Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE
& TECHNOLOGY
Vol. 29, No. 1, 10-18, 2016
http://dx.doi.org/10.5806/AST.2016.29.1.10

Analysis of molecular mechanism of cellular localization of various N-terminal mutants of *Aplysia* PDE4 in HEK293T cells

Su-Min Um[1,#], Yong-Woo Jun[2,#], Kun-Hyung Kim[2], Jin-A Lee[3,★], and Deok-Jin Jang[1,2,★]

[1]*Department of Applied Biology, Sangju-si, Gyeongsangbuk-do 37224, Korea*
[2]*Ecological Science, College of Ecology and Environment, Kyungpook National University, Sangju-si, Gyeongsangbuk-do 37224 Korea*
[3]*Department of Biological Science and Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Daejeon 34054, Korea*

(Received September 18, 2015; Revised October 21, 2015; Accepted October 26, 2015)

ApPDE4 long-form의 N-말단 돌연변이체들의 세포내 타기팅과 타기팅 기전 분석

엄수민[1,#] · 전용우[2,#] · 김건형[2] · 이진아[3,★] · 장덕진[1,2,★]

[1]경북대학교 생태환경대학 생물응용전공, [2]생태과학과
[3]한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템과학과

(2016. 9. 18. 접수, 2015. 10. 21. 수정, 2015. 10. 26. 승인)

Abstract: Phosphodiesterase (PDE) plays an important role in cAMP-mediated signaling within cells. We previously showed that the long-form of *Aplysia* PDE4 (ApPDE4) was localized in the plasma membrane and the presynaptic terminal in *Aplysia* sensory neurons, and the 16 N-terminal amino acid was sufficient for this targeting process. In this study, we characterized the cellular localization of various ApPDE4 mutants. We first identified the roles of each amino acid within the group of 16 N-terminal amino acids of long-form ApPDE4. As a result, we were able to identify various mutants that were localized to both the plasma membrane and the Golgi complex, Golgi only, or both the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi complex. To examine the role of palmitoylation on the cellular localization of ApPDE4 mutants, 2-bromo palmitate (2-BR) was used as a treatment. As a result, in the presence of 2-BR, the plasma membrane targeting of many mutants was impaired, indicating that palmitoylation was involved in the plasma membrane targeting of the mutants. We also found that PI4P play crucial roles in the Golgi targeting of (N16,C3S/VV/G)-mRFP, L(N16,C3S/LFS/R)-mRFP, and L(N16,EPL/R)-mRFP.

요 약: Phosphodiesterase(PDE)는 세포내에서 cAMP를 분해하는 효소로 세포의 신호 전달에 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 왔다. 이전의 연구를 통해 군소에서 클로닝된 PDE4 long-form의 N-말단에

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)54-530-1213 Fax : +82-(0)54-530-1218
E-mail : djangdj@knu.ac.kr
#이 저자들은 본 논문에 동등하게 기여했음.

위치하는 16 개 아미노산만으로 충분히 원형질막에 타기팅됨을 알 수 있었다. 본 연구에서는 ApPDE4의 N-말단 16 개(L(N16))를 주형으로 해서 9-11번째와 15번째 아미노산들(RHW-C)을 무작위적으로 아마노산에 돌연변이를 주어서 세포내 타기팅에 미치는 영향을 분석해 보았다. 본 연구를 통해 원형질막과 골지체로 타기팅되는 돌연변이체들과 골지체로만 타기팅되는 돌연변이체들과, 소포체와 골지체로 동시에 타기팅되는 돌연변이체들과, 세포질에만 위치하는 돌연변이체들을 얻을 수 있었다. 또한, 이러한 타기팅에 palmitoylation이 영향을 주는지 확인하기 위해 palmitoylation 억제제인 2-BR을 처리해보니 대부분의 돌연변이체에서 원형질막 타기팅이 사라지는 것을 확인하였다. 이를통해 palmitoylation이 ApPDE4 돌연변이체들의 원형질막 타기팅에 중요하다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한, 이들 돌연변이체들중 골지체로만 타기팅되는 L(N16,C3S/VV/G)-mRFP와 L(N16,C3S/LFS/R)-mRFP와 L(N16,EPL/R)-mRFP들의 경우는 골지체 타기팅에 인지질 중에 하나인 PI4P가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

Key words: Aplysia, phosphodiesteras 4, plasma membrane, Golgi complex, PI4P, palmitoylation

