

최종보고서 [기관고유연구사업]

과제고유번호	1310410	연구분야 (코드)	T3	지원 프로그램	창의 (일반연구)과제	공개가능여부 (공개, 비공개)	공개
연구사업명	국립암센터 기관고유연구사업						
연구과제명	선충에서 Rab GTPase에 의한 발암 억제 기전 연구						
과제책임자	성명	심재갈	소속	비교생명의학 연구과	직위	책임연구원	
세부과제	구분	과제명			과제책임자		
	(1세부)				성명	소속(직위)	전공
	(2세부)						
	(3세부)						
총연구기간	2013년 1월~ 2015년12월 (총 3년)	해당단계 참여 연구원 수	총: 5명 내부: 3명 외부: 2명	해당단계 연구개발비	연구비: 76,000천원 민간: 천원 계: 76,000천원		
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 6명 내부: 3명 외부: 3명		총연구개발비	연구비:236,000천원 민간: 천원 계:236,000천원	
연구기간 및 연구비 (단위:천원)	구분	연구기간	계	국립암센터	기업부담금		
	계	2013.1.1~2015.12.31	236,000	236,000	소계	현금	현물
	제1차	2013.1.1~2013.12.31	80,000	80,000			
	제2차	2014.1.1~2014.12.31	80,000	80,000			
	제3차	2015.1.1~2015.12.31	76,000	76,000			
참여기업	참여기업명 :						
국제공동연구	상대국명:				상대국 연구기관명:		
위탁연구	연구기관명:				연구책임자:		

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

2015 년 10 월 28 일

과제책임자 : 심재갈 (인)

국립암센터원장 귀하

< 국문 요약문 >

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><최종목표> Intracellular trafficking을 조절하는 Rab small GTPase들과 Rab interacting protein들의 기능을 선충 모델에서 기능을 규명함으로써 새로운 항암 표적을 발굴하고자 함.</p> <p><연구내용> rab-8 및 관련 유전자들의 돌연변이 개체를 이용한 유전학적 분석으로, 이들 유전자들이 EGFR/Ras/MAPK 신호전달에 의한 세포 증식에 중요하다는 것을 검증하였고, 추가적으로 EGFR/Ras/MAPK 신호전달의 하위 단계에 FGF/FGFR의 신호전달이 주요하게 작용한다는 것을 이들 돌연변이 개체들을 이용해 확인하였음. 특히 VPC에서 EGFR/Ras/MAPK 신호전달에 의해 생성되는 FGF의 분비에 rab-8과 rab-8의 활성화에 관여하는 rab-8 GEF 후보 유전자인 F54C9.11이 필요하다는 것을 규명하였음.</p> <p>암세포주를 이용한 연구에서는 A431 세포에서 Rab8A과 Rab8B의 기능이 적어도 세포 간 접점 형성에서는 반대 작용을 하는 것을 밝힘. 특히 Rab8b의 발현억제에 의해서 기존에 알려진 Rab8 기능과 정반대로 Cell-Cell Junction이 강화되어 세포 이동이 잘 일어나지 않는 것을 확인함.</p>																
<p>연구개발성과</p>	<p><정량적 성과¹⁾></p> <table border="1" data-bbox="464 920 1399 1059"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치¹⁾</th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>5/3</td> <td>167%</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>38/12</td> <td>316%</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td>학회발표 3건</td> <td>100%</td> </tr> </tbody> </table> <p>1) 총연구기간 내 목표연구성과로 기 제출한 값</p> <p><정성적 성과></p> <ul style="list-style-type: none"> - Rab8이 EGFR/Ras/MAPK 신호전달 하위에서 FGF 분비를 조절하여 FGF/FGFR의 신호전달에 필요하다는 것을 발견 - 암세포주에서 Rab8A와 Rab8B의 발현 억제는 모두 암세포의 성장을 억제하는 것으로 나타남. - Rab8A와 Rab8B의 기능이 cell-cell adhesion에 있어서 서로 다르게 기능함. 특히, Rab8B의 발현 억제는 세포 사이의 adhesion을 증가시켜 세포 이동성을 떨어뜨림. 					구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	5/3	167%	IF 합	38/12	316%	기타 성과	학회발표 3건	100%
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)															
SCI 논문 편수	5/3	167%															
IF 합	38/12	316%															
기타 성과	학회발표 3건	100%															
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>Rab8A의 발현은 선종성 폐암 환자의 생존율과 밀접한 연관을 가지므로, 적어도 예후 인자로 사용할 수는 있음. 암세포 성장과 이동에는 Rab8A보다는 Rab8B의 기능이 더 중요함. Rab8B의 발현 억제에 의해 A431 세포의 형태가 변하고, 이동성이 감소하는 이유는 세포 사이의 부착성이 증대되기 때문임. Rab8B를 억제하는 것이 암 치료에 효과적일지는 아직 명확하지 않으므로, 정확한 기전 규명과 다수의 암세포들에서 시험을 해보는 것이 필요함.</p>																
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>선충</p>	<p>세포내 이동</p>	<p>EGFR</p>	<p>Rab</p>	<p>FGF</p>												

< 영문 요약문 >

< SUMMARY >

<p>Purpose& Contents</p>	<p><Purpose> Discovery of new target proteins for cancer treatment by elucidating the mechanism of Rab small GTPases and their interacting proteins in intracellular trafficking using <i>C. elegans</i> model and cancer cell lines. <Contents> - Discovery of Rab genes which mediate EGFR-Ras-MAPK signaling using <i>C. elegans</i> multivulva strain and 30 Rab RNAi screen. - Candidate gene approach of putative RabGAP and RabGEF proteins using the genetic analysis of their mutant in <i>C. elegans</i>. - Discovery of new Rab8 interacting proteins using the yeast two-hybrid screen. - Observe the knockdown phenotype of Rab8A and Rab8B by siRNA transfection in A431 cells. - Investigation of changes in the junction protein localization and expression by Rab8B knockdown.</p>				
<p>Results</p>	<p>- Rab8 is required to mediate EGFR/Ras/MAPK signals by regulating FGF secretion in <i>C. elegans</i>. - GCK-2/MAP4K, CSN-5, KEL-8, CCM-3 were found from the yeast two-hybrid screen using <i>C. elegans</i> Rab8 as a bait. - Knockdown of either Rab8A or Rab8B displayed the slow cell growth in A431 cells. - Knockdown Rab8A and Rab8B displayed different phenotypes in cell adhesion. Rab8A knockdown reduced cell adhesion protein localization at the plasma membrane, but Rab8B knockdown increased.</p>				
<p>Expected Contribution</p>	<p>- Rab8A is possible to use a prognostic factor because its expression is correlated with the survival of lung adenocarcinoma patients. - Although it requires the exact mechanism of Rab8B function and its function should be tested in many cancer cells and in vivo, Rab8B inhibition looks better than Rab8A inhibition to apply cancer treatment. - To inhibit Rab8B is expected to decrease cancer cell growth and metastasis, because Rab8A knockdown resulted in the slow growth and migration of A431 cells.</p>				
<p>Keywords</p>	<p>C.elegans</p>	<p>Intracellular trafficking</p>	<p>EGFR</p>	<p>Rab</p>	<p>FGF</p>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	
2. 국내외 기술개발 현황	
3. 연구수행 내용 및 결과	
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	
5. 연구결과의 활용계획 등	
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	
7. 연구개발과제의 대표적 연구실적	
8. 참여연구원 현황	
9. 기타사항	
10. 참고문헌	

<별첨> 자체평가의견서

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제별로 작성함

(I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

<본문작성 양식>

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- Intracellular trafficking을 조절하는 Rab small GTPase들과 Rab interacting protein들의 기능을 선충 모델에서 기능을 규명함으로써 새로운 항암 표적을 발굴하고자 함. 이를 위하여 다음과 같은 연차별 목표를 둬م.
- 선충의 29개 Rab 유전자들과 Rab 상호작용 유전자들의 RNAi phenotype을 통한 분석
- 발암성 신호 전달 과정에서 Rab8과 FGF 역할 규명
- EGFR/Ras/MAPK 신호전달 하위에서 Rab8과 Rab8 결합 단백질들의 상호작용 분석

1-2. 연구개발의 필요성

(1) 막이동 관련 조절 단백질의 연구 현황

1) Membrane trafficking 조절에서 Rab GTPase의 중요성

세포소낭(vesicle)의 이동에 의한 세포소기관 사이의 membrane trafficking은 진핵세포에서 본질적 특성임. Small GTPase superfamily는 Rab GTPase들은 이동물질들의 목적지로의 정확한 이동에 핵심적인 역할을 함. Rab은 sorting adaptors, tethering factors, kinases, phosphatases와 motors를 끌어들여 membrane identity, vesicle budding, uncoating, motility와 fusion 같은 다양한 현상을 조절함. 다수의 Rab은 공유하는 effectors를 통하거나 선택적 Rab activators과의 상호작용을 통하여 막이동의 시공간적인 조절을 수행함. 이러한 Rab 경로의 기능적 이상은 면역결핍(immunodeficiency), 암과 신경 조절 이상을 유발함.

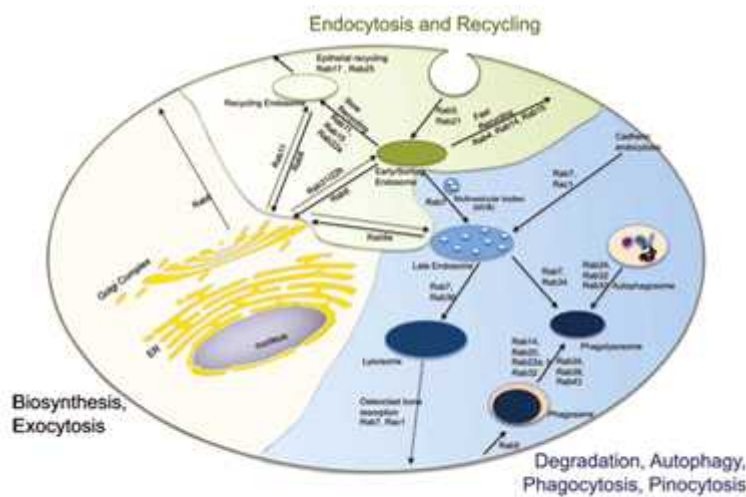


그림 1. Rab GTPases in endocytosis, recycling, and degradative pathways.
(Agola et al., Clin Genet 2011)

Receptor mediated endocytosis는 clathrin-coated vesicles에 의해 일어나고, Rab5와 Rab21에 의해 조절됨. Internalized cargo는 early/sorting endosomes으로 운반되고, 여기에서 물질들은 recycling endosomes과 특정한 Rab GTPases의 활성화에 의한 빠르게 또는 느리게 plasma membrane으로 재이동됨. 새로 합성된 세포막 단백질들은 trans-Golgi network에서 운반되어 recycling endosomes으로 이동되는 반면에 lysosomal hydrolases는 2개의 mannose 6-phosphate receptor를 통해서 early 또는 late endosomes으로 이동됨. Early endosome에서 Golgi로의 재이동은 Rab6에 의존하고, late endosome에서 trans-Golgi로 이동은 Rab9이 조절함. Rab7은 multiple degradative pathways에서 필수적이고, late endosome, phagosome, autophagosome과 lysosomes의 결합은 이 3가지 경로에 특이적인 Rab GTPases가 담당함. Rac1과 Rab7의 결합은 osteoclasts에 의한 bone resorption뿐만 아니라, 상피세포와 신경에서 cadherin degradation에 핵심적인 역할을 함(Stenmark, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009).

2) Rab effector 단백질에 의한 Rab의 활성 조절

ER에서 새로 합성된 GDP에 결합된 Rab은 REP에 의해 인식되고, prenylation을 하는 GTT enzyme에 노출됨. 많은 경우, prenylation에 이어서 GDP dissociation inhibitor (GDI)가 prenylation group에 결합하여 Rab을 정확한 endosomal compartment에 위치하기에 앞서 cytosol에 머물러 있게 함, 정확한 endosome에 이르러, GDI는 GDF에 의해 제거되고 guanine exchange factor (GEF)가 GDP-GTP 교환을 하게됨. GTP결합 Rab은 effector들과 결합하여 다양한 이동 기능을 수행함. 막에 있는 활성화된 GTP Rab은 GTPase activating proteins (GAPs)에 의해 불활성 되어, GDP결합 상태로 되돌아감. 몇몇 경우에는 GDI가 GDP결합 Rab을 막에서 세포질로 이동시켜, 이러한 과정을 다시 시작하게 함(Mitra et al., Seminars in Cell & Developmental Biology, 2011).

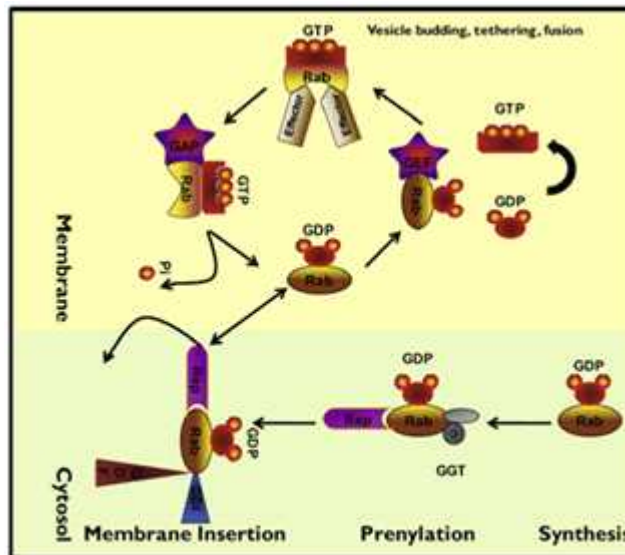


그림 2. GTP exchange and membrane association cycles
(Mitra et al., Seminars in Cell & Developmental Biology, 2011)

3) Rab과 Rab interacting protein들의 암세포에서의 역할

Rab GTPase들은 아직 치료학적으로 더 연구되어야 하지만, 이미 잘 알려진 인체 질병의 표적임. 변이와 잘못된 조절에 의한 Rab과 Rab interacting protein들이 조직 특이성과 질환에 어떻게 기여하는지가 효과적인 약제 표적의 발굴을 위해 연구가 많이 필요한 분야임. Rab과 Rab interacting protein들의 변이는 암을 비롯한 수많은 인간 유전 질환의 원인임. 세포 증식과 항상성의 잘못된 조절에 의한 동적인 유전체 변화는 암을 유발함. 막에 결합된 성장인자 수용체와 integrin은 세포 증식과 생존의 경로를 조절함. 잘못된 endocytosis는 분해를 중단시키고, 성장인자와 Integrin의 재이동을 증가시켜 암 세포에 성장인자와 세포외기질(extracellular matrix)를 부여함. 따라서 endocytosis, vesicle targeting과 receptor recycling이 잘못되면, cell adhesion, migration, proliferation, polarity, asymmetrical division과 overall survival이 변하는 암세포적 특징이 나타남. 여러 유전체 연구를 종합해 보면, Rab 경로의 이상이 다양한 암종의 발생과 성장에 기여하는 것을 짐작할 수 있음. Rab23의 과발현은 침윤성 위암과 관련되어 있고, Rab38은 melanoma, Rab2B는 대장암, Rab1A는 설암과 연관되어 있음. Rab5a와 Rab7b의 과발현은 thyroid-associated adenomas서 발생하고, Rab27A effector JFC1/Slp1은 전립선암에서 분비 과정에서 중요한 조절자임. 간암은 Rab1B, Rab4B, Rab10, Rab22A, Rab24 and Rab25등이 흔하게 과발현 되어, 특히 Rab 조절에 민감함. Rab27A는 insulin-like growth factor II의 분비 조절을 통해 유방암 세포의 침윤과 전이를 촉진함. Rab27B는 유방암 모델에서 Hsp90와 MMP2를 활성화시켜 G1-S transition, proliferation, invasive tumor growth와 lymph node metastasis를 증가시킴. Rab31은 침윤성 유방암의 낮은 치료 성과와 관련됨. 자궁암에서 분석 결과에서 현재까지 알려진 Rab or Rab-associated genes의 절반정도에서 발현 증가가 나타남.

자궁암에서 분석 결과에서 현재까지 알려진 Rab or Rab-associated genes의 절반정도에서 발현 증가가 나타남. Rab11A, Rab11B, Rab25/Rab11C and their effectors들은 breast, colon, lung, ovarian, renal, endometrial, prostate, bladder 등 다양한 암종에서 중요한 역할을 함. 암세포는 endocytosis의 여러 단계를 방해하여 Receptor tyrosine kinase(RTK)와 integrins을 통한 생존 신호를 높게 유지함. 따라서 Rab GTPase들은 암 표지자로 사용할 수 있을 것임(Mitra et al., Seminars in Cell & Developmental Biology. 2011).

3) 상피세포 암과 세포 극성

상피세포의 극성은 상피세포를 구성하는 3가지 세포 기구를 통합한 결과임. Polarized trafficking machinery는 cytoskeleton과 secretory/endocytic machineries를 to the task of sorting and delivering 서로 다른 세포막 단백질들을 apical과 basolateral로 분류하고 이동시킴. Domain-identity machinery는 apical과 basolateral PM domains 사이에 tight junctional fence (TJ)를 이루고, polarity proteins과 polarity lipids를 세포막의 세포질 쪽으로 보냄. 3D organization machinery는 다른 상피세포의 위치 센서로 adhesion molecules을 이용하고, domain-identity와 polarized trafficking machineries의 활성을 포함하는 위치 정보의 통합자로 basement membrane과 small GTPases를 이용함. 인간 암의 90%는 상피세포에서 유래한 암종이며, 상피세포 암은 세포 극성 프로그램 기구를 빼앗아 세포 극성을 잃어버리게 만듦. 세포 극성을 잃어버리는 것은 종종 암의 공격적 성향 정도와 상호관계가 있음.

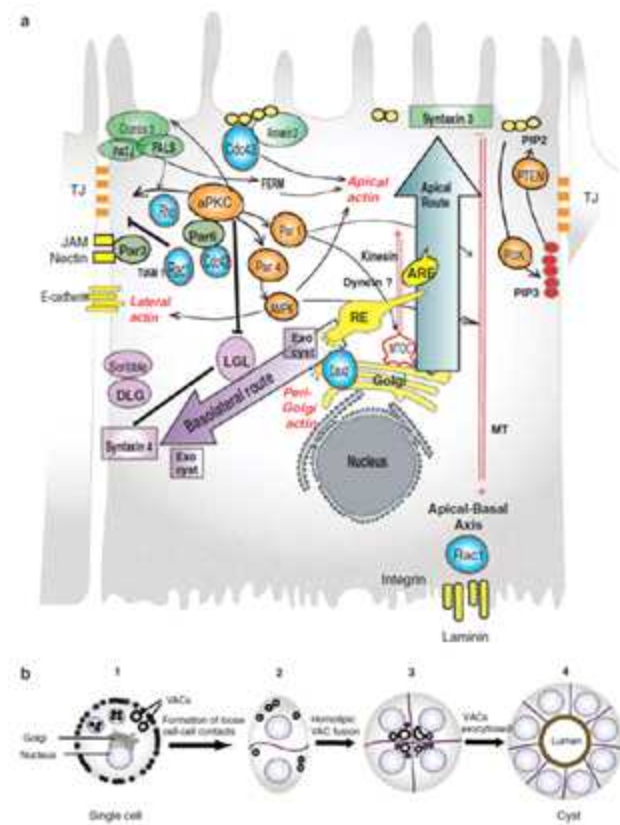


그림 3. The epithelial polarity program (Tanos and Rodriguez-Boulan, Oncogene. 2008)

으로써의 TJ를 갖추는 것과 세포골격의 구성을 통한 세포막으로의 극성화된 이동 경로의 확립을 결과로 완성됨. 상피세포와 내막세포들은 때때로 세포내에서 vacuolar apical compartment (VAC)인 luminal domains을 형성함, VACs은 homotypic fusion으로 커다란 액포로 성장하여 최종적으로 세포막과 융합하여 lumen을 생성함.

세포 외부로부터의 자극은 cell-cell 또는 cell-substrate adhesion molecules에 의해 인지되고, Par complex와 basolateral Scribble complex (Scribble, DLG, LGL)를 small GTPases Cdc42 그리고 Rac1과의 협력을 통해서 조절됨. 인산화는 이러한 분자들을 서로 다른 도메인에 분리하여 유지함. The Crumbs complex Crumbs1/PATJ/PALS)는 the Par complex (Par3/Par6/aPKC)와 상호 작용을 통해 tight junction (TJ) 형성과 apical domain 정체성(identity)을 조절함. The Scribble complex는 basolateral membrane identity를 조절하고, TJ 형성에 기여함. Apical과 basolateral membrane의 정체성은 PI3K에 의해 합성되는 매우 동적인 basolateral PIP3와 phosphatase PTEN에 의해 PIP3로부터 생성되는 apical PIP2에 의존함. Par1은 apical 방향으로 minus end를 가지고 basolateral 쪽으로 plus end를 가진 microtubule(MT)의 대단위 정렬을 조절함. Apical 쪽으로 향하는 + end를 가진 동적인 microtubule의 소단위체는 계속해서 MTOC로부터 생성됨. Kinase Par4 (LKB1)는 세포외적인 자극과 상관없이 AMPK에 의한 세포골격의 극성을 조절함. Apical 또는 basolateral domains의 정체성은 담장

상피세포의 극성이 붕괴되면 대표적으로 EGFR 신호를 활성화 시킴. 상피세포에서 EGFR은 basolateral 쪽에 위치하고 EGF는 apical 쪽에 위치함. 상피조직의 상처에 의해 Tight junction (TJ)이 파괴되면 receptor와 ligand가 섞이게 되어 EGFR을 활성화시킴. 그 결과로, 세포증식이 일어나고 상처를 막게됨. 발암과정에서 TJ의 파괴도 이와 유사한 효과를 가짐. 지속된 EGFR 활성화는 세포증식을 높이고 epithelial-mesenchymal transition (EMT)에 의한 neoplastic transformation을 유도함. 이동성, 침윤성, 전이성 세포들은 멀리 떨어진 조직에 침투할 수 있게됨. 또 다른 방편으로, EGFR의 apical membrane으로 잘못된 분포는 이와 유사한 효과를 가짐(Tanos and Rodriguez-Boulan, Oncogene. 2008).

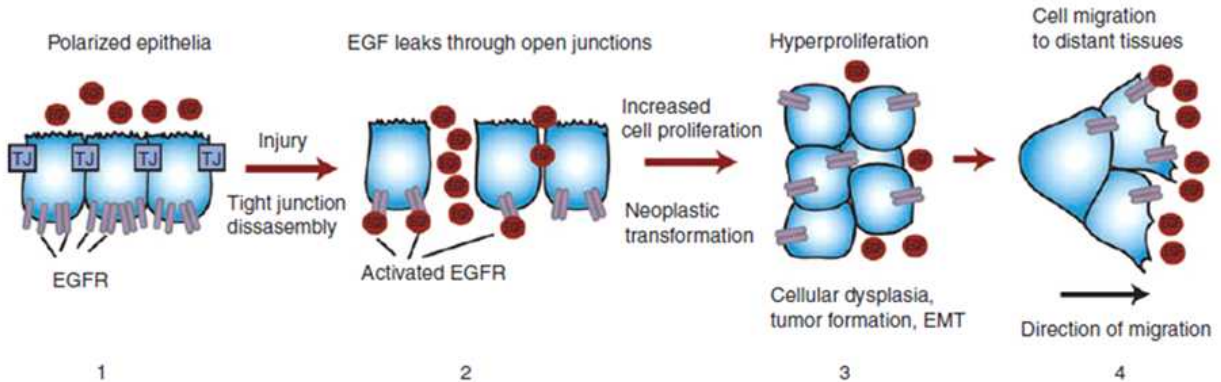


그림 4. Disruption of epithelial polarity activates EGF receptor (Tanos and Rodriguez-Boulan, Oncogene. 2008)

(2) 막이동 조절 단백질의 연구에 있어 문제점

1) 효모와 세포 배양 시스템에서의 막이동 연구의 한계성

세포에서 분비와 막이동의 연구에 있어 효모(yeast)의 유전학적 연구는 지대한 공헌을 했으며, 마찬가지로 세포 배양 시스템을 이용한 세포생물학적 및 생화학적 연구 결과들이 막이동 연구에 대한 방대한 지식을 제공하였음. 효모 시스템의 한계는 단세포 생명체이므로 다세포 동물에서 일어나는 복잡하고 진화적으로 다변화된 막이동 현상의 추가적인 이해가 어렵다는 것임. 실제로 효모는 11개의 Rab 유전자를 가지는데 비해, 사람은 60개의 Rab을 가짐. 세포 배양 실험은 실제 생체 내에서 복잡한 세포와 세포 또는 세포와 세포외기질 등의 상호작용과 구조를 배제한 상태에서의 이루어지고 있음. 세포 배양 실험은 동일한 세포군을 이용하여 실험하기 때문에 세포 내에서 일어나는 기전의 설명에는 적합하지만, 직접적이고 평면적인 연구를 벗어나기 어려움.

