creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

이학석사학위논문

효모의 자가포식에서 Sit4 단백질 탈인산화효소의 기능 연구

Study on the roles of Sit4 protein phosphatase on autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*

2022년 2월

서울대학교 대학원

생명과학부

남 한 열

효모의 자가포식에서 Sit4 단백질 탈인산화효소의 기능 연구

Study on the roles of Sit4 protein phosphatase on autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*

지도교수 허 원 기

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2021년 12월

서울대학교 대학원

생명과학부

남 한 열

남한열의 이학석사 학위논문을 인준함

2021년 12월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

초록

효모의 자가포식에서 Sit4 단백질 탈인산화효소의 기능 연구

남 한 열
서울대학교 대학원
생명과학부

자가포식은 세포 내 물질(세포 소기관, 병원체 등)을 액포(효모와 식물) 혹은 리소좀(동물)으로 이동, 분해하는 기작이다. 이는 영양 결핍 조건 시에 구성 성분의 일부를 분해하여 호흡 활동과 같이 필수적인 생명 활동을 유지하는 기작에 필수 물질을 제공한다. 또한 세포 내에 불필요하거나 세포에 악영향을 미치는 요소들(병원균 등)을 제거한다. 이러한 자가포식은 효모부터 동물, 인간까지 다양한 진핵생물 내에 보존되어 있으며, 이는 자가포식이 정상적인 생명 활동 유지에 중요한 기작임을 시사한다. 그리고 이러한 자가포식은 노화, 선천성 면역, 신경 퇴행성 질환, 암 등의 주요 원인으로 지목되고 있다. 자가포식은 수많은 연구들에 의해 다양한 인산화효소와 탈인산화효소에 의해 통제된다는 것이 밝혀졌다. 하지만 여전히 자가포식의 기전 속에서 발생하는 분자생물학적 작

용들을 설명하기에는 부족하며, 특히 탈인산화효소의 종류와 기능, 작용 기작에 대해서 알려진 것이 부족하기에 이에 대한 연구는 필요하다. 본 연구에서는 자가포식에 관여하는 다양한 탈인산화효소가 존재할 가능성을 바탕으로 이를 연구하고자 실험을 진행하였다. 우선 단백질 탈인산화효소 유전자를 각각 제거한 35개 효모를 활용하여 스크리닝 실험을 진행하였다. 자가포식 활성도(autophagy flux)를 측정하는 GFP 가공 분석을 이용한 스크리닝 실험으로 8개의 효모가 자가포식 활성도가 감소한 경향이 있는 것을 식별하였다. 이 중 3개는 기존 연구를 통해 자가포식에 관여한다고 알려진 단백질 탈인산화효소였다. 나머지 5개의 후보군에 대해 추가 검증을 위해 15, 24시간의 영양 결핍 조건 실험을 통해 Sit4 단백질 탈인산화효소가 제거된 효모가 정상 효모에 비해 지속적으로 유의미한 자가포식 감소 경향을 보이는 것을 확인하였다. Sit4는 효모 뿐만 아니라 사람(PPP6C)을 포함한 전반적인 진핵생물에 그 구조와 기능이 보존되어 있는 PP2A-related serine-threonine 단백질 탈인산화효소이다. 최근까지의 연구들에 의해서 Sit4는 세포 주기 진행, 질소 물질 대사 등 다양한 기작에 관여한다고 알려져 있다. 하지만 Sit4와 자가포식과의 직접적인 연관성은 모호하였으며, 본 실험 결과를 고려하였을 때 Sit4와 자가포식의 연관성을 규명하는 것이 필요할 것으로 사료되었다. 이와 함께 Sit4와 상호작용하는 단백질을 추가로 스크리닝 실험을 진행하여 Sap4 또한 영양 결핍 조건에서 자가포식 활성이 감소하 것을 확인하였다. 하여 Sit4와 Sap4의 자가포식과의 연관성을 규명하기 위한 추가 실험을 진행하였다. 특정 세포 소기관만을 분해하는 선택적 자가포식(selective autophagy)에 대한 영향을 확인하였으며, 이후 자가포식의 기작 내 핵심 구성 요소에 대한 *SIT4*와 *SAP4* 제거의 영향을 확인하였다. 실험 결과 *SIT4* 유전자 제거 효모에서

Atg8 단백질 발현과 *ATG8* mRNA가 감소하는 것을 관찰하였다. 그리고 Atg1, Atg13 인산화와 *ATG1* mRNA가 감소하는 것을 관찰하였다. 또한 Gln3의 핵 내 이동 경향을 확인하였을 때 *SIT4*, *SAP4* 제거 효모 모두에서 유의미하게 Gln3의 핵 내 이동이 감소하는 것을 확인하였다. 일련의 실험 결과를 통해 영양 결핍 조건에서 Sit4는 Atg8의 전사 수준부터 단백질 발현, Atg1의 전사 수준, Atg1, Atg13의 인산화에 영향을 주며, Gln3의 핵 내 이동을 조절하는 다양한 생리학적 역할을 통해 자가포식을 조절하는 positive regulator임을 확인하였다. 이와 더불어 *SIT4* 제거에 의한 자가포식 감소가 *SAP4* 제거에 비해 그 영향이 더 큰 것과 Sap4는 Sit4와 복합체를 형성한다는 기존 연구 결과로 미루어 볼 때 Sap4는 Sit4의 효소 활성도를 조절하는 positive factor로 작용할 것으로 사료된다.

본 연구는 기존에 밝혀지지 않았던 Sit4와 Sap4의 자가포식과의 직접적인 연관성을 밝혔으며, 나아가 자가포식의 positive regulator로써 역할을 수행함을 규명하였다. 이러한 자가포식 조절에 대한 연구는 면역, 노화, 신경퇴행성 질환, 암 등과 같이 자가포식과 관련되어 있다고 알려진 생명 현상, 질병에 대한 정확한 이해를 가능하게 한다. 그리고 나아가 관련 질병의 치료 접근법에 다양한 관점을 제시하여 질병 치료에 더 다가가는 기반을 마련할 수 있다는 점에서 의의가 있다.

주요어 : 효모, 자가포식, 탈인산화효소, Sit4, Sap4, Western blot, GFP 가공분석, Pho8Δ60 분석
학 번 : 2020-24228

목 차

초 록 ····· i

목 차 ····· ii

그림 & 목차 ····· iii

Ⅰ. 서 론 ····· 1

1. 자가포식 ····· 2
2. 효모의 단백질 탈인산화효소 ····· 3
3. 자가포식과 탈인산화효소의 연관성 ····· 4
4. Sit4 단백질 탈인산화효소와 Sap4 단백질 ····· 5

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 6

Ⅲ. 결 과 ····· 15

1. 단백질 탈인산화효소 스크리닝 ····· 16
2. *SIT4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소 ····· 18
3. *SAP4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소 ····· 24
4. *SIT4, SAP4* 제거 효모의 선택적 자가포식 활성 감소 ·· 29
5. *SIT4* 보완에 의한 자가포식 활성 회복 ····· 35

6. *SIT4*, *SAP4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소 원인 규명 ····· 38

Ⅳ. 논의 ····· 50

참고문헌 ····· 54

Abstract ····· 56

표 목 차

[표 1] ····· 12
[표 2] ····· 13
[표 3] ····· 14

그 림 목 차

[그림 1] ····· 17
[그림 2A] ····· 20
[그림 2B] ····· 22
[그림 3A] ····· 25
[그림 3B] ····· 27
[그림 4] ····· 31
[그림 5] ····· 36
[그림 6.1] ····· 40
[그림 6.2] ····· 43
[그림 6.3] ····· 46
[그림 6.4] ····· 48

Ⅰ. 서 론

1. 자가포식

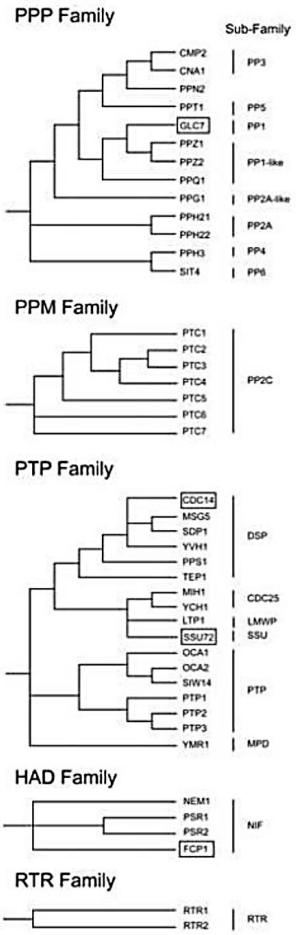
자가포식은 세포 내 물질(세포 소기관, 병원체 등)을 phagophore라 부르는 이중막 구조를 통해 감싸 액포(효모와 식물) 혹은 리소좀(동물)으로 운송하여 분해하는 기작이다. 이러한 기작은 영양 결핍 조건에서 세포 구성 성분 일부를 분해하여 호흡 활동과 같이 필수적인 생명 활동을 유지하는데 필요한 물질(단백질 등)을 제공한다. 또한 세포 내에 불필요하거나 세포에 악영향을 미치는 요소(병원균 등)를 제거하는 등의 기능을 수행하는 기작이다.

이러한 자가포식은 거대자가포식(macroautophagy)과 미세자가포식(microautophagy), 샤페론 매개 자가포식(chaperone-mediated autophagy)으로 분류된다. 가장 잘 알려지고 표준이 되는 자가포식은 거대자가포식이다. 여기에 더해 자가포식은 영양 결핍 등의 자가포식 유도 조건에서 무작위하게 세포 내 물질을 감싸 분해하는 대규모 자가포식 또는 비선택적 자가포식(bulk autophagy or non-selective autophagy)과 선택적으로 세포 내 구성물질(세포 소기관 등)을 분해하는 선택적 자가포식 (selective autophagy)으로 나뉜다. 본 연구는 통상적인 영양 결핍 조건에서 발생한 자가포식 기작에 영향을 주는 요인에 대해 연구하고자 하였다. 이에 따라 거대자가포식 중에 세포질 내 전반적인 물질에 대해 비선택적으로 분해하는 비선택적 자가포식(이하 자가포식)을 중점으로 연구를 진행하였다.

자가포식 기작의 구성 요소와 기능은 효모부터 동물, 인간까지 다양한 진핵생물 내에 잘 보존되어 있다. 이러한 맥락에서 자가포식은 세포의 항상성을 유지하는데 중요한 기능을 수행하는 기작임을 시사한다. 그리고 이러한 중요성은 자가포식이 노화, 선천성 면역, 신경 퇴행성 질환, 암 발생과 악화 등의 수많은 질환의 주요 원인 혹은 깊은 연관성이 있는 것으로 지목되고 있다는 점에서 그 정도가 더욱이 부각된다.

2. 효모의 단백질 탈인산화효소

효모 내에는 43개의 단백질 탈인산화효소가 존재한다고 알려져 있다. 이들은 생화학적 특성에 따라 다섯 가지 과(family)로 분류된다. PPP (13개의 탈인산화효소), phosphoprotein phosphatase; PPM(7개의 탈인산화효소), phosphoprotein phosphatase metal dependent: PTP(17개의 탈인산화효소), phoshpotyrosine phosphatase; HAD(4개의 탈인산화효소), haloacid dehalogenase, RTR(2개의 탈인산화효소); regulator of transcription)



3. 자가포식과 탈인산화효소의 연관성

생명체 내에서 발생하는 기작은 유전자의 전사부터 전사 후, 번역, 번역 후 등 다양한 단계와 요인을 통해 정밀하게 통제된다. 자가포식 또한 예외가 아니며 이를 통제하는 다양한 단계와 요인이 지속적으로 연구되고 있다. 중요한 통제 방법 중 하나가 인산화와 탈인산화이다. 현재까지 자가포식의 여러 단계에 관여하는 수많은 요소들이 인산화효소와 탈인산화효소에 의해 번역 후 변형(post-translational modification)을 거쳐 기능을 수행한다고 보고되었다. 이 중 Atg1, Vps34 (Vacuolar protein sorting 34) 등과 같이 자가포식에 필수적인 인산화효소뿐만 아니라 이외의 다양한 인산화/탈인산화효소가 자가포식의 진행이나 효율에 영향을 준다는 것이 밝혀졌다. 하지만 자가포식에 영향을 주는 인산화효소에 비해 탈인산화효소 종류와 기능은 알려진 바가 적다. 가령, Atg13 탈인산화에 관여하는 탈인산화효소가 정확하게 알려지지 않은 것이 그 예이다. 영양분이 풍부한 조건에서 Atg13은 TORC1에 의해 과인산화되어 Atg1, Atg17 등과의 복합체 형성이 저해된다. 영양분이 부족으로 자가포식이 유도되면 TORC1은 비활성 상태가 된다. 이에 따라 Atg13의 탈인산화가 진행되며, Atg1, Atg17 등과의 복합체를 형성하고, Atg8, Atg12, Atg9 등 다양한 자가포식 관련 복합체 등의 결합하여 일종의 자가포식포 핵을 형성(nucleation)되며 자가포식이 개시된다. 이렇게 자가포식에 영향을 주지만 아직 밝혀지지 않은 단백질 탈인산화효소의 종류와 그 기능에 대해서 연구하는 것은 자가포식 기작을 이해하는데 있어서 중요하다.

4. Sit4 단백질 탈인산화효소와 Sap4 단백질

Sit4 단백질 탈인산화효소(이하 Sit4)는 효모 뿐 아니라 사람(PPP6C) 등 전반적인 진핵생물에 그 구조와 기능이 보존되어 있는 PP2A-related serine-threonine이다. 최근까지의 연구들에 의해서 Sit4는 다양한 생물학적 기작에 관여한다고 알려져 있다. 또한 Sit4의 기능은 다양한 단백질과의 상호작용을 통해 수행될 것이라 예상된다.

Sit4는 *CLN1*과 *CLN2* G1-cyclins, *SWI4* 유전자 발현에 필요하다고 알려져 있으며, *SIT4* 제거 효모에서는 성장이 느린 표현형이 나타나는 등 세포 주기 진행과 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 기능은 SAPs (Sit4-associated proteins)인 Sap4, Sap155, Sap185, Sap190과 복합체 형성을 통해 수행된다고 알려져 있다. 또한 Sit4는 ceramid e signaling에도 관여한다고 알려져 있으며, 이러한 연유로 Sit4는 CAPP (Ceramide-activated protein phosphatase)라고도 불린다. ceramide signaling 조절에서 Sit4는 PP2A 단백질 탈인산화효소와 마찬가지로 Tpd3, Cdc55와 함께 이종 삼량체(heterotrimeric complex)를 형성하여 그 기능을 수행한다. 또한 Sit4는 TORC1 signaling pathway에 관여한다. 영양 결핍 조건 등에 의해 TORC1이 비활성되면 Tap42와 복합체 상태로 TORC1에 결합, 인산화로 인해 비활성 되어있던 Sit4는 복합체가 해체되며 탈인산화, 활성을 띄게 된다. 이렇게 활성화된 Sit4는 세포질 내에 존재하고 있는 Gln3와 Gat1 (GATA protein family activators)을 탈인산화, 핵 내로 이동 촉진, Nitrogen catabolite repression-sensitive gene을 활성화시키는데 관여하여 영양 부족 조건에서의 세포 물질대사를 조절한다.

