

이학 석사학위 논문

세포노화 과정 중 G-actin의 핵 내  
축적 : Exportin 6와 Ran-GTP의  
발현 및 분포 변화

아주대학교 대학원

의학과

박수현

세포노화 과정 중 G-actin의 핵 내  
축적 : Exportin 6와 Ran-GTP의  
발현 및 분포 변화

지도교수 임 인 경

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

2008 년 8 월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

박 수 현

박수현의 이학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 임 인 경 인

심 사 위 원 윤 계 순 인

심 사 위 원 박 태 준 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2008년 6월 23일

## 세포노화 과정 중 G-actin 의 핵 내 축적:

### Exportin 6 와 Ran-GTP 의 발현 및 분포 변화

**목적:** Actin 은 대부분의 세포에 존재하는 단백질로써 세포질과 핵을 이동하면서 각각 특정한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 세포질에서는 cytoskeleton 으로서의 역할이 대표적으로 알려져 있으며 핵에서의 역할에는 여러 가지가 보고되고 있지만 그 중에 전사를 조절하는 요소로써 작용하는 역할이 중요하고 흥미롭다고 생각 되고 있다. 이러한 actin 이 활성산소나 열 자극과 같은 외부적인 스트레스에 의해서 핵으로 이동하는 현상이 여러 곳에서 보고된바 있고 노화가 진행되는 세포에서도 actin 이 핵으로 이동해서 축적되는 현상을 관찰하였다. 지금까지 actin 이 핵과 세포질로 이동하는데 관여하는 단백질에 대해 보고된 바에 의하면 actin 을 핵으로 들여보내기 위한 역할을 하는 단백질에는 cofilin 이 알려져 있고, 핵 내 actin 을 세포질로 이동시키는 역할은 CRM1 이 한다고 알려져 있다. 그러나, exportin 6 라는 새로운 단백질이 보고되고 이것 또한 actin 을 핵 내에서 세포질로 이동시키는 역할을 한다고 보고된 바 있으며, 이 단백질을 발견한 그룹에서는 actin 을 세포질로 이동시키는데 CRM1 의 작용은 관찰하지 못했다고 보고하였다. 따라서 CRM1 보다는 exportin-6 가 actin 을 세포질로 이동시키는 역할을 한다는 내용이 보편적으로 받아들여지고 있는 실정이다. 본 실험에서는 노화가 진행될 때 actin 이 핵에 축적되는 현상의 기전을 actin 의 import 와 export 차원에서 관여하는 단백질들의 나타나는 변화를 알아보고자 하였다.

**재료 및 방법:** HDF 젊은 세포를 계대배양하면서 replicative senescence 를 유도하고, 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 의 농도로 한번 처리하여 조기노화 세포를 만들었다. 세포노화의 진행정도는 Senescence associated- $\beta$ -galactosidase assay (SA- $\beta$ -gal)와 세포성장을 측정으로 보고하였다. Actin, Ran 그리고 exportin 6 의 단백질 발현과 세포 내 위치변화는 western blot 과 면역형광염색을 수행하여 측정하였다. 세포 내 exportin 6 의 mRNA 발현양은 RT-PCR 로 측정하였으며 Exportin 6 와 actin 과의 결합을 보기 위해서 flag-exp6 발현 벡터를 제작해 이를 transfection 하여 immunoprecipitation 의 수행으로 측정하였다.

### **결과:**

1. HDF 젊은 세포를 계대배양으로 노화된 세포에서 SA- $\beta$ -gal 활성이 증가하고, 세포성장이 떨어지는 것을 관찰할 수 있었고, 세포노화표지자인 SA-p-Erk1/2 와 p53 의 발현이 HDF 노화 세포에서 증가하는 것을 관찰하였다.
2. 젊은 세포와 노화된 세포의 세포질과 핵을 별도로 분리하여 western blot 으로 관찰한 결과 노화 세포의 핵 분획에서 actin 발현이 증가하는 것을 관찰하였고 immunocytochemistry 를 통해서도 노화된 세포에서 actin 이 핵에 축적되어 있는 것을 관찰 하였다.
3. 젊은 세포에서나 노화 세포에서 cofilin 의 발현은 차이가 없으나 p-cofilin 발현 감소하는 것을 관찰 하였다. 또한 노화 세포의 핵 분획에서 cofilin 이 증가하는 것을 관찰하였다.
4. Exportin 6 발현 벡터를 제작해 Huh7 와 NIH3T3 세포에 transfection 해서 actin 과의 결합여부를 확인한 결과 상호 결합하는 것을 확인하였다.
5. 노화된 세포에서 exportin 6 의 mRNA 그리고 protein 발현이 감소하는 것을 관찰하였다.
6. 노화된 세포에서 Ran 의 발현이 감소하는 것을 관찰하였다.

7. 젊은 세포의 핵에 존재하던 Ran 단백질이 노화 세포에서는 모두 세포질에서 관찰되었다.
8. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 를 한번 처리한 후 5 일 동안 배양하여 노화를 유도시켰다는 것을 SA-β-gal 실험을 통해 관찰하였다. 하지만 활성화 정도가 약하게 관찰되어 노화가 약하게 유도되었다고 예상할 수 있었다.
9. 노화를 유도시킨 세포에서 exportin 6 와 Ran 의 발현차이는 관찰되지 않았으나 p-cofilin 의 발현은 감소되는 것을 관찰하였다.
10. 노화 세포와 같이 유도 노화 세포에서도 Ran 단백질 발현은 핵보다 세포질에서 크게 증가하는 것을 관찰하였다.

**결론:** HDF 젊은 세포를 계대배양으로 노화시키는 경우 노화가 진행되었음을 여러 가지 노화표지자로 측정하였고, 이러한 세포에서 actin 의 위치가 핵에 존재한다는 것을 면역형광염색법과 세포질과 핵 분획을 통해서 확인하였다. 그리고 actin 을 핵으로 들여보낸다고 알려진 cofilin 의 인산화 정도를 관찰한 결과 노화 세포에서 cofilin 인산화가 감소되는 것을 알 수 있었지만 cofilin 의 발현에는 변화가 없었다. 또한 cofilin 의 위치를 알아보기 위해 세포질과 핵 분획으로 나누어 cofilin 의 위치변화를 보았는데 노화 세포의 핵 내에서 cofilin 이 증가하는 것을 관찰함으로써 노화가 진행되면 cofilin 의 활성화가 높아져 G-actin 이 많아지고 cofilin 이 더 많은 actin 을 핵으로 들여보낼 것이라는 결론은 얻게 되었다. Actin 을 세포질로 내보낸다고 알려진 exportin 6 가 actin 과 결합하는 것을 확인한 후 노화 세포에서 발현을 관찰하였더니 mRNA 와 단백질 발현이 의미있게 감소하는 것을 관찰했다. 또한 exportin 6 가 actin 을 세포질로 이동시키는데 중요한 요소로 작용하는 Ran 의 위치변화를 관찰한 결과 젊은 세포에서는 핵에 많이 존재했던 Ran 이 노화 세포에서는 세포질로 이동하는 것을 관찰하였으며 Ran 의 단백질발현 또한 감소하는 것을 관찰하였다. 이 결과로 노화가 진행되면 exportin 6 의 발현감소로 인해 actin 과 결합하는 비율이 줄고

세포질에 있는 Ran 의 증가로 exportin 6 의 기능 또한 저하될 것이라 예상할 수 있다. 노화 세포에서 발견된 현상들이 유도 노화 세포에서도 동일하게 관찰되는지 알아보기 위해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 를 한 번 처리한 후 5 일 동안 배양하여 세포 노화를 유도하였다. 이때, SA-β-gal 발현이 증가 했으며 이 때 exportin 6 와 Ran 의 발현변화, cofilin 의 인산화 정도 그리고 Ran 의 위치변화를 관찰하였다. 그 결과 노화가 유도된 세포에서 cofilin 의 인산화 정도가 감소하는 현상을 관찰하였고 Ran 의 위치가 세포질로 변하는 것을 관찰했으나 exportin 6 와 Ran 의 발현이 감소하는 현상은 관찰되지 않았다. 그 이유는 노화가 유도된 세포가 SA-β-gal 에 약하게 염색되었는데 이는 노화가 약하게 유도되었다는 것을 예상할 수 있으며 따라서 노화가 더 진행되면 exportin 6 와 Ran 의 발현이 감소할 것이라 예상된다. 결과적으로, 노화된 세포에서 actin 이 핵에 축적되는 이유는 cofilin 의 활성화가 증가되어 actin 을 더욱 핵으로 많이 들여보내고 반면에 exportin 6 의 발현감소로 인해 actin 과 결합해 세포질로 내보내는 확률이 낮아지고 Ran 이 세포질로 이동하면서 활성이 저하되어 actin 과 결합된 exportin 6 가 세포질로 나가는 기능이 억제되기 때문이라는 추정을 할 수 있다.

---

핵심어: Exportin6, cofilin, 세포노화유도, HDF, Huh7, Ran

# 차 례

국문요약 .....	i
차례 .....	v
그림차례 .....	vii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	7
A. 세포 배양 .....	7
B. Exportin6 발현벡터 클로닝 .....	7
C. 면역형광세포염색 .....	8
D. RNA분리와 RT-PCR .....	9
E. Transfection .....	9
F. 세포질과 핵의 분리 .....	10
G. Senescence associated-β-galactosidase assay .....	10
H. Immunoprecipitation .....	11
I. 세포 수 집계 .....	11
J. Western blot analysis .....	12
K. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 를 이용한 노화 유도 .....	12
III. 결 과 .....	13
A. 노화된 세포에서 핵 내에 위치하는 actin 확인 .....	13
B. 노화된 세포에서 핵 내에 위치하는 cofilin의 증가와 phosphorylation 감소 .....	14
C. Exportin 6와 actin의 결합 .....	15
D. 노화된 세포에서 exportin 6의 발현감소 .....	16
E. 노화된 세포에서 Ran의 위치변화와 발현감소 .....	17
F. 노화를 유도시킨 세포에서 Ran의 위치변화와 변화없는 exportin 6와 Ran의 발현 .....	18



IV. 고찰 .....	35
V. 결론 .....	39
참고문헌 .....	41
영문요약 .....	45

## 그림 차례

Fig. 1. Model of nucleocytoplasmic transport mechanism .....	19
Fig. 2. Increased doubling time indicated senescence, evidenced by various senescence marker .....	20
Fig. 3. Actin translocated in nucleus during senescence .....	22
Fig. 4. Cofilin is translocated in the nucleus and dephosphorylated during senescence ...	23
Fig. 5. preparation of exportin 6 expression vector (flag-exp6) .....	25
Fig. 6. Exportin 6 bound with actin in normal condition .....	26
Fig. 7. Expression of exportin 6 was reduced in the replicative senescent cells .....	27
Fig. 8. Exportin 6 was abundant in cytoplasm, but localization was not detected by Western blot .....	28
Fig. 9. Senescence collapsed Ran distribution and reduced Ran expression .....	30
Fig. 10. Exportin 6 and Ran were not colocalized .....	31
Fig. 11. Cofilin phosphorylation decreased Ran transported to the cytoplasm, but Ran exportin 6 expression were not changed in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced senescent cells .....	33
Fig. 12. Summry about mechanism of nuclear actin accumulation in replicative Scenesence and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced premature senescence .....	34

## I. 서 론

노화는 크게 두 가지 종류로 나눌 수 있는데 한 가지는 세포가 일정 횟수로 분열한 후 더 이상 분열할 수 없는 상태에 이르게 되는 ‘replicative cellular senescence’ (Chen 와 Shen, 2007) 와 정상 세포가 오랫동안 스트레스에 노출되어 있는 경우에 진행되는 ‘stress-induced premeature senescence (SIPS)’ 이다 (Serrano 와 Blasco, 2001). Replicative cellular senescence 는 대사과정 동안에 미토콘드리아에서 생성된 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)가 세포 내 거대분자에 손상을 주게 되고 결국 세포의 기능을 감소시켜 초래하게 된다 (Harman, 2001). Stress-induced premature senescence (SIPS)는 자외선, 약물 또는 cytokine 등 세포 외의 자극에 의한 스트레스 (Chen 와 Ames, 1994;Duan 등, 2005)나 DNA 손상 (Robles 와 Adami, 1998)을 입었을 경우에 SIPS 가 유도되는 것으로 보고되어 있으며 이는 세포 내 활성 산소가 증가되어 매개하는 것으로 알려져 있다. 또한 세포증식을 유도하는 발암유전자의 과발현에 의해서도 SIPS 가 유도된다 (Serrano 등, 1997;Zhu 등, 1998). 세포 노화의 가장 두드러지는 특징은 더 이상 세포분열을 할 수 없다는 것으로 (Hayflick, 1965), 즉 세포분열주기의 G<sub>1</sub> 주기에서 S 주기로 넘어가는 시점에서 멈추어 있으며 (Sherwood 등, 1988), 노화된 세포는 성장을 촉진시키는 자극에 반응하여 DNA 를 복제를 하지 못하는 것으로 알려져 있다 (Cristofalo 와 Pignolo, 1993). 그러나 대사적인 측면에서는 활성화되어 있는 상태이다 (Sanes 등, 1990). 다른 중요한 특징은 세포모양의 변화로서 젊은 섬유아세포 (fibroblast)는 비교적 작고 가는 모양인 반면에 노화된 세포는 세포크기가

커지면서 납작하고 다양한 모양을 가지고 있다. 또한 세포의 증식능력 제한에 가장 본질적인 원인인 telomere 길이 감소가 노화 과정 동안에 나타나는 것으로 보고 되어 있다.

