

Pseudomonas putida 유래 Methioninase의 정제 및 생체내 ¹¹C-Methionine 섭취에 미치는 영향

변상성 · 박귀근*

경원대학교 공과대학 생명공학부 분자 · 식품생명공학전공

Purification of Methioninase from *Pseudomonas putida* and Its Effect on the Uptake of ¹¹C-Methionine *in Vivo*. Byun, Sang Sung and Gwi Gun Park. Dept. of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Seoungnam 461-701, Korea – Purification of methioninase resulted in a yield of 69%, and SDS-PAGE analysis of the purified product revealed a single band of approximately 43 kDa in molecular weight. *in vitro* experiments with cancer cells incubated in methionine-free media demonstrated an increase in ¹¹C-methionine uptake to 25.8±1.1% at 6 hr, 31.8±0.8% at 24 hr, and 62.2±0.6% at 48hr, compared to controls. Treatment of the cancer cells with purified methioninase showed no decrease in survival after a 2 hr incubation with 0.01 U/ml, but survival of RR1022 cells decreased 30% after 24 to 48 hr incubation. SKOV-3 cells showed a 5% and 14% decrease in survival with 0.1 and 1 U/ml methioninase after 24 hr. After 48hr survival decreased 15% and 24% with 0.1 and 1 U/ml methioninase. Measurements of ¹¹C-methionine uptake in RR1022 cells demonstrated no change at 2 hr, but a 13.7±4.7% and 40.7±2.6% increase in uptake at 24 and 48 hr, respectively. SKOV-3 cells also showed no change at 2 hr, but had a 17.7±7.2% and 38.9±4.9% increase in ¹¹C-methionine uptake after 24 hr and 48 hr treatment with methioninase, respectively. ¹¹C-methionine PET imaging revealed clear visualization of both the tumors and contralateral infectious lesions. Administration of rMET appeared to result in a slight increase in tumor:nontumor contrast on ¹¹C-methionine PET images. Injection of purified methioninase also produced PET images where tumor uptake was higher than that of infectious lesions.

Key words: Methioninase, *Pseudomonas putida*, uptake of ¹¹C-Methionine

암을 치료하는 데에는 정확한 진단이 진행되어야 하며 정확한 진단으로 적합한 치료가 선행되어야 한다. 최근에는 양전자 방출 단층촬영장치(PET: Positron Emission Tomography)이라는 PET를 이용하기도 한다. PET란 양전자를 방출하는 방사성 동위원소로 표지된 약품을 피검자에게 투여하여 방사능의 체내분포를 Positron CT장치에 의하여 체내 국소의 방사능을 측정하는 첨단 영상 기법으로 PET가 개발된 초기에는 PET 이용 분야 중 신경계 분야가 70%로 주된 이용대상이고 심장 스캔이 그 다음이었으나 종양분야에서의 이용이 유용하다는 것이 밝혀짐에 따라 앞으로는 많이 이용하는 분야가 될 것이다.

PET를 이용한 종양 검사는 원발성 및 전이성병변의 발견, 악성도의 등급화, 수술 후 평가 치료에 대한 반응 평가, 방사선괴사와 재발의 감별진단 등을 정확하게 알 수 있게 해준다. 이때 동위원소인 방사성 불소에 용도에 따라 포도당, 아미노산, 핵산 등을 붙여 만들어 사용하게 된다. 방사성 불소에 포도당을 붙인 FDG PET는 현재 광범위하게 사용되고

있는 것으로 암세포에서 포도당 대사가 증가하는 것을 이용하여 영상 진단하는 방법이다[18].

현재 진행되어진 아미노산 대사는 ¹¹C-methionine에 대한 연구에서는 뇌종양을 영상화하는 경우 ¹¹C-methionine이 18-F-FDG보다 우수하다고 알려져 있다. 그 이유는 18-F-FDG의 방사능 세기가 뇌종양에서 당의 대사정도에 따라 정상세포보다 높고 낮음이 결정지어지게 되므로 종양의 정확한 경계를 그려낼 수 없는데 반하여 ¹¹C-methionine의 tumor/background 비가 크기 때문이다[17]. 그러나 다른 부위의 종양에서는 ¹¹C-methionine의 tumor/background 비가 다양하여 종양 검출 예민도가 완벽하지 못한 경우도 있다. 이런 경우 우리가 정제한 methioninase를 처리하여 검사의 정확성을 높일 수 있다고 생각된다[4-6, 9, 10, 13].