Sap4는 상기 문단에서 서술한 바와 같이 Sit4와 복합체를 이루며, Saps에 포함되어 있으며 이 중 Sap155와 유사한 구조를 갖는 것으로 보고되었다. Sit4와 복합체를 형성하며, Sit4의 기질 특이성을 부여하며, 세포주기 관련된 기능을 수행한다고 알려져 있다. 하지만 Sit4와 Sap4가 어느 조건에서 주로 복합체를 형성하며, 어떠한 기질을 가지는지, 그 기능은 무엇인지 명확히 밝혀진 바가 없다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 효모 및 배양 조건

연구에 사용된 효모는 표 1과 같다. 모든 효모는 BY4741 (*MATa his∆1 leu2∆0 met15∆0 ura3∆0*)과 YTS159 (*MATa his3∆1 leu2∆0 met15∆0 ura3∆0 pho8::pho8∆60 pho13::Kan*)로부터 유래되었다. 유전자 제거 효모는 '*Saccharomyces cerevisiae* Genome Deletion Project' 의 *S.cerevisiae* deletion library (EUROSCARF)의 효모를 사용하였다. GFP 혹은 TAP가 표지된 효모의 경우 각각 GFP 또는 TAP 표지 library를 활용하였다(Huh et al. 2003), (Gghaemmaghami et al. 2003). 영양 결핍 조건을 부여하기 전 모든 효모는 overnight으로 YPD 배양액(1% yeast extract, 2% glucose, 2% peptone) 또는 SC (Synthetic complete medium) 배양액 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, amino acids), 30℃에서 배양되었다. mid log phase까지 배양된 효모를 3차 증류수 세척으로 기존 배양액을 제거한 뒤, SD-N 배양액 (0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 2% glucose)으로 질소 결핍(nitrogen starvation) 조건을 조성, 영양 결핍 조건을 부여하여 자가포식을 유도하였고, 특정 시간만큼 배양하였다.

2. 효모 및 플라스미드 제작

효모 내 유전자는 표 2에 제시된 프라이머를 이용, PCR-매개 유전자 제거 방법(PCR-mediated gene disruption method)으로 제거하였다. 이때 표 3에 제시된 플라스미드 template와 lithium acetate 방법(RD Gietz et al. 1995.)을 활용하여 대상 효모는 형질전환(transformation)되었다. 형질전환이 정상적으로 이뤄졌는지 확인을 위해 플라스미드에 포함되어 있는 selectable marker에 따라 SC-His, SC-Leu, SC-Ura 결핍 배지에

해당 효모를 배양(2~3일) 후 표 2에 제시된 프라이머와 함께 colony-PCR 방법을 통해 확인하였다. *SIT4* complementation 실험을 위해 효모의 genomic DNA를 추출(Exgene cell SV kit 이용, 106-152, Geneall) 후 *SIT4*의 promoter와 ORF, terminator를 primer와 PCR을 이용하여 증폭하였다. 이를 pRS415 vector에 삽입하고 효모에 lithium acetate 방법으로 형질전환시켰다.

3. Western blot 분석

Western blot 분석을 위해 효모는 YPD 혹은 SC 배지에서 mid log phase까지 배양 후 3차 증류수, phosphate-buffered saline과 원심분리로 배양액을 세척 및 제거하였다. 그 후 lysis buffer (50mM tris-CL, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.15% NP-40, 1mM EDTA)와 함께 protease inhibitor (10mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM benzamedine, 1mM leupeptin, 1mM pepstatin)을 첨가한 후 0.5mm Glass beads (SI-BG05, Scientific Industries)를 이용한 bead beating 방법으로 세포를 파괴하였다. 인산화를 보기 위한 실험에서는 phosphatase inhibitor (0.1M soduim pyrophosphate, 1M sodium fluoride, 1M sodium orthovanadate , 2M β-glycerol phosphate)를 추가로 첨가하여 세포를 파괴하였다. 세포 파괴 후 13,000 rpm, 4℃에서 10분 간 원심분리시킨 후 상등액을 취해 6x sodium dodecyl sulfate sample buffer와 섞고 95℃에서 5분 동안 가열하였다. SDS-PAGE와 immunoblot은 일반적인 방법을 통해 시행하였다. 항체는 HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (A9044-2mL, Sigma aldrich), rabbit anti-hexokinase antibody (H2035-03, Usbiological), HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (A9169-2ml, Sigma aldrich), HRP-conjugated goat anti-GFP antibody (600-103-215, Rockland)를 사용하였다. ECL solution은 EZ-Western Lumi Femto Kit (DG-WF200, Dogen)를 이용하

였으며, 촬영은 ez capture2 프로그램, 밴드 강도(band intensity) 산출은 image J 프로그램을 활용하였다.

4. GFP 가공 분석

비선택적 자가포식 활성도를 확인하기 위해서 단백질 탈인산화효소 유전자가 각각 결실된 *S.cerevisiae* deletion library (EUROSCARF) 효모에 2. 효모 및 플라스미드 제작에서 언급한 방법을 이용하여 효모의 Atg8에 GFP 표지를 표지하거나 혹은 GFP-Atg8을 발현하는 야생 효모(Huh et al. 2003)에 후보군 단백질 유전자를 각각 제거하였다. 선택적 자가포식 활성을 관찰하기 위한 효모로는 GFP 표지 library (Huh et al. 2003)에서 Ape1-GFP, Sec63-GFP, Pex11-GFP, Rpl25-GFP를 발현하는 효모를 활용하여 단백질 유전자를 각각 제거하였다. 대상 효모들에 대해 영양 결핍으로 자가포식을 유도 후 western blot 분석으로 원래의 구조(GFP-Atg8, Ape1-GFP, Sec63-GFP, Pex11-GFP, Rpl25-GFP)에서 GFP가 얼마나 분리되는지(GFP/원래의 구조 밴드 강도)를 야생 효모와 비교하였다.

5. Pho8Δ60 분석

스크리닝 실험을 통해 선별된 단백질 탈인산화효소에 대해 추가적인 검증 실험으로 Pho8Δ60 분석을 진행하였다. Pho8은 효모 내 존재하는 alkaline phosphatase이며 이 효소의 활성을 측정하여 정량하는 분석법이다. Pho8은 N-terminal에 있는 signal peptide에 의해 액포로 이동하여 활성을 띈다. 이 때 signal peptide가 제거된 Pho8Δ60 효모(YTS159)의 Pho8은 세포질에 부유하게 되어 비활성 상태로 존재한다. 부유하는 Pho8은 오직 자가포식포에 의해 무작위하게 싸여 액포로 운송되어 활성을

띈다. 해당 분석법은 GFP-Atg8 가공 분석법과 함께 비선택적 자가포식 정량법으로 가장 많이 활용되는 정량법이다. 2. 효모 및 플라스미드 제작에서 언급한 방법을 이용하여 YTS159 효모에서 단백질 탈인산화효소 유전자를 제거하였다. 제작된 효모를 1. 효모 및 배양 조건에 따라 배양 후 lysis buffer (250mM Tris-HCl pH 9.0, 10mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10μM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)와 10mM phenylmethylsulfonyl fluoride를 첨가하고 bead beating 방법으로 파괴하였다. 13,000 rpm, 4℃에서 10분 간 원심분리시킨 후 상등액만을 취해 55mM ρ-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate를 첨가하고 30℃에서 5분에서 15분간 반응시켰다. 이후 stop buffer (2M glycine-NaOH pH11.0)를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 최종 반응 용액을 96-well glass-bottomed microplates (Matrical Biosciences, MGB096)에 옮겨 Flex3 microplate reader를 이용하여 fluxstation 400nm에서 흡광도를 측정하였다(Noda T, et al. 2008.).

6. RNA 추출 및 정량적 실시간 PCR (quantitative real-time PCR)

mRNA level을 측정하기 위하여 정량적 실시간 PCR 방법을 활용하였다. mRNA는 RNase mini kit(QIAGEN, 74104)을 통해 추출되었다. 추출한 RNA 1㎍로 template으로 Reverta Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, FSQ-101)를 통해 cDNA를 합성하였으며, cDNA를 1/4~1/8로 희석하여 SYBR Green qPCR master mix (Bioline)로 반응물을 만들었다. 이 후 applied biosystems QuantStudio3를 이용하여 정량적 실시간 PCR을 진행하였다. 이때 각 유전자 mRNA에 대한 endogenous control은 *TAF10*을 사용하였다.

7. 형광현미경 분석

자가포식 조건에서 야생 효모, *SIT4*, *SAP4* 제거 효모의 Gln3가 자가포식 조건에서 핵 내 이동 경향을 확인하기 위해 형광현미경 분석을 진행하였다. 야생형 효모, *SIT4*, *SAP4* 제거 효모를 mid log phase까지 배양 및 DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole)를 이용해 DNA를 염색하였다. 이후 각 효모를 96-well glass-bottomed microplates (Matrical Biosciences, MGB096)에 옮겨 Nikon Eclipse E1 microscope with a Plan Fluor 100×/1.30 NA oil immersion objective lens를 이용하여 관찰하였다.

표1. 본 연구에서 사용한 효모

Strain	Genotype	Reference
BY4741	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*	EUROSCARF
YTS159	BY4742 *pho8Δ::pho8Δ60 pho13Δ::Kan*	Cheong et al. 2008.
HY1968	BY4741 *pATG8-GFP-ATG8::HIS3MX6*	Hyojeung Choi. 2019.
YLL010C	BY4741 *psr1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YLR019W	BY4741 *psr2Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YML057W	BY4741 *cmp2Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YML016C	BY4741 *ppz1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YMR036C	BY4741 *mih1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YNL053W	BY4741 *msg5Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YOR090C	BY4741 *ptc5Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YOR367W	BY4741 *scp1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YPL179W	BY4741 *ppq1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YDR066C	BY4741 *rtr2Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YDR075W	BY4741 *pph3Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YDR436W	BY4741 *ppz2Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YGR123C	BY4741 *ppt1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YER075C	BY4741 *ptp3Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YGR203W	BY4741 *ych1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YHR076W	BY4741 *ptc7Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YOR208W	BY4741 *ptp2Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YBL056W	BY4741 *ptc3Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YNL217W	BY4741 *ppn2Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YIR026C	BY4741 *yvh1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YPR073C	BY4741 *ltp1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YJR110W	BY4741 *ymr1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YHR004C	BY4741 *nem1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YLR433C	BY4741 *cna1D::kanMX6*	EUROSCARF
YDL230W	BY4741 *ptp1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YCR079W	BY4741 *ptc6Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YDL134C	BY4741 *pph21Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YDL188C	BY4741 *pph22Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YNR032W	BY4741 *ppg1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YNL032W	BY4741 *siw14Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YNL128W	BY4741 *tep1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YNL099C	BY4741 *oca1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YNL056W	BY4741 *oca2Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YBR125C	BY4741 *ptc4Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YBR276C	BY4741 *pps1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YDL006W	BY4741 *ptc1Δ::kanMX6*	EUROSCARF

YER139C	BY4741 *rtr1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YDL047W	BY4741 *sit4Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YER089C	BY4741 *ptc2Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YGL229C	BY4741 *sap4Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YFR040W	BY4741 *sap155Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YJL098W	BY4741 *sap185Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YKR028W	BY4741 *sap190Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YAL016W	BY4741 *tpd3Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YOR014W	BY4741 *rts1Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YPR040W	BY4741 *tip41Δ::kanMX6*	EUROSCARF
YGL180W	BY4741 *ATG1-TAP-His3MX6*	Ghaemmaghami et al. 2003.
YPR185W	BY4741 *ATG13-TAP-His3MX6*	Ghaemmaghami et al. 2003.
YER040W	BY4741 *GLN3-GFP-His3MX6*	Huh et al. 2003

표2. 본 연구에서 사용한 프라이머

Primer	Sequence (5' to 3')
ATG8-F4	GAGGGGATTGATAAGAGAATCTAATAATTGTAAAGT TGAG GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
ATG8-R5	TTTTTTCAAATGGATATTCAGACTTAAATGTAGACT TCAT ACCACCAGAACCTTTGTATAGTTCATCCATGC
ATG8+300R	TCCTTATCCTTGTGTTCTTG
R5-CHK	AGACACAACATTGAAGATGG
SIT4-F	TTGAAGCTCAAAAACATCCATAATAAAAGGAACAAT AACA CACAGGAAACAGCTATGACC
SIT4-R	TTATTTTTATTCGTCGAGTTAGGGAGGGCATGCCGT CGTG GTTGTAAAACGACGGCCAGT
SIT4-330	CTTTCTCTCTTCGCTCATGG
SAP4-F	TATGTCACTATGGCCCTTTGGAGAGACGCTGAGTCA TTCC CACAGGAAACAGCTATGACC
SAP4-R	CGACTTAACCTAATCAATTTAAGTCGGAATGATGAT CAAC GTTGTAAAACGACGGCCAGT
SAP-450	CGAAACCTGACTATCTTAGG
CgCHK	GGTCATAGCTGTTTCCTGTG
F2CHK	AACCCGGGGATCCGTCGACC
APE1-F2	CAAGCACTGGAGATCAGTCTACGATGAATTCGGCGA GTTGGGTCGACGGATCCCCGGGTT
APE1-R1	AGAAACAGAAATCAAAAGAAATAAAAAGAGTGTGGC AAAATCGATGAATTCGAGCTCGTT
APE1-CHK	TTGGAGTCAGTGGTGGAACG

PEX11-F2	CACATCTATCCTTGGTATGCAAGACATGTGGAAAGC TACAGGTCGACGGATCCCCGGGTT
PEX11-R1 (URA3)	ATTATAAAGAAGGGTCGAATCAAACATAAGCGGAGA ATAG TCTGGAGGAAGTTTGAGAGG
PEX11-CHK	ACAACGYCGTTAGAGTCTGC
SEC63-F2	CGATACGGATACAGAAGCTGAAGATGATGAATCACC AGAAGGTCGACGGATCCCCGGGTT
SEC63-R1	TCTAAGAGCTAAAATGAAAAACTATACTAATCACTT ATATTCTGGAGGAAGTTTGAGAGG
SEC63-CHK	GAGTAAACAGCCACTCGTCC
PEP4-F	ATGTTCAGCTTGAAAGCATTATTGCCATTGGCCTTG TTGTCACAGGAAACAGCTATGACC
PEP4-R	GCTCAAATTGCTTTGGCCAAACCAACCGCATTGTTGC CCAGTTGTAAAACGACGGCCAGT
PEP4-300	TACTTCCGTACTTCGTAACC
SIT4_709	GCTCACCAACTGGTTATGGA
SIT4_840R	CAGATCCTCATCGACCTTCA
TAF10+390	ATTCCAGGATCAGGTCTTCCGTAGC
TAF10+499R	TCTCATTCTGTTGATGTTGTTGTTG
ATG1+2514	GAATGCCTATGGTGACTACC
ATG1+2689R	TTTGGTGGTTCATCTTCTGC
ATG8+1149	TAGTTCCTGCTGACCTTACC
ATG8+1334R	CTCCTGAGTAAGTGACATAC
SIT4-500 (ApaI)	AGCTGGGCCCCAGGAGAGATGAAAAGAATG
SIT4+1195R (NotI)	GACTGCGGCCGCAGGAAAGAAAGGACAAGGAC

표3. 본 연구에서 사용한 플라스미드

Plasmid	Genotype	Source
HB0544	pFA6a-pATG8-GFP-ATG8	Hyojeung Choi. 2019.
HB0467	pCgLEU	This study
HB0592	pRS415-pSIT4-SIT4	This study

Ⅲ. 결 과

1. 단백질 탈인산화효소 스크리닝

자가포식에 영향을 미치는 새로운 단백질 탈인산화효소를 찾기 위해 단백질 탈인산화효소 유전자가 제거된 *S.cerevisiae* deletion library (EUROSCARF) 효모를 이용하여 자가포식 활성 경향을 관찰하였다. 이를 위해 해당 효모의 Atg8에 GFP를 표지하고 GFP 가공 분석을 진행하였다. 기존 연구에 의해 밝혀진 43개의 단백질 탈인산화효소 중 유전자 제거 시 치명적인 필수 단백질 탈인산화효소와 GFP가 제대로 표지되지 않는 효모를 제외한 35개의 효모를 대상으로 실험을 진행하였다.

