

## 국가지정연구실사업

세포골격근재배열 및 세포외기질분해 조절을 통한  
세포이동성 제어연구

Cell motility control via regulation of cytoskeletal  
rearrangement and proteolytic degradation of ECM

서울대학교

과학기술부

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 세부과제 “세포골격근재배열 및 세포외기질분해 조절을 통한 세포이동성 제어연구” 의 보고서로 제출합니다.

2004 . 12 . 2

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 박동은

연 구 원 : 지수선

” : 김충호

” : 이승준

” : 이덕재

” : 고봉국

” : 조용철

” : 송상호

- " : 김상범
- " : 양수정
- " : 이효선
- " : 신정은
- " : 윤지목
- " : 나연
- " : 최세형
- " : 박에스더
- " : 백현효
- " : 유재선
- " : 김유경

## 보고서 초록

과제관리번호	M1-0203-00-0072	해당단계 연구기간	2002. 6. 25 ~ 2004. 6. 24	단계 구분	1 / 2
연구사업명	중 사업명	특정연구개발사업			
	세부사업명	국가지정연구실사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	세포골격근재배열 및 세포외기질분해 조절을 통한 세포이동성 제어연구			
연구책임자	박동은	해당단계 참여연구원수	총 : 18명 내부 : 1명 외부 : 17명	해당단계 연구비	정부: 480,000천원 기업: 천원 계: 480,000천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p>본 연구과제의 1단계 연구 결과는 다음과 같다.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Epithin의 기능조절 단백질 검색             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Epithin의 기능조절단백질로 Filamin과 Tie-2를 동정함</li> </ul> </li> <li>2. 세포골격근 재배열에 관여하는 <math>\beta</math>Pix의 기능조절 단백질 검색             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\beta</math>Pix의 결합단백질로 MAP1b, adducin, actin, tubuline을 동정함</li> </ul> </li> <li>3. Epithin의 효소활성 저해제 탐색             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lead compound 4종 분리</li> </ul> </li> <li>4. 세포막 확장에 관여하는 <math>\beta</math>Pix의 기능조절 단백질 검색             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\beta</math>Pix-bL isoform이 endocytosis를 증가시킴을 확인하고, <math>\beta</math>Pix의 결합단백질로 endocytosis의 key factor인 Dynamin을 동정함.</li> </ul> </li> <li>5. Time lapse Imaging 기술 확립             <ul style="list-style-type: none"> <li>- time lapse imaging이 가능한 CO2 chamber와 온도조절기능을 갖춘 현미경시스템 확립</li> </ul> </li> </ol>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	세포이동, 세포골격근, 세포외기질, 단백질분해효소, 세포신호전달			
	영어	cell migration, cytoskeleton, extracellular matrix, protease, cell signaling			

## 요 약 문

### I. 제 목

세포골격근재배열 및 세포외기질분해 조절을 통한 세포이동성 제어연구

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

#### 가. 기술적 측면

(1) 세포의 이동성 기작에 관한 연구는 선진국에서도 최근에 시작된 분야로 본 연구의 성공적인 수행은 아직도 많은 부분이 밝혀져 있지 않은 발생 및 조직의 분화과정에서 세포이동의 역할에 대한 새로운 지식을 제공할 것이다.

(2) 세포이동의 원동력을 제공하는 세포골격근의 재배열 조절은 세포이동 뿐만 아니라, 세포분열, 세포내 물질수송, endocytosis 및 exocytosis, 바이러스와 박테리아의 세포내 침투과정등에도 관여하고 있으므로 본 연구의 결과 얻어진 지식은 여러 중요한 생명현상의 이해에 도움을 줄 것이다.

(3)  $\beta$ Pix에 의한 endocytosis의 활성화 기작연구는 이를 활용하여 약물의 세포내 침투(drug delivery) 효율을 높이는 방안에도 응용될 수 있을 것이다.

(4) Epithin은 세포외기질을 분해하는 단백질분해효소 cascade의 최상위에 존재할 것으로 생각되며, 또한 그 활성화부위가 세포막 외부에 존재하므로 Epithin의 효소활성 억제제는 세포내로의 deliver가 필요 없는 효과적인 암전이 억제제로서의 개발이 가능할 것이다.

#### 나. 경제·산업적 측면

(1) 세포이동성 제어기술은 암세포의 전이 억제, 상처치유 및 조직재생, 염증성 질환 등의 다양한 질병의 치료에 응용될 수 있다. 현재 이들 질병들의 치료제로 면역제

포화성 억제제(염증성 질환), 사이토카인/세포성장인자(상처치유 및 조직재생), MMP inhibitors(암전이억제)등이 주로 시판되거나 개발중이지만, 세포이동성 자체를 target으로 한 치료제는 거의 없는 편이다.

(2) 세포의 이동성 기작에 대한 연구는 최근에야 시작되었다. 따라서 세포이동성 제어기술에 근거한 암전이 억제, 상처의 치유, 염증성 질환의 치료제가 개발된다면 이는 기존의 치료제들과는 구별되는 미개발된 시장을 여는 것이다. 현재 암 의약품 시장만도 최소 150억불 (IMS Health, 1998년도)로 추산되며, 2003년 무렵까지는 두 배 이상의 신장을 보일 것으로 예상된다. 세포이동성제어를 응용한 치료제개발이 가능한 조직재생, 염증성질환등을 함께 생각하면 향후 그 경제적 가치는 매우 클 것으로 예상된다.

(3) 따라서 본 과제의 연구결과를 응용하여 세포의 이동성제어에 기반한 새로운 질병치료제가 도출된다면, 이는 현재 대부분 수입에 의존하고 있는 의약품에 대한 수입대체효과와 더불어 생물공학제품의 수출에도 기여하게 될 것이다.

#### 다. 사회·문화적 측면

(1) 본 연구의 성과는 삶의 질 향상에 기여할 수 있다. 이미 언급한 바와 같이 세포이동성 제어기술은 암, 상처치유 및 조직재생, 염증성 질환등 많은 사람들이 고통을 받고 있는 질병들의 치료제 개발에 기여할 수 있다.

(2) 또한 본 과제가 지향하고 있는 생물학-의학-산업계의 유기적인 협조로 국내 연구진에 의해 유용한 산물이 도출된다면, 이는 21세기 생물공학산업이 나아가야 할 모델을 제시해 줄 것이며 나아가서 현재 사회에 만연해 있는 후속세대의 이공계기피 현상의 해소에도 일조할 것이다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

구분	연구목표	연구내용
1차년도	1. Epithin의 기능조절 단백질 검색 2. 세포골격근 재배열에 관여하는 $\beta$ Pix의 기능조절 단백질 검색	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Yeast two-hybrid screening을 이용한 Epithin의 N-terminal 결합단백질 검색</li> <li>● Proteomics 기술을 이용한 Epithin의 C-terminal 결합 단백질 검색</li> <li>● <math>\beta</math>Pix의 기능성부위(domain)별 결합단백질의 검색</li> <li>● <math>\beta</math>Pix의 <i>in vivo</i> GEF assay 확립</li> </ul>
2차년도	1. Epithin의 효소활성 저해제 탐색 2. 세포막 확장에 관여하는 $\beta$ Pix의 기능조절 단백질 검색	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Epithin의 효소활성저해제 탐색을 위한 <i>in vitro</i> screening system 확립</li> <li>● Chemical library screening을 통한 Epithin의 효소활성 저해제 탐색</li> <li>● <math>\beta</math>Pix에 의해 유도되는 endocytosis 과정의 real-time imaging 기술확립</li> <li>● 세포골격근 조절 <math>\beta</math>Pix 결합단백질들의 기능연구</li> <li>● Membrane recycling을 조절하는 <math>\beta</math>Pix 결합단백질의 동정</li> </ul>

## IV. 연구개발결과

### 가. Epithin의 N-terminal 결합단백질 Filamin의 분리

Yeast two-hybrid screening을 통하여 Epithin의 cytoplasmic tail에 Filamin의 C-terminal 부위가 결합함을 확인하였다. Filamin은 N-terminal에 actin 결합 부위를 가진 단백질로서 Epithin과 actin filaments를 연결시키는 역할을 하며, 또한 PMA에 의해 유도되는 Epithin의 translocation, 활성화 및 shedding에도 Filamin이 결정적인 역할을 하고 있음을 밝혔다.

### 나. Epithin의 결합 단백질 Tie-2 (Angiopoietin-1의 수용체)의 분리

신생혈관형성조절에 중요한 역할을 하는 Angiopoietin-1의 수용체, Tie-2가 Epithin cytoplasmic tail에 결합함을 MALDI-TOF MS방법으로 확인하였다. Epithin과 Tie-2를 동시에 발현시키면 Tie-2의 ligand binding 부위가 절단됨을 관찰하였으며, Angiopoietin-1에 의한 Tie-2의 downstream Akt의 phosphorylation이 현저히 감소함을 관찰하였다. 이 결과는 Epithin이 Tie-2의 negative regulator로서, 신생혈관형성 및 이를 필요로 하는 암의 성장조절에도 중요한 역할을 할 수 있음을 제시한다.

### 다. Chemical library screening을 통한 Epithin의 효소활성 저해제 동정

10,000종의 저분자화합물 library로부터 Epithin의 활성저해제를 검색한 결과, 740 D5, 834 D4, 834 D5, 836 E10 의 네가지 chemical이 비교적 낮은 농도(50uM)에서 Epithin의 활성을 50%이상 저해함을 확인하였다. 현재 이들 lead chemical들의 구조를 근거로 specificity와 efficacy가 더 높은 저해제를 찾는 연구가 수행중이다. 이들 Epithin의 효소활성 저해제는 Epithin의 특성연구 뿐만 아니라 암세포전이 억제제로서 개발될 가능성을 가지고 있다.

### 라. 세포골격근 조절 $\beta$ Pix 결합단백질들의 동정

MULDI-TOF MS analysis 및 yeast two-hybrid screening을 통하여,  $\beta$ Pix의 결합단백질로 MAP1b, adducine, actin, tubulin등 세포 골격근 조절과 관련될 것으로 추정되는 단백질들을 동정하였다. 특히 MAP1b는 microtubule의 stabilization에 관여하는 단백질로 이 단백질의 LC1(Light chain1)이라는 부분과  $\beta$ Pix의 proline-rich 부위가 결합함을 밝혔다. 뿐만 아니라  $\beta$ Pix는 LC1에 의해서 microtubule상으로 이동함을 밝힘으로써 세포이동과 밀접한 관계가 있는 microtubule의 조절에  $\beta$ Pix가 관여할 가능성을 제시하고 있다.



