

Chemokines의 구조와 기능, 그리고 HIV의 감염억제

김 기 선

한국과학기술연구원 생체구조연구센터

Chemokine은 chemotatic cytokine으로써 혈중의 백혈구(leukocyte)들을 감염 부위에 이르게 하거나, 림프구(lymphocyte)들을 림프샘(lymph node)에 이르게 하는데 중요한 역할을 하는 분자량 10,000 정도의 조그마한 단백질이다. 백혈구나 림프구의 조직내로의 이동은 일반적으로 3단계로 이루어진다고 생각되고 있는데 chemokine의 농도가 높은 쪽으로 혈구들이 이동한다. 혈중에 혈구들은 매우 빠른 속도로 흘러가는데 i)혈구와 혈관벽에 있는 selectin이라는 단백질의 상호작용으로 혈구들이 혈관벽을 따라 끌리면서 굴러가게 된다(tethering and rolling). ii) 이때 chemokine이 분비되면 혈구에 있는 chemokine receptor와 결합함으로써 혈구표면의 integrin이라는 단백질을 활성화시키고, iii) 혈구는 혈관벽에 강하게 결합하여(flattening) 세포간을 통하여(diapedesis) 조직으로 이동한다. 조직으로 이동한 후 neutrophil은 radical 등을 생성하여 세균을 죽이고 monocyte는 macrophage로 분화되어 세균을 소화, 제거시킨다. 물론 selectin대신 일종의 integrin이 selectin역할을 대신하는 경우도 있다(1). Chemokine은 결국 백혈구가 감염부위에 이르러 감염된 세균을 제거하는데 도움을 주지만 비정상적인 경우에는 자신의 세포를 죽이거나(reumatoid arthritis) 혈관벽을 부풀게하는(atherosclerosis) 등의 여러 가지 allergic 또는 inflammatory diseases을 유발하는데 관여하기도 한다(2). 최근 몇몇 chemokine들이(RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β) HIV (human immunodeficiency virus) 감염을 방지한다는 것이 알려졌으며(3), 이들의 receptor가 CD4와 더불어 HIV-cell membrane fusion의 coreceptor임이 밝혀져(4) chemokine의 연구가 더욱 활발해질 것이다.

Chemokine은 아래 그림에 예를 보인 바와 같이 4개

의 cysteine들 사이에 두 개의 disulfide bond를 지니고 있으며 아미노산의 서열에 따라 크게 2부류, CXC와 CC그룹으로 나뉜다. CXC그룹은 cysteine중 처음 두 개의 cysteine사이에 한 개의 아미노산 잔기가 끼어 있고 CC그룹은 연속적으로 cysteine이 이어져 있다. CXC그룹은 neutrophil의 chemotaxis에 관여하며 CC그룹은 주로 monocyte chemotaxis에 관여한다. 최근에 CC그룹 중 eosinophil chemotaxis에만 관여하는 것으로 알려진 eotaxin이 발견되었으며(5) 아울러 lymphocyte chemotaxis에 관여하며 하나의 disulfide bond만을 지닌 lymphotactin이 발견되었다(6).

Chemokine receptor는 G-protein coupled된 7-transmembrane receptor이다. 세포밖에 30-40개의 아미노산 잔기를 가진 짧은 extracellular N-terminal peptide를 가지며 7개의 transmembrane domains을 거쳐 짧은 intracellular C-terminal peptide를 갖는 receptor으로써 extracellular나 intracellular portion에 다른 receptor에서 발견되는 structural 또는 functional domain이 발견되지 않는다. 지금까지 여러 종류의 CXC(CXCR) 및 CC chemokine receptor(CCR)가 발견되었으며, 서로 다른 그룹에 속하는 chemokine과는 receptor를 공유할 수 없다. 그러나 그룹내 chemokines간에는 affinity의 차이는 있으나 서로 receptor를 공유하기도 한다(2). Chemokine receptor의 N-terminal peptide는 acidic 아미노산잔기로 이루어져 있으며 specificity에 관여하는 것으로 알려져있다. 이외에 3번째 extracellular loop도 chemokine과 상호작용하는 것으로 제안되었으며(7) intracellular C-terminal peptide는 tyrosine kinase에 의한 phosphorylation site를 지니고 있다고 알려져있다(8).