1. 서 론

Phosphodiesterase (PDE)는 세포내에서 cAMP를 분해하는 효소로, 세포내 중요한 신호경로인 cAMP 신호전달경로에서 신호를 조절시키는 중요한 역할을 수행하고 있고, 이러한 신호조절을 통해 학습과 기억과 같은 다양한 생물학적 기능에 중요한 작용을 한다고 알려져 있다.[1-3] PDE는 기질의 종류와 결합성에 따라 PDE1-11로 구별되며, cAMP만을 선택적으로 분해하는 PDE4 약 20 개의 변이체가 선택적 접합 과정을 통해 A, B, C, D의 네 가지로 구별되어 발현된다고 알려져 있다. PDE4는 구조에 따라 long-form, short-form, supershort-form으로 구별된다. Long-form의 경우는 N-말단과 UCR1, UCR2, PDE활성 부위를 모두 포함하고, short-form의 경우는 특이적 N-말단과 UCR2, PDE활성 부위를, supershort-form의 경우는 특이적 N-말단과 PDE활성 부위만을 포함한다.잇본 연구실의 이전 연구를 통해 바다 달팽이인 군소(*Aplysia*)에서 supershort-form, short-form, long-form등 세 종류의 PDE4를 클로닝하였다.[4-7] 또한, 이들이 군소의 아가미 수축 반사에서 보여주는 세로토닌(5-HT)에 의한 감각뉴런과 운동뉴런사이의 시냅스촉진화(synaptic facilitation)에 관여한다는 사실을 확인하였다.[4-6] 군소에서 ApPDE4의 knock-down은 5-HT에 의해 유도되는 시냅스촉진화를 억제하는 것을 발견하였고, ApPDE4 supershort-form의 과발현은 depressed-synapse의 시냅스촉진화를 억제하지 못하고, non-depressed synapse의 시냅스 촉진화를 억제하는 것을 확인하였다.[5,6]

또한, 군소에서 클로닝된 세 종류의 ApPDE4는 세포 내에서 서로 다른 세포 내 타기팅을 보였다.[4] Long-form의 경우는 원형질막과 군소의 신경세포에서는 presynaptic terminal에 타기팅된다고 보고되었고, short-form의 경우는 원형질막에만 타기팅됨을 확인하였다.[6] 반면, supershort-form은 세포기질에 위치함을 확인할 수 있었다. ApPDE4의 타기팅되는 분자기전을 확인해본 결과 long-from의 경우는 N-말단에 존재하는 소수성 아미노산들의 소수성 상호작용으로 통해 원형질막에 타기팅되고, palmitoylation이 될 수도 있음을 확인하였다.[4] Short-form의 경우는 N-말단에 존재하는 소수성 부위가 세포막과의 결합에 영향을 주고, 인접부위의 염기성 아미노산들이 원형질막의 음성전하와 정전기적인 상호작용으로 원형질막에 타기팅되게하고, UCR1과 UCR2의 결합이 이러한 원형질막 타기팅을 향상시키는 것을 알게 되었다.[8] ApPDE4의 long-form의 경우는 결실돌연변이(deletion mutant)를 제작하여 조사한 결과 N-말단에 존재하는 13-16 개의 아미노산만으로도 충분히 원형질막으로 타기팅됨을 알 수 있었다.[8] ApPDE4 N-말단의 서열을 분석해 보면 막통과부위는 존재하지 않으며, 대신 N-말단의 아미노산 4-13번(MSCL$_4$LPAIRHWIS$_{13}$CCM)은 양친매성 부위임을 확인할 수 있었고, 중간에 알파나선구조를 끊는 프롤린(P)이 있어 MSCLL과 PAIRHWISCCM의 두 개의 도메인으로 구분될 가능성을 발견했다. 두 번째 도메인은 P-hy-hy-X-X-WI (hy는 소수성아미노산, X는 소수성이거나 염기성 아미노산)의 consensus 서열을 갖고 있는 것으로 생각되었다.[8] 이 두 도메인은 세포막에 결합하는데 관여하고, 그 뒤쪽에 존재하는 SCCM 도메인은 세포내 특정소기관 막타기팅에 중요하다고 생각되어진다. 그러나, 각각의 아미노산들의 그 정확한 역할을 아직 잘 연구되지 않았다.

세포내 막성세포소기관을 구성하는 막성분은 세포

소기관에 따라 다른 분포 양상을 보인다. 그 중 phosphoinositide (PI)는 세포내에 적은 양이 발현됨에도 불구하고, 많은 종류의 단백질의 타기팅에 중요한 역할을 수행한다.[9,10] 예를 들어, PI에 속하는 PI(4,5)P_2와 PI(3,4,5)P_3는 원형질막의 세포질 표면에 주로 분포하고, 이들과 결합하는 단백질의 원형질막 타기팅을 유도하며, 이들로 인해 원형질막의 안쪽 막의 전하를 강한 음전하로 만들어준다.[8,11] 이를 통해 많은 양전하를 띄는 단백질의 원형질막 타기팅을 유도한다. 본 연구실에서 연구한 ApPDE4 short-form의 경우도 이런 정전기적인 상호작용을 통해 원형질막에 타기팅됨을 확인할 수 있었다.[8] 또한, PI4P는 골지체와 원형질막에 주로 분포하고 있고, PI4P에 결합하는 많은 단백질들은 골지체에 타기팅이 된다.[12-14] PI3P는 early endosome (EE)과 autophagosome에 주로 분포하고, 특히 autophagosome 형성에 중요한 역할을 한다.[10,15] 따라서, 이러한 선택적인 PI에 결합하는 단백질은 선택적으로 특정 세포소기관 막에 분포하게 된다.