스크리닝 결과 *YMR1, PPH21, NEM1, PPQ1, PTP3, PTC7, LTP1, SIT4*가 제거된 총 8개의 효모에서 자가포식이 감소된 것을 식별하였다. 이 중 *YMR1, PPH21, NEM1*은 기존 연구를 통해 자가포식 조절에 연관이 있다는 것이 밝혀져 있다. 따라서 이들을 제외하여 Ppq1, Ptp3, Ptc7, Ltp1, Sit4 단백질 탈인산화효소를 스크리닝으로 선별하였다. (그림 1.)

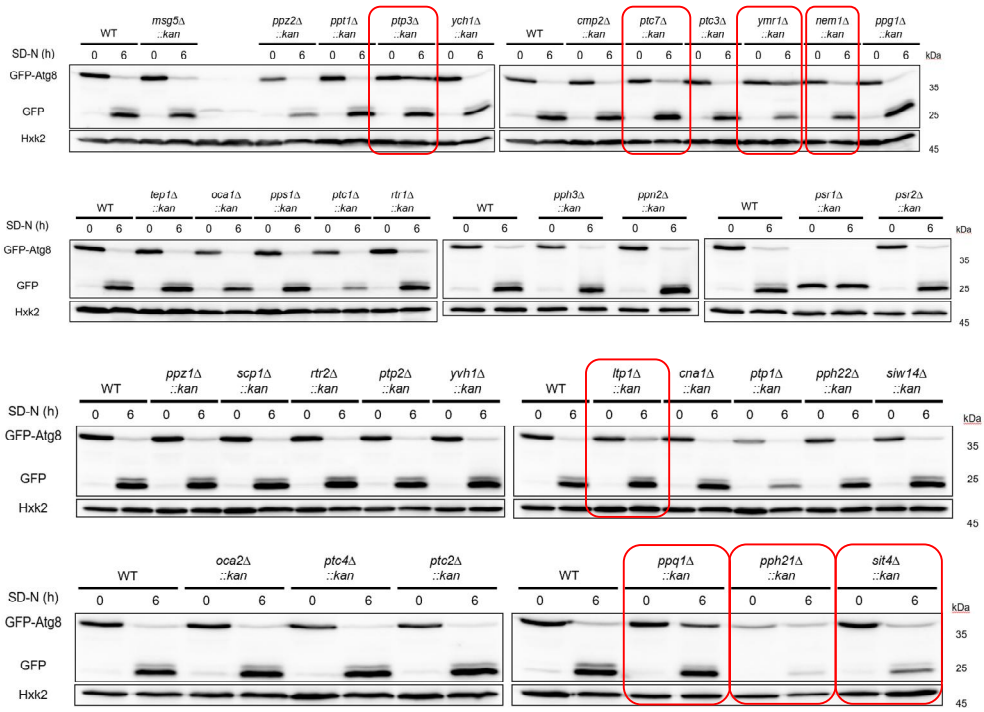


그림 1. 단백질 탈인산화효소 스크리닝

S.cerevisiae deletion library (EUROSCARF) 중 단백질 탈인산화효소 제거 효모를 이용하였다. GFP-Atg8을 발현하도록 Atg8에 GFP를 표지한 효모를 YPD 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건 (SD-N 배양액)을 통해 자가포식을 유도하였다. GFP-Atg8 가공정도는 anti-GFP antibody을 이용한 immunoblot으로 관찰하였다. Hxk2 (hexokinase isoenzyme 2)는 loading control로 활용되었다.

2. *SIT4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소

스크리닝 실험을 통해 5개의 단백질 탈인산화효소를 선별하였는데, 여기서 나타난 자가포식 활성 감소가 짧은 영양 결핍 조건에서 나타나는 일시적인 현상인지 긴 영양 결핍 조건에서도 지속적으로 나타나는 경향인지 확인하기 위해 비교적 긴 15, 24시간의 영양 결핍 조건을 부여하고 GFP 가공 분석을 통해 자가포식 활성 경향을 관찰하였다.

그 결과 스크리닝 실험 결과와 동일하게 6시간까지는 5개 후보군 모두에서 야생 효모에 비해 자가포식 활성이 저해된 것이 관찰되었지만, 이후 15, 24시간 영양 결핍 조건에서 *SIT4* 제거 효모를 제외한 4개 후보군에서는 유의미한 차이를 관찰하지 못하였다. 야생 효모에 비하여 *SIT4* 제거 효모에서 유의하게 자가포식 활성이 감소하였다. (그림 2A.)

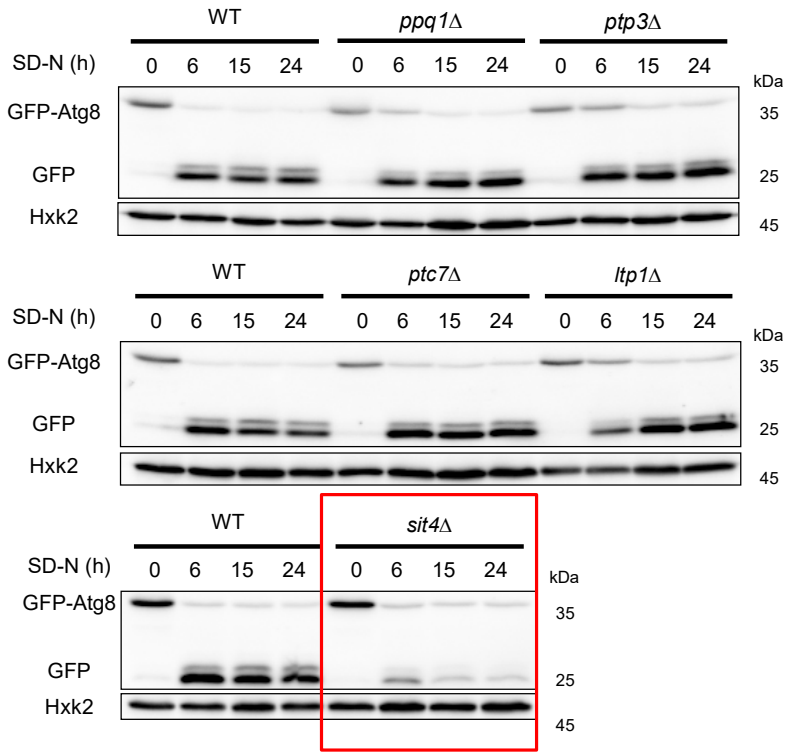
Sit4는 type 2A-related serine-threonine 단백질 탈인산효소로 대부분의 진핵생물에 보존되어 있다. Sit4는 세포 주기 진행과 질소 대사 등 다양한 기능에 관여한다고 보고되었다. 이러한 Sit4의 기능은 Tap42, SAPs (Sap4, Sap155, Sap185, Sap190), Tpd3, Cdc55 등의 단백질과 복합체를 형성하여 수행한다고 알려져 있다. 하지만 자가포식 조절 관점에서 Sit4의 생리학적 기능과 이와 관련된 복합체는 일부 기존 실험을 통해 제시된 바가 있지만 명확하지 않고 논쟁의 여지가 있다. 이러한 점에 비추어 보았을 때 본 실험에서 관찰된 *SIT4* 제거 효모에서 나타나는 자가포식 활성 감소는 Sit4와 자가포식의 직접적인 연관성과 함께 Sit4가 positive regulator로써 자가포식을 조절할 수 있음을 암시한다.

앞선 실험은 모두 *S.cerevisiae* deletion library (EUROSCARF)의 효모를 사용한 실험이다. 이러한 *SIT4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소 경향이 library 효모뿐만 아니라 야생 효모에서 유전자를 직접 제거할 경우에도 나타나는지 확인하기 위하여 효모의 selectable marker (auxotrophic marker)인 *LEU2*를 이용해 *SIT4*를 제거하였다. 이후 GFP 가공 분석과 함께 Pho8Δ60 분석을 활용하여 자가포식 활성을 검증하였다.

그 결과 deletion library 효모와 마찬가지로 *LEU2*로 *SIT4*를 제거한 효모에서 자가포식 활성이 유의하게 감소하였다. (그림 2B.)

이를 통해 *SIT4* 제거 효모의 자가포식 감소 경향이 deletion library 효모에서 보이는 특이적 현상이 아닌 것을 알게 되었으며, 이는 앞서 실험결과와 마찬가지로 Sit4와 자가포식의 연관성과 함께 Sit4가 자가포식의 positive regulator라는 것을 암시한다.

(a)


WT
ppq1Δ
ptp3Δ
SD-N (h)
0 6 15 24 0 6 15 24 0 6 15 24
kDa
GFP-Atg8
GFP
Hxk2
35
25
45
WT
ptc7Δ
ltp1Δ
SD-N (h)
0 6 15 24 0 6 15 24 0 6 15 24
kDa
GFP-Atg8
GFP
Hxk2
35
25
45
WT
sit4Δ
SD-N (h)
0 6 15 24 0 6 15 24
kDa
GFP-Atg8
GFP
Hxk2
35
25
45

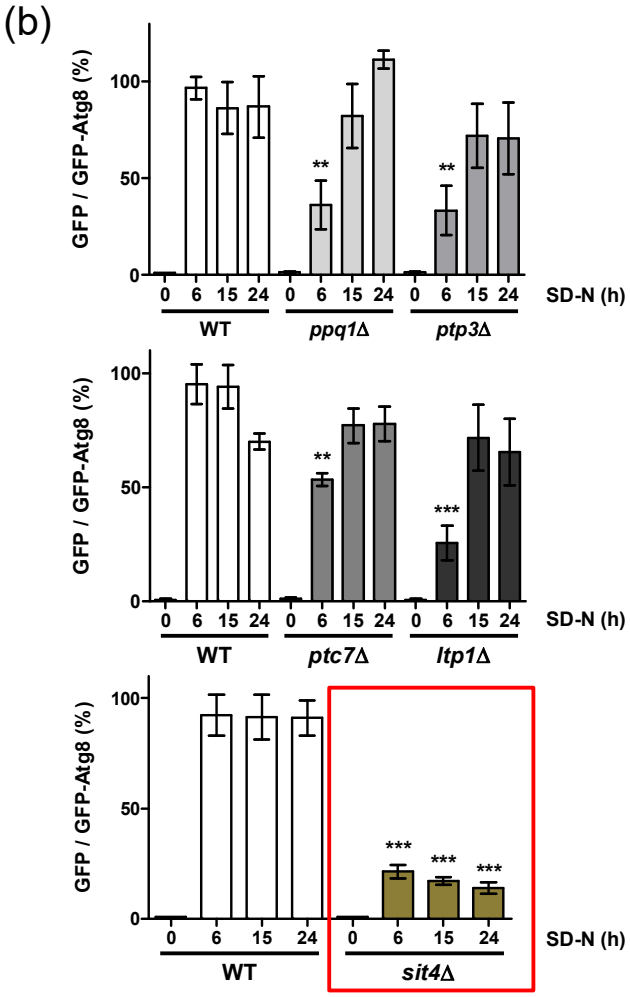
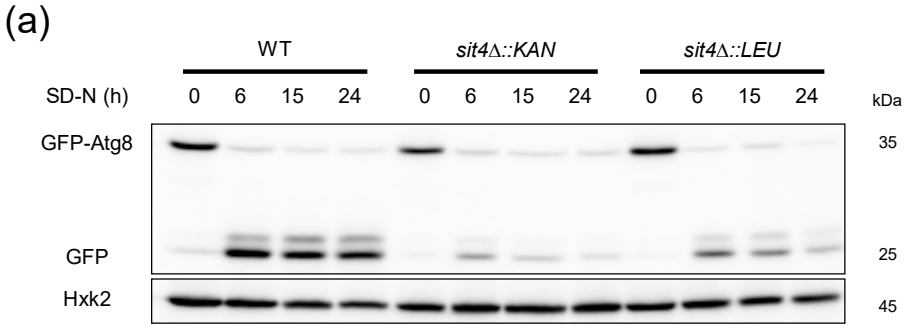
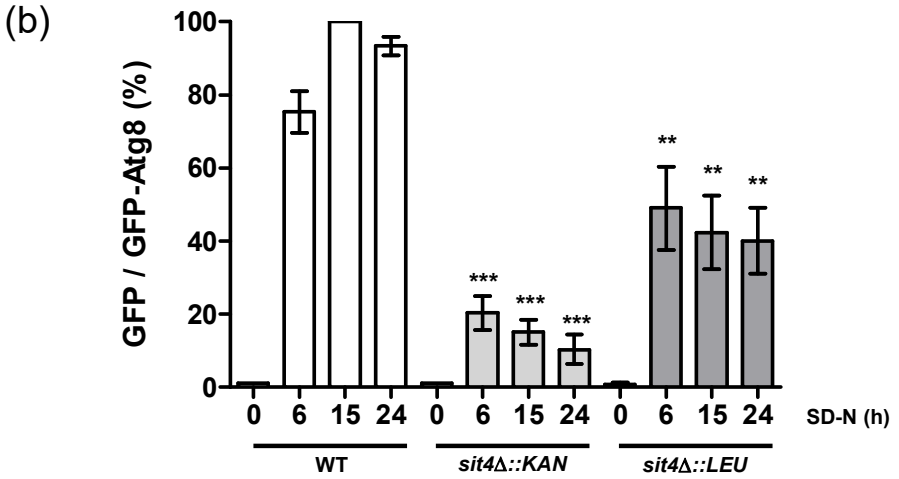


그림 2A. *SIT4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소

(a) *S.cerevisiae* deletion library (EUROSCARF)의 *ppq1*Δ, *ptp3*Δ, *ptc7*Δ, *ltp1*Δ, *sit4*Δ 효모를 이용하였다. GFP-Atg8을 발현하는 WT, *ppq1*Δ, *ptp3*Δ, *ptc7*Δ, *ltp1*Δ, *sit4*Δ를 YPD 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건(SD-N 배양액)을 통해 자가포식을 유도하였다. GFP-Atg8 가공 정도는 anti-GFP antibody을 이용한 immunoblot으로 관찰하였다 Hxk2는 loading control로 활용되었다. (b) immunoblot 결과를 GFP / GFP-Atg8로 계산하여 야생 효모의 결과값에 대하여 %로 환산하였다. 각 수치는 독립적인 3번 이상의 실험의 평균을 의미하며 error bar는 표준 편차를 의미한다. *P*-values는 two-tailed Student's t-test (***$P<0.001$, **$P<0.01$, *$P<0.05$)에 의해 결정되었다.