#### 마. Membrane recycling을 조절하는 $\beta$ Pix isoform의 기능 확인

$\beta$ Pix의 isoform중 다른 isoform에는 없는 calponin homology(CH) 기능성부위를 가지고 있는  $\beta$ Pix-b<sub>L</sub>을 분리하였다. 이 isoform은 세포에 발현 시 endocytosis의 일종인 macropinocytosis를 증가시킴을 확인하였다. 이 결과는  $\beta$ Pix-b<sub>L</sub>이 endocytosis의 regulation을 통해 세포이동에 필수적인 요소인 membrane recycling 과정을 조절할 수 있음을 밝힌 의미가 있다.. 또한 CH 기능성부위에 microtubule을 구성하는 tubulin과 actin filament를 구성하는 actin이 결합한다는 사실도 밝혀내었다.

#### 바. 세포이동성 연구의 기반기술로서 time-lapse imaging 기술의 확립

$\beta$ Pix를 발현시킨 세포를 Cell Observation Chamber에서 incubation 하면서 형광현미경을 사용하여 관찰하여 실제로  $\beta$ Pix-b<sub>L</sub>에 의해 유도되는 endosome들이 세포표면에서 세포내부로 유입됨을 관찰하였다. 또한  $\beta$ Pix-b를 발현한 세포에서 filopodia의 움직임을 관찰할 수 있었다. 이 시스템의 확립으로 살아있는 세포의 이동을 실시간으로 측정할 수 있게 되어 향후 세포이동성 제어연구의 기반기술을 확립한 의미가 있다.

#### 사. $\beta$ Pix의 유전자 적중생쥐 (knock-out mouse) 제조 진행

$\beta$ Pix의 *in vivo* 기능을 알기 위한 가장 좋은 방법은  $\beta$ Pix의 유전자가 발현되지 않는 knock-out mouse 모델을 제조하여 phenotype을 관찰하는 것이다. 원래 연구계획에는 포함되지 않았으나 2003년 8월부터 미국 NIH의 Lab. of Mammalian Genes의 실장인 Dr. Heiner Westphal과 공동으로  $\beta$ Pix의 isoform knock-out mouse 제조 연구를 시작하여 현재 targeting vector가 정확한 위치에 targeting된 ES cell clone을 확보하였으며, 이를 embryo에 injection하여 chimera mouse를 만드는 실험을 진행중이다.  $\beta$ Pix의 isoform knock-out mouse를 제조하게 된 동기는 독일 Ulm대학의 Klaus-Dieter Fisher 박사와의 정보교환으로 ubiquitous하게 발현되는  $\beta$ Pix-a의 knock-out이 early embryonic lethality를 보여 별 효용이 없음을 알게 되었기 때문이다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

### 가. Epithin과 Filamin의 상호작용

본 연구결과 Filamin과의 상호작용에 의해 Epithin의 shedding과 activation이 조절되는 것으로 나타났으므로 Filamin과 상호작용하는 단백질중에 Epithin의 shedding과 activation을 조절하는 단백질이 있는지를 찾아볼 계획이다.

### 나. Epithin과 Tie-2 (angiopoietin-1의 수용체)의 상호작용

Tie-2는 신생혈관형성조절에 중요한 역할을 하는 Angiopoietin-1의 수용체이므로, Epithin에 활성화에 의한 Tie-2의 down-regulation은 신생혈관형성 조절에 중요한 의미가 있다. 신생혈관 형성은 암의 성장에도 필수적인 과정이므로 Epithin의 활성화조절을 통한 암의 성장제어등에도 활용될 가능성이 있다.

### 다. Epithin의 효소활성 저해제

Epithin 특이적인 활성저해제는 Epithin의 세포내 기능연구에 크게 기여할 것이며, Epithin이 관여할 것으로 추정되는 암세포의 전이를 억제하는 치료제로서의 개발 가능성이 있다.

### 라. 세포골격근 조절 $\beta$ Pix 결합단백질들의 동정

MAP1b, adducine, actin, tubulin들과  $\beta$ Pix의 상호작용은  $\beta$ Pix에 의한 세포이동성 조절에 필수적인 cytoskeleton의 조절기작연구에 기여할 것이며, 세포이동성 제어방안 도출을 위한 새로운 target으로서의 가능성이 있다.

### 마. Membrane recycling을 조절하는 $\beta$ Pix isoform의 기능

$\beta$ Pix의 특정 isoform인  $\beta$ Pix-b<sub>L</sub>이 endocytosis의 일종인 macropinocytosis를 증가시키는 것으로 나타났다. 이 결과는  $\beta$ Pix가 세포이동에 필수적인 membrane recycling을 조절할 수 있음을 보여줄 뿐만 아니라,  $\beta$ Pix의 활성을 증가시키는 방법이 개발되면 이는 세포의 macropinocytosis를 증가시켜 drug delivery등에 유용하게 사용될 가능성이 있다.

### 바. Time-lapse imaging 기술의 확립

Time-lapse imaging 기술은 국내에서 개발 초기단계에 있는 기술로서, 향후 살아있는 세포의 이동성을 조절하는 chemical의 screening, 세포이동 메카니즘등의 연구에 기반기술로서 활용될 것이다.

### 사. $\beta$ Pix의 유전자 적중생쥐 (knock-out mouse) 제조

$\beta$ Pix의 유전자 적중생쥐는  $\beta$ Pix의 *in vivo* 기능연구에 결정적인 단서를 제공해 줄 것이며, 이 모델생쥐로부터 유래된 세포주들은  $\beta$ Pix의 신호전달경로연구 및 활성화조절방안연구등에 유용하게 사용될 것이다.

## S U M M A R Y

The results of the 1st stage in this project is summarized as following

1. Screening of the regulatory proteins for Epithin
  - Identification of Filamin and Tie-2 as regulatory proteins for Epithin
2. Screening of the  $\beta$ Pix regulatory proteins implicated in the cytoskeleton rearrangement
  - Identification of MAP1b, adducin, actin and tubulin for  $\beta$ Pix binding proteins
3. Screening of the chemical inhibitors for Epithin
  - Selection of 4 lead compounds
4. Screening of the  $\beta$ Pix regulatory proteins implicated in the membrane recycling
  - Enhancement of endocytosis triggered by  $\beta$ Pix-b<sub>L</sub>
  - Identification of Dynamin, a key regulator of endocytosis, for a  $\beta$ Pix binding protein
5. Establishment of time-lapse imaging technology
  - Set-up and utilization of the microscope system equipped with CO<sub>2</sub> chamber and temperature-controlling chamber

## C O N T E N T S

I. Introduction

II. The Present State of Research & Development

III. Result

IV. Achievement & Contribution

V. Applications

VI. Information

VII. Reference

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

◎ 세포의 이동 (cell migration)은 정상적인 세포의 생리활동이며, 이는 조직의 발생 및 분화, 면역세포의 활성화, 신생혈관의 형성, 손상조직의 재생등에 필수적인 과정이다.

◎ 세포이동의 부적절한 조절은 신경망형성의 이상에 의한 뇌신경계 질환과 같은 발생 및 분화과정에서의 여러 질병, 비정상적인 면역세포 활성화로 인한 allergy 및 각종 감염질환(inflammatory disease), 암세포의 전이, 상처치유의 지연등을 유발할 수 있으며, 세포이동성의 원리이해는 이러한 질병들의 치료에 응용될 수 있다 (그림 1).

◎ 세포가 이동하기 위해서는 세포의 부착을 매개하는 세포외기질의 분해, 세포골격근의 재배열에 의한 lamellipodium, filopodium과 같은 protrusion의 형성, 세포이동방향으로의 세포막의 확장이 필요하다.

◎ 따라서 본 연구과제는 세포외기질의 분해에 관여하는 Type II 막단백분해효소 (Type II membrane serine protease)인 **Epithin**과 세포골격근의 재배열 및 세포막의 확장조절에 관여하는 Rac/Cdc42의 활성인자인 guanine nucleotide exchange protein(GEF) **βPix**의 세포내 활성 조절기작을 연구하고, 이들을 통한 세포이동성조절의 세포신호전달경로에 관여하는 핵심유전자와 단백질의 탐색 및 그 기능연구를 통해 세포이동성을 제어할 수 있는 방안을 도출하는 것을 목표로 하고 있다.

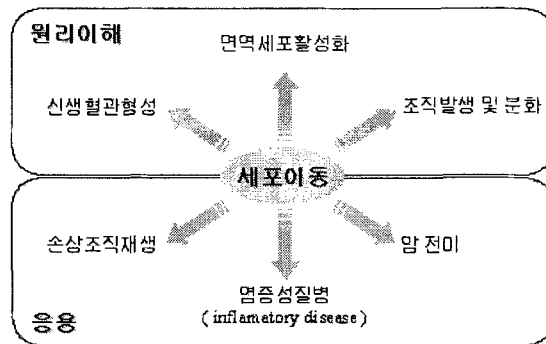


그림 1. 세포이동의 중요성

## (1) 기술적 측면

◎ 세포이동의 부적절한 조절은 다양한 질병을 유발한다.

세포이동 (cell migration)은 암세포의 전이, 암전이과정에서 endothelial 세포의 이동

에 의한 신생혈관형성 (angiogenesis), 손상조직의 회복(wound healing)을 위한 세포이동, 병원균 감염부위로의 면역세포의 이동, 류마티스성 관절염 등 면역세포들의 비정상적인 활성화에 의한 chronic inflammatory disease에 필수적으로 수반되는 과정이다.

◎ 세포이동성의 제어는 세포외기질의 분해조절, 세포골격근(cytoskeleton)의 변화와 세포막의 확장을 제어함으로써 달성될 수 있다.

◎ 세포가 이동하기 위해서는 세포의 형태를 유지하고 있는 세포골격근의 변화가 필수적이다. 세포이동에 가장 중요한 역할을 하는 세포골격근은 actin cytoskeleton이며, 세포이동시에는 actin cytoskeleton의 재배열에 의해 lamellipodia, filopodia와 같이 세포이동에 필요한 세포구조가 형성됨이 잘 알려져 있다. 또한 세포이동을 위해서는 세포의 이동방향으로 세포막의 지속적인 확장이 수반되어야 한다 (그림 2). 이러한 변화를 유발하는 세포신호전달경로에 대한 연구는 세포이동을 조절할 수 있는 방법을 제시해 줄 수 있다.

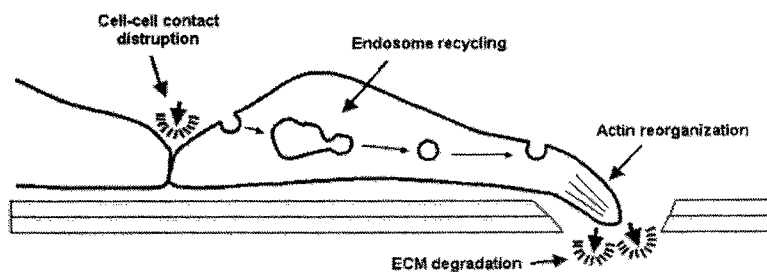


그림 2. 세포이동의 요인

◎ 세포골격근의 변화가 세포이동의 원동력이지만, 조직내에서 세포가 이동하기 위해서는 세포이동을 방해하는 세포외기질이나, 세포기저막(basal lamina)을 분해하여 세포가 이동할 수 있는 통로를 만드는 과정 또한 필수적이다. 그러므로 세포외기질을 분해하는 효소의 활성화조절기술은 암세포전이 등 세포이동을 차단하는 신약개발에 응용될 수 있다 (그림 2).