본 연구에서는 ApPDE4 long-form의 N-말단 16 개를 주형으로 해서 9-11번째와 15번째 아미노산들(RHW-C)을 무작위적으로 아마노산에 돌연변이를 주어서 세포내 타기팅에 미치는 영향을 분석해 보았다. 또한 이러한 타기팅에 palmitoylation이 영향을 주는지 확인하기 위해 palmitoylation 억제제인 2-bromo palmitate (2-BR)를 처리에 타기팅에 변화가 있는지 확인해 보았다. 이를 통해 다양한 돌연변이체의 아미노산 서열과 세포내 타기팅을 분석하여 종합할 수 있었다(*Table* 1). 특히, 골지체로만 타기팅되는 돌연변이체들의 경우는 PI4P결합에 의해 타기팅될 수 있음을 확인하였다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. DNA 제작

이전에 보고한 pcDNA3.1-ApPDE4(N16)-EGFP를 XbaI/ApaI으로 절단하고, mRFP-XbaI-S/mRFP-ApaI-A 프라이머를 이용한 PCR을 통해 얻은 mRFP를 XbaI/ApaI으로 절단하고 삽입하여 pcDNA3.1-ApPDE4 L(16)-mRFP를 제작하였다.[4] 다른 돌연변이는 degenerate primer를 이용하고, PCR법을 활용해 무작위적으로 제작하였고(*Table* 2), 실험 후에 염기서열을 결정하였다. 골지체 마커인 GalT-EGFP와 소포체 마커인 Sec61-EGFP과 미토콘드리아 마커인 AKAP-EGFP는 이전 논문에 언급되었다.[8]

Table 1. Summary of amino acid sequences and intracellular targeting of various L(N16) mutants. PM, plasma membrane; ER, endoplasmic reticulum; Go, Golgi complex; MT(m), mitochondria outer membrane; EE, early endosome; LE, late endosome; Cy, cytosol

Name	Sequence	-2BR	+2BR
1. Targeting: PM+Go -> ER+Go			
L(N16,IP/R)	MSCLLPAI**IP**WIS**R**CM	PM+Go	ER+Go
L(N16,KLS/S)	MSCLLPAI**KLS**IS**S**CM	PM+Go	ER+Go
L(N16,S/VC)	MS**S**LLPAI**VC**WISCCM	PM+Go	ER+Go
2. Targeting: PM+Go -> ER+ MT(m)			
L(N16,IYR)	MSCLLPAI**IYR**ISCCM	PM+Go	MT(m)+EE+LE
L(N16,E/R)	MSCLLPAI**E**HWIS**R**CM	PM+Go	ER+MT(m)
3. Targeting: PM+Go -> Cy			
L(N16,PRA)	MSCLLPAI**PRA**ISCCM	PM+Go	Cy
4. Targeting: Go -> Cy			
L(N16,EPL/R)	MSCLLPAI**EPL**IS**R**CM	Go	Cy
L(N16,S/LFS/R)	MS**S**LLPAI**LFS**IS**R**CM	Go	Cy
L(N16,S/VHV/G)	MS**S**LLPAI**VHV**IS**G**CM	Go	Cy
5. Targeting: ER+Go -> ER+Go			
L(N16,VYV)	MSCLLPAI**VYV**ISCCM	ER+Go	ER+Go
6. Targeting: Cy -> Cy			
L(N16,S/VLP)	MS**S**LLPAI**VLP**ISCCM	Cy	Cy
L(N16,ESP/R)	MSCLLPAI**ESP**IS**R**CM	Cy	Cy
L(N16,ARA/R)	MSCLLPAI**ARA**IS**R**CM	Cy	Cy
L(N16,TA/S)	MSCLLPAI**T**H**A**IS**S**CM	Cy	Cy

Table 2. List of oligonucleotides and their sequences

Name	Sequence
1. ApPDE4 primers	
ApPDE4-D3-S	5'-CGCCCAAGCTTGCCACCACCATGTCTTGCTTGCTTCCC-3'
ApPDE4(N16)-XbaI-A	5'-GCTCTAGACATACAGCAGCTTATCCA-3'
2. mRFP primers	
mRFP-XbaI-S	5'-GCTCTAGAATGGCCTCCTCCGAGGAC-3'
mRFP-ApaI-A	5'-CGTAGGGCCCTTAGGCGCCGGTGGAGTG-3'
3. degenerate primer of ApPDE4 mutants	
ApPDE4-vMT-XbaI-A	5'-GCTCTAGACATACAGCNGCTTATCVVGNRTNBAATAGC-3' *code letter: N(=A, C, G, T), V(A, C, G), R(A, G), B(C, G, T)

2.2. 세포 배양 및 DNA transfection

HEK293T 세포는 10 % FBS + Penicillin/streptomycin + DMEM 배양액에서 37 ºC (w/5 % CO_2) 세포 배양기를 이용해 배양하였다. DNA transfection을 위해 HEK cell을 4 well chamber로 옮기고 Ca^{2+}-phosphate법을 이용해 Transfection을 수행하고 다음날, 공초점 현미경 (Carl Zeiss)을 이용해 영상을 획득하였다.

