Journal of the Korean Chemical Society
2008, *Vol. 52, No. 5*
Printed in the Republic of Korea

탄저병 치사독소 저해제의 *in vitro* 스크리닝 및 *in vivo* 분석

박해철 · 박혜연 · 윤문영*
한양대학교 화학과
(2008. 7. 11 접수)

In Vitro Screening and *In Vivo* Analysis of Anthrax Lethal Factor Inhibitor

Hae-Chul Park, Hye-Yeon Park, and Moon-Young Yoon*
Department of chemistry, Hanyang university, Seoul 133-791, Korea
(Received July 11, 2008)

요 약. 탄저병의 원인이 되는 독소 가운데 하나인 치사요소는 단백질 가수분해 효소의 활성을 가지며 세포내의 MEK1 단백질을 가수분해하여 세포의 신호전달 체계에 손상을 입히며 궁극적으로 세포를 사멸 시킨다. 본 연구에서는 이러한 치사요소의 활성을 이용하여 in vitro 상에서 GST-MEK1 단백질을 기질로 사용하여 화합물 스크리닝을 통한 치사요소의 활성을 억제하는 화합물을 선별하였다. In vitro에서 재조합 LF의 단백질 가수분해 활성을 확인 하였고 스크리닝에 이용될 금속 이온들의 농도를 결정 하였다(50 M Ca^{2+} 및 5 mM Mg^{2+}). *In vitro* 스크리닝을 통하여 지금까지 보고된 적이 없는 선별된 화합물 유도체인 2,6-Dimercapto-3,5-diphenyl-thiopyran-4-one(FBS00831) 화합물의 IC_{50}가 100 μM 이었다. *In vivo* 상에서 검정하기 위하여 FBS00831 화합물의 활성을 RAW 264.7 세포주를 이용하여 적절한 세포 농도(12.5%) 및 DMSO(4%) 농도를 결정하였다. *In vivo* 상에서 FBS00831은 대조군으로 사용된 단백질 가수분해 효소 저해제로 알려진 GM6001(80% 복원)에 비하여 약 67%의 세포증식을 복원하였다. 본 화합물의 유도체 합성 및 기능기 치환 등을 통하여 LF의 활성 억제 가능성이 있는 선도 화합물을 합성할 수 있을 것으로 판단된다.

주제어: 탄저병, 치사요소, 2,6-Dimercapto-3,5-diphenyl-thiopyran-4-one, *in vitro* and *in vivo* 스크리닝

ABSTRACT. A chemical library was screened for inhibition of lethal factor (LF), one of anthrax toxin, by in vitro and in vivo analysis. Lethal factor has proteolytic activity to cleave MEK1 protein. This proteolytic activity was used for in vitro screening of chemicals by using GST-MEK1 as a substrate of lethal factor. The optimum metal ion concentrations for high proteolytic activity of LF were 50 M $Ca^{2+}$and 5 mM Mg^{2+}. 2,6-Dimercapto-3,5-diphenyl-thiopyran-4-one (FBS00831) was a strong inhibitor of LF and showed IC_{50} = 100 M by in vitro analysis. RAW 264.7 cell line and DMSO concentrations were established to 12.5% and 4% respectively. After treatment with protective antigen, lethal factor was endocytosed into RAW 264.7 cells, which were treated by FBS00831 for in vivo assay. 1.2 mM FBS00831 recovered 67% cell viability as compare to 80% recovery by GM6001 (known metalloprotease inhibitor) at 0.4 mM concentration.

Keywords: Anthrax, Lethal Factor, 2,6-Dimercapto-3,5-diphenyl-thiopyran-4-one, *in vitro* and *in vivo* Screening

서 론

탄저병은 대표적인 그램 양성균 인 *Bacillus* 속의 *anthracis* 종에서 발현되는 독소단백질에 의해 발병되며 lethal factor(LF)는 탄저병을 일으키는 3가지 독소 가운데 한 가지 독소 단백질이다.[1~3] LF 이외에 탄저를 일으키는 독소는 protective antigen(PA)와 edema factor(EF)가 존재한다. 이 세 가지 단백질은 단독적

으로는 독소의 활성을 나타낼 수는 없으며 PA와 LF 및 EF가 결합하여 LeTx 및 EdTx를 형성하면 병원성을 나타낸다. PA는 세포의 표면에 있는 수용체인 anthrax toxin receptor(ATR)에 결합하여 heptamer를 형성하여 LF 및 EF 를 세포 내로 유입 시키는 역할을 담당한다.[4~6] 그 중 LF와는 lethal toxin(LeTx)을 형성하여 세포 내부로 LF의 유입을 유도한다. 현재 EF의 저해제 연구 개발도 진행 되고 있지만[18] 보다 많은 연구가 LF 또는 PA연구 개발에 집중 되고 있다. LF는 세 가지 독소 단백질 중 금속 의존적(Zn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}) 단백질 가수분해 활성을 가지고 있는데, 세포 내의 기질로는 MKKS[MAPK(mitogen-activated protein kinase)kinase] 등의 단백질로 보고되어 있다.[7-8] LF는 기질 단백질인 MEK1 단백질의 아미노 말단 부위의 아미노산을 절단한다. 현재는 LF의 기질로서 MEK1 단백질 이외에도 여러 가지 단백질 들이 보고되고 있다.[19]

