Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE
& TECHNOLOGY
Vol. 31, No. 5, 208-218, 2018
https://doi.org/10.5806/AST.2018.31.5.208

Ultrastructural analysis and quantification of autophagic vacuoles in wild-type and *atg5* knockout mouse embryonic fibroblast cells

Suin Choi[1,2], Pureum Jeon[2], Yang Hoon Huh[1,★], and Jin-A Lee[2,★]
[1]*Electron Microscopy Research Center, Korea Basic Science Institute, Ochang, Korea*
[2]*Department of Biological Sciences and Biotechnology, College of Life Sciences and Nanotechnology, Hannam University, Daejeon, Korea*
(Received September 11, 2018; Revised October 8, 2018; Accepted October 10, 2018)

정상 및 *atg5* 유전자 제거 섬유아세포에서 자가포식체의 미세구조 및 이들의 정량적 분석

최수인[1,2] • 전푸름[2] • 허양훈[1,★] • 이진아[2,★]
[1]한국기초과학지원연구원 전자현미경연구부,
[2]한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템 과학과
(2018. 9. 11. 접수, 2018. 10. 8. 수정, 2018. 10. 10. 승인)

Abstract: Autophagy is a cellular process whereby cytosolic materials or organelles are taken up in a double-membrane vesicle structure known as an autophagosome and transported into a lysosome for degradation. Although autophagy has been studied at the genetic, cellular, or biochemical level, systematic ultrastructural quantitative analysis of autophagosomes during the autophagy process by using transmission electron microscopy (TEM) has not yet been reported. In this study, we performed ultrastructural analysis of autophagosomes in wild-type (WT) mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and autophagy essential gene (atg5) knockout (KO) MEFs. First, we performed ultrastructural analysis of autophagosomes in WT MEFs compared to atg5 KO MEFs in basal autophagy or starvation-induced autophagy. Although we observed phagopore, early, late autophagosomes, or autolysosomes in WT MEFs, atg5 KO MEFs had immature autophagosomes that showed incomplete closure. Upon starvation, late autophagosomes accumulated in WT MEFs while the number of immature autophagosomes significantly increased in atg5 KO MEF indicating that atg5 plays an important role in the maturation of autophagosomes. Next, we examined autophagosomes in the cell model expressing polyQ-expanded N-terminal fragment of huntingtin. Our TEM analysis indicates that the number of late autophagosomes was significantly increased in the cells expressing the mutant huntingtin, indicating that improving the fusion of autophagosome with lysosome may be effective to enhance autophagy for the treatment of Huntington's disease. Taken together,

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)43-240-5441 Fax : +82-(0)42-865-3939
E-mail : hyh1127@kbsi.re.kr
Phone : +82-(0)42-629-8785; Fax : +82-(0)42-629-8769
E-mail : leeja@hnu.kr

the results of our study indicate that ultrastructural and quantitative analysis of autophagosomes using TEM can be applied to various human cellular disease models, and that they will provide an important insight for cellular pathogenesis of human diseases associated with autophagy.

요 약: 자가소화작용은 세포 내 물질들을 이중막 구조의 자가포식체를 형성하여 라이소좀(lysosome)과 융합한 후 이들을 분해시키는 과정이다. 자가소화작용은 유전적, 세포적, 생화학 수준에서 연구가 진행되어왔지만, 자가포식체의 미세구조 분석 및 정량적 분석은 체계적으로 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 먼저, 기초 자가소화작용이 진행되는 환경과 기아상태로 자가소화작용을 유도한 환경의 세포에서 각각 자가포식체 막 형성에 중요한 역할을 하는 ATG5가 결핍된 섬유아세포와 정상 섬유아세포에서의 자가포식체의 미세구조를 비교 관찰 하였다. 정상 섬유아세포에서는 초기 패고포어, 초기 및 후기 자가포식체, 오토라이소좀과 같은 자가포식체의 단계별 미세구조를 확인한 반면, ATG5가 제거된 섬유아세포에서는 이중막 구조가 완성되지 않은 자가포식체 구조가 증가한 것을 확인하여 ATG5가 자가포식체 성숙에 중요한 역할을 함을 다시 한번 검증할 수 있었다. 본 연구를 통해 구축한 자가포식체 미세구조 분석법을 활용하여 확장된 폴리글루타민을 가지는 N-말단 헌팅틴 유전자를 발현시키는 헌팅턴병의 세포학적 모델에서 단계별 자가포식체를 분석하였다. 그 결과, 흥미롭게도 헌팅틴 단백질이 발현된 세포에서 후기 자가포식체가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 헌팅틴 돌연변이 단백질 응집체 제거에 필요한 자가소화작용 활성화를 위해서 자가포식체와 라이소좀의 결합 단계를 촉진하는 것이 효과적일 가능성에 대해서 유추할 수 있었다. 결론적으로 전자현미경을 활용한 자가포식체의 단계별 미세구조 관찰 및 정량 분석이 다양한 인간 질병모델에 적용되고, 자가소화작용과 연관된 병리 메커니즘 연구에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

Key words: autophagy, autophagosome, ultrastructure, huntington's disease, transmission electron microscopy (TEM)

1. 서 론

자가소화작용(autophagy)은 손상되거나 불필요한 세포내 물질 및 세포 소기관들을 이중막 구조의 자가포식체(autophagosome)로 감싸 라이소좀(lysosome)과 융합하여 세포내 물질을 분해하는 작용이다. 자가소화작용은 세포내 항상성을 조절하는 대표적인 분해 작용이며, 이들 경로의 잘못된 조절은 퇴행성 뇌질환, 암, 감염질환, 당뇨와 같은 다양한 인간 질병과 연관되어 있다.[1]

자가소화작용의 가장 큰 특징은 자가포식체의 형성과 분해이다. 자가소화작용은 형태학적으로 자가포식체의 초기단계로서 이중막 구조의 패고포어(phagophore) 형성, 자가포식체 완성과 이들과 라이소좀과 결합에 의한 오토라이소좀(autolysosome) 형성 및 분해 단계로 구분할 수 있다. 이러한 자가소화작용은 각 단계별로 핵심적인 역할을 하는 자가소화작용 연관 유전자(ATG, autophagy-related gene)와 여러 단백질들에 의해 조절된다.[2] 자가소화작용은 주로 기아(starvation)상태에서 활성화되는 것으로 가장 많이 연구가 되어왔는데, 자가소화작용 유도는 mTOR (mammalian target of rapamycin)가 억제되면서 시작된다고 알려져 있다.[3] 자가소화작용이 활성화되면 ATG9과 같은 인자들이 ULK(Unc-51-like autophagy activating kinase) 복합체 및 class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) 복합체와 함께 유도되어 패고포어를 형성하는 것으로 시작된다.[4] 패고포어의 막 신장과 자가포식체의 완성에는 ATG5-ATG12 접합 시스템(conjugation system)과 LC3(Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) 접합 시스템이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 먼저, ATG5-ATG12 접합 시스템에서는 ATG7이 ATG12를 활성화시킨 후, ATG12는 ATG5의 라이신(lysine)과 결합한다.[5] LC3 접합 시스템은 ATG4에 의해 잘린 LC3-I의 글라이신(glycine) 부위와 포스포티딜에탄올라민(phosphatidylethanolamine; PE)이 ATG5-ATG12 접합 시스템에 의해 활성화되어 결합한 형태의 LC3-II를 형성하고, 이러한 LC3-II는 자가포식체에 특이적으로 존재하여 자가포식체의 마커 단백질로 이용되고 있다.[6] 이러한 두 접합 시스템에 의해 막이 신장(elongation)되어 완전한 형태의 이중막 구조인 자가

