



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

생체리듬 조절 단백질, PERIOD의 분해 조절인자
발굴 및 기능평가

Discovery and Functional Evaluation of Degradation

Regulatory Factor for the Circadian Rhythm Protein, PERIOD

울산대학교 대학원

의과학과

옥순혁

생체리듬 조절 단백질, PERIOD의 분해 조절인자
발굴 및 기능평가

지도 교수 강민지

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2024년 8월

울산대학교 대학원

의과학과

옥순혁

국문요약

생체 리듬은 약 24시간 주기로 나타나는 생리학적, 생화학적 그리고 행동학적 변화를 의미한다. 이를 통해서, 유기체는 신경적 및 호르몬적 조절을 통해 다른 신체 기능을 생체 리듬에 맞게 체내에서 생리 활동을 적절히 조절을 한다. 만약, 이러한 생체 리듬이 어긋나게 된다면 건강을 해칠 뿐만 아니라 수면장애나 식습관과 같은 일상 장애나 혹은 심각한 질병에 노출될 가능성이 높아짐을 이전 연구를 통해서 잘 알려져 왔다.

본 연구에서는 생체리듬 단백질, PERIOD와 TIMELESS의 안정성에 기여하는 요인 발견 및 기능적 평가와, 더 나아가 생체리듬 단백질 분해에 관여하는 ubiquitin site를 알아내고자 하였다. 소개할 인자로서 제시할 것은 유비퀴틴화에 영향을 미치는 효소 중 하나인 deubiquitinase인 Ubiquitin-specific peptidase 14(USP14)이며, USP14의 기능 평가를 설명하고자 한다.

Deubiquitinase인 USP14을 과 발현한 초파리 체내에서 생체리듬 단백질, PERIOD의 수치가 단백질 수준은 낮아졌지만, mRNA 수준에서는 큰 변화가 없는 모습을 확인할 수 있었다. 또한, USP14을 과 발현한 초파리에서 대조군과 비교했을 때 음식 섭취량 증가하고 수명이 짧아지는 등 초파리 생리학적 변화가 관찰되었다.

이전 연구들은 생체리듬의 작동원리와 관련 단백질의 생성 및 분해에 대해 많이 밝혀져 왔지만, PERIOD 단백질의 유비퀴틴화 사이트는 명확하게 알려지지 않았다. 단백질 mass spectrometry를 통해서 생체리듬 단백질 PERIOD의 lysine 1117, lysine 1118이 PERIOD 안정성에 기여함을 밝혔다. 이 2가지 사이트를 다른 아미노산인 alanine으로 치환되었을 때, PERIOD 단백질이 시간대별로 진동모양을 보이는 대조군에 비해 주기성을 잃어버린 모습을

확인할 수 있었고, 낮 시간대에서도 degradation이 되지 않고 축적되는 모습을 확인할 수가 있었고 음식 섭취량 증가도 유발했다.

결론적으로, 본 연구는 PERIOD 단백질 분해에 영향을 미치는 새로운 인자로 USP14를 제시하였고, USP14가 생체 내 PERIOD 단백질의 안정성에 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다. 이 연구는 생체 리듬 및 관련 질병 연구에 중요한 기여를 할 것이며, 다양한 유기체의 생리학 연구에도 중요한 단서를 제공할 것이다.

Keyword: 생체 리듬, 유비퀴틴화, PERIOD, TIMELESS, deubiquitinase, USP14

차례

국문요약	1
차례	3
그림목차	5
서론	6
연구방법	13
1. 실험동물(Experimental Animal).....	13
2. 단백질 추출	13
3. Western blot.....	14
4. mRNA 추출(Extraction).....	16
5. Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR).....	16
6. Lifespan Analysis.....	18
7. Hemolymph extraction.....	18
8. Glucose measurement.....	19
9. Feeding assay	19
결과	21
USP14 의 과 발현에 따른 PERIOD 안정성 확인	21
USP14 의 과 발현이 초파리의 생리학에 미치는 영향	22
PERIOD 단백질의 유비퀴틴화 잔기 및 중요성 확인	23

유비쿼틴 잔기가 치환이 된 초파리에서 PERIOD 패턴 변화 및 생리학에 미치는 영향.....	24
고찰.....	25
참고문헌 목록.....	37
영문요약.....	43

그림목차

그림 1. USP14 을 과 발현시킨 초파리와 대조군에서의 생체리듬 단백질 western blot 결과.....	28
그림 2. USP14 을 과 발현시킨 초파리와 대조군에서의 Mrna 단계에서의 PERIOD 와 TIMELESS 의 양 변화	29
그림 3. USP14 을 과 발현시킨 초파리와 대조군 초파리 간의 체내 glucose 량 비교	30
그림 4. USP14 을 과 발현시킨 초파리와 대조군 초파리 간의 체내 TAG 양 비교	31
그림 5. USP14 을 과 발현시킨 초파리 내에서의 food consumption	32
그림 6. USP14 을 과 발현시킨 초파리와 대조군 초파리 간의 life span 변화	33
그림 7. PERIOD 의 유비퀴틴화에 영향을 미치는 site 확인	34
그림 8. PERIOD 의 유비퀴틴화에 영향을 미친 site 를 치환한 초파리 내에서의 생체리듬 단백질 확인	35
그림 9. PERIOD 의 잔기를 치환시킨 초파리의 Food consumption.....	36

서론

<생체리듬의 정의 및 작동 원리>

하루 24시간 동안, 대부분의 유기체들은 일정한 시간대에 깨어나 활동을 하고, 밤에는 숙면을 취하는 규칙적인 행동 패턴을 보인다. 이러한 패턴은 자연적인 외부 요인에 의해 변경이 될 수도 있으며, 개인이 의도적으로 바꿀 수도 있다. 그러나 이러한 변화가 지속되지 않는다면 시간이 경과함에 따라 원래의 패턴으로 회복되는 경향이 있다. 이러한 현상은 생체 일주기(Circadian Rhythm)에 의해 발생하는 것으로, 이는 신체 내부에 시계 역할을 한다고 알려져 있다.

생체 리듬은 지구상의 생명체에서 약 24시간 주기로 나타나는 생리학적, 생화학적 그리고 행동학적 변화를 의미한다. 생체 리듬은 외부의 물리적 변화가 아닌, 유기체 내부의 시간 측정 시스템으로 발생을 한다고 알려져 있다.^[8] 생체리듬은 빛이나 온도, 식습관 등의 외부 요인에 반응하여 유기체가 적절한 시간대에 행동을 유도하도록 한다. 이를 통해, 유기체는 식습관이나 호르몬 분비, 신체 기능 등을 미리 예측하고 적절히 대응을 할 수가 있다. 이러한 생체 리듬이 어긋나게 된다면 건강을 해칠 뿐만 아니라 암이나 우울증과 같은 질병에 걸릴 위험이 증가할 수도 있다. ^[1,9]

생체리듬을 조절하는 요소로는 음식, 빛, 온도 등 다양한 요소들이 있지만, 그 중 가장 중

요한 요소는 바로 빛이다. [4] 이전 연구에 따르면, 유기체들은 뇌 시상하부에 위치한 시교차상핵(Suprachiasmatic nucleus, SCN)의 유무에 따라 생체 리듬을 일차적으로 조절한다는 사실이 밝혀졌다. [2,3,8] SCN은 시각 자극에 민감한 세포들이 집중적으로 존재하기 때문에, 빛에 대한 자극에 민감하다. 눈이 빛에 대한 정보를 받아들이면, 이 정보는 뇌의 시상하부에 위치한 SCN에 전달이 되는데, 빛 자극이 주어지면 신경 전달 물질인 글루탐산(Glutamate)이 분비가 된다. 이 자극을 통해 호르몬적 작용, 신경적 작용 등을 통해서 생체 내 생리현상을 일주기 리듬에 맞게 조절을 한다. 이후, 일주기를 결정하는 단백질에 대한 분자학적 관점의 다양한 연구가 진행되었는데, 이를 통해 밝혀진 단백질과 메커니즘은 다음과 같다. [11,29,30]

<생체리듬 단백질 생성의 분자학적 메커니즘>

생체 리듬은 양성 피드백(Positive feedback)과 음성 피드백(Negative feedback)을 통해 단백질의 양을 조절한다. 초파리에서는 CLOCK 과 CYCLE 단백질이 양성 피드백 루프에서 핵심 역할을 한다. 이들 단백질은 basic-helix-loop-helix PER-ARNT-SIM 도메인을 가지며, 이합체를 형성하여 E-box cis-regulatory 프로모터 지역에 결합한다. 이를 통해 PERIOD(PER)와 TIMELESS(TIM)의 발현을 촉진한다. PERIOD 와 TIMELESS 단백질이 충분히 축적되면, 이들 단백질은 핵으로 이동하여 CLOCK-CYCLE 이합체와 상호작용하면서 그 활성을 억제한다. 이는 음성 피드백 루프를 형성하며, PERIOD 와 TIMELESS 의 발현이 억제되면 이들 단백질이 점차 분해되어 CLOCK 과 CYCLE 의 억제가 해제된다. 이로써 새로운 주기가 시작이 되는 루프 형태의 과정이 반복된다.

포유류에서는 CLOCK 과 BMAL1 단백질이 유사한 역할을 수행한다. 이들 단백질 역시 basic-helix-loop-helix PER-ARNT-SIM 도메인을 가지며, 이합체를 형성하여 E-box 프로모터 지역에 결합한다. 이를 통해 PERIOD 와 CRYPTOCHROME (CRY) 단백질의 발현을 촉진한다. PERIOD 와 CRYPTOCHROME 단백질이 축적되면, 이들 단백질은 핵으로 이동하여 CLOCK-BMAL1 이합체와 상호작용하면서 그 활성을 억제한다. 이는 음성 피드백 루프를 형성하며, PERIOD 와 CRYPTOCHROME 의 발현이 억제되면 이들 단백질이 분해되어 CLOCK 과 BMAL1 의 억제가 해제된다. 이 두 과정 모두 순환적인 피드백 루프를 통해 시간이 지남에 따라 PERIOD 와 CRYPTOCHROME 단백질이 분해되면 CLOCK 과 BMAL1 에 대한 억제가 해제되어 새로운 생체 주기가 시작된다.

이러한 메커니즘은 초파리와 포유류를 비교했을 때 유사하게 작동하는 모습이 잘 알려져 왔다. [5,10,12] 이번 연구는 초파리를 이용해서 생체리듬 단백질의 변화를 알아보고자 했다. 초파리 체내에서 생체리듬에 많이 관여한다고 잘 알려진 생체리듬 단백질은 PERIOD 와 TIMELESS 2 가지이며 유기체 내에서 시간대에 맞춰 농도를 조절하여 유기체가 생체 리듬을 유지할 수 있게 도와준다.