탄저병이 발병되면 수 시간 내에 혈액을 통하여 몸으로 퍼지고 24시간 이내로 사망에 이르게 되며 또한 *B. anthracis*에 의해 생성되는 포자는 체내에서 60일까지 잠복할 가능성이 있기 때문에 매우 위험한 질병이다.[9] 이러한 이유로 바이오테러의 주요 살상 무기로 사용된다. 현재 탄저병의 진단 및 치료 의 목적으로 많은 연구가 활발히 진행되고 있으며 본 연구에서는 탄저병의 치사독소로 알려진 LF의 단백질 가수분해 활성을 억제 할 수 있는 화합물들을 선별하기 위하여 *in vitro* 및 *in vivo* 검정을 통하여 화합물들을 screening 하였다. 화합물 라이브러리의 *in vitro* 검정을 위하여 LF의 기질로는 *Kim et al.*[10]을 이용하여 GST-MEK1를 분리 정제 하고 SDS-PAGE를 이용해서 기질의 절단을 단백질의 크기 및 절단 된 단백질의 농도를 비교하여 각 화합물의 활성 검정을 하였다. *In vitro* screening에서 FBS00831 화합물의 LF 활성 억제 활성을 확인 하였다. 그리고 선별된 화합물인 FBS00831의 *in vivo* 활성 검정을 위하여 LeTx에 반응을 보이는 쥐의 대식세포 세포주인 RAW 264.7[11~14]을 이용하여 다른 탄저 독소 단백질인 PA와 동시에 RAW 264.7에 처리하여 cell line 차원에서도 화합물의 활성을 확인 하였다. *In vivo* 활성검정을 위하여, 먼저 세포의 농도, 화합물의 농도, 및 탄저 치사독소의 처리 농도 등 검정에 필요한 조건을 구하는 실험을 진행하였다. 각 화합물의 활성은 MTT[15]를 이용하여 세포의 생존을 측정해서 검정하였다. 비록 *in vivo* 활성 검정의 결과는 *in vitro* 검정과 비교하였을 때 IC_{50} 값은 증가 하였지만 LF 활성을 억제하는 경향을 확인 할 수 있었다.

본 실험에서는 *in vitro* 및 *in vivo* screening을 통하여 선별된 FBS00831 화합물의 차후 탄저 치료제로서의 가능성을 확인 하였고, 나아가 이 화합물들의 유도체 합성 등을 통하여 더욱 발전된 화합물을 개발 할 수 있는 가능성을 보여 주었다.

재료 및 방법

화합물 라이브러리 및 시약

모든 화합물 라이브러리는 한국 화학 연구원 내 한국 화합물 은행(대전)에서 제공 받아 사용하였다. 대조군으로 사용된 GM6001화합물은 Calbiochem에서 구입하여 사용 하였다. 세포 배양에 이용된 배지는 DIFCO에서 구입하여 사용하였다. 이하 실험에 사용된 모든 시약은 Sigma, Biobasic 및 MP biotech 회사에서 구입하여 사용하였다.

LF, PA, 및 GST-MEK1의 분리 정제

LF 및 PA는 6His tag을 fusion 시켜 Ni-sepharose resin(GE healthcare)을 이용하여 분리, 정제 하였다.[10] 그리고 GST-MEK1은 GST tag을 fusion 시켜 GSH-sepharose resin(peptron)을 이용하여 분리, 정제하였다.[10] 정제 된 재조합 LF, PA, 및 GST-MEK1은 glycerol을 10% 되게 첨가하여 -70 °C에 보관하여 사용하였다. 분리된 LF의 단백질 가수분해 활성 검정은 단백질 가수분해 효소 억제제로 알려진 화합물인 GM6001 (Calbiochem)[16]을 대조군으로 이용하여 비교 분석하였다.

In vitro LF 단백질 가수 분해 활성 검정

LF의 단백질 가수분해 활성 검정을 위하여 25 mM Hepes pH 7.4, 1 mM DTT, 10% glycerol, 50 μM $CaCl_2$, 5 mM $MgCl_2$을 포함하는 반응용액을 사용하였다.[10] 먼저 LF(0.25 μg)를 반응용액에 첨가하여 200 μM GM6001 (Calbiochem) 및 1 μl DMSO와 10분간 전반응을 한 다음 기질 단백질인 GST-MEK1(1 μg)을 첨가하여 37 °C에서 30분간 반응하였다. 기질-효소의 몰 비율은 효소의 농도가 포화된 비율인 1 : 3이 되게 하였다. 30 분 후 5X loading buffer를 첨가하여 반응을 종료 하고 5분간 95 °C에서 반응 후 SDS-

PAGE 를 이용하여 전기영동 하고 Coomasie bule를 이용하여 염색 후 후 반응물을 분석하였다.

