

보도일시	2024. 9. 9.(월) / 배포 즉시 보도
문의	연구단장/연구책임자 생명과학부 윤태영 교수(02-880-2247, tyoon@snu.ac.kr)
	연구단/연구진 이승학 연구원(02-880-2247, lsh7734@snu.ac.kr), 김태균 연구원(02-880-2247, taegyun0806@snu.ac.kr) / 공동 제1저자

■ 제목/부제

제목	엑소시스트에 의한 세포 외 분비 조절 메커니즘의 단분자 수준 규명
부제	SNARE 단백질 복합체 형성과 막간 융합 촉진에서의 엑소시스트의 역할

■ 요약

연구 필요성	세포 내 소기관 및 세포 표면에서의 소포 이동은 세포 성장, 신호 전달 및 항상성 유지 등 세포의 중요한 과정 중 하나이다. 이때 SNARE 단백질들은 소포 전달 시 막의 융합에 있어서 핵심적인 역할을 수행한다. 정확한 전달을 위해서는, 다양한 인자들이 SNARE 단백질들의 복합체 형성과 막의 융합을 조절해야 한다. 엑소시스트는 이러한 조절 인자 중 하나로 주목받아 왔다. 그동안 엑소시스트 연구는 정제의 어려움과 적절한 분석 방법의 부재로 엑소시스트 복합체 전체를 연구하기보다는, 복합체를 구성하는 몇몇 구성 단백질을 이용한 연구만 진행되었다. 엑소시스트 복합체 전체를 이용하여, 엑소시스트 복합체가 SNARE 복합체 형성 및 막의 융합 등에 미치는 구체적인 분자적 조절 기전에 대한 연구의 필요성이 대두되어왔다.
연구성과/기대효과	연구팀은 엑소시스트 복합체를 성공적으로 정제한 후, 다양한 단분자 형광 이미징 기술을 이용해, SNARE 단백질 형성 과정 및 소포 융합 과정에서 엑소시스트의 역할을 밝혀내었다. 특히나 엑소시스트가 SNARE 복합체 형성의 각 과정에 관여하여, SNARE 복합체 형성부터 SNARE 복합체에 의해 촉진되는 소포 융합 과정까지 광범위한 과정을 가속화시킨다는 사실을 밝혀내었다. 연구팀은 본 연구를 통해, 엑소시스트를 구성하는 개별 단백질 단위가 아니라 복합체 단위에서 기능을 밝히고, 이를 통해, 거대한 복합체가 생명 현상에 중요한 소포체 이동 과정을 어떻게 조절하는지 밝힘으로써 세포 외 분비 과정의 메커니즘을 이해하는데 크게 기여하였다.

	<p>Exocytosis of secretory vesicles is required for cellular growth, division, and cell-cell communication. Lee et al., reveal that the exocyst tethering complex has stimulatory roles in exocytic SNARE complex assembly and SNARE-mediated vesicle fusion.</p>
Abstract	<p>Exocyst is a large multisubunit tethering complex essential for targeting and fusion of secretory vesicles in eukaryotic cells. Although the assembled exocyst complex has been proposed to tether vesicles to the plasma membrane and activate soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNAREs) for membrane fusion, the key biochemical steps that exocyst stimulates in SNARE-mediated fusion are undetermined. Here, we use a combination of single-molecule and bulk fluorescence assays to investigate the roles of purified octameric yeast exocyst complexes in a reconstituted yeast exocytic SNARE assembly and vesicle fusion system. Exocyst had stimulatory roles in multiple distinct steps ranging from SNARE protein activation to binary and ternary complex assembly. Importantly, exocyst had a downstream role in driving membrane fusion and full content mixing of vesicle lumens. Our data suggest that exocyst provides extensive chaperoning functions across the entire process of SNARE complex assembly and fusion, thereby governing exocytosis at multiple steps.</p>
Journal Link	<p>https://www.nature.com/articles/s41594-024-01388-2</p>

