

조기 난소 부전증 유발 관련 단백질인 FOXL2의 새로운 결합 단백질 UBE2I의 발견

박미라¹ · 정현숙¹ · 김현리¹ · Margareta D. Pisarska² · 하혜정³ · 이강석³ · 배지현^{1,*} · 고정재^{1,*}

¹포천중문의과대학교 생명과학전문대학원

²David Geffen 의과대학교 산부인과, UCLA, 로스앤젤레스

³중앙대학교 생명과학과

Discovery of UBE2I as a Novel Binding Protein of a Premature Ovarian Failure-Related Protein, FOXL2

Mira Park¹, Hyun Sook Jung¹, Hyun-Lee Kim¹, Margareta D. Pisarska², Hye-Jeong Ha³,
Kangseok Lee³, Jeehyeon Bae^{1,*} and Jeong-Jae Ko^{1,*}

¹Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University, Seongnam 463-836, Korea

²Dept. of Obstetrics and Gynecology, David Geffen School of Medicine, UCLA, Los Angeles, CA 90095-1740, USA

³Dept. of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

ABSTRACT : BPES (Blepharophimosis/Ptosis/Epicanthus inversus Syndrome) is an autosomal dominant disorder caused by mutations in FOXL2. Affected individuals have premature ovarian failure (POF) in addition to small palpebral fissures, drooping eyelids, and broad nasal bridge. FOXL2 is a member of the forkhead family transcription factors. In FOXL2-deficient ovaries, granulosa cell differentiation does not progress, leading to arrest of folliculogenesis and oocytes atresia. Using yeast two-hybrid screening of rat ovarian cDNA library with FOXL2 as bait, we found that small ubiquitin-related modifier (SUMO)-conjugating E2 enzyme UBE2I protein interacted with FOXL2 protein. UBE2I also known as UBC9 is an essential protein for processing SUMO modification. Sumoylation is a form of post-translational modification involved in diverse signaling pathways including the regulation of transcriptional activities of many transcriptional factors. In the present study, we confirmed the protein-protein interaction between FOXL2 and UBE2I in human cells, 293T, by *in vivo* immunoprecipitation. In addition, we generated truncated FOXL2 mutants and identified the region of FOXL2 required for its association with UBE2I using yeast-two hybrid system. Therefore, the identification of UBE2I as an interacting protein of FOXL2 further suggests a presence of novel regulatory mechanism of FOXL2 by sumoylation.

Key words : FOXL2, UBE2I, UBC9, BPES, Premature ovarian failure, Sumoylation.

요 약 : BPES(Blepharophimosis/Ptosis/Epicanthus inversus Syndrome)는 FOXL2 유전자의 돌연변이에 의해 유발되는 상염색체 우성질환이다. 눈꺼풀이 갈라지거나 처지고 넓은 미간이 나타나는 특징이 있으며, 여성의 조기 난소 부전증(premature ovarian failure, POF)을 일으켜 불임을 유발한다. FOXL2는 forkhead family에 속하는 전사인자로서 FOXL2가 결여된 난소에서는 granulosa cell의 분화가 진행되지 않아 난포 성숙과정의 멈춤과 난자의 폐쇄증을 유발한다. FOXL2를 bait로 하여 rat의 난소 cDNA 라이브러리의 yeast two-hybrid screening을 시행하여 FOXL2 단백질과 상호작용을 하는 small

ubiquitin-related modifier(SUMO)-conjugating E2 효소인 UBE2I 단백질을 찾았다. UBC9이라고도 알려진 UBE2I 단백질은 SUMO 변형 과정을 위한 필수적인 단백질이다. Sumoylation은 수 많은 전사인자의 전사능력의 조절을 포함하여 다양한 신호전달체계에 관여하는 번역 후 변형

* 교신저자: 고정재, 경기도 성남시 분당구 야탑동 222번지, (우) 463-836, (전) +82-31-780-4811, (팩) +82-31-725-8350, E-mail: highko@cha.ac.kr
배지현, 경기도 성남시 분당구 야탑동 222번지, (우) 463-836, (전) +82-31-725-8396, (팩) +82-31-725-8350, E-mail: jeehyeon@cha.ac.kr

과정이다. 본 연구에서 인간세포인 293T 내에서 번역집전반응 실험을 통해 FOXL2와 UBE2I의 단백질-단백질간의 상호작용을 확인하고, FOXL2의 돌연변이형을 제작하여 yeast two-hybrid system을 이용해 UBE2I와 결합에 필요한 FOXL2의 부분을 규명하였다. 따라서, FOX2에 상호작용하는 UBE2I의 규명은 sumoylation에 의한 FOXL2의 새로운 조절 메커니즘을 시사한다.