In vitro 화합물 라이브러리 스크리닝

모든 화합물 라이브러리는 한국 화학 연구원 내 한국 화합물 은행(대전)에서 제공 받아 사용하였다. 각각의 화합물은 DMSO에 녹인 상태로 사용을 하였다. 화합물 라이브러리를 앞에서 설명한 반응용액에 DMSO 부피의 1 uL에 상응하는 556 M의 농도로 첨가하고 LF(0.25 μg)와 10분간 37 °C에서 전 반응을 하였다. 그리고 기질 단백질 GST-MEK1(1 μg)을 첨가하여 30분간 37 °C에서 반응 하였다. 30분 후 5X loading buffer를 첨가하여 반응을 종료 하고 5분간 95 °C에서 반응 후 각각의 화합물 이 포함된 반응물을 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동 하고 Coomasie bule를 이용하여 염색 후 반응물을 분석하였다. 그리고 LF의 활성을 저해하는 화합물들을 대조군인 GM6001의 반응물과 비교하여 선별하였다.

In vivo 화합물 검정 조건 탐색 및 *in vivo* 화합물 검정

*In vitro*에서 선별된 화합물들의 *in vivo* 검정을 위하여 먼저 세포주에 대한 조건 확립 실험을 진행하였다. 쥐의 대식세포 세포주인 RAW 264.7 세포주를 96 well plate(SPL)에 넣어주고 10% fetal bovine serum (FBS; DIFCO)가 함유된 DMEM(DIFCO)에서 배양하였다. 먼저 *in vivo* 실험을 위하여 실험에 이용 될 세포농도를 100% 세포 농도에서 1/2 배수로 희석하여 12시간 동안 37 °C에서 배양 후 배지를 제거하고 0.5 g/L 농도의 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide(MTT; MP biotech) 시약을 100 μl 처리하여 4시간 더 배양 후 200 μL DMSO을 처리하여 formazan 침전물을 녹여 570 nm에서 UV/Vis spectrophotometer을 이용하여 흡광도를 측정하여 최적 농도를 결정하였다. 모든 세포의 배양은 5% CO_2 유지 상태에서 세포 배양을 하였다. 그리고 화합물 라이브러리의 용매인 DMSO 및 세포주의 농도 영향을 알아보기 위해 DMSO 및 세포주를 농도별로 처리하여 세포의 생장에 영향을 주지 않는 농도 및 세포가 적절히 사멸 하는 농도를 결정하였다.

In vivo 화합물 검정을 위하여 96 well plate에 RAW 264.7 세포주를 1시간 배양 후 각 화합물들을 1.2 mM의 농도로 1시간동안 처리하였다. 1시간 후 LeTx를 3000 ng/mL의 농도로 처리하여 5시간 동안 배양 후 배지를 제거하고 MTT를 처리하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 각 화합물의 LF 활성 저해 활성을 검정하였다. 대조군으로는 화합물 처리 대신에 DMSO를 동일한 조건으로 처리하여 배양하였다.

결과 및 고찰

In vitro LF 단백질 가수 분해 활성 검정

LF, PA, 및 GST-MEK1은 각각 6HIS tag 및 GST tag을 fusion 시켜 분리, 정제 하여 배양액 1 L 당 각각 5 mg, 3 mg, 및 2.7 mg을 얻었다(data not shown). 먼저 재조합 LF의 활성 검정을 위하여 재료 및 방법에서 언급한데로 GST-MEK1을 기질로 하여 단백질 가수분해 활성을 검정하였다.[10] *Fig*. 1에서 보는 바와 같이 0.25 μg의 LF를 사용하여 1 μg의 GST-MEK의 절단을 SDS-PAGE 전기영동을 통하여 확인하였다. SDS-PAGE 전기영동이 끝난 후 size maker를 제외한

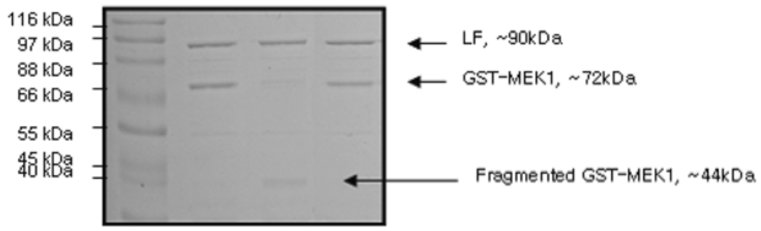

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of in vitro proteolytic activity assay of recombinant LF and GST-MEK1. The reaction was performed in the buffer containing 25 mM Hepes pH 7.4, 1 mM DTT, 10% glycerol, 50 μM $CaCl_2$, and 5 mM $MgCl_2$ at 37 °C for indicated time. The reaction was terminated by adding 5 μl of 5x SDS/loading buffer and boiling for 5 min. Lane 1, size marker; 2, LF reaction with GST-MEK1 for 0 min; 3, LF reaction with GST-MEK1 for 30 min; 4, LF reaction with GST-MEK1 for 30 min with GM 6001.