Actin 은 모든 진핵세포에 존재하며 일반적인 세포질 분열, 세포의 운동성, 세포 모양, 세포 성장 등 여러 가지 생물학적 현상에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Wada 등, 1998). 세포에서 대부분의 Globular actin (G-actin)은 thymosin, profilin, cofilin 그리고 다른 작은 단백질들과 복합체를 이루어 존재하며 profilin 에 의해서는 fibrous actin (F-actin)의 형성을 유도하고 탈인산화 된 cofilin 에 의해서는 F-actin 에서 G-actin 으로의 형성을 유도한다. G-actin 은 42 kDa 으로 핵으로 들어가기에 충분한 크기이지만 nuclear pore complex (NPC)를 통과하는 흐름이 완전히 제한되어 있어 대부분의 세포에서 actin 은 세포질에 존재한다. 하지만 열 충격, DMSO 와 같은 자극에 의해서 actin 은 핵으로 이동한다고 알려져 있고 (Bohnsack 등, 2006;Wada 등, 1998), mass spectrometry (Jonsson 등, 2001) 와 immunoreactivity criteria (Hofmann 등, 2004)의 결과로 인해 핵 내에 들어가는 actin 은  $\beta$ -actin 일 것이라 보고되었다 (Percipalle 와 Visa, 2006). 본 연구실에서는 세포의 자연노화뿐만 아니라 각종 스트레스에 의한 유도노화 과정 중에 G-actin 이 핵 내에 축적되는 현상을 발견하여 보고하였으며 (Lim 등, 2000), 이러한 현상은 정상세포나 각종 암세포 등에서 모두 발견되는 현상으로, 이를 세포노화의 마커로써 발표 한 바 있다 (Kwak 등, 2004) . 이렇게 핵 내에 존재하는 actin 을 nuclear actin 이라 명명되고 있으며 이들은 핵 안에서 다양한 역할을 수행하는 것으로 알려져

있다. 첫 번째로, 전사를 조절하는 인자로 알려져 있다. 세 개의 모든 RNA polymerase (Pol I, II, III)는 전사를 진행하기 위해 actin 을 필요로 한다고 알려졌으나 (Chen 와 Shen, 2007), nuclear myosin I 과 같이 RNA polymerase II 와 결합하여 전사를 억제하는 것을 *in vitro* transcription assay 를 통해서 밝혀져 전사를 억제한다고도 알려져 있다 (Bettinger 등, 2004). 두 번째는, mRNA 와 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP)을 핵 밖으로 내보내는 역할을 한다. Actin 에는 HIV-1 mRNA export 요소인 Rev 에 존재하는 nuclear export signal (NES)과 유사한 서열이 존재해 eukaryotic initiation factor-5A (eIF5A)와 결합해 Rev 에 의해 매개 되어져 mRNA 가 핵 밖으로 나가게 된다고 알려져 있으며, snRNP 복합체의 구성요소로 nuclear DNA helicase-II (DNH II)와의 결합을 통해서 snRNP 를 핵 밖으로 내보내는 역할을 한다고 알려져 있다 (Bettinger 등, 2004). 세 번째로, chromatin-remodeling 을 조절하는 역할을 수행한다. Actin 이 포유류의 chromatin-remodeling 요소인 BAF 복합체 (BRG-associated protein 복합체) 에서 순수 분리되었으며 (Zhao 등, 1998), 초파리의 chromatin-remodeling 복합체인 BAP 복합체에서도 순수분리 되었다고 발표되었기 때문이다. 그리고 흥미롭게도 한 BAF 복합체 당 오직 하나의 actin 만 결합을 하고 있다고 보고되었다 (Bettinger 등, 2004). 마지막으로 nucleoskeleton 으로서 핵의 내부구조를 지탱하는 역할을 한다. 핵 안에서 type-V IF (intermediate filament) 단백질과 nuclear lamin, actin 은 구조적 이고 기능적으로 다양한 분자적인 기법에 의해서 연결되어 있을 거라고 발표되었다 (Shumaker 등, 2003).

actin 을 핵으로 이동시키는 단백질로 cofilin 이 알려져 있다 (Fig. 1A). cofilin 은 actin 과 결합 할 수 있는 단백질로 18kDa 의 크기이며, nuclear location signal (NLS)과 유사한 KKRKK sequence 를 가지고 있으며 열 충격에 의해서 actin 과 유사하게 cofilin 도 핵 내에 축적하는 것을 관찰했다 (Iida 등, 1992). 그리고 Mast cell 에서 latrunculin B 처리 또는 ATP 가 고갈 되었을 때 cofilin 에 의해서 actin 이 핵으로 이동 되어진다고 보고된 바 있다 (Pendleton 등, 2003). 반면에 핵으로부터 세포질로 actin 을 이동시키는 단백질로는 CRM1 과 exportin 6 (exp6)가 관여한다고 알려져 있다. actin 에는 두 개의 nuclear export signal (NES) 이 존재해 CRM1 에 의해서 세포질로 이동된다고 알려졌으며 실제로 CRM1 의 기능을 억제시키는 leptomycine B 를 처리하면 actin 이 핵 내에 축적되어있는 것을 관찰 할 수 있다 (Wada 등, 1998). 하지만 최근의 실험 결과를 따르면 CRM1 은 actin 을 핵 밖으로 내보내는데 주요하게 그리고 직접적인 역할을 하지 않는다고 발표되었다 (Stuven 등, 2003). 또 다른 조절인자로 exportin 6 가 새로운 단백질로서 발견되었으며 (Fig. 1B) 이는 importin- $\beta$  family 에 속하고 아메바부터 척추동물에 이르기까지 모든 생물에 존재하고 있다. Exportin 6 는 수용성 G-actin 과 결합하기는 하지만 profilin 에 의해서 그 결합 이 촉진되어지며 profilin 이 G-actin 에 선택적으로 결합한 후 nuclear export 요소인 exportin 6 에 인지 됨으로써 결국에는 exportin 6- profilin  $\cdot$  soluble G-actin complex 가 핵으로부터 세포질로 배출되는 것으로 보고 되어있다 (Stuven 등, 2003). 게다가 최근에 *Xenopus* oocyte 에서는 선택적으로 actin 이 핵 밖으로 나가는 것을 억제하는 것이 관찰되는데 그

이유가 exportin 6 의 발현이 없기 때문이고 이러한 현상은 *Xenopus oocyte* 의 핵을 보호하는 역할을 한다고 발표 되었다 (Bohnsack 등, 2006).

신호에 의해 운반체가 핵으로 들어가 축적되거나 세포질로 나와 축적되기 위해서는 에너지를 요구하게 되는데 이런 역할은 small GTPase Ran 과 연결됨으로서 가능해진다 (Moore, 1998). 세포질과 핵의 이동에는 karyopherin- $\beta$  (kap- $\beta$ ) superfamily 가 주요하게 작용하지만 이들 모두는 GDP 형태보다는 GTP 형태와 결합된 ran 과 결합하여 하나의 기능적인 특성을 가질 수 있다고 발표되었다 (Nakielny 와 Dreyfuss, 1999). RanGTP 의 분포는 세포질에 매우 적고 대부분 핵 내에 존재하는데 그 이유는 GTP 형태를 GDP 로 전환시키는 Ran GTPase activating protein(GAP)이 세포질에 존재하고 GDP 형태를 GTP 로 전환시키는 Ran guanine nucleotide exchange factor (GEF) (RCC1)이 핵 내에 존재하기 때문이다. 이러한 핵막을 경계로 세포질과 핵 사이의 RanGTP 의 전위차는 단일방향성으로 이동하기 위한 위치적인 정보를 제공한다고 보고되었다 (Gorlich 등, 1996;Izaurralde 등, 1997). 운반체를 핵으로 들여보낼 때는 RanGTP 가 없는 상태에서 진행되나 핵으로 들어오게 되면 RanGTP 와 결합해 운반체와의 분리를 쉽게 도와주게 된다. 반면에 세포질로 운반체를 내보낼 때에는 RanGTP 가 직접 결합해 작용한다. 세포질에 위치해 GDP 형태와 결합되어 있는 Ran 은 다시 핵으로 위치하기 위해 nuclear transport factor 2 (NTF2) 에 의해서 핵 안으로 들어오게 되며 (Smith 등, 1998), 이때 actin binding protein 중 gelsolin family 에 속하지만 gelsolin 과 같지않은 CapG 또한 같이 핵으로 들여 보낸다는 보고가 있다 (Van Impe 등, 2008). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , 열

충격 그리고 UV 에 의한 스트레스가 가해 졌을 때 세포 내에 존재하는 ATP 의 비율이 감소하면서 Ran 의 위치가 핵 내에서 세포질로 바뀌게 되는 현상을 볼 수 있고 단순히 ATP 만 감소시켜도 Ran 의 위치가 변하게 된다는 내용이 보고되었다 그리고 이때 활성을 가지고 있지 않은 RanGDP 가 증가한다는 것을 관찰하였다. (Yasuda 등, 2006).

본 연구에서는 세포노화의 마커로써 알려진 actin 의 핵 내 축적 현상에 exportin 6 와 Ran 그리고 cofilin 이 어떻게 관여 하는지를 세포의 자연노화와 유도노화 과정에서 규명하고자 한다.



## II. 재료 및 방법

### A. 세포 배양

HDF(human diploid fibroblasts) 세포를 열 처리하여 불활성화 시킨 fetal bovine serum (FBS)(GibcoBRL, Life technologies, NY) 10%와 1% antibiotics (GibcoBRL, Life technologies, NY)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, high glucose, GibcoBRL, Life technologies, NY)를 사용하여 37℃에서 세포를 배양하였으며 세포가 가득 찼을 때를 기준으로 population doubling (PD)의 수를 다음 실험을 위하여 모니터링 하였다. NIH3T3 세포는 10% calf serum (GibcoBRL, Life technologies, NY)을 첨가한 DMEM 을 이용해 세포를 배양하였고 Huh7 세포는 10% FBS 를 첨가한 DMEM 을 사용해 배양하였다.

### B. Exportin 6 발현 벡터 클로닝

Exportin 6 primer 를 제작 ( sense: 5'-CATGGCATCTGAAGAAGCATCTCTCAGG-3', anti-sense: 5'-CCTAGAGCTTCACAGTGCCAGGGGGCAG-3') 후 HDF 세포에서 얻은 cDNA 를 주형으로 하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 이용해 exportin 6 의 서열을 증폭하였다. 다음으로 TA cloning (pGEM-T vector:promega)을 수행하고 Nco I 제한효소를 처리하여 insert 의 존재를 확인 한 후 T7 와 SP6 promoter 와 제작한 sequencing primer (sense: 5'-TCGGGGATGTGTTTGCT-3', 5'-GAGAAAGATGCC ACTGGA-3', 5'-AACAAATGCCACACAGTGAA-3' anti-sense: 5'-AACTCCACCACAGGGA ACTG-3')를 이용해 염기서열분석 (sequencing, Solgent, Daejeon,

korea )을 의뢰해 돌연변이가 존재하는 부위를 알아내고 돌연변이 된 부위를 수정하였다. 다음으로 이 단백질을 발현시키기 위해 flag vector 를 발현벡터로 선정하였다. 벡터에서는 Sac II 와 EcoR V 로 잘랐고 exportin 6 가 존재하는 TA cloning 벡터에서는 Hind III 와 Nde I 으로 잘라 subcloning 하였다.

### C. 면역형광세포염색 (Immunocytochemistry)

Coverslip 을 깔아 놓은 plate 에 HDF 젊은과 HDF 노화를 각각 25% 정도 분주 후 24 시간이 지나면 coverslip 을 꺼내 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후 4% paraformaldehyde (in PBS) 용액으로 20 분 상온에서 고정시켰다. Coverslip 에 고정된 세포를 PBS 로 두 번 세척한 후 0.1% tween-20 이 들어간 PBS (PBST)를 5 분씩 3 번 두어 세포를 투과 (permeabilization) 시켰다. 다음 3% BSA (bovine serum albumin) 이 들어있는 PBST 로 1 시간 상온에서 blocking 한 후 보고자 하는 단백질에 대한 첫 번째 항체 (1:200)를 12 시간 동안 4℃에서 반응시켰고, PBS 로 3 번 세척 후 0.1% BSA 가 들어있는 PBST 에 15 분간 다시 blocking 하였다. 그리고 형광물질이 결합되어있는 이차항체와 (1:200) Hoechst (4',6-diamidino-2-phenylindole, sigma, St Louis)(1:50000)를 상온에서 1 시간 동안 반응시키고 PBS 로 4 번 세척하였다. 마지막으로 100% glycerol 로 mounting 하여 형광 현미경 (Carl zeiss, Axioimager M1, Axiovision 4.5 software)을 이용해 관찰 하였다.

