

Phosphoglucomutase1 의 활성
조절과 생리적 기능 규명

연세대학교 대학원
의과학과
배은주

Phosphoglucomutase1 의 활성 조절과 생리적 기능 규명

지도교수 김 경 섭

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2013년 6월

연세대학교 대학원

의과학과

배 은 주

배은주 의 석사 학위논문을 인준함

지도교수 김경섭 인

심사위원 김재우 인

심사위원 차봉수 인

연세대학교 대학원

2013년 6월

차 례

국문요약.....	1
I. 서론.....	4
II. 재료 및 방법	
1. 세포 배양.....	11
2. Site-directed mutagenesis	11
3. Transient transfection 실험.....	13
4. 재조합 단백질 제조 및 정제.....	14
5. PGM1의 발현 억제 실험.....	15
6. PGM1 knockdown 안정 세포 주 제작.....	16
7. Western blot 분석.....	17
8. PGM1 효소 활성 측정.....	19
9. 글리코겐 양 측정.....	20
III. 결과	
1. PGM1의 카르복시기 말단 부위에 의한 효소 활성 조절.....	22

2. PGM1의 카르복시기 말단의 아미노산 변형을 통한 4개의 threonine 잔기의 특성 확인.....	25
3. PGM1 knockdown 안정 세포 주를 이용한 PGM1의 세포 내 역할 확인	33
4. PGM1에 의한 세포 내 O-GlcNAc 변형의 변화.....	37
IV. 고찰.....	40
V. 결론.....	44
참고문헌.....	45
영문요약.....	48

그림 차례

그림 1. 포도당 대사 경로.....	5
그림 2. 단백질 발현 vector 내 표지자 위치에 따른 PGM1의 활성 변화.....	23
그림 3. PGM1의 카르복시기 말단 부위의 threonin잔기의 특성.....	28
그림 4. 세포 내 글리코젠 양에 대한 PGM1의 영향	35
그림 5. PGM1에 의한 세포 내 O-GlcNAc 변형 변화	38

표 차례

표 1. Site-directed mutagenesis에 사용된 primer 서열.....	12
---	----

국문요약

Phosphoglucomutase1의 활성 조절과 생리적 기능 규명

Phosphoglucomutase1 (PGM1)은 세포 내 에너지 생산을 위한 포도당 대사의 경로 중 glucose 1-phosphate (G-1-P)와 glucose 6-phosphate (G-6-P)의 전환을 양방향으로 촉매하는 효소이다. G-1-P와 G-6-P는 각각 글리코겐 합성과 포도당 산화를 위한 초기 물질로써 PGM1의 효소 활성은 글리코겐과 포도당 산화에 모두 중요하다. 그러나 현재까지 PGM1의 활성 조절 및 생리적 역할에 관한 연구는 미흡하다.

본 연구에서는 PGM1의 카르복시기 말단 부위에 특징적으로 나열된 4개의 threonine 잔기가 PGM1의 효소 활성 조절에 관여함을 확인하였다. Site-directed mutagenesis를 통해 4개의 threonine 잔기를 각각 alanine 잔기 또는 glutamic acid 잔기로 치환을 시켜 실험을 진행하였다. 553번째 threonine 잔기의 경우, glutamic acid 잔기로 치환되었을 때 PGM1의 단백질 발현이 크게

감소한 것을 관찰하였다. 562번째 threonine 잔기의 경우, alanine 잔기로 치환되었을 때 PGM1의 효소적 활성이 감소되었고, glutamic acid 잔기로 치환 되었을 때는 활성이 더욱 억제되었다.

유방암 세포 주인 MCF7 세포 주에 shRNA를 이용하여 PGM1의 발현을 감소시킨 안정 세포주를 통해 글리코겐의 분해와 합성과정에서의 PGM1의 역할을 관찰하였다. 먼저 PGM1의 발현이 감소된 안정 세포주는 일반적인 세포 배양 상태에서 세포 내 글리코겐 함량이 대조군 세포주에 비해 감소되었다. 그리고 포도당이 고갈된 상황에서 글리코겐의 분해 속도가 대조군 세포주에 비해 감소되었으며, 포도당 고갈 상황 이후 다시 포도당을 공급하여 글리코겐의 합성 속도를 측정하였을 때도 대조군 세포주에 비해 그 속도가 감소하였다.

세포 내 *O*-GlcNAc 변형은 세포에 스트레스 상황이 유발되었을 때 변화하는데 PGM1의 발현이 세포 내 *O*-GlcNAc 변형에도 영향을 미치는 것을 관찰하였다. siRNA를 이용하여 PGM1의 발현을 감소시켰을 때 인간의 정상적인 신장 세포주인 HEK293 세포주에서 세포 내 *O*-GlcNAc 변형이 감소하였고, 세포를 포도당이 없는 배지에 배양하였을 때 세포 내 *O*-GlcNAc 변형이 증가되는 정도가

감소하는 것을 관찰하였다. 또한 대장암 세포주인 A549 세포주에서도 같은 현상이 나타나는 것을 확인하였다.

본 연구를 통해, PGM1의 562번째 threonine 잔기가 효소 활성화에 중요하며, 생체 내에서 PGM1의 카르복시기 말단의 threonine 잔기의 변형에 의해 PGM1의 효소 활성이 조절될 수 있는 가능성을 확인하였다. 또한, PGM1이 세포 내 포도당 농도의 변화와 같은 자극이 주어졌을 때 글리코겐의 분해와 합성 속도를 조절하는 초기 반응에서 역할을 한다는 근거를 제시하였다.

핵심 되는 말: PGM1, 효소 활성, 글리코겐, O-GlcNAc 변형

Phosphoglucomutase1의 활성 조절과 생리적 기능 규명

< 지도교수 김경섭 >

연세대학교 대학원 의과학과

배은주

I. 서론

세포 내 흡수된 포도당을 에너지원으로 사용하기 위한 대사 경로는 박테리아에서 인간까지 잘 보존이 되어있다. 그로 인해 포도당 대사 경로에 작용하는 각각의 효소들의 역할이 중요하며,

이에 대한 연구가 많이 진행 되고 있다¹. 그 중에서 phosphoglucomutase1 (PGM1)은 glucose 1-phosphate (G-1-P) 와 glucose 6-phosphate (G-6-P) 간의 전환을 촉매 하는 효소이다 (그림 1).

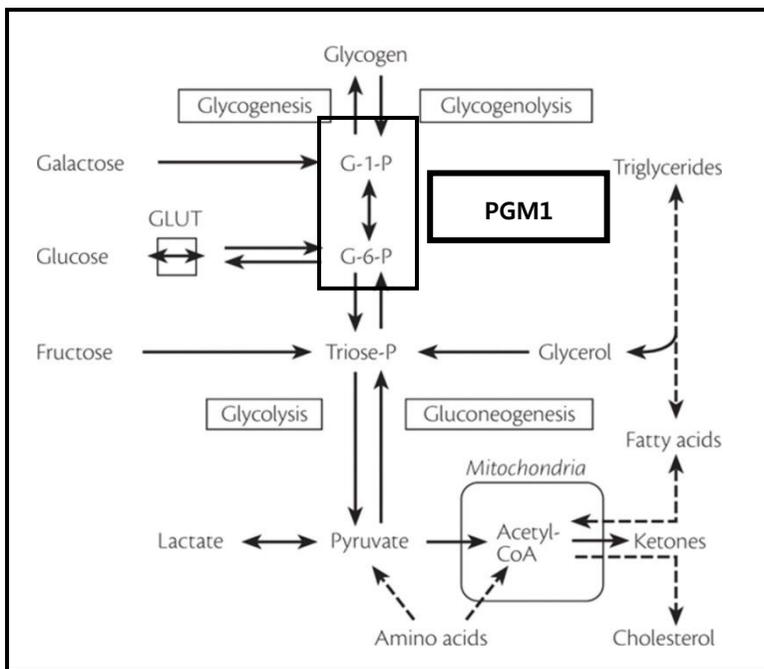


그림 1. 포도당 대사 경로

PGM1은 세포 내 G-1-P와 G-6-P의 양을 조절하여 포도당 산화 뿐만 아니라 글리코젠의 합성과 분해 기전에도 역할을 한다.

