



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

기능 단백질체학을 통한 무결성 소포체 막
단백질 생합성에 관여하는 CCDC47 과

EMC 의 협력적 역할 규명

Functional proteomics reveals the cooperative role
of EMC and CCDC47 in membrane protein
biogenesis

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

신 민 석

기능 단백질체학을 통한 무결성 소포체 막
단백질 생합성에 관여하는 CCDC47 과
EMC 의 협력적 역할 규명

지도교수 강 상 욱

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2024 년 08 월

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

신 민 석

신민석의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 강 민 지 인

심사위원 송 영 섭 인

심사위원 강 상 욱 인

울 산 대 학 교 대 학 원

2024 년 08 월

국문 요약

소포체에서 합성되는 막 단백질들은 물질 수송, 세포 접착, 신호 전달, 효소 활성화, 면역 반응을 포함한 광범위한 생물학적 과정에 관여한다. 이들 단백질의 생합성은 열역학적으로 불안정한 소수성 막 횡단 도메인(transmembrane domain, TMD)의 저조한 막 삽입 효율에 의해 쉽게 교란되는 경향이 있다. 이는, 손상된 막 삽입을 교정해, 구조 결함을 억제하는, 막 단백질 특이적 샤페론의 기능적 중요성을 시사한다. 본 연구에서는, 소포체 막 복합체(ER membrane complex, EMC)와 막 단백질 특이적 샤페론(coiled-coil domain containing 47, CCDC47)과의 기능적 상호 작용의 입증을 통해, 새로 합성된 Sec63 단백질에 특이적인 품질관리 기전을 규명하였다.

EMC의 신규 기능 규명을 위해 시도한 TAP-tag 기반 친화도 정제와 단백질 질량 분석으로 소포체 막 상주 샤페론인 CCDC47를 EMC와 상호 작용하는 신규 단백질로 식별할 수 있었다. CRISPR/Cas9 기술로 제작된 CCDC47 결핍 세포에 소포체 특이적 근접기반 라벨링을 적용하여 CCDC47 의존적 소포체 막 단백질들을 발굴할 수 있었으며, 이중, 소포체 단백질 채널 복합체의 중요한 구성 성분인 Sec63의 발현 수준이 CCDC47 결핍 세포에서 명확하게 감소함을 알 수 있었다.

결과적으로, CCDC47의 결손은 소포체 스트레스에 의해 활성화되는, Sec63/BiP 관련 신호전달 체계를 교란하였으며, EMC와 CCDC47 간의 상호 작용이 Sec63의 구조적 기능적 무결성에 협력적으로 기여함을 시사한다.

따라서, 본 연구는 소포체 막 매개 단백질 품질관리 기전의 신규 아이디어를 제공했다는 점에서 학문적 의미가 큰 것으로 판단된다

중심 단어: EMC, CCDC47, Sec63, 단백질 품질관리, 소포체 막

차례

국문요약	i-ii
차례	iii-iv
그림 목차	v-vi
서론	1-4
연구방법	5-16
1. 항체 및 시약	5-6
2. 분자생물학 실험	6-13
3. 세포 배양 실험	13
4. 공초점 현미경	13-14
5. 면역블리팅	14
6. 공동정제	14-15
7. 소포체 제한적 근접 표지	15
8. 펄스	16
연구결과	17-22

1. EMC의 구조적/기능적 핵심 구성 성분으로 EMC5를 도출함	17-18
2. EMC와 상호 작용하는 CCDC47을 발견함	18-19
3. CCDC47의 기질 발굴을 위한 소포체 제한적 근접 표지 전략	19-20
4. CCDC47의 기질 발굴	20
5. CCDC47 결핍에 따른 UPR 교란	21
6. CCDC47 결핍에 의한 Sec63 구조 변화	21-22
고찰	45-48
참고문헌	49-52
Abstract	53-54

그림 목차

그림 1. Cryo EM을 통해 밝혀진 EMC의 3차원 구조	23
그림 2. EMC의 구조적 핵심 구성 성분 도출	24
그림 3. EMC5 결핍에 의한 EMC의 기능 손상	25
그림 4. EMC와 상호 작용하는 신규 단백질 도출 전략	26
그림 5. EMC와 공동 정제되는 소포체 막 단백질 CCDC47 발견	27
그림 6. EMC와 CCDC47의 상호 작용을 검증함	28
그림 7. EMC5 결핍에 의한 상호인자 CCDC47 감소	29
그림 8. CCDC47 결핍 세포주 제작	30
그림 9. EMC 의존적 TA protein 삽입은 CCDC47과 무관함	31
그림 10. 소포체 제한적 근접 표지 전략	32
그림 11. TurboID 발현과 단백질의 바이오틴화를 확인함	33
그림 12. 공초점 현미경을 이용한 TurboID와 바이오틴화 된 단백질 위치를 확인함	34
그림 13. 바이오틴화의 공간적 특이성 검증	35

그림 14. 소포체 제한적 근접 표지 사용한 CCDC47 기질 발굴	36
그림 15. Volcano plot으로 나타낸 CCDC47의 기질 목록	37
그림 16. 표로 나타낸 CCDC47의 기질 목록	38
그림 17. CCDC47 결핍에 따른 Sec63 변화	39
그림 18. UPR 경로에서 Sec63 기능	40
그림 19. CCDC47 결핍에 따른 IRE1 α 의 변화	41
그림 20. CCDC47 결핍 세포에서 과발현된 Sec63-HA의 발현 수준 증가 ..	42
그림 21. CCDC47 결핍 세포에서 과발현된 Sec63-HA의 용해성 차이	43
그림 22. EMC와 CCDC47의 상호 작용을 통한 막 단백질 품질 관리 기전 ..	44

서론

소포체 (ER, endoplasmic reticulum)는 단백질 합성, 접힘, 번역 후 변형 및 지질 대사를 포함한 다양한 세포 과정에 관여하는 중요한 세포 소기관이며^[1], 기능 장애는 다양한 인간 질환, 특히 단백질 접힘 및 지질 대사와 관련된 질병의 병인과 밀접한 연관성이 있다^[2]. 따라서, 소포체 기능을 이해하고 유지 및 관리하는 소포체 항상성 기전 연구는 다양한 질병에 대한 치료법 개발에 있어 중요한 연구 분야다. 예를 들어 소포체에서 UPR (unfolded protein response) 및 샤페론 (chaperone) 단백질을 표적으로 삼는 것은 신경 퇴행성 장애 및 당뇨병과 같은 질병에서 소포체 스트레스의 영향을 완화하기 위해 적극적으로 고려되고 있는 전략이다^[3, 4].

막 단백질 (membrane protein)은 신호 전달, 물질 수송 그리고 항원 인식과 같은 필수적인 세포 활동에 참여한다^[5]. 진핵 세포 내 모든 단백질의 약 20-30%는 막 단백질이며, 지질 이중층 (lipid bilayer)에 삽입될 막 횡단 영역 (TMDs, transmembrane domains)을 가지고 있다. 막 단백질은 최종 목적지에 도달하기 전, 소포체 막에 공동 번역 (co-translationally) 또는 번역 후 삽입 (post-translationally inserted) 된다^[6]. 이 중, 소포체 막 단백질은 단백질의 접힘 뿐 아니라 소포체 내 단백질의 구조결함을 인식하여 핵에 정보를 전달하고, 필요한 샤페론 유전자의 전사 촉진을 유도한다는 점에서 막 단백질의 구조적, 기능적 무결성 보장은 소포체의 기능 유지를 위한 필수 요소라 할 수 있다^[7]. 또한, 세포질과는 달리 소포체는 지질 이중층 (lipid bilayer)에 쌓여 구획화되어 있는데^[8], 소포체 막에 결합해 기능을 하는 막 단백질들은 다중 막 단백질 복합체 (multisubunit membrane protein complexes)의 형태로, 제한적인

공간에서 다양한 기능을 시기적절하게 발휘할 수 있다^[9]. 예를 들어, 소포체 단백질의 공동 번역적 (co-translational), 접힘 (folding), 수식 (modification) 그리고 조립 (assembly) 과정에 관여하는 막 단백질들은 단백질 유입 통로인 Sec61 복합체를 중심으로 거대 다중 막 단백질 복합체를 형성하고 있다^[10, 11]. 이는 세포가 다양한 환경에 적응하고 진화하는 과정에서 단백질의 무결성을 보장하기 위한 가장 효율적인 전략으로, 소포체가 복잡하고 다양한 기능을 발휘하는데 효율성, 정밀도, 그리고 조절 및 적응성 측면에서 많은 이점을 제공한다.

일정 이상의 세포 외 자극으로 인해 소포체 항상성 유지가 어려워진다면, 세포는 소포체 스트레스를 통해 UPR을 활성화하게 된다^[12]. UPR이 활성화되면, IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), PERK (protein kinase-like ER kinase) 그리고 ATF6 (activating transcription factor 6)와 같은 신호 전달자가 단백질 합성을 줄이고, BiP 과 같은 샤페론의 생성을 촉진하여 잘못 접힌 단백질을 제거하거나 정상화한다^[13]. 하지만 소포체 스트레스가 지속되면 UPR 은 제대로 기능하지 못하는 세포를 제거하기 위해 세포 자살을 시작한다^[14]. UPR 에 의한 정확한 소포체 항상성 조절은 당뇨, 암과 같은 질병과 관련이 있다고 알려져 있어, UPR 의 조절에 관한 연구는 필수적이다^[15].

최근 다양한 연구를 통해 EMC (ER-membrane protein complex)는 단백질들의 정교한 생합성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^[16-23]. 하지만 EMC 의 기능을 규명하기 위한 연구 범위는 시험관 내 무세포 시스템을 이용한 소포체 막 단백질의 삽입 과정에 국한된 단일 분자 수준의 연구와 구조적 역동성 연구에 국한되어 왔다. 최근 다양한 연구를 통해 EMC 가 세포의 생리 활성에 다양한 방법으로 기여하고 있음을 시사하는 증거들이 제시되고 있다^{[24-}

^{26]}. 이는 EMC의 핵심 기능인 단백질 삽입 촉진 효과가 EMC와 상호 작용하는 단백질의 기능과 조합되어 신규 기능을 발휘할 가능성을 시사한다.

CCDC47 (coiled-coil domain-containing protein 47)은 소포체 막 단백질이며, Ca^{2+} 의 농도 센서로서 알려져, Ca^{2+} 의 항상성 조절과 관련된 연구가 진행되어 왔다^[27]. 하지만 Asterix와 함께 PAT complex의 구성 성분임이 최근 연구를 통해 발견되었으며, 특히 PAT complex의 단일 막 단백질을 제외한 다중 막 단백질의 생합성에 선택적으로 관여하는 기전에 관련한 CCDC47의 역할을 밝히기 위한 연구가 함께 이루어져 왔다^[28, 29]. 본 연구에서의 결과는 기질 단백질에 선택적으로 활성화되는 소포체 막 단백질 품질 관리 기전에 대한 단서를 제공하여 소포체 항상성 연구에 도움을 줄 것이라 기대한다.

현대 생물학에서 중요한 목표 중 하나는 단백질 간의 상호 작용을 알아내는 것이다. 서로 상호 작용하는 단백질은 일반적으로 유사한 기능을 공유하기 때문에^[30], 단백질의 기능을 규명하기 위해서는 상호 작용하는 단백질을 알아낼 필요가 있다. 질량 분석법 (mass spectrometry)은 이를 위한 중요 기술로 여겨졌다. 질량 분석법과 친화 정제법 (affinity purification)은 직접 상호 작용하는 단백질을 분리해내어 분석할 수 있게 하였고, 이는 단백질의 기능을 규명하는데 큰 단서가 되었다. 하지만 일시적이거나 약한 단백질 간의 상호 작용은 관찰할 수 없고, 일부 단백질은 상호 작용 후 다른 기관으로 이동하기 때문에^[31] 새로운 방법이 필요하였다. 근접 표지 (proximity labeling) 전략은 이를 극복하기 위해 만들어진 방식으로, 바이오틴 혹은 HRP (horseradish peroxidase)와 같은 물질을 근처의 단백질에 비특이적으로 표지시키는 효소를 이용하는 것이다. 예를 들어, TurboID는 주변의 단백질을 바이오틴으로 비특이적 표지시켜 TurboID가 위치한 곳의 단백질을 모두 식별할 수 있게

해준다. 이 방법은 일시적이거나 약한 상호 작용에도 적용할 수 있으며, 다른 소기관으로 가더라도 알 수 있다는 장점이 있다. 하지만, 비특이적으로 표지하여 수천개의 단백질이 식별되기 때문에 비교군을 필요로 한다^[32]. 근접 표지 전략은 단백질 상호 작용을 연구하는데 중요한 방식 중 하나로 다양한 상황에 적용 가능하며, 이는 분자생물학, 발생학, 신경생물학 등의 다양한 생물학 분야 연구에 필수적이다.

