

특집: 생리활성물질의 최근 연구동향(III)

신호전달관련 효소의 저해물질 탐색

안 종 석
생명공학연구소

세포반응은 세포 외로부터 여러 가지 특이한 자극인자(cell stimulants)들과 이들로 부터 시작되는 신호가 세포 내에서 일련의 반응을(signal transduction) 거쳐서 일어나게 된다. 이러한 세포 내 신호전달반응의 과정은 세포의 외부로부터 세포반응을 유도시키는 여러 가지 자극인자들이 각기 다양하고 독특한 세포들의 세포막에 존재하는 자극인자 수용체(receptor)에 결합하여 이 수용체들을 활성화시켜 여기서부터 세포 내로의 신호전달이 시작된다[1]. 이렇게 시작되는 세포 내 신호전달과정에 의해 세포의 성장, 분비, 수축, 흥분, 대사 등의 생리적인 현상이 촉진 혹은 억제되어 생체의 정상기능을 유지하게 되는 것이다. 이와 같은 신호전달체계의 이상은 암, 고혈압, 당뇨병, 정신 신경계 질환 및 면역이상질환이나 염증 등의 난치성 질병을 유발하게 되는 것으로 알려지고 있다. 이와 같은 질병에 대해 새로운 기작을 갖는 치료제의 개발을 위한 관점에 의해서 신호전달과정을 조절하는 물질의 탐색연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 세포 내 신호전달과정을 목표로 하는 저해물질의 탐색은 목표기작으로 선정하는 대상으로서의 신호전달과정이 대단히 복잡하고, 또한 새로운 신호전달기작의 발견이 계속해서 보고되고 있어 급속히 발전하고 있다. 그러므로 세포 내 신호전달과정을 목표로 하는 저해물질의 탐색에 대한 전체의 연구경향을 언급하기에는 저자의 식견으로 무리라고 생각된다. 따라서, 본 문에서는 그간 저자들이 주로 연구의 대상으로 삼아왔던 세포 내 신호전달에 관여하는 일부의 효소들인 protein kinase C(PKC), protein tyrosine kinase(PTK) 그리고 phosphatidylinositol-specific phospholipase C(PLC)에 국한하여 미생물 혹은 천연물 유래의 저해물질에 대한 탐색연구의 최근 연구동향들을 살펴보고자 한다.

세포 내 신호전달과정과 저해물질 탐색의 중요성

세포 내 신호전달과정은 대단히 복잡하고 정교하게 조절되고 있으며 이에 대한 구체적인 설명은 너무 방대하고 본 특집의 성격과는 거리가 있으며 저자도 이 분야의 적합한 전문가가 아니라고 생각된다. 따라서 본 란에서는 저자의 연구실에서 지난 몇 년간의 생리활성물질 탐색연구의 목표기작으로 삼

고있는 PLC 매개 신호전달과정을 중심으로 하여 가능한 간단히 설명하고자 한다.

세포 내 신호전달과정은 PLC가 관여하는 몇 가지의 공통되는 과정을 거치는데 이러한 과정들을 요약하면 다음과 같다. G protein과 PLC β 매개 신호전달 경로는 peptide성 hormone 류의 세포분열 자극인자인 bombesin, thrombin, angiotensin 등이 각각의 특이적인 세포막 수용체에 결합하면 이들 수용체에 화답하는 다양한 종류의 G protein(Guanin nucleotide binding protein)을 결합, 활성화시키고[3] 이에 따라 이들은 다시 선택적으로 PLC 중의 한 종류만을 활성화시켜 phosphatidylinositol 2,3-biphosphate(PIP₂)를 분해하여 inositol triphosphate(IP₃)와 diacylglycerol (DAG)를 생성시켜 이들이 2차 신호전달물질로 작용하여 PKC의 활성화와 세포질내의 Ca²⁺이온농도를 조절하는 신호전달과정을 거친다[4]. 한편 growth factor receptor, tyrosine kinase와 PLC γ 매개신호전달과정은 세포성장인자(growth factor)인 EGF, PDGF등은 세포막의 이들 수용체(growth factor receptor)와 결합하여 인산화되어 활성화됨으로써 이들과 결합하는 SH2 부위(Src homology domain 2)를 갖는 신호전달관련 효소 및 단백질들인 PLC γ , PI-3kinase, Grb2(growth factor binding protein 2) 등의 활성화로[5, 6] 이어져 IP₃와 DAG의 생성과 Ca²⁺증가 및 여러 가지 PTK와 protein tyrosine phosphatase(PTP)들의 순차적 활성화와 PKC 및 phosphatidylcholine-specific phospholipase D(PLD) 활성화로 또 다른 2차 신호전달물질인 arachidonic acid와 DAG를 생성하는 경로를 거친다[7]. 또한 Ras, Grb2와 SOS 등의 adaptor protein 매개 신호전달경로는[8] 이들에 의해서 Ras, Raf-1, MEK 등의 연쇄적인 활성화와 MAP kinase(mitogen activating protein kinase)들의 일련의 cascade과정을 거친다[9]. 이러한 신호전달과정은 핵 내의 유전자의 발현과 이에 따른 세포분열 순환과정을 거쳐 세포가 분열하게 되는 것이나 새로운 조절반응 단백질의 합성으로 귀결된다.

이러한 관점에서 볼 때 암세포는 정상세포와는 달리 계속적으로 세포분열이 일어나는 특징이 있으므로 세포분열에 관여하는 신호전달과정을 차단하면 암세포의 증식을 억제할 가능성이 있음이 입증되고 있다. 따라서, 항암제개발을 위한 목표로 세포분열 및 증식에 관련된 신호전달과정의 주요한 매개조

소인 PTK, PTP, PLC, PKC, PLD, cell division cycle dependent protein kinase[1]들과 growth factor receptor 및 receptor tyrosine kinase의 기능이나 이들과 결합하는 신호전달 매개역할을 하는 결합단백질들의 결합저해물질 그리고 Ras protein farnensyl transferse의 기능을 선택적으로 저해하는 물질들을 개발하고자 하는 노력이 최근에 시도되고 있다[1, 12, 13].

