NRF-2015M3A9B6073840

보안 과제( ), 일반 과제(○) / 공개(○), 비공개( )발간등록번호( )

원천기술개발 사업 제**3**차 연도 **평가용** 보고서

R&D / NRF-2015M3A9B6073840

암진단 및 암 치료 기술 개발을 위한 O-GlcNAc 수식화 제어 기술 연구 개발

최종보고서

2018.07.12.

주관연구기관 / 연세대학교

과학기술정보통신부

(전문기관) 한국연구재단

암진단 및 암 치료 기술 개발을 위한 O-GlcNAc 수식화 제어 기술 연구 개발

최종보고서

2018

과학기술정보통신부 한국연구재단

제출문

제 출 문

과학기술정보통신부장관 귀하

암진단 및 암 치료 기술 개발을 위한 O-GlcNAc 수식화 제어 기술 연구 개발(연구개발기간 : 2015.12.01. ~ 2018.06.30.) 과제의 최종보고서 2부를 제출합니다.

2018.07 .12.

주관연구기관명 : 연세대학교 (대표자) 이원용 (인)

주관연구기관책임자: 조 진 원

과학기술정보통신부 소관 과학기술분야 연구개발사업 처리규정
제35조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

보고서 요약서

과제 고유 번호	NRF-2015M3A9B6073840	해당 단계 연구 기간	2015. 12. 01 - 2018 06. 30 (31개월)	단계구분	3단계/5단계
연구사업명	중사업명	바이오 의료기술개발사업			
	세부사업명	차세대응용오믹스사업			
연구과제명	대과제명	프로테오믹스 분석 신기술 개발을 통한 질환 관련 O-GlcNAc 수식화 타겟 단백 발굴 및 이를 이용한 치료법 개발 연구			
	세부과제명	암진단 및 치료 기술 개발을 위한 *O*-GlcNAc 수식화 제어 기술 연구 개발			
연구책임자	조진원	해당단계 참여연구원 수	총: 26명 내부: 26명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:380,000천원 민간: 천원 계:380,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 26명 내부: 26명 외부: 명	총 연구개발비	정부:380,000천원 민간: 천원 계:380,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	연세대학교, 융합오믹스 의생명과학과			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	보안 없음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

• 저당 조건에서 암세포의 글리코겐을 대사를 이용한 *O*-GlcNAc수식화 증가 현상을 확인함. 글리코겐 대사 저해 및 OGT 발현 저해를 통한 EMT 현상 억제를 확인함으로써 [글리코겐대사 - *O*-GlcNAc수식화 - EMT현상] 사이의 직접적 연관성을 밝힘. • 기 보고된 암세포 내 *O*-GlcNAc수식화 증가에 반하여, 폐 유래 암세포의 *O*-GlcNAc수식화 감소를 확인함. 암 특이적 *O*-GlcNAc수식화 패턴 분석, 데이터베이스 구축의 토대가 됨. • 총 8종에 NBOS construct를 확보하고 최적화된 construct 조합을 찾기 위한 실험을 진행하여 LgBiT-CKII 와 GafD-SmBiT construct들을 *O*-GlcNAc 수식화 sensor 로서 적합함을 확인함.	보고서 면수

요약문

연구의 목적 및 내용	단백질 번역 후 수식화의 한 종류인 *O*-GlcNAc은 세포의 항상성 유지에 주요한 조절자 역할을 함. 암세포의 경우, 정상 세포와 비교하여 *O*-GlcNAc 수식화의 증가되어 있음이 보고되어 있으며 *O*-GlcNAc 수식화가 암세포에서의 세포 신호전달 및 대사 작용에 중요한 영향을 미치는 것이 알려져 있음. 본 연구는 프로테오믹스 기술을 활용하여 암의 기초연구로서 초기진단 및 암 치료 기술 확보를 목표로 함. 1) 암세포 내 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화 변화를 연구하여 암 특이적 *O*-GlcNAc 수식화 데이터베이스를 구축하고 2) 생명 공학적 센서기술을 이용하여 *O*-GlcNAc 수식화 변화 감지 기술을 개발하며 3)글리코겐 분해과정의 억제를 이용한 암세포의 전이를 조절하는 기술개발 연구를 진행함.
연구개발성과	• 정상 세포에 비해 저당조건에서 암세포 특이적인 *O*-GlcNAc 수식화가 증가되어 있고 *O*-GlcNAc 수식화 증가로 인한 EMT 현상을 확인함. • 이는 암세포에서의 글리코겐 축적과 분해 대사의 증가로 인함을 밝힘. • 저당조건에서 암세포의 글리코겐 분해 증가 요인은 glycogen phosphorylase인 PYGB와 PYGL 단백질의 활성 때문이므로, siRNA 기술을 이용하여 위 유전자들의 전사를 억제하여 글리코겐 분해를 제어 조건을 찾음. • MDA-MB-231와 MDA-MB-468(유방암), A549(폐암), HCT116(대장암) 세포군에서 *O*-GlcNAc 수식화 양상의 변화를 관찰하고 유방암 및 대장암 세포주에서 *O*-GlcNAc 수식화 및 *O*-GlcNAc 수식화 효소 증가를 확인함. • 암 전이 매개 단백질인 Smad2,4 그리고 암 증식 억제 신호전달경로의 YAP, LATS1, MST2 단백질들의 *O*-GlcNAc 수식화를 발굴 및 위치를 동정하여 *O*-GlcNAc 수식화 데이터베이스 구축의 기반을 마련함. • Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor(NBOS) 기술 개발을 위한 Nano Bit expression construct 8종 제작하고 *O*-GlcNAc 수식화 변화에 대한 민감도 최적화 조건을 맞추었음.
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	• 암세포에서의 *O*-GlcNAc 수식화와 글리코겐의 관계성 연구는 암질환의 치료기술에 대한 새로운 시각을 제시해 줄 것이고 '글리코겐 분해 억제'에 의한 암 전이 제어의 연구 기술 개발에 기반이 될 것으로 기대됨. • 암 특이적 *O*-GlcNAc 수식화 단백질의 데이터베이스 구축으로 암의 발생 및 전이에 대한 근본적인 이해를 향상시키고 *O*-GlcNAc 수식화에 의한 암의 치료에 대한 후속연구의 가능성을 제시할 것임. • Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor(NBOS) 의 개발로 신속하게 *O*-GlcNAc 수식화의 변화를 감지하는 획기적인 원천 기술을 확보하여 *O*-GlcNAc 수식화 연구에 접근성을 높여주고 신약 후보군의 스크리닝 및 테스트 기술로 이용될 것으로 기대됨. • *O*-GlcNAc 수식화 데이터베이스와 NBOS 기술을 융합하여 효과적인 암의 치료 기술 개발에 방향성을 제시해줄 것임.

국문핵심어 (5개 이내)	*O*-GlcNAc 수식화	암	암의 진단	*O*-GlcNAc 센서	프로테오믹스
영문핵심어 (5개 이내)	*O*-GlcNAc modification	Cancer	Cancer diagnosis	Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor	Proteomics

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

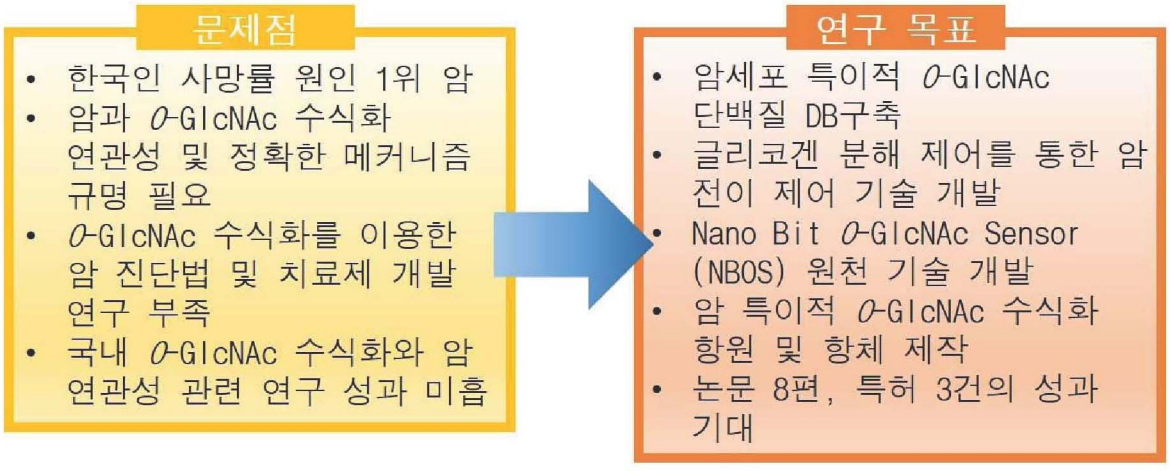
본문 작성 양식

〈 목 차 〉

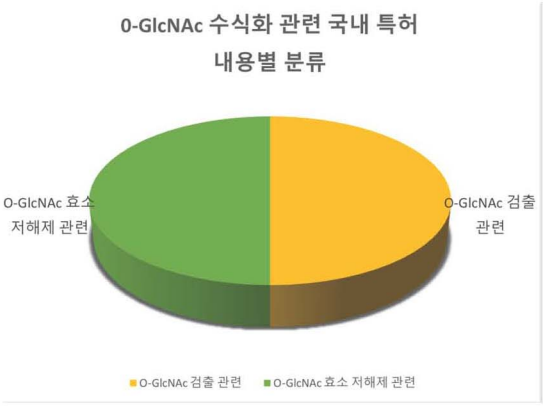
1. 연구개발과제의 개요 ·····5
2. 연구수행내용 및 성과 ·····9
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ·····17
4. 연구개발성과의 활용 계획 등 ·····26
붙임. 참고 문헌 ·····28

