



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

교육학석사 학위논문

초파리 *Pss* allele의
상호작용 및 특성에 관한 연구

Interaction and Characteristics
of *Drosophila Pss* Alleles

2022년 2월

서울대학교 대학원
과학교육과 생물전공
여 지원

초파리 *Pss* allele의
상호작용 및 특성에 관한 연구

지도교수 전 상 학

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함
2021년 12월

서울대학교 대학원
과학교육과 생물전공
여 지원

여지원의 교육학석사 학위논문을 인준함
2022년 1월

위원장 강 호 선 (인)

부위원장 이 준 규 (인)

위 원 전 상 학 (인)

초 록

Phosphatidylserine (PS)은 세포막을 구성하는 주요 인지질 중 하나이다. PS는 신경세포의 유지와 성장, 시냅스 형성에 중요한 신호전달에 작용하는 단백질들의 이동 및 활성화 등에 관여한다. PS는 초파리에서 유일한 PS 합성효소인 PSS에 의해 합성되며, PSS를 암호화하는 *Pss* 유전자는 돌연변이가 일어났을 때 신경 퇴행 표현형을 포함한 다양한 표현형에 영향을 미치는 일종의 다면발현 유전자이다. 본 연구에서는 *Pss*의 allele 간 상호작용 및 *Pss* allele의 특성을 확인하고자 하였다. 이를 위해 6가지 *Pss* homozygous lethal allele들에 대한 heterozygote와 trans-heterozygote를 활용하였다. 연구 결과, *Pss* heterozygote에 비해 *Pss* trans-heterozygote에서 매우 심각한 신경 퇴행 표현형이 나타났다. Trans-heterozygote 중에서는 *Pss*^{32/15}, *Pss*^{32/#2}가 상대적으로 온화한 표현형을 나타냈고, *Pss*^{32/27}, *Pss*^{32/72}, *Pss*^{32/79}는 상대적으로 심각한 표현형을 나타내어 그 정도를 비교하여 allele 간의 상호작용을 확인하였다. 또한, *Pss*^{56/56}과 일부 *Pss* trans-heterozygote에서 수컷의 불임이라는 새로운 표현형을 발견하였다. 특히, *Pss*^{56/56}의 정소에서 발생 중인 정자에서 미토콘드리아 fusion의 이상이 나타났고, 이를 통해 미토콘드리아 dynamics가 수컷 불임의 한 가지 원인일 가능성을 확인하였다. 본 연구는 *Pss*의 각 allele이 나타내는 신경 퇴행 표현형의 정도를 바탕으로 allele 간의 상호작용을 확인하고, 수컷 불임의 한 가지 원인으로 *Pss* 기능 이상을 처음으로 제안하였다.

주요어 : 인지질, 포스파티딜세린(PS), PS 합성효소(PSS), Allele 간 상호작용, 신경 퇴행성 질환, 수컷 불임

학 번 : 2020-23312

목 차

제 1 장 서 론	1
제 1 절 인지질과 신경 퇴행성 질환	1
제 2 절 PS와 Phosphatidylserine synthase	3
제 3 절 PS와 정자의 생식능력	6
제 4 절 미토콘드리아 dynamics와 생식능력	8
제 5 절 선행연구 분석 및 연구 목표	10
제 2 장 실험 방법 및 재료	12
제 1 절 사용한 초파리	12
제 2 절 생존율 측정(viability)	14
제 3 절 신경 퇴행 표현형 확인	14
1. 수명 측정(Life span)	14
2. 운동능력 측정(Climbing assay)	14
제 4 절 유전자 발현량 확인(qRT-PCR)	15
제 5 절 조직 해부 및 고정	15
1. 성체의 뇌	15
2. 성체 수컷의 생식기관	16
제 6 절 면역조직화학염색법	16
1. 사용한 항체	16
2. 면역조직화학염색법	16
제 7 절 수컷 생식기관 관찰	17
1. 정낭 내부의 정자	17
2. 정소 내부에서 형성되는 early round spermatid의 미토콘드리아(nebenkern)	17

제 3 장 결 과	18
제 1 절 <i>Pss</i> trans-heterozygote의 생존율	18
제 2 절 <i>Pss</i> heterozygote와 trans-heterozygote의 신경 퇴행 표현형	21
제 3 절 <i>Pss</i> ⁵⁶ allele의 특징	27
1. <i>Pss</i> ⁵⁶ 성체 뇌에서의 Strep-tag II 및 PSS 발현 패턴	27
2. <i>Pss</i> ⁵⁶ 을 중심으로 한 <i>Pss</i> trans-heterozygote의 생존율	27
3. <i>Pss</i> ⁵⁶ heterozygote와 homozygote의 생식능력	30
제 4 절 <i>Pss</i> ^{56/56} 및 <i>Pss</i> trans-heterozygote 수컷의 생식 능력	32
1. <i>Pss</i> ^{56/56} 과 <i>Pss</i> trans-heterozygote 수컷 생식기관 형태	32
2. <i>Pss</i> ^{56/56} 과 <i>Pss</i> trans-heterozygote 수컷 정낭 내부의 성숙한 정자 유무	35
3. <i>Pss</i> trans-heterozygote 수컷의 생식능력	35
4. <i>Pss</i> ^{56/56} 수컷 정소에서 발생 중인 early round spermatid의 미 토콘드리아(nebenkern) 형태	41
 제 4 장 고 찰	 44
 참고문헌	 49
Abstract	58

표 목 차

[표 1] 사용한 <i>Pss</i> allele 초파리	12
[표 2] 사용한 primer	15
[표 3] <i>Pss</i> trans-heterozygote의 생존율	20
[표 4] <i>Pss</i> ⁵⁶ 을 중심으로 한 <i>Pss</i> trans-heterozygote의 생존율	29
[표 5] <i>Pss</i> ⁵⁶ heterozygote와 homozygote의 생식능력	31
[표 6] <i>Pss</i> trans-heterozygote 수컷의 생식능력	40

그 림 목 차

[그림 1] 포유류와 초파리의 PS 합성 경로 및 MAM	5
[그림 2] <i>Pss</i> allele의 돌연변이 유발 지점	13
[그림 3] <i>Pss</i> heterozygote와 trans-heterozygote의 수명 ·	23
[그림 4] <i>Pss</i> heterozygote와 trans-heterozygote의 운동능력	25
[그림 5] <i>Pss</i> heterozygote와 trans-heterozygote의 <i>Pss</i> 발현량	26
[그림 6] <i>Pss</i> ⁵⁶ 성체 뇌에서의 Strep-tag II 및 PSS 발현 패턴	28
[그림 7] 야생형 초파리 수컷 생식기관의 구조	33
[그림 8] <i>Pss</i> ^{56/56} 과 <i>Pss</i> trans-heterozygote의 생식기관의 형태	34

[그림 9] $Pss^{56/56}$ 과 Pss trans-heterozygote 수컷 정낭 내부의 성숙한 정자 유무 37

[그림 10] 야생형과 $Pss^{56/56}$ 수컷 정소에서 발생 중인 early round spermatid의 미토콘드리아(nebenkern) 형태 42

제 1 장 서 론

제 1 절 인지질과 신경 퇴행성 질환

인지질은 생명체의 핵심적인 구성 요소로, 세포막을 구성하고, 다양한 단백질과 상호작용하며 세포 내의 대사활동을 조절한다. 인지질은 다양한 신호전달 경로 및 세포소기관 인식 경로(organelle recognition pathways)에 관여한다. 진핵생물의 세포막을 구성하는 인지질의 대표적인 종류에는 phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidic acid (PA) 등이 있다(Pettegrew et al., 2001; Wenk & De Camilli, 2004; Van Meer et al., 2008).

신경조직은 지방조직 다음으로 인지질의 밀도가 높으며, 인지질 대사가 매우 활발히 일어난다(O'Brien & Sampson, 1965; Sastry, 1985). 인지질은 신경조직에서 막의 backbone 구성, 생명 활동에 적절한 환경 구성, 막의 유동성 및 투과성을 조절하여 신경세포가 정상적인 기능을 수행하는 데 중요한 역할을 한다(Farooqui et al., 2004).

신경 퇴행성 질환에는 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD), 파킨슨병(Parkinson's disease, PD), 헌팅턴병(Huntington's disease, HD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 등이 있다. 신경 퇴행성 질환 연구는 주로 단백질들이 비정상적인 구조로 응집하여 붕입체(inclusion body)를 형성하는 것에 초점을 두고 진행되었다. 예를 들면, AD의 경우 베타 아밀로이드(Amyloid β , A β)로 구성된 아밀로이드 플라크(A β plaque, senile plaque)와 타우(tau) 단백질이 엉켜 만들어진 신경 섬유다발(neurofibrillary tangles, NFT)에 초점을 맞춘 연구가 진행되어 왔다(Irvine et al., 2008). PD의 경우 alpha-synuclein (α -synuclein) 단백질이 붕입체를 형성한 루이소체(Lewy body)에 대한 연구가 진행되었

다(Remy et al., 2005).

한편, 신경조직의 인지질합성 효소의 이상이나 인지질 조성의 불균형이 신경 퇴행성 질환과 밀접한 관련이 있다는 연구 결과를 통해 신경 퇴행성 질환 연구에서 인지질의 중요성 또한 드러나게 되었다(Pavlidis et al., 1994; Pettegrew et al., 2001; Li et al., 2015). 하지만 인지질 합성효소의 이상이나 인지질 조성의 변화가 신경 퇴행성 질환의 발병과 증상에 구체적으로 어떠한 역할을 하는지에 대한 연구는 아직 많이 이루어지지 않았다.

그러나 본 연구의 주요 관심사인 PS와 신경 퇴행성 질환의 연관성을 파악할 수 있는 몇 가지 연구 결과가 있다. AD 환자에서 PS의 비정상적인 분포가 관찰되었으며(Crook et al., 1992), 미토콘드리아에서 PS를 기질로 하는 PE의 합성에 이상이 생기면 α -synuclein의 항상성에 영향을 주어 PD의 발병에 영향을 준다는 연구 결과가 있다(Wang et al., 2014). 또한, PS의 섭취가 신경 퇴행성 질환 환자의 인지 기능 및 기억력을 향상시킬 수 있다는 여러 임상 연구가 진행되었으며(Crook et al., 1992; Heiss et al., 1994; Baumeister et al., 2008; Liu et al., 2012), PD 환자에서 PS 섭취는 일주기 및 수면 장애를 억제하였다(Valadas et al., 2018).

제 2 절 PS와 Phosphatidylserine synthase

PS는 세포막을 구성하는 주요 인지질 중 하나로, 신경세포의 유지와 성장, 시냅스 형성에 중요한 역할을 하는 신호전달에 관여하는 protein kinase C (PKC), Akt, Raf-1과 같은 단백질들의 이동 및 활성화를 조절한다(Kim et al., 2014). 또한, PS는 세포막의 인지질 이중층의 inner leaflet에 불균형하게 분포하지만, apoptotic cell에서 세포막의 바깥쪽 표면으로 노출되어 식세포작용이 일어나도록 하는 “Eat-me” 신호로도 작용한다(Fadok et al., 1998; Ravichandran, 2010). 이 외에도 PS는 신경세포 축삭돌기의 미세소관 안정화에 필요하며(Naftelberg et al., 2016; Seidel et al., 2015), 세포외유출 과정에서 소포와 세포막의 융합에도 관여한다(Williams et al., 2009).

PS는 head group의 치환을 통해 phosphatidylcholine (PC) 또는 phosphatidylethanolamine (PE)로부터 합성된다. 포유류에서 PS는 Phosphatidylserine synthase 1 (PSS1)과 Phosphatidylserine synthase 2 (PSS2)에 의해 합성되며, PSS1은 PC를, PSS2는 PE를 각각 기질로 사용하여 PS를 합성한다(Vance & Steenbergen, 2005). 이 두 효소는 소포체 막에 존재하며, 특히 소포체가 미토콘드리아와 밀접하게 결합하고 있는 mitochondria-associated membrane (MAM)에 위치하고 있다(Stone & Vance, 2000). 합성된 PS는 MAM에 의해 미토콘드리아로 이동해 Phosphatidylserine decarboxylase (PISD)의 기질로 작용하여 PE로 합성된다(Dennis & Kennedy, 1972; Choi et al., 2005).

포유류에서 PSS1과 PSS2는 서로 상보적으로 기능한다. *Pss1* 또는 *Pss2* 유전자 중 하나에만 기능 상실 돌연변이를 가진 쥐는 생존하지만, 두 유전자에 모두 돌연변이가 일어난 쥐는 태아 상태에서 치사하였다(Arikketh et al., 2008; Bergo et al., 2002). 이러한 상보성 효과(redundancy)로 인해 포유류에서 PSS 기능에 대한 연구를 진행하는 데 어려움이 있었다.

반면, 초파리는 Phosphatidylserine synthase (PSS)를 암호화하는 유

일한 유전자인 *Pss*를 가지고 있다. 초파리의 PSS는 PC 또는 PE를 기질로 사용하여 PS를 합성한다. 초파리의 PSS는 사람의 PSS1과 전체 서열에서 53%, 잘 보존된 PSS domain에서는 61%의 상동성을 가지고, PSS2와는 전체 서열에서 35%, PSS domain에서는 40%의 상동성을 가진다. 이에 PSS는 PSS2보다는 PSS1과 더 가깝게 연관되어 있기 때문에 기능적으로도 PSS1과 더 유사해 PC를 기질로 PS를 합성할 것이라 판단되었다(Park et al., 2021). 그러나 초파리의 PSS가 PE를 기질로 PS를 합성한다는 Yang et al.(2019)의 연구 결과도 발표되면서 초파리의 PSS가 PC와 PE 중 어떤 인지질을 기질로 하여 PS를 합성하는지는 아직 논란이 있다. 포유류와 초파리의 PS 합성 경로 및 MAM의 구조는 [그림 1]과 같다.



PS synthesis in mammal

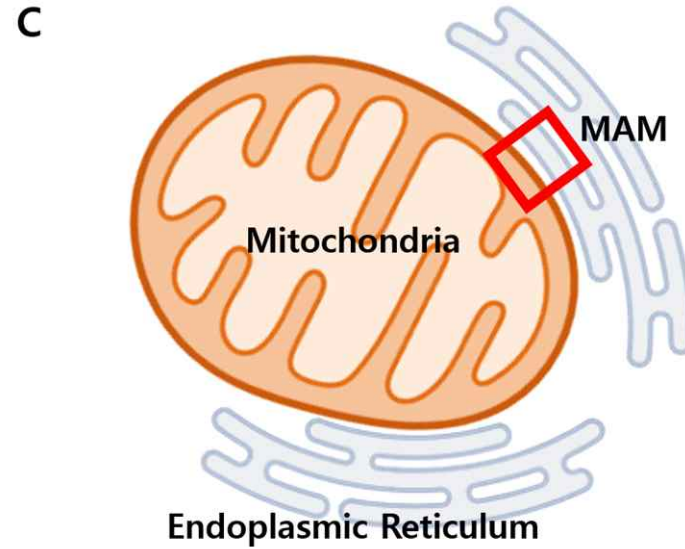
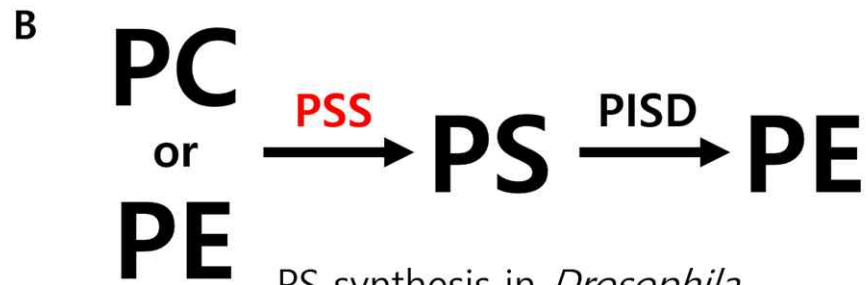


그림 1. 포유류와 초파리의 PS 합성 경로 및 MAM

A: 포유류의 PS 합성 경로. **B:** 초파리의 PS 합성 경로. **C:** MAM의 구조. MAM은 소포체가 미토콘드리아와 밀접하게 결합하고 있는 부분으로, PS 합성효소는 소포체 막의 MAM에서 PS를 합성한다.

