오?”. 별 수 없이 속으로 이렇게 대답한다. “나에겐 proteolysis가 가장 재미있는 데……”.