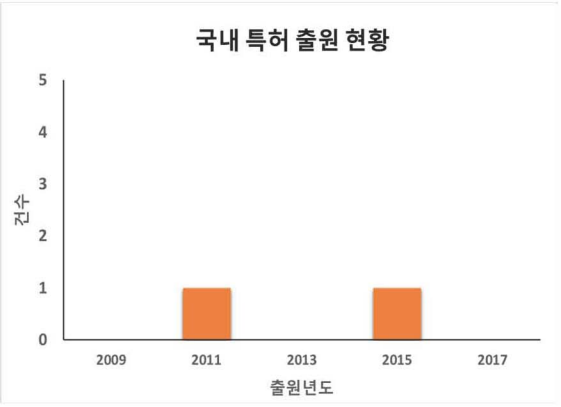
<별첨> 주관연구기관의 자체평가 의견서

1. 연구개발과제의 개요

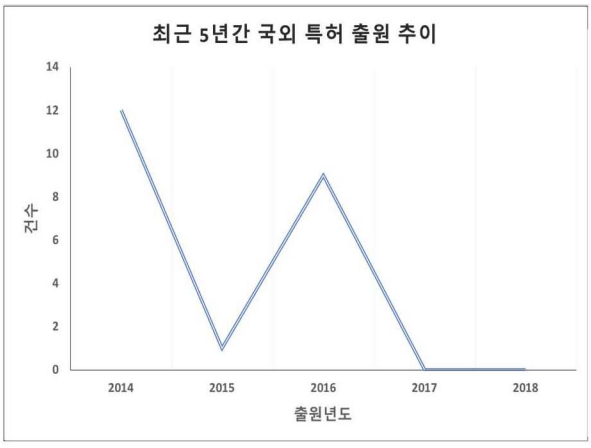


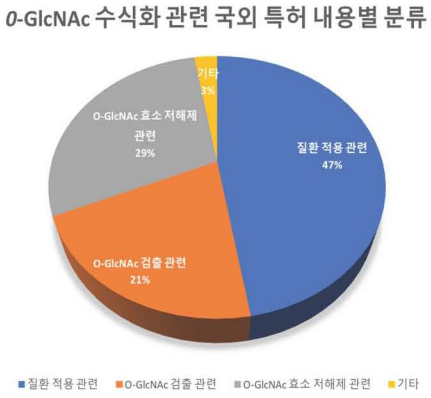
- 주요 선진국을 포함한 대한민국의 암 발생률은 여전히 높고, 모든 질병들 가운데 국민 사망 원인 1위를 차지함. 수십 년간 암 발병 기전 이해 및 진단, 치료를 위한 연구가 진행돼왔으나 암의 복잡성 (유전, 환경, 다수의 세포신호전달 과정 등 수많은 요인)과 유형의 다양성(유방암, 간암, 폐암, 췌장암) 때문에 지속적인 연구와 기술 개발로의 응용이 필수적임.
- 이 외에도 특정 단백질의 O-GlcNAc 수식화와 암 발병 간 밀접한 관계가 국내외 연구진에 의해 다수 보고되었으나 O-GlcNAc 수식화 제어를 암 조기진단 및 치료에 직접적으로 도입하여 응용 기술 개발을 시도한 사례는 전무함.
- O-GlcNAc은 번역 후 수식화의 한 종류인 인산화와 경쟁적으로 작용하여 세포의 수많은 신호전달 체계를 조절함. 최근 2018년, 비정상적으로 증가된 O-GlcNAc 수식화가 세포의 DNA 수선 및 Stress대응 기작을 고장내어 암 발생 촉진에 기여한다고 보고됨. (Hanover JA et al., 2018)
- 이 외에도 특정 단백질의 O-GlcNAc 수식화와 암 발병 간 밀접한 관계가 국내외 연구진에 의해 다수 보고되었으나 O-GlcNAc 수식화 제어를 암 조기진단 및 치료에 직접적으로 도입하여 응용 기술 개발을 시도한 사례는 전무함.
- O-GlcNAc 수식화는 세포가 처한 microenvironment에 의존도가 높아 'Nutrient Sensor'로 정의됨. 따라서 역동적으로 변화하는 세포 내 O-GlcNAc 수식화를 활용한 신속, 효율적 항암치료법 개발이 절실히 필요 함.
- 따라서 암세포와 정상세포의 O-GlcNAc 수식화 항상성 및 패턴 변화를 프로테오믹스 기술로 비교 분석한 DB제작과 O-GlcNAc 감지 센서인 NBOS의 개발을 통해 암 특이적 신호전달에 관여하는 단백질의 발굴 및 분류가 시급함.





- 국내 연구진에 의해 보고된 *O*-GlcNAc 수식화와 암의 상관관계에 관한 논문은 총 20여 편으로 2006년부터 꾸준하게 연구가 보고되었고 특히 최근 3년간 다수의 연구결과가 발표됨.
- 본 연구진 소속 대학에서도 2018년에 암 억제자 FOXO3의 *O*-GlcNAc 수식화가 췌장암 세포의 무분별한 성장을 야기함을 발표하였음.
- *O*-GlcNAc 수식화가 암세포 특이적인 세포 신호전달에 주요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌으며 국내에서도 대장암, 직장암, 위암, 폐암과 *O*-GlcNAc 수식화와의 연관성에 관한 연구 결과들이 다수 보고됨. 2016년에는 위암세포에서 *O*-GlcNAc 수식화가 증가되어 있으며 *O*-GlcNAc 수식화와 위암의 진행에 기여한다는 보고가 됨.(Jang TJ. et al., 2016)
- 본 연구진 소속 대학에서도 2018년에 암 억제자 FOXO3의 *O*-GlcNAc 수식화가 췌장암 세포의 무분별한 성장을 야기함을 발표하였음.(Shin H. et al., 2018)
- 2017년에는 Oncotarget 저널에서 OGT 효소 및 OGT 수식화 증가로 인하여 약제내성을 증가시키는 요소인 secretory Clusterin (sCLU)의 발현이 자궁경부암세포에서 증가됨을 밝힘.(Kim MJ. et al., 2018)
- 또한, 경상대학교 연구팀에서는 2017년에 Biochemical and Biophysical Research Communications에 *O*-GlcNAc 효소인 OGT 와 Human papilloma virus (HPV)가 폐암 전이를 촉진하며, 따라서 OGT 가 폐암의 표적치료에 이용될 가능성을 시사하였음. (Kim SH. et al., 2017)
- 그러나 국내 연구진들의 지속적 노력에도 불구하고 국외 *O*-GlcNAc 수식화 연구관련 성과에 비해 현재 국내의 *O*-GlcNAc 수식화 연구 성과는 미흡함.
- *O*-GlcNAc 수식화와 암의 연관성이 명확함이 증명되고 있으며, *O*-GlcNAc 수식화와 암에 관한 기초 연구가 지속적으로 진행됨에 따라 이와 같은 잠재적인 암의 진단법 및 치료법을 발굴하는 응용 기술 개발이 필수적으로 판단 됨.
- 국내에 등록된 *O*-GlcNAc 수식화 관련 특허는 총 2건이며 2017년에는 순천향대학교 연구팀이 *O*-GlcNAc 수식화와 관련된 암 등의 메커니즘 연구를 위한 OGT 억제제를 특허 등록 함.
- 그럼에도 불구하고 국외 특허 출원수와 비교하면 국내에서 개발된 특허 수는 소량이며, 따라서 본 연구진의 Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor개발은 *O*-GlcNAc 수식화 제어 및 암 진단, 치료에 접목 가능한 경쟁력 있는 특허로 출원 될 것이 기대됨.





- 현재까지 *O*-GlcNAc 수식화와 암의 상관관계를 보고한 논문은 약 260편임. 지난 2016·2017년에는 60여 편의 논문이 추가 발표되었음. 다수의 연구 성과에도 불구하고 암 진단 및 암 치료 관련 특허는 매우 적음.
- 다수의 연구 결과에서 여러 유형(간암, 방광암, 유방암, 전립선암, 직장암, 췌장암, 폐암)의 암세포 내 *O*-GlcNAc 항상성의 불균형이 존재하는 것으로 보고 됨.
- 2018년 이스라엘 Ben-Gurion University of the Negev 대학 연구팀은 대장암 모델 쥐에 shOGA를 통해 *O*-GlcNAc 항상성 불균형을 유도하였을 때 쥐의 사망률이 급증함을 보임. 그러나 shOGT로 OGT 발현을 억제하여 *O*-GlcNAc 수식화를 저해 시켰을 때는 쥐의 생존율이 증가함을 관찰 함. (Harosh-Davidovich SB & Khalaila I, 2018)
- 또한 암 전이의 중요 단계인 EMT (Epithelial-mesenchymal transition)와 밀접한 관계인 Wnt/β-catenin 신호 전달 체계가 *O*-GlcNAc 수식화의 조절을 받음을 보고 함. *O*-GlcNAc 수식화 절단 효소인 OGA를 억제시켜 세포내 *O*-GlcNAc을 증가 시켰을 때, E-Cadherin과 β-catenin의 단백질 발현 증가 및 세포 운동성 증가를 밝힘. (Harosh-Davidovich SB & Khalaila I, 2018)
- 또, 2018년 미국 John Hopkins 대학 연구팀에서는 Biotinylation을 이용한 BioSITe 기술을 개발하여 *O*-GlcNAc 수식화 유무 판별에 적용 가능함을 보임. 하지만 이는 기존의 Click-IT 방식과 거의 유사하며 시간적 효율성의 한계를 극복하지 못함. (Kim D I et al., 2018)
- 2012년 중국 연구팀에서 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 발굴에 이용 가능한 AANL2 렉틴을 새로이 개발하고 J. Biol. Chem에 논문 1편을 게재함 (Jiang S et al., 2012). 후속 연구로 2018년에는 이를 이용해 *O*-GlcNAc 수식화 peptide를 농축 및 발굴하는 응용 사례로 Glycobiology에 논문 1편을 추가 게재함. (Liu W et al., 2018)
- 현재 *O*-GlcNAc 수식화 탐지 관련 특허는 중국에서 지속적으로 출원되며, 렉틴과 *O*-GlcNAc의 특이성을 변형한 사례가 대부분임. 2018년 중국 연구팀에서는 *O*-GlcNAc 수식화 절단 시, 표면 굴절률의 변화로 인한 플라스몬 공명 (SPR) 신호로 *O*-GlcNAc 수식화를 양적 탐지할 수 있다는 내용의 특허 1건을 출원함.
- 하지만 여전히 기존의 시간적 효율성의 한계 및 *O*-GlcNAc 수식화 펩타이드 농축률의 한계를 극복하지 못 함. 현재까지의 *O*-GlcNAc 수식화 탐지 관련 특허들 대부분이 비용적 단점 및 실용성의 부족을 극복하지 못하는데 그침.
- 수십 년간의 암에 대한 연구가 진행돼왔고 축적된 연구 성과를 기반으로 둔 항암치료

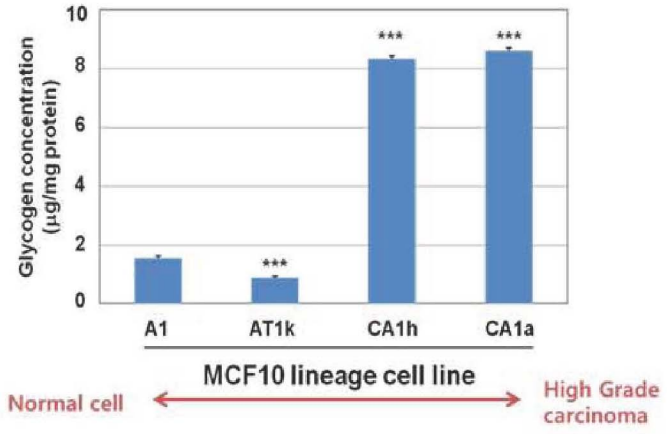
제 개발도 이루어져 왔지만 요인도 많고 복잡한 암의 특성 탓에 치료제들의 반응률도 낮고 큰 효험이 없었음.