2) 다세포 모델 동물에서 막이동 조절 단백질의 연구의 한계성

Rab을 비롯한 막이동 조절 단백질들은 진핵세포에서 기본적 기능을 수행하므로, 대부분 개체 생존에 필수적임. 효모에서는 temperature-sensitive mutant screen을 통해 대부분 막이동 조절 단백질들을 찾아내고 그 기능을 규명함. 이와 달리 초파리와 선충에서는 대부분 mutant들이 lethality를 보이므로 유전학적 접근이 어려웠음. 제브라피쉬나 마우스와 같은 척추 동물 모델에서는 유전학적 스크린 방법은 더욱 어렵고, 역유전학적 방법으로 연구될 수밖에 없음. 하지만 이마저도 Conditional Knockout 또는 Knockin 방법을 이용해야 하는 어려움이 있음. 배양된 세포에서는 간단히 siRNA로 Knockdown할 수 있는 것에 비해 비용과 시간적인 면에서 절대적으로 불리함.

(3) 막이동 조절 단백질의 연구의 향후 전망

1) 새로운 암 억제 전략으로의 방향성 제시

발암유전자를 표적으로 신규 개발된 항암제들은 글리벡을 제외하고는 기존의 전통적인 항암제 보다 못하거나 보조적으로 사용되므로 기대치에 비효 효능이 현저하게 떨어짐. 따라서 발암유전자와 차별화된 새로운 항암제 표적의 발굴과 이를 저해하는 방법의 필요성이 증대되고 있음. Tumor microenvironment나 cancer metabolism의 연구가 최근 들어 활발해지고 있는 이유임. 본 과제는 이러한 연구들과도 차별화하여 암 관련 연구 분야에서 최근 관심을 받기 시작한 막이동의 조절 연구를 통한 새로운 표적 경로를 제시하고자 함. 막이동의 조절은 특히 상피 세포에서 세포극성의 유지에 필수적이고 세포 증식과 이동, 침윤 및 전이에 밀접하게 연관되어 있으므로 암 세포에서 막이동을 제어함으로써 암 치료 효과를 얻을 수 있을 것임. 막이동 조절 단백질들 중에서 특히 Rab과 Rab interacting protein이 중요한 이유는 포유동물에만 60종의 Rab이 존재하고 각각의 Rab에 대한 공통적인거나 특이적인 GEF와 GAP이 존재하여 특정 조직이나 세포에서 발생한 특정한 암을 특화하여 공략할 수 있는 가능성이 높음.

2) 선충에서 막이동 조절 단백질의 연구의 추세와 장점

2000년대 이후로 초파리와 선충에서 막이동 조절 단백질 연구가 활발하게 이루어지고 있음. 아래 그래프는 Rab과 *Drosophila* 또는 *C. elegans*로 Pubmed에서 논문을 검색하여 수치화한 것임. 2000년 이전에는 거의 다세포 동물 모델을 이용한 Rab 연구가 이루어지지 않고 있다가 2000년대 이후에는 빠르게 증가함.

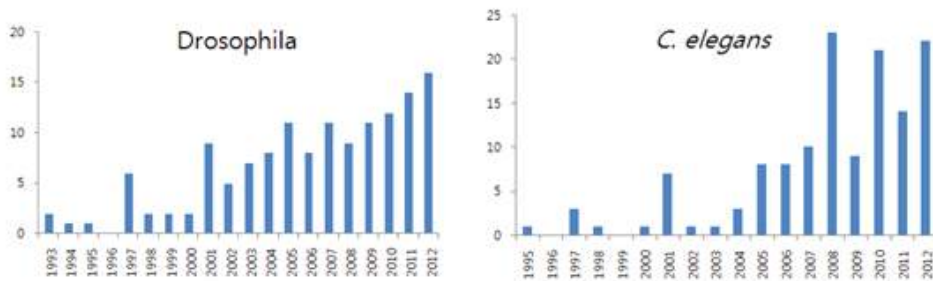


그림 5. 초파리와 선충에서 Rab 관련 연구의 추세

특히 선충에서의 Rab 연구는 최근 몇 년 사이에 급격하게 증가하고 있음. 선충에서 이러한 연구 증가가 일어나는 이유는 살아 있는 상태에서 이동되는 단백질에 GFP결합하여 발현시켜 효모에서 수행한 mutant screen방법과 유사한 형태로 새로운 유전자 발굴을 할 수 있기 때문임. 또한 RNAi에 의한 유전자 발현 억제가 아주 쉽고, genome-wide screen을 수행할 수 있기 때문에 essential gene의 연구도 가능하다는 장점이 있음.

3) *C. elegans*를 이용한 막이동 조절 유전자의 입체적 조망

본 연구계획은 선충이 가진 장점을 극대화하여 기존 연구들의 단편적이고 평면적인 연구 수준에서 벗어나 개체 전체에서 전체 Rab과 Rab interacting protein의 기능을 분석하고 입체적으로 조망하고자함. 이를 위해 선충의 대표적인 상피조직인 Hypodermis와 Intestine에서 apical trafficking marker와 basolateral trafficking marker들의 이동 조절에 Rab가 Rab interacting protein들의 기능을 RNAi를 이용해 규명하고자함.

선충은 모두 29개의 Rab을 가지고 있어, 효모의 11 Rab에 비해 충분히 다양하고 사람의 60개에 비해서 간단하기에 충분히 다세포 동물의 상피조직에서 모든 Rab들의 기능적 차이를 통합적으로 이해할 수 있는 연구 성과를 얻을 수 있음.

1-3. 연구개발 범위

- 선충의 29개 Rab 유전자들과 Rab 상호작용 유전자들의 RNAi phenotype을 통한 분석
 - 장세포와 난자에서 Yolk protein 이동에 대한 각 유전자들의 역할 분류
 - Hypodermis에서 Collagen의 분비에 대한 각 유전자들의 역할 분류
 - 선충 생식기 발암모델에서 EGFR 신호전달 경로에 대한 억제 정도를 분석
 - 장세포에서 gut lumen으로 secretion되는 marker 개발

- 발암성 신호 전달 과정에서 Rab8과 FGF 역할 규명
 - 선충의 Muv model에서 FGF 발현과 분비 조절에서 rab-8의 역할 규명
 - 암세포주에서 Rab8과 FGF의 역할 규명: 세포증식과 세포이동의 측면을 중심

- EGFR/Ras/MAPK 신호전달 하위에서 Rab8과 Rab8 결합 단백질들의 상호작용 분석
 - Rab8과 Rab8 GEF의 발현 조절관계 분석
 - gck-2 mutant를 이용한 gck-2와 rab-8 상호 작용의 유전학적 분석
 - Rab8A knockout 세포주 제작을 통한 phenotype 분석

2. 국내외 기술개발 현황

○ 국내외 연구 기관과 유사 연구 주제 분석

구분*	과제 책임자	수행기관	유사연구수행현황	중복여부
대학	Barth Grant	미국, Rutgers University	<i>C. elegans</i> 에서 yolk protein 분비 모델을 이용하여 rab-3,5,7,10,11의 기능을 규명	
연구소	Jim Norman	영국, Beaston 암연구소	Rab과 Rab effector protein의 암에서 기능을 연구	
대학	Amin ghabrial	미국, University of Pennsylvania	<i>Drosophila</i> 의 epithelial morphogenesis와 branching 연구를 통해 Rab35, EGFR 등의 기능 연구	
대학	Francis Barr	영국, Oxford University	Rab과 Rab interacting protein의 세포 이동과 adhesion에 관한 연구	

○ 연구결과의 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

본 연구 과제의 핵심 결과는 아직 논문으로 발표되지 않아서 정확히 다른 그룹과의 비교가 어려움. 선충에서의 초기 연구 결과는 동물세포에서의 연구 결과들을 따라가는 수준이었고, 2차년도 이후에 새로운 결과들을 얻었음. 특히 Rab8과 상호작용하는 새로운 단백질들을 발굴함으로써 Rab8의 기능을 더 자세히 연구할 수 있는 기반을 확보하였음. 인간의 암 세포주에서 Rab8A와 Rab8B의 기능을 연구하여 90% 이상 유사한 이 두 단백질이 적어도 세포 연접을 형성하는데 있어서는 정반대 역할을 한다는 놀라운 결과를 얻었음. 자세한 생화학 및 분자적 기전과 암 세포의 성장과 전이 등에 관해서는 추가 연구가 필요한 형편임. 현재 수준은 경쟁 그룹들에 뒤쳐져 있는 것은 사실이나, 2-3년 뒤에는 대등한 수준으로 경쟁할 수 있을 것으로 기대함.

3. 연구수행 내용 및 결과

○ 1차년도 연구 결과 및 내용

(1) 선충에서 Rab Escort Protein(REP)과 Rab proteins과의 관련성 규명

선충에서 *rep-1*은 몇몇 신경세포와 근육 세포, 인두(pharynx), Intestine 및 Hypodermis에서 발현된다고 알려져 있음 (Danaka et al., Genes cells, 2008). Wormbase(www.wormbase.org)에서는 선충의 *rep-1*이 alternative splicing에 의해 REP-1A와 REP-1B 2개의 단백질로 발현된다는 것이 확인됨.

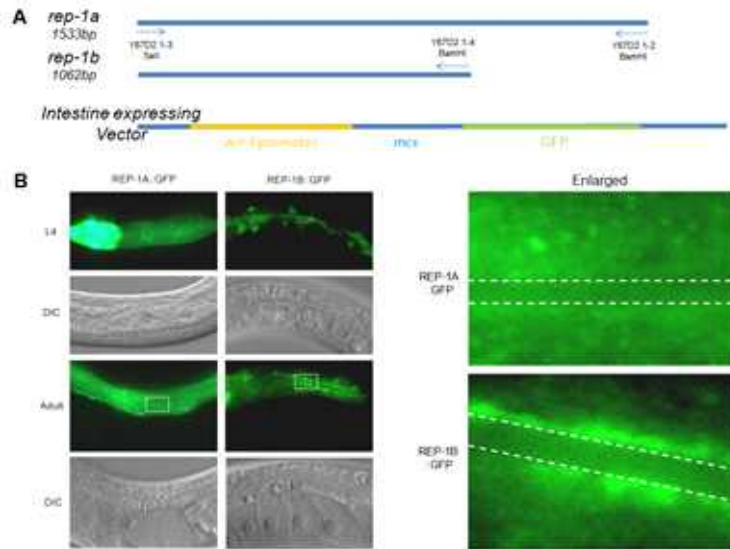


그림 1. REP-1A와 REP-1B의 Intestine 세포에서 발현. (A) *rep-1a/b* cDNA의 Intestine 발현을 위한 vector backbone. (B) Intestine에서 발현된 REP-1A::GFP와 REP-1B::GFP. 오른쪽 창선은 Gut tubule의 경계선임.

따라서 우선적으로 REP-1A와 REP-1B가 세포내에서 발현의 차이가 있는지 알아보기 위해, 그림 1과 같이 Intestine 특이적으로 발현되는 actin의 promoter(*act-5p*)에 조절되는 *rep-1a*와 *rep-1b* 각각의 cDNA를 GFP와 결합시켜 발현시킴. Intestine은 선충의 체세포 중에서 가장 크고, apical/basolateral polarity를 가지므로 세포 내의 단백질 발현 위치 규명에 유리함. REP-1A::GFP와 REP-1B::GFP는 intestine에서 잘 발현되나, 두 단백질은 분포에서 차이가 남. REP-1A::GFP는 intestine 세포 내에서 고르게 분포하는 반면, REP-1B::GFP는 intestine의 apical membrane 근처에 집중적으로 분포됨을 알 수 있음.

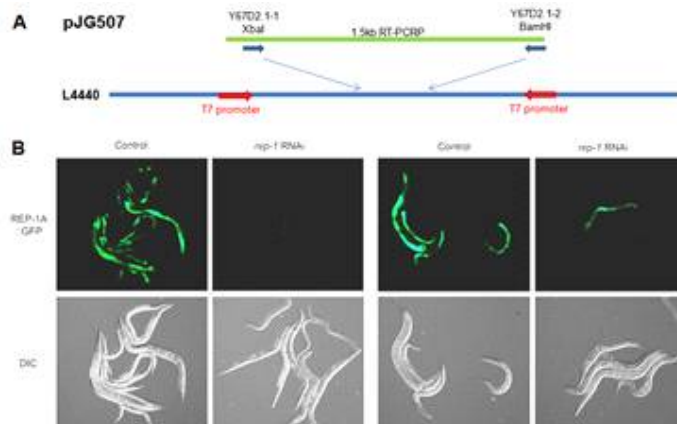


그림 2. *rep-1* RNAi clone 제작과 효과. (A) *rep-1a/b* cDNA를 이용한 *rep-1* RNAi clone 제작. (B) *rep-1* RNAi에 의해 REP-1A::GFP와 REP-1B::GFP의 발현이 효과적으로 억제됨.

REP-1의 knockdown phenotype을 보기 위해서, 그림 2와 같이 RT-PCR을 수행하여 얻은 rep-1 cDNA를 포함하는 RNAi clone을 제작하였고, rep-1 RNAi에 의해 REP-1A::GFP와 REP-1B::GFP 모두 잘 사라지는 것을 확인할 수 있었음.

rep-1 RNAi 결과에 의한 주요 phenotype은 그림에서 보는 것처럼, rep-1의 발현이 억제되면, 생식선에 존재하는 생식세포의 사멸이 일어나고, intestine의 모양이 비정상적이라는 것을 알 수 있음. 이외에 전체적으로 성장이 느리고, 건강하지 못함. rep-1 deletion mutant는 homozygote lethal 또는 sterile 이나, rep-1 RNAi는 progeny 수가 감소하는 것에서부터 다양한 현상을 보임.

1) 선충 시스템에서 yolk protein의 이동에 대한 rep-1 RNAi와 29 rab gene RNAi 결과 분석

가장 최근의 보고에서, 선충은 총 30개의 rab 유전자를 가지고 있음(Gallegos et al., PLoS one, 2012). 이 중에서 23개의 RNAi clone이 Ahringer RNAi library나 Vidal RNAi library에 존재하여 서울대로부터 확보하였음. rep-1과 나머지 6개 rab 유전자에 대한 RNAi clone은 RT-PCR을 하여 각 유전자에 대한 cDNA를 cloning하고, L4440 double T7 promoter vector에 옮긴 후 HT115 host *E. coli* strain에 transformation을 하여 확보하였음.

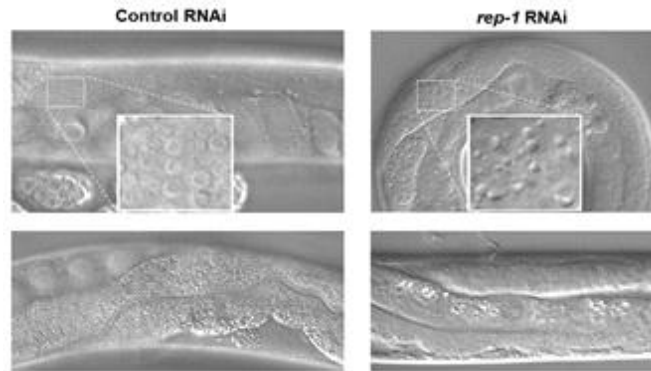


그림 3. rep-1 RNAi에 의한 생식세포의 사멸과 비정상적인 Intestine의 모양. Control은 L4440 vector를 사용.

RT130 strain에 rab RNAi 수행: RT130은 YP170::GFP를 발현하는 Integration line으로 Rutgers University의 Barth Grant 교수 실험실에서 제작되었음. 그림 4에서 rep-1 RNAi에 의한 YP170::GFP의 이동은 Intestine에서 분비가 안 되는 형태로 나타났으며, rab-10, rab-11과 rab-18의 RNAi 결과가 유사하게 나타남. 이와는 달리 rab-5와 rab-35의 RNAi 결과는 intestine에서 Yolk protein의 분비는 정상이나 난자로 endocytosis가 되지 않았으며, 나머지 rab 유전자들은 영향이 없었음. 따라서 intestine에서 yolk protein의 분비와 관련해서는 rep-1이 rab-10, rab-11, rab-18과 동일한 경로에서 기능하거나 함께 역할을 수행할 가능성이 있음.

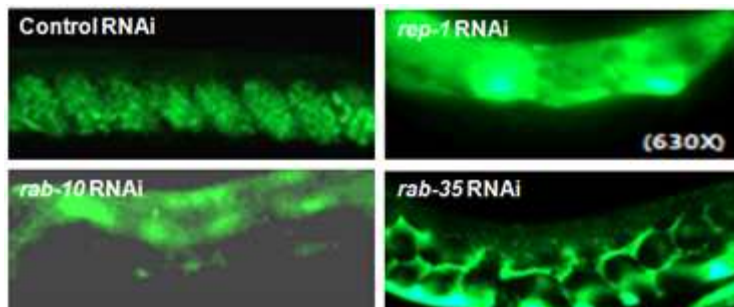


그림 4. rep-1과 rab RNAi 결과

2) Collagen 분비에 대한 rep-1과 rab의 기능적 차이 규명

선충에서 collagen은 cuticle을 이루는 주요 성분으로 잘 연구되어 있음. 선충에서 160종에 달하는 collagen은 주로 hypodermal cell에서 생성되어 apical 방향으로 분비가 이루어짐. 이 과정에서 rep-1과 rab 단백질들의 차이를 알아봄.

COL-19::GFP를 발현하는 Integration line인 TP12를 이용하여 rab RNAi를 수행하였음. rep-1의 RNAi 결과 COL-19::GFP의 분비와 cuticle에서의 배열이 정상적이었으며, rab-5를 제외한 다른 rab의 RNAi 결과도 별 다른 영향이 없는 것으로 나타남. 이 결과로 보면, 선충의 hypodermis에서 collagen의 apical secretion에 rep-1이나 대부분 Rab들은 기능하지 않는다는 것을 알 수 있었음.

(2) EGFR 신호전달 경로와 rep-1 및 rab의 관련성 규명을 통한 EGFR 신호 억제 전략

1) 선충의 생식기 발암 모델을 이용한 EGFR 신호 억제 rab 유전자 스크린

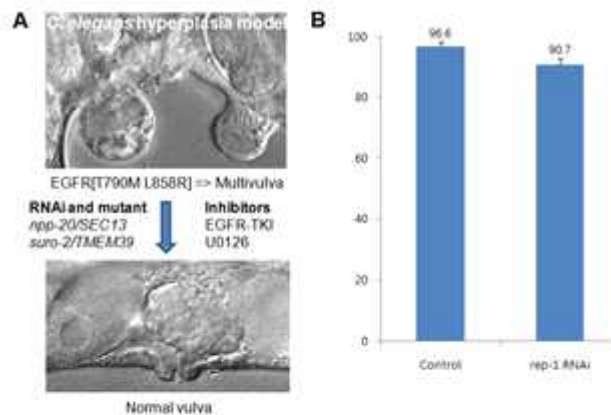


그림 5. JG388 Muv model에서 rep-1 RNAi 결과. (A) 발암성 EGFR의 발현에 의한 Muv형성은 특정 유전자의 RNAi 또는 EGFR-TKI 등에 의해 저해됨. (B) rep-1 RNAi에 의한 Muv suppression은 최대 6% 정도임.

선충에서도 최근에 rab-7이 EGFR 신호를 억제한다는 것이 보고되었고(Skorovogata and 개초딘며, PLoS one, 2012). 본 실험실에서는 인간의 oncogenic EGFR을 과발현한 multivulva(Muv) strain을 이용하여 EGFR-TKI의 작용과 이 모델을 이용한 새로운 저해제 스크린을 수행한 논문을 2012년도에 발간하였음(Bae et al., PLoS one, 2012). 발암성 EGFR을 과발현하는 선충모델의 장점은 Muv phenotype이 기존의 선충 Muv mutant들에 비해 구분하기 좋고, 이레사와 타세바 같은 항암제 반응성이 인간의 암세포에서와 동일하다는 것이 특징임. 특히 본 실험실에서는 EGFR-TKI에 민감한 EGFR[L858R] 모델과 내성을 가진 EGFR[T790M L858R]에 의한 두 가지 모델을 제작하였으므로, EGFR에 의한 암화과정에서 rab 유전자 발현을 억제하여 EGFR의 이동과 분포를 조절하는 것과 EGFR-TKI에 의한 효과를 비교 분석할 수 있는 장점이 있음.

EGFR-TKI 내성 EGFR[T790M-L858R]을 발현하는 JG388 strain에 rep-1의 RNAi를 수행한 결과, 그림 5B에서 보는 것처럼 의해 발암성 EGFR에 의한 Muv 형성이 겨우 6% 정도 억제 되는 것이 최대치임을 확인하였음. 이 결과는 A549 또는 A431과 같은 EGFR을 과발현하는 암세포주에서 rep-1을 siRNA를 이용해서 knockdown했을 때, EGFR의 발현과 활성 모두가 감소한 결과(비교생명의학연구과 내부 비공개 결과)에 비해서 효과가 거의 없는 것처럼 보임.

선충에서 JG388 strain을 이용하여 29개 rab 유전자의 RNAi screen을 수행한 결과, 그림 6에서처럼 전체적으로 Muv suppression이 일어나는 정도가 약함을 알 수 있음. 최대 10% 수준에서 억제 되는 정도임. RNAi가 선충의 생식기 형성과정에서 잘 작동하지 않는 것처럼 보임. 따라서, 우리는 EGFR-TKI에 잘 반응하는 EGFR[L858R]을 발현하는 또 다른 multivulva strain인 JG324에 rab RNAi 실험을 여러차례 수행하였음. 그 결과로 JG324와 JG388에서 모두 항상 Muv suppression이 관찰되는 rab-6와 rab-8 두 유전자를 선택하였음.