<생체 리듬 단백질의 종류>

PERIOD 는 시교차상핵 (SCN)과 다양한 말초 조직에서 발현되며, 생체 리듬을 조절하는 주요 단백질 중 하나이다. SCN 에서는 PERIOD 단백질의 일 주기적인 변화가 전체 일주기 리듬을 조절하고, 말초 조직에서 발현된 PERIOD 는 국소적인 생체 리듬을 조절한다.[25] 일반적으로 PERIOD 단백질은 밤 시간대에 높은 농도를 나타내며, 음성 피드백을 통해 낮

시간대에는 생성이 억제된다. 이러한 반복적인 피드백 과정을 통해 PERIOD 는 다양한 조직 내에서의 일주기를 조절하는 중요한 역할을 한다. [5,14]

TIMELESS 는 PERIOD 와 마찬가지로 생체 리듬을 조절하는 주요 단백질이다. TIMELESS 단백질은 SCN 및 말초 조직에서 주로 발현되며, 밤에 높은 농도를 나타낸다. PERIOD 와 상호작용하여 생체 시계 주기와 SCN 내부 시계 세포들의 활동을 조절하는 데 중요한 역할을 한다.[7] 또한, TIMELESS 는 외부 시간 신호, 특히 빛에 의해 발현이 조절되며, 이를 통해 SCN 내부 세포들의 활동을 조절한다. 이들 단백질은 음성 피드백 메커니즘을 통해 발현이 조절되며, 다양한 외부 환경에 적응할 수 있도록 한다.

<생체리듬 단백질 분해 메커니즘>

낮 시간대에는 일정 농도를 유지하기 위해 생체리듬 단백질이 분해되어야 한다. 유기체는 체내에서 단백질을 분해하는 2가지 대표적인 방법이 존재한다. 첫 번째는 리소솜에 의한 비 특이적 과정으로, 식세포작용을 통해 오래된 세포 자체나 외부의 바이러스, 병원 등을 분해한다. 리소솜은 단백질 분해 효소를 포함한 세포 내의 작은 주머니로, 산성 조건을 유지하며 식세포나 백혈구 등에서 활발히 작용한다. 주로 외부 바이러스를 분해하고, 병원이나 오래된 체내 단백질을 비 특이적으로 분해하는 역할을 한다. 두 번째 과정은 유비퀴틴-프로테아좀 시스템(Ubiquitin-Proteasome System, UPS)으로, 특정 단백질을 조절 가능하게 분해한다.[15] 이 과정에서는 유비퀴틴(Ubiquitin)이라는 단백질이 타겟 단백질에 결합하여 프로테아좀(Proteasome)에 의해 분해된다. UPS는 분해 예정인 기질 단백질에 유비퀴틴이라는 76개의 아미노산으로 구성된 작은 단백질을 공유 결합시켜 26S 프로테아좀에 의해 분해되는 시스

템이다. 유비퀴틴 활성화 효소(E1)는 ATP를 사용하여 유비퀴틴을 활성화하고, 유비퀴틴의 C-말단을 활성화시킨다. 유비퀴틴 결합효소(E2)는 활성화된 유비퀴틴을 표적 단백질로 전달할 준비를 한다. 마지막으로, 유비퀴틴 리가아제(E3)는 E2와 결합하여 표적 단백질을 인식하고, 유비퀴틴을 표적 단백질의 라이신(Lysine) 잔기에 결합시킨다. 이 과정을 거친 표적 단백질은 최종적으로 프로테아좀에 의해 분해된다. 생체리듬 단백질은 주기성을 가지기 때문에 비 특이적 분해의 특성을 가지는 리소좀에 의한 분해보다는 UPS에 의해 분해가 된다.

초파리와 포유류 모두 UPS 시스템을 통해 생체리듬 단백질을 분해한다. 초파리의 경우, PERIOD 단백질이 유비퀴틴화 과정을 거쳐 분해가 되고 이 과정에 Supernumerary limbs(SLIMB)가 관여한다고 알려져 왔다. TIMELESS 단백질은 빛에 의해 신속하게 분해가 되는데, 이 빛 신호는 JETLAG(E3 유비퀴틴 리가아제)에 의해 TIMELESS 단백질을 유비퀴틴화하여 분해를 촉진한다. 포유류에서는 β -TRCP가 PERIOD 분해를 촉진한다고 알려져 있고, CRYPTOCHROME 단백질의 유비퀴틴화에는 F-box and leucine-rich repeat protein 3(FBXL3)가 관여한다고 알려져 있다. [26,31,32] 이를 통해서, 생체리듬 단백질 분해에는 유비퀴틴화 뿐만 아니라 다양한 단백질이 분해를 도와준다는 것을 알 수 있다. 이전 연구를 통해, 생체리듬 단백질 생성, 조절 메커니즘 그리고 분해 과정에 대해 상당한 이해를 얻었다. 그러나, 이 중 PERIOD 단백질과 유비퀴틴이 결합하는 부위에 대한 자세한 정보는 여전히 알려지지 않았다.

본 연구의 목적은 PERIOD 단백질 분해에 관련하는 효소 중 하나인 deubiquitinase의 한 종류인 USP14를 소개하고 그 기능에 대해 평가하고, PERIOD 단백질 분해에 관련된 사이트를 식별하는 것이다. USP14은 이러한 deubiquitinase 중에서도 주목받는데, 그 이유는 여러

신호 전달 경로에서의 역할뿐만 아니라 프로테아좀의 기능을 조절하여 단백질 분해를 통제한다는 점이 있다.

USP14은 유비퀴틴 단백질이 결합한 후의 프로테아좀 복합체에서 중요한 역할을 한다. 일반적으로 유비퀴틴이 결합한 단백질은 프로테아좀에 전달되어 분해가 된다. 그러나 USP14은 이 과정을 역전시키는데, 이는 유비퀴틴 결합 단백질의 재활용을 허용한다. 이를 통해 USP14은 특정 단백질의 안정성을 유지하고, 세포 내에서 원활한 단백질 대사를 조절한다.^[16] 또한, USP14의 기능이 제대로 작용하지 않으면 바이러스 감염 및 면역 질환 등 다양한 질병에 걸릴 수 있다는 연구도 밝혀졌다.^[17,18,19,20] 따라서 본 연구를 통해, USP14이 PERIOD 단백질의 안정성에 어떻게 기여하는지를 명확하게 이해하고, 이를 통해 생체 리듬 제어의 메커니즘을 더욱 깊게 이해하고자 했다.

USP14의 작용 및 PERIOD 단백질 분해에 관련하는 유비퀴틴 사이트를 확인하기 위해 실험 동물 모델로 초파리를 선택했다. 초파리는 인간 유전자와 약 75% 유사성을 가지고 있어서, 인간 질병 연구에도 유용하며, 짧은 세대 주기를 가지고 있어서 대규모 실험에도 적합성을 가지고 있다. 또한, 발달 연구, 행동 연구를 함에 있어서 유용성을 보이는 장점이 있다. 이 연구에서 USP14를 발현하여 초파리에게 일어나는 변화를 확인하기 위해 가장 잘 알려지고 유전자 발현 조절에 많이 사용하는 기법인 GAL4-UAS 시스템을 사용했다. 이 시스템은 효모 전사 인자인 GAL4와 Upstream Activating Sequence (UAS)로 구성되어 있다. 부모 세대의 초파리 중 한 개체는 GAL4를 발현하는 라인, 그리고 다른 하나는 UAS-표적 유전자를 가지고 있는 라인을 교배한다. 교배에서 태어난 자손은 GAL4가 특정 프로모터에 의해 발현이 되고, 발현이 된 GAL4는 UAS 서열에 결합하여 UAS 뒤에 있는 표적 유전자의 전사를 활성화시

킨다. GAL4/UAS 시스템의 장점은 특정 유전자의 과발현을 통해 해당 유전자의 기능을 연구할 수 있다는 점이다. 이 시스템을 통해 표적 유전자를 세포 내에서 특정 시기에 발현시킬 수 있어, USP14의 기능을 타겟으로 초파리에서의 PERIOD 단백질 분해 관련된 연구를 진행할 수가 있다. [28,33]

Deubiquitinase로서의 USP14은 생체리듬 단백질인 PERIOD의 분해를 억제하고 안정성을 높이는 것을 확인할 수가 있었다. 이로 인해 초파리 생체 내 PERIOD의 양에 따라 생리현상에도 영향을 미치는 것을 확인이 가능했다. 이를 인해 초파리 생체 내 PERIOD의 단백질 양이 조절됨에 따라 생리적 현상에도 영향을 준다는 것을 확인할 수가 있었다. 이를 통해 PERIOD의 단백질 양이 생체리듬에 미치는 영향의 중요성을 파악할 수 있었고, 수명이나 식습관, 그리고 전반적인 유기체의 일생에 있어서 PERIOD가 중요한 역할을 함을 알 수가 있었다. 따라서, 앞으로의 연구의 목표는 초파리뿐 만 아니라 포유류 유기체에서 PERIOD의 안정성 및 분해에 관련되어 있는지를 확인함과 동시에 생리 현상에 어떤 영향을 미치는 지 파악하는 것이 주 된 목표가 될 것이다.

연구방법

1. 실험동물(Experimental Animal).

모든 실험 동물은 아산생명과학연구소의 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)에 의해 승인된 표준 초파리를 사용하였다. 사용된 음식은 표준 Bloomington drosophila stock center (BDSC) Cornmeal 조성에 따라 1.6% yeast, 0.9% soy flour, 6.7% cornmeal, 1% agar, 7% light corn syrup으로 사용하였다. 본 실험에 들어가기 전 초파리들은 25°C, 65% 습도, 빛이 없는 incubator 안에 보관을 하였으며, 실험에 필요한 초파리들은 Zeitgeber time (ZT) 시간을 맞추기 위해서 필요한 유전형의 초파리는 12L (A.M 09:00~ PM 09:00): 12D (P.M 09:00~ 익일 A.M 09:00)를 맞춘 incubator에 incubation 하였다. 그리고 초파리에 신선한 음식을 제공하기 위해서 실험에 사용하는 vial은 2일마다 1번씩 갈아주었다.

또한, 사용된 초파리는 표준 GAL4/UAS system을 따르며, 사용한 초파리 유전형은 대조군으로써 각각 *UAS-lacZ*, *per0,tim>PER^{WT}*을 사용했으며, 실험군의 초파리는 각각 *UAS-USP14-HA*, *per0,tim>PER^{1117A, 1118A}*이며, Bloomington stock 및 FlyORF을 통해 얻을 수 있었다.