한편, 심장순환계질환 중 혈관세포나 혈소판 응고에 따른 혈액응고에 의한 고혈압, 동맥경화증, 염증 등의 치료제개발에 이들 세포의 신호전달과정을 차단하는 물질을 개발하고자 하는 연구가 최근에 활발히 진행되기 시작하였다[35]. 이러한 관점중의 하나로서 심장순환계질환으로 고혈압이 유발되는 병리현상 중 과다한 혈관수축에 의해 야기되는 경우의 고혈압질환에서 endothelin의 작용이 중요함이 알려져 왔다[36]. 그리고 최근에 이 endothelin의 혈관수축작용에서 혈관세포의 phosphatidyl inositol 대사에 관여하는 PLC와 protein kinase C의 활성화를 통한 정보전달과정이 필수적으로 관여함이 입증되고 있으면서 PKC의 저해제가 endothelin에 의해 유도되는 혈관수축을 억제할 수 있음이 밝혀졌다[37, 38]. 따라서 PKC 및 PLC를 매개로 하는 혈관세포의 정보전달과정을 억제하면 endothelin에 의해 유도되는 혈관수축을 조절할 수 있으므로 혈압상승을 억제

하는 새로운 혈압강하제나 고혈압치료제 개발을 위한 중요한 약리기작 목표가 되고 있다[39, 40]. 그리고 혈소판응괴(platelet aggregation)나 혈전(platelet thrombi)의 형성을 초래하여 혈관수축, 염증, 동맥경화성혈관질환 등을 유발하는 병리기작의 한 과정으로서 thrombin, collagen, platelet-activating factor, thromboxane 같은 agonist에 의해 혈소판의 활성화에 PLC에 의한 phosphatidyl inositol phosphate(PIP)의 가수분해[41, 42]와 이에 따른 PKC의 활성화가 중요한 신호전달과정으로 작용하고 있음이 규명되고 있다[43, 44]. 이에 따라 혈소판응집억제제를 이용한 이러한 질환 치료제의 개발에서 새로운 목표기작으로 PKC저해와 phosphatidylinositol 대사저해가 부각되고 있으며 실제 기존의 PKC저해물질이 이러한 효과가 있음이 입증되면서 새로운 기작의 치료제 개발 가능성이 높아지고 있다[45]. 또한, 면역이상질환을 근본적으로 면역활성세포의 기능이상에 의한 것이므로 면역활성세포의 복잡한 세포간 활성조절도 궁극적으로는 면역세포내의 신호전달과정을 거치는 것으로 밝혀지고 있다[46]. 이에 따라 면역세포의 특이적 신호전달과정을 조절할 수 있는 물질의 개발이 현재 진행되고 있으므로 수년 이내에 현재의 미생물유래중 면역억제제 및 면역조절제인 cyclosporine A, FK-506, rafamycin 등과 같은 획기적인 새로운 미생물유래의 면역조절제의 개발가능성이 강력히 대두되고 있다.

Protein Kinase C 저해물질

Protein kinase C(PKC)는 1977년 Nishizuka 그룹에 의해 처음 발견되었는데, 그 구조나 조효소 의존성(cofactor requirement), 혹은 기질 특이성(substrate specificity)에 의해 약 10가지로 구분된다. cPKC (classical PKC)에는 PKC- α , - β 1, - β 2, 그리고 - γ 가 있는데 이들은 Ca^{2+} -의존성 활성을 보인다. nPKC

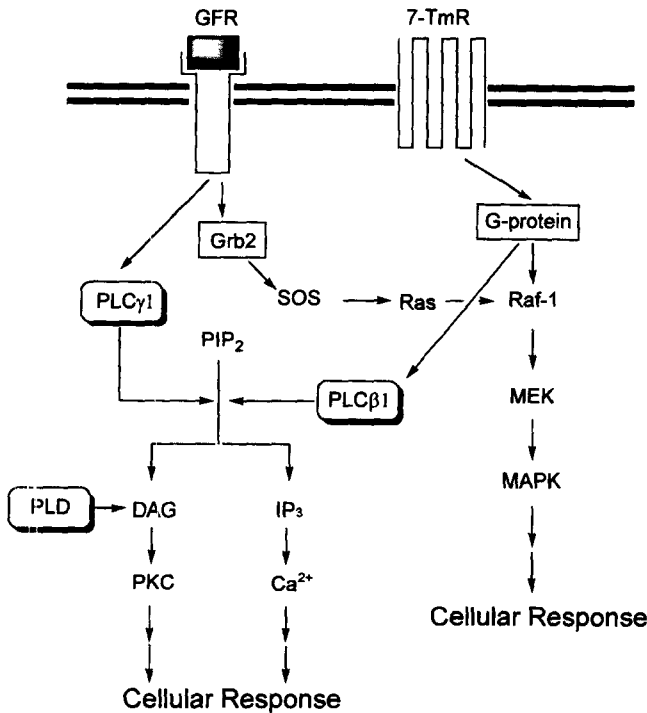


그림 1. 세포 내 신호전달과정의 모식도. TCR; T-cell receptor, GFR; growth factor receptor, 7-TmR; seven transmembrane receptor, Grb; growth factor receptor binding protein, PLC; phospholipase C, PLD; phospholipase D, G-protein; GTP-binding protein, PKC; protein kinase C, MAPK; mitogen activated protein kinase, IP3; inositol triphosphate, DAG; diacylglycerol.

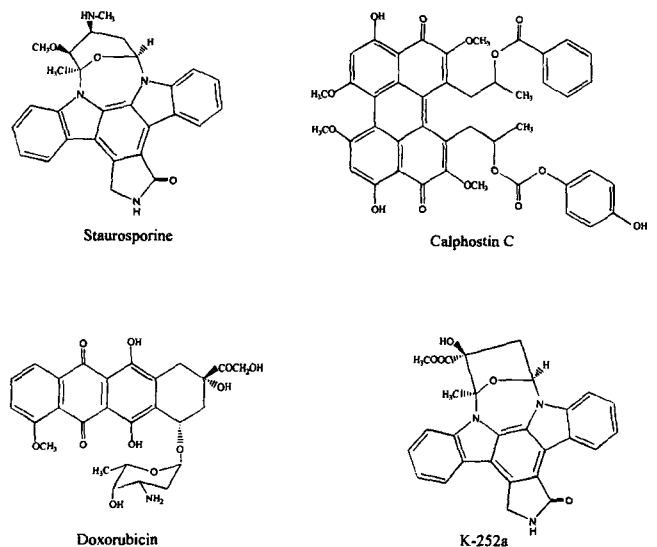


그림 2. 미생물 유래 protein kinase C 저해물질.