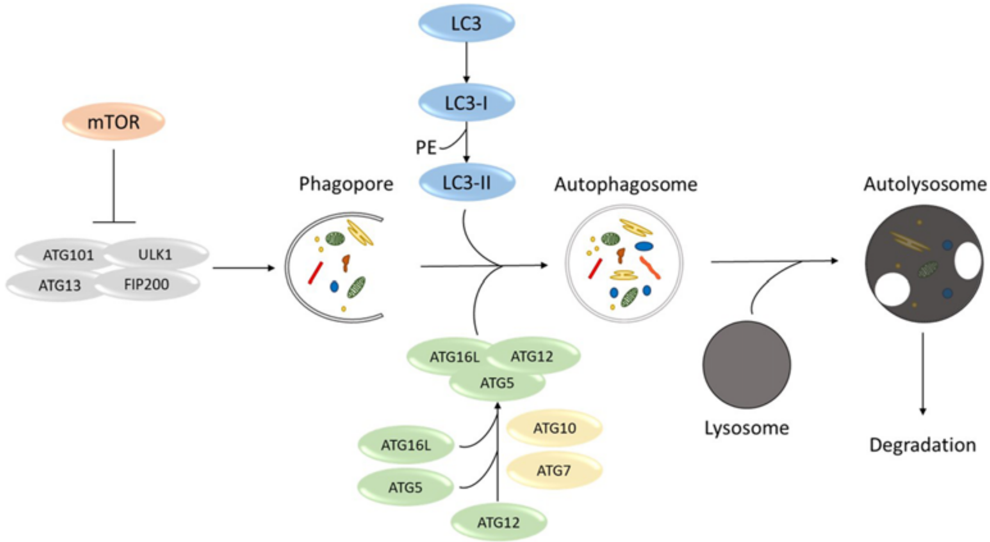

Fig. 1. The cellular process during autophagy process. Autophagic process follows distinct stages: vesicle nucleation (formation of phagophore), vesicle expansion (autophagosome formation), maturation (fusion of autophagosome with MVB (multivesicular body)/lysosome, degradation (acidification). Once autophagy is induced by autophagic stimuli such as inhibition of mTOR leading to recruitment of ULK complex (ATG101-ULK1-ATG13-IP200) on the site of formation of initial isolation membrane, phagophore (isolation membrane) begin to be formed and then cytosolic components are sequestered by autophagosomes characterized by LC3-II-positive double membrane structure. Lysosome can be fused with autophagosome to form autolysosome. In final step, cytosolic components are degraded in autolysosome. The elongation of phagophores requires two ubiquitin-like conjugating systems. 1) ATG12-ATG5-ATG16L system: 2) Phosphatidylethanolamine (PE)-LC3 system: As the other system, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1-LC3, simply LC3), mammalian orthologue of ATG8, is conjugated to PE. Cytosolic form of LC3, LC3-I is generated by cleavage of pro-LC by ATG4B and further processed by ATG7 and ATG3 to be conjugated to PE (LC3-II). LC3-II specifically associates with autophagosome membranes (mTOR, mammalian target of rapamycin; ULK, Unc-51 like autophagy activating kinase; PE, phosphatidylethanolamine).

포식체를 형성한다. 이렇게 형성된 이중막 구조의 자가포식체의 외막과 세포 내 존재하는 라이소좀이 융합하여 오토라이소좀을 형성하고, 자가포식체 막 안쪽에 있는 물질을 분해하게 된다(*Fig.* 1).[2,4,7]

자가소화작용의 과정을 관찰하고 활성을 측정하는 것은 세포 및 조직내 자가소화작용의 역할을 연구하기 위해 매우 중요하다. 자가소화작용을 연구하는 방법으로는 자가소화작용의 활성을 연구하는 방법과 형태를 연구하는 방법이 있다. 자가소화작용 마커가 개발되기 전에는 세포 내에서 자가포식체의 형태를 직접 관찰할 수 있는 전자현미경을 이용한 관찰이 연구방법의 주를 이루었다. 전자현미경을 사용하면 이중막 구조를 가지는 자가포식체의 미세구조 분석이 가능하다. 전자현미경을 사용한 방법이 아닌 자가소화작용을 관찰할 수 있는 다른 방법으로는 LC3의 양을 측정하여 자가포식체의 수를 측정하는 방법이 있다.[8,9] GFP-LC3를 형광현미경으로 관찰하여 형성된 점(puncta)의 수를 측정하거나 세포면역학적 웨스턴블랏(western blot)을 통해 LC3-I이 LC3-II로 전환된 양을 측정하여 자가포식체의 형성 및 활성을 알 수 있다.[8] 또한 자가소화작용의 흐름(flux)을 측정하는 방법이 있는데, 세포면역학적 웨스턴블랏 및 형광현미경분석을 통해 자가소화작용을 억제하는 약물이나, 자가소화작용 유전자의 억제법을 이용하여 LC3나 p62와 같은 자가소화작용의 기질(substrates)이 분해되는 양을 측정한다.[8,9] 이 방법들 중에서 초미세 구조를 확인할 수 있는 가장 좋은 방법은 투과전자현미경으로 자가포식체를 관찰하는 것이다.[10,11]

투과전자현미경(Transmission electron microscopy, TEM)은 세포생물학 연구에서 1940년대 초부터 활용된 중요한 영상(imaging) 기술로서, 세포소기관 및 그 외 특수한 구조 등을 포함하는 거의 모든 세포에서 고해상 구조 분석이 가능하다.[8,12] 투과전자현미경은 세포의 이미지를 자세하게 확인할 수 있는 반면에, 많은 수의 세포에서 데이터 값을 얻기에 제한이 있고, 또한 고정 등의 전처리 과정을 통해 관찰하기 때문에

살아있는 세포를 관찰할 수 없다는 단점이 있다. 하지만 광학현미경을 사용했을 때와는 다르게 투과전자현미경을 사용하게 되면 광학이나 형광현미경이 분석하지 못하는 세포소기관과 구성 분자 등의 미세구조를 관찰할 수 있는 장점이 있다.[8]