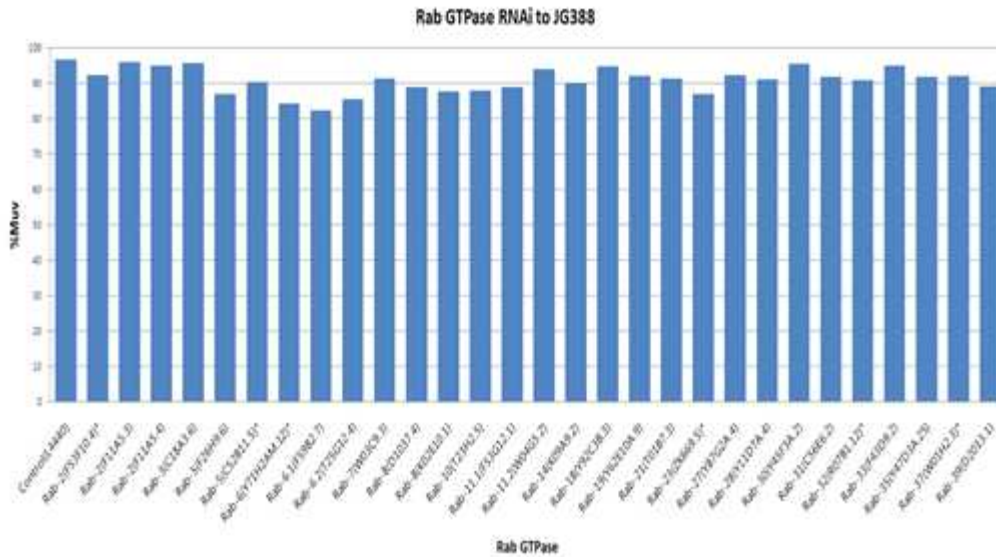


그림 6. JG388에 *C. elegans* 전체 rab gene RNAi를 수행한 결과

2) Multivulva mutant를 이용한 rab-6와 rab-8의 유전학적 분석

선충에 존재하는 대표적인 Muv mutant로 *lin-15*(n765), *let-23*(sa62), *let-60*(n1700)이 잘 알려져 있음. *lin-15* mutant는 EGF의 분비를 과도하게 하여 Muv을 형성하는 열성 돌연변이체이고, *let-23*는 선충의 EGFR의 gain-of-function(*gf*) mutant임. *let-60*는 Ras의 *gf* mutant로 이 3종의 돌연변이체는 상위에서 하위로의 단일 경로를 구성함.

*rab-6*와 *rab-8*이 EGFR 신호전달경로의 어느 단계에서 작용하는지 알아보기 위해, *lin-15*, *let-23*, *let-60* Muv mutant에 *rab-6*와 *rab-8* RNAi를 실시하였음. 그 결과 그림 7에서처럼, *rab-8*은 대체로 3종의 돌연변이체에서 Muv 발생을 잘 줄이는 것으로 확인되었음. 특히 *rab-8*과 상호작용한다고 알려진 *rab-10*의 경우도 *rab-8*과 유사하게 Muv suppression을 함으로써, *rab-8*은 Ras의 하위에서 작용한다는 것을 알 수 있음.

*rab-6*의 경우는 선충에 3종류가 존재하여, 각 유전자 단독 RNAi에 의해 충분히 Muv suppression이 일어나지 않을 가능성을 배제할 수 없음. 3종류의 *rab-6*가 JG388(그림 6)에서 10% 정도로 비교적 Muv suppression을 잘 하였으나, PS1839(*let-23*)에서는 5% 정도이나 동일한 경향성을 나타냄. 하지만, *let-60*의 경우에는 어느 정도 suppression을 하는 것처럼 보이거나, *rab-8*과 비교해 현저히 그 효과가 떨어지는 것을 알 수 있음. 이 결과들을 종합하여 그림 7D와 같이 *rab-6*과 *rab-8*의 EGFR 신호전달경로에서 작용점을 정리하였음. *rab-6*는 mutant를 통해 보다 확실한 증거가 필요하나, *rab-8*의 경우는 Ras/*let-60*의 하위에서 과도한 EGFR 신호전달을 매개하는 역할을 수행할 것으로 확신됨.

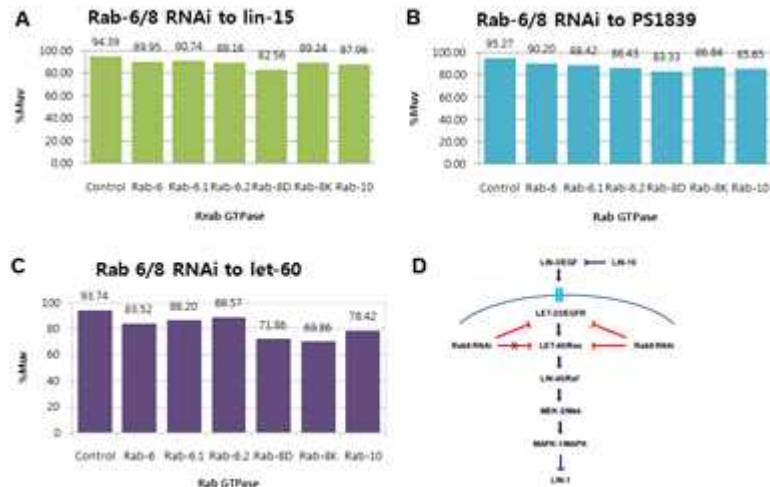


그림 7. 3종류의 Muv mutant에서 rab-6와 rab-8의 RNAi를 수행한 결과. (A) EGFR 상위에 존재하는 lin-15에서 RNAi 결과. (B) 선종의 EGFR gain-of-function mutant인 let-23(sa62)에서 RNAi 결과. (C) Ras/let-60 mutant에서 RNAi 결과. (D) 3종의 Muv mutant에서 RNAi를 수행한 결과로 얻은 rab-6와 rab-8의 작용 단계.

3) 선충 Muv model을 통한 Retromer complex와 COPII의 역할

rab-6는 Golgi에서 retrograde transport를 담당하는 것으로 알려져 있음(Luo et al., Mol Biol Cell, 2011). 이 과정에서 retromer complex와 상호작용하는 것으로 보고되었음. 이러한 점을 근거로 retrograde transport와 ER에서 Golgi로 단백질을 수송하는 COPII의 역할을 Muv model에서 확인해 보았음.

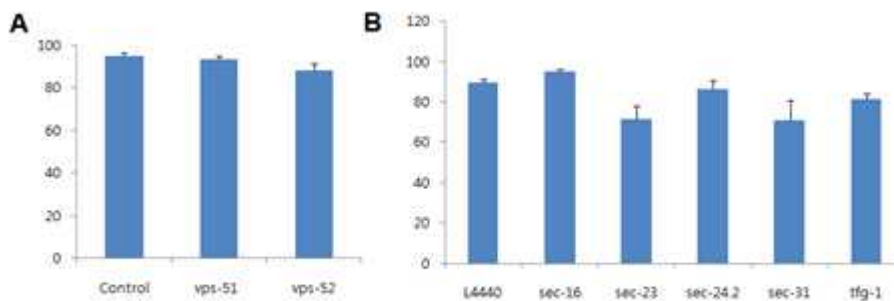


그림 8. Retromer complex와 COPII RNAi에 의한 Muv suppression. (A) rab-6와 상호작용하는 retromer complex인 vps-51과 vps-52의 RNAi 결과. (B) ER에서 Golgi로 수송을 담당하는 COPII component 유전자 RNAi 결과

그림 8A에서와 같이, retromer complex를 구성하는 여러 유전자 중에서 vps-51과 vps-52의 RNAi를 이용해 Golgi에서 retrograde transport의 Muv suppression 여부를 확인하였음. 그 결과 5% 미만의 효과만 있어, retrograde transport는 Muv 형성에 관여하지 않음을 알 수 있고, 따라서 rab-6 RNAi에 의한 Muv suppression은 retrograde transport와는 관련성이 없음을 알 수 있음. 이와 달리, COPII 구성 유전자들의 RNAi에 의해서는 sec-16처럼 별 효과가 없는 유전자가 존재하며, 이 경우 RNAi가 잘 작동했는지 확인하지는 못했기에 확신할 수는 없음. sec-24.2는 sec-24.1과 중복성이 있어 효과가 나지 않았을 것 같음. tfg-1은 선충 모델에서 발견한 발암 관련 유전자로 COPII와 같이 기능한다고 알려져 있음(Witte et al., Nat Cell Biol, 2011). tfg-1이 표준으로 보면, sec-23과 sec-31의 경우 Muv suppression을 잘 하는 것으로 나타남. 결과에 보이지는 않았지만, Sec13 상동유전자인 npp-20 RNAi에 의해서도 Muv suppression이 10% 정도 감소되는 것으로 보아, 과도한 EGFR 신호에 의한 Muv 형성은 anterograde transport가 중요하다는 것을 알 수 있음.

4) 선충 Muv 발생의 하위에서 rab-8과 FGF 신호전달 경로와의 관련성

앞서 서술했듯이, rab-8이 여러 번의 반복 실험과 여러 strain들을 이용한 실험에서 일정한 결과를 나타내고 있으며, rab-8이 다른 유전학적 분석에서 Ras/let-60의 하위에 작용함은 알려져 있음(Homes et al., C. elegans Meeting 2010 at Heidelberg).

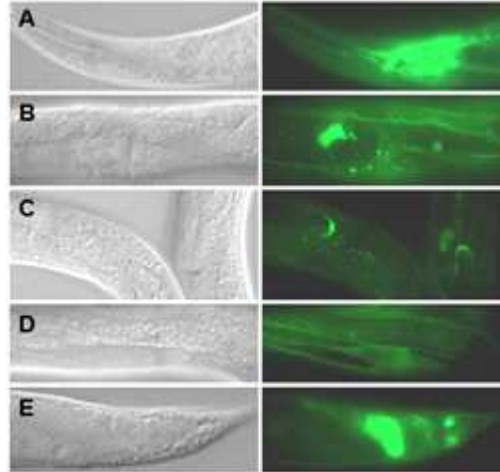


그림 9 RAB-8(D1037.4): GFP로 본 Rab8의 발현. (A) neurons and nerve ring. (B) Vulva. (C) Distal Tip Cells. (D) Body Wall Muscle. (E) Intestine and tail neurons. 간섭자 이미지(왼쪽), 형광이미지(오른쪽)

비록 RNAi가 선충 생식기 발생 모델에서 잘 작동하지 않지만, rab-8에 관해서는 우리의 실험 결과가 확실함을 알 수 있음. 따라서 rab-8의 기능을 이해하기 위해서 우선적으로 rab-8의 발현을 확인하였음. rab-8의 발현 확인을 위해서 rab-8의 promoter에서부터 rab-8의 coding region까지를 선충 발현용 GFP vector(pPD95.77, Dr. Fire)에 cloning한 후, microinjection을 이용해 형질전환 개체를 제작하였음. 그림 9는 RAB-8::GFP를 발현하는 선충에서 촬영한 사진임.

rab-8은 신경세포와 근육, 장세포, 생식선의 distal tip cell(DTC) 등에서 발현되고, 특히 vulva에서도 발현됨(그림 9B). 따라서 rab-8이 선충의 생식기 발생에 관여할 가능성이 높다고 생각됨. 다른 그룹의 genome-wide RNAi 연구에서 rab-8의 RNAi phenotype이 생식선 이동(gonad migration)이 문제가 있는 것으로 나타났는데, 우리의 실험 결과로 보면(그림 9B,C), rab-8이 생식선의 이동을 이끄는 DTC에서 강하게 발현되는 점의 발견도 흥미로움.

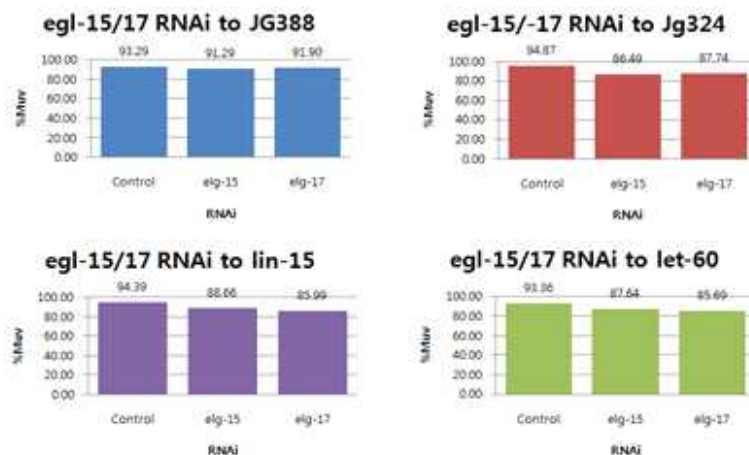


그림 10. FGF/egl-17과 FGFR/egl-15의 RNAi에 의한 Muv suppression. (A) JG388 strain에서의 egl-15 or egl-17 RNAi 결과. (B) JG324 strain에서의 egl-15 or egl-17 RNAi 결과. (C) lin-15 mutant에서의 egl-15 or egl-17 RNAi 결과. (D) Ras/let-60 mutant에서의 egl-15 or egl-17 RNAi 결과.

rab-8이 Ras 하위에서 어떻게 oncogenic signal을 매개하는지 알기 위해 문헌 조사를 한 결과, rab-8이 FGF의 분비에 관여한다는 보고(Kamikuma and Cooper, Traffic, 2006)가 있음. 이에 착안하여 FGF의 억제제 Muv 형성 과정에 관여하는지 알아보기로 함. 선충에서 FGF/egl-17과 FGFR/egl-15는 모두 egg laying defect를 보이는 것으로 잘 알려져 있으나, 이들 유전자 단독으로 mutation이 일어나도 vulval development에는 형태적으로 영향이 없는 것으로 알려져 있음. 따라서, oncogenic signal에 의한 tumorigenesis 상황에서 FGF 또는 FGFR이 세포 증식에 영향이 있는지를 알아보기 위해, egl-15와 egl-17의 RNAi를 수행하였음. egl-15와 egl-17의 cDNA를 RT-PCR을 통해 얻고, 이를 L4440 RNAi vector에 넣어 RNAi clone을 확보하였음. 이들 RNAi를 JG388/JG324와 같은 transgenic strain과 lin-15, let-60와 같은 mutant에 처리하여, Muv suppression이 일어나는지 확인하였음. 그림 10에서 JG388은 실험상의 문제인 것처럼 보이며, 다른 3종의 Muv strain에서 Muv 형성이 억제되는 것을 관찰하였음. 이 결과로 EGFR/Ras signal을 전달하기 위해서는 하위 단계에서 FGF 신호전달이 중요하다는 것을 나타냄.

5) 암세포주에서 Rab6와 Rab8의 기능 연구

선충에서 선정된 연구 결과를 토대로, 암 연구에 적용하기 위해, 일단 그림 11A에서처럼 폐암세포주 A549에서 siRNA의 knockdown 효과를 살펴보았음. Rab6A와 Rab8A에 대한 siRNA 모두 A549 세포주에서는 특이적으로 각각의 Rab 단백질 발현을 억제하는 것을 Western blot으로 확인하였음.

다음으로 Rab8에 집중하기 위해, Rab8이 Human Protein Atlas에서 유방암 세포주에서 발현이 높다는 것을 확인하고, 8개의 유방암 세포주를 선택하여 Rab8 siRNA에 의한 발현 억제 정도를 살펴보았음. 그 결과 A549에 비해 발현 억제가 잘 되지 않았음(그림 11B). 두 암종에 관한 siRNA 실험에서 세포 증식을 억제하는 것은 확인되지 않았으나, 세포의 모양이 달라지는 것을 확인하였음. 아마도 Rab8의 억제는 세포 증식에 직접 영향을 주기보다는 세포의 이동에 관여할 가능성이 크다고 봄. 이는 FGF가 주로 세포의 이동에 관계된다는 많은 연구 결과들과 선충에서 연구 결과를 함께 고려한 가설임.

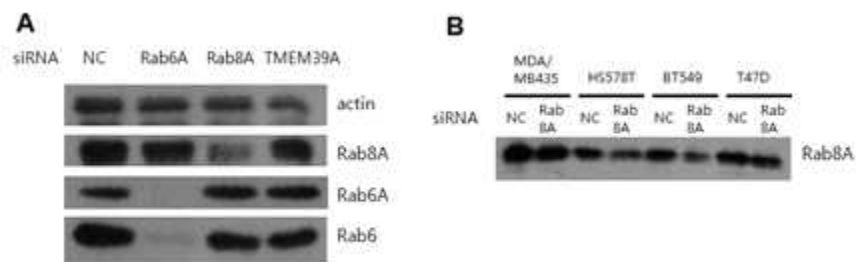


그림 11. 암세포주에서 Rab6와 Rab8의 siRNA (A) 폐암세포주 A549에서 Rab6와 Rab8의 siRNA 결과. (B) Rab8 발현이 높은 유방암세포주에서 Rab6와 Rab8의 siRNA 결과.

(3) Intestine에서 apical로 분비되는 단백질 표지자 모델 개발

상피세포에서 apical trafficking은 상대적으로 baso-lateral trafficking에 비해 덜 연구되어 있음. 단세포 모델인 효모의 유전학적 스크린은 단백질 이동과 분비에 대한 지대한 공헌을 하였지만, 상피세포와 같이 세포 극성이 명확하게 정해져 있고, 단백질의 이동 경로가 정해지는 다세포 동물에서 일어나는 현상을 반영하지 못하는 단점이 있음. 따라서 다세포 동물인 선충의 Intestine에서 gut lumen으로 분비되는 단백질의 형광 표지가 가능한 모델을 개발하여 Intestine에서 apical trafficking을 유전학적인 방법으로 연구하는 것이 가능할 것으로 계획함.

지난 1년 동안 12개 Intestine enriched genes의 선정하고, 각 유전자의 cDNA 또는 genomic coding region을 pBluscript SK+ 또는 pGEM-T easy vector에 cloning하여 확보하였음. 이후 intestine 특이적으로 발현하는 act-5 유전자의 promoter와 GFP 사이에 각 유전자를 cloning하였음. 불행하게도 12개 유전자에 대한 발현 플라스미드를 microinjection을 이용해 형질 전환 개체를 모두제작하였으나, 그림 12와 같이 F53A9.8::GFP strain만 발현을 하고, 나머지는 GFP가 제대로 관찰되지 않았음. 문제점을 파악하기에는 시간과 노력이 많이 들어, F53A9.8::GFP strain에만 rep-1 RNAi를 수행해 보았음. F53A9.8::GFP도 본래 목적과는 달리 gut lumen으로 분비되어 나가지 않았으나, rep-1 RNAi에 의해 발현이 증가하는 것을 관찰하였음. 이러한 결과는 F53A9.8::GFP가 gut lumen으로 분비되면 사라지게 되는데, rep-1이 없어 분비가 제대로 일어나지 않아 intestine 세포 내에 축적되어 발현이 높거나, 아니면 rep-1이 F53A9.8의 degradation에 관여할 가능성이 존재함.

Intestine에서 apical secretion marker를 얻는데 실패하여, 차선으로 기존에 진행하고 있던 cuticle 형성 mutant들의 원인 유전자를 파악하고 이 유전자가 rab-6 또는 rab-8이 관여하는 trafficking 조절과 연관되어 있는지를 확인하기로 함. suro-7(rs88) mutant는 collagen의 분비에 문제가 있는 돌연변이 스크린으로 찾았고, 이 돌연변이 개체의 원인 유전자를 찾기 위해, genetic mapping과 whole genome sequencing을 수행하였음. 그 결과 arx-2라는 유전자의 C-terminal region에 mutation이 존재하는 것으로 나타남. arx-2는 arp-2/3 complex의 일원으로 actin cytoskeleton의 조절에 중요한 유전자로 연구되었음. 선충에서도 null mutant는 embryo에서 hypodermal cell의 이동과 larva에서 intestine cell의 구조적 문제로 죽는다고 보고 되었음(bernadskaya et al., Mol Biol Cell, 2011). 하지만 우리가 찾은 suro-7 mutant는 단독으로는 embryo나 larva에서 죽지 않고 성체까지 성장함. suro-7 mutant에서 생식선의 모양을 관찰한 결과 90% 정도가 약하지만 생식선 형성 방향에 문제가 있는 것으로 관찰되었음. 이 결과는 rab-8, FGF 신호전달과 함께 세포 이동과 증식의 문제에 모두 관련된다는 점이 흥미로움.

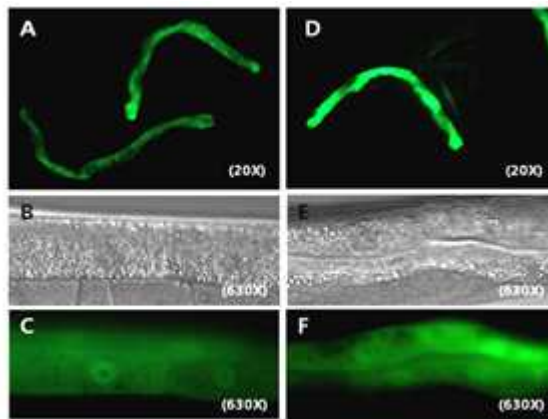


그림 12. Intestine 단백질인 F53A9.8::GFP 발현 선충에서 rep-1 RNAi에 의한 발현 증가

(4) rep-1과 rab 유전자의 RNAi 결과 종합

지난 1년 동안, rep-1과 rab 유전자들의 기능을 3가지 선충 모델에서 RNAi 실험을 통해 phenotype들을 비교해 보았음. 그 결과 생화학적인 연구 결과들과 다르게 rep-1과 rab 유전자들 사이에는 공통적으로 작용하는 부분이 거의 없다는 것을 알았음. 결론적으로 정리하자면, collagen-19의 분비에는 rep-1과 대부분의 rab 유전자들이 관여하지 않고, intestine의 yolk protein의 분비에서 rep-1과 rab-10,11,18이 유사한 양상을 보임. EGFR의 과도한 신호에 의한 Muv 형성에는 rep-1이 크게 관여하지 않는 것처럼 보였음.

○ 2차년도 연구수행 내용 및 결과

(1) 선충의 Muv model에서 FGF 발현과 분비 조절에서 rab-8의 역할 규명

1) rab-8 돌연변이체에서의 Muv 형성 억제 확인

1차년도에서 30개 rab 유전자의 RNAi 스크린을 이용해 rab-8을 발굴하였고, rab-8 RNAi에 의한 발현억제 효과는 여러 Muv strain에서 나타남을 확인하였음. 하지만 RNAi에 의한 Muv 억제 효과는 10% 정도에 그치는 것으로 확신하기에는 부족하였음. 따라서, 일본생체센터(Japan National Bioresource Project, JNBP)의 Mitami Shohei 박사에게서 rab-8 유전자의 결실 돌연변이체(tm2526)를 분양 받았음.

가장 우선적으로 rab-8(tm2526) 돌연변이 선충을 야생형 선충과 4차례 교배(outcross)를 통해 rab-8 결실 부위를 제외한 다른 염색체 부위를 야생형으로 교체하였음. rab-8(tm2526) 돌연변이체는 그림1A에서처럼 3번째 엑손과 4번째 엑손에 걸쳐 241bp가 결실되어 있음. 2개의 프라이머(D1034.4-5와 6)를 이용하여 선충의 genomic DNA PCR 결과, 그림1B와 같이 정상 개체는 약 800bp 크기의 밴드를 보이고, heterozygote는 상대적으로 희미한 800bp 밴드와 560bp 크기의 밴드를 동시에 보임. homozygote rab-8(tm2526) 돌연변이 개체는 상대적으로 강한 560bp 밴드만 보임.rab-8(tm2526) mutant는 야생형에 비해 약간 정도 성장 속도가 느리고, 자손의 수가 정상 개체의 60% 정도로 줄어 들고, 일부 개체에서 생식선의 이동(gonad migration)이 비정상적으로 일어나는 표현형질을 보임.