#### **D. RNA 분리와 RT-PCR**

세포를 60mm plate 에 분주한 후 24 시간 이후에 total RNA 를 분리하기 위해 Guanidium Thiocyanate 용액 (GT, 4M guanidium thiocyanate, 25mM sodium citrate, pH 7.0, 0.5% N-Lauryl sarcosine, 0.1M 2-mercaptoethanol in DEPC water)을 이용하였다. 다음 cDNA 를 합성하기 위해 1 $\mu$ g 의 total RNA 를 SuperScript™ II Reverse transcriptase (invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 oligo dT primer 을 이용해 진행하였으며 합성된 cDNA 를 primer (Exportin 6 , 144bp, sense: 5'-AACAAATGCC CACACAGTGAA-3', anti-sense: 5'-AACTCCACCACAGGGAAGT-3')와 e-taq (solgent, DaeJeon, Korea)을 이용하여 증 폭하였다. 샘플 당 cDNA 의 양적인 비교를 위해서는 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primer (196bp, sense: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3', anti-sense: 5'-CAAAG TTGTCATGGATGACC-3')를 이용하였다. 다음 증폭된 DNA 를 1.5%나 2% agarose gel 로 전기 영동하여 관찰하였다.

#### **E. Transfection**

세포 밀도를 50% 되도록 60mm 또는 100mm plate 에 NIH3T3 세포 또는 Huh7 를 분주한 후 14 시간 이후에 Flag-exportin 6 DNA 와 Flag 벡터 DNA 를 각각 OPTI-MEM (GibcoBRL, Life technologies, NY)에 2-4 $\mu$ g 씩 넣고 lipofectamin (invitrogen, carlsbed, CA, USA)은 동량의 OPTI-MEM 에 DNA 농도의 2.5 배 되도록 에 넣은 후 DNA 와 lipofectamin 을 섞어 25 분 반응시켰다. 다음으로 25 분이 되기 전에 미리 serum 이 들어있지 않은 배지를 넣은 plate 에 반응물을

떨어뜨린 후 5 시간 동안 37°C에서 배양 후 serum 을 넣어서 밤새 다시 배양하였다. 그리고 배지를 갈아주고 1 일 후 에 수확하여 필요한 실험을 진행하였다.

#### **F. 세포질과 핵의 분리**

세포를 trypsin-EDTA 로 수확한 후, PBS 로 세척하고 차가운 TD 용액(25mM tris, pH8.0, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM DTT, 0.01%PMSF, 1µg leupeptin)을 250µl 넣은 후 상온에서 5 분 방치한 후 10% NP-40 1.25µl 넣고 2 분간 상온에서 방치하면서 세포막을 깨주었다. 그 후 1000g 에서 20 분간 원심분리 하여 상층액과 침전물을 분리하였다. 상층액은 세포질 분획으로 상용하였고, 침전물은 TD 용액으로 3 번 세척 한 후 BL 용액(0.4M LiCl, 10mM tris pH8.0, 0.5mM DTT, 0.01% PMSF, 1µM leupeptin)을 넣고 상온에서 5 분 방치 후 세게 흔들어 주면서 세포의 핵막을 깨 주었다. 다음 12000 rpm 으로 20 분간 원심분리하여 상층액을 핵 추출물로 사용하였다.

#### **G. senescence associated-β-galactosidase (SA-β-gal) assay**

자연노화 된 HDF 와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 를 통해 HDF 유도 노화 세포를 35mm plate 에 5 x 10<sup>4</sup> 으로 분주한 후 24 시간 후에 배지를 제거한 다음 PBS 로 세척하고 3% formaldehyde (in PBS) 용액으로 상온에서 5 분간 고정했다. PBS 로 두 번 정도 세척하고 새로 제조한 X-gal 염색용액 (1mg/ml X-gal [in dimethylformamide], 0.1M citric acid/sodium phosphate buffer, pH6.0, 5mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 150mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub> )을 가하고 37°C humidified chamber 에서

12-24 시간 동안 반응시킨 후 SA- $\beta$ -gal 활성 증가를 광학 현미경으로 관찰하였다.

#### **H. Immunoprecipitation (IP)**

세포를 trypsin-EDTA 로 수확한 후 PBS 로 세척해주고 E1A(50mM HEPES, pH7.0, 150mM NaCl, 0.1% NP-40, 5mM EDTA, 1mM dithiothreitol [DTT], protease inhibitors) 용액으로 세포를 풀어준 후 sonication 하였다. 그 후 12000 RPM 으로 10 분 동안 원심분리 한 후 상층액 만을 취하여 정량하고 총 단백질 농도가 300 $\mu$ g 되도록 부피를 맞춘 후 15 $\mu$ l 의 proten G agarose beads (invitrogen, carlsbad, CA, USA)를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 미리 반응시켜 pre-clear 하였고 2000 RPM 에서 5 분간 원심분리 해 상층액 만을 얻어 anti-flag antibody 를 넣고 12 시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 rotation 하며 반응시켰다. 12 시간 후에 20  $\mu$ l 의 proten G agarose beads 를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 rotation 시키며 2 시간 반응시킨 후 E1A 용액으로 3 번 세척한 후 2x sample buffer 을 넣고 100 $^{\circ}$ C에서 5 분간 끓여 western blot 을 통해서 관찰하였다.

#### **I. 세포 수 집계 (Cell number counting)**

세포를 12 well plate 에 well 당  $1 \times 10^4$  으로 분주한 다음, 각 3 일, 5 일, 7 일 별로 trypsin 을 처리해 세포를 떼어낸 후 hemacytometer 를 이용해 세포 수를 계산하였다.

## J. Western blot analysis

HDF 젊은 세포와 HDF 노화 세포들을 수거하여 RIPA buffer 에 단백질 효소 저해제와 인산화 효소 저해제를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 13000 RPM 에서 10-15 분간 원심분리 한 후 상층액 만을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad protein assay system 을 이용하여 측정한 후 100℃에서 5분간 끓여주었다. 준비된 시료를 SDS-polyacrylamide gel 에서 전기영동 한 후 Nitrocellulose transfer membrane (NC, whatman)에 transfer 한 다음 5% skim milk 로 blocking 하였고 각 특이 항체와 반응시켰다. 그리고 horseradish peroxidase 가 link 된 이차항체 (Amersham, UK)를 반응시킨 후 ECL system (Amersham, UK)으로 검출 하였다. Actin 은 sigma 항체를 1:5000 으로 p44/42 MAP Kinase, p-p44/42 MAPK(Thr202/tyr204) (E-10)는 cell signaling 항체를 1:1000 으로 이용하였다. 또한, cofilin 은 cytoskeleton 항체를 p-cofilin 은 sigma 항체를 각각 1:1000 으로 사용하였고 Ran 은 BD bioscience 항체를 1:500 으로 이용하였고 exportin 6 의 항체는 Gorlich D 실험실에서 제공해 주어서 사용하였다.

## K. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용한 노화유도

HDF 세포에 200μM 의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 를 한번 처리하고 2 일 뒤 세포에 trypsin 을 처리해 다른 plate 에 나누어 3 일 동안 키워 노화를 유도했다. Trypsin 을 처리해 세포를 떼어냈을 때 면역세포형광법이나 SA-β-gal 실험을 하기 위해 준비를 했고 3 일 후에 실험을 진행하였다.

### III. 결 과

#### A. 노화된 세포에서 핵 내에 위치하는 actin 확인

HDF 세포를 계속 계대배양하여 replicative senescence 를 진행시킨 후 세포의 노화가 진행되고 있음을 확인하기 위하여 세포가 두 배로 증식하는 시간 (doubling time)이 1, 5, 10 일 되는 세포를 이용하여 노화표지자로 사용되는 SA- $\beta$  gal assay 와 세포의 성장률 비교 실험을 수행한 결과 세포가 두 배로 증식하는 시간이 길어질 수록 SA- $\beta$  gal 에 염색된 세포의 수가 증가하고 반면에 세포의 성장률은 매우 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2A, B). 또한 단백질 발현 차이를 비교하기 위해 임인경 교수 연구실 (Lim 등, 2000) 에서 노화의 표지자로 보고한 바 있는 SA-pErk1/2 와 p53 의 발현을 관찰하였다. 그 결과 세포가 두 배로 증식하는 시간이 길어 질 수록 SA-pErk1/2 의 인산화 정도와 p53 의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2C). 이를 바탕으로 해서 세포가 두 배로 증식하는 시간이 길어질수록 노화가 진행되고 있다는 사실을 알게 되었고 이와 비슷한 세포들을 사용하여 실험을 진행하였다.

이전에 보고한 연구결과에서와 같이 노화가 진행되면서 actin 이 핵 내에 축적되는지 알기 위해 먼저 젊은 세포와 Replicative senescence 가 진행되고 있는 세포에서 actin 의 위치를 immunocytochemistry 를 통해서 관찰해 보았다 (Kwak 등, 2004) 그 결과 노화가 진행되고 있는 세포에서 actin 이 핵 내에 위치하는 것을 관찰하였고 (Fig. 3A), actin 이 핵 내에 축적되어 있는 세포를

세어 비율을 계산한 결과 노화세포에서 ~27% 정도로 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 3B; right). 이러한 현상을 재확인하기 위해 이 세포를 핵과 세포질로 분리를 하여 actin 의 위치를 western blot 으로 관찰한 결과 또한 노화가 진행되고 있는 세포의 핵 분획에서 actin 이 더 많이 존재하는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 3C). 핵 분획에서 actin 의 증가를 densitometer 를 이용해 측정 actin 이 증가하고 있음을 확연하게 관찰할 수 있었다 (Fig. 3B; left). 이를 통해 노화가 진행될수록 actin 은 핵 내에 축적되어 있다는 것을 다시 한번 확인하게 되었다.

### **B. 노화된 세포에서 핵 내에 위치하는 cofilin 의 증가와 phosphorylation 감소**

노화가 진행될 때에 actin 을 핵으로 들여보내는데 관여하는 기전에 변화가 있는지 관찰하기 위해 일반적으로 actin 과 결합해 actin 의 위치를 세포질에서 핵으로 변화시키는 역할을 한다고 널리 알려진 cofilin 의 변화를 알아보았다. 젊은 세포와 replicative senescence 가 진행되고 있는 세포를 이용했고 cofilin 의 위치를 세포질과 핵을 분리하는 방법을 사용해 western blot 을 통해서 관찰하였다. 신기하게도 actin 과 같이 노화가 진행될수록 cofilin 도 핵 분획에서 많이 존재한다는 것을 관찰하였다 (Fig. 4B). 이를 통해 노화가 진행 될수록 cofilin 도 핵 내에 위치하고 있다는 것을 예상할 수 있었다.

다음으로 노화가 진행되면서 cofilin 이 actin 과 결합할 수 있는 능력이 변화하는지를 알아보기 위해 cofilin 의 phosphorylation 된 형태를 western blot



으로써 관찰하였다 (Fig. 4C). 앞서서도 설명한 바와 같이 cofilin 은 다른 단백질들과는 반대로 phosphorylation 되면 actin 과 결합하는 능력이 떨어져 기능을 하지 못하는 불활성화 상태로 변하게 된다. 실험결과를 보면 노화된 세포에서 phosphorylation 된 cofilin 이 감소하는 것이 관찰되고 이 결과로써 세포가 노화되면 활성화 되어있는 cofilin 이 증가하게 된다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 노화된 상태에서는 cofilin 이 actin 을 핵으로 더 많이 끌고 들어갈 것이라는 것을 예상할 수 있었다.

### C. Exportin 6 와 actin 의 결합

actin 과 결합하는 단백질로 actin 을 세포질로 운반시키는 역할을 하는 exportin 6 가 새롭게 발견되었다는 보고는 있지만 우리 실험실에서도 그 논문과 같이 actin 과 exportin 6 가 결합을 하는지 알 필요가 있었고 아직 시중에 exportin 6 에 대한 antibody 가 나오지 않았었기 때문에 exportin 6 의 N-terminal 에 falg 를 붙여 단백질을 발현 시킬 수 있는 vector 을 제작하게 되었다 (Fig. 5). Human diploid fibroblast (HDF) 세포에서 exportin 6 의 전체 DNA 서열을 얻었고 sequencing 과정을 거쳐 돌연변이가 된 서열을 찾아 고친 후 Flag 벡터에 삽입 하여 exportin 6 발현 벡터를 제작하였다 (Fig. 5B). 그리고 Huh7 세포에 이 vector 를 transfection 하고 1 일 정도 세포를 키워 단백질을 발현시킬 수 있는 시간을 준 후 정확한 크기의 단백질이 anti-body 에 의해서 나타나는지를 western blot 을 통해 관찰한 결과 128kDa 부위에 밴드가 나타나는 것을 보았고 이를 통해 exportin 6 가 잘 발현되고 있다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5C). 이 vector 을 NIH3T3 세포에 transfection 하여 exportin 6 를 발현시킨 후

immunoprecipitation 을 통해 actin 과 exportin 6 가 결합하는지를 관찰하였다. Anti-flag antibody 를 이용하였고 실험결과 actin 이 결합하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6A; top). 이와 같은 실험을 Huh7 세포에서도 수행하였는데 같은 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 6A; bottom). 이 결과를 재확인하기 위해 반대로 GFP 를 붙인 actin 을 transfection 하여 anti-GFP antibody 를 이용해 exportin 6 와 결합유무를 관찰한 결과 exportin 6 또한 결합하는 것을 관찰 하였다 (Fig. 6B). 이로써 actin 과 exportin 6 는 결합하는 단백질이라는 사실을 확인하였다.

