

제2차년도
연차·최종보고서

승인번호: BSBC160M-199043-1

p53 항암유전자에 의한 암억제기전의 연구

Study of Tumor Suppression Mechanism by p53 Tumor
Suppressor Gene

주관연구기관: 생명공학연구소

보건복지부

■ 연차

연구개발결과보고서

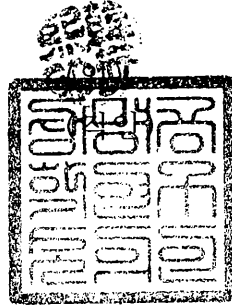
□ 최종

1998 연도 암정복추진연구개발사업에 의하여 완료한 " p53 항암유전자에 의한 암억제기전의 연구 "의 연차·최종연구개발결과보고서를 암정복추진연구개발사업 처리규정 제20조의 규정에 의하여 제출합니다.

1999 년 7 월 12 일

주관연구책임자
주관연구기관장

한 문 희
복 성 해



보건복지부장관 귀하

구비서류

1. 결과보고서 30부.
2. 요약문(국문) 5부.
3. 자체평가의견서 12부.
4. 참여기업의견서 2부(해당시)
5. 보고서 내용 수록 디스켓(3.5인치 *.HWP) 2매. 끝.

편집순서 2

제 출 문

보건복지부장관 귀하

이 보고서를 “p53 항암유전자에 의한 암억제기전의 연구에 관한 연구” 과제
의 연차·최종결과보고서로 제출합니다.

1999 . 7 . 12 .

주관연구기관명 : 생명공학연구소

주관연구책임자 : 한 문 희

연 구 원 : 신 득 용

연 구 원 : 채 희 돈

연 구 원 : 윤 진 호

협동연구기관명 : 단국대 의대

협동연구책임자 : 이 민 철

요 약 문

p53 항암유전자에 의한 암억제기전의 연구

한문희¹, 신득용¹, 채희돈¹, 윤진호¹, 이민철²

생명공학연구소¹, 단국대학교 의대²

목적 : p53 유전자는 전체 암의 55% 이상에서 변이가 발견되고 대부분의 암 유발 바이러스가 p53의 기능을 방해한다. 그러므로 p53 항암유전자의 암억제기능을 분석함으로써 p53 항암유전자 변이를 가지는 암세포를 효과적으로 소멸시킬 수 있는 분자적수단의 개발이 가능할 것이다.

방법 : cdk1의 p53 의존성 발현에 관여하는 promoter element 와 전사인자의 탐색 및 전사활성 조절기전을 규명하기 위하여 cdk1 promoter의 5' sequential deletion mutant 및 각 전사인자 binding site의 mutant를 제작하고 p53(+) HepG2 세포주에 mutant p53 발현백터와 cotransfection 하고 mutant p53에 의한 promoter의 활성 증가를 비교 검토한다. 반대로 p53 inducible 세포주 (EJ-p53)에 도입한 후 p53 발현 유도하고 promoter 활성의 감소를 비교한다. p53의 cdk1발현 제어에 관여하는 CCAAT-binding 전사인자탐색을 위한 gel shift assay를 수행한다. 세포주기를 G1/S에서 동조한 후 p53 발현을 유전자치료용 p53-adenovirus로 유도하고 세포주기 진행, cdk1 및 cyclin B 발현, cdk1 활성 변화를 분석하며 동조화세포에 cdk1 활성의 복원을 위해 cdk1의 인산화 mutant와 cyclin B를 ectopic 발현시킨다.

결과 : 본 연구 결과 p53에 의한 cdc2/cyclin B 유전자 발현에 관여하는 cis-acting element인 CCAAT 위치를 동정하였으며, 이 위치에 결합하는 trans-acting factor들로서 NF-Y 및 CBF를 발견하였다. 또한, p53에 의한 cdc2/cyclin B의 발현억제에 NF-Y의 기능이 필요함을 확인하였다. p53에 의한 세포주기 G2 정지 분석 시스템을 확립하였으며, p53에 의하여 억제된 cdc2-cyclin B 활성의 복원 및 이에 의한 세포주기 G2 정지의 bypass됨을 확인하였다.

연구결과의 활용계획 : p53의 세포주기 G2 제어기능을 이용한 p53 변이암세포의 사멸유도수단과 p53의 세포주기 조절유전자 발현억제기전을 이용한 p53 변이 암세포 사멸유도수단을 개발에 도움이 될 것이다. 또한 방사선을 이용한 p53 변이암세포의 선택적 사멸을 유발할 수 있는 기술 개발에 기초가 될 것이다.