본 연구에서는 친화 정제법, 질량 분석법 그리고 근접 표지 전략 등을 통해 소포체 막 단백질 품질 관리 기전을 밝혀내는데 필요한 단서를 제시하여, 이를 통한 소포체 기능 보장, 소포체 항상성 유지, 단백질 응집 방지 그리고 소포체 기능 손상에 의한 질병에 대한 실마리를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

연구 방법

항체 및 시약

본 연구에 사용된 항체 (antibody)는 다음과 같다.

Antibody	Company
BiP	BD Bioscience (East Rutherford, New Jersey, USA)
CANX	Cell signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
CCDC47	Bethyl (Montgomery, Texas, USA)
Sec63	Proteintech (Boulder, Colorado, USA)
EMC4	Proteintech (Boulder, Colorado, USA)
EMC5	Bethyl (Montgomery, Texas, USA)
EMC7	Proteintech (Boulder, Colorado, USA)
EMC8	Proteintech (Boulder, Colorado, USA)
EMC9	Proteintech (Boulder, Colorado, USA)
EMC10	Abcam (Cambridge, UK)
HSP90	Cell signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
IRE1 α	Cell signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
Streptavidin-HRP	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
V5	Invitrogen (Carlsbad, California, USA)

TRAPalpha (cysteine plus residue 272–286)와 Sec61beta (residues 2–10 plus a cysteine)는 Lampire Biological Laboratories (Pipersville, Pennsylvania, USA)를 통해 keyhole limpet hemocyanin이 붙은 peptide를 토끼에 주입하여 회수한 항혈청으로 검출하였다.

Peptide N-glycosidase (PNGase F)를 포함한 수식 및 제한 효소들은 New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)에서, Thapsigargin은 MiliporeSigma (Burlington, Massachusetts, USA)에서, Protease Inhibitor Cocktail Mini-tablet은 MedChemExpress (Monmouth Junction, New Jersey, USA)에서 구입하였다.

분자생물학 실험

Flp-In 293T-Rex 세포와 Hela 세포에게서 Favorgen (Changzhi Township, Pingtung County, Taiwan)에서 구입한 Tissue total RNA purification mini kit를 이용해 RNA를 추출한 후, Invitrogen (Waltham, Massachusetts, USA)에서 구입한 Superscript II Reverse transcriptase을 이용하여 cDNA를 합성하였다. Flp-In 293T-Rex 세포의 cDNA를 주형으로 FDFT1 (표 1의 #1/#2 primer 이용)과 Sec61 β (표 1의 #3/#4 primer 이용), Hela 세포의 cDNA를 주형으로 Cb5 (표 1의 #5/#6 primer 이용)를 각각의 primer와 함께 PCR로 증폭시켜 KpnI/XhoI으로 절단하였다. pcDNA5-FRT/TO-MCS-Tec-HA plasmid 또한 KpnI/XhoI으로 절단하여 앞서 만든 FDFT1, Sec61 β , Cb5를 삽입해 각 단백질의 C 말단에 Tev-HA가 붙는 plasmid를 제작하였다. 이 plasmid를 주형으로 PCR을 이용해 FDFT1-Tev-HA (표 1의 #7/#8 primer 이용), Sec61 β -Tev-HA (표 1의 #7/#9 primer 이용), Cb5-Tev-HA (표 1의 #7/#10 primer 이용)를 만들어 HindIII/XhoI으로 절단한다. 그리고 pcDNA5-FRT/TO plasmid를 XhoI/EcoO109I로 절단하여 Opsin (표 1의

#11/#12을 이용하여 PNK annealing)을 삽입해 pcDNA5-FRT/TO-Op sin plasmid를 제작한 후 이 plasmid를 HindIII/XhoI으로 절단하여 앞서 만든 절단된 FDFT1, Sec61 β , Cb5-Tev-HA를 삽입하면 pcDNA5-FRT/TO-Op sin-FDFT1, Sec61 β , Cb5-Tev-HA plasmid가 만들어진다.

Flp-In 293T-Rex 세포의 cDNA를 주형으로 CCDC47 (표 1의 #13/#14 primer 이용), Hela 세포의 cDNA를 주형으로 EMC5 (표 1의 #15/#16 primer 이용)를 각각의 primer와 함께 PCR로 증폭시켜 HindIII/XhoI으로 절단한다. 그리고 pcDNA5-FRT/TO plasmid를 XhoI/EcoO109I로 절단하여 2xSTRPtag (표 1의 #27/#28을 이용하여 PNK annealing)을 삽입해 pcDNA5-FRT/TO-2xSTRPtag plasmid를 제작한 후 이 plasmid를 HindIII/XhoI으로 절단하여 앞서 만든 절단된 CCDC47과 EMC5를 삽입하면 pcDNA5-FRT/TO-CCDC47, EMC5-2xSTRPtag plasmid가 만들어진다. 이 plasmid들이 CRISPR/cas9 guide RNA에 영향을 받지 않게 하기 위해, CCDC47은 (표 1의 #17/#18, #19/#20, #21/#22) primer를 이용해 세 번의 위치 유도 돌연변이법 (site-directed mutagenesis, SDM), EMC5는 (표 1의 #23/#24, #25/#26) primer를 이용해 두 번의 위치 유도 돌연변이법을 하여 각각의 결핍 세포에서 정상적으로 과발현 할 수 있도록 만들었다.

Flp-In 293T-Rex 세포의 cDNA를 주형으로 BiP의 신호 서열 (표 1의 #29/#30 primer 이용)을 PCR로 증폭시켜 HindIII/BamHI으로 절단하고, V5-TurboID-NES_pcDNA3 (Addgene, plasmid#107169)를 주형으로 V5-TurboID-KDEL (표 1의 #31/#32 primer 이용)을 PCR로 증폭시켜 BamHI/XhoI으로 절단하여 이 두개의 절편들을 HindIII/XhoI으로 절단된 pcDNA5-FRT/TO plasmid에 삽입하면 pcDNA5-FRT/TO-rBiP(45)-V5-TurboID-KDEL plasmid가 만들어진다.

CCDC47 (표 1의 #17-22), EMC4 (표 1의 #33-38), EMC5 (표 1의 #23-26), EMC7 (표 1의 #39-44), EMC8 (표 1의 #45-50), EMC9 (표 1의 #51-56), EMC10 (표 1의 #57-62)의 결핍세포를 위한 guide RNA는 pSPCas9(BB)-2A-Puro (PX459) (Addgene, plasmid#52963)을 BsmBI 절단 부위에 들어가도록 미리 디자인된 3가지 표적 서열 (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>)을 삽입하여 제작하였다.

표 1. Primer sequence

primer	Sequence (5' - 3')
#1. hFDFT1-Fw-KpnI	GCT TGG TAC CAT GGA GTT CGT GAA ATG CCT T
#2. hFDFT1-Rv-EcoRV	GCT GGA TAT CTC AGT GTT CTC CAG TCT GAA C
#3. hSec61b-Fw-Kpn1	CCA GGG TAC CAC CAT GCC TGG TCC GAC CCC C
#4. hSec61b-Rv-XhoI	AGA CTC GAG CTA CGA ACG AGT GTA CTT GCC
#5. hCB5-Fw-Kpn1	GCT TGG TAC CAT GGC AGA GCA GTC GGA CGA G
#6. hCB5-Rv-Xho1	AGA CTC GAG TCA GTC CTC TGC CAT GTA TAG

#7. P6	CGC CAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA GAG GTC TAT ATA AGC AGA GC
#8. FDFT1dSTOP-Rv	TAG ACT CGA GGT GTT CTC CAG TCT GAA CAT A
#9. hSec61b-Rv-dST-XhoI	AGA CTC GAG CGA ACG AGT GTA CTT GCC CCA
#10. hCB5-Rv-Xho1 (dST)	AGA CTC GAG GTC CTC TGC CAT GTA TAG GCG
#11. Opsin-S-XhoI	TCG AGA TGA ACG GTA CCG AAG GTC CAA ACT TCT ACG GTC CAT TCT CCA ACA AGA CCG TTG ATT AA
#12. Opsin-AS-Eco0109I	GCC CTT TAA TCA ACG GTC TTG TTG GAG AAT GGA CCG TAG AAG TTT GGA CCT TCG GTA CCG TTC AT
#13. CCDC47-HindIII-Fw	ACT TAA GCT TAC CAT GAA AGC CTT CCA CAC TTT C
#14. CCDC47-XhoI-Rv	TAG ACT CGA GCA TGG CTT TCA CTT TGA TTT G
#15. EMC5-HindIII-Fw	CTT AAG CTT ACC ATG GCG CCG TCG CTG TGG AAG
#16. EMC5-XhoI-Rv	TAG ACT CGA GAC GAC GCA GTG ATT CGA GTT T
#17. CCDC47-#1S	TAC TGA ATC TCC TCA GAG GGT TAT AAT

	CAC TGA AGA T
#18. CCDC47-#1AS	ATC TTC AGT GAT TAT AAC CCT CTG AGG AGA TTC AGT A
#19. CCDC47-#2S	TCC TGC ACA CCT CCA AAA TAG TTG GGA GAG TTA TTA T
#20. CCDC47-#2AS	ATA ATA ACT CTC CCA ACT ATT TTG GAG GTG TGC AGG A
#21. CCDC47-#3S	GTT TAA CAC TCA TAG AGA GCT TTT GGA GAG C
#22. CCDC47-#3AS	GCT CTC CAA AAG CTC TCT ATG AGT GTT AAA C
#23. EMC5-#2S	GGC CTT TGC AGT TAC TTG TTA CGG TAT AGT T
#24. EMC5-#2AS	AAC TAT ACC GTA ACA AGT AAC TGC AAA GGC C
#25. EMC5-#3S	CAT CGG TCT CTT TGC TCT AGC CCA CGC CGC C
#26. EMC5-#3AS	GGC GGC GTG GGC TAG AGC AAA GAG ACC GAT G
#27. Twin-STRP-Tag_II -S-XhoI	TCG AGT CTG CCT GGA GCC ACC CCC AGT TCG AGA AGG GCG GCG GCA GCG GCG GCG GCA GCG GCG GCA GCG CCT GGA GCC ACC CCC AGT TCG AGA AGG CCT AAG

#28. Twin-STRP-Tag_II-AS-Eco0109I	GCC CTT AGG CCT TCT CGA ACT GGG GGT GGC TCC AGG CGC TGC CGC CGC TGC CGC CGC CGC TGC CGC CGC CCT TCT CGA ACT GGG GGT GGC TCC AGG CAG AC
#29. rGRP78-Fw-H3	CCA AGC TTA CCA TGA AGT TCA CTG TGG TG
#30. rBiP-Rv-BmH1	CTA GTG GAT CCG AAT ACA CCG ACG CAG GAA TAG
#31. V5-BamH1-Fw	GCT CGG ATC CGG CAA GCC CAT CCC CAA CCC CCT G
#32. TurboID-KDEL-XhoI-Rv	TAG ACT CGA GCT ACA ACT CAT CTT TTT CTG ACT TTT CGG CAG ACC GCA GAC T
#33. sgEMC4-#1S	CACCGGCTTGTC CAAGTAACCGACT
#34. sgEMC4-#1AS	AAACAGTCGGTTACTTGGACAAGCC
#35. sgEMC4-#2S	CACCGGGGGCCTGGTGGCTAACCG
#36. sgEMC4-#2AS	AAACCGGTTAGCCACCAGGCCCCC
#37. sgEMC4-#3S	CACCGTCATACACACCATCATAGTA
#38. sgEMC4-#3AS	AAACTACTATGATGGTGTGTATGAC
#39. sgEMC7-#1S	CACCGCGAAGTGATATCCACTCGAA
#40. sgEMC7-#1AS	AAACTTCGAGTGGATATCACTTCGC
#41. sgEMC7-#2S	CACCGTTTATTAAAAGGGAATCGTG
#42. sgEMC7-#2AS	AAACCACGATTCCTTTTAATAAAC