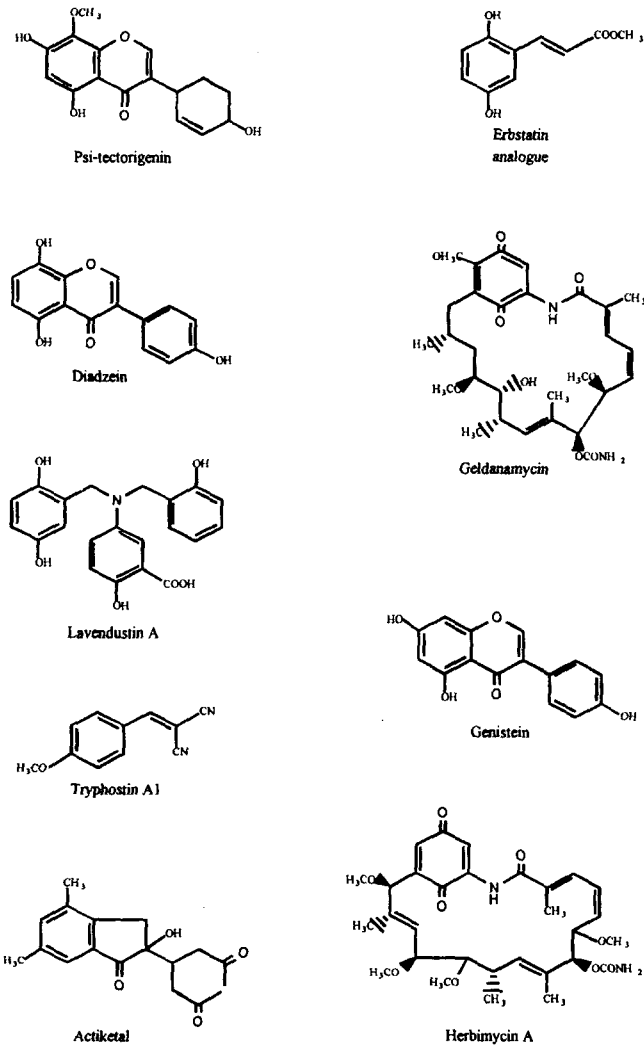


그림 3. 미생물 유래 protein tyrosine kinase 저해물질.

(novel PKC)에는 PKC- δ , - ϵ , - η , 그리고 - θ 가 포함되는데 Ca^{2+} -비의존성 효소들이다. 다른 한가지 그룹은 aPKC(atypical PKC)로서 PKC- ζ 와 - λ 가 여기에 해당되며 diacylglycerol (DAG) 또는 phorbol esters를 처리하여도 활성화되지 않는다. Ca^{2+} 과 phospholipid 의존성인 PKC는 DAG에 의해 활성화 된다. DAG는 PLC에 의해 PIP_2 가 분해되어 생성될 뿐만 아니라, phospholipase D(PLD)에 의해 phosphatidylcholine(PC)로부터 만들어져 PKC를 활성화 시킨다. PLC에 의한 DAG는 세포 활성화의 초기(수초내)에 생성이 되고, PC로부터의 DAG는 그 후 지속적으로 그 양이 증가하게 된다.

PKC는 심장순환계의 고혈압 질환이나 면역체계의 이상, 그리고 많은 경우의 암세포 등에서 그 양적 혹은 활성면에서의 증가를 볼 수 있다. 그리고 세포 내 신호전달과정에서 이들의 역할이 해명되면서 이들을 조절할 수 있는 물질은 기존의 약리작용기작과는 다른 새로운 기작을 갖는 의약품으로 개발될 수 있는 가능성이 대두되어 PKC조절물질의 탐색 및 개발이

생물산업

연구되기 시작하였다[11]. 미국, 일본의 제약회사 연구진들이 처음으로 1985년에 PKC 저해물질의 개발에 착수하고 미국의 경우는 합성화학물과 기존의 항암제 약물등에 대한 PKC저해 활성을 조사하였고, 일본의 경우는 전통적인 미생물로 부터의 탐색기술의 발달로 인하여 미생물의 대사산물로 부터 탐색하였다[13].

현재까지는 약용식물과 미생물의 대사산물을 대상으로 하여 탐색이 진행되기 시작하여 여러종류의 물질들이 알려지기 시작하였다. 그리고 이렇게 하여 탐색된 물질들은 신규물질들이 주이나 기존물질이라도 물론 항암제나 고혈압치료제로 개발하기 위하여 선진국의 제약회사에 개발연구를 진행하고 있다[14]. 한편, 신호전달과정의 중요매개체로서 PKC의 작용분자기구와 조절부위의 구조가 밝혀지면서 이들의 분자구조로부터 구조의 유사성에 의한 억제물질이나, 활성부위의 분자구조를 변형시킬 수 있는 물질을 화학적 합성이나 저분자의 peptide물질을 합성하여 개발하고자 하는 노력도 현재 활발히 추진중이다[32].