i) Chemokine의 구조

지금까지 구조가 밝혀진 모든 chemokine은 아래 그

IL8	SAKELR	IKTYSKPFHPKFI	KELRVI	ESGPH	ANTEI	IVKLS	DGREL	LDPKEN	WVOR	VEKFL	KRAENS	
GROMGSA	ASVATELR	LO	TLOGI	HPKNI	OSVNVK	SPGPH	AQTEVI	ATLKNGRKA	LNPASPI	VKKI	EKM	LNSDKSN
NAP2	AELR	IKTTS	GI	HPKNI	OSLEVI	GKGT	NQVEVI	ATLKDGKRI	LDPDAPRI	KKI	VQKKL	AGDESAD
PF4	EAEEDGDLQ	VKTT	SO	VRPRHI	TSLEVI	KAGPH	PTAQLI	ATLKNGRKI	LDLQAPL	YKKI	IKKLL	ES
MCP1	QPDAINAPV	T	YNFTNRKI	SVORLAS	YRRI	TSS	K	PKEAVI	FKTI	VAKEI	ADPKQK	WVQDSMDHLDKQTQTPKT
MCP3	QPVGINSTST	T	YRFINNKI	PKQRLES	YRRT	TSS	H	PREAVI	FKTKLDKEI	ADPTQK	WVQDFMKHLDKKTQTPKL	
Eotaxin	POGLAGPASVPTT		FNLANRKI	PLQRLES	YRRI	TSG	K	PQKAVI	FKTKLAKDI	ADPKKK	WVQDSMKYLDQKSPTPKP	
MIP-1 α	APMGSDPPT	A	FSYTARKL	PRNFV	VDYFE	TSS	L	SQPAVVF	QTKRSKQV	ADPSES	WVQEYVYDLELN	
MIP-1 β	ASLAADTPT	A	FSYTSROI	PONFI	ADYFE	TSS	O	SKPGVI	FLTKRSQV	ADPSEE	WVQKYVSDLELSA	
RANTES	SPYSSDTT	P	FAYIARPL	PRAHI	KEYF	YTS	K	SNPAVVF	VTRKNRQV	ANPEKK	WVREYINSLEMS	
Lymphotactin	GSEVSDKRT		VSLTTQRL	PVSRI	KTY		TIT	EGSLRAVI	FITKRG	LKV	ADPQATWVRD	VVRSMDRKSN

Fig. 1. Chemokine의 아미노산 서열 비교. IL8, interleukin 8; MGSA, melanoma growth stimulatory activity; PF4, platelet factor; NAP2, neutrophil-activating peptide 2; MCP, monocyte chemoattractant protein; MIP, macrophage inflammatory protein; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted. ELR motif는 box로 나타내었다.

림에 보이는 것과 같이 유사한 구조를 지니고 있으나, 구조를 결정한 농도에서 monomer, dimer로써 존재하는 것이 있는가 하면 tetramer로써 존재하는 것도 있다. 각 monomer의 구조는 유사하여 첫 cysteine까지는 거의 구조가 없는 상태이며, 둘째 cysteine부터 긴 loop과 β -sheet가 시작되어 3개의 sheet가 greek key motif를 형성하며 C-terminus에 α -helix는 β -sheet를 가로지르고 있다(9). 지금까지 구조가 밝혀진 CXC그룹의 chemokine(IL8(9), GRO/MGSA(10), NAP2(11))들은 β -sheet끼리 dimerization이 이루어져 6-stranded sheet를 이룬다(Fig. 2b). 반면 CC그룹의 chemokine들은 monomer (MCP3(12))로 존재하는(Fig. 2a) 것이 있는가 하면 dimer (MCP1(13), RANTES(14), MIP-1 β (15))로 존재하는(Fig. 2c) 것도 있다. 그러나 dimerization interactions는 CXC와 달라 N-termini끼리 'head-to-head' dimer를 이루고 있다. 이들 Chemokine과는 기능이 다른 PF4는 CXC와 CC그룹의 dimer interface를 동시에 가진 tetramer를(Fig. 2d) 이룬다(15).