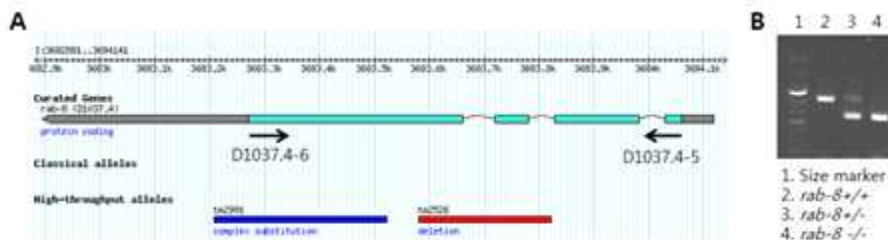


그림 1. *rab-8(tm2526)* 돌연변이체의 결실 부위와 PCR을 이용한 확인
(A) *rab-8(D1037.4)*의 genomic structure와 PCR에 사용된 프라이머의 위치
(B) Wild type, heterozygote와 homozygote의 Genomic DNA PCR 결과

다음으로 rab-8 mutant와 *jgls25* 또는 *let-60d* Muv strain을 교배하여, Muv 형성 정도를 관찰하였음. 그 결과, 그림2와 같이 *jgls25* 또는 *let-60d*에서 Muv 형성은 rab-8(tm2526) mutant에서 30% 정도 감소하는 것으로 나타났음(*** $P < 0.001$). 이러한 결과에서 rab-8이 과도한 EGFR/Ras/MAPK 신호 전달에 의한 세포 증식에 필요하다는 결론을 확신할 수 있었음.

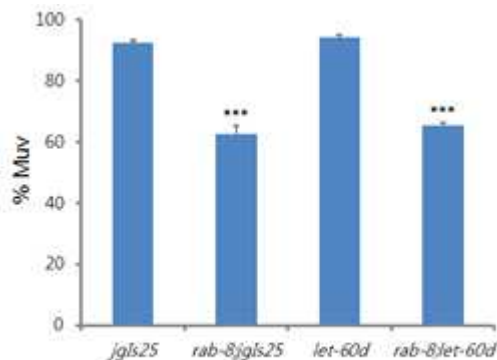


그림 2. *rab-8(tm2526)* 돌연변이체에서의 Muv 억제현상

2) 선충의 FGF 및 FGFR의 돌연변이체에서 Muv 형성 억제 확인

1차년도에서 선충의 FGF mutant인 *egl-17*과 FGFR mutant인 *egl-15*의 RNAi에 의해 Muv 형성이 억제되는 것을 확인하였으나, 이 역시도 vulva tissue의 특이성 때문인지 이들 유전자의 RNAi에 의한 Muv 형성의 억제 정도가 10% 정도에 불과했음. 따라서, Muv 형성 과정에서 FGF와 FGFR의 역할을 확실히 검증하기 위해, *egl-15*와 *egl-17* mutant를 Caenorhabditis Genetic Center(CGC)에서 분양 받아서 *jgls25* Muv strain과 교배를 통해 확인하였음. 그림3에서처럼 90%가 넘게 Muv이 형성되는 대조군 *jgls25*에 비해 *egl-15;jgls25* 또는 *egl-17;jgls25* 개체에서는 Muv 형성을 보이는 개체 수가 50%에 불과하여 약 40% 정도 Muv 형성이 감소하는 것을 확인하였음(***) $P < 0.001$).

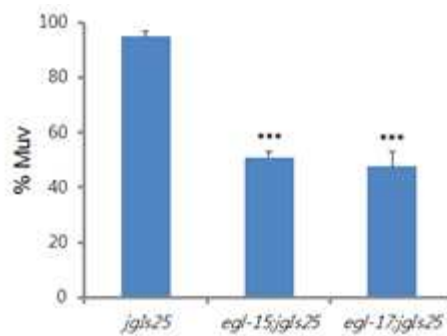


그림 3. *egl-15*와 *egl-17* 돌연변이체에서의 Muv 억제현상

이러한 결과에서, 과도한 EGFR/Ras/MAPK 신호전달에 의한 세포증식 현상은 FGF/FGFR 신호전달 이외에 다른 경로를 포함한다는 것을 짐작할 수 있음. 하지만, 적어도 FGF/FGFR 신호 전달 경로가 EGFR/Ras/MAPK 신호 전달 경로 하위에서 세포 증식에 중요한 역할을 한다는 것은 분명하다는 것을 알 수 있었음. 이미 알려진 것처럼 선충의 생식기 발생 과정에서 VPC에서의 FGF의 생성과 분비는 *rab-8*에 의존적임. 따라서 본 실험 결과는 공통적으로 *rab-8*과 FGF 신호전달의 이상이 모두 과도한 EGFR/Ras/MAPK 신호전달에 의한 Muv 형성에 필요하다는 것을 확인해 줌. 그렇지만, 여전히 *rab-8* mutant에서 Muv 형성 억제(30%)가 FGF 또는 FGFR mutant(*egl-17* or *egl-15*)에서 Muv 형성 억제(40%)에 못 미치는 것은 FGF의 분비에 *rab-8* 의존적 경로 이외에 다른 경로가 존재할 가능성을 암시함.

3) RAB-8의 GEF 또는 GAP 후보 유전자 돌연변이체에서 Muv 형성

일반적으로 Rab 단백질의 활성화와 비활성 주기는 GDP/GTP exchange factor(GEF)과 GTPase activating protein(GAP)에 의해 조절된다고 알려져 있음. GEF는 비활성화된 Rab-GDP에 결합하여 GDP를 GTP로 교환하여 활성화 형태로 전환시키는 역할을 하는 반면, GAP은 Rab-GTP에 결합하여 GTP를 분해하는 역할을 함. 과도한 EGFR/Ras/MAPK 신호전달에 의한 세포 증식 과정에서 *rab-8*과 FGF의 분비가 GEF 또는 GAP에 의한 조절을 포함하는지 확인하기 위해서, 1차년도에서 인간의 Rab8A의 GEF와 GAP으로 알려진 유전자의 서열 유사성을 이용해 선충의 *rab-8*의 GEF 후보유전자로 F54C9.11과 GAP 후보유전자로 *tbc-15*를 선정하여, 이들 유전자에 대한 RNAi 실험을 통해 Muv 형성 억제 또는 증가 현상을 관찰하였음. 이 역시도 Muv 형성의 변화 폭이 10% 이내에 불과하여 확신을 가질 수 없었음. 다행히 이들 유전자에 대한 결실 돌연변이체가 JNBP에 존재하여, 분양 받을 수 있었음. *rab-8* mutant와 마찬가지로 이들 유전자에 대한 결실 돌연변이체인 *tm2518*과 *tm6247*을 우선 야생형인 N2 strain과 4차례 교배를 한 뒤, 실험에 사용하였음. 이러한 과정에서 결실 부위의 확인을 위해서는 그림4에서와 같이, 각각의 돌연변이체의 결실 부위를 genomic DNA PCR 실험으로 확인할 수 있도록 프라이머들을 제작하였음. *rab-8* GEF 후보 유전자인 F54C9.11에 대한 결실 돌연변이체 *tm2518*은 2번째 엑손과 3번째 엑손에 걸쳐 571bp 결실이 일어나 있고, *rab-8* GAP 후보 유전자인 *tbc-15*에

대한 결실 돌연변이체 tm6247은 3번째 엑손과 3번째 인트론에 걸쳐 385bp 결실이 있음. tm2518은 별다른 표현형을 보이지 않고, 거의 정상 개체와 유사하며, tm6247은 약간 성장 속도가 느리고, 자손의 수도 줄어드는 표현형을 보이나, 두 돌연변이체 모두 실체 현미경을 이용한 관찰만으로 homozygote를 구분할 수 없어서 계속적으로 genomic DNA PCR을 이용하여 유전형을 확인하였음.

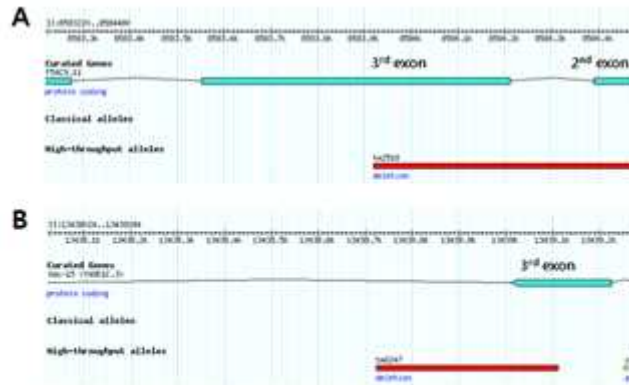


그림 4. RAB-8의 GEF 및 GAP 후보유전자의 돌연변이체의 결실 부위
(A) RAB-8 GEF 후보인 F54C9.11의 결실 돌연변이체인 tm2518의 결실 부위
(B) RAB-8 GAP 후보인 tbc-15의 결실 돌연변이체인 tm6247의 결실 부위

다음으로, 이들 돌연변이체에서 Muv 형성의 변화를 관찰하기 위해서, jgls25, let-60d 또는 jgls26 Muv strain들과 교배를 하였음. jgls26은 jgls25와 동일한 EGFR-TK[T790M-L858R]을 발현하는 형질전환개체이나, UV integration에 의해 독립적으로 구분된 strain임. 이 strain의 특징은 Muv 형성이 50% 정도밖에 일어나지 않아서, Muv 형성이 증가하는지를 알아보기 위해 사용하기 적합함.

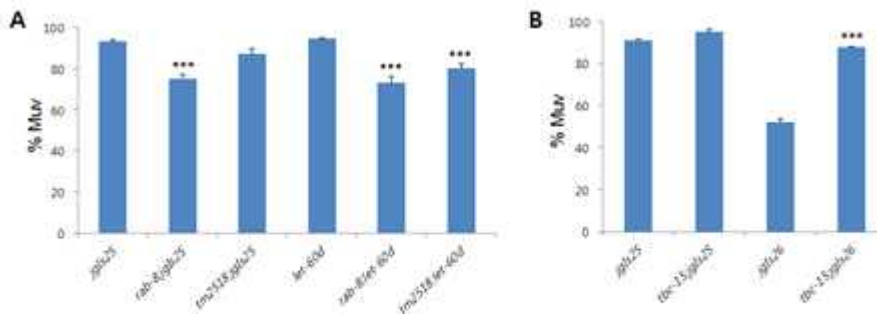


그림 5. RAB-8의 GEF 및 GAP 후보유전자의 돌연변이체에서의 Muv 억제 또는 증가 현상
(A) RAB-8의 GEF 후보 유전자인 F54C9.11의 돌연변이체(tm2518)에서의 Muv 억제 현상
(B) RAB-8의 GAP 후보 유전자인 tbc-15(tm6247)의 돌연변이체에서의 Muv 증가 현상

그림5A에서 rab-8과 tm2518 두 돌연변이체에서 jgls25와 let-60d에 의한 Muv 형성이 감소하는 것을 확인하였음. 비록 tm2518에서의 Muv 형성 억제가 rab-8에 비해서 약하게 일어나지만, 동일한 표현형을 보이므로 F54C9.11이 rab-8에 대한 GEF로 작용할 가능성이 높다고 판단됨. 그림5B의 그래프에서 tbc-15는 jgls25의 Muv 형성을 약간 증가하는 결과를 보였고, 이는 GAP이 Rab의 조절을 활성 상태에서 비활성 상태로 바꾸는 역할을 수행하기 때문에 rab-8 돌연변이체와 상반된 결과를 나타내는 것으로 추측할 수 있음. 이를 확실하게 하기 위해, tbc-15(tm6247) 돌연변이체를 jgls26과 교배하여 Muv 형성 정도를 재확인하였음. 그림과 같이 tbc-15 돌연변이체에서는 Muv 형성이 40% 정도 증가하는 것을 확인하였음(*** $P < 0.001$). 이러한 결과는 단백질의 아미노산 서열의 유사성과 함께 고려하여 tbc-15가 rab-8에 GAP일 가능성을 높여줌.

이러한 결과에서, 여전히 남는 의구심은 F54C9.11의 돌연변이체 *tm2518*에서 기대한 만큼 Muv을 억제하지 못하는 점임. 아마도 이러한 결과의 이유는 또 다른 rab-8 GEF이 존재하기 때문일 것으로 추측됨. 실제로 선충에는 Rabin8의 상동체인 F54C9.11 뿐만 아니라, 또 다른 rab-8 GEF인 MSS4의 상동체인 ZK970.8이 존재함. 따라서 그림6과 같이, ZK970.8에 대한 RNAi에 의해 let-60d의 Muv 형성의 정도를 확인하였음. 그 결과, MSS4의 상동체인 ZK970.8의 RNAi에 의해서도 Muv 형성이 10% 정도 줄어드는 것을 확인하였음 (** $P < 0.01$).

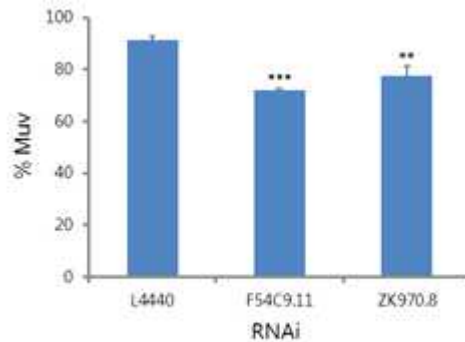


그림 6. RAB-8 GEF 후보유전자의 RNAi에 의한 Muv 억제현상

현재까지결과는 선충의 Rab8 GEF으로 F54C9.11과 ZK970.8이 존재하여, 각각 부분적으로 과도한 EGFR/Ras/MAPK 신호전달에 의한 세포증식에 역할을 하는 것으로 추측될 뿐, 실제로 두 단백질 모두 Rab8을 조절하는데 관여하는지는 불분명함. 따라서 *tm2518; jgls25* 또는 *tm2518; let-60d*에 ZK970.8 RNAi를 실시하여 추가적인 Muv 형성의 감소가 나타나는지 확인할 것임.

4) rab-8과 *tm2518* 돌연변이 개체에서 FGF 분비 조절 문제

선충에서 Rab8이 FGF 분비에 관여하므로, Rab8을 활성화시키는데 관여하는 Rab8 GEF도 FGF 분비에 관여할 것으로 추측됨. 이를 확인하기 위해 살아있는 선충에서 FGF 분비를 관찰할 수 있는 모델이 필요하므로, 그림7과 같이 EGL-17::GFP를 발현하는 integration line을 제작하였음.

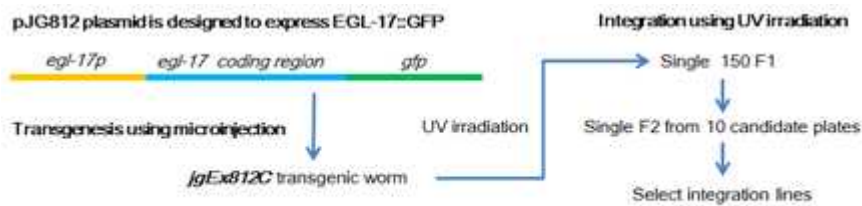


그림 7. UV 조사를 이용한 EGL-17::GFP 발현 Integration line 제작

가장 먼저 EGL-17::GFP를 발현하기 위한 플라스미드(pJG812)를 제작하였는데, 이 과정에서 몇 개월의 시간을 소모하였음. 다음으로 마이크로인젝션을 해서 EGL-17::GFP를 발현하는 형질전환 선충(*jgEx812C*)을 제작하였고, 이 선충은 pCFJ90(*myo-2p::mCherry*)를 표지자로 가지게 제작되었음. 따라서 실제 형광 현미경에서 형질전환 개체를 골라서 관찰해야 하므로, 정확한 관찰을 하는데 불리하였음. 특히 EGL-17::GFP는 야생형에서는 정상적으로 분비가 일어나서 L4 시기가 되어야 약하게 발현되었음. 따라서, 정성적인 분석 뿐만 아니라, 정량적인 분석을 위해서 *jgEx812* 형질전환 개체에 자외선을 조사하여 F2에서 완전히 transgene이 선충의 게놈에 끼어들어간 integration line을 제작하였고, 실험실의 제작 순서에 따라 *jgls39*라고 명명하였음. 이렇게 제작된 *jgls39*는 자외선에 의한 다른 돌연변이들을 제거하기 위해 야생형 N2와 outcross를 여러 번 수행한 뒤에 실험에 사용되어야 하므로, 적어도 4번의 outcross에 2달이 소요되므로, 정확한 분석은 내년도에 이루어질 계획임.

따라서, 그림8에서와 같이 예비 실험으로, EGL-17::GFP 플라스미드(pJG812)를 야생형 N2와 두 돌연변이체인 *rab-8(tm2526)*와 *tm2518*에 마이크로인젝션을 해서 각각의 형질전환체를 제작하여 관찰하였음. 그 결과, L4 유충 시기의 야생형에서는 EGL-17::GFP가 거의 발현이 되지 않는 반면에, *rab-8(tm2526)*과 *tm2518* 돌연변이 개체들에서는 비교적 EGL-17::GFP가 세포 내부에서 잘 발현되는 것을 관찰할 수 있었음. 야생형에서는 EGL-17::GFP가 생성된 후, 빠르게 세포 밖으로 분비되는데 비해, 이들 돌연변이체에서는 EGL-17::GFP의 분비가 원활하게 일어나지 않아서 세포 내에 축적되기 때문에 이런 차이가 발생하는 것으로 해석됨. 이 실험 결과로 F54C9.11이 *rab-8*과 마찬가지로, EGFR/Ras/MAPK 신호전달의 하위에서 생성되는 FGF의 분비에 동일한 역할을 수행하므로, F54C9.11이 RAB-8 GEF일 가능성이 매우 크다는 것을 추측할 수 있음.

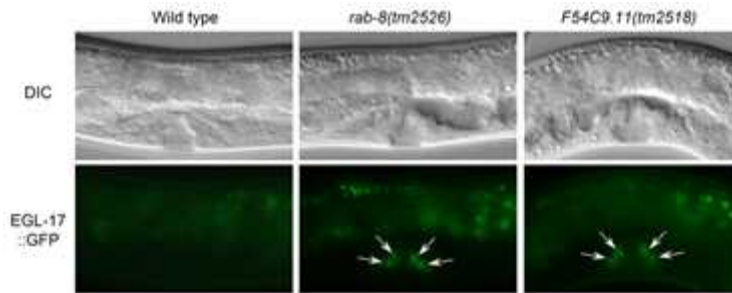


그림 8. RAB-8와 RAB-8의 GEF 후보유전자의 돌연변이체에서의 FGF 분비 이상 현상

(2) 암세포주에서 Rab8과 FGF의 역할 규명

1) Rab8A 발현과 암환자 생존율과의 상관관계

올 상반기에는 계획한 대로, 유방암 세포주를 포함한 여러 암 세포주에서 Rab8A siRNA를 이용하여 Rab8A의 Knockdown 결과를 보기를 시도하였음. 하지만, Rab8A siRNA에 의한 세포증식 또는 이동의 차이를 테스트한 어느 암 세포주에서도 확인할 수 없었음. 일단 문제점으로 인간을 비롯한 포유동물에는 선충과 달리 Rab8이 3종류가 존재하기 때문에, Rab8A의 siRNA만으로 세포 증식이나 이동에 문제점이 나타날 가능성이 적을 수 있다는 것임. 둘째로 Rab8A siRNA에 의해 감소하는 Rab8A이 절반 정도 수준이라는 것임. 물론 세포 주에 따라 유전자 특성에 따라 다르지만, 일반적으로 80% 이상 감소해야 phenotype을 관찰할 수 있다는 점임.

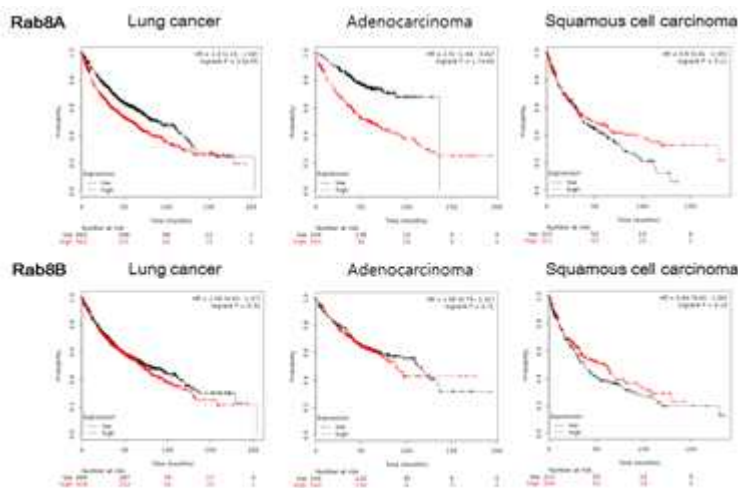


그림 9. Rab8A와 Rab8B의 발현 정도에 따른 해당암환자 생존율(<http://kmplot.com>)

당연하게도 7월의 중간평가에서 지적 사항이었고, 제안된 의견은 일단 암관련 데이터베이스에서 Rab8이 어떤 연관성이 있는지부터 확인하라는 것이었음. 따라서 이후, 여러 데이터베이스의 간단한 이용 방법을 배워서, Rab8과 여러 암종들과의 관련성을 확인한 결과, 놀랍게도 Kaplan-Meier plotter (<http://kmplot.com>)의 분석에서 Rab8A의 발현 정도가 폐암환자들 가운데 선종성 폐암환자의 생존율과 밀접한 관련성을 가진다는 것을 확인할 수 있었음. 그림9에서 Rab8B의 발현 수준과 폐암환자의 생존율은 아무런 상관관계가 없는 것으로 나타남. 이와 달리 Rab8A의 높은 발현은 전체 폐암 환자의 생존율을 일정 정도 낮추는 것으로 나타남. 특히 이들 환자군을 Adenocarcinoma(선암)와 Squamous cell carcinoma(편평상피암)으로 나누어 살펴본 결과, squamous cell carcinoma에서는 Rab8A의 발현과 환자 생존율과의 관계가 유의 수준 이하로 나타났고, adenocarcinoma에서는 Rab8A 발현이 낮을수록 환자 생존율이 높은 것으로 나타남($P=1.7e-09$). 추가적으로 Rab8 관련 단백질 또는 선종에서의 연구결과를 바탕으로 FGF와 폐암환자의 생존율과의 관련성을 표1과 같이 조사해 보았음.

Gene Name	Lung Cancer	Adenocarcinoma	Squamous Cell Carcinoma
Rab8A	HR=1.4, P=3.5e-05	HR=2.51, P=1.7e-09	HR=0.8, P=0.11
Rab8B	HR=1.09, P=0.31	HR=1.06, P=0.71	HR=0.84, P=0.19
Rabin8	HR=1.46, P=2.6e-06	HR=2.66, P=4.5e-11	HR=0.84, P=0.21
TBC1D17	HR=1.3, P=0.0012	HR=3.1, P=9.3e-14	HR=0.73, P=0.022
Rab8IP3	HR=1.39, P=4e-05	HR=1.4, P=0.022	HR=0.89, P=0.38
Rab1F	HR=0.77, P=0.0014	HR=0.84, P=0.24	HR=0.78, P=0.061
FGF2	HR=0.88, P=0.11	HR=0.62, P=0.0018	HR=0.88, P=0.34
FGF12	HR=1.38, P=7.1e-05	HR=1.87, P=2.1e-05	HR=0.79, P=0.085

표 1. Rab8와 Rab8 관련 단백질들의 발현과 폐암환자 생존율의 상관관계(<http://kmplot.com>)

표1에서의 결과처럼, Rab8의 GEF로 알려진 Rabin8과 Rab8 GAP인 TBC1D17, 그리고 FGF12의 발현 수준이 선종성 폐암환자의 생존율과 밀접한 연관이 있음을 알게 됨.

2) 선종성 폐암 세포주에서 Rab8A 발현 확인

Rab8 발현과 폐암환자의 생존율 간의 상관관계를 토대로, Rab8 유전자 중에서 Rab8A를 계속 연구하는 것으로 결정하였고, 세포주는 선종성 폐암세포주를 사용하기로 결정함.

