



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](#)

이학석사학위논문

**Human MST2 인산화효소의
기질 특이성에 관한 연구**

Characterization of the substrate specificity
of human MST2 kinase

2016년 2월

서울대학교 대학원

생명과학부

배수진

ABSTRACT

Characterization of the substrate specificity of human MST2 kinase

Sujin Bae

School of Biological Sciences

The Graduate School

Seoul National University

Mammalian Hippo signaling plays an important role in controlling organ size by regulating cell growth, proliferation and apoptosis. Dysregulation of this pathway is implicated in several human diseases including cancer. MST2 (also known as STK3/Hpo in *Drosophila*) is an upstream kinase in the Hippo signaling pathway, to activate LATS1 kinase, which in turn phosphorylates and inactivates a transcriptional coactivator, YAP (Yes associated protein). Previous structural study of the MST2 kinase domain showed that it forms a canonical kinase fold. However, it did not explain the substrate specificity of MST2 kinase and the molecular mechanism of substrate binding. Here, to investigate substrate specificity of MST2 kinase, we performed in vitro

kinase assays using the several different substrates, including MOB1, LATS1, and YAP1. Unexpectedly, YAP1 as well as YAP1 peptide containing well-known phosphorylation site, Ser127, were readily phosphorylated by MST2. LATS1, a cellular substrate of MST2 was phosphorylated by MST2, whereas LATS1 peptide including Thr1079 could not be phosphorylated, implying for the importance of three dimensional structure of the substrate in some cases. Sequence analysis of various substrates suggests that there is no consensus sequence motif for MST2 kinase but the presence of at least one or more basic amino acids surrounding the phosphorylation site is highly preferred. These results will greatly improve our understanding of substrate specificity of MST2 kinase and be helpful for future structural study of the MST2-substrate complexes.

Keywords : MST2 kinase structure, LATS kinase, MOB1, YAP1, Hippo signaling pathway, MST2 specificity

Student Number : 2013-20294

목 차

초록	1
목차	3
서론	4
실험 재료 및 방법.....	12
재조합 플라스미드와 항체	12
GST-단백질 및 펩타이드의 정제	13
in vitro kinase assay	15
Thrombin cleavage.....	15
인산화단백질 염색	15
실험 결과	17
MST2에 의한 기질 단백질의 인산화와 기질 펩타이드의 정제 ...	17
MST2에 의한 기질 펩타이드의 인산화	24
결론	29
참고문헌	35

서론

진핵생물에서의 단백질 인산화효소 (Protein kinase)는 작용하는 아미노산 잔기에 따라 Tyrosine 과 Serine/Threonine 인산화효소로 구분할 수 있다 (Ubersax JA et al., 2007). Serine/Threonine 단백질 인산화효소는 ATP의 γ -인산기 그룹(γ -phosphoate group)을 기질의 Serine/Threonine side chain의 하이드록시기(Hydroxyl group)에 전달하는 과정을 거쳐 세포내의 중요한 조절자로 작용한다 (Ross I. Brinkworth et al., 2007). 이러한 인산화효소에 의한 단백질 인산화는 생체 내 신호전달의 중요한 기작을 담당하는 번역 후 변형(post-translational modification) 과정을 담당한다 ((Ubersax JA et al., 2007; Ross I. Brinkworth et al., 2007). 본 연구 내용의 주제인 MST2 (STK3/Hpo)는 세포증식 및 세포기관의 크기 조절에 관여하는 Hippo 신호전달 과정에서의 중요한 역할을 하는 인산화 효소이다 (Fa-Xing Yu et al., 2013; Zhao B et al., 2011).

MST 단백질 인산화효소는 모두 4가지의 subtype이 알려져 있으며 사람에서 MST1/2와 MST3/4는 서로 다른 세포 내 기능을 갖는다 (Record CJ et al., 2010). MST1/2는 JNK/p38 MAPK kinase 신호전달의 활성화 및 Hippo 신호전달 경로에 관여하는 반면, MST3/4는 ERK의 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Record CJ et al., 2010).

이렇듯 서로 다른 기작을 가지고 있으나 각 kinase 도메인들 사이의

아미노산 서열은 약 90%의 높은 유사성을 갖는다. 반면 카르복시 말단 도메인은 서열의 유사성이 20%정도로 상대적으로 낮으며 효소 활성의 조절 기능을 하는 것으로 알려져 있다 (Record CJ et al., 2010; Graves JD et al., 1998). MST family(1-4)의 kinase 도메인은 각각의 구조들이 모두 밝혀져 있는데, 높은 아미노산 서열의 유사성으로부터 예상되는 바와 같이 삼차 구조가 매우 비슷하다. MST2는 아미노 말단의 kinase 도메인 뿐 아니라 카르복시 말단의 SARAH 도메인의 구조도 보고되어 있다 (그림 1). 그림 1에서 보듯이 MST2의 카르복시 말단 SARAH 도메인은 α -helix로 이루어져 있으며 homodimer를 형성한다 (PDB ID: 4OH9). 이러한 homodimerization은 kinase 도메인의 Thr 180 잔기에서의 자가인산화와 활성화를 야기시키는 것으로 알려져 있다 (Ni L et al., 2013).

MST family의 kinase 도메인은 N lobe와 C lobe로 이루어진 전형적인 kinase 구조를 형성하고 있으며, 활성 상태와 비활성 상태의 구조 역시 기존에 보고된 구조적 특징을 잘 따르고 있다 (그림 2). 2013년도에 보고된 MST2 kinase 도메인 구조는 146번 catalytic 잔기인 Aspartic acid가 Asparagine으로 치환되고 activation loop의 Thr 180 잔기가 비인산화되어 있는 비활성 상태의 구조이다 (PDB ID: 4LG4) (Ni L et al., 2013).

반면, 2008년도에 발표된 MST1 kinase 도메인 구조는 activation loop의 Thr177, Thr 183 잔기가 인산화된 활성 상태의 구조이다 (PDB code 3COM). 기존에 보고된 바와 같이 activation loop에

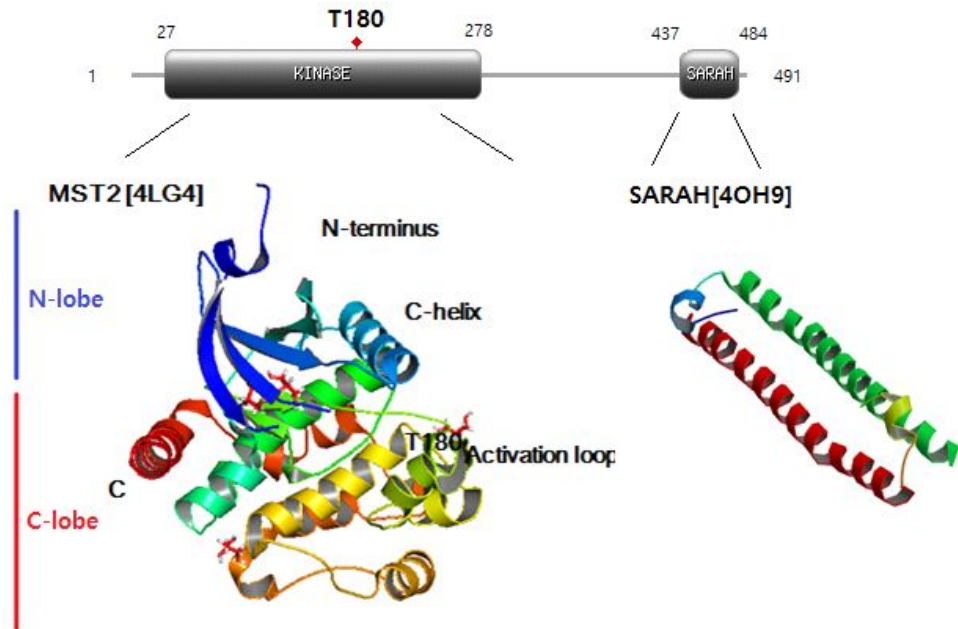


그림 1. MST2 인산화효소의 도메인 모식도와 구조

아미노 말단의 kinase 도메인과 그의 activation loop에 포함되어 있는 Thr 180 잔기 가 표기되어 있다. 각 kinase 도메인 (4LG4), SARAH 도메인 (4OH9)에 해당하는 구조가 나타나 있는데, kinase 도메인의 경우 남색, 파란색으로 표시된 부분이 ATP-binding site에 관련된 N-lobe이며 붉은색, 주황색, 노랑색, 초록색의 부분이 기질단백질을 인식하여 인산화반응에 참여하는 C-lobe이다. SARAH 도메인은 붉은색과 초록색으로 표시된 α -helix가 homodimer를 이룬 구조를 가지고 있다.

