NM-3

신경세포 리모델링의 신호전달체계 규명을 통한 뇌기능항진기술 개발

Studies on the Structural Remodelling of Neurons

서울대학교

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “신경세포 리모델링의 신호전달체계 규명을 통한 뇌기능항진기술 개발 ”의 보고서로 제출합니다.

2009. 5 . 30

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 박동은

연 구 원 : 송상호
〃 : 이승준
〃 : 조용철
〃 : 양수정

협동연구기관명 : 광주과학기술원
한림대학교

협동연구책임자 : 장성호
허성오

보고서 초록

<table>
<tr><td>과제관리번호</td><td>NM-1</td><td>해당단계
연구기간</td><td>2단계</td><td>단계 구분</td><td>2단계 / 총3단계</td></tr>
<tr><td rowspan="2"><u>연구사업명</u></td><td>중 사 업 명</td><td colspan="4">뇌기능 활용 및 뇌질환 치료기술 개발연구사업</td></tr>
<tr><td>세부사업명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구과제명</td><td>중 과 제 명</td><td colspan="4">신경세포 리모델링의 신호전달체계 규명을 통한 뇌기능항진기술 개발</td></tr>
<tr><td>세부(단위)과제명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td>연구책임자</td><td>박동은</td><td>해당단계
참여연구원수</td><td>총 : 56 명
내부 : 3 명
외부 : 53 명</td><td>해당단계
연구비</td><td>정부: 925,000 천원
기업: 천원
계: 925,000 천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소속부서명</td><td colspan="2">서울대학교 생명과학부</td><td colspan="2">참여기업명</td><td></td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="5">상대국명 : 상대국연구기관명 :</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="5">연구기관명 : 연구책임자 :</td></tr>
<tr><td colspan="4">요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)</td><td>보고서
면수</td><td>52</td></tr>
<tr><td colspan="6">신경세포의 구조변화(remodeling)는 다양한 환경 및 신호인자들 (extracellular signals)에 의해 유도되며, 이는 곧 신경세포의 기능적 변화로 이어진다. 이러한 신경세포의 구조변화는 또한 퇴행성뇌질환, 학습장애 및 정신발달장애(mental retardation)와 같은 뇌질환의 원인이 되기도 한다. 따라서 본 연구는 신경세포의 구조변화 (remodeling)를 유발하는 세포신호전달체계의 연구를 통하여 신경세포의 구조 및 기능을 조절할 수 있는 표적단백질을 발굴하고, 이를 이용하여 신경세포의 기능에 이상이 있는 동물 및 세포모델 시스템을 개발함으로써 궁극적으로 뇌질환치료 및 뇌기능항진 방법 개발에 기반을 제공함을 목표로 하였다. 이를 위하여, 제 1 세부과제는 흥분성 신경세포의 시냅스 형성 및 시냅스 가소성에 중요한 dendritic spine의 remodeling에 필수적으로 수반되는 액틴세포골격근 조절의 핵심기전인 Rac GTPase 신호전달경로를 βPix, Abi-1, CaMKII 등을 중심으로 연구하여 그 분자적 조절기작을 규명하였고, 이를 기반으로 dendritic spine의 조절에 이상이 있는 동물/세포 모델을 개발하였다. 제 2 세부과제는 신경세포의 구조적 변화에 수반하여 receptor recycling등의 기능적 변화를 유도하는 endocytosis 조절인자인 sorting nexin family의 신경세포 기능조절에서의 역할을 규명하였고, 이들과 β-Pix 신호전달체계와의 연관성 연구를 통하여 dendritic spines의 morphogenesis 및 metabotropic glutamate receptor 의존적 신경가소성의 분자적 조절기전을 규명하였다. 제 3 세부과제는 신경세포의 구조변화를 유발하는 생활성 라이소지질 (lysophospholipid) 에 의한 신경세포 특이적 신호전달체계를 규명하였고, 라이소지질에 의한 뇌 세포내 신경신호전달과정이 변형된 형질전환 마우스를 개발하여, 변화된 행동양상을 분석함으로써, 새로운 뇌 활성기능 물질로서 대두되고 있는 라이소지질의 작용 기작을 규명하였다.</td></tr>
<tr><td rowspan="2">색 인 어
(각 5개 이상)</td><td>한 글</td><td colspan="4">dendritic spine, βPix, SPIN90/18/14, 시냅스, 생활성 라이소지질</td></tr>
<tr><td>영 어</td><td colspan="4">dendritic spine, βPix, SPIN90/18/14, synapse, lysophospholipids</td></tr>
</table>

요 약 문

Ⅰ. 제 목

신경세포 리모델링의 신호전달체계 규명을 통한 뇌기능항진기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

신경세포의 구조변화(remodeling)는 다양한 환경 및 신호인자들 (extracellular signals)에 의해 유도되며, 이는 곧 신경세포의 기능적 변화로 이어진다. 이러한 신경세포의 구조변화는 퇴행성뇌질환, 학습장애 및 정신발달장애(mental retardation)와 같은 뇌질환의 원인이 되기도 한다. 따라서 본 연구는 신경세포의 구조변화(remodeling)를 유발하는 세포신호전달체계의 연구를 통하여 신경세포의 구조 및 기능을 조절할 수 있는 표적단백질을 발굴하고, 이를 이용하여 신경세포의 기능에 이상이 있는 동물 및 세포모델 시스템을 개발함으로써 궁극적으로 뇌질환치료 및 뇌기능항진 방법 개발에 기반을 제공함을 목표로 한다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1) 제1세부과제 : 본 연구는 Rho GTPase 신호전달체계를 중심으로 dedritic spine의 형태변화, 생성 및 소멸을 조절하는 신호 전달 기전을 규명하고, dendritic spine의 이상과 관련된 신경계질환의 원인을 규명하며, 이를 통하여 뇌기능항진을 위한 표적단백질을 발굴하는데 목표를 두었다. 특히, dendritic spine의 remodeling에 필수적으로 수반되는 액틴세포골격근 조절의 핵심기전인 Rac GTPase 신호전달경로를 βPix, Abi-1, CaMKII 등을 중심으로 연구하여 그 분자적 조절기작을 규명하였고, 이를 기반으로 dendritic spine의 조절에 이상이 있는 동물/세포 모델을 개발하였다.
2) 제2세부과제 : 본 연구는 두뇌의 학습능력과 기억의 초기형성을 조절하는 해마(hippocampus)의 구성 세포들 간에 형성된 시냅스에서 장기상승작용(LTP)과 장기억제작용(LTD) 형성의 핵심기작인 신경전달물질분비기전 및 시냅스낭의 재순환과정에 관여하는 actin 및 actin 조절 단백질들간의 상호작용기작을 규명하고 신경세포의 구조적 변화에 수반하여 receptor recycling등의 기능적 변화를 유도하는 endocytosis 조절인자인 sorting nexin family의 신경세포 능조절에서의 역할을 규명하였고, 이들과 β-Pix 신호전달체계와의 연관성 연구를 통하여 dendritic spines의 morphogenesis 및 metabotropic glutamate receptor 의존적 신경가소성의 분자적 조절기전을 규명하였다.
3) 제3 세부과제 : 신경세포의 구조변화를 유발하는 생활성 라이소지질

(lysophospholipid) 에 의한 신경세포 특이적 신호전달체계를 규명하였고, 라이소지질에 의한 뇌 세포내 신경신호전달과정이 변형된 형질전환 마우스를 개발하여, 변화된 행동양상을 분석함으로써, 새로운 뇌 활성기능 물질로서 대두되고 있는 라이소지질의 작용 기작을 규명하였다.

Ⅳ. 연구개발결과

제 1공동연구에서는 βPix의 isoform에 따라 신경세포에서 다르게 나타나는 그 분포와 기능의 차이를 규명하였으며, 특별히 βPix-a와 b가 신경세포 dendritic spine 형성에 미치는 차이를 명확히 규명하였다. 또한, βPix-b에서 598번째 tyrosine 인산화에 따른 dendritic spine형성 조절 작용은 leucine zipper domain에 의한 dimer 형성 조절에 의한 기작이라는 것을 규명하였다. 배양신경세포를 이용한 이 결과를 in vivo에서 확인하기 위해 βPix knockout mouse line를 구축하였으며 발생학적 연구를 수행하였다. 더 나아가 βPix knockout mouse line을 이용하여 신경세포 특이적 βPix isoform knockout mice 제조에 성공하였다. 신경세포 특이적 βPix isoform knockout mice는 현재 특성 분석의 초기단계이지만 신경세포의 dendnritic spine 발달과 시냅스 형성에 중요한 역할을 하는 Rac1과 Cdc42 활성화, PAK과 ERK의 활성화를 조사하여 신경세포 특이적인 βPix의 발현이 신경계발달에 중요한 것임을 확인하는 연구를 수행하였다. Abi1을 이용한 연구에서는 Abi1이 기존에 밝혀진 CaMKIIa에 대한 조절 단백질들 보다 더 높은 sequence homology를 갖고 있는 단백질로서 Abi1가 CaMKIIa의 주요 조절 단백질로 작용하고 있는 가능성을 제시하고 CaMKIIa와의 작용으로 dendritic spine 발달에 조절자로서이 역할을 제시하였다.

제2 공동연구에서는 SNX family 중 SH3 도메인과 BAR 도메인을 지니고 있는 SNX9과 상호작용하는 단백질네트워크의 규명 및 신경세포기능 조절연구을 목표로 SNX9과 endocytosis관련 단백질의 상호작용 네트워크구축 및 신경기능조절연구를 수행하였고 SNX9과 매우 유사한 구조를 지녔으나 전혀 알려진 것이 없는 SNX18과 상호작용하는 단백질네트워크의 규명 및 신경세포기능 조절연구를 목표로, SNX9과 SNX18의 역할의 상호연계 및 배제적인 역할연구, SNX18과 단백질의 상호작용 네트워크구축 및 신경기능조절 연구를 수행하였다. 또한, SNX14의 GPCR 의존적 신경가소성에 미치는 영향연구를 목표로, β-PIX 신호전달체계와 SNX의 상호작용연구 및 수상돌기분화기전 연구, GPCR신호전달체계에 의한 신경가소성에서 SNX14의 역할 연구, β-PIX/LPA KO/TG mice에서 SNX를 통한 시냅스전,후세포 기능연구를 수행하였다.

제3 공동연구에서는 신경조직 유래 세포주에서 나타나는 Lysophospholipids 조절 기전에 관한 연구를 신경세포 모델을 이용하여 수행하였으며, LPA 수용체의 발현 조절 기전을 규명하기 위해 전사조절기작 및 조절인자에 대한 연구를 수행하였다. 또한, 동물 모델로서 형질전환 마우스를 이용하여 LPA 수용체 및 의 기능적 연

구를 수행하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

신경세포 특이적인 βPix에 대한 연구로 독창적인 연구결과를 수립하였다. 특히, βPix-b에 의한 dendritic spine발달 및 시냅스 형성에 대한 분자적 모델은 신경세포가 학습과 기억이라는 기능을 수행하기 위해 특유의 형태형성과 가소성을 일으키는 분자적 기작을 제시한 의미가 크다. 이는 형태형성과 기능에 밀접한 연관성을 갖는 여러 가지 뇌질환 치료와 뇌기능 항진 연구에 새로운 target을 제시하는 것이다. 또한, βPix knock mice제작 및 신경조직 특이적인 βPix knock mice 제작은 이를 이용한 연구로 세포수준에서 밝힌 dendritic spine 발달 및 시냅스 형성기작이 개체수준에서 기억과 학습에서 어떻게 적용되는지에 대한 실용적인 연구를 가능하게 하며, 퇴행성 뇌질환의 동물모델을 제공하여 뇌기능 항진을 위한 치료법과 약물개발을 위한 유용한 도구를 제공하게 될 것으로 생각한다. 생활성 라이소지질의 뇌 발생동안의 역할에 대한 분자 및 세포생물학적 기전연구는, 생체 내에서 일어나는 많은 현상에서의 생활성 라이소지질의 역할 및 메카니즘을 규명한 것으로 발생과정에서의 대뇌피질층 형성장애등의 뇌질환에 대한 병리기전의 규명과 치료법 개발에 관한 연구로 이어질 전망이다. Sorting nexin family의 신경 세포내 신호전달체계 및 βPix signaling과의 연관성에 대한 본 연구는 G protein signaling과 관련된 뇌신경세포의 학습과 기억과정에 대한 세포생물학적 기전을 제공할 것이며 연구책임자의 핵심기술인 살아있는 신경세포의 관찰과 세포내 단백질변화 등을 연구할 수 있는 고해상도 CCD camera와 고배율 DIC 및 형광현미경을 이용한 digital imaging기법은 세계적으로 각광 받고 있으나 현재 국내의 연구가 미흡한 세포영상 분야의 연구에도 크게 기여할 것으로 사료된다.

S U M M A R Y

The neuronal morphology can be changed dramatically by their external environment and extracellular signals. This structural remodeling of neurons leads to many functional changes that are required for neuronal differentiation and development. To understand structural remodeling of neurons, it is essential to investigate changes in the cytoskeleton of neurons, particularly the actin cytoskeleton which is required for structural remodeling, and the cell signaling pathways that regulate the actin reorganization.

In the 1st individual project, research focus was on the Rho GTPase signaling pathway which is a major cell signal transduction pathway determining the structural changes of dendritic spines. We investigated the role of ßPix, Abi-1, and CaMKII in the dendritic spine formation and development. We found the molecular mechanism of dendritic spine regulation by ßPix-b during neuronal development. The dimer of ßPix-b is changed into its monomer by tyrosine phosphorylation via AMPA receptor-mediated Src kinase activation and monoeric ßPix-b can locally activate Rac1 at dendritic spines. In addition, we generated neuronal specific ßPix knock-out mice. This will provide a valuable tool for the studies of the development of brain and nerve system. And we also found that Abi-1 is involved in spine development through the interaction with CaMKIIa.

The 2nd individual project was centered on the role of SNX family in synaptic vesicle recycling, dendritic morphogenesis, and synaptogenesis. We found that SNX18 is involved in the regulation of neuronal development through its interaction with other proteins. We also found that SNX14 functions as a neuronal RGS protein. It regulates Gαs-linked G protein-coupled receptor signaling in neurons.

In the 3rd individual project, the roles of lysophosphatidic acid(LPA)-mediated signaling on survival, proliferation, migration of neuronal cells were investigated. We have found that LPA prevented apoptosis in a hippocampal progenitor cells, H19-7, at a differentiation-inducing condition. It is shown that the anti-apoptotic effect of LPA is induced by stabilization of Mcl-1, anti-apoptotic factor. We also found that lysophosphatidylcholine (LPC) induces apoptosis of H19-7 through the activation of Fas ligand. Our results suggest that lysophospholipids plays important roles in the regulation of cell proliferation, morphological change, survival, and neuronal differentiation.

C O N T E N T S

I. Introduction ····· 9

II. The present state of research & development ·····19

III. Result ·····22

IV. Achievement & contribution ·····36

V. Applications ·····43

VI. Information ·····46

VII. Reference ·····49

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ·····9

제 2 장 국내외 기술개발 현황·····19

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과·····22

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도·····36

제 5 장 연구개발결과의 활용계획·····43

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보·····46

제 7 장 참고문헌·····49

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적 및 필요성

신경세포의 구조는 세포 외부로부터의 환경 및 신호인자들에 의해 매우 역동적으로 변화될 수 있으며, 신경세포의 구조변화(remodeling)는 곧 신경세포의 기능적 변화로 이어진다. 이러한 신경세포의 구조변화에는 신경세포의 세포골격구조를 구성하고 있는 actin cytoskeleton의 변화가 필수적이며, 이를 조절하는 세포신호전달과정의 연구는 신경세포의 구조변화를 이해하기 위해 필수적이다. 신경세포의 구조변화는 퇴행성뇌질환, 그리고 신경세포간 비효율적인 정보전달과정에 의해 초래되는 학습장애 및 정신발달장애(mental retardation)와 같은 뇌질환의 원인이 되기도 하므로, 이러한 질환의 근원적 치료를 위해서는 신경세포구조 변이에 관련된 뇌질환의 병태생리를 보다 분자세포학적으로 자세히 이해하기 위한 기전 연구가 필수적이다. 따라서, 본 연구에서는 신경세포의 구조변화 (remodeling)을 유발하는 세포신호전달체계의 연구를 통하여 신경세포의 구조변화를 조절할 수 있는 표적단백질을 발굴하고, 궁극적으로 뇌질환치료 및 뇌기능항진에 기여하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

ㅇ 기술적 측면

1) 신경세포의 dendritic spine의 조절과 신경계 질환

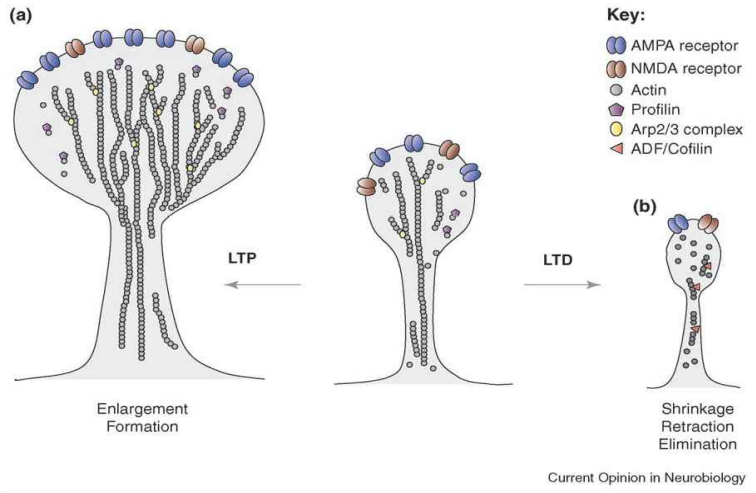
(1) 신경세포의 dendritic spine과 actin cytoskeleton

◈ 신경세포의 postsynaptic구조인 dendritic spine은 기존에 알려진 것과 같이 정적인 구조가 아닌 신경활성도에 따라 매우 역동적으로 그 형태의 변화를 일으키는 구조임.

◈ dendritic spine의 형성은 곧 신경시냅스형성과 밀접한 관계가 있으므로 현재 신경가소성분야에서 가장 각광받고 있는 연구 분야의 하나임.