제 3 절 PS와 정자의 생식능력

PS는 포유류 정자와 난자의 수정 과정, 정자의 질 등에 관여하여 생식능력에 영향을 준다. PS는 살아있고 운동성이 있는 정자의 머리 부분에 노출되어 있다. PS의 노출은 부정소를 통한 정자의 이동 과정 동안 점진적으로 증가하며, 정자 표면에 노출된 PS를 막으면 수정이 억제된다. 난모세포(oocyte)에는 PS를 인식하는 수용체인 BAI1, CD36, Tim-4, Mer-TK가 있고, 이 수용체들은 수정에 관여한다. 또한, BAI1/BAI3의 신호전달 과정 하위에 있는 세포질의 ELMO1 또는 RAC1의 기능이 결여된 난모세포에서도 정자의 진입 과정에 이상이 생긴다. 따라서 살아있는 정자의 PS와 난모세포의 PS 인식 수용체는 정자와 난자 융합의 핵심 요소이다(Rival et al., 2019).

인간 정자의 세포막은 위치에 따라 5가지 domain으로 구성되어 있고, 정자의 세포막에서 PS를 포함한 인지질의 위치에 따른 비대칭적 분포는 세포 활성의 지표이다. Annexin-V/PI 염색을 통해 PS의 위치 이동 및 정자의 활성 여부를 확인한 결과, 살아있는 정자와 죽은 정자에서 PS가 이동하는 domain이 유의미한 차이를 나타냈다. 이러한 PS의 특정 막 domain에 대한 정확한 이동은 기능적인 특이성을 나타낸다(Kotwicka et al., 2011).

PS의 외부 노출(Externalization of phosphatidylserine, EPS)은 세포자멸 유사(apoptotic-like) 정자에서도 일어나며, 의학적 보조생식기술로 불임 환자의 정자의 질을 향상시키기 위해 EPS 정자를 제거할 수 있다. 정자의 질은 기본적으로 농도, 운동성, 형태를 기준으로 정의되며, 생존력, 미토콘드리아 막전위(MMP)를 통해서도 측정할 수 있다. Annexin-V와 Hoechst 이중염색을 통해 세포자멸(apoptotic)과 세포괴사(necrotic) 정자를 구분하고, Annexin V-conjugated microbead를 활용한 자력이용 세포분리법(MACS-ANMB)으로 EPS 정자와 비정상적인 MMP를 갖는 정자를 제거한 결과 정자 생존율과 운동능력이 증가했다. 따라서 EPS는 정자 질의 지표로 활용될 수 있으며, EPS 정자의 제거는 의학적 보조생

식기술에서 불임 환자의 생식능력을 높일 수 있다(de Vantéry Arrighi et al., 2009).

제 4 절 미토콘드리아 dynamics와 생식능력

미토콘드리아는 TCA 회로, 지방산의 베타 산화(β oxidation), 산화적 인산화 등의 핵심적인 물질대사 경로가 일어나며, apoptosis나 Ca^{2+} 항상성에 관여하는 중요한 세포소기관이다(Nunnari & Suomalainen, 2012). 미토콘드리아의 기능은 fusion과 fission의 변화, 즉 미토콘드리아 dynamics에 의해 조절되는 미토콘드리아의 형태와 밀접한 연관이 있다. Mitofusin (Mfn)과 Optic atrophy 1 (Opa1)은 각각 미토콘드리아 외막과 내막의 fusion에 관여해 두 미토콘드리아가 하나로 합쳐지게 한다(Chen et al., 2003; Cipolat et al., 2004). 반면, Dynamin-related protein 1 (Drp1)은 미토콘드리아 외막을 수축시켜 하나의 미토콘드리아가 두 개로 분리되는 fission이 일어나게 한다(Smirnova et al., 2001). 적절한 fusion과 fission의 조절은 미토콘드리아 네트워크를 통해 구성 요소가 분배될 수 있도록 하고, 세포가 에너지 요구나 스트레스 상황에 대응할 수 있도록 한다(Mishra & Chan, 2016).

초파리의 정자 형성 과정에서 미토콘드리아 fusion은 생식줄기세포(germline stem cell, GSC)의 유지에 중요한 역할을 한다. Fusion에 관여하는 *dMfn* 또는 *Opa1*에 돌연변이가 일어나면 정소에서 TOR가 활성화되고, SREBP에 의한 지질 합성이 증가해 lipid droplet이 축적되어 생식줄기세포의 수가 정상적으로 유지되지 못하고 감소한다(Demarco et al., 2019). 반면, 초파리 3령 유충의 정자 형성 과정에서 미토콘드리아 fission은 생식줄기세포 유지 및 생식세포 분화를 조절한다. Fission에 관여하는 *Drp1*에 돌연변이가 일어나면 정소 내 생식세포의 활성산소가 증가함에 따라 주변 체세포의 EGFR이 활성화되고, 생식줄기세포의 손실 및 비정상적으로 이른 분화를 일으킨다(Demarco & Jones, 2019).

또한, 미토콘드리아 dynamics는 초파리의 난자 형성 과정에서도 생식줄기세포의 수, 세포의 운명, 암컷의 번식력을 조절한다. 암컷 생식줄기세포의 미토콘드리아는 난자를 만들기 위한 에너지를 제공하고, 자손에게 유전되는 미토콘드리아의 유일한 풀(pool)이기도 하다. 생식줄기세포

의 안정적인 유지를 위해서는 *Marf*, *Opal*, *Drp1*에 의해 적절하게 조절되는 미토콘드리아의 fusion과 fission이 모두 요구되며, 미토콘드리아 dynamics에 이상이 생기면 보모세포의 형태, 난실의 발달 및 번식력에 문제가 생긴다(Garcez et al., 2021).

제 5 절 선행연구 분석 및 연구 목표

본 연구실에서 진행한 선행연구에서는 *Pss* 기능 상실 돌연변이에서 수명 및 운동능력의 감소, 충격 민감성 발작, 뇌조직의 퇴화 등의 신경 퇴행 관련 표현형을 확인하였다. 또한, 성체의 뇌에서 미토콘드리아의 형태 이상 및 ROS (reactive oxygen species)의 증가, autophagy와 apoptosis가 증가하였다. 특히, 신경교세포 특이적으로 *Pss*의 발현을 억제하거나 과발현시켰을 때 시냅스의 형성, 축삭의 성장, 발생의 이상 및 신경 퇴행 표현형이 나타났다. 이러한 표현형은 신경세포 특이적으로 *Pss*의 발현을 조절했을 때는 나타나지 않았다(Park et al., 2021). 또한, *Pss*^{32/+}의 성체 비행근(indirect flight muscle)에서도 미토콘드리아 dynamics의 이상을 확인하였으며(김하은, 2021), 신경교세포 중에서도 특히 cortex glia 특이적으로 *Pss* 발현을 억제하였을 때 발생 단계에 이상이 생기는 것을 확인하였다(박반야, 2021). 그 외에도 *Pss* 발현을 장세포 특이적으로 억제하였을 때 번데기 및 성체의 크기가 작아졌고(김관영, 2021), *Pss* 돌연변이는 야생형에 비해 저온 스트레스에 취약함을 확인하였다(주현정, 2021).

이러한 선행연구 결과를 통해 *Pss*는 신경계의 기능, 미토콘드리아의 형태, 발생, 성장, 온도 저항성 등 다양한 표현형에 영향을 미치는 일종의 다면발현 유전자(pleiotropic gene)라는 것을 확인할 수 있다. 그러나 기존의 선행연구는 대부분 *Pss*³², *Pss*¹⁵, *Pss*⁷²와 같이 5' UTR에 P-element가 삽입된 제한적인 *Pss* 돌연변이 allele만을 사용하였다는 한계가 있다.

이에 본 연구에서는 선행연구에서 사용하지 않은 추가적인 *Pss* 돌연변이 allele들의 heterozygote 및 trans-heterozygote을 활용하여 선행연구에서 확인한 신경 퇴행 표현형의 정도를 다양한 *Pss* allele에서 확인하고, *Pss* allele 간의 상호작용 또한 확인하고자 한다. 또한, 추가적인 *Pss* allele의 분석을 통해 기존의 선행연구에서 확인하지 못했던 *Pss* 돌연변이와 관련된 새로운 특성이 있는지를 확인하고자 한다. 다양한 *Pss* 돌연

변이 allele을 활용한 연구를 통해 *Pss* 유전자의 기능을 보다 심층적으로 파악할 수 있을 것으로 기대한다.

제 2 장 실험 방법 및 재료

제 1 절 사용한 초파리

초파리는 옥수수수와 효모(cornmeal/yeast) 배지에 dry yeast를 추가로 넣은 관병에서 배양하였다. 인큐베이터 습도는 50%, day/night 주기는 12시간으로 맞추었고, 실험에 따라 25°C와 29°C의 온도 조건에서 배양하였다. 대조군으로는 야생형 초파리인 *Canton-S*를 사용하였다. *Pss* mutant allele로는 #11632, #22115, #76627, #104172, #5479, Ex2-1 #2[-14], #115456을 사용하였다(표 1). *Pss*³², *Pss*¹⁵, *Pss*⁷²는 P-element 삽입 돌연변이이고, *Pss*²⁷은 transposon 삽입 돌연변이이다. *Pss*⁵⁶은 piggyBac과 P-element를 결합한 PBac 삽입 돌연변이이다. *Pss*⁷⁹는 EMS에 의해 G:C가 A:T로 유사형 염기치환이 일어난 돌연변이이고, *Pss*^{#2}는 CRISPR-Cas9으로 제작한 돌연변이이다. *Pss*⁵⁶을 제외한 모든 *Pss* allele은 homozygous lethal이다. 각 *Pss* allele에서 돌연변이가 일어난 지점은 [그림 2]와 같다.

표 1. 사용한 *Pss* allele 초파리

Stock number	Stock center	Mutagenesis	Genotype	Remarks
11632	BDSC	P-element	<i>P{PZ}Pss⁰⁴⁵²¹ ry⁵⁰⁶/TM3, ry^{RK} Sb^l Ser^l</i>	<i>Pss</i> ³²
22115	BDSC	P-element	<i>w¹¹¹⁸; P{EPg}Pss^{HP31723}/TM3, Sb^l</i>	<i>Pss</i> ¹⁵
76627	BDSC	transposon	<i>y^l w[*]; Mi{Trojan-GAL4.2}Pss^{M101234-TG4.2}/TM3, Sb^l Ser^l</i>	<i>Pss</i> ²⁷
104172	Kyoto	P-element	<i>w[*]; P{GawB}Pss^{NP2363}/TM3, Sb^l Ser^l</i>	<i>Pss</i> ⁷²
5479	BDSC	EMS	<i>Pss^{Y6}/TM6C, Sb^l Tb^l</i>	<i>Pss</i> ⁷⁹
Ex2-1 #2[-14]	GD Lab	CRISPR-Cas9	<i>y² cho² v^l; Pss^{Ex2-1 #2[-14]}/TM6C, Sb^l Tb^l</i>	<i>Pss</i> ^{#2}
115456	Kyoto	piggyBac/ P-element	<i>w¹¹¹⁸; PBac{802.P.SVS-2}Pss^{CP11003911}/TM6C, Sb^l</i>	<i>Pss</i> ⁵⁶

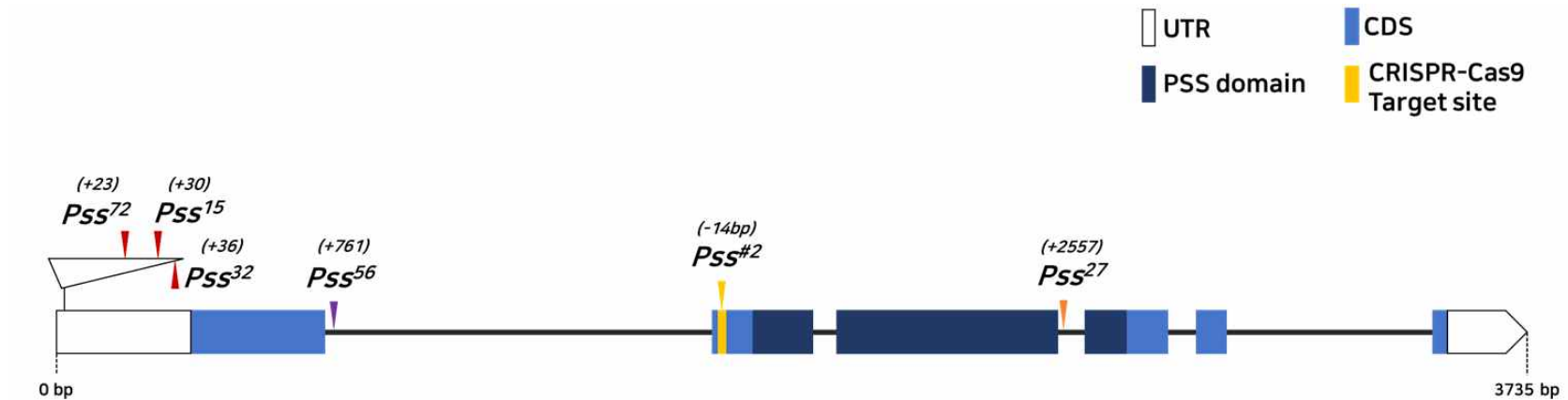


그림 2. *Pss* allele의 돌연변이 유발 지점

*Pss*는 초파리의 3번 염색체 좌완에 위치해 있고, 유전자의 총 길이는 3735bp이다. *Pss*³², *Pss*¹⁵, *Pss*⁷²는 5' UTR에 P-element가 삽입되었고, *Pss*⁵⁶은 첫 번째 intron에 PBac이 삽입되었으며, *Pss*²⁷은 세 번째 intron에 transposon이 삽입되었다. *Pss*^{#2}는 두 번째 exon의 CRISPR-Cas9 target site에서 14 bp가 제거된 frame shift 돌연변이이다. *Pss*⁷⁹는 EMS에 의해 무작위적으로 GC가 AT로 바뀌는 point mutation이 일어났으므로 따로 표기하지 않았다.