존재하는 Serine/Threonine 잔기의 인산화에 의해 loop의 구조 및 위치 변화를 관찰할 수 있다. 즉, 활성이 있는 MST2의 경우에는 인산화된 activation loop가 기질의 결합을 가능하게 하는 extended conformation을 취하고, 비활성 상태의 MST2는 비인산화된 activation loop가 alpha helix를 형성하여 기질 결합 위치와 활성 위치를 방해하고 있다 (Ni L et al., 2013).

MST2는 모든 세포에서 보편적으로 발현되며 Hippo 신호전달에서 LATS1, WW45, MOB1과 함께 주요한 인자로서 작용한다 (Jose M et al., 2013; Laura R et al., 2010; Gogl G et al., 2015; Lee KP et al., 2010). 그림 3은 사람에서의 canonical Hippo 신호전달을 나타낸 모식도이다. Hippo 신호가 있을 때 MST2는 SARAH 도메인을 통한homodimerization에 의하여 activation loop의 T180이 trans-autophosphorylation되어 활성화된다 (Ni L et al., 2013).

WW45은 WW 도메인과 SARAH 도메인을 가지고 있는데, SARAH 도메인을 통하여 MST2 SARAH 도메인과 결합하고 WW 도메인은 NDR/LATS (Large tumor suppressor) 인산화 효소의 PPXY motif와 결합함으로써 scaffolding 역할을 하는 단백질이다 (Lee KP et al., 2010; Salah Z et al., 2012). LATS1은 다른 NDR family 인산화 효소와 함께 AGC 인산화효소 그룹에 속하는데, 활성화되기 위해서는 두 군데의 진화적으로 보존된 regulatory site가 순차적으로 인산화되는 과정이 필요하다 (Chan EH et al., 2005). 즉, 활성화된 MST2에 의하여 먼저 카르복시 말단 HM motif의 Thr 1079 잔기에

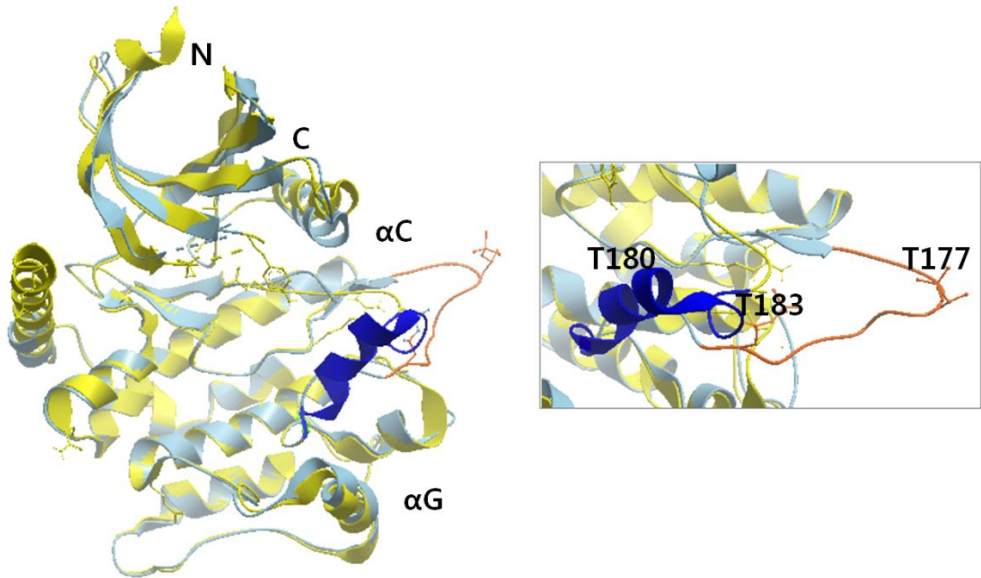


그림 2. MST1과 MST2 구조의 activation loop 형태 비교

Activation loop의 Thr177와 Thr183이 인산화되어 활성상태의 MST1(PDB code : 3COM) 과 Thr180이 인산화되어 있지 않은 비활성 상태의 MST2 (PDB code : 4LGD)의 구조를 비교한 그림이다. MST1과 MST2는 각각 하늘색과 노란색으로 나타내었으며, activation loop는 주황색 선 (MST1)과 파란색 코일 (MST2)로 표시되어 있다.

인산화가 일어난 후, activation loop의 Ser 909 잔기에서 자가인산화가 일어나 완전히 활성화 되는 특징을 가지고 있다 (Chan EH et al., 2005). MOB1 (Mps one binder kinase activator-like 1) 단백질은 효모에서 사람에 이르기까지 잘 보존되어 있으며, LATS1의 activator로 기능하는 것으로 알려져 있다 (Alexander Hergovich, 2012). 활성화된 MST2는 kinase와 SARAH 도메인 사이의 linker에 MOB1이 docking할 수 있는 구조를 만들어, MOB1 아미노 말단 부위의 Thr12번과 Thr35번을 인산화 시킨다 (Praskova M et al., 2008; Lisheng Ni et al., 2015). 인산화된 MOB1은 LATS1의 아미노 말단에 위치한 MOB1 결합 도메인과 상호작용 함에 따라 LATS1을 MST2와 가깝게 위치하게 하여 HM부위가 인산화될 수 있도록 돕는 scaffolding 역할을 한다 (Lisheng Ni et al., 2015). Hippo 신호전달에서 주요한 effector로서 작용하는 YAP1(Yes-associated protein)은 핵 안에서 TEAD등의 전사인자와 결합하여 cyclin E과 같이 cell cycle에 관여되거나 Diap1과 같은 세포사멸을 막는 유전자들의 전사를 유도하는 단백질이다 (Tsutomu Oka et al., 2008; Kodaka M et al., 2015). 그러나 활성화된 LATS1에 의하여 YAP1의 Ser 127번 잔기에 인산화가 되면 세포질의 14-3-3 단백질과 결합하여 핵 내로 이동하는 대신 세포질에 머무르게 되어 세포사멸이 방해되지 않고 일어나게 된다 (Kodaka M et al., 2015; Zhao B et al., 2011).

이러한 Hippo 신호전달의 조절 이상은 세포의 정상적인 증식과 사멸을 방해하여 암을 야기할 수 있으며 사람에서는 간, 췌장, 심장

등의 발암에 관련된 연구가 이루어진 바 있다 (Kieran et al., 2013). Hippo 신호전달경로에서 상위 단계 조절자 역할을 하는 MST2가 기질을 인산화시키는 정확한 기작을 이해하는 것은 이러한 암 억제연구에 관련된 중요한 단서가 될 수 있는데 현재까지 MST2의 기질 특이성에 관한 연구는 매우 제한적으로 이루어져 있다.

본 연구에서는 Hippo 신호 전달에서 MST2가 직접적으로 인산화시키는 기질들과 그 기질들의 인산화자리를 포함하는 펩타이드를 고안하여 in vitro kinase assay를 해봄으로써, 다른 인산화 효소들과 달리 MST2는 어떠한 기질 특이성을 가지는지 연구하였다. 이와 같은 MST2 효소의 기질 특이성에 대한 이해는 이 단백질이 주요하게 작용하는 Hippo 신호전달의 조절 기작을 이해하고 나아가 Hippo 신호전달 과정을 특이적으로 저해하고 조절할 수 있는 억제제 또는 조절제 개발에 중요한 정보를 제공할 것이다.