#43. sgEMC7-#3S	CACCGTTCTCCGTCTACCAGCACTC
#44. sgEMC7-#3AS	AAACGAGTGCTGGTAGACGGAGAAC
#45. sgEMC8-#1S	CACCGGTGGCCTCCAGAATCGCCGA
#46. sgEMC8-#1AS	AAACTCGGCGATTCTGGAGGCCACC
#47. sgEMC8-#2S	CACCGAGACAACACCAAGTTTACGA
#48. sgEMC8-#2AS	AAACTCGTAAACTTGGTGTTGTCTC
#49. sgEMC8-#3S	CACCGAGGGGGAGGTGCTCCTTACG
#50. sgEMC8-#3AS	AAACCGTAAGGAGCACCTCCCCCTC
#51. sgEMC9-#1S	CACCGCCATAATAAGTACTGCATCA
#52. sgEMC9-#1AS	AAACTGATGCAGTACTTATTATGGC
#53. sgEMC9-#2S	CACCGCAAAAACAGCCCGTTGACTG
#54. sgEMC9-#2AS	AAACCAGTCAACGGGCTGTTTTTGC
#55. sgEMC9-#3S	CACCGATGCAGCTGTGAACGATCAG
#56. sgEMC9-#3AS	AAACCTGATCGTTCACAGCTGCATC
#57. sgEMC10-#1S	CACCGAGTGCCAACTTCCGGAAGCG
#58. sgEMC10-#1AS	AAACCGCTTCCGGAAGTTGGCACTC
#59. sgEMC10-#2S	CACCGGTCGGTGGTGACGCACCCCG
#60. sgEMC10-#2AS	AAACCGGGGTGCGTCACCACCGACC
#61. sgEMC10-#3S	CACCGCCCGACACCAACTCACCGCA

#62. sgEMC10-#3AS	AAACTGCGGTGAGTTGGTGTCTCGGGC
-------------------	-----------------------------

세포 배양 실험

Flp-In T-Rex 293 세포는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였고, Corning (Corning, New York, USA)에서 구입한 10 % fetal bovine calf serum을 포함한 Wellgene (경산시, 경상북도, 대한민국)에서 구입한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에서, 5 % CO₂, 37 °C에서 배양하였다. DNA의 세포내 도입은 Invitrogen (Waltham, Massachusetts, USA)에서 구입한 Lipofectamine 2000을 이용하였으며, doxycycline (10 ng/ml) (약 16시간)에 의해 발현이 안정적으로 유도 (induction) 되는 293 기반 세포주를 제작하였다. 제작된 세포주에 세가지의 PX459 (v2.0)-sgCCDC47-puro와 pcDNA-Cas9을 혼합하여 도입하고, puromycin에 저항성을 나타내는 세포를 선별하여 CCDC47 결핍 세포주를 제작하였다. EMC4, EMC5, EMC7, EMC8, EMC9, EMC10 결핍 세포주 또한 동일한 방식으로 제작하였다. 또한, EMC5와 CCDC47의 결핍세포에 guide RNA 표적 서열 인식 부위를 위치 유도 돌연변이법 (SDM)을 통해 바꾼 EMC5와 CCDC47-STRP plasmid를 도입하여 각각의 복구 세포주를 제작하였다.

공초점 현미경

세포 내 TurboID, 바이오틴화된 단백질 그리고 Sec61 β 의 위치를 확인하기 위해 4 % formaldehyde, 1x PHEM 으로 고정시켰고, methanol 로 세포벽에 구멍을 내 항체를 처리하였다. 이후 공초점 현미경 (confocal microscope)

(Zeiss LSM880; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 가시화한 후, ZEN2012 프로그램을 이용해 분석하였다.

면역블러팅

단백질의 축적된 양은 웨스턴 블롯 (western blot)을 통해 분석하였다. 200 ul Lysis buffer (1 % SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5)에 용해된 총 단백질을 SDS-PAGE sample buffer 와 섞은 후, 10 ul 을 10 % Tricin gel 에 전기영동 (SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)으로 분리시켰다. 그리고 Bio-rad (Hercules, California, USA)에서 구입한 nitrocellulose (NC) membrane 을 이용해 wet transfer system 하였다. Membrane 은 30 분 동안 5 % skim milk in PBS-T (1 X PBS, 0.1 % Tween-20)에서 blocking 시킨 후 (IRE1 α 와 streptavidin-HRP 는 skim milk 대신 3% BSA 를 사용하였다.), 1 차 항체 1 시간, 30 분 세척, horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 2 차 항체 1 시간, 1 시간 세척하였다. 그리고 Thermo fisher scientific (Waltham, Massachusetts, USA)에서 구입한 SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate 에 3 분간 반응시킨 후, C-DiGit Blot Scanner (LI-CDR)를 이용해 확인하였다.

공동 정제

세포질 단백질은 semi-permeabilize buffer (0.015 % digitonin, 110 mM KoAC, 20 mM HEPES, 2 mM MgAC)을 이용하여 선택적으로 제거하였으며, 막 단백질을 포함한 잔류물은 lysis buffer (2 % digitonin, 50 mM HEPES, 1 mM DTT, 150 mM NaCl, 2 mM MgAC)으로 용해하였다. Strep-tactin bead (iba)와

2 시간 동안 결합시켜 침강하였다. bead 는 0.2 % digitonin buffer 로 5 회 세척한 후, 30 ul 1x Buffer BXT (iba)로 회수하였다. 7.5 ul 5x sample buffer 를 추가해 10 분간 끓이고, 10 % Tricine gel 에 분리 시킨 후, 항체로 웨스턴 블러팅하였다.

소포체 제한적 근접 표지

ER-BioID 세포주를 150 mm dish 에서 doxycycline 10 ng/ml 처리하여 24 시간 동안 과발현시킨 후, 바이오틴 50 μ M 을 30 분간 처리하였다. 세포의 세포질 단백질은 semi-permeabilize buffer (0.015 % digitonin, 110 mM KoAC, 20 mM HEPES, 2 mM MgAC)을 이용하여 선택적으로 제거하였으며, 막 단백질을 포함한 잔류물은 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 1 % TX-100, 0.5 % Na-deoxycholate)로 용해하였다. Streptavidin-bead (MCE)로 3 시간 동안 결합시켜 침강시켰다. Bead 는 RIPA buffer 2 분 2 회, 1M KCl 2 분, 0.1M Na₂CO₃ 10 초, 2M Urea(in 10 mM Tris-HCl pH 8.0) 10 초, RIPA buffer 2 분 2 회 세척한 후 마지막 세척 과정에서 1 ml RIPA buffer 에 풀어놓은 bead 중 50 ul 를 면역 블러팅에 사용하였다. 면역블러팅을 위해 분리해낸 50 ul 를 30 ul 3x Sample buffer (containing 2 mM biotin)로 회수하였다. 이후 10 분간 끓이고, 그 중 well 당 10 ul 를 10 % Tricine gel 에 전기영동 후 SYPRO Ruby Protein Stain gel (Invitrogen)로 염색하였고, Streptavidin-HRP 로 웨스턴블롯 하였다. 나머지 bead 는 50 mM Tris pH 7.5 로 1 회 세척한 후 bead 만 남겨 질량분석법을 위해 Clinical Proteomics Core (서울아산병원)에 의뢰하였다.

펄스 (pulse)

세포주를 serum-free & methionine/cysteine-free media 로 30 분간 starvation 한 후, PerkinElmer (Waltham, MA, USA)에서 구입한 trans-labeling mixture ($[^{35}\text{S}]$ -methionine/cysteine)로 30 분 동안 단백질에 동위원소를 표지 하였다. 각 세포는 DPBS 로 세척한 후, lysis buffer (1 % SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 넣고 끓이면서 용해하였다. 그리고 IP buffer (1 % TritonX-100, 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.5, 150 mM NaCl)로 10 배 희석하였다. HA bead (Thermo scientific)와 4 °C 90 분 동안 결합시켜 침강하였다. Bead 는 IP buffer 로 5 회 세척한 후, 30 ul 2 X SDS-PAGE sample buffer 로 회수하였다. 10 ul 의 샘플을 10 분간 끓이고, 10 % Tricine gel 에 분리시킨 후, 자기 방사법 (autoradiography)으로 x-ray 필름에 노출시켰다.

연구 결과

EMC의 구조적/기능적 핵심 구성 성분으로 EMC5를 도출함

EMC는 소포체 내 널리 보존되어 있는 단백질 복합체이며, 정확한 막 단백질의 생성을 시작하는데 필수적이다^[33]. 하지만 EMC는 모든 막 단백질의 삽입에 기여하는 것이며, 이러한 기질 특이성에 주목하고 있다. 최근 Cryo EM을 통해 EMC의 3차원 구조가 밝혀졌다 (그림 1)^[34]. EMC는 9개의 구성 성분으로 이루어져 있으며, 2개의 세포질 단백질과 7개의 필수적인 막 단백질이 강하게 결합되어 있는 형태이다^[33]. 이들 복합체 간의 역할 분담을 통해 특정 막 단백질에 대한 특이성을 획득하는 것이라 추정한다. 본 연구는 EMC의 기질 특이성과 기능을 수행하는데 새로운 구성 성분이 그 역할을 할 것이라는 가설에서부터 시작되었다.

EMC의 새로운 구성 성분을 찾아내기 위해서는 순수한 EMC를 분리하여 이와 결합하고 있는 단백질을 분석해야 한다. 이를 위해 EMC의 구조적 핵심 구성 성분을 찾아낼 필요가 있었다. 그래서 CRISPR/cas9을 이용해 EMC 구성 성분의 유전자를 편집한 세포주를 만들어 나머지 구성 성분의 변화를 면역블로팅 (immunoblotting)을 통해 관찰하였다. 그 결과, EMC5의 결핍 세포에서 나머지 EMC 구성 성분 제거가 가장 두드러졌다 (그림 2). 이는 EMC5가 EMC의 구조적 핵심 구성 성분이라는 것을 의미한다.

EMC는 꼬리 고정 단백질 (Tail Anchored protein, TA protein)의 삽입에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^[35]. 앞서 확인한 것처럼, EMC5가 결핍되어 EMC 구성 성분에 의해 EMC 구조가 파괴되었다면, EMC의 기능은 손상되어야 한다. 이를 확인하기 위해, 정상 세포와 EMC5 결핍 세포, 그리고 EMC5 결핍 세포에 Streptactin 태그가 붙은 EMC5를 과발현한 세포를 사용하였고, 삽입

여부를 확인할 수 있는 Opsin 을 C 말단에 붙인 꼬리 고정 단백질을 각 세포에 발현시켰다. 그 결과, EMC5 가 결핍된 세포에서 당화된 꼬리 고정 단백질의 비율이 줄어든 것을 확인할 수 있었고, EMC5 를 다시 과발현 시켰을 때, 그 비율이 정상세포만큼 돌아온 것을 확인할 수 있었다(그림 3). 따라서 EMC5 는 구조적 핵심 구성 성분일 뿐 아니라 기능적으로도 핵심 구성 성분임을 알 수 있다.

EMC 와 상호 작용하는 CCDC47 을 발견함

EMC 의 새로운 구성 성분을 발견하기 위해, EMC 의 핵심 구성 성분인 EMC5 를 이용한 신규 단백질 도출 전략을 수립했다. Streptactin 이 결합되어 있는 EMC5 의 안정적 과발현을 유도하는 세포를 제작하였고, 세포질과 같이 불필요한 부분을 제거하여 친화 정제 (affinity purification)를 최적화했다 (그림 4). 이를 이용하여 얻어낸 단백질을 질량 분석법 (mass spectrometry)을 통해 분석했다. 그 결과, 과발현된 EMC5 와 기존에 알려진 EMC1-10 을 확인할 수 있었고, 이 외에 신규 단백질인 RpnI/II, CCDC47, BiP 이 EMC 와 함께 공동 정제되어 회수되었다 (그림 5). 이 중, 최근 소포체 막 단백질 특이적 샤페론 (chaperone)으로 알려진 CCDC47 을 본 연구에서 다루고자 한다.