제 2 절 생존율 측정(viability)

Pss allele의 trans-heterozygote의 발생 단계에서의 생존율을 측정하기 위해 25°C와 29°C의 온도 조건에서 각 allele의 암수를 바꾸어 가며 교배하였다. 이후 태어난 F₁ 자손 세대에서 balancer에 포함된 Sb¹의 표현형인 짧은 등털의 유무를 기준으로 성체로 깨어난 모든 개체의 수를 세었다. *Pss* allele의 trans-heterozygote의 viability 계산식은 다음과 같다.

$$Viability = \frac{\text{등털이 긴 개체 수의 합}}{\text{등털이 짧은 개체 수의 합}/2} \times 100(\%)$$

제 3 절 신경 퇴행 표현형 확인

1. 수명 측정(Life span)

25°C에서 발생시켜 깨어난 지 24시간 이내의 수컷을 관병마다 10마리 또는 20마리씩 총 10개의 관병에 넣어 29°C에서 노화시켰다. 3일에 한번씩 transfer를 하면서 관병마다 남은 개체 수를 기록하였다. 총 생존율을 그래프로 나타내고, 각 관병에서 50% 이하의 초과리가 남는 날을 T50으로 하여 그 평균을 구해 비교하였다.

2. 운동능력 측정(Climbing assay)

25°C에서 발생시켜 깨어난 지 24시간 이내의 수컷을 29°C로 옮겨 노화시켰다. 적정기간 동안 노화시킨 초과리를 CO₂를 이용하여 마취한 뒤, 각 20마리씩 나누어 배지가 들어있는 새 관병으로 옮기고, 마취가 풀리고 온도에 적응할 때까지 25°C에서 30분 동안 배양하였다. 약 25cm 길이의 climbing assay 용 vial에 마취 없이 transfer 한 후 1시간 동안 25°C에 두면서 새로운 환경에 적응할 때까지 기다렸다. 이후 동영상을 촬

영할 카메라를 설치하고, 초파리를 넣은 vial을 바닥에 두드리 초파리들이 모두 밑으로 내려오도록 하였다. 10초 동안 초파리가 기어올라가는 것을 동영상으로 촬영하고, 촬영한 동영상을 분석하여 10초 동안 각각의 초파리가 올라간 거리를 Tracker로 측정 후 대조군과 비교하였다.

제 4 절 유전자 발현량 확인(qRT-PCR)

NucleoZOL (Macherey-Nagel)을 이용하여 노화 1일 차 수컷 초파리에서 RNA를 추출한 뒤, 5X All-In-One RT MasterMix (abm)를 이용하여 각 라인당 1000ng의 RNA를 cDNA로 합성하였다. TOPreal qPCR 2X PreMix (SYBR green with low ROX, enzynomics)와 Rotor-Gene Q (QIAGEN)를 이용하여 qRT-PCR (quantitative real-time PCR)을 진행하였다. Normalization을 위한 유전자로는 *Actin 42A* (*Act42A*)를 사용하였다. 사용한 primer 정보는 [표 2]와 같다.

표 2. 사용한 primer

유전자	구분	primer 서열
<i>Act42A</i>	forward	5'-AAGAGGTTGCAGCTTTAGTGG-3'
<i>Act42A</i>	reverse	5'-TCCCATTCCTACCATTACGCC-3'
<i>Pss</i>	forward	5'-CATCAGTTGGGATCGCGTT-3'
<i>Pss</i>	reverse	5'-CACAGAAATGGCCCACAGA-3'

제 5 절 조직 해부 및 고정

1. 성체의 뇌

노화 3일 차의 수컷 초파리를 CO₂로 마취시킨 뒤 입을 제거하고 머리를 몸통에서 떼어내었다. PBST (1X PBS, 0.1% Triton X-100) 상에서 forcep을 이용하여 머리의 큐티클을 제거하고 뇌를 꺼낸 뒤 4%

paraformaldehyde에 넣어 20분 동안 고정하였다.

2. 성체 수컷의 생식기관

노화 3일 차의 수컷 초파리를 CO₂로 마취시킨 뒤 1X PBS 상에서 forcep을 이용하여 복부 끝을 잡아당겨서 내부의 조직을 밖으로 빼내었다. 서로 붙어 있는 testis, seminal vesicle, accessory gland, ejaculatory duct를 복부 내부의 다른 조직들과 분리하여 꺼내었다. 별도의 고정 과정을 거치지 않고 즉시 현미경을 이용하여 촬영하였다.

제 6 절 면역조직화학염색법

1. 사용한 항체

1차 항체

mouse anti-Strep-tagII (GT661, 1:2000, Abcam), rabbit anti-PSS (96-58, 1:2000, GD Lab)

2차 항체

Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:1000, Invitrogen), Alexa Fluor 594 goat anti-mouse (1:1000, Invitrogen)

2. 면역조직화학염색법

해부하여 고정한 뇌 조직에서 고정액을 제거하고 PBST로 10분씩 3회 washing 하였다. 항체의 비특이적 결합을 방지하기 위해 PBST로 희석한 5% NGS (Normal Goat Serum)를 30분 동안 처리한 후, 5% NGS에 비율에 맞게 희석한 1차 항체를 처리하였다. 1차 항체는 4°C에서 overnight으로 처리하였다. 1차 항체를 제거한 후 PBST로 20분씩 3회 이상 washing 하였다. 형광 염색을 위해 호일로 빛을 차단하고, 5% NGS에 비율에 맞게 처리한 2차 항체를 상온에서 2시간 처리하였다. 2차 항체를 제거한 후 PBST로 20분씩 3회 이상 washing 하고, 이중염색을

위해 앞의 과정을 반복하여 다른 1차 항체와 2차 항체를 처리하였다. 이 중염색이 완료되면 Fluoromount-G 용액을 넣어 4℃에 보관하였다. 이후 뇌 조직을 mounting 하여 LSM 880 공초점 현미경으로 관찰하였다.

제 7 절 수컷 생식기관 관찰

1. 정낭 내부의 정자

해부한 정낭을 1X PBS 상에서 forcep을 이용하여 터뜨려 정낭 내부에 저장되어 있던 성숙한 정자가 밖으로 터져 나오게 하였다. 이후 bridge 없이 mounting 하여 LSM 880 공초점 현미경으로 관찰하였다. 정낭 내부의 정자 유무는 Soulavie et al.(2014)의 연구 결과를 참고하여 판단하였다.

2. 정소 내부에서 형성되는 early round spermatid의 미토콘드리아(nebenkern)

해부한 정소의 onion stage가 있는 level 2 위치를 forcep으로 터뜨려 내부의 세포들을 잘 관찰할 수 있도록 bridge 없이 mounting한 후 LSM 880 공초점 현미경으로 관찰하였다. 정소 내부에서 일어나는 정자 형성의 여러 단계 중 감수분열 이후의 early round spermatid에서 구형의 haploid 핵 근처에 미토콘드리아가 뭉쳐서 구형의 nebenkern이라는 구조를 형성한 onion stage를 관찰하였다.

제 3 장 결 과

제 1 절 *Pss* trans-heterozygote의 생존율

*Pss*의 homozygous lethal mutant allele 간의 상호작용을 확인하기 위해 가장 먼저 각 allele의 암수를 바꾸어 가며 25°C와 29°C의 온도 조건에서 교배하여 *Pss* allele의 trans-heterozygote가 발생 단계에서 치사하지 않고 생존하여 성체로 우화하는지를 확인하였다. 실험 결과 25°C에서 *Pss*³² allele을 포함하여 교배했을 때에만 trans-heterozygote가 성체로 우화하여 태어났다. *Pss*³²를 포함하지 않은 교배 결과에서는 trans-heterozygote가 모두 발생 단계에서 치사하여 성체로 우화하지 못했다. 또한, 교배 시 *Pss*³²를 암컷으로 사용하였을 때의 생존율이 *Pss*³²를 수컷으로 사용하였을 때보다 더 높게 나타났다(표 3A).

25°C에서 trans-heterozygote가 태어난 *Pss*³²를 포함하는 교배에 대해서만 고온 스트레스로 작용하는 29°C에서 추가로 교배를 진행하여 생존율을 확인하였다. 29°C에서 교배하여 trans-heterozygote를 발생시킨 결과 *Pss*³²를 암컷과 수컷으로 사용한 경우 모두에서 25°C에 비해 낮은 생존율을 보였다. 특히, 29°C에서 *Pss*³²와 *Pss*²⁷, *Pss*⁷², *Pss*⁷⁹를 교배하였을 때 trans-heterozygote의 생존율이 5% 이하로 매우 낮게 나타나거나, 아예 성체로 우화하지 못하고 발생 단계에서 치사하는 것으로 나타났다(표 3B).

실험 결과 태어난 trans-heterozygote의 생존율은 이론적으로 viable인 100%에 비해 낮게 나타났다. 즉, 태어나는 *Pss*의 trans-heterozygote들은 모두 낮은 생존율(low viability)을 보인다. 특히 모든 조건에서 *Pss*³²와 *Pss*¹⁵를 교배하였을 때 태어나는 trans-heterozygote의 생존율이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 25°C에서 *Pss*³²를 암컷으로 사용하여 교배하면 태어나는 trans-heterozygote들의 생존율이 25% 이상

으로 확보되어 실험에 사용하기 용이하고, 성염색체인 1번 염색체의 유전적 background를 야생형으로 통일할 수 있다. 따라서 이후 진행한 실험에서는 *Pss* trans-heterozygote line으로 25°C에서 Pss^{32} 를 암컷으로 사용하여 교배 후 발생시킨 $Pss^{32/15}$, $Pss^{32/27}$, $Pss^{32/72}$, $Pss^{32/79}$, $Pss^{32/\#2}$ 를 사용하였다.

A

♀ \ ♂	<i>Pss</i> ³²	<i>Pss</i> ¹⁵	<i>Pss</i> ²⁷	<i>Pss</i> ⁷²	<i>Pss</i> ⁷⁹	<i>Pss</i> ^{#2}
<i>Pss</i> ³²	Lethal	56.26%	27.21%	42.05%	27.63%	41.97%
<i>Pss</i> ¹⁵	35.25%	Lethal	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pss</i> ²⁷	5.24%	0.00%	Lethal	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pss</i> ⁷²	2.27%	0.00%	0.00%	Lethal	0.00%	0.00%
<i>Pss</i> ⁷⁹	8.49%	0.00%	0.00%	0.00%	Lethal	0.00%
<i>Pss</i> ^{#2}	12.04%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	Lethal

B

♀ \ ♂	<i>Pss</i> ¹⁵	<i>Pss</i> ²⁷	<i>Pss</i> ⁷²	<i>Pss</i> ⁷⁹	<i>Pss</i> ^{#2}
<i>Pss</i> ³²	28.19%	1.55%	4.65%	0.00%	13.91%
♂ \ ♀	<i>Pss</i> ¹⁵	<i>Pss</i> ²⁷	<i>Pss</i> ⁷²	<i>Pss</i> ⁷⁹	<i>Pss</i> ^{#2}
<i>Pss</i> ³²	28.08%	0.00%	0.00%	4.56%	0.49%

표 3. *Pss* trans-heterozygote의 생존율

A: 25°C에서 발생시킨 *Pss* trans-heterozygote의 생존율. **B:** 29°C에서 발생시킨 *Pss* trans-heterozygote의 생존율. 25°C에서는 *Pss*³² allele을 포함하여 교배했을 때에만 trans-heterozygote가 성체로 우화하여 태어났다. 29°C에서는 25°C에 비해 태어나는 trans-heterozygote가 낮은 생존율을 보였다.

제 2 절 *Pss* heterozygote와 trans-heterozygote의 신경 퇴행 표현형

Pss allele에서 나타나는 신경 퇴행 표현형 및 allele 간의 상호작용을 확인하기 위해 상동염색체 중 한쪽에만 *Pss* mutant allele을 갖고 다른 한쪽은 야생형인 heterozygote와 서로 다른 *Pss* mutant allele을 상동염색체 양쪽에 각각 한 개씩 갖는 trans-heterozygote를 제작하여 실험에 사용하였다. *Pss* heterozygote line으로는 25°C에서 야생형 암컷과 각 *Pss* allele, 즉 Pss^{32} , Pss^{15} , Pss^{27} , Pss^{72} , Pss^{79} , $Pss^{\#2}$ 를 교배하여 발생시킨 $Pss^{+/32}$, $Pss^{+/15}$, $Pss^{+/27}$, $Pss^{+/72}$, $Pss^{+/79}$, $Pss^{+/\#2}$ 를 사용하였다. *Pss* trans-heterozygote line으로는 25°C에서 Pss^{32} 암컷과 다른 5가지 *Pss* allele들을 교배하여 발생시킨 $Pss^{32/15}$, $Pss^{32/27}$, $Pss^{32/72}$, $Pss^{32/79}$, $Pss^{32/\#2}$ 를 사용하였다.

우선, 야생형과 *Pss* heterozygote, *Pss* trans-heterozygote의 수명을 측정하기 위해 각각의 life span 그래프를 그리고, 각 관병에서 개체수가 50% 이하로 감소하는 날인 T50 값을 측정하였다(그림 3). 야생형의 T50 값은 31.8일이었다. *Pss* heterozygote의 경우 T50 값이 $Pss^{+/32}$ 는 41.1일, $Pss^{+/15}$ 는 41.7일, $Pss^{+/27}$ 는 36.3일, $Pss^{+/72}$ 는 37.5일, $Pss^{+/79}$ 는 45.9일, $Pss^{+/\#2}$ 는 34.8일로 나타났다. 이 중 $Pss^{+/27}$ 와 $Pss^{+/\#2}$ 를 제외한 다른 *Pss* heterozygote의 T50 값은 야생형과 유의미한 차이를 보였다. 즉, *Pss* heterozygote의 T50 값은 야생형과 유의미한 차이가 없거나 오히려 증가하는 것으로 나타났다(그림 3B). *Pss* trans-heterozygote의 T50 값은 $Pss^{32/15}$ 는 9일, $Pss^{32/27}$ 는 6.6일, $Pss^{32/72}$ 는 4.5일, $Pss^{32/79}$ 는 5.1일, $Pss^{32/\#2}$ 는 15일로 나타나 야생형의 T50 값인 31.8일에 비해 큰 폭으로 감소한 것을 확인할 수 있었다(그림 3D).

다음으로, 야생형과 *Pss* heterozygote, *Pss* trans-heterozygote의 수명을 측정하기 위해 climbing assay 결과를 비교하였다. 노화 10일 차의 야생형은 평균 14.48cm를 올라갔다. 노화 10일 차 *Pss* heterozygote의 경우 평균적으로 $Pss^{+/32}$ 는 11.69cm, $Pss^{+/15}$ 는 15.90cm, $Pss^{+/27}$ 는

12.78cm, $Pss^{+/72}$ 는 11.98cm, $Pss^{+/79}$ 는 11.01cm, $Pss^{+/\#2}$ 는 13.09cm를 올라갔다. 이 중 유의미한 증가를 보인 $Pss^{+/15}$ 를 제외한 다른 모든 Pss heterozygote는 야생형에 비해 운동능력이 감소하였다(그림 4A). 노화 1일 차의 야생형은 평균 15.58cm를 올라갔다. 노화 1일 차 Pss trans-heterozygote의 경우 평균적으로 $Pss^{32/15}$ 는 1.41cm, $Pss^{32/27}$ 는 0.57cm, $Pss^{32/72}$ 는 0.42cm, $Pss^{32/79}$ 는 0.18cm, $Pss^{32/\#2}$ 는 0.82cm를 올라가 모두 야생형에 비해 운동능력이 매우 큰 폭으로 감소하였다(그림 4B).