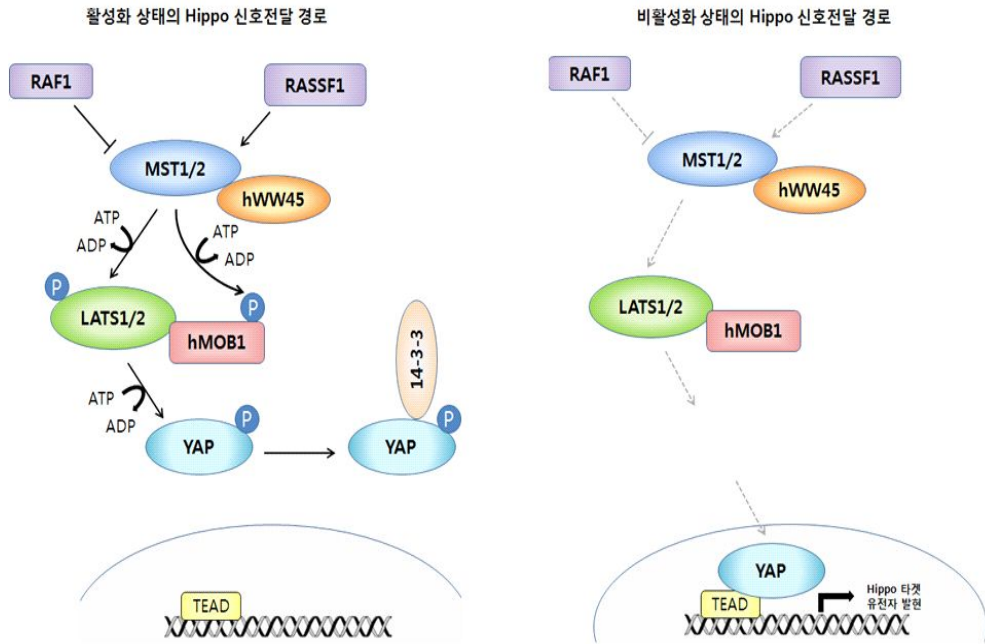


그림 3. Canonical Hippo signaling pathway 모식도

활성화 상태와 비활성화 상태의 사람에서의 canonical Hippo 신호전달을 나타낸 그림이다. Hippo 신호전달이 일어날 때 RASSF1 등의 상위 단백질에 의하여 MST1/2의 활성화가 일어나면 adaptor protein인 hWW45의 도움을 받아 LATS1/2가 인산화된다. 이 때 MST2에 의하여 인산화된 MOB1이 이 과정을 돕는 scaffolding 단백질 역할을 한다. 인산화된 LATS1은 전사활성인자인 YAP1의 인산화 및 14-3-3과의 상호작용을 유도하여 세포질에 머물도록 한다. 반면 Hippo 신호전달이 일어나지 않을 때는 YAP1이 핵 안으로 들어가 세포 사멸을 억제하는 유전자들을 발현시키는 기작을 가지고 있다.

실험 재료 및 방법

재조합 플라스미드와 항체

human MST2(MST2-16 491, 이하 MST2)는 아미노 말단에 GST tag와 tobacco etch virus (TEV) cleavage site를 포함하고 있는 pGEX-TEV-KG 벡터에 클로닝되었다. MST2의 56번 Lys을 Arg으로 치환시킨 비활성 돌연변이(MST2-16 491-K56R, 이하 MST2-K56R)는 QuickChange (Stratagene) 방법으로 제작되었다. MOB1은 1번 아미노산을 제외한 전체 단백질을 TEV에 의해 제거될 수 있는 GST tag와 fusion 시켜서 발현되도록 재조합 플라스미드를 만들었다 (pGEX-KG-MOB1-2-216 : 이하 MOB1). YAP1은 단백질의 solubility를 증가시키기 위해 아미노 말단의 48개 아미노산을 제외한 단백질을 발현시키도록 고안하였다 (pGEX-KG-YAP1-49end : 이하 YAP1). LATS1은 기능이 잘 알려져 있지 않고 구조적으로 불안정한 아미노 말단의 543개 아미노산을 제외하고 발현시키기 위한 재조합 플라스미드를 고안하였다 (pGEX-KG-LATS1-544end :이하 LATS1).

6가지의 기질 펩타이드들은 thrombin에 의해 제거될 수 있는 GST tag를 포함하여 발현되도록 재조합 플라스미드를 만들었다. 각 펩타이드의 아미노산 서열을 아래에 나타내었다.

MST2-T180 : TDTMAKRNT(180)VIGTPFWMAPEVIQE

LATS1-S909 : QHQRC LAHS(909)LVGTPNYIAPEVLLR

LATS1-T1079 : PEHAFYEFT(1079)FRRFFDDNGYPYNYP

MOB1-T12 : LFSSRSSKT(12)FKPKKNIPEGSHQYE

MOB1-T35 : ELLKHAEAT(35)LGSGNLRQAVMLPEG

YAP1-S127 : TPQHVRAHS(127)SPASLQLGAVSPGTL

모든 재조합 플라스미드는 최종적으로 DNA sequencing을 통해 확인하였다.

실험에 사용된 일차 항체는 각 단백질의 특정한 인산화 자리가 인산화된 것을 검출할 수 있는 항체로써 western blot을 위해 아래에 표기된 비율로 4℃에서 20시간 반응시켰다. Phospho-Mst1 (Thr183)/Mst2 (Thr180) rabbit mAb (1:1000, Cell Signaling); Phospho-MOB1 (Thr35) rabbit mAb (1:1000, Cell Signaling); Phospho-LATS1 (Thr1079) rabbit mAb (1:1000, Cell Signaling); and phospho-YAP1 (Ser127) rabbit mAb (1:2000, abcam).) 이차 항체는 Rabbit IgG Antibody (1:2000, Bioss) 를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 뒤 검출하였다.

GST-단백질 및 펩타이드의 정제

MST2, MST2-K56R, YAP1, LATS1, MOB1 단백질의 발현 및 정제를 위하여 먼저 각각의 재조합 플라스미드를 박테리아 균주 Rosetta cell에 형질전환시켰다. 형질전환된 박테리아는 37 ℃에서 키우다가 OD₆₀₀ 값이 약 0.6에 이르면, 0.5 mM IPTG를 첨가하여 단백질의 발현을 유도하였다. 이후 30 ℃에서 4시간 이상 추가로 기른 후 6,000 rpm에서 15분간 centrifuge하여 박테리아를 회수하였다.

이후 Emulsiflex를 이용하여 cell lysis를 일으키고 18,000 rpm에서 30분간 centrifuge를 돌려 상층액을 glutathione agarose resin (QIAGEN) 과 섞어 1시간 동안 반응시켰다 Resin에 붙은 단백질은 PBSTR 완충용액 (8 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KH₂PO₄, 3 mM KCl, 0.05% Tween® 20, 5 mM Mercaptoethanol) 으로 충분히 씻어주고 4 °C에서 16시간 이상 TEV 단백질 분해효소를 처리하여 GST tag을 제거하였다 (단백질:TEV 효소 (w/w) = 20:1). GST가 제거된 단백질을 회수한 뒤, 이를 Resource Q anion exchange column과 Superdex 200 gel filtration column (GE Healthcare)을 통해 95% 이상의 순도로 정제하였고, 20 mM Tris (pH 8.0), 100 mM NaCl, 2 mM DTT가 포함된 버퍼에서 최대 6.5 mg/ml로 농축하였다. 6가지 기질펩타이드 MST2-T180, LATS1-S909, LATS1-T1079, MOB1-T12, MOB1-T35, YAP1-S127는 앞서 기질단백질에서와 같은 방법으로 발현시켰는데, Rosetta 대신 BL21 (DE3) cell을 사용하였다. Cell lysis 후, 발현된 단백질은 glutathione agarose resin을 이용하여 앞서와 같이 일차정제하였으며, GST tag을 제거하는 대신, 20 mM reduced L-gluthathione (SIGMA-ALDRICH)을 이용하여 GST fusion 펩타이드를 얻었다. 여기서 얻어진 샘플은 Superdex 200 gel filtration 컬럼을 통해 이차정제하여 20 mM Tris (pH 8.0) and 150 mM NaCl이 포함된 버퍼에서 각 12 mg/ml로 농축하였다.

in vitro kinase assay

in vitro kinase assay는 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM ATP가 포함된 용액에서 상온에서 20시간 이상 반응시켰다. MST2 인산화 효소 또는 그의 비활성 돌연변이 효소 (MST2-K56R)은 각 1 μ M씩 140 mM의 기질 펩타이드 (MST2-T180 펩타이드, LATS1-S909 펩타이드, LATS1-T1079 펩타이드, MOB1-T12 펩타이드, MOB1-T35 펩타이드, YAP1-S127 펩타이드)와 반응시킨 후 5× SDS sample buffer를 첨가하고 5분간 100° C에서 끓여 반응을 종료하였다.