본 연구에서는 위와 같은 종양세포의 성장에 필요한 methionine의 유용성에 착안하여 숙주에게는 영향을 주지 못하면서 암세포에게는 영향을 주는 암세포의 methionine 대사의 특성을 이용하였다[1-3, 12, 15]. 또한 생체 내의 혈중 methionine의 농도를 낮추어 암조직의 methionine의 섭취 요구량을 증폭시켜 방사성 동위원소가 표지된 ¹¹C-methionine의 섭취율이 증가함을 PET으로 영상화 하여 암조직의 영상화의 정확성을 높이는데 있다. 생체 내의

*Corresponding author
Tel. 82-31-750-5383, Fax. 82-31-750-5383
E-mail: :ggpark@mail.kyungwon.ac.kr

methionine의 농도를 낮추기 위해서는 methionine을 분해할 수 있는 methioninase가 요구된다. methionine 분해 인자는 가장 널리 알려진 *Pseudomonas putida* 균주로 부터 생산할 수 있었다[7,19].

*Pseudomonas putida*로 부터 생산된 methioninase를 종양 세포에 투여하여 종양세포의 생존을 확인하였고, 방사성 methionine 섭취 변화를 관찰하였으며, 동물모델에서는 암조직의 방사성 methionine의 섭취를 PET를 이용하여 영상화를 확인하였다.

재료 및 방법

Pseudomonas putida 배양

*Pseudomonas putida*는 LB배지에서 26°C에서 120 rpm으로 24시간 배양하였다.

LB배지의 조성은 0.5% Yeast extract, 1% NaCl, 1% Trypton이고, 배양된 *Pseudomonas putida*는 Special media [5% bacteria, 10% LB, 0.1% Urea(Sigma Chemical Co.), 0.025% Yeast extract(Sigma Chemical Co.), 0.01% Magnesium sulfate(Sigma Chemical Co.)] and 0.25% Methionine(Sigma Chemical Co.)로 26°C에서 120rpm으로 24시간 배양하였고, 배양 균주는 UV-spectrophotometer로 OD600에서 측정하였다.

배양세포의 수확과 추출

배양액은 AGT column(LZR electronics. Inc NO 48240500310)으로 세포를 수확한 후 4°C, 7000 rpm, 30 min 원심분리(Beckman, J2-MC)하여 얻었고, 수확한 세포는 추출용액(20 mM potassium phosphate(Sigma chemical Co.) pH 9.0, 10 μM pyridoxal phosphate(Sigma chemical Co.)로 평형화한 뒤 DEAE-Toyopearl 650 M에 의해 얻어진 효소액을 15 ml/hr 유속으로 tube당 5 ml씩 용출하였으며, 150 mM-450 mM potassium chloride로 linear gradient 농도 구배법에 의해 정제를 진행하였다[16].

단백질 정량

Schliep법[14]에 따라 UV-spectrophotometer(Shimadzu Model 1201)로 1.5×A280-0.75×A260의 식을 이용한 결과를 단백질 농도로 사용하였다.

효소 활성 측정

효소액 50 μl에 50 mM phosphate buffer pH 8.0, 10 μM pyridoxal phosphate, 10 mM methionine을 혼합한 후 10분 동안 37°C에서 반응시키고, 4.5% TCA 0.5 ml를 첨가한 뒤 반응을 중지시켰다. 그리고 반응액을 원심 분리하여 상층액 0.5 ml에 0.05% 3-methyl-2-benzothiazolone

hydrazone 0.5 ml를 첨가한 후 50°C에서 반응 시켜 UV-spectrophotometer로 OD335에서 α-ketobutyrate의 생성을 측정하였다[11].