■ 본문

- 서울대학교 생명과학부 윤태영 교수 · UMass Uchan Medical school Mary Munson 교수 공동연구팀은 다양한 단백질 형광 이미징 기술을 이용하여 SNARE 복합체 형성 및 소포 융합 과정에서 엑소시스트(exocyst) 복합체의 역할을 단백질 수준으로 규명하였다.
- 연구팀은 세포 외 분비 과정에서 SNARE 단백질 간의 결합과 소포 막 융합을 모사하여 SNARE 단백질인 Sso1, Sec9, Snc2의 순차적인 결합과 이를 통한 막 융합을 관측하는 단백질 형광 이미징 방법을 개발하였다. 더불어 Mary Munson 연구팀과의 공동 연구를 통해 엑소시스트 복합체를 정제하여 본 연구팀이 개발한 단백질 형광 이미징 실험에 적용하는데 성공하였다.
- 엑소시스트는 8개의 단백질이 결합된 거대 이종 단백질 복합체로, 소포를 세포막에 결합시켜 분비 과정을 돕는 기능을 갖는다고 알려져 있다. 하지만 기존 연구는 복합체 전체보다는, 복합체를 구성하는 단백질의 부분을 통한 연구로 국한되어, 복합체 전체의 구체적인 작동 방식은 여전히 밝혀지지 않았다. 연구팀은 엑소시스트의 복합체를 이용해 엑소시스트의 생화학적 작동 방식을 세포 외 분비 과정에서 Sso1 구조 조절, 이량체 및 삼량체 SNARE 복합체 형성, 그리고 막 융합을 통한 물질 교환까지 광범위하게 작동함을 밝혀내었다.
- 연구팀은 엑소시스트가 Sso1에 의한 SNARE 단백질 결합에 미치는 영향을 관찰하기 위해 Sso1의 닫힘 상태와 열림 상태를 구분하고자 하였다. 이를 위해 Sso1의 조절 영역인 Habc 도메인과 SNARE 단백질의 결합 영역인 SNARE 도메인을 형광 표지하여 단백질 형광 공명 에너지 전이 기법으로 Habc 도메인의 닫힘과 열림을 구분하는 방법을 개발하였다. 연구팀은 해당 방법을 통해 엑소시스트가 첨가되었을 때 Sso1이 닫힘 상태에서 열림 상태로 전환되는 현상을 확인하였다. 뿐만 아니라, 연구팀은 SNARE 단백질 중 하나인 Sec9을 형광 표지하여, 엑소시스트를 첨가했을 때 Sso1이 열린 후 Sec9과의 결합을 유도하여 이량체의 SNARE(Q-SNARE) 복합체 형성이 촉진되는 현상을 관찰하였다. 이를 통해 엑소시스트는 세포 외 분비를 조절하는 핵심적인 단계인 Sso1의 구조 변화를 일으키고 이량체 SNARE 복합체를 형성시킴으로써 소포 융합을 더 효과적으로 일으킨다는 사실을 밝혀내었다.
- 추가적으로 연구팀은 엑소시스트가 Q-SNARE 복합체 형성 이후에 막간 융합에 필요한 삼량체 SNARE 복합체 형성하는 역할을 수행하는지 확인하고자 하였다. 이를 위해 R-SNARE인 Snc2가 함입된 소포막에 형광 표지를 하여 Q-SNARE 복합체가 함입된 소포 사이의 상호작용을 관찰하였다. 연구팀은 엑소시스트를 첨가하였을 때 Habc 도메인의 유무와 상관없이 삼량체의 SNARE 복합체 형성 속도가 빠르게 증가함을 확인하였다.
- 위 결과로부터 연구팀은 엑소시스트가 여러 단계의 SNARE 복합체들과 직접적으로 결합할 수 있음을 설명하고자 하였다. 엑소시스트에 형광단백질을 표지하고 여러 단계의 SNARE 복합체가 함입된 소포막에 형광을 표지하여, 단백질 형광 이미징 기술을 통해 엑소시스트와 SNARE 복합체 사이의 결합을 확인하였다. 이를 통해 엑소시스트는 다양한 단계의 SNARE 복합체와 결합하는 능력이 있으며, SNARE 단백질의 또 다른 매개 단백질인 Sec17보다도 더 높은 친화도로 결합한다는 사실을 밝혀냈다.