2.3. 시약

Antimycin A (Sigma)는 PBS에 200 nM을 녹여 40분간 처리하였고, PAO (sigma)은 DMEM+10 % FBS에 10 μM를 녹여 30분간 처리하였다. 2-BR (Sigma)는 100 μM를 DMEM에 녹여 5시간이상 처리하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. ApPDE4 long-form의 N-말단 16개 아미노산의 돌연변이들의 세포내 타기팅

바다달팽이인 군소(*Aplysia*)에서 클로닝된 APPDE4 long-form은 N-말단의 최소 13 개의 아미노산만으로도 원형질막에 타기팅되며, 16 개의 아미노산으로는 wild-type (WT)과 거의 유사한 타기팅이 보인다는 것을 최근의 연구를 통해 보고하였다.[4,8] 그러나, 이들의 세포내 타기팅에 N-말단내의 각각의 아미노산들이 어떤 역할을 수행하는지에 대해선 알려진 바가 없다. 이를 연구하기 위해 ApPDE4 long-form의 N-말단의 16 개 아미노산서열 (MSCLLPAI**RHW**IS**C**CM)을 구성하는 아미노산중에 9-11번째 위치한 RHW와 14번에 위치한 시스테인(C) 자리에 PCR법을 이용해 무위적으로 다양한 돌연변이를 유도하고 mRFP를 융합시켜 돌연변이체를 만들고, 이들을 세포내 발현을 시켜 보았다.

ApPDE4 long-form의 N-말단 16 개의 아미노산을 mRFP와 결합시킨 L(N16)-mRFP는 세포내 원형질막과 EE와 late endosome (LE)에 타기팅됨을 확인하였다 (*Fig.* 1A).[8] 반면, L(N16,IYR)-mRFP와 L(N16, PRA)-mRFP와 L(N16,E/R)-mRFP와 L(N16,IP/R)-mRFP와 L(N16,KLS/S)- mRFP는 원형질막과 골지체에 타기팅됨을 확인하였다(*Fig.* 1A와 3A). 그 중, L(N16,E/R)-mRFP와 L(N16,IP/R)-mRFP는 비교적 강하게 원형질막과 골지체에 타기팅되고, L(N16,IYR)-mRFP와 L(N16,PRA)-mRFP와 L(N16,KLS/S)-mRFP의 경우는 세포질에도 일부 존재함을 확인하였다(*Fig.* 1A). 이러한 타기팅은 *Fig.* 1B에서 보여지듯이 L(N20,AA)-mRFP에서 보여지는 타기팅 결과와 유사함을 확인하였다. 반면, L(N16,EPL/R)-mRFP의 경우는 골지체에만 존재하고, 원형질막 타기팅은 사라진 것을 확인할 수 있었다(*Fig.* 1A와 3B). L(N16,VYV)-mRFP의 경우는 소포체와 골지체로 타기팅되고, 원형질막 타기팅은 없음을 확인할 수 있었다(*Fig.* 1A와 3C).

Palmitoylation이 돌연변이체들의 타기팅에 영향을 주는지 확인하기 위해 2-BR을 처리해주었다. L(N16)-mRFP의 경우는 2-BR처리 전후에 차이가 없었다(*Fig.* 1A). L(N16,PRA)-mRFP와 L(N16,EPL/R)-mRFP의 경우는 원형질막 타기팅이 사라짐을 확인할 수 있었다. 반면, L(N16,IP/R)-mRFP, L(N16,KLS/S)-mRFP는 2-BR처리에 의해 골지체타기팅은 유지되고, 원형질막 타기팅이 사라지고 소포체 타기팅이 생기는 것을 확인하였다(*Fig.* 1A와 3C). 이와 유사하게 L(N20,AA)-mRFP의 경우도 2-BR처리에 의해 원형질막 타기팅이 사라지고, 골지체 타기팅은 어느 정도 남아 있는 것을 확인하였다(*Fig.* 1B). L(N16, IYR)-mRFP와 L(N16,E/R)-mRFP는 2-BR처리에 의해 원형질막과 골지체타기