#### **D. 노화된 세포에서 exportin 6 의 발현감소**

노화가 진행될 때 actin 을 핵 내에서 세포질로 끌고 나오는 기전에 대한 변화를 관찰하기 위해 actin 을 세포질로 이동시킨다고 새롭게 알려진 exportin 6 에 대한 실험을 진행하였다. 젊은 세포와 replicative senescence 가 진행되고 있는 세포에서 exportin 6 의 발현 정도를 RT-PCR 을 통해 관찰한 결과 노화된 세포에서 확연하게 exportin 6 의 mRNA 가 감소하는 것이 관찰 되었으며 (Fig. 7A) RNA 뿐만 아니라 단백질 발현도 이와 같은 현상이 나타나는지 western blot 을 통해 관찰한 결과 노화된 세포에서 exportin 6 가 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 7B). 이러한 결과로써 노화가 진행될수록 actin 과 exportin 6 가 결합할 수 있는 비율이 줄어들어 세포질로 내보내는 역할이 활발하게 일어나지 못할 것이라는 예상을 할 수 있었다. 다음 실험으로 exportin 6 가 기능을 하기 위해 actin 과 같이 핵 내에 위치하는지 알아보기 위해 젊은 세포와 노화된 세포를 각각 세포질과 핵으로 나누어 exportin 6 의 위치를 관찰했다 (Fig. 8A). 그 결과 4 $\mu$ g 의 단백질을 loading 해 western blot 을 수행했을 때는 세포질에서

exportin 6 가 존재하는 것이 관찰되는 반면 핵 내에서는 관찰 할 수 없었다. 그래서 단백질의 양을 늘려서 관찰했더니 (Fig. 8B) 핵 내에서도 exportin 6 가 존재하는 것은 관찰하였으나 핵 내에 더 많이 위치하는 결과는 얻지 못했다.

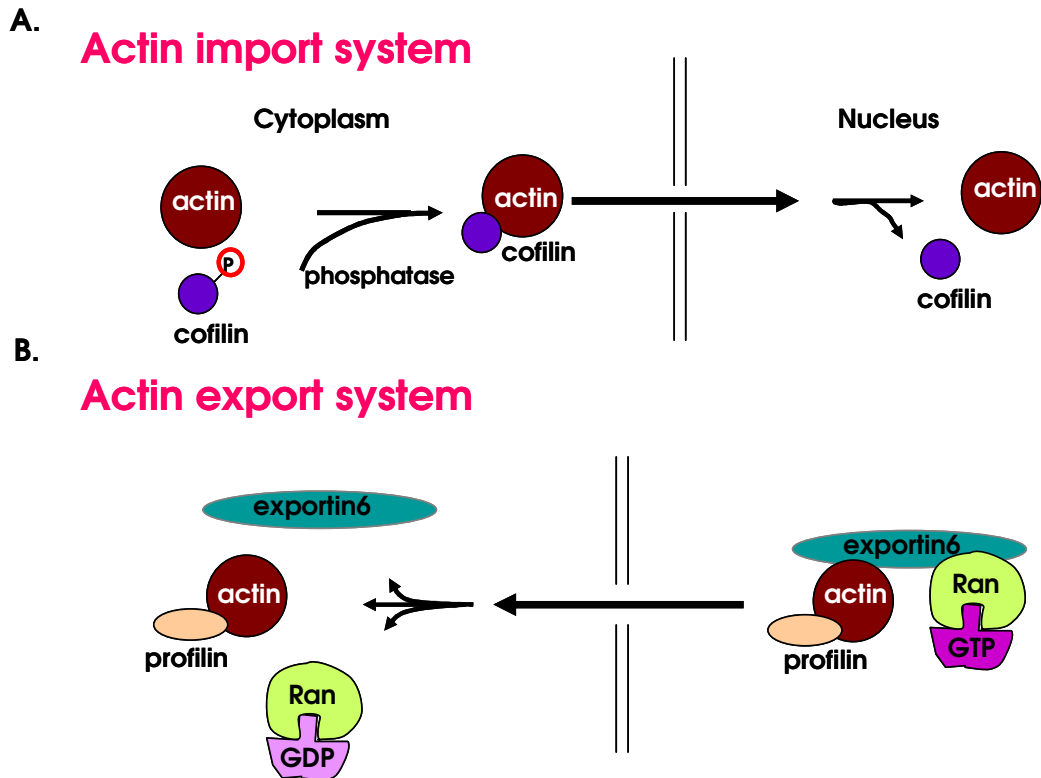
#### **E. 노화된 세포에서 Ran 의 위치변화와 발현감소**

Actin 과 exportin 6 의 결합체가 세포질로 이동할 때 중요한 중개자로서 역할을 하는 Ran 은 핵막을 경계로 해서 세포질과 핵 사이에 분포가 다르게 나타난다. 핵 내에서는 GTP 가 결합된 형태가 많고 세포질에서는 GDP 가 결합된 형태가 많다고 보고되고 있다 (Fig. 9A). 이러한 보고가 있기 때문에 Ran 의 변화에 대해 관찰 하였다. 젊은 세포와 노화된 세포에서 Ran 의 발현이 차이가 있는지 알아보기 위해 western blot 으로 단백질의 양적인 차이를 관찰 하였다 (Fig. 9C). 그 결과 노화가 진행될수록 Ran 의 발현이 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 다른 실험으로써 Ran 의 위치변화를 면역형광세포 염색 방법을 통해서 관찰하였다 (Fig. 9B). 그 결과 젊은 세포에서는 핵 내에 존재하는 Ran 이 적지 않게 관찰 되었으나 노화된 세포에서는 모두 세포질에 위치하는 것을 관찰했다. 그리고 전체세포에 대한 Ran 이 핵 내에 존재하는 세포의 비율을 계산한 결과 젊은 세포에 비해 노화된 세포에서 40 배 가량이 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 10; bottom). 이 실험은 Ran 의 활성화 정도를 예측할 수 있는 실험으로 노화 때 세포질에 있는 Ran 이 증가하는 것은 RanGDP 형태가 증가했음을 예상할 수 있고 Ran 의 활성화도가 떨어졌음을 의미한다. Ran 의 발현이 감소하고 활성화가 억제되는 현상이 나타나는 것을 보아 exportin 6 와 actin 의 결합체가 Ran 의 도움으로 함께 세포질로 나가야

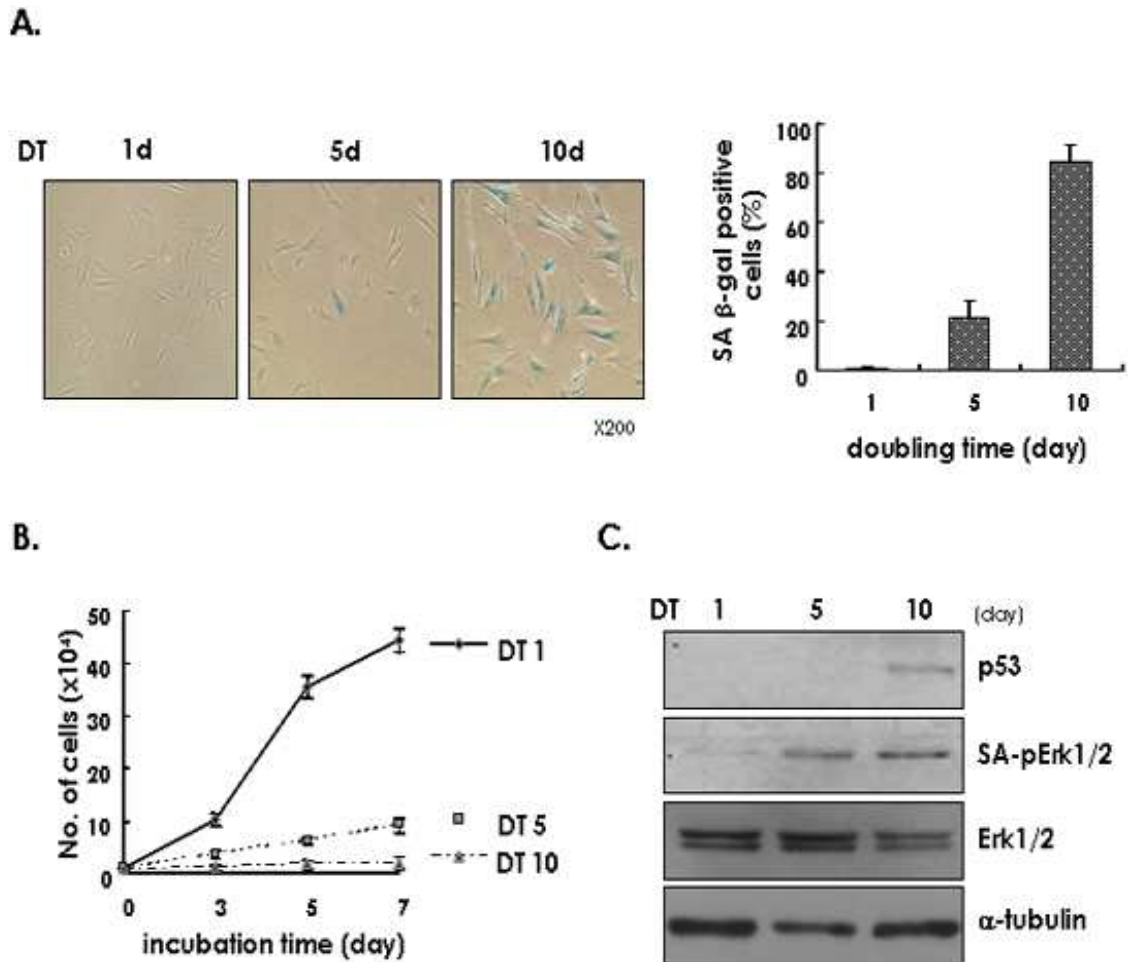
하는데 노화가 진행될수록 이 기능을 못할 것이라는 것을 예상할 수 있었다. 다음 실험으로 exportin 6 와 Ran 이 핵 내에서 같이 존재하는 지를 알아보기 위해 두 단백질을 한 세포에서 모두 염색하여 관찰하였다 (Fig. 10). 하지만 exportin 6 와 Ran 이 핵 내에서 같이 있는 현상은 관찰하지 못했다.

#### F. 유도 노화 세포에서 Ran 의 위치변화와 변화 없는 exportin 6 와 Ran 의 발현

HDF 세포에  $H_2O_2$  를 한번 처리하고 2 일 후 분리하여 3 일 까지 두어 노화를 유도시켰다 (Fig. 11A). 노화가 유도 되었다는 것을 SA- $\beta$ -gal 에 염색된 정도를 통해 관찰 할 수 있었다 (Fig. 11B). 이때 Ran 의 위치를 면역형광염색법을 이용해 알아보니  $H_2O_2$  를 처리하지 않은 세포는 많은 세포에서 핵 내에 위치한 Ran 이 44% 되는 것을 볼 수 있었는데 반해 노화가 유도된 세포에서는 Ran 이 핵 내에 위치하는 세포가 11% 정도로 많이 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 11D). 다음 실험으로 exportin 6 와 Ran 의 발현 그리고 cofilin 의 활성화 정도에는 변화가 있는지를 western blot 로 관찰 한 결과 Ran 과 exportin 6 의 발현이 감소하는 현상은 확연하게 관찰하지 못했다. 하지만 cofilin 이 탈인산화 되는 정도는 증가한다는 것을 알 수 있었다. 이런 현상은 노화가 진행 될 때뿐만 아니라  $H_2O_2$  에 의해 스트레스를 받았을 때도 같은 현상을 보이는 것을 관찰 했다. 이 결과로써 핵 내에 actin 이 축적되는 가장 큰 이유가 Ran 의 분포가 달라지고 cofilin 의 활성화가 증폭됨에 의해서라고 예상되었고, SA- $\beta$ -gal 결과로 보아 노화가 약하게 일어났음을 알 수 있었기 때문에 exportin 6 와 Ran 의 발현변화는 노화가 더욱 진행됨에 따라 나타날 것이라 생각되었다.