서 론

FOXL2는 1998년에 최초로 확인된 forkhead family 전사인자이며 정상적인 난소 발육에 필수적인 단백질이다. Blepharophimosis-Ptosis-Epicanthus inversus Syndrome(BPES)는 눈꺼풀 처짐과 여성의 조기 난소 부전증을 유발하는 상염색체 우성의 유전병으로서 돌연변이된 FOXL2 유전자를 가진 사람에게서 나타난다(Uhlenhaut & Treier, 2006). 조기 난소 부전증은 1967년 Moraes-Ruehsen와 Jones에 의해 정의되었으며(Schoemaker et al., 1997), 40세 이전의 여성에게서 무월경, 여성호르몬의 저하를 보이는 질병이며(김정옥 등, 2000), 40세 이전의 여성에서 약 1%의 빈도로 나타난다(Schoemaker et al., 1997). BPES는 FOXL2 단백질의 heterozygous한 돌연변이에 유발되어지는 질병으로 type I과 type II로 분류된다. BPES type I의 경우, 눈꺼풀의 변형이 일어나고 조기 난소 부전증이 나타난다. BPES type II의 경우 조기 난소 부전증은 유발되지 않으며 눈꺼풀의 이상 증후만 보인다(Beysen et al., 2004). FOXL2를 결여시킨 마우스 모델 실험에 의하면, FOXL2가 결여된 난소에서는 granulosa cell이 정상적으로 분화하지 못하여 난포 성숙과정의 멈춤과 난자의 폐쇄증(atresia)을 유발하여(Pannetier et al., 2006; Uda et al., 2004) 결국엔 불임에 이른다. 하지만 현재까지 난소의 발달과정에서의 FOXL2에 대한 연구와 이해가 부족한 실상이다.

FOX(Forkhead box) family 전사인자는 helix-turn-helix 구조를 가진 최대 110 아미노산의 공통된 DNA 결합 도메인을 가지며, “winged helix”라고도 불린다(Uhlenhaut & Treier, 2006). 인간의 경우, 39개의 forkhead family로 구성되어 있으며, 이것은 생물학적인 과정에서 다양한 영향을 미친다. 예를 들면, forkhead 단백질은 신체의 축의 확립이나 생선선으로부터의 발달과정, 세포 주기 조절뿐 아니라 대사과정 등 여러 가지 과정에서 중요한 전사인자이다(Uhlenhaut & Treier, 2006). 진화적으로 보존된 서열을 가지는 인간과 쥐의 FOXL2 DNA 서열은 95% 이상의 상동성을 가진다(Beysen et al., 2004).

FOXL2는 난소발달에 대한 마커 중 하나이기 때문에 FOXL2의 타겟 단백질에 대한 연구는 난소의 발달과 기능 연구에 적합하다. 최근, FOXL2가 granulosa cell 분화 마커인 StAR의 전사활성을 억제한다고 보고되었다(Pisarska et al., 2004). FOXL2가 돌연변이될 경우, StAR에 대한 전사억제 능력은 낮아지며 granulosa cell의 분화가 급격히 증가되어 난포의 조기 소진을 유도하고, 결국 조기 난소 부전증을 유발한다고 예측할 수 있다. FOXL2는 granulosa cell의 조기 성숙 분화를 억제함으로써, 원시난포의 개수를 조절하고 조기 난소 부전증의 발병을 막아준다(Pisarska et al., 2004). 이는 FOXL2가 steroidogenesis의 조절에 중요한 역할을 한다는 사실을 뒷받침하고 있다.

Sumoylation은 SUMO(small ubiquitin-related modifier) 단백질이 그들의 기질에 비공유적으로 결합하여 일어나는 번역 후 변형 과정이다(Dohmen, 2004). Ubiquitin-related protein SUMO-1은 RanGAP1의 공유적인 변형과정으로서 포유동물 세포에서 핵으로의 이동에 대한 연구를 통해 발견되었다. 1996년 발견 이후로, 종양억제 유전자 p53, c-Jun, PML 등과 같은 생물학적으로 중요한 인자를 포함하여 다양한 단백질을 타겟으로 하고 있기 때문에 많은 연구가 진행되어 오고 있다(Dohmen, 2004). Sumoylation은 ubiquitination과 같이 ATP 의존과정이며, SUMO-activating E1 효소 AOAI/UBA2와 SUMO-conjugating E2 효소 UBE2I가 요구되며, 직접적으로 SUMO 단백질의 이동을 촉매한다. UBE2I는 UBC9이라고도 알려져 있으며, SUMO 단백질을 그들의 타겟 단백질로 이동시킨다(Ihara et al., 2008). 이때 UBE2I 단백질은 타겟 단백질의 lysine 잔기 내의 특정한 서열(Ψ KXE)을 인지하여 SUMO 단백질을 타겟 단백질로 이동시킨다(Ankar & Sistonen, 2007). 이렇듯 UBE2I 단백질은 SUMO의 일부분을 타겟으로의 이동을 촉매시키는 것뿐 아니라, 변형이 일어나야 하는 정확한 위치를 인식하는 데에도 중요한 역할을 한다. 이동된 SUMO 단백질은 E2 효소와 E3 ligase에 의해 isopeptide 결합을 형성하며 기질에 결합하게 된다(Ankar & Sistonen, 2007).