Thrombin cleavage

GST-펩타이드는 20 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl이 포함된 버퍼에서 단백질 50 μ g당 1unit의 농도로 트롬빈 단백질 분해효소 (thrombin protease, Sigma Aldrich) 를 사용하여 GST-tag을 제거하였다. 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 5× SDS sample buffer를 넣고 5분간 100° C에서 끓여 반응을 종료하였다.

인산화단백질 염색

in vitro kinase assay를 거친 단백질들은 SDS-PAGE gel에서 이후 3차수로 10분씩 3회 Fix solution (50% methanol and 10% acetic acid)으로 30분 2회 고정시킨 후 Pro-Q® diamond phosphoprotein gel stain solution (Invitrogen)으로 암실에서 90분 동안 염색하였다. 이후 20% acetonitrile과 50 mM sodium

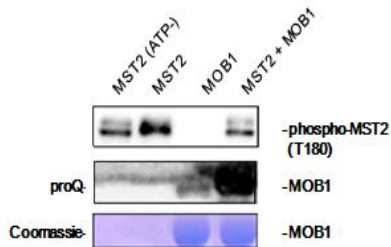
acetate (pH 4.0)를 포함한 Destaining 용액으로 30분 3회 씻어낸 후 ChemiDoc MP (BIO-RAD)으로 반응을 검출하였다. 인산화단백질 염색이 끝난 gel은 쿠마시 블루 (Coomassie blue)로 재염색하였다.

결과 및 고찰

MST2에 의한 기질 단백질의 인산화와 기질 펩타이드의 정제

본 실험에서는 MST2 인산화효소의 기질에 대한 특이성을 알아보기 위하여 Hippo 신호전달과정에서 MST2에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있는 알려진 기질들을 정제하여 in vitro kinase assay 실험을 통한 인산화여부를 관찰하였다. MST2 인산화효소는 아미노 말단에 activation loop가 포함된 kinase 도메인을 가지고 있으며, 그 안에 trans-autophosphorylation에 의하여 인산화되는 Threonine 180번 아미노산이 존재한다. 박테리아에서 발현시켜 정제한 MST2는 이미 Thr180에 부분적으로나마 인산화가 일어났음을 알 수 있었다 (그림 4 (가)). 이는 MST2가 박테리아에서 발현되는 과정에서 이미 trans-autophosphorylation을 통해 인산화가 일어난 것으로 판단된다. 여기서 얻어진 MST2는 세포 내 기질단백질로 알려진 MOB1과 LATS1의 인산화를 일으키는 것으로 관찰되었다 [그림 4 (가), (나)]. 또한, 실험의 정확한 통제를 위하여 부분적으로 활성상태로 얻어진 MST2를 lambda protein phosphatase로 처리하여 탈인산화시킨 후 kinase assay 실험을 수행하여 앞서의 결과와 비교해 보았다. 그 결과, MST2 단백질 자기 자신을 인산화시켜 활성화되며 또한 기질 단백질인 MOB1과 LATS1과도 잘 반응하는 것을 확인할 수 있었다. 한편, YAP1은 MST2에 의해 활성화 되는 LATS1의 기질로써 전사활성인자로 알려져 있다. 그러나 정제된 MST2, LATS1, YAP1을

(가)



(나)

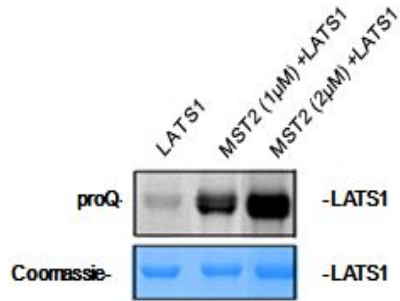


그림 4. MST2에 의하여 인산화되는 기질 단백질 MOB1, LATS1

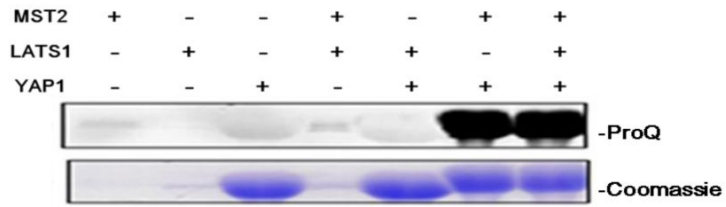
(가) MST2에 의한 MOB1의 인산화를 0.2 mM의 ATP가 있는 환경에서 *in vitro* kinase assay한 결과이다. MST2와 MOB1은 각각 최종 1 μ M, 200 μ M로 상온에서 20시간 이상 반응하였다. MST2는 anti phospho-MST2 (T180) 항체를 사용하여 western blot하였고 MOB1은 proQ와 쿠마시 염색을 하였다.

(나) (가)와 같은 조건에서 MST2와 LATS1을 *in vitro* kinase assay한 후 proQ와 쿠마시로 본 결과이다. LATS1 기질을 최종 40 μ M로 하여 MST2는 각각 1 μ M, 2 μ M로 반응하였다.

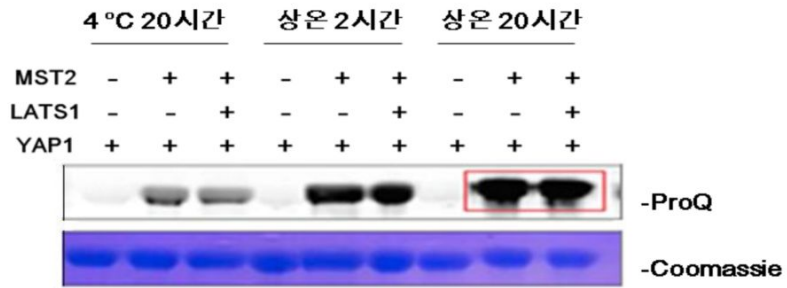
이용한 *in vitro* kinase assay 결과, YAP1이 MST2에 의해 직접적으로 인산화 될 수 있음을 확인하였다 (그림 5 (가), (나)). 즉 YAP1은 MST2와 LATS1이 모두 존재할 경우뿐 아니라, MST2만 존재하는 조건에서도 인산화가 됨을 볼 수 있다. 반면, LATS1만 존재하는 경우는 YAP1의 인산화를 관찰할 수 없었는데, 이는 LATS1이 활성화 되지 않았기 때문으로 생각할 수 있다. Hippo 신호전달 경로에서 LATS1에 의하여 YAP1이 인산화되는 부위는 Serine 127번으로 알려져 있다. ProQ 용액을 이용하여 확인한 인산화 단백질이 YAP1의 127번 Serine 잔기의 인산화에 의한 것인지를 확인하기 위해 그림 5 (다)에서는 YAP1의 pS127 항체를 이용한 western blot을 수행하였다. 그 결과, western blot 과 ProQ에서의 결과가 일치하는 것을 볼 수 있었다. 또한 MST2의 활성이 이러한 반응을 일으킨 주요 요인임을 확인하기 위해, MST2의 비활성 돌연변이 (K56R)를 이용하여 같은 실험을 수행하였다. 그림 5 (다)에서 보듯이 MST2가 비활성 상태일 경우 어떠한 인산화 반응도 일어나지 않음을 알 수 있다. 따라서, YAP1 Ser127의 인산화는 활성상태의 MST2에 의해 직접적으로 일어날 수도 있다고 말할 수 있다. 그러나 실제로 세포 내에서도 MST2에 의해 YAP1이 직접 인산화가 될 수 있는지에 대해서는 추후 연구가 필요하다.