Pss 의 homozygous lethal mutant allele의 mRNA 수준에서의 상대적인 Pss 발현량을 확인하기 위해 qRT-PCR을 진행하였다. Pss heterozygote와 trans-heterozygote 모두 야생형에 비해 Pss 발현량이 유의미하게 감소하였다. $Pss^{+/32}$ 는 67%, $Pss^{+/15}$ 는 73%, $Pss^{+/27}$ 는 31%, $Pss^{+/72}$ 는 64%, $Pss^{+/79}$ 는 43%, $Pss^{+/\#2}$ 는 42%로 감소하였다(그림 5A). 또한, $Pss^{32/15}$ 는 58%, $Pss^{32/27}$ 는 55%, $Pss^{32/72}$ 는 44%, $Pss^{32/79}$ 는 41%, $Pss^{32/\#2}$ 는 62%로 감소하였다(그림 5B).

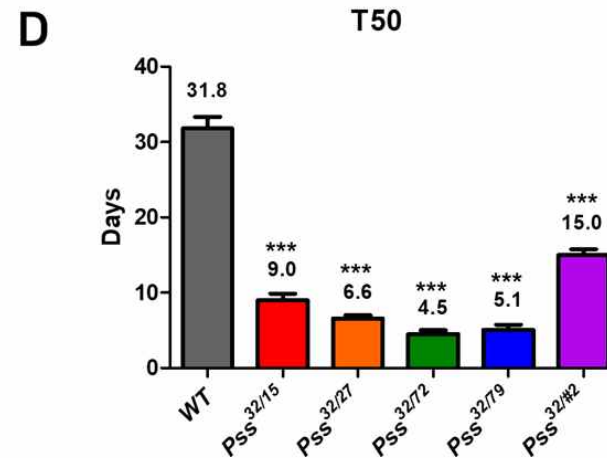
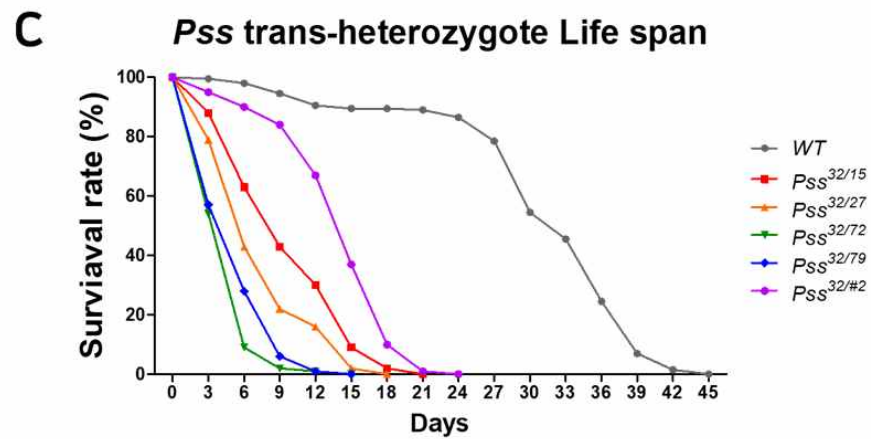
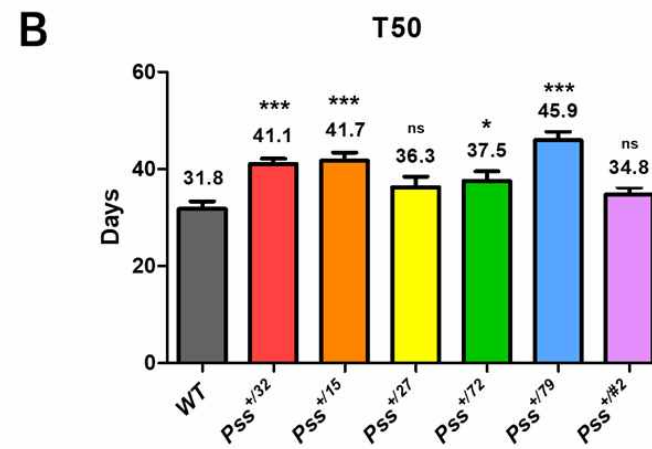
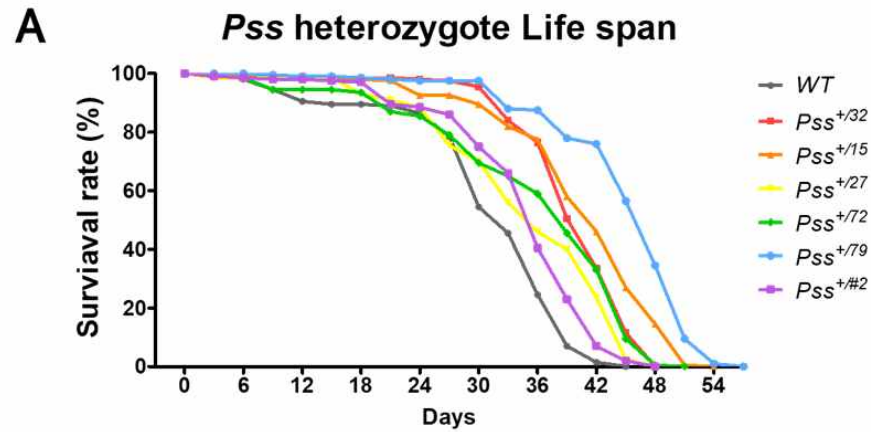
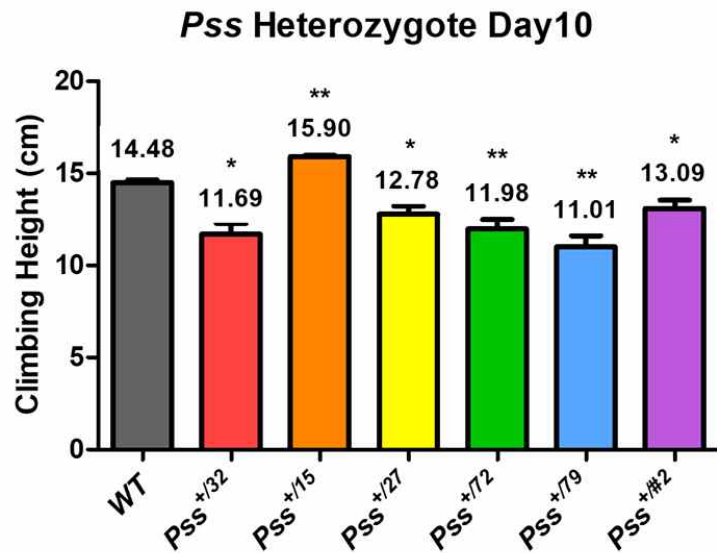


그림 3. *Pss* heterozygote와 trans-heterozygote의 수명

A: *Pss* heterozygote의 수명. (n=200) **B:** *Pss* heterozygote의 T50. (n=200) **C:** *Pss* trans-heterozygote의 수명. (n=100) **D:** *Pss* trans-heterozygote의 T50. (n=100) *Pss* heterozygote의 T50 값은 야생형과 유의미한 차이가 없거나($P_{ss}^{+/27}$, $P_{ss}^{+/\#2}$), 오히려 증가하였다($P_{ss}^{+/32}$, $P_{ss}^{+/15}$, $P_{ss}^{+/72}$, $P_{ss}^{+/79}$). *Pss* trans-heterozygote의 T50 값은 모두 야생형에 비해 큰 폭으로 감소하였다.

A



B

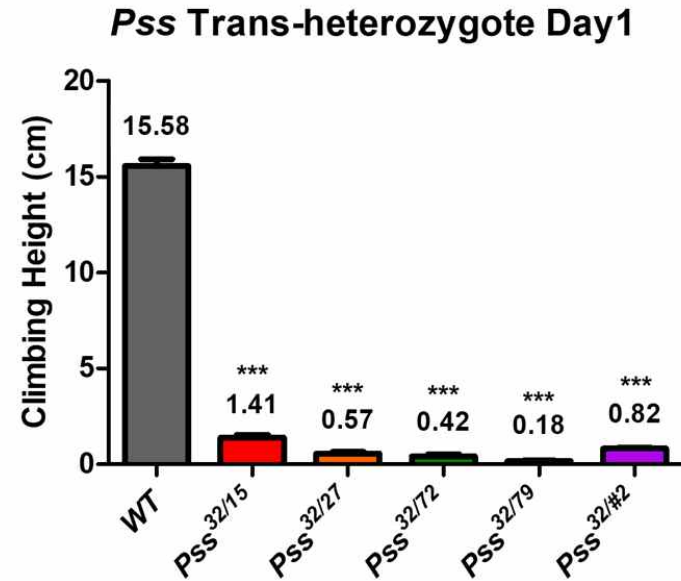
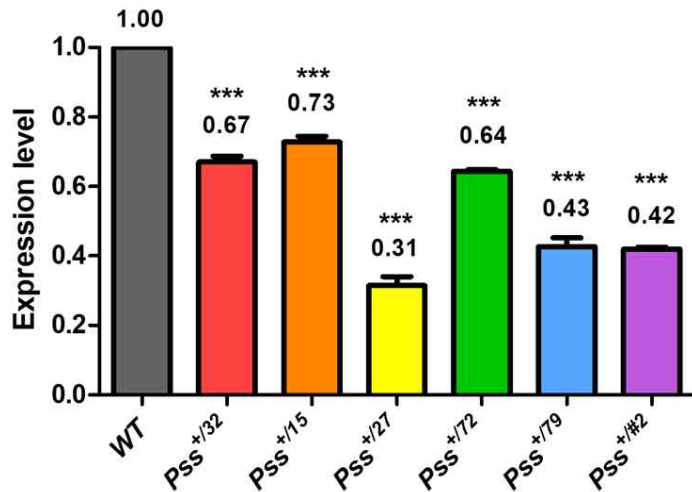


그림 4. *Pss* heterozygote와 trans-heterozygote의 운동능력

A: 노화 10일 차 *Pss* heterozygote의 운동능력. **B:** 노화 1일 차 *Pss* trans-heterozygote의 운동능력. 노화 10일 차 *Pss* heterozygote의 경우 *Pss*^{+/15}를 제외한 다른 *Pss* heterozygote는 야생형에 비해 운동능력이 감소하였다. 노화 1일 차 *Pss* trans-heterozygote의 경우 모두 야생형에 비해 운동능력이 매우 큰 폭으로 감소하였다.

A Heterozygote *Pss* expression level



B Trans-heterozygote *Pss* expression level

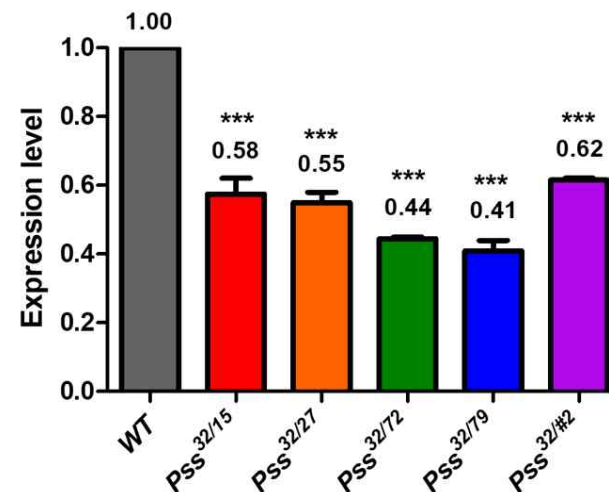


그림 5. *Pss* heterozygote와 trans-heterozygote의 *Pss* 발현량

A: 노화 1일 차 *Pss* heterozygote의 *Pss* 발현량. **B:** 노화 1일 차 *Pss* trans-heterozygote의 *Pss* 발현량. *Pss* heterozygote와 trans-heterozygote 모두 야생형에 비해 *Pss* 발현량이 유의미하게 감소하였다.

제 3 절 Pss^{56} allele의 특징

1. Pss^{56} 성체 뇌에서의 Strep-tag II 및 PSS 발현 패턴

Pss^{56} 은 piggyBac/P-element를 활용한 protein trap 기술로 인공적인 exon을 가지는 전이인자를 첫 번째 intron에 적절한 reading frame이 되도록 삽입하여 PSS 단백질에 multiple tagging을 시킨 allele이다. 삽입된 전이인자인 PBac{802.P.SVS-2}는 YFP인 Venus와 Strep-tag II, 강력한 splice acceptor 및 donor를 갖는다(Lowe et al., 2014). 따라서 tag에 특이적인 항체를 사용하면 PSS 단백질의 발현 패턴을 간접적으로 확인할 수 있다. 기존에 본 연구실에서 자체적으로 주문 제작해 사용했던 anti-PSS 항체가 제대로 작동하는지 확인된 바가 없었기 때문에 anti-Strep-tag II 항체와 anti-PSS 항체를 사용하여 이중염색한 후 노화 3일 차 Pss^{56} 수컷 초파리의 뇌에서 Strep-tag II와 PSS 단백질의 발현 패턴을 확인하였다. 실험 결과 성체 뇌의 피질(cortex) 부분인 cell body rind에서 Strep-tag II와 PSS 단백질의 발현 패턴이 겹치는 것을 확인할 수 있었다(그림 6).

2. Pss^{56} 을 중심으로 한 Pss trans-heterozygote의 생존율

새로운 Pss^{56} allele의 탐색을 위해 Pss^{56} 과 앞서 사용한 다른 6가지의 homozygous lethal Pss allele들을 교배하여 그 결과 태어나는 Pss trans-heterozygote의 생존율을 확인하였다. Pss^{56} 은 homozygous viable allele로, 3번 염색체의 상동염색체 중 한쪽 염색체에 balancer가 있는 heterozygote ($Pss^{56}/TM6C$)와 양쪽 염색체에 모두 Pss^{56} allele을 갖는 homozygote ($Pss^{56/56}$)가 stock 상에 모두 존재하며 유지된다. 생존율 계산을 위해 balancer를 갖는 $Pss^{56}/TM6C$ 암컷과 수컷을 사용하여 25°C에서 교배를 진행하였고, 실험 결과 태어나는 trans-heterozygote의 생존율이 거의 100%에 가깝게 나타나 모두 viable인 것을 확인할 수 있었다(표 4).