각 lane에는 총 3가지의 단백질 band를 관찰 할 수 있었다. 단백질들의 크기에 따라 첫 번째로 위치하는 band는 LF이고 두 번째로 위치하는 band는 절단되지 않은 GST-MEK band 이다. 그리고 세 번째는 LF에 의해 잘려진 단백질 fragment인 MEK1(~Ile9) 이었다. 재조합 LF에 의한 GST-MEK1의 절단 부위는 MEK1 단백질의 아미노 말단 (Pro8~Ile9)이기 때문에 SDS-PAGE상에서 단백질의 크기 차이를 이용하여 절단된 MEK1(~44 kDa)를 확인 할 수 있었다 (*Fig*. 1). *Fig*. 1의 lane 2~4에서 2번의 결과는 LF와 GST-MEK1을 0분 동안 반응 시킨 결과이고, 3번, 4번은 30분 동안 반응을 시킨 결과이다. Lane 3에서 GST-MEK1의 band 는 LF 에 의해 잘려 없어지고 절단 된 MEK1 band를 확인 할 수 있었다. 하지만 lane 4번은 GST-MEK1의 절단 반응이 재조합 LF에 의해 일어나는 것을 확인하기 위하여 대조군으로 사용된 기존에 보고된 LF 활성 억제제로 알려진 GM6001의 반응 조건에서는 LF의 활성이 억제되어 GST-MEK1 band가 그대로 남아 있는 것을 확인 할 수 있다. 이와 같은 결과는 재조합된 LF와 GST-MEK1 단백질의 활성이 나타나는 것을 보여주는 것이며 이 실험을 통하여 대조군 이외에 여러 다른 화합물을 동시에 처리 하여 LF 활성 억제의 활성을 가지는 화합물 검출을 가능하게 하였다. 그리고 잘려진 기질의 band intensity를 비교하여 그 화합물의 LF 활성 억제 정도를 대조군과 비교 할 수 있었다.

또한 LF는 금속 의존적 단백질 가수분해 효소로 알려져 있다.[7-8] 따라서 2가 양이온 금속들인 Ca^{2+}, Mg^{2+}, 및 Zn^{2+}등을 단독 또는 혼합하여 반응에 첨가하여 LF 의 활성을 실험하였다(*Fig*. 2, 3). *Fig*. 2에서 보는 바와 같이 금속이온들이 없는 조건이거나 단독으로 존재하는 조건 하에서는 LF의 활성이 있는 조건도 있지만 그렇지 않은 조건도 있었다. Lane 5,6번은 Mg^{2+}이 처리된 조건으로서 GM6001이 존재하는 조건과 그렇지 않은 조건에서 정상적인 LF의 활성을 보였으나 GM6001에 의한 LF의 저해가 조금 약한 점을 관찰 할 수 있었다. Lane 7,8,9 및 10 번은 각각 Ca^{2+} 및 Zn^{2+}가 처리된 조건으로서 Ca^{2+}의 경우는 GM6001에 의한 LF의 활성 저해를 관찰 하지 못하였고, Zn^{2+}의 경우에는 LF의 단백질의 활성 저

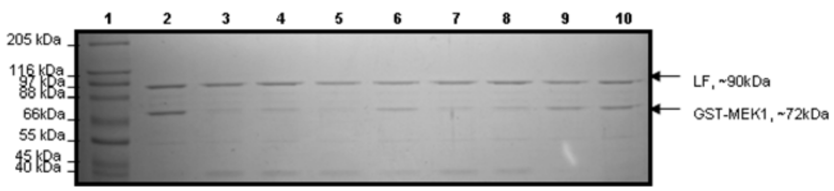

Fig. 2. SDS-PAGE analysis of metal ion effect on *in vitro* LF activity. The reaction was performed in the buffer containing 25 mM Hepes pH 7.4, 1 mM DTT, 10% glycerol, and the indicated metal ions at 37 °C for 0 or 30 min (Concentration of metal ions: Zn^{2+}, 50 M of $ZnCl_2$; Ca^{2+}, 50 M of $CaCl_2$; Mg^{2+}, 5 mM of $MgCl_2$). The reaction was terminated by adding 5 µl of 5x SDS/loading buffer, followed by boiling for 5 min. Twenty l of sample was resolved on 12% SDS/PAGE. Lane 1, size marker; 2, LF reaction with GST-MEK1 for 0 min; Reaction in the absence of metal ion: 3, with GM 6001 and 4, without GM 6001; Reaction in the presence of $MgCl_2$: 5, with GM 6001 and 6, without GM 6001; 7 and 8, $CaCl_2$ with or without GM 6001; 9 and 10, $ZnCl_2$ with or without GM 6001.

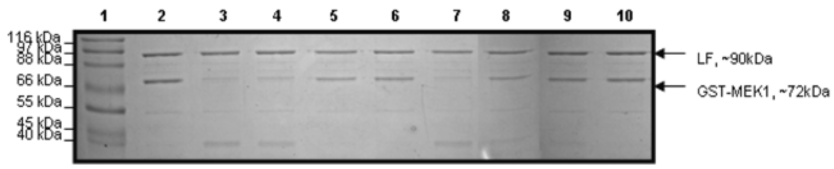

Fig. 3. SDS-PAGE analysis of mixed metal ions effect on in vitro LF activity. Three conditions of mixed metal ions group, $ZnCl_2$/$MgCl_2$, $CaCl_2$/$MgCl_2$, and $ZnCl_2$/$CaCl_2$, were tested with or without GM 6001. The reaction was performed in the buffer containing 25 mM Hepes, pH 7.4, 1 mM DTT, 10% glycerol and the indicated metal ions at 37 °C for 0 or 30 min (Concentration of metal ions: Zn^{2+}, 50 µM of $ZnCl_2$; Ca^{2+}, 50 µM of $CaCl_2$; Mg^{2+}, 5 mM of $MgCl_2$). The reaction was terminated by adding 5 µl of 5x SDS/loading buffer, followed by a boiling for 5 min. Twenty µl of sample was resolved on 12% SDS/PAGE.