중심 단어 : p53, 암, 세포주기, cdc2

원본자료 제공

(*) 본 연구는 1998년도 보건복지부 암정복추진연구개발사업 지원(주관연구책임자 한문희)으로 이루어진 것임.

SUMMARY

Study of Tumor suppression mechanism by p53 tumor suppressor gene

M.H.Han¹, D.Y.Shin¹, H.D.Chae¹, J.H.Yun¹, M.C.Lee²

Protein Function Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon, Korea¹, School of Medicine, Tanguknal Medical Center, Cheonan, Korea².

Purposes : The p53 tumor suppressor protein regulates the transcription of regulatory genes involved in cell cycle arrest and apoptosis. We have reported previously that inducible expression of the p53 gene leads to the cell cycle arrest both at G1 and G2/M in association with induction of p21 and reduction of mitotic cyclins (cyclin A and B) and cdc2 mRNA. In this study, we investigated a mechanism by which p53 regulates transcription of the cdc2 gene.

Methods : Transient transfection assay using reporter constructs containing cdk1 gene promoter and gel shift assay were carried out to elucidate the transcriptional regulation mechanism of cdk1 gene by p53.

Results : Transient transfection analysis showed that wild type p53 repressed, while various dominant negative mutants of p53 increased cdc2 transcription. Repression of the cdc2 promoter activity was not detected in cells transfected with a transactivation mutant p53. An adenovirus oncoprotein, E1B-55K inhibits the p53-mediated repression of cdc2 promoter, but E1B-19K did not. Since the cdc2 promoter does not contain a TATA sequence, we performed deletion and point mutation analysis and identified the inverted CCAAT sequence located at 76 as a cis-acting element for the p53-mediated regulation. We found that a specific DNA-protein complex was formed at the CCAAT sequence and this complex contained the NF-Y transcription factor. Consistently, a dominant negative mutant of the NF-YA subunit, NF-YAm29, decreased the cdc2 promoter and p53 did not further decrease the promoter activity in the presence of NF-YAm29. These results suggest that p53 negatively regulates cdc2 transcription and the NF-Y transcription factor is required for the p53-mediated regulation.

Usefulness : These results could be a important reference in p53-deficient cancer therapy by using p53 induced cell growth arrest. These will be also helpful to develop gamma irradiation therapy for p53-deficient cancer.

Key Words : Cancer, p53, Cell Cycle

(*) This study was supported by a grant of the 1998 Korean National Cancer Control Program, Ministry of Health & Welfare. R. O. K.(Principle Investigator Mun Hui Han)

CONTENTS

1. Abstract
2. Contents
3. Introduction
4. Present Researches
5. Results
6. Accomplishment
7. Application of results
8. References

목 차

제 1 장 서론

제 2 장 국내·외 연구개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참고문헌

제 1 장. 서론

- 세포주기의 진행은 엄격하게 조직된 질서에 따라 세포의 모든 구성성분이 복제되고 동등하게 분열이 이루어지는 세포기능의 기본적인 과정이다.
- 세포주기는 세포주기의 진행 여부를 결정하는 G1기, DNA 복제가 이루어지는 S기, 세포분열을 준비하고 복제된 DNA의 상태를 점검하고 세포분열을 위한 준비를 완료하는 G2기, 세포분열을 일어나는 M기를 순서대로 진행된다.
- 세포주기 조절기능의 연구는 주로 G1 checkpoint를 중심으로 이루어져 왔다. 그러나 최근의 본 연구진 및 외국의 연구 결과는 세포주기 G2기 조절기능이 항암 기능에 중요하며 특히 암세포의 항암제에 대한 감수성을 결정하는 중요한 요인임을 시사하고 있다.
- Taxol을 비롯한 대부분의 항암제가 G2 check point의 조절에 관여하는 machinery의 dysregulation을 유발함으로써 암세포 특이적 세포치사를 유도한다.
- 특히 흥미로운 최근의 연구는 Taxol이 p53+ 세포보다 p53 mutation을 가지는 암세포에 훨씬 효과적으로 작용하는 것이 밝혀졌다 (Bristol-Myer).
- 이는 암세포의 G2 정지 기능에 이상이 있을 경우 microtubule formation등을 방해하는 drug이 효과적으로 암세포의 세포치사를 유도하기 때문이다.
- 세포주기 G2기는 세포분열을 위한 모든 준비를 완료하고 DNA 복제 및 변이를 점검하고 세포분열의 시작을 결정하는 세포주기의 주요 check point 이다.
- G2 특이적 유전자의 전사 조절 기작을 규명함으로써 세포주기 G2기 조절 및 세포치사 유도에 의한 암 억제기작의 실체를 밝히고자한다.