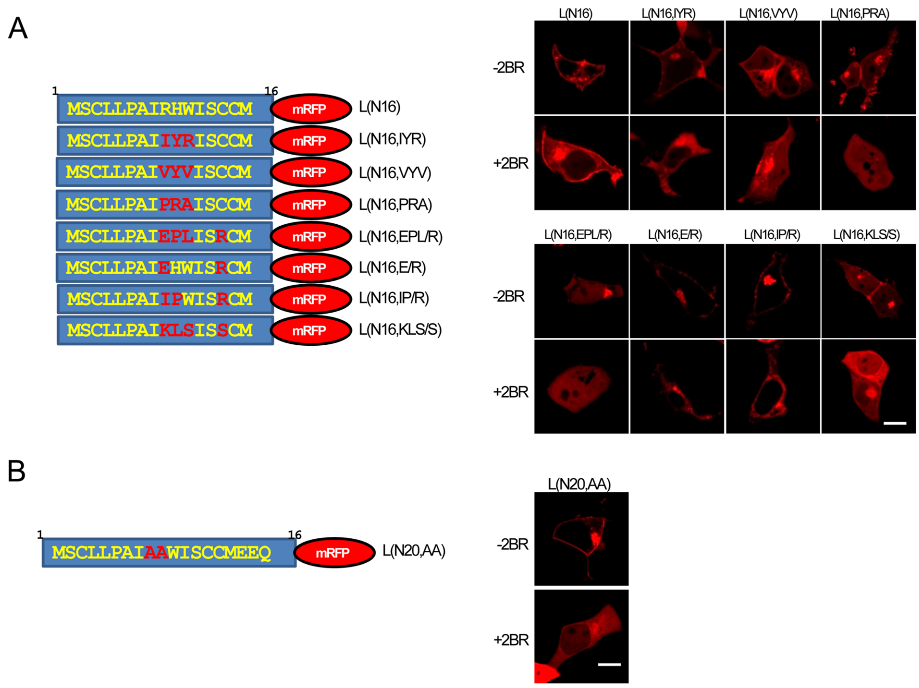

Fig. 1. Cellular localization of various mutants of L(N16) in HEK293T cells. (A) Schematic diagrams (left) and cellular localization (right) of various mutants of L(N16)-mRFP in the absence (2-BR) or presence of 2-BR (+2-BR) (B) Schematic diagrams (left) and cellular localization (right) of L(N20,AA)-mRFP in the absence (2-BR) or presence of 2-BR (+2-BR). Scale bar, 20 μm.

팅이 사라지고, 미토콘드리아 외막에 타기팅됨을 확인할 수 있었다(*Fig.* 1A와 3D).

3.2. L(N16,C3S)의 N-말단 16개 아미노산의 돌연변이들의 세포내 타기팅

이전의 연구에서 14, 15번째 시스테인(C)이 세린(S)으로 치환된 돌연변이인 L(N20,C14,15S)-mRFP의 경우 골지체로만 타기팅되고, 2-BR처리에 의해 소포체/골지체로 타기팅이 변화되는 것을 확인하였다.[4] 이를 통해 세번째 시스테인은 palmtioylation이 될 수도 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 따라서, 이번 연구에서는 세번째 시스테인(C)을 세린(S)으로 치환한 돌연변이체인 L(N16,C3S)를 바탕으로하고 앞쪽에서 수행한 연구와 같은 방법으로 다양한 돌연변이를 유도해 보았다.

우선, L(N16,C3S)-mRFP는 L(N16)-mRFP와 마찬가지로 원형질막과 세포내 소기관에 타기팅되는 것을 확인하였다(*Fig.* 2A). 2BR 처리에 의해서는 원형질막 타기팅은 사라지고, 일부 세포내 타기팅이 남는 것을 확인하였다. 반면, L(N16,C3S/VV/G)-mRFP와 L(N16,C3S/LFS/R)-mRFP는 골지체로만 타기팅이 이루어지는 것을 확인할 수 있고, 2-BR처리에 의해 골지체타기팅이 사라짐을 확인할 수 있었다. 그 중 L(N16,C3S/LFS/R)-mRFP는 약하게 미토콘드리아로 타기팅되는 것을 확인할 수 있었다. L(N16,C3S/VC)-mRFP는 약하게 원형질막에 타기팅되고, 골지체에도 타기팅되었다(*Fig.* 2A). 2-BR처리에 의해 대부분의 돌연변이체에서 원형질막 타기팅이 사라지고 소포체와 골지체 타기팅이 되는 것을 확인할 수 있었다. 이전의 연구에서처럼 L(N20,C3,14S)-EGFP는 골지체로만 타기팅되는 것을 확인할 수 있었고, 이 경우는 2-BR처리에 의해 골지체타기팅에 영향이 없음을 확인할 수 있었다(*Fig.* 2B).

2-BR처리를 통해 확인할 수 있는 사실은 원형질막에 타기팅되는 것은 주로 palmitoylation에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 대부분의 경우 2-BR처리에 의해 원형질막 타기팅이 사라지기 때문이다. 또한, C3S의 돌연변이체들의 경우 3번째와 14번째 시스테인이 치환된 경우 원형질막 타기팅이 현저히 줄어든 것으로 보아서, 3번째, 14번째 시스테인의 palmitoylation이