### ◎ 세포골격근 재배열 및 세포막 확장 제어기술

- Rho family GTPases에 속하는 Rho, Rac, Cdc42는 세포이동을 유발하는 신호전달 경로에서 중심적인 역할을 하는 신호단백질로서, Rac과 Cdc42의 활성화는 actin cytoskeleton의 재배열을 유발하여 세포이동에 필요한 lamellipodia, filopodia등의 형성을 유도한다 (그림 3).

- 본 실험실에서는 Rac/Cdc42를 활성화시키는 상위단계의 신호단백질인 βPix를 최초로 동정하고, 최근 수 년간 βPix의 기능을 연구하여 이 단백질의 기능이 불완전할 경

우 세포의 actin cytoskeleton의 재배열과 세포막 확장을 위한 membrane recycling에 필요한 endocytosis 과정에 이상이 생겨 세포의 이동성이 저해됨을 규명하였다.

◎ 세포외기질 분해 제어기술

- 세포는 조직내에서 세포외기질과의 부착에 의하여 자신의 위치를 고수하고 있으나, 이동시에는 세포의 이동을 방해하는 세포외기질들이 분해되어야 한다. 그러므로 세포의 이동을 위해서는 세포외기질을 분해하는 단백질 분해효소의 활성이 필수적이다.

- 최근까지 연구된 세포외기질 분해경로의 대표적인 것은 uPA(urokinase type plasminogen activator)→plasminogen→plasmin→MMPs(matrix metalloprotease)의 순차적인 단백질분해효소 cascade의 활성화이다 (그림 4).

- 본 실험실에서는 세포막에 존재하는 type II serine protease인 Epithin을 최초로 동정하고, 그 기능을 연구해 오고 있다. 최근 Epithin은 uPA의 전구물질인 pro-uPA로부터 active한 uPA를 만드는 활성을 갖고 있음이 밝혀졌으며, 또한 Epithin은 세포의 scattering을 유발하는 HGF(hepatocyte growth factor)의 활성화에도 작용함이 밝혀졌다. 이와같은 결과들은 Epithin이 단백질분해효소의 cascade를 활성화시켜 세포외기질의 분해를 증가시켜 세포의 이동을 촉진할 수 있음을 보여주고 있다. 또한 Epithin은 전립선암, 유방암등 전이성이 큰 암종에 과발현됨도 보고되어 있다. 그러므로 Epithin의 활성조절은 세포이동을 위해 필요한 세포외기질의 분해를 제어할 수 있는 방안이 될 수 있을 것이다.

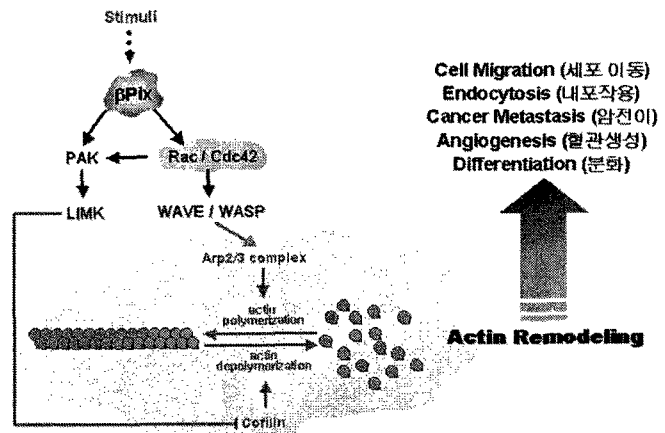


그림 3. 세포이동을 유발하는 신호전달경로

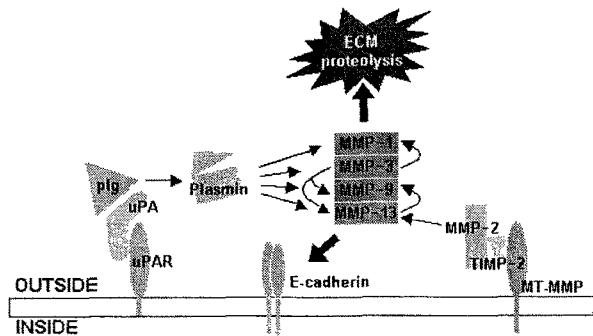


그림 4. 세포외기질 분해 경로



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### (1) 국외의 기술동향

◎ G 단백질 연구로 노벨상을 획득한 Texas 대학의 Alfred G. Gilman과 Virginia 대학의 Rich Horwitz등이 이끄는 세포이동협회 (Cell Migration Consortium)는 세포이동에 관한 기초적인 메카니즘과 이를 매개하는 신호전달과정을 밝혀내고 나아가 세포이동을 제어하는 치료제의 개발을 목표로 하고 있으며 이를 위해 2001년 미국국립보건원에서 8백만 달러의 연구비를 지원받고 있고, 향후 5년간 3천8백만 달러의 연구비를 추가로 지원 받을 계획이다. 이외에도 University College London에 있는 Alan Hall, Harvard univeristy의 Joan Brugge, Yale University의 Thomas Polard등이 이 분야의 대표적인 연구자들이다.

#### ■ 국외의 대표적인 세포 이동성 제어 기술 연구

세포의 이동성 유전자 탐색	세포골격근 분석
-Rich Horwitz, GFP labelled cDNA library	-Thomas Polard, actin branching
-Donald Hunt, Fourier transform mass spectrometer	연구
-Joan Brugge, retroviral cDNA library	
세포의 이동성에 중요한 신호전달기작 연구	세포기질 분해효소와 저해제 탐색
-Alan Hall, small G protein	-Heparanase
-Donald Hunt, integrin binding protein 탐색	

자료출처: News focus, *Science*, vol. 296, 606-609

#### ◎ 본 과제와 직접관련된 해외연구 동향

본 과제에서 세포이동성제어를 위한 연구 target으로 설정한  $\beta$ Pix와 Epithin은 본연구실에서 1997년과 1999년에 각각 최초로 동정하여 보고한 유전자들로 현재 이들을 연구하는 국외 연구자들이 많지는 않으나, 이들의 중요성이 인식되면서 연구자들이 급속히 확대되는 중이다.

#### ● 대표적 $\beta$ Pix 관련연구자

- Scripps Research Institute의 Dr. Gary Bokoch
- Imperial College 의 Dr. Louis Lim
- Cornell Univ.의 Dr. Richard Cerione

● 대표적 Epithin 관련연구자

- Georgy Town 의과대학 롬바르디 암센터의 Dr. Richard Dixon
- U.C. San Francisco의 Dr. Charles Craik

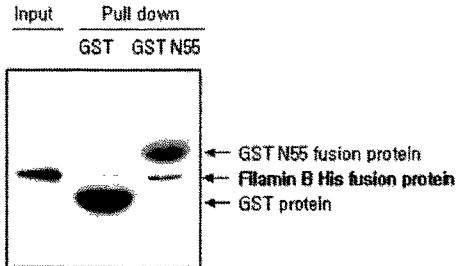
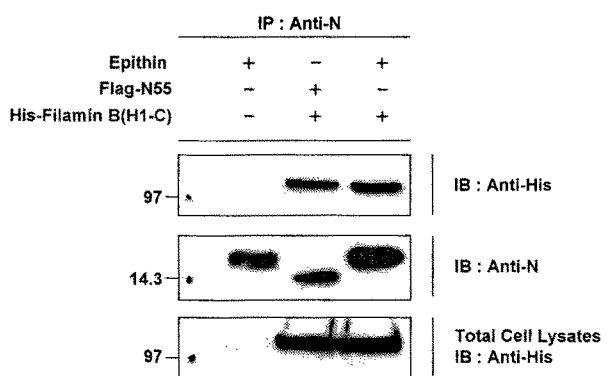
(2) 국내의 기술동향 및 수준

◎ 세포이동성 제어기술에 대한 국내의 연구는 선진국에 비해 아직 미비한 수준이다. 그러나 최근들어 세포생물학분야의 연구자들이 증가하면서 세포골격근의 조절에 관여하는 신호전달경로에 대한 연구가 활발해 지고 있다. 고려대 생명공학연구소의 김재홍박사 연구실은 감염부위로의 neutrophil의 이동과정을 연구하고 있고, 광주과학기술원의 송우근박사 연구실은 integrin-mediated 세포부착에 관한 연구를 하고 있으며, 벤처기업인 코메드 생명공학연구소의 윤병수박사팀은 면역세포의 주화성(chemotaxis)를 유발하는 사이토카인의 신호전달경로를 본 연구실과 공동으로 연구하고 있다. 또한 연세대 이승택교수 연구실은 저분자 MMP 저해제에 의한 세포외기질 분해조절을 연구하고 있다.