제 2 장 국내·외 연구개발 현황

1. 암억제유전자의 발견

암(종양) 생물학의 역사에서 1980년대를 발암유전자 (oncogene)의 시대라고 기록한다면 1990년대는 암 억제유전자 (tumor suppressor gene)의 시대로 기록될 것이라는 MIT의 Weinberg박사의 예언대로 암 억제유전자의 연구가 1990년대의 초반부터 빠른 속도로 발전해오고 있다. 1980년대 초반부터 시작된 인체 암세포로부터의 발암유전자의 발견은 전세계 암 생물학계를 흥분과 기대로 가득차게 하였다. 그러나 암의 발생을 세포증식을 조절하는 일부 유전자의 dominant mutation으로 설명하려는 시도는 곧 한계에 부딪치게 되었고 암의 발생에 중요한 기능을 가지는 새로운 유전자군의 발견으로 인하여 암 생물학의 중심적인 위치를 암 억제유전자에게 내어주게 되었다 (1).

1969년 Harris 박사와 그의 동료들은 정상세포에는 암 억제인자 (tumor suppressive factor)가 존재한다는 결과를 발표하였다 (2). 암세포와 정상세포의 융합으로 생성된 융합세포는 tumorigenicity를 상실한다는 이 모델은 암 억제인자의 상실에 의한 암 발생이라는 새로운 모델을 제시한 것이다. 이 결과는 인체의 암은 바이러스 혹은 화학물질에 의한 우성적인 변이에 의한 것이라는 당시의 지식수준으로는 전혀 받아들일 수 없는 엉뚱한 주장이었고, 결국 20년 동안이나 학계의 주목을 받지 못한 채 암 생물학의 구석에서 묻혀 있어야만 했다.

1971년에는 Knudson박사가 당시의 암 발생 개념에 수정을 요구하는 또 하나의 중요한 결과를 발표하였다 (3). 그는 유아기에 발생하는 망막종양 (childhood retinoblastoma)의 연구를 통하여 암 발생의 'Two-Hit' 가설을 제창하였다. 유전성 망막종양 (Familiar retinoblastoma)의 경우 부모로부터 물려받은 한쪽 대립유전자의 변이 (susceptibility locus의 변이 혹은 germ line mutation)에 이어서 정상적인 다른 한쪽의 대립유전자에 2차 변이가 일어남으로서 발생하고, 후천성 종양 (sporadic form)은 동일 세포 내에서 양쪽 대립유전자에 2개의 변이가 연속적으로 발생하여 일어난다고 주장하였다. 그러나 Knudson의 가설도 Harris박사 등의 연구와 마찬가지로 당시 학계의 주목을 받지 못하였으며 그 이후 상당기간 Two-Hit 가설을 증명할 수 있는 실험적인 방법이 개발되지 못하였다.

그러나 1980년대의 중반부터 염색체분석 기술의 발전에 의하여 Cavenee 박사 등은 RFLP (restriction fragment length polymorphism)을 이용한 염색체 분석을 통하여 유전성 망막종양의 암세포에서 13번 염색체의 q14번 band에 위치한 유전자의 결손 (LOH, loss of heterozygosity)을 발견하였다. 즉 암세포에서 발견되는 13q14 band의 LOH (loss of heterozygosity)는 부모로부터 유전된 한쪽의 대립유전자 (mutant allele)의 변이에 이어서 다른 한쪽의 정상적인 대립유전자의 상실을 초래한다고 발표하였다 (4). 이 결과는 Knudson박사의 Two-Hit 가설을 명백하게 증명해주는 것이다. 곧 이어서 13q14에 위치하는 retinoblastoma 유전자 (Rb) cDNA가 세균 대의 연구실에서 경쟁적으로 클로닝 됨으로서 암 억제 유전자의 실체가 최초로 증명되었고 세포증식을 제어하는 유전자의 기능상실에 의하여 암이 발생한다는 새로운 패러다임이 형성되기 시작하였다. 1989년에는 발암유전자로 생각해왔던 p53 유전자가 암 억제유전자로 밝혀졌고 대부분의 암에서 약 50-60%의 빈도로 발견되는 암 발생의 공통적인 유전적 결손인 것이 밝혀짐으로서 암 억제유전자의 기능상실이 암 발생의 중요한 과정인 것이 분명해졌다 (4).