In vitro kinase assay를 통해 MST2에 의한 인산화가 확인된 단백질들을 토대로 아미노산 서열의 특이성을 분석하고자 각각의 인산화자리를 포함하는 24개 아미노산 펩타이드를 GST tag이 붙은 상태로 발현이 되도록 고안하였다 (그림 6 (가)). 먼저 MST2 kinase

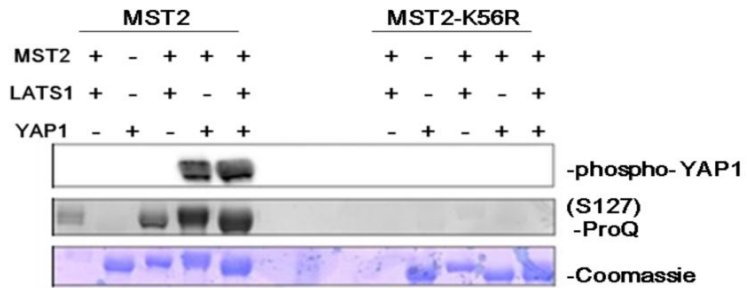
(가)



(나)



(다)



(라)

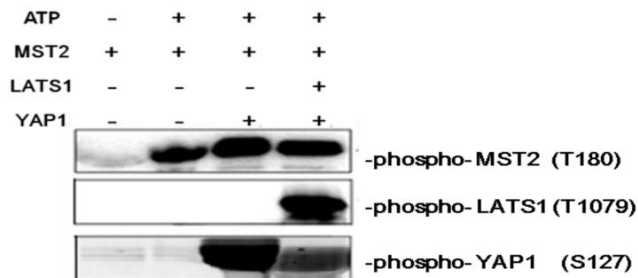


그림 5. MST2에 의하여 직접적으로 인산화된 YAP1 단백질

(가) 정제된 MST2, LATS1, YAP1을 각각 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M로 in vitro kinase assay를 수행하여 proQ와 쿠마시 염색으로 본 결과이다. MST2, LATS1, YAP1 단백질은 약 50 kDa으로 젤 상에서 크기가 비슷하게 나타났다.

(나) 온도별 (4 $^{\circ}$ C, 상온), 시간별 (2시간, 20시간)로 MST2, LATS1, YAP1의 in vitro kinase assay 결과를 proQ와 쿠마시로 나타내었다.

(다) MST2 인산화효소와 비활성화효소 (MST2-K56R)를 사용하여 in vitro kinase assay후 anti-phospho-YAP1 (S127) 항체를 이용하여 western blot 및 proQ와 쿠마시 염색을 하였다.

(라)(다)의 결과를 anti-phospho-MST2 (T180), anti-phospho-LATS1 (T1079), anti-phospho-YAP1 (S127) 항체를 이용하여 western blot을 수행하였다.

도메인의 activation loop에 존재하는 Thr180 아미노산을 포함하는 MST2-T180 펩타이드를 고안하였다. LATS1의 경우, 활성화 과정에서 두 개의 아미노산이 인산화 되는 것으로 알려져 있는데, MST2에 의해 인산화된다고 알려진 Thr1079를 포함한 펩타이드와, LATS1 스스로에 의해 자가인산화 된다고 알려진 Ser909를 포함한 펩타이드를 각각 디자인하여 서로간의 인산화 여부를 비교분석하였다. MOB1은 아미노 말단 쪽의 Thr12과, Thr35을 포함한 펩타이드를 각각 고안하였다. 또한 MST2에 의해 인산화 되는 것이 확인된 보인 YAP1의 Ser127 인산화 자리를 포함하는 펩타이드도 함께 디자인하였다. 이렇게 고안된 6가지의 펩타이드는 GST에 fusion된 상태로 박테리아에서 발현되었으며, 각각은 G-agarose affinity column을 통해 정제하였다. 이후 최종적으로 Gel filtration column을 거쳤음에도 GST tag과 GST-펩타이드가 dimer를 이루어 그림 6 (나)에서와 같이 정제되어 나오는 것으로 보인다.

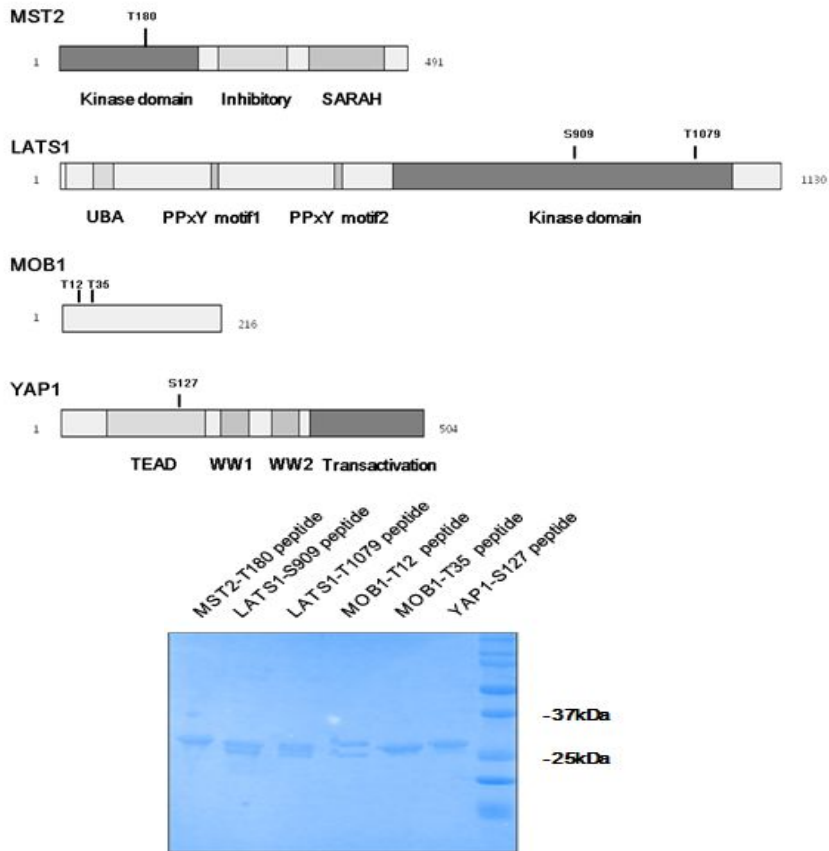


그림 6. 기질 펩타이드의 정제

MST2 인산화효소의 기질 MST2, LATS1, MOB1과 YAP1의 인산화 자리를 나타낸 모식도이다. 각각의 인산화 자리를 기준으로 아미노 말단 쪽 8개, 카르복시 말단 쪽 15개의 아미노산을 포함하는 펩타이드를 만들어 정제하였다. 총 6가지의 펩타이드는 각각의 인산화 자리를 따서 MST2-T180, LATS1-S909, LATS1-T1079, MOB1-T12, MOB1-T35, YAP1-S127로 표기하였다.