대표적인 PKC를 저해하는 물질로 Kyowa Hakko사 연구팀은 방선균 *Nocardia*로부터 K252라는 물질과 방선균 *Actinomyces*로부터는 staurosporine 이라는 물질을 탐색하였다. Staurosporine은 5 nM의 농도에서도 PKC를 완전히 저해하는데, 이외에도 PTK, PKA(Protein Kinase A)등 다른 여러 가지의 효소활성도 저해하는 것으로 알려져 있다. K252는 PKC에 대하여 IC_{50} 20-25 nM의 강력한 저해능을 보였으며 PKC에 직접 binding하는 것으로 추정되었다. 뿐만아니라, calmodulin에도 어느 정도 영향을 미치기 때문에 Ca^{2+} -의존성 신호전달에도 영향을 미치는 것으로 추정된다[31-33]. 또한 일본 이화학연구소의 항생물질 연구팀은 PKC의 inhibitor로서 sangivamycin[34], RK286-C[35] 등을 토양 방선균의 배양액으로부터 분리하였다. Sangivamycin은 PDBu에 의한 K562 세포표면의 소포형성과 *in vitro* PKC 활성에 대하여 각각 30 μ g/ml, 0.3 μ g/ml에서 저해활성을 보였으며 PKC에 의한 EGF 수용체(receptor)의 아미노산 Ser/Thr 부위 인산화도 농도비례적으로 저해됨이 보고되었다. Tamaoki 그룹에 의해 발견된 UCN-01, -02는 *Streptomyces* sp. N-126에서 분리되었는데[36] 이들은 PKC와 PKA에 대해 각각 4.1 nM, 42 nM 그리고 62 nM, 250 nM의 IC_{50} 값을 나타내었으며 4 nM, 20 nM에서 HeLa S3 세포독성을 보였다. 그러나 이들이 DNA에는 전혀 손상을 입히지 않는 것으로 보아 protein kinases를 저해하여 세포성장을 조절하는 것으로 보인다. 뿐만 아니라 A3[N-(2-aminoethyl)-5-chloronaphthalene-1-sulfonamide, HCl]은 PKC에 대해 47 μ M의 IC_{50} 를 나타내었으며[37], bisindolylmaleimide I-V은 각각 10 nM[38], 13 nM, 26 nM, 87 nM 그리고 100 μ M 이상[39]의 IC_{50} 를 보였다. Calphostin C는 PKC에 대해 IC_{50} 50 nM의 저해활성을 가지며 DAG와 phorbol ester의 PKC에 대한 bind-

표 1. Protein kinase C 저해물질 (미생물 유래)

저해물질	분리원
Staurosporine	<i>Streptomyces</i> sp.
K252 a, b, c, d	<i>Nocardiopsis</i> sp.
K259-2	
KS-619-1	
UCN-01, -02	
Calphostin (UCN-1028)	<i>Cladosporium</i>
TAN-999	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>
Sangivamycin	<i>Streptomyces</i> sp.
RK-206 C,D	<i>Streptomyces</i> sp.
RK-1049	<i>Streptomyces</i> sp.
Cardiotoxin	<i>Naja Nigricollis</i>

표 2. 미생물유래가 아닌 protein kinase C 저해제

Celcospolin, Polymyxin B, Tamoxifen, Degualinium, Doxorubicin, H-7, H-9, Aminoacridine, Sphingolipid, Suramine, Daidzein, Ganglioside, Phenothazines, W7 Pseudohypericin, Rottlerin, Ro 31-8220

ing site 저해를 보이는 것으로 밝혀졌다[40]. *Naja Nigricollis* 에서 분리된 cardiotoxin은 PKC에 대해 1.8 μM의 IC₅₀ 뿐만 아니라 PLA₂에 의해서 활성이 증가된다[41]. Chelerythrine chloride는 PKC의 phosphate acceptor와 competition을 하여 catalytic domain에 저해를 한다(IC₅₀, 660 nM)[37]. 그리고 Go 6976은 Ca²⁺- 의존성 PKC-α(IC₅₀, 2.3 nM), PKC-β1(IC₅₀, 6.2 nM)을 가지며 Ca²⁺-비의존성인 PKC-δ, -ε, -ζ에는 활성이 적어

수 μM의 농도에서 저해활성을 보인다[42]. H7, [1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine, HCl]의 경우 PKC에 대해 6 μM, 그리고 이밖에 MLCK(myosin light chain kinase), PKA, PKG(Protein Kinase G)에 대해 각각 97 μM, 3.0 μM, 5.8 μM의 IC₅₀값을 보이고 HL60 세포에서 apoptosis를 유도시킨다[40]. 또한 pseudohypericin은 28.7 μM의 농도에서 PKC 저해활성을 보이며 anti-retroviral agent로도 사용되고 있다[43]. Tamoxifen의 경우, human malignant glioma 세포의 apoptosis를 유도하고 PKC에 대해 10 μM의 IC₅₀를 가지며[44], sphingosine과 그 유도체는 IC₅₀ 2.8-12 μM에서 PKC 저해활성을 나타내고 apoptosis와 PLD에도 영향을 준다[45]. 이밖에 Rottlerin은 PKC에 대해 3-6 μM에서 저해활성을 보이고 -α, -β, -γ에 대하여도 어느 정도의 저해능을 가진다(IC₅₀, 30-42 μM) -ε, -ζ, -η에 대하여는 매우 약한 활성을 보인다(IC₅₀, 80-100 μM) [43]. Ro-31-8220은 PKC에 선택적으로 작용하며(IC₅₀, 10 nM) CaM kinase II, PKA에 대해서도 각각 17 μM, 900 nM의 IC₅₀값을 가진다[46, 47].

Protein Tyrosine Kinase 저해물질

모든 세포는 외부 자극에 의해 활성화 되면 세포막 수용체의 protein tyrosine kinase(PTK) 또는 세포내의 PTK에 의해 일련의 신호전달과정이 이루어 진다. 이러한 PTK에 의한 신호 전달 조절작용의 이상화는 암세포화의 원인이 되기도 한다. 이들 발암원인과 발암기작에 매우 밀접한 관계가 있는 발암유

표 3. Protein tyrosine kinase 저해물질

작용부위	저해물질	분리원	
Growth factor	EGF	Reveromycin A	
		Actiketal	
		Epiderstatin	
		Aspelicin	
		Heparin	
		Pentosan polysulfate	
		Trapoxin	
	PDGF		
	Growth factor receptor	EGF receptor kinase	Erbstatin
			Orobol
		Lavendustin	
		BE-23372M	
		Dicyanobenzylidene	
		Carboxybenzylidene	
		PD153035	
General tyrosine kinase		Genestein	
		Daizein	
src tyrosine kinase		Herbimycin A	
		<i>Streptomyces</i> sp.	
		<i>Streptomyces</i> sp.	
		<i>S. pulveraceus</i> sub. <i>epiderstagens</i>	
		<i>S. viridosporus</i>	
		<i>S. neyagawaensis</i> var. <i>orobol</i>	
		<i>Streptomyces</i> sp.	
		<i>R. solani</i>	
		<i>Pseudomonas stetzzi</i>	