(a)
WT
sit4Δ::KAN
sit4Δ::LEU
SD-N (h)
0 6 15 24 0 6 15 24 0 6 15 24
kDa
GFP-Atg8
35
GFP
25
Hxk2
45


(b)
GFP / GFP-Atg8 (%)
100
80
60
40
20
0
***
**
0 6 15 24 0 6 15 24 0 6 15 24
SD-N (h)
WT
sit4Δ::KAN
sit4Δ::LEU

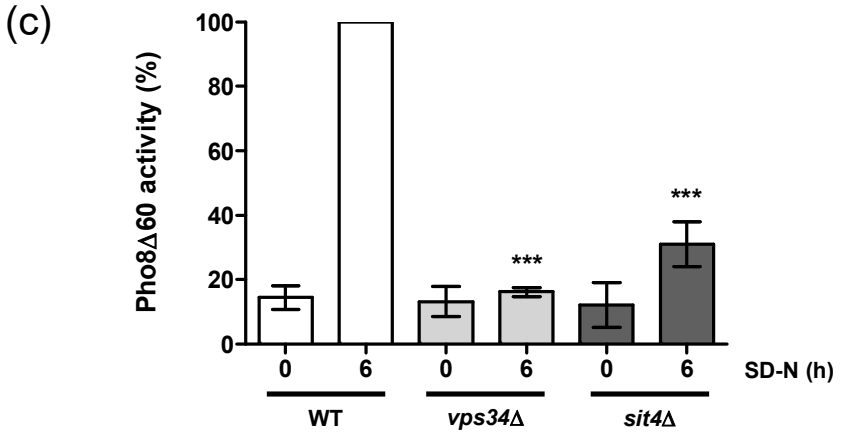

(c)
Pho8Δ60 activity (%)
100
80
60
40
20
0
***
0 6 0 6 0 6
SD-N (h)
WT
vps34Δ
sit4Δ

그림 2B. *SIT4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소

(a) *sit4*Δ*::KAN*은 *S.cerevisiae* deletion library (EUROSCARF) 효모를 의미한다. *sit4*Δ*::LEU*은 *LEU2*를 이용해 야생 효모의 *SIT4*를 제거한 효모를 의미한다. GFP-Atg8을 발현하는 *sit4*Δ*::KAN, sit4*Δ*::LEU* 효모를 YPD 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건(SD-N 배양액)을 통해 자가포식을 유도하였다. GFP-Atg8 가공정도는 anti-GFP antibody을 이용한 immunoblot으로 관찰하였다. Hxk2는 loading control로 활용되었다. (b) immunoblot 결과를 GFP / GFP-Atg8로 계산하여 야생 효모의 결과값에 대하여 %로 환산하였다. (c) 야생형 효모와 함께 negative control인 *VPS34* 제거 효모와 *SIT4* 제거 효모를 YPD 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건으로 자가포식을 유도하였다. Pho8Δ60 활성은 재료 및 방법에 기재된 바와 같이 측정하였다. (b-c) 각 수치는 독립적인 3번 이상의 실험의 평균을 의미하며 error bar는 표준 편차를 의미한다. *P*-values는 two-tailed Student's t-test (***$P<0.001$, **$P<0.01$, *$P<0.05$)에 의해 결정되었다.

3. *SAP4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소

Sit4는 세포 주기 진행과 질소 물질대사 등 다양한 기작에 관여한다고 보고되었으며, 이러한 기능은 Tap42, SAPs (Sap4, Sap155, Sap185, Sap190), Tpd3, Cdc55 등의 단백질과 복합체를 형성하여 수행한다고 알려져 있다.

앞선 실험에서 관찰한 *SIT4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소 경향이 기존에 알려진 Sit4 상호작용 단백질들과도 연관이 있는지 확인하기 위하여 상호작용 단백질 유전자가 제거된 효모를 대상으로 실험을 진행하였다. *S.cerevisiae* deletion library (EUROSCARF) 중 *sap4*Δ, *sap155*Δ, *sap185*Δ, *sap190*Δ, *rts1*Δ, *tip42*Δ 효모를 이용하였다. GFP-Atg8을 발현하도록 만든 효모를 6시간의 영양 결핍 조건을 부여하고 그 후 GFP 가공 분석을 진행하였다. 실험 결과 야생 효모에 비해 *SAP4* 제거 효모에서 자가포식 활성이 유의하게 감소하였다. (그림 3A.) *RTS1* 제거 효모도 유의미한 감소가 관찰되었지만, 기존 연구에 의해 자가포식과의 연관성이 밝혀진 단백질이었기 때문에 후보군에서 제외하였다.

이후 *SAP4* 제거 효모의 자가포식 감소 경향을 검증하기 위한 실험을 진행하였다. GFP 가공분석 및 Pho8Δ60 분석을 진행하였고 그 결과 *LEU2*을 이용한 *SAP4* 제거 효모에서 자가포식 활성 감소를 확인하였다. (그림 3B.)

이는 기존 Sap4가 Sit4와 물리적 상호작용(physical interaction)한다고 알려진 기존 연구 결과(M M Luke, et al. 1996.)에 비춰볼 때, Sit4와 상호작용하며 자가포식 활성을 촉진하는 positive regulator일 가능성을 제시한다.

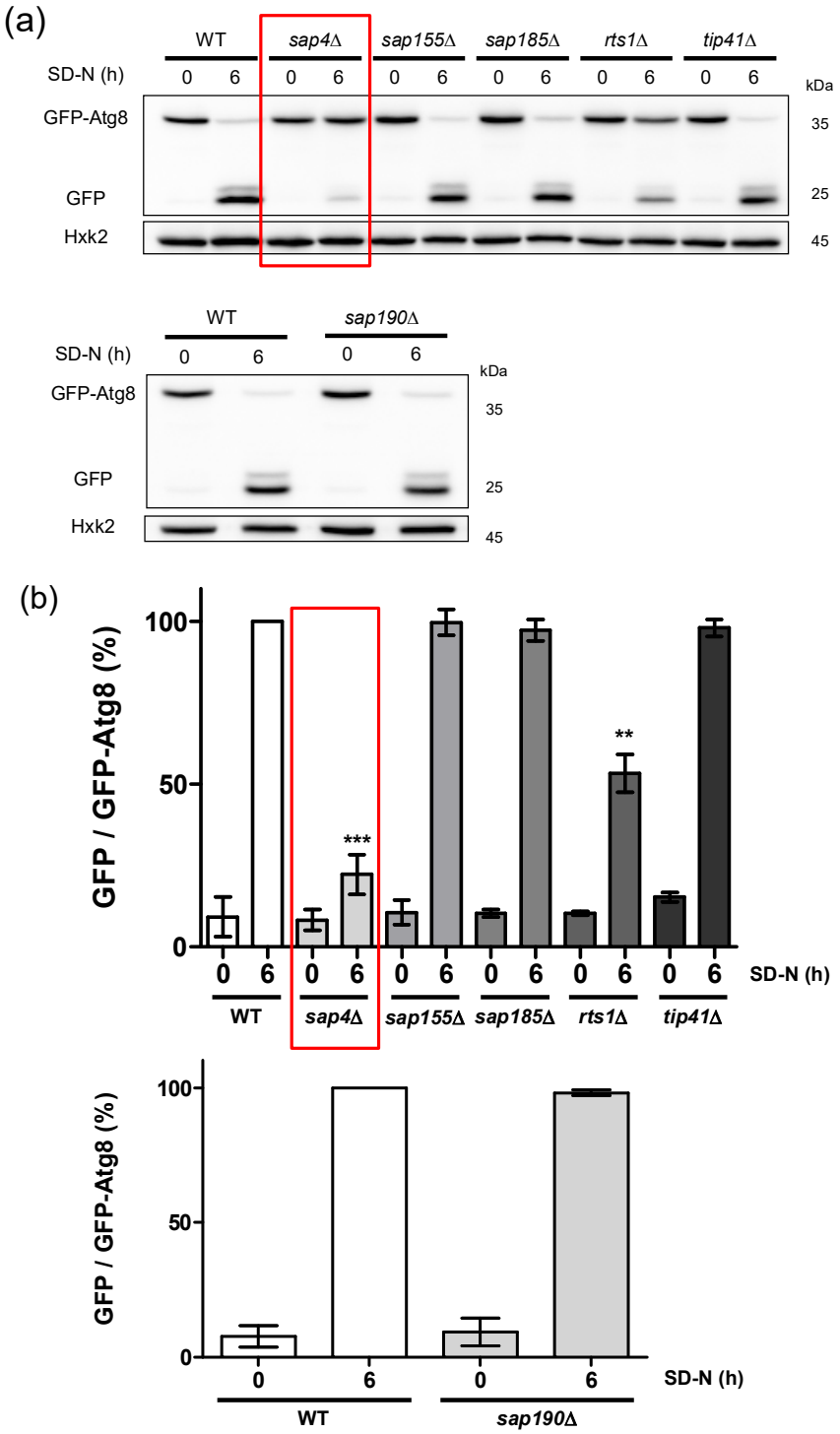
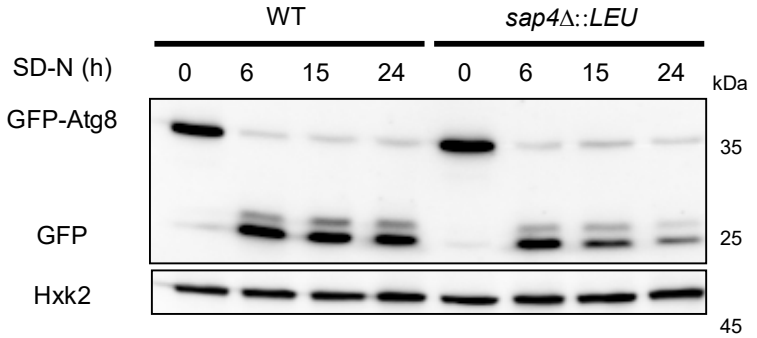

(a)
WT
sap4Δ
sap155Δ
sap185Δ
rts1Δ
tip41Δ
SD-N (h)
0 6 0 6 0 6 0 6 0 6 0 6
kDa
GFP-Atg8
GFP
Hxk2
35
25
45
WT
sap190Δ
SD-N (h)
0 6 0 6
kDa
GFP-Atg8
GFP
Hxk2
35
25
45
(b)
GFP / GFP-Atg8 (%)
100
50
0
***
**
0 6 0 6 0 6 0 6 0 6 0 6
SD-N (h)
WT
sap4Δ
sap155Δ
sap185Δ
rts1Δ
tip41Δ
GFP / GFP-Atg8 (%)
100
50
0
0 6 0 6
SD-N (h)
WT
sap190Δ

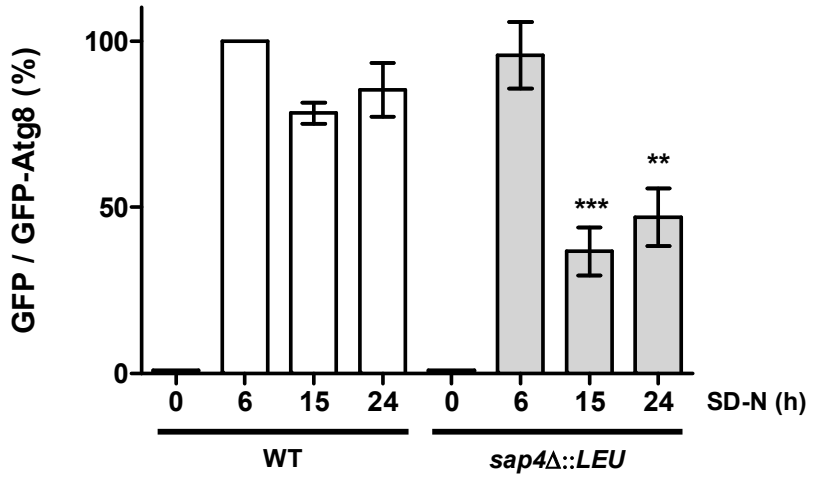
그림 3A. *SAP4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소

(a) *S.cerevisiae* deletion library (EUROSCARF) 효모 *sap4*Δ, *sap155*Δ, *sap185*Δ, *sap190*Δ, *rts1*Δ, *tip42*Δ를 이용하였다. GFP-Atg8을 발현하는 WT, *sap4*Δ, *sap155*Δ, *sap185*Δ, *sap190*Δ, *rts1*Δ, *tip42*Δ를 YPD 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건(SD-N 배양액)을 통해 자가포식을 유도하였다. GFP-Atg8 가공 정도는 anti-GFP antibody을 이용한 immunoblot으로 관찰하였다. Hxk2는 loading control로 활용되었다. (b) immunoblot 결과를 GFP / GFP-Atg8로 계산하여 야생 효모의 결과값에 대하여 %로 환산하였다. 각 수치는 독립적인 3번 이상의 실험의 평균을 의미하며 error bar는 표준 편차를 의미한다. *P*-values는 two-tailed Student's t-test (***$P<0.001$, **$P<0.01$, *$P<0.05$)에 의해 결정되었다.

(a)


WT
sap4Δ::LEU
SD-N (h)
0 6 15 24 0 6 15 24
kDa
GFP-Atg8
35
GFP
25
Hxk2
45

(b)


GFP / GFP-Atg8 (%)
100
50
0
***
**
0 6 15 24 0 6 15 24
SD-N (h)
WT
sap4Δ::LEU

(C)

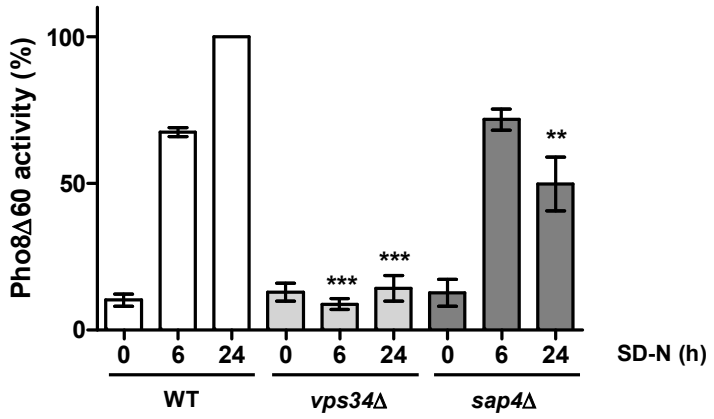

Pho8Δ60 activity (%)
100
50
0
***
***
**
0 6 24 0 6 24 0 6 24
SD-N (h)
WT
vps34Δ
sap4Δ

그림 3B. *SAP4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소

(a) 야생 효모의 *SAP4*를 *LEU2*으로 제거한 효모 *sap4*Δ*::LEU*을 이용하였다. GFP-Atg8을 발현하는 WT, *sap4*Δ*::LEU* 효모를 YPD 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건(SD-N 배양액)을 통해 자가포식을 유도하였다. GFP-Atg8 가공정도는 anti-GFP antibody을 이용한 immunoblot으로 관찰하였다. Hxk2는 loading control로 활용되었다. (b) immunoblot 결과를 GFP / GFP-Atg8로 계산하여 야생 효모의 결과값에 대하여 %로 환산하였다. (c) negative control인 *VPS34* 제거 효모와 *SAP4* 제거 효모를 이용하였다. WT, *vps34*Δ, *sap4*Δ 효모를 YPD 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건으로 자가포식을 유도하였다. Pho8Δ60 활성도는 재료 및 방법에 기재한 바와 같이 측정하였다. (b-c) 각 수치는 독립적인 3번 이상의 실험의 평균을 의미하며 error bar는 표준 편차를 의미한다. *P*-values는 two-tailed Student's t-test (***$P<0.001$, **$P<0.01$, *$P<0.05$)에 의해 결정되었다.