EMC 와 CCDC47 이 실제로 상호 작용하는지 알아보기 위해, EMC5 특이적 항체를 이용한 면역 침전물에서 CCDC47 이 공동 침전되어 회수되는지 확인하고자 하였다. 그 결과, EMC4, 5, 8 이 나오는 EMC 면역 침전물에서 CCDC47 이 회수된 것을 볼 수 있다 (그림 6). 따라서 세포 수준에서 CCDC47 은 EMC 와 명백히 상호 작용함을 알 수 있었다. 또한, 앞서 EMC5 가 결핍되었을 때, EMC 구성 성분이 감소하는 것처럼 새롭게 발견된 상호인자인 CCDC47 이 EMC 의존적인지 확인해 본 결과, EMC 결핍 세포에서 CCDC47 의

양이 감소하는 것을 알 수 있었다 (그림 7). 정리하면 CCDC47 이 EMC 의존적 막 단백질인 것으로 추정할 수 있다.

EMC 의 구조적 상호인자인 CCDC47 이 기능적으로도 연관되어 있는지 확인하기 위해, Crisper/Cas9 을 이용해 CCDC47 결핍 세포를 제작하였고 (그림 8), CCDC47 결핍 세포와 EMC 결핍 세포를 이용해 꼬리 고정 단백질의 막 삽입 효율을 비교하였다. 그 결과, 정상 세포와 CCDC47 결핍 세포에서 꼬리 고정 단백질의 막 삽입 효율이 거의 동일했다 (그림 9). CCDC47 의 결핍이 EMC 의 기능에는 영향을 주지 않는다는 결론을 얻을 수 있었다.

CCDC47 의 기질 발굴을 위한 소포체 제한적 근접 표지 전략

CCDC47 의 기질 발굴을 위해 CCDC47 결핍 세포에서 특이적으로 감소하는 소포체 단백질을 도출할 전략인 소포체 제한적 근접 표지 (ER-restricted proximity labeling) 전략을 수립하였다 (그림 10). 우선 인접한 단백질을 바이오틴화 (biotinylation) 시키는 TurboID 에 V5 를 붙여 식별할 수 있게 하였고, BiP 의 신호서열 (signal sequence)과 KDEL 을 각각 N 말단과 C 말단에 결합시켜 ER 내에 머무르도록 하여 결과적으로 소포체 단백질이 특이적으로 바이오틴화 되도록 하였다. 이후 바이오틴화 된 단백질을 streptavidin 으로 친화 정제하여 얻어내 질량분석법으로 분석하여 분류한다.

이 전략이 정상적으로 작동하는지 확인하기 위해, 우선 TurboID 의 발현과 기능 여부를 확인하였다. 세포에 TurboID 를 발현시키고 바이오틴을 처리했을 때, TurboID 에 붙었던 V5 를 통해 발현되는 것을 확인하였고, streptavidin 항체를 이용하여 바이오틴화 된 단백질을 발견할 수 있었다 (그림 11). 결과적으로 TurboID 는 발현되었고, 단백질을 바이오틴화 시킨 것을 확인할 수

있었지만, 이 발현된 TurboID 가 기능하고 있는 위치는 알 수 없었다. 이를 위해 몇 가지 추가 실험을 진행하였다.

우선 공초점 현미경을 이용해 TurboID 와 바이오틴화 된 단백질이 같은 위치에서 시각화 되는지 확인하였다. 소포체 표지인 Sec61 β 를 이용해 TurboID 의 위치가 동일한 것을 확인할 수 있었고, 바이오틴을 처리했을 때 나타나는 단백질의 위치 또한 동일한 것을 알 수 있었다 (그림 12). 이를 통해 TurboID 가 소포체 단백질에 특이적임을 확인할 수 있었지만, 소포체 내강 단백질에 특이적인지는 알 수 없다. 그래서 바이오틴화 된 단백질 친화 정제를 이용하여 소포체 내강에 바이오틴화 될 수 있는 부위를 노출한 단백질만 있는지 확인하였다. 실험 결과 BiP, CANX 그리고 TurboID-V5 와 같이 바이오틴화 될 수 있는 부위가 ER 내에 존재하는 단백질만 선택적으로 바이오틴화 되어, streptavidin bead 로 회수되었다 (그림 13). 따라서 소포체 제한적 근접 표지를 위해 설계한 TurboID 가 ER 내에 머물러 정확히 기능하는 것을 확인하였다.

CCDC47 의 기질 발굴

EMC 의 상호 작용 인자로서 발견한 CCDC47 의 기능을 찾기 위해, 앞서 검증한 최적화된 소포체 제한적 근접 표지 방법 (그림 13)을 CCDC47 결핍 세포 (그림 8)에 적용하여 CCDC47 의존적 단백질을 발굴 전략을 수립하였고 (그림 14), 이를 통해 얻어낸 단백질은 질량분석법을 통해 식별하였다 (그림 15). 이후 기질로서 초점을 맞춘 막 단백질이며 p-value 가 높은 단백질을 우선적으로 선별하였고 (그림 16), 이 중 Sec63 는 최근 소포체 항상성과 소포체 막 스트레스에 의해 일어나는 UPR 에 밀접한 관련이 있다고 알려져 기질로서 연구 가치가 있다고 판단하였다.

CCDC47 결핍에 따른 UPR 교란

CCDC47 결핍 세포와 CCDC47 결핍 세포에 CCDC47 을 다시 과발현 시킨 세포에서 Sec63 의 단백질 양이 어떻게 변하는지 알아보기 위해 면역 블러팅을 진행하였다. 그 결과, 앞선 질량분석법을 통한 분석 결과와 동일하게 CCDC47이 결핍되었을 때, Sec63 의 양이 줄어드는 것을 확인할 수 있었고, CCDC47 을 다시 과발현시켰을 때, Sec63 의 양이 다시 정상 세포만큼 돌아오는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 Sec63는 CCDC47의 기질임을 확인할 수 있었다 (그림 17).

Sec63 의 결핍은 BiP 을 통한 IRE1 α 의 안정화를 불가능하게 하고, 소포체 스트레스 상황에서 UPR 경로 중 하나인 IRE1 α 가 활동 과잉 (hyperactive) 상태가 되어 결국 올리고머화 (oligomerization) 되고 기능을 잃어버리게 된다고 알려져 있다 (그림 18)^[36]. Sec63 를 기질로 가지고 있는 CCDC47 이 결핍되었을 때, IRE1 α 에 변화가 생기는지 알아보았다. 그 결과, p-IRE1 α 의 형성이 정상 세포에 비해 늦는 것을 확인할 수 있었고, BiP 또한 정상 세포에 비해 더 많은 양이 생성되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 19). 따라서 CCDC47의 결핍은 UPR 에 대한 교란을 야기한다.

CCDC47 결핍에 의한 Sec63 구조 변화

CCDC47 의 결핍은 Sec63 의 발현 수준을 낮추어 UPR 교란을 일으키게 된다 (그림 17). CCDC47의 결핍과 Sec63의 발현 수준의 관계를 알기 위해, 정상 세포와 CCDC47 결핍 세포에서 C 말단에 HA 가 결합된 Sec63 를 과발현시켰다. 그 결과, 내인성 Sec63와는 반대로 CCDC47 결핍 세포에서 과발현된 Sec63-HA 의 양이 더 많은 것을 확인할 수 있었다 (그림 20). 이는 CCDC47 결핍 세포에서 과발현된 Sec63-HA 의 양을 조절하지 못하여 막에 축적되는 것이라 추측하였다. 과발현된 Sec63-HA 가 축적되었는지 확인하기 위해, 디지토닌을 이용해 상층액과 침전물로 나누어 양을 비교하였다. 예상한

바와 같이 침전물에서 과발현된 Sec63-HA 가 더 많이 나오는 것을 확인할 수 있었다 (그림 21). CCDC47 결핍 세포에서 Sec63-HA 는 정상적인 형태가 아닌 것을 확인할 수 있었다.

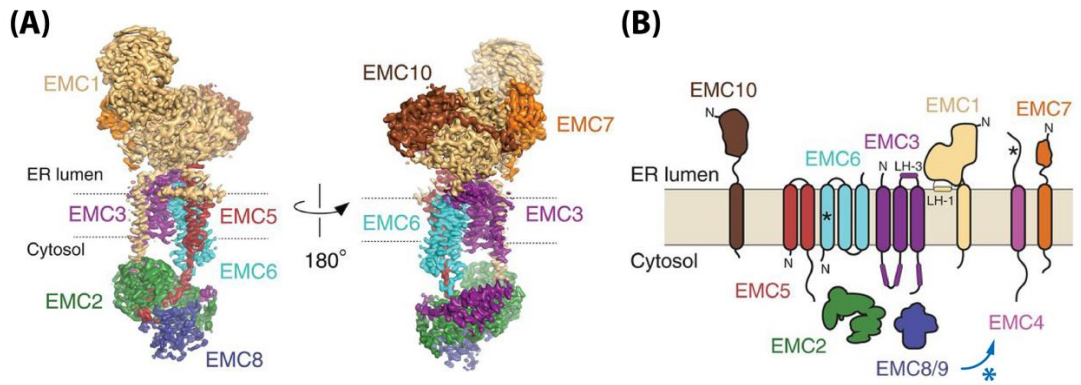


그림 1. Cryo EM 을 통해 밝혀진 EMC 의 3 차원 구조 (ref.)^[34]

(A) Cryo EM 을 통해 밝혀낸 EMC 의 3 차원 구조다. 두 가지 시점에서 EMC 의 형태를 보여준다. (B) EMC 는 9-10 개의 구성 인자로 이루어져 있으며, 이 중 EMC8/9 는 기능적 유사체이다.

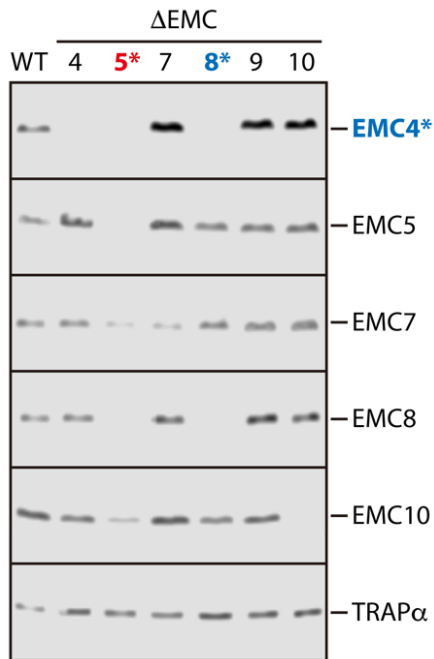


그림 2. EMC의 구조적 핵심 구성 성분 도출

293T-rex 세포에 CRISPR/cas9을 이용하여 EMC4, 5, 7, 8, 9, 10이 결핍된 세포주를 만들어, 각각의 EMC 구성 성분 항체를 이용하여 면역블러팅 (immunoblotting)한 후 EMC 구성 성분의 변화를 관찰하였다. EMC5가 결핍된 세포에서 대부분의 EMC 구성 성분의 단백질 양이 떨어졌다.