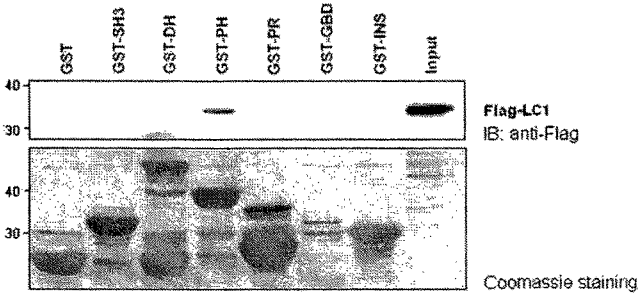
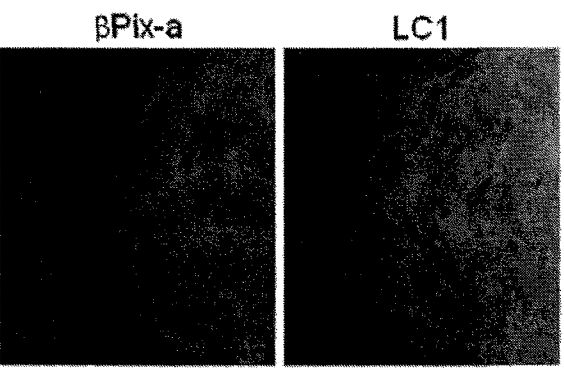
◎ 현 기술상태의 취약성

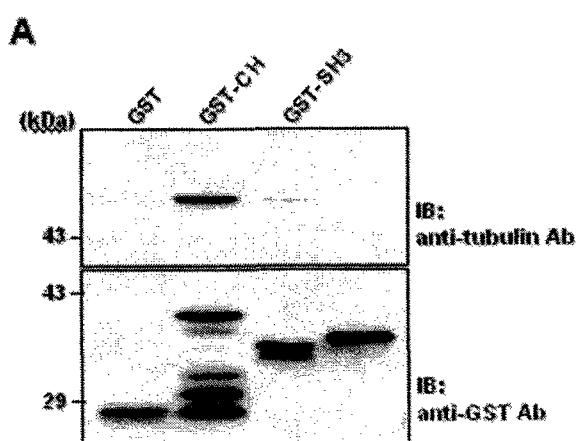
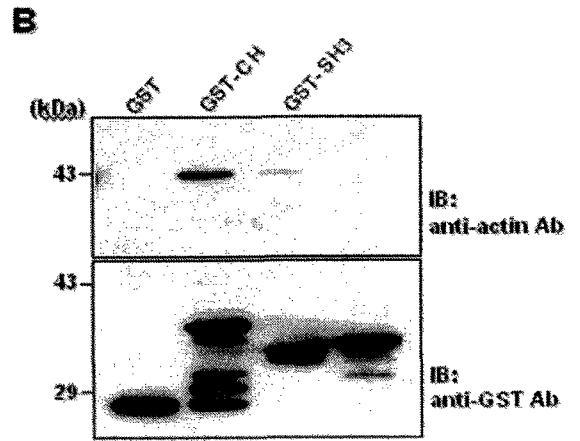
현재 국내에서는 대웅제약, 삼양제넥스, 리드바이오와 같은 몇몇 제약 회사나 바이오 벤처에서 간접적으로 세포의 이동성의 근간이 되는 세포골격근 조절을 통한 항암제의 개발이나 상처치유 촉진제의 개발에 성공하거나 성공단계에 이른 경우도 존재한다. 그러나 암전이 억제, 상처의 치유, 염증 반응 등을 조절하는데 있어서 근간이 되는 세포의 이동성 기작에 대한 기초연구에 대한 투자는 아직 미미한 상태이다. 이 분야의 지속적인 신제품 개발을 위해서는 세포이동성 기작을 밝힘으로써 신약개발의 target이 되는 단백질이나 이에 대한 조절기작을 밝혀내는 과정이 필수적이다. 그러므로 우리 나라도 이 분야의 경쟁력을 확보하기 위하여 지속적인 지원이 요구되는 상황이다.

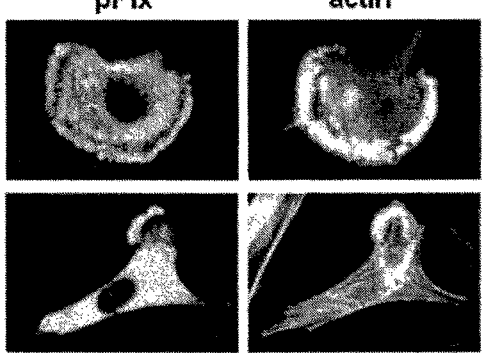
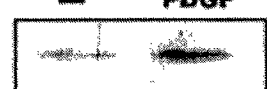
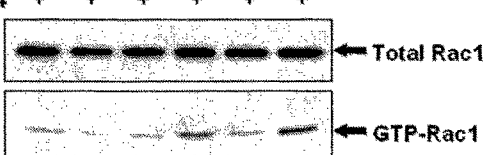
### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

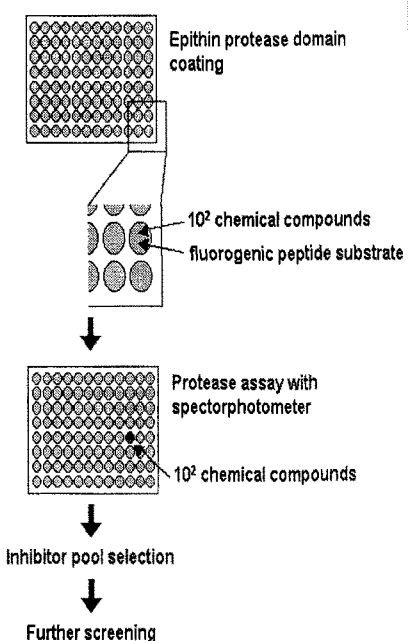
	연구내용	연구 결과
1차년도	Yeast two hybrid screening을 이용한 Epithin의 N-terminal 결합 단백질 검색	<p>Epithin의 cytoplasmic tail을 bait로 하여 18일된 생쥐 배아의 cDNA library에서 Epithin의 결합 단백질을 검색한 결과 actin 결합 단백질인 filamin B가 Epithin의 cytoplasmic domain과 결합할 수 있다는 사실을 관찰하였고 이는 pull down assay (그림 5)와 co-immunoprecipitation assay(그림 6)로 확인할 수 있었다.</p>  <p>그림 5. Filamin B와 Epithin cytoplasmic domain의 결합</p>  <p>그림 6. Filamin B와 Epithin의 결합</p> <p>이전의 여러 보고에 의하면 filamin은 von Willebrand Factor(vWF) receptor의 한 subunit이나, integrin등과 같은 transmembrane protein의 cytoplasmic domain에 결합하여 cortical actin이나 stress fiber를 transmembrane protein과 연결시키는 역할을 한다는 것이 잘 알려져 있다. 따라서 다른 여러 transmembrane protein과 같이 Epithin도 filamin을 통하여 세포골격인 F-actin과 상호작용할 수 있는지, 또한 이러한 상호작용이 Epithin의 cellular localization나 Epithin의 활성화와는 어떠한 관련이 있는지 알아보는 것이 앞으로의 주된 과제중 하나이다.</p>

	연구내용	연구결과										
<p>1차년도</p> <p>Proteomics 기술을 이용한 Epithin의 C-terminal 결합 단백질 검색</p>		<p>Yeast two hybrid screening으로는 불가능하리라 여겨지는 단백질분해효소 Epithin의 기질을 검색하기 위한 첫 단계로, Epithin과 결합하는 단백질을 co-immunoprecipitation 기법으로 분리해내기 위해 Epithin의 N-terminal region을 인식하는 antibody를 CNBr-sepharose에 cross-link 하여 affinity column을 제작하고, Epithin을 발현하고 있는 427.1.86 세포주를 재료로 하여 co-immunoprecipitation을 수행하였다(그림 7).</p> <div data-bbox="577 696 1313 1150"> </div> <p>그림 7. (A)Epithin의 결합단백질, (B)Epithin과 Tie2의 결합</p> <p>그림 3의 A에서 확인할 수 있듯이, Epithin의 두 fragment인 Epi-S와 N-terminal fragment(NTF), 그리고 column에서 떨어져 나온 Epithin의 antibody(IgG)와 같은 단백질 이외에, 여러 가지의 단백질들 관찰할 수 있었고, 이들을 MALDI-TOF 방법으로 확인해 본 결과 표1과 같은 Epithin 결합단백질을 찾아낼 수 있었다. 특히 Tie2와 같은 막단백질은 Epithin의 <i>in vivo</i> substrate일 가능성이 크므로 이에 대한 지속적인 연구를 통해 Epithin과 이들의 상호작용이 가지는 의미를 분석해야 할 것이다.</p> <p><b>표 1. Epithin 결합단백질</b></p> <table border="1" data-bbox="536 1743 1342 2046"> <tbody> <tr> <td>전사조절</td> <td>Similar to splicing factor 3b Similar to DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 1</td> </tr> <tr> <td>단백질안정화</td> <td>HSP70s</td> </tr> <tr> <td>세포내신호전달</td> <td>Eukaryotic elongation factor-2 kinase Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein 2</td> </tr> <tr> <td>세포골격근</td> <td><math>\gamma</math>-actin</td> </tr> <tr> <td>막단백질</td> <td>Receptor-activated cation channel TRP4 Endothelial-specific receptor tyrosine kinase(TEK, Tie2)</td> </tr> </tbody> </table>	전사조절	Similar to splicing factor 3b Similar to DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 1	단백질안정화	HSP70s	세포내신호전달	Eukaryotic elongation factor-2 kinase Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein 2	세포골격근	$\gamma$ -actin	막단백질	Receptor-activated cation channel TRP4 Endothelial-specific receptor tyrosine kinase(TEK, Tie2)
전사조절	Similar to splicing factor 3b Similar to DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 1											
단백질안정화	HSP70s											
세포내신호전달	Eukaryotic elongation factor-2 kinase Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein 2											
세포골격근	$\gamma$ -actin											
막단백질	Receptor-activated cation channel TRP4 Endothelial-specific receptor tyrosine kinase(TEK, Tie2)											

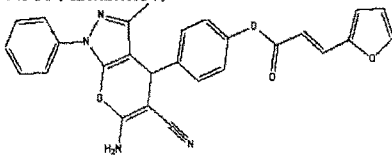
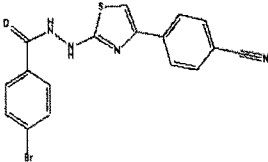
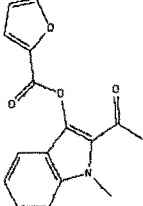
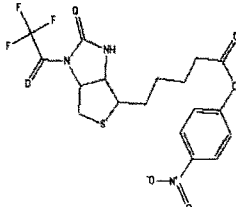
	연구내용	연구결과
1차년도	βPix의 결합 단백질의 검색	<p>βPix를 bait로 이용하여 yeast two hybrid를 수행한 결과, 세포 골격근 조절 단백질과 관련된 것으로 MAP1b라는 microtubule 결합 단백질을 동정하였다. 특히 MAP1b 중에서 LC1이라는 부분과 βPix가 결합한다는 것을 밝혔다. 또한 βPix의 어떤 결합 기능성 부위가 LC1과의 결합에 관여하는지를 조사한 결과 기존에 알려져 있지 않은 새로운 부위가 이러한 결합에 관여한다는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라 LC1에 의해서 재배열된 microtubule로 βPix가 이동하여 그곳에 결합된다는 사실이 밝혀졌다.</p>  <p>그림 8. βPix와 MAP1b LC1의 결합</p>  <p>그림 9 βPix와 MAP1b LC1의 세포 내 colocalization</p>