PGM1은 phosphohexose mutase family에 속하는 phosphoglucomutase의 네 종류의 isozyme (PGM1, PGM2, PGM3, PGM5) 중 하나이다. PGM1이 전체 PGM의 활성의 90%를 나타내고, PGM2는 적혈구에서 주로 나타나는 형태이며 나머지 isozyme에 대한 연구는 거의 없다. PGM1과 관련된 질병으로는 PGM1의 유전자 결핍으로 인한 운동 후 근육파괴가 주된 증상으로 나타나는 ‘글리코겐 저장 질병 유형 14’라는 질병이 알려져 있다².

‘Weizmann Institute of Science’에서 제공하는 유전자 데이터베이스인 www.GeneCard.org 사이트를 통해 인체 내 여러 조직에서 PGM1의 mRNA 발현에 관련된 microarray 자료를 찾아보면, PGM1의 mRNA 발현이 포도당 대사가 활발하게 일어나는 간과 근육에서 특히 높게 발현되는 것을 확인할 수 있다. 또한 신장암, 대장암, 피부암 그리고 자궁 경부암 등에서도 발현이 많이 되어 있다.

현재까지 PGM1이 관련한 연구들은 대부분 PGM1을 분리하여 단백질의 구조 또는 효소 활성의 기본 원리를 확인한 것들이다^{3, 4}. 일반적인 상황에서 PGM1은 G-1-P에서 G-6-P로의 전환이

우세하게 일어나도록 작용한다⁵. 그 작용기전을 살펴보면, PGM1에 존재하는 금속-결합 자리에 마그네슘 한 분자가 결합을 하며 이것은 PGM1의 활성 자리인 108번째 serine 잔기에서 일어나는 인산염 (phosphate)의 결합과 분해를 돕는다⁶. 촉매과정은 PGM1에 결합한 인산염이 G-1-P로 이동하여 중간 생성물인 glucose 1,6-bisphosphate (G-1,6-BP)가 생성된다. 그 뒤 G-1,6-BP에서 인산염이 떨어져서 다시 PGM1에 결합을 하게 되고, G-6-P가 생성된다^{5, 7}. 중간 생성 물질인 G-1,6-BP는 PGM1의 효소 활성을 강력하게 조절하는 조절자로도 작용한다고 알려져 있다⁸.

PGM1의 세포의 성장과 관련한 보고로는 p21-activated kinase 1 (PAK1)가 PGM1의 466번째 threonine 잔기를 인산화 시킴으로써 PGM1의 활성을 증가시켜 세포 성장을 촉진한다는 연구 결과가 있다⁹.

최근에는 PGM1이 암 세포의 생존에 영향을 준다는 연구 결과가 발표되었다¹⁰. 세포가 저산소 상태에 노출되면 PGM1의 mRNA와 단백질의 발현이 증가하여 글리코젠의 합성이 증가하며 따라서 세포 내 글리코젠의 저장량이 많아진다. 이후 포도당 고갈로 인해

포도당의 공급이 부족한 상황이 되면, 세포 내 저장되어 있던 글리코젠을 분해하여 생존에 필요한 포도당을 공급하게 된다고 한다. 결론적으로 저산소 상태에 놓였던 세포는 PGM1의 발현이 증가하여 세포 내 더 많은 글리코젠을 저장하고 포도당 공급이 원활하지 못한 상황이 되면, 저장되어 있던 글리코젠을 분해하여 포도당으로 사용함으로써 세포의 생존이 늘어난다.

한편, 포도당 결핍 상황에서 글리코젠의 분해를 통해 세포 내 *O*-GlcNAc 변형이 증가된다는 연구 결과가 보고 되었다¹¹. *O*-GlcNAc 변형은 단백질의 posttranslational modification (PTM)의 일종으로 세포 내 핵과 세포질에 존재하는 단백질의 serine 또는 threonine 잔기에 β -N-acetylglucosamine (GlcNAc)이 결합하는 *O*-linked N-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) 형태이다¹². *O*-GlcNAc transferase (OGT)가 *O*-GlcNAc을 특정 단백질에 결합시키는 효소이고, *O*-GlcNAcase (OGA)가 그 반대 작용을 하는 효소이다. *O*-GlcNAc 변형을 통해 단백질의 기능 또는 활성이 조절되고¹³, 단백질의 세포 내 위치가 변화될 수 있으며¹⁴, 단백질의 안정성¹⁵이 변화될 수 있다. 또한 최근 암 대사에 있어서 *O*-GlcNAc 변형에

대한 연구들을 보면, 폐암과 대장암에서 세포 내 전체 *O*-GlcNAc의 양과 OGT의 발현이 증가되어 있다고 보고되었고¹⁶, 유방암과 전립선암의 경우 OGT가 암 세포의 성장과 전이를 조절한다고 알려져 있다¹⁷. 따라서 현재 세포 내 *O*-GlcNAc 변형이 다양한 종류의 암을 예측하는 표지로서 역할을 할 수 있을 것이라 예상되고 있다. PGM1은 글리코젠 및 갈락토스에서 유래되는 G-6-P의 통로 역할을 하기 때문에 결국 UDP-GlcNAc의 양적 변화를 초래하여, 세포 내 *O*-GlcNAc 변형이 달라지는 데에 연관이 있을 것이라는 추측을 할 수 있다.

현재까지 PGM1에 대한 연구들은 단백질의 PTM이나 다른 단백질과의 상호 작용을 통해 PGM1의 단백질 발현 양과 효소 활성이 된다는 매우 제한된 보고들이 있으며, 기본적인 효소적 특성 및 생리적 기능에 대한 연구도 거의 없다. 따라서 PGM1의 활성 조절과 생체 내 역할에 대한 더 깊은 연구가 필요하다고 생각된다.

본 연구에서는 PGM1의 활성 조절에 대한 연구와 더불어 포도당 고갈과 같은 세포 내 스트레스 유발 상황에서 PGM1이 세포 내

글리코겐의 양의 조절과 세포 내 O-GlcNAc 변형의 변화에
관여함을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

실험에 사용하는 모든 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입하여 사용하였다. 각각의 배양조건에 맞는 배지를 Gibco (Gibco, Carlsbad, California, USA)에서 구입하여 10% FBS (Fetal bovine serum), 10 µg/ml streptomycin, 그리고 100 U/ml penicillin을 첨가한 뒤 37°C, 5% CO₂ 공기 조성에서 지속적으로 유지하여 사용하였다. 포도당 고갈 상태에서의 실험은 포도당이 함유되지 않은 배지 (Gibco)를 구입하여 일반적인 배지와 동일하게 처리하여 사용하였다.

2. Site-directed mutagenesis

정상적인 유전자를 다른 형태로 변형시키기 위해 특정 아미노산을 변형시킬 수 있는 두 개의 서로 상보적인 염기서열의 oligonucleotide primer를 GC contents 50% 이하, T_m값은 70°C 정도가 되도록 30mer 길이로 제작하였다. Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene, California, USA)를 사용하여 plasmid

상태의 DNA를 mutation을 가진 plasmid로 시험관에서 증폭, 합성하고, wild type의 plasmid는 Dpn I 제한효소를 처리하여 제거하였다.

표 1. Site-directed mutagenesis에 사용된 primer 서열

이름		서열 (5'→ 3')
pSG5- hPGM1(T553E)(S)	sense	CAGCTGCAGGAGAGGGAAGGACGCACTGCACCC
pSG5- hPGM1(T553E)(AS)	antisense	GGGTGCAGTGCCTCCTTCCCTCTCCTGCAGCTG
pSG5- hPGM1(T556E)(S)	sense	AGAGGACGGGACGCGAAGCACCCACTGTCAT
pSG5- hPGM1(T556E)(AS)	antisense	ATGACAGTGGGTGCTTCGCGTCCCCTCCTCT
pSG5- hPGM1(T559E)(S)	sense	GGACGCACTGCACCCGAAGTCATCACCTAAGGG
pSG5- hPGM1(T559E)(AS)	antisense	CCCTTAGGTGATGACTTCGGGTGCAGTGCCTCC
pSG5- hPGM1(T562E)(S)	sense	GCACCCACTGTCATCGAATAAGGGTCGACTCGA
SG5- hPGM1(T562E)(AS)	antisense	TCGAGTCGACCCTTATTCGATGACAGTGGGTGC
pSG5- hPGM1(T553A)(S)	sense	AGCTGCAGGAGAGGGCAGGACGCACTGCA

pSG5- hPGM1(T553A)(AS)	antisense	TGCAGTGCGTCCTGCCCTCTCCTGCAGCT
pSG5- hPGM1(T556A)(S)	sense	AGAGGACGGGACGCGCAGCACCCACTGTC
pSG5- hPGM1(T556A)(AS)	antisense	GACAGTGGGTGCTGCGCGTCCCGTCCTCT
pSG5- hPGM1(T559A)(S)	sense	GGACGCACTGCACCCGCAGTCATCACCTAAGG
pSG5- hPGM1(T559A)(AS)	antisense	CCTTAGGTGATGACTGCGGGTGCAGTGCGTCC
pSG5- hPGM1(T562A)(S)	sense	GCACCCACTGTCATCGCATAAGGGTCTGACTCGA
pSG5- hPGM1(T562A)(AS)	antisense	TCGAGTCGACCCTTAGTTGATGACAGTGGGTGC
pQE30- hPGM1(T562E)(S)	sense	GCACCCACTGTCATCGAATAAGGGTCTGACCCT
pQE30- hPGM1(T562E)(AS)	antisense	AGGGTCTGACCCTTATTCGATGACAGTGGGTGC
pQE30- hPGM1(T562A)(S)	sense	GCACCCACTGTCATCGCATAAGGGTCTGACCCT
pQE30- hPGM1(T562A)(AS)	antisense	AGGGTCTGACCCTTATGCGATGACAGTGGGTGC