◈ 현재 일반적으로 받아들여지고 있는 가설은 LTP를 일으키는 자극에 의해 dendritic spine의 수와 크기가 증가하고 또한 LTD중에는 dendritic spine의 수와 크기가 감소하고 이로 인한 새로운 시냅스의 형성 및 감소가 신경계 가소성

의 기전으로 제안되었음 (Current Opinion in Neurobiology, 2006).



<LTP/LTD에 의한 dendritic spine의 형태변화>

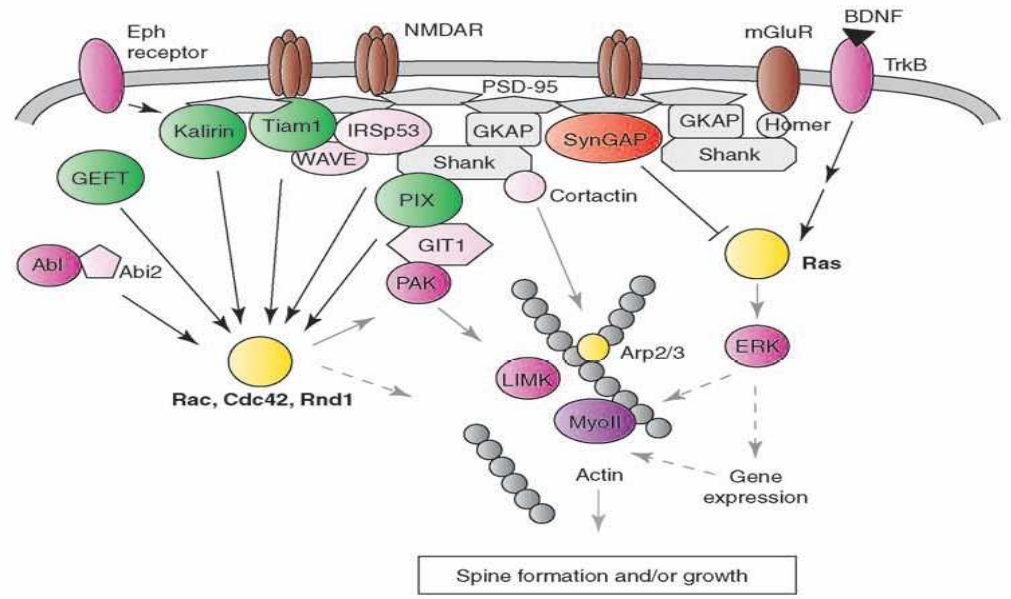
(2) 신경세포의 dendritic spine 조절과 Rho GTPase Signaling

◈ dendritic spine은 actin이 밀집된 구조이며 actin dynamics의 변화가 곧 dendritic spine의 형태변화와 연관되어 있으므로 actin cytoskeleton의 역동성 조절의 핵심인자인 Rho GTPase에 의한 dendritic spine의 형성 및 형태변이에 관한 연구가 활발히 진행중임.

◈ 최근연구에 의하면 G protein coupled receptor kinase interacting protein(GIT)1이 dendritic spine의 형태변이 및 시냅스 형성에 중요한 역할을 하며 GIT1에 의한 Rac의 guanine nucleotide exchange factor(GEF)인 βPix의 dendritic spine으로의 targeting이 이에 필수적임이 보고됨.

◈ Postsynaptic density형성에 중요한 단백질인 Shank가 βPix와 상호작용하며 이들의 상호작용이 βPIX 및 p21 associated protein(PAK)의 synaptic localization을 유도하고 Rac1/Cdc42 및 PAK을 활성화시켜 actin cytoskeleton을 조절함으로서 dendritic spine의 역동성을 조절하는데 중요한 역할을 할 것이라는 최근연구가 보고됨.

◈ Abl kinase의 결합단백질로 최초에 알려진 Abl-interactor-1 (Abi-1)의 신경세포에서의 과발현은 Rac의 활성화를 통해 dendritic spine의 maturation을 촉진하고, Abi-2가 knock-out된 생쥐에서는 dendrtic spine의 maturation이 억제될 뿐만 아니라 그 숫자도 감소함이 최근 보고 되었음.



(Source, Current Opinion in Neurobiology, 2006)

(3) 신경계 질환과 dendritic spine

◈ 정신발달장애는 Down 증후군, pheylketonuria(PKU)와 같은 유전적인 요인, 임신 중의 풍진(rubella)감염이나 엄마의 과도한 알코올 섭취, 출산시의 질식 등에 의한 산소공급부족, 또는 출산 후의 빈약한 영양공급 및 교육과 같은 환경적 요인 등 다양한 요인들에 의해 유발되는 것으로 알려져 있음.

◈ 정신발달장애아들의 뇌신경세포들의 dendritic spine은 정상아들에 비해 수가 적으며 그 형태도 정상 dendritic spine에 비해 가늘고 길쭉한 비정상적인 형태를 하고 있음.

◈ 최근 X-linked mental retardation 증후군들에서 Rho GTPases의 신호전달 체계를 조절하는 단백질들의 돌연변이가 발견됨.

◈ 따라서, Rho GTPases의 신호전달과정에 이상이 생기면 신경세포의 actin cytoskeleton의 조절이 비정상적으로 되고, 이는 dendritic spine의 형태, 생성 및 소멸에 이상을 가져와서 정신발달장애의 원인을 제공할 것으로 생각됨.

2) 신경세포의 Endocytosis의 조절과 신경세포 리모델링

(1) Sorting nexin 9과 신경세포 endocytosis의 연관성

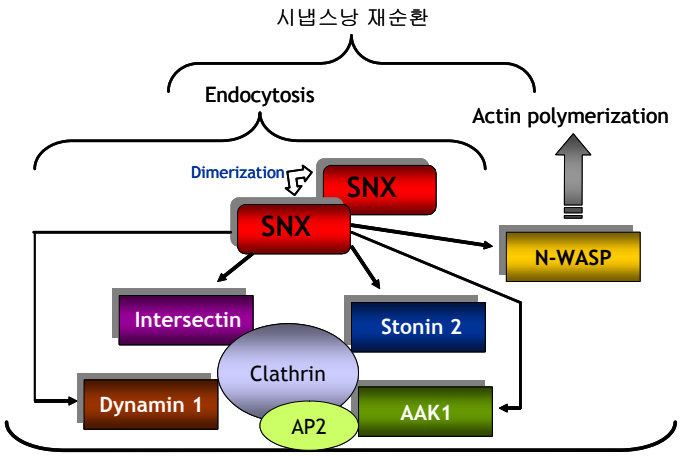
◈ Sorting nexins은 세포내이입과정(endocytosis) 및 단백질 trafficking에 관여하는 다양한 종류의 cytosolic과 membrane-associated 단백질로 SH3 domain과 결합하는 것으로 알려진 PXXP motif가 포함된 phospholipid결합부위인 PX domain을 공통적으로 가지고 있음.

◈ Sorting nexins중 sorting nexin 9과 sorting nexin18은 N-terminal에 Proline rich domain (PRD)와 결합하는 SH3 domain을 가지고 있으며, 또한 endocytosis에 관여하는 많은 단백질들의 상호작용이 SH3-PRD의 상호작용에 의함이 매우 잘 알려져 있으므로, SNX9이 SH3 domain을 통한 PRD domain을 가진 다른 단백질과의 상호작용에 의해서 endocytosis에 관여할 것이라는 가능성이 제시됨.

◈ SNX9이 clathrin-binding tyrosine kinase인 Activated Cdc42-associated kinase-2 (Ack2)와 SH3-PRD 의 상호작용에 의해 결합하는 것이 발견되었고, Ack2에 의한 SNX9의 phosphorylation에 의해 EGF receptor의 degradation이 조절됨이 밝혀졌으며, 최근연구결과에 의하면 Insulin receptor의 trafficking에도 SNX9이 관여하는 것으로 알려짐.

◈ 생화학적 연구를 통하여 SNX9은 actin cytoskeleton의 주요 조절단백질인 WASP와 상호작용함이 발견되었음. 많은 연구들에 의해서 세포내이입과정에서 actin cytoskeleton의 역할이 규명되고 있으나, 어떤 기전에 의해서 actin cytoskeleton이 endocytosis 관련 단백질들과 상호작용을 하고 있는지는 잘 알려져 있지 않고, 현재 이 기전에 관한 연구는 endocytosis 연구분야의 화두 중에 하나임. SNX9이 세포내이입과정에서 Dynamin과 상호작용하고 있고, 또한 WASP를 통하여 actin cytoskeleton을 조절할 것으로 생각되므로, SNX9이 actin cytoskeleton과 endocytosis과정을 연결시켜주는 인자(linker)로 작용할 가능성이 있음.

◈ in silico protein interaction database를 통하여 SNX9 및 SNX18의 possible binding partners를 검색해본 결과 intersection, stonin2, AAK1등이 발견되었으며 이들 단백질모두
endocytosis에 중요한 역할을 하는 단백질임을 감안할 때, 이들 단백질간의 상호작용이 endocytosis를 조절할 것으로 생각됨.



(2) βPIX signaling pathway와 sorting nexin의 연관성 및 이를 통한 dendritic spine 형태변이

◈ 1차년도 실험에서 Micro LC MS/MS분석을 통하여 β-PIX에 결합하는 신규 단백질들을 동정하였음. 그 결과 29가지의 단백질들이 동정되었고 이중 기존에 알려진 α-PIX, β-PIX, GIT, Pak이외에 sorting nexin 14 (SNX14) 이 새로운 결합단백질로 동정되었음.

◈ SNX14 은 Phox homology인 PX, PX-associated domain인 PXA, 그리고 RGS를 가지는 multidomain protein으로 PX domain을 특징으로 하는 sorting nexin (SNX) family일 뿐만이 아니라 Regulator of G protein signaling (RGS) family임. RGS는 heterotrimeric GTP-binding proteins (G proteins) 조절인자로 알려진 단백질임. G proteins은 α, β, 그리고 γ의 세 가지 서브유닛으로 이루어져 있고, 자극이 없는 상태에서는 α 서브유닛이 비활성화된 GDP 결합형태로 존재하나 수용체가 활성화됨으로 자극이 발생하면 α 서브유닛이 GDP를 해리하고 GTP가 결합하고 이로 인해 trimer가 α 서브유닛과 βγ 복합체의 두 가지 요소들로 나누어짐으로 활성화됨

◈ SNX14이 β-Pix와 결합하는 것으로 생각되므로, 이는 β-Pix signaling pathway가 SNX14과의 결합을 통하여 신경세포에서의 receptors의 endocytic trafficking에 관여할 가능성을 제시하며, 또한 SNX14이 G protein signaling을 조절하는 RGS이므로, 신경세포에서 대표적인 G protein coupled receptor(GPCR)이며 신경세포기능 및 가소성의 중요한 기전인 metabotropic glutamate receptors(mGluRs)를 통한 G protein signaling에 관여할 가능성을 제시하여 줌.

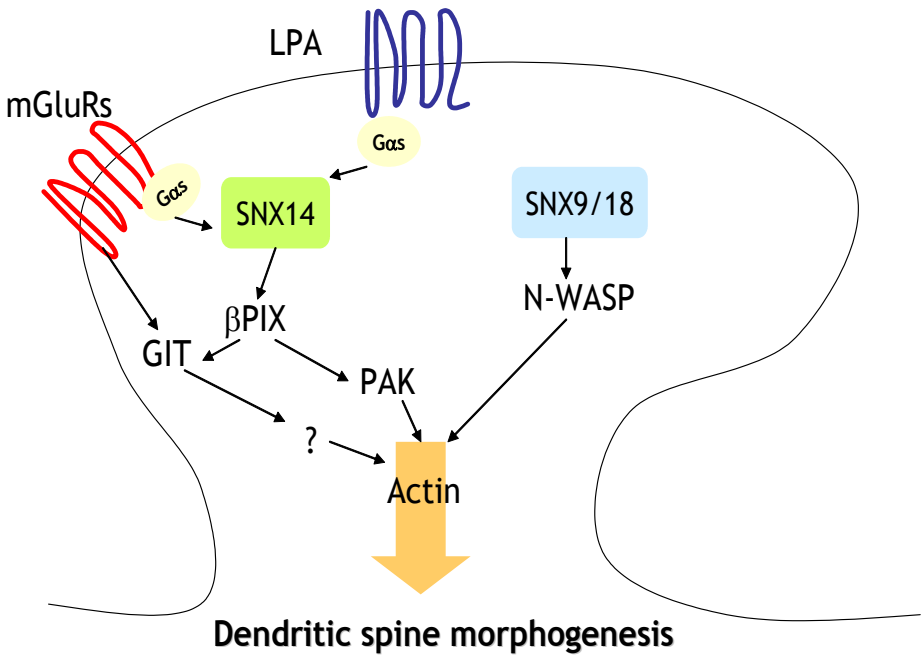
◈ Lysophosphatidic acid (LPA)는 특이적인 G-protein coupled receptors

(LPA1-4)을 경유하여 세포내 전달자의 활성을 증가시키는 활동적인 인지질임.

◈ 최근의 연구결과들에 의해서 β-Pix는 이러한 LPA에 의한 FAK및 PAK의 activation에 관계할 것으로 생각됨.

◈ 따라서 RGS 단백질인 SNX14 이 GPCR인 LPA 수용체의 활성도를 조절하는 동시에 β-Pix와의 결합을 통하여 β-Pix signaling pathway와 LPA 수용체 signaling을 연결해 줄 수 있을 것으로 생각됨.

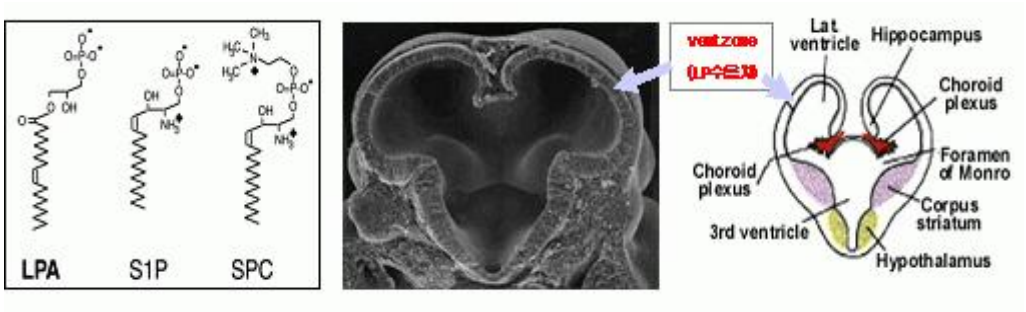
◈ 1, 3연구과제와의 협력을 통하여 β-Pix knock-out mice 및 LPA signaling이 비정상적으로 이루어지는 동물모델을 통해 신경세포에서의 dendritic spine의 변화와 그로인해 발생하는 생체 내에서의 세포학적, 생물학적, 행동학적 그리고 발생학적인 변화를 관찰함으로서 학습과 기억과정과 퇴행성 신경계질환에 새로운 약물의 표적물질로서의 생활성 라이소지질의 가능성을 제시할 수 있을 것으로 사료됨



3) 라이소지질에 의한 신경세포의 구조 리모델링

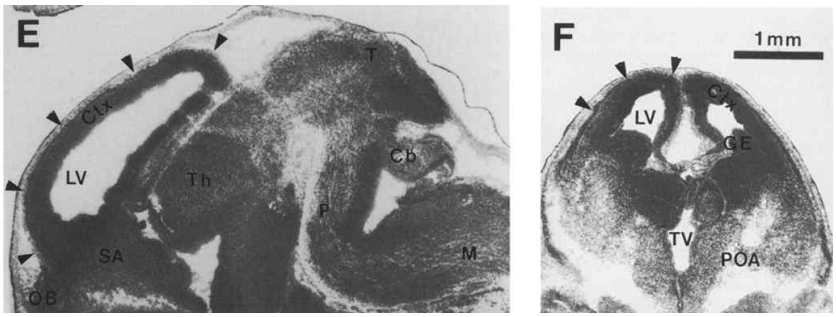
(1) 라이소지질 수용체의 신경세포내 발현

◈ 라이소지질 (Lysolipid)은 내재하는 수용성 인지질로서, 세포성장인자 (growth factor)와 유사한 생리활성을 나타내는 물질임. 최근 신경세포 내에 그 수용체가 발생 중의 neuroepithelium의 ventricular zone (vent.zone)에서 발견됨으로써 발생신경생물학자들의 초미의 관심을 받기 시작했으며, 라이소지질의 뇌세포에서의 기능에 관한 연구가 활발히 진행되기 시작하였음 (Hecht et al., 1996).



[뇌에 수용체가 존재하는 라이소지질 (좌) 및 LPA 수용체가 발현하는 위치 (우)]

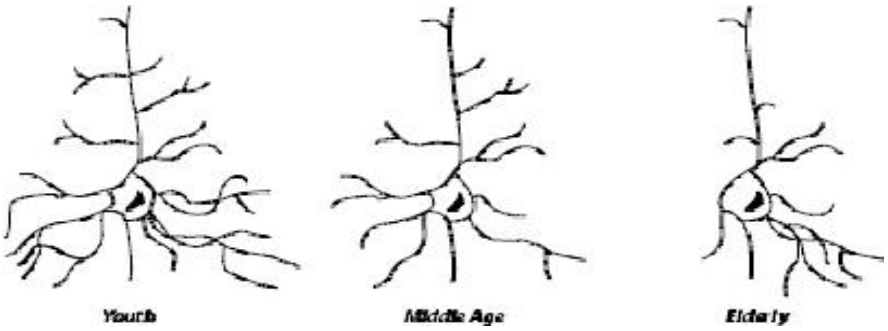
◈ 라이소지질 family의 주요 구성요소의 하나인, LPA 수용체 유전자는 생쥐의 태아시기 18일 경 (E18.5), 종뇌 (telencephalon)의 ventricular zone에서 발현이 시작됨. ventricular zone은 신경상피세포(neuroepithelial cell layer)가 위치해 있는 부위로서 신경세포 (neuron) 및 신경교세포 (glia)로의 운명결정이 되기 전의 progenitor cell이 위치해 있음. LPA 수용체가 ventricular zone에서 위치해 있다는 사실로부터, LPA 수용체의 신경발생상에서의 중요한 역할을 추정 할 수 있으나, 아직 많은 연구가 되어 있지 않은 실정임.