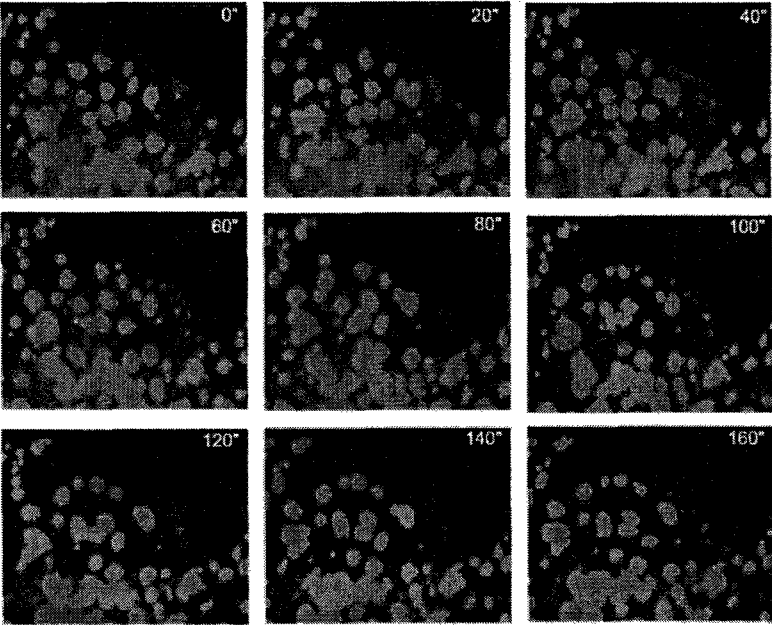
	연구내용	연구결과
1차년도	βPix의 결합 단백질의 검색	<p>βPix의 isoform인 βPix-b<sub>L</sub>은 다른 isoform과는 달리 calponin homology(CH) 기능성부위를 가지고 있다. 다른 단백질의 CH domain은 세포 골격을 이루는 단백질과의 결합이 보고 되어 있으므로, βPix의 CH 기능성부위에 대한 결합 단백질을 조사하였다. 따라서 이 부분을 GST 융합단백질을 만들어서 이에 대한 affinity chromatography를 실시하여 찾아진 단백질을 MALDI-TOF를 이용하여 동정한 결과 microtubule을 구성하는 tubulin과 actin filament를 구성하는 actin이 결합한다는 사실을 밝혀내었다.</p> <div style="text-align: center;"> <p><b>A</b></p>  <p><b>B</b></p>  </div> <p>그림10. βPix와 tubulin, actin과의 상호 결합 확인          이외에도 MALDI-TOF 기술을 이용하여 proline-rich region에 결합하는 단백질로 NEDD-4를 밝혀냈으며, 이의 의미를 연구 중에 있다.</p>

	연구내용	연구결과														
	<p>βPix의 결합 단백질의 검색</p>	<p>PAK과의 결합 기능성부위인 SH3 기능성부위와, PAK의 activator인 Rac을 활성화시키는 DH 기능성부위의 돌연변이가 유도된 βPix는 actin 세포골격근의 재배열 현상중의 하나인 membrane ruffling을 저해한다는 사실을 확인하였다.</p> <div style="text-align: center;"> <p>βPix                  actin</p>  <p>정상 βPix</p> <p>SH3DH 돌연변이</p> </div> <p>그림 11. NIH3T3 세포주에서 SH3 기능성부위와 DH 기능성 부위에 돌연변이가 actin 세포골격근에 미치는 영향</p>														
1차년도	<p>βPix의 <i>in vivo</i> GEF assay 확립</p>	<p><i>In vivo</i> GEF assay를 구축하기 위해서 기존에 알려진 Rac을 활성화 시키는 PDGF를 대조군으로 사용하였다. 결과 PDGF에 의해서 Rac이 활성화 되는 것을 측정할 수가 있었다. 이와 같이 구축된 assay를 사용하여 βPix가, 상위의 heterotrimeric G protein의 활성화를 유도하는 fluoroaluminate에 의해서 Rac을 활성화 시킨다는 사실을 밝혀내었다.</p> <div style="text-align: center;"> <p>—                  PDGF</p>  <p>그림 12. GEF assay의 확립</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>βPix</td> <td>-</td> <td>a</td> <td>b</td> <td>c</td> <td>p50</td> <td>Vav</td> </tr> <tr> <td>AIF4<sup>-</sup></td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </table>  <p>← Total Rac1</p> <p>← GTP-Rac1</p> </div> <p>그림 13. fluoroaluminate에 의한 βPix, Rac의 활성화</p>	βPix	-	a	b	c	p50	Vav	AIF4 <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	+
βPix	-	a	b	c	p50	Vav										
AIF4 <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	+										

	연구내용	연구결과
2차년도	Epithin의 효소활성저해제 탐색을 위한 <i>in vitro</i> screening system 확립	<p>Epithin의 효소활성저해제의 탐색을 위한 enzyme의 source로, <i>E.coli</i>에서 과발현시킨 Epithin의 protease domain의 순수 분리를 목적으로 하였으나, 이러한 시도는 과발현된 protease domain의 solubization과 activation에 상당한 어려움이 있었다. 이에 따른 대안으로, Epithin을 내재적으로 발현하는 세포에서 activation된 Epithin을 분리하는 방법을 선택하였다. 이전의 연구에 따르면 Epithin은 manganese 처리에 의해 activation이 유도됨으로, 이를 처리한 세포의 medium을 실험에 사용하여 아래와 같은 screening system을 확립하였다.</p> <p>위에서 언급한 activated Epithin의 포함된 medium을 각 well에 처리하고, chemical library에서 얻은 10여개의 화학물질 pool 또한 각 well에 처리한 후, Epithin의 protease activity를 측정할 수 있는 fluorogenic peptide substrate (N-t-Boc-Glu-Ala-Arg-7-amido-4-methylcoumarin)를 넣어 주었다. 다음으로 이를 spectrophotometer를 이용하여 330 nm의 파장으로 excitation 시키고 440 nm의 emission 파장을 측정함으로써 substrate가 Epithin에 의하여 분해되었는지 알 수 있게 되고 그에 따라 Epithin의 효소활성을 저해할 수 있는 화학물질이 넣어준 pool에 있는지를 알 수 있다. 이와 같은 방법으로 well 당 10개의 화학물질이 있는 pool을 넣어준 96-well-plate를 약 10개 사용하면 만개의 화학물질 중에 Epithin의 효소활성저해제가 들어 있는 pool을 찾아 낼 수 있다. 이후 얻어진 pool 에 있는 화학물질을 나누어 한 종류씩 Epithin과 fluorogenic peptide substrate를 넣은 96 well에 나누어 처리하여 최종적으로 Epithin의 효소활성을 저해할 수 있는 물질을 얻을 수 있게 된다.</p>  <p>그림14 . Epithin의 효소활성저해제 탐색법</p>



	연구내용	연구결과												
2차년도	Chemical library screening을 통한 Epithin의 효소활성 저해제 탐색	<p>위의 방법으로 10,000 종의 chemical을 검색한 결과, 아래 그림과 같은 네가지 chemical이 비교적 낮은 농도 (50<math>\mu</math>M)에서 Epithin의 활성을 50% 이상 저해함을 확인하였다(그림 15). 현재 이들 lead chemical들의 구조를 근거로 specificity와 efficacy가 더 높은 저해제를 찾는 연구가 수행중이다. 이들 Epithin의 효소활성 저해제는 Epithin의 특성연구 뿐만 아니라 암세포전이 억제제로서 개발될 가능성을 가지고 있다.</p> <table border="1" data-bbox="556 1013 749 1196"> <thead> <tr> <th colspan="2">% of Activity</th> </tr> <tr> <th>Chemical</th> <th>200 <math>\mu</math>M</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>740 D5</td> <td>-26</td> </tr> <tr> <td>834 D4</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>834 D5</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>836 E10</td> <td>7</td> </tr> </tbody> </table> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;"> <p>740 D5 (C<sub>27</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>)</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>834 D4 (C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>)</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>834 D5 (C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>)</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>836 E10 (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S)</p>  </div> </div> <p>그림 15. Epithin의 효소활성 저해제로 동정된 4가지 화합물</p>	% of Activity		Chemical	200 $\mu$ M	740 D5	-26	834 D4	35	834 D5	29	836 E10	7
% of Activity														
Chemical	200 $\mu$ M													
740 D5	-26													
834 D4	35													
834 D5	29													
836 E10	7													

	연구내용	연구결과
<p>2차년도</p>	<p>βPix에 의해 유도되는 endocytosis 과정의 real-time imaging 기술확립</p>	<p>Live cell imaging 기술은 현미경에 장기간 세포배양이 가능하도록 온도, 습도, 이산화탄소를 일정하게 공급, 유지시킬 수 있는 chamber와 고해상도 slow scan cooled digital camera를 장착하여 살아있는 이용하여 세포의 움직임을 관찰할 수 있도록 고안한 연구 시스템이다. 시스템을 이용하여 세포의 이동성을 살아있는 상태에서 정확히 관찰, 분석할 수 있다. 위의 그림은 신경세포 초기 발생과정에서 신경말단이 이동하는 과정을 실시간으로 관찰한 그림이다. 이와 같은 위상차 image 외에도 FGFP등의 형광단백질을 세포내에 발현시거나 fluorescence dye를 이용하여 세포이동에 관여하는 분자적 기작을 조사하는데에도 사용되고 있다. 최근 이 기술을 이용한 세포이동성 연구는 세계적인 추세이며 꾸준히 개발되어 오고 있다. 현재 선진국 여러 실험실에서 사용되고 있는 기술이지만 국내에서는 아직 도입단계에 있으며 본 실험실을 비롯하여 일부 연구자들에 의해 사용되고 있다.</p>  <p>그림 16. Real-time imaging 기술의 확립. βPix-b<sub>L</sub>에 의한 endocytosis</p>

	연구내용	연구 결과												
<p>2차년도</p> <p>세포골격근 조절 βPix 결합단백질들의 기능연구</p>		<p>βPix가 MAP1b LC1이 결합한다는 것을 본 실험실에서 동정한 이후에 이와같은 결합이 세포내에서 어떤 기능을 수행할 것인가에 대한 연구를 수행하였다.</p> <p>MAP1b LC1이 microtubule과 결합하여 이를 안정화 시킨다는 점에 착안하여, 이때 βPix가 어떤 기능을 수행하는가에 대해서 알아보기 위해서 immunocytochemistry를 수행하여 보면, βPix / LC1 중합체는 acetylated microtubule 즉 안정화된 microtubule과 결합하여 있다는 사실을 보여준다.</p> <div data-bbox="749 747 1177 1174" data-label="Image"> </div> <p>그림 17. βPix와 acetylated microtubule과의 colocalization</p> <p>또한 LC1에 의한 microtubule의 안정화는 βPix의 기능에 의해서 조절된다는 사실 또한 밝혀내었다. βPix의 SH3 domain과 DH domain을 동시에 돌연변이화한 βPix를 세포에 발현시키면 이러한 세포는 LC1이 microtubule을 안정화시키는 능력을 저해시킴을 알 수가 있다. 이러한 조절은 βPix에 의한 PAK의 활성 조절이 중요하다는 사실 또한 밝혀내었다.</p> <div data-bbox="702 1625 1215 1957" data-label="Figure"> <table border="1"> <caption>Data for Figure 18: Proportion of cells with highly stabilized microtubules (%)</caption> <thead> <tr> <th>Construct</th> <th>Proportion (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>LC1</td> <td>~52</td> </tr> <tr> <td>βPix-a WT LC1</td> <td>~48</td> </tr> <tr> <td>SH3m LC1</td> <td>~49</td> </tr> <tr> <td>SH3DHm LC1</td> <td>~37</td> </tr> <tr> <td>DHm LC1</td> <td>~46</td> </tr> </tbody> </table> </div> <p>그림 18 . βPix에 의한 microtubule 안정화의 조절</p>	Construct	Proportion (%)	LC1	~52	βPix-a WT LC1	~48	SH3m LC1	~49	SH3DHm LC1	~37	DHm LC1	~46
Construct	Proportion (%)													
LC1	~52													
βPix-a WT LC1	~48													
SH3m LC1	~49													
SH3DHm LC1	~37													
DHm LC1	~46													