2. p53 암억제 유전자의 발견

1979년 Lane박사와 Crawford박사는 SV40 tumor virus에 의하여 transform (형질전환)된 세포에

서 large T항원과 결합하는 분자량 53 kd의 단백질 (p53)을 발견하고, 이 단백질을 SV40에 의한 transformation에 관여하는 세포성 인자로 발표하였다 (5). 곧 이어서 human, mouse 등의 p53 유전자가 분리되었다. p53 단백질이 암세포에서 많이 존재하고 정상세포에서는 거의 검출되지 않는 수준으로 발현되기 때문에 p53유전자의 고발현이 세포의 발암과정에 관여할 것이라고 생각되었다. 또한 암세포에서 분리한 p53 유전자를 ras 혹은 myc등의 발암유전자와 동시에 REF세포에 transfection 하면 transformation을 유도한다는 사실은 p53 유전자를 발암유전자로서 인식하게 하였다 (6). 그러나 약 10년간에 걸친 oncogene 으로서의 p53 유전자의 기능해석은 1989년 전혀 예상하지 못하였던 방향으로 전환되었다. 1989년 미국 princeton 대학의 Anold Levine박사연구팀과 이스라엘 와이즈만 연구소의 Moshe Oren박사연구팀이 각각 wild type p53 유전자의 분리에 성공하고 이를 정상 및 암세포에 도입한 결과 p53 유전자는 정상세포의 transformation을 유도하는 것이 아니라 오히려 세포의 형질변환 (transformation)을 억제하며, 암세포의 tumorigenecity를 억제한다는 사실이 밝혀졌다 (7). 이로서 p53 유전자를 암 억제유전자로 재 명명하고 전혀 새로운 방향으로 활발한 연구가 시작되었다.

3. p53 유전자의 변이와 암

p53 유전자의 변이는 인체 종양에서 약 50%-60%의 고빈도로 발견된다. 이것은 인체종양에서 발견되는 발암 혹은 암 억제 유전자들의 변이율 중에서 가장 높은 빈도이다. p53 유전자상의 변이의 대부분은 DNA 결합부위의 'Hot Spot'으로 불리는 특정부분에 집중되어 나타난다. 대부분의 carcinoma에서는 missence 변이가 나타나고, sarcoma에서는 deletion, insertion, 혹은 arrangement가 주로 발견된다 (1). 또한 각 조직의 종양에서 유전자의 변이율과 변이의 Hot Spot이 서로 다른 경우도 있다. 자궁경부암의 경우에는 p53 유전자의 변이율이 낮지만 대장암의 경우는 약 70%의 암세포에서 p53의 변이가 발견된다 (4).

p53 유전자의 germ-line 변이가 유전성 종양의 하나인 Li-Fraumeni syndrom이 나타나는 가계도의 유전자 분석을 통하여 발견되었다. 이는 knudson박사가 제안한 암 발생의 two-hit 가설을 증명하는 또 하나의 증거를 제공해 준것이다 (overview 참조). 이 가계도의 사람들은 p53 유전자의 한쪽 allele (대립유전자)에 변이를 가지고 있으며 주로 LOH (Loss of Heterozygosity)에 의하여 다른 한쪽의 allele를 상실함으로써 어린 나이에 osteosarcoma, breast, brain carcinoma가 나타난다. 흥미로운 사실은 대장암의 환자에서 p53 유전자의 변이가 고빈도로 발견되지만 p53 유전자의 germ line 변이를 가지는 Li-Fraumini syndrome의 환자중 대장암이 발생하는 빈도는 극히 낮다는 것이다 (4).

4. p53단백질의 구조와 기능

p53 유전자는 염색체의 17q13에 위치하며 10개의 coding exon으로 구성되어있다. p53 단백질은 395개의 아미노산으로 구성되어있고 구조적인 특성 및 기능에 따라서 아미노 말단 (1번-80번 아미노산), 중앙부분 (80번-276번 아미노산), 그리고 카르복시 말단 (276번-395번 아미노산)으로 구별할 수 있다. 아미노말단은 acidic한 부분으로 helical 구조를 가지며 전사활성 (transactivation activity)이 있다. 중앙부분의 아미노 말단 쪽은 hydrophobic하며 proline-rich 한 특성이 나타난다. 중앙부분 (110번-290번 아미노산)은 주로 DNA 결합에 관여하며 인체 종양에서 고빈도로 발견되는 변이의 대부분이 이 부분에서 발견된다. 카르복시 말단 부분은 basic한 부분으로 p53 단백질의 oligomerization에 관여하는 것으로 알려져 있으며 최근의 연구결과에 따르면 p53이 손상된 DNA에 결합하는 것이 알려져 있다 (1).