[E18.5의 생쥐 뇌에서 LPA1 수용체의 발현(Hecht et al., 1996)]

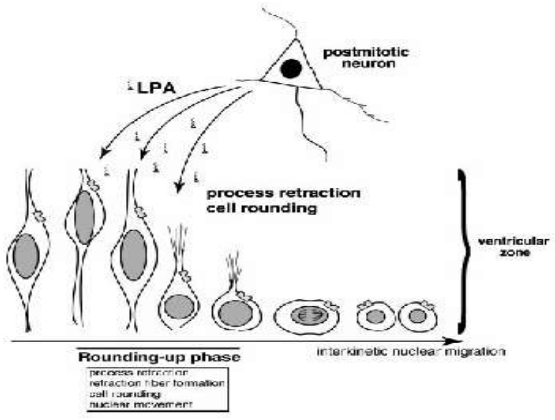
(2) 라이소지질 (LPA)에 의한 dendrite의 retraction

◈ 뇌의 발달 및 노화 과정 동안 dendrite을 포함한 neurite의 수축현상이 잘 알려져 있음. 최근, 인간의 섬유모세포를 노화과정에 LPA1 수용체가 긴밀히 관여함이 관찰되었음 (Jang et al., 2003). 노화시킨 세포내 LPA1 수용체의 mRNA 수준이 감소되었음. 이와 같은 관찰은 LPA1 수용체가 신경세포 리모델링에도 깊이 관여할 수 있는 가능성을 시사하고 있음.



[Age-dependent Down regulation of Numbers in Neurite Processes]

◈ 신경세포내에서 만들어진 LPA는 ventricular zone 신경 상피세포 (neuroepithelial cell)에 존재하는 LPA1 수용체 또는 라이소지질계열과 연관된 수용체들에 대한 높은 결합친화력을 갖는다. 수용체에 결합한 LPA는 G protein coupled receptor 신호전달체계를 활성화시켜 신경세포의 수축, 및 ventricular zone 내 신경세포의 이동을 유발함 (Fukushima et al., 2000).



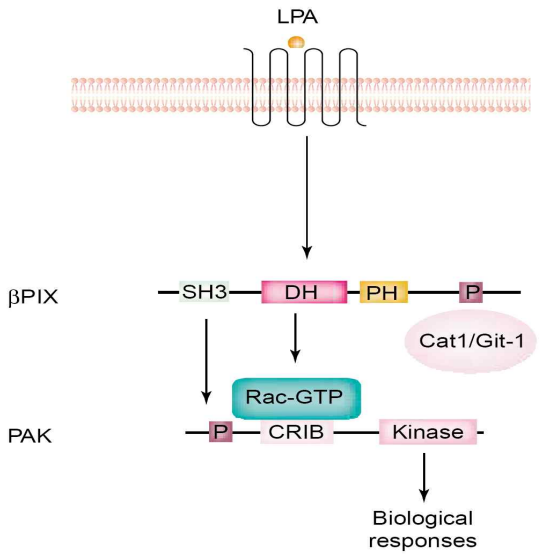
(3) LPA 수용체와 actin cytoskeleton의 연관성

◈ Focal adhesion에서, LPA는 간접적으로 세포이동에 영향을 주며, 암세포 전이를 유도하는 Rho family의 small GTPase들을 통해서 actin이 근간이 되는 세

포골격의 변형을 유도한다고 알려져 있음. 특히, LPA가 focal adhesion kinase(FAK)와 세포이동에 중요한 p21-activated kinase를 자극한다고 알려짐.

◈ 세포 이동의 경우에 있어, LPA에 의한 인산화가 진행되는 p38 MAPK와 FAK의 전달 경로 내 존재하는 p85 β-Pix가 그 역할을 수행함.

◈ 신경의 전구체에서 LPA1 수용체의 결핍은 증식하는 세포군의 감소, 비대칭적인 분할의 증가, 세포주기와 초기 성숙의 단축을 야기함. LPA1 수용체가 없는 마우스에서 해마 내 신경발생은 환경적으로 풍부한 조건에서조차도 새로운 세포의 생산 감소의 영향을 받음.



[LPA에 의해 유도되어지는 β-Pix와 PAK 신호전달경로를 보여주는 추정적 모델]

◈ LPA1 수용체가 결여된 마우스는 인지 성취도에 차이를 나타냄. LPA1 수용체는 신경재생을 요구하는 신경퇴행성 질환에 영향을 줄 것으로 기대되며, 이는 새로운 대뇌피질생성의 조절자로서 그리고 임상적인 치료 방법에 있어 새로운 타겟으로 대두될 가능성이 있으므로, LPA1에 관한 신경세포학적 기작의 규명이 요구됨.

ㅇ 경제·산업적 측면

◈ 본 연구의 결과는 신경계의 시냅스형성, 학습과 기억의 분자세포생물학적 기초지식을 축적함과 동시에 mental retardation, 간질 등 신경계 질환의 원인을 규명하는 자료로 이용될 수 있으며, 신경계 질환을 진단하는 지표가 되는 단백

질과 신약개발의 target이 되는 표적단백질을 제공할 수 있음.

◈ 본 과제를 통해 신경세포의 구조 및 기능에 이상이 있는 동물모델 및 세포 모델이 수립되면 이는 귀중한 국내 지적 재산으로 그 가치를 가지며 이를 screening 시스템으로 활용한 신약개발과 신경계 질환의 진단 및 치료방법 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것임.

ㅇ 사회·문화적 측면

◈ 본 연구는 21세기 프론티어 사업이 지향하는 바와 같이, 장기간의 팀플레이를 통한 미래지향적인 연구를 통하여 국가 경쟁력 향상에 기여할 수 있는 주제이며, 성공적으로 수행 시 SCI에 등록된 최고 수준의 신경생물학 계통의 저널에 실릴 정도의 잠재성을 가지고 있음. 따라서 순수 국내 연구진에 의한 성공사례는 국내 연구 분위기를 활성화시키고 국내 과학자들에게 자신감을 심어줄 수 있을 것임.

◈ dendritic spine의 연구는 신경생물학의 가장 근본적인 연구과제인 학습과 기억의 분자세포생물학적 기반에 대한 지식을 제공할 수 있음. 따라서 본 연구는 인간의 정신 활동을 이해하고자 하는 인간 본연의 호기심을 자극하며 이에 기초적 지식을 줄 수 있는 주제임.

◈ mental retardation syndrome 등 신경계 질환으로 인한 관련 사회적 문제를 해결함에 궁극적으로 도움을 줄 수 있음.

3. 연구개발의 범위

가. 제 1 세부과제

흥분성 신경세포의 시냅스 형성 및 시냅스 가소성에 중요한 dendritic spine의 생성 및 소멸을 조절하는 기전을 βPix/Abi-1/Rac GTPase 신호전달경로를 중심으로 연구하여 그 분자적 조절기작을 규명하고, 이들 기반으로 dendritic spine의 조절에 이상이 있는 동물/세포 모델을 개발하는 것을 목표로 세우고 연구를 수행하였다.

1) 1차년도: βPix isoform 간의 기능차이 연구 및 βPix knock-out mouse line 구축
2) 2차년도: βPix isoform 간의 기능차이 연구 및 Abi-1에 의한 dendrtic spine 조절기전 연구
3) 3차년도: β-Pix 신호전달경로와 Abi-1/CaMKII 신호전달경로의 상호연관

성규명 및 동물모델/세포모델을 이용한 dendritic spine 조절방안 screening 시스템 구축

나. 제 2 세부과제

Sorting nexin family가 신경세포 기능조절에 미치는 역할 규명 및 sorting nexin family와 β-PIX 신호전달체계와의 연관성 연구를 통하여 신경시냅스기능 조절 기전, dendritic spines의 morphogenesis와 GPCR 의존적 신경가소성의 분자적 조절기전의 규명을 목표로 연구를 수행하였다.

다. 제 3 세부과제

생활성 라이소지질 수용체의 신경세포 특이적 기능을 분자 및 세포 생물학적 기전을 밝히고자 함이다. 연구의 목표를 달성하기 위해 대뇌피질과 해마신경 조직으로부터 유래한 모델동물의 신경 세포주의 신호전달체계 연구 및 라이소지질의 신호전달 체계의 시작점인 LPA 수용체 유전자가 삽입된 형질 전환 마우스 모델을 구축하고자 한다. 신경세포에서 생활성 라이소지질 수용체의 발현조절관련 상위 신호전달체계 확립을 위해서 LPA 유전자의 Promoter/Enhancer 특성 분석 연구를 병행하며, 나아가 라이소지질에 의한 신경세포 특이 신호전달체계에 작용하는 구성원들 중의 하나인 β-Pix 및 SNX9 등의 단백질과의 상호연관성을 신경세포 모델 및 형질전환 마우스 모델을 이용한 다각적 접근을 통해 신경세포의 리모델링에 관여하는 분자적 조절 기전과 생활성 라이소지질 관련 뇌 질환의 병리기전의 규명을 목표로 연구를 수행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

가. 연구사례의 조사

1) 외국의 경우

◈ 최근에 dendritic spine의 remodelling이 신경계의 가소성, 학습 및 기억의 분자적인 메카니즘으로 인식됨에 따라 이의 조절에 관한 연구가 활발히 진행되고 있음.

◈ dendritic spine의 remodelling에는 세포의 형태변화와 유지에 필수적인 세포골격근의 변화가 필수적일 것으로 추정되어 왔으며, 또한 최근 multiphoton confocal microscope를 이용한 *in vivo* hippocampal neuron의 imaging 연구를 통하여 dendritic spine은 dynamic한 구조임이 밝혀졌으며, 세포골격근중 하나인 actin cytoskeleton의 dynamics가 dendritic spine의 형태 및 생성 조절에 중요함이 알려짐.

◈ 최근 actin cytoskeleton의 dynamics를 조절하는 Rac GTPase가 신경세포의 dendritic spine의 형태변화, 생성 및 소멸을 조절하는 신호전달체계의 핵심 인자임이 밝혀짐. 또한 X-linked mental retardation 증후군들에서 Rac GTPases의 신호전달체계를 구성하는 단백질들의 돌연변이도 발견됨.

◈ 따라서, Rac GTPase의 신호전달과정에 이상이 생기면 신경세포의 actin cytoskeleton의 조절이 비정상적으로 되고, 이는 dendritic spine의 형태, 생성 및 소멸에 이상을 가져와서 정신발달장애의 원인을 제공할 것으로 생각됨.

◈ Rac GTPase의 활성인자인 βPix는 Rac GTPase를 활성화 시켜 actin dynamics를 조절하여 dendritic spine의 조절에 관여할 것으로 예측 됨.

◈ βPix-a의 과발현은 배양 해마신경세포에서 Git-1에 의한 βPix-a의 시냅스로의 targeting을 misregulation함으로써 시냅스의 형성을 저해하는 것으로 최근 Univ. of Virginia의 Alan F. Horwitz 그룹에 의해 보고되었음.

◈ 본 연구실의 연구결과 뇌에는 βPix-a, -b, -c, -d등 여러 isoform이 발현되며, βPix-a는 모든 조직에서 발현되는 βPix isoform으로 neurogenesis가 활발히 일어나는 시기에는 뇌에서 그 발현이 감소되는 것으로 밝혀짐.

◈ 본 연구실은 1단계 연구에서 βPix-a와는 달리 βPix-b의 과발현은 시냅스의 형성을 촉진함을 밝혔음.

2) 국내의 경우

◈ 현재 신경세포의 dendritic spine에 대한 국내의 연구보고는 매우 적은 실정임. 최근에 dendritic spine의 head부위에 존재하는 PSD에 관한 연구는 현재 한국과학기술원 생명과학부의 김은준 교수의 실험실에서 활발히 진행 중임.

◈ βPix의 Rho GTPase의 조절연구는 국내에서도 활발히 진행 중임. 본 연구실에서는 βPix의 여러 isoform들을 cloning하여 보고하였으며, βPix의 C-말단 leucine zipper motif를 통한 dimerization이 βPix의 기능에 필수적임을 밝혔고, 또한 βPix의 발현은 p38 MAPK 의존적으로 섬유아세포의 lamellipodia형성을 촉진시킨다는 것을 보고 하였음. 또한 충북대의 김응국 교수는 FGF 처리에 의한 PC12 cell의 neurite outgrowth에는 βPix의 단백질인산화가 필수적임을 밝혔고, 한국과학기술원의 김은준교수는 PSD의 scaffolding 단백질인 Shank가 βPix와 상호작용함을 보고하였음.

◈ Phosphoinositides대사에 의한 신경세포 기능조절연구는 현재 선진국에서도 시작되고 있는 연구 분야이나 국내에서는 본 실험실 및 서울대학교 의과대학 이석호교수 실험실에서 전기생리학을 이용한 phosphoinositides 대사에 의한 신경전달물질분비 연구가 수행됨. 그러나 그 중요성에 비해 이것의 신경세포에서의 기능은 알려져 있지 않고, 또한 Phosphoinositides대사의 다양성에 비추어 볼 때 더 많은 Phosphoinositides가 신경세포에서 역할을 할 것으로 기대되므로, 본 연구의 연구결과는 앞으로 Phosphoinositides의 신경세

포에서 역할연구의 기초가 될 것으로 사료됨

◈ 최근 들어 생활성라이소지질에 관한 연구가 활발이 이루어지고 있지만 뇌 발생에서의 이 물질의 역할은 아직 초기단계의 연구결과에 머무르고 있음.

◈ LPA 수용체와 관련된 신호전달 연구는 활발히 이루어지고 있으나 그 수용체의 발현 조절 기전은 아직까지 밝혀진 바가 없음.

◈ Knock-out 방법을 통한 개체 단위에서의 LPA 수용체의 loss-of function에 대한 연구는 활발히 전개되고 있으나 gain-of function 을 통한 개체단위의 연구는 아직 미비한 상태임.

◈ 국내의 신경세포 remodeling을 연구하는에 연구인력은 외국에 비해 절대적으로 그 숫자가 부족하나, 현재 질적으로 우수한 연구를 하는 소수의 연구집단이 존재하며(대표적으로 시냅스생성 창의사업단을 운영하고 있는 한국과학기술원의 김은준교수와 기억제어 창의사업단을 운영하고 있는서울대학교의 강봉균교수), 이들 소수의 연구집단은 국제적인 경쟁력을 갖추고 있으나, 시냅스 기능연구의 중요성에 비추어 볼 때 이 분야를 연구하는 국내의 연구인력 및 연구집단은 더욱 확충되어야 할 것으로 판단됨.

3) 조사연구개발사례에 대한 평가

◈ Dendritic spine의 조절기작에 대한 연구는 이제 시작 단계이며, 특히 이 과정에서 뇌 특이적 βPix isoform들의 역할에 대해서는 아직 보고된 바가 없음.

◈ Dendritic spine 조절에 대한 연구는 정신발달장애, 간질 등 여러 신경계 질환에서 그 이상이 발견되고, dendritic spine의 remodelling이 신경계의 가소성, 학습 및 기억의 분자적인 메카니즘으로 인식되면서 그 연구열기가 고조되고 있음.

나. 세부 기술사항의 검토 분석

(1) 신경세포 연구에 필수적인 최신 기술들, 신경세포 분리, 배양 및 transfection은 1단계 연구를 통하여본 연구실도 선진국 수준으로 확보되어 있음.

(2) 기존 공정방법, 기술의 사례

가) 기술적인 평가 : 적용의 난이성, 기술수준 등

◈ 본 수행과제의 연구방법들은 대부분 선진국에서 개발된 방법들이다. 그러나 현재 본 연구진도 다양한 실험방법을 확보하고 있으며, 특히 최근 서울대 생명과학부에 도입된 multiphoton confocal microscope를 이용한 연구는 한국의 신경과학 수준을 한 단계 끌어올리는 초석이 될 것이다.

나) 경제적인 평가 : 제조원가, 투자규모 등

◈ 본 연구의 결과가 신경계 질병의 기작을 설명하고 의학적 진단, 치료에 이용될 때 제조원가에 비해 그 부가가치 및 투자규모는 매우 높다.