	연구내용	연구결과
2차년도	<p>Membrane recycling을 조절하는 <math>\beta</math>Pix 결합단백질의 동정</p>	<p>Dynamin은 <math>\beta</math>Pix와 결합하는 단백질로 본 연구실에서 동정된 단백질로써, <math>\beta</math>Pix의 SH3 domain에 결합하는 것을 밝혀내었다. <math>\beta</math>Pix와 결합하는 dynamin은 세포 내에서 같은 localization을 보이며, 특히 <math>\beta</math>Pix에 의해 형성되는 endosome 구조로 recruit되는 것을 밝혀내었다. Dynamin과 결합하지 못하는 <math>\beta</math>Pix mutant의 경우, endosome으로의 localization이 두 단백질 모두에서 저해되는 것으로 보아, 이 두 단백질 간의 결합이 endosome의 형성 과정에서 필수적인 것임을 예상할 수 있다. 이 경우, 두 단백질 모두 세포막에 주로 위치하는 것은 fission 과정이 일어나지 않아서 endosome의 형성이 이루어지지 않아서 초래된 결과임을 또한 알 수 있다. 현재까지의 결과로써는 dynamin의 GTPase 활성이 endosome의 형성을 억제하지 않는 것으로 생각된다.</p> <div data-bbox="682 387 1356 763"> </div> <p>그림 19 A. GST-Pix SH3 융합 단백질을 이용하여 생쥐의 뇌에서 결합단백질을 확인하였다. B. Immunoprecipitation을 이용하여 Pix와 Dynamin의 결합을 확인하였다.</p> <div data-bbox="862 1006 1301 1548"> </div> <p>그림 20. dynamin과 Pix의 세포 내 localization과 dynamin과 결합하지 못하는 Pix과의 localization을 관찰하였다.</p>

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### (1). 연구개발의 최종목표

1. Type II 막단백분해효소 Epithin의 기능조절을 통한 세포외기질 분해 제어기술 탐색
2. Rac/Cdc42의 GEF인βPix의 기능조절을 통한 세포골격근의 재배열 제어기술 탐색
3. Rac/Cdc42의 GEF인βPix의 기능조절을 통한 세포막확장 제어기술 탐색
4. 세포이동성 제어를 통한 질병치료 방안 도출

### (2) 연차별 연구개발 목표 및 내용

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2002년)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Epithin의 기능조절 단백질 검색</li> <li>2. 세포골격근 재배열에 관여하는 βPix의 기능조절 단백질 검색</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Yeast two-hybrid screening을 이용한 Epithin의 N-terminal 결합단백질 검색</li> <li>● Proteomics 기술을 이용한 Epithin의 C-terminal 결합 단백질 검색</li> <li>● βPix의 기능성부위(domain)별 결합단백질의 검색</li> <li>● βPix의 <i>in vivo</i> GEF assay 확립</li> </ul>
2차년도 (2003년)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Epithin의 효소활성 저해제 탐색</li> <li>2. 세포막 확장에 관여하는 βPix의 기능조절 단백질 검색</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Epithin의 효소활성저해제 탐색을 위한 <i>in vitro</i> screening system 확립</li> <li>● Chemical library screening을 통한 Epithin의 효소활성 저해제 탐색</li> <li>● βPix에 의해 유도되는 endocytosis 과정의 real-time imaging 기술확립</li> <li>● 세포골격근 조절 βPix 결합단백질들의 기능연구</li> <li>● Membrane recycling을 조절하는 βPix 결합단백질의 동정</li> </ul>

(3) 연구 개발의 목표 달성도

	세부연구개발목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1차년도	Epithin의 기능조절 단백질 검색	Epithin의 기능조절단백질로 Filamin과 Tie-2를 동정함	100
	세포골격근 재배열에 관여하는 $\beta$ Pix의 기능조절 단백질 검색	$\beta$ Pix의 결합단백질로 MAP1b, adducin, actin, tubuline을 동정함	100
2차년도	Epithin의 효소활성 저해제 탐색	Lead compound 4종 분리	100
	세포막 확장에 관여하는 $\beta$ Pix의 기능조절 단백질 검색	$\beta$ Pix-b <sub>L</sub> isoform이 endocytosis를 증가시킴을 확인하고, $\beta$ Pix의 결합단백질로 endocytosis의 key factor인 Dynamin을 동정함.	80
	Time lapse Imaging 기술 확립	time lapse imaging이 가능한 CO2 chamber와 온도조절기능을 갖춘 현미경시스템 확립	100

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### (1) 추가연구의 필요성

● Tie-2는 신생혈관형성과정에서 중요한 역할을 하는 Angiopoietin-1의 수용체이다. 1단계 연구결과로 밝혀진 Epithin에 의한 Tie-2의 down-regulation은 Angiopoietin-1에 의한 신생혈관의 형성, 암의 성장 조절에 중요한 조절기작이 될 수 있으므로 이에 대한 후속연구가 필요하다.

● Filamin은 actin 결합단백질로 외부 신호에 의한 액틴 세포골격근의 변화를 Epithin과 같은 세포막단백질로 연결시킬 수 있다. 1단계 연구결과로 밝혀진 Filamin에 의한 Epithin의 shedding 및 활성증가는 현재 거의 알려져 있지 않은 Epithin의 활성 조절기작이 될 수 있으므로 이에 대한 후속연구가 필요하다.

● 1단계 연구결과 chemical library로부터 Epithin의 효소활성 저해제 4종을 분리하였다. 향후 이들의 유도체 screening을 통해 specificity와 efficacy가 더 높은 chemical을 찾는 연구가 필요하며, 또한 이들이 실제 세포이동성을 제어하는 지에 대한 in vitro 및 in vivo model에서의 검증을 위한 후속연구도 필요하다.

● 1단계 연구결과 검색된  $\beta$ Pix의 결합 단백질, Map1b, Adduccin, Actin, Tubuline, Dynamine등에 대해서는 2단계 연구를 통해 이들이 실제로  $\beta$ Pix와의 상호작용을 통해 microtubule, actin filament와 같은 세포골격근의 재배열, endocytosis의 조절을 통한 membrane recycling의 조절에 관여하는 지, 또 어떤 신호전달기작을 통해 작용하는 지를 밝혀야 한다.

### (2) 타연구에의 응용 및 기업화 추진방안을 기술

1단계 연구수행의 결과 Epithin과  $\beta$ Pix의 기능조절 단백질 및 효소활성 저해제가 분리되었다. 그러나 이들이 실제로 세포이동성 조절에 관여하는 지는 2단계 연구를 통해 확인되어야 하며, 또한 효율적인 세포이동성 제어방안의 도출을 위해서는 이들의 작용기작이 밝혀져야 한다. 2단계 연구의 후반부는 도출된 세포이동성 제어방안에 대한 in vitro 및 in vivo 모델에서의 효용성 검증으로 이 과정은 도출된 세포이동성 제어방안이 암전이 억제, 염증 억제등의 질병치료에 직접 적용될 수 있을 지를 가능하게 해 줄 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 과제의 수행을 위해서 필요로 하는 동물 모델 시스템을 개발하기 위해서, 이에 대한 전문가를 초청하여 세미나를 수행하였다.

### ● 초청강연 “Transcriptional control of forebrain development”

1. 일 시 : 2004년 5월 25일
2. 연 사 : Dr. Heiner Westphal, NICHD, NIH, USA
3. 장 소 : 서울대학교 생명과학부 세미나실
4. 본 과제 수행과의 연관성

Dr. Heiner Westphal 박사는 미국 국립보건원 Lab. of Mammalian Genes의 연구실장으로서, 다양한 knock-out mouse를 제조하였으며 그의 실험실은 현재 미국 국립보건원에서도 가장 knock-out mouse를 잘 만드는 실험실로 정평이 나 있다. 현재 본 실험실과 공동연구로  $\beta$ Pix knock-out mouse 제조를 진행하고 있으며, 이 번 방문을 통해 향후 공동연구 진행 사항에 대해서도 토의를 진행하였으며, 세미나를 통하여 그 제조 기술에 대한 정보를 수집하였다.



## 제 7 장 참고문헌

1. Chang C. and Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. (2001) Trends Cell. Biol., 11, S37-43
2. Chicurel M. Cell migration research is on the move. (2002) Science., 295, 606-609
3. Cho E.-G., Kim M.G., Kim C., Kim S.-R., Seong I.S., Chung C., Schwartz R.H. and Park D. N-terminal Processing Is Essential for Release of Epithin, a Mouse Type II Membrane Serine Protease (2001) J. Biol. Chem., 276, 44581-44589
4. Chung C.Y., Funamoto S. and Firtel R.A. Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. (2001) Trends Biochem. Sci., 26, 557-66
5. Condeelis J. How is actin polymerization nucleated *in vivo*? (2001) Trends Cell Biol., 7, 288-293
6. Condeelis J.S., Wyckoff J.B., Bailly M., Pestell R., Lawrence D., Backer J. and Segall J.E. Lamellipodia in invasion. (2001) Semin. Cancer Biol., 11, 119-128
7. de Curtis I. Cell migration: GAPs between membrane traffic and the cytoskeleton. (2001) EMBO. Rep., 2, 277-281
8. Ellis V. and Murphy G. Cellular strategies for proteolytic targeting during migration and invasion. (2001) FEBS., 506, 1-5
9. Feldner J.C. and Brandt B.H. Cancer cell motility on the road from c-erbB-2 receptor steered signaling to actin reorganization. (2002) Exp. Cell Res. 272, 93-108
10. Holt M.R. and Koffer A. Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. (2001) Trends Cell Biol. 11, 38-46
11. Kim M.G., Chen C., Lyu M.S., Cho E.G., Park D., Kozak C. and Schwartz R.H. Cloning and chromosomal mapping of a gene isolated from thymic stromal cells encoding a new mouse type II membrane serine protease, epithin, containing four LDL receptor modules and two CUB domains. (1999) Immunogenetics. 49, 420-428
12. Kim S., Kim T., Lee D., Park S.H., Kim H. and Park D. Molecular cloning of neuronally expressed mouse betaPix isoforms. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 272, 721-725
13. Kim S., Lee S.-H. and Park D. Leucine Zipper-Mediated Homodimerization of