전기영동

3% stacking gel과 10% running gel을 사용한 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 이용하여 Laemmli법[8]에 따라 수직 전기영동을 수행하였다. 전기영동을 수행한 후 0.1% Coomassie brilliant blue R-250으로 30분 정도 염색후 gel은 5% methanol, 7% acetic acid으로 탈색하였다.

종양세포의 배양

종양세포는 RPMI1640에 10% FBS(GIBCO BRL Co.), 1% Antibiotic-Antimycotic(GIBCO BRL Co.)를 첨가하였으며, 37°C, 5% CO₂, 95%으로 조정된 항온항습 배양기에서 배양하였으며, 3일에 한번씩 계대 배양하여 사용하였다.

Methionine결핍 배지에서 11C-methionine의 섭취 변화

각각의 6 well flat form의 세포배양용기에 well당 5×10⁵개의 세포를 분주한 뒤 RPMI1640 배양액에 배양시켰다. 24시간이 경과 뒤 RPMI1640에 methionine이 결핍된 배양액으로 교환하여 6시간, 24시간 48시간 경과할 때 각각의 well당 25 μCi의 11C-methionine를 첨가한 후 30분간 37°C의 항온항습 배양기에서 11C-methionine의 섭취 변화를 관찰하고 PBS로 2번 세척한 뒤 세포를 모아 감마카운터를 사용하여 방사능을 측정하였다.

종양세포의 생존 변화

12 well flat form의 세포배양용기에 well당 1×10⁵개의 세포를 분주한 뒤 RPMI1640 배양액에 배양시킨다. 24시간 경과 뒤 methioninase를 well당 0.01, 0.1, 1 units를 첨가하여 6시간, 24시간, 48시간 경과 후 Trypan Blue 기법을 이용하여 세포의 생존수를 측정하였다[20].

RPMI1640 배지에서 methioninase 처리에 의한 11C-methionine의 섭취 변화

각각의 6 well flat form의 세포배양용기에 well당 5×10⁵개의 세포를 분주한 뒤 RPMI1640 배양액에 배양시킨다. 24시간이 경과 뒤 신선한 RPMI1640에 배양액으로 교환하고 정제한 methioninase 0.1 U/ml를 주입하여 2, 24, 48시간 경과 뒤 각각의 well당 25 μCi의 11C-methionine를 첨가한 후 30분간 37°C에서 11C-methionine의 섭취 변화를 관찰하고 PBS로 2번 세척한 뒤 세포를 모아 감마카운트를 사용하여 방사능을 측정하였다.

동물 모델

RR1022 세포를 150 mm flat form에 5×10^6 개의 세포를 분주한 후 RPMI1640 배지에 배양한다. 3일후 2×10^7 개의 세포가 될 때 세포를 수확한다.

세포의 수확은 1mM EDTA를 처리한 뒤 0.1% Normal Saline으로 세척한 후 세포를 모아 SD rat의 오른쪽 피하에 주사한 후 10일 경과 뒤 1cmx1cm의 고체의 암세포가 생성됨을 확인하였다.

실험 당일 3일전에 왼쪽 근육에 상처를 내어 염증 형성을 확인한 후 래트의 정맥에 10U의 methioninase를 주입하고 30분 뒤 ^{11}C -methionine 1mCi를 iv에 주입하여 ^{11}C -methionine의 섭취 변화를 PET를 이용한 영상 장비로 영상을 확인하였다

결과 및 고찰

효소의 정제

1차 DEAE-Toyopearl 650 M column chromatography에서는 40-150 mM KCl gradient를수행한 결과 methioninase의 main peak는 fraction number 22-34까지로 나타났으며

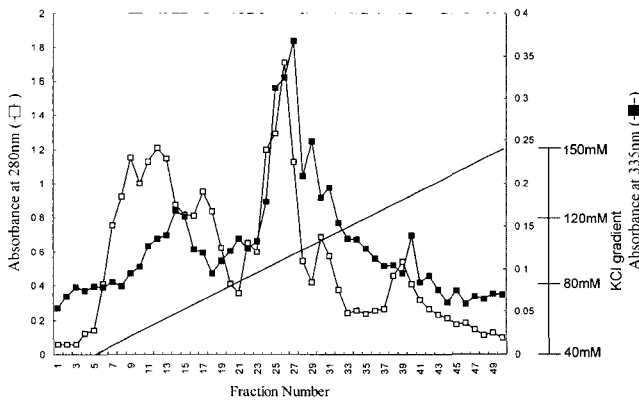


Fig. 1. Chromatography of the methioninase from *Pseudomonas putida* by DEAE-Toyopearl 650 M column chromatography.