- 암의 조기예방 그리고 조기진단으로 인한 신속한 항암치료 시작이 주목되고 있는 동시에 세포신호전달 체계를 조절할 수 있는 당화인 *O*-GlcNAc 수식화가 암세포에 영향을 준다는 연구내용들이 다수 보고되었으나 이로 인한 주요 기술개발 발달까지 다다르기엔 부족했음.
- *O*-GlcNAc 수식화가 암의 전이, 혈관 신생, 증식 등에 밀접하게 연관돼 있음이 지속적으로 보고돼 왔으나 여전히 이를 접목시킨 바이오마커 및 암 진단 기술 개발은 괄목할만한 성과가 없음.
- 따라서 *O*-GlcNAc 수식화가 암세포 특이적으로 보이는 특징을 활용한 응용 기술 개발 지향적 연구가 필수적임. 더불어 *O*-GlcNAc 수식화 제어를 통한 암의 전이 및 증식 제어 기술은 종래에 없던 새로운 항암치료 접근법이 될 수 있음.
- 본 연구진이 2009년에 J. Biol. Chem에 발표한 암세포 내 높은 글리코겐 보유량과 2010년 EMBO J에 발표한 Snail1 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화를 통한 EMT 현상 촉진은 글리코겐 분해와 *O*-GlcNAc 수식화의 제어가 암 전이를 조절하는 핵심 요소임을 시사함.(Kang JG et al., 2009; Park SY et al., 2010)
- 또한 본 연구진이 계획하는 암세포 내 *O*-GlcNAc 수식화 단백질들의 변화를 고효율 저비용으로 빠르게 분석하기 위한 Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor (NBOS) 개발은, *O*-GlcNAc 수식화를 암의 탐지 및 항암제 선별에 활용할 수 있는 획기적인 기술로 생각 됨.
- 질량분석 기반의 프로테오믹스 기술을 확보하여 발굴된 암 특이적 단백질들의 정확한 *O*-GlcNAc 수식화 자리를 동정하여 암 특이적 항원으로 제작하고, 이를 인식하는 *O*-GlcNAc 항체를 개발하는 것은 국내 최초의 연구 성과임.
- 항체 기술 개발을 원천 기술 확보하여 암의 조기진단과 항암치료법 개발에 적용하고, 항체 제작 기술을 산업화함으로써 경제적 효용성을 창출하는 것은, 바이오의료산업의 응용기술 확보에 필수적임.
- 더불어 *O*-GlcNAc 수식화 패턴 분석 및 제어를 통한 암 발병 단계 추적, 종양 성질 구별은 암세포의 비정상적 당대사를 이용한 희소성 있는 방법임.
- 본 연구팀은 *O*-GlcNAc 수식화가 암의 발병 및 전이를 일으키는 구체적인 작용 기작을 밝히며 암을 이해하기 위한 새로운 방향을 제시할 것임.
- 추가로 프로테오믹스 기술을 이용하여 암 특이적인 *O*-GlcNAc 수식화 변화를 나타내는 신호전달계나 암 전이 관련 단백질들을 데이터베이스화하여 국내외의 후속연구의 기반을 마련을 목표로 함.
- 또한, 암 관련 *O*-GlcNAc 수식화 변화 감지 기술 개발 등을 통하여 새로운 원천기술을 확보하고 데이터베이스와 접목하여 암세포에서의 *O*-GlcNAc 수식화 제어를 위한 기술을 정립할 것임.

2. 연구수행내용 및 성과

가. 암세포에 존재하는 글리코겐의 분해 억제를 통한 암전이 제어 기술 확보

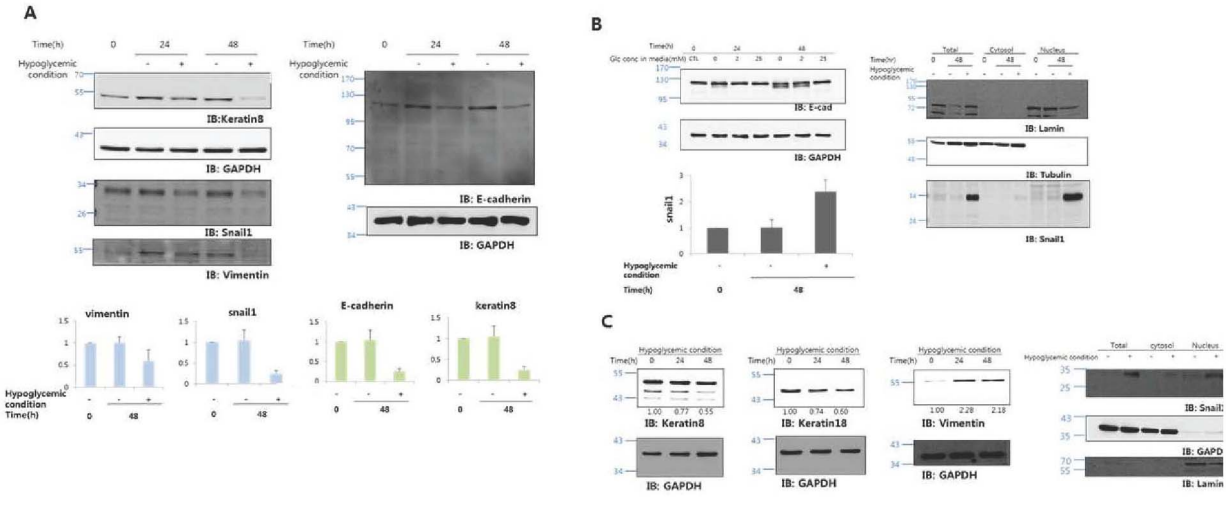
- 본 연구진은 지난 3차 년도 기간 동안 다음과 같은 결론을 도출하였음.
- 첫째, 악성 암 세포주는 과량의 글리코겐을 보유하고 있음[그림 1].



Cell line designation	Stage
MCF10A1	Normal epithelium
MCF10AT1k.cl2	premalignant epitheliur
MCF10CA1h	Low-grade carcinoma
MCF10CA1a.cl1	High grade metastatic carcinoma

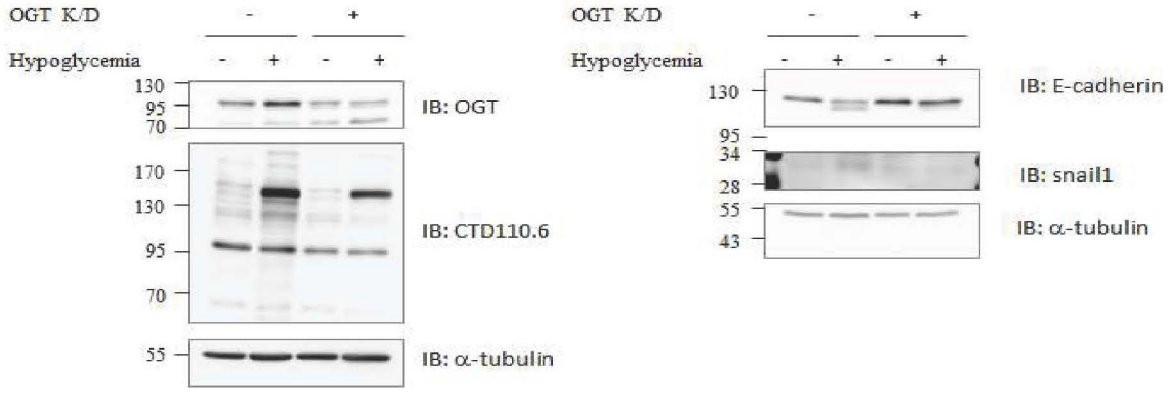
[그림 1. CF10A lineage cell line를 통한 암세포와 정상세포 내의 글리코겐 양 비교]

- 둘째, 저당조건에서 암 전이 초기 증상인 EMT (epithelial - mesenchymal transition)가 유도됨[그림 2].



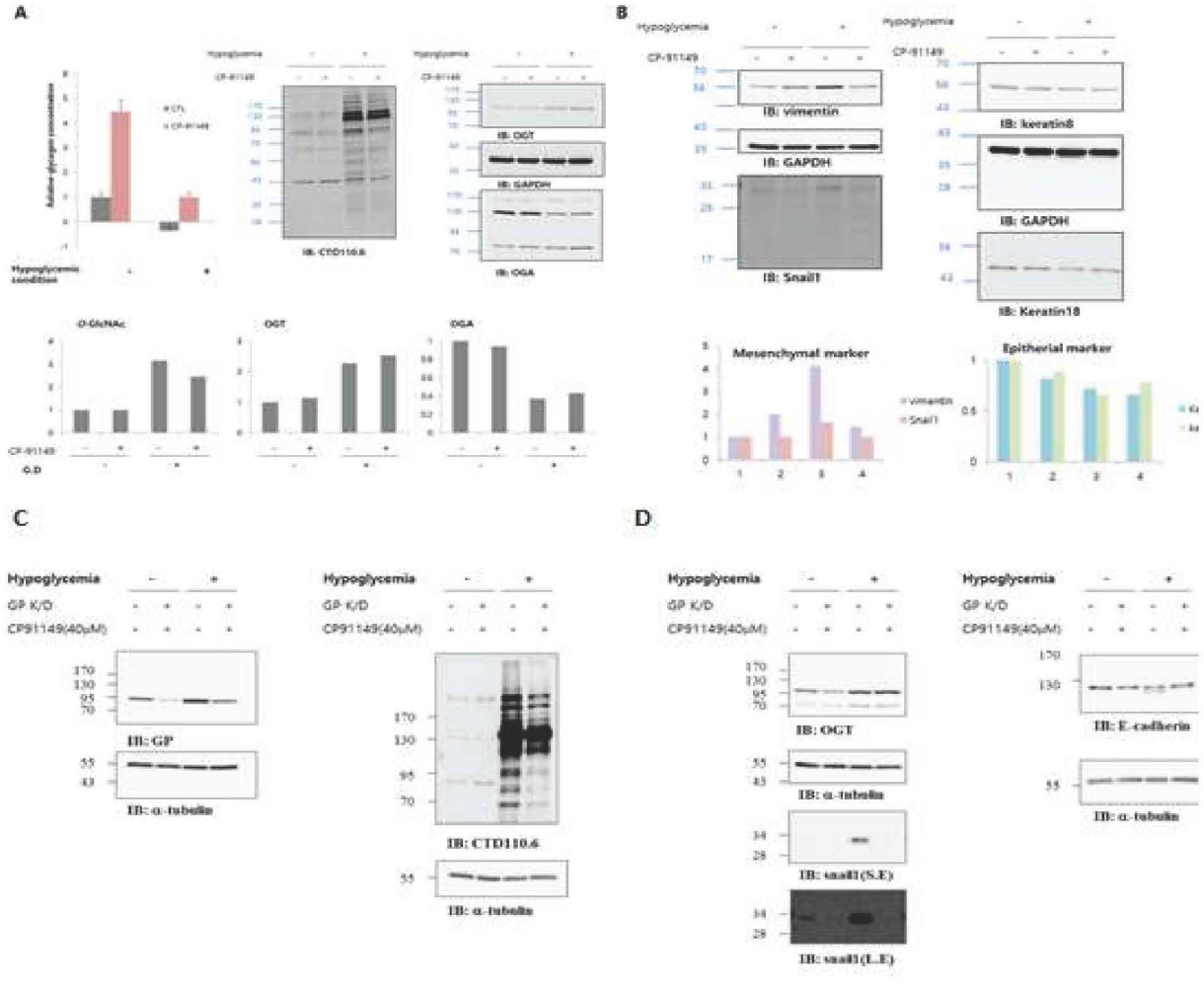
[그림 2. 저당조건에서 암세포 특이적인 EMT 유도]

- 셋째, 저당조건에서 유도되는 EMT현상은 세포 내의 *O*-GlcNAc 수식화의 증가로부터 수반됨[그림 3].



[그림 3. OGT knock down 시 저당조건에서 유도된 EMT현상이 완화됨]

- 넷째, 암세포의 글리코겐 대사를 저해 시 세포 내 *O*-GlcNAc 수식화의 증가 및 EMT marker의 변화가 완화됨[그림 4].