- 연구팀은 SNARE 복합체와의 결합 및 형성뿐 아니라, 엑소시스트가 막간 융합에도 직접적으로 작용하는지 알아보고자, Q-SNARE 복합체가 함입된 소포와 R-SNARE 복합체가 함입된 소포에 각각 형광을 표지하여, 두 소포가 융합됨에 따라 나타나는 형광 공명 에너지 전이를 측정하였다. 이를 통해 엑소시스트를 첨가하는 경우, 두 소포의 융합이 촉진됨을 확인하였다. 특히나 앞서 확인된 Sec17 결합 결과와 마찬가지로 엑소시스트가 Sec17 보다 더 높은 친화도를 보이며 두 소포 간 융합 촉진에 기여함을 규명하였다.
- 연구팀은 본 연구를 통해 SNARE를 조절하는 핵심 인자인 엑소시스트의 구체적인 기작을 밝힘으로써 세포 외 분비 과정의 메커니즘을 이해하는 데 기여하였다. 관련 질병의 치료에 도움이 될 것으로 기대하며 향후 추가 연구를 통해 SNARE 단백질의 상호 작용에 관여하는 다양한 인자와 엑소시스트의 관계를 밝혀내는 것을 목표로 하고 있다.
- 공동교신저자 윤태영 교수는 “본 연구를 통해 거대 단백질 복합체에도 다양한 단분자 형광기법을 적용할 수 있는 가능성을 보여 주었다”라며 연구의 의의를 전했다. 윤태영 교수 연구팀은 매사추세츠 주립대학 의과대학의 Mary Munson 교수팀과 지속적인 공동연구를 통하여, 엑소시스트 복합체가 보다 다양한 세포 외 분비 조절인자들과 갖는 상호작용을 밝히는 후속 연구를 수행하고 있음을 밝혔다.
- 본 연구 결과는 이와 같은 연구성과를 인정받아 이 분야의 세계적인 학술지인 네이처 구조·분자 생물학(Nature Structural and Molecular Biology, IF=12.5)에 게재된다. 본 연구는 한국연구재단(NRF) 리더연구자지원사업 및 바이오파이기술 혁신연구센터 사업 지원을 받아 수행되었다.

□ 연구결과

Exocyst stimulates multiple steps of exocytic SNARE complex assembly and vesicle fusion

Chanwoo Lee*, Dante Leopre*, Seung-Hak Lee*, Tae Gyun Kim*, Natasha Buwa, Jongchan Lee, Mary Munsont†, and Tae-Young Yoont

(Nature Structural and Molecular Biology, September 2024)

- 엑소시스트는 세포 외 분비 과정에 있어 SNARE 단백질의 결합을 조절하는 핵심적인 인자로 알려져 있다. 엑소시스트는 복합체의 부분적인 요소들의 연구를 통해 기능이 유추되어왔으나, 복합체의 구체적인 작동 기작은 여전히 밝혀져 있지 않다. 이에 본 연구팀은 엑소시스트 복합체를 정제하여 다양한 단분자 형광 기법을 통해 SNARE 단백질의 상호작용과 소포 융합 과정의 복합적인 과정들에 관여하는 엑소시스트의 기능을 규명하였다. 연구단은 엑소시스트가 Sso1의 Habc 도메인 구조를 변화시켜 이량 SNARE 복합체의 결합을 촉진시킬 뿐만 아니라 삼량 SNARE 복합체 결합을 촉진시켜 **소포막**의 결합과 내용물의 융합도 유도함을 확인했다. 이를 통해 엑소시스트의 분자적인 기전을 밝혀내어 세포 외 분비 과정에서의 소포와 세포막 융합 원리의 이해를 크게 넓혔다.

□ 용어설명

1. 세포 외 분비 (Exocytosis) : 세포가 세포 밖으로 신경전달물질 혹은 단백질 등을 운반하는 수송의 한 형태이다.
2. 엑소시스트 (Exocyst) : SNARE 단백질과의 결합을 통해 세포 외 분비 과정에 관여하는 팔량체 단백질 복합체이다.
3. SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment proteins REceptor) : 소포의 결합 과정에서 밧줄과 같이 당기는 힘을 제공하여 막 융합이 일어나도록 매개하는 단백질군이다. 효모에는 24종류, 포유류에서는 60종류 이상이 존재하며 또한 이들의 결합을 세밀하게 조절하는 다양한 SNARE 조절 인자가 존재한다.
4. 단분자 형광 이미징 : 전반사 형광현미경을 이용해 생체 분자의 상호작용 등의 생물 물리적 현상을 단일 분자 수준으로 정밀하게 측정할 수 있는 정성적/정량적 현미경 기법이다.
5. 단분자 형광 공명 에너지 전이 : 단분자 형광 이미징 기법의 생물물리학적 기법으로, 형광 물질 사이의 공명 현상을 통해 1~10 나노미터 단위의 거리를 측정할 수 있다. 대표적으로 단백질의 도메인 사이의 거리와 움직임을 확인할 수 있는 정밀한 방법이다.