2. 단백질 추출

웨스턴 블롯 실험에 사용할 단백질을 추출하기 위해서, 교배 후 태어난 초파리의 자손들을 12L: 12D를 4일 동안 훈련한 뒤, 5일차 아침 9시부터 익일 아침 9시까지 4시간 간격으로 30마리씩을 모아 -80°C에 보관하였다. 그리고 실험 당일, 모은 초파리들의 머리를 수술용 메

스로 몸통과 분리한 후, 1.5 microcentrifuge tube에 모아 2X lysis buffer(10 mM HEPES, 5mM Tris-HCl (pH7.5), 50 mM KCl, 10% glycerol, 2.5 mM EDTA, 0.2% Triton X-100), 7X Protease inhibitor(Basel, Switzerland; catalog number 11836170001), 0.1M DTT를 사용해 1X lysis buffer를 조성하였다. 그리고 lysis buffer을 초파리 두부가 있는 tube에 각각 70ul 넣은 다음 pestle을 이용해 충분히 으깨 주었다. Sonicator (SONICS, USA; catalog number VCX-130)을 이용해 'time 7초, amplitude 30%, pulse 1초' 조건 하에 진행한 다음, 20분동안 얼음에 incubation 하였다. 그리고 '13,200rpm, 4°C, 10분'의 조건으로 원심분리(Eppendorf AG, Germany; catalog number Z605212)를 진행한 다음, lysate를 얻을 수 있었다. 각각의 농도를 측정하고 정량을 하기 위해 BSA 2mg/ml (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; catalog number 23208)를 사용하였다. 이후, 같은 양의 단백질을 loading하기 위해서, 5X loading dye (1M Tris-HCl(pH 6.8), 50% glycerol, 10% SDS, 2-mercaptoethanol, 1% bromophenol blue)와 함께 lysate와 lysis buffer을 동일한 단백질의 양을 넣을 수 있도록 계산하고, 결과 수치에 따라 각각 넣은 다음 충분히 섞어준 뒤, 100°C에서 5분 동안 가열하였다. 그 후, 꺼낸 다음 얼음에서 충분히 식히고 다시 한번 vortex 및 spin down을 진행하였다.

3. Western blot.

초파리 내에서의 생체 리듬 단백질, PERIOD와 TIMELESS 변화를 각각 확인하기 위해 웨스턴 블롯 실험을 진행했다. 타겟이 되는 단백질인 PERIOD와 TIMELESS을 확인하기 위해서 사용한 gel은 Tricine gel (40% acrylamide, 10% SDS, 2 M Tris-HCl(8.45), APS, TEMED)를 사용하였다. Housekeeping gene으로 사용한 α -tubulin을 확인하기 위해서 SDS-PAGE을 사용하였고, 'stacking gel: 30% acrylamide, 10% SDS, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), APS, TEMED,

running gel: 30% acrylamide, 10% SDS, 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8), APS, TEMED'을 사용하였다.

PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA; catalog number: 1645050)을 사용하여 전기 영동을 공통적으로 80V로 약 30분, 120V로 SDS-PAGE gel은 약 1시간 30분, Tricine gel은 약 3시간 30분 더 진행한 후, Immobilon®-P PVDF Membranes (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA; catalog number IPVH00010)을 이용해 gel에 있는 단백질을 옮기는 transfer과정을 마찬가지로 PowerPac™ Basic Power Supply을 사용하여 '90V, 1시간 30분' 낮은 온도가 유지되는 cold room에서 진행했다. Ponceau 염색을 통해 단백질 밴드가 잘 transfer 되었는지 확인한 후, destaining 과정을 TBST (10X TBS, 10% Tween 20)를 이용하여 진행했다. 5% Difco™ Skim Milk (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA; catalog number 232100)를 통해 1시간 blocking 과정을 진행하였다. 이후, 1차 항체를 housekeeping gene 항체는 1:200,000의 비율로, PERIOD와 TIMELESS 항체는 1:3,000의 비율로 5% skim milk로 희석한 후, sealing bag에 희석한 항체를 각각 1 ml을 넣은 다음 4°C가 유지되는 cold room에 있는 shaker에 약 16시간 정도 둔다.

익일, sealing back에서 membrane을 꺼낸 다음, 10분간 TBST로 3번 씻어낸다. 그리고 host에 맞게 2차 항체를 1:5,000의 비율로 5% skim milk로 희석한 다음, 새로운 sealing bag에 다시 1ml 넣은 후 상온에서 1시간 동안 shaking을 진행하였다. 반응 완료 후, membrane을 꺼낸 다음 10분간 TBST로 3번 씻어 냈다. Membrane에 SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; catalog number 34075)를 1분간 반응시킨 다음, 암실에서 AGFA CP BU 8×10 X-RAY FILM (AGFA, Mortsel, Belgium; catalog number AGFA810)을 사용하여 현상 과정을 진행한다.

4. mRNA 추출(Extraction).

TRIzol® RNA 분리 시약(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; catalog number 15596026)을 통해서 mRNA를 추출했다. 교배 후 태어난 초파리의 자손들을 12L: 12D를 4일동안 훈련한 뒤, 5일차 아침 9시부터 익일 아침 9시까지 4시간 간격으로 각각 교배 후 태어난 자손을 10마리씩 수술용 메스로 분리한 초파리 두부를 모은 다음 시간대 별로 각각 tube에 넣었다. TRIzol reagent를 200ul을 넣고 pestle을 이용해 충분히 으깨 준 다음, TRIzol reagent을 300ul을 마저 넣고 chloroform을 TRIzol reagent와 5:1 비율로 넣어준다. 그리고 '13,200 rpm, 4°C, 15분'의 조건으로 원심분리를 진행한 다음, 상층에 존재하는 aqueous phase를 160ul를 추출해 새로운 tube로 옮긴다. 새 tube에 있는 aqueous phase에 isopropanol 200ul을 넣고 충분히 vortex 한 다음, 얼음에 10분간 보관 후, '13,200 rpm, 4°C, 10분'의 조건으로 원심분리를 진행한다. 이후, pellet을 제외한 나머지를 깔끔하게 제거한 후, 75% alcohol 500ul을 넣어 위아래로 잘 섞어 준 다음, '13,200 rpm, 4°C, 5분'의 조건으로 원심분리를 진행한다. 다시, pellet을 제외한 나머지를 깨끗하게 제거한 뒤, 튜브를 뒤집어서 5분동안 충분히 말린 후, D.W 50ul을 넣어 pellet이 충분히 풀어지게 한다.

5. Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR).

USP14에 의한 PERIOD와 TIMELESS의 변화가 단백질의 수준보다 상위 단계인 mRNA 수준에서도 비슷한 경향을 보이는지 확인하기 위해서 진행하였다. 사용한 mRNA의 양이 총 100ng이 되도록 정량을 하였으며, reverse transcription에 사용한 kit는 ReverTra Ace - α - (Toyobo, Osaka, Japan; catalog number FSQ-101)이다. 먼저, D.W와 100ng 분량의 RNA를

합 7ul가 되도록 튜브에 넣은 다음, 65°C에 5분간 incubation 한다. 그 이후, 얼음에 2분간 incubation한 후, 각 tube별로 '5X buffer 2ul, enzyme mix 0.5ul, primer mix 0.5ul'을 넣은 다음 tapping해 충분히 섞어준 후, 37°C에서 30분간 그리고 98°C에서 5분간 incubation한다. 이 과정이 끝난 후, 얼음에서 충분히 식혀 준 뒤, 90ul의 D.W을 첨가해 vortex 및 spin down 을 진행한다.

합성된 cDNA를 이용하여 RT-qPCR을 통해 각각 PERIOD와 TIMELESS의 발현 양 차이를 확인하고자 했다. 2X SYBR GREEN master mix (TOPreal™ qPCR 2X PreMIX (SYBR Green with low ROX) (Enzynomics, Daejeon, Korea; catalog number RT500S)를 사용하였으며, '2X SYBR GREEN master mix 10ul, cDNA 4ul, Forward primer 1ul, Reverse primer 1ul, D.W 4ul' 조건 하에 각각 96 well plate에 넣은 다음, LC480 light cycler에 아래의 조건으로 진행하였다.

<조건>

Incubation: 95°C, 10m

Amplification: ① 95°C 10s, ② 60°C 15s, ③ 72°C 30s, 총 40 cycle 진행

Melting: ① 95°C 5s, ② 65°C 15s

사용한 프라이머 정보는 다음과 같다.

	Forward primer	Reverse primer
per	5'- AACATGCTGCTCGTCATCTG	5'-GAACTTGGGGCTCTTCTGTG
tim	5'- CAAGAGCGTGGTGGAGTACA	5'-TCTCAGCAGCAGCAGACAGT
rp49	5'-AGATCGTGAAGAAGGCACCAAG	5'-CACCAGGAAGTTCTTGAATCCGG

분석은 LC light cycler 내부에 있는 프로그램을 사용하였으며, 최종적으로 각각 나타난 발

현양 수치는 '대조군 4h'을 기준으로 상대 수치화 하였다.

6. Lifespan Analysis.

유전형 별로 각각 초파리들의 수명을 확인하고자, 교배 후 태어난 자손을 준비한다. 실험 진행 기간 동안 교배를 막기 위해 수컷과 암컷을 따로 진행하였으며, 한 chamber별로 각각 100마리씩 넣었다. 실험에 쓰인 초파리는 유전형과 성별 구분하여 400마리씩 사용을 했으며, 25°C incubator에 보관을 하였다. 초파리 음식이 담긴 vial은 2일에 한 번씩 바꿔주었으며, 그 때마다 죽은 초파리 수를 체크하였다. 이 실험은 chamber에 있는 초파리가 모두 생존하지 않았을 때까지 진행하였다.

7. Hemolymph extraction.

초파리의 체내 glucose 양을 확인하기 위해서, 초파리의 체액인 hemolymph를 추출하였다. 확인하고자 하는 유전형의 초파리 교배 후 태어난 자손을 각각 암수 구별 없이 1개의 vial에 40마리씩, '10일 후' 와 '20일 후' 위해 총 2개를 1세트로 구성했다. 12L:12D가 맞춰져 있는 25°C incubator 안에 두었으며, 2일에 한 번씩 음식이 담긴 vial을 교체해 주었다. 해당하는 날짜가 되었을 때, 면도 날로 0.5ml microtube 하단 부분을 절단한 다음, 1.5ml tube에 겹쳐서 얼음에 보관하였다. 초파리를 패드 위에 올려 이산화탄소를 이용해 마취한 다음, 1ml 주사기를 이용하여 초파리 어깨 부분을 가볍게 한 번 찌른 후, 20마리씩 총 2개의 tube에 나눠 남았다. '5,000rpm, 4°C, 5분'의 조건으로 원심분리를 진행한 다음, 하단에 모인 hemolymph를 같은 유전형끼리 한 tube에 모았다.