3. Transient transfection 실험

Transfection을 실시할 때 배양 접시의 면적에 50~60% 정도로 세포가 자랄 수 있도록 세포를 transfection 하루 전 날 분주하였다. Transfection 시에는 혈청을 넣지 않은 형태의 동일한

배지로 사용하였다. Lipofectamine LTX 사용시에는 배지를 바꾸지 않고 세포를 키우던 상태에서 시약만 첨가하는 방법을 사용하였다. Plasmid의 양은 각 세포 주의 조건에 따라 농도를 조정하여 사용하였고, transfection 시약으로는 Lipofectamine과 PLUS reagent를 혼합하여 사용하거나, Lipofectamine LTX와 PLUS reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA)를 혼합하여 사용하였다. 최소 3시간 후 20% FBS가 함유된 DMEM 배지를 첨가하여 배지 내 FBS 농도가 10%가 되도록 하였다. 48시간 배양한 뒤, 세포를 Dulbecco's PBS (Gibco)로 씻어준 후, lysis 완충용액 (20 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)을 이용하여 세포를 수확하였다.

4. 재조합 단백질 제조 및 정제

pET21a vector 또는 pQE30 vector에 인간 PGM1의 cDNA를 cloning하여 각각 대장균 BL21 DE3 codon(+) 또는 BL21 pLacI에 형질 전환시킨 후 한 개의 colony를 얻어 5 ml의 LB (Luria Bertani) 배지에 접종 한 뒤 37°C 14시간 동안 배양하였다. 14시간 후 대장균이 자란 5 ml의 배양액을 동일한 LB 배지 500 ml에 첨가하였고 600 nm의 빛의 파장에서 O.D값이 0.6~0.8정도가 될 때까지 37°C의 shaking incubator에서 배양하였다. O.D값이

0.6~0.8정도가 되면 300 μ M IPTG (isopropylthio- β -galactoside, Duchefa, Haarlem, Netherland)를 넣고 30 $^{\circ}$ C에서 8시간을 더 배양하였다. 8시간 후 500 ml의 대장균 배양액을 8,000 rpm으로 10분 원심분리 한 뒤 상층액을 버리고 남은 고형물을 PBS에 녹였다. 초음파로 세포벽을 깬 후, 다시 원심분리하여 상층액을 수확하였고, 수확한 상층액에 Ni-NTA chelating agarose beads (Peptron)를 혼합한 후 4 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 결합시켰다. Beads를 거를 수 있는 column을 준비하여 50 mM, 100 mM의 imidazole (Sigma-Aldrich)이 들어있는 완충용액 (300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)을 차례로 넣어 흐르게 한 뒤 마지막으로 250 mM imidazole이 들어간 완충용액을 넣어 재조합 단백질을 정제하였다.

5. PGM1의 발현 억제 실험

PGM1의 mRNA의 발현을 억제할 수 있는 siRNA를 IDT (Integrated DNA Technologies, Inc)를 통해 구입하였다. Transfection을 실시할 때 배양 접시의 면적에 50~60%정도로 세포가 자랄 수 있도록 세포를 transfection 하루 전 날 분주하였다.

Transfection reagent는 Lipofectamine RNAimax (Invitrogen)를 사용하고 10 nM siRNA를 처리하였다. 48시간 배양한 뒤, 세포를 Dulbecco's PBS (Gibco)로 씻어준 후, lysis 완충용액 (20 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)을 이용하여 세포를 수확한 후, mRNA 또는 단백질 발현 정도를 통해 PGM1의 발현 억제를 확인하였다.

6. PGM1 knockdown 안정 세포 주 제작

PGM1의 발현을 억제할 수 있는 shRNA를 발현하는 pLKO.1-puro lentivirus vector를 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. Human PGM1 (GenBank TM accession number: NM_002633.2) mRNA 염기서열에서 각각 nucleotides 694-714와 862-842 부위를 표적하는 shPGM1을 구입하였다. pLKO.1-puro empty vector를 negative control로 사용하였다. Lentivirus 제작을 위해 virus packaging vector로는 envelope glycoprotein 발현 vector (pMD2.G), gal-pol 발현 vector (pMDLg/pRRE), 그리고 rev 발현 vector (pRSV-Rev)를 사용하였다. HEK293T 세포에

Lipofectamine (Invitrogen)을 이용하여 세 개의 packaging vector를 1:1:1의 농도 비율로 섞은 뒤 target lentiviral vector와 1:1의 농도 비율로 다시 섞은 후 transfection하였다. 48시간 후에 virus가 포함된 세포 배양액을 0.45 μ m membrane filter (Sartorius stedim, Goettingen, Germany)로 거른 후 바로 사용하거나, 4°C에서 최대 2주간 보관하였다. 표적세포에 감염시킬 때 virus액과 새로운 배지와와의 비율을 1:4 정도로 하고, 8 mg/ml의 polybrene (Sigma-Aldrich)을 첨가한 뒤 24시간 정도 배양하였다. 그 후 세포를 계대할 때 puromycin (Sigma-Aldrich)을 0.1~0.25 μ g/ml의 농도로 처리하여 안정 세포 주를 선별하여 계속 배양하였다.

7. Western blot 분석

세포를 10% FBS 가 함유된 DMEM 배지에서 2~3일 배양한 뒤, lysis 완충용액 (20 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)을 이용하여 세포를 수확하였다. 초음파 분쇄기를 이용하여 세포벽을 깬 후 13,200 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 얻어서 Bradford 또는 BCA protein assay를 이용하여

단백질의 양을 정량하였다. 같은 양의 단백질을 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis) gel에 전기영동 하였고, Nitrocellulose membrane (Whatman™, GE healthcare, Dassel, Germany)에 transfer하였다. Transfer가 완료된 membrane은 0.1% (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich)가 포함된 TBST 완충용액에 5% (v/v) non-fat skim milk (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ, USA) 또는 5% (v/v) Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich)을 섞은 완충액에 blocking하고, 같은 tris 완충용액에 1차 항체를 넣어 4℃에서 12시간 이상 반응시켰다. 주로 사용했던 1차 항체는 다음과 같다. PGM1 (Abcam, Cambridge, UK), *O*-GlcNAc (Covance, USA), α -tubulin (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA), GAPDH (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA). 2차 항체는 anti-mouse IgG horseradish peroxidase, anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (Thermo scientific, Rockford, IL, USA)을 사용하였다. 결과 분석은 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo scientific)를 이용하고 Fuji X-Ray (Fuji, Japan) 필름에 현상하여 확인하였다.