해를 관찰 할 수 있었다.

따라서 metal ion을 독립적으로 처리하는 방법 보다 2종류씩 혼합하여 실험 조건에 첨가하여 LF의 활성 관찰 및 GM6001에 의한 정상적인 활성 저해를 실험하였다(*Fig*. 3). *Fig*. 3에서, 3가지의 서로 다른 금속이온들의 조건에서 LF의 단백질 가수분해 활성 검정을 실시한 결과 Ca^{2+} (50 μM)/ Mg^{2+}(5 mM) 조건에서 LF의 활성이 정상적으로 관찰되었다. 반대로 Zn^{2+}가 첨가된 Zn^{2+}/Ca^{2+} 및 Zn^{2+}/Mg^{2+} 조건에서는 LF의 활성이 저해됨을 관찰 할 수 있었다. 이 결과는 *Fig*. 2의 결과와도 일치 하는데, 독립적으로 3종류의 metal ion을 첨가 한 실험 조건에서 Zn^{2+}가 존재하는 조건에서는 LF의 활성이 정상적으로 관찰되지 않았다. 비록 LF가 metal dependent protease이지만 재조합 LF를 분리, 정제하는 과정에서 이미 발현용 균주인 *E. coli* BL21 DE3 내에 존재하는 $ZnCl_2$와 결합하게 되어 오히려 *in vitro*에서의 실험 과정 중 $ZnCl_2$의 첨가는 LF의 활성을 저해 하는 효과가 나타났다. 이 결과를 토대로 하여 차후 *in vitro*에서의 LF 저해제 screening에서는 LF가 최대 활성을 나타내는 조건인 $CaCl_2/MgCl_2$가 첨가된 조건에서 screening을 진행하였다.

화합물 screening은 Hwang *et al*.[17] 로부터 한국 화학연구원에서 제공받은 약 5,000 여개의 화합물에서 1차 선별된 48개의 화합물에 대한 실험을 진행하였다(*Fig*. 4). 모든 화합물은 DMSO에 용해되어 있는 상태로 실험 중 control로 사용된 조건에는 같은 부피의 DMSO를 첨가하여 DMSO의 LF에 대한 영향도 같이 실험을 진행 하여 외부의 영향 없이 screening을 실시하였다.

In vitro 화합물 라이브러리 스크리닝

Fig. 4에서, 총 48개의 화합물을 *in vitro*에서 분석하였다. 모든 화합물의 농도를 15 M로 처리하여 screening을 실시하였다. SDS-PAGE를 이용한 GST-MEK1 절단 결과를 확인한 결과 총 48개의 화합물 중 20E4 화합물의 LF 활성 저해 활성이 가장 높게 나타났다. *Fig*. 4의 마지막 lane의 대조군으로 사용된 GM6001의 결과와 비교했을 때, SDS-PAGE 상에서 GST-MEK1의 band intensity는 낮았지만 어느 정도 GST-MEK1의 band가 존재 하는 것으로 보아 LF의 단백질 가수분해 활성이 저해 되었다는 것을 알 수 있다. 비록 20E4 화합물의 LF 활성 억제의 정도가 낮지만 이는 실험에 사용된 20E4 화합물의 농도가 낮고, 또한 화합물의 purity 등과도 관련된 문제로 생각된다. 그러나 다른 화합물들과 비교를 했을 때 어느 정도 LF 활성 저해 활성이 있다고 생각되어지며 차 후 화합물의 유도체 등을 합성하여 LF 활성 억제에 있어서 좋은 후보 물질이 될 수 있다고 생각된다. 화합물 은행에서 수령한 화합물들은 그 농도가 한정이 되어 있어서 농도별로 화합물 처리를 하여 실험을 하고자 할 때는 반드시 같은 부피의 DMSO를 첨가하여 DMSO의 영향도 같이 확인하여야 한다. *Fig*. 5에서는 선별된 20E4 화합물을 LF에 농도별로 처리한 실험 결과를 나타내었다. 이를 위하여 앞서 언급한대로 DMSO를 같은 부피별로 처리하여 DMSO에 대한 영향도 동시에 실험하였다.

Fig. 5에서 20E4 화합물을 농도별로 처리하여 실험을 진행 하면서 동시에 화합물의 농도증가에 따른

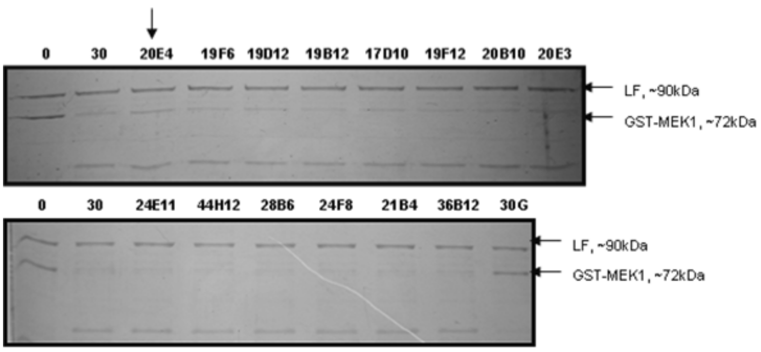

Fig. 4. SDS-PAGE analysis of chemical screening for inhibition of LF activity. Total 48 chemicals were analyzed in vitro. Each lanes represent the chemical number and 0/30 represent the incubation time. The reaction was performed as described in materials and methods. The arrow represents the chemical which shows inhibition of LF activity.