자가소화작용은 1950년대부터 투과전자현미경으로 관찰할 수 있었다. 전자현미경은 1990년대초 유전학과 2000년대 형광현미경이 발달할 때까지 자가소화작용을 연구할 수 있는 중요한 도구였다.[12] 1954년 Dr. Rhodin는 mouse kidney epithelial세포에서 미토콘드리아가 막 경계로 둘러싸여있는 구조를 전자현미경으로 관찰하였다. 1960년대 동안에는 다양한 조직의 세포질이 함유된 액포(vacuole)에 대한 연구가 이루어졌다.[12] 1963년에 Dr. de Duve가 세포의 일부분이 세포 자신의 라이소좀 안에서 분해된다는 의미를 가진 자가소화작용(autophagy)라는 용어를 도입하였고, 자가소화액포 막의 범위를 형태학적으로 정의했다. 향후, Dr. de Duve와 공동연구자 Dr. Wattiaux은 수많은 생리적 발달 조건 및 병리적 상황에서 다양한 자가소화작용을 확인했다.[13] Dr. Seglen은 패고포어로 불리는 자가포식체 초기구조인 독특한 소기관을 정의했다. 1990년대에는 효모(yeast, *Saccharomyces cerevisiae*)에서 자가소화작용이 관찰되었고, Dr. Tsukada와 Dr. Ohsumi에 의해 자가소화작용과 연관된 유전자들이 처음으로 발견되었다.[13] Dr. Ohsumi는 자가소화작용을 연구하기 위해 유전적 접근법으로 효모에서 apg (autophagy protein) 돌연변이의 유전학적 분석을 하여 15 개의 상보성 그룹을 밝혔다.[14] 전자현미경 분석을 통해 이 돌연변이들이 자가포식체 형성에서 결함을 일으킨다는 것을 알아냈다. Dr. Klionsky는 전자현미경을 통한 연구에서 Cvt 경로와 자가소화작용의 경로가 거의 일치한다는 것을 밝혔다. 이렇듯 ATG 유전자는 빠른 시간내에 클로닝이 이루어졌고, ATG 유전자가 기능적 단위로 작용한다는 것이 밝혀졌다. Dr. Eskelinen은 전자현미경을 사용하여 동물세포에서 세포 주기를 조절하여 자가소화작용을 연구하여, 자가소화액포(autophagic vacuoles)에 LC3와 Lamp1 단백질이 포함된다는 것을 발견하였고,[15] Lamp1과 Lamp2가 같이 결핍된 경우, 자가소화작용 단백질인 LC3-II가 축적되는 것을 확인하였다.[16]

이처럼 전자현미경을 활용한 자가소화작용의 연구는 60년대부터 시작하여 현재까지 활발하게 사용되고 있으나, 다양한 종류의 세포에서 여러 생리, 병리 환경에서 이들의 형태학적 다양성 및 단계별 초미세구조 분석 및 정량 분석은 매우 부족한 실정이다. 또한, 세포내 존재하는 다양한 구조와 구별하여 여러 형태를 가지는 자가포식체의 미세구조를 관찰하고, 구분하여 정량적으로 분석하는 일은 자가소화작용의 단계별 과정을 이해하는데 매우 중요하다. 이러한 연구는 질병을 가지는 세포나 조직에서 자가포식체의 결여 및 이상, 특정한 형태를 가지는 자가포식체의 축적등을 미세구조적 측면에서 분석하여 질병 세포병리기전을 이해하는데 기여할 수 있을 것이다.

따라서, 본 연구에서는 자가소화작용에서 막 형성에 중요한 역할을 하는 ATG5 유전자가 없는 자가소화작용 결핍 섬유아세포와 정상세포에서의 자가포식체의 미세구조를 비교 분석하여 자가소화작용 단계별로, 다양한 형태의 자가포식체의 미세구조를 관찰하고, 정량화 하고자 하였다. 또한, 이를 바탕으로 대표적인 퇴행성 뇌질환으로 알려진 헌팅턴병과 자가소화작용 연관성 분석을 위해서 확장된 폴리글루타민을 가진 헌팅틴 유전자의 N-말단 돌연변이 단백질을 발현시킨 세포모델에서 자가소화포식체의 미세구조를 분석하고 정량 하였다.

2. 실험방법

2.1. 정상 및 자가소화작용 결핍 섬유아세포 (mouse embryonic fibroblast) 배양

섬유아세포 배양배지에서 정상 및 자가소화작용 결핍 섬유아세포를 37 ºC, 5 % CO_2조건의 항온기에서 배양했다.[17] 계대배양(subculture)은 세포가 배양접시에 80%정도 증식했을 때 진행하였다. 배양접시에 있는 배지를 모두 제거하고 1X DPBS (Dulbecco's modified eagles medium, Gibco, Cat# 14190-144)로 1회 세척 후, trypsin-EDTA(Gibco, Cat# 125200-056)와 물리적 충격을 통해 부양시켰다. 원심분리기(centrifuge)로 세포를 가라앉히고 상등액을 제거 후, 배양접시에 배지와 함께 항온기에서 배양하였다.

배지 조성: FBS (Fetal Bovine Serum, PAN Biotech, Cat# P30-1402), DMEM (Dulbecco's modified eagles medium, Hyclone, Cat# SH30243.01), penicillin/streptomycin (Gibco, Cat# 15140-122), 0.25 % Trypsin-EDTA (Gibco, Cat# 125200-056), 1X DPBS (Gibco, Cat# 14190-144).

2.2. 약물 처리 시간 및 농도

기아(starvation)는 섬유아세포 배양액을 EBSS

(Earle's Balanced Salts, Sigma-Aldrich, Cat# E2888)로 사용하여 3시간동안 처리하였다.

2.3. 전자현미경 샘플 준비

2.3.1. 정상 섬유아세포 및 ATG5 결핍 섬유아세포

섬유아세포 배양접시에서 배지(media)를 제거 후 1X DPBS로 1회 세척한 다음, 2.5% 글루타르알데하이드(Glutaraldehyde, EMS, Cat# 16220)로 전고정(2시간) 하였다. 1X DPBS로 3회 세척 후, 고정된 세포를 배양접시에서 회수하여 원심분리기(centrifuge)로 세포를 모아주었다. 추가로 1% 오스뮴산(O_sO_4, EMS, Cat# 19192)+1.5%페로시아나이드(Ferrocyanide, Sigma, Cat# 14459-95-1)로 후고정을 하고, 에탄올(Ethanol, EMD Millipore, Cat# 64-17-5)과 프로필렌(Propylene oxide, EMS, Cat# 20401)으로 탈수하였다. 탈수된 시료는 Epon 812 mixture (EMS, Cat# 14120)를 이용해 침투 과정을 거친 후 포맷하였다. 중합은 70 °C 오븐(oven)에서 48시간동안 굳혔다. 초박절편(ultrathin section)은 초박편제작기(ultramicrotome, Leica, Germany)로 80 nm로 자르고, 150 mesh 구리 그리드(copper grid, EMS, Cat# G150-Cu)에 절편을 모았다. 2% Uranyl acetate (EMS, Cat No. 22400)로 7분, 0.3% lead citrate (EMS, Cat No. 17800)로 2분 30초간 염색했다. 완성된 시편은 120 kV TEM (JEM-1400Plus, JEOL, Japan, 한국기초과학지원연구원)으로 관찰했다.

2.3.2. HEK 세포(Human embryonic kidney cells) 배양 및 정상 및 돌연변이 헌팅턴 단백질 발현

Nhtt16Q-EGFP, Nhtt150Q-EGFP[18]을 HEK 세포에 DNA plasmid 1 μg을 Ca^{2+} phosphate (12.4 μL)법을 이용하여 transfection하여, 24-48시간 발현하여 HEK 세포를 4% paraformaldehyde 용액으로 고정한다.