p53 단백질은 p53 responsive element로 불리는 promoter 부위의 특이한 DNA sequence에 결합하여 유전자의 발현을 유도한다. p53에 의하여 발현이 유도되는 유전자로는 p21/WAF1 (세포주기 조절 유전자), Gadd45 (DNA repair에 관여하는 유전자), mdm2 (p53의 feed back regulator), Creatin Kinase, Trombospondin (angiogenesis의 저해)등이 알려져 있다. 인체 종양세포로부터 발견되는 대부분의 변이된 p53 단백질은 전사활성 기능을 상실하고 있다. 이는 p53의 전사활성 기능이 암 억제 기능에 필수적인 것임을 나타낸다. p53에 의하여 발현이 유도되는 유전자는 현재까지 알려진 것보다 훨씬 많을 것으로 추측하고 있으며 p53 연구의 선두그룹들을 중심으로 p53 response gene의 클로닝 작업이 활발하게 진행되고 있다 (8).

p53 단백질이 TBP (TATA box binding protein)과 결합하여 유전자의 발현을 억제한다는 보고가 있다. 실제로 p53에 의하여 발현이 억제되는 유전자가 최근 계속 발표되고 있다. 즉 c-fos, IL-6, PCNA, bcl2 등의 유전자 발현이 p53에 의하여 억제된다. 그러나 이들 유전자가 p53이 TBP와 결합함으로써 전사가 억제되는지는 확실하지 않다. 최근 필자의 연구실에서는 TATA box가 없는 cell cycle gene의 발현이 p53에 의하여 억제되는 것을 발견하고 구체적인 전사억제 기작을 추적하고 있다 (1).

발암바이러스의 oncogene들, SV40 virus의 Large T항원, Adenovirus의 E1B, Epstein-Barr virus의 EBNA-5, Human Papilloma virus의 E6등은 p53 단백질과 결합하여 p53의 암억제기능 즉 세포주기 조절기능 및 전사활성기능을 저해함으로써 정상세포의 암세포화를 유도하는 것이 밝혀졌다. 자궁경부암에서 p53 유전자의 변이율이 낮은 이유는 human papillomavirus의 E6 단백질이 p53의 기능을 저해하기 때문에 p53의 변이가 일어나지 않아도 종양이 발생하기 때문일 것이다. 그러므로 약 50-60%정도의 빈도로 발견되는 p53 유전자 자체의 변이에 의한 p53의 기능상실과 virus에 의한 기능적 저해를 감안하면 훨씬 많은 암에서 p53의 기능상실이 암 유발원인이 되어있을 것이다. 세포성 단백질이 p53과 결합하여 p53의 기능을 저해하는 경우도 있다. mdm2 유전자는 약 30%의 soft tissue sarcoma에서 유전자의 증폭이 발견된다. 이들 세포에서는 과발현된 mdm2 단백질이 p53과 결합하여 p53의 기능을 저해함으로써 암 발생의 원인이 된 것으로 생각된다 (9).

5. p53 유전자의 세포주기 조절기능

정상 혹은 암세포에서 p53 유전자의 발현에 의한 세포주기의 G1기 정지 (G1 arrests)가 보고된 이후 p53 단백질이 세포주기의 G1 check point에서 세포주기를 조절할 것이라고 추측하였다. p21 유전자의 발견은 이러한 추측을 실험적인 사실로 입증해 주는 계기가 되었다. 세포노화의 과정 중에 발현이 유도되는 유전자로서 Noda박사 등에 의하여 sdi 유전자가 분리되었고, Elledge박사연구팀은 cdk 결합 단백질로서 p21 유전자를 분리하였다. 또한 Vogelstein, Kinzler박사 연구팀은 p53 유전자에 의하여 발현이 유도되는 유전자로서 WAF1 유전자를 분리하였다. 이들 세 유전자는 염기배열의 비교를 통하여 동일 유전자임이 밝혀졌다. p21/WAF/Sdi (약칭, p21)는 G1기에서 작용하는 cdk:cyclin complex (cdk4:cycD, cdk2:cycE)와 결합하여 protein kinase 활성을 저해한다. cdk:cyclin complex는 Rb 단백질을 인산화하여 불활성화한다. Rb 단백질은 G1-S 진행에 필요한 유전자의 발현을 유도하는 전사인자 E2F와 결합하여 E2F의 전사활성을 저해한다. 결국 p53에 의하여 발현이 유도된 p21은 연속적으로 cdk:cyclin complex의 불활성화, Rb의 탈인산화, E2F의 전사활성으로 이어지는 cascade를 통하여 세포주기 G1정지를 유도한다. p53 단백질이 직접 DNA 복제에 관여하는 단백질 (RPA; replication protein A)와 결합하여 DNA 복제 및 세포주기 S기로의 진행을 저해한다는 보고도 있다.