8. PGM1 효소 활성 측정

PGM1 단백질을 포함하고 있는 세포 추출물이나, 대장균을 이용한 재조합 PGM1 단백질을 만들어 실험에 사용하였다. PGM1의 activity 측정 원리를 설명하자면 다음과 같다. PGM1에 의해 glucose 1-phosphate로부터 glucose 6-phosphate가 생성되고 이는 다시 glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)에 의해 6-phosphoglucrono- δ -lactone이 된다. 이 과정에서 NADP^+ 가 NADPH로 환원이 되는 데 이때의 흡광도를 spectrophotometer를 이용하여 340 nm의 파장에서 측정하였다. 즉, PGM1 단백질을 제외한 모든 시약을 혼합한 뒤 마지막에 PGM1 단백질을 넣고 30°C에서 5분 동안 흡광도를 측정하였고 1분 동안 변화된 O.D값으로 PGM1의 효소 활성을 비교하였다. 실험에 사용된 시료의 종류와 농도는 다음과 같다. 175 mM glycylglycine 완충 용액, pH 7.4, 5 mM glucose 1-phosphate, 0.67 mM β -NADP⁺, 30 mM MgCl₂, 0.02 mM glucose 1,6-bisphosphate, 43 mM L-cysteine HCl 용액, 1 unit glucose 6-phosphate dehydrogenase. 모든 시료는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

9. 글리코겐 양 측정

실험에 사용할 세포는 PBS를 이용하여 한번 씻어 준 뒤 PBS로 수확하여 원심분리기로 세포를 침전시켜 수확하였다. 3차 증류수를 이용하여 세포 침전물을 녹인 후 얼음에 15분 정도 방치하였다. 초음파 분쇄기를 이용하여 5초간 세포를 분쇄시킨 뒤 95℃에 5분간 가열하였다. 13,200 rpm 속도에서 15분 동안 원심 분리 하여 상층액을 수확하였다.

글리코겐 측정을 위해 starch assay kit (Sigma-Aldrich)를 구입하였고, 제조사가 제공하는 측정법에서 세포 추출액과 시약의 양을 줄여서 실험을 진행하였다. 한 개의 세포 추출액을 기준을 할 때, 1.5 ml tube에 starch assay reagent 25 μ l와 amylase 1 μ l를 섞은 뒤 수확한 세포 추출액 25 μ l와 섞어 주었다. 60℃에서 15분간 반응시켰고, glycogen assay reagent를 100 μ l씩 넣고, 37℃에 30분간 반응시켰다. 마지막으로 12 N의 황산을 100 μ l 넣고 13,200 rpm의 속도로 1분간 원심 분리 하였다. 상층액을 96 well plate에 100 μ l씩 넣은 뒤 spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

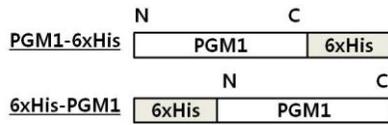
기준 글리코젠 양을 6개로 지정 하여 (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/ml) 수확한 세포 추출액과 같이 실험을 진행한 뒤, 세포 추출액의 결과값을 기준 글리코젠의 값과 비교하여 글리코젠 양을 정량하였다. 그 뒤 각 세포 추출액의 단백질 양을 측정하여 단위 단백질 양에 대한 글리코젠의 양으로 나타내었다.

III. 결과

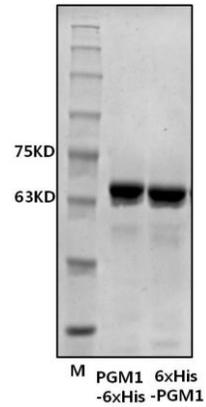
1. PGM1의 카르복시기 말단 부위에 의한 효소 활성 조절

재조합 단백질을 이용하여 PGM1의 효소 활성을 측정하는 과정에서 재조합 단백질을 발현하는 vector의 표지자 역할을 하는 6개의 histidine 잔기가 PGM1의 카르복시기 말단에 위치하였을 때 효소 활성이 전혀 나타나지 않는 것을 확인하였다. 반대로 6개의 histidine 잔기가 아미노 말단에 위치하였을 때는 정상적으로 효소 활성이 나타났다 (그림 2, 다). 카르복시기 말단에 의한 이러한 효소 활성 억제 현상은 PGM1의 효소 활성을 증가시키는 물질인 G-1,6-BP를 첨가 하여도 변화가 없었다 (그림 2, 라). 이를 통해 PGM1의 카르복시기 말단이 효소 활성을 나타내는 데에 중요한 역할을 할 것임을 예상하였다.

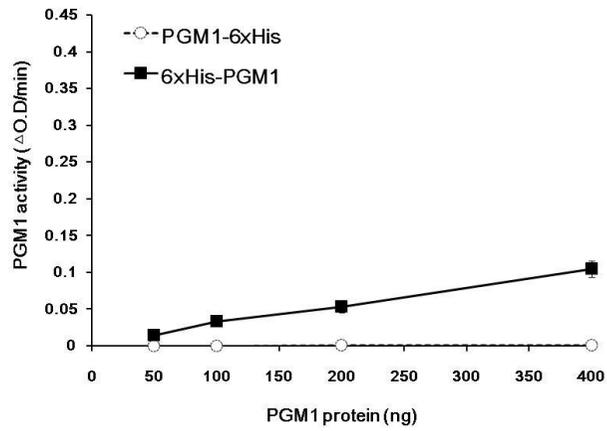
가.



나.



다.



라.

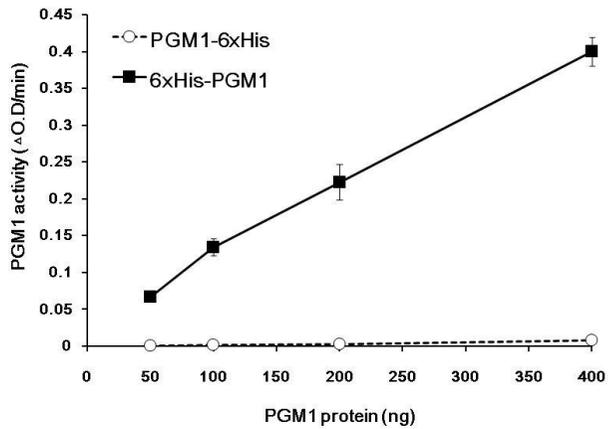


그림 2. 단백질 발현 vector 내 표지자 위치에 따른 PGM1의 활성 변화

가. 대장균을 이용한 재조합 단백질을 발현시키는 두 가지 종류의 vector내에서 PGM1과 6xHis 표지자의 위치에 대한 모식도. 나. 두 개의 vector를 통해 만들어진 PGM1의 재조합 단백질을 정제 한 후 Coomassie brilliant blue R-250 염색을 통해 단백질 발현 양을 비교하였다. M, 단백질 크기 표시. 다, 라. 재조합 PGM1 단백질의 활성 측정. 정제한 재조합 단백질을 이용하여 PGM1의 활성을 G-1,6-BP이 없는 상태와 (다) 첨가한 상태 (라)에서 측정하였다.

2. PGM1의 카르복시기 말단의 아미노산 변형을 통한 4개의 threonine 잔기의 특성 확인

PGM1의 카르복시기 말단의 아미노산 서열을 살펴보면 특징적으로 553번째 threonine 잔기부터 마지막 잔기인 562번째까지 TXXTXXTXXT의 형태로 나열되어 있음을 알 수 있다 (그림 3, 가). 일반적으로 threonine 잔기의 경우 단백질 변형의 한 종류인 인산화가 주로 일어나기 때문에 이들 위치에서의 인산화가 효소 활성화에 어떻게 영향을 미치는 지를 확인하기 위하여 실험을 진행하였다. 각각의 threonine 잔기를 site-directed mutagenesis 실험을 통해 인산염이 결합한 것처럼 모방하는 glutamic acid 잔기로 치환시키거나 인산염이 전혀 결합을 할 수 없도록 하는 alanine 잔기로 치환시킨 후 PGM1의 발현하였다 (그림 3, 나). 553번째 threonine 잔기를 glutamic acid 잔기로 바꾸었을 때 (T553E) 단백질 발현이 현저히 감소하였다. 또한 4개의 잔기 모두가 glutamic acid 잔기로 치환된 변형체는 단백질의 발현이 거의 없는 것을 관찰하였다.

이러한 단백질 발현의 감소가 proteasome을 이용한 단백질 분해 시스템을 통해 일어나는 것인지 알아보기 위하여 proteasomal 분해 억제제인 MG132를 10 μ M의 농도로 12시간 동안 처리 한 후 단백질 발현을 관찰하였다 (그림 3, 다). 그 결과 MG132의 처리에 의해 단백질 발현이 증가되지는 않았다. 따라서 T553E 변형에 의한 단백질 발현 감소가 proteasome을 통한 단백질 분해로 인한 것은 아님을 확인하였다.