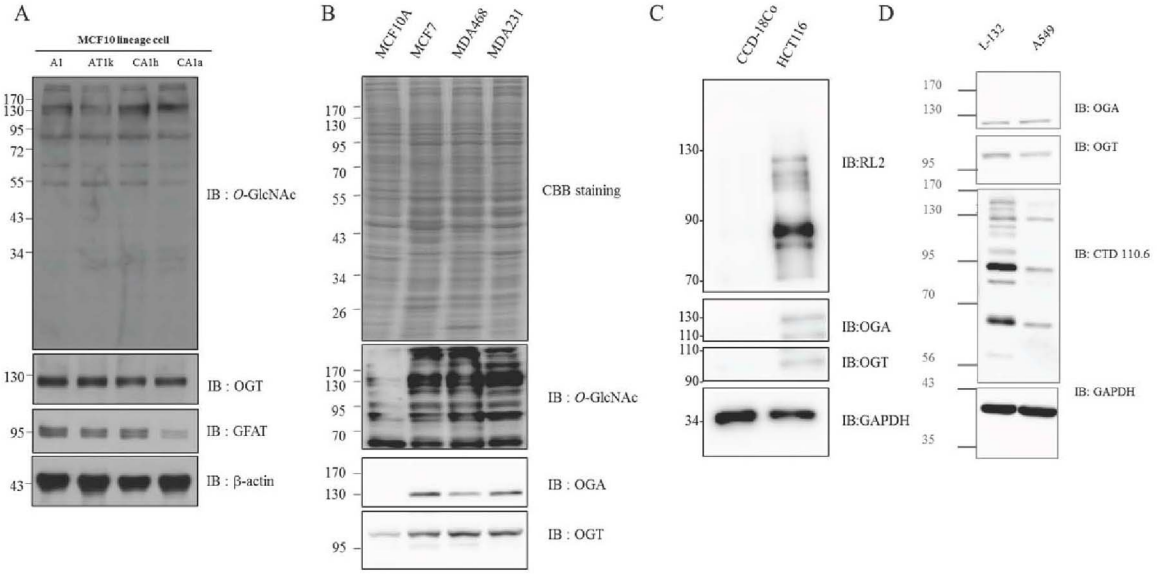
[그림 4. 글리코겐 대사 저해 시 저당조건 하에서 유도되는 암세포의 *O*-GlcNAc 수식화의 증가 및 EMT현상이 완화됨]

- 본 연구진은 앞선 선행연구를 바탕으로 저당조건에서 암세포의 전이가 유도되며, 이는 암세포가 보유한 글리코겐이 세포 내 *O*-GlcNAc 수식화를 증가시킴으로써 일어나는 것이라 추정하였음.

- 지난 3차 년도 동안의 연구는 세포 내의 분자적 수준에서 EMT현상을 확인하였음.

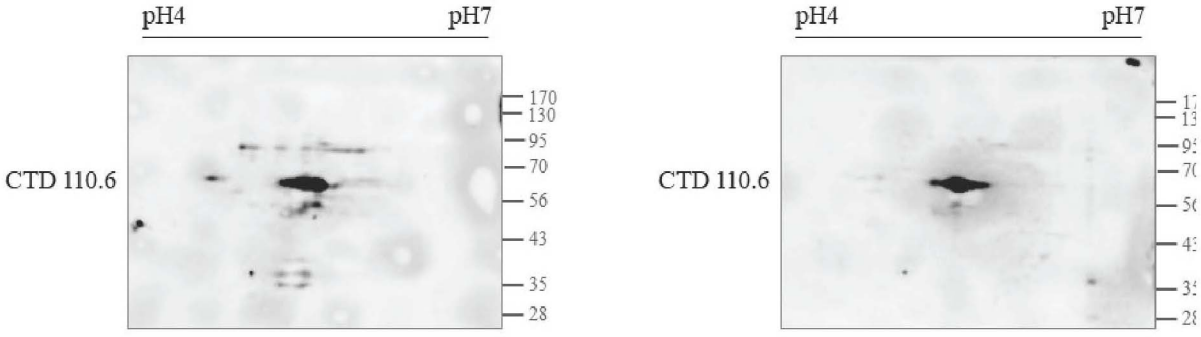
나. 암 특이적 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 DB 구축

- 본 연구진은 지난 3년 동안 다음과 같은 연구를 수행하였음.
- 유방, 대장, 폐 조직으로부터 유래한 정상 세포와 암세포의 *O*-GlcNAc 수식화를 western blotting을 통하여 비교한 결과 유방암 세포인 MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-468과, 대장암 세포 HCT116이 정상 세포와 비교하여 높은 *O*-GlcNAc 수식화 정도를 나타냄[그림 5B,C].
- 또한 이들 세포는 관련 효소인 *O*-GlcNAc transferase(OGT), *O*-GlcNAcase(OGA)의 단백질 양 역시 정상 세포보다 높은 것으로 관찰되었음.
- 반면 H-RAS를 과 발현시켜 암세포로 만든 MCF10CA1h와 CA1a, 폐암 세포주 A549의 경우 일반 세포와 비교하여 *O*-GlcNAc 수식화나 *O*-GlcNAc transferase(OGT), *O*-GlcNAcase(OGA) 효소의 양에 큰 차이가 없거나 오히려 줄어있는 것을 관찰하였음[그림 5A,D].
- 이는 유래한 조직에 따라 *O*-GlcNAc 수식화 양상이 다르게 나타남을 시사함.



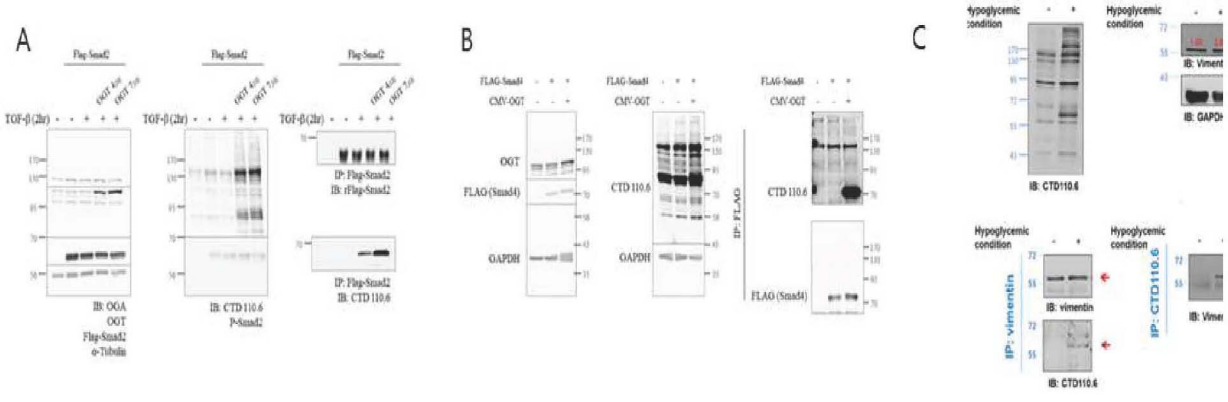
[그림 5. 다양한 조직별 정상 세포와 암세포의 *O*-GlcNAc 수식화 비교]

- 이후 정상 세포 MCF10A와 유방암 세포 MDA-MB-468의 *O*-GlcNAc 수식화 양상을 좀 더 면밀히 관찰하기 위해 이차원 전기영동(2-DE)을 수행한 후, CTD 110.6 항체로 western blotting하여 두 세포 간의 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 pool에 많은 차이가 있음을 입증하였음[그림 5].



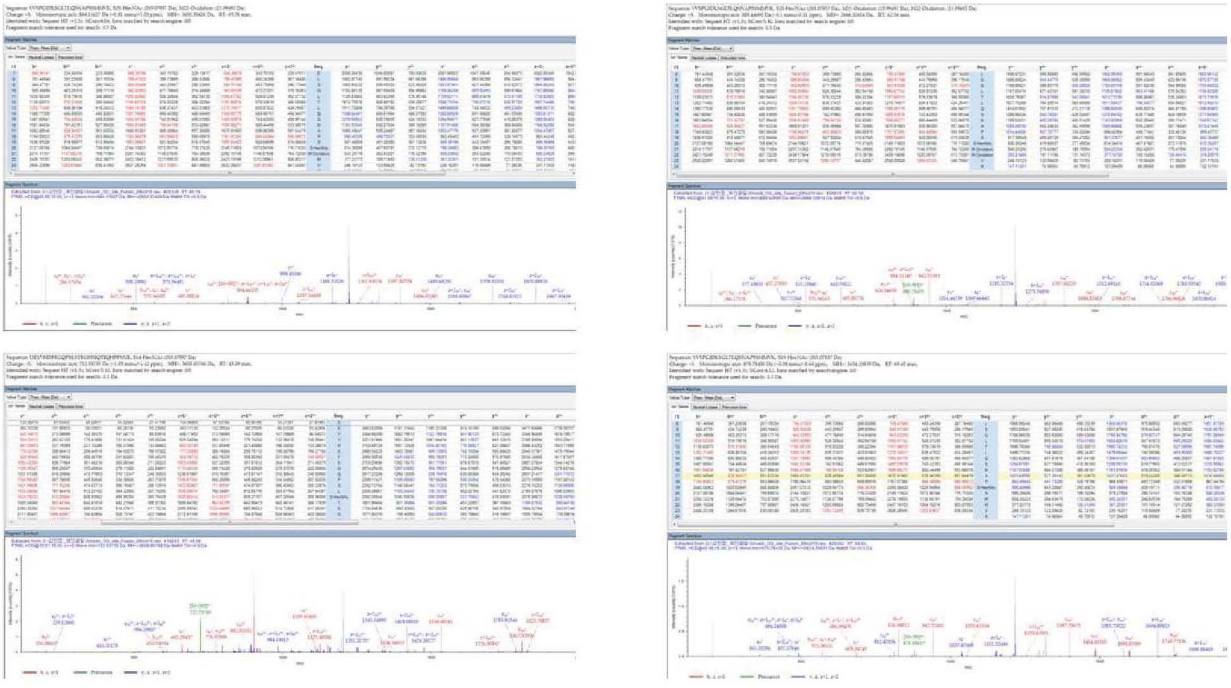
[그림 6 MCF10A 정상 세포와 MDA-MB-468 유방암 세포 내 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 변화]

- 연구를 확장하여 암 전이를 매개하는 EMT(Epithelial-Mesenchymal Transition) 현상을 조절하는 것으로 알려진 SMAD2, SMAD4 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화[그림 7A,B] 및 mesenchymal cell 표지자인 Vimentin 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화[그림 7C]를 면역침강법을 통해 관찰하였음.
- 특히 Vimentin 단백질의 경우 저당 조건에서 *O*-GlcNAc 수식화가 더 증가하는 것을 확인하였음[그림 7C].