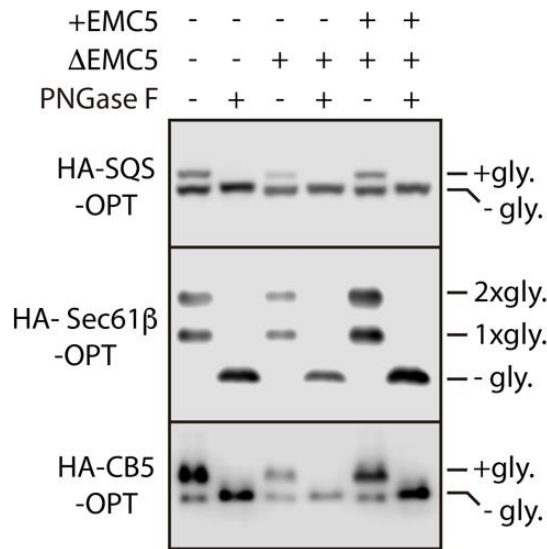


그림 3. EMC5 결핍에 의한 EMC의 기능 손상

EMC5 결핍 세포와 EMC5가 결핍된 세포에서 EMC5-STRP를 발현하는 세포주 (stable cell line)를 만들고, OPT가 삽입된 꼬리 고정 단백질을 도입하여 발현시켜 면역블러팅 하였다. 당화 결핍 (-gly), 단일 당화 (+gly or 1xgly), 2중 당화 (2xgly)를 표시하였다. PNGase F를 처리하여 당화되었음을 확인하였다. 정상 세포와 달리 EMC5가 결핍된 세포에서 당화된 꼬리 고정 단백질의 비율이 적은 것을 확인할 수 있었고, EMC5-STRP를 과발현시켰을 때 원래의 비율로 돌아오는 것을 확인할 수 있었다.

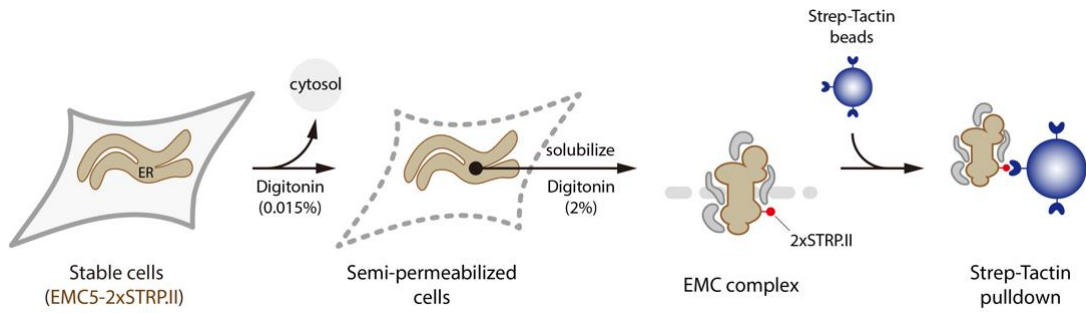


그림 4. EMC 와 상호 작용하는 신규 단백질 도출 전략

EMC5-STRP 를 과발현하는 세포주를 제작하여 이를 과발현 시켰다. 0.015% 디지토닌 (digitonin)을 사용해 세포질을 제거한 후, 남은 것을 2% 디지토닌으로 용해하여 strep-tactin bead 로 공동 정제하여 단백질을 회수하였다.

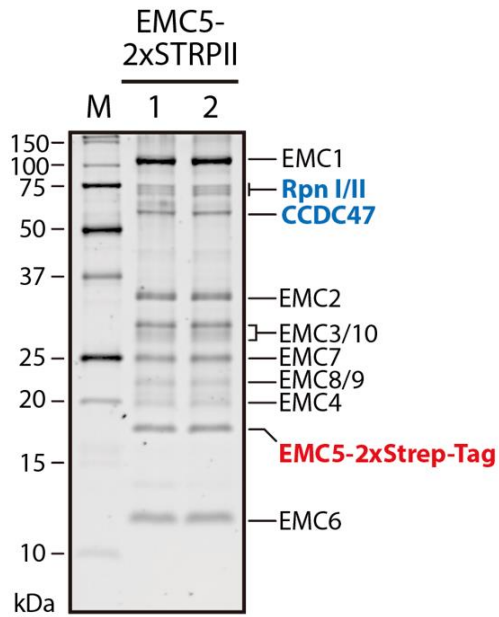


그림 5. EMC 와 공동 정제되는 소포체 막 단백질 CCDC47 발견

그림 4 의 전략으로 얻어낸 단백질을 전기영동법으로 분리하여 ruby staining 하였다. 공동 정제하는데 사용된 strep-tactin bead 와 결합한 EMC5 가 확인되었고, EMC1-10 이 함께 회수되었다. 이 외에 CCDC47, RpnI/II, HSP70 등의 단백질이 EMC 의 추가로 함께 회수되었다.

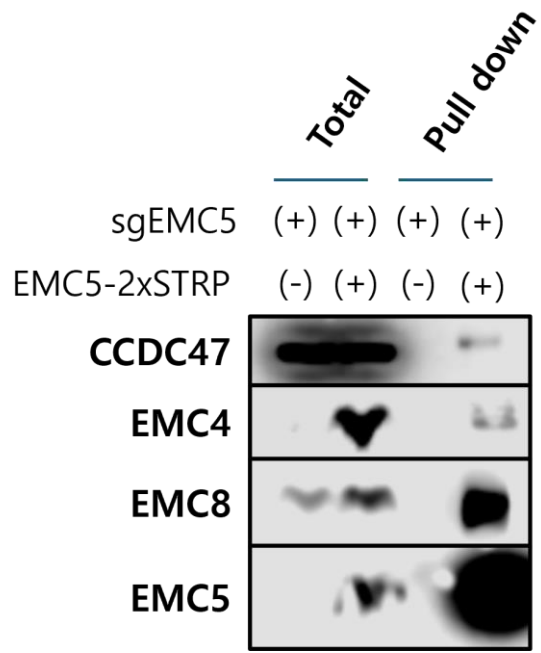


그림 6. EMC와 CCDC47의 상호 작용을 검증함

그림 3에서 이용한 EMC 결핍 세포와 EMC 과발현 세포에 doxycycline을 10ng/ml 16시간 처리한 후 strep-tactin bead로 공동 정제하여 면역블러팅 하였다. 이미 알려진 EMC 구성 성분과 CCDC47 모두 검출되었다.

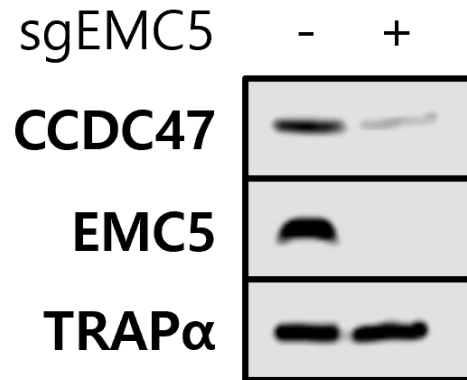


그림 7. EMC5 결핍에 의한 상호인자 CCDC47 감소

정상 세포와 EMC5 결핍세포에서 CCDC47 항체를 이용하여 면역블러팅 하였다. EMC5가 결핍되었을 때, 다른 EMC 구성 성분과 같이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. TRAP α 로 양이 같음을 증명하였다.

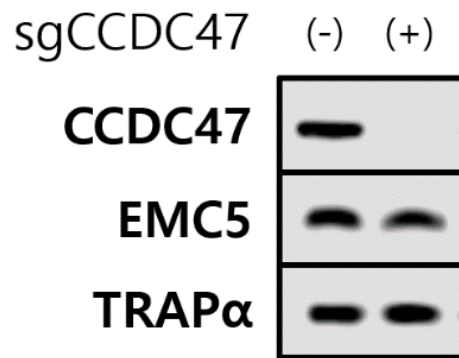


그림 8. CCDC47 결핍 세포주 제작

CRISPR/cas9 과 guide RNA 를 이용해 CCDC47 결핍 세포를 만들었고, 이를 면역블러팅으로 확인하였다.

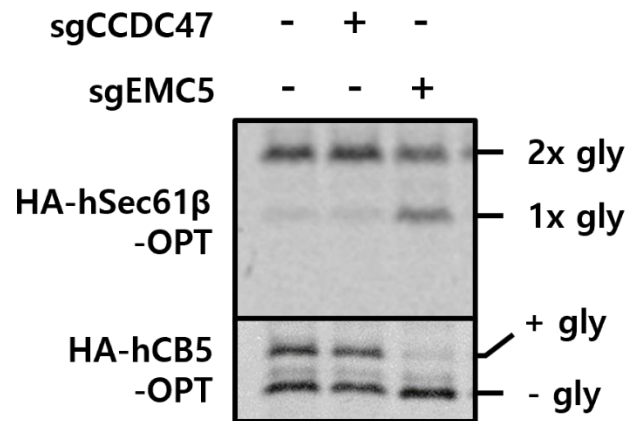


그림 9. EMC 의존적 TA protein 삽입은 CCDC47 과 무관함

정상 세포와 CCDC47 결핍 세포 그리고 EMC5 결핍 세포에 N 말단에 HA, C 말단에 opsin 이 달린 꼬리 고정 단백질을 과발현 시켜 펄스를 진행했다. 그 결과, CCDC47 결핍 세포는 정상 세포와 삽입 정도가 비슷했으며, EMC5 결핍 세포와 차이를 보여주었다.

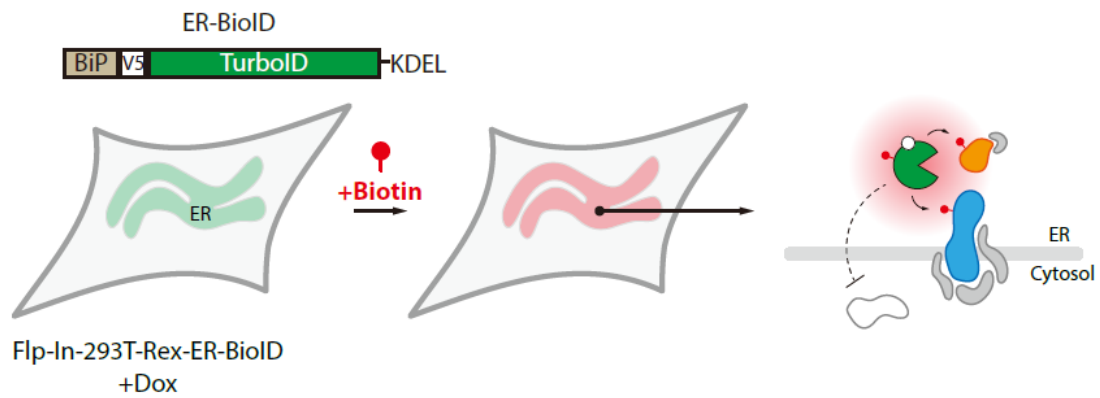


그림 10. 소포체 제한적 근접 표지 전략

소포체 내의 단백질만 제한적으로 얻어내기 위해 TurboID를 사용하였다. V5를 이용해 TurboID의 발현을 확인할 수 있도록 하였다. TurboID는 근접한 단백질을 바이오틴화 시키는데, 이와 같은 과정이 소포체 내에서 일어나게 하기 위해, N 말단에 BiP의 신호 서열 그리고 C 말단에 KDEL을 가진 복합체를 만들었다.

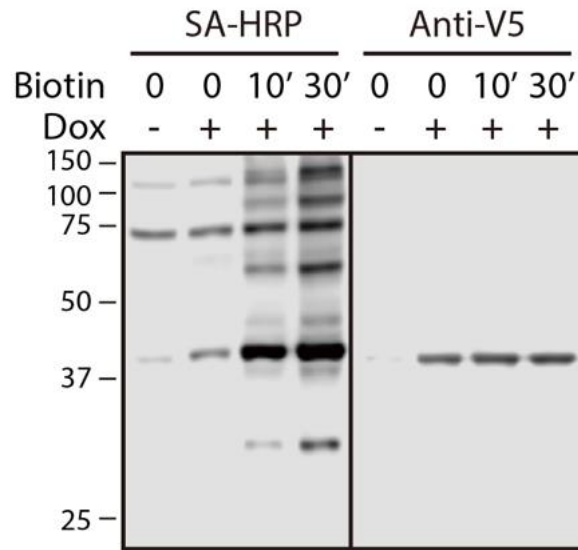


그림 11. TurboID 발현과 단백질의 바이오틴화를 확인함

Doxycycline과 바이오틴 처리 조건을 나누어 면역블러팅을 진행하였다. Doxycycline을 처리한 세포에서 V5 항체를 이용하여 V5-TurboID가 검출되는 것을 확인할 수 있고, 바이오틴을 10분 정도 처리하였을 때 바이오틴화 되는 단백질을 확인할 수 있었다.