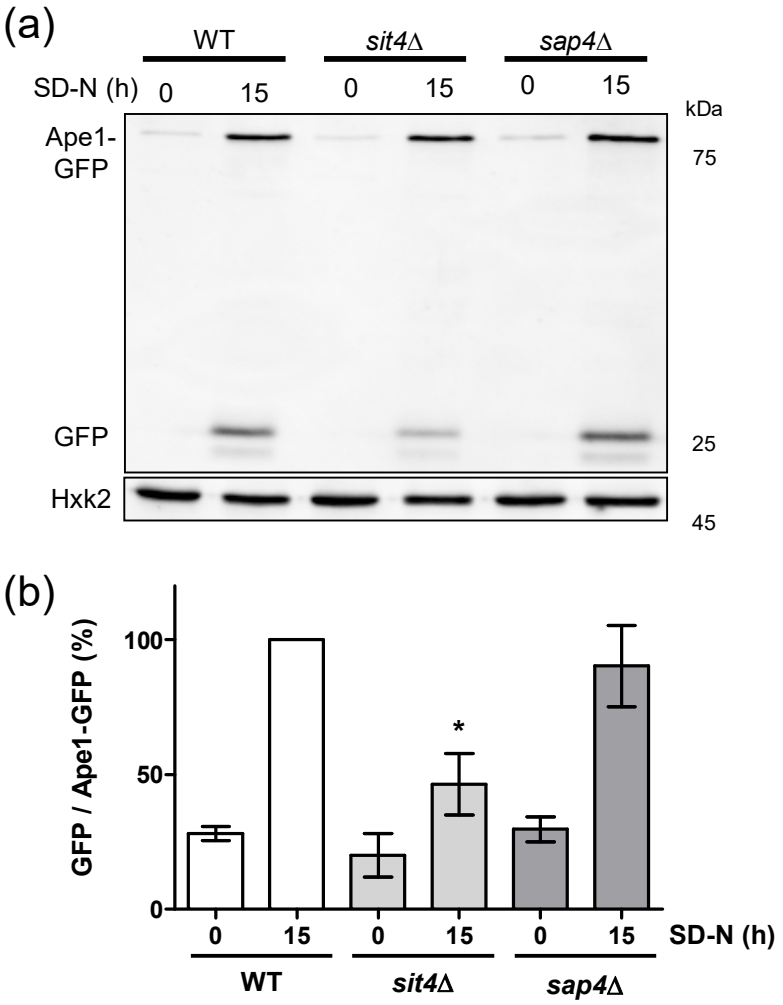
4. *SIT4*, *SAP4* 제거 효모의 선택적 자가포식 활성 감소

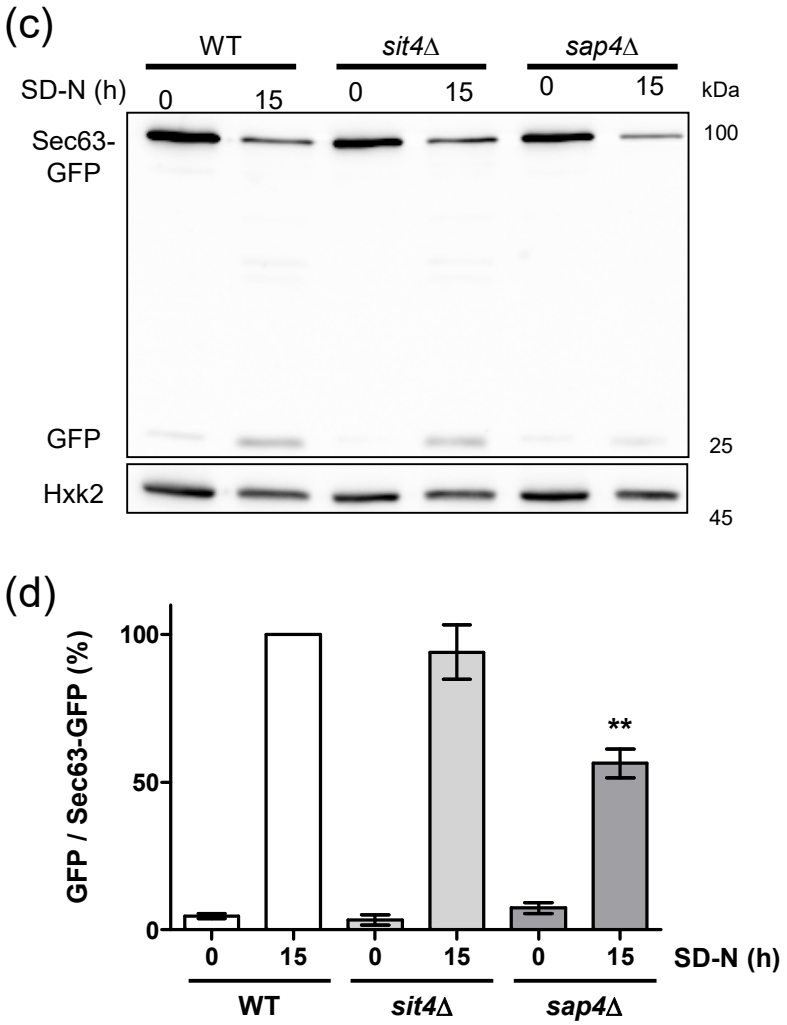
앞서 시행한 GFP 가공분석(GFP-Atg8)과 Pho8Δ60 분석을 통해 Sit4와 Sap4가 비선택적 자가포식 활성에 중요하다는 것을 관찰하였다. 이러한 경향이 선택적 자가포식에도 나타나는지 관찰하기 위하여 세포소기관 구성 단백질에 GFP를 표지하고 자가포식을 유도, GFP 가공 분석을 진행하였다. 선택적 자가포식에 대한 분석은 대표적으로 Cvt pathway와 reticulophagy, pexophagy를 대상으로 진행하였다. 세포소기관 구성 단백질-GFP 형태의 단백질은 영양결핍으로 자가포식이 유도되면 비선택적 자가포식 기작과 세포소기관을 인식하는 receptor 단백질과의 상호작용을 통해 선택적으로 액포로 이동하여 세포소기관 특이 단백질과 GFP가 가공(분리)된다. 이를 통해 선택적 자가포식이 얼마나 발생하였는지 GFP 가공 분석을 통해 정량할 수 있다.

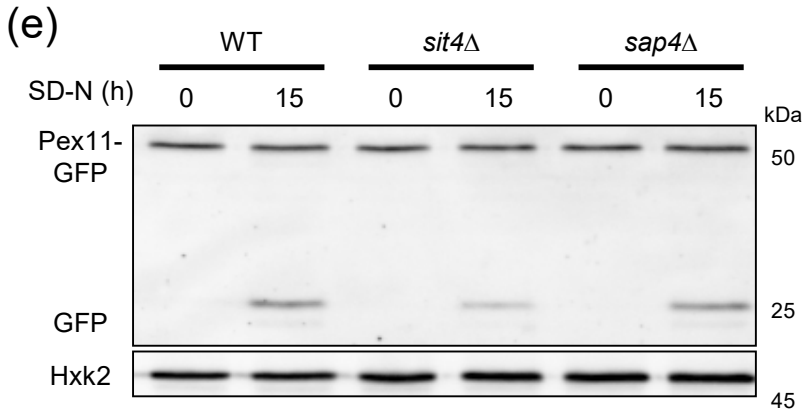
Cvt pathway는 효모 내에 존재하는 선택적 자가포식의 한 종류이다. 액포 기능에 필요한 가수분해 효소가 소포체에서 합성되면 이를 액포로 운송하는 신생물질 운송 경로로써 활용된다. 엄밀히 말하면 세포 내 물질을 분해하는 기작은 아니지만, 자가포식의 핵심 요소를 공유하며 특이적인 효소만을 PAS(phagophore assembly site)로 자가포식 기작을 통해 운송하기 때문에 선택적 자가포식으로 분류된다. 이러한 Cvt pathway를 관찰하기 위하여 Cvt pathway를 통해 운송되는 가수분해 효소 중 하나인 Ape1에 GFP를 표지하여 영양 결핍 조건에서 GFP 분리 정도를 관찰하였다. reticulophagy는 소포체를 분해하는 선택적 자가포식의 한 종류이다. Sec63 단백질은 소포체를 구성하는 단백질 중 하나이다. pexophagy는 퍼옥시좀을 분해하는 선택적 자가포식의 한 종류이다. Pex11 단백질은 퍼옥시좀 구성 물질 중 하나이다. 위에서 언급한 세포소기관 구성물질에 GFP를 표지한 효모에 영양 결핍 조건을 부여하고 GFP 가공 정도를 관찰하였다.

실험을 통해 *SIT4*와 *SAP4* 제거 효모에서 선택적 자가포식이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. (그림 4.) 이는 Sit4와 Sap4가 비선택적

자가포식, 선택적 자가포식의 전반적인 자가포식 활성에 중요하며 이를 촉진하는 역할을 함을 암시한다.


(a)
WT
sit4Δ
sap4Δ
SD-N (h)
0
15
0
15
0
15
kDa
Ape1-GFP
75
GFP
25
Hxk2
45
(b)
GFP / Ape1-GFP (%)
100
50
0
*
0
15
0
15
0
15
SD-N (h)
WT
sit4Δ
sap4Δ


(c)
WT
sit4Δ
sap4Δ
SD-N (h)
0
15
0
15
0
15
kDa
Sec63-GFP
100
GFP
25
Hxk2
45
(d)
GFP / Sec63-GFP (%)
100
50
0
**
0
15
0
15
0
15
SD-N (h)
WT
sit4Δ
sap4Δ


(e)
WT
sit4Δ
sap4Δ
SD-N (h)
0
15
0
15
0
15
kDa
Pex11-GFP
50
GFP
25
Hxk2
45

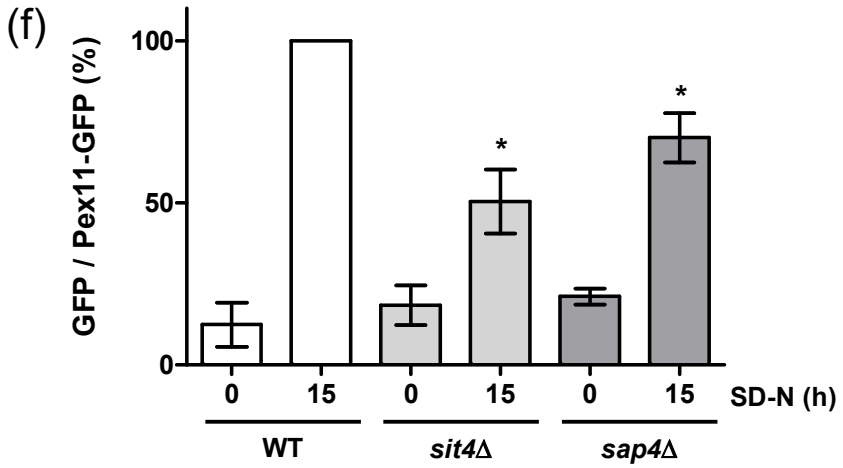

(f)
GFP / Pex11-GFP (%)
100
50
0
*
*
0
15
0
15
0
15
SD-N (h)
WT
sit4Δ
sap4Δ

그림 4. *SIT4, SAP4* 제거 효모의 선택적 자가포식 활성 감소

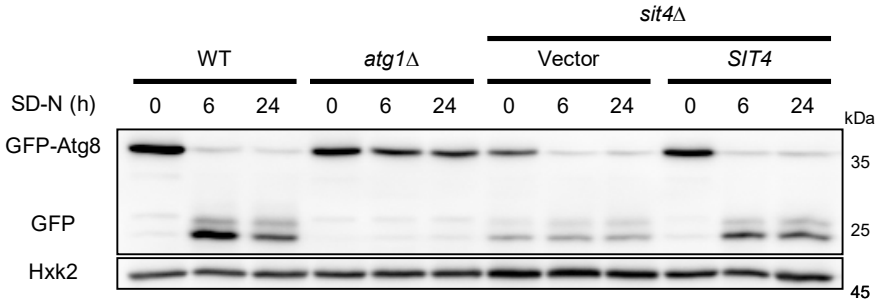
(a,c,e) *SIT4*, *SAP4* 제거 효모에 세포소기관 구성 단백질(Ape1, Sec63, Pex11, Rpl25)에 GFP를 표지한 효모를 이용하였다. 각 선택적 자가포식 특이적인 단백질에 GFP를 표지된 효모를 YPD 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건(SD-N 배양액)을 통해 자가포식을 유도하였다. 각 단백질의 가공정도는 anti-GFP antibody을 이용한 immunoblot으로 관찰하였다. Hxk2는 loading control로 활용되었다. (a) Cvt pathway를 통해 액포로 운송되는 Ape1에 GFP를 표지하고 Ape1-GFP 가공 정도를 야생 효모에 비교하였다. (b) immunoblot 결과를 GFP / Ape1-GFP로 계산하여 야생 효모의 결과값에 대하여 %로 환산하였다. (c) 소포체 구성 물질 중 하나인 Sec63 단백질에 GFP를 표지하고 Sec63-GFP 가공 정도를 야생 효모에 비교하였다. (d) immunoblot 결과를 GFP / Sec63-GFP로 계산하여 야생 효모의 결과값에 대하여 %로 환산하였다. (e) 퍼옥시좀 구성 물질 중 하나인 Pex11 단백질에 GFP를 표지하고 Pex11-GFP 가공 정도를 야생 효모에 비교하였다. (f) immunoblot 결과를 GFP / Pex11-GFP로 계산하여 야생 효모의 결과값에 대하여 %로 환산하였다. (b,d,f) 각 수치는 독립적인 3번 이상의 실험의 평균을 의미하며 error bar는 표준 편차를 의미한다. *P*-values는 two-tailed Student's t-test (***$P<0.001$, **$P<0.01$, *$P<0.05$)에 의해 결정되었다.

5. *SIT4* 보완에 의한 자가포식 활성 회복

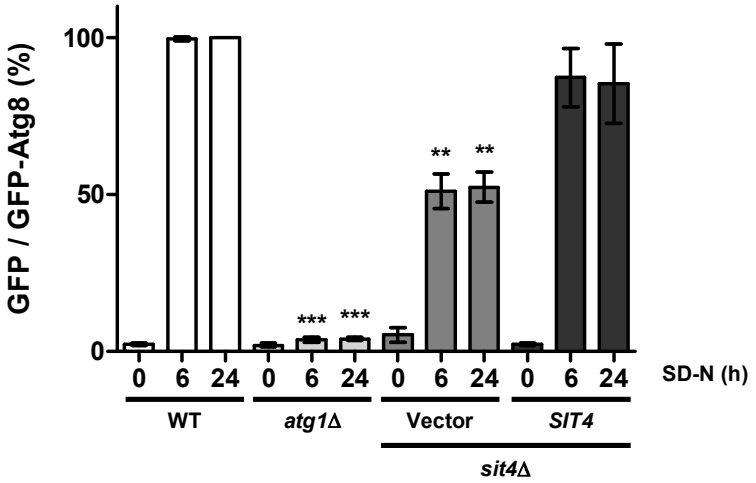
앞선 실험을 통해 Sit4가 자가포식 활성에 중요하다는 것을 확인하였다. 그리고 또한 각 선택적 자가포식 실험을 통해 비선택적, 선택적 자가포식 모두에 중요하다는 것을 확인하였다. 하지만 확인한 실험 결과가 *SIT4* 제거에 의해 나타나는 생리학적 기능 결함인지 아니면 유전자 제거 과정에서 나타난 비특이적인 부작용인지 검증이 필요하다고 판단하였다. 하여 *SIT4* 제거 효모에 각 유전자의 promoter, ORF, terminator를 cloning한 벡터를 형질전환시켜 재발현시키는 complementation 실험을 진행하였다.

실험 결과 *SIT4* complementation 실험에서 자가포식 활성이 야생 효모와 유사한 수준으로 회복되는 것을 관찰하였다. 이는 *SIT4* 제거 효모에서 나타났던 자가포식 감소 경향이 유전자 제거에 의한 비특이적 부작용이 아님을 말한다. 즉 Sit4가 자가포식을 촉진, 조절하는 중요한 단백질 탈인산화효소임을 의미한다.