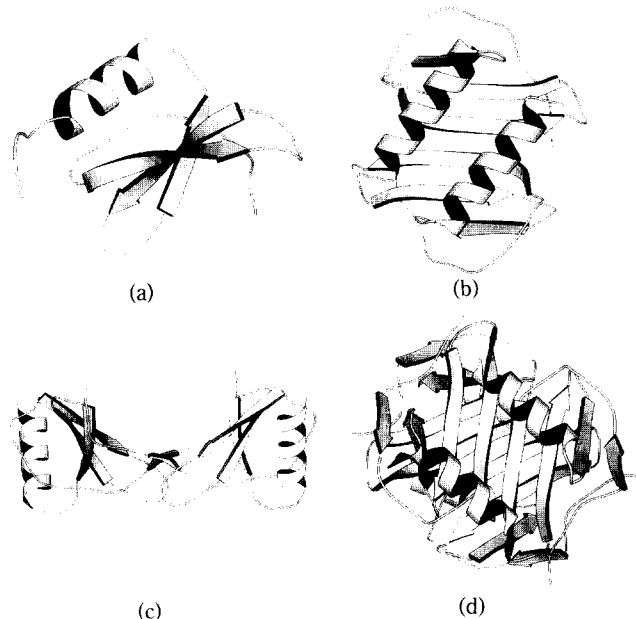


Fig. 2. 대표적인 Chemokine의 3차원 구조.
 a) MCP3 (12)
 b) IL8 (9), dimerization으로 이루어진 두 helix와 sheet가 receptor binding site로 제안되었다.
 c) MIP-1 β (15), dimerization으로 형성된 concave (그림의 아래 쪽)가 receptor binding site로 제안되었다.
 d) PF4(16), A-B, C-D subunit interface는 IL8 type dimer interface를 A-C, B-D subunit interface는 MIP-1 β type dimer interface를 지니고 있다.

ii) Chemokine의 구조와 기능

Chemokine과 receptor의 결합위치는 처음 IL8의 구조를 결정한 Clore 등에 의해 dimerization에 의해 형성된 두 helix사이의 β -sheet로 제안되었다(9; Fig. 2b). 이는 이미 결정된 구조 중 IL8 dimer와 비슷한 구조를 갖는 class I major histocompatibility complex(HMC I) antigen HLA-A2의 peptide binding pocket(17)으로부터 추론한 것이다. 이러한 결합은 dimer로써만이 가능한데 과연 생체내에서 IL8은 dimer로 존재할 것인가? 이에 대한 해답을 얻기 위해 IL8의 dimer interface β -sheet의 hydrogen bond에 참여하는 아미노산 잔기의

backbone amide proton을 methyl group(N-methylation)으로 치환시켜 dimer를 monomer로 변환시켰다. 결과적으로 변환된 IL8은 monomer로 존재하는 것이 NMR과 sedimentation analysis로 확인되었으며, 이 단백질은 지금까지 알려진 모든 기능을 유지하고 있음을 보여 결합 위치는 dimer interface가 아님을 알 수 있었다(18). Clore그룹은 또한 CC그룹의 하나인 MIP-