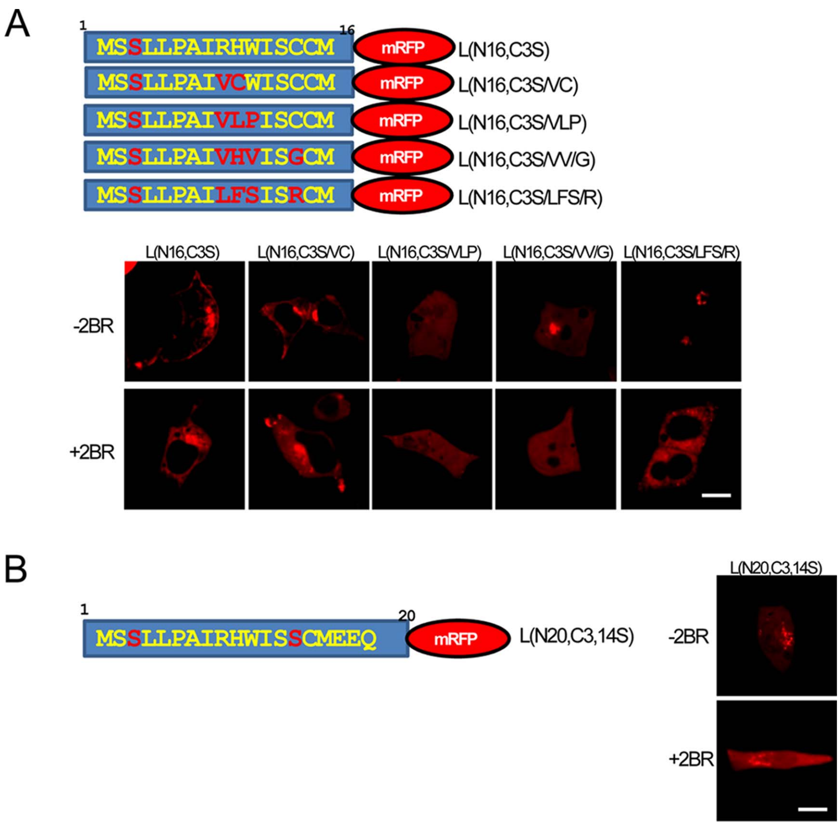

Fig. 2. Cellular localization of various mutants of ApPDE4 L(N16,S) and their effects on cell morphology in HEK293T cells. (A) Schematic diagrams (left) and cellular localization (right) of various mutants of ApPDE4 L(N16,C3S)-mRFP in the absence (2-BR) or presence of 2-BR (+2-BR). (B) Schematic diagrams (left) and cellular localization (right) of ApPDE4 L(N20,C3,14S)-mRFP in the absence (2-BR) or presence of 2-BR (+2-BR). Scale bar, 20 μm.

ApPDE4 long-form의 다양한 돌연변이체들의 원형질막 타기팅에 중요한 것을 확인할 수 있었다.

원형질막 타기팅에는 palmitoylation 뿐만이 아니라, 소수성, 염기성 정도도 중요한 것으로 생각되어진다. RH가 AA로 치환된 L(N20,AA)-mRFP보다 좀더 소수성을 가지는 L(N16/VYV)-mRFP의 경우는 원형질막 타기팅이 사라지고 소포체 타기팅이 나타난다. 또한 여러 돌연변이체들중 약한 소수성이거나 염기성 아미노산으로 치환되는 경우는 대체적으로 원형질막 타기팅이 나타났다. 세포막에서 소포체는 가장 전하를 띄지 않으며, 원형질막은 가장 음전하를 띄고 있다고 알려지고 있는데, 본 연구의 결과도 전하를 띄거나 약한 소수성을 띄는 경우는 원형질막에 타기팅되고, 소수성이 큰 경우인 L(N16,VYV)-mRFP는 소포체로 타기팅되는 사실은 이 사실과 부합한다고 볼 수 있다.

본 연구를 통해 만들어진 다양한 돌연변이체중 L(N16,C3S/VV/G)-mRFP와 L(N16,C3S/LFS/R)-mRFP와 L(N16,EPL/R)-mRFP의 경우는 골지체로만 타기팅된다. *Fig.* 2B에서 보여지듯이 L(N20,C3,15S)-mRFP의 경우도 골지체로만 타기팅되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 대체로 3번째와 14번째 시스테인이 세린이나 다른 아미노산으로 변하는 것은 골지체 타기팅에 중요한 아미노산 자리로 생각되어지며, 중앙에 위치하는 RHW의 경우는 적정한 소수성이 유지되는 것이 중요한 것으로 생각되어진다. 본 연구를 통해 알 수 있었던 사실은 비록 이전의 연구를 통해 ApPDE4 long-from의 N-말단에 3가지의 도메인이 있을 것으로 추정하였지만, 그 내에서 특정 아미노산이 중요하기 보다는 그들 아미노산들의 서열의 합으로 이루어지는 소수성 정도와 전하량 들이 세포내 타기팅에 중요하다고 생각되어진다