6. p53 단백질은 분자경찰국의 공안요원

γ 선의 조사 (照射, irradiation) 혹은 etoposide 등의 DNA-damaging drug을 처리하면 세포 (thymocyte)는 능동적 세포사 (programmed cell death, apoptosis)를 일으킨다. 그러나 p53 변이유전자를 발현하는 세포는 γ 선의 조사 등에 의한 세포사가 일어나지 않는다. 즉 p53이 능동적 세포사를 조절하고 있는 것이다. p53 변이를 가지고있는 암세포에 정상 p53 유전자를 발현하면 세포사를 유도한다는 사실도 p53 단백질의 세포사 조절기능을 시사한다 (1).

다양한 환경요인들에 의하여 DNA가 손상을 입게되면 세포내 p53 단백질이 활성화되고, 곧 이어서 세포주기의 G1 정지가 일어나며 DNA 복제가 중단된다. p53에 의하여 활성화된 DNA 수복 단백질(Gadd45 등)에 의하여 DNA repair가 완료되면 다시 세포는 증식을 시작한다. DNA 손상이 심각해서 수복할 수 없는 상태가 되면 p53 단백질은 세포의 능동적 세포사를 유도한다. p53 유전자를 결손하고 있는 세포는 DNA 수복을 위한 세포주기의 G1 정지가 일어나지 않고 손상된 DNA를 가진 상태로 DNA복제가 일어나고 유전정보의 mutation과 rearrangement에 의한 genomic instability가 증폭된다. 이러한 변이의 축적에 의하여 세포는 암세포로의 변환 혹은 high malignant 상태로 계속 발전한다. 이러한 사실은 p53 단백질의 세포주기 조절기능과 능동적 세포사 (apoptosis) 조절기능을 이용하여 p53이 세포의 유전정보를 안전하게 보호해 줌으로서 세포의 정상적인 증식과 기능을 보호하는 보호자로서 혹은 분자경찰로서 역할을 수행하고있다는 사실을 시사한다.

7. 새로운 시도, 새로운 발견, 새로운 패러다임

암 억제유전인자의 기능상실에 의한 암 발생이라는 새로운 패러다임의 출현은 유전성 혹은 후천적 종양의 염색체를 분석하여 각 종양에 특이적인 혹은 공통적인 유전자의 결손을 추적하는 연구를 활성화시켰다. 다수의 유전성 혹은 후천성 암세포로부터 염색체의 특정부분의 LOH가 발견되었고 position cloning법의 개발에 힘입어 새로운 암 억제 유전자가 계속 클로닝 되고있다. 현재 약 10 여종의 암 억제유전자가 클로닝 되어있으며, 앞으로 훨씬 많은 수의 새로운 암 억제 유전자가 계속 분리될 것으로 예상된다. 그러나 이들 암 억제 유전자의 기능 분석은 Rb 와 p53 유전자를 제외하고는 잘 알려져 있지 않다. 많은 수의 암 억제유전자가 클로닝되고 암 발생에 있어서 그들의 기능이 밝혀지면 암 발생의 분자적 기전이 분명해질 것으로 기대된다.