본 연구를 통하여 이제껏 알려지지 않았던 UBE2I 단백질이 FOXL2 단백질과 상호작용을 한다는 새로운 사실을 발견하고, UBE2I와 FOXL2 단백질 간의 상호작용에 필요한 결합 도메인을 규명하였다.

재료 및 방법

1. 프라이머 제작 및 클로닝

알려진 FOXL2 유전자 서열(NCBI, USA)에 맞는 프라이머를 제작하여 클로닝을 수행하였다(Table 1). pcDNA3 FOXL2 (Pisarska et al., 2004)를 주형으로 하여 95°C에서 5분간 변성과정을 거친 후 95°C에서 5분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 동안 총 30 사이클의 PCR 반응을 거친 후 마지막으로 72°C에서 여분의 신장반응을 하여 FOXL2 유전자를 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 가지고 와일드 형은 BamHI/XhoI 효소를 이용하고, 돌연변이 형은 HindIII/BamHI 효소를 이용하여 pcDNA3 벡터(Invitrogen, Calsbad, CA, USA)와 ligation 과정을 거쳐 DH5 α competent 세포에 형질 전환을 하였다. 또, yeast two-hybrid assay를 위해 pGBT9 FOXL2 (Lee et al., 2005)를 주형으로 하여 증폭된 FOXL2 와일드 형과 돌연변이 형의 PCR 산물을 GAL4-binding domain (BD)을 가진 pGBT9 벡터(Clontech, Mountain View, CA, USA)와 ligation 과정을 거쳐 DH5 α competent 세포에 형

질 전환시켜 클로닝하였다. UBE2I 역시 NCBI 데이터베이스를 기반으로 하여 HA tag를 포함한 프라이머를 제작하였다(Table 1). PCR 산물을 BamHI/EcoRI 효소를 이용하여 각각 pcDNA3 벡터(Invitrogen)와 GAL4-activating domain(AD)을 가진 pACT2 벡터(Clontech)에 ligation 과정을 거쳐 DH5 α competent 세포에 형질 전환시켜 클로닝하였다.

2. Yeast Two-Hybrid Screening

인간의 FOXL2 유전자의 open-reading frame 서열을 pGBT9 벡터에 클로닝하였다. 이 플라스미드를 이용하여 rat에 PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 처리하여 얻은 GAL4-activation domain(AD)-tagged ovarian fusion cDNA 라이브러리로부터 만들어진 150만 개의 형질전환체와의 스크리닝을 통해 FOXL2와 상호작용을 하는 단백질을 찾게 되었다. AH109 yeast competent 세포를 이용하여 pGBT9 FOXL2와 난소의 cDNA 라이브러리로부터 얻은 cDNA를 형질전환시켜 tryptophan, leucine, histidine이 결여되고 15 mM 3-amino-1,2,4-triazole(Sigma)을 첨가한 한천 배지에서 콜로니를 선택하였다. 플라스미드는 KC18 *Escherichia coli* 세포를 통해 positive한 콜로니에서 분리하였으며 염기서열 분석을 진행하였다.

3. Yeast Two-Hybrid Assay

Table 1. Primer sequences used to construct respective plasmids

Plasmids	Forward primer	Reverse primer
pcDNA3 FOXL2 wild type	AGTGGATCCATGGACTACAAAGACGACGACG ACAAAGCCAGCTACCCCGAGCCC	CTACTCGAGTCAGAGATCGAGGCGCGA
pGBT9 FOXL2 wild type	ACGAAGCTTGAATTCATGATGGCCAGCTACCCC	CTAGGATCCTCAGAGATCGAGGCGCGA
pGBT9 FOXL2 mutant 1~52 a.a	ACGAAGCTTGAATTCATGATGGCCAGCTACCCC	CTAGGATCCCTACGCCGGTCCGGCTTCTC
pGBT9 FOXL2 mutant 1~279 a.a	ACGAAGCTTGAATTCATGATGGCCAGCTACCCC	CTAGGATCCCTACGAGTTCACACTACGCCGGG
pGBT9 FOXL2 mutant 1~218 a.a	ACGGAATTCATGGCCAGCTACCCCGAGCCC	CTAGGATCCCTAGCAGGAGGCATAGGGCAT
pGBT9 FOXL2 mutant 218~376 a.a	ACGAAGCTTGAATTCATGCAGATGGCGGCAG CCGCA	CTAGGATCCTCAGAGATCGAGGCGCGA
pcDNA3 HA UBE2I	CTAGGATCCATGTATCCATATGATGTTCCAGA TTATGCTTCGGGGATTGCCCTCAGC	CTAGAATTCATTATGAGGGGGCAAACCT

FOXL2의 서열부분을 pGBT9 yeast 벡터에 클로닝하였다. HA tag 서열을 포함한 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 얻은 UBE2I 서열부분을 pACT2 벡터에 클로닝하였다. AH109 yeast competent 세포에 각각의 DNA 500 ng과 carrier DNA 2 μ l를 넣은 다음 PEG/LiAC solution을 600 μ l 넣었다. 30°C shaking incubator에서 30분 배양시킨 다음 DMSO 70 μ l를 넣어 42°C에서 15분간 배양하였다. 다시 얼음에 2분을 둔 후 TE solution을 70 μ l 넣어 부유시킨 다음 tryptophan과 leucine이 결여된 한천 배지에 도말하였다. 자라난 콜로니를 다시 tryptophan, leucine, histidine이 결여되고 15 mM 3-amino-1,2,4-triazole을 첨가한 한천 배지에 도말하여 pACT2 UBE2I와 pBGT9 FOXL2 와일드 형 및 돌연변이 FOXL2 단백질간의 상호작용을 알아보았다.