MST2에 의한 기질 펩타이드의 인산화

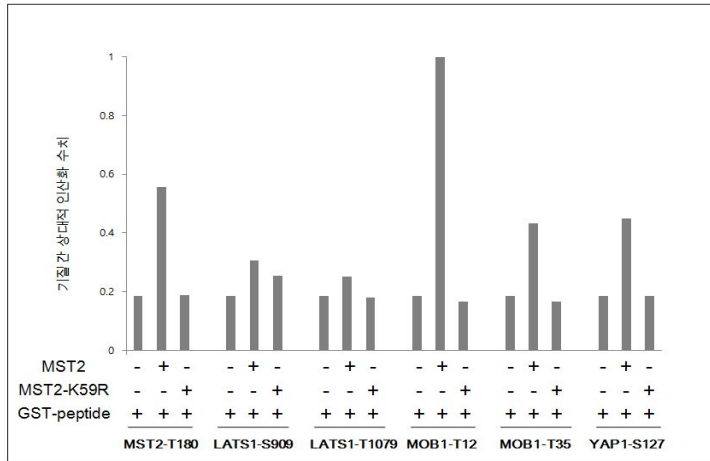
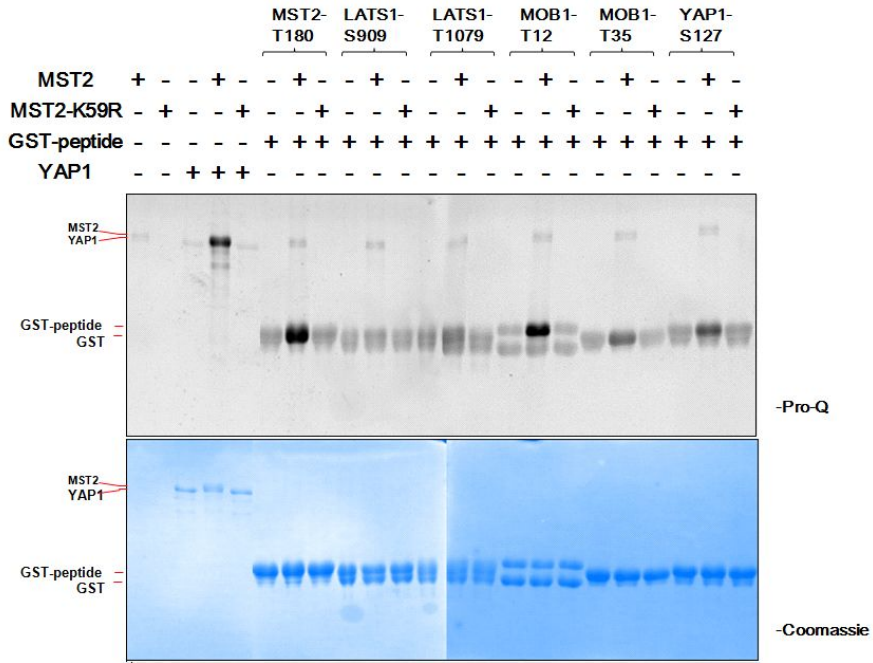
그림 7 (가)에서와 같이 *in vitro* kinase assay를 통한 MST2 기질 펩타이드의 인산화는 다양한 수준으로 관찰되었다. MST2에 의한 인산화는 MST2-T180 펩타이드에서 잘 관찰되었으며 비활성화 효소 (K56R) 에서는 인산화 반응이 일어나지 않았다. GST tag은 기질 펩타이드와 같이 정제되어 나왔으나 proQ에서는 인산화반응을 보이지 않는 것을 알 수 있다. MOB1에서의 인산화는 MST2에 의하여 인산화되는 것으로 알려진 두 부위 Thr12, Thr35에서 서로 다른 정도로 나타났다. 즉, MOB1-T12 펩타이드는 뚜렷한 인산화 반응을 보인 반면 MOB1-T35에서는 이에 미치지 못하는 정도의 인산화가 관찰되었다. 한편 흥미롭게도 LATS1의 경우 MST2에 의해 인산화되는 Thr1079를 포함하는 펩타이드가 인산화 반응을 거의 나타내지 않았고, 자가인산화에 관련된 Ser909 또한 반응이 일어나지 않았다. 또한 YAP1은 Ser127을 포함하는 펩타이드에서 YAP1 단백질과 마찬가지로 인산화 반응을 나타내었다. 기질간의 상대적인 인산화 정도를 알고자 각 펩타이드를 기준으로 MST2 또는 비활성화 효소 (K56R)와 반응하였을 때의 시그널을 측정된 결과, LATS1을 제외한 모든 펩타이드에서 인산화가 일어났으며, 그 중 MOB1-T12과 MST2-T180 펩타이드가 높은 반응을 보임을 알 수 있다.

MST2의 농도에 따른 기질 펩타이드의 인산화 정도를 알고자, 반응이 일어나지 않은 펩타이드와 일어난 펩타이드들로 나누어 다양한 비율로 *in vitro* kinase assay를 수행하였다. 그림 7 (나)에서는 인산화반응을 보이지 않은 LATS1 펩타이드에서 MST2 인산화효소의 비율을

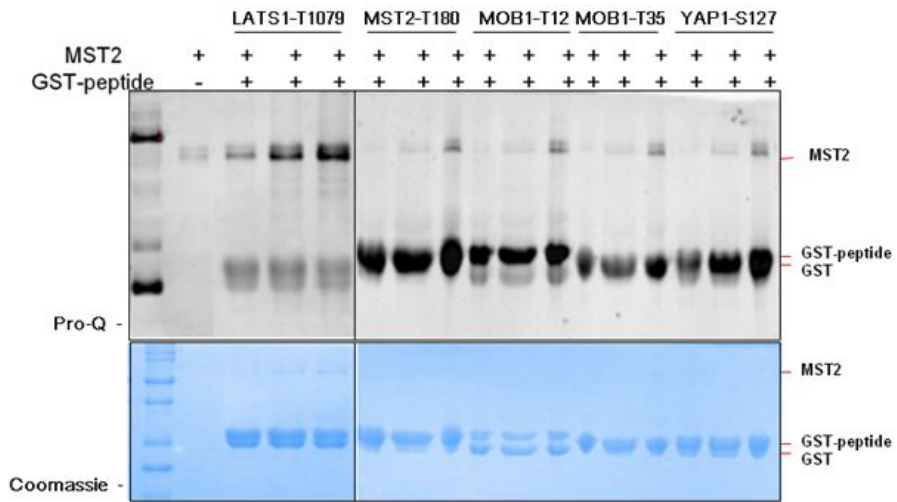
높이고, 그 외의 펩타이드에서는 낮추어 인산화 반응을 수행하였다. 그 결과 LATS1-T1079는 높은 농도의 MST2에서도 반응이 일어나지 않았으며, 그 외의 MST2-T180, MOB1-T12, MOB1-T35, YAP1-S127 펩타이드는 적은 농도의 MST2로도 충분히 인산화가 일어남을 알 수 있다.

한편 기질 펩타이드들은 펩타이드 크기 (약 4 kDa)에 비하여 상대적으로 큰 GST tag(26 kDa)을 포함하고 있다. ProQ에 의하여 검출된 인산화 반응이 GST에 존재하는 Serine 또는 Threonine의 인산화에 의한 것일 가능성이 있으므로 그림 7 (다)와 같이 GST tag를 자른 경우 인산화 신호가 어떻게 나타나는지 관찰하였다. GST tag과 펩타이드 사이를 절단하는 트롬빈 단백질 분해효소의 농도를 점차 높이며 처리한 결과 GST-펩타이드의 양이 감소함에 따라 인산화 신호도 함께 낮아졌다. 펩타이드가 제거된 GST에서는 인산화 신호가 나타나지 않았으며, 반면 GST tag이 제거된 펩타이드의 인산화 신호는 점차 뚜렷해 지는 것으로 보아 펩타이드 내의 아미노산 부위에 인산화가 일어난 것임을 확인할 수 있다.