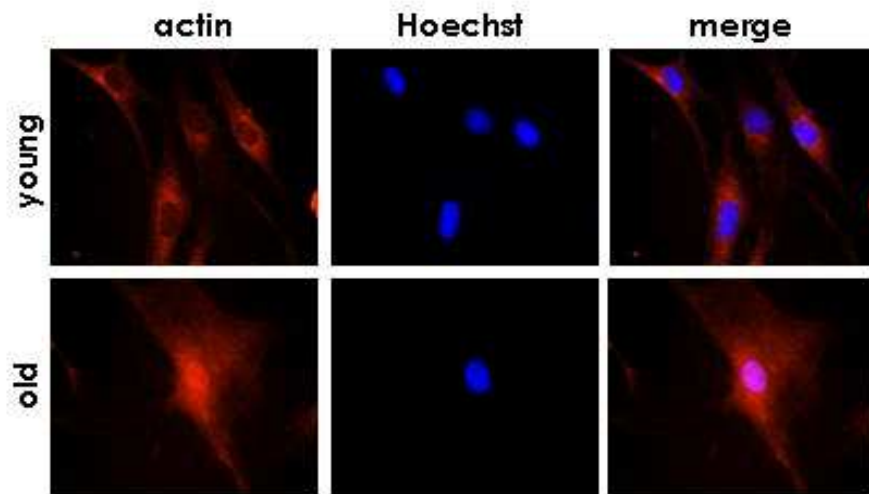


**Fig. 1. Model of nucleocytoplasmic transport mechanism.** Top; Actin is imported to the nucleus by dephospholated cofilin which has the nuclear localization signal (NLS). The NLS of cofilin is bound via heterodimeric importin- $\alpha/\beta$  complex in the cytoplasm: Importin- $\alpha$  provides the NLS-binding site, whereas importin- $\beta$  accounts for subsequent interaction with the nuclear pore complex (NPC), thereby driving translocation. The trimeric NLS/importin  $\alpha/\beta$  complex is transferred as a single entity through NPC, and becomes disassembled upon termination of translocation. Bottom; Actin is exported from the nucleus through exportin 6-dependent pathway. Profilin in the export complex formation induces a conformational change of actin, resulting in the high affinity form for exportin 6 binding. To achieve unidirectional transport, positional information is provided by a RanGTP gradient across the nuclear membrane.

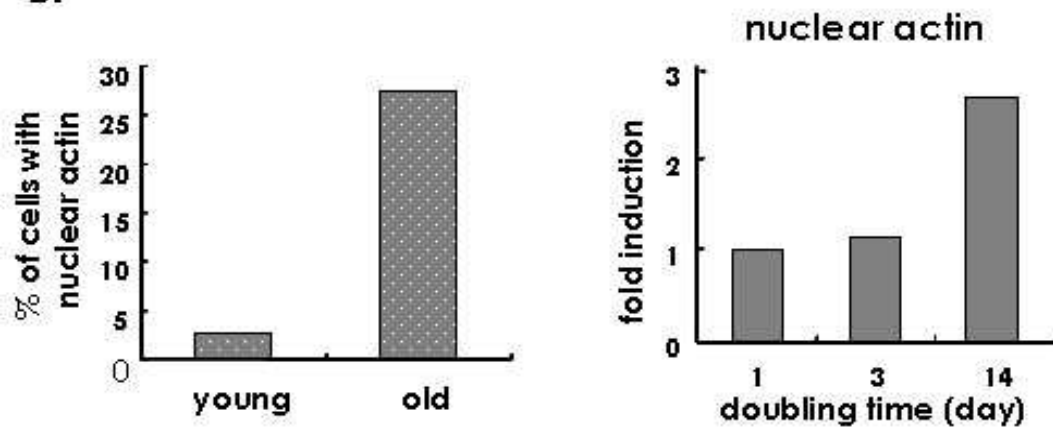


**Fig. 2. Increased doubling time indicated senescence, evidenced by various senescence marker.** (A) HDF cells with different doubling times were stained to evaluate senescence-associated- $\beta$ -galactosidase and observed by phase contrast microscope (x200). (B) At the indicated times, cells were harvested by trypsinization and counted after trypan blue staining to exclude dead cells. Data indicate the average counts and S.D from two independent experiments. (C) Western blot analysis was carried out to detect expressions of SA-pErk1/2, Erk1/2,  $\alpha$ -tubulin and p53.

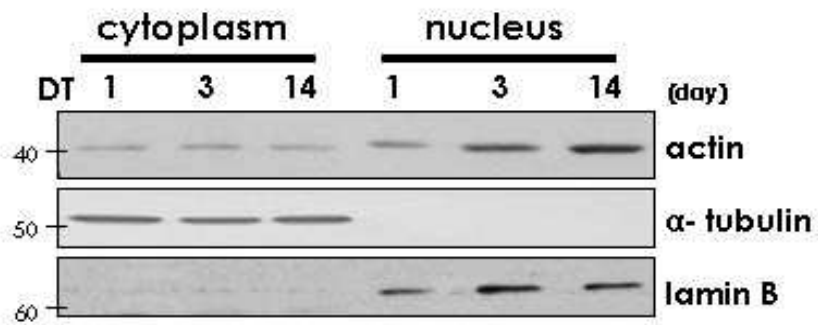
**A.**



**B.**

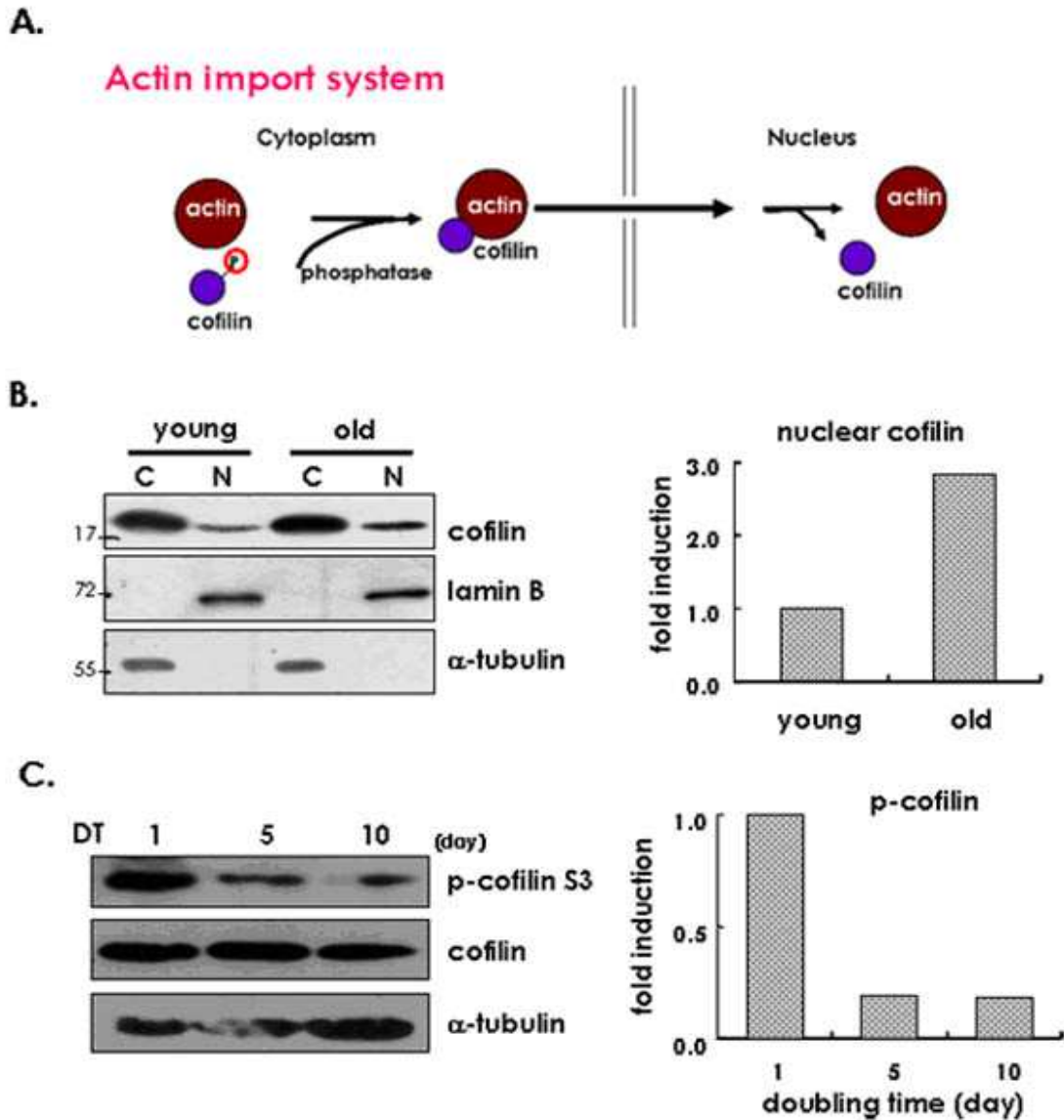


**C.**



**Fig. 3. Actin translocated in nucleus during senescence.** (A) Young and old cells up to 25% confluent were incubated overnight with anti-actin antibody (1:200) at 4°C in a chamber and additionally with Texas red conjugated secondary antibody and Hoechst 33258 (0.1µg/ml) for 1h. Actin was accumulated in the nucleus of old cells (x1000). (B) right; Cells with nuclear actin accumulation were counted as the percentage of total cells. left; The nuclear actin expression level was measured by densitometry as the ratio relative to lamin B expression in panel C. (C) Western blotting was carried out to confirm the change of actin localization after fractionation of cells with distinct doubling times (1d, 3d and 14d).

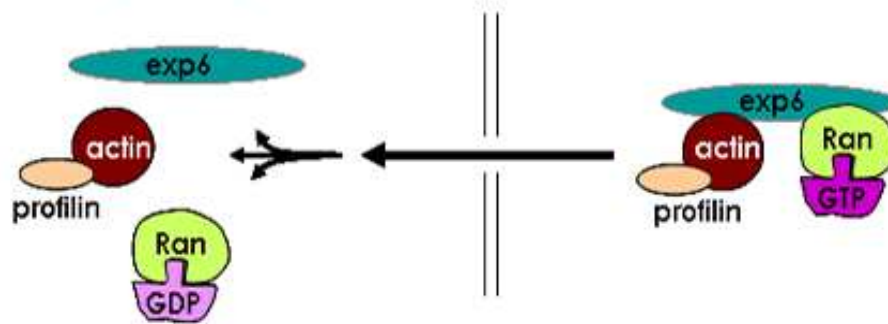




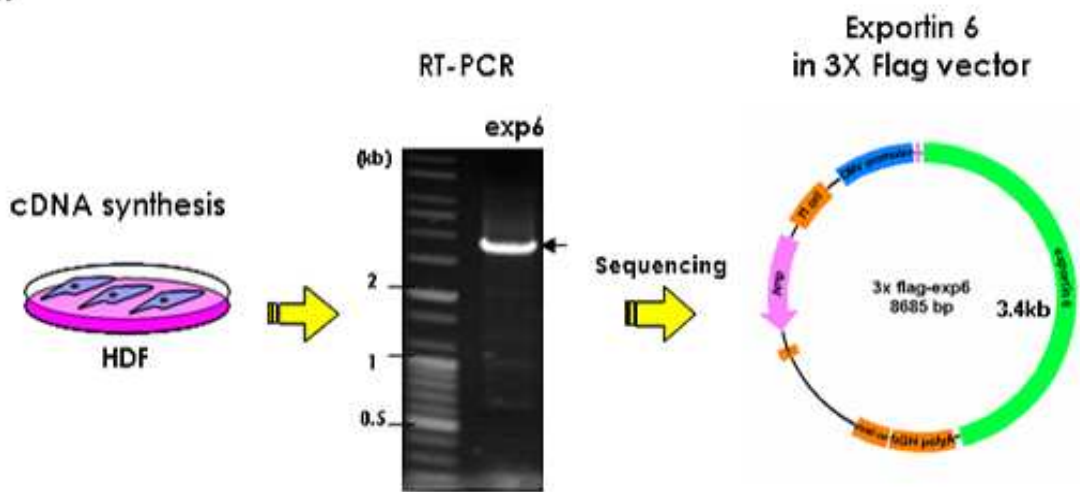
**Fig. 4. Cofilin is translocated in the nucleus and dephosphorylated during senescence.**

(A) Actin was imported in the nucleus by dephospholated cofilin. Actin monomer is available for cofilin to bind to and subsequently to translocate into the nuclei. (B) Young and old HDF cells were fractionated to cytoplasmic and nuclear fractions. Then, Western blot was carried out to confirm that cofilin was accumulated in the nucleus during senescence. (C) Western blot analyses reveal p-cofilin change in the old HDF cells.