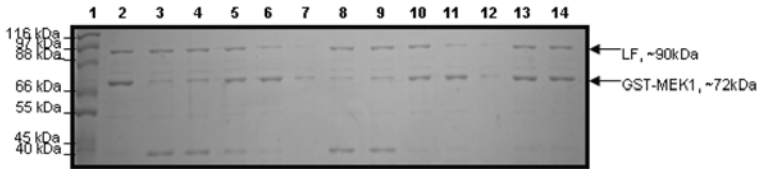

Fig. 5. SDS-PAGE analysis of concentration dependent inhibition of LF activity by 20E4 and the effect of DMSO concentration on LF activity.

DMSO 부피의 변화에 대한 실험도 진행하였다. SDS-PAGE 상에서 전체적으로 DMSO의 부피가 증가할수록 LF 단백질의 band가 사라지는 현상을 관찰 할 수 있었는데, 이는 DMSO 때문에 단백질 침전이 발생하였다. 또한 20E4 화합물의 농도가 증가 하면서 LF의 활성이 더욱 감소함을 확인 할 수 있었다. 이는 LF의 활성이 20E4 화합물에 의해 활성이 억제됨을 다시 한 번 증명하는 결과이다. 이 결과를 토대로 하여 20E4 화합물의 합성 유도체 들을 화합물은행에 의뢰하여 제공 받아 총 4가지의 화합물 유도체를 *in vitro*에서 실험을 진행하여 1가지의 화합물(FBS00831)이 LF의 활성을 억제하는 것을 확인하였다.

Fig. 4의 결과에서 선별된 20E4 화합물의 유도체 총 4개를 합성하여 LF 활성 억제 실험을 진행하였다 (data not shown). 이중 FBS00831(*Fig*. 9) 화합물이 LF 활성 억제 활성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물을 농도별로 처리 하여 화합물이 없는 조건의 기질 band 를 100% 로 하여 약 IC_{50} 값을 구하였다(*Fig*. 6). 화합물의 IC_{50} 값은 화합물의 농도가 증가 하면서 기질 단백질인 GST-MEK1 의 band intensity 를 측정하여 약 100 M의 IC_{50} 값을 구하였다. 이 IC_{50} 값은 대조군인 GM6001의 45 μM IC_{50} 값에 비해 약

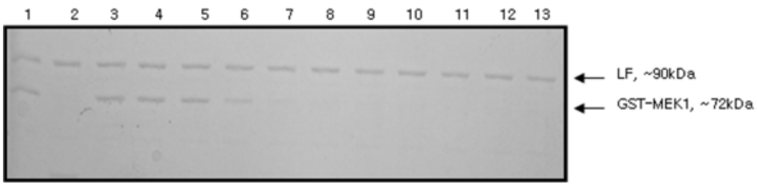

Fig. 6. SDS-PAGE analysis of concentration dependent inhibition of LF activity by FBS00831. Lane 1, LF reaction with GST-MEK1 for 0 min; lane 2, LF reaction with GST-MEK1 for 30 min; lane 3~13, LF reaction with GST-MEK for 30 min, with FBS00831 in the range of 830 μM~0.4 μM.

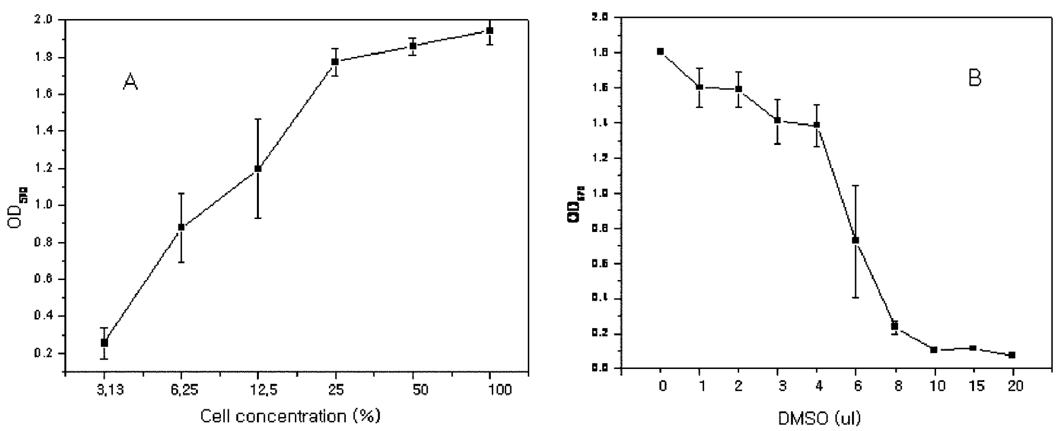

Fig. 7. *In vivo* establishment for cell concentration (A) and DMSO concentration (B). Each concentration of cells were incubated for 24 hours and treated with MTT for cell viability at indicated concentration of cell (A). Cytotoxicity of DMSO to cells were measured at various DMSO concentrations (B).