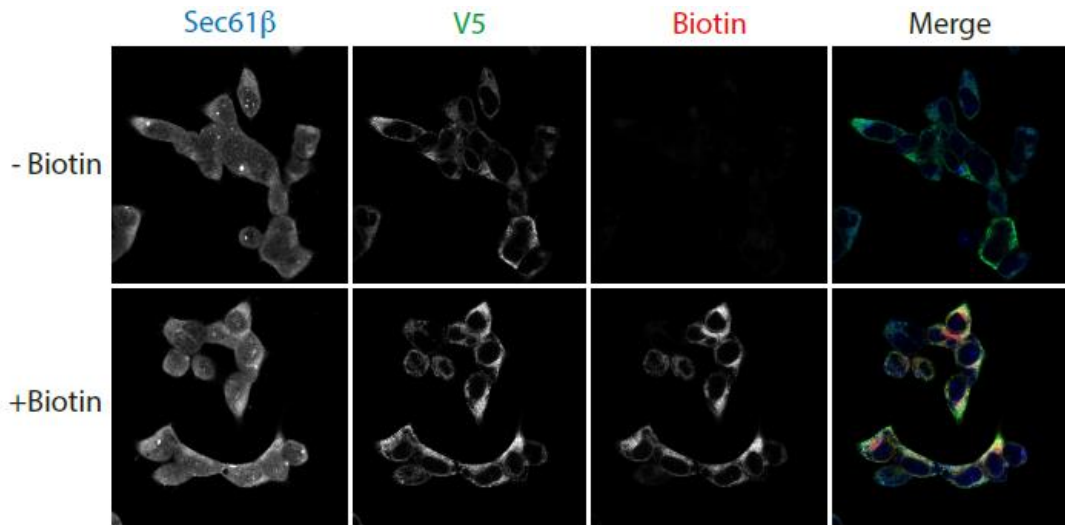


그림 12. 공초점 현미경을 이용한 TurboID 와 바이오틴화 된 단백질 위치를 확인함

TurboID 를 과발현한 세포에 바이오틴을 처리 후 Sec61 β , V5 그리고 Streptavidin 항체를 붙여 공초점 현미경을 통해 시각화하여 TurboID 의 위치와 바이오틴화된 단백질이 소포체에 위치하는지 소포체 표지인 Sec61 β 의 위치와 비교하였다. TurboID 와 Sec61 β 의 위치가 동일하여 위치를 확인하였고, 바이오틴을 처리했을 때 나타나는 단백질들 또한 위치가 동일한 것을 확인할 수 있다.

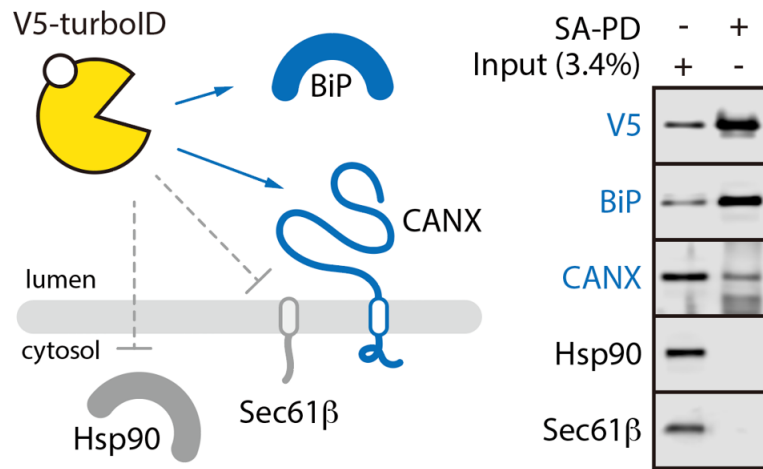


그림 13. 바이오틴화의 공간적 특이성 검증

소포체 내의 단백질만 특이적으로 표지 되는 것을 확인하기 위해 바이오틴화 된 단백질을 streptavidin 으로 공동 정제하여, 소포체 내 바이오틴화 될 수 있는 부위를 가진 BiP 과 CANX 이 정제된 산물에 존재하는지, 그리고 소포체 내 바이오틴화 될 수 있는 부위가 없는 HSP90 과 Sec61β가 정제된 산물에 존재하지 않는지를 면역블러팅으로 확인하였다.

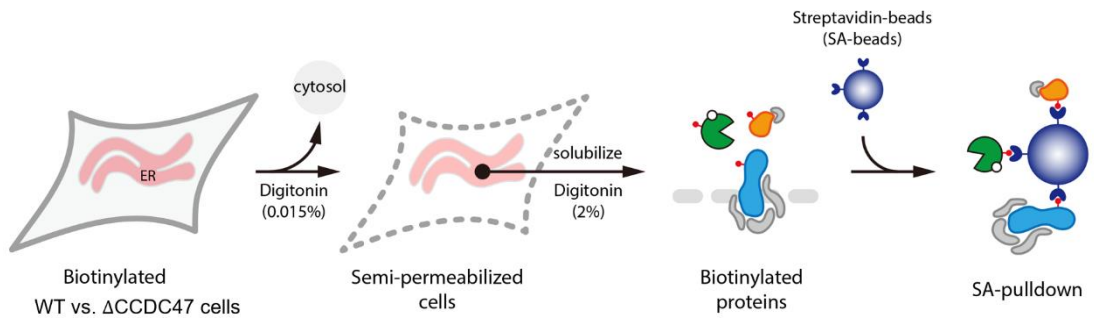


그림 14. 소포체 제한적 근접 표지 사용 한 CCDC47 기질 발굴

정상 세포와 CCDC47 결핍 세포에 그림 11-13 을 단서로 제대로 작동함을 확인한 TurboID 복합체를 과발현 시켰다. 소포체 내 단백질 특이적으로 반응시키기 위해 0.015% 디지토닌으로 세포질을 제거하였고, 남은 소포체를 2% 디지토닌으로 용해하여 streptavidin bead 로 공동정제하였다.

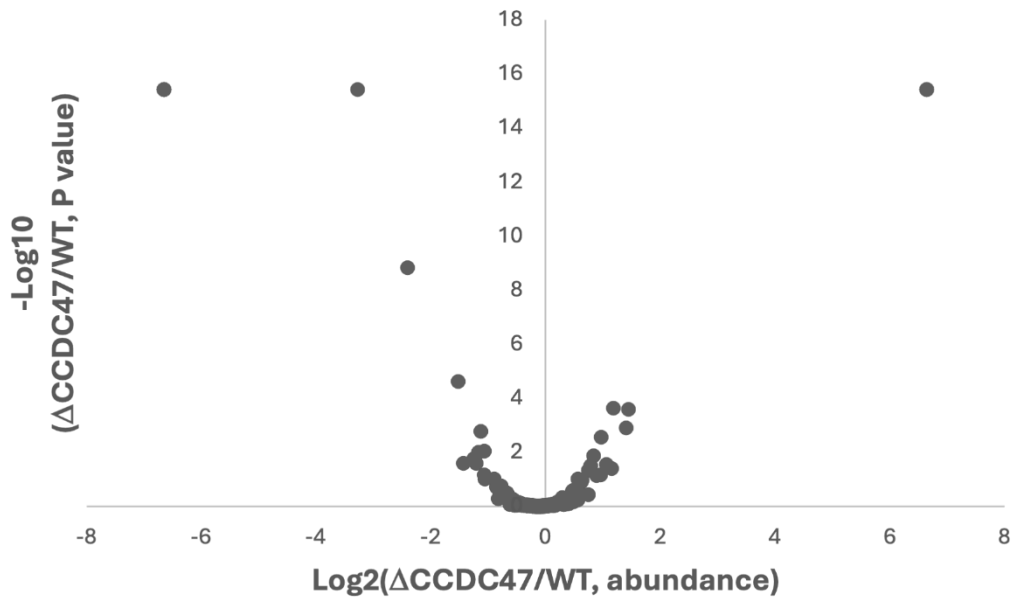


그림 15. Volcano plot 으로 나타낸 CCDC47 의 기질 목록

그림 14 를 통해 얻어낸 단백질을 질량분석법 (mass spectrometry)을 통해 분석하여 Volcano plot 으로 정리한 표다. 세로 축은 높을수록 p-value 가 높다는 것을 나타내고, 가로축은 좌측으로 갈수록 CCDC47 결핍 세포에서 줄어드는 것, 우측으로 갈수록 CCDC47 결핍 세포에서 늘어나는 것을 뜻한다.

Accession	Description	Protein name
O00124	UBX domain-containing protein 8	UBXN8
Q96A33	PAT complex subunit CCDC47	CCDC47
Q9NV64	Transmembrane protein 39A	TMEM39A
Q9NVV0	Trimeric intracellular cation channel type B	TMEM38B
Q86UP2	Kinectin	KTN1
Q9H3H5	UDP-N-acetylglucosamine--dolichyl-phosphate N-acetylglucosaminophosphotransferase	DPAGT1
Q9Y6A9	Signal peptidase complex subunit 1	SPCS1
Q9UGP8	Translocation protein SEC63 homolog	Sec63

*P value<0.0001

그림 16. 표로 나타낸 CCDC47 의 기질 목록

그림 15 에서 p-value 가 높으며, 막 단백질인 것들을 정리한 표다. 당연하게도 CCDC47 결핍 세포에서 CCDC47 이 더 적다고 판별되었다.

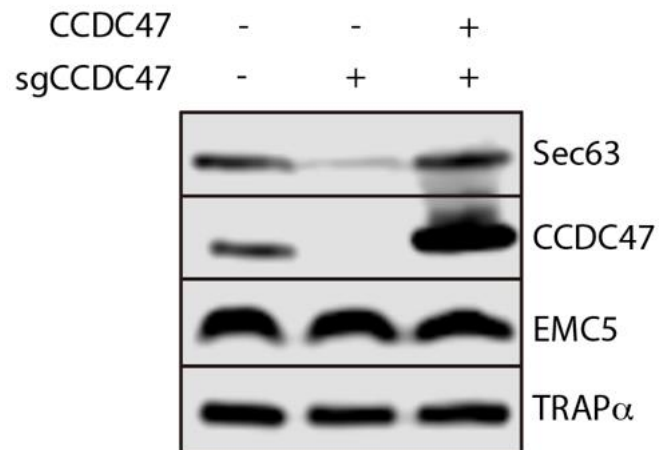


그림 17. CCDC47 결핍에 따른 Sec63 변화

CCDC47 결핍 세포에서 Sec63 의 양이 실제로 줄어드는지 면역블러팅을 통해 확인하였고, CCDC47 결핍 세포에 CCDC47 을 다시 과발현 시켰을 때, Sec63 의 양이 다시 돌아오는 것을 확인할 수 있었다.