2.4. 자가소화작용 단계별 자가포식체 구조의 정량적 분석

자가포식체를 패고포어, 초기 자가포식체1, 초기 자가포식체2, 후기 자가포식체, 오토라이소좀의 단계로 구분하였다. 이 구조들의 수를 세기 위하여 Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij)를 사용하였다. 먼저, Image J 프로그램을 이용하여 이미지에 있는 scale bar로 해당 이미지의 픽셀(pixel) 수를 측정한다. 다음으로 세포에서 핵을 제외한 세포질 부분의 면적을 측정하여 그 면적에 해당하는 픽셀 수를 측정한다. 이후, scale bar의 길이(pixel 수와 μm)를 통하여 구조체의 면적(μm^2)=면적 pixels/[(scale bar pixels/scale bar μm)(scale bar pixels/scale bar μm)]]을 구하여 단위면적당 자가포식체 수를 정량하고자 하였다. 이미지에서 보이는 자가포식체의 단계별 개수를 측정한 뒤, 이를 세포 단위 면적(1 μm^2)당 자가포식체의 수(자가포식체 수/1 μm^2)로 정량 하였다.

3. 결 과

3.1. 마우스 정상 섬유아세포에서 자가소화작용 단계별 미세구조 관찰 및 분석

자가소화작용은 일반적으로 자가포식체 초기구조형태인 패고포어가 형성되고, 이로부터 확장된 패고포어가 자가포식체로 발전하고, 이중막 구조의 자가포식체가 세포질을 싸 닫힌다. 그리고, 라이소좀과 자가포식체의 결합에 의한 오토라이소좀 형성의 단계로 진행된다. 자가포식체의 미세구조 분석을 위해서 먼저, 정상 섬유아세포에서 다양한 형태의 자가포식체 구조를 전자현미경으로 관찰하였다.

정상 섬유아세포에서 관찰한 자가포식체 구조를 좀 더 세밀하게 분석하기 위해서 전자현미경으로 관찰한 자가소화작용 단계별 자가포식체를 패고포어, 초기 자가포식체1, 초기 자가포식체2, 후기 자가포식체, 오토라이소좀, 그리고 다중막구조체(multi lamellar body (MLB))로 나누어 구분하였다(*Fig.* 2A).[19]

먼저, 패고포어는 완성되지 않은 반원 모양의 이중막 구조이면서 그 안쪽으로 세포 내 물질을 싸고 있는 막구조체로 정의하였다.[20] 초기 자가포식체의 구조를 명확하게 분석하기 위하여 두 단계로 나누어 구분하였다. 초기 자가포식체1은 완성된 이중막 구조를 가지고 있으며, 이중막 안으로 아직 분해되지 않아 그 구조를 명확히 구분할 수 있는 세포 내 물질들이 관찰되는 구조체로 구분하였다. 초기 자가포식체2는 초기 자가포식체1과 마찬가지로 이중막이 완성되고, 막 안의 내용물이 보이지만 초기 자가포식체1에 비하여 좀 더 분해가 진행되어 전자밀도가 높이 관찰되는 경우로 구분하였다(*Fig.* 2A, B). 후기 자가포식체는 이중막을 이루고 있으며 막 안의 전자밀도가 초기 자가포식체2에 비해 높아진 구조로서 라이소좀과 결합하기 전의 막구조체로 구분하였다. 오토라이소좀은 자가포식체와 라이소좀이 융합되어 안쪽부터 분해되기 시작하기 때문에 단일막으로 이루어져있고, 막 안쪽의 내용물이 분해되어 세포내 구조물을 확인할 수 없고,

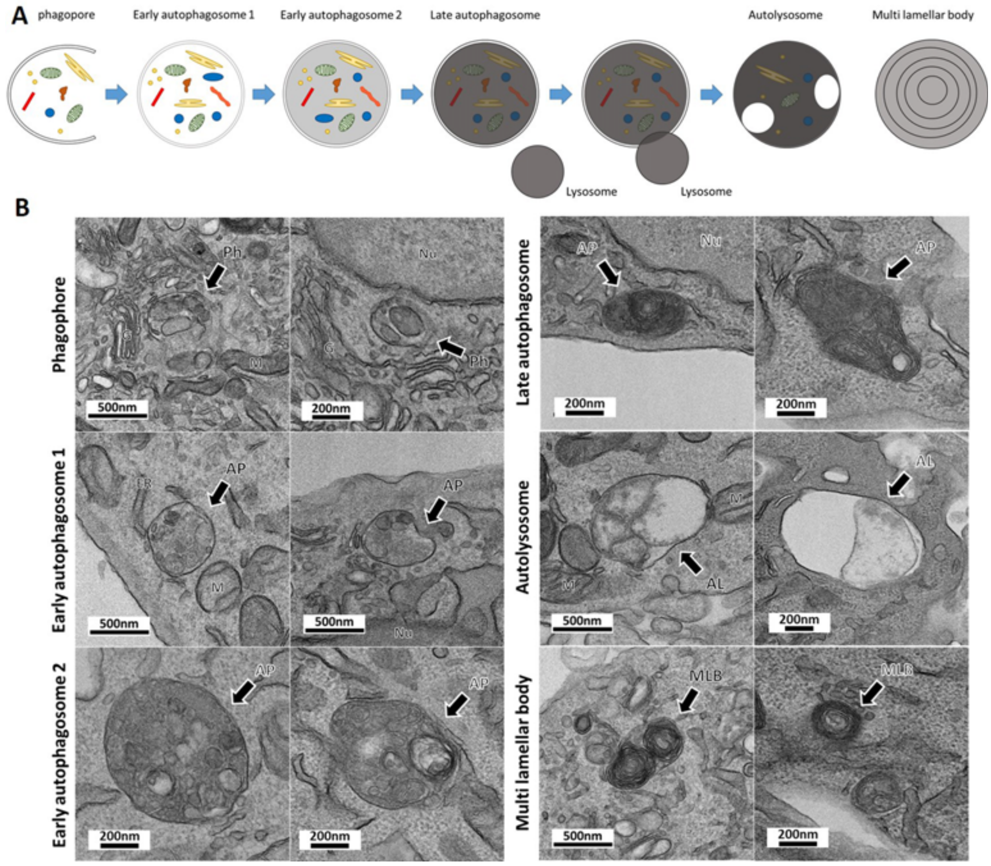

Fig. 2. Illustration and representative TEM images showing the steps of autophagy process in WT MEFs. (A) Illustration of a series of autophagy process in WT MEFs showing key characteristics of phagophore, autophagosome, and autolysosome during autophagy process. (B) Representative TEM images of each autophagy step during autophagy process. phagophore is a forming stage of crescent-shaped incomplete double membrane to enclose fragments of cytoplasmic organelles. In early autophagosome stage, intact thin double membrane formation is completed and the fragments of cytoplasmic organelles which still having their own shape are fully enclosed within the double membrane. In late and dense autophagosome stage, the matrix of each autophagosome is compacted with homogeneous contents having various electron density. Finally, the autolysosome is fused with the lysosome which adjacent to the outer membrane of the late autophagosome, and the lysosomal hydrolase degrades the contents and inner membrane of the autophagosome. Multi lamellar body is a structure with continuously overlapped membranous multilayers. Abbreviations are: **Nu**, nucleus; **M**, mitochondria; **ER**, endoplasmic reticulum; **G**, golgi apparatus; **Ph**, phagophore; **AP**, autophagosome; **AL**, autolysosome; **MLB**, multi lamella.