(가)



(나)



(다)

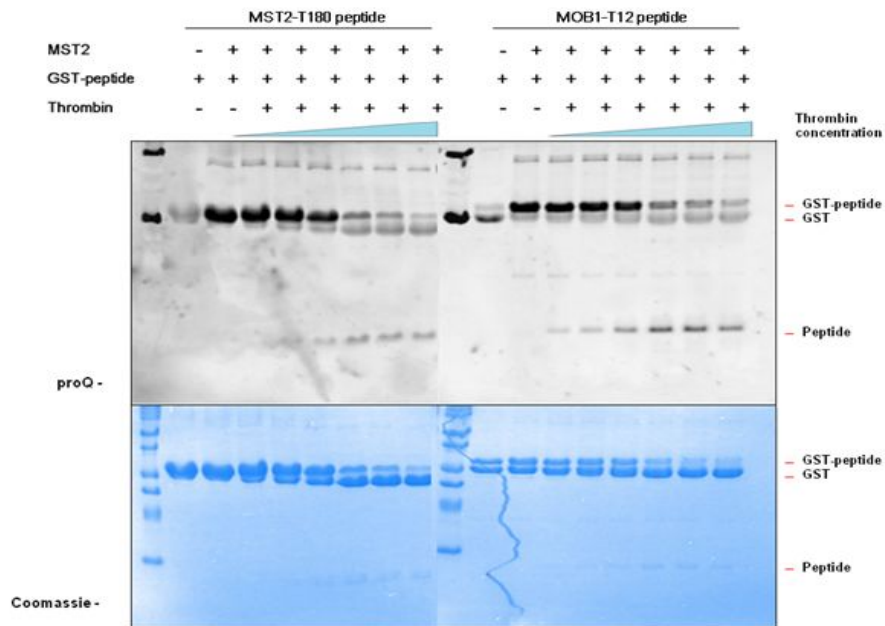


그림 7. MST2에 의한 기질 펩타이드의 다양한 정도의 인산화

(가)MST2 인산화효소 및 비활성화효소 (MST2-K56R) 1 μ M, 펩타이드기질 140 μ M을 사용하여 0.1 mM의 ATP가 포함된 환경에서 in vitro kinase assay하고 proQ와 쿠마시로 염색하였다. MST2가 없는 환경에서 각각의 기질 펩타이드의 인산화를 기준으로 반응이 일어난 정도를 상대적으로 수치화하였다. 이 때 GST tag부분은 제외하고 GST-펩타이드만을 정량화하였다.

(나)LATS1-T1079 펩타이드 140 μ M을 각 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M의 MST2 인산화효소와 in vitro kinase assay로 반응시킨 후 proQ와 쿠마시로 본 결과이다. MST2-T180, MOB1-T12, MOB1-T35 및 YAP1-S127 펩타이드는 각 140 μ M씩 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M의 MST2 인산화효소와 반응하였다. .

(다)MST2 인산화효소와 반응시킨 MST2-T180, MOB1-T12 펩타이드를 트롬빈 단백질 분해효소(Thrombin protease)의 농도를 높이며 상온에서 2시간 처리한 결과이다. 트롬빈을 처리하지 않은 샘플, 0.05unit, 0.1unit, 0.2unit, 0.5unit, 1unit, 2unit의 농도로 처리한 샘플을 proQ와 쿠마시를 사용하여 인산화 정도를 측정하였다.

요약 및 결론

Hippo 신호전달과정은 세포 사멸과 장기기관의 크기 조절에 중요하게 작용하여 이 신호전달이 제대로 이루어지지 않을 경우 각종 암을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Kieran F. Harvey et al., 2013). MST2 인산화 효소는 Hippo 신호전달 과정에서 상위 단계에 작용하는 인산화 효소로써 MST2의 활성화는 LATS1의 활성화를 유도하고 이는 결국 전사활성인자인 YAP1의 인산화를 야기시켜 YAP1의 기능을 방해한다 (Tsutomu Oka et al., 2008; Kodaka M et al., 2015). 따라서, Hippo 신호전달의 최상위 단계 효소인 MST2의 기능에 대한 연구는 전체 Hippo 신호전달과정을 이해하는데 중요하다. 그러나 아직까지 MST2가 어떠한 기질 특이성을 가지는지 알려져 있지 않으며, MST2와 기질간의 결합에 대한 구조적 정보도 전무한 상태이다. 본 연구에서는 MST2 인산화 효소의 기질에 대한 특이성을 알아보고자 박테리아에서 발현 및 정제한 다양한 기질단백질과 MST2 효소를 사용하여 *in vitro* kinase assay를 수행하였다. 먼저, MST2 단백질은 자가인산화된 상태로 박테리아에서 발현 정제되어 활성을 지닌 것을 확인할 수 있었다. 여기에 자가인산화가 일어나는 MST2의 Thr180 아미노산을 포함하는 펩타이드를 기질로 사용하였을 때 실제로 인산화 반응이 일어남을 관찰하였다.

기존의 연구에서 MST4 kinase 도메인의 activation loop에 DFG+1이라는 특정한 서열이 존재하여 +1의 서열이 Val일 때 Thr을

선호하는 것으로 알려졌는데 (Catherine Chen et al., 2014), MST2 kinase 도메인은 MST4의 Kinase 도메인과 90% 이상의 유사성을 보이며 DFGV 서열을 가지고 있어 Thr을 선호할 것으로 예상하였다. 실제로 세포 내 기질 단백질들은 인산화 위치에 Thr을 포함하고 있음을 알 수 있다 (표 1). 그러나 YAP1의 경우, MST2의 세포 내 기질 단백질로 알려져 있지 않으며 인산화되는 아미노산 127번은 Ser으로 선호 아미노산이 아닌 것을 볼 수 있다. 그러나, 예상과 달리 본 연구에서는 Ser 127을 포함한 YAP1 펩타이드와 YAP1 단백질 모두 MST2에 의해 직접적으로 인산화되는 것이 관찰되었다. 실제로 세포 내에서도 MST2에 의해 YAP1이 직접 인산화 되는지에 대해서는 추후 연구가 필요하다.

MST2 인산화 효소의 세포 내 기질단백질로 MOB1과 LATS1이 잘 알려져 있는데, 인산화되는 아미노산을 포함하는 펩타이드를 기질로 사용한 실험에서는 예상과 다른 결과가 관찰되었다. MOB1의 경우 Thr12번과 Thr35번 위치에서 인산화가 일어난다고 알려져 있다. Thr12번과 Thr35번 아미노산을 포함한 펩타이드는 모두 인산화가 되는 것을 관찰하였으나 특이하게도 Thr12번 아미노산을 포함한 펩타이드에서 더 높은 인산화 반응이 관찰되었다. LATS1의 경우, MST2에 의하여 Thr1079이 먼저 인산화되면 이후 Ser909번이 자가인산화 됨에 따라 LATS1이 활성화가 되는 것으로 알려져 있다 (Chan EH et al., 2005). LATS1-S909 펩타이드를 기질로 사용한 경우 기존에 알려진 바와 같이 MST2에 의해 인산화가 일어나지 않았으나, LATS1-T1079 펩타이드를 기질로 사용한 경우에서도

	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	pl
MST2-T180	D	T	M	A	K	R	N	T	V	I	G	T	P	F	W	8.8
LATS1-T1079	E	H	A	F	Y	E	F	T	F	R	R	F	F	D	D	4.8
MOB1-T12	F	S	S	R	S	S	K	T	F	K	P	K	K	N	I	11.3
MOB1-T35	L	L	K	H	A	E	A	T	L	G	S	G	N	L	R	8.8
YAP1-S127	P	Q	H	V	R	A	H	S	S	P	A	S	L	Q	L	10.2

Acidic	D E	Asp/Glu
Basic	K R	Lys/Arg

표 1. 기질 펩타이드 간 sequence alignment 및 구성 아미노산의 특성

펩타이드 기질의 인산화 자리(0번 위치)를 기준으로 하여 아미노 말단과 카르복시 말단에 위치한 아미노산 서열들의 상동성을 본 그림이다. 산성에 해당하는 아미노산은 붉은색으로 염기성 아미노산은 파란색으로 표시되었다. 각 펩타이드 서열 끝에 이론적인 등전점 값이 표기되어 있다.

예상과 달리 MST2에 의한 인산화를 관찰할 수 없었다.