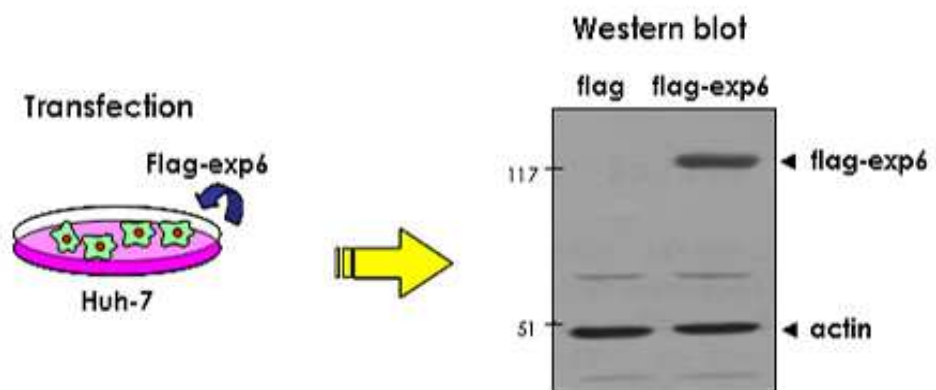
**A.**  
**Actin export system**



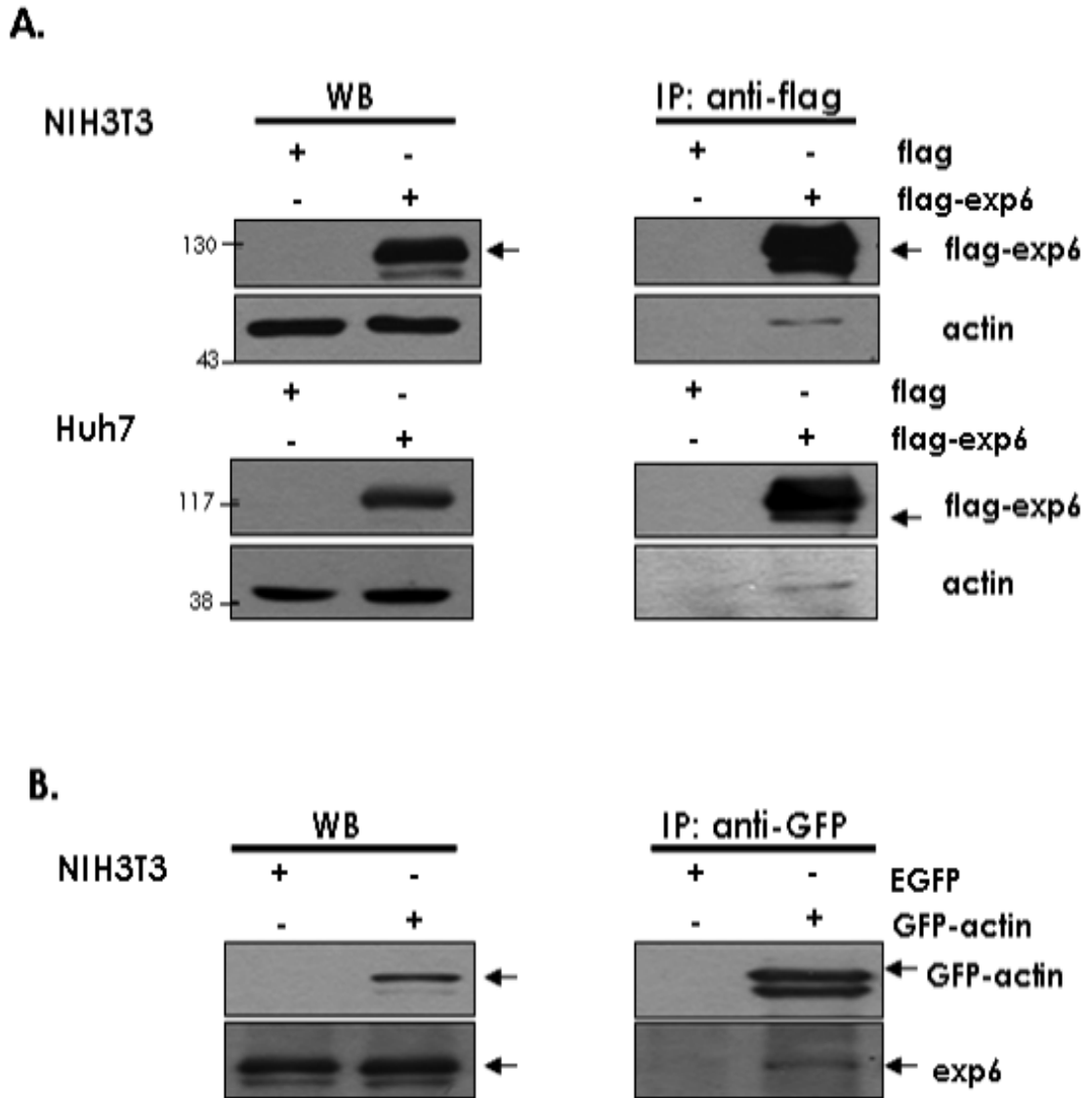
**B.**



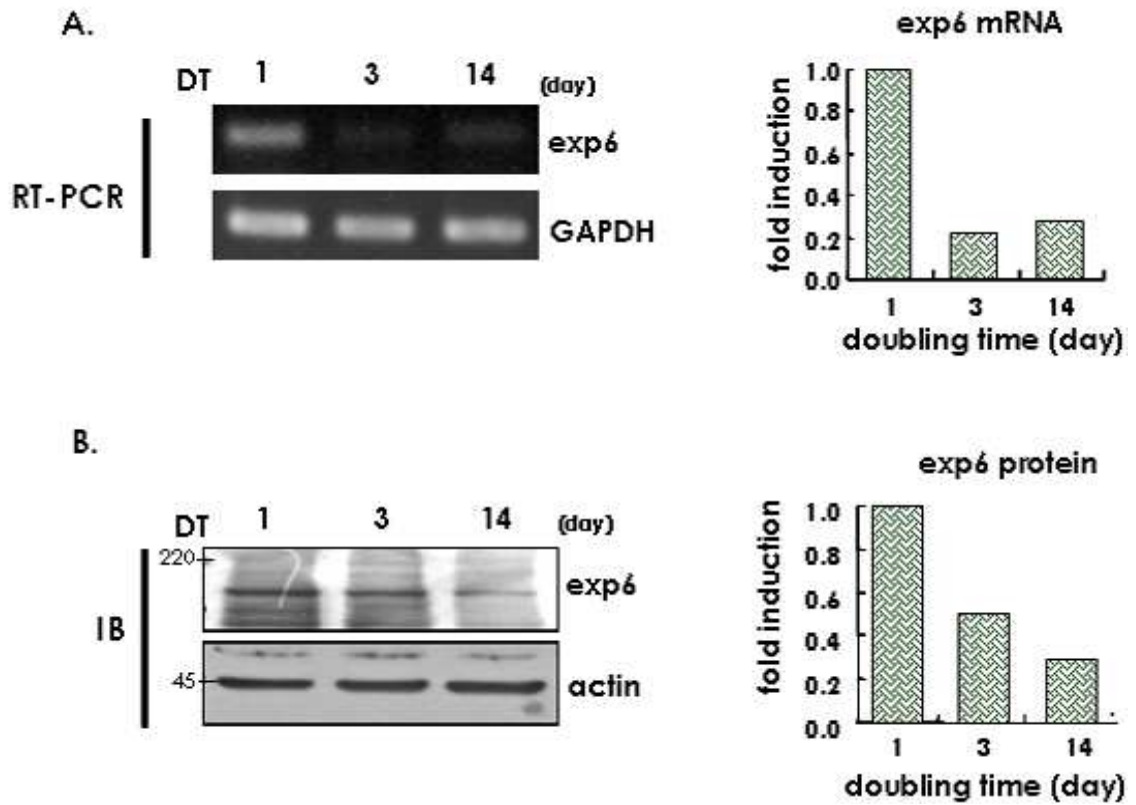
**C.**



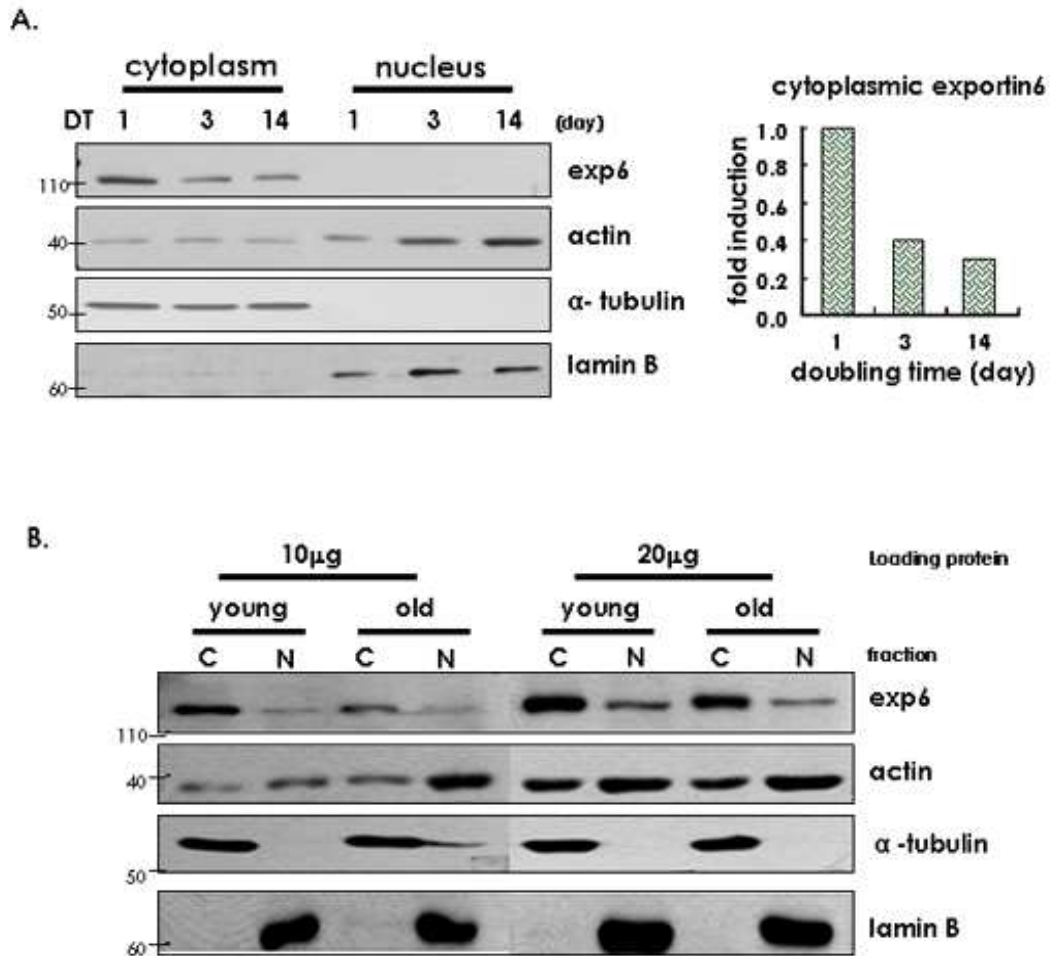
**Fig. 5. Preparation of exportin 6 expression vector (flag-exp6) .** (A) Actin was exported from the nucleus by exportin 6 dependent-pathway. The function of profilin in the export complex formation would be to induce a conformational change that brings actin into the high affinity form for exportin 6 binding. To achieve unidirectional transport, positional information is provided by a RanGTP gradient across the nuclear membrane. (B) Exportin 6 cDNA from HDF cells was expended by RT-PCR and mutation was searched by sequencing. (C) Huh7 cells were transfected with flag vector and flag-exp6 vector. Cells were incubated for 1day, and then the expression of exportin 6 was confirmed by Western blot.



**Fig. 6. Exportin 6 bound with actin in normal condition.** (A) Flag and flag-exp6 vectors were transfected into Huh7 and NIH3T3 cells. After 1day, cells were lysed, and then IP was performed using anti-flag antibody. (B) Method was the same as in A, but EGFP and GFP-actin were transfected into NIH3T3 cells and then anti GFP antibody was used.



**Fig. 7. Expression of exportin 6 was reduced in the replicative senescent cells.** (A) Expression of exportin 6 mRNA was analyzed via RT-PCR (left). The level was measured by densitometry as the ratio relative to GAPDH mRNA level (right). (B) Western blot was carried out to detect the expression of exportin 6 protein during senescence.



**Fig. 8. Exportin 6 was abundant in cytoplasm, but localization was not detected by Western blot.** HDF cells were fractionated into cytoplasmic and nuclear fractions, and then Western blotted with exp6 and actin. 4 µg/lane (A), 10µg/lane and 20µg/lane (B) of protein was loaded.

A.