다) 산업기술에 미치는 파급효과 분석

◈ dendritic spine의 remodelling은 신경계의 가소성, 학습 및 기억의 분자적인 메카니즘으로 제시되고 있음으로 그 조절기작 연구는 뇌기능항진 기술개발의 기반을 제공함.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1공동연구

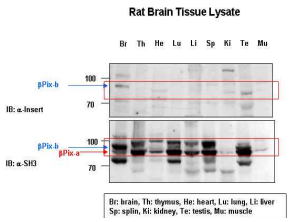


그림 1. 흰쥐의 각 조직에서 발현되는 βPix-a와 βPix-b의 양상

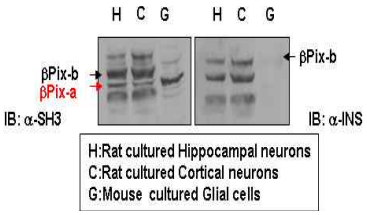


그림 2. 신경세포와 신경교세포 사이의 βPix isoform 발현 비교

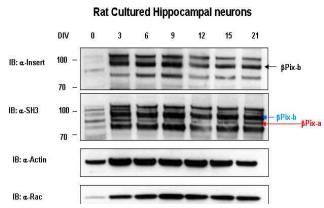


그림 3. 배양 해마신경세포에서 βPix isoform 발현 비교

1) βPix-a는 모든 조직 그리고 뇌를 구성하는 모든 세포에서 발현, βPix-b가 쥐의 신경조직과 testis, 뇌를 구성하는 신경세포분화에서만 발현함을 확인, 배양신경세포 발달시 βPix-b가 주요발현인자 임을 확인

2) βPix-a는 dendritic spine 발달 및 시냅스 형성을 저해하고 βPix-b는 dendritic spine 발달 및 시냅스 형성을 촉진

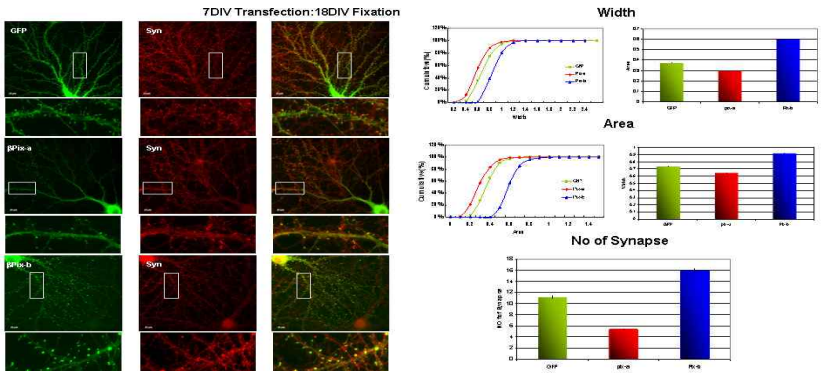


그림 4. 배양 해마신경세포에서 βPix-a와 βPix-b의 발현

표 1. βPix-a와 βPix-b가 dendritic spine 형성에 미치는 영향

3) βPix-a는 신경세포 전체에 분포, βPix-b는 주로 dendritic spine에 위치함을 확인

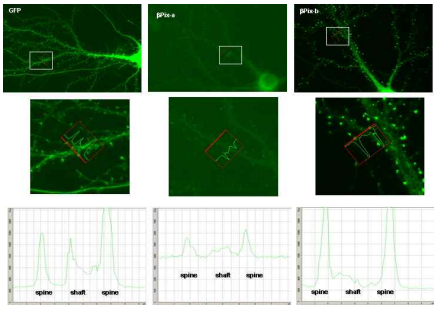
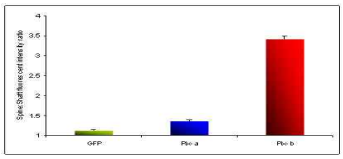


그림 5. dendrite에서 ßPix-a와 ßPix-b의 위치



Spine:Shaft fluorescent intensity ratio

표 2. spine과 shaft에서 ßPix-a와 ßPix-b가 분포하는 비율

4) 신경세포발달시 βPix-d는 초기에 핵안에 위치하다가 발달이 진행됨에 따라 핵에서 세포전체에 결쳐 존재함

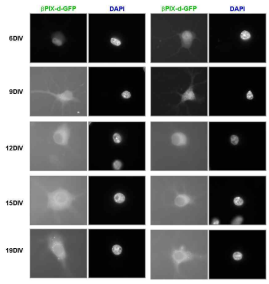


그림 6 Nuclear localization of ßPix-d in hippocampal neurons

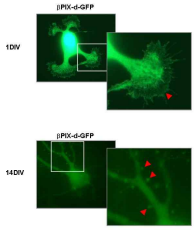


그림 7 Localization of ßPix-d at growth cones and neurites in hippocampal neurons

5) 598번째 tyrosine인산화가 βPix-b dimer의 형성을 억제함

6) ßPix-bfΔLZ가 tyrosine598의 인산화가 억제된 형태의 monomer로 Rac1을 활성화시키며 dendritic spine 발달에 기여함

7) GFP-LZ domain을 이용한 ßPix-bF의 dimer 형성 저해했을 때 ßPix-bF에 의한 Rac1의 활성이 증가하고 dend갸샞 spine 발달이 촉진됨

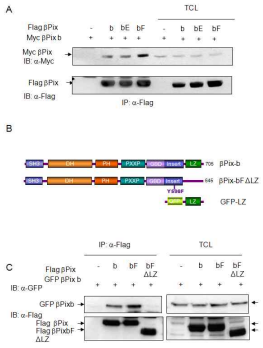


그림 8 tyrosine598 phosphorylation inhibits leucine zipper domain-mediated dimerization of ßPix-b

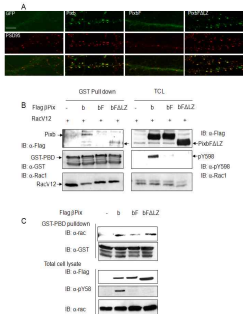


그림 9 Monomeric forms of ßPix-b localize at dendritic spines and promote interaction with Rac1

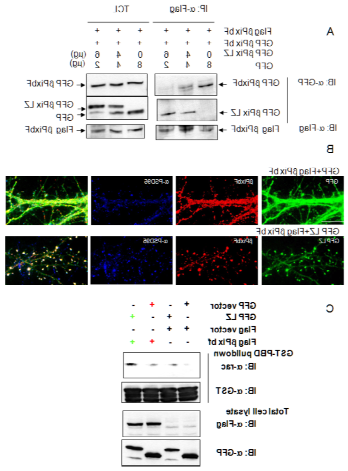


그림 10 GFP-LZ을 이용한 dimer 형성 억제 효과

8) βPix knockout mouse line 구축 발생학적 특성연구로 homozygote에서 open brain phenotype으로 embrynic lethality를 나타내며, MEF의 경우 cell attachment와 focal addhesion이 약화

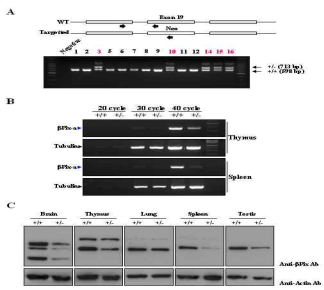


그림11. 3가지의 primer를 이용한 βPix knockout mice의 genotyping method와 결과 (B,C) Wild type과 heterozygote의 여러 조직에서 RNA 및 단백질 level의 차이.

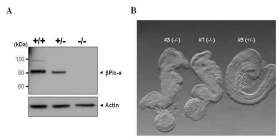


그림 12. βPix wild type/heterozygote/homozygote embryo (E9.5)에서의 βPix 단백질 발현 양상 (A)과 morphological defect (B)

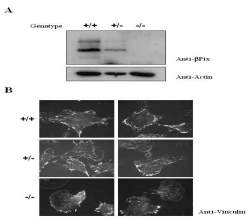


그림 13 βPix knockout mice에서 추출한 MEF에서 βPix 단백질의 발현 양상 (A) 및 fibronectin 위에서의 adhesion 양상 (B)

9) βPix knockout homozygote로부터 MEF의 제작

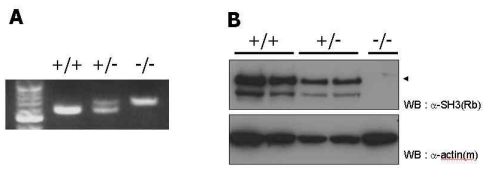


그림 14 βPIX wile-type(+/+), heterozygote(+/-), homo- zygote(-/-) MEF cell line의 genotyping(A) 결과와 βPIX 단백질 발현 양상(B)

10) βPix knockout mouse의 embryonic phenotype에서 혈관형성에 결손을 보이며

PIX를 knock down 시킨 MS-1 cell에서는 혈관 형성을 하기 위해 하나의 군집으로 모이는 과정에 defect를 보임

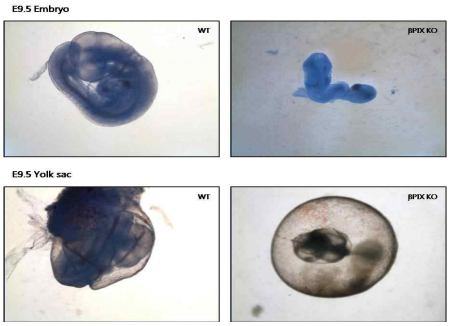


그림 15 βPix knock out mice(E9.5)의 embryo와 yolk sac에서의 혈관 형성 defect

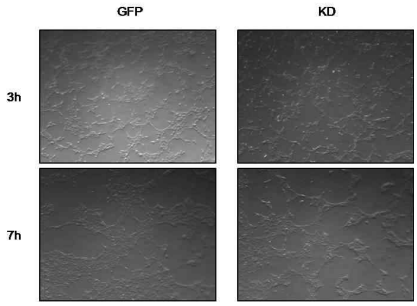


그림 16 MS-1 cell에서 βPix knock down이 tubule formation에 미치는 영향

11) βPix knockout mouse의 행동학적 검사에서radial eight-arm maze, Revisiting error, ommission error test를 통해 βPix knock out heterozygote mice가 memory 기능에 결함이 있으며 낮은 anxiety level 혹은 높은 motor activity를 가질 가능성을 시사

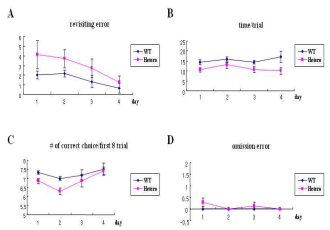


그림 17. Radial eight-arm maze test 수행 결과

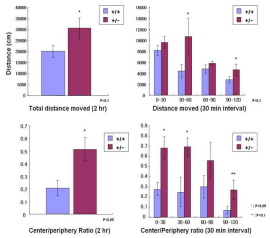


그림 18. βPix heterozygote mice에서 anxiety 수준이 감소된 것을 관찰함.

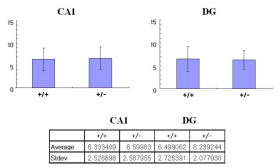


그림 19. βPix heterozygote mice 및 정상 생쥐는 해마에서 dendritic spine의 개수에서 유의미한 차이를 보이지 않았음.

12) 신경세포 특이적 βPix isoform knockout mice 제조

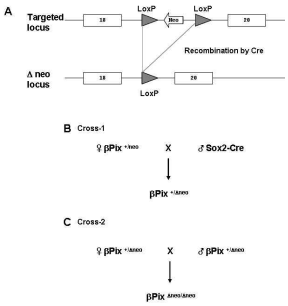


그림 20. Cre-LoxP system 을 이용한 네오마이신 저항성 유전자를 제거한 과정을 나타낸 scheme

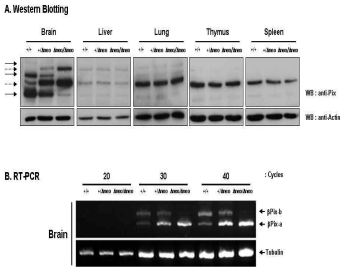


그림 21. $\beta Pix^{\Delta neo/\Delta neo}$ mice 의 단백질 및 mRNA 발현 양상

13) 신경세포 특이적 βPix isoform knockout mice의 특성 분석에서는 $\beta Pix^{\Delta neo/\Delta neo}$ mice에서 신경세포 특이적인 βPix isoform이 신경세포의 형태형성에 중요한 역할을 하는 Rac과 Cda42의 활성과 pPAK1, pERK1/2도 많이 감소되어 있음

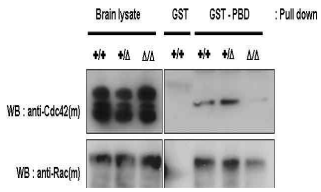


그림 22. $\beta Pix^{\Delta neo/\Delta neo}$ mice brain 에서 Rac/Cdc42 activation 양상

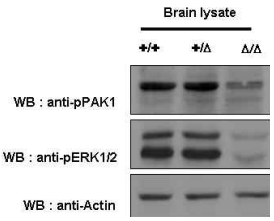


그림 23 $\beta Pix^{\Delta neo/\Delta neo}$ mice 에서 βPix와 연관된 세포신호전달 물질의 활성화가 억제됨

14) Abi1에 의한 신경세포의 시냅스 형성 조절인자임을 확인

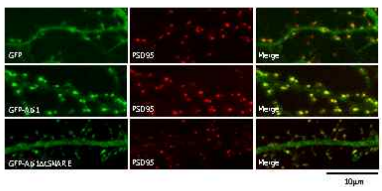


그림 24

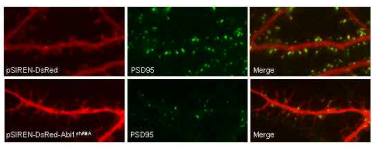


그림 25

15) tSNARE domain을 통한 Abi1과 CaMKIIa의 결합을 확인

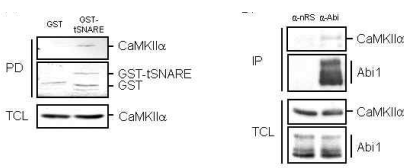


그림 26

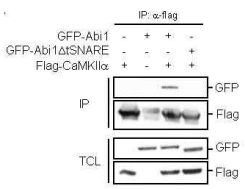


그림 27

16) Abi1과 CaMKIIa의 sequence 유사성 확인

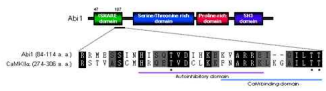


그림 28

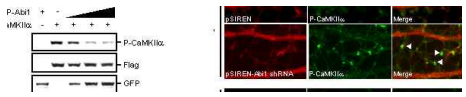


그림 29

17) Abi1와 CaMKIIa의 결합에 의해 CaMKIIa의 활성 억제됨

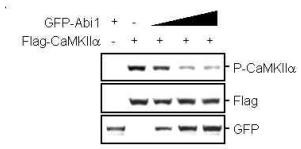


그림 30

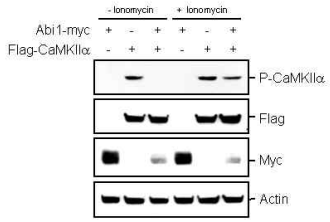


그림 31

18) Abi1 knockdown으로 의한 CaMKIIa 활성화 증가를 확인

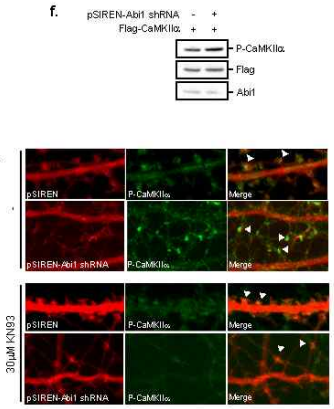


그림 32

19) Glutamate를 자극에 의한 CaMKII활성화로 Abi1와의 결합이 저해됨 확인

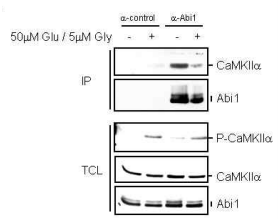


그림 32

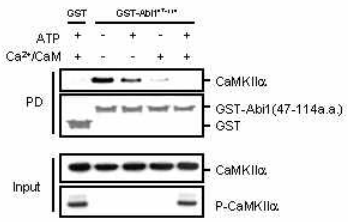


그림 34

20) CaMKIIa에 의해 Abi1의 serine88이 인산화됨을 확인

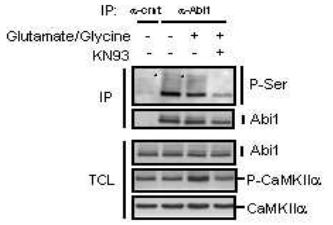


그림 35

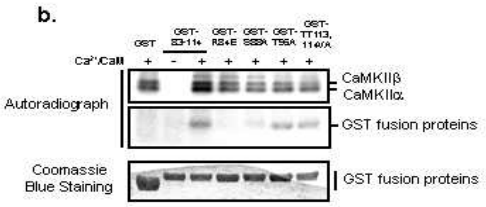


그림 36

21) 인산화된 Abi1에 의한 Rac이 활성화 되며 dendritic spine 발달됨을 확인

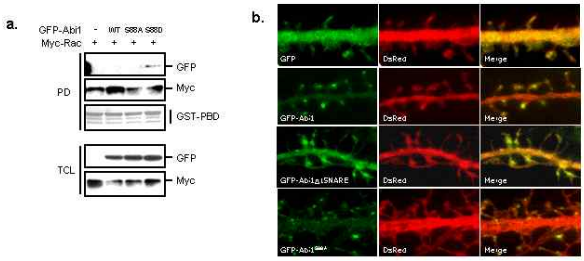


그림 37

제2공동연구

1) Rat brain에서 분리된 해마신경세포에서 SNX9의 발현되며 배양시간에따라 발현량이 증가하며 시냅스 전세포말단에 존재하며 presynaptic markers들과 colocalization함(그림 1, 2).

2) SNX9과 dynamin I 이 주결합단백질이고 N-WASP 또한 SNX9의 SH3도메인을 통하여 결합함을 pull-down assay, CO-IP를 통하여 확인함(그림 3).

3) SNX9과발현에 의한 endocytosis저해를 확인하고 SNX9과 dynamin I의 상호작용에 의한것임을 recovery assay로 확인함. SNX9과 결합 단백질인 dynamin, N-WASP을 함께 발현시킨 후 세포내 함입 속도에 변화 측정시 SNX9에 의한 세포내 함입 속도의 느려짐이 회복됨(그림 4, 5).

4) SNX9은 자극 후 endocytosis뿐만아니라 신경자극이 진행되는 동안에 발생하는 endocytosis kinetics에도 영향을 미치나 시냅스낭의 exocytosis에는 영향이 없음을 발견함(그림 6).

5) Endogenous하게 시냅스전세포 말단에서 발현되는 SNX9의 양을 shRNA를 통하여 억제하였을때 시냅스낭의 endocytosis kinectics가 느려짐을 발견(그림 7, 8).

6) SNX9과 SNX18을 조직 별로 발현 정도를 비교했을 때 조직부위별 발현정도에서 차이를 보임.따라서 SNX9과 SNX18이각 조직에서 다른 역할을 가질 것으로 예상됨

7) Sorting nexin 18(이하 SNX18)은 SH3 domain, PX, 그리고 BAR domain을 가지고 있는 단백질로 sorting nexin family 중 SNX9과 구조가 매우 유사함(그림 9).