1 β 의 dimer interface가 N-termini에 존재함을 밝혀내고(Fig. 2c) dimerization이 제공하는 concave가 receptor의 결합부위라고 추정하였다(15). 그러나 2 mM의 농도에서도 CC chemokine인 MCP3는 monomer로 존재하며(Fig. 2a) MIP-1 β 와 유사한 dimer로 존재하는 MCP1이나 RANTES의 receptor에 결합하는 것이 밝혀져 결국 chemokine은 monomer로써 기능을 나타내고 receptor와의 결합위치도 dimer interface가 아니라고 생각된다(12). 그렇다면 chemokine의 어떤 부위가 receptor와 결합을 하는지가 의문이다. IL8을 model로 Clark-Lewis그룹에 의하여 많은 일이 진행되었는데 truncation 및 hybrid approach가 주로 사용되었다(19). 즉 N-terminus 혹은 C-terminus부터 몇몇 아미노산 잔기씩을 제거하며 활성을 측정하거나, 활성이 없는 chemokine과 부위를 바꾸어 hybrid를 만들어 활성을 측정하는 방법이다. 이 결과, C-terminus의 helix를 모두 제거해도 활성을 조금은 지니고 있었으나 N-terminus의 ELR motif를 제거하면 활성을 잃어버리는 것을 밝혀내었다. 특히 EL까지만 제거하고 R을 지닌 truncation mutant는 결합은 하나 활성이 없는 antagonist의 역할을 할 수 있음이 밝혀져 N-terminus의 disordered peptide부분이 활성에 크게 관여함을 알 수 있다. 또한 tetramer구조를 지니며(Fig. 2d) ELR motif를 갖지 않은 PF4의 경우도 ELR로 치환시킨 경우 IL8의 활성을 지니게 됨으로 미루어 aggregation 정도는 활성과 무관하며 disordered N-terminus가 활성에 중요한 역할을 함을 알 수 있다(20). 이는 또한 CC그룹 MCP1의 경우에서도 증명이 되어 chemokine의 N-terminus가 활성에 중요하다는 것은 밝혀진 셈이다(21). 그러나 N-terminal peptide만을 합성하여 활성을 측정하면 활성이 없음으로 미루어 이외의 구조를 이루는 부분은 N-terminus를 presentation하는데 필요한 scaffold 역할을 하리라고 추정하고 있다. 또한 세포표면에 있는 heparin과 같은 proteoglycan과 결합하여 chemokine concentration gradient를 형성하는데는 C-terminal helix가 관여하리라 제안되기도 했다(18,19).

그러나 이것들은 지금까지 알려진 chemokine의 기능에 대한 실험결과이므로 밝혀지지 않은 기능, 예를 들면 최근 발견된 HIV감염억제 효과 등에 또 다른부위가 관여하는지 지켜볼 일이다. 또한 disordered N-terminal

peptide가 receptor와 결합시 어떤 형태의 구조를 형성하는지, 형성한다면 어떤 역할을 하는지 궁금하다.

iii) Chemokine receptor와 HIV infection

작년 말 Gallo그룹이 RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β 등이 HIV감염을 억제한다는 보고를(3) 한 뒤 이 분야의 연구가 아주 활발해졌다. 지금까지 밝혀진 바로는 chemokine receptor가 HIV-cell membrane fusion시 CD4와 더불어 fusion coreceptor로써 작용한다는 것이다. 결국 chemokine은 fusion coreceptor인 chemokine receptor에 HIV와 경쟁적으로 결합하므로써 HIV감염 억제효과를 갖는 것이다. HIV환자 중 chemokine receptor에 deletion mutation를 가지고 있는 환자들은 HIV에 감염이 현저히 낮아진 것으로 알려졌다(22). 대표적인 chemokine receptor는 CC-chemokine receptor 5(CCR-5)이며, 이는 CC-chemokine인 RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β 와 결합하는 receptor이다. 이들 세 CC-chemokine은 macrophage에 감염하는 HIV strain (M-tropic strain)의 감염을 억제하며, CCR-5가 HIV의 세포내 이입을 돕는 receptor임이 밝혀졌다. 그러나 T-cell line은 잘 감염시키나 macrophage는 감염시키지 않는 HIV strain(T-tropic strain)의 감염을 억제하지는 못하며, 이때 HIV는 CXC chemokine receptor인 fusin/CXCR-4를 이용하는 것으로 밝혀졌다(3). 어떤 HIV strain은 이외에 CCR-2b나 CCR-3를 이용하기도 한다(23). 특히 chimeric receptor를 만들어 실험한 결과 N-terminal extracellular peptide가 HIV strain selectivity와 관련이 있는 것으로 밝혀져 chemokine의 interaction site와 큰 차이가 없음을 보여 주었다(24). 지금까지 알려진 HIV의 fusion기작은 처음 HIV단백질인 gp120가 세포표면의 CD4와 상호작용으로 HIV의 gp41이 노출되면서 gp41의 fusion peptide가 세포막과 상호작용을 통하여 세포내로 이입되는 것으로 생각되었다. 그러나 CD4만으로는 fusion이 되지 않는 것이 알려져있고 chemokine receptor가 존재함으로써만 fusion이 이루어 지는 것으로 알려졌다. 그렇다면 chemokine receptor의 역할은 무엇일까? HIV의 selectivity 즉, tropism은 gp120의 V3 loop에 의한 것이라는 것이 알려져 있으며 chemokine receptor 또한 tropism과 관련이 있으므로 이 receptor들과 상호작용하는 것이 gp120의 V3 loop를 포함한다는 것은 추측할 수 있으며, 실험적으로 gp120의 deletion mutation을