4. 세포 주 및 세포배양

배아의 신장세포주인 293T 세포를 사용하였다. 세포 배양액은 DMEM(PAA laboratories, Haidmannweg9, Austria)을 사용하였으며, 10% fetal bovine serum(PAA laboratories, Etobicoke Ontario, Canada), 1% penicillin-streptomycin(Welgene, Daegu, Korea)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 환경 하에서 배양하였다.

5. 면역침전반응(Immunoprecipitation) 및 Western Blot

배아 신장 세포 주 293T를 100 mm 배양접시에 3.5×10⁶개로 분주하여 24시간 후에 pcDNA3 HA-UBE2I와 pcDNA3 FLAG-FOXL2를 각각 3 μ g씩 Welfect-Ex(Welgene)를 이용하여 cotransfection하였다. 24시간 후, 세포를 10% protease inhibitor cocktail(Sigma)이 함유된 Lysis buffer(150 mM NaCl, 10% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl pH 8.0; Sigma) 250 μ l에 모아 4°C에서 한 시간 동안 lysis시켰다. 한 시간 후, 4°C 원심분리기를 이용하여 5,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 한 다음 상층액을 새로운 tube로 옮겨 각 sample에 normal mouse IgG 0.4 μ g(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 또는 normal rabbit IgG 0.4 μ g을 protein G agarose(Upstate, Charlottesville, VA, USA) 30 μ l와 함께 넣어 4°C에서 한 시간 동안 반응시켜 비특이적인 결합을 제거해 주었다. 다음으로 4°C 원심분리기를 이용하여 5,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 후 상층액을 새 tube로 옮긴 후 anti-FOXL2 항체와 anti-HA 항체(Sigma)를 넣고 4°C rotator

를 이용하여 12시간 동안 반응시켰다. 반응 후 다시 4°C 원심분리기를 이용하여 5,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하였다. Lysis buffer 1 ml를 넣어 3회 세척한 다음 20 μ l의 SDS sample buffer(Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 50% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 14.4 mM 2-mercaptoethanol; Sigma)를 넣어 끓인 시료를 SDS가 포함된 30% polyacrylamide gel에서 50 V로 전기영동을 실시하였다. 4시간 정도 전기영동 실시 후 gel을 PVDF membrane (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K)에서 100 V의 전압 하에서 90분 동안 transfer를 실시하였다. Transfer가 끝난 후 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking 과정을 거친 후, 3% skim milk에 anti-HA monoclonal antibody(Sigma)와 anti-FOXL2 antibody를 넣어 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS-Tween 20(Sigma)으로 7분씩 3회 세척 후 anti-goat-mouse IgG-horseradish peroxidase(HRP)와 anti-goat-rabbit IgG-horseradish peroxidase(HRP) 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology)로 1시간 동안 반응시켰다. 그 다음으로 PBS-Tween 20으로 10분씩 3회 세척 후 Luminescence image analyzer(LAS-3000)(Fujifilm Life Science, Stamford, CT, USA)에서 단백질의 발현을 관찰하였다.

결 과

1. Yeast Two-Hybrid Assay를 통한 FOXL2 단백질과 UBE2I 단백질의 상호작용 확인

Rat의 난소 라이브러리를 이용한 yeast two-hybrid screening을 통하여 positive한 콜로니를 선택하여 플라스미드를 분리하고 염기서열 분석 과정을 거쳐 FOXL2 단백질과 SUMO-conjugating E2 효소인 단백질이 상호작용한다는 사실을 발견하였다. FOXL2의 서열부분을 GAL4-binding domain (BD)을 가진 pGBT9 yeast 벡터에, HA tag 서열을 포함한 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 얻은 UBE2I 서열부분을 GAL4-activating domain(AD)을 가진 pACT2 벡터에 클로닝하였다. AH109 세포주의 competent 세포를 사용하여 assay를 진행하였다. 형질전환 과정을 거친 후 tryptophan과 leucine이 결여된 배지에 도말하여 얻은 콜로니를 다시 tryptophan, leucine, histidine이 결여되고 15 mM 3-amino-1,2,4-triazole을 첨가한 한천 배지에 도말하여 pACT2 UBE2I와 pBGT9 FOXL2 와일드 형 단백질의 상호작용 여부를 알아본 결과,