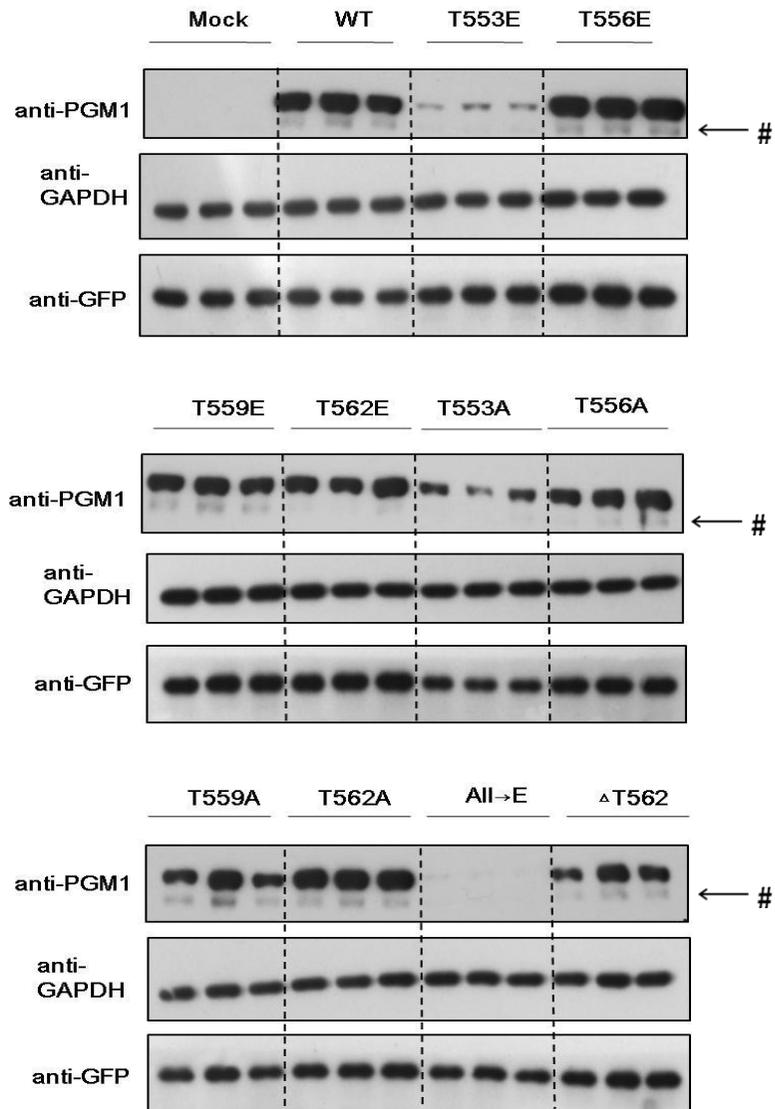
다음으로, 각각의 유전자 변형체에서 PGM1의 효소 활성을 확인해 보았다. 대부분 단백질 발현양에 비례하여 효소 활성이 나타났으나, 562번째 threonine 잔기의 변형체에서는 발현양에 무관하게 효소 활성이 저하되었다. 562번째 threonine 잔기를 glutamic acid 잔기로 변형 시켰을 때 (T562E) 효소 활성이 거의 소실됨을 확인하였고, alanine 잔기로 변형 시켰을 때는 (T562A) 효소 활성이 나타났지만 정상 수준보다는 훨씬 낮은 정도를 보였다 (그림 3, 라). 대장균을 통해 정상형태 및 T562E, T562A로 변형된 재조합 단백질을 만들어 PGM1의 효소 활성을 측정하였을 때도 동일한 결과를 확인하였다. (그림 3, 마, 바, 사).

결과를 정리해 보면, PGM1의 카르복시기 말단에 순차적으로 나열된 4개의 threonine 잔기중에서 553번째 잔기는 PGM1 단백질의 발현에 영향을 미치고, 만약 이 threonine 잔기가 인산화 되면 PGM1의 양이 감소될 것으로 예상된다. 또한 562번째 threonine 잔기는 효소 활성화에 직접적으로 중요하며, 이 잔기의 PTM이 세포내에서 일어난다면 PGM1의 효소 활성화에 결정적인 역할을 할 것이다.

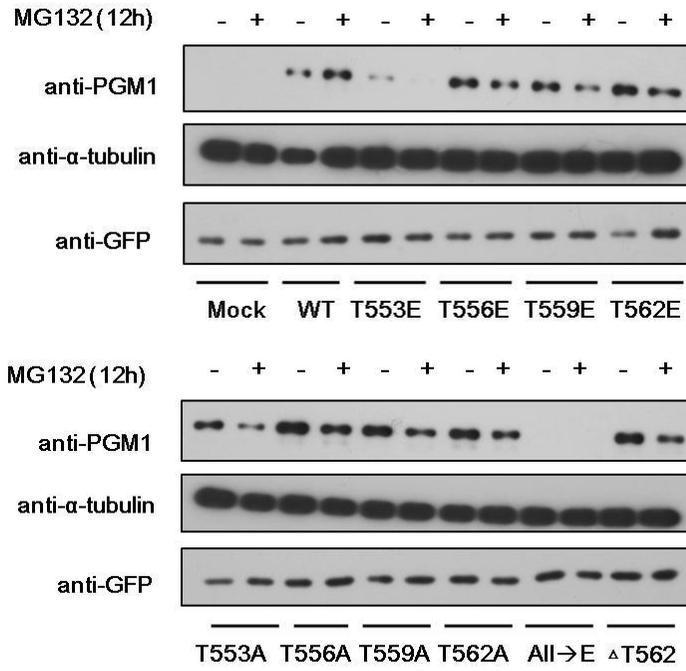
가.

T553 T556 T559 T562
QLQERTGRTAPT**VIT**-COOH

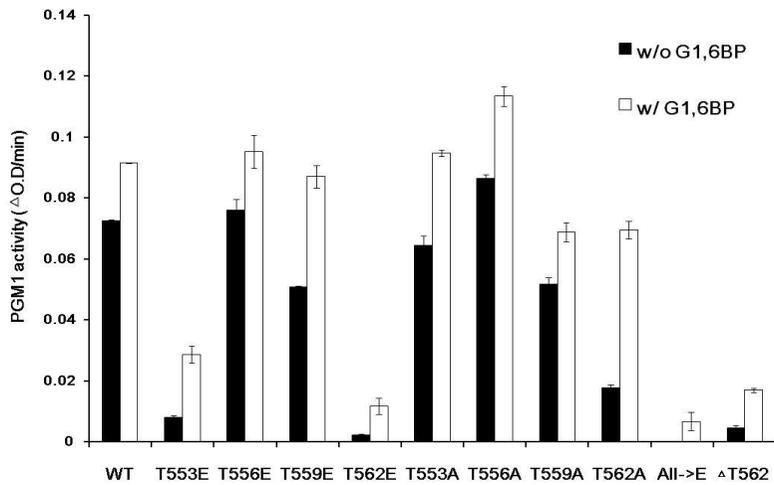
나.



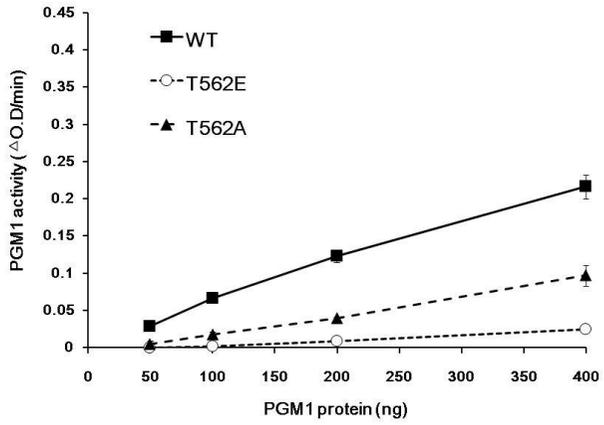
다.



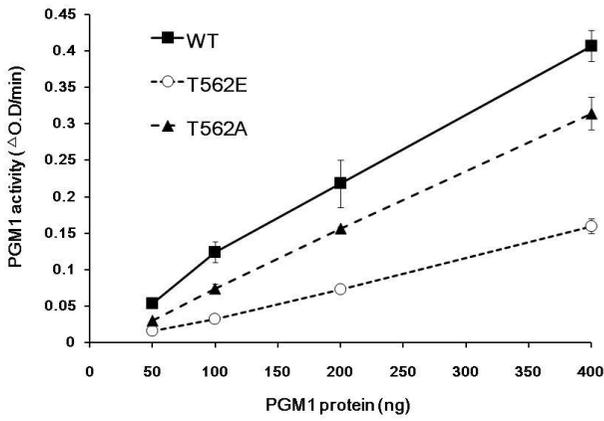
라.