8. Glucose measurement.

Hemolymph를 이용하여, 먼저 BSA 2mg/ml를 통해 단백질 정량을 실시하였다. 희석 비율은 20배로 하였으며, d.w로 희석을 진행하였고, standard curve를 통해 595nm에서의 O.D값을 측정해 각각의 농도를 계산하였다. Glucose 농도 또한 1X PBS를 사용하여 20배로 희석하였고, Glucose assay reagent(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; catalog number G3293)를 사용하였고 standard curve 작성을 위해서 D-(+)-Glucose(St. Louis, MO, USA; catalog number G3285)을 사용하였다. 20배로 희석한 hemolymph에 990ul의 Glucose assay reagent를 넣은 다음 15분동안 상온에서 incubation하였다. 그리고 96 well plate에 100ul씩 옮긴 다음, spectrometer을 이용하여 340nm에서의 O.D값을 측정하였다. 그리고 standard curve를 이용해 glucose의 농도를 측정하였다. [27]

Trehalase를 이용하여 더 정확한 glucose 농도를 측정하고자 하였다. 20배 희석한 hemolymph에 Trehalase (St. Louis, MO, USA; catalog number T8778) 1ul을 넣은 다음, 37°C water bath에 24시간 incubation 하였다. 24시간 경과 후, 990ul의 Glucose assay reagent를 넣은 다음 15분동안 상온에서 incubation하였다. 그리고 glucose 농도 측정과 같은 방법으로 O.D값을 측정하였고, 이를 수치화 하였다.

9. Feeding assay

보고자 하는 초파리의 유전형을 각각 2가지 종류의 vial에 10마리씩 담았다. 하나의 vial에는 해당하는 음식을 얼마나 먹었는지 확인을 하기 위해서 1% agar, 5% sucrose, and 1% blue food dye의 조성으로 음식을 만들었고, 다른 하나는 대조군으로써 일반 food를 조성하

였다. 10일차와 20일차에 각각 실험을 진행하였으며, 해당 날짜에 각각 만들어 놓은 food에 초파리를 옮긴 후, 30분간 25°C incubation을 진행하였다. 이후, 초파리를 1X PBS로 wash 해 준 다음, PBS를 제거했다. 그리고 새 PBS 100ul을 넣은 다음 pestle로 으깨 준 후, 4°C, 13,200 rpm, 25분'간 원심분리를 하였다. 상층액을 96-well plate로 옮긴 다음 spectrometer 에서 625nm의 파장으로 O.D값을 측정했다.

결과

USP14의 과 발현에 따른 PERIOD 안정성 확인

초파리 내에서 USP14이 생체 리듬 단백질 PERIOD 분해에 어떻게 관여하는지 확인하기 위해 tim(UAS)-gal4 driver을 사용하여 USP14을 과 발현시켰다. 그리고 24시간의 일생 주기를 맞춰주기 위해서 Zeitgeber time(ZT) 0을 빛이 시작하는 아침 09시부터 12시간 경과된 시간을 '낮', 그리고 빛이 꺼진 21시부터 익일 09시 까지의 12시간 동안을 '밤' 시간대로 설정하였다. USP14을 과 발현한 초파리와 대조군으로 설정한 UAS-lacZ 초파리들을 4일간 12L:12D 조건 하에 훈련 뒤, 각각 두부를 분리하여 웨스턴 블롯을 진행한 결과, 대조군에서는 PERIOD 단백질이 시간이 지남에 따라 점점 증가하는 모습을 보였지만, USP14을 과 발현한 초파리 그룹에서는 대조군과 비교했을 때 PERIOD 안정성이 떨어진 모습을 했다. 반면, 또 다른 생체리듬 단백질인 TIMELESS는 두 그룹 모두 큰 차이 없이 일정하게 나타내는 모습을 보였다. [그림 1]

또한, 이러한 생체리듬 단백질 수치 변화가 단백질이 만들어지기 전 단계인 mRNA에서도 같은 변화를 나타내는지 확인하기 위해서, 두 그룹의 초파리를 각각 mRNA를 추출해 CT값을 구한 뒤 상대적으로 수치를 계산했다. 그 결과, 두 그룹에서의 초파리의 mRNA 단계에서 수치와 패턴 모두 PERIOD와 TIMELESS 큰 차이가 없는 모습을 보였다. [그림2] 이를 통해서 USP14은 PERIOD이 mRNA 수준에서 관여하지 않고 단백질의 분해에 관여한다는 사실을 확인할 수가 있었다.

USP14의 과 발현이 초파리의 생리학에 미치는 영향

USP14의 과 발현이 PERIOD의 분해를 촉진하여 초파리 내에서의 단백질 양이 감소하는 모습을 확인할 수 있었다. 이에 따라, 초파리의 생활 패턴에도 영향을 미치는지 조사를 하였다. 실험에 사용한 초파리는 모두 12L: 12D 조건 하에 시간을 조절하였으며, 조건화 된 초파리의 체내 glucose의 양을 확인했을 때, USP14을 과 발현한 초파리 그룹에서는 대조군과 비교했을 때 증가한 모습을 관찰할 수가 있었다. [그림 3] 또한, 체내 지질인 triglyceride(TAG)의 양은 나이와 성별에 관계없이 유사한 수준을 나타내었다. [그림 4] 또한, 초파리의 실시간 음식 섭취량을 통해서 USP14 작용을 확인하고자 했다. ZT0의 초파리를 사용하여, 파랑 염료가 포함된 음식을 사용하였고 30분간 섭취 시간 후 각각 파랑 염료의 신호 세기를 측정하였다. 그 결과, USP14이 과 발현된 초파리 그룹에서의 파랑 염료의 O.D값이 대조군에 비해 높게 나타나는 것을 확인하였다. [그림 5] 즉 USP14이 과 발현된 초파리들은 체내의 PERIOD양이 감소함에 따라 음식 섭취량이 더 많아진다는 사실을 확인할 수 있었다.

USP14의 과 발현이 정상적인 생활 패턴을 벗어나게 함에 따라, 전체 초파리의 수명에도 영향을 미친다는 가설을 확인하기 위해, 각 그룹의 수명을 측정했다. 실험에서 12L: 12D 시간을 맞춘 incubator 내에서 동일한 음식을 제공하면서 대조군과 USP14을 과 발현한 초파리 그룹을 분리하여 실험을 진행하였다. 또한, 성별에 따라 추가적으로 그룹을 분리하였으며, 2일마다 죽은 초파리 수를 확인하고 새 음식을 교체해 주었다. 그 결과, USP14이 과 발현된 초파리 그룹에서의 중간 수명 및 평균 수명이 대조군에서의 수명보다 더 짧아진 모습을 확인할 수가 있었다. [그림 6] 이를 통해, USP14이 PERIOD의 분해를 촉진함과 동시에 초파리의 행동 및 생리학에도 영향을 미친다는 사실을 확인할 수가 있었다.

PERIOD 단백질의 유비퀴틴화 잔기 및 중요성 확인

USP14이 PERIOD 단백질에 유비퀴틴화 되는 잔기에 어떤 방법으로 영향을 주는지 확인하고자 했다. USP14을 과 발현한 초파리 그룹에서 PERIOD양이 많은 ZT 20에 해당하는 초파리의 두부를 분리한 다음, mass spectrometry를 통해서 분석하였다. 그 결과, PERIOD 단백질에서 유비퀴틴화에 영향을 미치는 3가지 후보 lysine 잔기 K53, K1117, K1118을 확인할 수가 있었다. Lysine을 alanine으로 치환하면 유비퀴틴화가 불가능해지기 때문에 단백질 분해가 억제된다. 이러한 사실을 기반으로, 각 사이트의 기여도를 확인하기 위해, 3가지 사이트를 가능한 조합인 single mutation(PER^{K53A}, PER^{K1117A}, PER^{K1118A}), double mutation(PER^{K53A K1117A}, PER^{K53A K1118A}, PER^{K1117A K1118A}), triple mutation(PER^{K53A K1117A K1118A})를 모두 만들어 각각의 그룹에서 PERIOD의 안정성을 확인하고자 했다. 다른 그룹과는 달리, double mutation 중 'K1117A K1118A'에서 PERIOD의 분해가 억제가 되는 모습을 확인할 수가 있었다. 이를 통해, K1117과 K1118의 2가지 잔기가 동시에 치환이 되었을 때, PERIOD의 분해가 억제가 되고 안정성이 증가한다는 사실을 알 수 있었다. [그림7]

앞선 결과를 통해, K1117과 K1118이 유비퀴틴화의 주요 잔기임을 가정하고 USP14가 PERIOD의 2가지 잔기가 치환된 PER^{K1117A, K1118A}에 어떤 영향을 주는지 확인하고자 했고 기존 PERIOD와 다른 결과를 보이는지 비교하고자 했다. 그 결과, 잔기가 치환이 된 PER^{K1117A, K1118A}에서 USP14에 의한 PERIOD 안정성이 사라짐을 확인할 수가 있었다.

유비퀴틴 잔기가 치환이 된 초파리에서 PERIOD 패턴 변화 및 생리학에 미치는 영향

유비퀴틴화 사이트의 치환에 따른 초파리의 PERIOD 생체리듬 변화를 조사하기 위해, PERIOD의 두 유비퀴틴화 사이트인 lysine 1117, lysine 1118의 치환 여부에 따라, 대조군과 치환이 된 초파리 그룹을 구성하여 12L:12D의 주기로 적응시켰다. 이후, ZT 시간대별로 초파리를 성별과 유전형에 따라 분류하여 PERIOD 단백질 양을 웨스턴 블롯으로 측정하였다. 결과적으로, 정상 그룹의 초파리에서는 PERIOD가 점점 높아지는 현상을 보인 반면, PERIOD 단백질 유비퀴틴 사이트가 치환이 된 초파리 그룹 내에서는 24시간 동안 일정한 농도를 보였다. [그림 8] 이를 통해, 생체리듬 단백질 PERIOD의 유비퀴틴화의 사이트인 lysine 1117과 lysine 1118의 잔기가 PERIOD 분해에 관여하는 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수가 있었다.