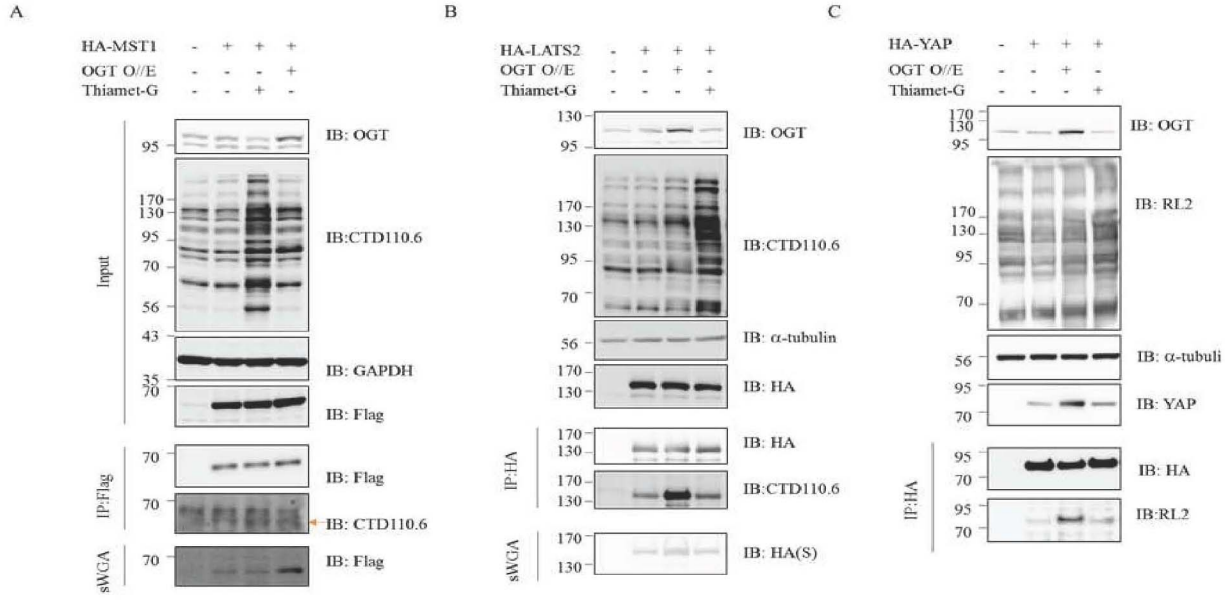
[그림 7. SMAD2, SMAD4, Vimentin 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화]

- 이후 질량분석을 실시하여 SMAD4 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화 위치 세린 69, 154, 155, 173 잔기를 동정하였음[그림 8].



[그림 8. SMAD4 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화 잔기 규명 위한 질량분석]

- Hippo signaling은 인산화에 의해 전달되는 암 전이 및 증식을 매개하는 신호전달경로임.
- 해당 신호전달경로 상의 주요 단백질 MST1, LATS2, YAP 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화를 또한 면역침강법을 통하여 추가로 동정하였음[그림 9A,B,C].



[그림 9. Hippo signaling 경로 상 단백질 MST1, LATS2, YAP 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화]

- 이로써 3차 년도 동안 다수의 신규 *O*-GlcNAc 수식화 단백질을 발굴하였고, 그 기능별로 분류하면 다음과 같음[표 1].

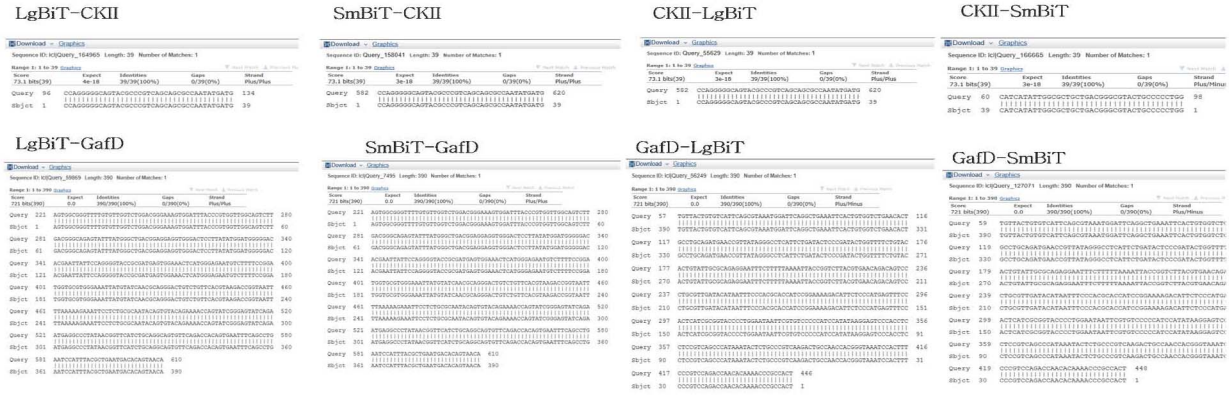
SMAD2	EMT, 전이/이동성, 암세포 생존, Angiogenesis(신생혈관생성)
SMAD4	EMT, 전이/이동성, 암세포 생존, Angiogenesis(신생혈관생성)
Vimentin	EMT, 전이/이동성
MST1	EMT, 전이/이동성, 암세포의 증식, Angiogenesis(신생혈관생성) 억제
LATS2	EMT, 전이/이동성, 암세포의 증식, Angiogenesis(신생혈관생성) 억제
YAP	EMT, 전이/이동성, 암세포의 증식, Angiogenesis(신생혈관생성) 촉진

[표 1. 암세포에서 발굴한 신규 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 및 그 기능별 분류]

- 본 연구진은 지난 3년간 위의 선행 연구 결과를 토대로 조직별로 정상 세포와 암세포에서 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 pool이 달라진다고 결론지을 수 있었음.
- 또한 암의 성격을 결정하는 일부 중요 신호전달경로에서 특정 단백질들이 *O*-GlcNAc 수식화되는 것을 관찰하였음.
- 따라서 지금까지의 결과를 바탕으로 최종적인 데이터베이스를 구축하여 연구 결과를 발표할 것임.

다. *O*-GlcNAc 수식화 Sensor 원천 기술 개발

- 세포내 *O*-GlcNAc 수식화의 변화를 측정하기 위해 NanoLuc Binary Technology (NanoBiT)를 기반으로 하는 bimolecular luminescence complementation (BiLC) based *O*-GlcNAc 수식화 sensor를 제작함.
- NanoBiT system을 기반으로 하는 *O*-GlcNAc 수식화 sensor 제작을 위하여 Promega Korea company에서 제공되는 NanoBiT® PPI Starter Systems를 도입함.
- O-GlcNAc-binding domain 으로는 원생생물 내의 lectin protein 으로 잘 알려진 GafD를 도입하고 O-GlcNAc substrate domain으로는 *O*-GlcNAc 수식화가 일어나는 casein kinase II (CKII) 특정 peptide를 도입함.
- 전년도까지 제작 되어진 6종의 NanoBiT *O*-GlcNAc 수식화 sensor construct 에 추가하여 2종의 NanoBiT *O*-GlcNAc 수식화 sensor construct 를 추가 제작 완료 [그림 10].
-



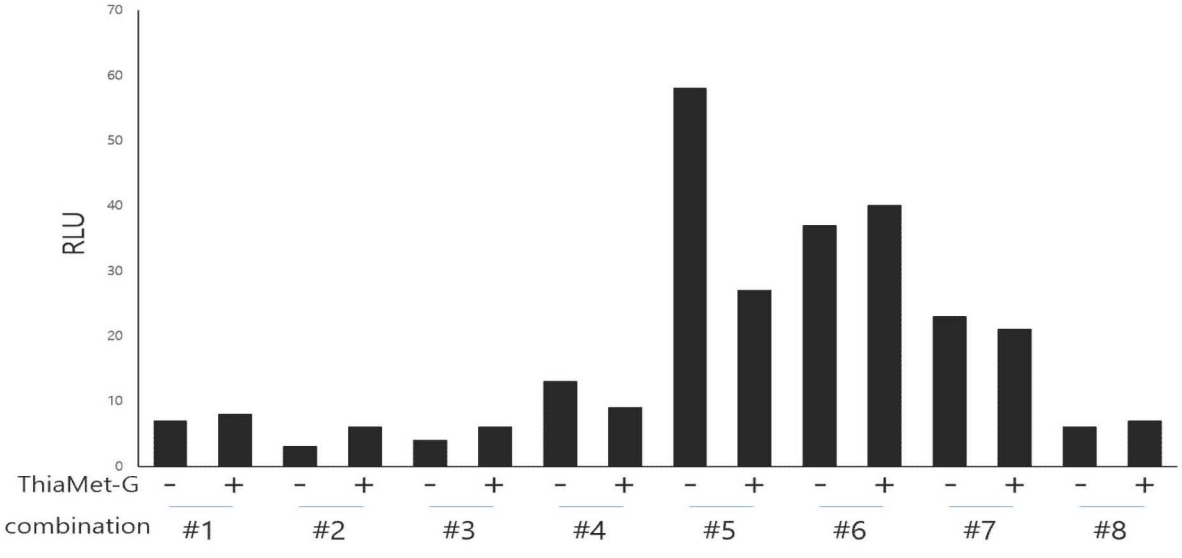
[그림 10. 8종의 NanoBiT *O*-GlcNAc 수식화 sensor constructs]

- 제작되어진 8종의 NanoBiT *O*-GlcNAc 수식화 sensor constructs 를 이용하여 8 종류의 orientation 의 조합 가능 [표 2].

#1 LgBiT-CKII:SmBiT-GafD	#2 CKII-LgBiT:SmBiT-GafD	#3 LgBiT-GafD:SmBiT-CKII	#4 GafD-LgBiT:SmBiTKII
#5 LgBiT-CKII:GafD-SmBiT	#6 CKII-LgBiT:GafD-SmBiT	#7 LgBiT-GafD:CKII-SmBiT	#8 GafD-LgBiT:CKII-BiT

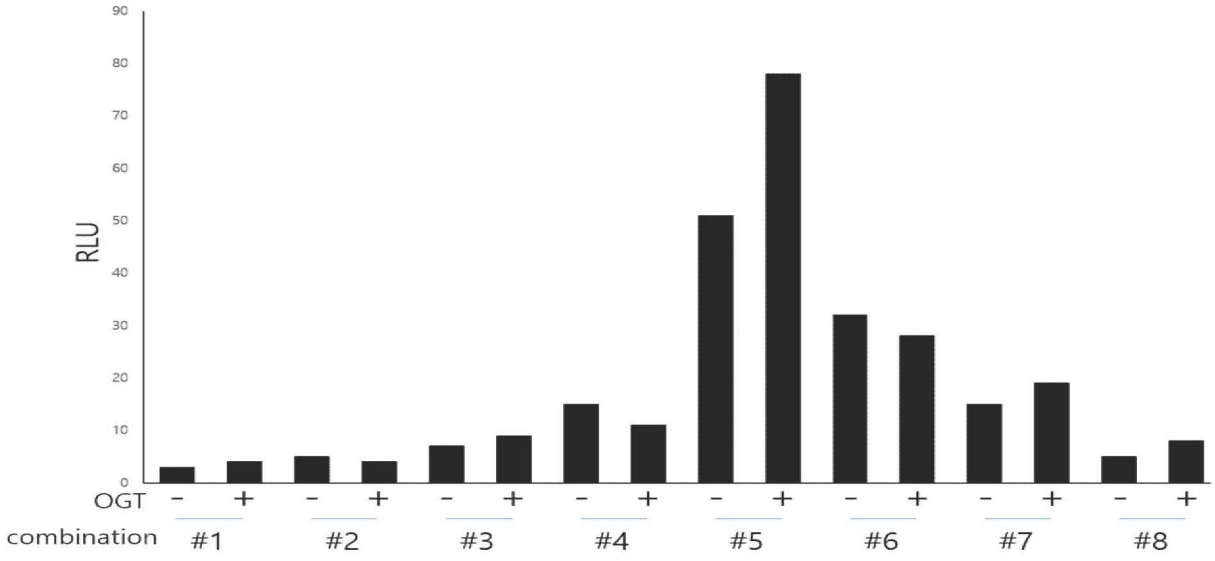
[표 2, combination of 8 kinds NanoBiT *O*-GlcNAc 수식화 sensor constructs]

- HEK 293 세포에 각각 8 종류의 orientation 조합에 따라 NanoBiT *O*-GlcNAc 수식화 sensor constructs를 도입하여 *O*-GlcNAcase inhibitor 인 ThiaMet-G를 처리하여 *O*-GlcNAc 수식화 sensor 로서 적절하게 작동하는지 확인 [그림11]. 조합 #5, #6, #7 으로 HEK 293 세포에 construct 들이 도입이 되었을 때 NanoBiT 의 활성이 나타나는 것을 확인함. 하지만 ThiaMet-G 처리에 의한 *O*-GlcNAc 수식화 증가를 sensor 로서 나타 내지 못함.