마.



바.



사.

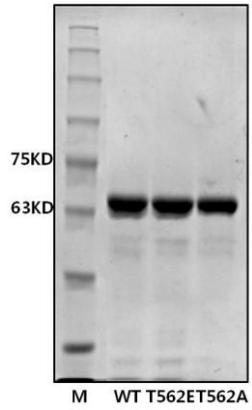


그림 3. PGM1의 카르복시기 말단 부위의 threonine 잔기의 특성

가. PGM1의 카르복시기 말단 부위의 아미노산 서열. 나. 각각의 PGM1의 유전자 변형체를 HEK293T 세포에 과발현 시킨 후 PGM1의 단백질 발현을 western blot을 통해 확인하였다. 한 그룹 당 세 개의 샘플을 분석하였다. #, HEK293T 세포 내의 내재적인 (endogenous) PGM1의 발현. All→E, 4개의 threonine 잔기 모두를 glutamic acid 잔기로 변형한 변형체. Transfection의 효율이 그룹간에 동일함을 보이기 위하여 GFP (green fluorescence protein)를 발현하는 vector를 함께 transfection하여 그룹간의 GFP가 동일하게 발현됨을 확인하였다. 다. 각각의 PGM1의 유전자 변형체를 HEK293T 세포에 과발현 시킨 후 MG132를 10 μ M의 농도로 12시간 동안 처리하고 PGM1의 단백질 발현을 western blot을 통해 확인하였다. 라. 각각의 PGM1의 유전자 변형체를 HEK293T 세포에 과발현 시킨 후 세포 추출물 내의 PGM1의 효소 활성을 측정하였다. 내재적인 PGM1의 발현에 따른 효소 활성을 배제하기 위해 mock vector를 과발현 시킨 실험군의 값을 각각의 값에서 뺀 후 비교하였다. 마, 바. 재조합 PGM1의 효소 활성. 정상 형태 및 T562E, T562A 변형체를 대장균에서 발현시킨 후 단백질

양에 따른 효소 활성을 G-1,6-BP가 없는 상태 (마)와 첨가한 상태 (바)에 따라 측정하였다. 사. 재조합 단백질을 정제한 후 Coomassie brilliant blue R-250 염색을 통해 발현 양을 비교하였다. M, 단백질 크기 표시.

3. PGM1 knockdown 안정 세포 주를 이용한 PGM1의 세포 내 역할 확인

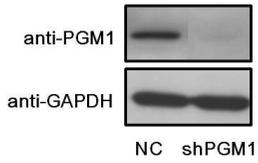
PGM1의 생리적인 역할을 알아보기 위하여, 인간 유방암 세포주인 MCF7 세포주에 lentiviral vector를 매개로 하는 shRNA를 이용하여 PGM1의 발현이 감소된 안정 세포주를 만들어 실험을 진행하였다. 먼저 western blot을 통해 non-targeted short hairpin RNA를 발현하는 대조군 세포주 (NC)에 비해 PGM1을 knockdown시켰을 때 PGM1의 단백질 발현이 현저하게 낮아진 것을 확인하였다 (그림 4, 가).

세포 내 포도당 고갈 시 글리코겐의 분해를 통해 포도당을 공급한다는 보고가 있다^{11, 18}. 정상 세포는 물론이고, 특히 암 세포의 경우 포도당 고갈 상황이 되어도 글리코겐으로부터 포도당을 공급받기 때문에 지속적인 세포 성장이 가능하다는 것이다. 이러한 결과에 근거하여 PGM1의 발현에 따라 글리코겐의 대사에 변화가 있을 것이라는 가설을 세웠다. 먼저, 25 mM 글루코스 포함 배지를 이용한 세포 배양 조건에서 PGM1의 발현이 감소된 세포주에서 대조군에 비해 세포 내 글리코겐의 양이 감소되어 있음을

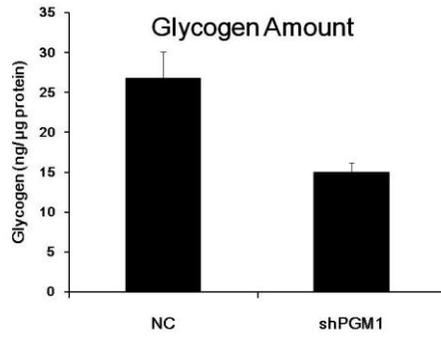
확인하였다 (그림 4, 나). 또한 포도당 고갈 상황을 주었을 때 글리코겐이 분해되는 속도도 감소되어 있음을 확인하였다 (그림 4, 다). 포도당 고갈 상황 뒤 다시 포도당을 공급하여서 글리코겐이 합성되는 속도를 확인하였을 때도 PGM1 knockdown 세포주에서 감소되어 있었다 (그림 4, 라).

본 실험 결과를 통해 세포 내 포도당의 공급변화에 대한 글리코겐의 양적 변화가 빠르게 일어남을 알 수 있었고, PGM1에 의해 글리코겐의 분해와 합성 속도가 조절될 수 있음을 확인하였다.

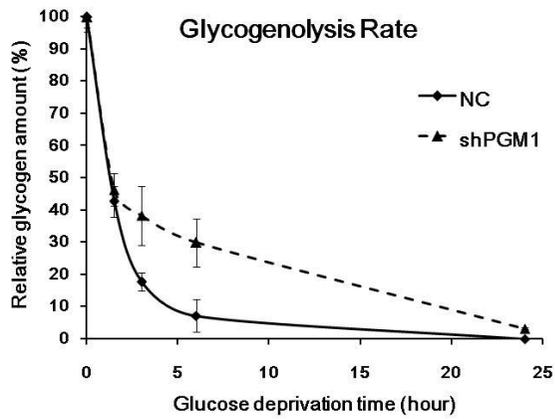
가.



나.



다.



라.

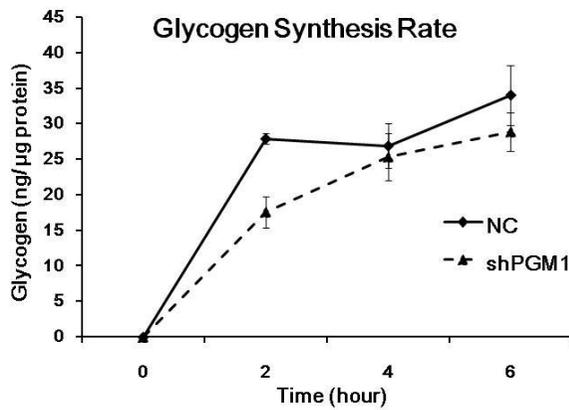


그림 4. 세포 내 글리코겐 양에 대한 PGM1의 영향

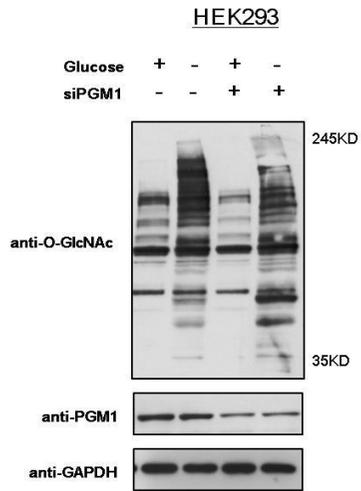
가. PGM1을 특이적으로 표적하는 shPGM1를 발현하는 lentivirus 만들어 MCF7 세포에 감염시킨 후 PGM1의 발현 감소를 western blot으로 확인하였다. NC, negative control. 나. MCF7 세포 주에서 NC와 shPGM1 안정 세포주의 글리코겐 함량. 두 가지의 세포 주를 일반적인 세포 배양 상태에서 (25 mM의 포도당이 함유된 배지를 사용) 24시간 배양한 후 세포 내 글리코겐 양을 측정하였다. 다. PGM1 억제에 따른 글리코겐 분해 속도의 변화. 25 mM 농도의 포도당을 함유한 배지에서 24시간 배양한 세포를 PBS로 한번 씻은 후 0 mM 농도의 포도당을 함유한 배지로 바꿔서 배양한 후 0 h, 1.5 h, 3 h, 6 h, 24 h에 세포를 수확한 후 글리코겐의 양을 측정하였다. 라. PGM1 억제에 따른 글리코겐 합성 속도의 변화. 0 mM 농도의 포도당을 함유한 배지에서 24시간을 배양한 후 10 mM 농도의 포도당을 함유한 배지로 바꿔서 배양한 후 0 h, 2 h, 4 h, 6 h에 세포를 수확 후 글리코겐의 양을 측정하였다.