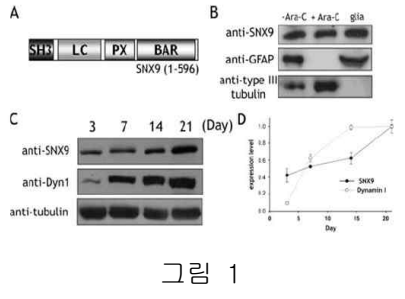


그림 1

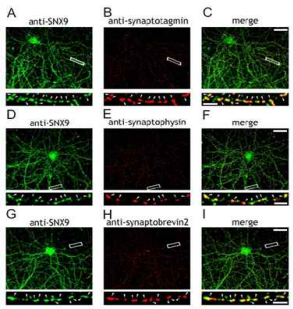


그림 2

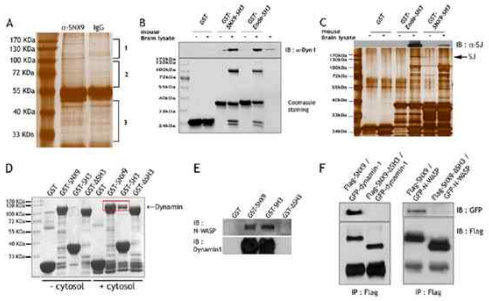


그림 51

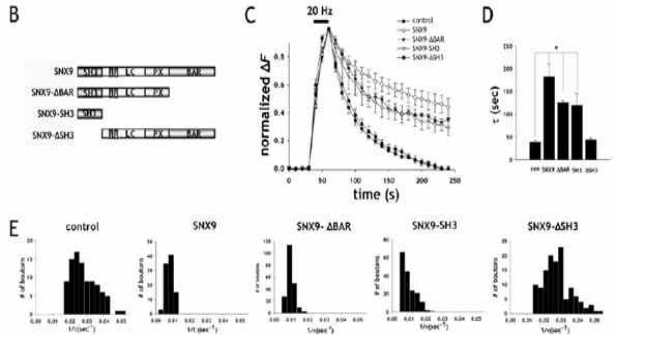


그림 4

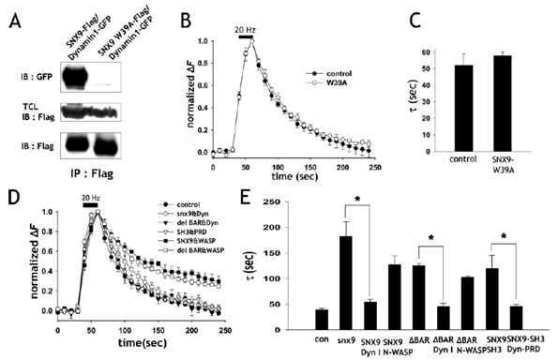


그림 5

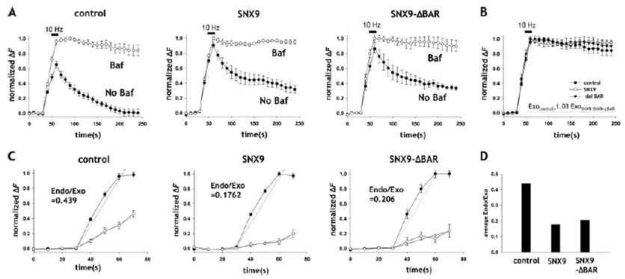
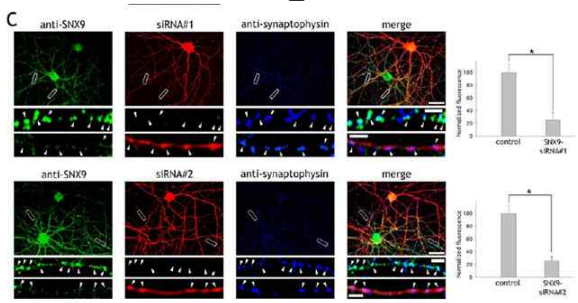


그림 6



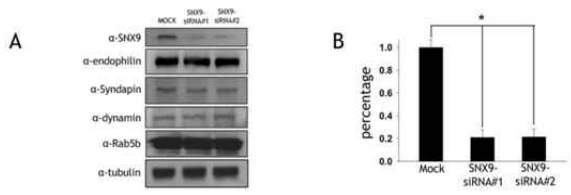


그림 7

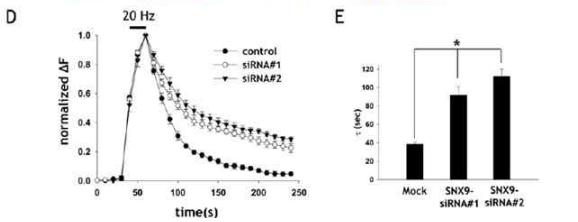


그림 8

8) 개체에서 SNX18는 광범위하게 발현되고 뇌에서는 특히 해마부위와 소뇌에 주로 발현됨을 확인하였다(그림 10, 11, 12).

9) 여러 세포주들의발현양상을 비교하였을 때 HeLa의 경우는 SNX9이, C6의 경우는 SNX18이 주요하게 발현되었고, NIH/3T3의 경우는 두 개의 단백질이 비슷하게 발현되는 것으로 보임(그림 13).

10) Rat hippocampal neuron을 primary culture 배양에서 SNX9의 경우 시간에 따른 증가하며, SNX18은 발생초기부터 고발현됨을 확인함(그림 14).

11) SNX18이 BAR domain을 통하여 homo-dimerization이 되고 SNX9과도 hetero-dimerization이 일어남을 확인함(그림 15).

12) SNX18과 SNX9이 서로간에 결합함을 확인함(그림 16).

13) dynamin과 spectrin이 SNX18과 내재적으로 상호작용을 하고 있음을 확인함. 또한 Hsc70의 경우도 SNX18과 상호작용을 하고 있음을 확인하고 GST-pull down assay를 으로 Dynamin, N-WASP, Synaptojanin1이 서로간에 상호작용함을 확인함 (그림 17,18).

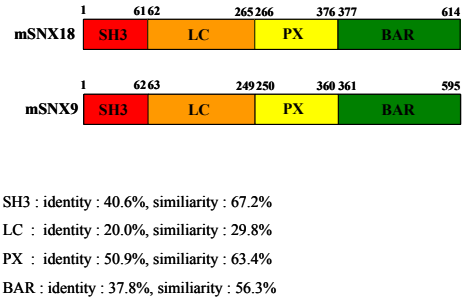
15) Mass 결과와 일치하게 SH3 domain을 통해 두 단백질이 상호작용함을 확인함 (그림 19-20).

16) IP를 통해 synapsin1과 synapsin2 모두 SNX18과 상호작용하며, synapsin1의 경우 SNX18의 PXBAR domain을 통해 상호작용함을 확인함(그림 21).

17) A.에서 SNX18이 presynaptic part에 위치하며 B.에서 synapsin1과도 colocalize 함을 확인함(그림 22).

18) electrical stimulation (900APS, 10Hz)을 가한뒤 time lapse imaging을 수행함. 실험결과 시냅신과 유사한 모습을 나타냄을 확인함(그림 23).

19) SNX9이 유도하는 tubule에 SNX18이 colocalize 함을 확인. PIP strip assay결과 PI(3)P와 PI(5)P에 주요하게 상호작용하며 PIP2에도 약하게 상호작용함을 보임 (그림 24, 25)



➢ SH3 : identity : 40.6%, similiarity : 67.2%
➢ LC : identity : 20.0%, similiarity : 29.8%
➢ PX : identity : 50.9%, similiarity : 63.4%
➢ BAR : identity : 37.8%, similiarity : 56.3%

그림 9

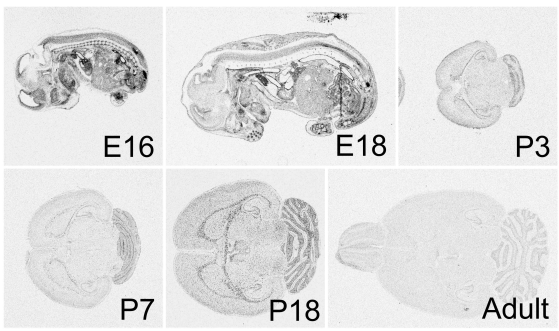


그림 10

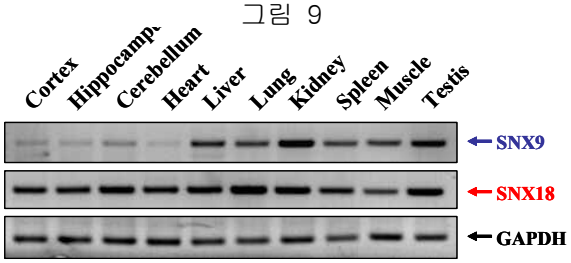


그림 11

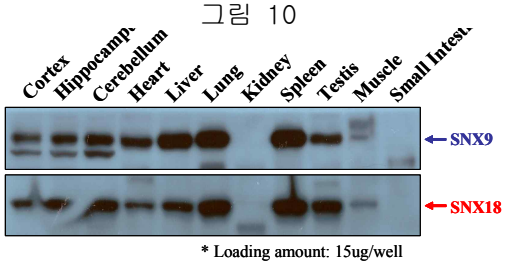
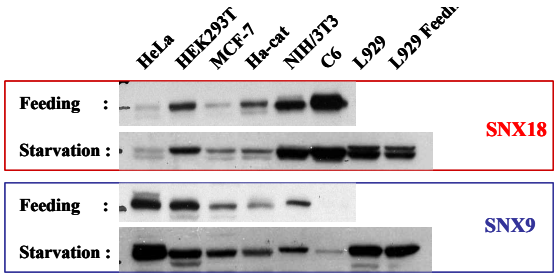


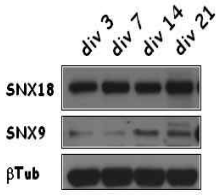
그림 12

20) SNX14을 발굴하고 cortex, hippocampus 및 cerebellum에 발현됨을 확인(그림



•MCF-7; breast cancer (human)
•HeLa; cervical cancer (human)
•L929; connective tissue (mouse)
•C6; glioma (rat)
•NIH/3T3; embryo (mouse)
•HEK293T; embryonic kidney (human)
•Ha-cat; keratinocyte (human)

그림 13



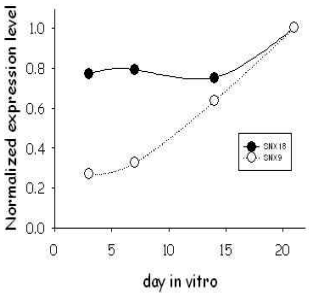


그림 14

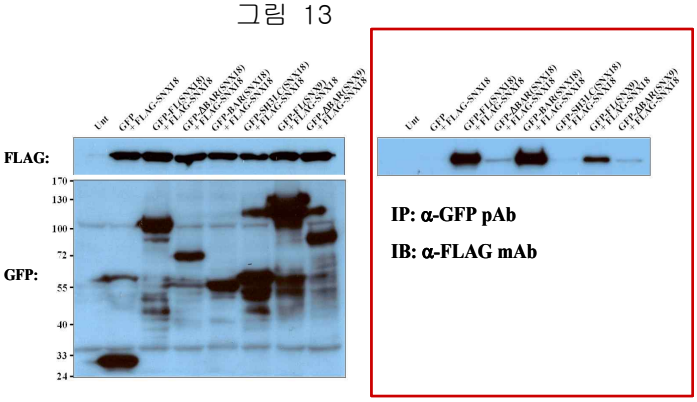


그림 15

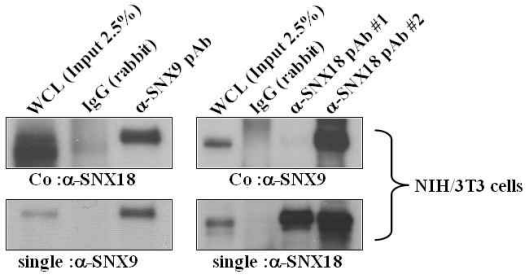


그림 16

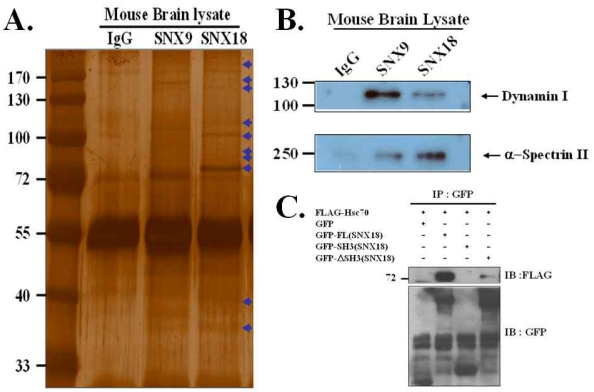
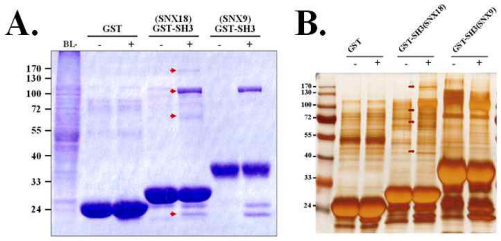


그림 17



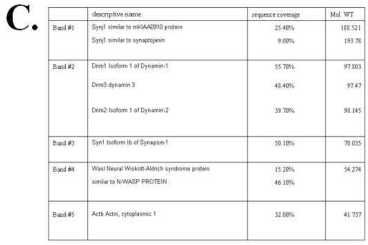


그림 18

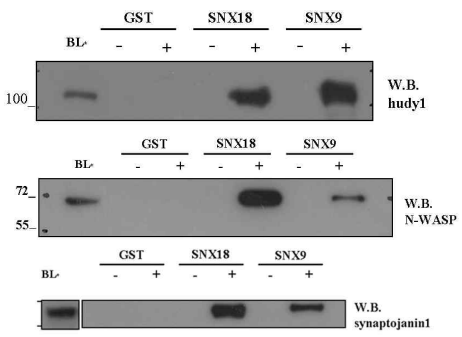


그림 19

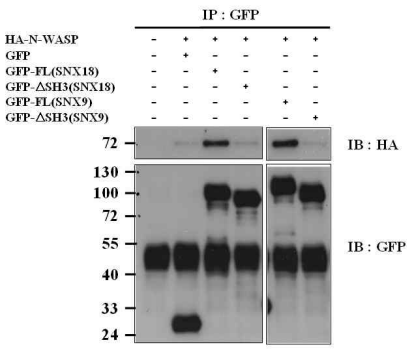


그림 68

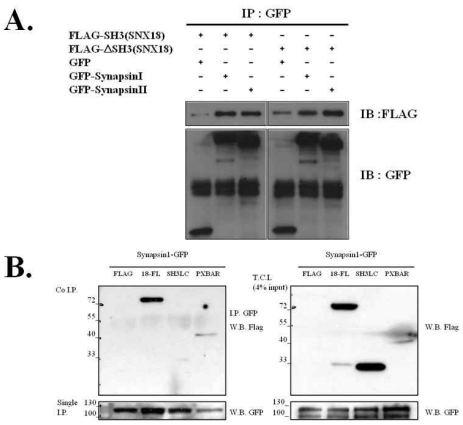


그림 21

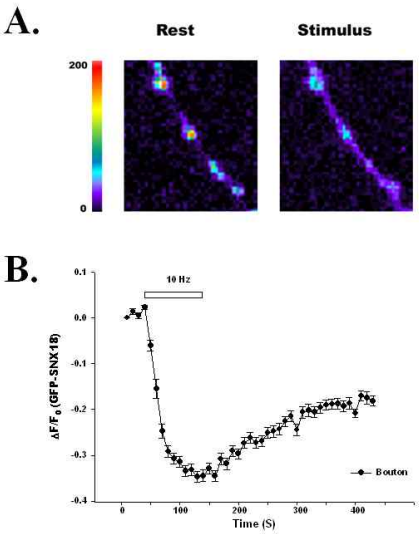


그림 23

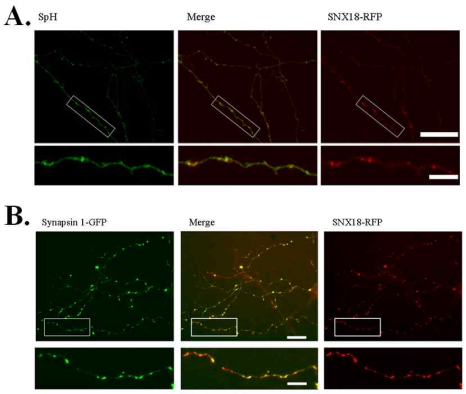


그림 22

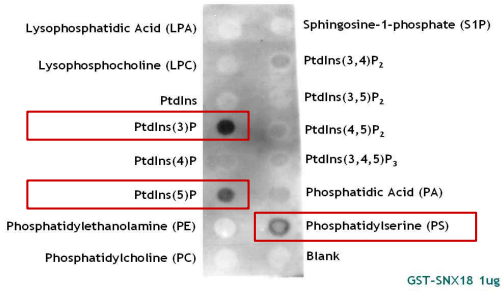


그림 25

26).

21) SNX14은 Gαs(QL) constitutive active form에 결합하고 wild-type Gαs에는 AMF가 존재할시에 다수 결합함. 또한 이들상호작용에 의하여 Gαs의 GTP hydrolysis가 촉진되며 isopreterenol에 의한 cAMP level의 증가가 저해됨을 확인함으로서 SNX14이 Gαs에 특이적 RGS임을 증명(그림 27).

22) SNX14이 인산화에 의해 RGS로서의 활성이 조절됨을 증명. SNX14은 PKA에 의하여 Serine 382와 388이 인산화됨을 LC MS/MS로 규명하고 이들을 S382D/S388D로 돌연변이 시켰을 경우 PKA에 의한 인산화가 저해됨을 확인하였고, SNX14가 PKA에 의하여 S382/S388에 인산화되었을 경우 Gαs와의 상호작용이 저해되어 RGS로의 역할이 방해됨을 확인(그림 28, 29).

23) SNX14은 PX도메인을 통하여 PI(3)P, PI(5)P에 다수 결합하고 PXA도메인을 통하여 PI(3,4)P2, PI(4,5)P2, PI(3,4,5)P3에 다수 결합하는 것으로 보아 세포막과 endosome을 오가는 sorting nexin 단백질로서의 기능을 함을 확인하였고, 세포내에서도 발현부위에 따라 endosome 및 세포막에 존재함을 확인(그림 30).

24) 5-HT6 receptor의 세포막발현이 SNX14의 동시발현으로 인하여 매우 감소하며 5-HT6 receptor의 감소는 세포내 SNX14발현의 증가와 맞물려 있음을 확인함. 이는 chariot을 이용한 SNX14 peptide를 세포내 도입시켰을 경우나 Tet-on expression system을 이용하여 SNX14의 발현을 증가시켰을 경우에도 5-HT6 receptor의 감소와 SNX14의 증가가 연관되있음을 증명함. 5-HT6 receptor는 세포내에 ubiquitination을 통하여 degradation되며 SNX14이 이를 매우 촉진시킴을 발견함(그림 31, 32, 33).

25) 다른 종류의 Gαs의존적인 GPCR인 dopamine D1 receptor의 경우에도 5-HT6 receptor와 동일하게 SNX14에 의해서 degradation이 증가됨을 밝힘(그림 34).

26) Gαs가 과발현된 해마 신경세포는 대조군에 비하여 dendritic spines(수상돌기극)의 형성이 매우 증가하며 수상돌기극의 형태 또한 neck이 길어지는 현상을 유발함. Gαs와 SNX14을 동시발현시키면 Gαs에 의한 수상돌기극 형성과 형태변이가 저해됨을 발견함(그림 35).

