ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2016** Vol. 26. No. 9. 991~998 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2016.26.9.991

Hsp70 and IKKγ Synergistically Suppress the Activation of NF-κB

Mi Jeong Kim[1†], Ka Hye Kim[1†], Moon Jeong Kim[1], Jin Ik Kim[1], Hye Jung Choi[2], Ja Young Moon[1], Woo Hong Joo[2] and Dong Wan Kim[1*]

[1]*Department of BioHealth Sciences, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea*
[2]*Department of Biology and Chemistry, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea*

Received June 9, 2016 /Revised July 25, 2016 /Accepted July 28, 2016

NF-κB acts as a critical transcription factor for the survival of cells via the induction of antiapoptotic genes. Constitutive activation of NF-κB in many types of solid tumors suggests that the inhibition of NF-κB might prevent or inhibit tumorigenesis. Although a number of studies demonstrated that Hsp70 regulated NF-κB activity, the exact mechanism is not clear. This study investigated the functional relationship of Hsp70 and IKKγ in the regulation of NF-κB activation using expression plasmids of components of the IKK complex. Wild-type and deletion mutants of IKKγ were expressed together with Hsp70, and the combined regulatory effect of Hsp70 and IKKγ on NF-κB activation was assayed. Hsp70 suppressed the activation of NF-κB in a reporter plasmid assay. Hsp70 also suppressed the phosphorylation and degradation of IκBα. The suppressive effect of Hsp70 on NF-κB activation was synergistically elevated by IKKγ. The N-terminal IKKβ binding site, C-terminal leucine zipper, and zinc finger domains of IKKγ were not necessary for the suppressive effect. Furthermore, Hsp70 and IKKγ synergistically suppressed the induction of COX-2 expression by lipopolysaccharides in RAW264.7 cells. These results suggest that overexpression of Hsp70 and IKKγ may be a strategic method for inhibition of NF-κB and related diseases.

Key words : COX-2, Hsp70, IKKcomplex, IKKγ, NF-κB

서 론

NF-κB (Nuclear Factor-kappa B)는 모든 세포유형에서 광범위하게 발현되는 유도성 전사인자로 세포외부로부터 가해지는 TNF-α, lipopolysaccharide (LPS), irradiation, reactive oxygen species (ROS) 등 다양한 자극에 대한 방어 작용과 면역세포의 활성화를 일으키며 세포의 증식 및 사멸, 염증반응 등에 관련된 다양한 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[8, 10, 22]. 또한 NF-κB는 암의 발생, 암세포의 증식과 사멸, 혈관생성, 전이 등과 연관성이 밝혀지면서 암 치료의 표적으로 관심을 끌고 있다[5, 7, 23, 32].

NF-κB는 유도자극이 없는 경우 IκB에 결합되어 세포질 속에 머물러 있다. 세포를 TNF-α, LPS, IL-1β 등으로 자극하면 IκB가 인산화 되고 IκB의 분해가 일어나서 NF-κB의 신호전달 회로가 활성화된다[10]. IκB는 IκB kinase인 IKKα와 IKKβ에 의해 serine 잔기가 인산화 되는데 인산화 된 IκB는 ubiquitination이 촉진되어 세포질 내의 26S proteosome에 의해 분해된다. 따라서 남은 NF-κB는 자유로이 핵 안으로 이동하여 target DNA에 결합함으로써 전사를 촉진한다[9, 11, 20, 29].

IκB의 인산화는 IKK complex에 의해 일어난다. IKK complex (700~900 kDa)는 catalytic subunit인 IKKα (87 kDa), IKKβ (85 kDa)와 효소활성은 없지만 NF-κB활성에 필수적 조절역할을 하는 IKKγ (NEMO, 48 kDa)를 포함한다. 그 외 HSP90, CDC37, ELKS 등과 아직 밝혀지지 않은 protein들이 IKK complex를 구성하고 있다[10]. IKKα/IKKβ의 heterodimer의 형성은 leucine zipper (LZ) domain에 의해 이루어지며, IKKα는 IKKβ보다 낮은 활성을 보인다. 또한 이들 IKK의 활성화에는 IKK 자신의 인산화가 필요하며 NIK, MEKK 등의 upstream kinase가 여기에 작용하는 것으로 알려져 있다[6, 19, 25, 26].

IKK complex의 구성성분인 IKKγ는 kinase 활성을 가지지 않으며 IKKβ와 IκBα의 interaction을 증가시키고 IKKβ의 kinase 활성 증가 및 IKK complex 형성에 중요한 역할을 한다고 보고되었다[18, 34]. 또한 IKKγ는 과다 발현되었을 때 오히려 NF-κB의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다[1, 14]. 그러나 아직 IKKγ가 다른 protein과 결합하는 부위와 결합하는 protein의 종류, N-말단과 C-말단을 포함한 부위별 기능, NIK 또는 MEKK와 같은 upstream kinase에 의해 NF-κB가 활성화되었을 때 IKKγ가 NF-κB pathway에 작용하는 역할 등에 대해서는 상세히 알려져 있지 않다.

†**Authors contributed equally.**
***Corresponding author**
Tel : +82-55-213-3482, Fax : +82-55-213-3480
E-mail : dwkim@changwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한편, 1962년부터 Heat shock response라고 불리는 자기방어 현상이 연구되어 갑작스런 heat stress가 생체 내에서 단백질 발현을 유발함을 알게 되었고 이들을 Heat shock protein (Hsp)라 부르게 되었다[28]. Hsp는 분자량의 크기에 따라 small Hsps, Hsp60, Hsp70, Hsp90 등으로 구분된다. Hsp70는 정상 환경에서는 새로 합성된 protein folding에 관여하고 복수의 단백질을 단백질 복합체로 조합하는 등의 기능을 가지는 것으로 밝혀져 있으며, 스트레스 상황에서는 스트레스로 인한 protein folding 및 변성을 방지하여 세포의 정상기능을 유지시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[2, 3, 30, 31]. 이러한 Hsp70의 세포 보호 기능은 세포 내 대사에 관련된 필수 단백질들의 분해 및 파괴를 방지함으로써 이루어지는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 Hsp70가 NF-κB 활성조절 과정에서 어떠한 역할을 하는지 규명하고자 하였다. 특히 Hsp70에 의한 NF-κB의 활성조절에서 IKKγ의 연관성을 규명하고자 IKKγ의 wild type 및 deletion mutant을 이용하였으며, IKKβ의 활성형 mutant인 IKKβ-EE를 사용하여 Hsp70에 의한 NF-κB활성 조절에서 upstream kinase의 연관성을 검토하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 transfection