전자(oncogene)가 존재함이 밝혀졌으며 현재까지 약 100여가지 이상의 발암유전자의 존재가 보고되었다. 이들 중 많은 발암유전자가 세포증식에 필요한 세포성장인자나 세포내 신호전달 매개체의 비정상적인 형태를 그 유전자의 산물로 생산한다는 것이 입증되고 있다. 즉, *erb B* 유전자가 상피세포 성장인자(EGF, epidermal cell growth factor)의 세포막 수용체의 변형된 형태를 생산한다는 것과, *sis* 유전자가 혈소판 유래 성장인자(PDGF, platelet-derived growth factor)와 유사한 단백질을 생산하며, *B lymph 1* 유전자와 *transferin*의 아미노산 서열이 유사하고, *fms* 유전자가 myeloid 세포의 성장인자인 콜로니형성 자극인자(CSF-1, colony stimulating factor-1)의 수용체와 일치하고 *neu* 유전자는 PDGF의 수용체와 유사함이 밝혀졌다. 그리고 *src* 유전자 그룹들은 protein tyrosine kinase의 활성을 갖고 있는 세포막의 수용체에 해당한다고 입증되고 있으며 *ras* 유전자 그룹들은 small G protein과 밀접한 관계가 있음이 밝혀졌다[5].

현재 tyrophostin 등이 PTK 저해제로서 탐색 또는 개발되었는데, 이러한 PTK 억제물질의 탐색에 의해 발표된 물질들을 미생물유래의 것들을 중심으로 정리하여 표 3에 표시하였다. 이들중 대표적인 것으로는 *src* gene을 갖는 rous sarcoma virus(RSV)의 temperature sensitive mutant virus를 rat kidney cell에 감염시켜 transformed cell(ts TH/VRK cell)을 만들어서 이 cell을 이용하여 *src* ts gene에 의한 transformation을 일으키는 것에 대한 inhibitor를 screening해서 방선균 *Streptomyces* sp MH 237-CF8 strain으로부터 benzoquinoid ansamycin계 물질인 herbimycin A를 얻었다. Herbimycin A는 *src* gene의 산물인 p60^{src}의 tyrosine kinase activity를 *in vitro*와 *in vivo*에서 inhibition함을 밝혔다[39]. Herbimycin A는 tyrosine kinase의 활성을 저해하지 않고 activity를 저해한다고 결론지었다. Umezawa group은 EGF receptor의 tyrosine kinase activity를 inhibition하는 물질을 screening하여 방선균으로부터 orobol과 erbstatin[40]을 찾아내었고 Suzuki 등은 *Pseudomonas*로부터 genistein[41]을 screening 하였으며, 또한 일본 이화학연구소의 항생물질 연구팀은 EGF의 inhibitor로서 epiderstatin을 발견하였다[42]. 그리고 최근에는 미국의 Waner-Lambert사에서 EGFR만을 특이적으로 저해하는 PD15305를 발표하였다[43].

Phospholipase C의 저해물질

PLC는 세포내 미량 인지질인 phosphatidylinositol 2,3-bisphosphate(PIP₂)를 분해하여 inositol triphosphate(IP₃)와 diacylglycerol(DAG)를 생성시켜 이들이 2차 신호전달물질로 작용하여 protein kinase C(PKC)의 활성화와 세포질내의 Ca²⁺ 이온농도를 조절하는 효소이다. PLC는 조직이나 세포의 종류에 따라 세 종류의 isozyme인 PLCβ(β-1, 2, 3, 4), PLCγ(γ-1, 2), PLCδ가 존재하며 이들은 각각 특이한 자극인자에 의해서 활성화 되어 세포의 반응과 성장에 필요한 신호전달과정을 거치게 한다. Growth factor인 PDGF, EGF, TGF 등은 PLCγ를 통한 선택적 신호전달과정을 거치고 bombesin, angiotensin, thrombin 등의 peptide성 hormone류의 세포성장인자들은 G protein과 PLCβ에 의한 신호전달과정을 거친다[4]. 그리고 PLCδ는 뇌의 신경전달과 기억작용의 신호전달과 혈압조절기구의 신호전달작용에 관여함이 고혈압취의 대동맥의 PLCδ의 이상화와 노인성치매 환자의 뇌에서 PLCδ의 이상화가 보고됨에 따라 설명되고있다[44].

PLCβ 혹은 PLCγ를 세포내로 주입하면 DNA합성이 증가되고 정상세포가 암세포화(transformation)하는 결과와, PLCγ의 단세포 항체가 *ras* 활성화에 의해 유도되는 DNA의 합성을 억제한다는 사실, 그리고 PDGF에 의해 활성화 되지않는 PDGF 변형 mutant세포에 PLCγ를 도입하면 PDGF에 의한 DNA의 합성이 다시 유도된다는 등의 연구결과에서 암세포의 증식에 PLC매개의 신호전달이 필수적으로 관여함이 밝혀졌다[45]. 또한 Her2/neu oncogene은 PLCγ를 인산화시켜 활성화된 상태로 유지시키고 활성화 mutant Gαq는 PLCβ를 항상 활성화된 상태로 만들어 세포를 암세포화 한다는 사실도 보고되고 있다[45]. 한편 인간의 유방암조직의 세포와 non small lung cancer는 정상세포에 비해 PLCγ이 과발현됨과 glial tomour에서 EGF 수용체와 PLCγ의 일체분리 등의 결과[46]는 PLC 및 PLC 매개신호전달과정이 항암제개발의 새로운 목표기작으로서 중요함을 제시하고있다[11]. 표 4에서는 미생물 유래의 PLC 저해물질을 정리하였고 표 5에서는 미생물유래가 아닌 PLC 저해물질을 나타내었다(그림 4).