통하여 증명되었다(25). 따라서 처음 gp120와 CD4가 결합하여 V3 loop는 노출되면 V3 loop는 chemokine receptor와 결합하여 gp41의 fusion peptide가 세포막과 상호작용을 통하여 fusion이 일어나는 것을 돕는다는 가설이 성립된다(26).

그러나, 왜 chemokine receptor가 필요한 것일까? Chemokine receptor는 G-protein coupled된 7-transmembrane receptor이다. 즉 G-protein의 activation을 통해 여러가지 변화가 세포내,외에서 일어날 수 있다는 것이다. Chemokine이 monocyte나 neutrophil등을 조직내로 이동시키는 기능이 있다는 것을 생각하면 HIV도 chemokine의 기능을 모방한 것이 아닌가 생각된다. Herpes virus 중에 chemokine receptor와 유사한 단백질을 encode하고 있는 gene이 발견된 것(27)도 이와 맥락을 같이 하며, virus가 정상세포의 기능을 모방하여 세포내에 기생하는 것은 virus생존의 일반적인 방법일 것이다.

iv) Chemokine을 이용한 질병치료제 개발

Chemokine은 arthritis, asthma, allergies, atherosclerosis, malaria등에 관련되어 있다고 알려져 있어, 많은 연구자들이 chemokine inhibitor의 개발에 주력해왔다. Chemokine inhibitor는 chemokine antagonist, receptor analogs 또는 anti-chemokine antibody등의 방향으로 진행되고 있다. Chemokine inhibitor의 효과는 유전자의 knock-out 또는 monoclonal antibody 등을 이용하여 실험한 결과 chemokine의 redundancy때문에 우려했던 것과는 달리 효과가 있는 것으로 나타나 inhibitor의 개발은 더욱 활발해질 것으로 기대된다. HIV의 경우 chemokine이 suppressor역할을 하기 때문에 chemokine 대신 사용할 수 있는 antagonist의 개발에 초점이 맞추어 진다. Chemokine의 N-terminal truncation을 통하여 만든 antagonist가 단백질 제제로써 이용할 수 있는 가능성이 있으나 native chemokine에 비해 binding affinity가 낮아 이를 바탕으로 한 high affinity antagonist의 개발이 기대된다.