African green monkey kidney cell에 SV40의 T항원이 발현되고 있는 COS-7 세포와 RAW264.7 macrophage세포를 실험에 사용하였으며 이들 세포의 배양은 Fetal bovine serum (FBS)이 10% 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)을 사용하여 37℃, 5% CO_2 의 incubator에서 배양하였다. FBS와 DMEM배지는 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY. USA)제품을 사용하였다. 세포에 plasmid DNA를 도입하기 위한 transfection은 FuGENE HD (Roche, Basel, Switzerland)를 사용하였으며 sample 당 10~20 μg의 DNA를 serum free DMEM과 FuGENE HD의 혼합액에 섞고 실온에서 20분간 반응시켜 lipid와 DNA의 복합체를 형성시킨 다음 recipient cell에 적하하고 배양하였다. recipient 세포는 10-cm plate에 세포가 70~80%의 밀도로 배양된 것을 사용하였다.

세포추출물(whole cell extract) 및 세포질추출물(cytoplasmic extract)의 제조

세포추출물(whole cell extract)은 세포를 PBS로 두 번 세척 후 harvest 하고 1,500 rpm, 4℃, 5분 동안 원심분리하여 상등액을 제거한 후, Total lysis buffer (20 mM hepes (pH 7.9), 25% glycerol, 450 mM Nacl, 0.4 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1% NP-40)로 suspension 하고 on ice 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 12,000 rpm, 4℃, 15분 동안 원심분리하여 상등액을 수거하였다[14, 34]. 세포질추출물(cytoplasmic extract)은 세포를 PBS로 두 번 세척 후 harvest하고 1,500 rpm, 4℃, 5분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고, buffer A (10 mM hepes (pH 7.9), 1 mM EDTA, 10 mM KCl, 1 mM DTT)로 suspension 후 on ice 15분 동안 반응시켰다. 이 후 1 ml 주사기에 25G needle을 이용해 20번 stroke 하여 세포막을 파괴시키고, 14,000 rpm, 4℃, 15분 동안 원심 분리하여 상등액을 수거하였다[14, 34].

Luciferase assay

Luciferase activity를 측정하기 위하여 Nano-Glo Substrate (Promega, Madison, WI, USA)를 Nano-Glo buffer (Promega)에 100배 희석하여 사용하였으며 cell lysate는 96-well plate에 20 μl씩 분주하여 사용하였다. Substrate는 luminometer program (Microwin assay reader 2000, Centro LB960 Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)을 이용하여 노즐을 70% Ethanol로 50회 wash하고 멸균 증류수로 50회 wash 한 후 투여하였다. 효소반응은 20 μl씩 substrate가 분주되도록 하였으며 luciferase activity를 10초 간격으로 측정하였다.

Western blotting

시료단백질을 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 Gel상의 단백질을 실온에서 90 V로 2시간 동안 nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Science, Germany) membrane에 electrotransfer 한 뒤 membrane을 5% 탈지분유를 포함한 TBS-T (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) 용액으로 1시간 동안 실온에서 blocking 하였다. Membrane을 1차 항체와 실온에서 2시간 반응시키고 TBS-T용액으로 3번 세척한 후 peroxidase-conjugated 2차 항체로 다시 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응시킨 membrane을 TBS-T용액으로 3번 세척한 후 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Corp. Arlington Heights, IL, USA)로 발광시킨 후 Amersham Imager 600 (GE Healthcare)을 이용하여 결과를 확인하였다. Membrane의 strip은 stripping buffer (6.25 mM Tris-HCl (pH 6.7), 2% SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol)에 membrane을 넣고 50℃에서 30분간 처리한 뒤 TBS-T 용액으로 10분씩 3회 세척하였다. 항체는 anti-IκBα polyclonal antibody (C-21), anti-actin polyclonal antibody (I-19), anti-HA monoclonal antibody (F-7), anti-cMyc monoclonal antibody (9E10), anti-COX-2 polyclonal antibody (C-20) (Santa Cruz Bio Technology, CA, USA)와 anti-Flag antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 제조사의 사용법에 따라 사용하였다.

Raw264.7 세포의 COX-2발현유도

COX-2의 발현 유도를 위해 RAW264.7 macrophage 세포를 5×10^6 cells로 60-㎜ plate에 seeding한 후 LPS (Lipopolysac-

charides from Escherichia *coli* 055:B5, Sigma)를 무혈청 DMEM배지에 희석하여 0.5 μg/ml의 농도로 처리 하였다. COX-2의 발현은 Western blotting으로 확인하였다.

통계처리

실험은 3회 반복하였고, 평균(mean) ± 표준편차(SD)로 나타내었다. Student's t-test를 이용하여 통계적으로 분석하였으며, p값이 0.05 이하이면 유의성이 있다고 판단하였다.