(a)


sit4Δ
WT
atg1Δ
Vector
SIT4
SD-N (h)
0 6 24 0 6 24 0 6 24 0 6 24
kDa
GFP-Atg8
GFP
Hxk2
35
25
45

(b)


GFP / GFP-Atg8 (%)
100
50
0
***
***
**
**
0 6 24 0 6 24 0 6 24 0 6 24
SD-N (h)
WT
atg1Δ
Vector
SIT4
sit4Δ

(c)

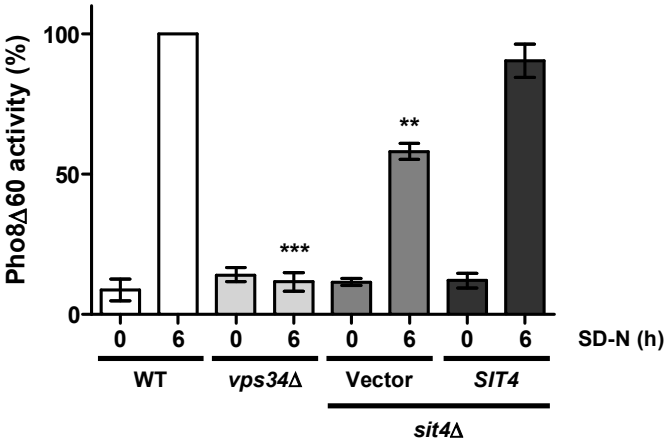

Pho8Δ60 activity (%)
100
50
0
***
**
0 6 0 6 0 6 0 6
SD-N (h)
WT
vps34Δ
Vector
SIT4
sit4Δ

그림 5. *SIT4* 보완에 의한 자가포식 활성 회복

(a) *SIT4*가 삽입되어있는 pRS415 플라스미드, *SIT4*가 삽입되어있지 않은 pRS415 플라스미드를 각각 도입시킨 효모 sit4Δ Vector, sit4Δ *SIT4*와 negative control인 *atg1*Δ효모를 이용하였다. GFP-Atg8을 발현하는 WT, *atg1*Δ, *sit4*Δ *SIT4*, *sit4*Δ Vector 효모를 YPD 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건(SD-N 배양액)을 통해 자가포식을 유도하였다. GFP-Atg8 가공정도는 anti-GFP antibody을 이용한 immunoblot으로 관찰하였다. Hxk2는 loading control로 활용되었다. (b) GFP 가공 분석 결과를 GFP / GFP-Atg8로 계산하여 야생 효모의 결과값에 대하여 %로 환산하였다. (c) *SIT4*가 삽입되어있는 pRS415 플라스미드, SIT4가 삽입되어있지 않은 pRS415 플라스미드를 각각 도입시킨 효모 sit4Δ Vector, sit4Δ *SIT4*와 negative control인 *VPS34* 제거 효모를 이용하였다. WT, *vps34*Δ, *sit4*Δ *SIT4*, *sit4*Δ Vector 효모를 YPD 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건(SD-N 배양액)을 통해 자가포식을 유도하였다. Pho8Δ60 활성도는 재료 및 방법에 기재한 바와 같이 측정하였다. (b-c) 각 수치는 독립적인 3번 이상의 실험의 평균을 의미하며 error bar는 표준 편차를 의미한다. *P*-values는 two-tailed Student's t-test ($***P<0.001$, $**P<0.01$, $*P<0.05$)에 의해 결정되었다.

6. *SIT4*, *SAP4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소 원인 규명

SIT4, *SAP4* 제거 효모에서 관찰되는 자가포식 활성 감소는 Sit4와 Sap4가 자가포식 기작 내 중요 단백질에 영향을 주어 발생할 가능성을 시사한다. 이를 규명하기 위해 *SIT4*와 *SAP4*가 각각 제거된 효모를 대상으로 자가포식 핵심 단백질들에 대한 영향을 확인하였다.

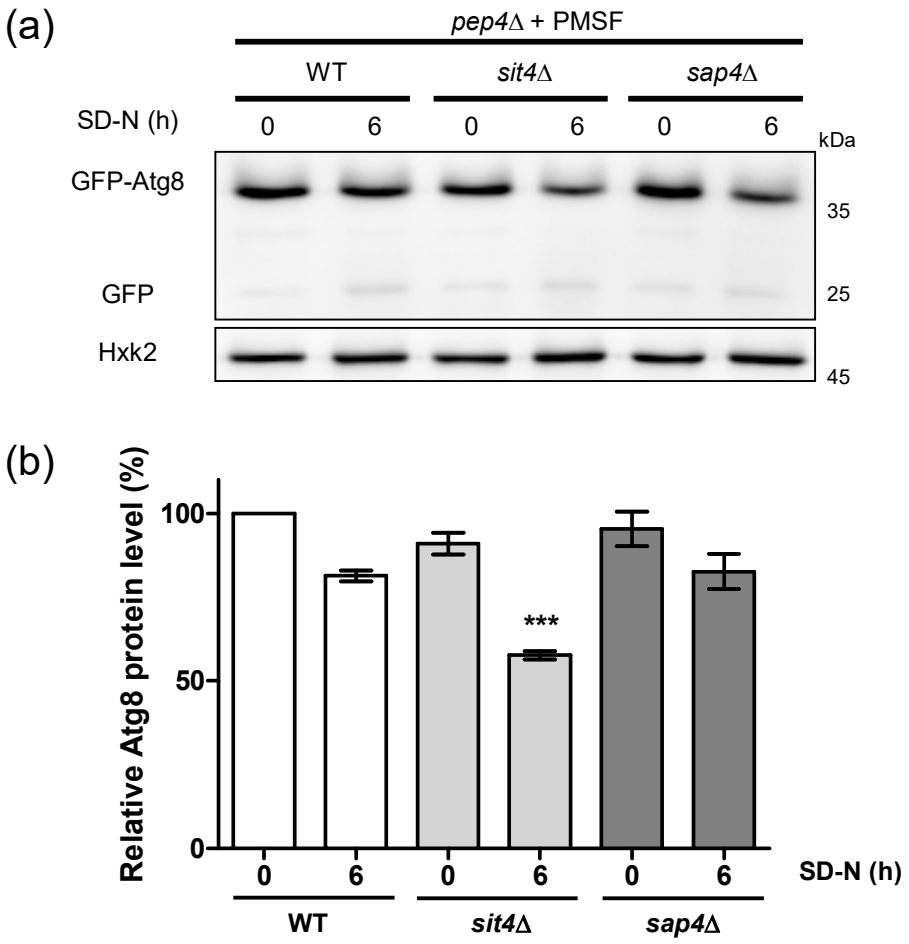
6.1. *SIT4* 제거 효모의 Atg8 단백질, *ATG8* mRNA 발현량 감소

SIT4, *SAP4* 제거 효모의 GFP 가공 분석 결과에서 GFP 밴드 총량 (‘GFP’ + ‘GFP-Atg8’)이 감소된 것처럼 보인다. 이는 GFP-Atg8 발현량이 감소되었다는 해석이 가능하다. Atg8은 자가포식 기작 내 존재하는 2가지 Ubiquitin-like protein conjugation systems 중 하나의 구성 단백질이다. Atg8은 Ubiquitin-like protein conjugation systems에 의해 phosphatidylethanolamine과 결합하여 Atg8-PE를 형성함으로써 자가포식포 형성과 자가포식의 진행, 효율 전반적으로 영향을 주는 중요한 단백질이다. Atg8은 비선택적 자가포식 뿐만 아니라 선택적 자가포식에서도 그 역할을 하기 때문에 앞서 살펴보았던 Sit4와 Sap4가 Atg8 발현량에 영향을 준다면 *SIT4*와 *SAP4* 제거 효모에서의 자가포식 감소의 원인으로 지목할 수 있다. 이러한 가능성은 영양 결핍 조건에서 액포 내에서의 Atg8 분해를 최대한 억제한 후 효모 내 존재하는 Atg8 총발현량을 비교하는 것을 통해 확인할 수 있다. 이를 위해 액포 내 다른 가수분해 효소의 활성을 조절하며 중요한 가수분해 효소인 Pep4 가수분해 효소를 제거하고, 단백질 분해효소 저해제인 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride을 배양액에 첨가(Half life 고려, working concentration이 0.1~1mM이 되도록 1시간에서 1시간 30분마다 첨가)하여 나머지 단백질 분해효소의 활성을 억제하는 것을 통해 Atg8의 분해를 최대한 억제시켰다. 이후 GFP 가공 분석을 통해 Atg8 단백질 발현량을 관찰하였다. 그 결과 *SIT4* 제거 효모에서 Atg8 총발현량이 유의미하게 감소된 것을 관

찰하였다.

Sit4와 Sap4가 Atg8의 발현량 조절 뿐만 아니라 *ATG8* mRNA에도 영향을 미치는지 확인하기 위해서 정량적 실시간 PCR을 진행하였다. 실험 결과 *SIT4* 제거 효모에서 mRNA 발현량이 감소된 것을 확인하였다.

이는 *SIT4* 제거 효모의 자가포식 활성 감소의 원인이 Atg8 단백질 발현, *ATG8* mRNA 발현 수준의 감소 때문일 수 있다는 것을 의미한다. 즉 영양 결핍 조건에서 Sit4가 Atg8의 단백질, *ATG8* mRNA 발현량을 조절하는 positive regulator임을 암시한다. *SIT4* 제거 효모에서와 달리 *SAP4* 제거 효모에서는 Atg8 발현량 감소가 관찰되지 않았다. GFP 가공 분석과 Pho8Δ60에서 *SAP4* 제거 효모가 영양 결핍 6시간까지는 야생 효모와 자가포식 경향이 거의 유사한 것을 관찰할 수 있다. 이로 미루어 볼 때, Sap4는 영양 결핍이 6시간을 초과한(15시간~24시간) 시점부터 *ATG8* mRNA, Atg8 단백질 발현량에 영향을 주는 positive regulator일 가능성을 암시한다.


(a)
pep4Δ + PMSF
WT
sit4Δ
sap4Δ
SD-N (h)
0
6
0
6
0
6
kDa
GFP-Atg8
35
GFP
25
Hxk2
45
(b)
Relative Atg8 protein level (%)
100
50
0
***
0
6
0
6
0
6
SD-N (h)
WT
sit4Δ
sap4Δ

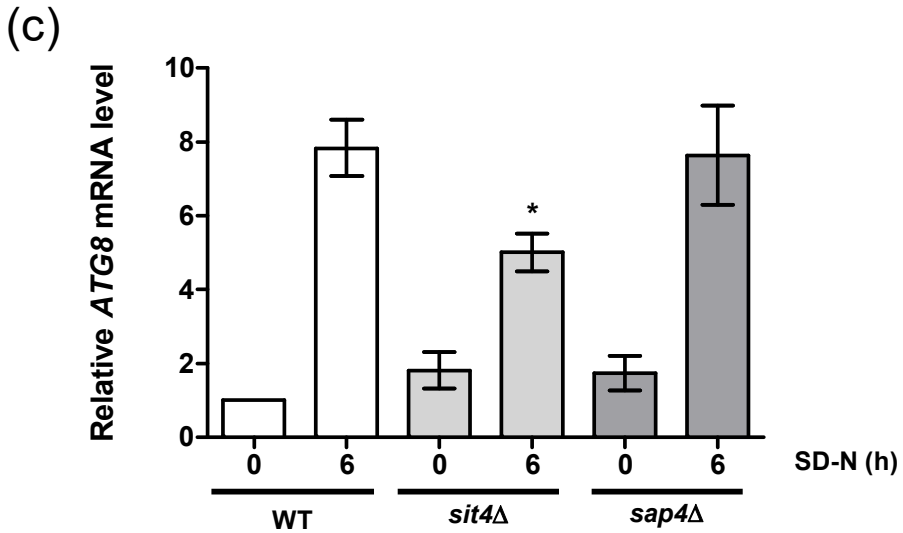
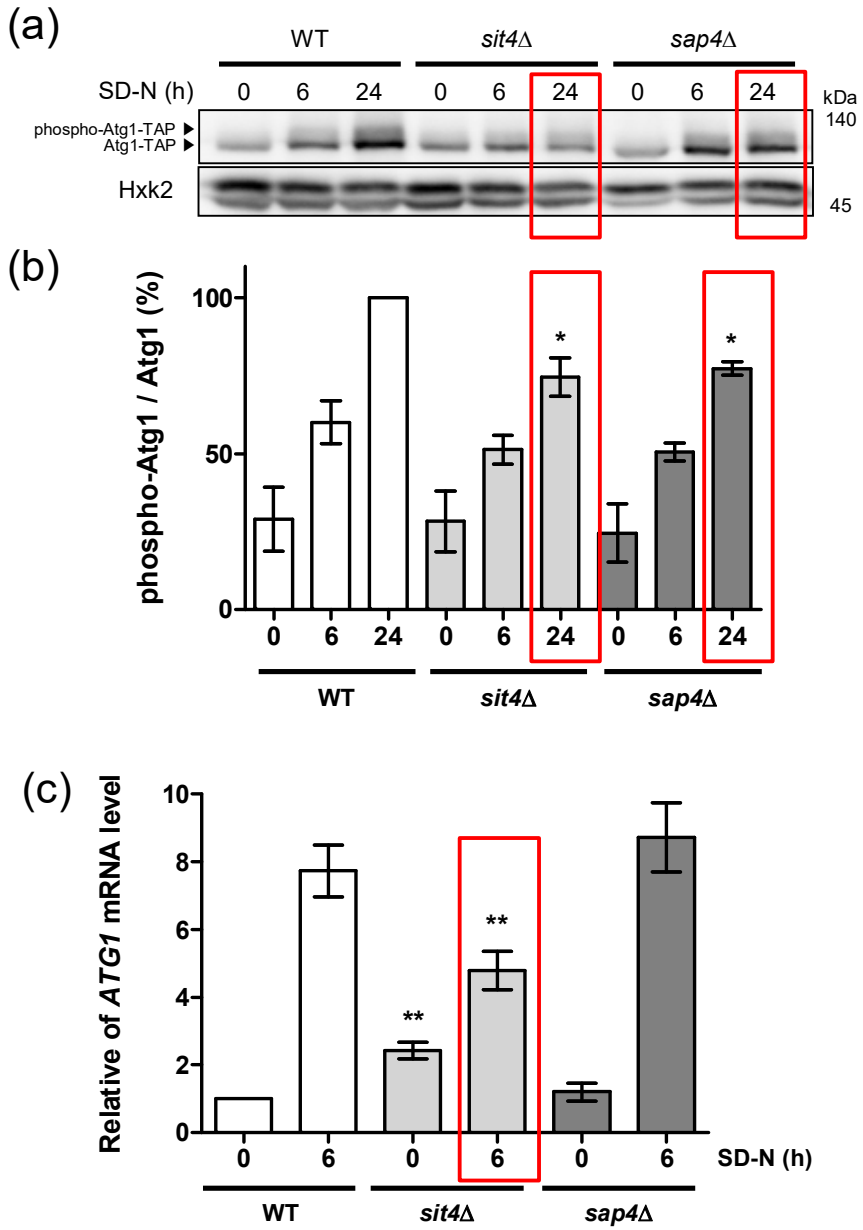


그림 6.1. *SIT4* 제거 효모의 Atg8 단백질, *ATG8* mRNA 발현량 감소
(a) 단백질 분해 효소 Pep4를 제거한 WT, *sit4*Δ, *sap4*Δ 효모를 이용하였다. GFP-Atg8을 발현하는 WT, *sit4*Δ, *sap4*Δ 효모를 단백질 분해 효소 저해제인 phenylmethylsulfonyl fluoride을 첨가한 YPD 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건(SD-N 배양액)을 통해 자가포식을 유도하였다. 각 단백질은 anti-GFP antibody를 이용하여 immunoblot되었다. Hxk2는 loading control로 활용되었다. (b) GFP 가공분석 결과를 GFP와 GFP-Atg8를 합친 각 총량을 야생 효모의 결과값에 대하여 %로 환산하였다. (c) *ATG8* mRNA level 발현량 확인을 위한 RNA 추출 및 정량적 실시간 PCR을 진행하였다. (b-c) 각 수치는 독립적인 3번 이상의 실험의 평균을 의미하며 error bar는 표준 편차를 의미한다. *P*-values는 two-tailed Student's t-test (***$P<0.001$, **$P<0.01$, *$P<0.05$)에 의해 결정되었다.