현재까지 미생물의 대사산물로부터 PLC 저해물질을 탐색한 보고는 매우적으나 *Penicillium* 곰팡이로부터 PLC 저해활성이 미약한 물질로 vinaxanthone과 *Actinomadura*로부터 기지물질인 Q12713이 일본의 제약회사 연구진에 의해 보고된 정도이다[47, 51]. Keio 대학의 Umezawa 등은 A431 cell의

현재까지 미생물의 대사산물로부터 PLC 저해물질을 탐색한 보고는 매우적으나 *Penicillium* 곰팡이로부터 PLC 저해활성이 미약한 물질로 vinaxanthone과 *Actinomadura*로부터 기지물질인 Q12713이 일본의 제약회사 연구진에 의해 보고된 정도이다[47, 51]. Keio 대학의 Umezawa 등은 A431 cell의

표 4. 미생물 유래 phospholipase C 저해물질

저해물질	분리원
Vinaxanthone	<i>Penicillium vinaceum</i>
Caloporoside	<i>Caloporus dichrous</i>
Hispidospermidine	<i>Chaetosphaeronema hispidulum</i>
Fluvirucin B2	<i>Streptomyces</i> sp.
CRM-51005	Fungal isolate MT51005

표 5. 미생물 유래가 아닌 phospholipase C 저해물질

Wortmanin, Q12713, ET-18-OCH3, U73122
SRI 62834, Ilmofosine, Myroridink, Streptothricin B, Edeine, Rhodomycin A, Hexadecylphosphocholine, D609, Manoalide, Spermine

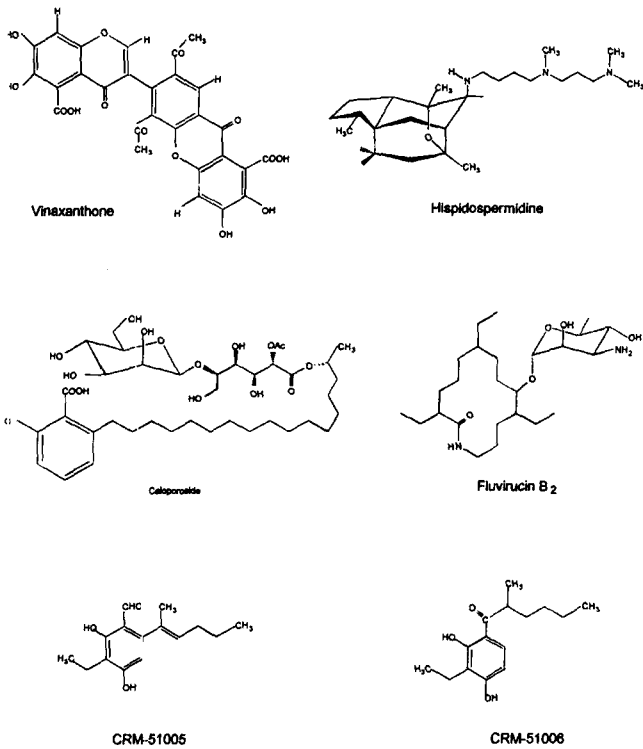


그림 4. 미생물 유래 phospholipase C 저해물질.

membrane fraction을 부분 분리하여 PI turn-over 및 PI kinase 효소원으로 하여 PI turn-over 저해물질과 PI kinase 저해물질로 *Streptomyces*로부터 peldomycin, inositamycin, toyokamycin[48], echiguanine[49] 및 benzoic acid[50]들을 분리하였다.

그리고 미국의 Mayo clinic 연구소의 Powis 연구그룹과 오스트리아의 Innsbruck대학의 연구팀들에 의해서 유기합성 ether lipid analogue인 ET-18-OCH₃와 phospholipid analogue인 hexadecylphosphocholine이 PLC를 강력히 저해한다고 보고하였다(표 4). ET-18-OCH₃는 강력한 항암 능력을 가지며 PI-PLC(IC₅₀, 15 μM), PKC에도 저해활성을 보이나 PC-PLC, PLD에는 영향을 주지 않는다[51, 52]. D609(tricyclodecan-9-yl-xantogenate)은 PC-PLC만을 저해(IC₅₀, 5-10 μM)하고 PI-PLC, PLA, PLD는 저해하지 않는다[53]. *Luffariella variabilis*에서 분리된 manoalide는 PLC(IC₅₀, 1.5 μM) 뿐만아니라 PLA₂(IC₅₀, 0.02-2 μM)에도 영향을 주며 PMN(polymorphonuclear leucocyte) 세포에서 SOD(superoxide dismutase) 생성을 저해한다[54]. 그밖에 spermine은 PLCα, -δ를 저해하고 apoptosis와 neuronal NOS(nNOS)에 대해 활성을 보이는 것으로 알려져 있다[56]. U73122는 platelets과 neutrophils에도 PLC 활성화를 저해(IC₅₀, 1-2.1 μM)하고 그밖의 여러 세포에서도 활성을 보인다[56]. 그리고 국내에서는 본 연구진이 토양곰팡이 분리주로부터 CRM_51005와 scopafungine 그리고 식물에서 몇가지의 isoflavonoid 화합물들을 분리하였다[57, 58].

그러나 이상에서 살펴보았듯이 PLC는 세포내 신호전달과

정에서 중요한 역할을 담당하고 있으나 이의 저해물질 개발에는 괄목할 결과가 아직까지 보고되고 있지 않다. 그 이유로는 PLC는 세포 내에 극히 미량으로 존재하며 많은 종류의 isozyme과 subfamily가 존재하여 이들의 신호전달작용에 대한 규명이 어려웠기 때문이었다. 그러나 최근의 활발한 PLC의 신호전달 작용에 대한 연구에 의해서 다시 이들의 작용과 PLC에 의해 매개되는 신호전달역할이 명확해짐에 따라서, PLC에 의해 매개되는 신호전달과정이 생리활성물질 개발의 target으로서 중요성이 제시되고 있다.