결 과

NF-κB의 활성화에 대한 Hsp70 및 IKKγ의 영향

NF-κB활성화에 대한 Hsp70의 영향을 검토하기 위해 IKKβ, NIK, Hsp70, IKKγ 발현 plasmid와 pNL3.2.NF-κB-RE report plasmid (Promega, code N1111)를 COS-7세포에 co-transfection 시킨 후 32시간 후에 세포를 수거하여 luciferase assay를 실시하였다. pNL3.2.NF-κB-RE는 5개의 NF-κB결합부위를 가진 luciferase assay reporter plasmid이다. 실험 결과 Fig. 1A에 나타난 바와 같이 NF-κB를 활성화시키는 NIK (NF-κB inducing kinase)에 의해 NF-κB가 활성화 되어 luciferase 활성이 증가하였으며 여기에 Hsp70를 발현시켰을 때 NF-κB의 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 IKKγ를 발현시켰을 때에도 NIK에 의한 NF-κB의 활성화가 억제되는 것으로 나타났다. 이 결과로부터 Hsp70와 IKKγ는 각각 NIK에 의한 NF-κB의 활성화를 억제한다는 것을 알 수 있었다. 또한, Hsp70와 IKKγ를 동시에 첨가하였을 때에는 각각 첨가한 경우보다 NIK에 의한 NF-κB의 활성화가 더욱 억제되어 Hsp70와 IKKγ가 NF-κB의 활성화를 상호협력적(synergistically)으로 억제할 가능성을 보여주었다. 다음은 Hsp70와 IKKγ에 의한 NF-κB의 활성화 억제가 NIK에 의한 활성화에 특이적으로 작용하는 것인지 알아보기 위해 IKKβ의 활성형 mutant인 IKKβ-EE를 이용하여 Hsp70와 IKKγ가 NF-κB의 활성에 각각 어떠한 영향을 미치는지 검토 하였다. IKKβ-EE는 IKKβ의 activation loop의 Ser177과 Ser181부위를 glutamate로 교체시켜 NIK, MEKK 등 upstream kinase가 없어도 항상 활성화된 상태를 나타내는 IKKβ의 변이형이다[19]. COS-7 세포에 각각 IKKβ, IKKβ-EE, Hsp70, IKKγ 발현 plasmid와 pNL3.2.NF-κB-RE report plasmid를 co-transfection 시킨 후 32시간 후에 세포를 수거하여 luciferase assay로써 NF-κB활성에 미치는 Hsp70와 IKKγ의 영향을 검토하였다. 그 결과 Fig. 1B에 나타난 바와 같이 IKKβ-EE는 예상대로 NIK이 없어도 NF-κB를 활성화시킴을 확인하였고, Fig. 1A의 NIK에 의한 활성화의 경우와 마찬가지로 Hsp70와 IKKγ는 각각 IKKβ-EE에 의한 NF-κB의 활성화를 억제하였고, Hsp70와 IKKγ를 동시에 첨가하였을 때 NF-κB의 활성은 더욱 많이 억제되었다. 이 결과로부터 Hsp70와 IKKγ에 의한 NF-κB활성억제는 NIK에 의한

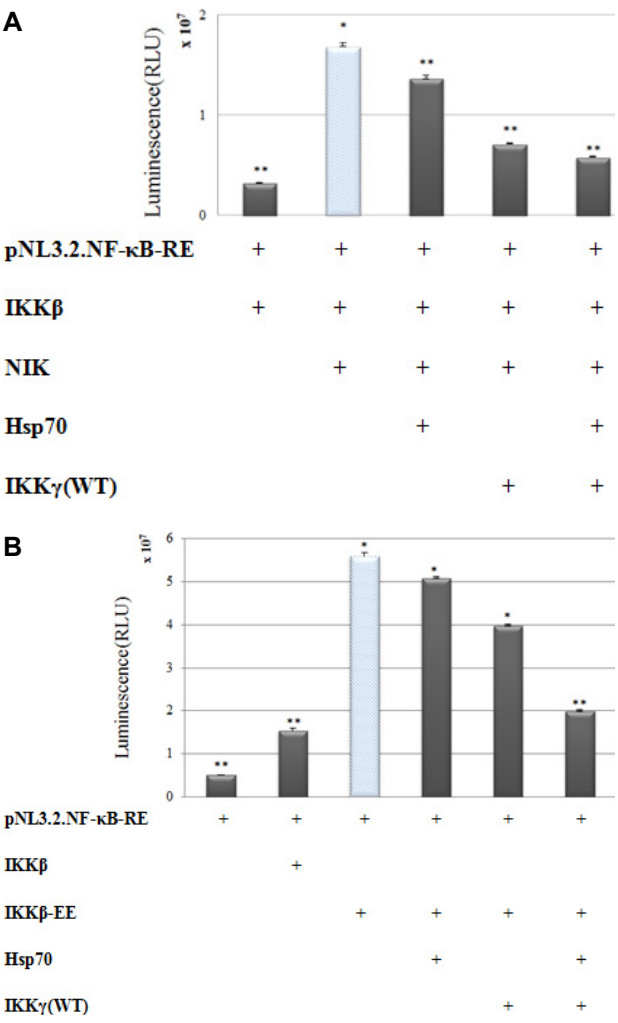

Fig. 1. Effect of Hsp70 and IKKγ on the activation of NF-κB. The COS-7 cells were co-transfected with pNL3.2.NF-κB-RE reporter plasmid and the expression plasmids of IKKβ, NIK, IKKβ-EE, Hsp70, wild type (WT) IKKγ as indicated. Luciferase assay was performed after 32 hr of transfection. (mean ± SD, n=3, *p<0.001, **p<0.0001)

NF-κB의 활성화에만 특이적으로 작용하는 것이 아니라 IKKβ를 경유하는 NF-κB의 활성화 경로 모두에 작용함을 알 수 있었다.

IKK complex에 의한 IκBα의 분해에 미치는 Hsp70 및 IKKγ의 영향

NF-κB는 비활성화 상태에서는 NF-κB의 세포 내 저해제인 IκBα에 결합되어 세포질에 머물러 있다가 활성화 될 때는 IκBα가 IKK complex에 의해 인산화되어 분해됨으로써 IκBα로부터 유리되어 핵 속으로 이동하여 작용하게 된다. 그러므로 NF-κB의 활성화 회로는 대부분의 경우 IκBα의 분해과정을 거치게 된다[8, 18, 22]. 본 연구의 경우도 Hsp70와 IKKγ에 의한 NF-κB 활성화 저해가 IκBα의 분해억제를 통해 일어나는지를

알아보기 위해 COS-7세포에 NIK, IKKβ, IKKβ-EE 및 Hsp70와 IKKγ 발현 plasmid를 co-transfection시켜 32시간 후에 cell lysate를 제작하고 Western blotting을 통해 세포 내 (endogenous) IκBα의 분해를 검토하였다. 그 결과 IKKβ는 NIK의 첨가에 의해 활성화되어 IκBα를 분해시키는 것을 확인하였다(Fig. 2A, lane 1, 2). 이와 비교하여 Hsp70와 IKKγ를 각각 첨가한 경우에서는 NIK에 의한 IκBα의 분해증가가 저해됨을 확인하였으며(Fig. 2A, lane 3, 4), 특히 IKKγ와 Hsp70을 함께 첨가하였을 때 IκBα의 분해가 가장 크게 저해됨을 알 수 있었다(Fig. 2A, lane5). 이 결과로부터 Hsp70와 IKKγ가 IκBα의 분해를 저해함으로써 NF-κB의 활성을 저해함을 알 수 있었다. 이어서 IKKβ의 활성형 mutant IKKβ-EE를 이용하여 같은 검토를 실시하였다. 그 결과 IKKβ-EE가 첨가되었을 때 IKKβ보다 IκBα의 분해가 증가되어 IKKβ-EE가 활성을 나타냄을 확인하였고(Fig. 2B, lane 1, 2), Hsp70와 IKKγ는 각각 IKKβ-EE에 의한 IκBα분해를 저해하였으며(Fig. 2B, lane 3, 4), Hsp70와 IKKγ를 동시에 첨가했을 때 IκBα의 분해저해가 더욱 크게 나타났다(Fig. 2B, lane 5). 그러나 Fig. 2의 endogenous IκBα의 분해시험에서는 Hsp70와 IKKγ의 저해효과가 두드러지게 크지 않았으므로 이 결과를 더욱 명확히 확인하기 위해 IκBα의 발현 plasmid를 이용하여 IkBα를 overexpression시킨