6.2. *SIT4*, *SAP4* 제거 효모의 Atg1 인산화, *ATG1* mRNA 발현량 감소

SIT4, SAP4 제거 효모에서 관찰된 자가포식 활성 감소 경향의 원인을 규명하기 위해 Atg1 인산화를 관찰하였다. Atg1은 자가포식 기작의 초기 단계에서 핵심적인 역할을 수행하는 단백질 인산화 효소이다. Atg1은 영양 결핍에 의해 TORC1이 비활성화되면 Atg13과 결합, Atg17 등 자가포식 기작 요소들과 상호작용, 다양한 기질을 인산화시킬 뿐만 아니라 본인도 인산화(autophosphorylation)된다. 인산화를 통한 Atg1의 촉매 기능 활성, PAS로의 결집, 비촉매적(non catalytic scaffolding) 역할 모두가 자가포식의 시작에 필수적이다. 하여 이러한 인산화 정도를 확인하기 위하여 Atg1에 TAP이 표지된 효모 library를 활용하였다(Gghaemmaghami et al. 2003). 해당 효모에 각각 *SIT4, SAP4*를 제거하고 인산화를 관찰하였다. 실험 결과 *SIT4, SAP4* 제거 효모 모두에서 Atg1 인산화가 감소해 있는 것을 확인하였다. 이어서 *ATG1* mRNA 발현량에도 영향을 주는지 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 실험 결과 *SIT4* 제거 효모에서 *ATG1* mRNA 발현량 또한 유의미한 감소가 있음을 확인하였다. 이는 Sit4와 Sap4가 영양 결핍 조건에서 Atg1의 인산화와 함께 *ATG1* mRNA 발현량을 조절하는 자가포식 positive regulator임을 암시한다. Sit4가 단백질 탈인산화 효소라는 것과 Sap4가 Sit4-associated protein임을 고려할 때, Sit4와 Sap4가 Atg1과의 직접적인 상호작용은 없을 것으로 사료되며, 다른 요소(인산화 효소 활성 또는 탈인산화 효소의 비활성 등)에 영향을 주어 간접적으로 Atg1의 인산화 및 *ATG1* mRNA를 조절할 것으로 판단된다.

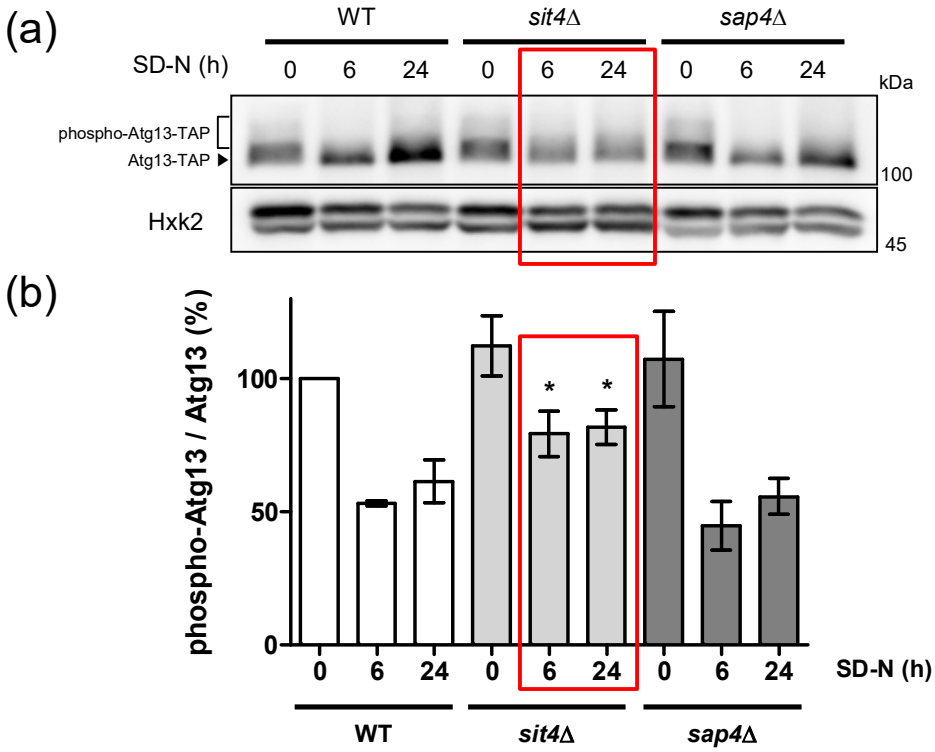

(a)
WT
sit4Δ
sap4Δ
SD-N (h)
0 6 24 0 6 24 0 6 24
kDa
140
phospho-Atg1-TAP
Atg1-TAP
Hxk2
45
(b)
phospho-Atg1 / Atg1 (%)
100
50
0
*
*
0 6 24 0 6 24 0 6 24
WT
sit4Δ
sap4Δ
(c)
Relative of ATG1 mRNA level
10
8
6
4
2
0
**
**
0 6 0 6 0 6
SD-N (h)
WT
sit4Δ
sap4Δ

6.2. *SIT4*, *SAP4* 제거 효모의 Atg1 인산화, *ATG1* mRNA 발현량 감소

(a) TAP 표지 library(Huh et al. 2003) 효모 Atg1-TAP의 *SIT4*, *SAP4*를 제거한 *sit4*Δ, *sap4*Δ 효모를 이용하였다. WT, *sit4*Δ, *sap4*Δ 효모를 SC 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건(SD-N 배양액)을 통해 자가포식을 유도하였다. 각 단백질은 anti-mouse antibody를 이용하여 immunoblot 되었다. Hxk2는 loading control로 활용되었다. (b) western blot 결과를 인산화된 Atg1-TAP(up-shift) / Atg1-TAP를 야생 효모의 결과값에 대하여 %로 환산하였다. (c) *ATG1* mRNA 발현량 확인을 위한 RNA 추출 및 정량적 실시간 PCR을 진행하였다. (b-c) 각 수치는 독립적인 3번 이상의 실험의 평균을 의미하며 error bar는 표준 편차를 의미한다. *P*-values는 two-tailed Student's t-test (***$P<0.001$, **$P<0.01$, *$P<0.05$)에 의해 결정되었다.

6.3. *SIT4* 제거 효모의 Atg13 인산화 증가

SIT4, SAP4 제거 효모에서 관찰된 자가포식 활성 감소 경향의 원인을 규명하기 위한 실험으로 Atg13 인산화를 관찰하였다. Atg13은 자가포식 기작의 가장 초기 단계에서 핵심적인 역할을 수행하는 단백질이다. Atg13 영양분이 풍부한 조건에서는 TORC1에 의해 과인산화 상태로 존재하는데, 영양 결핍 조건에서 TORC1의 활성이 억제됨에 따라 탈인산화가 진행된다. 이는 Atg1과의 결합으로 이어지고 Atg17 등 자가포식 기작 요소들과 상호작용함으로써 자가포식을 촉진한다. 하여 이러한 인산화를 확인하기 위하여 Atg13에 TAP 이 표지된 효모 library를 활용하였다 (Gghaemmaghami et al. 2003). 해당 효모에 각각 *SIT4, SAP4*를 제거하고 인산화를 관찰하였다. 실험 결과 *SIT4* 제거 효모 Atg13 인산화가 증가해 있는 것을 확인하였다. 이는 Sit4가 영양결핍 조건에서 직접 혹은 간접적으로 Atg13의 탈인산화를 촉진하는 탈인산화 효소일 가능성을 제시한다.



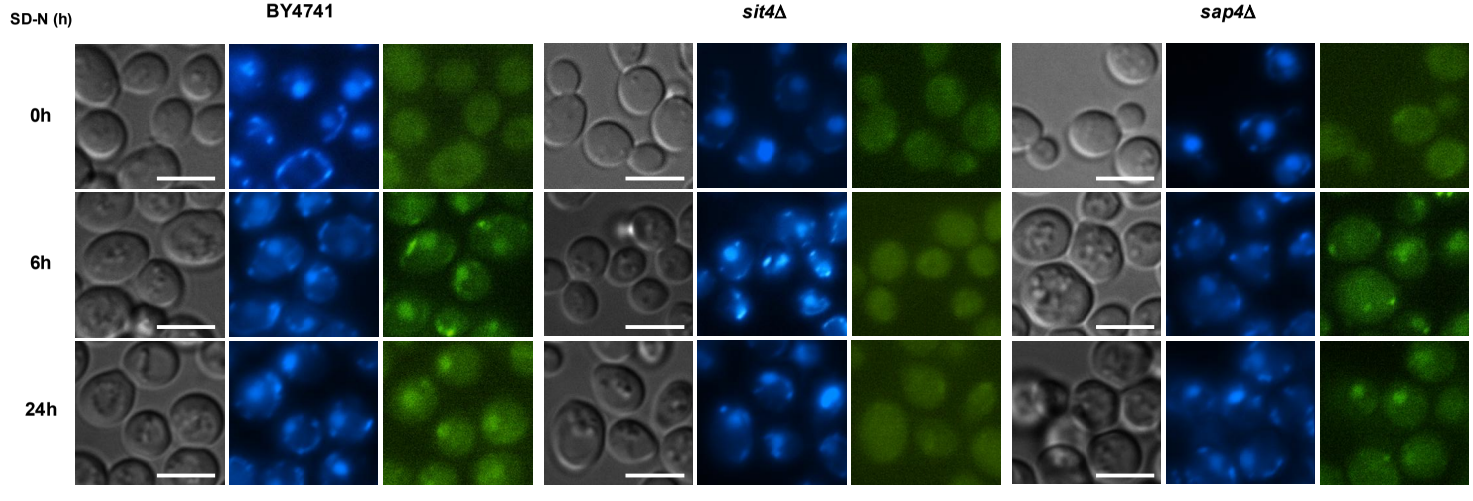
6.3. *SIT4* 제거 효모의 Atg13 인산화 증가

(a) TAP 표지 library(Huh et al. 2003) 효모 Atg13-TAP 의 *SIT4*, *SAP4*를 제거한 *sit4*Δ, *sap4*Δ 효모를 이용하였다. WT, *sit4*Δ, *sap4*Δ 효모를 SC 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건(SD-N 배양액)을 통해 자가포식을 유도하였다. 각 단백질은 anti-mouse antibody를 이용하여 immunoblot 되었다. Hxk2는 loading control로 활용되었다. (b) western blot 결과를 인산화된 Atg13-TAP(up-shift) / Atg13-TAP를 야생 효모의 결과값에 대하여 %로 환산하였다. 각 수치는 독립적인 3번 이상의 실험의 평균을 의미하며 error bar는 표준 편차를 의미한다. *P*-values는 two-tailed Student's t-test (***$P<0.001$, **$P<0.01$, *$P<0.05$)에 의해 결정되었다.

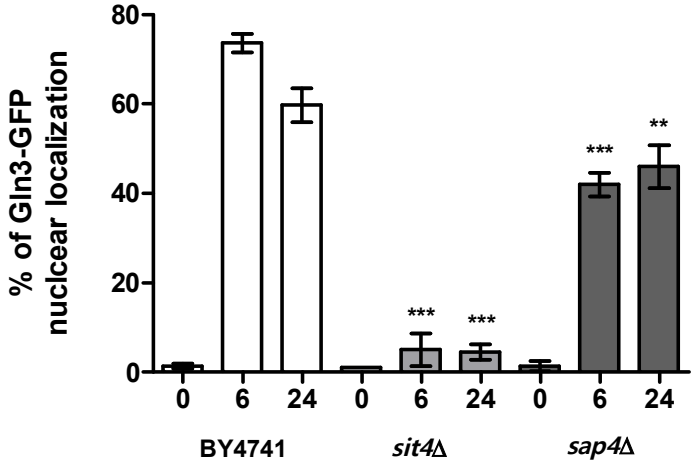
6.4. *SIT4*, *SAP4* 제거 효모의 Gln3 핵 이동 감소

효모에서 Sit4는 PP2A 탈인산화효소와 함께 영양 조건에 따른 영양 대사 적응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이는 TORC1 signaling pathway를 통해 이뤄지는데, 영양 결핍 조건이나 proline 등과 같은 비선호적인 아미노산만이 존재할 때 이러한 아미노산을 활용하기 위해 nitrogen catabolite repression gene 발현을 촉진하는 경로이다. 이는 핵 내 promoter에 직접 결합하는 GATA-like transcription factors인 Gln3, Gat1 등에 의해 조절된다. 영양 풍부 조건에서는 TORC1에 Tap42-PP2A, Tap42-Sit4가 인산화된 상태로 결합하여 PP2A와 Sit4 탈인산화효소 활성이 저해된다. 영양 결핍 조건에서는 TORC1에서 Tap42, PP2A, Sit4가 각각 분리, 탈인산화된다. 이렇게 탈인산화된 PP2A와 Sit4는 Gln3와 Gat1과 같은 transcription factor를 탈인산화시키고, 탈인산화된 Gln3와 Gat1은 핵 내로 들어가 nitrogen catabolite repression gene 발현을 촉진한다. 최근 연구에 의하면 Gln3가 이러한 질소 부족 조건에서 nitrogen catabolite repression gene 뿐만 아니라 자가포식 관련된 유전자(*ATG*, autophagy-related gene) 또한 촉진한다는 것이 밝혀졌다. 이러한 연구 결과들을 고려할 때, Sit4와 Sap4가 이러한 TORC1 signaling pathway 내에서 기능을 할 수 있다는 것과 동시에 이를 통해 자가포식을 조절할 수 있다는 가능성을 제시한다. 이를 확인하기 위하여 야생 효모와 *SIT4*와 *SAP4* 제거 효모의 Gln3에 GFP를 표지하고 영양 결핍 조건에서 Gln3-GFP가 핵 내 위치 경향을 확인하였다. 실험 결과 야생형 효모에 비해 *SIT4* 제거 효모에서 영양 결핍 조건에서 Gln3-GFP의 핵으로의 이동이 현저히 감소된 것을 확인하였다. 또한 *SAP4* 제거 효모에서도 *SIT4* 제거 효모에서 만큼은 아니지만 유의미하게 Gln3-GFP의 핵으로의 이동이 감소된 것을 확인하였다. 이러한 실험 결과는 기존에 잘 알려진 TORC1 signaling pathway를 통해 Sit4와 Sap4가 영양 결핍 조건에서 Gln3의 핵으로의 이동을 촉진하며, 이를 통해 자가포식 관련 유전자의 발현을 촉진하고 나아가 자가포식을 촉진함을 암시한다.