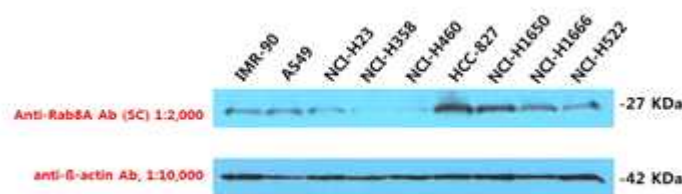


그림 10. 여러 Lung adenocarcinoma cell lines에서의 Rab8A 발현 분석

Rab8A 항체를 이용하여, 그림10과 같이 각 세포주에서 Rab8A 단백질의 발현을 비교해 보았음. 그 결과 HCC-827과 NCI-H1650 세포주가 Rab8을 많이 발현하고 있음을 알 수 있었고, NCI-H23과 NCI-H358 세포주에서 Rab8A 발현이 매우 낮음을 알 수 있었음. 따라서 Rab8A 발현이 높은 세포주인 HCC-827과 NCI-H1650에서 Rab8A의 기능을 연구하기로 결정하였음. 현재까지는 Rab8A siRNA에 의한 Rab8A 단백질의 발현 감소가 여전히 50% 정도에 불과하여, 세포증식과 이동에 관한 뚜렷한 phenotype을 관찰하지 못하고 있음. 현재는 김용연 박사님과 장현철 박사님께 자문을 구해서, 일단 Rab8A 발현이 낮은 세포주에서 Rab8A siRNA 효과가 있는지 확인하는 과정에 있고, 새로 여러 개의 Rab8A siRNA를 추가로 구매하여 테스트할 계획임.

(3) Yeast two-hybrid screen을 통한 Rab8 상호결합 단백질 발굴

선충에서의 Rab8과 GAP 또는 GEF의 상호 기능 연구는 어느 정도 잘 진행되고 있지만, 연구 진행 속도 면에서 약간은 불만족스럽고, 특히 암 세포주에서 Rab8A에 대한 연구 진행이 너무 느린 상황에 직면하여, 새로운 연구 진행 방향을 모색하였음. 본 실험실의 장점은 유전학적 분석과 실험인 반면에, 생화학적인 실험 분석에서는 약점을 가지고 있음. 따라서 단점을 보완하는 차원에서 Rab8과 직접 결합하는 새로운 단백질을 찾기로 계획함. 이를 위하여, 여러 방법 중에서 과거에 직접 해본 적이 있는 Yeast two-hybrid screen을 선충의 RAB-8을 미기로 해서 수행하였음. 마침 과거에 사용하던 선충의 라이브러리가 있고, 노승배 박사님께 자문을 구해서 실수를 줄이는 방향으로 진행하였음. 그 결과로 표2와 같이 총 78개의 fish plasmid를 시퀀싱한 결과, 42개의 RAB-8결합 단백질 후보들을 찾았음. 특히 표에서 상위에 존재하는 6개 유전자들은 최소 4번 이상으로 발견되었음. 그 중에서 csn-5는 13번으로 가장 높은 빈도로 나왔는데, csn-5는 COP9 signalosome complex의 subunit 5임. 두 번째로 많이 나온 유전자는 gck-2와 kel-8으로 모두 7번씩 발견되었음. kel-8은 cul-3 의존적 ubiquitin E3 ligase의 substrate receptor로 알려져 있고, gck-2는 mitogen-activated protein kinase kinase kinase(MAP4K)임. 다음으로 모두 6번 나온 유전자는 vig-1으로 RNA binding RISC component 임. Protein phosphatase 2A complex의 subunit인 paa-1이 5번 나왔고, TM-CC, cif-1 interacting protein인 tcc-1이 4번 나왔음. csn-5, kel-8, tcc-1은 모두 단백질 분해하는 역할을 수행하므로, RAB-8의 분해를 통한 양적인 조절에 관여할 것으로 생각되며, 나머지 것들의 기능은 예측하기 어려움. 스크린 결과 1번 밖에 나오지 않은 것들은 RAB-8과 결합해서 나온 것인지, 우연히 나온 것인지 판단하기 어려워서 우선순위에서 배제하였음.

	Gene	Feature	Frequency
1	csn-5(B0547.1)	subunit 5 of the COP9 signalosome complex (CSN5)	13
2	gck-2(ZC404.9)	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase(MAP4K3)	7
3	kel-8(W02G9.2)	Substrate receptor for cul-3 dependent ub ligase	7
4	vig-1(F56D12.5)	RISC component	6
5	paa-1(F48E8.5)	subunit of protein phosphatase 2A (PP2A)	5
6	tcc-1(Y59A8A.3)	TM-CC, cif-1(signalosome) interacting protein	4
7	aldo-2(F01F1.12)	fructose-bisphosphatealdolasehomologous,humanALDO8	1
8	abu-6(C03A7.7)	transmembrane protein with a predicted signal sequence,	1
9	asp-1(Y3986A.20)	homolog of cathepsin D aspartic protease	1
10	B0403.6	Nematode specific	1
11	B0495.7	ER metalloprotease	1
12	C15C7.7	O-fucosyltransferase orthologous	1
13	C42D4.1	Nematode specific	1
14	ccm-3(C14A4.11)	programmed cell death protein	1
15	col-20(F11G11.11)	collagen protein	1
16	col-3(T28C6.6)	collagen protein	1
17	eef-2(F25H5.4)	homolog of translation elongation factor 2 (EF-2)	1
18	F26F12.3	Nematode specific	1
19	F41C3.5	serine carboxypeptidase that is related to human cathepsin A	1
20	K02B2.1	phosphofucto-kinase	1
21	K07HB.3	N-terminal acetyltransferase	1
22	lin-39(C07H6.7)	homeodomain protein homologous	1
23	lys-1(Y22F5A.4)	putative lysozyme	1
24	ocri-1(C16C2.3)	Inositol-1,4,5-triphosphate 5-phosphatase homolog, human OCRL	1
25	oma-1(C09G9.6)	a zinc finger protein of the TIS11 finger type	1
26	ppm-1(F25D1.1)	ProteinPhosphatase,Mg2+/Mn2+-dependent	1
27	pqn-36(F39D8.1)	contain a glutamine/asparagine (Q/N)-rich ('prion') domain	1
28	prp-8(C50C3.6)	orthologous to the human gene SIMILAR TO US SNRNP -SPECIFICPROTEIN(220KD)	1
29	roi-8(ZK1290.3)	collagen	1
30	rpl-3(F13B10.2)	a large ribosomal subunit L3 protein	1
31	scrm-4(F11A6.2)	putative phospholipid scramblase homologous, human PLSCR1-5	1
32	sepa-1(M01E5.6)	a self associating adaptor protein of 702 amino acids	1
33	sqv-1(D2096.4)	UDP-glucuronic acid decarboxylase,	1
34	T07A9.9	Probable nucleolar GTP-binding protein 1	1
35	usp-5(T27A3.2)	ubiquitin protease	1
36	vit-2(C42D8.2)	the vitellogenin homolog YP170	1
37	Y111B2A.3	Nematode specific	1
38	Y34B4A.6	Nematode specific	1
39	Y41E3.22	non-coding Transcript Isoform, Nematode specific	1
40	Y51F10.2	RING finger protein 224	1
41	Y54G9A.7	Nematode specific	1
42	ZK795.3	Brix domain-containing protein	1

표 2. RAB8에 대한 Yeast two-hybrid screen 결과

Yeast two-hybrid screen system을 구축하고, 스크린 결과 나온 후보 유전자들을 확인하는 과정에서 6개월 이상의 시간을 소비하였기 때문에, 남은 연구 기간을 고려해서 확실한 하나의 단백질의 탐구에 집중하기로 결정하였음. 본인은 MAP4K 상동체인 *gck-2*에 일단 흥미가 있었는데, 일단 작은 수치지만, MAP4K와 암과 관련된 보고가 존재하고, germinal center kinase(*gck*)라는 이름에서 세포 증식이나 개체 발생에 중요한 역할을 할 것으로 기대되었기 때문임.

가장 우선적으로 *gck-2*에 대해 수행한 실험은 선충의 *gck-2* cDNA를 클로닝하여, 새로 fish plasmid를 제작하고, RAB-8과 상호결합을 검증하였음. 그 결과 그림11A에서처럼 GCK-2는 wild-type RAB-8이나 constitutively active form의 RAB-8에 모두 잘 결합하는 것으로 나타났음. 그림11B에서와 같이, 선충은 몇 개의 GCK 단백질들을 발현 하는데, 특히하게도 GCK-2만 C-terminus에 citron homology domain(CNH)를 가지고 있음. CNH 도메인을 가진 단백질들은 Rho와 같은 small GTPase에 결합하는 것으로 알려져 있으므로, RAB-8과 결합할 가능성이 매우 높다는 것을 추측할 수 있음.

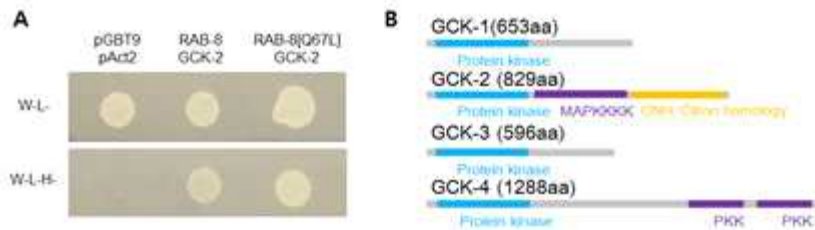


그림 11. RAB-8과 GCK-2의 결합 및 선충에 존재하는 GCK 단백질들의 1차 구조
(A) Yeast two-hybrid를 이용한 RAB-8과 GCK-2의 물리적 결합관계
(B) 선충에 존재하는 4종의 GCK 단백질들의 1차 구조 비교

다음으로 수행한 실험은 본 연구계획에서 가장 중요한 EGFR/Ras/MAPK 경로에서 *gck-2*가 기능하는지를 알아보기 위해, *gck-2* RNAi clone을 제작하였음. 그림12A에서의 결과와 같이 *let-60d* mutant에 control(L4440) RNAi와 *gck-2* RNAi를 먹인 결과, Muv 형성이 20% 가까이 줄어드는 것을 확인하였음. 이러한 결과로 보아, *gck-2*도 *rab-8*과 마찬가지로 과도한 EGFR/Ras/MAPK 신호전달에 의한 세포 증식에 필요하다는 것을 알 수 있었음.

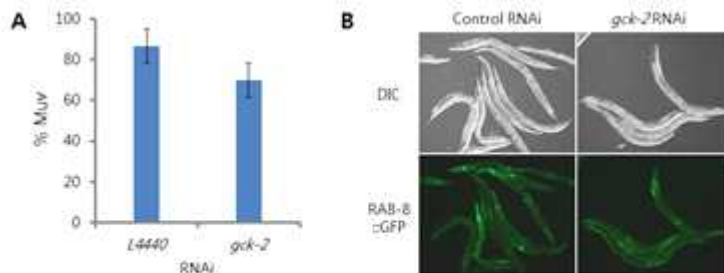


그림 12. *gck-2* RNAi에 의한 Muv 형성 억제와 RAB-8 발현에 미치는 영향
(A) *let-60d* 돌연변이체에서 *gck-2* RNAi에 의한 Muv 형성 억제 현상
(B) *gck-2* RNAi에 의한 RAB-8::GFP 발현에 미치는 영향

*gck-2*가 *rab-8* 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해, 그림12B와 같이 RAB-8::GFP를 발현하는 형질전환 선충에 *gck-2* RNAi를 먹였음. 그 결과, 약간 RAB-8::GFP의 발현이 감소하는 듯 보이나, 뚜렷하지 않기에, *gck-2*가 *rab-8* 발현에 어떠한 영향을 주는지 결론을 낼 수 없었음. 아마도 정확한 결과를 얻기 위해서는, RAB-8의 C-terminus에 존재하는 prenylation site에 영향을 주지 않도록 GFP::RAB-8 발현 플라스미드를 제작하여 실험할 계획임. *rab-8* mutant에서 나타나는 여러 표현형질들 중에 생식선 이동이 잘못된 경우가 있음. 앞서 확인한 것처럼 *gck-2*와 *rab-8* 두 유전자는 공통적으로 EGFR/Ras/MAPK 신호전달에 의한 세포 증식에 긍정적인 역할을 수행하므로, 두 유전자 간의 조절 관계를 아직은 모르지만, 다른 표현형질도 공유할 것으로 예상됨. 따라서 *gck-1* RNAi에 의한 생식선 이동의 문제가 일어나는지 확인해 보았음. 그림13A는 RAB-8::GFP를 발현하는 선충에 control RNAi와 *gck-2* RNAi를 먹여서 본 결과임.

1차년도 결과에서 이미 RAB-8::GFP는 생식선의 이동과 성장을 이끄는 Distal tip cell(DTC)에서 강하게 발현된다는 것을 확인하였으므로, RAB-8::GFP를 발현하는 선충에서는 뚜렷하게 생식선의 이동 방향과 위치를 관찰할 수 있음. 검은색 화살표 머리는 Vulva를 가리키고, 흰색 화살표들은 DTC를 가리킴. 흰색 별표는 몸의 앞쪽에 위치한 인두(pharynx)의 위치를 나타냄. 선충 성체는 몸 중앙의 Vulva를 기준으로 자궁(Utrus)이 가운데 위치하고, 자궁의 양쪽에 정낭(Spermatheca)이 연결된 구조임. 생식선은 각 정낭에서부터 시작되어, 각기 양쪽으로 뻗어나가다가 U자 형태로 휘어져서 다시 몸 중앙을 약간 지나쳐 상하로 겹치게 됨. 그림13A에서 Control RNAi를 먹인 경우에는 생식선 끝이 몸 중앙을 약간 지나쳐 위치하는 정상적인 이동을 보이는 반면에, *gck-2* RNAi를 먹인 경우에는 한 쪽 생식선이 휘어져 몸 중앙 쪽으로 이동하지 않고, 그대로 몸 앞 쪽의 인두 근처로 이동해 있는 잘못된 이동 현상을 보임.

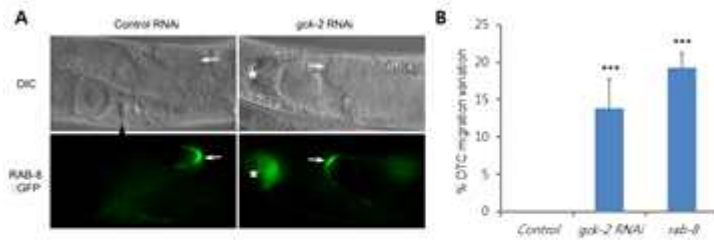


그림 13. *gck-2* RNAi에 의한 비정상적 생식선 이동 현상
 (A) *gck-2* RNAi에 의한 Distal tip cell의 위치 변화
 (B) *gck-2* RNAi에 DTC 이동 이상의 수치적 변화

그림13B에서는 control RNAi, *gck-2* RNAi 그리고 *rab-8*(*tm2526*) 돌연변이 개체에서 생식선의 이동 문제가 생기는 개체의 수를 간섭차 현미경에서 세어 보았음. control RNAi를 먹인 경우에는 생식선 이동의 문제가 전혀 관찰되지 않았으나, *gck-2* RNAi를 먹인 경우에는 약 14% 정도의 개체에서 생식선 이동의 문제를 보이는 것으로 나타났음. *rab-8* 돌연변이체의 경우에 약 18%의 생식선 이동 문제를 나타나는 개체 비율을 보임.

여기까지 결과들을 종합해 보면, *rab-8*과 *gck-2*는 서로 직접 결합하고, 공통적으로 EGFR/Ras/MAPK 신호전달 하위에서 기능하며, 생식선의 정상적인 이동에 중요하다는 것을 알 수 있음.

Rab8과 상호작용하는 Yeast two-hybrid screen을 통해 발견된 다른 단백질들은 암에서 어떤 역할을 수행할 지에 대해 KM plotter를 이용해 조사해 보았음. Rab8의 분해에 작용할 것으로 예상되는 단백질들인 *csn-5/COPS5*, *tcc-1/RB1CC1*, *cif-1/EIF3M*들의 발현이 높을수록 선종성 폐암환자들의 생존율을 높이는 관계를 보임. 이는 Rab8A의 발현과 환자 생존율과의 관계에 대해 반대임. 몇몇 단백질들의 발현은 Rab8A과 유사한 결과를 보임. 이는 아주 예비적인 결과이지만, Rab8과 상호작용하는 단백질의 발현이 선종성 폐암환자 생존율과 밀접한 관련성을 보이는 것에 의미가 있음.

1차년도 결과에서 보였듯이, 선충의 30개 *rab* 유전자들의 RNAi 결과로 *rab-8* 이외에 다른 몇몇 *rab* 유전자들도 Muv 형성에 관여하는 것으로 나타났음. 1차년도 후반기부터는 *rab-8*의 기능 연구로 집중하였지만, 다른 *rab* 유전자들도 선종성 폐암환자 생존율에 관련되어 있는지 조사해 보았음. RNAi 실험결과로 Muv 형성을 저해한 *rab-5*, *rab-6*, *rab-7*, *rab-23* 유전자들의 발현과 선종성 폐암환자의 생존율의 관계는 Rab8A과 환자 생존율의 관계와 모두 유사성을 보였고, Muv 형성과 관련 없는 유전자인 *rab-2*와 *rab-27*의 발현 수준은 선종성 폐암환자의 생존율과 아무런 관계가 없음을 보였음.

이러한 결과들은 우리가 선충의 Muv 모델을 이용한 RNAi screen과 yeast two-hybrid screen이 성공적이었다는 것을 보여주며, 나아가 선충의 과도한 EGFR/Ras/MAPK 신호전달에 의한 Muv model이 인간에서 선종성 폐암을 연구하기 좋은 모델임을 제시함.

○ 3차년도 연구 수행 내용 및 결과

(1) Rab8과 Rab8 GEF의 발현 조절관계 분석

1) GFP::**RAB-8** 발현 선충 제작

기존에 제작된 RAB-8::**GFP**는 RAB-8의 C-terminus에 존재하는 prenylation site가 **GFP**에 의해 방해될 수 있으므로, GFP::**RAB-8** 발현 플라스미드를 제작하였음. GFP::**RAB-8**[WT]과 GTP hydrolysis가 안되는 constitutive active form인 GFP::**RAB-8**[Q67L]과 GTP와 결합 못하는 dominant negative form인 GFP::**RAB-8**[T22N]를 발현하는 선충을 제작하여 관찰함. 그림 1은 선충의 인두 주위의 신경세포들에서의 GFP::**RAB-8**의 발현을 보여주고 있음. 신경세포의 크기가 비교적 작은 편이고, GFP::**RAB-8**의 발현이 세포질에 전반적으로 퍼져서 나타나 질적인 차이를 알기가 어려웠음. 배양된 포유동물 세포주에서 관찰된 차이를 보기가 어려웠음. 현재는 선충에서 가장 큰 세포인 intestine 세포에서 발현하는 act-5 프로모터를 이용한 mCherry와 GFP 리포터 플라스미드를 클로닝하여 실험 중임.

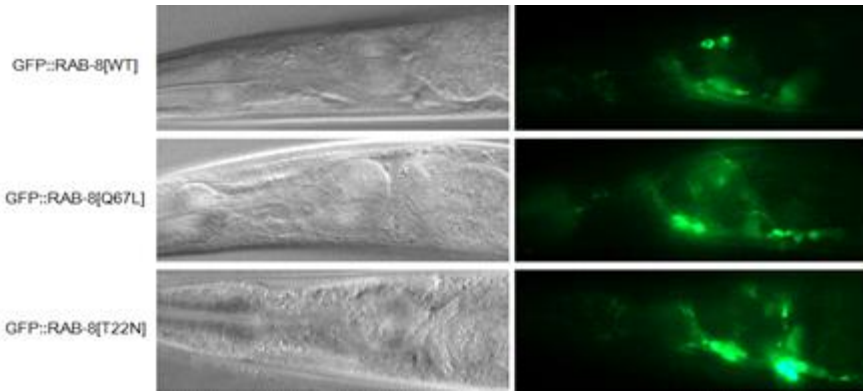


그림 1. RAB-8의 발현 비교

다음으로 RAB-8 GEF인 F54C9.11의 mutant인 tm2518과 GAP 후보 유전자인 tbc-15 mutant에서 RAB-8 발현을 GFP::**RAB-8**을 이용해 조사해 보았음. 그림 2A는 tm2518에서 GFP::**RAB-8**의 발현 인두 부위에서 관찰한 결과임. 그림 1에서와 마찬가지로 세포 내에서 발현 차이는 보기 어려웠음. 흥미롭게도 tm2518 mutant에서 선충의 머리 부위가 좁아진 현상이 관찰됨(화살표 머리).

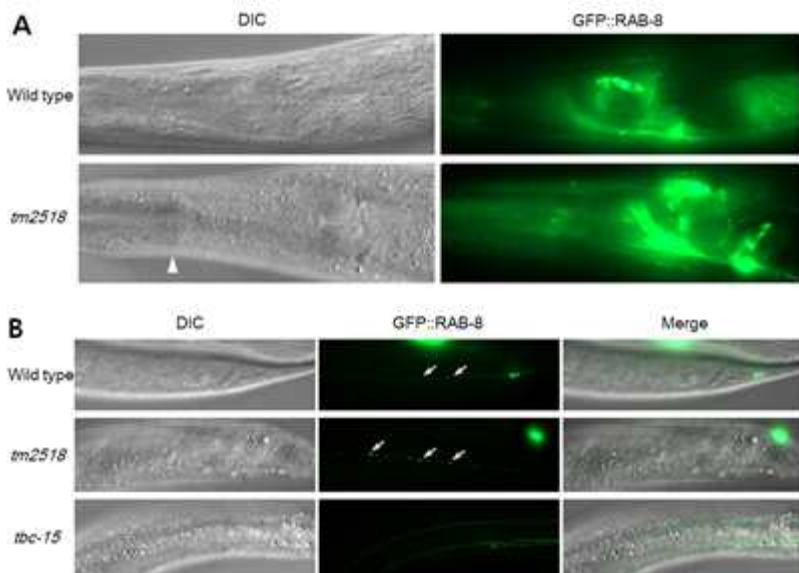


그림 2. F54C9.11의 mutant인 tm2518과 GAP 후보 유전자인 tbc-15 mutant에서 RAB-8 발현

그림 2B는 *rab-8* 자체 프로모터를 사용하지 않고, mechanosensory neuron에서 발현하는 *mec-7* 유전자의 프로모터를 사용하여 GFP::*RAB-8*의 발현을 신경세포의 process에서 관찰한 결과임. GFP::*Rab-8*은 신경세포의 process를 따라 점점이 나타남(punctate expression pattern). *tm2518 mutant*에서는 이러한 spot이 더 강하게 보이는 경향이 나타나고(화살표), *tbc-15 mutant*에서는 전체적으로 세포질에 퍼져서 보이는 것으로 나타남.

2) RAB-8과 F54C9.11의 co-localization 조사

Rab8의 GEF로 잘 알려진 Rabin8 homolog인 F54C9.11와 또 다른 Rab8GEF인 MSS4의 homolog인 MDT-9의 발현을 *rab-8 promoter*를 이용해서 관찰함. Rab8GEF은 Rab8을 활성화시키는데 필요하므로 세포 내에서 Rab8과 colocalization할 수 있음. 그림 3A는 mCherry::*RAB-8*과 F54C9.11::GFP의 발현을 비교한 것임. 신경세포의 process에서 점점이 나타나는 현상은 유사해 보이거나(화살표), 신경세포의 soma에서 발현은 서로 배제적으로 작용하는 것처럼 보임(점원). 두 신경세포를 비교해 보면, 왼쪽 세포는 mCherry::*RAB-8*의 발현 범위가 넓으나, 오른쪽 세포에서는 F54C9.11::GFP의 발현 범위가 더 넓음. 이것은 단순히 형광단백질의 발현 강도의 차이일 수 있으나, 동일한 프로모터를 가지고도 여러 세포에서 비슷한 양상을 보임.