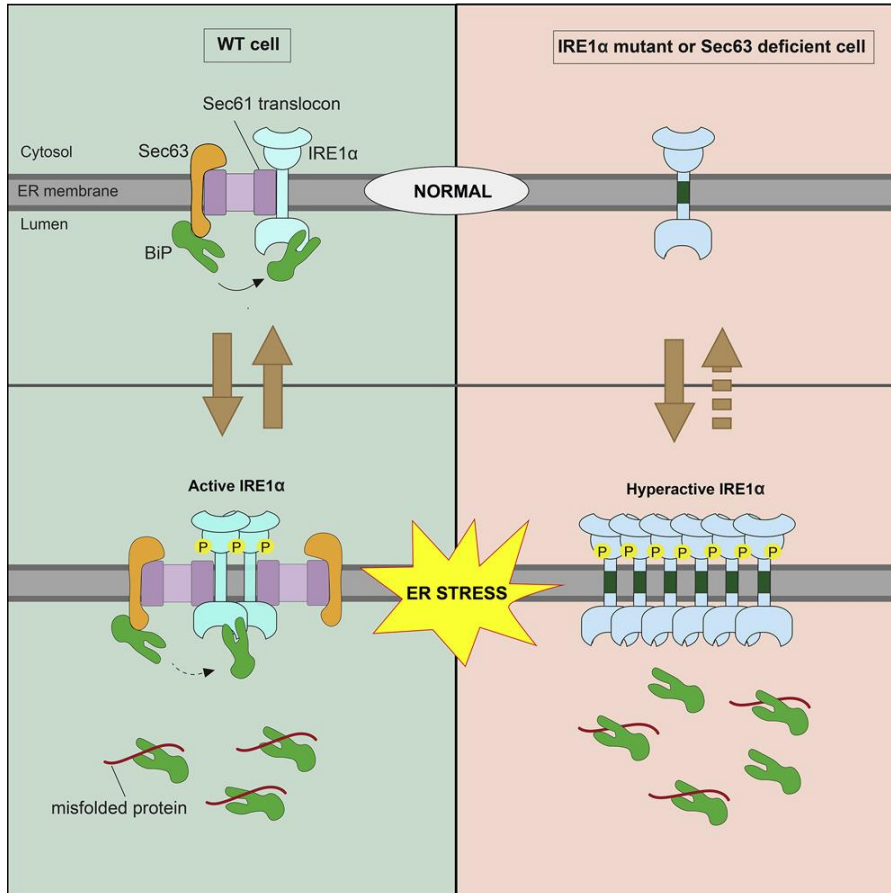


그림 18. UPR 경로에서 Sec63 기능 (ref.)^[35]

Sec63 는 소포체 막에 존재하는 막 단백질이며, Sec61, IRE1 α 와 함께 소포체 스트레스 비의존적인 복합체를 형성하고 있다. Sec63 의 J-domain 은 BiP 을 IRE1 α 에 결합시켜 안정화를 시키고, 소포체 스트레스 상황에서 또한 초과 발현된 BiP 을 IRE1 α 에 결합시켜 IRE1 α 을 비활성화 시킨다. Sec63 가 결핍된 상황에서는 BiP 이 초과 발현되어도 IRE1 α 에 결합을 시켜줄 수 없어 결국 IRE1 α 이 활동 과잉 (hyperactive) 상태가 되어 올리고머화 (oligomerization) 된다.

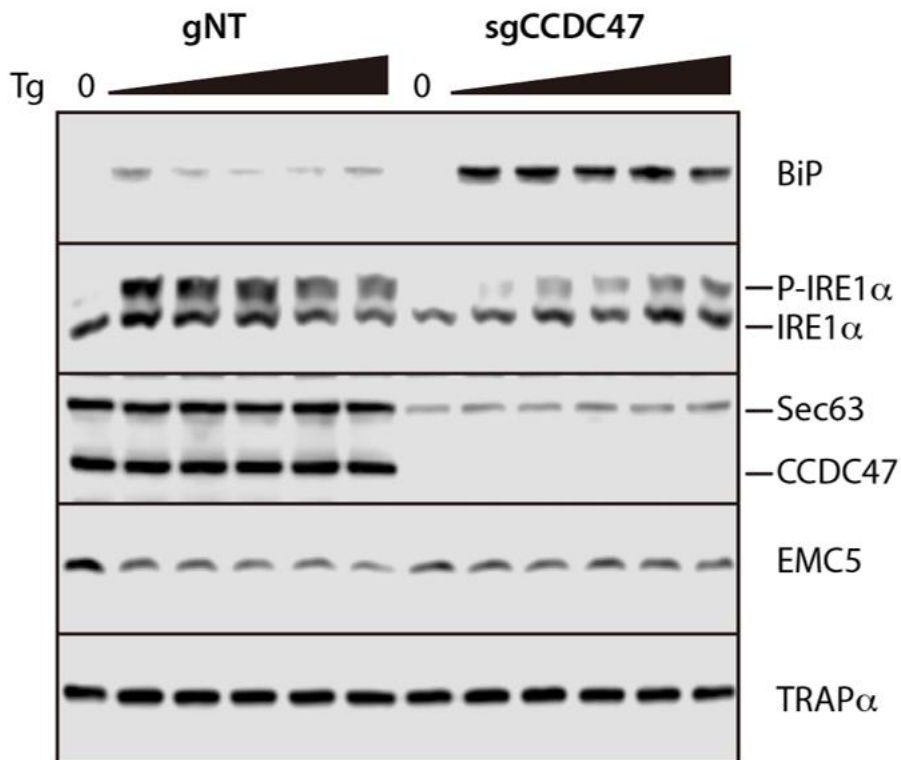


그림 19. CCDC47 결핍에 따른 IRE1 α 의 변화

CCDC47의 기질인 Sec63가 IRE1 α 에 영향을 준다는 사실을 바탕으로 CCDC47과의 연관성을 면역블러팅을 통해 확인하였다. 타프시가진(thapsigargin)을 0.5 μ M을 처리하고 0, 1, 2, 4, 6, 8 시간이 되었을 때, IRE1 α 의 변화를 살펴보았다. CCDC47 결핍 세포에서 p-IRE1 α 가 생성되는 시간이 늦어지는 것을 확인할 수 있다. 또한, BiP의 양도 CCDC47이 결핍된 세포에서 타프시가진을 처리하였을 때, 더욱 더 많이 증가한 것을 확인할 수 있다.

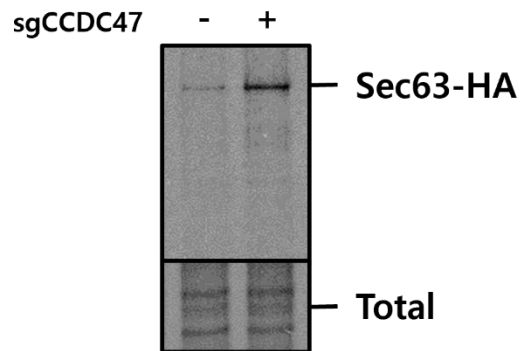


그림 20. CCDC47 결핍 세포에서 과발현된 Sec63-HA 의 발현 수준 증가
 정상 세포와 CCDC47 결핍 세포에 N 말단에 HA 가 결합된 Sec63 를 과발현 시켜 펄스를 진행했다. 그 결과, CCDC47 결핍 세포에서 과발현된 Sec63-HA 가 정상 세포에 비해 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

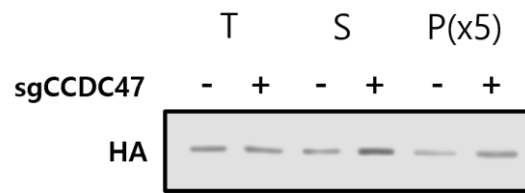


그림 21. CCDC47 결핍 세포에서 과발현된 Sec63-HA 의 용해성 차이

정상 세포와 CCDC47 결핍 세포에 N 말단에 HA 가 결합된 Sec63 를 과발현 시켜 1% 디지토닌으로 용해하여 총량 (T)을 얻어내었고, 이후 원심분리기를 이용하여 상층액과 침전물로 나누어준 후, 상층액 (S)을 얻어내고, 남은 침전물을 1% 디지토닌과 sample buffer 로 용해하여 침전물 (P)를 얻어내었다. 그 결과, CCDC47 결핍 세포의 침전물에서 과발현된 Sec63-HA 가 더 많이 나오는 것을 확인할 수 있었다.

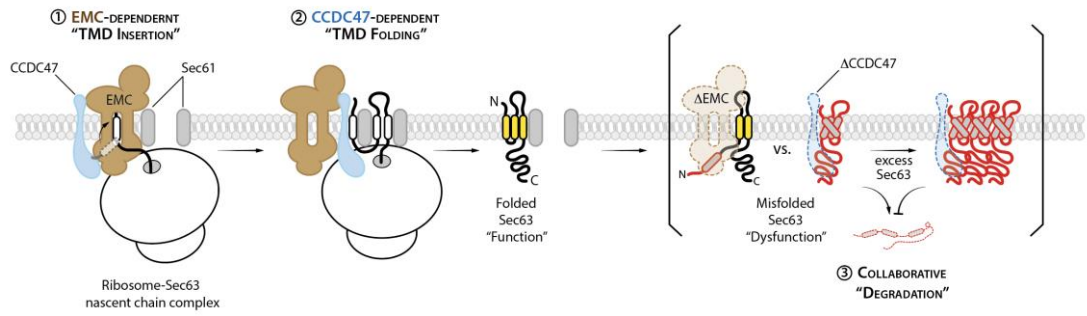


그림 22. EMC 와 CCDC47 의 상호 작용을 통한 막 단백질 품질 관리 기전

고찰

본 연구는 어떤 단백질의 기능이 상호 작용하는 단백질과 관계가 있다는 연구를 배경으로 친화 정제를 이용해 EMC (ER-membrane complex)의 새로운 구성 성분인 CCDC47 을 찾아내었고, 근접 표지 전략을 이용해 CCDC47 의 기질인 Sec63 를 찾아 EMC 와 UPR (unfolded protein response) 과의 관련성을 실험적 근거를 통해 제시하였다. 본 연구를 통해, EMC 의 새로운 구성 성분을 통한 기전을 찾고 이해하는데, 몇 가지 중요한 단서와 의문점을 제시한다.

첫째, 친화 정제법과 근접 표지 전략을 이용한 이유는 무엇인가?

EMC 의 기능을 규명하기 위해 EMC 와 상호 작용하는 단백질을 알아내야 했다. 이때, 친화 정제법은 상호 작용하는 단백질을 분리해 낼 수 있는 방법이기 때문에, EMC 와 상호 작용하는 신규 단백질을 찾아내는데 적합하였다. 하지만 CCDC47 의 기질을 밝힐 때는 적합하지 않았다. 친화 정제법은 상호 작용하는 단백질을 분리해 낼 수 있지만, 상호 작용이 약하거나 일시적으로 일어날 경우, 함께 분리해내기 어렵기 때문이다. 이 단점을 극복하기 위해 근접 표지 전략을 사용하였다. 근접 표지 전략은 주변을 비특이적으로 표지시키는 효소를 이용하는 것으로 효소가 위치한 곳의 단백질을 모두 식별할 수 있게 한다. 또한 근접 표지 전략을 사용하면 이전에 위치했던 단백질도 모두 식별할 수 있다. 예를 들어, 본 연구에서 사용한 소포체 제한적 근접 표지 방법은 TurboID 가 소포체 내에 머무르도록 하여 소포체 내의 단백질을 모두 바이오틴으로 표지되도록 하는데, 소포체 내 짧은 시간 존재하더라도 표지되고 이후 다른 세포 소기관으로 이동하여도 표지된 상태가 유지되어 소포체에 존재했던 단백질을 모두 분리해낼 수 있다. 하지만 이에 따른 한계 또한 존재한다. 우리가 찾아낼 단백질이 바이오틴화 될 수 있는 부위를 가지고 있어야 한다. 본 연구에서 소포체 내

단백질만 제한적으로 표지되는지 알아보기 위해 사용하였던 Sec61 β 는 소포체 내 노출 부위가 소수 존재하지만, 바이오틴화 되지 않았다.

둘째, EMC는 단백질 생합성에 어떻게 영향을 미치는가?

EMC의 핵심 기능은 정교한 막 단백질 삽입으로 밝혀져 왔다. 하지만 최근 다양한 연구를 통해 EMC는 단백질들의 정교한 생합성에 중요한 역할을 한다고 알려졌다. 이는 EMC가 상호 작용하는 다른 단백질의 기능과 조합되어 신규 기능을 발휘할 가능성을 제시한다. 따라서, 상호 작용하는 단백질의 기능이 EMC의 밝혀지지 않은 기능이라 추측할 수 있다. 본 연구에서는 EMC의 순수 분리를 통해 새로운 구성 성분을 밝힌 바 있다. 새로운 구성 성분에는 본 연구에서 주목한 CCDC47와 RpnI/II와 BiP이 존재했다. CCDC47과 BiP은 샤페론(chaperone)으로 단백질 접힘과 합성에 주로 기능을 하고, RpnI/II는 OST 복합체에 속하며 번역 후 변형의 대표적 예인 당화(glycosylation)에 관련된 단백질이다. 이 단백질들은 단백질 합성과 변형(modification)과 관련된 기능을 한다는 공통점을 가지고 있으며, EMC의 핵심 기능인 막 단백질 삽입과 관련된 기능과 관련되어 있다고 알려진 바가 없다. 따라서, EMC는 막 단백질의 삽입에 기능한 후, CCDC47, RpnI/II, BiP과 같은 단백질과의 상호 작용을 통해, 단백질의 전반적인 생합성에 중요한 역할을 할 것이라 판단된다.