4. PGM1에 의한 세포 내 O-GlcNAc 변형의 변화

세포 내 스트레스가 주어지는 환경의 일종인 포도당 결핍에 의해 O-GlcNAc 변형이 증가한다는 연구 결과¹¹대로 HEK293 세포주에서 포도당 결핍에 의한 O-GlcNAc 변형의 증가를 확인하였고 siRNA를 이용하여 PGM1의 발현을 감소시켰을 때 O-GlcNAc 변형의 증가 폭이 감소되는 것을 확인하였다 (그림 5, 가). 또한 A549 세포주에서 같은 실험을 수행하였을 때에도 PGM1의 발현 감소로 인해 O-GlcNAc 변형이 감소됨을 확인하였다 (그림 5, 나).

이를 통해 PGM1 발현 양이 세포 내 O-GlcNAc 변형의 정도에 영향을 미치며, 또한 세포 내 스트레스가 주어질 때 O-GlcNAc 변형의 패턴 변화에도 연관이 있음을 알 수 있다.

가.



나.

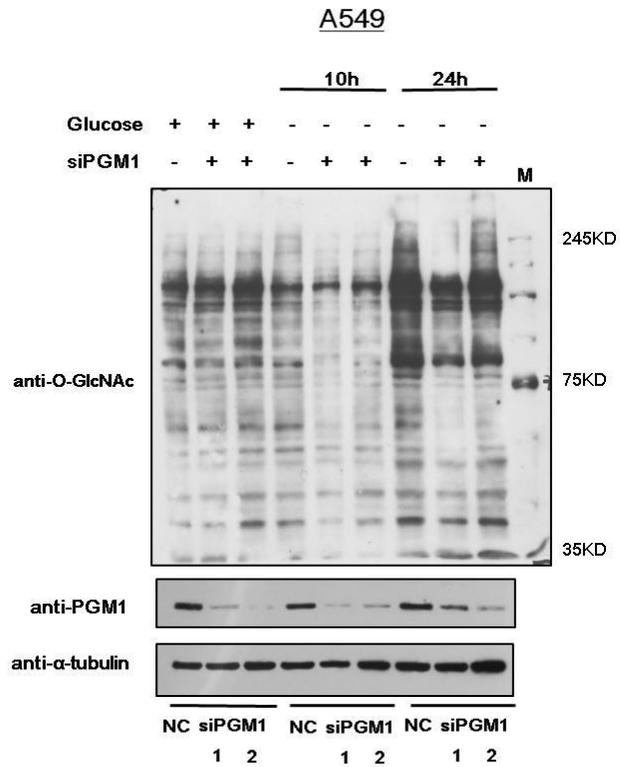


그림 5. PGM1에 의한 세포 내 O-GlcNAc 변형 변화

가. HEK293 세포주에 PGM1에 특이적인 siRNA를 이용하여 PGM1의 발현을 감소시킨 후 0 mM의 포도당을 함유한 배지에 24시간 동안 배양 한 뒤 세포를 수확하여 PGM1의 단백질 발현과 세포 내 O-GlcNAc 변형의 변화를 western blot을 통해 확인하였다.

나. A549세포주에 두 가지 종류의 siRNA (siPGM1 1, siPGM1 2)를 이용하여 PGM1의 발현을 감소시킨 후 0 mM의 포도당을 함유한 배지에 10시간, 24시간 동안 배양 한 뒤 세포를 수확하여 PGM1의 단백질 발현과 세포 내 O-GlcNAc 변형의 변화를 western blot으로 확인하였다. NC, negative control.

IV. 고찰

PGM1은 포도당 해당 대사뿐만 아니라 글리코젠 대사와 연관된 효소지만, 현재까지 PGM1에 대한 연구는 많지 않다. 주로 기본적인 구조를 밝히거나^{7, 19} 효소의 특성을 밝힌 연구^{6, 20}, 몇몇의 단백질과 상호작용을 한다^{9, 21}는 매우 제한된 수의 연구 보고가 있으며, PGM1 결핍 시에 인간에서 나타나는 질병에 관한 간단한 보고^{2, 22, 23}가 있다. 본 실험에서 PGM1의 카르복시기 말단이 효소 활성 조절에 중요함을 확인하였고, 이는 다른 연구 결과에서 언급된 적이 없는 새로운 발견이다.

Threonine 잔기의 경우, 기본적으로 인산화에 의한 단백질의 변형이 주로 일어나기 때문에 PGM1의 카르복시기 말단 부위에서 이러한 변형이 일어나는 지 확인해 보았지만 자극이 없는 상태에서는 이 부위의 직접적인 인산화를 확인 할 수 없었다. 따라서 세포 내 PGM1의 역할이 조절 될 수 있는 자극을 동반하여 T562 잔기의 인산화 여부에 따른 PGM1의 효소 활성 변화나 단백질 발현의 변화를 확인하는 실험이 진행되어야 할 것이다.

하지만 553번째 threonine 잔기가 glutamic acid 잔기로

변형되거나 (T553E), 4개의 threonine 잔기 모두가 glutamic acid 잔기로 변형이 되었을 때 (All→E) PGM1의 단백질의 발현이 크게 감소한 것을 확인하였다. 이를 통해 PGM1의 카르복시기 말단의 인산화, 특히 553번째 threonine 잔기의 인산화는 PGM1의 단백질 양을 조절하는 결정적인 역할을 할 수 있을 것으로 예상된다. 이러한 단백질의 양적 조절 기전을 찾고자 본 실험에서 MG132를 처리한 결과 단백질 발현이 증가되지 않은 것으로 보아 proteasome을 통한 단백질 분해로 인한 것은 아님을 알 수 있었다. Lysosome을 통한 분해 또는 PGM1의 단백질 형성 시 단백질의 접힘 과정에서의 결함으로 인한 것인지를 앞으로 확인해 봐야 할 것이다.

또한, 562번째 threonine 잔기를 glutamic acid 잔기 (T562E) 또는 alanine 잔기로 변형시켰을 때 (T562A) PGM1의 효소 활성이 거의 없어진 것을 확인하였다. 특히 T562E의 경우, G-1,6-BP에 대한 반응도도 현저히 떨어져 있었다. 앞으로 이러한 현상이 *in vivo*에서 실제로 일어날 수 있는지를 알아보는 것이 진행되어야 할 것이다.

특정 잔기를 통한 단백질 변형에 의한 직접적인 효소 활성 조절

이외에 다른 단백질과의 상호작용의 조절을 통한 생리적 기능을 담당할 가능성 또한 앞으로 보다 깊은 연구가 필요하다.

세포 내 포도당이 결핍된 상황에서는 세포 내 저장되어 있던 글리코젠을 분해시켜 포도당을 공급 한다. 글리코젠은 glycogen phosphorylase에 의해 분해되어 G-1-P가 된다. PGM1은 G-1-P와 G-6-P를 가역적으로 촉매 하는 효소이므로 세포 내 G-1-P와 G-6-P의 양을 결정하는 데에 중요한 역할을 한다⁶. G-1-P는 UDP-glucose phosphorylase에 의해서 uridine diphosphate glucose (UDP-glucose)로 변환된다. UDP-glucose는 다시 glycogen synthase에 의해서 glycogen으로 합성이 된다. 따라서 PGM1의 활성이 저하되거나 발현이 감소된다면 글리코젠의 분해와 합성에 영향이 있을 것이라 예상하였고, 본 실험을 통해서 PGM1의 발현이 억제되었을 때 글리코젠의 분해 뿐만 아니라 합성 속도가 감소되어 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 PGM1의 결핍으로 인해 운동 후 근육이 파괴되는 질병인 ‘글리코젠 저장 질병 유형 14’의 원인이 되는 기전을 설명하기에 기초 결과가 될 수 있다고 여겨진다.

세포 내 *O*-GlcNAc 변형의 증가는 세포 스스로 스트레스에 대한 방어 기전으로 인해 일어난다고 한다^{11, 24, 25}. 최근 암 세포에서

이러한 *O*-GlcNAc 변형과 암 세포의 성장이 관련이 있다는 연구가 많이 진행되고 있다^{16, 17, 25, 26}. 유방암, 전립선암, 대장암 등의 암 세포주에서 세포 내 *O*-GlcNAc 변형이 정상 세포에 비해 증가가 되어있고, 이러한 세포 내 *O*-GlcNAc 변형을 억제시켰을 때 암 세포의 성장이 저해된다고 한다²⁷. 본 실험을 통해 PGM1의 발현이 감소되었을 때 *O*-GlcNAc 변형이 감소되는 것을 관찰하였고, 또한 세포 내 스트레스를 유발하기 위해 포도당 결핍의 상황을 주었을 때 *O*-GlcNAc 변형의 패턴이 변화하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 암 세포에서 PGM1의 발현에 따라 세포 내 *O*-GlcNAc 변형이 변화가 되어 암 세포의 성장이 조절되는 지를 확인하는 것 또한 앞으로의 중요한 연구 과제가 될 것이라 생각한다.