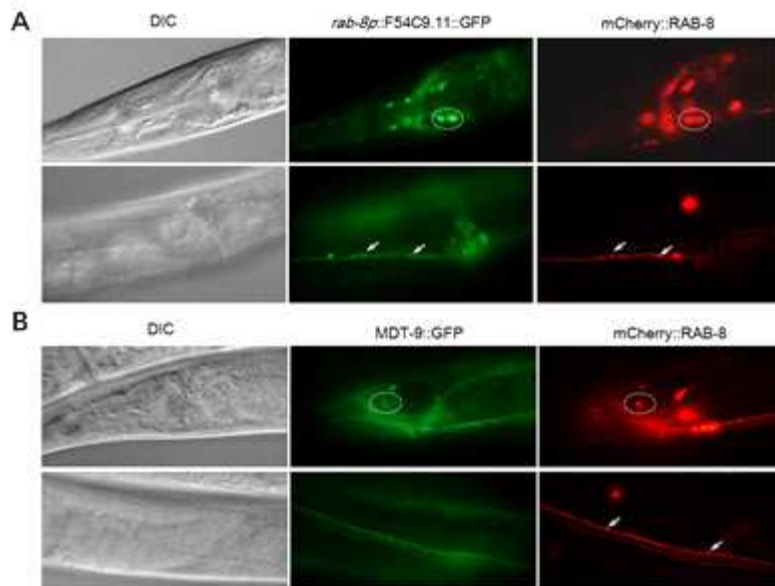


그림 3. mCherry::*RAB-8*과 F54C9.11::GFP 또는 MDT-9::GFP의 동시 발현

그림 3B에서는 MDT-9::GFP와 mCherry::*RAB-8*의 동시 발현을 비교한 것임. 이 경우에는 각 유전자의 자체 프로모터를 사용하였음. MDT-9::GFP의 발현이 mCherry::*RAB-8*의 발현 영역보다 넓어 보이고(점원), 신경 process에서 MDT-9::GFP은 전반적으로 퍼져 보이는 반면에, 앞서와 마찬가지로 mCherry::*RAB-8*의 발현은 점점이 나타남(화살표). 선충의 신경세포는 세포 크기가 작아서 colocalization을 보기 어려우나, process에서 점으로 나타나는 경향성이 F54C9.11과 RAB-8은 공통성을 보이므로, 두 단백질의 발현 상관성이 높아 보임.

3) RAB-8과 F54C9.11의 상호 결합

인간과 선충 유전자 사이의 염기 서열 비교와 *rab-8*, F54C9.11 간의 유전학적 분석은 F54C9.11가 RAB-8의 GEF일 가능성은 보여주지만, 확신을 위해서는 세포 내에서 이들이 complex로 존재하는지 확인해야 함. 이를 위해, CMV promoter에 의해 발현되는 RAB-8-Flag, F54C9.11-Myc 플라스미드를 제작하고, HEK293 세포주에 cotransfection하여, Flag에 대한 항체로 면역침전을 시키고, Myc에 대한 항체로 Western blot 분석을 수행하고 있으나, 현재까지 확실한 결과를 얻지 못함.

(2) *gck-2* mutant를 이용한 *gck-2*와 *rab-8* 상호 작용의 유전학적 분석

1) MAP4K의 중요성과 선충에서 GCK-2의 발현

앞서 선충에서 RAB-8을 이용한 yeast two-hybrid screen 결과로 찾은 GCK-2는 포유동물의 MAP4K를 발현함. 특히, GCK-2와 가장 유사한 MAP4K는 MAP4K5와 MAP4K3임. 흥미롭게도 선종성 폐암 환자의 생존율과 MAP4K의 발현과의 상관성을 조사해 본 결과, MAP4K5와 MAP4K3의 발현이 높을수록 환자 생존율이 증가하는 것을 알 수 있었음(그림 4). 이 결과는 Rab8A의 발현과 반대임.

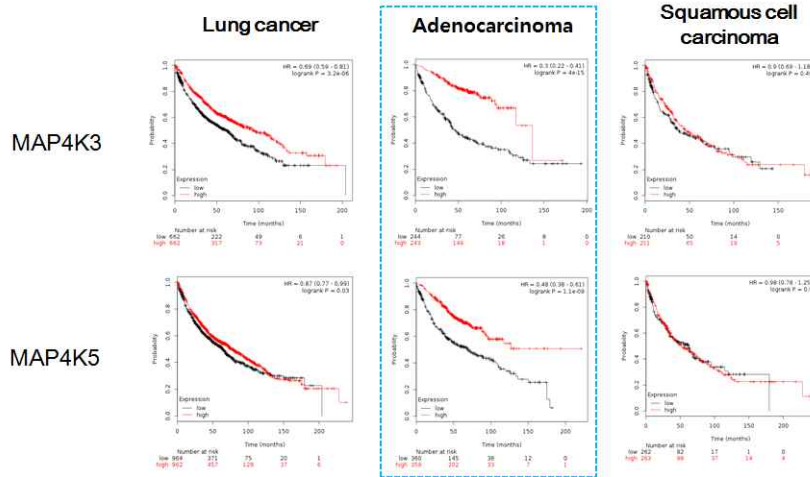


그림 4. MAP4K3와 MAP4K5의 발현과 폐암환자 생존율(www.kmplot.com)

선충에서 GCK-2의 기능을 연구하기 위해, 우선적으로 GCK-2의 발현을 *gck-2* promoter GFP 리포터와 GFP::GCK-2를 이용하여 관찰함.

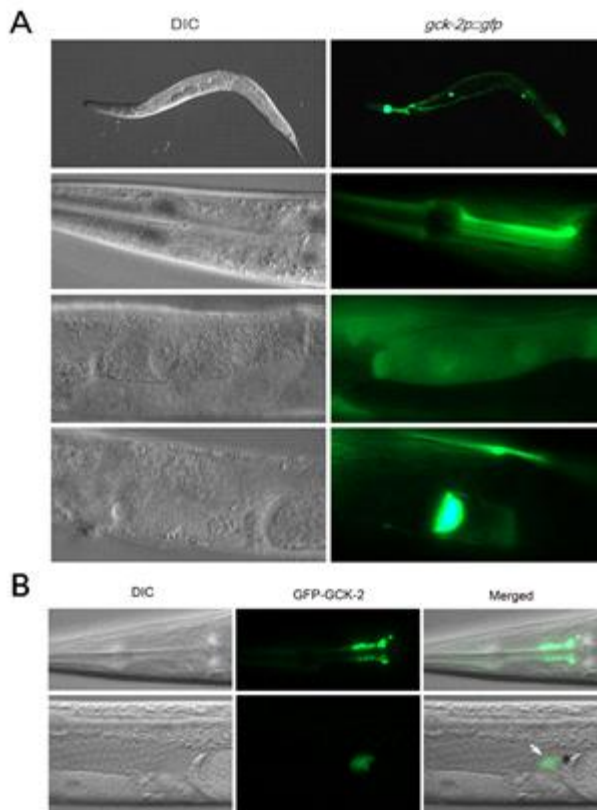


그림 5. 선충에서 GCK-2의 발현

그림 5A는 *gck-2* promoter에 의해 발현되는 GFP의 관찰 사진으로, pharynx, excretory canal, gonad, intestine에서 주로 발현됨을 알 수 있음. 그림 5B는 GFP::*GCK-2*의 발현 사진으로 특이하게 gonad의 DTC(*, distal tip cell) 주변 세포에서 발현됨(화살표). 이는 DTC에서 발현되는 RAB-8의 발현과 차이점을 보이거나, 신경세포에서 발현되지 않는 점을 제외하고는 pharynx, excretory canal, intestine에서 공동적으로 발현됨.

2) *gck-2* mutant에서 RAB-8의 발현

*GCK-2*가 RAB-8의 발현 조절에 필요한지 알아보기 위해, GFP::*RAB-8*을 *gck-2* mutant에서 발현시켜 보았음. 앞서 2차년도에서 *gck-2* RNAi의 결과는 차이가 없는 것처럼 나타났지만, GFP::*RAB-8*의 발현이 *gck-2* mutant에서 아주 많이 증가하는 것을 보여줌(그림6A). 그림 6B는 Western bolt analysis로 GFP::*RAB-8*의 발현 증가를 확인한 것임. 이러한 결과는 *GCK-2*가 RAB-8의 발현 조절의 negative regulator로 기능할 가능성을 제시함.

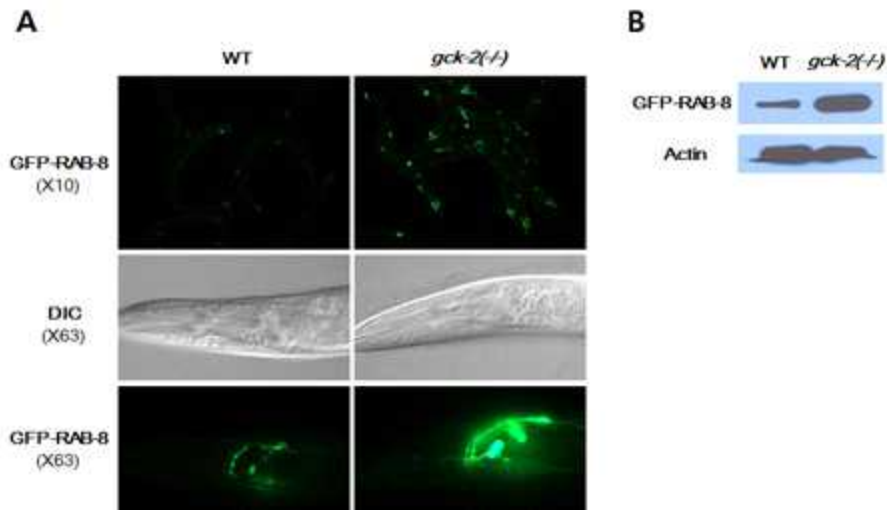


그림 6. *gck-2* mutant에서 GFP::*RAB-8*의 발현

정확한 GFP::*RAB-8* 발현을 검증하기 위해서, GFP::*RAB-8*의 integration line (*jgls42*)을 UV irradiation으로 제작하여 outcross를 4번 진행하였고, outcross를 4번 진행한 *gck-2* mutant와 교배하는 실험을 진행 중임. *gck-2* deletion mutant는 genomic DNA PCR을 이용하여 band 크기 차이로 구분하는데, genotyping에 어려움이 있어 실험 진행이 늦어지고 있음. *tbc-15;jgls42*와 *tm2518;jgls42*는 두 달 전에 완료했는데, *gck-2;jgls42*는 비로소 이번 주에 완료됨.

3) *rab-8* mutant에서 *GCK-2* 발현

RAB-8과 *GCK-2* 상호작용에 대한 두 번째 가설은 RAB-8이 *GCK-2*의 이동에 관여할 가능성임. 이를 확인하기 위해, GFP::*GCK-2* 발현 플라스미드를 제작하여 정상 개체와 *rab-8* mutant에서 발현 및 분포의 차이가 있는지 관찰하였음. 그 결과 GFP::*GCK-2* 발현의 차이를 보이지 않았음.

4) RAB-8과 *GCK-2*의 colocalization 확인

RAB-8과 *GCK-2*가 상호 결합하는 것이 사실이면, 이 두 단백질이 세포 내에서 같은 장소에서 발현되어야 할 것임. 이를 확인하기 위해, mCherry::*RAB-8*과 GFP::*GCK-2*를 동시에 발현하는 선충을 제작하여 이 두가지 단백질의 colocalization을 관찰하였음. 다른 실험들과 마찬가지로, 선충에서 colocalization은 세포의 크기가 작아서 잘 보이지 않았고, 세포질에 대체로 퍼져 보이므로 관찰이 어려움. 따라서 선충에서 가장 관찰하기 쉬운 intestine에서 다시 관찰하고자 함.

현재 act-5 promoter를 이용한 플라스미드 제작을 완료한 상태임.

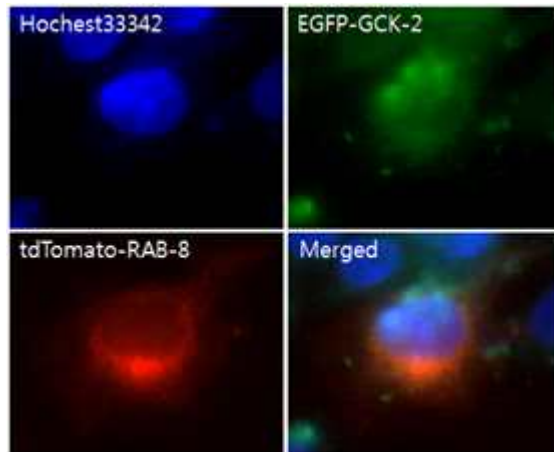


그림 7. gck-2 mutant에서 GFP::RAB-8의 발현

GCK-2와 RAB-8의 발현을 선충에서 자세히 관찰하기 어려워, 그 대안으로 CMV promoter 하위에 tdTomato-RAB-8과 EGFP-GCK-2를 발현하는 플라스미드를 A431 세포에 cotransfection하여 관찰하였음. 그 결과 tdTomato-RAB-8의 발현은 Rab8A의 면역염색 결과와 유사하게 핵 주변에서부터 세포질 전체로 점점이 퍼져 있는 형태로 나타남. 하지만 EGFP-GCK-2는 세포질 전체로 희미하게 퍼져 있어 colocalization을 확인하기 어려웠음(그림 7).

5) COP9의 RAB-8 조절 기능 연구

Y2H 스크린 결과에서 csn-5라는 COP9 signalosome component가 가장 많이 나왔기 때문에, 심사위원 제안대로 COP9 기능을 추가적으로 조사함. 이를 위해 csn-5를 포함한 8종의 후보 유전자들의 RNAi를 이용해 GFP::RAB-8의 발현 변화를 조사함. 그림 8에서 paa-1 RNAi에 의해 GFP::RAB-8의 발현이 감소하는 것을 제외하고는 나머지 유전자들의 효과는 확실하지 않음. 아마도 GFP::RAB-8의 발현이 신경에 가장 강하기 때문에, RNAi의 효과가 미미할 것으로 판단됨.

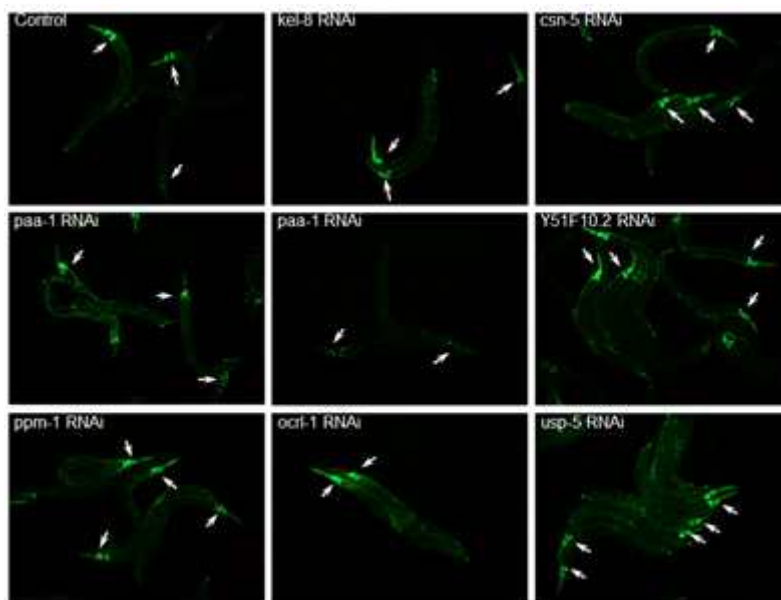


그림 8. RAB-8 상호작용 후보 유전자의 GFP::RAB-8의 발현에 대한 영향

(3) Rab8A와 Rab8B의 기능적 차이 분석

1) Rab8B의 knockdown phenotype

최초의 계획은 Rab8A를 표적으로 하는 CAS9-CRISPR로 Knockout하는 세포주를 제작하고자, 장현철 박사팀에서 플라스미드를 제작하고, 테스트 한 결과 KO가 잘 안되었음. Rab8A는 siRNA로 발현이 잘 떨어지는데 비해 뚜렷한 phenotype을 관찰하기 힘든 이유로 Rab8B의 기능이 중복될 것으로 판단됨. 이를 확인하기 위해, Rab8B에 특이적인 siRNA로 여러 세포주에서 Rab8A siRNA와 동시에 또는 단독으로 처리해 보았음. 현재 판매되는 Rab8B 항체들은 Rab8A와 8B를 동시에 인식하는 것 같고, 실제로 구입한 항체에서도 마찬가지였음. Rab8A 항체도 Rab8B를 인식하는 것으로 나타남. 따라서 Rab8B 특이적 항체가 없다는 것이 문제임. Rab8B siRNA에 의한 발현억제는 어쩔 수 없이 RT-PCR로 조사하였음.

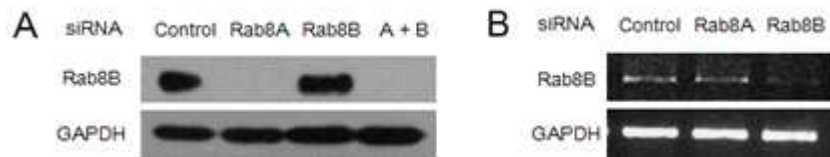


그림 9. A431 세포주에서 Rab8의 siRNA에 의한 발현 억제

그림 9A는 Rab8A 항체로 Western blot를 수행한 것이고, 그림 9B는 RT-PCR을 수행한 것임. 각각의 siRNA는 각 유전자에 특이적으로 작용하며, Rab8B의 발현은 상당히 낮아 30 cycle 이상을 수행하여야 RT-PCR band를 확인할 수 있었음.

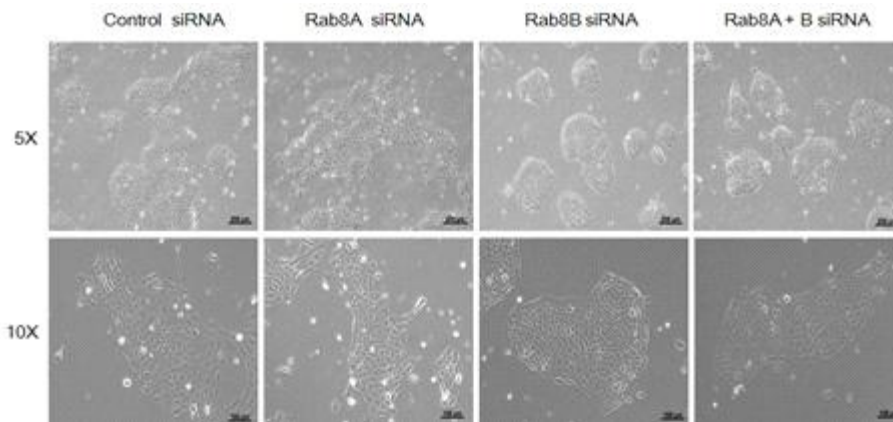


그림 10. A431 세포주에서 Rab8의 siRNA에 의한 세포 콜로니 형성

Rab8A siRNA처리에 의해 세포의 자라는 형태는 대조군과 크게 다르지 않으나, Rab8B의 siRNA 처리 결과, 세포 군집이 아주 밀집한 형태로 이루어지는 것을 알 수 있었음. Rab8A와 Rab8B의 siRNA를 동시에 처리했을 때는 대조군과 Rab8B siRNA 처리군의 사이의 형태를 보임(그림 10).

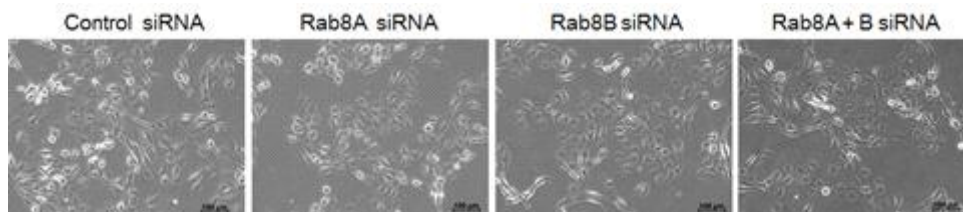


그림 11. HT1080 세포주에서 Rab8의 siRNA에 의한 세포 형태 변화

전혀 특성이 다른 섬유육종 세포인 HT1080 세포주에서 Rab8B를 knockdown 했을 때도, 세포의 형태가 섬유아세포에서 상피세포와 유사한 형태로 변하는 것을 알 수 있음(그림 11).

2) 세포 증식 또는 이동에 관한 Phenotype 분석

Rab8B의 knockdown에 의해 세포 군집이 밀집하는 것으로 보아, 세포의 이동성에 영향을 줄 것으로 생각됨. 이를 조사하기 위해, A431 세포주를 이용하여 Wound healing assay를 실시한 결과, Rab8B의 발현 억제에 의해 세포 이동성이 감소하는 것을 관찰하였음(그림 12).

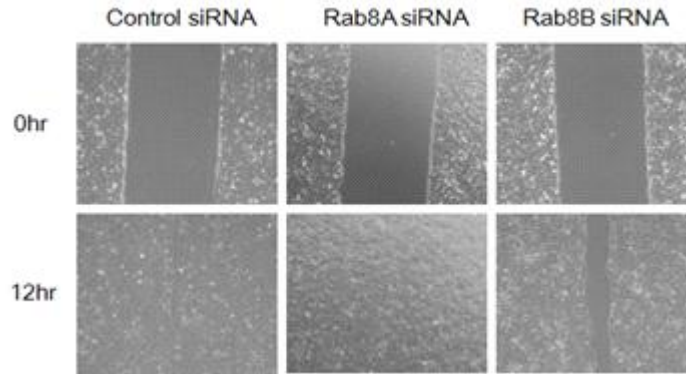


그림 12. A431 세포주에서 Rab8의 siRNA에 의한 세포 이동성 변화

다음으로, 실시간 이미지 촬영으로 Rab8B의 knockdown에 의한 세포의 운동성을 조사해 보았음. 대조군에서 붉은 원으로 표시된 세포들의 위치는 시간에 따라 부단히 변화하는데 비해, Rab8B를 knockdown한 세포들은 거의 제자리에서 움직이지 않는 것을 확인할 수 있음(그림 13A).

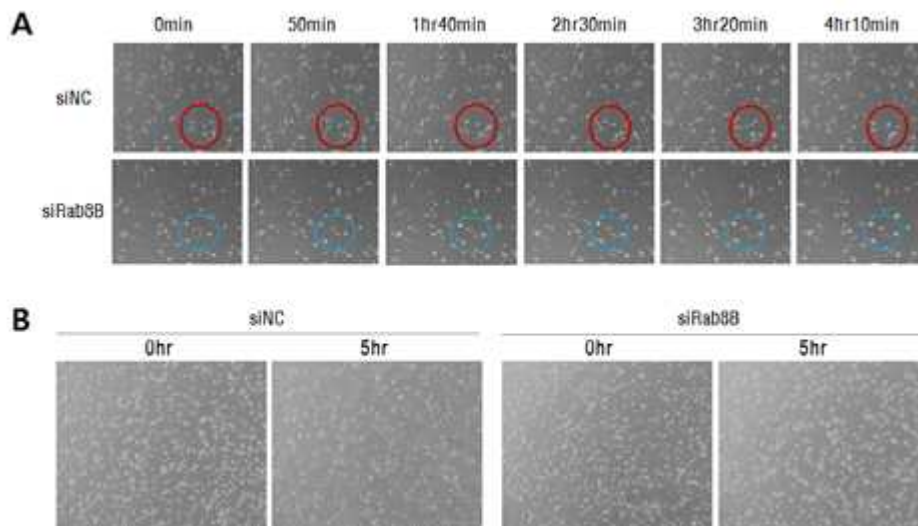


그림 13. A431 세포주에서 Rab8의 siRNA에 의한 세포 운동성 및 부착성의 변화

세포의 부착성이 변화하는지 알기 위해서, Rab8B knockdown한 A431을 대조군과 비교해 보았음. 배양된 세포를 수확한 후, 다시 배양 플레이트에 뿌리고 5시간 경과 후에 비교해 보았음. 대조군은 거의 모든 세포가 바닥에 부착하였으나, Rab8B siRNA가 처리된 세포들은 5시간 후에도 대부분의 세포들이 부착하지 못한 것을 관찰할 수 있었음(그림 13B).