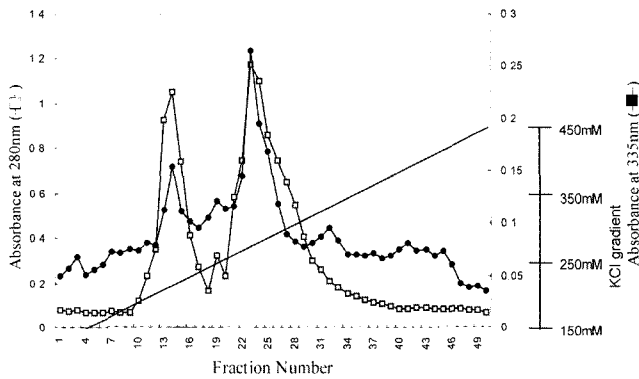


Fig. 2. Chromatography of the methioninase from *Pseudomonas putida* by DEAE sephadex column chromatography.

(Fig. 1), 상기 fraction을 모아 potassium phosphate buffer로 투석 농축하여 2차 DEAE Sephadex column chromatography를 수행하였다. DEAE-Sephadex A-50에서는 150-450 mM KCl gradient 농도구배법에 의해 2개의 main peak (Fraction No. 12-19, 21-28)가 나타났으며(Fig. 2), 본 연구에서는 두 번째 peak(Fraction No. 21-28)를 대상으로 수행하였으며 정제효소의 수득율은 68%, 비활성은 92배(Table 1), SDS-PAGE로 43 kDa의 위치에서 단일밴드를 확인할수 있었다(Fig. 3).

Methionine 결핍 배지에서의 ^{11}C -methionine의 섭취 변화

래트의 대장암 세포인 RR1022세포와, 사람의 난소암 세포인 SKOV-3 세포에 RPMI1640 배지와 methionine이 결핍된 RPMI1640 배지를 6, 24, 48시간동안 반응한 결과 RR1022에서는 ^{11}C -methionine의 섭취 변화가 정상군에 비하여 대조군에서는 6시간에서 $25.8 \pm 1.1\%$ 24시간에는 $31.8 \pm 0.8\%$ 48시간에는 $62.2 \pm 0.6\%$ 으로 증가하였으며 (Fig. 4), SKOV-3 6시간에는 $425 \pm 31.5\%$, 24시간에서는

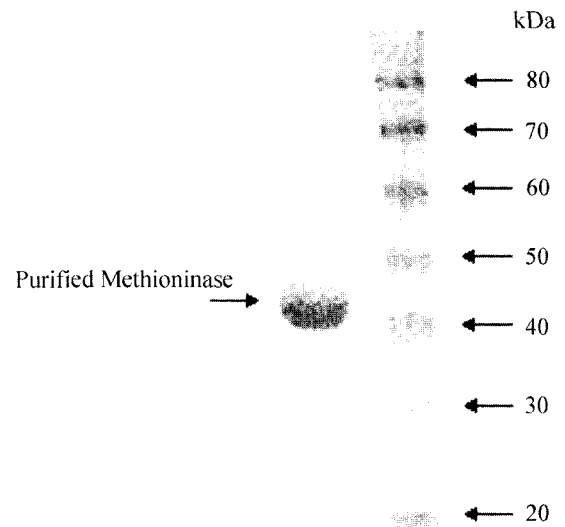


Fig. 3. Analysis of the purified methioninase by SDS-PAGE.