또한, 이러한 결과를 바탕으로 초파리의 생리학적 및 행동적 변화를 평가하기 위해, 각 그룹의 음식 섭취량을 측정하였다. 파랑 염료를 사용하여 10일차와 20일차의 섭취량을 측정한 결과, 치환 실험 그룹에서는 정상 대조군보다 더 많은 양의 식량을 섭취하는 경향이 있었다. 특히, 20일차에서 이 차이가 더 컸으며, 10일차와 비교하여 더 높은 수준을 나타내었다. [그림 9] 이러한 결과는 PERIOD 유비퀴틴화의 변화가 초파리의 식욕 조절에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다."

고찰

본 연구를 통해, PERIOD 단백질의 분해에 관여하는 USP14의 기능을 평가하고자 했으며, 그 결과, 비 정상적인 생체리듬 단백질의 양은 초파리의 생리적 변화에 미치는 영향을 끼친다는 것을 알 수 있었다. 결론적으로, deubiquitinase인 USP14가 PERIOD 단백질의 분해 과정에 영향을 미치는 중요한 요소임을 확인할 수 있었다.

Deubiquitinase인 USP14가 과 발현이 되면 체내 PERIOD 양이 감소하는 모습을 확인할 수가 있었고, 초파리의 생리학에 큰 영향을 미친다는 사실을 확인할 수가 있었다. 생체 내에서 PERIOD 양에 따라서 즉, PERIOD가 분해가 되지 않거나, PERIOD의 양이 시간대 별로 일정 범주보다 더 적어지게 되거나 많아지게 된다면, 유기체의 생리학에 영향을 미친다는 사실을 알 수가 있었다. 초파리 외에도 다른 유기체들의 생체리듬을 살펴보면 메커니즘이 큰 차이가 없다는 것을 이전 연구를 통해 잘 알려져 왔다.^[34,35] 관여하는 단백질만 조금씩 이름은 다를 뿐, 전체적인 메커니즘은 비슷하다는 것을 알 수 있다 (ex. 초파리에서는 TIMELESS, 포유류에서는 CRYPTOCHROME). 이를 통해서, 모든 유기체에서의 생체리듬 메커니즘은 비슷해 연구를 진행함에 있어서 관련된 단백질만 파악하면 이를 다른 유기체에 적용할 수 있다는 점을 시사한다.

또한, 생체리듬 단백질에 문제가 생기면 다양한 질병이 생길 수가 있다. 일례로, 포유류에서 생체리듬 단백질로 존재하는 *PER2* 유전자가 변이가 되었을 시, 수면 장애 및 대사 질환에 영향을 미친다는 사실이 알려져 왔다. 그리고 생체리듬 단백질이 CLOCK과 BMAL1이 제대로 작동하지 않았을 때, 종양 세포의 증식과 줄기세포 조성을 조절하는데 있어서 중요한 역할

을 한다는 점을 알 수 있다. DNA checkpoint나 암 등에서도 PERIOD 단백질의 변화가 확인이 가능하다. 앞선 결과를 통해, 정상적인 생활패턴을 벗어난 경우, PERIOD 단백질 양의 변화가 있다는 것을 알 수가 있었고, 전체적인 생리적 변화에도 영향이 있다는 것을 알 수 있었다. 그리고 일반적인 생활패턴을 가지지 않는 암 환자 내에서의 암세포에서 PERIOD 양 발현이 억제되는 모습도 이전 연구를 통해서 알려져 왔다.^[23] 또한, 생체리듬 단백질이 포유류의 제2형 당뇨병, 비만 및 대사 증후군과 같은 대사 질환을 악화시키는데 관여한다고 알려졌다. 이를 통해서, 생체리듬 단백질의 양과 변동이 건강에 중요한 영향을 미친다는 것을 알 수가 있다.^[36,37]

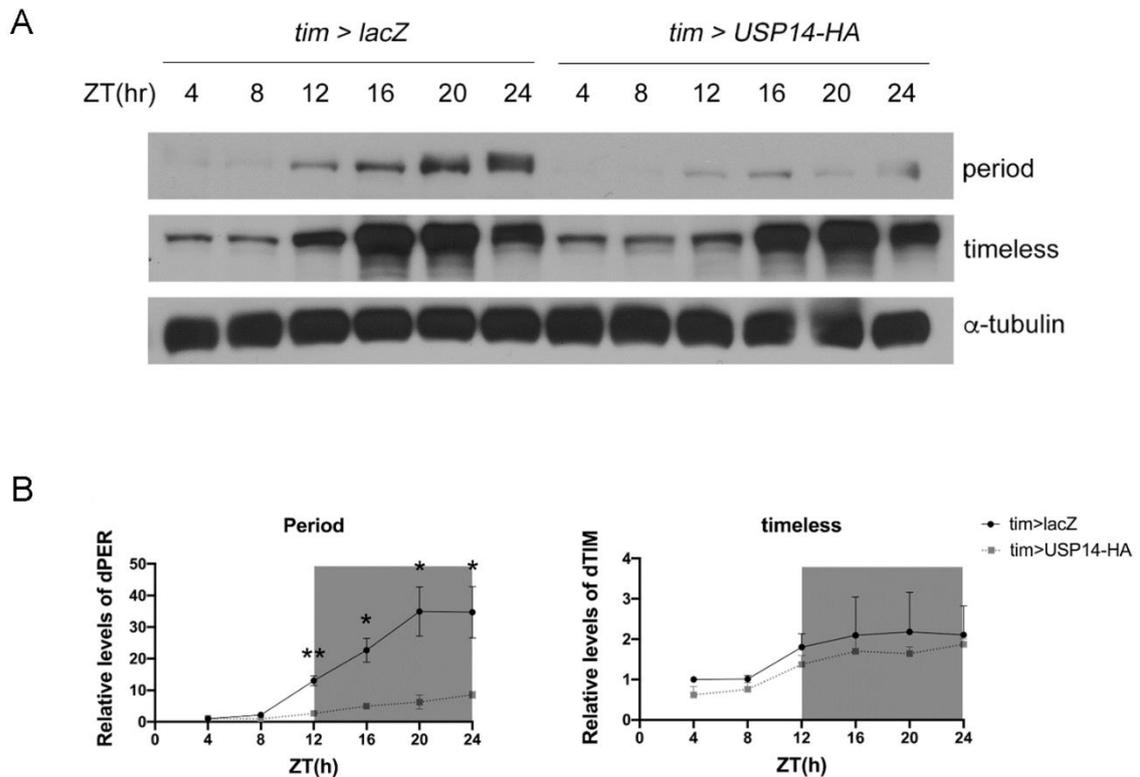
또한, 생리 현상에서도 영향을 미치는 것을 이전 연구를 통해 확인할 수 있었는데, BMAL1의 단백질이 없어지게 되면 쥐의 식사량이 현격하게 줄어드는 모습이 보였다. 그리고 포유류에서의 *PER1*, *PER2*에서의 돌연변이 형 또한, 대조군에 비해서 식사량이 변화되는 것을 알 수 있었다. ^[21,22] 즉, 이를 통해서 PERIOD는 각종 생리학에 있어서 하나의 신호 전달 메신저로써 역할을 하고 전체적인 생활 패턴에 영향을 미친다고 볼 수 있다.

이전 연구들은 USP14이 생체리듬 단백질 PERIOD에 영향을 미칠 가능성을 제시해 왔다. 구체적으로 USP14은 다중 유비퀴틴화 된 PER1의 수치를 감소시키고, PER2를 불안정화를 유도하는 것으로 보고되었다. 또한, HEK293a 세포에서 PER1 및 PER2 단백질의 감소에 영향을 준다는 것을 이전 연구를 통해 제시되었다. 이런 결과를 종합해볼 때, 본 연구에서도 초파리에서 PERIOD 단백질에 미치는 USP14의 영향이 유사할 것으로 예상할 수 있으며, 이는 USP14이 생체리듬 단백질 PERIOD에 영향을 미친다는 결론을 뒷받침한다. ^[40,41]

본 연구 결과를 통해서, 2가지 lysine site인 1117과 1118 site를 동시에 치환이 된 PERIOD 단백질에서, 낮 시간대에는 PERIOD 양이 감소하고 시간이 지남에 따라 밤이 되었을 때 증가 하던 control의 초파리와는 다르게, 전 시간대에 높은 농도를 유지하는 모습을 확인할 수가 있었다.[그림 6] 즉, 1117과 1118의 잔기가 PERIOD의 분해에 직접적으로 관여하는 site임을 확인이 가능했고, 이 2가지 site가 E3 유비퀴틴 ligase로서의 유비퀴틴 site임을 확인할 수가 있었다. 이와 비슷한 예로, *Arabidopsis* 식물에서도 lysine 잔기가 치환이 되었을 때, 유비퀴틴화가 되지 않는다는 것을 연구를 통해 밝혀졌다. 이 식물에서의 생체리듬 단백질인 AtACS7은 lysine 285 와 lysine 286 사이트가 주 유비퀴틴화 사이트이다. 이 사이트가 각각 돌연변이가 된다면, 생체리듬 단백질 AtACS7의 분해가 저해된다는 사실을 밝혔다.^[38] 또한, 포유류에서도 CUL4-DDB1-CDT2 E3 ligase가 CRYPTOCHROME1의 단백질의 lysine 585 사이트에 유비퀴틴화를 하는데, 이 사이트가 돌연변이가 되면 CUL4-DDB1-CDT2 E3 ligase는 유비퀴틴화를 진행하지 않는다는 사실 또한 밝혀졌다. ^[39] 이번 연구 결과를 통해서 초파리의 유비퀴틴화 사이트 발견은 큰 의의를 가짐과 동시에 앞으로의 유비퀴틴화 및 생체 리듬 연구에 있어서 새로운 이정표를 제시할 것이다.

최종적으로, PERIOD의 안정성에 영향을 미치면서 분해와 연관이 있는 USP14 생체리듬에 직접적인 영향을 주고 그 사실을 기반으로 초파리의 전체적인 생리학에 영향을 끼친다는 것을 결론 지을 수 있다. 이를 통해서, 생체 리듬이 무너짐으로 인해 사람들에게 대한 질병을 가지고 어려움을 겪는 사람들에게 연구 결과를 통해서 PERIOD 단백질을 회복시키고, 생체 리듬을 복귀 시키는 과정을 통해서 알맞은 치료제나 해결 방법을 제시할 것으로 사료된다.