셋째, CCDC47의 결핍은 어떻게 Sec63의 발현 수준을 감소시켰는가?

CCDC47이 결핍되었을 때, Sec63의 발현 수준이 감소한 것을 확인할 수 있었다(그림 17). 그러나, 내인성 Sec63의 발현 수준과 달리, 추가적으로 과발현한 Sec63-HA의 발현 수준은 CCDC47 결핍 세포에서 더 증가하였다(그림 20). 과발현한 Sec63-HA의 발현 수준 증가는 두 가지 경우로 설명할 수 있다. 첫째는 CCDC47이 Sec63의 분해에 기능한다는 것이다. 하지만 이는

CCDC47 결핍 세포에서 내인성 Sec63의 발현 수준이 감소하는 것을 증명할 수 없다. 둘째는 CCDC47이 Sec63의 생성과정, 특히 접힘에 기능한다는 것이다. CCDC47 결핍 세포에서 과발현된 Sec63-HA가 제대로 접히지 못하고 막에 축적되어, 이로 인해 과발현된 Sec63-HA의 발현 수준이 높아보이게 될 수 있다. 이는 정상 세포와 CCDC47 결핍 세포에서 과발현된 Sec63-HA의 용해도를 비교해보면 더욱 더 확실하게 알 수 있다. 정상 세포에 비해 CCDC47 결핍 세포에서 용해도가 떨어지는 Sec63-HA가 더 많이 보이는 것을 확인할 수 있는데 (그림 21), 이는 앞서 언급했던 CCDC47 결핍 세포에서 과발현된 Sec63-HA가 축적될 것이라는 추측을 뒷받침하는 근거가 된다. 따라서, CCDC47은 샤페론으로서 Sec63의 접힘에 관여할 수 있는 가능성을 제시할 수 있다. 또한 이 연구에서 다루지는 않았지만, EMC가 결핍된 세포에서 Sec63의 발현 수준 감소와 CCDC47 결핍 세포에서의 UPR 이상 패턴이 관찰되었다. 이를 통해 제시할 수 있는 모델은 막 삽입 기능을 하는 EMC가 Sec63의 삽입을 돕고, 샤페론으로서 기능을 하는 CCDC47이 Sec63의 접힘을 돕는다는 것이다 (그림 22). EMC와 CCDC47이 결핍되어 제대로 합성되지 못한 Sec63가 형성된다면 분해를 통해 제거하지만, 과발현된 Sec63-HA는 그것을 처리할 수 있는 능력이 되지 않아 막에 쌓이게 되고, 분해를 막아 발현 수준이 높을 수 있다는 가설을 세울 수 있다.

넷째, EMC와 CCDC47에 의한 소포체 막 단백질 품질 관리의 중요성은 무엇인가?

EMC와 상호 작용하는 CCDC47이 결핍되면 Sec63의 발현 수준을 감소시킨다는 것을 실험을 통해 증명했다. Sec63는 BiP을 통해 IRE1 α 를 안정화시켜 UPR (unfolded protein response)이 정상적으로 작동할 수 있게 한다. 하지만 EMC와 CCDC47의 결핍은 이러한 Sec63의 발현 수준을

감소시켜 BiP 을 통한 IRE1 α 의 안정화를 불가능하게 하고, 결국 UPR 의 교란을 야기하게 된다. 이는 곧 EMC 와 CCDC47 의 상호 작용을 통한 소포체 막 단백질 품질 관리가 소포체 항상성에 기여한다는 것을 의미한다.

결론적으로, EMC 와 CCDC47 의 상호 작용이 소포체 항상성 유지에 중요한 역할을 한다는 것을 밝혀냈다. 하지만 EMC 를 순수 분리하는 과정에서, CCDC47 외에도 RpnI/II 와 BiP 과 같은 단백질도 함께 얻어낼 수 있었다. 이는 EMC 가 또 다른 신규 단백질과의 상호 작용을 통해 더 다양한 기능을 수행할 가능성을 시사한다. 또한 EMC 와 CCDC47 의 상호 작용 기전에 대한 연구가 다낭성 신장 질환과 다낭성 간 질환^[33], 그리고 당뇨와 암, 신경퇴행성 질병에 대한 치료책을 제공할 것이라 기대한다.

참고 문헌

- [1]: Anelli T, Sitia R. 2008. Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J.* 27:315–27.
- [2]: Lebeauvin C, Vallee D, Hazari Y, Hetz C, Chevet E, Bailly–Maitre B. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non–alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* (2018) 69:927–47.
- [3]: Yin Y, Sun G, Li E, Kiselyov K, Sun D. ER stress and impaired autophagy flux in neuronal degeneration and brain injury. *Ageing Res Rev* (2017) 34:3–14.
- [4]: Engin F. ER stress and development of type 1 diabetes. *J Investig Med* (2016) 64:2–6.
- [5]: Anson L (2009) Membrane protein biophysics. *Nature* 459, 343.
- [6]: Shao S & Hegde RS (2011) A flip turn for membrane protein insertion. *Cell* 146, 13–15.
- [7]: Brodsky JL, Goeckeler J, Schekman R (1995) BiP and Sec63p are required for both co– and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9643–9646.
- [8]: Shibata Y, Voeltz GK, Rapoport TA: Rough sheets and smooth tubules. *Cell* 2006, 126:435–439.
- [9]: von Heijne, G. The membrane protein universe: what’ s out there and why bother? *J. Intern. Med.* 261, 543–557 (2007).
- [10]: Anghel, S. A., McGilvray, P. T., Hegde, R. S. & Keenan, R. J. Identification of Oxal1 homologs operating in the eukaryotic endoplasmic reticulum. *Cell Rep.* 21, 3708–3716 (2017).

- [11]: Lewis AJO, Hegde RS. A unified evolutionary origin for the ubiquitous protein transporters SecY and YidC. *BMC Biol.* 2021 Dec 15;19(1):266. doi: 10.1186/s12915-021-01171-5.
- [12]: Schröder, M.; Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.*, 2005, 74, 739–789.
- [13]: Groenendyk, J.; Sreenivasaiah, P.K.; Kim, D.H.; Agellon, L.B.; Michalak, M. Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ. Res.*, 2010, 107(10), 1185–1197.
- [14]: Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Jan 18;13(2):89–102.
- [15]: Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Aug;21(8):421–438.
- [16]: Satoh T, Ohba A, Liu Z, Inagaki T & Satoh AK (2015) dPob/EMC is essential for biosynthesis of rhodopsin and other multi-pass membrane proteins in *Drosophila* photoreceptors. *Elife* 4, e06306.
- [17]: Lahiri S, Chao JT, Tavassoli S, Wong AK, Choudhary V, Young BP, Loewen CJ & Prinz WA (2014) A conserved endoplasmic reticulum membrane protein complex (EMC) facilitates phospholipid transfer from the ER to mitochondria. *PLoS Biol* 12, e1001969.
- [18]: Richard M, Boulin T, Robert VJ, Richmond JE & Bessereau JL (2013) Biosynthesis of ionotropic acetylcholine receptors requires the evolutionarily conserved ER membrane complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, E1055–E1063.

- [19]: Louie RJ, Guo J, Rodgers JW, White R, Shah N, Pagant S, Kim P, Livstone M, Dolinski K, McKinney BA et al. (2012) A yeast phenomic model for the gene interaction network modulating CFTR- Δ F508 protein biogenesis. *Genome Med* 4, 103.
- [20]: Christianson JC, Olzmann JA, Shaler TA, Sowa ME, Bennett EJ, Richter CM, Tyler RE, Greenblatt EJ, Harper JW & Kopito RR (2011) Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nat Cell Biol* 14, 93–105.
- [21]: Bircham PW, Maass DR, Roberts CA, Kiew PY, Low YS, Yegambaram M, Matthews J, Jack CA & Atkinson PH (2011) Secretory pathway genes assessed by high-throughput microscopy and synthetic genetic array analysis. *Mol Biosyst* 7, 2589–2598.
- [22]: Tang X, Snowball JM, Xu Y, Na CL, Weaver TE, Clair G, Kyle JE, Zink EM, Ansong C, Wei W et al. (2017) EMC3 coordinates surfactant protein and lipid homeostasis required for respiration. *J Clin Invest* 127, 4314–4325.
- [23]: Tian S, Wu Q, Zhou B, Choi MY, Ding B, Yang W & Dong M (2019) Proteomic analysis identifies membrane proteins dependent on the ER membrane protein complex. *Cell Rep* 28, 2517–2526.e5.
- [24]: Guna, A. et al. (2018) The ER membrane protein complex is a transmembrane domain insertase. *Science* 359, 470–473.
- [25]: Chitwood, P.J. et al. (2018) EMC is required to initiate accurate membrane protein topogenesis. *Cell* 175, 1507–1519.
- [26]: Shurtleff, M.J. et al. (2018) The ER membrane protein complex interacts cotranslationally to enable biogenesis of multipass membrane proteins. *eLife* 7, e37018

[27]: M. Zhang, T. Yamazaki, M. Yazawa, S. Treves, M. Nishi, M. Murai, E. Shibata, F. Zorzato, H. Takeshima, Calumin, a novel Ca^{2+} -binding transmembrane protein on the endoplasmic reticulum, *Cell Calcium* 42 (2007) 83–90

[28]: Chitwood PJ, Hegde RS. An intramembrane chaperone complex facilitates membrane protein biogenesis. *Nature*. 2020 Aug;584(7822):630–634.

[29]: Talbot, B. E., Vandorpe, D. H., Stotter, B. R., Alper, S. L. & Schlondorff, J. S. Transmembrane insertases and N-glycosylation critically determine synthesis, trafficking, and activity of the nonselective cation channel TRPC6. *J. Biol. Chem.* 294, 12655–12669 (2019)

[30]: Sen TZ, Kloczkowski A, Jernigan RL: Functional clustering of yeast proteins from the protein–protein interaction network. *BMC.Bioinformatics* 2006, 7:355.

[31]: L. Gatto, J. A. Vizcaíno, H. Hermjakob, W. Huber, K. S. Lilley, *Proteomics* 2010, 10, 3957–3969.

[32]: Shkel O, Kharkivska Y, Kim YK, Lee JS. Proximity Labeling Techniques: A Multi–Omics Toolbox. *Chem Asian J.* 2022 Jan 17;17(2):e202101240.

Abstract

Membrane proteins synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) play crucial roles in a wide range of biological processes, including substance transport, cell adhesion, signal transduction, enzyme activity, and immune response. However, their biosynthesis is often disrupted due to the thermodynamically unstable nature of the hydrophobic transmembrane domains (TMDs), leading to inefficient membrane insertion. This underscores the functional importance of membrane protein-specific chaperones in correcting faulty membrane insertion and suppressing structural defects. In this study, we elucidate a specific quality control mechanism for newly synthesized Sec63 protein through the demonstrated functional interaction between the ER membrane complex (EMC) and the membrane protein-specific chaperone, coiled-coil domain containing 47 (CCDC47).

To unveil novel functions of EMC, we identified CCDC47 as a novel protein interacting with EMC through TAP-tag based affinity purification and protein mass analysis. By applying proximity-based labeling specific to the ER in CCDC47-deficient cells generated via CRISPR/Cas9 technology, we discovered CCDC47-dependent ER membrane proteins, among which, a significant reduction in the expression level of Sec63, an essential component of the ER protein translocation machinery, was observed in CCDC47-deficient cells.

Consequently, the deficiency of CCDC47 disrupted the Sec63/BiP-

associated signaling pathway activated by ER stress and, in conjunction with the inhibition of Sec63 TMD insertion observed in EMC-deficient cells, indicates a cooperative contribution of the interaction between EMC and CCDC47 to the structural and functional integrity of Sec63. Therefore, this study provides novel insights into the quality control mechanism of ER membrane protein biosynthesis, significantly advancing our understanding of membrane proteins' involvement in critical biological processes within the cell.

Keywords : EMC, CCDC47, Sec63, Membrane protein quality control, ER membrane