내부가 비어 있거나 일부 전자밀도가 높은 막 구조체로 구분하였다. 또한, 세포 내에서는 여러겹의 막이 집중적으로 회오리처럼 둘러싸인 다중막으로 구성된 다중막 구조체(MLB)라는 특이적인 구조가 관찰되어 이들 또한 막구조체로서 일부 구분하였다(*Fig.* 2A, B). 기아상태를 유도하지 않은 정상 섬유아세포에서는 매우 적은 수이기는 하지만 패고포어, 초기와 후기 단계의 자가포식체, 오토라이소좀의 형태학적으로 구분되는 각 단계별 미세구조를 구분 지어 단계별로 관찰할 수 있었다(*Fig.* 2A, B).

3.2. ATG5 유전자 결핍 섬유아세포에서 자가포식체 미세구조 관찰 및 분석

정상 섬유아 세포에서 관찰한 자가포식체의 미세구조를 분석 및 검증하기 위해서 자가소화작용의 핵심 유전자인 ATG5 유전자 결핍 섬유아세포에서 자가포식체 존재 여부 및 미세구조를 비교 분석하고자 하였다. ATG5는 ATG12와 복합체를 형성하여 자가포식체의 막을 신장시키는 역할을 한다.[21]

ATG5가 결핍된 섬유아세포에서도 드물긴 하지만 정상 섬유아세포와 마찬가지로 초기, 후기 단계의 자

가포식체가 여전히 존재함을 확인하였다(*Fig.* 3A). 이를 통해, ATG5 유전자 없이도 존재하는 자가소화작용이 있을 가능성이 있음을 유추해 볼 수 있었으며, 최근 연구결과에 의하면 ATG5 유전자 비의존적인 자가소화작용의 예가 보고되었다.[22]

그리고, ATG5가 결핍된 섬유아세포에서 자가포식체 미세구조를 전자현미경으로 보다 면밀히 관찰 및 분석하였을 때, 매우 흥미롭게도 이중막 구조의 자가포식체 구조가 닫히지 않은, 완성되지 않은 패고포어 형태를 가지는 막구조가 매우 많이 관찰되었다(*Fig.* 3A, B). 이들의 미세구조를 조금 더 분석해 보면 이중막이 완성되지 않았지만, 막이 생기고 있는 안쪽으로 여러 가지 세포 내 물질들이 있는 것을 볼 수 있었다(*Fig.* 3B). 따라서, ATG5 결핍 섬유아세포에서는 주로 패고포어 형태의 막구조가 주로 관찰되었으며, 초기와 후기 자가소포체도 종종 관찰되었다(*Fig.* 3A). 반면에, 오토라이소좀과 다중막 구조체(MLB)는 거의 관찰되지 않았다.

따라서, ATG5 결핍된 섬유아세포에서의 자가포식체의 미세구조 관찰 및 분석을 통해 ATG5가 자가포식체의 막신장 뿐 아니라, 자가포식체 구조의 이중막 닫힘 및 완성에 중요한 역할을 하며, ATG5 유전자 비의존성 자가소화작용의 존재가능성에 대해서 유추해 볼 수 있었다.

3.3. 정상섬유아세포와 ATG5 KO 자가소화작용 결핍 섬유아세포에서 관찰된 자가소화작용 단계별 구조 비교

앞서, 정상 섬유아세포에서는 자가소화작용이 정상적으로 진행되어 다양한 단계의 자가포식체 구조가 형성되는 것을 확인하였다(*Fig.* 2B). 또한, ATG5 결핍 섬유아세포에서는 이중막이 닫히지 않는, 완성되지 않은 자가포식체 구조를 빈번히 관찰하였다(*Fig.* 3).

다음으로, 정상 및 자가소화작용 결핍 세포에서 자가소화작용이 활성화 된 경우의 단계별 미세구조 분석을 위하여 세포 내에서 자발적으로 일어나고 있는 기초자가소화작용(basal autophagy)과 기아(starvation)에 의해 유도된 자가소화작용(autophagy induction)상황에서 자가포식체의 미세구조 및 수를 분석하였다. 자가소화작용의 유도를 위해서 세포를 기아상태로 처리해 주기 위해 아미노산과 혈청이 결여된 세포배양용액인 EBSS(Earle's Balanced Salts)를 사용하여 세포를 배양하였다.[23]

먼저 정상 섬유아세포에 기아상태를 유도하였을 때, 자가소화작용의 유도와 활성에 의해서 세포질 내의 세포소기관들 주변에 초기 자가포식체 및 후기 자가포식체, 오토라이소좀의 수가 전반적으로 증가되었으며, 특히, 패고포어와 전자밀도가 높은 이중막 구조의 후기 자가포식체가 많이 관찰되었다(*Fig.* 4A-a-d). 그

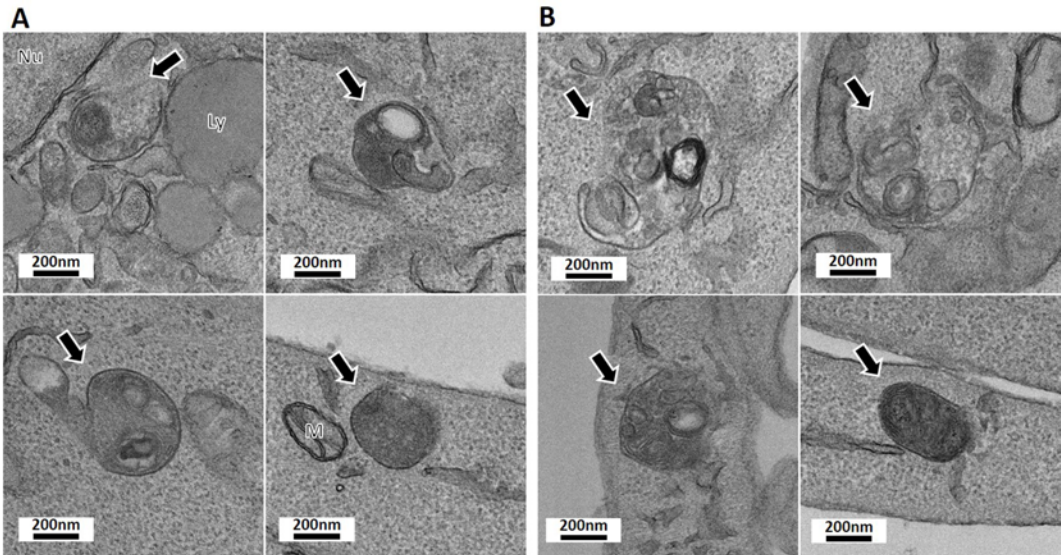

Fig. 3. Representative TEM images showing the steps of autophagy process in ATG KO MEFs. (A and B) In difference with the autophagy process of WT MEFs, the double membrane structure of autophagosome and autolysosome (arrows in each image) are incompletely formed. Abbreviations are: **Nu**, nucleus; **Ly**, lysosome; **M**, mitochondria.