결론

세포 내 신호전달과정에 관계하는 효소들에 대한 저해물질 개발을 위한 연구는 1980년대 중반부터 미국과 일본을 중심으로 이루어지면서 현재까지 PKC와 PTK의 경우는 매우 다양한 물질들이 탐색되고 이들 물질을 기초로하여 isozyme 특이적인 저해물질이 합성에 의해 급속히 개발되고 있다. 특히 PKC 저해물질의 경우에는 항암제로의 개발가능성이 가장 빨리 대두되어서 이중 calphostin 등 몇가지 물질들은 암전이억제제 및 항암제 내성 암치료제로의 제품개발을 위한 임상실험이 진행되고 있으므로 수년내에 신규 항암제가 개발되리라고 추정된다. 암화에도 많은 연관성이 있어 이들 효소들에 특이적인 저해제 개발은 항암제의 개발이라는 목적 외에 세포 내 신호전달기작의 해석을 위해서도 필요하다. 그러나 아직까지도 PKC, PTK 외에는 신호전달매개 효소나 단백질들의 기능을 선택적으로 저해할 수 있는 물질들이 대두되지 않고 있다. 따라서 이에 대한 연구개발은 세계적으로 계속해서 진행되고 있으며, 새로운 관련 신호전달매개체의 발견을 위한 연구와 밝혀진 새로운 목표기작을 대상으로 하는 저해물질의 탐색이 계속해서 진행되고 있다.

참고문헌

- Pazin, J. M., T. L. Williams. 1992. Triggering signalling cascade by receptor tyrosin kinase. *Trends in Biochemical Science (TIBS)* 17: 374-378.
- Eva, J. Neer. 1995. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-257.
- Asaoka, Y., K. Yoshida., Y. Nishizuka. 1992. Proein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *TIBS* 17: 414-418.
- Rhee, S. G. and K. D. Choi. 1992. Regulation of phospholipid specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 267: 12393-12396.
- Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases, *Cell* 80: 225-236.
- Cohen, B. G., R. Ren. and D. Baltimore. 1995. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80: 237

- 248.
7. Ira Herskowitz. 1995. MAP kinase pathway in yeast, *Cell* **80**: 187-197.
 8. Hill, S. C. and R. Tresman. 1995. Transcriptinal regulation by extracellular signals: mechanism and specificity. *Cell* **80**: 119-211.
 9. Karin, M. and T. Smeal. 1992. Control of transcription factors by signal transduction pathways. *TIBS* **17**: 414-418.
 10. Gescher, A. and L. I. Dale. 1989. Protein kinase C-a novel target for rational anti-cancer drug design? *Anti-Cancer Drug Design*, **4**: 93-105.
 11. Powis, G. and Workman, P. 1994 Signalling target for the development of cancer drugs. *Anti-Cancer Drug Design* **9**: 263-277.
 12. 권병목 (1996) 라스단백질 활성조절을 통한 항암제개발 연구동향, *생명공학 동향* **4**(1): 78-88.
 13. 김보연, 안종석 (1996) 신호전달 관련 효소의 저해제, *생명공학 동향* **4**(1): 95-101.
 14. Yanagisawa, M., H. Kurihara, and S. Kimura. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**: 411-415.
 15. Harata, Y., H. Yoshimi, and S. Tanaka. 1988. Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 868-875.
 16. Sugiura, M., T. Inagami and A. J. Hohns. 1989. Inhibition by a protein kinase C inhibitor and involvement of phosphoinositols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**: 170-176.
 17. Ralph, E. W., A. Z. Guy, and M. S. Prescott. 1990. Lipid metabolism and signal transduction in endothelial cells. *Prog. Lipid Res.* **29**: 45-63.
 18. O'Rourke, F. A. 1985. Inositol 1,4,5-triphosphate releases Ca^{2+} from a Ca^{2+} transporting membrane vesicle fraction derived from human platelets. *J. Biol. Chem.* **260**: 956-952.
 19. Nozawa, Y., S. Nakashima, and K. Nagata. 1991. Phospholipid-mediated signalling in receptor activation of human platelets. *Biochem. Biophys. Acta.* **1082**: 219-238.
 20. Watson, S. P. and E. G. Lapetina. 1988. 1,2-diaclyglycerol and phorbol ester inhibit agonist-induced formation of inositol phosphate in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 2623-2626.
 21. Watson, S. P. and J. McNally. 1988. The action of the protein kinase inhibitor, staurosporine, on human platelets. *Biochem. J.* **249**: 345-350.
 22. Pawlowska, Z., M. V. Hogan, E. Korneck, and Y. H. Ehrlich. 1993. Ecto-protein kinase and surface protein phosphorylation in PC12 cells; interactions with nerve growth factor. *J. Neurochem.* **60**: 676-686.
 23. Nakanish, S., Y. Matsuda, K. Iwahashi and H. Kase. 1986. K-252b, c, d. Potent inhibitors of protein kinase C from microbial origin. *J. Antibiotics* **39**: 1066-1071.
 24. Yasuzawa, T., T. Iida, M. Yoshida, N. Hirayama, M. Takahashi, K. Shrahata, and H. Sano. 1986. The structure of the novel protein kinase C inhibitors K-252a, b, c and d. *J. Antibiotics* **39**: 1072-1078.
 25. Osada, H., T. Sonoda, K. Tsunoda, and K. Isono. 1989. A new biological role of Sangivamycin; Inhibition of protein kinases. *J. Antibiotics* **42**: 102-106.
 26. Takahashi, H., H. Osada, M. Uramoto, and K. Isono. 1990. A new inhibitor of protein kinase C, RK-286C. *J. Antibiotics* **43**: 168-173.
 27. Takahashi, I., Y. Saitoh, M. Yoshida, H. Sono, H. Nakano, M. Morimoto, and T. Tamaoki. 1989. UCN-01 and UCN-02, new selective inhibitors of protein kinase C and biological activities. *J. Antibiotics* **42**: 571-576.
 28. Inagaki, M., S. Kawamoto, H. Itoh, M. Saitoh, M. Hagiwara, J. Takahashi, and H. Hidaka. 1986. Naphthalenesulfonamides as calmodulin antagonists and protein kinase inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **29**: 577-581.
 29. Kiss, Z., H. Phillips, and W. H. Anderson. 1995. The bisindolylmaleimide GF 109203X, a selective inhibitor of protein kinase C, does not inhibit the potentiating effect of phorbol ester on ethanol-induced phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta.* **1265**: 93-95.
 30. Toulle, D., P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. G. Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle, L. Dhame, D. Charon, and J. Kirilovsky. 1992. The Bisindolylmaleimide GF109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**: 1577-1581.
 31. Jarvis, W. D., A. J. Turner, L. F. Povirk, R. S. Traylor, and S. Grant. 1994. Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL60 human promyelocytic leukemic cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res.* **54**: 1707-1714.
 32. Raynor, R. L., B. Zheng, and J. F. Kuo. 1991. Membrane interactions of amphiphilic polypeptides Mastoparan, Melittin, Polymyxin B, and Carkiotoxin. *J. Biol. Chem.* **266**: 2753-2758.
 33. Latharine, W. S., C. Schachtele, and R. Seifert. 1994. N-protein kinase C isoenzymes may be involved in the regulation of various neutrophil functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**: 1536-1543.
 34. Takahashi, I., S. Nakanishi, E. Kobayashi, H. Nakano, K. Sazuki, and T. Tamaoki. 1989. Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C; possible relation to their antiretroviral activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**: 1207-1212.
 35. Couldwell, W. T., D. R. Hinton, S. He, T. C. Chen, I. Sebat, M. H. Weiss, and R. E. Law. 1994. Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cells. *FEBS Lett.* **345**: 43-46.
 36. Ohta, H., E. A. Sweeney, A. Masamune, Y. Yatomi, S.