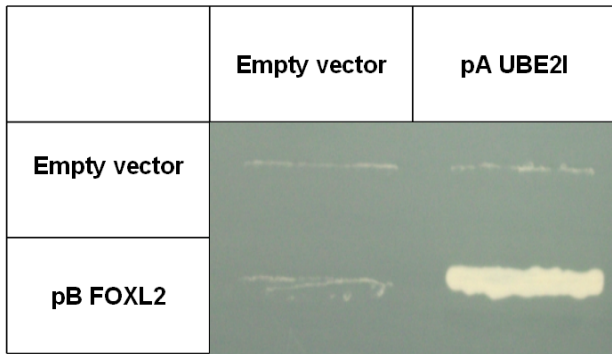


Fig. 1. Identification of UBE2I as a FOXL2-binding protein in yeast. Yeast cells were cultured in selective media lacking tryptophan, leucine, and histidine. Growth was demonstrated in colonies expressing both UBE2I and FOXL2 fused to the GAL4 DNA activation domain and binding domain, respectively. The picture shown is a representative of at least 50 different yeast colonies. No growth of yeast was seen in colonies expressing only FOXL2 or UBE2I.

UBE2I 단백질과 FOXL2 와일드 형 단백질이 서로 상호작용한다는 사실을 발견하였다(Fig. 1).

2. 면역 항체 침전반응을 통한 FOXL2와 UBE2I 단백질의 상호작용 확인

Yeast two-hybrid assay를 통해 확인한 FOXL2와 UBE2I의 상호작용을 면역침전반응 실험을 통하여 다시 확인하였다. *In vivo* 상태에서 UBE2I와 FOXL2 단백질의 상호작용을 확인하기 위해 HA-tagging한 UBE2I와 FLAG-tagging한 FOXL2를 과발현시켜서 면역항체 침전법을 이용하여 상호작용을 확인하였다. Transfection한 유전자가 정상적으로 과발현이 되었는지 Western blot analysis를 통해 anti-FOXL2, anti-HA 항체로 알아본 결과, FOXL2 단백질은 약 55 KDa, UBE2I 단백질은 20 KDa에서 밴드를 확인할 수 있었다. 발현 확인 과정을 거친 후 면역항체 침전법을 시행하였다. Lysate 250 μ g을 사용하여 monoclonal anti-HA 항체의 비특이적인 반응을 normal mouse IgG와 protein G agarose bead를 넣어 1차적을 제거시킨 후 monoclonal anti-HA 항체를 이용하여 면역 침전을 확인한 결과 약 55 KDa의 FOXL2 밴드를 확인할 수 있었다. 그리고 lysate 250 μ g을 사용하여 polyclonal anti-FOXL2 항체의 비특이적인 반응을 normal

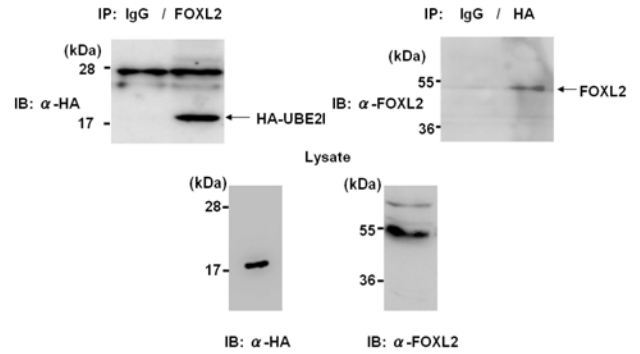


Fig. 2. *In vivo* association of FOXL2 and UBE2I in human cells. 293T cells (3.5×10^6) were transfected with 3 μ g of pcDNA3 Flag-tagged FOXL2, HA-tagged UBE2I, or both and incubated for 24 h. The pre-cleared cell lysates were used for immunoprecipitation (IP) experiments with the anti-FOXL2 or anti-HA antibodies. As controls, normal IgG was used. Following IP, immunoblotting (IB) were performed and the immunoprecipitated proteins were detected with anti-FOXL2 or anti-HA antibodies. Expressions of FOXL2 and HA-UBE2I were determined by Western blot analysis using the cell lysates.

rabbit IgG와 protein G agarose bead를 넣어 1차적으로 제거시킨 후 polyclonal anti-FOXL2 항체를 이용하여 면역 침전을 확인한 결과 20 KDa의 UBE2I 밴드를 확인할 수 있었다. 이로써 인간 세포에서 FOXL2와 UBE2I가 서로 *in vivo* 상호작용하고 있음을 확인하였다(Fig. 2).