[그림11. 8 종류의 orientation 조합에 따른 NanoBiT *O*-GlcNAc 수식화]

- HEK 293 세포에 각각 8 종류의 orientation 조합에 따라 NanoBiT *O*-GlcNAc 수식화 sensor constructs를 도입한 후 OGT를 같이 transfection 하여 나타나는 *O*-GlcNAc 수식화의 증가에 대해 *O*-GlcNAc 수식화 sensor 로서 적절하게 작동하는지 확인함 [그림12]. 전에 시행된 실험결과와 비슷하게 조합 #5, #6, #7 으로 HEK 293 세포에 construct 들이 도입이 되었을 때 NanoBiT 의 활성이 나타나는 것을 확인함. 특히 조합 #5 의 경우 OGT의 과발현에 의해 나타나는 *O*-GlcNAc 수식화가 증가 되었을 때에 *O*-GlcNAc 수식화 sensor 의 활성이 증가 되는 것을 확인 함.



[그림12. 8 종류의 orientation 조합에 따른 NanoBiT *O*-GlcNAc 수식화]

- 이러한 결과들을 바탕으로 LgBiT-CKII 와 GafD-SmBiT NanoBiT *O*-GlcNAc 수식화 sensor constructs를 *O*-GlcNAc 수식화 sensor 로서 적합함을 확인함. 하지만 *O*-GlcNAcase inhibitor 인 ThiaMet-G를 처리에 의한 *O*-GlcNAc 수식화 증가는 NanoBiT *O*-GlcNAc 수식화 sensor에 의해 적절하게 감지되지 않은 점은 보안해야 할 점으로 판단됨.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

가. 목표

(1) 암세포에 존재하는 글리코겐의 분해 억제를 통한 암전이 제어 기술 확보

- 암세포는 contact inhibition에 구애 받지 않고 지속적인 증식이 가능하여, 종양의 중심부에 위치한 암세포의 경우 산소 및 영양물질이 원활히 공급되지 않음.
- 포도당은 암의 증식 및 생존의 가장 중요한 영양요소로 인식되고 있으나 microenvironment 상의 변화와 암의 전이에 대한 연구는 주로 저 산소 조건에서 이루어지고 있으며, 저당조건에 대한 연구보고는 아직 미미함.
- 본 연구진은 저당조건에서 암세포가 보유한 글리코겐이 세포의 생존에 필수적인 ATP의 생산이 아닌*O*-GlcNAc 수식화의 증가에 이용됨을 확인한 바 있음.(Kang JG et al., 2008)
- 또한 암전이와 *O*-GlcNAc 수식화의 연관성은 이미 여러 차례 보고된 바 있음.(Gu Y et al., 2010)
- 따라서 본 연구진은 종양의 중심부에 위치하여 포도당의 공급이 원활하지 못한 암세포의 글리코겐이 *O*-GlcNAc 수식화의 증가에 사용되어 암의 전이를 유도할 것이라는 가설을 세웠음.
- 연구 결과, 암세포 특이적으로 저당조건에서 *O*-GlcNAc 수식화의 증가 및 EMT 마커의 유의미한 변화가 나타났으며, 그러한 변화는 *O*-GlcNAc 전이 효소인 OGT를 knock down 시켰을 때 완화되었음.
- 또한 저당조건에서 glycogen phosphorylase의 양적 증가와 더불어 세포 내의 글리코겐의 양적 감소 역시 확인하였음.
- 암세포의 글리코겐 대사와 *O*-GlcNAc수식화의 증가 그리고 그로 인한 EMT 현상의 연관성을 확인하기 위해 glycogen phosphorylase를 knock down 하거나 glycogen phosphorylase의 저해제를 처리하여 저당조건에서 보여진 *O*-GlcNAc 수식화의 증가와 EMT 마커들의 변화의 완화 여부를 확인였으나 그 완화정도가 미미하였음.
- 사람의 glycogen phosphorylase는 PYGM, PYGB, PYGL의 3가지 형태가 존재하며 각각은 alternative splicing으로 인해 생성되는 isoform이 아니라 각각 다른 염색체에 존재하는 독립적인 유전자의 번역에 의해 합성되어짐.
- 따라서 3가지 glycogen phosphorylase 중 저당조건에서 글리코겐의 분해에 관여하는 주된 glycogen phosphorylase를 확인하기 위해 저당조건에서 PYGM, PYGB, PYGL의 단백질 및 mRNA의 양을 Western blotting과 Real-Time PCR를 통해 확인하였음.
- 또한 각각의 glycogen phosphorylase를 모두 knock down시킬 수 있는 siRNA를 고안하여 Western blotting 및 Real-Time PCR로 테스트하여 그 효율을 확인하였음.
- 고안된 siRNA를 실험에 적용하여 glycogen phosphorylase를 knock down시키고 동시에 glycogen phosphorylase 저해제인 CP-91149를 처리하여 암세포의 글리코겐의 분해를 억제한 뒤 *O*-GlcNAc 수식화와 EMT 마커의 변화를 Western blotting으로 확인하였음.

- 현재 여러 영양물질의 고갈 및 저산소 조건이 암세포의 전이를 유도한다는 여러 연구 보고가 있으나 암의 증식 및 생존의 가장 중요한 영양요소로 인식되고 있는 포도당의 결핍과 암의 전이의 상관관계에 대한 연구는 미흡함.
- 본 연구진은 저당조건에서 암세포의 *O*-GlcNAc 수식화가 증가함을 보고한 바 있으며, 암세포의 전이와 *O*-GlcNAc 수식화의 상관관계에 대한 보고가 학계에 여러 차례 게재된 바 있음.
- 따라서 본 연구진은 암세포의 글리코겐에서 기인한 *O*-GlcNAc 수식화와 암 전이의 상관관계를 밝힘으로써 학계의 새로운 연구방향을 제시하고, 더 나아가 암세포에서 글리코겐 분해를 제어함으로써, 암의 전이를 제어할 수 있는 가능성을 제시하고자 함.

(2) 암 특이적 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 DB 구축

- *O*-GlcNAc 수식화가 암의 증식 및 전이와 밀접한 연관성이 있으며, 일부 암세포의 *O*-GlcNAc 수식화가 정상세포보다 증가되어 있음이 보고된 바 있음. 또한 암과 관련된 여러 단백질에서 *O*-GlcNAc 수식화가 확인 된 바 있음.
- 그러나 현재까지는 암과 관련된 *O*-GlcNAc 수식화 단백질의 정보들이 산재되어 있어 정보의 통합이 요구됨.
- 따라서 이를 위해 본 연구진은 암 특이적 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 DB를 구축하기로 계획하였음.
- 먼저 조직별 암세포와 정상세포간의 *O*-GlcNAc 수식화의 차이를 확인하기 위해 유방, 폐, 대장에서 유래한 정상세포와 암세포의 *O*-GlcNAc 수식화의 차이를 Western blotting을 통해 비교하였으며, 그 차이가 큰 조직을 선정하였음.
- 그 중 유방조직에서 기인된 정상세포 MCF10A와 암세포 MDA-MB-468의 *O*-GlcNAc 수식화 패턴을 보다 면밀히 비교하기 위해 이차원 전기영동(2-DE)를 이용한 Western blotting 방식을 도입하였음.
- 또한 암과 밀접한 연관성을 지니며 *O*-GlcNAc 수식화의 가능성이 보이는 일부 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화를 면역침강법을 통해 확인하였으며 *O*-GlcNAc 수식화 여부를 확인하였으며 최신질량분석법(Fusion Mass Spectrometry)을 통해 수식화 위치를 동정하였음.
- 암 특이적으로 *O*-GlcNAc 수식화가 증가한 단백질의 데이터베이스를 구축하여 좀 더 통합적인 관점에서 *O*-GlcNAc 수식화를 통한 암 제어를 위한 기초 연구를 수행할 수 있는 기틀을 만들었음.

(3) *O*-GlcNAc 수식화 Sensor 원천 기술 개발

- 세포내 *O*-GlcNAc 수식화의 변화를 신속하고 손 쉽게 측정할 수 있는 *O*-GlcNAc Sensor를 제작하기 위한 제반 기술을 확보하기 위해 연구가 시작됨.
- 기존에 Lara K. Mahal 의 연구진에 의하여 FRET-Based Sensor for O-GlcNAc system 이 개발됨을 확인함.(Carrillo LD. et al., 2006) 이러한 *O*-GlcNAc sensor 는 기존 fluorescence resonance energy transfer (FRET) 기술에 *O*-GlcNAc-binding domain 과 O-GlcNAc substrate domain을 접목시킴으로서 개발되어짐.

- 또한 *O*-GlcNAc sensor는 세포 내 *O*-GlcNAc 수식화 변화를 측정하는데에 있어 많은 장점들을 가지고 있지만 전형적인 FRET assay 의 단점들을 여전히 가지고 있음. 비교적 낮은 sensitivity 와 특정 파장의 빛으로 excitation 시키고 특정 파장의 빛을 detect 할 수 있는 기기가 필수적으로 필요한 한계성, 그리고 여러 실험 표본을 측정하기에는 많은 시간이 필요한 낮은 효율성 등을 FRET-Based *O*-GlcNAc sensor 의 단점으로 볼 수 있음.
- 본 연구진은 이러한 FRET-Based *O*-GlcNAc sensor 의 개발 원리를 응용하고 나아가 앞에서 언급된 단점들을 보완하기 위하여 새로운 reporter assay 기술을 도입하여 더욱 발전된 *O*-GlcNAc sensor를 개발할 필요성을 제기함.
- 이러한 reporter assay 기술로서 luminescent 를 기반으로 하는 assay 방법이 본 연구진에서 논의됨.
- luminescent assay 는 fluorescence assay 와 비교하여 superior sensitivity 와 dynamic range를 지니고 있으며 좀 더 간편한 detection 방법을 필요로 하는 장점을 지니고 있음.
- 본 연구진은 *O*-GlcNAc sensor 개발에 적합한 여러 luminescent assay 들을 조사하고 분석한 결과 최근 Promega Biotechnology company에서 개발 되어진 NanoLuc Binary Technology (NanoBiT)가 *O*-GlcNAc sensor 개발에 적용하기에 매우 뛰어난 luminescent assay 방법임을 확인함.
- NanoBiT 은 기존의 전형적으로 단백질간의 interaction을 측정하기 위하여 사용되어지는 Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 실험기법을 luminescent 에 적용한 bimolecular luminescence complementation (BiLC) 실험기법의 일종임.
- 특히 firefly luciferase chemistry 를 기반으로 하는 기존의 BiLC 에 비교하여 NanoBiT 은 최근 Promega Biotechnology company에서 개발한 NanoLuc® luciferase 가 기존의 BiLC 에적용된 일종의 Next generation BiLC 로 개발됨.
- NanoLuc® luciferase(NanoBiT® PPI Starter Systems, Promega)는 기존의 luciferase 인 Firefly luciferase 나 Renilla luciferase 와 비교하여 19kD 으로 매우 적고 monomeric 이며 어떠한 PTM을 가지고 있지 않으며 매우 강한 빛의 세기를 가짐. 이러한 특성들은 hinderic effect 가 적고 높은 sensitivity 와 dynamic range를 보여줌.
- 또한 안정적인 신호를 발생시키며 낮의 빛의 파장 길이에서 좁은 emission spectrum을 가진다는 장점을 지님.
- 본 연구진에서는 이러한 NanoBiT system 에 *O*-GlcNAc-binding domain 과 *O*-GlcNAc
- substrate domain을 적용하여 좀 더 효율적이고 민감하며 손 쉬운 *O*-GlcNAc sensor를 개발할 것을 목표로 진행하였음.
- NanoBiT *O*-GlcNAc Sensor 에 대한 expression constructs를 제작하였고, NanoBiT expression constructs를 mammalian cell culture system에 도입하였음.
- *O*-GlcNAc Sensor로서 활성 측정을 하여 Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor 에 대한 최적 NanoBiT expression constructs 조합 orientation 선정 및 여러 종류의 cell culture system 도입 가능 여부, 최적 Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor 작동 condition 구축을 목표로 함.
- NanoBiT expression *O*-GlcNAc sensor constructs 제작하여 NanoBiT *O*-GlcNAc sensor system을 구축함.