(a)



(b)



6.4. *SIT4*, *SAP4* 제거 효모의 Gln3 핵 이동 감소

(a) Gln3-GFP를 발현하는 WT, *sit4*Δ, *sap4*Δ 효모를 YPD 배양액에서 mid log phase까지 배양 후 기재된 시간 만큼 질소 결핍 조건(SD-N 배양액)을 통해 자가포식을 유도하였다. Gln3-GFP 형광 신호는 형광현미경을 통해 관찰되었고 DNA는 DAPI를 통해 염색하였다. scale bars는 4μm를 의미한다. (b) Gln3-GFP의 핵 내 위치 사진 및 분석은 최소 200개 이상의 효모의 수를 통해 진행하였다. 각 수치는 독립적인 3번 이상의 실험의 평균을 의미하며 error bar는 표준 편차를 의미한다. *P*-values는 two-tailed Student's t-test (***$P<0.001$, **$P<0.01$, *$P<0.05$)에 의해 결정되었다.

Ⅲ. 논의

본 연구는 자가포식 조절하는 새로운 단백질 탈인산화효소를 찾기 위한 목적으로 연구를 진행하였다. 기존 연구를 통해 자가포식 조절에 관여하는 다양한 단백질 인산화효소와 단백질 탈인산화효소의 종류와 역할, 작용 기작에 대해서 밝혀졌다. 하지만 상대적으로 여전히 자가포식의 기전 속에서 발생하는 분자 생물학적 작용들을 설명하기 위한 단백질 탈인산화효소의 종류와 그 역할, 작용 기작에 대해서 알려진 것이 부족하다. 아직 밝혀지지 않은 것 중 대표적으로 영양이 풍부한 조건에서 Vps34와 Atg1의 탈인산화효소, 영양이 부족한 조건에서 Atg13의 탈인산화효소이다. Vps34, Atg1, Atg13 모두 자가포식의 시작과 진행에 핵심 단백질이며 이들의 인산화/탈인산화가 없으면 자가포식의 결함이 발생한다. 그렇기 때문에 자가포식 기작을 이해하기 위해서는 단백질 탈인산화효소에 대한 연구는 반드시 필요하다.

이에 따라 효모에서 알려진 43개의 단백질 탈인산화효소 중 35개의 단백질 탈인산화효소를 후보군으로써 스크리닝 실험을 진행하였다. 스크리닝 실험 결과 8개의 후보군을 선별할 수 있었으며, 이 가운데 3개는 기존 연구에 의해 자가포식 조절에 관여하는 단백질 탈인산화효소라는 것이 밝혀져 있었다. 하여 3개 후보군을 제외한 5개의 단백질 탈인산화효소에 대해서 자가포식과의 연관성을 연구하였다. 비교적 긴 영양결핍 조건을 부여한 GFP 가공분석 실험을 통해 Sit4가 유의미하게 자가포식 활성이 감소되는 것을 확인하였다. Sit4는 기존 연구를 통해 세포 주기 진행, 질소 물질대사 등 다양한 생물학적 기작에 관여한다는 것이 밝혀졌다. 하지만 자가포식과 연관성은 모호한 상황이었다. 이에 따라 Sit4를 최종 후보군으로 스크리닝 실험을 검증하기 위해 야생 효모의 *SIT4*를 직접 제거하여 GFP 가공분석, Pho8Δ60 분석을 진행하였다. *SIT4* 제거 효모에서 나타나는 지속적인 자가포식 활성 감소 경향을 통해 Sit4가 자가포식 활성을 조절하는 positive regulator라는 것을 알 수 있었다. 이러한 Sit4가 생리학적 기능을 수행할 때 다양한 단백질들과 상호작용한다는 기존 연구 결과를 참고하여 상호작용 단백질에 대해 스크리닝 실험을 진행하였다. 해당 실험을 통해 *SAP4* 제거 효모에서 자가포식 활성이 감

소하는 것을 확인하였다. Sap4는 Sit4와 복합체를 형성하며 세포 주기 진행과 관련된 기능을 수행한다는 연구가 보고되었으나, 자가포식과의 연관성을 포함한 단백질의 생리학적 기능 전반에 대한 연구가 미흡하다. 하여 Sit4와 함께 Sap4가 자가포식 조절의 positive regulator로써 생리학적 역할을 할 것이라고 가정하고 이를 검증하기 위해 추후 실험을 진행하였다. Sit4와 Sap4가 선택적 자가포식 조절에도 관여하는지 확인하기 위하여 선택적 자가포식에 대한 GFP 가공 분석을 진행하였고, 이를 통해 Sit4와 Sap4가 전반적인 자가포식 조절에 관여하는 것을 알 수 있었다. 이후 Sit4와 Sap4가 자가포식 기작 내 핵심 단백질 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위해 Atg8, Atg1, Atg13에 대한 실험을 진행하였고, 이를 통해 Sit4와 Sap4가 Atg8 발현, ATG8 mRNA 발현, Atg1 인산화, ATG1 mRNA 발현, Atg13 인산화에 관여하는 것을 확인하였다. 또한 Sit4와 TORC1 signaling pathway를 통해 자가포식 유전자 발현을 촉진한다고 알려진 Gln3의 핵 내 위치에 영양 결핍 조건에서 Sit4와 Sap4가 영향을 주는지 확인하기 위한 형광현미경 실험을 통해 *SIT4*, *SAP4* 제거 효모에서 Gln3의 핵 내 위치가 유의미하게 감소하는 것을 알 수 있었다.

일련의 실험을 통해 Sit4와 Sap4가 질소 결핍 조건에서 자가포식의 positive regulator로써 역할을 수행할 것이라는 가정을 검증할 수 있었다. 특히 Sit4와의 단백질 상호작용한다는 실험 결과 외에는 밝혀진 것이 없던 Sap4가 자가포식 조절에 관여하는 것을 확인한 것은 그 의미가 크다고 할 수 있다. 또한 *SIT4* 제거 효모에서 나타나는 자가포식 활성 감소 정도가 *SAP4*에 비해 더 큰 것으로 미루어 볼 때, Sap4는 Sit4와의 단백질 간의 상호작용을 통해 자가포식을 조절하는 자가포식 관련 Sit4-associated positive factor로 역할을 할 것으로 사료된다.

그리고 Sit4가 기존에 세포 주기와 질소 물질대사 등의 다른 분자생물학적 경로 조절과 관련이 있다고 보고된 것과 실험결과로 미루어볼 때 이러한 생물학적 경로와 자가포식 간의 조절이 Sit4를 통해 매개될 가능성을 시사한다.

하지만 본 연구에서는 영양 결핍 조건에서 Sit4와 Sap4의 직접적인 물리적 상호작용을 하는지, 이를 통해 자가포식을 조절하는지는 밝히지 못하였다. 또한 *SIT4* 제거 효모의 Atg13 인산화 증가를 확인한 실험을 통해 Atg13이 Sit4의 기질일 가능성은 제시하였지만, 정말 효소-기질 관계가 맞는지 검증하지 않았다. 이러한 점에서 본 연구는 한계가 존재한다. 본 연구에서 검증되지 못한 부분들은 Co-immunoprecipitation 등의 실험을 통해 확인이 필요할 것으로 사료된다.

Sit4의 경우 일부 연구(Tomohiro Yorimitsu et al. 2009., Akter MST Yeasmin et al. 2016. 등)에서 자가포식 조절과 연관이 없을 것이라는 주장을 펼친 연구 결과가 존재한다. 하지만 본 실험의 조건과 상이한 점과 함께 자가포식 조절과 관련된 다양한 관점에서의 Sit4의 영향 분석이 부족하다. 따라서 본 연구에서 자가포식 조절과 관련된 다양한 관점에서의 Sit4의 영향 검증 실험은 Sit4가 자가포식과 직접적인 연관성이 있으며 나아가 positive regulator라는 것을 충분히 뒷받침한다고 생각한다.

이러한 자가포식 조절 인자에 대한 연구는 면역, 노화, 신경퇴행성 질환, 암 등과 같이 자가포식과 관련되어 있다고 알려진 생명 현상, 질병에 대한 정확한 이해를 할 수 있게 된다. 그리고 나아가 관련 질병의 치료에 한 걸음 더 다가가는 기반을 마련할 수 있다는 점에서 중요한 의의를 지닌다.

참 고 문 헌

Huh, WK., Falvo, J., Gerke, L. et al. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. Nature 425, 686 – 691

Ariño, J., Velázquez, D., & Casamayor, A. (2019). Ser/Thr protein phosphatases in fungi: structure, regulation and function. Microbial cell (Graz, Austria), 6(5), 217 – 256. https://doi.org/10.15698/mic2019.05.677

Offley, Sarah R, and Martin C Schmidt. (2019). Protein phosphatases of Saccharomyces cerevisiae. Current genetics vol. 65,1 : 41-55. doi:10.1007/s00294-018-0884-y

Torggler, R., Papinski, D., & Kraft, C. (2017). Assays to Monitor Autophagy in Saccharomyces cerevisiae. Cells, 6(3), 23.

Takeshi Noda, Daniel J. Klionsky. (2008). Chapter 3 The Quantitative Pho8Δ60 Assay of Nonspecific Autophagy. Volume 451, Pages 33-42

Eduardo Cebollero, Fulvio Reggiori. (2009). Regulation of autophagy in yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. Volume 1793, Issue 9, Pages 1413-1421. ISSN 0167-4889,

James H. Hurley and Lindsey N. Young. (2017). Mechanisms of Autophagy Initiation. Annu. Rev. Biochem. 86:225 – 44.

Hideaki Morishita and Noboru Mizushima. (2019). Diverse Cellular Roles of Autophagy. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 35:453 – 75.

Joaquín Ariño1, Diego Velázquez1 and Antonio Casamayor. (2019). Ser/Thr protein phosphatases in fungi: structure, regulation and function. Microbial Cell, Vol. 6, No. 5, pp. 217 - 256

Sarah R. Offley and Martin C. Schmidt. (2019). Protein Phosphatases of S. cerevisiae. Curr Genet. 65(1): 41 – 55.

Yeasmin AM, Waliullah TM, Kondo A, Kaneko A, Koike N, Ushimaru T. (2016). Orchestrated Action of PP2A Antagonizes Atg13 Phosphorylation and Promotes Autophagy after the Inactivation of TORC1. PLoS ONE 11(12): e0166636.

Bernard A, Jin M, Xu Z, Klionsky DJ. (2015). A large-scale analysis of autophagy-related gene expression identifies new regulators of autophagy. Autophagy. Nov 2;11(11):2114-2122. doi: 10.1080/15548627.2015.1099796. PMID: 26649943; PMCID: PMC4824583.

Luke, M. M., Della Seta, F., Di Como, C. J., Sugimoto, H., Kobayashi, R., & Arndt, K. T. (1996). The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. Molecular and cellular biology, 16(6), 2744 - 2755. https://doi.org/10.1128/MCB.16.6.2744

Chan, T. F., Bertram, P. G., Ai, W., & Zheng, X. F. (2001). Regulation of APG14 expression by the GATA-type transcription factor Gln3p. The Journal of biological chemistry, 276(9), 6463 - 6467. https://doi.org/10.1074/jbc.M008162200

Bernard, A., Jin, M., Xu, Z., & Klionsky, D. J. (2015). A large-scale analysis of autophagy-related gene expression identifies new regulators of autophagy. Autophagy, 11(11), 2114 - 2122. https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1099796

Beck, T., Hall, M. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. Nature, 402, 689 - 692. https://doi.org/10.1038/45287

Yan, G., Shen, X., & Jiang, Y. (2006). Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. The EMBO journal, 25(15), 3546 - 3555. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601239

Abstract

Study on the roles of Sit4 protein phosphatase on autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*

Hanyeol Nam
School of Biological Sciences
The Graduate School
Seoul National University

Autophagy is a essential mechanism that transports and degrades cellular components *e.g.* organelles, pathogens into vacuole (yeasts and plants) or lysosomes (animals). This degrades some of the components upon nutritional deficiency conditions and provides essential components for mechanisms that maintain essential cellular activities such as respiratory activities. It also removes components unnecessary or adversely affecting the cell. This autophagy mechanism is conserved in a variety of eukaryotes, from yeast to animals and humans, suggesting that autophagy is an important mechanism for maintaining essential life activities. And this autophagy is pointed out as the main cause of aging, innate immunity, neurodegenerative diseases, and cancer. Numerous studies have shown that autophagy is controlled by various kinases and phosphatases. However, it is still insufficient to explain the molecular biological actions that occur in the mechanism of autophagy,

especially because there is a lack of knowledge about the types, functions, and mechanisms of action of phosphatases. Based on the possibility that various phosphatases are expected to affect autophagy, I studied the association between autophagy and phosphatases to identify novel protein phosphatases affecting autophagy. First, screening experiments were conducted using 35 yeast strains that protein phosphatase was deleted. GFP processing screening identified that eight yeast strains have a propensity for decreased autophagy flux upon nitrogen starvation. Three of them are protein phosphatases known to be involved in autophagy through previous studies. For further verification of the remaining five candidates, experiments upon 15- and 24-hour nitrogen starvation confirmed that yeast strains deleted *SIT4* had a prospensity for continuously decreasing autophagy flux compared to wild type yeast strains. Sit4 protein phosphatase is a PP2A-related serine-threonine protein phosphatase whose structure and function are conserved not only in yeast but also in overall eukaryotes including humans (PPP6C). According to recent studies, Sit4 protein phosphase is known to be involved in various mechanisms such as cell cycle progression and nitrogen metabolism. However, the direct association between Sit4 and autophagy was ambiguous, and considering the results of these experiments, it was considered necessary to investigate the association between Sit4 protein phosphatase and autophagy. To find the Sit4-interacting proteins affecting autophagy, additional screening were conducted and confirmed that Sap4 also had prospensity for decreasing autophagy flux upon nutritional deficiency conditions. Therefore, further experiments were conducted to investigate the association between Sit4 and Sap4 with autophagy. The effects on selective autophagy that degrades only specific cell organelles were researched, and the effects of Sit4 and Sap4 on key components of autophagy mechanism were subsequently researched. As a result of a series of experiments,

effects of Sit4 protein phosphatase and Sap4 protein on autophagy were observed. Atg8 protein expression and *ATG8* mRNA levels, Atg1 phosphorylation and *ATG1* mRNA levels were decreased and Atg13 phosphorylation levels were increased in *SIT4* or *SAP4* deleted yeast strains. In addition, with experiments for Gln3 localization to nucleus upon nitrogen starvation, it was confirmed that the nucelar localization of Gln3 was significantly reduced in both *SIT4* and *SAP4* deleted yeast strains. Through a series of experimental results, it was confirmed that Sit4 is a positive regulator that regulates autophagy through various physiological roles that regulate transcriptional levels of *ATG8* and *ATG1*, Atg1 and Atg13 phosphorylation levels, nuclear localization of Gln3. Sap4 is considered to play a role as a positive factor to control or enhance Sit4 activities, given that the effects of *SIT4* deletion on autophagy were greater than that of *SAP4* deletion and the results of previous studies that showed that Sap4 forms a complex with Sit4 to promotes its activities.

This study revealed the direct association between Sit4 and Sap4 with autophagy, which was not previously investigated, and further investigated that it plays a role as the positive regulators of autophagy.

Studies on the autophagy regulators enable an accurate understanding of life phenomena and diseases known to be related to autophagy, such as immunity, aging, neurodegenerative diseases, and cancer. Furthermore, it is meaningful in that it can lay the foundation for approaching disease treatments by presenting various perspectives on the treatment approach for related diseases.

keywords : Yeast, Autophagy, Phosphatase, Sit4, Sap4, GFP-Atg8 processing assay, Pho8Δ60 assay
Student Number : 2020-24228