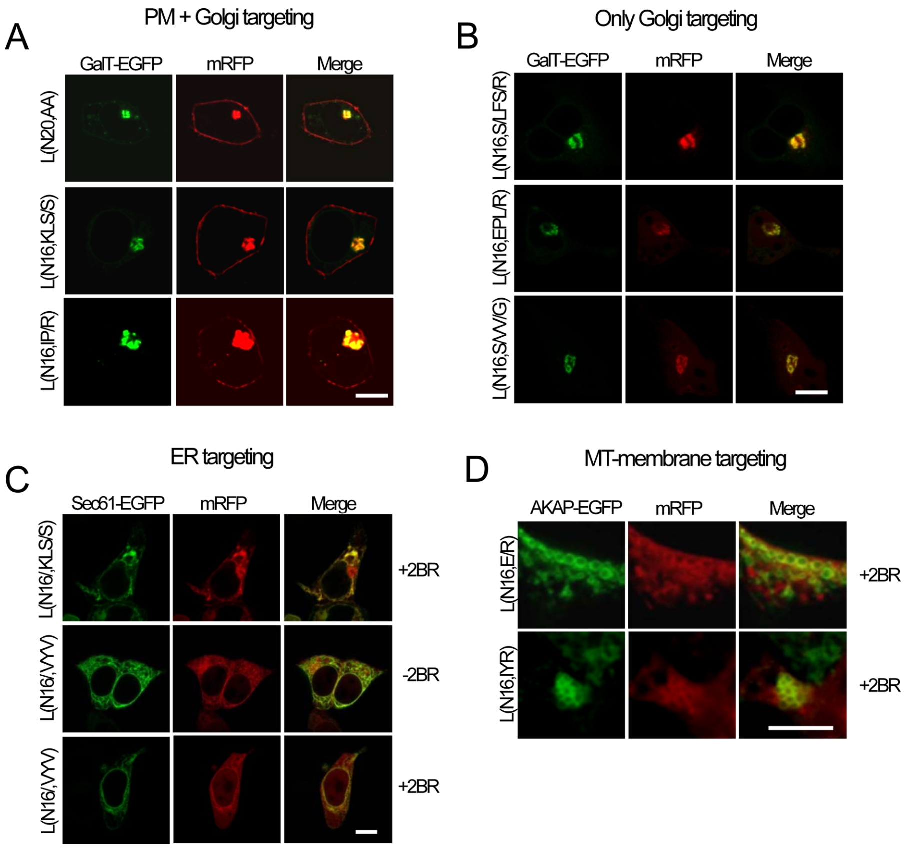

Fig. 3. Identification of intracellular targeting of various ApPDE4 L(N16) mutants. (A) Plasma membrane and Golgi complex targeting of ApPDE4 L(N16) mutants. L(N20,AA)-mRFP, L(N16,KLS/S)-mRFP or L(N16,IP/R)-mRFP was co-expressed with EGFP-GalT in the absence of 2-BR, a TGN marker. (B) Golgi complex targeting of ApPDE4 L(N16) mutants. L(N16,S/LFS/R)-mRFP, L(N16,EPL/R)-mRFP, or L(N16,S/VV/G)-mRFP was co-expressed with EGFP-GalT, a TGN marker in the absence of 2-BR. (C) Endoplasmic reticulum targeting of ApPDE4 L(N16) mutants. L(N16,KLS/S)-mRFP, or L(N16,YVY)-mRFP was co-expressed with Sec61-EGFP, an ER marker in the absence (2-BR) or presence of 2-BR (+2-BR). (D) Mitochondria targeting of ApPDE4 L(N16) mutants. L(N16,E/R)-mRFP, or L(N16,IYR)-mRFP was co-expressed with AKAP1-EGFP, a mitochondria marker in the presence of 2-BR (+2-BR). Scale bar, 20 µm.

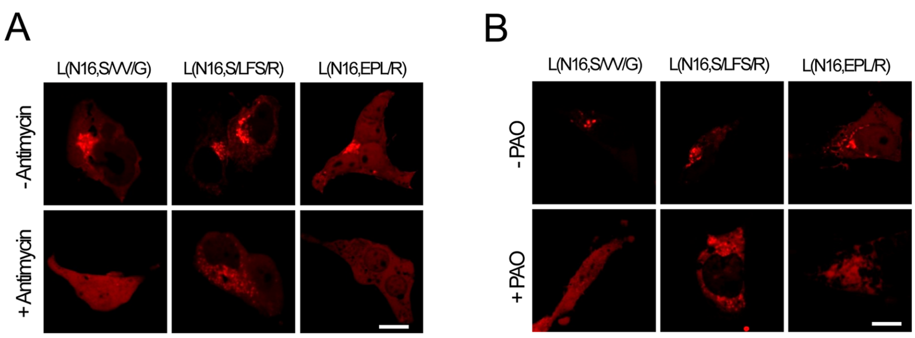

Fig. 4. Golgi complex localization of ApPDE4 L(16) mutants via PI4P binding. (A, B) Effects of PI depletion by antimycin A or PAO on Golgi membrane localization of L(N16,S/VV/G)-mRFP, L(N16,S/LFS/R)-mRFP or L(N16,EPL/R)-mRFP. Images were acquired before and after 200 nM antimycin A treatment for 40 min in PBS or 10 µM PAO treatment for 30 min in DMEM + 10 % FBS. Membrane localization of L(N16,S/VV/G)-mRFP, L(N16,S/LFS/R)-mRFP or L(N16,EPL/R)-mRFP is changed from plasma membrane to cytosol by antimycin A and PAO treatment. Scale bar, 20 µm.

3.3. PI4P 결합에 의해 매개되는 ApPDE4 L(16)의 N-말단 돌연변이체의 골지체 타기팅

본 연구를 통해 만들어진 다양한 돌연변이체들중 L(N16,C3S/VV/G)-mRFPP와 L(N16,C3S/LFS/R)-mRFP와 L(N16,EPL/R)-mRFP의 경우는 골지체로만 타기팅되는 것을 확인하였다. 이들은 어떻게 골지체로 타기팅되는 것일까? 이들의 분자기전을 연구하기 위해 우선은 antimycin A를 처리해 보았다. Antimycin A는 세포내 ATP합성을 억제하는 약물로, 이것을 세포에 처리하면, 세포내에서 PI의 인산화에 의해 발생하는 지질인 PI4P, $PI(4,5)P_2$등이 만들어지지 않는다. 이 antimycin A를 처리해보니 L(N16,C3S/VV/G)-mRFP와 L(N16,C3S/LFS/R)-mRFP와 L(N16,EPL/R)-mRFP 모두 골지체 타기팅이 사라지고, 세포기질에 위치하는 것을 확인할 수 있었다(*Fig.* 4A). 단지 L(N16,C3S/LFS/R)-EGFP의 경우는 골지체가 아닌 다른 dot(미토콘드리아로 확인함)에 타기팅되는 것을 확인하였다.