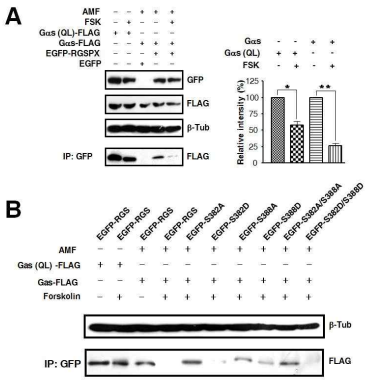


그림 29

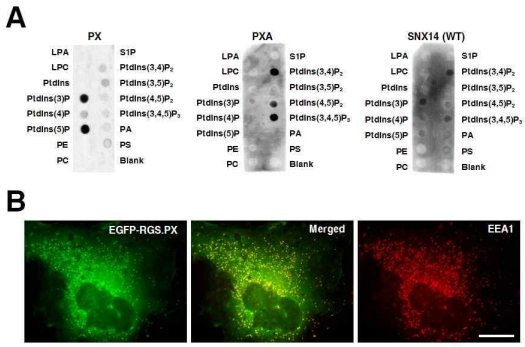


그림 30

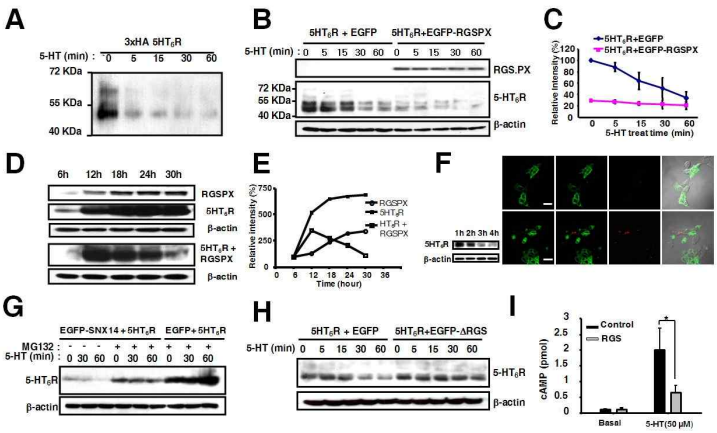


그림 31

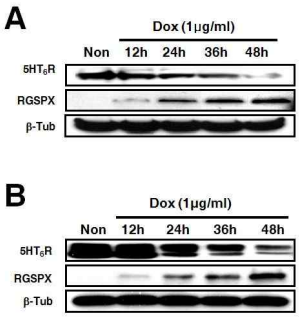


그림 32

제3공동연구

1) 생활성라이소지질의 하나인 Lysophosphatidylcholine (LPC) 에 의한 세포사멸확인(그림1)

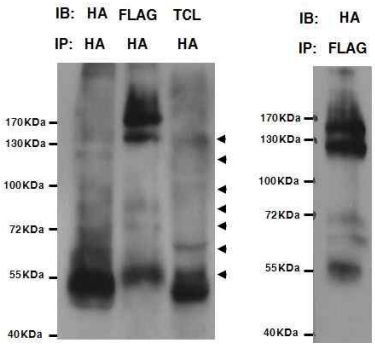


그림 33

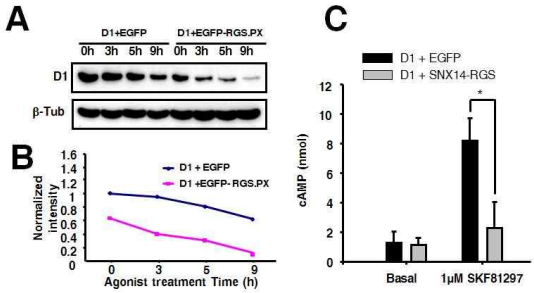


그림 34

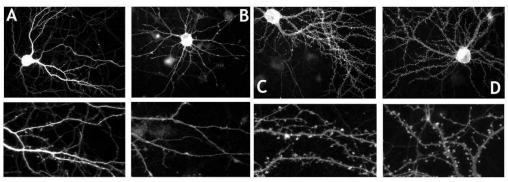


그림 35 A: GFP control; B: Gαs + SNX14; C, D: Gαs

2) LPC에 의한 H19-7 세포주의 사멸과 G2A 수용체를 통해 발생함을 확인(그림2)

3) LPC에 의한 H19-7 세포주의 사멸과 Fas ligand에 의한 신호전달체계에 의해 발생함을 확인(그림3)

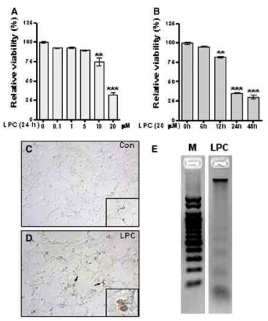


그림 1

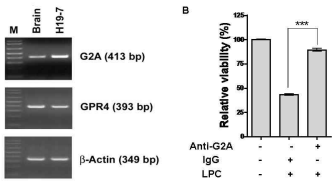


그림 2

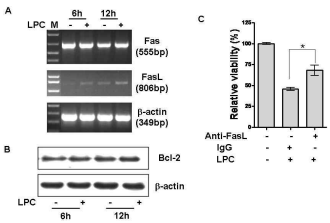


그림 3

4) LPC에 의한 Caspase-8, 3의 활성화됨을 확인(그림4)

5) LPC에 의한 NF-kB 활성화를 통해 Fas ligand 발현이 증가(그림5)

6) H19-7 세포주의 신경세포로의 분화과정에서의 LPA의 세포사멸억제효과확인(그림6)

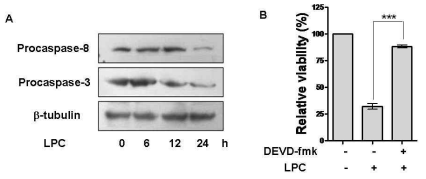


그림 4

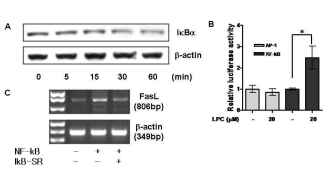


그림 5

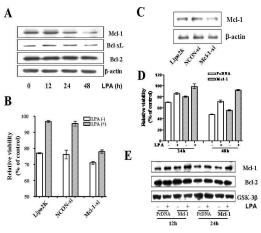


그림 6

7) LPA에 의한 세포보호효과의 주요인자가 Mcl-1 단백질이라는 것을 확인(그림7)
8) LPA에 의한 Mcl-1 양의증가는 Mcl-1 안정화에 의한 현상임(그림8)
9) glycogen synthase kinase 3 (GSK3) 의 억제로 인한 세포사멸억제되며 Mcl-1 단백질양이 증가함(그림9)

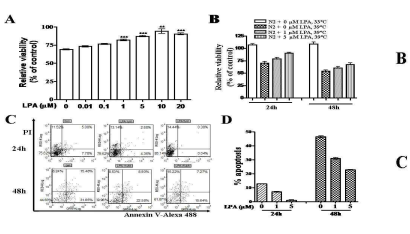


그림 7

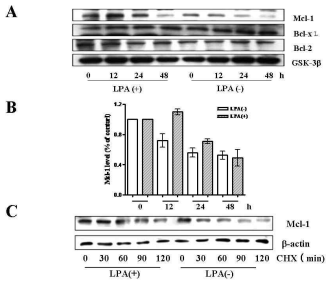


그림 8

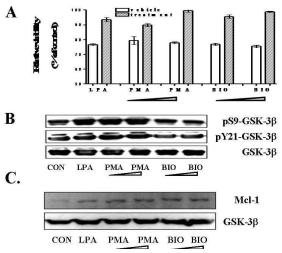


그림 9

10) LPA에 의한 세포보호효과가 Gi 경로를 통한 GSK3 의 불활성화로 인해 일어남(그림10)
11) LPA1, LPA2 수용체가 세포사멸 억제에 주요 역할을 함(그림11)
12) 5′RACE 기법을 통한 LPA1유전자의 전사시작부위 확인(그림12)

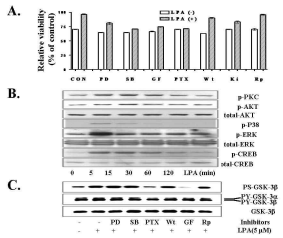


그림 10

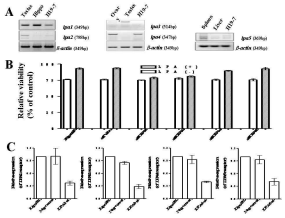


그림 11

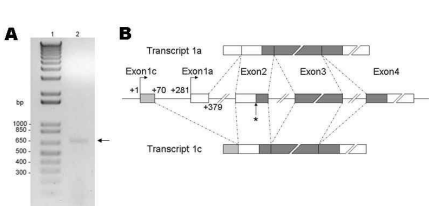


그림 12

13) 재조합한 LPA1-reporter 유전자의 프로모터 활성도 확인(그림13)
14) LPA1 유전자는 기본적인 프로모터 활성도는 역 조절인자에 의하여 조절되며, 3 부위의 주요 전사 억제 부위를 확인(그림14)
15) LPA1 유전자의 전사조절 억제에 E-box가 주요 부위임을 확인함(그림15)

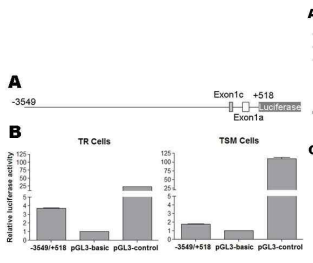


그림 13

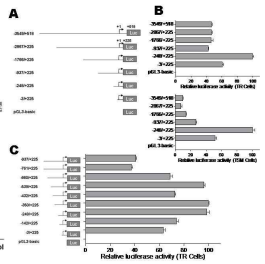


그림 14

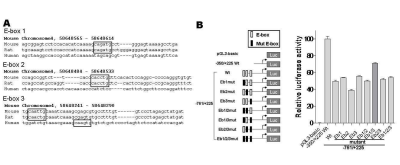


그림 15

16) Hela E-box binding protein (HEB) 단백질에 의한 LPA1 프로모터 활성도 감소확인(그림16)
17) LPA1 프로모터상의 실질적인 HEB 결합 확인(그림17)

18) LPA1 inducible 형질전환마우스 라인 구축(그림18)

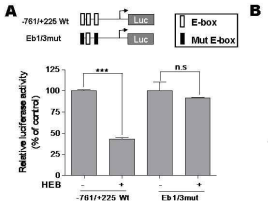


그림 16

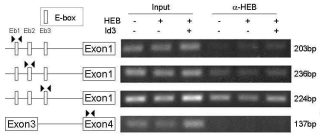


그림 17

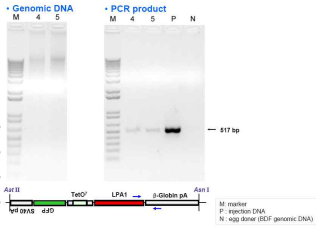


그림 18

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

가. 계획대비 달성도

구분	연구개발 세부목표	추진실적	달성도 (%)
2006	ßPix-a와 ßPix-b의 dendritic spine조절기전의 차이 연구	○ ßPix-a와 ßPix-b의 조직 및 뇌구성 세포에서의 발현 차이 규명 ○ 신경세포의 분화과정 중 ßPix-b 가 spine 형성 및 synapse발달을 촉진하며 ßPix-a의 과발현은 spine 형성 및 synapse발달을 저해하는 것을 확인	100
	siRNA를 이용한 ßPix isoform들의 기능연구	○ βPix의 모든 isoform에 공통으로 작용하는 3종의 shRNA와 βPix-b,c,d 와 d_{FL}에 특이적인 2종류의 shRNA, 그리고 βPix-d와 d_{FL}에 특이적으로 작용하는 4종류의 shRNA제작 ○ siRNA를 이용하여 βPix가 focal adhesion의 형성에 중요하다는 사실을 확인	80
	ßPix-knock-out line 구축 및 특성분석	○ ßPix-knock-out line 구축 ○ heterozygote 상태의 ßPix-knock-out line 구축 ○ homozygote embryo의 embryonic lethality 원인 규명 ○ homozygote embryo의 MEF (mouse embryonic fibroblast)를 focal adhesion defect가 있음을 증명	100

		○ radial eight-arm maze test를 통해 heterozygote에서 해마조직의 기능인 spatial memory에 defect가 있음을 증명	
	SNX9와 endocytosis관련 단백질의 상호작용 네트워크구축	○ SNX9과 상호작용하는 단백질들의 네트워크를 구축	100
	규명된 상호작용에 의한 신경세포 기능조절연구	○ SNX9과 상호작용하는 단백질들에 의한 시냅스낭 재순환과정 조절기전 규명	100
	SNX9에 의한 actin cytoskeleton의 조절기전연구	○ SNX9과 상호작용단백질에 의한 actin 조절기전 및 tubule형성기전 규명	100
	SNX9와 SNX18의 역할의 상호연계 및 배제적인 역할연구	○ SNX18을 cloning하고 antibody를 제작 2차년도 연구의 토대를 마련	100
	신경조직 유래 세포주에서 나타나는 Lysophospholipids에 의한 조절 기전에 관한 연구	○ Lysohpospholipids 신호전달체계와 관련된 조절인자들에 대한 분자적 기전 연구를 통하여 해마신경간세포주의 사멸과 사멸억제 매카니즘 확인	100
	LPA 수용체 발현을 시기 선택적으로 유도할 수 있는 형질전환 DNA construct 구축	○ LPA 수용체의 full length cDNA을 GFP 단백질과 양방향으로 Doxycycline의 처리에 의해 발현시킬 수 있는 발현벡터 pBI-EGFP에 융합한 형질전환 construct를 제조	100
2007	Abi-1의 dendritic spine 조절 기전의 차이 연구	○ Abi-1와 CaMKII의 결합에 의한 CaMKII의 활성 억제를 in vitro 및 in vivo에서 확인 ○ Abi-1와 CaMKII의 상호 작용이 dendritic spine을 조절하는 기작으로Rho GTPase를 통한 actin cytoskeleton 조절기전과의 상호작용 연구	100
	ßPix-d와 ßPix-b의 기능적 차이 연구	○ rat primary culture를 통한 신경세포 발달 과정에서 ßPix-d가 세포분화에 따라 위치변화가 일어나는 것을 확인 ○ ßPix-b는 tyrosine598인산화가 leucine zipper domain을 통한 ßPix-b의 dimer형성을 억제하여 monomer의 형태로 존재하게 하 dendritic spine에 특이적으로 위치하여 Rac1의 활성을 높이기때문이라는 ßPix-b의 dendritic spine 조절기전을 증명	90

	ßPix knock-out mouse의 특성 분석	○ Open field test를 비롯한 행동학적 검사에서 ßPix knock-out mouse (heterozygote)에서 anxiety 수준이 감소한 것을 관찰함. Golgi 염색을 통한 해마 신경세포의 spine density에는 변화가 없음을 관찰함. ○ Cre-LoxP system을 이용한 신경세포 특이적인 ßPix isoform knock-out mouse을 구축하였으며 mRNA 및 단백질 발현 양상을 분석한 결과 신경세포 특이적인 isoform만이 knockout된 것을 확인함.	100
	SNX18와 SNX9의 역할의 상호연계 및 배제적인 역할연구	○ SNX18과 SNX9의 조직 및 세포내 발현패턴의 차이를 분석	100
	SNX18와 exo/endocytosis관련 단백질의 상호작용 네트워크구축	○ SNX18과 상호작용하는 단백질 작용 네트워크를 구축	100
	규명된 상호작용에 의한 신경세포 기능조절연구	○ SNX18과 상호작용하는 단백질들에 의한 시냅스낭 재순환과정조절 기전 규명	100
	SNX18에 의한 tubulation의 조절기전연구	○ SNX18과 dynamin, N-WASP의 상호작용에 의한 tubule형성기전 규명	100
	LPA 수용체의 발현 조절 기전에 관한 연구	○ LPA1 수용체의 프로모터 분석방법을 이용한 대뇌신피질 신경전구세포에서 LPA1 수용체 발현 조절 기작의 규명 ○ LPA1 수용체의 발현에 초기발생단계에서 세포 운명(cell fate)을 결정짓는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 E-protein이 관여되어짐을 관찰하였음	100
	LPA 수용체 발현을 시기 선택적으로 유도할 수 있는 형질전환 마우스 생산	○ 라이소인지질의 수용체의 발현이 실험자에 의해 시기, 선택적으로 자유자재로 조절될 수 있는 형질전환 유전자 모델 (inducible transgenic model)을 제작	95
2008	βPix knock-out mouse를 이용한 dendritic spine 조절방안 screening 시스템	○ 신경세포 특이적 ßPix isoform knock-out mice를 이용하여 dendritic spine 조절과 정신발달장애(mental	80

	구축	retardation)와의 상관 관계 연구 ○ 신경세포 특이적 ßPix isoform knock-out mice를 mental retardation 연구 모델 동물로 확립 및 응용 방안 연구	
	βPix knock-down cell line을 이용한 dendritic spine 조절방안 screening 시스템 구축	○ βPIX wile-type(+/+), heterozygote(+/-), homozygote(-/-) MEF cell line을 확립	70
	Rac GTPase 활성화 경로에서 βPIX와 Abi-1/CaMKII 의 상호작용 연구	○ Abi-1의 과발현 및 knock down에 의한 CaMKII의 활성화 정도 및 Rac을 통한 dendritic spine morphology 분석 ○ Abi-1와 CaMKII의 결합을 조절하는 인자에 대한 연구 ○ CaMKII에 의한 Abi-1인산화 여부에 대한 조사	100
	GPCR신호전달체계에 의한 신경가소성에서 SNX의 역할 연구	○ SNX14이 Gαs의 RGS로서 신경계에서 GPCR신호전달을 조절함을 규명	100
	신경세포에서SNX에 의한 dendritic morphogenesis기전 연구	○ SNX14이 Gαs에 의한 수상돌기극의 형태변이를 조절함을 규명	100
	SNX14와 β-PIX의 상호작용연구	○ SNX14이 β-PIX와 상호작용함을 규명	100
	β-PIX knock-out및 LPA TG mice에서 SNX를 통한 시냅스전,후세포 기능연구	○ β-PIX KO를 이용한 SNX14에 의한 신경세포 기능 연구 수행 중	20
	형질전환 마우스 모델의 제시를 통한 LPA 수용체의 기능적 연구 동물 생리 행동학적 방법으로 분석	○ LPA1 수용체 조절인자 연구 및 기 확립된 마우스 라인을 이용하여 행동학적 특성연구 진행중	95
	조직면역학적 염색법을 통한 형질 전환 동물의 유전자 발현 변화 탐색	○ 대뇌피질 및 해마에서의 유전자 발현변화 양상 탐색 진행중	95

나. 주요 연구 성과

제1세부과제

1) ßPix isoform에 따른 조직 특이적, 신경세포 특이적 발현 규명

ßPix는 여러 가지 isoform으로 구성되었어 그 기능의 차이를 갖고 잇을 것으로 예상되나 현재까지 세계적으로 포유류 이상의 개체에서 이를 구분하여 연구가 진행되어 오지 않았고 따라서 신경세포의ßPix에서의 기능연구는 지극히 제한적인 결과만을 나타내고 있다. 본 연구그룹은 이를 착안하여 신경세포 및 신경 조직에서 특이적으로 발현하는 ßPix isoform들에 대해 이를 구분하여 연구의 초점을 맞추기 시작하였다.