Table 1. Purification of Methioninase from *Pseudomonas putida*

Purification step	Total activity (units) ^a	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg) ^b	yield (%)
Crude enzyme	165.2	953.1	0.17	100
DEAE-Toyopearl 650M	92.5	191.77	0.48	78
DEAE-Sephadex A-50	72.3	4.54	15.92	69

a: One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme that catalyzes of 1 μmol of α -ketobutyrate/min.

b: The specific activity is expressed as units/mg of protein.

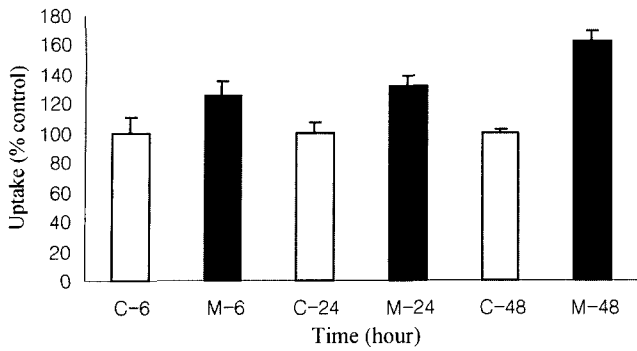


Fig. 4. Cells grown in normal RPMI1640 culture media and methionine-free RPMI1640 media were compared for ¹¹C-methionine uptake rates in RR1022. C: normal RPMI1640, M: methionine-free RPMI1640, 6 hr: P<0.1, 24, 48 hr: P<0.01.

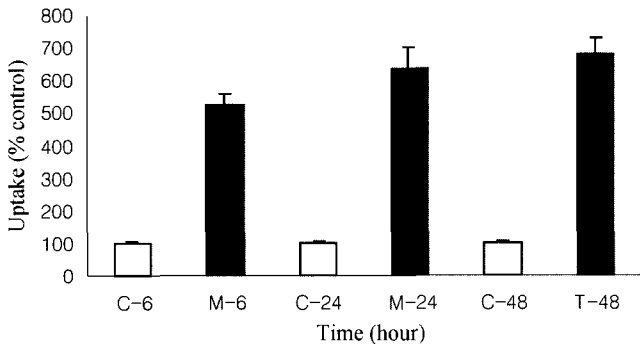


Fig. 5. Cells grown in normal RPMI1640 culture media and methionine-free RPMI1640 media were compared for ¹¹C-methionine uptake rates in SKOV-3. C: normal RPMI1640, M: methionine-free RPMI1640, 6, 24, 48 hr: P<0.01.

537 ± 61.6%, 48시간에서는 581 ± 46.6%으로 증가하였다 (Fig. 5).

종양세포의 생존 변화

종양세포인 RR1022, SKOV-3세포에 methioninase 0.01, 0.1, 또는 1 U/ml를 투여하여 2, 24, 48시간 반응시킨 뒤 세포 생존율의 변화를 trypan blue 기법으로 확인한 결과 RR1022와 SKOV-3는 methioninase 0.01 U와 2시간에서는 별 차이가 없었으나 24, 48시간에서는 RR1022세포의 경우 30%정도 감소하였다(Fig. 6). 또한 SKOV-3세포의 경우에는 24시간 배양 시킨 결과 0.1 U에서는 5%, 1 U에서는 14% 감소하였고, 48시간의 경우에는 0.1 U에서 약 15%, 1 U에서는 약 24% 감소하였다(Fig. 7). 이와 같은 결과는 RPMI1640 배지 내에서 methioninase의 영향으로 종양세포의 증식에 필요한 methionine의 농도가 감소하여 cell cycle의 단백질 합성에 관여하는 S/G2 phase에 관여하여 DNA, RNA, Protein의 합성을 저해한다고 사료된다.

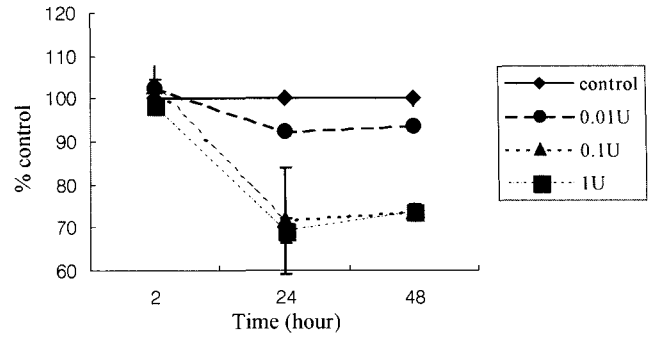


Fig. 6. Compared for survival rates using the trypan blue method in RR1022.