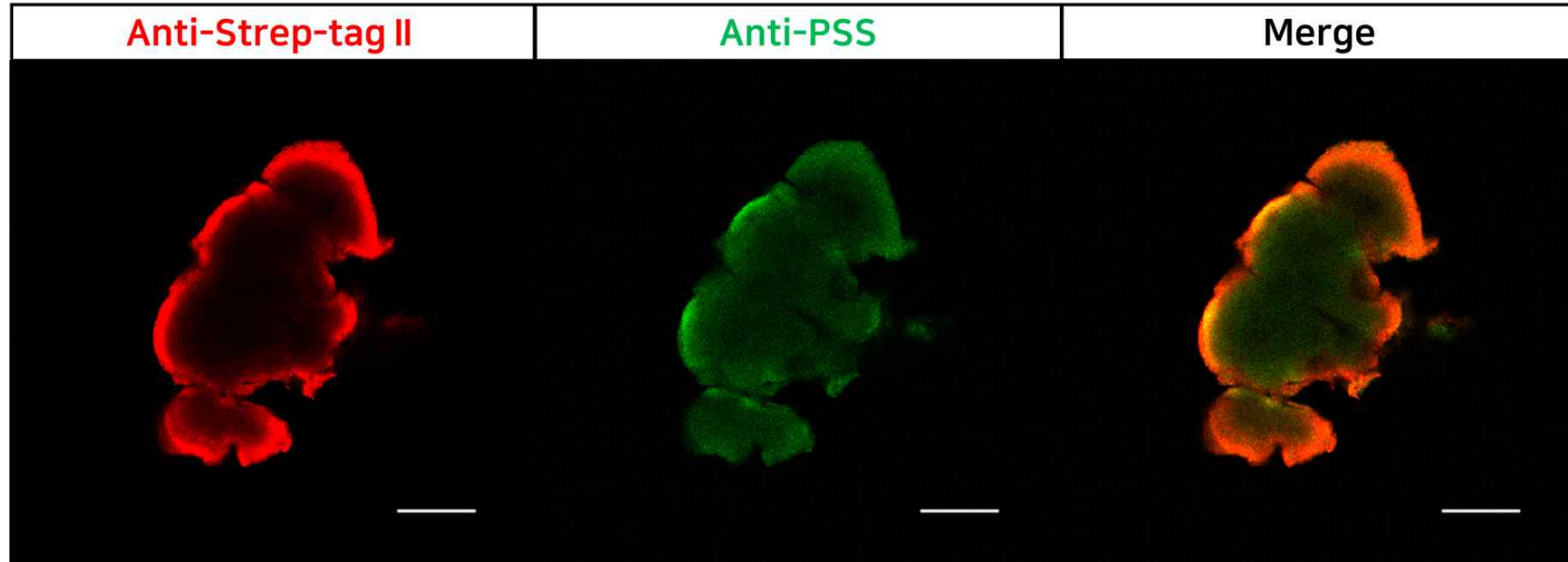


그림 6. *Pss*⁵⁶ 성체 뇌에서의 Strep-tag II 및 PSS 발현 패턴

A: *Pss*⁵⁶의 anti-Strep-tag II 항체 염색 결과. **B:** *Pss*⁵⁶의 anti-PSS 항체 염색 결과. **C:** Merge. 성체 뇌의 피질 (cortex) 부분인 cell body rind에서 Strep-tag II와 PSS 단백질의 발현 패턴이 나타났다. Scale bar, 100 μ m. (n=6)

♀ \ ♂	<i>Pss</i> ³²	<i>Pss</i> ¹⁵	<i>Pss</i> ²⁷	<i>Pss</i> ⁷²	<i>Pss</i> ⁷⁹	<i>Pss</i> ^{#2}
<i>Pss</i> ⁵⁶	88.89%	102.35%	73.42%	99.27%	94.81%	75.00%
♂ \ ♀	<i>Pss</i> ³²	<i>Pss</i> ¹⁵	<i>Pss</i> ²⁷	<i>Pss</i> ⁷²	<i>Pss</i> ⁷⁹	<i>Pss</i> ^{#2}
<i>Pss</i> ⁵⁶	105.77%	95.56%	152.94%	95.56%	121.43%	103.53%

표 4. *Pss*⁵⁶을 중심으로 한 *Pss* trans-heterozygote의 생존율

*Pss*⁵⁶을 중심으로 한 *Pss* trans-heterozygote의 생존율. 교배 결과 태어나는 *Pss*⁵⁶을 중심으로 하는 trans-heterozygote는 모두 생존율이 정상적인 100%에 가까우므로 viable이다.

3. Pss^{56} heterozygote와 homozygote의 생식능력

Pss^{56} 은 다른 Pss homozygous lethal allele들과는 달리 heterozygote와 homozygote가 모두 태어나므로, 이들의 생식능력을 각각 확인해 보고자 하였다. 야생형과 $Pss^{56}/TM6C$, $Pss^{56/56}$ 의 암컷과 수컷을 25°C에서 각각 바꿔 가며 교배한 결과, 야생형과 $Pss^{56}/TM6C$ 수컷을 교배에 사용하였을 때는 자손이 정상적으로 태어났다. 한편, $Pss^{56/56}$ 수컷을 교배에 사용하였을 때는 자손이 아예 태어나지 않았다(표 5). 즉, $Pss^{56/56}$ 수컷은 발생 단계에서 생존하여 성체로 우화할 수 있으나 생식능력이 없는 불임이라는 것을 확인하였다.

♀ \ ♂	WT	<i>Pss⁵⁶/TM6C</i>	<i>Pss^{56/56}</i>
WT	Fertile	Fertile	Sterile
<i>Pss⁵⁶/TM6C</i>	Fertile	Fertile	Sterile
<i>Pss^{56/56}</i>	Fertile	Fertile	Sterile

표 5. *Pss⁵⁶* heterozygote와 homozygote의 생식능력

Pss⁵⁶ heterozygote와 homozygote의 생식능력. Fertile은 교배 결과 자손이 정상적으로 태어났음을 의미한다. Sterile은 교배 결과 자손이 태어나지 못했음을 의미한다. *Pss^{56/56}* 수컷은 생식능력이 없는 불임이다.

제 4 절 $Pss^{56/56}$ 및 Pss trans-heterozygote 수컷의 생식능력

1. $Pss^{56/56}$ 과 Pss trans-heterozygote 수컷 생식기관 형태

수컷 초파리의 생식기관의 전체 구조는 [그림 7]과 같다. 정소(testes)는 정낭(seminal vesicles)을 통해 사정관(ejaculatory duct)과 연결되어 있고, 한 쌍의 부속샘(accessory glands)도 사정관에 붙어 있다. 정소에서는 위치별로 정자 형성 과정의 단계가 일어난다. 정소의 level 1 위치에는 정자 형성 과정의 초기 단계, 즉 전이-증폭되며 4단계를 거쳐 체세포분열을 하여 증식 후 성장하는 세포들이 있고, level 2 위치에는 감수분열 단계의 spermatocyte 및 감수분열 이후 단계의 early round spermatid가 있고, level 3 위치에는 길어지고 개별화된 성숙한 정자가 있다(Sitaram et al., 2014). 정낭에는 정소에서 만들어진 성숙한 정자가 저장되며, 정자와 부속샘에서 만들어진 accessory gland protein이 섞인 정액이 사정관을 통해 배출된다(Ravi Ram & Wolfner, 2007).

$Pss^{56/56}$ 에서 나타난 수컷의 불임이라는 새로운 표현형에 대해 심층적으로 탐색하기 위해 야생형과 $Pss^{56/56}$, Pss trans-heterozygote 수컷의 생식기관 중 정소와 정낭을 따로 분리하여 그 형태를 관찰하였다. 실험 결과 야생형에 비해 $Pss^{32/\#2}$ 의 정소의 크기가 눈에 띄게 작아지고, 비정상적인 형태가 나타났다(그림 8G). $Pss^{32/\#2}$ 를 제외한 $Pss^{56/56}$ 이나 다른 Pss trans-heterozygote들은 야생형과 비교했을 때 정소의 크기는 크게 차이하지 않았다(그림 8A-F). 한편, $Pss^{56/56}$ 및 $Pss^{32/27}$, $Pss^{32/79}$, $Pss^{32/\#2}$ 는 야생형에 비해 정낭의 크기가 감소했다(그림 8A-G, 그림 9A-G).

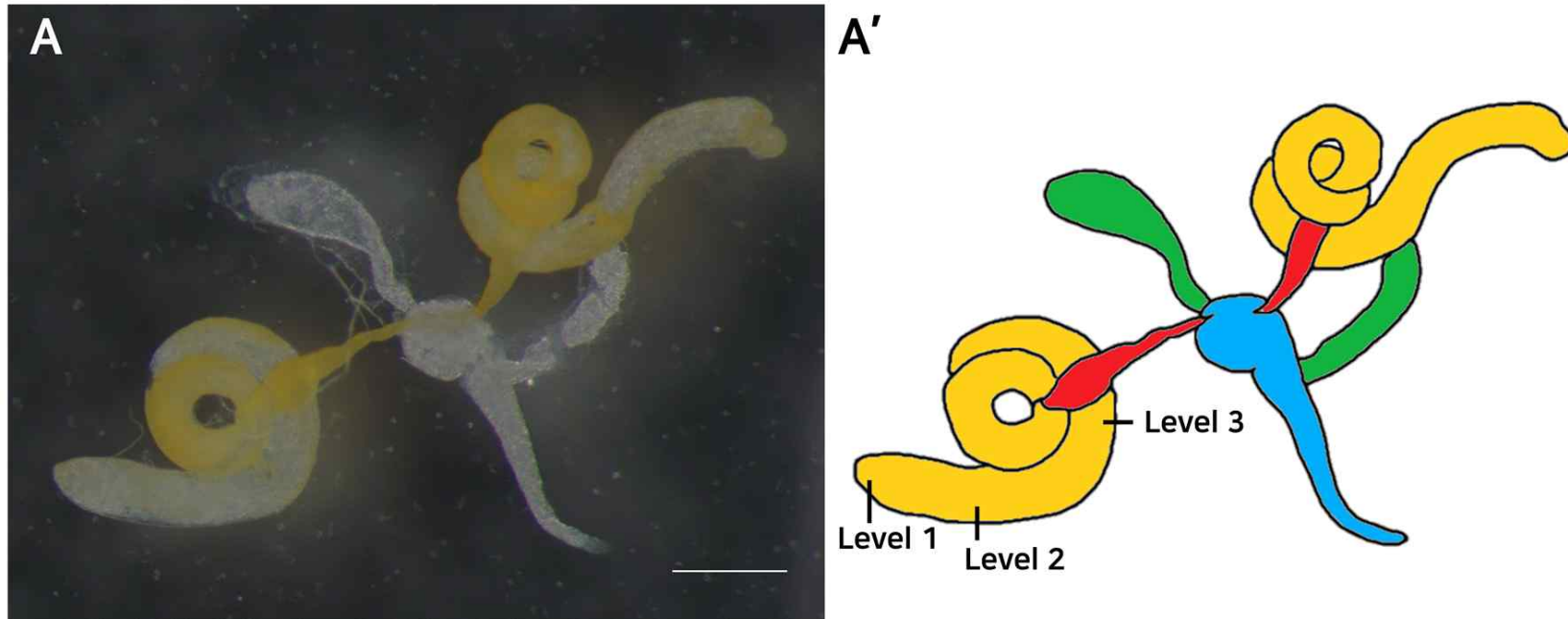


그림 7. 야생형 초파리 수컷 생식기관의 구조

초파리 수컷의 정소(testes, yellow)는 정낭(seminal vesicles, red)을 통해 사정관(ejaculatory duct, blue)과 연결되어 있고, 한 쌍의 부속샘(accessory glands, green)도 사정관에 붙어 있다. 정소의 level 1 위치에는 정자 형성 과정의 초기 단계의 세포들이, level 2 위치에는 감수분열 및 감수분열 이후 단계의 생식세포가, level 3 위치에는 성숙한 정자가 있다. Scale bar, 50 μ m.

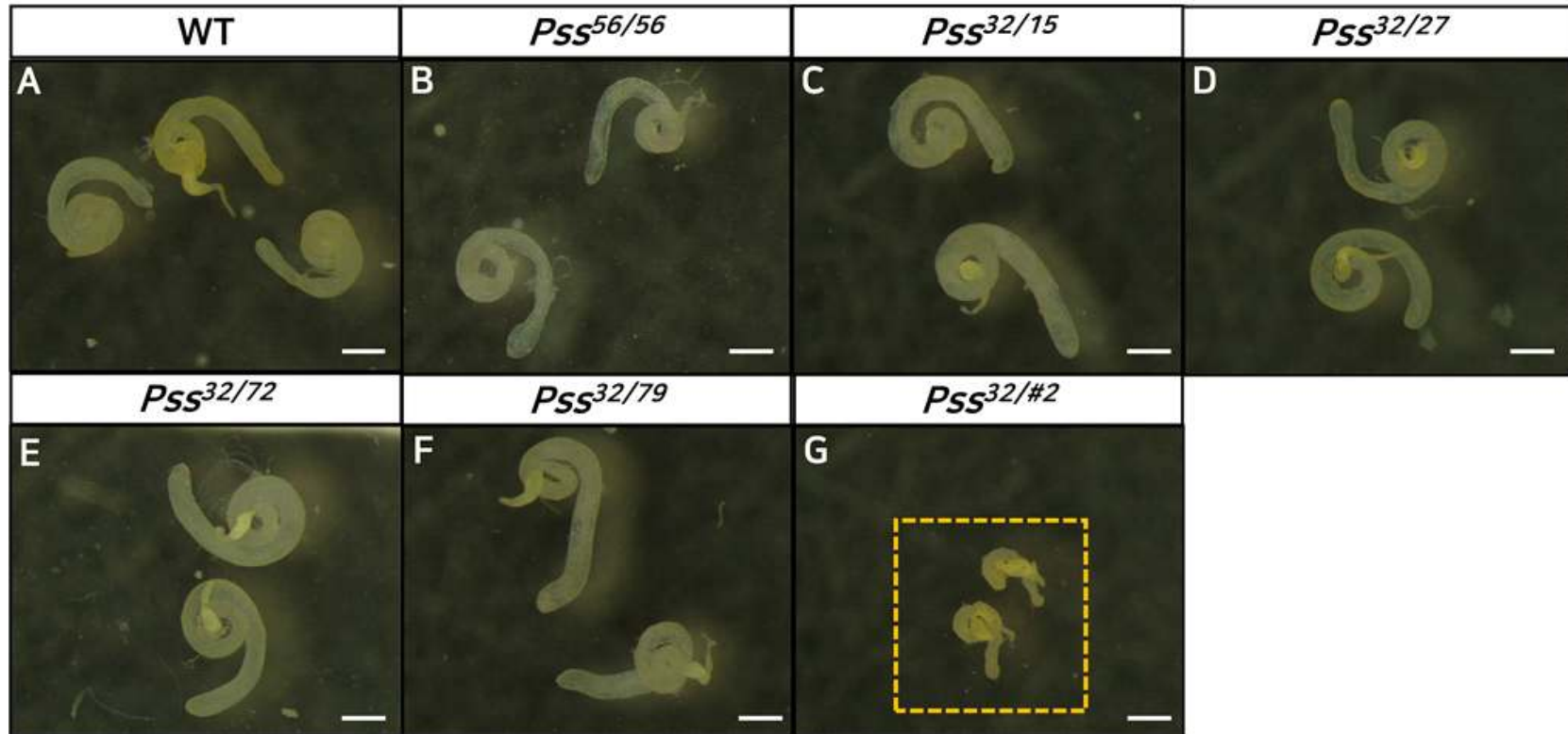


그림 8. *Pss*^{56/56}과 *Pss* trans-heterozygote의 생식기관의 형태

A: 야생형. B: *Pss*^{56/56}. C: *Pss*^{32/15}. D: *Pss*^{32/27}. E: *Pss*^{32/72}. F: *Pss*^{32/79}. G: *Pss*^{32/#2}. 야생형에 비해 *Pss*^{32/#2}의 정소의 크기가 작아지고, 비정상적인 형태가 나타났다. Scale bar, 50 μ m. (n=6)