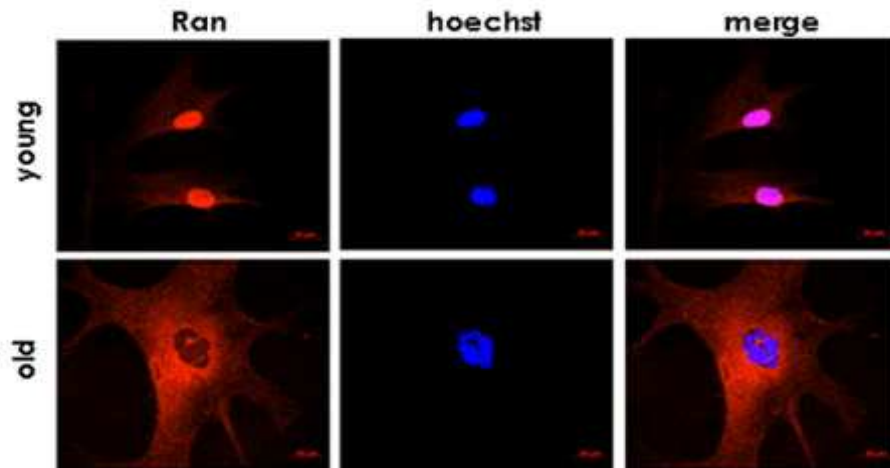


Ran GTP bound form

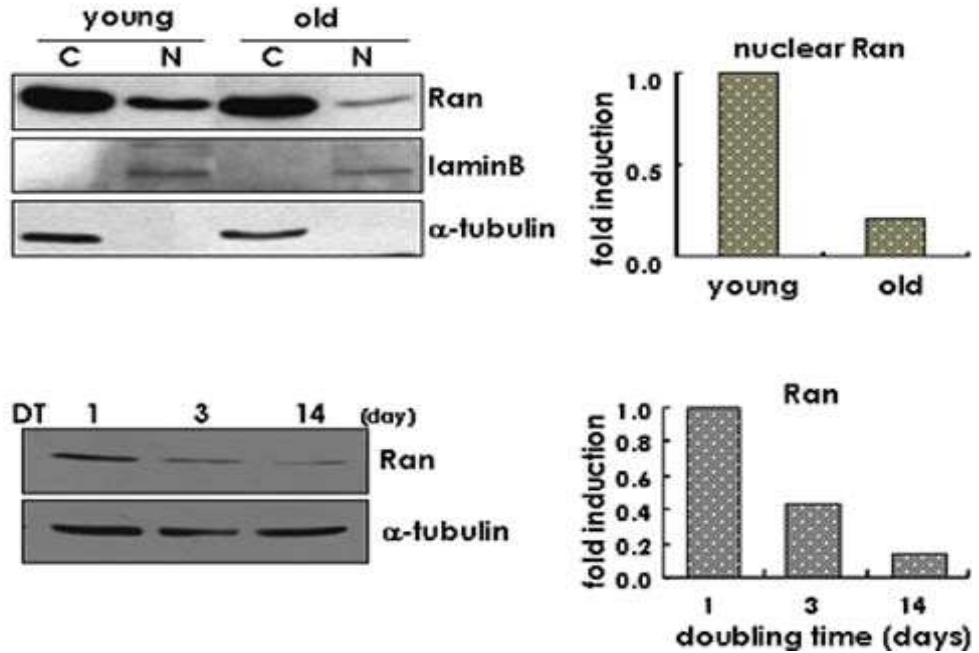
Ran GDP bound form

(Izaurralde 등, 1997; Yasuda 등, 2006)

B.

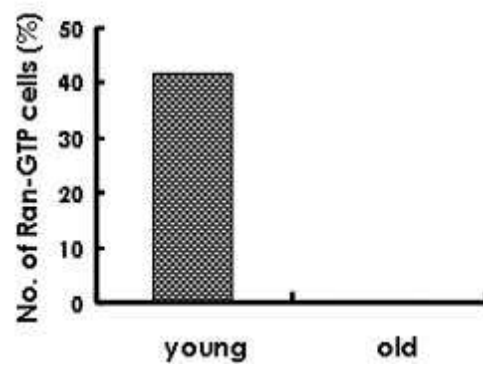
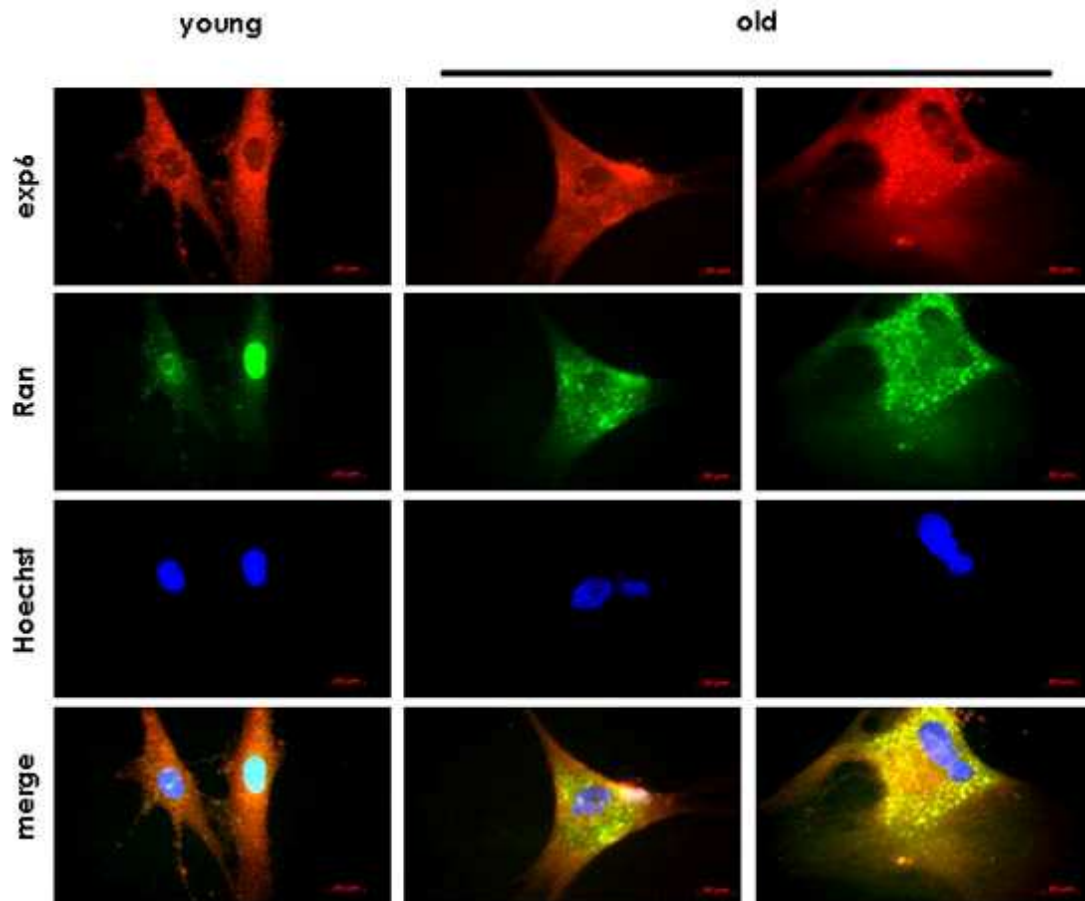


C.

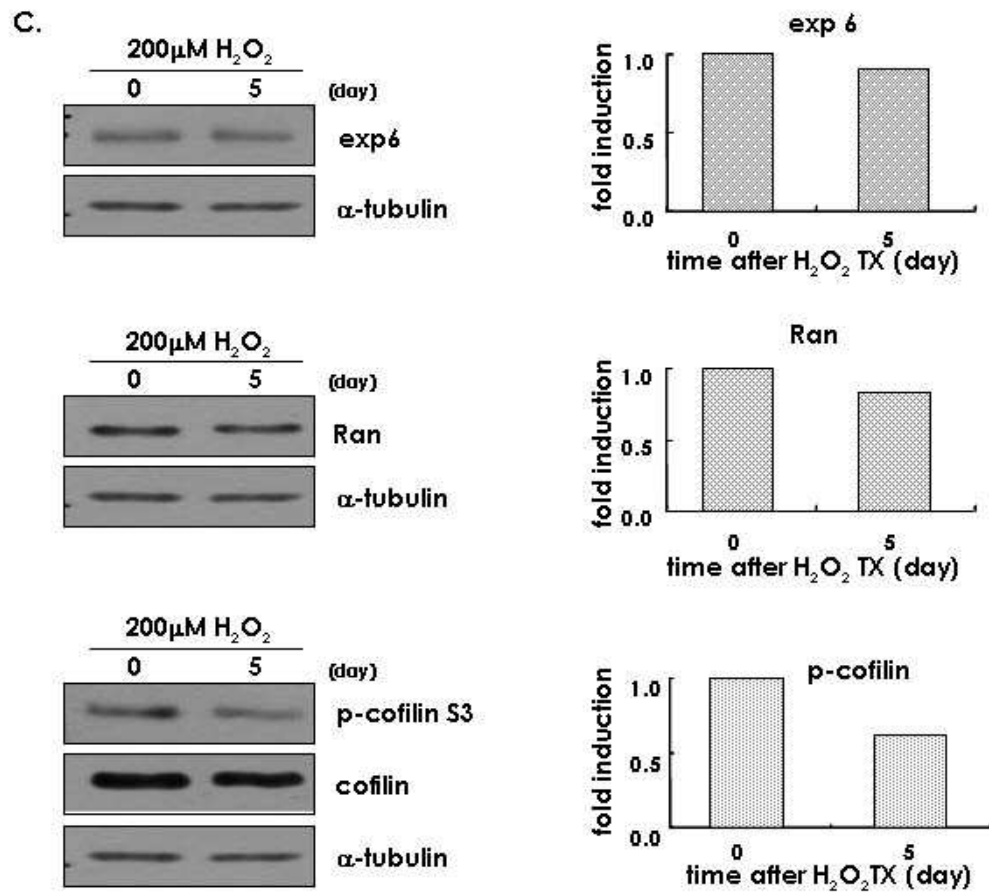
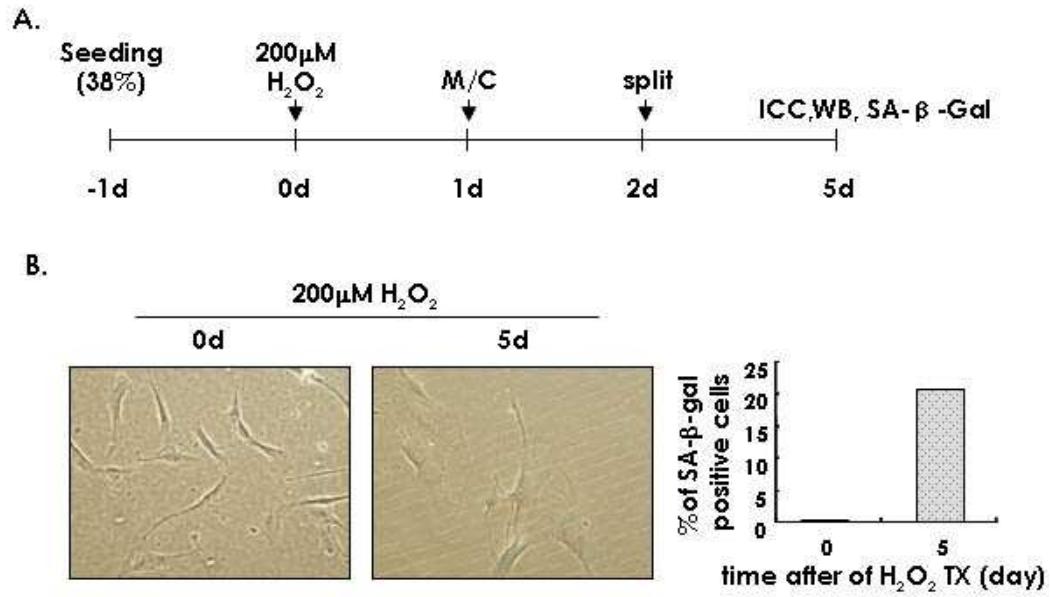


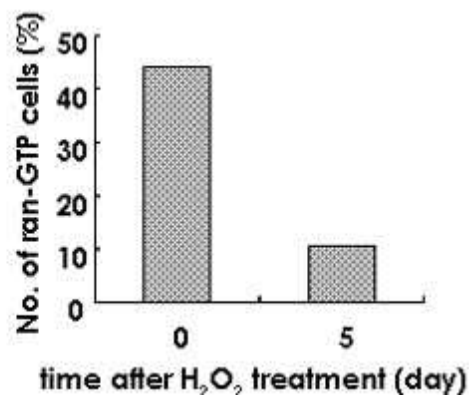
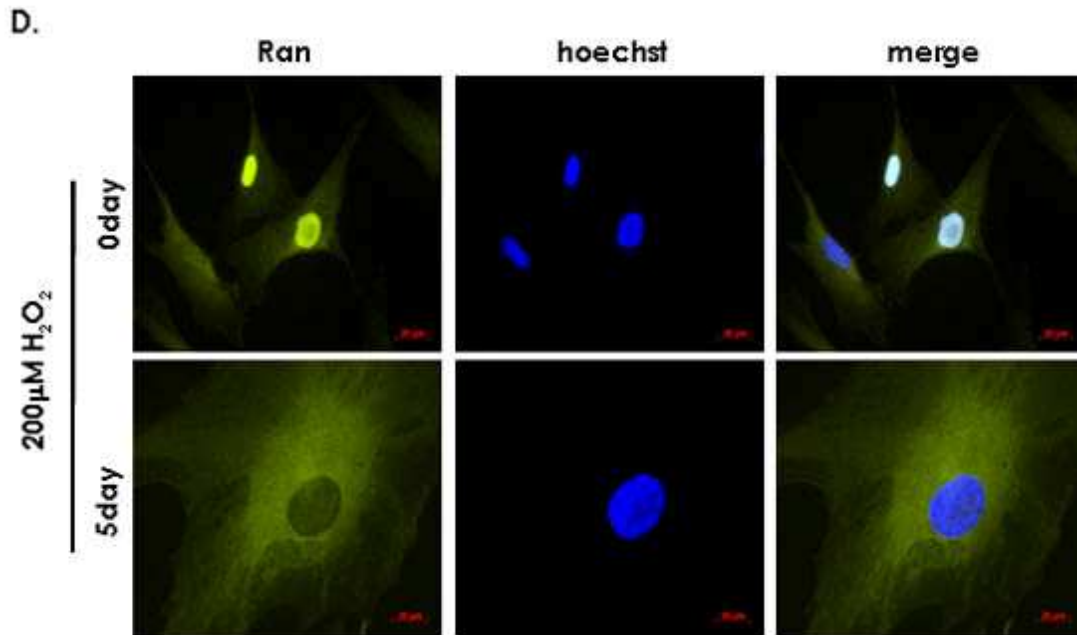
**Fig. 9. Senescence collapsed Ran distribution and reduced Ran expression.** (A) Ran itself is predominantly, but not exclusively, nuclear. Ran's major nucleotide exchange factor is the chromatin-bound RCC1, that generates RanGTP inside the nucleus. In contrast, the principal GTPase activating protein, RanGAP, is excluded from the nucleoplasm. RanGAP stimulates conversion of RanGTP to GDP-bound form, thereby depleting RanGTP from the cytoplasm. (B) Young and old cells were fixed by 4% paraformaldehyde. Representative photomicrographs of fluorescent images show Ran staining. (x1000) (C) Western blot was carried out to detect the Ran expression and location in young and old HDF cells.