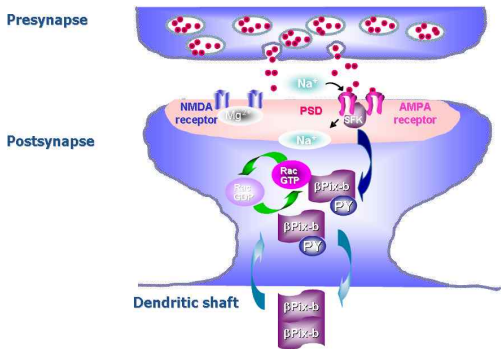
2) ßPix isoform에 따른 신경세포에서 미치는 영향 분석

본 연구진에서는 독보적으로 포유류 ßPix isoform에 대한 지식을 쌓아왔으며 각각 isoform을 구분할 수 있는 항체를 제작하였다. 이를 이용하여 신경세포에서 각 isoform에 따른 위치와 분포 차이를 구분하는 것이 가능해졌고 이를 통해 신경세포에서 ßPix가 isoform에 따라 다른 기능을 갖게 된다는 사실을 규명하였다.

3) 기존에 알려진 ßPix-a와 차별적인 ßPix-b의 신경세포 특이적인 기능 규명

현재까지 신경세포에서 알려진 ßPix의 기능과 역할은 ßPix-a에 의한 것으로 신경세포의 시냅스 가소성에 주요한 기능을 설명하기에는 지극히 제한적이다. 그러나 본 연구를 통해 그 동안 세계적인 연구그룹들에서 발표해온 ßPix-a의 신경세포 형태형성에 대한 제한적인 기능설명을 넘어 ßPix-b에 의한 신경세포의 dendritic spine 발달과 시냅스 가소성에 미치는 전반적인 영향을 설명 하였다.

4) 신경세포 특이적 ßPix-b가 신경세포 분화에서 dendritic spine 발달과 시냅스 형성을 조절하는 분자적 기작을 규명함으로 뇌기능 항진 및 뇌질환 치료에 대한 새로운 지식 기반 제공



ßPix-b에 의한 dendritic spine 발달 및 시냅스 형성에 대한 모델

5) ßPix knock out mice line 제작 및 특성분석(특허출원)
ßPix의 생리학적 역할을 규명하기 위해서 ßPix발현이 전조직에서 억제된 동물을 제작하였다. ßPix 유전자의 19번 엑손을 LoxP 유전자와 네오마이신 저항성 유전자로 대치시키는 방법을 이용하였다. 이렇게 만들어진 생쥐는 초기배아발생과정에서 문제가 생겨 사산하며, 신경발생과정에서 가장 중요한 neural tube closure에 defect가 있음을 확인하였다. 이 결과로 ßPix가 신경발생과정에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 생각할 수 있다. 앞으로 후속연구를 통해서 신경발생과정에서 ßPix의 기능을 명확하게 규명할 수 있는 실험동물 모델로서 충분한 가능성이 있다. 현재 이 생쥐는 특허출원을 획득하였다.(출원번호: 10-2007-0090528)
6) ßPix knock out mice를 이용한 MEF cell line 구축
βPIX를 발현하지 않은 MEF cell line이 확립되었기 때문에, 세포 내에서 βPIX가 없을 경우 발생할 수 있는 현상들을 확인하는 데 유용한 도구로 쓰일 수 있을 것이다.
7) ßPix knock out mice homozygote의 embryonic lethality 원인 규명
βPIX가 배아 발생에서 중요한 역할을 하고 있는 단백질로 개체발생에 대한 새로운 지식을 제공하였다.
8) βPix knockout mouse를 이용하여 βPix혈관형성에 미치는 영향연구
9) 신경세포 특이적 βPix isoform knockout mice 제작 및 특성 분석(특허출원)
본 연구진에서 제작한 ßPix knock out mice를 이용해 유전자 조작과 교배를 통해 insert domain을 갖는 신경세포 특이적인 ßPix isoform의 발현을 억제하고, 모든 조직에서 발현하고 있는 isoform인 ßPix-a는 정상적으로 발현할 수 있는 $\beta Pix^{\Delta neo/\Delta neo}$ mice를 만들었다. 이 동물모델을 이용하여 신경세포 특이적 βPix isoform의 in vivo 연구를 할 수 있는 기반을 마련하였다. (출원번호 : 10-2008-0103420)
10) Abi1에 의한 CaMKIIa 활성 조절 기작 규명 및 Abi1에 의한 dendritic spine 형성 조절 기작 규명
신경세포에서 glutamate 자극에 의한 CaMKIIa 활성 신호전달체계에서 Abi1에 의한 신경세포의 시냅스 형성 조절 기작 규명으로 CaMKIIa 가 관여하는 여러 퇴행성 뇌질환에서 치료를 위한 새로운 target 제시

제2세부과제

1) 1단계 연구개발성과를 바탕으로 2006년 SPIN90/WISH단백질이 수상돌기극의 형성에 중요한 역할을 함을 규명하여 시냅스의 형성 및 수상돌기극 형성의 분자적 기전을 밝힘으로서 뇌질환치료제 개발의 이론적 바탕을 제공하였다(EMBO J 교신발표, Genes Cell 공동발표, 2006년 9월 주요일간지/국정홍보처 연구성과자료로 보도)
2) 2단계사업의 1차년도 연구결과를 통하여 sorting nexin family중 SNX9이 신경세포 시냅스낭의 재순환과정을 조절함을 최초로 규명하였다(J. Bio. Chem., Mol.

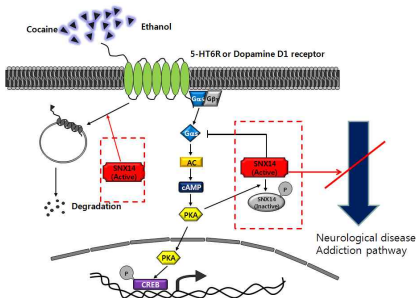
Neurobiol. 교신발표).

3) SNX18이 dynamin, N-WASP와의 연관작용을 통하여 세포내 시냅스낭의 endosome-TGN-세포막의 trafficking에 관여함을 규명하였다.

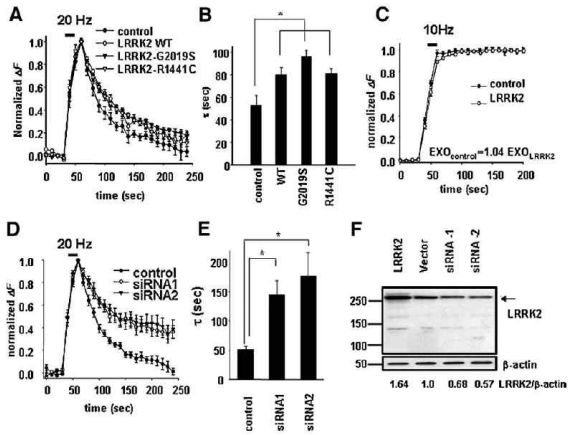
4) 3차년도 연구를 바탕으로 SNX14의 Gαs-linked GPCR의 신호전달체계를 조절하고 또한 GPCR의 postendocytic degradation을 매개함으로서 GPCR-cAMP-PKA신호전달체계를 조절과 연관된 다양한 뇌질환 및 중독등의 질환치료의 새로운 target을 제공하였다.

5) 국내 연구 그룹과의 공동연구를 통하여 1) delta-catenin이 신경계에서 p190RhoGEF와의 연관작용을 통하여 수상돌기의 가지분화에 역할을 함을 규명하였다(J. Biol. Chem. 공동발표), 2) 기존에 알려져 있지 않았던 파킨슨병의 병인단백질로 알려진 LRRK2가 신경세포에서 Rab5와 상호작용을 통하여 시냅스낭의 재순환과정을 조절함을 규명함으로서 LRRK2에 의한 파킨슨병 유발기전에 새로운 이론을 제시하였다(Exp. Cell Res. 교신발표)

6) 본 연구의 2단계 연구과정 중에 얻어진 실험방법의 know-how를 바탕으로 새로운 high-efficiency neuronal transfection method를 개발하였다(J. Neurosci. Meth. 에 투고)



SNX14에 의한 GPCR신호전달 조절기전



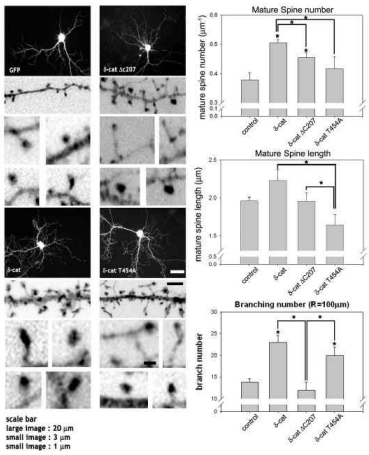
LRRK2 발현에 의한 시냅스낭 재순환과정의 조절 (출처 : Exp. Cell Res. 2008)

7) 또한 신경계에서 시냅스낭의 재순환과정에 가장 중요한 매개체로 알려진 dynamin의 inhibitor를 chemical library를 이용한 screening방법을 통하여 각각 다른 affinity를 지닌 다수의 후보군을 선별하였으며 이들에 의한 dynamin저해작용을 규명하였다(논문준비 중)

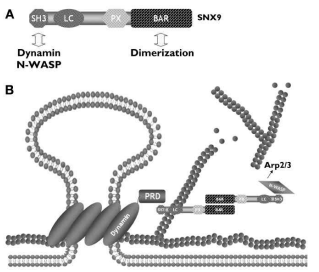
8) 본 연구의 결과를 다수(국내 22건, 국외 4건)의 학술대회를 통하여 발표하였다.

제3세부과제

1) 해마신경간세포주인 H19-7 세포의 분화과정에서의 세포사멸이 생활성 라이소지질인 LPA에 의하여 억제됨을 확인하였다. 또한 이런 현상은 anti-apoptotic factor



delta-catenin에 의한 수상돌기가지분화 및 수상돌기극 형성(출처 : J. Biol. Chem. 2007)



SNX9의 도메인 구조와 endocytosis에서의 역할 (출처 : Mol. Neurobiol. 2006)

중의 하나인 Mcl-1 단백질의 안정화의 조절이 주요한 매카니즘임을 확인하였다.

2) LPC에 의하여 H19-7 세포주의 세포사멸이 일어남을 확인하였다. H19-7 세포주의 사멸은 Fas 를 통한 세포자살기작에 의한 것 역시도 확인할 수 있었다.

3) LPA 수용체중 뇌에서의 기능과 가장 밀접한 수용체인 LPA1 수용체의 발현기작을 확인 하였다. 이 LPA1 수용체의 전사조절은 면역세포의 분화에서의 기능이 많이 밝혀진 HEB가 주요하게 조절한다는 것을 확인 하였다.

4) 전뇌 부위에 제한적으로 발현시킬 수 있는 Tissue-specific promoter를 이용하여 LPA1 수용체를 원하는 시기에 전뇌부위에 발현할 수 있는 Transgenic mouse line을 확립하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

가. 추가연구의 필요성 및 연구 계획

제1세부과제

βPix에 대한 연구초기에 βPix는 비신경조직 및 비신경세포에서 형태형성과정과 운동성에 주요한 역할 을 하는 것으로 알려져 왔으며 최근 까지도 그러한 연구는 세계적으로 지속되고 있다. 이와 함께 몇몇 세계적인 신경과학자 그룹들에서 βPix가 신경조직 및 신경세포에 미치는 기능을 연구하기 시작했다. 그러나 현재까지의 결과는 매우 제한적인 결과만을 보여주고 있다. 이러한 이유에 대해서 본 연구그룹의 분석으로는 βPix의 다양한 isoform에 대한 차별적인 기능 및 분표 연구가 이루어지고 있지 않기 때문이라고 판단된다. βPix의 기능의 중요성에 대해서는 그동안

다른 그룹들의 연구 결과와 함께 본 연구그룹의 결과인 βPix knock out mice homogygote의 embryonic lethality에서 증명되어진바 세포 수준 뿐만 아니라 개체 수준에서 중요한 역할을 하고 있는 것을 알 수 있다. βPix는 신경조직 특이적인 isoform이 존재하며, 이는 개체발생에서 βPix가 신경계 발생에 필수적인 기능을 담당할 것으로 예상된다. 본 연구 그룹은 βPix에 연구 초기부터 이러한 점에 착안하여 βPix의 여러 isoform에 대한 조직 특이적 발현을 연구하였으며 그 기능의 차이를 구분해오고 있다. 또한 신경조직 특이적인 βPix의 isoform을 구분하여 이를 구분할 수 있는 여러 종류의 항체와 각각의 isoform에 다양한 construct를 갖고 연구를 수행해오고 있다. 또한 βPix-b를 통한 dendritic spine발달 및 시냅스 형성에 대한 분자적 모델은 신경세포가 학습과 기억이라는 기능을 수행하기 위해 특유의 형태형성과 가소성을 기전에 대한 새로운 기작이다. 이는 형태형성과 기능에 밀접한 연관성을 갖는 여러 가지 뇌질환 치료와 뇌기능 항진 연구에 새로운 target을 제시하는 것이다. 이와 함께 βPix knock mice제작 및 신경조직 특이적인 βPix knock mice 제작은 세포수준에서 밝힌 dendritic spine 발달 및 시냅스 형성기작이 개체 수준에서 기억과 학습에서 어떻게 적용되는지에 대한 실용적인 연구를 가능하게 하며 다양한 뇌질환 치료 모델을 제공하며 뇌기능 항진을 위한 치료법과 약물개발에 초석이 될 것으로 생각한다. 이와 함께 Abi1에 의해 밝혀진 CaMKIIa를 통한 dendritic spine 조절 기작에 대한 연구 또한 앞으로의 후속 연구를 통하여 뇌기능을 이해를 넓히는 새로운 지식 기반을 제공할 것으로 예상된다.포유류 이상의 수준에서 βPix의 다양한 isoform에 대한 조직 수준, 세포수준에서의 분포와 기능의 차이 구분에 대한 지식과 실험 기법은 본 연구 그룹만의 독보적인 성과로 현재까지 βPix isoform 에 대한 구분 없이 수행 되어온 세계적인 그룹들에 의해 밝혀진 βPix에 대한 연구 결과들을 재조명 하며 그 의미를 더 구체화 할 수 있을 것으로 판단된다.

제2세부과제

최근의 연구들을 통해 다양한 세포내 기능조절인자로 인식되고 있는 sorting nexin family의 신경 세포내 신호전달체계 및 b-PIX signaling과의 연관성에 대한 본 연구는 G protein signaling과 관련된 뇌신경세포의 학습과 기억과정에 대한 세포생물학적 기전을 제공할 것으로 판단된다. 본 연구를 수행하기 위한 연구책임자의 핵심기술인 살아있는 신경세포의 관찰과 세포내 단백질변화 등을 연구할 수 있는 고해상도 CCD camera와 고배율 DIC 및 형광현미경을 이용한 digital imaging기법은 국내에는 현재까지 확립되어 있지 않고 미국에서도 새로운 세포생물학적 기법으로 각광받고 있는 분야임. 따라서 본 연구와 더불어 본 실험실에 확립되게 될 digital imaging 기술은 공동연구 및 교육을 통한 전반적인 국내 세포생물학연구에도 크게 기여할 것으로 사료된다. 또한 본 연구는 상기한 이론적/기술적 배경을 제시함으로

서 신경계 기능이상으로 발생하는 신경질환의 치료제 target발굴 및 두뇌의 기능조절인자의 발굴을 통한 실용화에 중요한 기여를 할 것으로 사료된다.

제3세부과제

본 연구는 생활성 라이소지질 및 수용체의 신경세포 특이적 기능을 분자 및 세포생물학적 기법을 통해 밝히는 것이었다. 이번 연구를 통해 생활성 라이소지질인 Lysophosphatidic acid와 Lysophosphatidylcholine의 신경세포 특이적 기능 및 메카니즘을 확인할 수 있었고 이들의 수용체중 하나인 LPA1 수용체의 전사조절 주요인자를 찾아낼 수 있었다. 이러한 연구결과를 토대로 생활성 라이소지질의 뇌 발생동안의 역할을 분자 및 세포생물학적 기전 뿐만 아니라, 생체 내에서 일어나는 많은 현상에서의 생활성 라이소지질의 역할 및 메카니즘을 연구할 수 있을 것이다. 특히 LPA1 수용체는 neuropathic pain, 발생과정에서의 대뇌피질층 형성장애 등 많은 뇌질환이 에 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. 이에 대한 추가적인 연구를 토대로, 생활성 라이소지질과 관련된 많은 뇌 질환의 병리기전의 규명 및 치료법 개발에 관한 연구도 진행할 수 있을 것으로 사료된다.