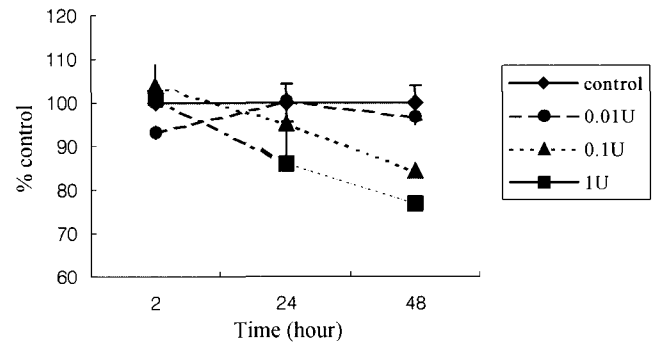


Fig. 7. Compared for survival rates using the trypan blue method in SKOV-3.

Methioninase 처리 배지에서의 ¹¹C-methionine의 섭취 변화

종양세포 RR1022, SKOV-3 세포의 methioninase에 대한 영향 결과 RR1022는 2시간에서는 차이가 없었으나 24, 48시간에서는 13.7 ± 4.7, 40.7 ± 2.6 증가하였으며(Fig. 8), SKOV-3도 2시간에서는 차이가 없었으나 24, 48시간에서는 17.7 ± 7.2, 38.9 ± 4.9 증가하였다(Fig. 9). 배지 내 methionine의 농도는 methioninase에 의해 시간이 지나면서 점점 감소하는 것으로 사료되어 시간이 증가 하면서 ¹¹C-methionine

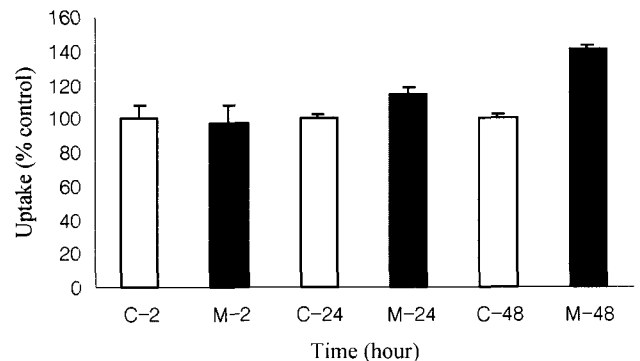


Fig. 8. The uptake rate of ¹¹C-methionine after incubation with methioninase was compared to that of control cells in RR1022. C: Control, M: Methioninase, 6 hr: P<0.3, 24 hr: P<0.5, 48 hr: P<0.1.

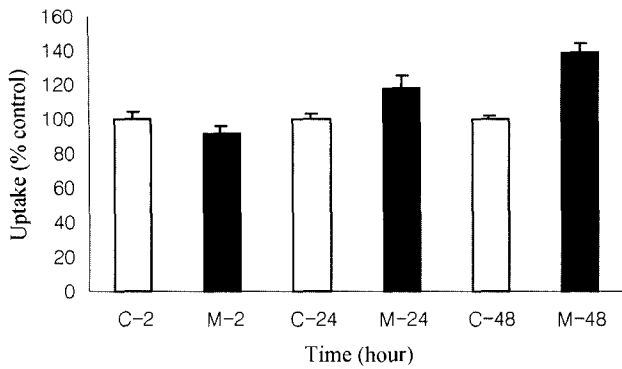


Fig. 9. The uptake rate of ¹¹C-methionine after incubation with methioninase was compared to that of control cells in SKOV-3. C: Control, M: Methioninase, 2 hr: P<0.7, 24, 48 hr: P<0.03.

의 섭취가 증가 된다고 사료된다.