- 최적화된 NanoBiT *O*-GlcNAc sensor를 이용한 *O*-GlcNAc 수식화가 세포활성 및 생리활성에 미치는 영향 연구함.

나. 목표 달성여부

(1) 연구개발의 최종목표

(가) 암세포에 존재하는 글리코겐의 분해 억제를 통한 암전이 제어 기술 확보

- 본 연구진은 지난 연구개발 기간 동안 악성 암세포 내에 과량으로 존재하는 글리코겐이 포도당 결핍 시 *O*-GlcNAc 수식화의 재료로 사용되어, 암전이 초기 단계인 EMT를 유도하는 것을 분자적 수준에서 확인한 바 있음.
- 따라서 이 후 연구기간 동안 암세포가 보유한 글리코겐이 암의 전이에 미치는 영향을 현상학적으로 확인하기 위해 글리코겐 대사를 저해시킨 뒤 암세포의 이동성 및 침윤성을 확인하고자 함.
- 선정연도 당시 글리코겐 대사를 억제하는 두 가지 방법으로 glycogen phospholyase를 knock down시키는 방안과 저해제를 처리하는 방안을 제안하였으며, 각각의 방법으로 글리코겐이 암의 전이에 미치는 영향을 이중으로 확인하고자 계획하였음.
- 그러나 MDA-MB-468세포주에서 각각의 방안을 단독으로 적용하여 실험한 결과 *O*-GlcNAc 수식화의 변화 및 EMT마커의 변화가 미미하였음.
- 이를 해결하기 위해 두 방안을 복합적으로 적용하여 glycogen phospholyase의 양과 활성을 모두 줄인 결과 저당조건에서 유도되는 *O*-GlcNAc 수식화의 증가 및 EMT현상이 완화됨.
- 따라서 본 연구진은 직접 고안한 siRNA를 사용하여 저당조건에서 증가하는 glycogen phospholyase인 PYGB, PYGL를 선택적으로 knock down시키고 동시에 저해제인 CP-91149를 처리하여 암세포의 침윤성 및 이동성의 변화를 확인하는 것을 최종 목표로 함.

(나) 암 특이적 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 DB 구축

- 다양한 암에서 *O*-GlcNAc 수식화 정도와 *O*-GlcNAc transferase(OGT) 효소 발현이 증가한다고 알려져 있음.
- 하지만 어떠한 단백질 pool이 암세포에서 *O*-GlcNAc 수식화되며, 또 그 기능 변화로 암세포로의 형질전환을 일으키는가에 관해서 거시적인 수준에서 연구를 진행한 바는 전무함.
- 따라서 본 연구진은 보다 융합적인 시각에서 암 발생 및 전이의 원인을 표적 단백질들의 비이상적인 *O*-GlcNAc 수식화에서 찾았고, 따라서 암 특이적으로 나타나는

O-GlcNAc 수식화 단백질 DB를 확보할 계획임.

- 이를 위해 실제 암세포에서 *O*-GlcNAc 수식화 혹은 *O*-GlcNAc transferase(OGT), *O*-GlcNAcase(OGA) 효소 발현이 증가해 있는지 확인하였고, 면역침강법과 프로테오믹스 기법을 접목하여 *O*-GlcNAc 수식화 단백질들을 선별하였음.
- 선별된 *O*-GlcNAc 수식화 단백질들은 그 기능별로 분류하여 DB 구축 중에 있음.
- 구축된 데이터베이스를 바탕으로 암의 발달과 전이에 특이적인 *O*-GlcNAc 수식화 신호전달 체계의 분자생리학적 연관성 및 작용기전을 규명을 최종 목적으로 함.

(다) *O*-GlcNAc 수식화 Sensor 원천 기술 개발

- Promega Biotechnology company에서 개발한 Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 와 luminescent assay를 기반으로 하는 NanoLuc Binary Technology (NanoBiT)을 *O*-GlcNAc sensor 개발에 적용함.
- Firefly luciferase chemistry 를 기반으로 하는 기존의 BiLC 에 비교하여 NanoBiT 은 최근 Promega Biotechnology company에서 개발한 NanoLuc® luciferase 가 도입됨으로서 낮은 hinderic effect, 높은 sensitivity, 높은 dynamic range 라는 장점을 가짐.
- NanoBiT system 에 *O*-GlcNAc-binding domain 과 *O*-GlcNAc substrate domain을 도입하여 *O*-GlcNAc 수식화 변화를 감지할 수 있는 *O*-GlcNAc sensor system을 구축하고자 함.
- 새로운 방식의 클로닝 기술을 도입하여 8종류의 NanoBiT expression constructs를 제작하였음.
- 제작된 NanoBiT expression constructs를 이용한 8 종류의 조합에 대한 활성 조사 및 *O*-GlcNAc 수식화 변화에 대한 민감도 최적화 조건을 확인함.
- HEK 293세포에 도입되는 NanoBiT expression constructs 의 최적 용량 및 , 다양한 transfection reagent test 및 최적 농도 확인 등을 통하여 최적의 활성도를 보이는 조건 규명함.
- NanoBiT expression constructs 에 다양한 길이와 종류의 linker domain을 도입하여 *O*-GlcNAc 수식화 변화에 따른 *O*-GlcNAc Sensor 에 대한 민감도를 최적화함.
- *O*-GlcNAc sensor 를 이용하여 세포의 생리활성 및 암 발생 같은 질병 모델에서의 *O*-GlcNAc 수식화 변화를 효율적이고 민감하게 동정하고,
- *O*-GlcNAc 수식화 변화를 야기하는 세포나 조직의 상태 및 천연 또는 인공 화합물에 대한 동정에 *O*-GlcNAc sensor 를 이용하여 분석하는 것을 최종 목표로 함.
- 또한 NanoBiT *O*-GlcNAc sensor system 구축 하여 *O*-GlcNAc 수식화 변화를 측정하는 기술 개발을 통한 세포활성 및 각종 질병에 관련된 *O*-GlcNAc 수식화 연구 가능성을 제시할 수 있음.

(2) 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	선별된 세포주의 *O*-GlcNAc 수식화 제어와 글리코겐 양 측정	• OGT knock down과 glycogen phosphorylyase knock down stable cell line 구축
	프로테오믹스 기법의 수행 및 암 특이적 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 DB 구축	• 유방암, 대장암, 췌장암 세포 주 등에서 *O*-GlcNAc 수식화 변화 확인
	Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor (NBOS) 원천 기술 개발	• Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor (NBOS)에 필요한 모든 종류의 NanoBiT expression constructs 제작
2차년도	OGT knock down과 유방암세포주의 전이 연구	• nude mouse를 이용하여 OGT를 knock down 했을 때 유방암세포주의 전이성 확인
	암 특이적 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 작용기전 규명	• 구축된 DB 내 *O*-GlcNAc 수식화 변화 단백질의 신호전달 체계 분류 • 타겟 단백질의 저해제 및 발현 억제를 통한 기능 규명
	Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor (NBOS) 원천 기술 개발 및 응용	• Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor (NBOS) 원천 기술 개발을 위하여 각 NanoBiT expression construct 들의 조합 및 최적의 sensor system condition 구축
3차년도	glycogen phosphorylase knock down cell line 구축	• glycogen phosphorylase knock down된 유방암 세포주를 nude mouse에 주입 후 전이성 추적 관찰
	암 특이적 *O*-GlcNAc peptide 규명	• 타겟 단백질의 암 특이적 *O*-GlcNAc 수식화 peptide 확보 • Mutagenesis 기법을 통한 *O*-GlcNAc peptide의 기능 검증
	Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor (NBOS) 원천 기술 개발 및 응용	• NanoBiT *O*-GlcNAc sensor를 이용한 *O*-GlcNAc 수식화연구

(3) 계획대비 달성도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	암 특이적 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 DB 구축	• 유방암, 대장암 세포주에서 *O*-GlcNAc 수식화 증가 확인함.	100%
		• 유방암, 대장암 세포주에서 *O*-GlcNAc 관련효소의 발현량이 증가한 것 관찰함.	100%

		• 동정한 SMAD2, SMAD4, MST1, LATS2, YAP, Vimentin 단백질을 기능별로 카테고리화 하였음.	100%
		• SMAD4의 트레오닌 59, 62, 63, 세린 69, 154, 155, 173 잔기의 *O*-GlcNAc 수식화 발굴함.	100%
2	Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor (NBOS) 에 필요한 모든 종류의 NanoBiT expression constructs 제작	• 8 종류의 NanoBiT expression constructs 제작 완료함.	100%
3	Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor (NBOS) 원천 기술 개발을 위하여 각 NanoBiT expression construct 들의 조합 및 최적의 sensor system condition 구축	• 최적 NanoBiT expression constructs 조합 확인 함.	70%
4	선별된 세포주의 *O*-GlcNAc 수식화 제어와 글리코겐 양 측정	• 저당 조건 하에서 암세포 특이적으로 *O*-GlcNAc 수식화가 증가함을 확인함. • 저당조건하에서 두 암세포의 글리코겐 보유량이 감소함을 확인함.	100%
5	OGT knock down과 유방암세포주의 전이 연구	• OGT knock down시 저당조건하에서 유도되는 EMT마커의 변화가 완화됨을 확인함. • OGT knock down시 암세포의 전이가 억제된다는 연구결과가 보고된 바 있으므로 세부 연구개발 내용을 저당조건이라는 특정 조건으로 수정하여 수행하였음.	100%
6	glycogen phosphorylase knock down cell line 구축	• glycogen phosphorylase knock down cell line은 구축하였으나 knock down 만으로는 저당조건에서 나타나는 암세포의 EMT 현상이 저해되지 않았음. • 이를 해결하기 위해 저당조건에서 증가하는 glycogen phosphorylase의 type을 규명하여 knock down 시키고 이와	80%

		함께 저해제인 CP-91149을 복합적으로 처리하여 암세포의 EMT 현상의 저해를 유도하였음.	