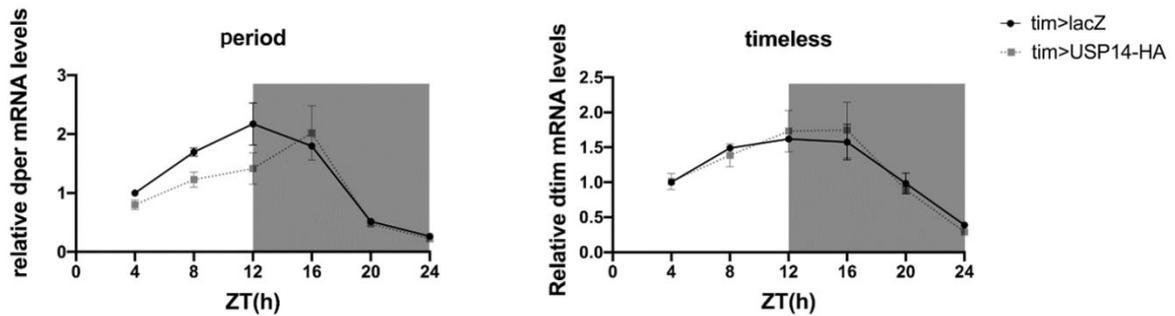
그림1. USP14을 과 발현시킨 초파리와 대조군에서의 생체리듬 단백질 western blot 결과



A) USP14을 과 발현시켰을 때 시간대 별로 생체리듬 단백질의 양을 확인하기 위해서 4일간 12L:12D 아래의 조건에서 훈련된 대조군과 USP14을 과 발현한 초파리를 시간대 별로 모았다. 그리고 각 초파리의 두부를 각각 모아 웨스턴 블롯을 진행하였고 생체리듬 단백질인 PERIOD와 TIMELESS의 양을 확인했다.

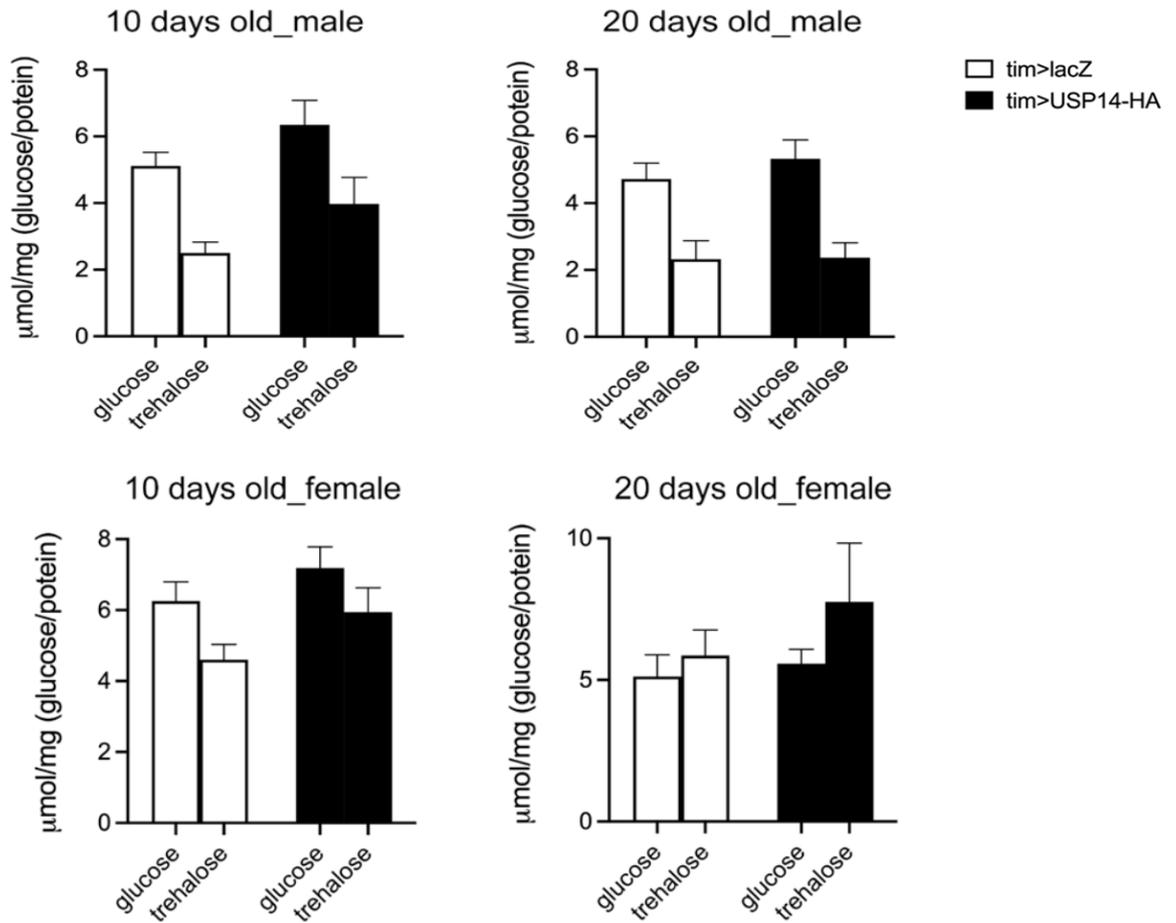
B) Loading control로 사용한 항체는 a-tubulin이고, 이를 기준으로 각각 PERIOD와 TIMELESS를 상대수치화 하였다. 모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표기하였으며, P-value는 Student t-test를 이용해 구했으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$ 은 각각, *, **를 나타낸다.

그림2. USP14을 과 발현시킨 초파리와 대조군에서의 mRNA 단계에서의 PERIOD와 TIMELESS의 양 변화



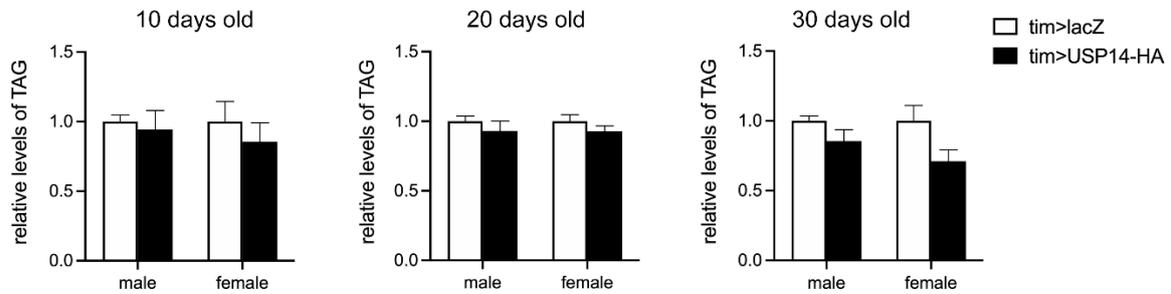
USP14이 생체리듬 단백질의 전사단계에서도 영향을 미치는지 확인하기 위해서, 4일간 12L:12D 아래의 조건에서 훈련된 대조군과 USP14을 과 발현한 초파리를 각각 mRNA를 추출해 CT값을 측정하였고, loading control인 rp49의 농도로 상대화 하여 수치를 도출했다.

그림 3. USP14을 과 발현시킨 초파리와 control 군 초파리 간의 체내 glucose량 비교



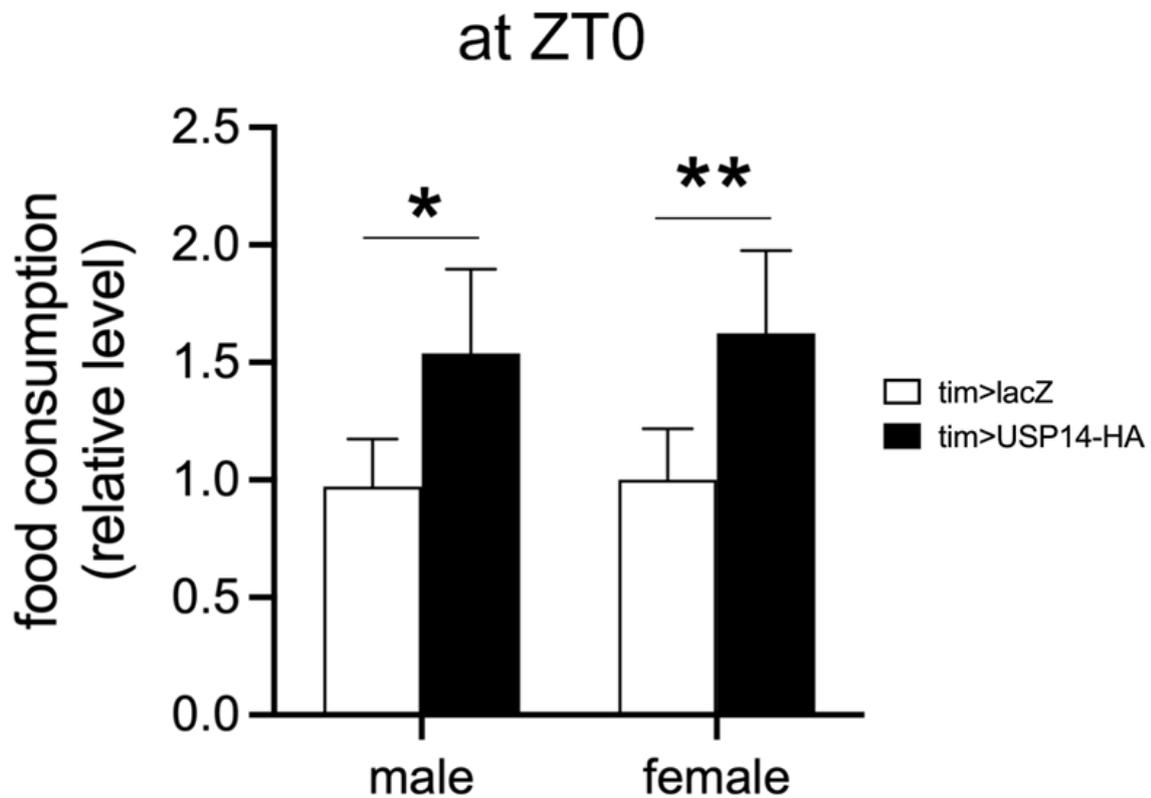
USP14이 체내 glucose량에 미치는 영향을 확인하기 위해서, 12L:12D 아래의 조건에서 훈련된 대조군과 USP14을 과 발현한 초파리를 성별로 구별한 뒤, 10일과 20일 후 hemolymph를 각각 추출해, 체내 glucose양과 trehalose양을 비교를 했다. 각각의 수치는 체내 단백질 양을 측정해 normalization을 실시했다.