종양이식 쥐에서 ¹¹C-Methionine 섭취 변화

동물의 ¹¹C-methionine PET 영상 결과 종양과 염증병변이 모두 관찰되었다. recombinant methioninase를 투여한 결과 염증병변의 섭취에 비하여 종양의 섭취가 증가하는 경향이 관찰되었으며, 정제된 methioninase를 투여하고 영상을 얻은 경우에도 종양 섭취가 염증보다 약간 더 높았다(Fig. 10). 종양세포에 methioninase를 처리하면 methionine의 섭취 요구량은 시간이 지나면서 유의하게 증가하였으며 생존율은 감소하였다. 종양 동물모델에서도 methioninase를 투여한 경우 종양의 좋은 ¹¹C-methionine 섭취를 관찰할 수 있었다. 이상에서 methioninase의 이용이 종양의 검출에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료되었다.

요 약

1차 DEAE-Toyopearl 650 M ion exchange column chromatography 및 2차DEAE-Sephadex A-50 ion exchange column chromatography에 의해 정제를 수행한 결과 15.92 units/mg의 정제배율 및 비활성은 92배, 정제 효소의 순도는 SDS-PAGE에 의해 단일 밴드를 나타내었으며, 분자량은 43 kDa으로 추정되었다. 래트의 대장암 세포인 RR1022세포

와, 사람의 난소암 세포인 SKOV-3 세포에서 RPMI1640 배지와 methionine이 결핍된 RPMI1640 배지를 처리한 결과 정상군에 비해 대조군의 ¹¹C-methionine의 섭취 변화가 증가하였다. 종양세포인 RR1022, SKOV-3세포에 methioninase 투여하여 종양세포의 생존율의 변화를 trypan blue 기법으로 확인한 결과 배지내에서 종양세포의 증식에 필요한 methionine의 농도가 감소하여 DNA, RNA, Protein의 합성을 저해한다고 사료된다. 종양세포인 RR1022, SKOV-3세포에 methioninase를 투여한 결과 정상군에 비해 대조군이 시간 지나면서 ¹¹C-methionine의 섭취 변화가 증가하였다. 동물의 ¹¹C-methionine PET 영상 결과 종양과 염증병변이 모두 관찰되었다. rMET를 투여한 결과 염증병변의 섭취에 비하여 종양의 섭취가 증가하는 경향이 관찰되었으며, 정제된 methioninase를 투여하고 영상을 얻은 경우에도 종양 섭취가 염증보다 높게 나타났다. 종양세포에 methioninase를 처리하면 methionine의 섭취 요구량은 시간이 지나면서 증가하였으며 생존율은 감소하였다. 종양 동물모델에서도 methioninase를 투여한 경우 종양의 좋은 ¹¹C-methionine 섭취를 관찰할수 있었으며 methioninase의 이용이 종양의 검출에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료되었다.

REFERENCES

1. Bagley, P.J. and M.H. Stipanuk.1995. Rats fed a low-protein diet supplemented with sulfur amino-acids have increase cysteine dioxygenase activity and increased taurine production in hepatocytes. *J. Nutr.* **125**: 933-940.
2. Fiskerstrand, T., B. Christensen, O.B. Tysnes, P.M. Ueland, and H. Refsum. 1994. Development and reversion of methionine dependence in human glioma cell line relation to homocysteine remethylation and cobalamin status. *Cancer Res.* **54**: 4899-4906.
3. Goseki, N. S. Yamazaki, K. Shimojo, F. Kndo, M. Maruyama, M. Endo, M. Koike, and H. Takahashi. 1995. Synergistic effect of methionine-depleting total parenteral nutrition with 5-fluorouracil on human gastric cancer: a randomized prospective clinical trial. *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**: 484-489.
4. Goseki, N., S. Yamazaki, and M. Endo. 1992. Antitumor effect of methionine depleting total parenteral nutrition with