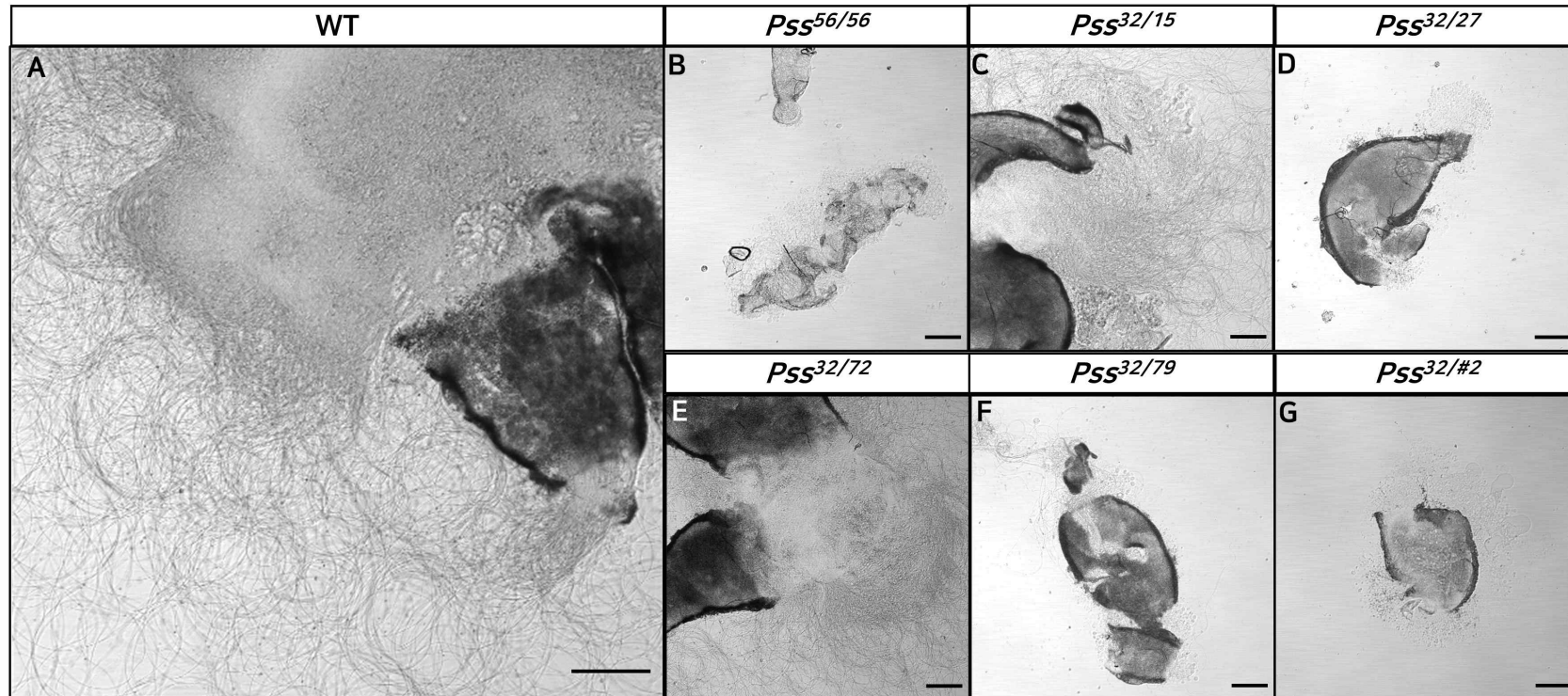
2. $Pss^{56/56}$ 과 Pss trans-heterozygote 수컷 정낭 내부의 성숙한 정자 유무

$Pss^{56/56}$ 과 Pss trans-heterozygote 수컷의 생식능력을 확인하기 위해 야생형과 $Pss^{56/56}$, Pss trans-heterozygote 수컷의 정낭을 forcep으로 터뜨려서 정낭 내부에 저장되어 있던 성숙한 정자가 밖으로 터져 나오게 하여 관찰하였다. 정낭 내부의 성숙한 정자 유무는 Soulavie et al.(2014)의 연구 결과를 참고하여 판단하였다. 실험 결과 야생형의 정낭 안에는 성숙한 정자가 가득 차 있고, 정낭을 터뜨리면 내부에 저장되어 있던 성숙한 정자가 밖으로 터져 나와 성숙한 정자의 편모가 보였다(그림 9A-A'). $Pss^{32/15}$, $Pss^{32/72}$ 또한 정낭 내부에 성숙한 정자가 들어있었다(그림 9C-C', E-E'). 반면, $Pss^{32/79}$ 는 개체에 따라 정낭 내부에 적은 양의 정자만 들어있거나, 정자가 아예 없고 lipid droplet으로 보이는 방울 외에는 아무것도 들어있지 않은 채 비어 있는 정낭을 가지고 있었다(그림 9F-F'). $Pss^{56/56}$, $Pss^{32/27}$, $Pss^{32/\#2}$ 는 정낭 내부에 정자가 아예 없고 lipid droplet으로 보이는 방울만 있는 텅 빈 정낭을 가지고 있었다(그림 9B-B', D-D', G-G'). 또한, $Pss^{56/56}$, $Pss^{32/27}$, $Pss^{32/79}$, $Pss^{32/\#2}$ 와 같이 정낭 내부에 정자가 거의 혹은 아예 없이 비어 있는 정낭은 샘플을 준비하는 과정에서도 정낭의 크기가 작고 밀도가 낮아 PBS 상에서 가라앉지 않고 떠다니는 모습을 보였다. 반면, 야생형이나 $Pss^{32/15}$, $Pss^{32/72}$ 의 것처럼 내부에 정자가 들어있는 정낭은 크기가 크고 밀도가 높아서 PBS 상에서 가라앉았다.

3. Pss trans-heterozygote 수컷의 생식능력

야생형 암컷과 Pss trans-heterozygote의 수컷을 25°C에서 각각 교배한 결과, $Pss^{32/15}$ 수컷을 교배에 사용하였을 때는 자손이 정상적으로 태어났다. 한편, $Pss^{32/27}$, $Pss^{32/79}$, $Pss^{32/\#2}$ 수컷을 교배에 사용하였을 때는 자손이 아예 태어나지 않았다(표 6). 즉, 성숙한 정자가 제대로 만들어지지 못해 정낭에 성숙한 정자가 거의 혹은 아예 저장되지 않는 $Pss^{32/27}$, $Pss^{32/79}$, $Pss^{32/\#2}$ 수컷은 불임이다. 앞서 제 3 절에서 서술하였던 $Pss^{56/56}$

역시 정낭에 성숙한 정자가 아예 저장되어 있지 않고, 불임이다(표 5, 그림 9B-B'). $Pss^{32/72}$ 의 경우 정낭 내부에는 성숙한 정자가 들어있으나(그림 9E-E'), 실제 야생형 암컷과의 교배 결과는 자손이 태어나지 않는 불임인 것으로 나타났다.



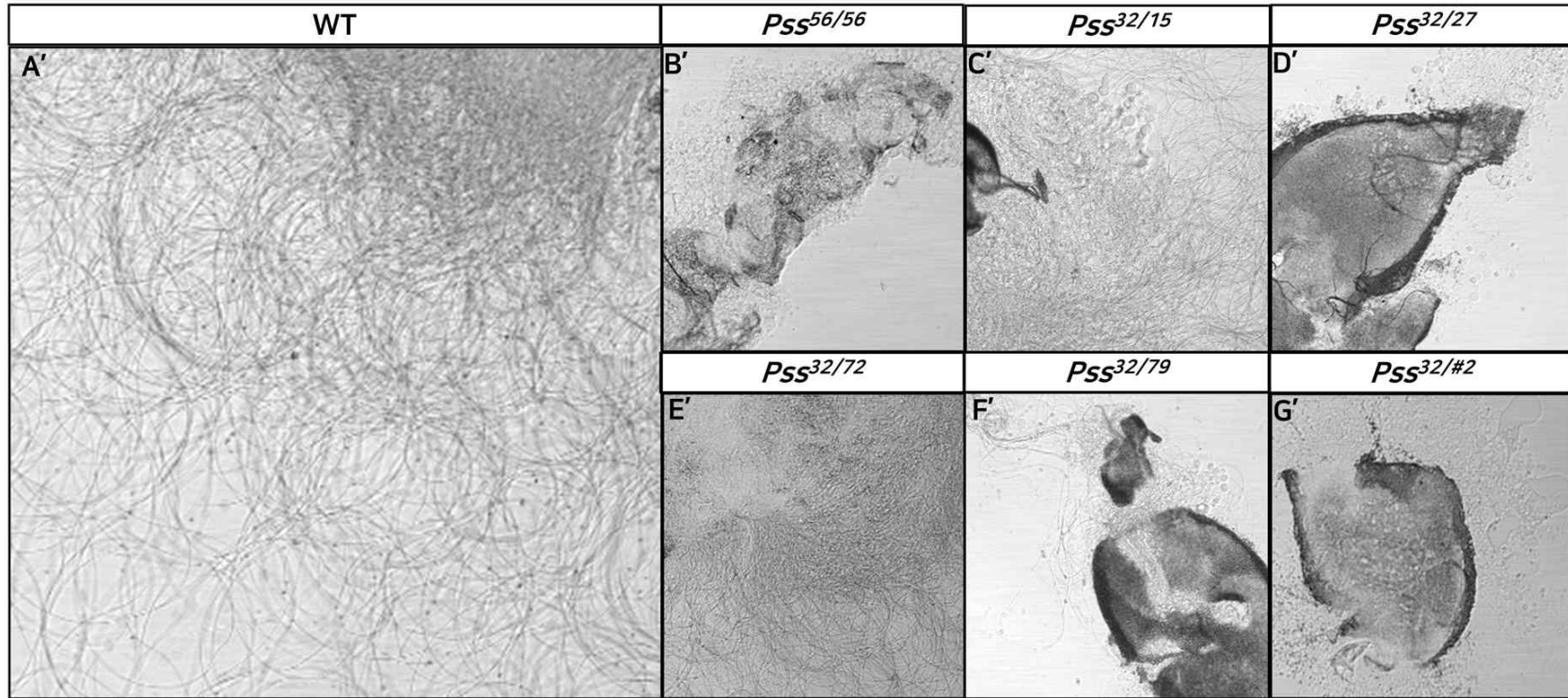


그림 9. $Pss^{56/56}$ 과 Pss trans-heterozygote 수컷 정낭 내부의 성숙한 정자 유무

A, A': 야생형. B, B': $Pss^{56/56}$. C, C': $Pss^{32/15}$. D, D': $Pss^{32/27}$. E, E': $Pss^{32/72}$. F, F': $Pss^{32/79}$. G, G': $Pss^{32/\#2}$. 야생형의 정낭 안에는 성숙한 정자가 가득 차 있고, 정낭을 터뜨리면 내부에 들어있던 성숙한 정자들의 편모가 보인다. $Pss^{32/15}$, $Pss^{32/72}$ 또한 정낭 내부에 성숙한 정자가 들어있다. $Pss^{32/79}$ 는 개체에 따라 정낭 내부에 적은 양의 정자가 들어있거나 혹은 정자가 없이 lipid droplet 같은 방울만 들어있다. $Pss^{56/56}$, $Pss^{32/27}$, $Pss^{32/\#2}$ 는 정낭 내부에 정자가 아예 없고 lipid droplet 같은 방울만 들어있는 텅 빈 정낭을 가지고 있다. Scale bar, $50\mu m$. (n=7)

♀ \ ♂	<i>Pss</i> ^{56/56}	<i>Pss</i> ^{32/15}	<i>Pss</i> ^{32/27}	<i>Pss</i> ^{32/72}	<i>Pss</i> ^{32/79}	<i>Pss</i> ^{32/#2}
생식능력	Sterile	Fertile	Sterile	Sterile	Sterile	Sterile
정자 유무	없음	있음	없음	있음	거의 없음	없음

표 6. *Pss* trans-heterozygote 수컷의 생식능력

Pss trans-heterozygote 수컷과 야생형 암컷을 교배하여 *Pss* trans-heterozygote 수컷의 생식능력을 확인하였다. 성숙한 정자가 제대로 만들어지지 못해 정낭에 성숙한 정자가 저장되지 않는 *Pss*^{32/27}, *Pss*^{32/79}, *Pss*^{32/#2} 수컷은 모두 불임이다. *Pss*^{32/72}의 경우 정낭 내부에는 성숙한 정자가 들어있으나, 교배 결과 자손이 태어나지 않았다.

4. $Pss^{56/56}$ 수컷 정소에서 발생 중인 early round spermatid의 미토콘드리아(nebenkern) 형태

정소 내부에서 일어나는 정자 형성 과정은 생식줄기세포(germline stem cell)에서 만들어진 gonialblast가 체세포분열, 감수분열의 단계를 거쳐 spermatid가 되고, 최종적으로 성숙한 정자가 만들어지는 과정이다 (Sitaram et al., 2014). 이 과정 중 감수분열 이후의 onion stage에 해당하는 early round spermatid에서는 구형의 haploid 핵 근처에 미토콘드리아가 뭉쳐서 핵과 거의 같은 크기로 구형의 nebenkern이라는 구조를 형성한다. Deng et al.(2008)의 선행연구에서 미토콘드리아 fission에 이상이 생긴 *pink1* 돌연변이의 nebenkern은 내부에 공포(vacuole)가 생겼다. 반면, 미토콘드리아 fusion factor인 *Mfn*의 초파리 homologue인 *fzo* 돌연변이는 nebenkern이 구형을 유지하지 못하고 가운데가 갈라져 경계가 생긴 비정상적인 형태를 나타냈다.

$Pss^{56/56}$ 과 $Pss^{32/27}$, $Pss^{32/79}$, $Pss^{32/\#2}$ 에서 나타난 수컷의 불임 및 정낭 내부의 성숙한 정자의 부재와 같은 새로운 표현형이 나타나는 것에 대한 가능한 원인을 정자 형성 과정에서 심층적으로 탐색하기 위해 대표적으로 $Pss^{56/56}$ 의 정자 형성 과정에서의 미토콘드리아 형태 이상 여부를 확인하였다. 해부한 정소에서 onion stage가 있는 level 2 위치를 forcep으로 터뜨려 내부의 세포들을 잘 관찰할 수 있도록 mounting한 후 LSM 880 공초점 현미경으로 관찰하였다. 실험 결과 야생형의 정소에서는 핵과 비슷한 크기의 구형의 nebenkern이 관찰되었으나, $Pss^{56/56}$ 의 정소에서는 nebenkern이 구형을 유지하지 못하고 가운데가 갈라져 경계가 생긴 비정상적인 형태가 나타났다(그림 10). 즉, Deng et al.(2008)의 선행연구에서 fusion factor인 *fzo* 돌연변이와 같은 표현형이 나타난 것이다. 이를 통해 $Pss^{56/56}$ 의 정자 형성 과정에서 미토콘드리아 fusion에 이상이 생겼음을 확인할 수 있다.