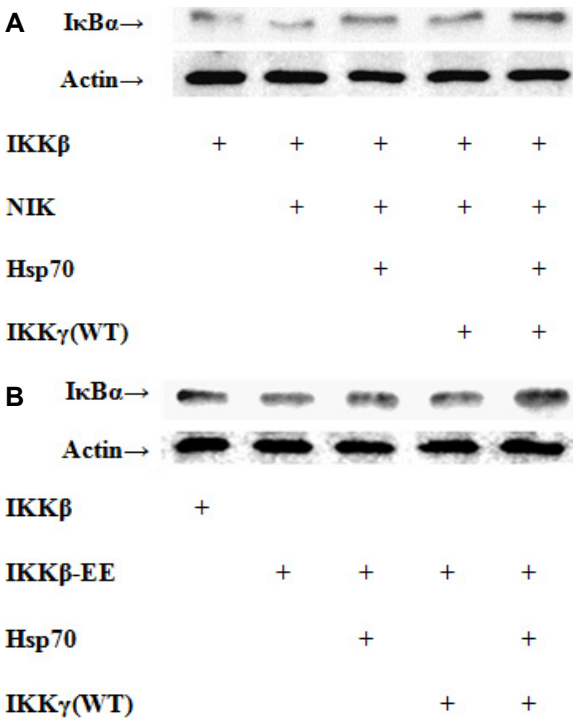

Fig. 2. Inhibitory effect of Hsp70 or IKKγ on the degradation of endogenous IκBα. Each expression plasmid was co-transfected into COS-7 cells and after 32 hr, the cells were harvested and the endogenous IκBα in the cytoplasmic extracts was assayed by Western blotting using anti-IkBα monoclonal antibody.

후 Hsp70와 IKKγ의 IκBα의 분해에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 overexpression된 Flag-tagged IkBα는 NIK에 의해 활성화된 IKKβ (Fig. 3A, lane 1, 2)와 활성형 mutant IKKβ-EE (Fig. 3B, lane 2)에 의해 분해되었으며, 이 분해는 Hsp70와 IKKγ에 의해 저해되었고(Fig. 3A, B, lane 3, 4), Hsp70와 IKKγ를 동시에 첨가하였을 때 가장 많이 저해되었다(Fig. 3A, B, lane 5).

IκBα는 IKK complex의 활성에 의해 인산화 된 후 분해되기 때문에 이 실험 결과로부터 Hsp70와 IKKγ는 IKK complex의 활성을 억제시켜 IκBα의 분해를 저해하고 이로 인해 NF-κB의 활성도 저해됨을 알 수 있었다. 또한 IKK complex에는 IκBα를 인산화 시키는 IKKα와 IKKβ가 존재하며 Fig. 2와 Fig. 3의 결과로부터 Hsp70와 IKKγ의 overexpression은 IKKβ의 활성

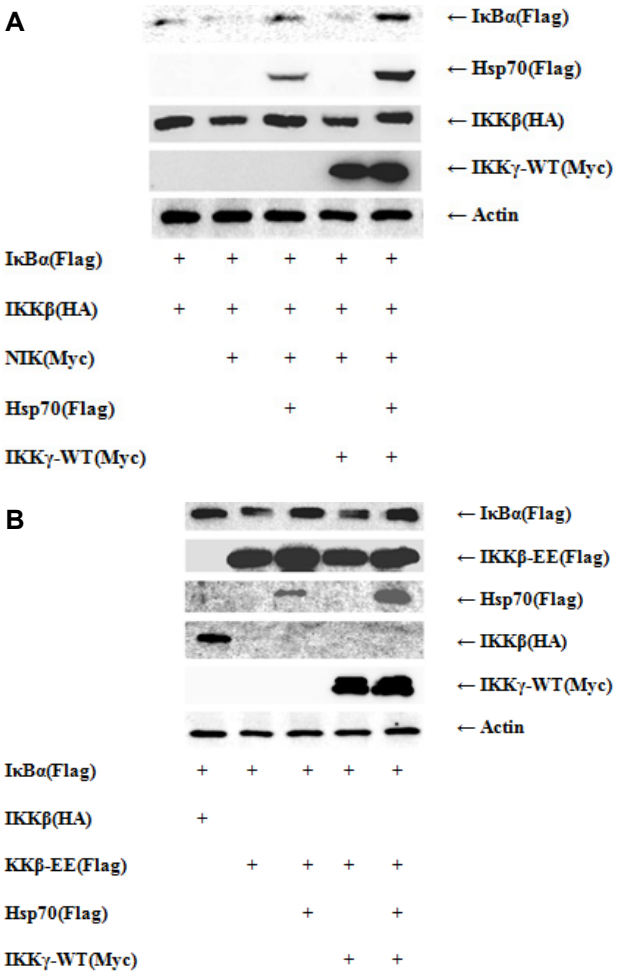

Fig. 3. Effect of Hsp70 and IKKγ on the degradation of overexpressed IκBα. Each expression plasmid was co-transfected into COS-7cells and after 32 hr, the cells were harvested and the IκBα in the cytoplasmic extracts was detected by Western blotting using anti-Flag antibody. The proteins expressed by transfected plasmids were detected by Western blotting using antibodies against tags.

을 저해할 것으로 추정할 수 있다. 또한 IKKβ-EE에서도 같은 결과가 나온 것으로 보아 Fig. 1B의 결과와 마찬가지로 Hsp70와 IKKγ는 NIK에 의한 NF-κB의 활성화 뿐만 아니라 IKKβ를 경유하는 모든 NF-κB의 활성화 경로를 억제할 것으로 추정할 수 있다.