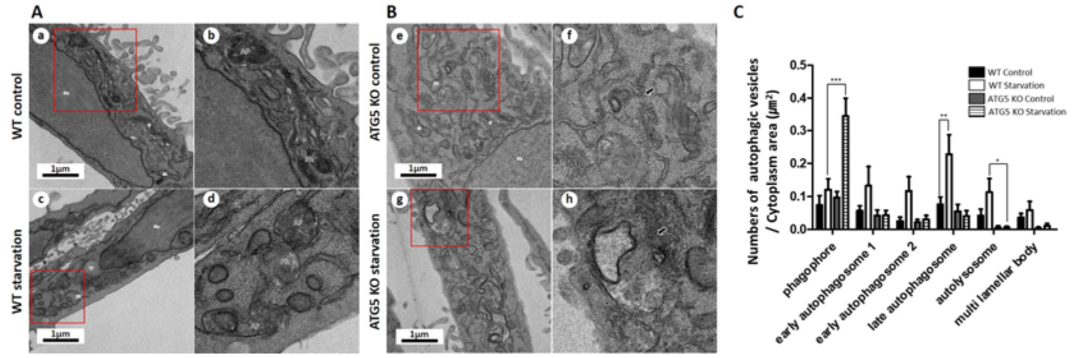

Fig. 4. Ultrastructural comparison and statistical analysis of autophagy process between WT and ATG5 KO MEF cells upon starvation. (A) Representative TEM micrographs showing various autophagy steps in cytoplasm were acquired from WT MEFs in control (a) and starved condition (c). (b and d) High power zoomed images of marked area in **a** and **c**, respectably. (B) Representative TEM micrographs showing various autophagy steps in cytoplasm were acquired from ATG KO MEFs in control (e) and starved condition (g). (f and h) High power zoomed images of marked area in **e** and **g** respectably. (B) EM images in ATG5 KO MEFs. Abbreviations are: **Nu**, nucleus; **Ly**, lysosome; **M**, mitochondria; **G**, golgi apparatus; **ER**, endoplasmic reticulum; **AP**, autophagosome; **AL**, autolysosome. (C) Comparison of the quantified number of each autophagy step per unit area of cytoplasm in each experimental condition, respectably. Each bar represents the mean ± SEM. Statistical significance was evaluated using two-way AVOVA test. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$.

러나, *Fig.* 4의 C에서 보이는 것과 같이 자가소화작용을 유도하지 않은 경우와 기아에 의해 자가소화작용이 유도되었을 때의 정상세포에서는 단계별 자가포식체 미세구조의 형태적, 수적 차이는 없었다.

이를 통해, 자가소화작용이 활성화 된 경우 라이소좀과의 결합 전 단계의 후기 자가포식체가 세포 내에 축적됨을 확인할 수 있었다.

그러나, ATG5 결핍 섬유아세포에서 기아상태를 유도하였을 때, 정상 섬유아세포와 비교하여 자가포식체의 미세구조적 차이는 없었지만, 자가포식체 수는 확연히 줄어들었다(*Fig.* 4B-f, h). 그리고, ATG5 결핍 섬유아세포에서 기아 상태를 유도한 상황에서는 패고포어 구조들이 더 많이 축적되어 있는 것을 관찰하였다(*Fig.* 4B-e, g). 이러한 미세구조를 정량 하였을 때, 기아상태 유도 시 ATG5 결핍 섬유아세포에서는 패고포어의 형태를 가지는 닫히지 않은 초기단계의 자가포식체 구조가 크게 증가하였고, 다른 단계의 자가포식체는 드물게 관찰되었다(*Fig.* 4C). 이를 통해, ATG5가 마우스 섬유아세포에서 초기 패고포어 완성에 중요한 역할을 한다는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다. 또한, 정상 섬유아세포는 기아상태 유도에 의한 자가소화작용의 활성화로 인해 후기 단계의 자가포식체가 세포 내에 축적됨에 따라, 후기 자가포식체와 라이소좀의 결합 단계가 자가포식작용의 속도 결정단계가 될 수 있을 가능성에 대해 유추해 볼 수 있었다.[21]

본 연구결과를 통해, 자가소화작용 결핍 세포와 정상세포에서 자가소화작용 유도에 의한 단계별 자가포식체의 미세구조를 명확히 분석하고, 이를 정량함으로써 전자현미경을 이용한 자가포식체 미세 구조의 단계별 구조 분석 및 정량법을 구축할 수 있었다.

3.4. 돌연변이 헌팅틴 단백질(mutant huntingtin protein)이 발현된 세포모델에서 관찰되는 자가소화작용

자가소화작용은 생리환경에서만 중요한 역할을 할 뿐 아니라, 인간의 다양한 질병과도 연관되어 있음이 많이 보고되고 있다. 자가소화작용과 연관된 유전자나 경로에 문제가 있을 경우, 세포내 분해작용 비정상으로 인해 세포내 물질 및 세포소기관들의 축적이 질병과 연관되는 경우가 있으며, 세포내 비정상적인 물질 및 잘못된 세포소기관의 축적은 자가소화작용을 활성화시키지만, 이들의 불충분한 활성화가 질병과 연관되어 있기도 하다.[24,25] 그 중에서도, 비정상적인 질병 연관 단백질 응집체 및 잘못된 기능을 보이는 세포소기관 축적을 보이는 퇴행성 뇌질환과 자가소화작용의 연관성 연구는 매우 폭발적으로 이루어지고 있다.[26] 다양한 퇴행성 뇌질환에서 자가소화작용의 연관성에 대해서 보고하고 있지만, 다양한 뇌질환에서 보이는 단계별 자가포식체들의 미세구조 분석 및 정량에 대한 연구는 부족한 실정이다.

자가포식체가 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease)과 같은 다양한 신경 퇴행성 질환 환자의 뇌에서 축적된다는 많은 보고가 있다. 일반적인 단백질 대사 과정 동안 자연스럽게 생성된 잘못 접힌 단백질 제거의 역할 외에도 자가소화작용은 여러 신경 퇴행성 질환과 관련된 응집되기 쉬운 돌연변이 단백질의 제거에 중요한 역할을 한다고 생각되어 지고 있다.[27] 따라서 자가소화작용의 조절은 이 질병들의 잠재적인 치료 방법으로 제안되었다. 가장 흔한 폴리글루타민(polyglutamine; polyQ)질환인 헌팅턴병(Huntington's disease)은 엄청난 손상을 가하는 상염색체 우성 신경 퇴행성 질환이다. 헌팅턴병은 폴리글루타민의 확장과 병원성 응집체를 유도하는 헌팅틴(huntingtin; HTT)유전자의 첫 번째 엑손(exon)의 N-말단에서 CAG서열이 반복되는 것이 특징이다.[26,28] 돌연변이 헌팅틴(mutant huntingtin; mHtt)은 세포 내 신호전달 경로의 변화, 비정상적인 시냅스 전달, 단백질 분해 복합체(proteasome)의 기능장애와 미토콘드리아의 변화와 같은 다양한 세포의 기능장애를 이끈다.[29] 40회 이상 반복되는 확장된 폴리글루타민 서열이 단백질 응집을 유도하고, 헌팅틴 단백질의 비정상적인 응집과 이들의 축적이 질병 기전에 핵심 기전 중 하나임이 보고되고 있다.[30] 이 질환의 대표적인 임상증상은 근육긴장이상(dystonia)이나 인지능력저하이며, 현재까지 효과적인 치료법은 없는 상황이다. 그러나, 최근 다양한 연구에 의하면 폴리글루타민에 의해서 야기되는 비정상적인 헌팅틴 단백질 응집체는 세포내 다양한 정상 단백질들과 비정상적인 결합 및 축적을 야기 하여,[31] 이들의 응집체 제거가 퇴행성 뇌질환 치료의 핵심이 될 것이라 예측되고 있다. 단백질 제거방법으로 최근 세포내 효과적인 분해경로인 자가소화작용 활성화가 대두되고 있다. 따라서, 퇴행성 뇌질환 연관 응집체 제거를 위해 다양한 자가소화작용 유도체를 찾고 동정하는 일이 진행되고 있다.[32,33]

그러나, 비정상적인 폴리글루타민 반복서열을 가지는 헌팅틴 단백질 응집체가 구체적으로 자가소화작용과 어떻게 연관되어 있는지에 대한 미세구조 분석을 통한 자가포식체의 단계별 분석 및 정량은 거의 이루어지지 않았다.