(4) 연구목표 중요도

번호	세부연구목표	가중치
1	Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor (NBOS) 원천 기술 개발을 위하여 각 NanoBiT expression construct 들의 조합 및 최적의 sensor system condition 구축	20%
2	NanoBiT *O*-GlcNAc sensor를 이용한 *O*-GlcNAc 수식화연구	20%
3	OGT knock down과 유방암세포주의 전이 연구	20%
4	선별된 세포주의 *O*-GlcNAc 수식화 제어와 글리코겐 양 측정	10%
5	암 특이적 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 DB 구축	30%
계		100%

다. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 본 연구진은 Glycogen phosphorylase의 효율적 억제를 위해 siRNA system을 도입하여,저당조건에서 발현량이 증가한 암세포의 PYGB, PYGL를 효율적으로 저해하는 데 성공했음.
- 그 후 유방암세포주의 전이 능력이 *O*-GlcNAc수식화에 의해 조절됨을 밝하기 위해 in vivo, nude mouse를 이용한 실험을 2차 년도에 계획하였으나, 유사한 내용의 연구 결과가 학계에 보고된 바 있음. 더불어 Nude mouse 실험을 위한 IRB심의 및 동물실험실 준비에 일정 시일이 소요 됨.
- 따라서 2차 년도 세부 연구개발 내용을 수정하여, 저당 조건에서 siRNA로 OGT를 Knock down하는 방식을 적용하여, *O*-GlcNAc수식화 제어가 저당조건에서 유도되는 암세포의 전이 능력을 완화시킴을 분자적 수준에서 밝히었음.
- 암 환경 특이적 *O*-GlcNAc수식화 단백질 DB를 구축하기 위한 발굴 및 선별 작업 중에 있음. 발굴된 단백질 모두는 세계 최초의 발굴이며 정확도가 우수하지만 그 수가 적은 단점이 있음.
- 이는 1차, 2차년도 O-GlcNAc수식화 단백질 발굴이 bottom-up 방식으로 이루어져 왔던 데 요인이 있음.
- 그러나 3차 년도부터 질량분석기술을 기반으로 한 top-down 방식으로 진행하여 대량의 신규 단백질을 발굴하고, 기존의 발굴 방식을 이용해 검증하는 방식으로 정확도를 높이었

음.

- 기술적 문제로 인해 구축에 실패했던 2종류의 NBOS constructs [smBiT-CKII, CKII-SmBiT]를 제작하기 위해 새로운 cloning 기법을 도입하였음.
- 그 결과 성공적으로 총 8종류의 constructs를 구축하였음. 그러나 각 constructs의 조합으로 진행 된 Sensor test 결과 민감성이 불충분하다고 판단하였음. 따라서 4차년도에서는 OGA 저해제 뿐 아니라 OGT 저해제 및 Etoposide와 같은 항암제 약물을 이용하여 Sensor의 작동 여부를 확인할 예정이었음.
- 본 연구 과제의 목표는 대부분 달성되었고 간단한 몇 가지 실험결과와 현재 확보된 연구결과로 특허출원 및 논문 발표 계획을 갖고 있음.

4. 연구개발성과의 활용 계획 등

- 2010년 이후로 꾸준히 *O*-GlcNAc 수식화 증가가 암의 일반적 특징으로 분류되는 가운데, 본 연구진은 *O*-GlcNAc 수식화 제어 기술 개발을 통한 암 진단 및 치료 기술 개발을 골자로 한 연구들을 수행하고 있음.
- 먼저 본 연구진은 암세포의 글리코겐 보유량이 증가해있고, 이는 결과적으로 *O*-GlcNAc 수식화 증가를 야기하여 암 전이를 촉진하는 여러 표지자 단백질들을 조절한다는 것을 규명하였음.
- 이러한 발견을 구체화하여 암세포가 글리코겐을 분해하는 것을 siRNA나 저해제 처리를 통하여 방해했을 때 암 전이가 완화되는 것을 관찰함.
- 해당 연구는 글리코겐 대사 억제를 통하여 *O*-GlcNAc 수식화를 제어하여 암 전이를 조절하는 연구로 발전시킬 수 있음.
- 또한 암세포의 글리코겐 양이나 관련 효소의 활성 및 발현 정도를 측정하여 향후 암 바이오마커로써 활용할 수 있음.
- *O*-GlcNAc 수식화가 암의 전이뿐만 아니라 정상 세포에서 암세포로의 형질 전환 및 증식, 신생혈관생성, 침윤 등 여러 면에서 조절하는 만큼 암의 다양한 표현형을 제어할 수 있는 연구로의 확대 적용이 가능하므로 미래원천기술로서 가능성이 있음.
- 또한 본 연구진은 저당 조건에서 글리코겐 분해에 주효하게 기능하는 glycogen phosphorylase가 PYGB, PYGL임을 규명하였는데, 해당 동위체들을 억제하기 위해 디자인한 siRNA 서열은 매우 효과적이라 특허 출원 및 치료 기술로도 활용이 가능함.
- 이에 더해 글리코겐 대사 효소를 표적하여 암을 치료하는 연구로 확장 시킬 수 있음.
- 암과 *O*-GlcNAc 수식화의 상관성에 관한 종래의 연구는 특정 수식화 단백질의 기능 변화에 치중하여 진행되어왔음.
- 하지만 암의 성질이나 원인을 하나로 정의 내리는 것이 불가능하듯, 개별 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화 변화만으로 암의 발생 및 발전 기전을 설명하기에는 한계가 있음.
- 거시적인 시각에서 정상 세포와 비교하여 암세포 특이적인 *O*-GlcNAc 수식화 단백질의 데이터베이스를 구축하는 것은 산재한 정보들을 통합하고, 또 이를 발전시켜 암세포만을 대상으로 하는 항암제 개발을 위한 연구에 응용할 수 있음.
- 그러한 의미에서 암의 전이를 유도하는 것으로 알려진 저당 조건을 처리한 암세포주에서 *O*-GlcNAc 수식화 단백질군은 암 질환 관련 바이오마커로 발전시켜 특허 출원과 산업화로의 이용이 가능함.
- 향후 암세포에서 해당 단백질들의 *O*-GlcNAc 수식화 결함 돌연변이체를 연구하여 새로운 항암 후보군에 관한 유의미한 정보를 제공하리라 사료됨.
- 보다 더 정확하고 효율적인 *O*-GlcNAc 수식화 검출 방법을 위한 연구는 1980년대 처음 *O*-GlcNAc 수식화가 학계에 보고된 이후로 현재까지 미해결 분야임.
- 본 연구진이 개발 중에 있는 Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor (NBOS) 원천 기술은 실시간으로 실험자에게 대상 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화나 시료 내 전체적인 *O*-GlcNAc 수식화에 관련한 정확한 정보를 제공해준다는 데 그 가치가 있음.
- 해당 원천 기술은 다양한 천연물이나 화합물 library에서 암 전이를 효과적으로 억제할 수 있는 후보군을 단시간에 민감하게 스크리닝하는 기술로 발전이 가능함.
- 또한 구축된 암 특이적 *O*-GlcNAc 수식화 단백질 데이터베이스에서 프로파일링 된 특

정 단백질이 실제로 정상 세포와 암세포에서 *O*-GlcNAc 수식화 차이를 보이는지를 검증하는 좋은 도구로 활용할 수 있음.

- Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor (NBOS) 원천 기술은 신속하며 정확하게 개별 단백질 및 시료의 *O*-GlcNAc 수식화 검출을 가능케 하는 혁신적인 것으로, 제반 기술을 확보하여 특허 출원과 기술 이전하여 *O*-GlcNAc 수식화 연구를 위한 기반을 제공할 수 있으리라 기대함.
- 또한 여러 천연물 및 화합물 library에서 암의 다양한 표현형을 억제할 수 있는 신약 예비 후보군을 스크리닝하는 동시에, 여러 암 조직별로 검증된 항암제의 실효성 테스트를 위한 도구로 응용될 수 있음.
- Nano Bit *O*-GlcNAc Sensor (NBOS) 기술은 실시간으로 살아있는 세포에서도 *O*-GlcNAc 수식화 검출을 가능하게 해주며, 기존 lectin이나 항체를 이용한 enrichment 과정이 필요 없이 시간, 비용 효율적인 면에서 많은 연구자의 needs를 충족시키는 훌륭한 모델이 될 수 있으리라 예상됨.

참고문헌

1. Ali A. et al. O-GlcNAcylation of NF-κB Promotes Lung Metastasis of Cervical Cancer Cells via Upregulation of CXCR4 Expression. *Molecules and Cells*. **40(7)**, 476-484. (2017).
2. Carrillo LD. et al. A cellular FRET-based sensor for beta-O-GlcNAc, a dynamic carbohydrate modification involved in signaling. *J Am Chem Soc* 128:14768-14769. (2006)
3. Gu Y. et al. GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res*. **70(15)**, 6344-51. (2010).
4. Hanover JA. et al. O-GlcNAc in cancer: An Oncometabolism-fueled viscious cycle. *J Bioenerg Biomembr*. (2018). https://doi.org/10.1007/s10863-018-9751-2
5. Harosh-Davidovich SB & Khalaila I. O-GlcNAcylation affects β-catenin and E-cadherin expression, cell motility and tumorigenicity of colorectal cancer. *Exp Cell Res*. **364(1)**, 42-49. (2018)
6. Jang TJ & Kim UJ. O-GlcNAcylation is associated with the development and progression of gastric carcinoma. *Pathol Res Pract*. **212(7)** 622-30. (2016)
7. Jiang S. et al. A novel lectin from Agrocybe aegerita shows high binding selectivity for terminal N-acetylglucosamine. *Biochem J*. **443(2)**, 369-378. (2012)
8. Kang JG. et al. *O*-GlcNAc protein modification in cancer cells increases in response to glucose deprivation through glycogen degradation. *J Biol Chem*. **284(50)**, 34777-84. (2009).
9. Kim DI. et al. BioSITe: A Method for Direct Detection and Quantitation of Site-Specific Biotinylation. *J Proteome Res*. **17(2)**, 759-769. (2018)
10. Kim MJ. et al. O-GlcNAcylation of NF-κB Promotes Lung Metastasis of Cervical Cancer Cells via Upregulation of CXCR4 Expression. *Molecules and Cells*. **40(7)**, 476-484. (2017).
11. Kim SH. et al. O-linked-N-acetylglucosamine transferase is associated with metastatic spread of human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins to the lungs of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. **483(2)**, 793-802 (2017)
12. Lamar JM. et al. The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109(37)**, E2441 - E2450. (2012).
13. Liu W. et al. AANL (Agrocybe aegerita lectin 2) is a new facile tool to probe for O-GlcNAcylation. *Glycobiology* (2018). https://doi.org/10.1093/glycob/cwy029
14. Liu Y. et al. Suppression of OGT by microRNA24 reduces FOXA1 stability and prevents breast cancer cells invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. **487(3)**, 755-762. (2017).
15. Park SY. et al. Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *Embo J*. **29(22)**, 3787-3796. (2010)
16. Shen B. et al. A novel strategy for global mapping of O-GlcNAc proteins and

peptides using selective enzymatic deglycosylation, HILIC enrichment and mass spectrometry identification. *Talanta*. **169**, 195-202. (2017).

17. Shin H. et al. O-GlcNAcylation of the tumor suppressor FOXO3 triggers aberrant cancer cell growth. *Cancer Res.* **78(5)**, 1214-24 (2018)
18. Wang T. et al. O-GlcNAcylation of fumarase maintains tumour growth under glucose deficiency. *Nat Cell Biol*. **19(7)**, 833-843. (2017).
19. Yang WH et al. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol*. **8(10)**, 1074-83. (2006)
20. Yang Y. et al. Label-free electrochemical biosensing of small-molecule inhibition on O-GlcNAc glycosylation. *Biosens Bioelectron*. **95**, 94-99. (2017).