Rab8A와 Rab8B의 기능은 어떤 단백질의 발현에 영향을 주는지 알기 위해, Rab8A와 Rab8B의 knockdown을 한 뒤, EGFR 관련 신호전달 단백질들과 cell junction protein들에 대하여 western blot analysis를 수행하였음. EGFR과 그 하위 단백질들의 변화는 Rab8A knockdown에 의해 EGFR과 phospho-EGFR의 양이 약간 증가하고, phospho-Akt의 양도 증가함. Erk의 양은 감소함. Rab8B knockdown은 별다른 변화가 없음(그림 14A). Cell junction 단백질들의 경우, Rab8A knockdown에서는 desmocollin이 감소하고, Rab8B knockdown에 의해서는 desmoglein이 감소하였음. Plakoglobin은 Rab8A와 Rab8B knockdown

모두에서 감소하는 경향성을 보였으나, E-cadherin의 경우에는 양적인 변화가 거의 없었음(그림 14B).

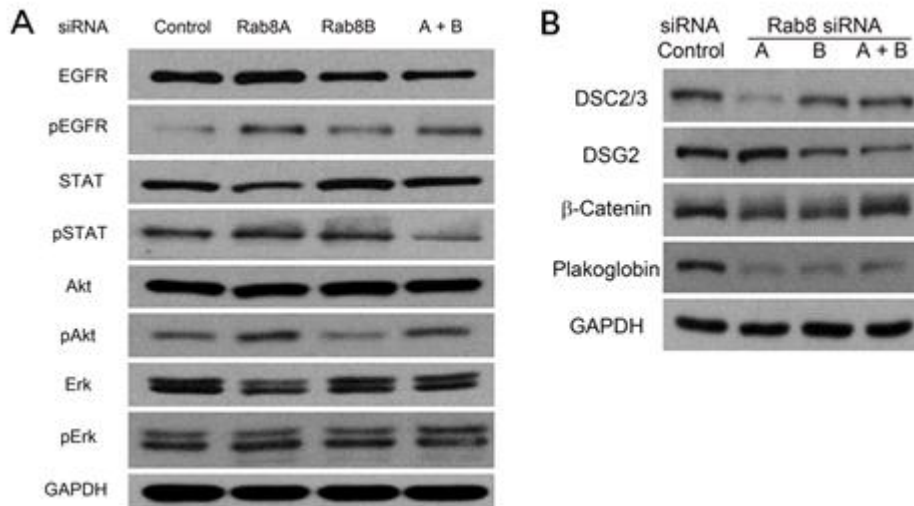


그림 14. A431 세포주에서 Rab8의 siRNA에 의한 단백질들의 양적 변화

Rab8A knockdown에 의해 EGFR이 약간 증가하므로, Rab8A과 EGFR의 발현 상관성을 알기 위해, A431 세포에 Rab8A knockdown과 Rab8A 항체와 EGFR 항체를 이용해 면역염색을 하였음. 그 결과 EGFR의 발현 위치의 변화나 Rab8A와의 colocalization 등을 관찰하기에는 어려웠음(그림 15A).

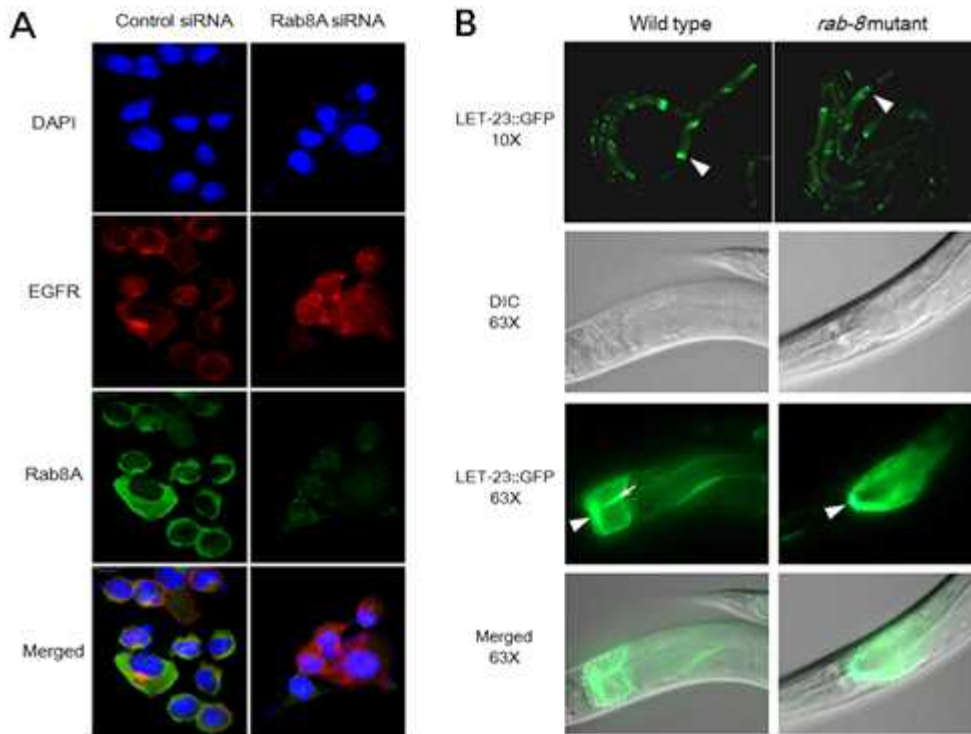


그림 15. A431 세포주에서 Rab8의 siRNA에 의한 EGFR의 세포 내 위치

선충 Rab8 mutant에서도 선충의 EGFR인 LET-23의 GFP 리포터의 발현 차이는 크게 차이가 없어 보임. 흥미롭게도 pharyngeal-intestine valve (화살표 머리)가 대조군에서는 넓고 편평한데 비해, *rab-8* mutant에서는 좁게 형성되어 있음(그림 15B).

3) Rab8A와 Rab8B의 Cell adhesion 조절에서의 기능적 차이

Rab8B knockdown에 의해 일차적으로 A431 세포의 형태가 변하므로, 공초점 현미경을 이용하여 자세히 관찰하였음. Rab8B siRNA를 처리한 후, paxillin과 actin의 항체로 면역염색을 수행하였음. 그 결과 대조군 세포에서 많이 뻗어 나오는 세포의 돌기(화살표, 형태적으로 filopodia로 생각됨)들이 Rab8B의 knockdown에 의해 완전히 사라져 버림(그림 16).

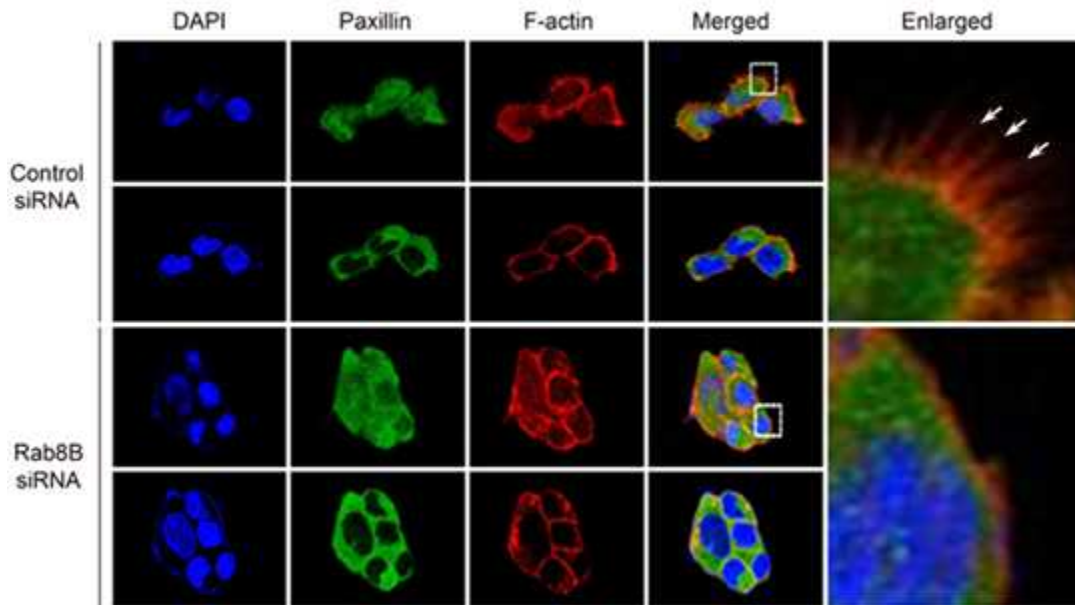


그림 16. A431 세포주에서 Rab8B의 siRNA에 의한 형태 변화

다음으로 조사한 것은 cilia의 형성에도 Rab8B가 중요할 것으로 생각되어, cilia의 marker인 acetyl-tubulin과 Arl13b 항체를 이용하여 면역염색을 수행하였음. 그 결과 위의 실험 결과와 유사하게 길게 뻗어 나오는 세포 돌기가 Rab8B knockdown에 의해 사라짐(그림 17). 대조군 세포에서 형성되는 길다란 세포 돌기는 acetyl-tubulin과 Arl13b의 항체에 의해 모두 염색이 되지만, primary cilia라고 단정짓기에는 아직 불확실함.

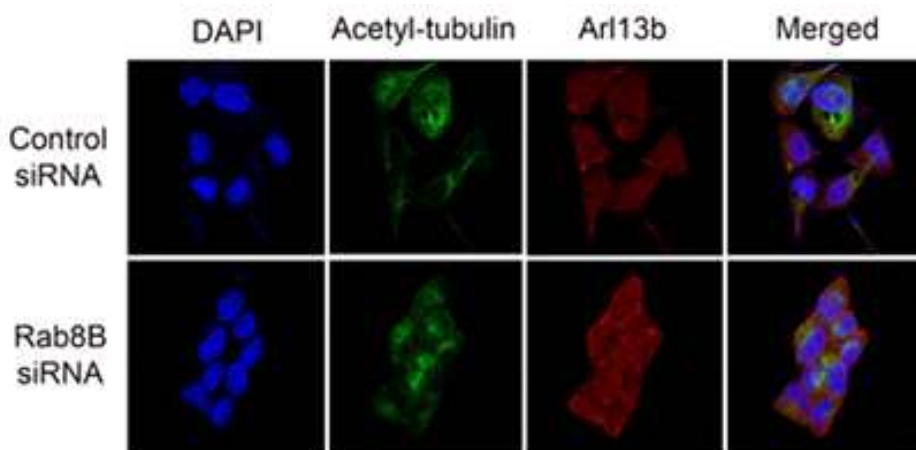


그림 17. A431 세포주에서 Rab8B의 siRNA에 의한 cilia marker의 발현 변화

이러한 결과들에서 적어도 세포의 형태 변화에는 Rab8A보다도 Rab8B가 더 중요하고, 특히나 filopodia와 같은 세포 돌기의 형성에 Rab8B의 기능이 절대적으로 필요함을 알 수 있었음.

Rab8B knockdown 결과, 세포 군집의 밀집도가 증가하므로 세포 연접에 관여하는 단백질의 변화를 면역염색을 통해서 살펴 보았음. Rab8A knockdown에서 desmocollin이 줄어들고, Rab8B knockdown에서 desmoglein이 줄어드는 결과는 앞서의 western blot analysis와 동일함. Rab8B knockdown에 의해서는 desmocollin과 plakoglobin이 세포 연접 부위에 증가하는 양상을 관찰할 수 있었음(그림 18).

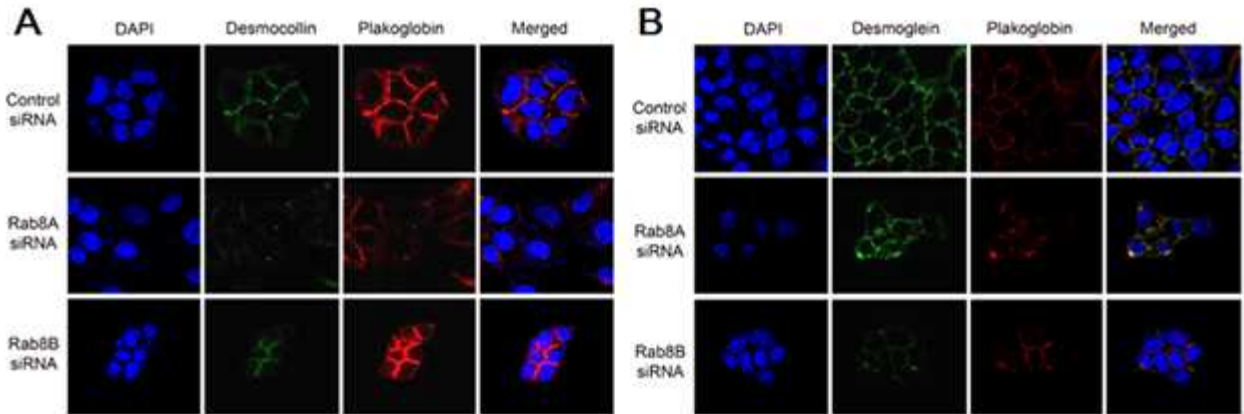


그림 18. A431 세포주에서 Rab8B의 siRNA에 의한 cell junction 단백질의 발현 변화

다음으로 세포 연접 관련 단백질 중에서 adherens junction 단백질인 E-cadherin과 β -catenin의 발현을 면역염색을 통해 관찰함. Rab8A knockdown에 의해서 E-cadherin은 세포 연접 부위에서 줄어드는 것처럼 보이고, Rab8B knockdown에 의해서 E-cadherin이 세포 연접 부위보다 다른 세포막에 증가하는 것처럼 보임. β -catenin은 Rab8A knockdown에 의해서 줄어들고, Rab8B knockdown에 의해서는 세포 연접 부위에 앞에서 관찰한 plakoglobin과 desmocollin처럼 확연히 증가함(그림 18).

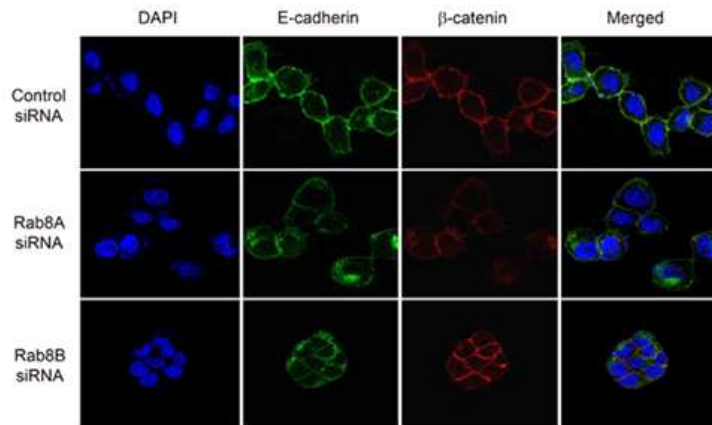


그림 18. A431 세포주에서 Rab8B의 siRNA에 의한 cell junction 단백질의 발현 변화

이러한 결과들에서 Rab8A와 Rab8B가 세포 연접에 있어 확연히 다른 기능을 하는 것처럼 보이므로

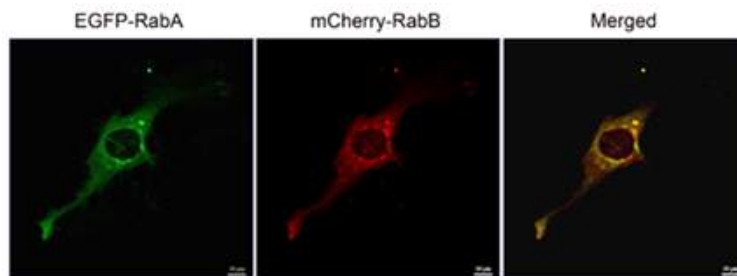


그림 19. A431 세포주에서 EGFP-Rab8A와 mCherry-Rab8B의 발현

세포 내에서 Rab8A와 Rab8B의 같은 장소에서 기능을 하는지 알아보기 위해서 EGFP-Rab8A와 mCherry-Rab8B를 A431에 cotransfection하였음. 그 결과 이 두 단백질은 핵 주변에서 세포질 전체에 걸쳐 점점이 발현되는 것으로 확인됨. 특히 핵 주변에서 강한 발현을 보이고, 많은 경우 두 단백질의 발현 위치가 일치하기도 하지만, 일부는 다르게 보임(그림 19).

4) EGFP-Rab8B의 과발현에 의한 Rescue 실험

이제까지의 실험 결과들은 Rab8B knockdown에 의한 것들임. 과연 이러한 효과가 사실인지 확실하기 위해서는 Rab8B knockdown의 효과를 Rab8B의 과발현으로 상쇄할 수 있는지 확인하는 것임. 현재 사용하고 있는 Rab8B siRNA의 인식 부위는 Rab8B mRNA의 3' UTR에 위치하므로, wild type Rab8B를 CMV 벡터에 있는 3' UTR을 이용하여 발현시키면 안정적으로 발현될 것임. 이러한 실험을 위해, A431에 Rab8B siRNA를 먼저 transfection한 뒤, 24시간 뒤에 EGFP-Rab8B를 transfection하고 24시간 뒤에 세포의 형태 변화와 다른 단백질들의 발현 등을 조사해 보았음. EGFP 항체로 western bolt analysis를 수행한 결과, EGFP-Rab8B가 Rab8B siRNA처리에도 불구하고 잘 발현됨을 알 수 있었음(그림 20A).

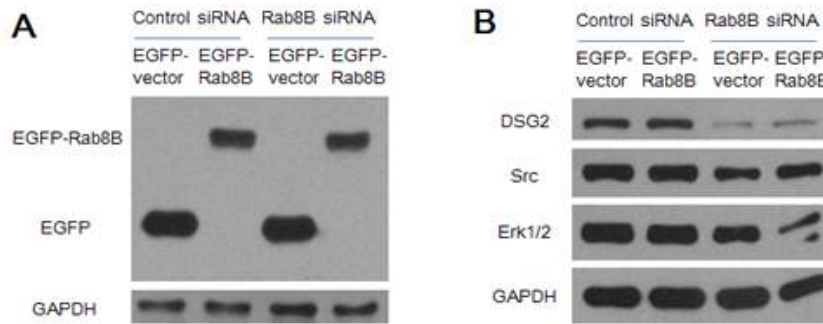


그림 20. A31 세포주에서 EGFP-Rab8B의 발현에 의한 효과

그림에도 불구하고, 세포 군집의 형태적 변화는 tranfection 효율이 낮아서인지 확연히 관찰되지 않았음. Rab8B knockdown에 의해 변하는 몇 가지 단백질 발현의 변화를 보면, desmoglein과 Src의 경우에 EGFP-Rab8B 발현에 의해 살짝 회복되는 것을 알 수 있었음(그림 20B). 이 경우에 있어서도 마찬가지로 transfection 효율이 낮아서 결과가 확연한 차이를 보이지 않는 것으로 생각됨.

4) MAP4K3와 MAP4K5 knockdown 효과

선충에서 GCK-2/MAP4K와 Rab8의 상호작용이 고등동물의 세포에서도 적용되는지 알기 위해, Gck-2와 가장 유사한 MAP4K3와 MAP4K5의 siRNA를 이용하여 A431과 HEK293 세포에서 phenotype을 관찰함. 그 결과 두 유전자 siRNA 모두 세포의 형태가 변했는데, 특히 MAP4K5 knockdown이 Rab8B knockdown과 유사성을 보임(그림 21).

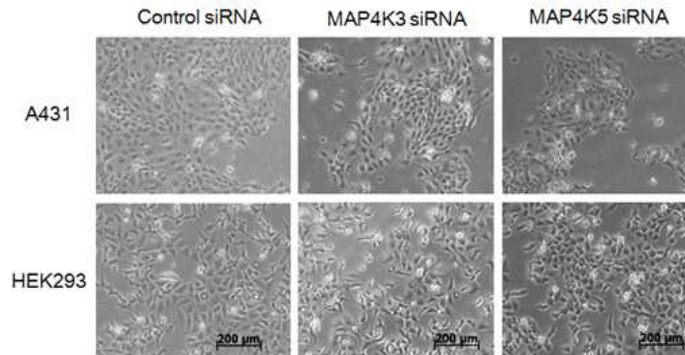


그림 21. A31과 HEK293 세포주에서 MAP4K3/5 발현 억제 효과

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4-1. 목표달성도

○ 1차년도

목 표	달성도(%)	내 용
장세포와 난자에서 Yolk protein 이동에 대한 각 유전자들의 역할 분류	당해연도달성도 100% 누적달성도 30%	rab 유전자들에 대한 RNAi를 수행하여 rab-10,11,18 이 intestine에서 Yolk protein의 분비에 관여하는 것을 발견함.
Hypodermis에서 Collagen의 분비에 대한 각 유전자들의 역할 분류	당해연도달성도 100% 누적달성도 30%	RNAi 결과 rab-5를 제외한 다른 rab 유전자들은 hypodermis에서 collagen 분비에 관여하지 않는다는 것을 발견함.
선충 생식기 발암모델에서 EGFR 신호전달 경로에 대한 억제 정도를 분석	당해연도달성도 100% 누적달성도 30%	rab-6와 rab-8이 발암성 EGFR 신호전달에 필요함을 확립함. 특히 rab-8은 Ras 하위에서 FGF 분비 조절에 관여하여 Muv 형성에 관여한다는 것을 확인함
장세포에서 gut lumen으로 secretion되는 marker 개발	당해연도달성도 80% 누적달성도 20%	12개 후보 유전자들의 GFP fusion construct들을 제작하고 형질전환 개체를 제작했으나, 목표에 부합하는 marker를 확보하는 것은 실패함. 본 연구에 있어 주요 연구 주제는 아니므로 이 부분에 대한 연구는 더 이상 수행하지 않음.

○ 2차년도

목 표	달성도(%)	내 용
선충의 Muv model 에서 FGF 발현과 분비 조절에서 rab-8의 역할 규명	당해연도 달성도 100% 누적달성도 100%	EGL-17(FGF)::GFP를 발현하는 형질전환 개체를 제작하고 rab-8과 rab-8 GEF mutant에서 FGF 분비가 잘 되지 않는 것을 관찰함
암세포주에서 Rab8과 FGF의 역할 규명: 세포증식과 세포 이동의 측면을 중심	당해연도 달성도 50% 누적달성도 20%	인간의 Rab8 유전자들 중에서 Rab8A의 발현이 선종성 폐암세포주 환자 생존율에 중요하다는 것을 발견하고, Rab8A발현이 높은 선종성 폐암세포주를 선정함

○ 3차년도

목 표	달성도(%)	내 용
Rab8과 Rab8 GEF의 발현 조절관계 분석	당해연도 달성도 100% 누적달성도 100%	RAB-8의 발현을 tm2518 mutant에서 관찰하고, RAB-8과 F54C9.11의 colocalization을 조사함
gck-2 mutant를 이용한 gck-2와 rab-8 상호 작용의 유전학적 분석	당해연도 달성도 100% 누적달성도 100%	gck-2 mutant에서 RAB-8의 발현, rab-8 mutant에서 GCK-2 발현, RAB-8과 GCK-2의 colocalization 조사함
Rab8B knockdown에 의한 암세포 이동에 관한 기전 조사	당해연도 달성도 100% 누적달성도 100%	Rab8A와 Rab8B의 knockdown에 의한 세포 성장과 이동성을 조사하고, 그 기전이 cell junction protein의 조절을 통한 것으로 발견함

4-2. 관련분야 기여도

- Rab8A와 Rab8B가 암세포의 연접 형성에 전혀 다른 방향으로 기능하고, Rab8B의 억제자가 암 세포의 전이 억제 가능성이 높다는 결과를 얻음. 이 결과는 기존의 연구 결과들에서 전혀 유추할 수 없는 놀라운 발견임. 따라서 세포간 연접 형성의 새로운 negative regulator를 발견한 셈임.