3. FOXL2의 돌연변이 Constructs 제작

FOXL2 단백질 내의 어떤 결합 도메인이 UBE2I와의 상호작용에 영향을 미치는지 알아보기 위해 FOXL2 구조적으로 돌연변이 constructs를 제작하였다(Fig. 3A). 서로 다른 길이의 돌연변이 FOXL2 DNA를 PCR을 통해 증폭하여 pGBT9 yeast 벡터에 클로닝하여 pACT2 UBE2I와 yeast two-hybrid assay를 이용하여 두 단백질간의 상호작용이 일어나는지 확인하였다. 그 결과, FOXL2 돌연변이 형 1~52와 FOXL2 돌연변이 형 1~218은 pACT2 UBE2I와의 상호작용을 보이지 않았다. 그러나 FOXL2 돌연변이 형 1~279와 FOXL2 돌연변이 형 218~376은 yeast system 내에서 pACT2 UBE2I와 상호작용 한다는 사실을 발견하였다. 이것을 미루어 보아 FOXL2와 UBE2I가 상호작용하는데 대하여 forkhead 도메인은 영향을 미치지 않으며, C-terminal 부위의

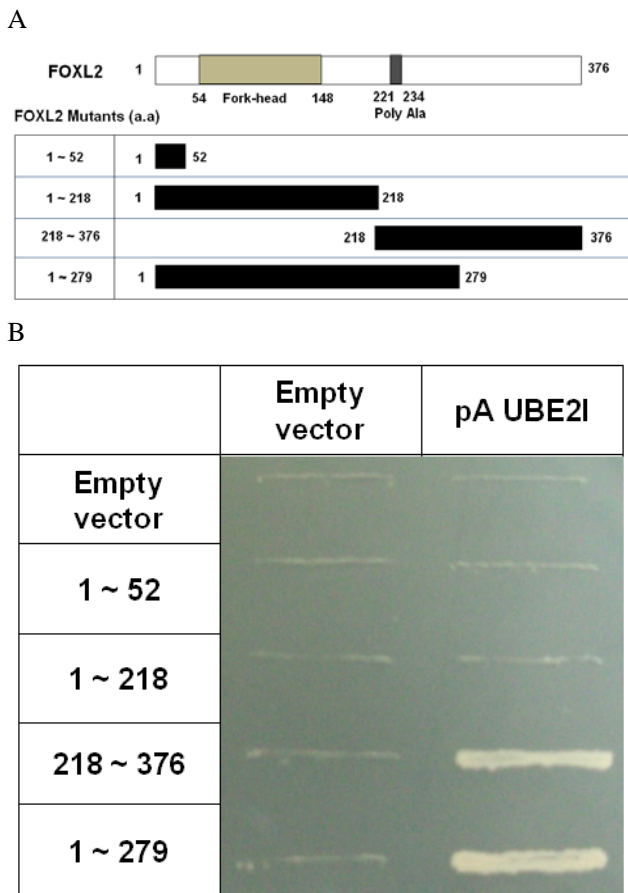


Fig. 3. Diagrammatic representation of truncated FOXL2 mutants and identification of FOXL2 region required for UBE2I binding. A: Different FOXL2 mutants (1~52, 1~218, 218~376, 1~279 a.a) lacking different regions were generated by PCR. B: Yeast cells were cultured in selective media lacking tryptophan, leucine, and histidine. The picture shown is a representative of at least 50 different yeast colonies. No growth of yeast was seen in colonies expressing only FOXL2 mutants or UBE2I.

poly-alanine 지역과 근처의 60개 아미노산 부위가 UBE2I와 FOXL2 단백질의 상호작용에 영향을 미친다고 생각된다 (Fig. 3B).

고찰

Winged helix/forkhead family의 전사인자들은 100개의 아미노산, monomeric DNA-결합 도메인으로 규명화 될 수 있다. DNA-결합 도메인은 helix-helix 모티프의 다양한 형태

로 접히고 큰 루프 또는 “wings”로 규명화 될 수 있다. 그러므로 DNA-결합 도메인 모티프는 winged helix DNA-결합 도메인으로 불린다(Kaestner et al., 2000). Forkhead 인자들은 전사 활성화자 또는 억제자로 알려져 왔는데, 최근 FOX family 멤버들이 그 외의 세포 사멸, 세포 주기, 세포 증식, 세포 분화, 대사 등 여러 가지를 조절하고 있다고 보고되었다 (Lee et al., 2005).

FOXL2 단백질이 BPES에 관련이 있다고 보고된 이후로, FOXL2의 기능을 규명하기 위해 많은 연구가 진행되어 오고 있지만 현재까지 명확하게 알려지지는 않았다. BPES type I은 돌연변이 FOXL2에 의해 유발되며 40세 이전에 폐경 현상을 보이는 질병인 조기 난소 부전증(POF)과 관련 있는 상염색체 우성 질환이다(Schmidt et al., 2003). BPES type I은 조기 난소 부전증과 눈꺼풀 변형의 증상을 가지며 BPES type II는 조기 난소 부전증을 유발하지 않고 눈꺼풀 결함의 증상만을 가진다. 최근 FOXL2 단백질의 돌연변이는 두 타입의 BPES를 유발한다는 연구가 보고되었다. 여성의 경우 BPES는 불임을 유발하지만 남성의 경우 수정능력은 유지되어진다(Schmidt et al., 2003).