IKKγ의 mutant를 이용한 Hsp70 및 IKKγ의 NF-κB 활성 조절 기전 검토

위의 결과에서 IKKγ는 Hsp70의 NF-κB 활성억제작용을 더욱 증가시키는 것으로 나타났다. 그러므로 Hsp70와 IKKγ의 NF-κB활성억제작용의 기전을 더욱 상세히 검토하기 위하여 IKKγ의 deletion mutant를 사용하였다. 사용한 IKKγ의 deletion mutant는 mouse IKKγ의 N-말단의 IKKβ결합부위 100아미노산이 결손된 ΔN과 C-말단의 Leucine Zipper (LZ) 부위와 Zinc Finger (ZF)부위를 포함하는 100아미노산이 결손된 ΔC mutant를 사용 하였다[14](Fig. 4). C-말단의 LZ와 ZF는 IKKγ의 결합을 유도하여 고분자 복합체 형성에 필요한 부위이다[17]. pNL3.2.NF-κB-RE reporter plasmid와 IKKβ, NIK, Hsp70, IKKγ-ΔN, IKKγ-ΔC의 발현 plasmid를 COS-7세포에 co-transfection시킨 후 cell lysate를 제작하여 luciferase assay로 NF-κB 활성을 검토 하였다. 그 결과 Fig. 5에 나타난 바와 같이 NIK은 NF-κB를 활성화 시켰고(Fig. 5, lane 2), IKKγ-ΔN과 IKKγ-ΔC에 의해 NF-κB 활성이 저해 되어(Fig. 5, lane 3, 5) IKKγ-ΔN과 IKKγ-ΔC는 wild type IKKγ와 마찬가지로 NF-κB를 억제하는 것으로 나타났다. 또한 이들 IKKγ mutants는 Hsp70와 함께 첨가되었을 때 NF-κB 활성 저해 효과가 더욱 크게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5, lane 4, 6). 이 결과로부터 IKKγ의 N말단에 의한 IKKγ와 IKKβ의 결합 및 C-말단에 의한 IKKγ의 고분자 형성은 NF-κB의 활성저해에 필요하지 않음을 알 수 있었다.

다음은 Hsp70와 IKKγ-ΔN, ΔC에 의한 NF-κB 활성 저해 기전을 IκBα분해에 대한 영향을 통해 알아보기 위해 IκBα의 overexpression plasmid를 이용하여 검토하였다. COS-7 세포에 Flag-tagged IκBα, Flag-tagged Hsp70, HA-tagged IKKβ, Myc-tagged IKKγ를 각각 다양한 조합으로 32시간 동안

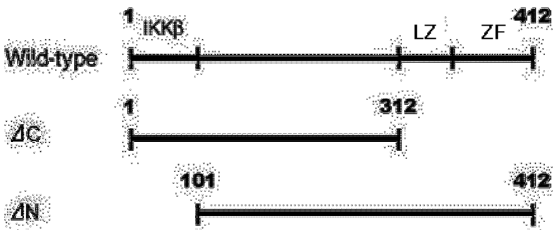

Fig. 4. The structure of wild-type and N- terminal, C- terminal deletion mutants of IKKγ. IKKβ binding domain at N-terminal and Leucine Zipper domain (LZ), Zinc finger domain (ZF) at C-terminal were shown. The numbers indicate the number of amino acids.

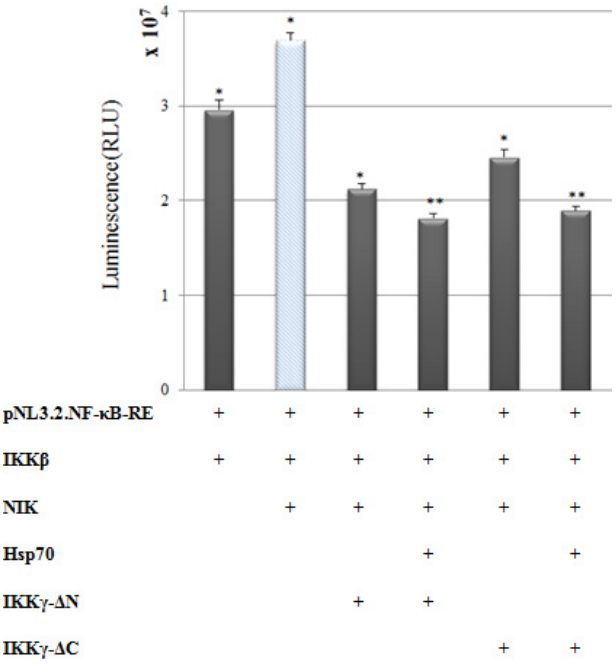

Fig. 5. Inhibition of NF-κB activation by IKKγ mutants and Hsp70. COS-7 cells were co-transfected with pNL3.2. NF-κB-RE reporter plasmid and the expression plasmids as indicated. Luciferase assay was performed after 32 hr of transfection. (mean ± SD, n=3, *p<0.001, **p<0.0001)

co-transfection한 후 cell lysate를 제조하여 anti-Flag antibody로 IκBα의 분해 정도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 IKKβ의 경우 NIK의 첨가에 의해 활성화 되어 IκBα의 분해가 증가 하였고(Fig. 6, lane 1, 2), Hsp70가 첨가되었을 때 IκBα의 분해가 저해 되는 결과를 얻었으며(Fig. 6, lane 3), Hsp70와 IKKγ가 함께 첨가 되었을 때 IκBα의 분해가 더욱 저해되는 것을 확인하였다(Fig. 6, lane 5). 이러한 현상은 IKKγ의 ΔN, ΔC mutant에서도 wild type IKKγ와 같이 나타났다(Fig. 6, lane 7, 9). 이 결과는 Fig. 5의 reporter gene을 이용한 검토의 결과와 일치하며, 이로부터 Hsp70는 IκBα의 분해를 억제함으로써 NF-κB를 저해하고, IKKγ는 Hsp70의 IκBα분해 억제작용을 상승시키며, 이 작용에 IKKγ N-말단의 IKKβ결합부위와 C-말단의 LZ, ZF부위는 필요하지 않음을 알 수 있었다. 아울러 Fig. 6의 3번째 panel에 나타난 바와 같이 IKKγ의 경우 wild type은 48 kDa, ΔN, ΔC는 약 35 kDa로 검출되어 예상된 크기의 IKKγ가 발현됨을 확인 할 수 있었고, IKKγ의 wild type과 ΔN은 C-말단의 인산화 부위를 포함하므로 인산화 정도에 따라 넓은 범위의 band로 검출되었고, ΔC는 C-말단의 인산화 부위가 제거되어 단일 band로 검출되어 예상한 대로 정상적으로 발현 되었음을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 Hsp70는 NF-κB의 활성을 억제하며 이 억제작용은 IKKγ가 첨가되었을 때 더욱 강해짐을 알 수 있었다.