항암 관련 유전자의 탐색은 항암제 개발의 새로운 표적인자로서 유용하기 때문에 대학 및 국립 연구기관 뿐만 아니라 바이오텍 관련 기업에서도 적극적으로 연구개발하고 있는 분야이다. 본 연구팀은 암 억제 및 발암 관련 유전자를 탐색하는 방법들을 개발하는 동시에 암 관련 유전자를 발굴하는 성과를 거두고 있으며 이들 유전자의 분자적 성질을 규명함으로써 새로운 표적인자 및 암 진단의 새로운 소재로서 활용하고자 한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구범위 및 연구수행방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
cdk1의 p53 의존성 발현에 관여하는 promoter element 와 전사인자의 탐색 및 전사활성 조절기전	p53 의존성 발현에 필요한 cdk1 promoter 영역의 cis-element 탐색을 위한 co-transfection assay	cdk1 promoter의 5' sequential deletion mutant 및 각 전사인자 binding site (E2F, ets, CCAAT, E2F-like)의 mutant를 제작하고 p53(+) HepG2 세포주에 mutant p53 발현벡터와 cotransfection 하고 mutant p53에 의한 promoter의 활성 증가를 비교 검토함. 반대로 p53 inducible 세포주 (EJ-p53)에 도입한 후 p53 발현 유도하고 promoter 활성의 감소를 비교.
	p53의 cdk1발현 제어에 관여하는 CCAAT-binding 전사인자탐색을 위한 gel shift assay	cdk1 promoter의 CCAAT을 probe로 gel shift assay. CCAAT binding protein으로 알려진 전사인자, NF-Y, C/EBP 등의 항체를 이용한 super shift assay를 통하여 CCAAT-binding protein의 탐색. HA-tagged CBF를 293세포주에 도입하고 nuclear extract를 제조하고 gel shift assay한 후 HA 항체로 supershift assay
	CCAAT binding 전사인자의 기능조절 기전 분석	NF-Y의 dominant negative mutant 발현벡터 제작 CBF 발현벡터의 제작 및 발현 p53, NF-Y, CBF의 상호작용을 분석
p53의 발현에 의한 G2 정지 분석시스템의 확립	세포주기를 G1/S에서 동조한 후 p53 발현을 유전자치료용 p53-adenovirus로 유도하고 세포주기 진행, cdk1및 cyclin B 발현, cdk1 활성 변화를 분석	thimidine을 이용한 세포주기의 G1/S 동조화 (synchronization) 및 p53 adenovirus의 감염에 의한 발현, 동조화 해제 후 세포주기 진행 분석 p53 발현에 의한 세포주기 G2정지시 cdc2-cyclin B의 불활성화 및 cdk1, cyclin B의 발현 분석
cdk1 활성의 복원 및 p53의 세포주기 G2 정지에 미치는 영향	동조화세포에 cdk1 활성의 복원을 위해 cdk1의 인산화 mutant와 cyclin B를 ectopic 발현	cdk1의 인산화site 변이체와 cyclin B-adenovirus를 감염, cdkk1 kinase 활성의 constitutive 발현 동조화 세포에 cdk1 활성의 복원과 동시에 p53 발현유도 후 세포주기의 진행을 분석

2. 연구수행내용 및 결과

연구 내용	연구 결과
cdk1의 p53 의존성 발현에 관여하는 promoter element 탐색	cdk1 프로모터의 p53 의존성 발현 조절에 CCAAT element (-76)가 negative cis-acting element로 작용한다. cyclin B, cyclin A, cdc25C 등 다른 세포주기 G2 조절 유전자의 promoter에 도 CCAAT이 존재하며 p53 의존성 발현에 관여한다. 또한 E1A에 의한 cdk1 발현 활성화에는 CCAAT element가 positive cis element로 작용한다.
CCAAT-binding 전사인자 탐색	cdk1 promoter CCAAT에 결합하는 서로 다른 두 개의 전사인자 NF-Y 및 CBF를 탐색. cyclin B, cyclin A, cdc25C 등 세포주기 G2 조절 유전자의 promoter의 CCAAT에도 NF-Y와 CBF가 결합한다.
NF-Y dominant negative mutant와 CBF를 이용한 cdk1 발현 조절의 기능적 network 분석	NF-Y dominant negative mutant는 cdk1 발현을 저해, CBF는 cdk1 발현을 증가시킨다. CBF에 의한 cdk1의 활성화를 p53과 NF-Y mutant가 저해한다. p53이 CBF와 결합하여 NF-Y의 전사 활성을 저해. CBF와 NF-Y는 상호 결합함.
p53의 G2 제어 기능 규명 및 분석 시스템 확립	G1/S에서 동조화한 세포에 p53-adenovirus를 감염, p53을 발현하면 세포주기는 G1/S에서 S, G2로 진행 그러나 G2/M에서 정지. 이를 분석 시스템으로 이용, cdk1, cyclin B, cdc25C의 세포주기 특이적 발현이 억제되고 cdk1-cyclin B 복합체의 kinase 활성도 억제됨. 따라서 p53은 G2 조절 유전자의 발현 억제를 통하여 세포주기 G2-M 진행을 저해함
cdk1 활성의 세포주기 비의존적 복원	cdk1의 인산화 변이 유전자와 cyclin B-adenovirus를 동조 세포에 감염, kinase 활성의 constitutive activation 확인
p53에 의한 G2 정지 세포에 cdk1 kinase의 역할 분석	p53에 의한 G2 정지가 cdk1-cyclin B의 활성 복원에 의하여 bypass 되었으며 세포죽음은 일어나지 않았다. 따라서 p53의 활성화에 의한 세포주기 G2 정지는 cdk1-cyclin B 복합체의 활성 억제를 통하여 이루어지며 p53(-)의 암세포의 경우 이러한 G2 정지 신호를 무시함으로써 chromosome instability가 증가하고 항암제 내성을 나타낼 것이다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1. 연구개발목표의 달성도