2배정도 높기 때문에 약 1/2의 LF 저해 활성을 보이는 것으로 생각 된다.

FBS00831 화합물의 *in vivo* 검정 조건 탐색 및 *in vivo* 검정

FBS00831 화합물의 *in vivo* 검정을 위하여 적절한 in vivo 조건 실험을 진행하였다.

화합물의 용매인 DMSO의 세포 독성 및 cell viability 측정을 위한 적절한 세포주의 농도를 실험하여 결정하였다(*Fig*. 7). 100% 배양된 세포주를 단계별 희석을 통하여 24시간 배양 후 각 세포 농도에서 MTT를 처리하여 각각의 흡광도를 측정 하였다(*Fig*. 7A). 각 농도에서의 흡광도(OD 570)는 2.0에서 0.2 범위에서 측정 되었다. 본 실험에서는 가장 적절한 값인 0.9~1.2 범위의 흡광도를 선택하여 *in vivo* 검정에 사용하였다. 또한 용매의 세포 독성 실험을 위하여 DMSO를 농도별(0~20 μl)로 처리하여 세포의 사멸을 측정하였다. 6 μl(6%, v/v) 이상 부피의 DMSO가 처리된 실험 조건에서는 cell viability 가 현저히 감소하는 현상을 관찰 할 수 있었다. 이는 6%(v/v) 이상의 화합물을 처리하면 cell viability를 측정하는데 어려움이 있기 때문에 최대 부피는 4 μl(4%, v/v)로 선택하여 이에 상응하는 화합물의 농도를 최대로 처리 하여 in vivo 검정을 진행하였다(*Fig*. 7B). *Fig*. 7의 조건을 이용하여 *in vitro*(SDS-PAGE analysis)에서 선별된 화합물인 FBS00831의 *in vivo* 검정을 하였다(*Fig*. 8A, B). 반응에 처리된 FBS00831의 농도는 0~1.2 mM로 사용 하였다. FBS00831 화합물 자체의 세포 독성을 테스트 한 결과 세포의 성장에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 따라서 이 화합물을 LeTx와 함께 처리하여 LF의 활성을 억제하는 실험을 한 결과 대조군인 GM6001과 비교했을 때 약 1.2 mM에서 약 67%의 cell viability를 회복시키는 것으로 관찰 되었다. 또한 대조군인 GM6001은 약 0.4 mM의 농도에서 약 80%의 cell viability를 회복시키는 것으로 나타났다. *In vivo* 에서의 LF 활성저해 활성은 *in vitro*와 비교하였을 때 더 높은 농도의 IC_{50} 값이 예상 되었다(~1 mM). FBS00831 화합물의 구조를 *Fig*. 9에 나타내었다. 위 화합물은 thiopyran구조가 기본 골격으로 구성된 분자량 M.W=328. 47 크기의 화합물로서 *in vitro* 및 *in vivo* 모두에서 LF 활성 억제 활성을 나타내었다.

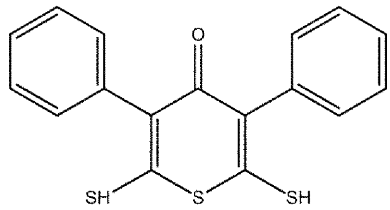

Fig. 9. Chemical structure of 2,6-Dimercapto-3,5-diphenylthiopyran-4-one (FBS00831).

결 론

본 연구에서는 기존의 *in vitro*(SDS-PAGE) LF 활성 억제 방법을 적용하여 처음으로 LF 활성을 억제하는 화합물을 선별 하였다. 본 연구에서 사용한 방법은 SDS-PAGE 를 이용한 시각적인 화합물의 활성을 관찰 할 수 있었으며 각 화합물에 대한 뛰어난 재현성을 보였다. 정제된 LF의 단백질 가수분해 활성을 최대로 나타내는 조건을 탐색하여 스크리닝에 사용하였다. 또한 Ca^{2+}(50 μM) 및 Mg^{2+}(5 mM)의 존재

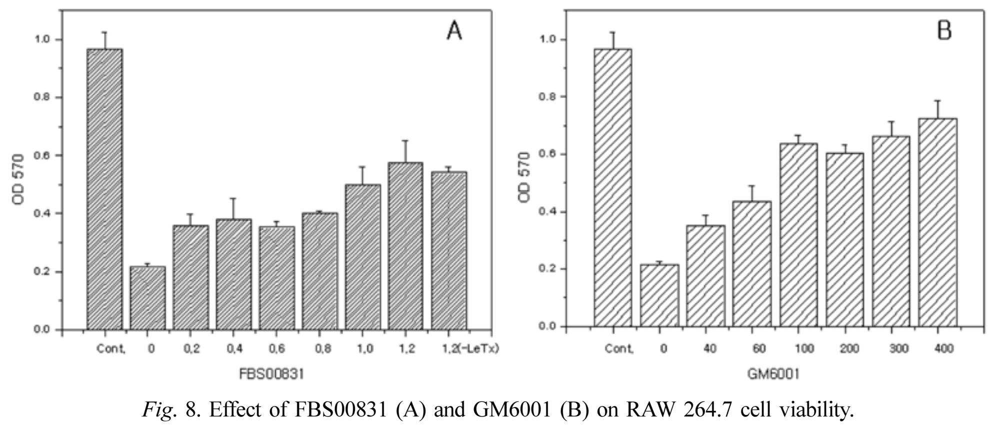

Fig. 8. Effect of FBS00831 (A) and GM6001 (B) on RAW 264.7 cell viability.