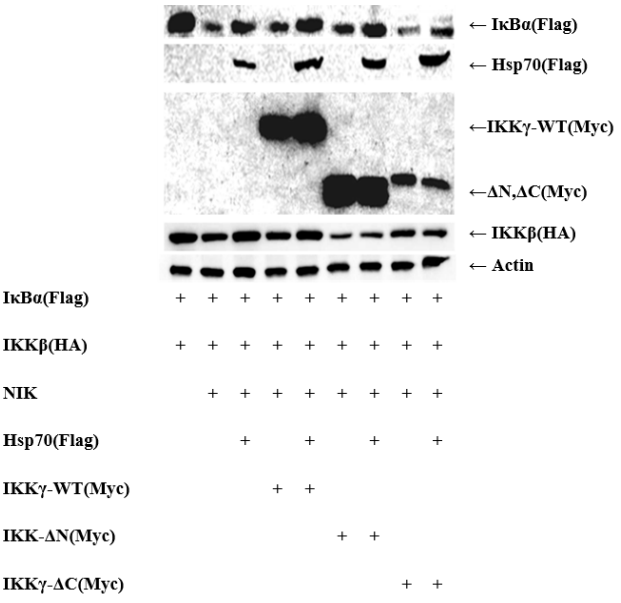

Fig. 6. Combined effect of Hsp70 and IKKγ on the degradation of IκBα. Each expression plasmid was co-transfected into COS-7 cells as indicated and after 32 hr, the cells were harvested and the proteins in cytoplasmic extracts were assayed by Western blotting using antibodies against tags.

Hsp70와 IKKγ에 의한 염증유발인자 COX-2의 발현 억제

Cyclooxygenase-2 (COX-2) 유전자는 NF-κB에 의해 발현이 증가되는 대표적인 유전자로서 염증을 유발하고 염증성 암의 원인이 되는 것으로 알려져 있으며 퇴행성 질환의 진행과정에도 관여하는 유전자이다[16, 35, 36]. 앞의 실험결과 Hsp70와 IKKγ가 상호협력적(synergistially)으로 NF-κB활성을 저해하는 효과를 나타내었으므로 이번에는 Hsp70와 IKKγ가 NF-κB의 target 유전자인 COX-2의 발현을 억제할 수 있는지 검토하였다. 이를 위해 RAW264.7 macrophage cell을 이용하였으며 RAW264.7은 LPS처리 시에 NF-κB의 활성화가 일어나 COX-2가 유도되는 대표적인 세포로 알려져 있다[33].

RAW264.7세포에 Hsp70와 IKKγ의 발현 plasmid를 co-transfection시킨 후 20시간 뒤에 0.5 μg/ml 농도의 LPS 용액을 12시간 처리 후 total cell lysate를 제작하여 COX-2의 발현을 western blotting으로 확인하였다. 그 결과 Fig. 7에 나타난 바와 같이 LPS를 처리하지 않은 RAW264.7 세포에서는 COX-2가 매우 소량으로 검출되었고 LPS를 처리하였을 때는 알려진 바와 같이 COX-2가 증가 하는 것으로 나타났으며, Hsp70와 IKKγ는 각각 COX-2발현을 억제하는 결과를 얻었다. 또한 Hsp70와 IKKγ을 함께 첨가하였을 때 COX-2의 발현 억제효과가 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 7, lane 5).

본 연구에서 얻은 결과를 종합하여 보면 Hsp70와 IKKγ를 함께 첨가 했을 때 NF-κB를 가장 효율적으로 저해할 수 있고

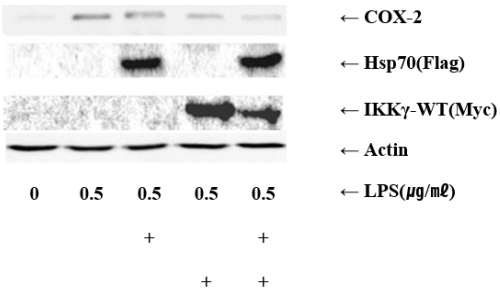

Fig. 7. Inhibition of COX-2 expression by Hsp70 and IKKγ. The RAW264.7 cells were co-transfected with expression plasmids of Hsp70 and wild type (WT) IKKγ as indicated and after 20 hr, the cells were treated with 0.5 μg/ml of LPS for 12 hr. The total cell extracts were assayed by Western blotting using anti-COX-2 polyclonal antibody.

아울러 NF-κB의 target유전자인 COX-2의 발현도 효과적으로 억제할 수 있다. 그러므로 Hsp70와 IKKγ의 적절한 사용방안을 모색한다면 COX-2를 비롯하여 NF-κB의 과다활성이 원인이 되는 각종 염증과 암에 관해 치료적 도움을 제공 할 수 있을 것으로 결론 내릴 수 있다.

고 찰

NF-κB는 세포에 가해지는 다양한 stress에 대한 방어작용과 면역세포의 활성화뿐만 아니라 세포의 사멸과 증식, 분화와 암화 등 세포에서 일어나는 변화에 매우 광범위하게 관여하고 있다는 사실이 밝혀지면서 NF-κB 활성의 적절한 조절이 각종 질병의 치료에 효율적으로 이용될 수 있다는 기대와 함께 많은 연구가 이루어지고 있다[5, 7, 15].

IKKγ는 IKKα, IKKβ와 함께 NF-κB의 활성화 경로에서 중추적인 역할을 하는 IKK complex의 구성성분이다. IKKγ는 효소활성이 없는 phosphoprotein이며 2개의 colid-coli domain과 C-말단에 1개의 Leucine zipper 및 Zinc finger domain을 가지고 있으며 N-말단에는 IKKβ와의 결합부위를 가지고 있다[6, 14, 17]. IKKγ가 결핍된 세포에서는 IKK의 고분자 복합체가 형성되지 않으며 TNF-α, HIV의 Tax, LPS 등에 의한 NF-κB 활성화가 일어나지 않는 것으로 알려져 있어 IKKγ는 세포가 다양한 자극에 반응하여 NF-κB가 활성화 되는 과정에서 중요한 중계역할 및 조절작용을 하는 것으로 생각 된다[14, 18, 34].