V. 결론

PGM1의 효소 활성이 카르복시기 말단에 위치한 562번째 threonine 잔기에 의해 조절 될 수 있다. PGM1의 발현을 감소시키면 세포 내 글리코겐의 양이 감소되었으며, 포도당 고갈에 따른 글리코겐의 분해 속도와 합성 속도 또한 감소되었다. 또한, 세포 내 스트레스에 대한 반응으로 나타나는 *O*-GlcNAc 변형이 감소되었다. 앞으로 이를 연관시켜 PGM1 자체의 활성 조절에 따른 세포 내 스트레스 반응의 변화 기전에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Alberghina L, Gaglio D, Gelfi C, Moresco RM, Mauri G, Bertolazzi P, et al. Cancer cell growth and survival as a system-level property sustained by enhanced glycolysis and mitochondrial metabolic remodeling. *Front Physiol* 2012;3:362-84
2. Stojkovic T, Vissing J, Petit F, Piraud M, Orngreen MC, Andersen G, et al. Muscle glycogenosis due to phosphoglucomutase 1 deficiency. *N Engl J Med* 2009;361:425-7
3. Lee YS, Marks AR, Gureckas N, Lacro R, Nadal-Ginard B, Kim DH. Purification, characterization, and molecular cloning of a 60-kDa phosphoprotein in rabbit skeletal sarcoplasmic reticulum which is an isoform of phosphoglucomutase. *J Biol Chem* 1992;267:21080-8.
4. Jayant G, Joshi H, Philip H. Purification and properties of pgm from e.coli. *J Biol Chem* 1964;239:2741-51.
5. Brigitta E, Silvia DF, Gregor F. Theoretical investigation of the enzymatic phosphoryl transfer of beta-phosphoglucomutase: revisiting both steps of the catalytic cycle. *J Mol Model* 2012;18:3169-79.
6. Venkataraman J, Murray LJ. PGM mechanism and action. *J Mol Model* 1949;179:569-75.
7. Mehra-Chaudhary R, Mick J, Tanner JJ, Henzl MT, Beamer LJ. Crystal structure of a bacterial phosphoglucomutase, an enzyme involved in the virulence of multiple human pathogens. *Proteins* 2011;79:1215-29.
8. Dai J, Wang L, Allen KN, Radstrom P, Dunaway-Mariano D. Conformational cycling in beta-phosphoglucomutase catalysis: reorientation of the beta-D-glucose 1,6-(Bis)phosphate intermediate. *Biochemistry* 2006;45:7818-24.
9. Gururaj A, Barnes CJ, Vadlamudi RK, Kumar R. Regulation of phosphoglucomutase 1 phosphorylation and activity by a signaling kinase. *Oncogene* 2004;23:8118-27.
10. Pelletier J, Bellot G, Gounon P, Lacas-Gervais S, Pouyssegur J, Mazure NM. Glycogen synthesis is induced in hypoxia by the

- Hypoxia-Inducible Factor and promotes cancer cell survival. *Front Oncol* 2012;2:18.
11. Kang JG, Park SY, Ji S, Jang I, Park S, Kim HS, et al. O-GlcNAc protein modification in cancer cells increases in response to glucose deprivation through glycogen degradation. *J Biol Chem* 2009;284:34777-84.
 12. Laczy B, Hill BG, Wang K, Paterson AJ, White CR, Xing D, et al. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H13-28.
 13. Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, et al. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-Linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* 2002;106:466-72.
 14. Golks A, Tran TT, Goetschy JF, Guerini D. Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. *EMBO J* 2007;26:4368-79.
 15. Han I, Roos MD, Kudlow JE. Interaction of the transcription factor Sp1 with the nuclear pore protein p62 requires the C-terminal domain of p62. *J Cell Biochem* 1998;68:50-61.
 16. Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:514-9.
 17. Ruan HB, Singh JP, Li MD, Wu J, Yang X. Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:301-9
 18. Vigoda A, Mamedova LK, Shneyvays V, Katz A, Shainberg A. Glycogen metabolism in rat heart muscle cultures after hypoxia. *Mol Cell Biochem* 2003;254:311-8.
 19. Whitehouse DB, Putt W, Lovegrove JU, Morrison K, Hollyoake M, Fox MF, Hopkinson DA, Edwards YH. Phosphoglucomutase 1 complete human and rabbit mRNA sequences and direct mapping of this highly polymorphic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:411-5.
 20. Luis RM, Guillermo O, Luiz AV, Aida AP, Ruiz H. Partial purification and some properties of b-PGM from *Lactobacillus brevis*. *Arch Biochem Biophys* 1984;228:592-9.
 21. Arimura T, Inagaki N, Hayashi T, Shichi D, Sato A, Hinohara K, et al. Impaired binding of ZASP/Cypher with

- phosphoglucomutase 1 is associated with dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2009;83:80-8.
22. Perez B, Medrano C, Ecay MJ, Ruiz-Sala P, Martinez-Pardo M, Ugarte M, et al. A novel congenital disorder of glycosylation type without central nervous system involvement caused by mutations in the phosphoglucomutase 1 gene. *J Inherit Metab Dis* 2012;36:535-42
 23. Nishinari M, Aoyama N, Ogawa Z, Yukino S, Oka S, Yano K, et al. Phosphoglucomutase activity as a novel biomarker in patients with acute myocardial infarction. *Cir J* 2012;76:2197-203.
 24. Mattaini KR, Vander Heiden MG. Cancer. Glycosylation to adapt to stress. *Science* 2012;337:925-6.
 25. Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem* 2004;279:30133-42.
 26. Olivier-Van Stichelen S, Guinez C, Mir AM, Perez-Cervera Y, Liu C, Michalski JC, et al. The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of beta-catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302:E417-24.
 27. Ma Z, Vocadlo DJ, Vosseller K. Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-kappaB activity in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2013;288:15121-30.

ABSTRACT

Regulation of phosphoglucomutase1 activity and elucidation of its physiological function

Eunju Bae

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor **Kyung Sup Kim**)

Phosphoglucomutase1 (PGM1) catalyses the inter-conversion between glucose-1-phosphate (G-1-P) and glucose 6-phosphate (G-6-P) in carbohydrate metabolism. G-1-P and G-6-P act as key initiative molecules for glycogenesis and glycolysis, respectively. So, PGM1

enzymatic activity is important for both pathways. However, the specific regulation of its activity, other than its role in the enzymatic process itself, is unknown. And there are few researches to figure out its physiological role. Here, we focused distinct four threonine residues at c-terminus of PGM1. Using site-directed mutagenesis, we made several PGM1 mutants that each threonine residues have replaced with glutamic acid or alanine residues. As a result, we found the PGM1 mutant (T553E, All→E) has low protein expression. In addition, we showed that T562A mutant has reduced enzymatic activity and T562E mutant lost it.

We observed that glycogen content was reduced in the PGM1 knockdown stable cell line. When cell culture media has no glucose, the rate of glycogenolysis was slowed in the PGM1 knockdown stable cell line (PGM1 K/D). In addition, the culture media was changed to 10 mM glucose media after glucose deprivation for 24 h. The rate of glycogen synthesis was also slowed in the PGM1 K/D. Besides cellular *O*-GlcNAc modification is changed by PGM1 expression level. Using siRNA to reduce the expression of PGM1, cellular *O*-GlcNAc modification was reduced in HEK293 and A549 in normal media (25

mM glucose) and it was less increased in response to glucose deprivation.

From these results, we report that the c-terminus of PGM1 is important for enzymatic activity, especially 562 threonine residue is directly involved in the regulation of enzymatic activity. So we identify that PGM1 enzyme activity may be regulated by its c-terminus modification in physiological environment. And also PGM1 expression affects glycogen usage and cellular *O*-GlcNAc modification in response to glucose deprivation.

Key words: PGM1, enzyme activity, glycogen, *O*-GlcNAc modification