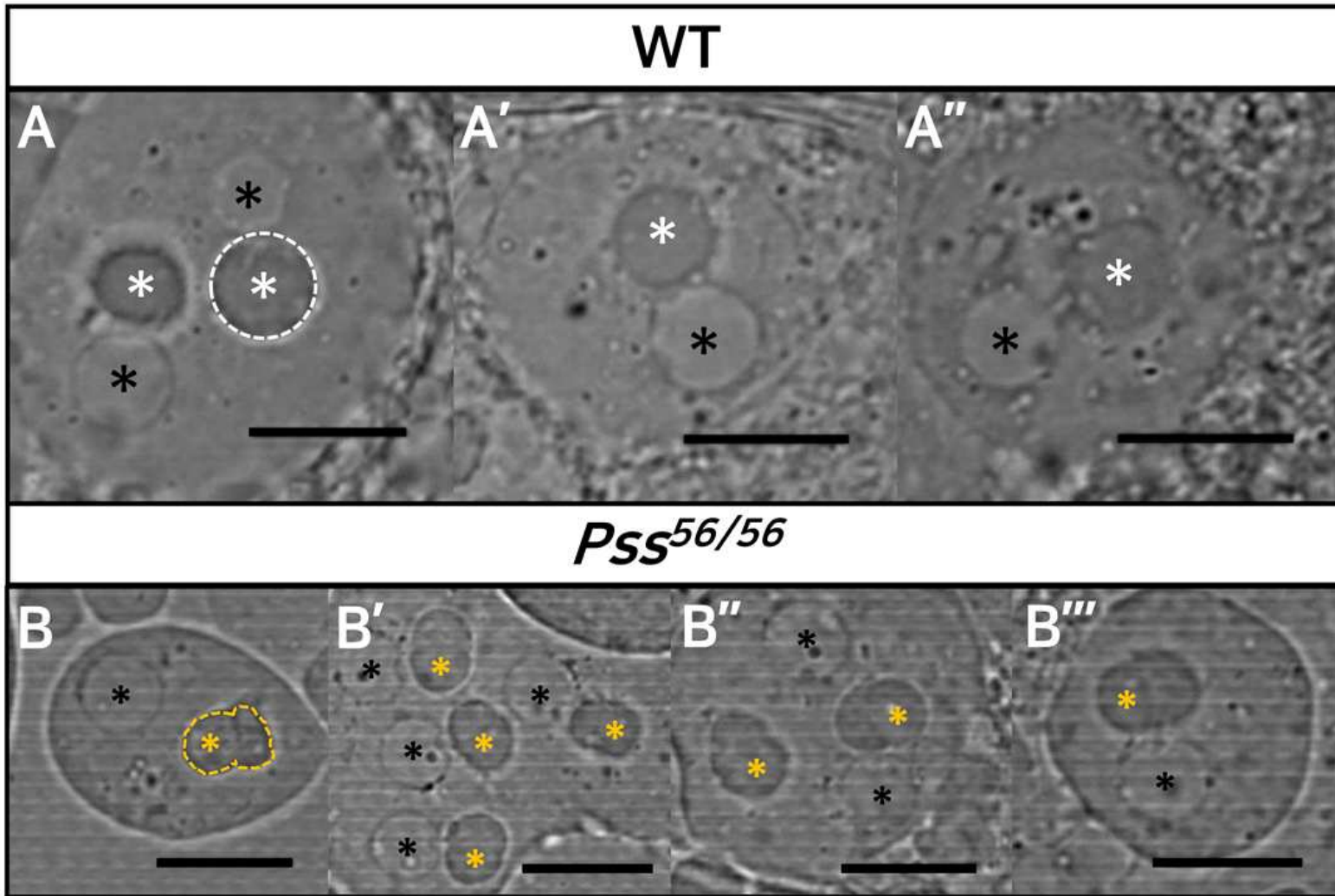


그림 10. 야생형과 $Pss^{56/56}$ 수컷 정소에서 발생 중인 early round spermatid의 미토콘드리아(nebenkern) 형태

A-A'': 야생형의 미토콘드리아(white asterisk). **B-B'''**: $Pss^{56/56}$ 의 미토콘드리아(yellow asterisk). Onion stage에서 나타나는 구형의 haploid 핵은 black asterisk로 표시했다. 야생형의 미토콘드리아(nebenkern)는 구형이나, $Pss^{56/56}$ 의 미토콘드리아는 fusion에 이상이 생겨 nebenkern이 구형을 유지하지 못하고 가운데가 갈라져 경계가 생긴 비정상적인 형태가 나타났다. Scale bar, 10 μ m. (n=4)

제 4 장 고 찰

PS는 세포막을 구성하는 주요 인지질 중 하나로, 초파리에서는 유일한 PS 합성효소인 PSS에 의해 합성된다. 본 연구실의 선행연구 결과에 따르면 PSS를 암호화하는 *Pss*는 신경계의 기능, 미토콘드리아의 형태, 발생, 성장, 온도 저항성 등 다양한 표현형에 영향을 미치는 일종의 다면 발현 유전자(pleiotropic gene)이다(Park et al., 2021; 김관영, 2021; 김하은, 2021; 박반야, 2021; 주현정, 2021). 본 연구에서는 선행연구에서 사용하지 않았던 추가적인 *Pss* 돌연변이 allele들의 heterozygote 및 trans-heterozygote를 활용하여 선행연구에서 확인하였던 신경 퇴행 표현형의 정도를 다양한 *Pss* allele에서 확인하고, *Pss* allele 간의 상호작용 또한 확인하였다. 또한, 기존의 선행연구에서 확인하지 못했던 *Pss* 돌연변이와 관련된 새로운 표현형이 있는지를 연구하였다.

Pss trans-heterozygote의 생존율을 확인한 결과 Pss^{32} , Pss^{15} , Pss^{27} , Pss^{72} , Pss^{79} , $Pss^{\#2}$ 는 모두 homozygous lethal allele이며, Pss^{32} 를 포함하지 않은 교배 결과에서는 trans-heterozygote가 모두 발생 단계에서 치사하여 성체로 우화하지 못함을 확인하였다. 이를 통해 *Pss*는 발생 과정에 중요한 역할을 하는 유전자임을 알 수 있다. *Pss* trans-heterozygote가 치사하지 않고 태어나는 Pss^{32} 를 포함한 교배 결과의 경우에는 모든 조건에서 Pss^{32} 와 Pss^{15} 의 교배 결과 태어나는 trans-heterozygote의 생존율이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다.

Pss heterozygote의 수명, 운동능력, *Pss* 발현량 실험 결과 *Pss* heterozygote의 수명은 야생형과 유의미한 차이가 없거나($Pss^{+/27}$, $Pss^{+/\#2}$) 오히려 증가했다($Pss^{+/32}$, $Pss^{+/15}$, $Pss^{+/72}$, $Pss^{+/79}$). *Pss* heterozygote의 운동능력은 $Pss^{+/15}$ 만 야생형보다 증가했고, 다른 heterozygote는 모두 야생형보다 운동능력이 감소한 것으로 나타났다. *Pss* 발현량은 모든 *Pss* heterozygote가 야생형보다 감소하였다. 종합하

면, 상동염색체 중 한쪽의 *Pss*에만 이상이 있고 다른 한쪽에는 야생형의 정상적인 *Pss* copy를 갖는 *Pss* heterozygote는 신경 퇴행 표현형이 불완전하게 나타났다.

반면, *Pss* trans-heterozygote에서 상동염색체 양쪽의 *Pss*에 모두 이상이 생겼을 때는 수명, 운동능력, 발현량의 모든 측면에서 심각한 신경 퇴행 표현형이 나타났다. *Pss* trans-heterozygote 중에서는 특히 *Pss*^{32/15}와 *Pss*^{32/#2}가 생존율, 수명, 운동능력, 발현량의 모든 실험 결과에서 다른 line에 비해 상대적으로 온화한 표현형을 나타냈다. *Pss*^{32/15}에서의 이러한 결과는 앞서 *Pss* heterozygote의 신경 퇴행 표현형 실험 결과에서 확인한 것처럼 *Pss*¹⁵가 *Pss*의 모든 homozygous lethal allele 중 가장 온화한(mild) 표현형을 나타내는 allele이기 때문일 것으로 해석할 수 있다.

Pss^{32/#2}의 온화한 표현형은 transvection에 의해 해석해 볼 수 있다. Lewis(1954)의 연구에서 *Ubx* allele 중 서로 보완되는 것이 있다는 것이 처음으로 발견된 이후 이들 allele 간의 보완은 한 쪽 상동염색체에 있는 조절 서열이 다른 쪽 상동염색체의 전사 단위의 발현을 조절하는 것으로 설명될 수 있다는 분자적인 연구 결과가 제안되었다(Peifer & Bender, 1986). 이러한 allele들의 상호보완적 현상이 바로 transvection이다. *Pss*³²는 5' UTR에 P-element가 삽입되었고, *Pss*^{#2}는 두 번째 exon의 CRISPR-Cas9 target site에서 14 bp가 제거된 frame shift 돌연변이이다. 따라서 transvection에 의하면 *Pss*^{#2}의 정상적인 5' UTR 부분에 의해 *Pss*³²의 정상적인 exon이 발현되어 allele 간의 보완이 일어날 수 있을 것이다. 그러나 transvection은 일부 유전자에서만 드물게 나타나는 현상이므로, *Pss*^{32/#2}에서 실제로 transvection이 일어났는지를 확인하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

PSS 단백질에 multiple tagging이 된 allele인 *Pss*⁵⁶을 활용하여 뇌에서 Strep-tag II와 PSS 단백질의 발현 패턴을 비교한 결과 성체 뇌의 피질(cortex) 부분인 cell body rind에서 Strep-tag II와 PSS 단백질의 발현 패턴이 겹치는 것을 확인할 수 있었다. Cell body rind는 신경세포체가 신경교세포의 식세포작용에 의해 제거되는 지역이다(Cantera &

Technau, 1996). 초파리에서는 신경교세포의 한 종류인 cortex glia가 신경세포체를 감싸고 있어 신경세포를 지지하고, 영양 공급 및 면역 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Freeman, 2015). 즉, cell body rind는 cortex glia가 분포해 있는 지역임을 알 수 있고, 이는 cortex glia 특이적으로 *Pss* 발현을 억제하였을 때 발생 단계에 이상이 생기는 것을 확인한 본 연구실의 선행연구 결과(박반야, 2021)와도 연관이 있다. 특히, cell body rind 중에서도 성체 뇌의 위쪽에 있는 SLP (superior lateral protocerebrum), LH (lateral horn)와 인접한 지역인 rSLPd (dorsal to SLP), rLHd (dorsal to LH)에서 PSS 단백질의 발현 패턴이 강하게 나타났다(Ito et al., 2014). 곤충의 뇌에서 superior protocerebrum은 후각 학습과 기억에 관여하는 mushroom body의 뉴런이 central complex와 간접적으로 연결되는 것에 관련되어 곤충의 행동을 결정하는 데 중요하다(Li & Strausfeld, 1997, 1999). Lateral horn 역시 mushroom body와 연관되어 있고, 후각 및 선천적 행동(innate behaviour)에 관여한다(Dolan et al., 2019). 따라서 *Pss* 돌연변이 allele에서 mushroom body와 연관된 후각 학습 및 행동의 변화를 심층적으로 확인할 필요성이 있다.

*Pss*⁵⁶을 다른 *Pss* homozygous lethal allele과 교배했을 때 태어난 trans-heterozygote의 생존율이 모두 100%에 가까운 것으로 나타났다. 또한, 다른 *Pss* allele들은 homozygous lethal allele인 반면, *Pss*⁵⁶은 homozygous viable allele이다. 이를 통해 *Pss*⁵⁶ allele은 초파리의 발생 과정과 생존율에는 큰 영향을 주지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 *Pss*⁵⁶이 기존 *Pss*의 exon이나 조절부위가 망가진 것이 아니라, 인공적인 exon을 가지는 전이인자를 첫 번째 intron에 적절한 reading frame이 되도록 삽입한 allele이므로 덜 치명적이기 때문일 것이라 해석할 수 있다.

그러나 *Pss*^{56/56}에서 수컷의 불임이라는 기존에 알려지지 않았던 새로운 표현형이 발견되었고, 이러한 표현형은 *Pss*^{32/27}, *Pss*^{32/72}, *Pss*^{32/79}, *Pss*^{32/#2}와 같은 다른 *Pss* trans-heterozygote에서도 공통적으로 나타났다. PS는 정자와 난자의 수정 과정, 정자의 질 등에 관여하며 생식능력

과 연관이 있다는 여러 선행 연구 결과에 의해 수컷의 불임과 *Pss* 돌연변이 사이의 연관성을 파악할 수 있다(de Vantéry Arrighi et al., 2009; Kotwicka et al., 2011; Rival et al., 2019). 수컷의 불임이 나타난 line 중 *Pss*^{56/56}, *Pss*^{32/27}, *Pss*^{32/79}, *Pss*^{32/#2}는 모두 정낭 내부에 성숙한 정자가 아예 혹은 거의 저장되어 있지 않았기 때문에 정자 형성 과정에서 이상이 생겼을 것이라 추측할 수 있다. 한편, *Pss*^{32/72}의 경우 정낭 내부에는 성숙한 정자가 들어있으나, 실제 교배 결과는 자손이 태어나지 않는 불임인 것으로 나타났다. 따라서 *Pss*^{32/72}의 경우 편모가 있는 성숙한 정자가 만들어지기는 했지만 정자의 운동성, 수정 과정, 배아 단계에서의 치사 등 정자 형성 이후의 과정에서 문제가 생겼을 것이라 추측된다.

Pss 돌연변이 allele에서 수컷의 불임이 발생한 가능한 원인 중 하나로는 *Pss*^{56/56}에서 나타난 정소 내부에서 발생 중인 early round spermatid의 미토콘드리아(nebenkern)의 형태 이상을 제시할 수 있을 것이다. *Pss*^{56/56}에서는 미토콘드리아 dynamics 중 특히 fusion의 이상으로 과하게 분열된 형태의 미토콘드리아가 나타났다. 소포체에서 PSS에 의해 합성된 PS는 MAM을 통해 미토콘드리아로 전달되어 PISD에 의해 PE로 전환된다. PE는 미토콘드리아 내막의 안정성 및 미토콘드리아의 기능에 관여한다(Choi et al., 2005; Schenkel & Bakovic, 2014; Tamura et al., 2012; Vance, 2014; Baker et al., 2016). 또한, PE를 합성하는 PISD는 미토콘드리아 fusion을 촉진하고(Chan & McQuibban, 2012), PA와 CL(cardiolipin)은 미토콘드리아 dynamics에 관여하며(Kameoka et al., 2018), 인지질의 생합성은 미토콘드리아 fusion, division, mitophagy와 관련이 있다(Zhang et al., 2014)는 여러 선행연구 또한 인지질과 미토콘드리아 dynamics 사이의 연관성을 제시하고 있다. 따라서 *Pss* 돌연변이에 의한 PS 합성에 이상이 생기면 PE 합성에도 이상이 생기고, 인지질 조성 변화에 의해 미토콘드리아의 dynamics 이상에 따른 형태 및 기능 이상이 나타날 수 있을 것이라 해석할 수 있다.