한편, 체내 방어기전을 수행하는 물질로 알려진 열충격단백질(Heat shock protein, Hsp)은 일시적인 열충격이나 sodium arsenite, 저산소증, 대사성 스트레스 등에 의해 유도되며, 그 중에서도 분자량이 70 kDa인 Hsp70가 가장 대표적이다[3, 31]. Hsp70는 단백질의 3차 구조를 보존하고 단백질 축적을 방지함으로써 세포를 보호하는 chaperon기능을 하는 것으로 알려져 있다[2, 30]. Hsp70는 스트레스요인에 의해 3차원구조

가 풀리거나 변성된 단백질을 원래의 상태로 활성화시키는 작용을 통해 신체 내 항상성을 유지하는 방어기전으로 작용한다. 이러한 이유로 최근 Hsp70는 알츠하이머, 루게릭병 및 각종 암과 관련하여 많은 연구가 진행되고 있다[3, 12, 27, 31]. 특히, 최근에 Hsp70에 의한 NF-κB의 활성조절 기전이 활발히 연구되어 염증을 비롯한 각종질병의 치료에서 Hsp70를 이용한 NF-κB의 활성제어가 주목을 받고있다[4, 13, 21, 24].

본 연구에서는 NF-κB의 signaling pathway에서 Hsp70의 역할을 명확히 하기 위하여 Hsp70와 IKKγ의 상호연관성을 검토하였다. 그 결과 Hsp70와 IKKγ는 각각 NF-κB의 활성을 억제하였으며 이 억제작용은 Hsp70와 IKKγ를 동시에 overexpression 시켰을 때 더욱 두드러지게 나타났다. 그리고 IKKγ의 N-말단에 존재하는 IKKβ binding domain과 C-말단의 Leucine zipper 및 Zinc finger domain이 결손 된 mutant IKKγ의 존재하에서도 NF-κB에 대한 활성억제효과는 wild type IKKγ의 경우와 동일하게 나타남으로써 IKKγ는 IKKβ와 결합하지 않은 상태로, 또한 고분자 복합체를 형성하지 않은 상태에서도 NF-κB를 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 그리고 Hsp70 및 IKKγ의 NF-κB 활성억제작용이 실제 NF-κB의 target 유전자의 발현에도 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RAW264.7세포를 이용하여 검토한 결과 Hsp70와 IKKγ의 overexpression이 COX-2의 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터 Hsp70와 IKKγ를 적절히 활용함으로써 NF-κB의 활성을 효과적으로 억제할 수 있으며, 이는 NF-κB의 과다활성에 의해 나타나는 각종 암과 염증성 질환의 예방과 치료에 활용 될 수 있음을 알 수 있다. Hsp70와 IKKγ에 의한 NF-κB활성억제의 구체적인 기전에 관해서는 Hsp70와 IKKγ의 결합여부, IKK complex 내에 Hsp70의 존재여부 및 역할 등을 검토하면 더욱 상세히 밝혀질 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 교신저자(김동완)에게 지원된 2015-2016년도 창원대학교 자율연구과제 연구비에 의해 이루어 진 것이며 이에 감사드립니다.

References

1. Amde, S., Joshua, M. and Marshall, S. 2008. IKKγ (NEMO) is involved in the coordination of the AP-1 and NF-κB pathways. *Mol. Cell. Biochem.* **310,** 181-190.
2. Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C. and Calderwood, S. K. 2000. Hsp70 stimulates cytokine production through a CD 14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* **6,** 435-442.
3. Blachere, N. E., Li, Z., Chandawarkar, R. Y., Suto, R., Jaikaria, N. S., Basu, S., Udono, H. and Srivastava, P. K. 1997. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted *in vitro*, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J. Exp. Med.* **186,** 1315-1322.
4. Cao, W., Li, M., Li, J., Li, C., Xu, X. and Gu, W. 2015. Geranylgeranylacetone ameliorate lung ischemia/reperfusion injury by Hsp70 and thioredoxin redox system : NF-κB pathway involved. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **32**, 109-115.
5. Chariot, A. 2009. The NF-κB-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. *Trends Cell Biol.* **19,** 404-413.
6. Criollo, A., Senonilla, L. and Authier, H. 2010. The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J.* **29,** 619-631.
7. DiDonato, J. A., Mercurio, F. and Karin, M. 2012. NF-κB and the link between inflammation and cancer. *Immunol. Rev.* **246,** 379-400.
8. Ghosh, G., Wang, V. Y., Huang, D. B. and Fusco, A. 2012. NF-κB regulation: lessons from structures. *Immunol. Rev.* **246,** 36-38.
9. Ghosh, S. and Febin Prabhu Dass, J. 2016. Non-canonical pathway network modelling and ubiquitination site prediction through homology modelling of NF-kB. *Gene* **581**, 48-56.
10. Hayden, M. S. and Ghosh, S. 2008. Shared principles in NF-κB signaling. *Cell* **132,** 344-362.
11. Hinz, M., Arslan, S. C. and Scheidereit, C. 2012. It takes two to tango: IκBs, the multifunctional partners of NF-κB. *Immunol. Rev.* **246,** 59-66.
12. Kalmar, B., Lu, C. H. and Greensmith, L. 2014. The role of heat shock proteins in Amylotrophic Lateral Sclerosis: The therapeutic potential of Arimoclomol. *Pharmacol. Ther.* **141**, 40-54.
13. Kretz-Remy, C., Munseh, B. and Arrigo, A. P. 2001. NF-κB-dependent transcriptional activation during heat shock recovery: thermolability of the NF-κB·IκB complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 43723-43733.
14. Kwon, W. J., Kim, S. H., Park, Y. O., Cho, M., Kang, C. D., Lee, G., An, W. G., Joo, W. H. and Kim, D. W. 2004. IKKγ inhibits activation of NF-κB by NIK. *Mol. Cells* **18,** 200-206.
15. Lawrence, T. and Fong, C. 2010. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-κB. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42,** 519-523.
16. Li, S., Ma, X., Ma, L., Wang, C., He, Y. and Yu, Z. 2013. Effects of ectopic HER-2/neu gene expression on the COX-2/PGE2/P450arom signaling pathway in endometrial carcinoma cells: HER-2/neu gene expression in endometrial carcinoma cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **32,** 11-17
17. Li, X. H., Fang, X. and Gaynor, R. B. 2001. Role of Ikkγ/NEMO in assembly of the ikappa B kinase complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 4494-4500.
18. Mauro, C., Pacifico, F., Lavorgna, A., Mellone, S., Iannetti, A., Acquaviva, R., Formisano, S., Vito, P. and Leonardi, A. 2006. ABIN-1 binds to NEMO/IKKγ and co-operates with A20 in inhibiting NF-κB. *J. Biol. Chem.* **281,** 18482-18488.
19. Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A.,

Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B. and Rao, A. 1997. Ikk-1 and Ikk-2: Cytokine-activated ikappa B kinase essential for NF-kB activation. *Science* **278**, 860-866.
20. Morgan, M. J. and Liu, Z. G. 2011. Crosstalk of reactive oxigen species and NF-κB signaling. *Cell Res.* **21,** 103-115.
21. Nivon, M., Richet, E., Codogno, P., Ariigo, A. P. and Kretz-Remy, C. 2009. Autophagy activation by NF-κB is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy* **5,** 766-783.
22. Oeckinghaus, A., Hayden, M. S. and Ghosh, S. 2011. Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nat. Immunol.* **12**, 695-708.
23. Prashanth, A. K. and Levine, A. J. 2010. p53 and NF-κB: different strategies for responding to stress lead to a functional antagonism. *FASEB J.* **24,** 3643-3652.
24. Quaglio, A. E., Castilho, A. C. and Di Stasi, L. C. 2015. Experimental evidence of heparanase, Hsp70 and NF-kB gene expression on the response of anti-inflammatory drugs in TNBS-induced colonic inflammation. *Life Sci.* **141**, 179-187.
25. Rapino, F., Abhari, B. A., Jung, M. and Fulda, S. 2015. NIK is required for NF-kB-mediated induction of BAG3 upon inhibition of constitutive protein degradation pathway. *Cell Death Dis.* **6**, e1692.
26. Regula, K. M., Ens, K. and Kirshenbaum, L. A. 2002. IKKβ is required for Bcl-2-mediated NF-κB activation in ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **277,** 38676-38682.
27. Repalli, J. and Meruelo, D. 2015. Screening strategies to identify Hsp70 modulators to treat Alzheimer's disease. *Drug. Des. Devel. Ther.* **9**, 321-331.
28. Ritossa, F. A. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophillia*. *Experientia* **18,** 571-573.
29. Smale, S. T. 2011. Hierarchies of NF-κB target-gene regulation. *Nat. Immunol.* **12,** 689-694.
30. Srivastava, P. 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2,** 185-194.
31. Udono, H. and Srivastava, P. K. 1993. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J. Exp. Med.* **178**, 1391-1396.
32. Vasudevan, K. M., Gurumurthy, S. and Rangnekar, V. M. 2004. Suppression of PTEN expression by NF-κB prevents apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **24,** 1007-1021.
33. Yamada, H., Kikuchi, S., Inui, T., Takahashi, H. and Kimura, K. 2014. Gentiolactone, a secoiridoid dilactone from *Gentiana trifola*, inhibits TNF-α, iNOS and Cox-2 mRNA expression and blocks NF-kB promoter activity in murine macrophages. *PLoS One* **9**, e113834.
34. Yamamoto, Y., Kim, D. W., Kwak, Y. T., Parajapati, S., Verma, U. and Gaynor, R. B. 2001. IKKγ/NEMO facilitates the recruitment of the IκB proteins into the IκB kinase complex. *J. Biol. Chem.* **276,** 36327-36336.
35. Zha, L., Chen, J., Sun, S., Mao, L., Chu, X., Deng, H., Cai, J., Li, X., Liu, Z. and Cao, W. 2014. Soyasaponins can blunt inflammation by inhibiting the reactive oxygen species-mediated activation of PI3K/Akt/NF-kB pathway. *PLoS One* **9**, e107655.
36. Zhan, P., Qian, Q. and Yu, L. 2013. Prognostic value of COX-2 expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J. Thorac. Dis.* 40-47.

초록 : Hsp70와 IKKγ에 의한 NF-κB 활성억제의 상승효과

김미정[1†] · 김가혜[1†] · 김문정[1] · 김진익[1] · 최혜정[2] · 문자영[1] · 주우홍[2] · 김동완[1*]
([1]창원대학교 생명보건학부, [2]창원대학교 생물화학융합부)

NF-κB는 anti-apoptotic gene을 유도하는 전사인자로서 대부분의 세포의 생존에 필요하다. 그러나 NF-κB가 많은 종류의 암세포에서 지속적으로 과다 활성화됨이 알려지면서 NF-κB의 활성억제가 암의 예방과 치료에 유효하다는 점이 알려지게 되었다. 한편, Hsp70가 NF-κB의 활성을 조절한다는 사실이 알려지면서 Hsp70를 이용한 암예방과 치료가 주목받게 되었으나 아직 Hsp70에 의한 NF-κB의 활성조절기전은 명확하지 않다. 본 연구에서는 Hsp70에 의한 NF-κB의 활성조절과정에서 IKK complex의 구성성분인 IKKγ의 역할을 검토하였다. IKKγ의 wild type과 deletion mutants를 이용하여 Hsp70와 관련된 NF-κB의 활성조절을 연구한 결과 Hsp70는 NF-κB의 활성화를 억제하였으며, 이러한 억제효과는 IKKγ가 과발현되었을 때 더욱 증가하였다. 또한 IKKγ의 N-말단의 IKKβ 결합부위와 C-말단의 Leucine zipper 및 Zinc finger부위는 Hsp70와 연관된 NF-κB억제작용에 필요하지 않는 것으로 나타났으며, Hsp70와 IKKγ에 의한 NF-κB의 활성억제는 IκBα의 인산화와 분해를 저해함에 의해 일어나는 것으로 나타났다. 또한 RAW264.7 macrophage세포에서 LPS에 의한 COX-2의 발현유도는 Hsp70와 IKKγ가 동시에 발현 되었을 때 가장 효과적으로 억제되었다. 이상의 결과로부터 Hsp70에 의한 NF-κB의 활성억제작용은 IKKγ에 의해 상승됨을 알 수 있었으며, Hsp70와 IKKγ를 적절히 이용하면 NF-κB의 과다활성에 의해 발생하는 각종 질병의 예방과 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.