목 표	달 성 도 (%)	내 용
cdk1의 p53 의존성 발현에 관여하는 promoter element, 전사인자의 탐색 및 전사활성 조절기전	100%	cdk1프로모터의 p53 의존성 발현조절에 CCAAT element (-76)가 cis-acting element로 작용한다. cyclin B, cyclin A, cdc25C등 세포주기 G2 조절 유전자의 promoter에 CCAAT이 존재하며 p53 의존성 발현에 관여한다. cdk1 promoter CCAAT에 결합하는 NF-Y 및 CBF 전사인자의 탐색. cyclin B, cyclin A, cdc25C등 세포주기 G2 조절 유전자의 promoter에 CCAAT에도 NF-Y와 CBF가 결합한다. CBF에 의한 cdk1의 활성화를 p53과 NF-Y mutant가 저해한다. p53이 CBF와 결합하여 NF-Y의 전사활성을 저해할 것으로 추정함. CBF와 NF-Y는 상호 결합함.
p53의 G2 제어 분석시스템 확립 및 G2 정지기능분석	100%	G1/S에서 동조화한 세포에 p53-adenovirus를 감염, p53을 발현하면 세포주기는 G1/S에서 S, G2로 진행 그러나 G2/M에서 정지. 이를 분석시스템으로 이용, cdk1, cyclin B, cdc25C의 세포주기 특이적 발현이 억제되고 cdk1-cyclin B복합체의 kinase 활성도 억제됨. 따라서 p53은 G2 조절유전자의 발현억제를 통하여 세포주기 G2-M 진행을 저해함
cdk1 활성의 복원 및 p53에 의한 세포주기 G2 정지에 cdk1-cyclin B의 역할분석	100%	cdk1의 인산화 변이유전자와 cyclin B-adenovirus를 동조 세포에 감염, kinase 활성의 constitutive activation 확인 p53에 의한 G2 정지가 cdk1-cyclin B의 ectopic 발현에 의하여 bypass 되었다. 따라서 p53의 활성화에 의한 세포주기 G2 정지는 cdk1-cyclin B 복합체의 활성억제를 통하여 이루어진다. p53(-)의 암세포의 경우 이러한 G2 정지신호를 무시함으로써 chromosome instability가 증가하고 항암제 내성을 나타낼 것이다

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. p53의 세포주기 G2 제어기능을 이용한 p53 변이암세포의 사멸유도수단의 개발
2. p53의 세포주기 조절유전자 발현억제기전을 이용한 p53 변이 암세포 사멸유도수단의 개발
3. 방사선을 이용한 p53 변이암세포의 선택적 사멸

제 6 장 참고문헌

1. Ko L. J., and Prives C. p53:puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 1996; 10: 1054
2. Harris H., and Klein G. Malignancy of somatic cell hybrids. *Nature* 1969; 224: 1314
3. Knudson A. G. Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1971; 68: 820
4. Vogelstein B., and Kinzler K. W. The genetic basis of human cancer. *Academic Press.* 1998
5. Lane D. P., and Crawford L. V. T antigen is bound to a host protein in SV 40 transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261
6. Rovinski B., and Benchimol S. Immortalisation of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. *Oncogene* 1988; 2: 445
7. Hinds P. W., Finlay C. A., and Levine A. J. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J. Virol.* 1989; 63: 739
8. Wiman K. G. p53:emergency brake and target for cancer therapy. *Exp. Cell Res.* 1997; 237: 14
9. Oliner J. D., and Kinzler K. W., Meltzer P. S., George D. L., and Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358: 80