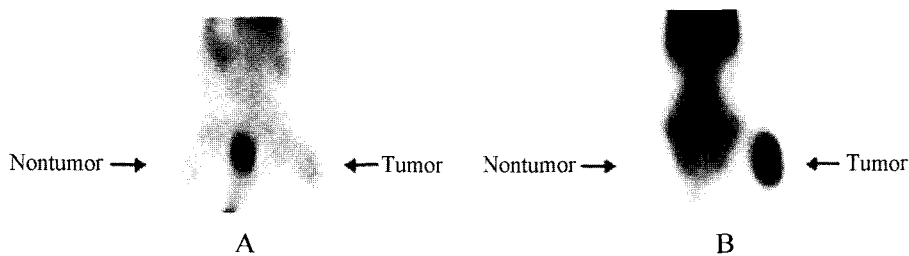


Fig. 10. ¹¹C-methionine PET imaging revealed clear visualization of both the tumors and contralateral infection. A: Purified methioninase, B: rMET.

- doxorubicin administration on Yoshida sarcoma-bearing rats. *Cancer* **69**: 1865-1872.
5. Guo, H.Y., H. Herrera, A. Groce, and R.M. Hoffman. 1993. Expression of the biochemical defect of methionine dependence in fresh patient tumors in primary histoculture. *Cancer Res.* **53**: 2479-2483.
 6. Hoffman, R.M. 1982. Methionine dependence in cancer cells: a review. *in vitro* **18**:421.
 7. Jones, B.N and J.P. Gilligan. 1983. *o*-Phthaldialdehyde pre-column derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiologica fluids. *J. Chromatog.* **266**: 471-482.
 8. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of strucural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
 9. Kamely, D. J.W. Littlefield, and R. Erbe. 1973. Regulation of 5-methyltetra-hydrofolate, Homocysteine methyltransferase activity by methionine, vitamin B12, and folate in cultures baby hamster kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 2585-2589.
 10. Kreis, W. and M. Goodenow. 1978. Methionine requirement and replacement by homocysteine in tissue cultures of selected rodent and human malignant and normal cells. *Cancer Res.* **38**: 2259-2262.
 11. Susan, H. K, J. Catherine, A. Waterfield, and J.Timbrell. 2002. Methionine synthase activty and sulphur amino acid levels in the rat liver tumor cells HTC and Phi-1. *Biochemical Pharmacology* **63**: 381-391.
 12. Lu, S.C. 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis, current concepts and controversies. *FASEB J.* **13**: 1169-83.
 13. Naylor, S. L. L. L. Busby. and R. J. Klebe. 1976. Biochemical selection systems for mammalian cells, the essential amino acids. *Somat Cell Genet.* **2**: 93-111.
 14. Nobuyoshi, E. and S. Kenji. 2000. L-Methionine γ -Lyase from *Pseudomonas putida* and *Aeromomonas*. *Cancer Res.* **79**: 459-465.
 15. Ogier, G. J. Chantepie., C. Deshayes, B. Chantegrel, C. Charlot, A. Doutheau, and G. Quash. 1993. Contribution of 4-methylthio-2-oxobutanoate and its trans-aminase to the growth of methionine-dependent cells in culture. *Biochem Pharmacol.* **45**: 1631-1644.
 16. Schlieff, R. F. and P. C. Wensink. 1981. Pratical methods in molecular biology. New York, *Springer-Verlag*. p74.
 17. Shogo, Y. 1999. Application of methionine-free nutrition as an anticancer treatment. *Nutritional Pharmaceuticals* **15**(5): 422-424.
 18. Taizo, S, M. Akihiko, and K. Yukifumi. 1999. Effects of D-methionine-containing solution on tumor cell growth *in vitro*. *Hoechst Marion Roussel Ltd, Saitama(Japan)*. **49**(1): Nr.6: 541-543.
 19. Tan, Y., M. Xu, X.Sun, T. Kubota, and R. M. Hoffman. 1996. Anticancer efficiency of methioninase *in vivo*. *Anticancer Res.* **16**: 3931-3936.
 20. Valerie, W. H. U. and S. H. Daniel. 2000. Radiolabing revisited : metabolic labeling with 35S-methionine inhibits cell cycle progression, proliferation, and survival. *Cellular Effects of Radiolabeling* **14**: 448-454.

(Received Aug. 26, 2003/Accepted Oct. 27, 2003)