최근 초파리에서 미토콘드리아 dynamics에 이상이 생기면 수컷의 생식능력에 영향을 준다는 연구 결과가 제시되었다(Demarco et al., 2019;

Demarco & Jones, 2019). 따라서 수컷의 불임이 나타난 다른 *Pss* trans-heterozygote에서도 미토콘드리아 dynamics 및 정자 형성 과정에서의 이상을 확인할 필요가 있다. 또한, *Pss* allele과 trans-heterozygote 중 일부 line에서만 수컷의 불임이 나타난 이유를 각 allele의 특징 및 allele 간 상호작용을 고려하여 심층적으로 연구할 필요가 있을 것이다.

참 고 문 헌

- Arikketh, D., Nelson, R., & Vance, J. E. (2008). Defining the importance of phosphatidylserine synthase-1 (PSS1): unexpected viability of PSS1-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 12888-12897.
- Baker, C. D., Basu Ball, W., Pryce, E. N., & Gohil, V. M. (2016). Specific requirements of nonbilayer phospholipids in mitochondrial respiratory chain function and formation. *Molecular biology of the cell*, 27(14), 2161-2171.
- Baumeister, J., Barthel, T., Geiss, K. R., & Weiss, M. (2008). Influence of phosphatidylserine on cognitive performance and cortical activity after induced stress. *Nutritional neuroscience*, 11(3), 103-110.
- Bergo, M. O., Gavino, B. J., Steenbergen, R., Sturbois, B., Parlow, A. F., Sanan, D. A., ... & Young, S. G. (2002). Defining the importance of phosphatidylserine synthase 2 in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47701-47708.
- Cantera, R., & Technau, G. M. (1996). Glial cells phagocytose neuronal debris during the metamorphosis of the central nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Development genes and evolution*, 206(4), 277-280.
- Chan, E. Y., & McQuibban, G. A. (2012). Phosphatidylserine decarboxylase 1 (Psd1) promotes mitochondrial fusion by regulating the biophysical properties of the mitochondrial membrane and alternative topogenesis of mitochondrial genome maintenance protein 1 (Mgm1). *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40131-40139.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., &

- Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology*, 160(2), 189–200.
- Choi, J. Y., Wu, W. I., & Voelker, D. R. (2005). Phosphatidylserine decarboxylases as genetic and biochemical tools for studying phospholipid traffic. *Analytical biochemistry*, 347(2), 165–175.
- Cipolat, S., de Brito, O. M., Dal Zilio, B., & Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45), 15927–15932.
- Crook, T. H., Petrie, W., Wells, C., & Massari, D. C. (1992). Effects of phosphatidylserine in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology Bulletin*.
- de Vantéry Arrighi, C., Lucas, H., Chardonnens, D., & De Agostini, A. (2009). Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(1), 1–12.
- Demarco, R. S., & Jones, D. L. (2019). Mitochondrial fission regulates germ cell differentiation by suppressing ROS-mediated activation of Epidermal Growth Factor Signaling in the *Drosophila* larval testis. *Scientific reports*, 9(1), 1–10.
- Demarco, R. S., Uyemura, B. S., D'Alterio, C., & Jones, D. L. (2019). Mitochondrial fusion regulates lipid homeostasis and stem cell maintenance in the *Drosophila* testis. *Nature cell biology*, 21(6), 710–720.
- Deng, H., Dodson, M. W., Huang, H., & Guo, M. (2008). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote

- mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14503–14508.
- Dennis, E. A., & Kennedy, E. P. (1972). Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *Journal of lipid research*, 13(2), 263–267.
- Dolan, M. J., Frechter, S., Bates, A. S., Dan, C., Huoviala, P., Roberts, R. J., ... & Jefferis, G. S. (2019). Neurogenetic dissection of the *Drosophila* lateral horn reveals major outputs, diverse behavioural functions, and interactions with the mushroom body. *Elife*, 8, e43079.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L., & Henson, P. M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death & Differentiation*, 5(7), 551–562.
- Farooqui, A. A., Ong, W. Y., & Horrocks, L. A. (2004). Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A 2. *Neurochemical research*, 29(11), 1961–1977.
- Freeman, M. R. (2015). *Drosophila* central nervous system glia. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(11), a020552.
- Garcez, M., Branco-Santos, J., Gracio, P. C., & Homem, C. C. (2021). Mitochondrial Dynamics in the *Drosophila* Ovary Regulates Germ Stem Cell Number, Cell Fate, and Female Fertility. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 1633.
- Heiss, W. D., Kessler, J., Mielke, R., Szelies, B., & Herholz, K. (1994). Long-term effects of phosphatidylserine, pyritinol, and cognitive training in Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 5(2), 88–98.

- Irvine, G. B., El-Agnaf, O. M., Shankar, G. M., & Walsh, D. M. (2008). Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Molecular medicine*, 14(7), 451-464.
- Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, J. D., Boyan, G., Hartenstein, V., ... & Insect Brain Name Working Group. (2014). A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron*, 81(4), 755-765.
- Kameoka, S., Adachi, Y., Okamoto, K., Iijima, M., & Sesaki, H. (2018). Phosphatidic acid and cardiolipin coordinate mitochondrial dynamics. *Trends in cell biology*, 28(1), 67-76.
- Kim, H. Y., Huang, B. X., & Spector, A. A. (2014). Phosphatidylserine in the brain: metabolism and function. *Progress in lipid research*, 56, 1-18.
- Kotwicka, M., Jendraszak, M., & Jedrzejczak, P. (2011). Phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: topography in membrane domains and relation to cell vitality. *The Journal of membrane biology*, 240(3), 165-170.
- Lewis, E. B. (1954). The theory and application of a new method of detecting chromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*. *The American Naturalist*, 88(841), 225-239.
- Li, Y., & Strausfeld, N. J. (1997). Morphology and sensory modality of mushroom body extrinsic neurons in the brain of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of Comparative Neurology*, 387(4), 631-650.
- Li, Y., & Strausfeld, N. J. (1999). Multimodal efferent and recurrent neurons in the medial lobes of cockroach mushroom bodies. *Journal of Comparative Neurology*, 409(4), 647-663.

- Li, Z., Zhang, J., & Sun, H. (2015). Increased plasma levels of phospholipid in Parkinson's disease with mild cognitive impairment. *Journal of Clinical Neuroscience*, 22(8), 1268–1271.
- Liu, S. H., Chang, C. D., Chen, P. H., Su, J. R., Chen, C. C., & Chaung, H. C. (2012). Docosahexaenoic acid and phosphatidylserine supplementations improve antioxidant activities and cognitive functions of the developing brain on pentylenetetrazol-induced seizure model. *Brain research*, 1451, 19–26.
- Lowe, N., Rees, J. S., Roote, J., Ryder, E., Armean, I. M., Johnson, G., ... & St Johnston, D. (2014). Analysis of the expression patterns, subcellular localisations and interaction partners of *Drosophila* proteins using a pigP protein trap library. *Development*, 141(20), 3994–4005.
- Mishra, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *Journal of Cell Biology*, 212(4), 379–387.
- Naftelberg, S., Abramovitch, Z., Gluska, S., Yannai, S., Joshi, Y., Donyo, M., ... & Ast, G. (2016). Phosphatidylserine ameliorates neurodegenerative symptoms and enhances axonal transport in a mouse model of familial dysautonomia. *PLoS genetics*, 12(12), e1006486.
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148(6), 1145–1159.
- O'Brien, J. S., & Sampson, E. L. (1965). Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *Journal of lipid research*, 6(4), 537–544.
- Park, Y. J., Kim, S., Shim, H. P., Park, J. H., Lee, G., Kim, T. Y., ... & Jeon, S. H. (2021). Phosphatidylserine synthase plays an

- essential role in glia and affects development, as well as the maintenance of neuronal function. *Isience*, 24(8), 102899.
- Pavlidis, P., Ramaswami, M., & Tanouye, M. A. (1994). The *Drosophila* easily shocked gene: a mutation in a phospholipid synthetic pathway causes seizure, neuronal failure, and paralysis. *Cell*, 79(1), 23-33.
- Peifer, M., & Bender, W. (1986). The anterobithorax and bithorax mutations of the bithorax complex. *The EMBO journal*, 5(9), 2293-2303.
- Pettegrew, J. W., Panchalingam, K., Hamilton, R. L., & McClure, R. J. (2001). Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochemical research*, 26(7), 771-782.
- Ravi Ram, K., & Wolfner, M. F. (2007). Seminal influences: *Drosophila* Acps and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integrative and comparative biology*, 47(3), 427-445.
- Ravichandran, K. S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1807-1817.
- Remy, P., Doder, M., Lees, A., Turjanski, N., & Brooks, D. (2005). Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*, 128(6), 1314-1322.
- Rival, C. M., Xu, W., Shankman, L. S., Morioka, S., Arandjelovic, S., Lee, C. S., ... & Ravichandran, K. S. (2019). Phosphatidylserine on viable sperm and phagocytic machinery in oocytes regulate mammalian fertilization. *Nature communications*, 10(1), 1-13.
- Sastry, P. S. (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Progress in lipid research*, 24(2), 69-176.

- Schenkel, L. C., & Bakovic, M. (2014). Formation and regulation of mitochondrial membranes. *International journal of cell biology*, 2014.
- Seidel, C., Schnekenburger, M., Dicato, M., & Diederich, M. (2015). Histone deacetylase 6 in health and disease. *Epigenomics*, 7(1), 103-118.
- Sitaram, P., Hainline, S. G., & Lee, L. A. (2014). Cytological analysis of spermatogenesis: live and fixed preparations of *Drosophila* testes. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (83).
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L., & Van Der Blik, A. M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*, 12(8), 2245-2256.
- Soulavie, F., Piepenbrock, D., Thomas, J., Vieillard, J., Duteyrat, J. L., Cortier, E., ... & Durand, B. (2014). hemingway is required for sperm flagella assembly and ciliary motility in *Drosophila*. *Molecular biology of the cell*, 25(8), 1276-1286.
- Stone, S. J., & Vance, J. E. (2000). Phosphatidylserine synthase-1 and-2 are localized to mitochondria-associated membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34534-34540.
- Tamura, Y., Onguka, O., Itoh, K., Endo, T., Iijima, M., Claypool, S. M., & Sesaki, H. (2012). Phosphatidylethanolamine biosynthesis in mitochondria: phosphatidylserine (PS) trafficking is independent of a PS decarboxylase and intermembrane space proteins UPS1P and UPS2P. *Journal of Biological Chemistry*, 287(52), 43961-43971.
- Valadas, J. S., Esposito, G., Vandekerckhove, D., Miskiewicz, K., Deaulmerie, L., Raitano, S., ... & Verstreken, P. (2018). ER lipid defects in neuropeptidergic neurons impair sleep patterns

- in Parkinson's disease. *Neuron*, 98(6), 1155–1169.
- Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(2), 112–124.
- Vance, J. E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(4), 595–609.
- Vance, J. E., & Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in lipid research*, 44(4), 207–234.
- Wang, S., Zhang, S., Liou, L. C., Ren, Q., Zhang, Z., Caldwell, G. A., ... & Witt, S. N. (2014). Phosphatidylethanolamine deficiency disrupts α -synuclein homeostasis in yeast and worm models of Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(38), E3976–E3985.
- Wenk, M. R., & De Camilli, P. (2004). Protein–lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(22), 8262–8269.
- Williams, D., Vicôgne, J., Zaitseva, I., McLaughlin, S., & Pessin, J. E. (2009). Evidence that electrostatic interactions between vesicle-associated membrane protein 2 and acidic phospholipids may modulate the fusion of transport vesicles with the plasma membrane. *Molecular biology of the cell*, 20(23), 4910–4919.
- Yang, X., Liang, J., Ding, L., Li, X., Lam, S. M., Shui, G., ... & Huang, X. (2019). Phosphatidylserine synthase regulates cellular homeostasis through distinct metabolic mechanisms. *PLoS genetics*, 15(12), e1008548.

- Zhang, Q., Tamura, Y., Roy, M., Adachi, Y., Iijima, M., & Sesaki, H. (2014). Biosynthesis and roles of phospholipids in mitochondrial fusion, division and mitophagy. *Cellular and molecular life sciences*, 71(19), 3767–3778.
- 김관영. (2021). 초파리 배아 및 유충 발생 시기에 나타나는 *Pss* 유전자 돌연변이 표현형에 관한 연구. 석사학위논문, 서울대학교, 서울
- 김하은. (2021). Effects of Mutation in Genes Encoding Phospholipid Biosynthetic Enzymes in *Drosophila* Mitochondrial Morphology. 석사학위논문, 서울대학교, 서울
- 박반야. (2021). Cortex glia에서 초파리 *Pss* 유전자 돌연변이에 관한 연구. 석사학위논문, 서울대학교, 서울
- 주현정. (2021). *Pss* 돌연변이가 저온 스트레스 저항에 미치는 영향. 석사학위논문, 서울대학교, 서울

Abstract

Interaction and Characteristics of *Drosophila Pss* Alleles

Jiwon Yeo

Department of Science Education

Biology Major

The Graduate School

Seoul National University

Phosphatidylserine (PS) is one of the major phospholipids in the cell membrane. PS is involved in the maintenance and growth of neurons, as well as the movement and activation of signaling proteins, which is important for synapse formation. PS is synthesized by PSS, *Drosophila's* only PS synthase, and the *Pss*, which encodes PSS, is a pleiotropic gene that affects various phenotypes in addition to neurodegenerative phenotypes when mutations occur. The purpose of this study is to confirm the allelic interaction and characteristics of *Pss* alleles. For this study, heterozygotes and trans-heterozygotes of the six *Pss* homozygous lethal alleles were used. As a result of the study, more severe neurodegenerative phenotypes were found in *Pss* trans-heterozygotes compared to *Pss* heterozygotes. *Pss*^{32/15} and *Pss*^{32/#2} showed relatively mild phenotypes among trans-heterozygotes,

whereas $Pss^{32/27}$, $Pss^{32/72}$, and $Pss^{32/79}$ showed severe phenotypes. The allelic interaction was confirmed by comparing the degree of the phenotypes. In addition, a new phenotype of male sterility was found in $Pss^{56/56}$ and some Pss trans-heterozygotes. Abnormality of mitochondrial fusion was observed during spermatogenesis in $Pss^{56/56}$, and this result shows mitochondrial dynamics might be one of the reasons of male sterility. This study demonstrates the allelic interaction of Pss depending on the degree of neurodegenerative phenotypes, and first proposed a possibility of Pss mutation as one cause of the male sterility.

Keywords : Phospholipid, Phosphatidylserine (PS),
Phosphatidylserine synthase (PSS), Allelic interaction,
Neurodegenerative disease, Male sterility

Student Number : 2020-23312