Yeast two-hybrid screening을 통해 FOXL2 단백질과 UBE2I와 상호작용한다는 사실을 발견하였고, 이를 재확인하기 위해 yeast two-hybrid assay와 면역 항체침전 실험을 실시하였다. Yeast two-hybrid assay를 통해 와일드 형의 FOXL2를 비롯하여 돌연변이 형의 일부 FOXL2 단백질이 UBE2I 단백질과 상호작용한다는 사실을 발견하였으며, 면역침전항체 실험을 통해 와일드 타입의 FOXL2 단백질이 UBE2I와 상호작용한다는 사실을 재확인하였다. UBE2I는 SUMO-conjugating E2 효소로 알려져 있으며(Ankar & Sistonen, 2007), 포유류와 *S. cerevisiae* 사이에서 ~56%의 상동성을 가진다(Dohmen, 2004).

SUMO family 단백질은 타겟 단백질에 결합하여 구조적으로 기능적으로 변형을 일으킨다(Ankar & Sistonen, 2007). SUMO 변형은 생물내의 염증반응을 포함한 매우 다양한 과정의 조절뿐 아니라 염색체의 분리, 세포의 분화, DNA 복제 및 회복, 단백질의 수송에 중요한 역할을 하고 있다. SUMO 단백질은 타겟 단백질의 특정한 lysine 잔기에 비공유적으로 결합하여 작용하게 되지만 sumoylation은 타겟 단백질의 분해를 유도하는 것이 아니라 같은 lysine 잔기의 ubiquitination을 막아주면서 타겟 단백질의 안정성에 기여한다(Ankar &

Sistonen, 2007).

Sumoylation의 과정 중 활성화 된 SUMO 단백질은 SUMO-activating 효소 UBA2로부터 SUMO-conjugating 효소인 UBE2I로 옮겨지는데, 이때 SUMO 단백질과 UBE2I는 thioester 결합을 형성하게 된다(Dohmen, 2004). UBE2I는 SUMO와 결합하여 SUMO 단백질의 타겟 단백질로의 이동을 도와주는데 타겟 단백질의 sumoylation 인식 서열(Ψ KXE)를 통해 그들의 표면에 결합하게 된다. 타겟 단백질의 sumoylation 예상 motifs는 UBE2I에 간접적이 아닌 직접적으로 UBE2I 단백질 홈에 결합한다(Dohmen, 2004).

대부분의 SUMO 타겟 단백질은 sumoylation에 의해 그들의 전사활성이 조절된다. Sumoylation 변형을 거친 전사인자는 공통적으로 전사능력이 억제되는데, 이것은 부분적으로 본래의 SUMO 단백질이 전사 억제 능력을 가지고 있고, SUMO 단백질이 전사를 억제시키기 충분할 정도로 프로모터 지역에 영향을 미치기 때문이다(Ankar & Sistonen, 2007). 덧붙여 sumoylation은 타겟 단백질의 신호의 도입, 손상된 DNA의 회복, 염색체분리 등 여러 기작을 이끈다. Sp family 중 하나인 전사 인자 Sp3는 sumoylation에 의해 전사 능력이 억제된다(Sapetchnig et al., 2002). 이외에도 안드로겐 수용체나 c-Jun 같은 다른 전사조절인자 역시 SUMO 변형에 의해 전사능력이 감소하는 양상을 보인다. 이와 반대로 p53의 경우 SUMO 변형에 의해 전사능력이 증가하였다(Sapetchnig et al., 2002). 또, 프로제스테론 수용체의 경우 SUMO-1의 과발현은 PR-매개의 전사를 증진한다는 연구 결과가 있다(Dohmen, 2004).

본 연구를 통하여 여성의 조기 난소 부전증 유발에 관련있는 FOXL2 단백질이 sumoylation 과정 중 필수적인 효소인 UBE2I와 상호작용한다는 새로운 사실을 발견하였고, 두 단백질의 상호작용에 필요한 결합 도메인 부분을 찾았다. 조기 난소 부전증과 연관 있는 질병인 BPES를 가진 환자에 대해 FOXL2의 돌연변이 유형을 조사한 실험에 의하면(De Baere et al., 2001), 21개의 돌연변이 형을 찾았으며, 이 중 17개는 새로운 발견이다. 이 연구를 통해 짧은 길이의 단백질이거나 forkhead 도메인을 포함하지 않는다면 BPES 유형 I를 유발하며, 이와 반대로 forkhead의 downstream 또는 내에서 서열의 중복이 일어나거나 서열의 바뀔이 일어난다면 BPES 유형 II가 발생된다는 것을 예측할 수 있었다. 또한, forkhead 도메인의 downstream에 위치한 alanine-rich 도메인은 전사억제

능력을 가지고 있다고 생각되며, alanine tract이 증가한 FOXL2의 돌연변이 유형에서 BPES 유형 II와 산발성의 BPES가 유발된다는 결과가 있다(De Baere et al., 2001).