이와 같이 다양한 기질 펩타이드를 이용한 실험 결과를 바탕으로 펩타이드 기질들의 특징을 알아내고자 각각의 인산화 자리를 중심으로 아미노 말단과 카르복시 말단 쪽으로 7개의 아미노산을 포함하는 서열에서 그 특이성을 조사해 보았다. 이를 통해 기질 펩타이드 서열간의 유사성을 보고자 하였으나 모든 펩타이드들 혹은 인산화 반응이 잘 일어난 펩타이드들 간에도 어떠한 공통적인 특징을 확인할 수 없었다 (표 1). 이는 일반적으로 대부분의 인산화 효소가 특정 아미노산 공통배열 (consensus sequence)을 가진 기질에 대해 특이성을 지니는 것과는 사뭇 다른 결과이다. MST2 기질 펩타이드들간의 특징적인 아미노산 서열을 관찰할 수는 없었으나, 인산화 반응이 잘 일어난 펩타이드들의 경우, 특이하게도 Lys, Arg 과 같은 염기성을 띠는 아미노산을 포함하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이를 토대로 각 펩타이드들의 정전기적 특성을 조사한 결과, 예외적으로 LATS1-T1079 펩타이드에서는 산성을 띠는 아미노산들이 많이 포함되어 있음을 확인할 수 있었다. 각각의 펩타이드의 이론적인 등전값은 인산화가 제일 잘 일어났던 MOB1-T12가 11.3으로 가장 높고, MST2-T180 펩타이드는 8.8, MOB1-T35, YAP1-S127 펩타이드들도 각각 8.8, 10.2의 높은 등전점 값을 보였다. 반면, 인산화 반응이 일어나지 않았던 LATS1-T1079는 4.8로 유일하게 산성을 띤다. 이로부터 MST2 인산화효소와 기질 펩타이드와의 결합에는 정전기적 특성이 매우 중요하게 관여할 것으로 예상되는데, 실제로 MST2의 삼차구조로부터 MST2의 catalytic cleft가 산성을

띠는 것을 확인할 수 있었다 (그림 8).

세포 내 MST2의 기질인 LATS1의 Thr1079은 카르복시 말단 HM 도메인에 존재하는데, HM 도메인은 기존에 발표된 연구결과, alpha helix를 형성하는 것으로 알려져 있다 (Richard Marais et al., 2003). 이러한 삼차구조 형성이 MST2 인산화 효소와의 반응에 중요하게 작용하는지 확인하기 위해, LATS1 단백질을 이용한 인산화 반응을 수행하였고 그 결과 Thr1079의 인산화를 관찰할 수 있었다. 즉, Thr1079를 포함한 펩타이드의 경우 alpha helix를 형성하지 못하고 산성을 띠는 아미노산을 포함함에 따라 MST2의 기질로 작용하지 못한 것으로 사료된다.

실제로 MST2와 기질들간의 상호작용에 정전기적 특성이 중요하게 작용하는지 확인하기 위해 기질 펩타이드의 염기성 아미노산을 산성 아미노산으로 돌연변이 시켜 인산화 여부를 관찰하는 등의 추가적인 실험이 필요할 것이다. 또한, LATS1 기질단백질의 alpha helix 형성이 MST2와의 반응에 중요하게 작용하는지에 대해서도 추가적인 연구가 요구된다. 이러한 연구결과는 앞으로의 MST2와 기질단백질간의 복합체 구조연구에 중요한 정보를 제공할 것이며, 궁극적으로 MST2의 기질특이성 및 작용 메커니즘 이해에 도움을 줄 것으로 사료된다.

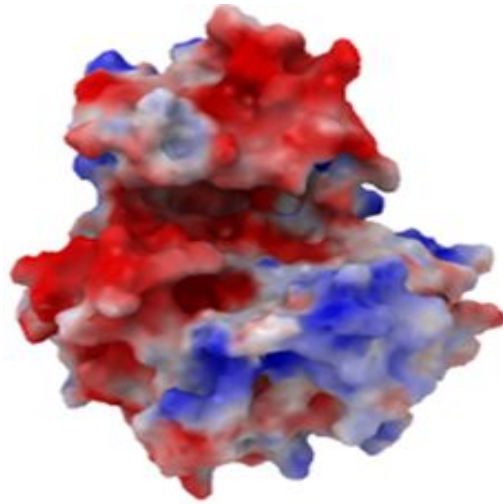


그림 8. MST2 kinase domain 표면의 정전기적 특성

MST2 인산화효소의 catalytic cleft 표면에서의 정전기적 특성을 보여주는 모델이다. 붉은색은 산성, 파란색은 염기성을 띠는 것을 나타낸다.

참고문헌

- [1] Ubersax JA and Ferrell JE Jr. (2007) Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Review Molecular Cell Biol.* 8, 530-41.
- [2] Ross I. Brinkworth, Robert A. Breinl and Bostjan Kobe. (2007) Structural basis and prediction of substrate specificity in protein serine/threonine kinases. *PNAS.* 100,74-79.
- [3] Fa-Xing Yu, Kun-Liang Guan. (2013) The Hippo pathway: regulators and regulations, *Genes & Dev.* 27, 355-71.
- [4] Zhao B, Li L, Lu Q, Wang LH, Liu CY, Lei Q and Guan KL. (2011) Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes & Dev* 25, 51-63.
- [5] Record CJ, Chaikuad A, Rellos P, Das S and Pike ACW. (2010) Structural Comparison of Human Mammalian Ste20-Like Kinases. *PLOS ONE* 5
- [6] Graves JD, Gotoh Y, Draves KE, Ambrose D and Han DK.

(1998) Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1. *EMBO J* 17,2224-34.

[7] Ni L1, Li S, Yu J, Min J, Brautigam CA, Tomchick DR, Pan D and Luo X. (2013) Structural basis for autoactivation of human Mst2 kinase and its regulation by RASSF5. *Structure*, 21, 1757-68

[8] Jose M. Arencibia, Daniel Pastor-Flores, Angelika F. Bauer and Jorg O. Schulze. (2013) AGC protein kinases: From structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*,1834, 1302-21

[9] Laura R. Pearce¹, David Komander² and Dario R. Alessi¹. (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Molecular Cell Biology* 11, 9-22

[10] Gogl G, Schneider KD, Yeh BJ, Alam N, Nguyen Ba AN, Moses AM, et al. (2015) The Structure of an NDR/LATS Kinase Mob Complex Reveals a Novel Kinase Coactivator System and Substrate Docking Mechanism. *PLoS Biology* 13(5)

- [11] Lee KP, Lee JH, Kim TS, Kim TH, Park HD, Byun JS, Kim MC, Jeong WI, Calvisi DF, Kim JM and Lim DS. (2010) The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis. *PNAS*. 107, 8248-53
- [12] Salah Z, Alian A and Aqeilan RI. (2012) WW domain-containing proteins: retrospectives and the future. *Front Bioscience*. 17, 331-48.
- [13] Chan EH, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schafer A, Nigg EA and Sillje HH. (2005) The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene*. 17, 2076-86.
- [14] Alexander Hergovich. (2012) Mammalian Hippo signalling: a kinase network regulated by protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans*. 40, 124-128.
- [15] Praskova M, Xia F and Avruch J. (2008) MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr Biology* 18, 311-21.

[16] Lisheng Ni, Yonggang Zheng, Mayuko Hara, Duoia Pan and Xuelian Luo. (2015) Structural basis for Mob1-dependent activation of the core Mst Lats kinase cascade in Hippo signaling. *Genes and Development*. 29, 1416-31

[17] Tsutomu Oka, Virginia Mazack and Marius Sudol. (2008) Mst2 and Lats Kinases Regulate Apoptotic Function of Yes Kinase-associated Protein (YAP) *The Journal of Biological Chemistry*. 283, 27534-46.

[18] Kodaka M and Hata Y. (2015) The mammalian Hippo pathway: regulation and function of YAP1 and TAZ. *Cell Mol Life Sci*. 72, 285-306

[19] Zhao B, Tumaneng K and Guan KL. (2011) The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nature Cell Biol*. 13(8):877-83.

[20] Kieran F. Harvey, Xiaomeng Zhang and David M. Thomas. (2013) The Hippo pathway and human cancer. *Nature Reviews Cancer*. 13, 246-257.

[21] Catherine Chen, Byung Hak Ha, Anastasia F. Thévenin,

Hua Jane Lou, Rong Zhang et al. (2014) Identification of a Major Determinant for Serine-Threonine Kinase Phosphoacceptor Specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 53, 140-7.

[22] Richard Marais, Rastislav Tamaskovic, Samuel J. Bichsel and Brian A. Hemmings (2003) NDR family of AGC kinases essential regulators of the cell cycle and morphogenesis. *FEBS Letters*. 546,73-80