그림 4. USP14을 과 발현시킨 초파리와 control 군 초파리 간의 체내 TAG량 비교



USP14이 체내 TAG량에 미치는 영향을 확인하기 위해서, 12L:12D 아래의 조건에서 훈련된 대조군과 USP14을 과 발현한 초파리를 성별로 구별한 뒤, 10일과 20일, 30일 후 hemolymph를 각각 추출해, 체내 TAG양을 확인했다. 각각의 수치는 체내 단백질 양을 측정해 normalization을 실시했다.

그림 5. USP14을 과 발현시킨 초파리 내에서의 Food consumption



USP14이 초파리의 음식 섭취량에 미치는 영향을 확인하기 위해서, 12L:12D 아래의 조건에서 훈련된 대조군과 USP14을 과 발현한 초파리를 성별로 구별한 뒤, ZT 0의 초파리를 파랑 염료가 포함된 음식을 사용하여 섭취량을 O.D값을 통해 비교하였고 대조군의 음식 섭취량을 기준으로 상대 수치화 하였다. 모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표기하였으며, P-value는 student t-test를 이용해 구했으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$ 은 각각, *, **를 나타낸다.

그림 6. USP14을 과 발현시킨 초파리와 control 군의 life span 변화

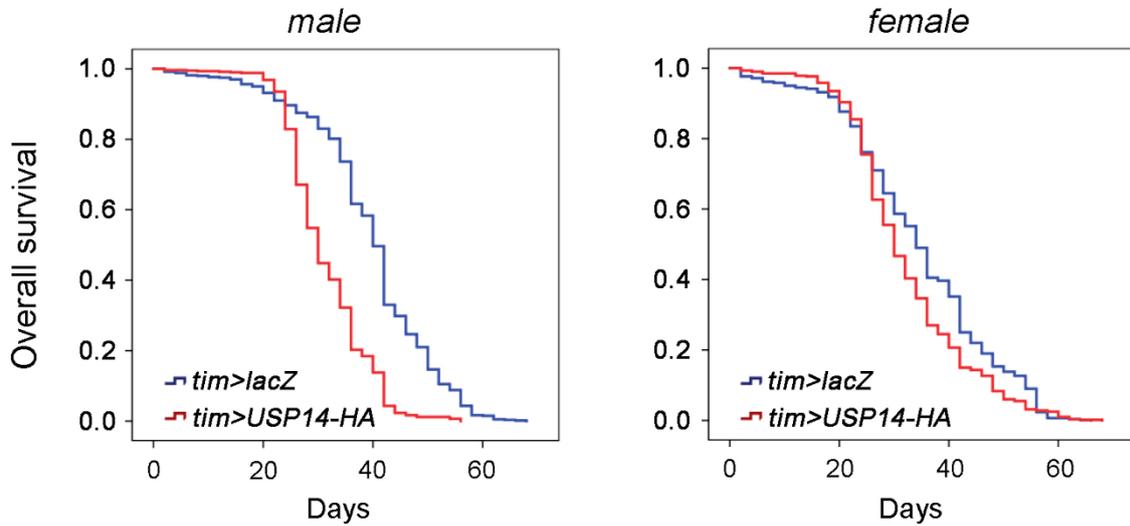
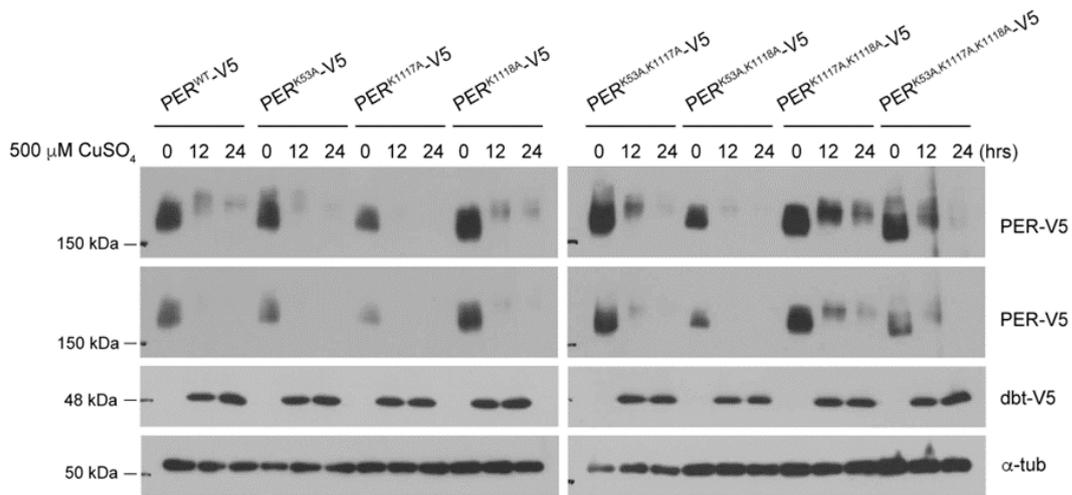


Table1. Summary of changes in lifespan and their statistical significance in adult files

gender	genotype	Mean LS	Median LS	n	% decrease of Median LS	Log-Rank		Cox Proportional Hazard Analysis		
						Chi Square	P Value	HR	P Value	95% CI
male	<i>tim>lacZ</i>	39.6	40	600		284.9	<0.0001	0.39	<0.0001	[0.343, 0.438]
	<i>tim>USP14-HA</i>	31.4	30	602	25.0					
female	<i>tim>lacZ</i>	34.8	34	600		20.215	<0.0001	0.79	<0.0001	[0.700, 0.880]
	<i>tim>USP14-HA</i>	32.2	30	600	11.8					

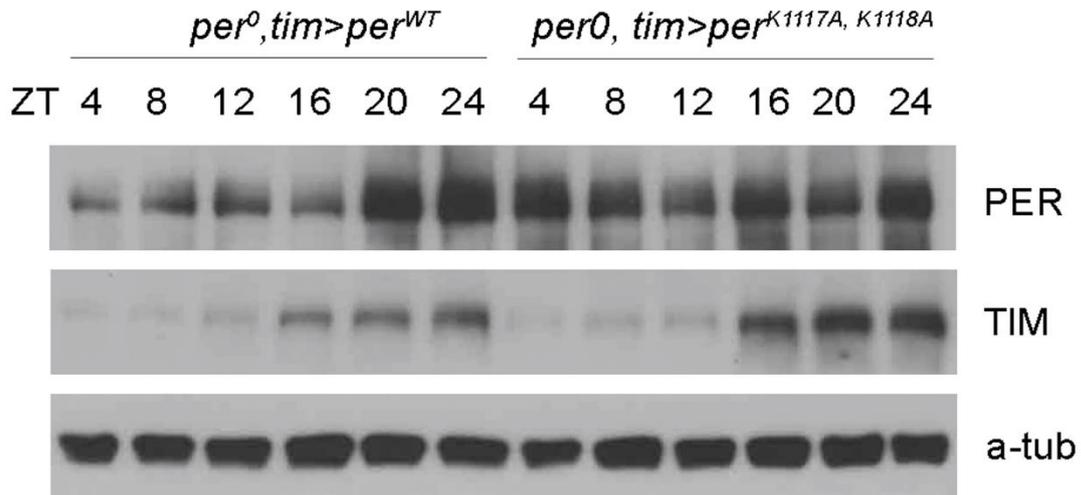
USP14을 과 발현시켰을 때 PERIOD 단백질 양 변화가 초파리의 수명에 미치는 변화를 확인하기 위해서, USP14을 과 발현시킨 초파리의 대조군의 초파리를 성별 별로 구별한 뒤, chamber에 각각 넣은 후 2일마다 죽은 초파리 마리 수를 확인했다. 분석 프로그램은 IBM SPSS Statistics 27을 사용했고 생존율 데이터를 Cox 회귀모형을 통해 분석했다. Table 1을 통해 자세한 통계자료를 제시한다.

그림 7. PERIOD의 유비퀴틴화에 영향을 미치는 site 확인



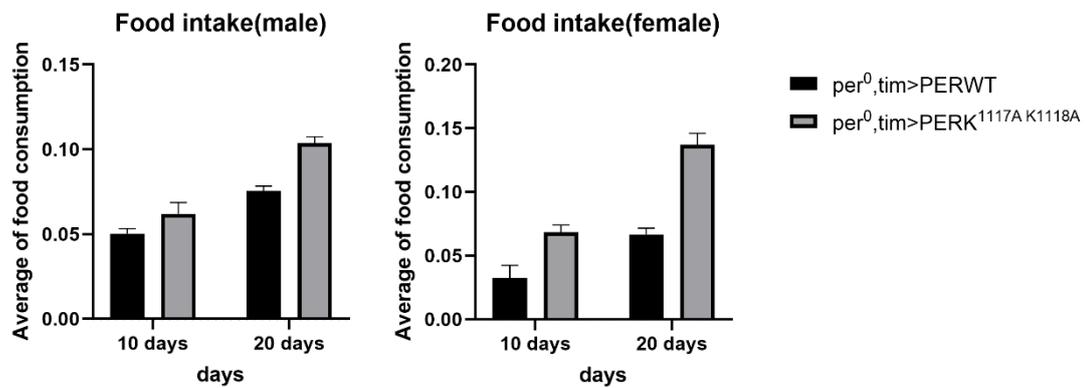
PERIOD 단백질의 유비퀴틴화에 영향을 미치는 site를 확인하기 위해서, ZT 20의 초파리의 두부를 모아 Post-Transcriptional Modification을 통해 3가지의 후보 site를 확인할 수 있었다. 그리고 후보로 나온 3가지 사이트 중, PERIOD의 안정성에 영향이 있는 사이트를 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 진행하였다.

그림 8. PERIOD의 유비퀴틴화에 영향을 미치는 site를 치환한 초파리 내에서의 생체리듬 단백질 확인



PERIOD의 유비퀴틴화에 영향이 있다고 결론 내어진 2가지 사이트를 치환 했을 때, 체내의 생체리듬 단백질 변화량 추이를 확인하기 위해서, 12L:12D 아래의 조건에서 훈련된 대조군과 PERIOD 단백질의 1117과 1118 site를 mutation 시킨 초파리의 두부를 모아 웨스턴 블롯을 진행했다. Loading control로 a-tubulin을 사용했다.

그림 9. PERIOD의 잔기를 치환시킨 초파리의 food consumption 비교



PERIOD의 잔기를 mutation 시켰을 때 초파리의 식습관 변화량을 확인하기 위해서 12L:12D 아래의 조건에서 훈련된 대조군과 PERIOD 유비퀴틴 사이트를 치환한 초파리들을 성별로 구별한 뒤, ZT 0의 초파리를 파랑염료가 포함된 음식을 사용하여 섭취량을 O.D값을 통해 비교하였고 대조군의 음식 섭취량을 기준으로 상대 수치화 하였다. .