따라서, 앞서 구축한 자가포식체 미세구조 분석/정량법을 적용하여 150 개의 폴리글루타민을 가지는 비정상적인 N-말단 헌팅틴 단백질이 발현된 세포와 대조군으로 16 개의 정상적인 폴리글루타민을 가지는 헌팅틴 단백질이 발현된 세포에서 자가포식체 미세구조를 비교하여 관찰하여 이들을 정량 분석 하고자 하였다. 이를 위해, 헌팅턴 유전자의 N-말단에 150 개의 글루타민이 EGFP(N-terminal of huntingtin (Nhtt)와 융합된 EGFP-Nhtt (150Q) 플라스미드(plasmid)와 대조군으로 정상 길이의 16개의 폴리글루타민이 헌팅틴 유전자의 N-말단에 붙은 EGFP-Nhtt (16Q)를 HEK 세포에 발현하여, 이들 세포에서 전자현미경을 통해 자가

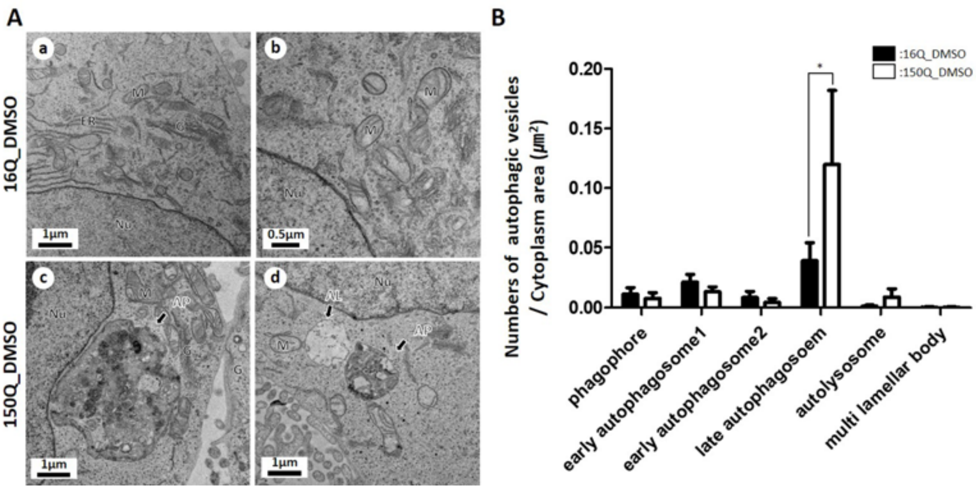

Fig. 5. Ultrastructural analysis of autophagosomes in Huntington's disease cellular model. (A) EM images in HEK293T cells expressing EGFP-Nhtt (16Q) (a and b) and EGFP-Nhtt (150Q) (c and d). Abbreviations are: (**Nu**, nucleus; **M**, mitochondria; **G**, Golgi apparatus; **ER**, endoplasmic reticulum; **AP**, autophagosome; **AL**, autolysosome). (B) The graph shows quantification of number of autophagic vesicle in EGFP-Nhtt (16Q) and EGFP-Nhtt (150Q) expressing cells (*: $p<0.05$, student t-test).

포식체의 구조를 분석하고, 정량 하였다. 먼저, 16Q의 헌팅틴이 발현된 세포(*Fig.* 5Aa, b)와는 달리 150개의 폴리글루타민을 가지는 헌팅틴 단백질이 발현된 세포에서는 직경이 약 2-3 μm정도의 폴리글루타민 단백질 응집체가 세포핵 근처와 세포질 근처에 분포함을 확인할 수 있었다(*Fig.* 5Ac, d).

또한, 전자현미경 이미지 및 이를 활용한 정량분석 그래프에서 볼 수 있듯이(*Fig.* 5A, B), 150Q의 비정상적인 헌팅틴 단백질이 발현된 세포에서는 화살표로 표시된 구조에서 명확히 알 수 있는 것처럼, 후기 자가포식체가 유의미하게 증가한 것을 관찰할 수 있었다(*Fig.* 5A, B). 이는 헌팅틴 단백질의 응집체가 후기 자가포식체와 라이소좀의 결합을 억제하여 라이소좀 결합전의 후기 자가포식체가 축적되었거나, 비정상적인 단백질의 증가에 의해 자가소화작용이 활성화되어 자가포식체가 축적되고, 자가소화작용의 분해가 효율적이지 않아 후기 자가포식체가 축적된 경우를 생각해 볼 수 있다. 따라서, 헌팅턴병에 존재하는 단백질 응집체를 제거하는 기전으로 자가소화작용을 활용할 경우, 자가포식체와 라이소좀 결합을 증가하거나, 분해를 증가시킬 수 있는 자가소화작용 조절제가 필요할 것으로 생각된다.

4. 고 찰

본 논문에서는 정상 섬유아세포와 자가소화작용에 중요한 역할을 하는 ATG5 결핍 섬유아세포에서 자가소화작용 단계별 자가포식체를 비교 분석하여 미세구조 분석을 통해 자가포식체의 구조 분석 및 정량적 분석법을 구축하였다. 본 연구 결과로서 첫째, 정상 섬유아세포와 ATG5 결핍 섬유아세포에서 자가포식체의 단계별 미세구조 분석을 위해 전자현미경을 이용하여 정상 섬유아세포에서 패고포어, 초기 자가포식체, 후기 자가포식체, 오토라이소좀의 단계별 미세구조를 관찰하였고, 자가포식체의 수를 정량화 하였다. 또한, 정상 섬유아세포와 ATG5 결핍 섬유아세포에서 미세구조를 비교 관찰하여, 정상 섬유아세포에서와는 달리 자가소화작용 결핍 세포에서는 이중막이 완성되지 않은 자가포식체가 존재하고, 이들이 자가소화작용 유도 이후 축적되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 자가소화작용 유도에 의해서 초기단계의 패고포어가 유도되어 생성되었으나, ATG5 유전자의 결핍으로 이중막 구조의 닫힘이 완성되지 않아 불완전한 형태의 이중막 구조가 세포 내에 축적되었다고 생각해 볼 수 있다. 본 연구에서 ATG5가 결핍된 세포에서 막이 닫히지 않은 구조가 축적된다는 사실과 ATG5-ATG12 접합 시스템이 격리막(isolation membrane)의 발달에 중요한 역할을 한다는 기존의 보고와 일치된 결과를 통해서 ATG5의 기능을 확실히 검증할 수 있었다.[17]