- the Pak Kinase Interacting Factor,  $\beta$ Pix : Implication for a role in cytoskeletal reorganization. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 10581-10584
14. Kim T. and Park D. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Mouse  $\beta$ Pix isoform. (2001) *Mol. Cells.*, 11, 89-94
  15. Lee S.-H., Eom M., Lee S.J., Kim S., Park H.-J. and Park D.  $\beta$ Pix-enhanced p38 Activation by Cdc42/Rac/PAK/MKK3/6-mediated Pathway : Implication in the regulation of membrane ruffling. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 25066-25072
  16. Oh W.K., Yoo J.C., Jo D., Song Y.H., Kim M.G. and Park D. Cloning of a SH3 domain-containing proline-rich protein, p85SPR, and its localization in focal adhesion. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235, 794-798
  17. Price L.S. and Collard J.G. Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion. (2001) *Semin. Cancer Biol.*, 11, 167-73
  18. Ridley A.J., Rho GTPases and cell migration. (2001) *J. Cell. Sci.*, 114, 2713-2722
  19. Ridley A.J. Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility. (2001) *FEBS Lett* 498, 168-71
  20. Stetler-Stevenson W.G. and Yu A.E. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. (2001) *Semin. Cancer Biol.*, 11, 143-152
  21. Takenawa T. and Miki H. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. (2001) : *J. Cell Sci.*, 114, 1801-9
  22. Wittmann T. and Waterman-Storer C.M. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? (2001) *J. Cell. Sci.*, 114, 3795-3803
  23. Zucker S., Cao J. and Chen W.T. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. (2000) *Oncogene*, 19, 6642-50

## 특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	특정연구개발사업		
	세부사업명	국가지정연구실사업		
과제명	세포골격근재배열 및 세포외기질분해 조절을 통한 세포이동성 제어연구			
연구기관	서울대학교	연구책임자	박동은	
총연구기간	2002년. 6월. 25일. ~ 2004년. 6월. 24일. ( 24개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	480,000		480,000	
기술분야				
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ( )	2. 기술이전( )	3. 후속연구추진( )	4. 타사업에 활용( )
	5. 선행 및 기초연구(√)	6. 기타목적활용(교육연구)( )	7. 활용중단(미활용)( )	8. 기타( )

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.  
2. 기술요약서 1부

2004 년 12월 2일

연구책임자 : 박 동 은  
연구기관장 : 서울대학교



(직인)

과학기술부장관 귀하

## [첨부1]

# 연구결과 활용계획서

### 1. 연구목표 및 내용 (1단계)

#### (1) Epithin의 기능조절 단백질 검색

- Yeast two-hybrid screening을 이용한 Epithin의 N-terminal 결합단백질 검색하고, proteomics 기술을 이용한 Epithin의 C-terminal 결합 단백질 검색한다.

#### (2) Epithin의 효소활성 저해제 탐색

- 효소활성저해제 탐색을 위한 *in vitro* screening system을 구축하고, 이를 바탕으로 chemical library screening을 통한 Epithin의 효소활성 저해제 탐색한다.

#### (3) 세포골격근 재배열에 관여하는 $\beta$ Pix의 기능조절 단백질 검색

- 기능성부위(domain)별로 결합 단백질을 검색하며, 이들 단백질들과  $\beta$ Pix의 상호작용에 의한 세포골격근 조절 기능을 연구한다.

#### (4) 세포막 확장에 관여하는 $\beta$ Pix의 기능조절 단백질 검색

- Membrane recycling을 조절하는  $\beta$ Pix 결합단백질의 동정하고, 이의 연구를 위해서 endocytosis 과정의 real-time imaging 기술을 확립한다.

### 2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

#### 가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고

#### 나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

#### 다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
<i>J. Biol. Chem.</i>	Phosphorylation of p85 $\beta$ Pix, a Rac/Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor, via the Ras/ERK/PAK2 pathway is required for basic fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth.	2002.11.15	277:444 17-4443 0	the American Society for Biochemistry and Molecular Biology	미국	○
<i>Cancer Letters</i>	Overexpression of $\beta$ Pix-a in human breast cancer tissues	2003.4.10	93(1):99 -107	Elsevier B.V	미국	○
<i>J. Biol. Chem.</i>	The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42	2003.5.23	278:192 20-1922 9	the American Society for Biochemistry and Molecular Biology	미국	○
<i>Eur. J. Biochem.</i>	Activation of p21-activated kinase 1 is required for lysophosphatidic acid-induced focal adhesion kinase phosphorylation and cell motility in human melanoma A2058 cells	2004.1.2	271: 1557-15 65	the Federation of European Biochemical Societies	유럽	○
<i>J. Biol. Chem.</i>	Cdc42-dependent mediation of UV-induced p38 activation by G protein beta gamma subunits	2004.4.23	279:173 66-1737 5	the American Society for Biochemistry and Molecular Biology	미국	○
<i>Biochem. Biophys. Res.</i>	$\beta$ Pix-bL, a novel isoform of $\beta$ Pix, is generated by alternative translation, and regulates cellular pinocytosis	2004.5.28	318:415 -421	Elsevier B.V	미국	○
<i>Mol. Cell. Biol.</i>	Sequential activation of PI3K, Pix, Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2004.5.24	24(10): 4384-43 94	the American Society for Microbiology	미국	○
<i>Biochem. Biophys. Res.</i>	Pak regulates calpain-dependent degradation of E3b1	2004.6.25	319:683 -689	Elsevier B.V	미국	○
<i>EMBO report</i>	Filamin is essential for shedding of the transmembrane serine protease, epithin	2004.2.10	in revision	the European Molecular Biology Organization	유럽	○
계: 9건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	계재연월일	호	발행기관	국명
제 14회 세포생물학회 학술발표회	Molecular Cloning and Characterization of a novel Mouse $\beta$ PIX Isoform	2002.8.16-17	14회	세포생물학회	한국
제 14회 세포생물학회 학술발표회	$\beta$ PIX isoforms cooperate with dynamin in regulating endosome dynamics	2002. 8.16-17	14회	세포생물학회	한국
The 3rd FAONS Congress	Differential distribution and phosphorylation of $\beta$ PIX Isoforms and their regulated interaction with dynamin in the neurons	2002.9.28-10.1	3회	the Federation of Asian-Oceanian Neuroscience Societies	한국
제 57회 한국생물과학협회 학술발표대회	Secretion of Epithin is regulated by PKC-p38 MAPK pathway and requires rearrangement of actin microfilaments	2002.10.24-26	57회	한국생물과학협회	한국
한국 분자세포생물학회 추계학술대회	$\beta$ Pix-bL, a novel isoform of $\beta$ Pix, is generated by alternative translation, and regulates cellular pinocytosis	2002.10 17-18		분자생물학회	한국
42nd American Society for Cell Biology Annual Meeting	Molecular Cloning and Characterization of a novel Mouse $\beta$ PIX Isoform	2002.12.14-18	42회	American Society for Cell Biology	미국
42nd American Society for Cell Biology Annual Meeting	Differential distribution and phosphorylation of $\beta$ PIX Isoforms and their regulated interaction with dynamin in the neurons	2002. 12.14-18	42회	American Society for Cell Biology	미국
Gordon Research Conference on Mechanism of Cell Signaling	Pak activity regulates calpain-dependent degradation of E3b1	2003.6.1-6			미국
The 2nd Japan-Korea Conference on Cellular Signaling	Secretion of Epithin, A Mouse Type II Membrane Serine Protease Is Regulated by p38-dependent Pathway	2003. 7.14-17	2회		일본
The 2nd Japan-Korea Conference on Cellular Signaling	Pak activity regulates calpain-dependent degradation of E3b1	2003.7.14-17	2회		일본
한국분자생물학회 추계학술대회	Filamin, actin binding protein, is required to release a transmembrane serine protease, epithin.	2003.10.9-10		분자생물학회	한국
Society for Neuroscience; 33rd Annual meeting	Differential distribution of $\beta$ PIX Isoforms and their regulated interaction with dynamin in the neurons	2003.11.8-12	33회	Society for Neuroscience	미국
The 10th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research	$\beta$ Pix-bL, a novel isoform of $\beta$ PIX, is generated by alternative translation, and regulates cellular pinocytosis.	2003.11. 18-19	10회		일본
43rd American Society for Cell Biology Annual Meeting	Release of Epithin is dependent on the interaction with filamin and reorganization of actin cytoskeleton	2003.12.13-17	43회	American Society for Cell Biology	미국
제6회 고사리 신호전달심포지움	Filamin links the transmembrane serine protease, epithin, to actin cytoskeleton and is required for shedding epithin	2004. 1. 29-31	6회	세포신호전달연구센터	한국
Nano and Microtechnology: Tools for the Future of Biology and Medicine Symposium	Topographical Control of Cell Growth using Holographic Surface Relief Grating	2004.4.17			미국
계: 16건수					

### 3. 연구성과

벤처회사 (주)코메드에  $\beta$ Pix의 polyclonal 항체개발기술을 이전하여 코메드가 생산한  $\beta$  Pix 항체를 OEM방식으로 미국계 항체판매 전문회사인 Chemicon International을 통해 판매중. 2003년도 총 판매는 4mg (약 \$10,000)이며, 이 중 코메드에 \$3,600이 지급되었으며 코메드가 지급받은 금액의 30% (\$1,080)에 해당하는 금액을 royalty로 지급받기로 함

### 4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

#### 가. 당해연도 활용계획

- 1단계 연구결과 chemical library로부터 Epithin의 효소활성 저해제 4종을 분리하였다. 당해연도에는 이들의 유도체 screening을 통해 specificity와 efficacy가 더 높은 chemical을 찾는 연구를 진행할 것이다.
- 1단계 연구결과 검색된  $\beta$ Pix의 결합 단백질, Map1b, Adduccin, Actin, Tubuline, Dynamine등에 대해서는 2단계 연구를 통해 이들이 실제로  $\beta$ Pix와의 상호작용을 통해 microtubule, actin filament와 같은 세포골격근의 재배열, endocytosis의 조절을 통한 membrane recycling의 조절에 관여하는 지, 또 어떤 신호전달기작을 통해 작용하는 지에 대한 연구를 진행할 것이다.

#### 나. 활용방법

- Epithin의 효소활성 저해제로 분리한 chemical을 이용하여, 이들이 실제 세포이동성을 제어하는 지에 대한 in vitro 및 in vivo model에서의 검증을 위한 후속연구를 수행한다.
- $\beta$ Pix의 결합 단백질로 동정된 단백질의 신호전달 기작을 밝힌 후 이를 이용하여 세포이동성을 제어하기 위한 모델을 수립한다.