본 연구를 통하여 와일드 형 및 돌연변이 형 1~279과 돌연변이 형 218~376이 UBE2I와 상호작용하는 것을 확인하였다. 반면에 forkhead 도메인이 결여된 돌연변이 형 1~52와 forkhead 도메인을 포함하되 alanine-rich 도메인이 결여된 돌연변이 형 1~218은 UBE2I와 상호작용하지 않았다. 이 점을 미루어 보건대 두 단백질의 상호작용에는 forkhead 도메인이 필수적이지 않으며 alanine-rich 도메인을 중심으로 60개의 아미노산 부분이 상호작용에 필요함을 결론지었다. 또, alanine-rich 도메인을 포함하지 않은 돌연변이 형 1~218이 BPES 환자로부터 FOXL2의 돌연변이 유형을 조사한 연구에서 발견되었으며 이는 BPESII 유형을 유발한다고 알려졌다(De Baere et al., 2001).

FOXL2의 아미노산 서열에서 sumoylation이 일어날 수 있는 지역을 예상 프로그램을 통해 조사해 보았다(SUMOsp 2.0). 그 결과 아미노산의 전체 서열에 전반적으로 sumoylation 예상 부분이 존재하지만 대개 forkhead 도메인을 기점으로 분포되어 있었다. 그러나 본 실험의 결과, FOXL2와 UBE2I의 상호작용에는 forkhead 부분을 비롯하여 N-terminal 부분은 크게 작용을 하지 않는 것으로 유추되어, 이것은 아미노산이 단백질로의 합성 과정 중 3차 구조를 형성하면서 영향을 미치지 않게 되었으리라 생각된다. 아직 FOXL2에 대한 결정(crystal) 구조가 확립되지 않아 본 연구를 바탕으로 예측하건대 alanine-rich 도메인을 포함하는 약 60개의 아미노산 부분이 단백질로의 합성과정 중 UBE2I와 상호작용을 통해 sumoylation이 일어나 정상적인 FOXL2의 기능을 유도하고, UBE2I와 상호작용 하지 못하는 돌연변이 FOXL2를 가질 경우 sumoylation이 일어나지 않아 정상적인 FOXL2의 기능을 하지 못해 BPES의 유발에 기인한다고 예측할 수 있다. 향후 FOXL2 돌연변이 형과 UBE2I와의 상호작용 및 FOXL2 단백질의 기능적 측면에 관한 후속 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

This work was supported by the Korea Research Foundation Grants(KRF-2006-311-E00332) funded by the Korean Government(MOEHRD, Basic Research Promotion Fund).

인용문헌

- Anckar J, Sistonen L (2007) SUMO: Getting it on. *Biochem Soc Trans* 35:1409-1413.
- Batista F, Vaiman D, Dausset J, Fellous M, Veitia RA (2007) Potential targets of FOXL2, a transcription factor involved in craniofacial and follicular development, identified by transcriptomics. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3330-3335.
- Beysen D, Vandesompele J, Messiaen L, De Paepe A, De Baere E (2004) The human FOXL2 mutation database. *Hum Mutat* 24:189-193.
- De Baere E, Dixon MJ, Small KW, Jabs EW, Leroy BP, Devriendt K, Gillerot Y, Mortier G, Meire F, Van Maldergem L, Courtens W, Hjalgrim H, Huang S, Liebaers I, Van Regemorter N, Touraine P, Praphanphoj V, Verloes A, Udar N, Yellore V, Chalukya M, Yelchits S, De Paepe A, Kuttann F, Fellous M, Veitia R, Messiaen L (2001) Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype--phenotype correlation. *Hum Mol Genet* 10:1591-1600.
- Dohmen RJ (2004) SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta* 1695:113-131.
- Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA (1997) Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev* 18:107-134.
- Ihara M, Stein P, Schultz RM (2008) UBE2I (UBC9), a SUMO-conjugating enzyme, localizes to nuclear speckles and stimulates transcription in mouse oocytes. *Biol Reprod* 79:906-913.
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 14:142-146.
- Lee K, Pisarska MD, Ko JJ, Kang Y, Yoon S, Ryou SM, Cha KY, Bae J (2005) Transcriptional factor FOXL2 interacts with DP103 and induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 336:876-881.
- Pannetier M, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pépin B, Cotinot C, Veitia R, Pailhoux E (2006) FOXL2 activates P₄₅₀ aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J Mol Endocrinol* 36:399-413.
- Pisarska MD, Bae J, Klein C, Hsueh AJ (2004) Forkhead 12 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology* 145:3424-3433.
- Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, Doll A, Schergaut M, Melchior F, Suske G (2002) Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J* 21:5206-5215.
- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131:933-942.
- Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G (2004) Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 13:1171-1181.
- Uhlenhaut NH, Treier M (2006) Foxl2 function in ovarian development. *Mol Genet Metab* 88:225-234.
- 김정욱, 엄혜원, 이형송, 송건지, 천강우, 박용석, 김계현 (2000) 조기 난소 부전증(Premature Ovarian Failure, POF) 환자에서 난포 자극 호르몬 수용체 유전자 변이 및 발현 양상에 대한 분석. *발생과 생식* 4:61-66.

(received 27 October 2008, received in revised form 24 November 2008; accepted 25 November 2008)