- Hakomoris, and Y. Igarashi. 1995. Induction of apoptosis by sphingosine in human leukemic HL-60 cells; a possible endogenous modulator of apoptotic DNA fragmentation occurring during phorbol ester-induced differentiation. *Cancer Res.* **55**: 691–697.
37. Gschwendt, M., H. J. Muller, K. Kielbassa, R. Zang, W. Kittstein, G. Rincke, and F. Marks. 1994. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**: 93–98.
38. Keller, H. U. and V. Niggli. 1993. The protein kinase C-inhibitor Ro 31-8220 selectively suppresses PMA- and diacylglycerol-induced fluid pinocytosis and actin polymerization in PMNs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**: 1111–1116.
39. Uehara, Y., M. Hori, T. Takeuchi and H. Umezawa. 1986. Phenotypic change from transformed to normal induced by benzoquinonoid ansamycins accompanies inactivation of p60^{src} in rat kidney cells infected with rous sarcoma virus. *Mol. Cell Biol.* **6**: 2198–2207.
40. Umezawa, H., M. Imoto, T. Sawa, K. Isshiki, N. Matsuda, H. Inuma, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1986. Studies on a new epidermal growth factor receptor kinase inhibitor, erbstatin, produced by MH435-hF3. *J. Antibiotics* **39**: 170–173.
41. Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. I. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, and Y. Fukami. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**: 5592–5595.
42. Osada, H., T. Sonada, H. Kusakabe, and K. Isono. 1989. Epiderstatin, a new inhibitor of the mitogenic activity induced by epidermal growth factor. *J. Antibiotics* **42**: 1599–1606.
43. Fry, D. W., A. J. Kraker, A. McMichael, L. A. Ambroso, J. M. Nelson, W. R. Leopold, R. W. Connors, and A. J. Bridges. 1994. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science* **265**: 1093–1095.
44. Shimohara, S., Y. Honma, T. Taniguchi, T. Kimura. 1991. *Amer. J. Pathology* **139**: 737–742
45. Peles, E., R. B. Levy, E. Ullrich, A. Yarden. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**: 12266–12271.
46. Haas, N., M. McDanel, A. Wong. 1991. *Proc. Amer. Ass. Cancer. Res.* **32**: 1789–1794.
47. Ogawara, H., K. Higawashi, S. Manita, K. Tanaka, Y. Shimizu, and S. Liang. 1992. An inhibitor for inositol-specific phospholipase C from *Actinomadura* sp. *J. Antibiotics* **45**: 1365–1366.
48. Nishioka, H., T. Sawa, M. Hawada, I. Inoto, and K. Umezawa. 1990. Inhibition of phosphatidylinositol kinase by toyocamycin. *J. Antibiotics* **43**: 1586–1589.
49. Nishioka, H., T. Sawa, M. Hawada, T. Takeuchi, and K. Umezawa. 1991. Isolation and structure determination of novel phosphatidylinositol kinase inhibitors, echiguanines A and B from *Streptomyces* sp. *J. Natl. Prod.* **54**: 1321–1325.
50. Nishioka, H., M. Imoto, T. Sawa, T. Takeuchi and K. Umezawa. 1989. Screening of phosphatidylinositol kinase inhibitors from *Streptomyces*. *J. Antibiotics* **42**: 823–825.
51. Powis, G., M. J. Seewald, C. Gratas, D. Melder, J. Ricbow, and E. J. Modest. 1992. Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxin ether lipid analogues. *Cancer Res.* **52**: 2835–2840.
52. Uberall, F., H. Oberhuber, L. Demuth and H. H. Grunicke. 1991. Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity. *Cancer Res.* **51**: 807–812.
53. Schutze, S., K. Potthoff, T. Machleidt, D. Berkovic, K. Wiegmann, and M. Kronke. 1992. TNF activates NF- κ B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* **71**: 765–776.
54. Reynolds, L. J., E. D. Michelich, and E. A. Dennis. 1991. Inhibition of venom phospholipase A₂ by manoalide and manoalogue. *J. Biol. Chem.* **266**: 16512–16517.
55. Tompkins, T. A. and M. A. Moscarello. 1994. The mechanism of stimulation of brain phospholipase C- α by myelin basic protein involves specific interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1206**: 208–214.
56. Tatrai, A., S. K. Lee, and P. H. Stern. 1994. U-73122, a phospholipase C antagonist, inhibits effects of endothelin-1 and parathyroid hormone on signal transduction in UMR-106 osteoblastic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1224**: 575–582.
57. Won Keun Oh, Hyun Sun Lee, Soon Cheol Ahn, Bo Yeun Kim, Dae Ook Kang, Tae Ick Mheen, Jong Seog Ahn, 1997. A new phospholipase C inhibitor, CRM-51005 isolated from unidentified fungal strain 51005, *J. Antibiotics.* **50**: 1083–1085.
58. Lee, H. S., W. K. Oh, B. Y. Kim, S. C. Ahn, D. O. Kang, S. Y. Ryu, T. I. Mheen, J. S. Ahn. 1997. Inhibition of phospholipase C γ 1 activity by the penylated flavonoids from *Sophora flavescens*. *Planta Medica* **63**: 266–268.