또한, 본 연구에서 구축한 자가포식체의 단계별 초미세 구조 분석 및 이를 정량화 한 분석법을 바탕으로 대표적인 퇴행성 뇌질환인 헌팅턴병 질병모델에서 자가포식체 미세구조를 추가 관찰하여 정량 분석하였다. 그 결과, 비정상적인 150Q 헌팅틴 단백질이 발현되는 세포에서는 비정상적인 단백질 응집체가 세포질에 축적되고, 후기 자가포식체의 수가 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 최근 많은 연구자들이 헌팅턴병에서 나타나는 비정상적인 헌팅틴 단백질 응집체 제거를 위해서 자가소화작용 조절 물질의 스크리닝을 시도하고 있다. 그러나, 자가소화작용은 앞선 연구에서 볼 수 있듯이 단계별로 매우 정교하게 조절되는 세포내 분해 기전이다. 따라서, 단백질 응집체 제거를 위해 정확히 어떠한 단계에서 자가소화작용을 증가시켜야 할지에 대해 많은 연구가 진행되지 않았다. 본 연구에서는 헌팅틴 돌연변이 단백질 응집체가 축적되는 세포모델에서 전자현미경 분석법을 이용하여 후기 자가포식체가 유의미하게 증가하는 결과를 얻었고, 이를 바탕으로 자가포식체와 라이소좀의 결합을 향상시키는 단계의 자가소화작용 조절 물질이 단백질 응집체 제거에 효율적일 가능성을 유추해 볼 수 있었다. 따라서, 질병모델에서의 자가포식체 단계별 미세 구조 분석은 헌팅턴병의 치료제 개발에 핵심이 될 자가소화작용 조절 물질에 대한 단서를 제공해 줄 수 있다.

따라서, 본 연구에서 구축한 전자현미경을 활용한 자가포식체의 단계별 미세 구조 관찰과 정량적 분석 시스템은 자가소화작용과 연관된 다양한 종류의 인간 질병 모델에 적용할 수 있을 것이라 생각한다.

감사의 글

이 논문은 한국기초과학지원연구원(T38210, C38916)과 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단 바이오 의료기술개발사업(2017M3A9G7073521) 및 리더연구(국가과학자)의 지원을 받아 수행된 연구이다.

References

1. I. Dikic and Z. Elazar, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.,* **19**(6),

349-364 (2018).
2. J. Bestebroer, P. V'Kovski, M. Mauthe, and F. Reggiori, *Traffic,* **14**(10), 1029-41 (2013).
3. Y. Murakami, S. Notomi, T. Hisatomi, T. Nakazawa, T. Ishibashi, J. W. Miller, and D. G. Vavvas, *Prog. Retin. Eye Res.,* **37**, 114-40 (2013).
4. S. T. Shibutani and T. Yoshimori, *Cell Res.,* **24**(1), 58-68 (2014).
5. H. Nakatogawa, *Essays Biochem.,* **55**, 39-50 (2013).
6. D. Glick, S. Barth, and K. F. Macleod, *J. Pathol.,* **221**(1), 3-12 (2010).
7. A. B. Birgisdottir, T. Lamark, and T. Johansen, *J. Cell Sci.,* **126**(Pt 15), 3237-47 (2013).
8. D. J. Klionsky, K. Abdelmohsen *et al*., *Autophagy,* **12**(1), 1-222 (2016).
9. S. R. Yoshii and N. Mizushima, *Int. J. Mol. Sci.,* **18**(9) (2017).
10. N. Mizushima, T. Yoshimori, and B. Levine, *Cell,* **140**(3), 313-26 (2010).
11. S. Barth, D. Glick, and K. F. Macleod, *J. Pathol.,* **221**(2), 117-24 (2010).
12. J. H. Hurley and E. Nogales, *Curr. Opin. Struct. Biol.,* **41**, 211-216 (2016).
13. E. L. Eskelinen, F. Reggiori, M. Baba, A. L. Kovacs, and P. O. Seglen, *Autophagy,* **7**(9), 935-56 (2011).
14. Y. Ohsumi, *Cell Res.,* **24**(1), 9-23 (2014).
15. E. L. Eskelinen, A. R. Prescott, J. Cooper, S. M. Brachmann, L. Wang, X. Tang, J. M. Backer, and J. M. Lucocq, *Traffic,* **3**(12), 878-93 (2002).
16. E. L. Eskelinen, C. K. Schmidt, S. Neu, M. Willenborg, G. Fuertes, N. Salvador, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, J. Heeren, K. von Figura, E. Knecht, and P. Saftig, *Mol. Biol. Cell.,* **15**(7), 3132-45 (2004).
17. N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhisa, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, *J. Cell. Biol.,* **152**(4), 657-68 (2001).
18. J. A. Lee, C. S. Lim, S. H. Lee, H. Kim, N. Nukina, and B. K. Kaang, *J. Neurochem.,* **85**(1), 160-9 (2003).
19. M. Hariri, G. Millane, M. P. Guimond, G. Guay, J. W. Dennis, and I. R. Nabi, *Mol. Biol. Cell,* **11**(1), 255-68 (2000).
20. S. R. Carlsson and A. Simonsen, *J. Cell Sci.,* **128**(2), 193-205 (2015).
21. C. Kishi-Itakura, I. Koyama-Honda, E. Itakura, and N. Mizushima, *J. Cell Sci.,* **127**(Pt 18), 4089-102 (2014).
22. Y. Nishida, S. Arakawa, K. Fujitani, H. Yamaguchi, T. Mizuta, T. Kanaseki, M. Komatsu, K. Otsu, Y. Tsujimoto, and S. Shimizu, *Nature,* **461**(7264), 654-8 (2009).
23. D. B. Munafo and M. I. Colombo, *J. Cell Sci.,* **114**(Pt 20), 3619-29 (2001).
24. N. Mizushima, *Nat. Cell Biol.,* **20**(5), 521-527 (2018).
25. S. Saha, D. P. Panigrahi, S. Patil, and S. K. Bhutia, *Biomed. Pharmacother.,* **104**, 485-495 (2018).
26. F. Guo, X. Liu, H. Cai, and W. Le, *Brain Pathol.,* **28**(1), 3-13 (2018).
27. B. Levine and G. Kroemer, *Cell,* **132**(1), 27-42 (2008).
28. D. D. Martin, S. Ladha, D. E. Ehrnhoefer, and M. R. Hayden, *Trends. Neurosci.,* **38**(1), 26-35 (2015).
29. B. Khalil, N. El Fissi, A. Aouane, M. J. Cabirol-Pol, T. Rival, and J. C. Lievens, *Cell. Death Dis.,* **6**, e1617 (2015).
30. J. Nah, J. Yuan, and Y. K. Jung, *Mol. Cells.,* **38**(5), 381-9 (2015).
31. M. Arrasate and S. Finkbeiner, *Exp. Neurol.,* **238**(1), 1-11 (2012).
32. M. Renna, M. Jimenez-Sanchez, S. Sarkar, and D. C. Rubinsztein, *J. Biol. Chem.,* **285**(15), 11061-7 (2010).
33. C. G. Towers and A. Thorburn, *EBioMedicine,* **14**, 15-23 (2016).

Authors' Positions

Suin Choi	: Research Scientist
Pureum Jeon	: Graduate Student
Yang Hoon Huh	: Senior Research Scientist
Jin-A Lee	: Professor