하에서 LF의 활성이 최대로 유지 되었다. *In vitro* 검정에서 선별된 화합물인 FBS00831(*Fig*. 9) 은 thiopyran 골격을 가지는 화합물로서 LF의 대상 세포인 RAW 264.7 세포주에서도 활성이 검증 되었다(~1 mM IC_{50}). *In vitro*상태와 비교하였을 때 FBS00831 화합물이 in vivo상태에서 현저히 높은 IC_{50} 값이 예상 되지만 세포 독성 시험결과 해당 세포주에는 영향을 주지 않기 때문에 위 화합물을 기본 골격을 통하여 여러 가지 유도체 들을 합성하고 시험하여 탄저 치사독소억제제 후보화합물로 사용될 수 있을 것으로 생각된다 . 현재 FBS00831 화합물은 본 연구 이외에는 어떠한 LF 활성 억제의 활성이 보고된 바가 없는 상태이며 비록 대조군인 GM6001과의 활성 비교에서는 낮은 LF 활성 억제 현상(67% IC_{50})을 보였지만 유도체 합성 및 기능기 치환 등을 통하여 차 후 LF의 활성 억제 가능성이 있는 후보 화합물로 판단된다. 또한 화합물 구조와 효소 단백질 사이의 컴퓨터 모델링 연구를 통하여 더욱 강한 억제효과를 나타내는 화합물의 구조를 유추하여 차후 탄저 억제제 연구에 있어서 좋은 선도 실험이 될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 2006 년도 산학 협동재단 의 학술 연구비 지원에 의해 수행된 과제 이며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Leppla, S. H., *Acdemic press*., **1998**, *165*, 103.
2. Mock, M. and Fouet, A., *Annu. Rev. Microbiol.*, **2001**, *55*, 647.
3. Morton, M. and Swartz, M. D., *New Eng. J. Med.*, **2001**, *345*, 1621.
4. Beauregard, K. E.; Collier, R. J.; Swanson, J. A., *Cell Microbiol.*, **2000**, *2*, 251.
5. Collier, R.J. and Young, J. A., *Annu. Rev. cell Dev. Biol.*, **2003**, *341*, 815.
6. Grossier, F. and Mock, M., *Toxicon.*, **2001**, *39*, 1747.
7. Duesery, N. S.; Webb, C. P.; Leppla, W. H.; Gordon, V. M.; Klimpel, K. R.; Copeland,, T. D.; Ahn, N. G.; Oskarsson, M. K.; Fukasawa, K.; Paull, K. D.; Woude, G. F. B., *Science*, **1998**, *280*, 734.
8. Klimpel, K. R.; Arora, N.; Leppla, S. H., *Mol. Mocrobiol.*, **1994**, *13*, 1093.
9. Gietz, D.; Jean, A. St.; woods, T. A.; Schiestl, T. H., *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *20*, 1425.
10. Kim, J.; Kim, Y. M.; Koo, B. S.; Chae, Y. K.; Yoon, M. Y., *Protein Exp. & Puri.*, **2003**, *30*, 293.
11. Koo, H. M.; VanBrocklin, M.; McWilliams, M. J.; Leppla, S. H.; Duesbery, N.S.; Woude, G. F., *Proc. Natl. Acad. Sci*., **2002**, *99*, 3052.
12. Popov, S. G.; Villasmil, R.; Bernardi, J.; Grene, E.; Cardwell, J.; Popova, T.; Wu, A.; Alibek, D.; Bailey, C.; Alibek, K., *FEBS Lett*., **2002**, *527*, 211.
13. Popov, S. G.; Villasmil, R.; Bernardi, J.; Grene, E.; Cardwell, J.; Wu, A.; D.; Alibek, C. B.; Alibek, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **2002**, *283*, 349.
14. Bernasconi, P.; Woodworth, A. R.; Rosen, B. A.; Subramanian, M. V.; Siehl, D. L., *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 1381.
15. Babich, H. and Borenfreund,, E., *Appl. Environ. Microbiol*., **1991**, *57*, 2101.
16. Turk, B. E.; Wong, T. Y.; Robert Schwarzenbacher; Emily T Jarrell; Stephen H Leppla; R John Collier; Robert C Liddington & Lewis C Cantley, *Nature Structural & Molecular Biology,* **2003**, *11*, 60.
17. Hwang, H.; Kim, J.; Choi, K. J.; Park, H.; Chung, H.; Han, S. H.; Koo, B. S.; Park, J. S.; Yoon, M. Y., *Kor. J. Microbiol.*, **2006**, *42*, 195.
18. Jimenez, M. E.; Bush, K.; Pawlik, J.; Sower, L.; Peterson, J. W., *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **2008,** in press.
19. Kim, J.; Park, H.; Jang, M. H.; Han, S. H.; Chung, H.; Lee, J. S.; Park, J. S.; Yoon, M. Y.; *Arch. of Biochem. and Biophys.,* **2008**, *472*, 58.