참고문헌

1. Mackay, C. (1995). *Curr Biol* 5, 733-736; Springer, T.A. (1994). *Cell* 76, 301-314.
2. Miller, M.D., and Krangel, M.S. (1992). *Crit. Rev. Immunol.* 12, 17-46.; Baggiolini, M., Dewald, B., and

- Moser, B. (1994). *Adv. Immunol.* 55, 97-179.
3. Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C., and Lusso, P. (1995). *Science* 270, 1811-1815.; Bleul, C.C. *et al.* (1996). *Nature* 382, 829-833.; Oberlin, E. *et al.* (1996). *Nature* 382, 833-835.
4. Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). *Science* 272, 872-877; Deng, H. *et al.* (1996). *Nature* 381, 661-666.; Dragic, T. *et al.* (1996). *Nature* 381, 667-673.; Alkhatib, *et al.* (1996). *Science* 272, 1955-1958.; Gura, T. (1996). *Science* 272, 954-956.
5. Jose, P.J., *et al.* (1994). *J. Exp. Med.* 179, 881-886.
6. Kelner, G.S. *et al.* (1994). *Science* 266, 1395-1399.
7. H bert, C.A. *et al.* (1993)., *J. Biol. Chem.* 268, 18549-18553.; LaRosa *et al.* (1992). *J. Biol. Chem.* 267, 25402-25406.
8. Richardson, R.M. *et al.* (1995). *Biochem.* 34, 14193-14201.
9. Clore, G.M. *et al.* (1990). *Biochem.* 29, 1689-1696.; Baldwin, E.T. *et al.* (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 502-506.
10. Kim, K.-S., Clark-Lewis, I., & Sykes, B.D. (1994). *J. Biol. Chem.* 269, 32909-32915.; Fairbrother, W.J. *et al.* (1994). *J. Mol. Biol.* 242, 252-270.
11. Malkowski, M.G. *et al.* (1995). *J. Biol. Chem.* 270, 7077-7087.
12. Kim, K.-S., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., & Sykes, B. D. (1996). *FEBS letters* 395, 277-281.
13. Handel, T.M., & Domaille, P.J. (1996). *Biochem.* 35, 6569-6584.
14. Skelton, N.J., Aspiras, F. Ogez, J. & Schall, T.J. (1995). *Biochem.* 34, 5329-5342.
15. Lodi, P.J. *et al.* (1994). *Science* 263, 1762-1767.
16. St. Charles, R., Walz, D.A., & Edwards, B.F.P. (1989). *J. Biol. Chem.* 264, 2092-2099.; Zhang, X., Chen, L., & Bancroft, D.P. (1994). *Biochem.* 33, 8361-8366.
17. Bjorkman, P.J. *et al.* (1987). *Nature* 329, 506-512.
18. Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., & Sykes, B.D. (1995). *Biochem.* 34, 12983-12990.
19. Clark-Lewis, I. *et al.* (1995). *J. Leuk. Biol.* 57, 703-711.; Moser, B., Dewald, B., Barella, L., Schumacher, C., Baggiolini, M., & Clark-Lewis, I. (1993). *J. Biol. Chem.* 268, 7125-7128.; Clark-Lewis, I., Dewald, B., Loetscher, M., Moser, B., & Baggiolini, M. (1994). *J. Biol. Chem.* 269, 16075-16081.
20. Clark-Lewis, I., Dewald, B., Geiser, T., Moser, B., & Baggiolini, M. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 3574-3577.
21. Gong, J.-H., & Clark-Lewis, I. (1995). *J. Exp. Med.* 181, 631-640.
22. Liu, R. *et al.* (1996). *Cell* 86, 367-377.; Samson, M. *et al.* (1996). *Nature* 382, 722-725.; Dean, M. *et al.* (1996). *Science* 273, 1856-1862.
23. Choe, H. *et al.* (1996). *Cell* 85, 1135-1148.; Doranz, B.J. *et al.* (1996). *Cell* 85, 1149-1158.
24. Rucker, J. *et al.* (1996). *Cell* 87, 437-446.

25. Wu, L. *et al.* (1996). *Nature* **384**, 179-183.
26. Trkola, A. *et al.* (1996). *Nature* **384**, 184-187.; Wain-Hobson, S. (1996) *Nature* **384**, 117-118.; Wilkinson, D. (1996). *Curr. Biol.* **6**, 1051-1053.
27. Ahuja, S.K., & Murphy, P.M. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 20691-20694.