#### 다. 차년도이후 활용계획

1단계의 연구수행 결과로 얻어진 Epithin 및  $\beta$ Pix의 기능조절 단백질들 및 효소활성 저해제들은 2단계에서 이루어질 세포이동성 제어방안 연구를 위한 재료를 제공하게 될 것이다. 앞으로 이들과 Epithin 및  $\beta$ Pix와의 상호작용이 어떻게 세포이

동성을 조절할 것인지에 대한 기능적 연구를 수행하여, 이를 기반으로 가능한 세포이동성 제어방안을 제시하고 이들을 대상으로 연구하여 얻어질 세포이동성 제어 기술들은 산업적 응용가치의 판단에 따라 기술이전 및 특허출원을 추진할 계획이다.

● **임상 실험에의 응용:**  $\beta$ Pix의 유방암조직에서의 과발현은 본 연구를 통하여 확인되었고, 전립선암 세포주에서의 Epithin의 과발현은 다른 그룹의 연구에 의해 보고되었다. 따라서 이들 단백질이 암세포의 표식인자로 사용될 수 있는지를 각종 암조직 및 암환자의 혈액등을 다수 확보하고 있는 임상 의사들과 공동으로 연구하여, 암 진단키트의 개발 가능성을 모색할 것이다.

● **관련 벤처 기업과의 공조 체제 구축:** 1단계 연구에서 (주)Sigmol과 공동연구로 수행된 chemical library screening을 통하여 Epithin 활성저해제 lead compound 4종을 분리하였다. 이들 lead compound를 모체로 이들의 유도체 screening을 통해 specificity와 efficacy가 높은 물질을 동정하고, 이들이 암세포의 전이를 막는 신약으로서의 가능성이 있는지를 배양세포 및 동물모델을 사용한 실험으로 검증할 것이다. 검증된 물질은 (주)Sigmol에 기술이전하여 전임상 실험을 수행하고자 한다. 이미 (주)코메드와 공동개발하여 상용화된  $\beta$ Pix 항체 이외에  $\beta$ Pix와 Epithin의 단클론항체의 개발과 관련 단백질들의 항체생산 및 상품화를 (주)코메드와 공동으로 추진할 것이다.

## 5. 기대효과

### 가. 기술적 측면

● 세포의 이동성 기작에 관한 연구는 선진국에서도 최근에 시작된 분야로 본 연구의 성공적인 수행은 아직도 많은 부분이 밝혀져 있지 않은 발생 및 조직의 분화과정에서 세포이동의 역할에 대한 새로운 지식을 제공할 것이다.

● 세포이동의 원동력을 제공하는 세포골격근의 재배열 조절은 세포이동 뿐만 아니라, 세포분열, 세포내 물질수송, endocytosis 및 exocytosis, 바이러스와 박테리아의 세포내 침투과정등에도 관여하고 있으므로 본 연구의 결과 얻어진 지식은 여러 중요한 생명현상의 이해에 도움을 줄 것이다.

●  $\beta$ Pix에 의한 endocytosis의 활성화 기작연구는 이를 활용하여 약물의 세포내 침투 (drug delivery) 효율을 높이는 방안에도 응용될 수 있을 것이다.



● Epithin은 세포외기질을 분해하는 단백질분해효소 cascade의 최상위에 존재할 것으로 생각되며, 또한 그 활성화부위가 세포막 외부에 존재하므로 Epithin의 효소활성 억제제는 세포내로의 deliver가 필요 없는 효과적인 암전이 억제제로서의 개발이 가능할 것이다.

#### 나. 경제·산업적 측면

● 비정상적인 세포이동의 결과는 암세포의 전이, 상처치유의 지연, 여러 감염성 질환등을 유발할 수 있으므로, 본 연구의 결과 효과적인 세포이동성 제어기술이 확립된다면 이를 이용한 신약개발은 그 시장성이 매우 클 것으로 판단된다.

● 현재 세포이동성 자체를 target으로 한 치료제는 거의 없는 편이다. 따라서 세포이동성 제어기술에 근거한 질환 치료제가 개발된다면 이는 기존의 치료제들과는 구별되는 미개발된 시장을 여는 것으로 독점적 지적재산권 확보를 통하여 장기적인 국부의 창출에 기여할 수 있을 것이다.

● 본 연구를 통하여 세포이동성 제어분야의 경쟁력 있는 전문인력을 양성하고, 국내에서 활용함으로써 국제사회에서 국가 경쟁력을 확보하는데 기여할 것이다.

#### 6. 문제점 및 건의사항

[첨부2]

## 기술 요약서

■ 기술의 명칭

세포골격근재배열 및 세포외기질분해 조절을 통한 세포이동성 제어 기술

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	M1-0203-00-0072			
과제명	세포골격근재배열 및 세포외기질분해 조절을 통한 세포이동성 제어 연구			
사업명	특정연구개발사업			
세부사업명	국가지정연구실사업			
연구기관	서울대학교	기관유형	학	
참여기관(기업)				
총연구기간	2002년. 6월. 25일. ~ 2004년. 6월. 24일.			
총연구비	정부(480,000)천원    민간(        )천원    합계(480,000)천원			
연구책임자 1	성명	박동은	주민번호	540409-1114215
	근무기관 부서	서울대학교 생명과학부	E-mail	depark@snu.ac.kr
	직위/직급	교수	전화번호	02-880-5753
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	이덕재	소속/부서	서울대학교/생명과학부
	직위/직급	박사과정 연구원	E-mail	jdeel2@snu.ac.kr
	전화번호	02-880-6696	FAX	02-872-1993
	주소	(151-747) 서울시 관악구 신림동 산56-1, 20동 322호 서울대 자연과학대학 생명과학부 세포생리학실험실		

## ■ 기술의 주요내용

### [기술의 개요]

세포이동에 필수적인 세 과정, 세포골격근의 재배열, 세포막의 확장과 세포외기질 분해를 제어할 수 있는 기술을 개발함으로써 세포이동성을 제어할 수 있는 방안을 도출하고 이를 통하여 관련 질병의 치료제 개발에 기여하고자 하므로, 본 연구를 통하여 Epithin의 결합단백질로 Filamin, Tie2를 확인하였으며, Epithin의 활성화저해제 lead chemical 4종을 분리하였다. 또한 Filamin이 Epithin의 shedding 및 activation을 유도함을 발견하였으며, Angiopoietin-1의 수용체인 Tie-2가 Epithin에 의해 분해되어 down regulation 됨을 밝혔다.  $\beta$ Pix의 결합단백질로 MAP1B, Adducin, Actin, Tubulin을 확인하였다. 이 결과들은 학계에 보고되지 않은 새로운 발견들로, Epithin 과  $\beta$ Pix가 이들과 상호작용함으로써 세포이동성을 제어할 수 있음을 제시한다.

### <기술적 특징>

본 연구의 1단계 연구개발 결과는 수요자에게 공급할 수 있는 구체적 기술로서의 개발을 위한 기초 탐색 연구 단계임.

### [용도 · 이용분야]

- (1) 혈관 생성 조절, 암세포의 전이 억제 등에 관련한 항암제 개발
- (2) 세포 이동성 및 증식과 관련된 상처치유제의 개발
- (3) 염증성 질병의 치료제 개발

■ 기술의 분류

[기술코드] 411

[기술분야] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- 정보산업     기계설비     소재     정밀화학·공정     생명과학  
 원자력     자원     에너지     항공·우주     해양  
 교통     보건·의료     환경     기초·원천     기타

[기술의 활용유형] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- 신제품개발     신공정개발     기존제품개선     기존공정개선  
 기 타 (    )

[기술의 용도] (복수 선택(√로 표시)가능합니다)

- 기계설비     부품소자     원료재료     소프트웨어  
 가공처리기술     자동화기술     불량률 감소 등 현장애로기술  
 제품설계기술     공정설계기술     기 타 ( 신약 개발에 대한 기초연구 )

■ 산업재산권 보유현황(기술과 관련한)

권리유형	명 칭	국가명	출원단계	일자	등록번호

\* '권리유형'란에는 특허, 실용신안, 의장, 컴퓨터프로그램, 노하우 등을 선택하여 기재

\* '출원단계'란에는 출원, 공개, 등록 등을 선택하여 기재

## ■ 기술이전 조건

이전형태	<input type="checkbox"/> 유상 <input type="checkbox"/> 무상	최저기술료	천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타(    )		
이전 소요기간	년      개월	실용화예상시기	년도
기술이전시 선행요건			

- \* 기술이전시 선행요건 : 기술이전을 위한 사전준비사항(필수 설비 및 장비, 전문가 확보 등)을 기술
- \* 실용화예상시기 : 기술을 활용한 대표적인 제품이 최초로 생산이 시작되는 시기를 기재

## ■ 기술의 개발단계 및 수준

[기술의 완성도] (1개만 선택(√호 표시)하여 주십시오)

√	① 기초, 탐색연구단계 : 특정용도를 위해 필요한 신 지식을 얻거나 기술적 가능성을 탐색하는 단계
	② 응용연구단계 : 기술적 가능성의 실증, 잠재적 실용화 가능성의 입증 등 실험실적 확인 단계
	③ 개발연구단계 : Prototype의 제작, Pilot Plant Test 등을 행하는 단계
	④ 기업화 준비단계 : 기업화에 필요한 양산화 기술 및 주변 기술까지도 확보하는 단계
	⑤ 상품화 완료단계

[기술의 수명주기] (1개만 선택(√호 표시)하여 주십시오)

√	① 기술개념 정립기 : 기술의 잠재적 가능성만 있는 단계
	② 기술실험기 : 기술개발에 성공했으나 아직 실용성, 경제성 등이 확실치 않은 단계
	③ 기술적용 시작기 : 최초의 기술개발국에서만 활용되고 있는 단계
	④ 기술적용 성장기 : 기술개발국 및 일부 선진국에서 활용되고 있는 단계
	⑤ 기술적용 성숙기 : 선진국사이에서 활발한 기술이전이 일어나며, 기술의 표준화가 되어가는 단계
	⑥ 기술적용 쇠퇴기 : 선진국에서 개도국으로 기술이전이 활발하게 일어나고, 선진국에서는 기술의 가치가 저하되나, 개도국에서는 아직 시장의 가치가 높은 기술

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개만 선택(√호 표시)하여 주십시오)

	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
	② 외국기술의 소화·흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적용시킴
√	③ 외국기술의 개선·개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
	④ 신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[ 기술개요 ]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[ 기술을 도출한 과제현황 ]

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	합계 : (            )백만원 - 정부 : (            )백만원    민간 : (            )백만원		
연구책임자	소속		성명
	전화번호		E-mail
연구개발 주요내용			