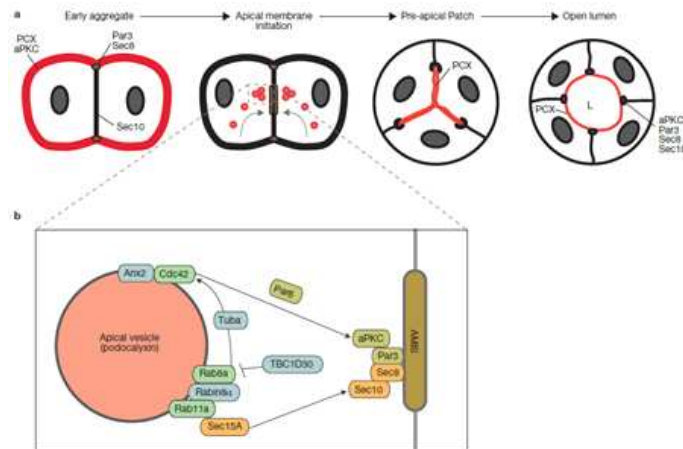
5. 연구결과의 활용계획

○ 추가 연구의 필요성

선충 Rab8의 새로운 상호작용 단백질들이 Rab8의 조절에 어떻게 관여하는지 또는 Rab8 하위에서 작용하는 effector molecule인지를 규명하는 후속 연구가 필요함. 특히 암세포에서 Rab8B가 세포 연결 형성에서 negative regulation을 한다는 것을 발견했는데, 현재까지 A431, HT1080, HEK293과 같이 제한적인 세포주에서의 한정된 결과임. 따라서 보다 다양한 암 세포주에서 Rab8B에 의한 세포 연결 형성과 세포 이동성에 대한 영향을 조사할 필요가 있고, 이것을 암 세포의 성장과 전이를 억제 가능한 표적임을 확인하기 위해서는 추가적인 동물 실험이 필요함. MAP4K5

○ 타 연구에의 응용

Intestine과 같은 장기의 내강(lumen) 형성 기전에 대한 연구 결과가 최근 주목 받고 있음. 이는 lumenogenesis 또는 hollow formation이라고도 하는데, 동물 발생과정에서 필수적인 morphogenesis 과정 중 하나임. 흥미롭게도 여러 상피세포들이 모여서 하나의 관을 형성하거나, 하나의 세포 안에 좁은 관이 형성되는 경우가 있는데, 이의 분자적 기전은 유사할 것으로 생각하고 있음. 크기가 1mm에 불과한 선충의 경우, 4개 또는 2개의 세포가 둘러싼 gut lumen과 하나의 긴 세포 내에 좁은 관이 형성되는 excretory canal의 두 가지가 모두 존재함. 내강 형성의 가장 핵심적인 기전은 apical membrane의 형성과 apical membrane으로의 polarized trafficking임. 이 과정에서 Rab11과 Rab8이 필요하고(Nat Cell Biol, 2010). 선충의 Rab8과 GCK-2의 공통적인 발현 부위 중 하나가 excretory canal cell임을 발견했고, Rab8과 GCK-2의 상호 작용 결과로 보아, GCK-2가 Rab8의 조절을 통해 내강 형성 과정에 관여할 것으로 기대됨. 또한 이번 연구의 yeast two-hybrid screen 결과, Rab8과 상호작용할 것으로 생각되는 CCM3가 내강 형성에 기능(Nat Comm, 2015)한다는 보고도 있음 따라서 이번 연구 결과는 내강 형성에 대한 연구로 응용될 수 있을 것임.



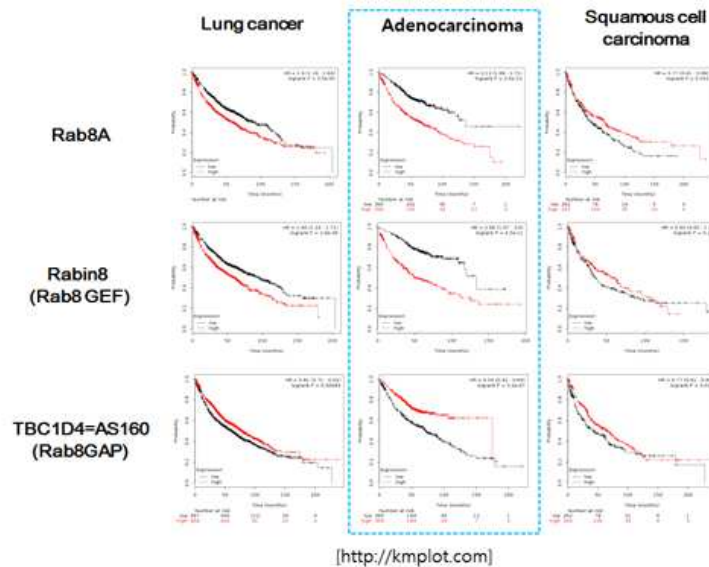
A molecular network for de novo lumen generation (Nat Cell Biol, 2010)

CCM3를 비롯한 선충 Rab8의 yeast two-hybrid screen 결과로 찾은 단백질들 중 일부는 STRIPAK(striatin interacting phosphatase and kinase) complex임. 최근 연구 결과에 의하면 STRIPAK 성분들이 암세포의 이동과 전이에 기능한다고 보고함(Nat Cell Biol, 2014). 따라서 Rab8이 STRIPAK의 apical membrane으로 이동에 관여할 가능성이 높고, 세포 이동성과 전이 그리고 내강 형성에 기능할 수 있음.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ Rab8 상호작용 단백질들과 폐암환자 생존을 조사 결과

Rab8A와 Rab8A의 활성을 조절하는 GEF과 GAP인 Rabin8과 TBC1D4의 발현과 선종성 폐암환자 생존율은 밀접한 연관성을 보임. 아래 그림에서 Rab8A의 positive regulator인 Rabin8의 경우에는 발현이 높을수록 생존율이 낮아지는 Rab8A과 동일한 경향성을 보이는 반면에, Rab8A의 negative regulator인 TBC1D4의 경우에는 Rab8과 반대의 경향성을 보이는 것이 우연은 아닐 것으로 생각됨. 하지만 여러 폐암 세포주에서 Rab8A을 knockdown한 결과 뚜렷한 phenotype을 발견할 수 없었음. 최근에 보고된 연구 결과로 판단해 보면, 암 미세환경에서의 Rab8A의 역할이 중요할 것으로 기대됨. 암세포가 TGF- β 와 같은 growth factor를 분비하여 주변 세포들과의 CAF(cancer associated fibroblast) 또는 TAM(tumor associated macrophage)로 변화시키고, CAF 또는 TAM은 암세포 성장과 이동을 촉진시키는 사이토카인과 ECM(extracellular matrix)를 분비함(Nature Review Cancer, 2014).



비록 이번 연구에서 Rab8A의 암 미세환경에서의 기능을 조사해 보지 못했지만, 선종의 Rab8과 Rab8GEF인 F54C9.11 mutant에서 FGF의 분비가 잘 일어나지 않는 결과로 보아 Rab8A이 CAF나 TAM에서 FGF와 같은 세포성장 인자의 분비에 관여할 가능성이 있음.

2014년 Developmental Cell에 발표된 한 논문에서는 A549 세포주에서 60여종의 Rab에 대한 siRNA를 이용한 Wound healing assay로 암세포의 이동에 Rab14이 매우 중요하다는 연구 결과를 보였음. 이 논문의 접근 방식은 본 연구 방법과 유사한데, 놀랍게도 A549 세포에서는 기존에 알려진 것과 달리 Rab14의 knockdown에 의해 세포 연결 부위에서 N-cadherin의 발현 증가되어 세포 이동성이 감소한다는 것임(Dev Cell, 2012). 이는 A431 세포주에서 Rab8B의 knockdown에 의해 E-cadherin, plakoglobin, desmocollin, β -catenin이 세포 연결 부위에 증가하여 이동성이 감소한다는 이번 연구 결과와 유사함. 일반적으로 mesenchymal marker인 N-cadherin이 Rab14의 knockdown에 의해 양적으로도 상당히 증가하고 세포막에서도 증가한 점은 Rab8B knockdown에 의해 주로 위치가 조절되는 E-cadherin과 차이점을 보임. 앞서 기술한 것처럼, 최근 STRIPAK이 암세포의 이동과 전이(Nat Cell Biol, 2014), 내강 형성(Nat Comm, 2015) 등에 관련한다는 것에서 Rab8의 알려진 주요 기능과 연관해 보면, Rab8이 STRIPAK의 apical membrane 쪽으로 이동에 관여할 가능성이 큼.

7. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	FK-3000 isolated from <i>Stephania delavayi</i> Diels. inhibits MDA-MB-231 cell proliferation by decreasing NF- κ B phosphorylation and COX-2 expression	국립암센터	책임저자	International Journal of Oncology	3.025	2014.06.01		
2	논문	The condensin component NCAPG2 regulates microtubule-kinetochore attachment through recruitment of Polo-like kinase 1 to kinetochores.	국립암센터	제1저자	Nature Communications	10.742	2014.08.11		
3	논문	Telomere maintenance through recruitment of internal genomic regions	국립암센터	공동저자	Nature Communications	11.47	2015.09.18		
4	논문	Down-regulation of lipid raft-associated onco-proteins via cholesterol-dependent lipid raft internalization in docosahexaenoic acid-induced apoptosis	국립암센터	공동저자	BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids	4.495	2014.01.01		
5	논문	TopBP1 deficiency impairs V(D)J recombination during lymphocyte development	국립암센터	공동저자	The EMBO Journal	10.748	2014.02.03		

8. 참여연구원 현황

번호	소속기관명	직위	생년월일	전공 및 학위		연구담당 분야
	성명	과학 기술인등록 번호	성별	취득 년도	학위 (전공)	과제참여 기간
	국립암센터 심재갈					

9. 기타사항

○ 없음

10. 참고문헌

- Rab GTPases as regulators of endocytosis, targets of disease and therapeutic opportunities. Agola JO, Jim PA, Ward HH, Basuray S, Wandering-Ness A. *Clin Genet*. 2011 Oct;80(4):305-18. doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01724.x. Epub 2011 Jul 13.
- Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Stenmark H. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Aug;10(8):513-25. doi: 10.1038/nrm2728. Epub 2009 Jul 15. Review.
- Rab GTPases implicated in inherited and acquired disorders. Mitra S, Cheng KW, Mills GB. *Semin Cell Dev Biol*. 2011 Feb;22(1):57-68. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.12.005. Epub 2010 Dec 13.
- The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. Tanos B1, Rodriguez-Boulan E. *Oncogene*. 2008 Nov 24;27(55):6939-57. doi: 10.1038/onc.2008.345.
- *Caenorhabditis elegans* Rab escort protein (REP-1) differently regulates each Rab protein function and localization in a tissue-dependent manner. Tanaka D, Kameyama K, Okamoto H, Doi M. *Genes Cells*. 2008 Nov;13(11):1141-57. doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01232.x.
- The *Caenorhabditis elegans* GARP complex contains the conserved Vps51 subunit and is required to maintain lysosomal morphology. Luo L, Hannemann M, Koenig S, Hegermann J, Ailion M, Cho MK, Sasidharan N, Zweckstetter M, Rensing SA, Eimer S. *Mol Biol Cell*. 2011 Jul 15;22(14):2564-78. doi: 10.1091/mbc.E10-06-0493. Epub 2011 May 25.
- TFG-1 function in protein secretion and oncogenesis. Witte K1, Schuh AL, Hegermann J, Sarkeshik A, Mayers JR, Schwarze K, Yates JR 3rd, Eimer S, Audhya A. *Nat Cell Biol*. 2011 May;13(5):550-8. doi: 10.1038/ncb2225. Epub 2011 Apr 10.
- Clathrin interaction and subcellular localization of Ce-DAB-1, an adaptor for protein secretion in *Caenorhabditis elegans*. Kamikura DM1, Cooper JA. *Traffic*. 2006 Mar;7(3):324-36.
- Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. *Nat Rev Cancer*. 2014 Jun;14(6):430-9. doi: 10.1038/nrc3726. Epub 2014 May 15.
- Rab14 and its exchange factor FAM116 link endocytic recycling and adherens junction stability in migrating cells. Linford A1, Yoshimura S, Nunes Bastos R, Langemeyer L, Gerondopoulos A, Rigden DJ, Barr FA. *Dev Cell*. 2012 May 15;22(5):952-66. doi: 10.1016/j.devcel.2012.04.010.
- A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. Bryant DM, Datta A, Rodriguez-Fraticelli AE, Peränen J, Martín-Belmonte F, Mostov KE. *Nat Cell Biol*. 2010 Nov;12(11):1035-45. doi: 10.1038/ncb2106. Epub 2010 Oct 3.
- CCM-3/STRIPAK promotes seamless tube extension through endocytic recycling. Lant B, Yu B, Goudreault M, Holmyard D, Knight JD, Xu P, Zhao L, Chin K, Wallace E, Zhen M, Gingras AC, Derry WB. *Nat Commun*. 2015 Mar 6;6:6449. doi: 10.1038/ncomms7449. *Nat Commun*. 2015 Mar 6;6:6449. doi: 10.1038/ncomms7449.
- STRIPAK components determine mode of cancer cell migration and metastasis. Madsen CD, Hooper S, Tozluoglu M, Bruckbauer A, Fletcher G, Erler JT, Bates PA, Thompson B, Sahai E. *Nat Cell Biol*. 2015 Jan;17(1):68-80. doi: 10.1038/ncb3083. Epub 2014 Dec 22.

<별첨작성 양식>

[별첨]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		1310410	
사업구분	기관고유연구사업				
연구분야	T3			과제구분	단위
사업명	기관고유연구사업				주관
총괄과제	선충에서 Rab GTPase에 의한 발암 억제 기전 연구			총괄책임자	심재갈
과제명				과제유형	(기초, 응용, 개발)
연구기관	국립암센터			연구책임자	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	연구비	민간	계
	1차년도	2013.1.1.-2013. 12.31	80,000		
	2차년도	2014.1.1.-2014. 12.31	80,000		
	3차년도	2015.1.1.-2015. 12.31	76,000		
	계		236,000		
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2015년 10월 29일

3. 평가자(과제책임자) :

소속	직위	성명
비교생명의학연구과	책임연구원	심재갈

4. 평가자(과제책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	심재갈
----	-----

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

선충의 30개 Rab 유전자들의 RNAi 스크린을 이용하여, 선충의 발암 모델(mutivulva model)을 억제하는 Rab을 찾아서, 그 기능을 선충과 인간의 암세포주(주로 A431)을 이용하여 연구함. 선충의 Rab 연구는 신경 세포에서 기능 등은 다른 시스템에 비해 앞서 있지만, 다른 분야는 거의 진척이 없음. 따라서 먼저 다른 시스템에서 연구된 결과를 선충에서 증명해야 하는 것이 많은 시간과 노력을 들여야 했고, 선충에서 찾은 것을 실제 암 세포주에 적용하는 과정에서 많은 시행착오가 있었음. 그럼에도 불구하고, 이번 연구를 통하여 Rab8A와 Rab8B가 세포 연접 형성에 전혀 다른 기능을 한다는 결과를 얻을 수 있었음. 또한 선충의 Rab8을 이용한 yeast two-hybrid screen으로 기존에 보고되지 않았던 새로운 Rab8 상호작용 단백질들을 여러 개 찾았고, 그 중에서 GCK-2/MAP4K가 Rab8의 발현을 조절하는데 중요하다는 것을 발견함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

이번 연구는 선충에서의 RNAi 스크린, yeast two-hybrid screen, 여러 암세포주의 테스트 과정을 거치는 과정을 포함해서, 연구 기간 내에 핵심 연구 주제에 대한 연구 결과들을 논문으로 정리하는데 미달함. 따라서 그 파급 효과를 확신하기에는 부족한 단계이나, 이제까지 거의 주목 받지 못한 Rab8B의 기능이 세포 연접 형성에서 Rab8A와 반대 작용을 한다는 놀라운 발견을 했으므로, 1-2년 내에 이번 연구 결과가 발표되면 많은 세포학 연구자들과 종양학 연구자들의 관심을 끌 것으로 예상됨. 특히, yeast two-hybrid screen 결과로 나온 여러 단백질들이 최근 주목 받고 있는 STRIPAK 관련 단백질이므로 Rab8이 STRIPAK과의 상호 작용을 통한 내강 형성과 apical membrane structure 형성에서의 기능 연구로 파급될 수 있음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

마찬가지로 연구 기간 내에 핵심 연구 주제에 대한 연구 결론을 지지하는 결과들이 부족함에 따라, 이번 연구 결과의 활용성을 확신하기에는 부족한 단계이나, 선종성 폐암과 같은 특정 암에서 Rab8A과 Rab8GAP(TBC1D4), Rab8GEF(Rabin8), MAP4K3, MAP4K5들의 발현이 환자 생존율과 밀접한 상관 관계를 보이는 결과와 Rab8B의 발현 억제에 의해 세포 연접이 증가하고 이동이 제한되므로 Rab8을 중심으로 한 단백질 네트워크가 일부 암에서는 중요하다는 것을 알 수 있음. 따라서 아직 암 치료 표적으로 제안할 연구 수준에 있지는 않지만, 예후 인자로는 충분히 사용될 수 있을 것임.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

앞서 기술한 것처럼, 이번 연구는 선충 모델과 암세포주를 이용하였고, 초기 2년의 연구는 거의 스크린한 단백질의 테스트를 하는데 많은 시간과 노력을 들여야 했음. 특히, 이번 연구 기간 동안, 전혀 연구 경험이 없는 2명의 학부 졸업생을 한명에게는 선충 모델을 가르치고, 다른 한명에게는 세포 배양 실험을 가르치면서 앞서 기술한 연구 결과들을 얻기 위해 주변 동료들(김용연, 배영기, 김경태, 장현철 박사)의 도움을 받기는 했지만, 연구책임자로서 무척 힘든 시간을 보냈음. 특히 본인의 전문 분야가 아닌 세포 배양의 자세한 내용들을 알기 위해, 김용연 박사 팀의 랩 미팅(매주 금요일 저녁 또는 토요일 오전, 저널클럽도 포함하여 평균 3시간 정도 걸림)에 참석하였음(김용연 박사님의 배려와 도움에 감사). 따라서 랩 미팅만 일주일에 2번을 하면서, 연구 목표를 달성하고자 연구책임자 본인이 과제 연구원들보다 더 많은 시간을 실험에 투여했음. 이번 연구 기간 동안 노력에 비해서는 엄격하게 평가하면 성과 달성도가 부족한 것이 아쉬움.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

이번 연구기간 동안 발표된 논문은 모두 연구 기간만 5년 이상인 공동연구로 진행된 연구들의 결과임. 주 저자 논문으로 Nature Communications에 1편과 International Journal of Oncology에 1편의 논문을 발표하였고, 공동 저자로 참여한 논문 3편도 모두 우수한 논문임. 향후 이번 연구 종료 시점 이후, 이번 연구의 핵심 연구 결과를 정리한 논문을 2편 정도 추가적으로 투고할 예정임.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
장세포와 난자에서 Yolk protein 이동에 대한 각 유전자들의 역할 분류	10	100	30개 선충 rab 유전자들에 대한 RNAi를 스크린을 수행하여 rab-10,11,18이 intestine에서 Yolk protein의 분비에 관여하는 것을 발견함.
Hypodermis에서 Collagen의 분비에 대한 각 유전자들의 역할 분류	10	100	RNAi 결과 rab-5를 제외한 다른 rab 유전자들은 hypodermis에서 collagen 분비에 관여하지 않는다는 것을 관찰함.
선충 생식기 발암모델에서 EGFR 신호전달 경로에 대한 억제 정도를 분석	10	100	rab-6와 rab-8이 발암성 EGFR 신호전달에 필요함을 확인함. 특히 rab-8은 Ras 하위에서 FGF 분비 조절에 관여하여 Muv 형성에 관여한다는 것을 확인함.
선충의 Muv model 에서 FGF 발현과 분비 조절에서 rab-8의 역할 규명	10	100	EGL-17(FGF)::GFP를 발현하는 형질전환 개체를 제작하고 rab-8과 rab-8 GEF mutant에서 FGF 분비가 잘 되지 않는 것을 확인함
암세포주에서 Rab8과 FGF의 역할 규명: 세포증식과 세포 이동의 측면을 중심	10	100	인간의 Rab8 유전자들 중에서 Rab8A의 발현이 선종성 폐암세포주 환자 생존율에 중요하다는 것을 발견하고, Rab8A 발현이 높은 선종성 폐암세포주를 선정함
Rab8과 Rab8 GEF의 발현 조절관계 분석	10	100	RAB-8의 발현을 tm2518 mutant에서 관찰하고, RAB-8과 F54C9.11의 colocalization 조사함
gck-2 mutant를 이용한 gck-2와 rab-8 상호 작용의 유전학적 분석	20	100	gck-2 mutant에서 RAB-8의 발현, rab-8 mutant에서 GCK-2 발현, RAB-8과 GCK-2의 colocalization 조사함
Rab8B knockdown에 의한 암세포 이동에 관한 기전 조사	20	100	Rab8A와 Rab8B의 knockdown에 의한 세포 성장과 이동성을 조사하고, 그 기전이 cell junction protein의 조절을 통한 것으로 관찰함
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

선종성 폐암과 같은 특정 암에서 Rab8A와 Rab8GAP(TBC1D4), Rab8GEF(Rabin8), MAP4K3, MAP4K5들의 발현이 환자 생존율과 밀접한 상관 관계를 보이는 결과와 Rab8B의 발현 억제에 의해 세포 연접이 증가하고 이동이 제한되는 결과. Yeast two-hybrid screen에서 찾은 여러 STRIPAK 관련 단백질들의 결과들에서 Rab8과 관련된 단백질 네트워크가 특정 암의 성장 및 전이에 관여할 가능성은 매우 보임. 하지만 현재까지 연구 결과로는 응용이나 개발 연구로 발전시키기에는 부족한 단계임. 따라서 추가적인 연구가 필요할 것으로 보임. 특히 Rab8A와 Rab8B가 세포 연접 형성에 있어 정 반대 기능을 한다는 점은 놀라운 발견인데, Rab8B에 대해서는 아주 제한적인 연구 결과만 존재하는데, 이번 연구 결과를 통해 다른 세포생물학자와 종양 생물학자들의 관심을 받게 될 것임.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

이미 기술했듯이 이번 연구에서의 새로운 발견들은 아직 개발이나 임상적 응용을 할 수 있는 단계가 아닌 기초 연구 결과임. 따라서 폭넓은 후속 연구들을 통해서 이번 연구 결과들의 가능성을 더 확인해 보아야 함.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

이번 연구의 핵심 결과는 아직 논문으로 발표하지 않았으므로, 보안이 필요함.

2. 연구기관 자체의 검토결과