나. 활용방안

1) 포유류 이상의 수준에서 βPix의 다양한 isoform에 대한 조직 수준, 세포수준에서의 분포와 기능의 차이 구분에 대한 지식과 실험 기법은 본 연구 그룹만의 독보적인 성과로 현재까지 βPix isoform 에 대한 구분 없이 수행 되어온 세계적인 그룹들에 의해 밝혀진 βPix에 대한 연구 결과들을 재조명 하며 그 의미를 더 구체화할 수 있을 것으로 판단된다.
2) 본 연구 그룹에 의한 신경세포 특이적인 βPix에 대한 연구는 세계적으로 독보적인 연구결과를 수립하고 있다. 특히, βPix-b에 의한 dendritic spine발달 및 시냅스 형성에 대한 분자적 모델은 신경세포가 학습과 기억이라는 기능을 수행하기 위해 특유의 형태형성과 가소성을 일으키는 새롭게 제시되는 기작이다. 이는 형태형성과 기능에 밀접한 연관성을 갖는 여러 가지 뇌질환 치료와 뇌기능 항진 연구에 새로운 target을 제시하는 것이다. 후속 연구를 통해 실용적인 접근을 이루는 일에 지식 기반이 될 것으로 판단된다.
3) βPix knock mice제작 및 신경조직 특이적인 βPix knock mice 제작은 세포수준에서 밝힌 dendritic spine 발달 및 시냅스 형성기작이 개체 수준에서 기억과 학습에서 어떻게 적용되는지에 대한 실용적인 연구를 가능하게 하며, 다양한 뇌질환 치료 모델을 제공하며 뇌기능 항진을 위한 치료법과 약물개발에 주요한 실험 기법을 제공하게 될 것으로 생각한다.

4) Abi1에 의해 밝혀진 CaMKIIa를 통한 dendritic spine 조절 기작에 대한 연구 또한 앞으로의 후속 연구를 통하여 뇌기능을 이해를 넓히는 새로운 지식 기반을 제공할 것으로 예상된다.
5) 최근의 연구들을 통해 다양한 세포내 기능조절인자로 인식되고 있는 sorting nexin family의 신경 세포내 신호전달체계 및 b-PIX signaling과의 연관성에 대한 본 연구는 G protein signaling과 관련된 뇌신경세포의 학습과 기억과정에 대한 세포생물학적 기전을 제공할 것으로 사료된다.
6) 본 연구를 수행하기 위한 연구책임자의 핵심기술인 살아있는 신경세포의 관찰과 세포내 단백질변화 등을 연구할 수 있는 고해상도 CCD camera와 고배율 DIC 및 형광현미경을 이용한 digital imaging기법은 국내에는 현재까지 확립되어 있지 않고 미국에서도 새로운 세포생물학적 기법으로 각광받고 있는 분야임. 따라서 본 연구와 더불어 본 실험실에 확립되게 될 digital imaging 기술은 공동연구 및 교육을 통한 전반적인 국내 세포생물학연구에도 크게 기여할 것으로 사료된다.
7) 본 연구는 상기한 이론적/기술적 배경을 제시함으로서 신경계 기능이상으로 발생하는 신경질환의 치료제 target발굴 및 두뇌의 기능조절인자의 발굴을 통한 실용화에 중요한 기여를 할 것으로 기대된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

뇌에서 일어나는 흥분성 신호전달은 90%이상이 dendritic spine에서 이루어지고 있다(Harris and Kater, 1994, Nimchinsky et al., 2002). dendritic spine은 수상가지로부터 돌출된, 세포막으로 둘러싸인 구조물로 인식작용과 신경계의 발달에 중요한 기능을 하고 있다(Kennedy, 2000, Nimchinsky et al., 2002). spine의 형태는 그 기능과 밀접하게 연관되어 있고 actin cytoskeleton은 이 spine의 형태를 이루고, 변화, 유지 등의 조절을 하는 주된 요소이다. actin cytoskeleton을 조절하는 주요인자로 3가지 Rho GTPase(RhoA, Cdc42, Rac1)가 잘 알려져 있다(Adams et al., 1990, Ridley et al., 1992, Nakayamaet al., 2000, Carlisle and Kennedy, 2005). 또한 guanine nucleotide exchange factor (GEFs)는 Rho GTPase를 활성화시키는데 이 중 Kalirin-7, Tiam1, GEFT는 dendritic spine에 존재하여 spine의 형태조절에 영향을 미치는 것으로 밝혀지고 있다(Penzeset al., 2001, Bryan et al., 2004). Rac/p21-activated kinase (PAK) signaling pathway는 동물 개체수준과 배양신경세포수준에서 모두 spine 형태조절에 관여하고 있다(Hayashi et al., 2004, Zhang et al., 2005). 최근들어 ßPix 또한 dendritic spine에 존재하는 GEF로 세계적인 연구그룹들의 주요 연구 목표가 되고 있다. 하지만 지금까지의 연구에서와 같이 본 연구그룹을 제외한 다른 연구그룹들의 연구는 ßPix-a에 관한 연구에 머물러 있어 신

경세포에서 그 기능의 연구에 한계를 드러내고 있다. 신경세포에서 활성화에 의한 synaptogenesis조절경로의 하나인 CaMKinase signaling pathway는 세계적인 많은 그룹들이 관심을 갖고 연구하고 있는 주제인데 2007년 Soderling 그룹의 보고에서는 이러한 CaMKinase signaling pathway에 ßPix관여하고 있다고 보고하고 있다(Saneyosh et al., 2007). 그러나 다양한 ßPix isoform을 구분하지 못하고 있어 spine 형성과정에서 ßPix의 작용기작을 설명하는데 한계를 드러내고 있다. 이러한 연구 결과는 본 그룹의 신경세포 특이적인 ßPix isoform대한 연구로 명확한 작용기작을 밝힐 수있을 것이라 기대한다.

지금까지 많은 연구에서 Rac1이 spine형태조절에 중요한 인자라는 보고가 되어졌으나 최근까지 자세한 메카니즘과 정확한 기능은 밝혀지고 있지 않은 상태였다. 그러나 최근 Dezhi Liao 그룹의 발표에 의하면 Rac1이 dendritic spine형성을 개시하는데 중요한 요소임을 보고하고 있다. 초기 배양신경세포에서 Rac1의 과다발현이 dendritic spine의 형성을 유도하여 온전한 기능을 갖는 synapse를 형성한다는 것을 보고하고 있다(Katie et al., 2005). 또한 이미 시냅스가 형성된 배양신경세포 후기단계에서도 Rac1의 과다발현은 spine의 크기와 synapse의 수가 증가시키는 것을 보고 하였다. 이것으로 신경세포에서 초기 발생단계이서 spinogenesis를 유도하는 주요인자가 Rac1이며 synapse형성이후 spine의 발달 및 유지에도 기능을 하는 것으로 밝히고 있다. 이러한 결과는 본 연구에서 밝혀진 ßPix-b가 dendritic spine의 발달과 synapse형성을 촉진하는 기능 또한 Rac1과 연관되어 있음을 시사하고 있다. 또한 Rac1의 기능은 세포내에서 특정한 장소에 targeting되어 활성화됨으로써 세포의 기능을 유지시켜 세포를 극성화(polarizing)하는 것으로 이해되어져왔다. 이러한 기능을 통해 세포의 이동성 및 형태적 극성화(polarizing)가 조절되어지며 특히, 신경세포에서는 그 형태가 특수한 모양으로 분화되어가는데 중요한 역할을 하는 것으로 추정되어 왔다(Fukata et al., 2002, Etienne-Manneville and Hall, 2003, Schmoranzer et al., 2003, Watanabe et al., 2005). 이와 관련하여 최근에 밝혀진 중요한 기술정보는 2006년에 Peter L. Hordijk 그룹에 의해 보고된 것으로 Rac1의 targeting과 그에 따른 세포내 특정위치에서 Rac1의 활성화는 ßPix와의 상호작용을 통해 이루어지고 있다는 것이다(Jean et al., 2006). 이들의 연구 결과는 ßPix의 SH3 domain과 Rac1의 C-terminal hypervariable domain이 직접 결합하는 것으로 보고하고 있으며 Rac1의 hypervariable domain의 proline-rich sequence가 이 결합에 중요한 역할을 하고 있음을 제시하였다. 이는 기존에 알려진 ßPix와 Pak과의 결합 모티브와 유사한 것으로 이러한 결합 모티브유사성은 Rac1-ßPix 결합이 Pak의 작용에 의해 조절되는 것으로 증명되고 있다. 또한 최근의 보고에 의하면 Pak의 활성화는 autophosphorylation을 유도하며 인산화된 Pak은 ßPix와의 결합이 6배 이상 감소하는 것으로 보고되었다(Helen et al., 2005). 따라서 Rac1/Pak-signaling에서 Rac1과 Pak의 활성화는 ßPix와의 결합에 있어서 Rac1에 대해서는 증가시키고 Pak에 있어서는 감소시키는 것으로 생각할 수 있다. 이러한 보고들은 본 연구의 결과

에 따른 ßPix의 기능조절과 밀접히 연관되는 것으로 신경세포 특이적인 ßPix의 인산화형태가 dendritic spine에만 존재하며 glutamate에 의한 신경세포의 자극은 Pak의 인산화를 촉진시키며 ßPix의 인산화 또한 증가시키고 있다. 따라서 신경세포의 자극에 따른 Pak의 인산화와 ßPix의 인산화가 Rac1과의 상호작용을 촉진할 것으로 예상할 수 있으며 이것은 신경세포의 분화에서 ßPix와 Rac1의 상호작용의 조절이 spinogenesis 및 synaptogenesis에 중요하게 작용하고 있을을 시사한다.

최근 Rittinger 그룹은 ßPix의 기능에 중요한 작용 분자로 알려진 GIT1과의 상호 작용에서 ßPix의 trimmer 형성이 중요하다고 보고하였다(Schlenker et al., 2009). ßPix와 GIT의 결합은 그동안 많은 연구그룹들에의 synaptogenesis, cell polarity, cell migration에 많은 영향을 미치는 것으로 보고되어 왔다(Zhao et al., 2000, Manabe et al., 2002, Lahuna et al., 2005, Phee et al., 2005). 이들은 ßPix와 GIT이 각각 trimer와 dimer형태로 결합하여 거대한 complex를 이루어 작용한다고 보고하였는데, 이는 ßPix가 세포골격을 구성하는 주요인자인 actin cytoskeleton reorganization을 조절함으로써 다양한 세포기능을 조절하기 위해 여러 신호전달체계에서, 여러 단백질들과 상호작용해야 하는 기능에 대해 설득력 있는 설명을 하게 해 준다. 또한, Rittinger 그룹의 연구 결과는 ßPix의 기능에 C-terminal의 LZ domain을 통한 multimer 형성이 중요하다는 것을 시사하고 있는데, 이러한 사실은 본 연구결과의 중요성을 뒷받침하는 것이다. 본 연구그룹은 신경세포 특이적인 ßPix의 tyrosine인산화가 궁극적으로 ßPix의 multimer 형성을 조절하는 기능을 하는 것을 밝혔다. 본 연구는 또한, ßPix의 인산화에 의해 형성된 ßPix의 monomer형태가 신경세포의 dendritic spine에 특이적으로 위치하여 Rac1을 신경세포 내의 제한된 장소에서 국소적으로 활성화시켜 dendritic spine 발달을 촉진하는 분자적 기작을 밝혔다. 이러한 본 연구 그룹의 결과는 ßPix-GIT 상호작용에 관한 최근 연구와 함께 LZ domain에 의한 ßPix의 multimer 형성 조절이 세포내에서 ßPix의 기능에 중요하다는 사실에 대한 강력한 증거가 되고 있다. 또한 그동안 Rho GTPase에 대한 많은 연구를 해온 Curtis 그룹은 최근 동물모델을 통해 신경세포의 발달 및 뇌의 발달에 Rac1 및 Rac3의 중요성을 보고하였다(Corbetta et al. 2009). 이들은 synapsin promoter를 이용하여 뇌의 해마부위 hilus에서 Rac1과 Rac3의 발현을 특이적으로 억제하여 dentate gyrus에서 hilus와 연계되어 이루어지는 회로가 신경세포 발달억제로 인해 손상되었음을 보여 주였다. 이는 본 연구 그룹의 결과에서 보여주고 있는 것처럼 ßPix의 작용을 통한 Rac의 활성조절 작용이 신경세포 발달에 중요하며, 더 나아가 ßPix의 활성조절이 뇌 회로형성에도 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 보여주고 있다. 본 연구를 통해 제작된 신경세포 특이적 ßPix KO mice는 이러한 가능성에 대한 후속연구에 유용한 동물모델이 될 것으로 사료된다.

제 7 장 참고문헌

Adams AE, Johnson DI, Longnecker RM, Sloat BF, Pringle JR (1990) CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol 111: 131-142.

Bryan B, Kumar V, Stafford LJ, Cai Y, Wu G, Liu M (2004) GEFT, a Rho family guanine nucleotide exchange factor, regulates neurite outgrowth and dendritic spine formation. J Biol Chem 279: 45824-45832.

Carlisle HJ, Kennedy MB (2005) Spine architecture and synaptic plasticity. Trends Neurosci 28: 182-187.

Corbetta S, Gualdoni S, Ciceri G, Monari M, Zuccaro E, Tybulewicz VL, de Curtis I. (2009). Essential role of Rac1 and Rac3 GTPases in neuronal development. FASEB J. 23(5):1347-57.

Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2003. Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. Curr. Opin. Cell Biol.

Eunhye Park, Moonseok Na, Jeonghoon Choi, Seho Kim, Jae-Ran Lee, Jiyoung Yoon, Dongeun Park, Morgan Sheng, and Eunjoon Kim (2003) The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. J. Biol. Chem. 278:19220-19229.

Fukata, M., T. Watanabe, J. Noritake, M. Nakagawa, M. Yamaga, S. Kuroda, Y. Matsuura, A. Iwamatsu, F. Perez, and K. Kaibuchi. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. Cell. 109:873 - 885.

Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. Annu Rev Neurosci 17: 341-371.

Hayashi ML, Choi SY, Rao BS, Jung HY, Lee HK, Zhang D, Chattarji S, Kirkwood A, Tonegawa S (2004) Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. Neuron 42: 773-787.

Helen R. Mott, Daniel Nietlispach,Katrina A. Evetts, Darerca Owen (2005) Structural Analysis of the SH3 Domain of β-PIX and Its Interaction with α-p21 Activated Kinase (PAK) Biochemistry 10977 -10983.

Jean Paul ten Klooster, Zahara M. Jaffer, Jonathan Chernoff, Peter L. Hordijk (2006) Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. J Cell Biol. 172(5):759-69.

Katie M, Hang Lin, Dezhi Liao. (2005) Raci induces the clustering of AMPA receptors during spinogenesis. J Neurosci 25;10627-10636.

Kennedy MB (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. Science 290: 750-754.

Kim DJ, Kim SH, Lim CS, Choi KY, Park CS, Sung BH, Yeo MG, Chang S, Kim JK Song WK. (2006) Interaction of SPIN90 with the Arp2/3 complex mediates lamellipodia and actin comet tail formation. J. Biol. Chem. 281(1):617-25.

Kim Y, Kim S, Lee S, Kim SH, Kim Y, Park ZY, Song WK Chang S. (2005) Interaction of SPIN90 with dynamin I and its participation in synaptic vesicle endocytosis. J. Neurosci. 25(41):9515-23.

Lahuna, O., Quellari, M., Achard, C., Nola, S., Meduri, G., Navarro, C. et al. (2005). Tyrotropin receptor trafficking relies on the hScrib-betaPIX-GIT1-ARF6 pathway. EMBO J. 24, 1364-1374

Lee, C,W., Nam, J.S., Park, Y.K,, Choi, H.K., Lee,J.H., Kim, N.H., Cho, J., Song, D.K., Suh, H.W., Lee, J., Kim, Y.H., Huh S.O. (2003) Lysophosphatidic acid stimulates CREB through mitogen- and stress-activated protein kinase-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 305: 455-461.

Manabe, R., Kovalenko, M., Webb, D. J. & Horwitz, A. R. (2002). GIT1 functions in a motile, multimolecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration. J. Cell Sci. 115, 1497-1510.

Nakayama AY, Harms MB, Luo L (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. J Neurosci 20: 5329-5338.

Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. Annu Rev Physiol 64: 313-353.

Oliver Schlenker and Katrin Rittinger (2009). Structures of Dimeric GIT1 and Trimeric β-PIX and Implications for GIT.PIX Complex Assembly. J. Mol. Biol. 386, 280-289

Penzes P, Johnson RC, Sattler R, Zhang X, Huganir RL, Kambampati V, Mains RE, Eipper BA (2001) The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. Neuron 29: 229-242.

Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. Cell 70: 401-410.

Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR. (2007) Activity-Dependent Synaptogenesis:Regulation by a CaM-Kinase Kinase/CaM-Kinase I/bPIX Signaling Complex. Neuron. 57(1):94-107.

Schmoranzer, J., G. Kreitzer, S.M. Simon. 2003. Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge. J. Cell Sci. 116:4513 - 4519.

Seung-Hye Lee, Mira Eom, Seung Joon Lee, Seyun Kim, Hyun-Jung Park, Dongeun Park (2001) βPix enhanced p38 activation byCdc42/Rac/PAK/MKK3/6-mediated pathway : Implication in the regulation of membrane ruffling. J. Biol. Chem. 276:25066-25072.

Seyun Kim, Seung-Hye Lee, Dongeun Park (2001) Leucine Zipper-Mediated Homodimerization of the Pak Kinase Interacting Factor, βPix : Implication for a role in cytoskeletal reorganization. J. Biol. Chem. 276:10581-10584.

Seyun Kim, Taeho Kim, Deokjae Lee, Sun-Hwa Park, Hyun Kim, Dongeun Park (2000) Molecular cloning of neuronally expressed mouse βPix isoforms. Biochem. Biophys. Res. Comm. 272:721-725.

Watanabe, T., J. Noritake, and K. Kaibuchi. 2005. Regulation of microtubules in cell migration. Trends Cell Biol. 15:76 - 83.

Yan, J.J., Jung, J.S., Lee, J.E., Lee J., Huh, S.O., Kim, H.S., Jung, K.C., Cho, J.Y., Nam,J.S., Suh, H.W., Kim, Y.H., Song, D.K. (2004) Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. Nature. Med. 10:161-167.

Zhang H, Macara IG. (2006) The polarity protein PAR-3 and TIAM1 cooperate in dendritic spine morphogenesis. Nat Cell Biol. 8(3):227-37.

Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Niu S, Horwitz AF (2005) A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. J Neurosci 25: 3379-3388.

Zhao, Z. S., Manser, E., Loo, T. H. & Lim, L. (2000). Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. Mol. Cell. Biol. 20, 6354-6363.

주 의

1. 이 보고서는 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.