참고문헌 목록

- [1] Reddy S, Reddy V, Sharma S. Physiology, Circadian Rhythm. [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519507/>
- [2] Duffy JF, Czeisler CA. Effect of Light on Human Circadian Physiology. *Sleep Med Clin*. 2009 Jun;4(2):165-177. doi: 10.1016/j.jsmc.2009.01.004. PMID: 20161220; PMCID: PMC2717723.
- [3] Weaver DR. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *J Biol Rhythms*. 1998 Apr;13(2):100-12. doi: 10.1177/074873098128999952. PMID: 9554572.
- [4] Allada R, Chung BY. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:605-24. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135815. PMID: 20148690; PMCID: PMC2887282.
- [5] Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*. 2013;(217):3-27. doi: 10.1007/978-3-642-25950-0_1. PMID: 23604473; PMCID: PMC3762864.
- [6] Fagiani, F., Di Marino, D., Romagnoli, A. *et al*. Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 7, 41 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00899-y>
- [7] Cai YD, Chiu JC. Timeless in animal circadian clocks and beyond. *FEBS J*. 2022

Nov;289(21):6559-6575. doi: 10.1111/febs.16253. Epub 2021 Nov 18. PMID: 34699674;
PMCID: PMC9038958.

[8] Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health*. 2001;25(2):85-93. PMID: 11584554; PMCID: PMC6707128.

[9] Rana, S., Mahmood, S. Circadian rhythm and its role in malignancy. *J Circad Rhythms* 8, 3 (2010). <https://doi.org/10.1186/1740-3391-8-3>

[10] Saini, R., Jaskolski, M. & Davis, S.J. Circadian oscillator proteins across the kingdoms of life: structural aspects. *BMC Biol* 17, 13 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0623-3>

[11] *J Korean Sleep Res Soc*. 2009;6(2): 63 :63-68.

Publication Date (Web): 2009 December 31 (Review Article)

doi:<https://doi.org/10.13078/jksrs09013>

[12] *Endocrinology and Metabolism* 2010;25(4):249-

257 DOI: <https://doi.org/10.3803/EnM.2010.25.4.249>

Published online: December 1, 2010

[13] Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 1999 Jan 22;96(2):271-90. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80566-8. PMID: 9988221.

[14] Kuczenski RS, Hong KC, García-Ojalvo J, Lee KH. PERIOD-TIMELESS interval timer may require an additional feedback loop. *PLoS Comput Biol*. 2007 Aug;3(8):e154. doi: 10.1371/journal.pcbi.0030154. PMID: 17676950; PMCID: PMC1937016.

[15] Grima B, Lamouroux A, Chelot E, Papin C, Limbourg-Bouchon B, Rouyer F. The F-box protein slimb controls the levels of clock proteins period and timeless. *Nature*. 2002;420(6912):178-82. Epub 2002/11/15. doi: 10.1038/nature01122. PubMed PMID: 12432393.

[16] Komander, D., Clague, M. & Urbé, S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 550–563 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrm2731>

[17] Wang F, Ning S, Yu B, Wang Y. USP14: Structure, Function, and Target Inhibition. *Front Pharmacol*. 2022 Jan 5;12:801328. doi: 10.3389/fphar.2021.801328. PMID: 35069211; PMCID: PMC8766727.

[18] Harrigan J. A., Jacq X., Martin N. M., Jackson S. P. (2018). Deubiquitylating Enzymes and Drug Discovery: Emerging Opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 57–78. 10.1038/nrd.2017.152.l

[19] Reyes-Turcu F. E., Ventii K. H., Wilkinson K. D. (2009). Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-specific Deubiquitinating Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 363–397. 10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526.

[20] Kessler B. M., Edelman M. J. (2011). PTMs in Conversation: Activity and Function of Deubiquitinating Enzymes Regulated via post-translational Modifications. *Cell Biochem Biophys* 60, 21–38. 10.1007/s12013-011-9176-6.l

[21] Storch KF, Weitz CJ. Daily rhythms of food-anticipatory behavioral activity do not require the known circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 21;106(16):6808-13. doi: 10.1073/pnas.0902063106. Epub 2009 Apr 6. PMID: 19366674; PMCID:

PMC2666092.

[22] Takasu NN, Kurosawa G, Tokuda IT, Mochizuki A, Todo T, Nakamura W. Circadian regulation of food-anticipatory activity in molecular clock-deficient mice. PLoS One. 2012;7(11):e48892. doi: 10.1371/journal.pone.0048892. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23145013; PMCID: PMC3492221.

[23] 원근희. (2021). 암의 생물학과 일주기 리듬의 교란. *생물치료정신의학*, 27(3), 145-155.

[24] Kidd, P. (2015). Dynamics Of The Circadian Rhythm In *Drosophila Melanogaster*.

[25] Sandipan Ray *et al.* Circadian rhythms in the absence of the clock gene *Bmal1*. *Science* 367,800-806(2020).DOI:10.1126/science.aaw7365

[26] He Q, Cheng P, Yang Y, He Q, Yu H, Liu Y. FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation. *EMBO J*. 2003 Sep 1;22(17):4421-30. doi: 10.1093/emboj/cdg425. PMID: 12941694; PMCID: PMC202367.

[27] Broughton SJ, Piper MD, Ikeya T, Bass TM, Jacobson J, Drieger Y, et al. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(8):3105-10. Epub 2005/02/15. doi: 10.1073/pnas.0405775102. PubMed PMID: 15708981; PubMed Central PMCID: PMC549445.

[28] Brand, A.H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118 2, 401-15 .

[29] Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:551-77. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135919. PMID: 20148688; PMCID: PMC3758475.

[30] Hastings, M.H., Maywood, E.S. & Brancaccio, M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Rev Neurosci* 19, 453–469 (2018).

<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0026-z>

[31] Yoo SH, Mohawk JA, Sieppka SM, Shan Y, Huh SK, Hong HK, Kornblum I, Kumar V, Koike N, Xu M, Nussbaum J, Liu X, Chen Z, Chen ZJ, Green CB, Takahashi JS. Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm. *Cell*. 2013 Feb 28;152(5):1091-105. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.055. PMID: 23452855; PMCID: PMC3694781.

[32] Ko HW, Jiang J, Edery I. Role for Slimb in the degradation of *Drosophila* Period protein phosphorylated by Doubletime. *Nature*. 2002 Dec 12;420(6916):673-8. doi: 10.1038/nature01272. Epub 2002 Nov 20. PMID: 12442174.

[33] del Valle Rodríguez, A., Didiano, D. & Desplan, C. Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nat Methods* 9, 47–55 (2012).

<https://doi.org/10.1038/nmeth.1800>

[34] Zhang H, Zhou Z, Guo J. The Function, Regulation, and Mechanism of Protein Turnover in Circadian Systems in *Neurospora* and Other Species. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(5):2574. <https://doi.org/10.3390/ijms25052574>

[35] Honma, S. The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm. *J Physiol Sci* 68, 207–219 (2018).

<https://doi.org/10.1007/s12576-018-0597-5>

[36] Fagiani, F., Di Marino, D., Romagnoli, A. *et al.* Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 7, 41

(2022). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00899-y>

[37] Chan K, Wong FS and Pearson JA (2022) Circadian rhythms and pancreas physiology: A review. *Front. Endocrinol.* 13:920261. doi: 10.3389/fendo.2022.920261

[38] Tang X, Liu R, Mei Y, Wang D, He K, Wang NN. Identification of Key Ubiquitination Sites Involved in the Proteasomal Degradation of AtACS7 in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(5):2931. <https://doi.org/10.3390/ijms25052931>

[39] Tong X, Zhang D, Guha A, Arthurs B, Cazares V, Gupta N, Yin L. CUL4-DDB1-CDT2 E3 Ligase Regulates the Molecular Clock Activity by Promoting Ubiquitination-Dependent Degradation of the Mammalian CRY1. *PLoS One*. 2015 Oct 2;10(10):e0139725. doi: 10.1371/journal.pone.0139725. PMID: 26431207; PMCID: PMC4592254.

[40] Srikanta, S. B. and Cermakian, N. (2020). To ub or not to ub: regulation of circadian clocks by ubiquitination and deubiquitination. *Journal of Neurochemistry*, 157(1), 11-30. <https://doi.org/10.1111/jnc.15132>

[41] D'Alessandro M, Beesley S, Kim JK, Chen R, Abich E, Cheng W, Yi P, Takahashi JS, Lee C. A tunable artificial circadian clock in clock-defective mice. *Nat Commun*. 2015 Nov 30;6:8587. doi: 10.1038/ncomms9587. PMID: 26617050; PMCID: PMC4674671.

영문요약

Circadian rhythms refer to physiological, biochemical, and behavioral changes that occur on an approximately 24-hour cycle. Through these rhythms, organisms appropriately regulate various physiological activities within the body via neurological and hormonal control. Disruptions to these circadian rhythms can harm health, leading to sleep disorders, irregular eating habits, and increasing susceptibility to serious illnesses, as previous studies have demonstrated.

In this study, we aimed to discover and functionally evaluate factors contributing to the stability of circadian rhythm proteins, PERIOD and TIMELESS, and to identify the ubiquitin sites involved in the degradation of these proteins. The key factor introduced here is the deubiquitinase enzyme, Ubiquitin-specific peptidase 14 (USP14), and we will explain the functional assessment of USP14.

In *Drosophila*, overexpressing the deubiquitinase USP14, we observed that the protein levels of the circadian rhythm protein PERIOD decreased, while the mRNA levels showed no significant change. Additionally, physiological changes were noted in *Drosophila* overexpressing USP14, including increased food intake and a shorter lifespan compared to the control group.

Previous studies have elucidated much about the mechanisms of circadian rhythms and the synthesis and degradation of related proteins, but the

ubiquitination sites of the PERIOD protein have not been clearly identified.

Through protein mass spectrometry, we identified lysine 1117 and lysine 1118 on the circadian rhythm protein PERIOD as contributing to its stability. When these two sites were substituted with another amino acid, alanine, the PERIOD protein lost its rhythmic oscillation observed in the control group, accumulated without degradation during daytime, and increased food intake.

In conclusion, this study identifies USP14 as a novel factor affecting the degradation of the PERIOD protein, confirming that USP14 plays a critical role in the stability of PERIOD protein within the organism. This research makes a significant contribution to the study of circadian rhythms and related diseases and provides important insights for physiological research across various organisms.