분자기전을 좀더 조사하기 위해 다른 약물인 PAO를 처리해보았다. 이 약물은 세포내 PI4 인산화효소의 활성을 억제해, 전체적으로 세포내 PI4P의 양을 줄여주는 역할을 한다. PAO를 처리해보니 antimycin A과 마찬가지로(N16,C3S/VV/G)-mRFP와 L(N16,C3S/LFS/R)-mRFP와 L(N16,EPL/R)-mRFP 모두 골지체타기팅이 사라지는 것을 확인할 수 있었다(*Fig.* 4B). 이와 같은 사실은 PI4P가(N16,C3S/VV/G)-mRFP와 L(N16,C3S/LFS/R)-mRFP와 L(N16,EPL/R)-mRFP의 골지체 타기팅에 중요한 역할을 수행한다는 것을 말해준다. 이 펩타이드들이 직접 PI4P에 결합하는지 아니면 다른 단백질이나 분자의 도움을 받는지는 peptide-lipid 결합성 에세이등과 같은 추가 실험이 요구된다. 하지만, 본 연구를 통해 이들의 골지타기팅에 PI4P가 관여한다는 것을 발견한 것은 향후 연구에 중요한 단초를 제공한다.

4. 결 론

본 연구를 통해 ApPDE4 long-form의 N-말단의 16개의 아미노산을 바탕으로 다양한 돌연변이체를 만들어 다양한 세포내타기팅을 보이는 돌연변이체를 제작하였다. 이를 통해 3번째와 14번째 시스테인의 palmitoylation이 ApPDE4 long-form의 다양한 돌연변이체들의 원형질막 타기팅에 중요한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 원형질막 타기팅에는 palmitoylation 뿐만이 아니라, 소수성, 염기성 정도도 중요할 수 있음을 알게 되었다. 돌연변이체들중 전하를 띄거나 약한 소수성을 띄는 아미노산을 가지는 돌연변이체의 경우는 원형질막에 타기팅되고, 소수성이 큰 아미노산으로 구성된 경우는 소포체로 타기팅되는 사실은 확인하였다. 이와 같은 결과는 ApPDE4 long-form의 N-말단에 특정 아미노산이 특정한 세포내 타깃팅에 중요한 것이 아니라, N-말단에 있는 아미노산의 특정 영역이 특정한 세포내 타깃팅을 유도하는 것을 보여주었다. 또한, 골지체로만 타기팅되는 돌연변이체를 찾았고, 이들의 타기팅은 PI4P가 관여할 수 있음을 발견하였다.

감사의 글

본 연구에서 이진아 박사의 연구는 한남대학교 연구비(Hannam Research Program, 2015)로 지원되었습니다.

References

1. Y. S. Lee, C. H. Bailey, E. R. Kandel and B. K. Kaang, *Mol Brain,* **1**(1), 3 (2008).
2. E. R. Kandel, *Mol. Brain,* **5**, 14 (2012).
3. W. Richter, F. S. Menniti, H. T. Zhang and M. Conti, *Expert. Opin. Ther. Targets,* **17**(9), 1011-1027 (2013).
4. D. J. Jang, S. W. Park, J. A. Lee, C. Lee, Y. S. Chae, H. Park, M. J. Kim, S. L. Choi, N. Lee, H. Kim and B. K. Kaang, *Learn. Mem.,* **17**(9), 469-479 (2010).
5. D. J. Jang, J. A. Lee, Y. S. Chae and B. K. Kaang, *Mol. Cells,* **31**(2), 175-180 (2011).
6. H. Park, J. A. Lee, C. Lee, M. J. Kim, D. J. Chang, H. Kim, S. H. Lee, Y. S. Lee and B. K. Kaang, *J. Neurosci.,* **25**(39), 9037-9045 (2005).
7. D. J. Jang, H. F. Kim, J. H. Sim, C. S. Lim and B. K. Kaang, *Exp. Neurobiol.,* **24**(3), 246-251 (2015).
8. K. H. Kim, Y. W. Jun, Y. Park, J. A. Lee, B. C. Suh, C. S. Lim, Y. S. Lee, B. K. Kaang and D. J. Jang, *J. Biol. Chem.,* **289**(37), 25797-25811 (2014).
9. G. Di Paolo and P. De Camilli, *Nature,* **443**(7112), 651-657 (2006).
10. D. J. Jang, S. W. Park and B. K. Kaang, *BMB Rep.,* **42**(1), 1-5 (2009).
11. Y. W. Jun, S. Kim, K. H. Kim, J. A. Lee, C. S. Lim, I. Chang, B. C. Suh, B. K. Kaang and D. J. Jang, *Lipids,* **50**(4), 427-436 (2015).

12. A. Godi, A. Di Campli, A. Konstantakopoulos, G. Di Tullio, D. R. Alessi, G. S. Kular, T. Daniele, P. Marra, J. M. Lucocq and M. A. De Matteis, *Nat. Cell. Biol.,* **6**(5), 393-404 (2004).
13. T. P. Levine and S. Munro, *Curr. Biol.,* **12**(9), 695-704 (2002).
14. A. Roy and T. P. Levine, *J. Biol. Chem.,* **279**(43), 44683-44689 (2004).
15. K. M. Lee, S. K. Hwang and J. A. Lee, *Exp. Neurobiol.,* **22**(3), 133-142 (2013).