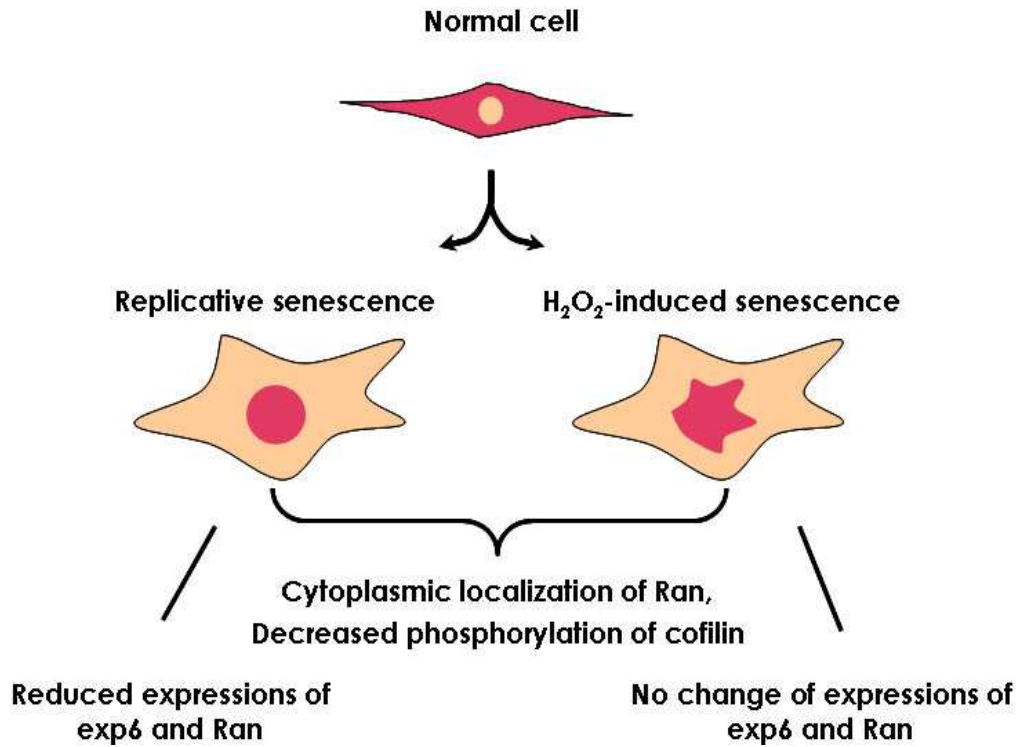


**Fig. 10. Exportin 6 and Ran were not colocalized.** Young and old cells were subjected to immunocytochemical analysis with anti-exp6 and Ran antibody (x1000, upper panel). Cells with nuclear Ran accumulation were counted as the percent of total cells (lower panel).





**Fig. 11. Cofilin phosphorylation decreased Ran transported to the cytoplasm, but Ran and exportin 6 expression were not changed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent cells.** (A) Scheme showing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence. (B) HDF cells were examined for SA- $\beta$ -gal activities and observed by phase contrast microscope (x320). (C) Western blot was carried out to detect the exportin 6, Ran, cofilin, p-cofilin and  $\alpha$ -tubulin expressions as a control. (D) HDF cells, incubated for 5days after treatment once with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, were fixed by 4% paraformaldehyde. Representative photomicrographs of fluorescent images show Ran staining. (x1000)



**Fig. 12. Summary about the mechanism of nuclear actin accumulation in replicative senescence and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence.** Actin accumulates in nuclei during senescence. Ran distribution collapses, and cofilin phosphorylation is reduced during replicative senescence or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence. Expressions of Ran and exportin 6 decrease completely in replicative senescent cells. However, the expressions of Ran and exportin 6 are not changed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence.

## IV. 고 찰

Actin 은 거의 모든 세포에 존재하고 있으며 세포질과 핵 내에 위치해 매우 많은 역할들을 수행하고 있고 아직까지도 새로운 기능들이 보고되고 있다. 하지만 이러한 actin 이 열 충격이나 DMSO 와 같은 자극뿐만 아니라 노화의 진행에 의해서도 핵으로 이동해 축적되어 있다는 사실이 보고되고 있지만 어떤 기작에 의해서 나타나는 현상인지는 밝혀진 바 없다.

본 연구에서는 노화가 진행될 때 actin 이 핵으로 축적되는 이유를 알기 위해 actin 을 핵 안으로 들여보내는 입장에서 그리고 세포질로 내보내는 입장에서 관여하는 단백질들의 변화를 알아보기 위한 실험들을 수행하였다. 먼저 노화의 진행을 알아보기 위해 마커로서 대표적으로 알려져 있는 SA- $\beta$ -gal 을 수행하였고 세포생장률을 관찰하였다. 또한 임인경연구실 (Lim 등, 2000)에서 노화 의 표지자로 보고한바 있는 SA-pErk1/2 와 p53 을 관찰하였다. 그 결과 노화세포가 될수록 SA- $\beta$ -gal 에 염색이 잘되는 것을 관찰하였고 그때 세포생장률이 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1A, B). 그리고 Erk1/2 의 인산화 정도와 p53 의 발현은 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 1C, D). 따라서 population doubling (PD)이 증가할수록 노화가 진행된다는 것을 확인할 수 있었다.

노화된 세포에서 actin 이 핵 내에 축적되어 있다고 보고되었는데 (Kwak 등, 2004) 이러한 현상을 자세히 확인하기 위해 actin 의 위치를 면역세포형광염색 법과 핵과 세포질을 분리한 후 western 으로 관찰한 결과 모두 노화세포의 핵

내에 있는 actin 이 증가함이 확인되었다 (Fig. 3A, C). 그리고 이러한 결과를 표로 나타내어 관찰해 변화가 확인함을 알 수 있었다 (Fig. 3B).

노화 세포에서 actin 이 핵 내에 존재하는 이유를 알아보기 위해, actin 을 핵으로 들어 보낸다고 널리 알려진 cofilin 에 대해서 관찰을 했다. Cofilin 또한 노화 세포의 핵 분획에서 증가하는 것을 관찰해 핵 내에 존재한다는 것을 간접적으로 알 수 있었고 인산화된 형태가 감소하는 것을 관찰해 cofilin 의 활성화가 증가되었다는 것을 짐작할 수 있었다 (Fig. 4B, C). 2004 년 Kwak 등의 실험에서도 같은 현상을 보고한바 있으며 그 이유가 cofilin 을 인산화시키는 LIMK 의 활성도가 노화세포에서는 줄어들기 때문이라고 보고하고 있다 (Kim 등, 2003). 결과들을 미루어 볼 때 노화세포 에서 actin 은 활성화가 비정상적으로 높아진 cofilin 에 의해 젊은 세포에서 핵으로 들어가는 것 보다 더 많이 들어갈 것이라 예상할 수가 있다.

다음 실험으로 cofilin 과는 반대로 핵 내에 있는 actin 을 세포질로 내보내는 역할로 알려진 exportin 6 에 대하여 실험을 진행하였다. 먼저 exportin 6 의 항체가 없는 이유로 flag cap 을 달고 발현할 수 있는 벡터를 제작하였다 (Fig. 5B). 그리고 이 벡터가 원하는 단백질을 발현하는지를 western blot 으로 확인한 후 본격적인 실험을 진행했다 (Fig. 5C). 새로운 단백질인 exportin 6 가 발견되고 역할이 actin 과 결합하는 importin  $\beta$  family 단백질이라는 사실이 *in vitro* 실험을 통해서 밝혀졌다 (Stuven 등, 2003). 그래서 직접 Huh7 과 NIH3T3 세포에 flag-exp6 벡터를 transfection 하여 actin 과 결합하는지를 immunoprecipitation 으로서 관찰하였고 반대로 GFP-actin 을 transfection 해 exportin 6 와 결합하는지를

관찰하였다 (Fig. 6A, B). 그 결과 두 경우 모두 결합하는 것을 *in vivo* 로써 관찰할 수 있었다. 노화된 세포에서 exportin 6 의 변화를 알아보기 위해 먼저 mRNA 발현에 차이가 있는지 관찰하였고 다음으로 단백질 발현차이를 관찰하였는데 두 경우 모두 노화가 진행 될수록 감소하는 것을 관찰하였다 (Fig. 7A, B). 따라서 exportin 6 가 발현이 감소해 actin 과 결합하는 비율이 감소하게 되고 이런 이유로 세포질로 내보내는 정도가 감소할 것이라는 예상을 할 수 있었고 *Xenopus* 의 oocytes 의 핵 내에서도 actin 이 축적되는 현상이 관찰되는데 그 이유가 이 시기 동안에 exportin 6 의 단백질 발현이 안 되기 때문이라는 내용도 발표된 바 있다 (Bohnsack 등, 2006).

Exportin 6 는 actin 과 직접 결합하여 세포질로 끌고 나오지만 만약 Ran 이 없으면 그 기능을 제대로 수행할 수가 없다. 즉 Ran 은 exportin 6 가 기능을 하기 위한 중개자로서 중요한 역할을 한다. 이러한 Ran 은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 와 같은 시약에 의해 스트레스를 받거나 에너지원이 없어진 상태에서 핵 내에 존재하던 것이 세포질로 위치가 변화된다는 내용이 많은 논문에서 발표되었다 (Schwoebel 등, 2002; Yasuda 등, 2006). 이와 같은 현상이 노화가 진행될 때에도 나타나는지 알아보기 위해 HDF 젊은 세포와 HDF 노화세포에서 Ran 의 위치를 면역형광 세포염색 (immunocytochemistry) 방법을 통해 관찰한 결과 젊은 세포와 비교해 볼 때 노화된 세포에서 세포질에 위치한 Ran 의 비율이 현저히 높게 나타났다 (Fig. 10) 이는 Ran 의 활성화 정도를 간접적으로 나타낼 수 있다. 간단하게 설명하면 actin 이 세포질로 내보내질 때 핵 내에서 GTP 와 결합된 Ran 은

actin 과 exportin 6 의 결합체와 결합해 세포질로 나가면서 GTP 의 형태가 GDP 로 변화한다고 예상할 수 있다.

젊은 세포와 노화된 세포에서 cofilin, exportin 6, Ran 의 활성이나 발현차이를 관찰하였는데 이러한 현상들이 유도 노화 세포에서 나타나는지 알아보기 위해  $H_2O_2$  를 처서 노화를 유도시켰다. 노화가 유도되었다는 것은 SA- $\beta$ -gal 염색을 통해서 알 수 있었고 이때 cofilin 의 인산화 정도를 관찰했다 (Fig. 11B, C). 그 결과 노화세포와 마찬가지로 탈인산화된 cofilin 이 감소하는 것을 관찰하였고 다른 실험으로써 단순히  $H_2O_2$  를 단시간 처리했을 때에도 같은 현상을 관찰했다. 또한 Ran 의 위치를 면역형광염색법을 이용해 관찰했다 (Fig. 11D). 노화가 유도되지 않은 세포에 반해 노화가 유도된 세포에서 Ran 은 상당수가 세포질에 존재하는 것을 관찰 하였다. Ran 과 exportin 6 의 발현변화 도 western blot 으로 관찰했다. 하지만 Ran 과 exportin 6 의 발현에는 어떠한 변화도 관찰 할 수 없었다 (Fig. 11C). 이 또한 단시간  $H_2O_2$  를 처리한 세포에서도 같은 현상을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과가 나타나는 이유는 SA- $\beta$ -gal 에 염색된 세포들이 약하게 염색되어 있는 것으로 보아 노화가 약하게 유도되었다 짐작할 수 있고 따라서 노화의 진행이 지속적으로 일어나면 나타날 것이라는 생각을 할 수 있었다.



## V. 결 론

본 연구를 통해 노화가 진행되는 동안 actin이 핵 내에 축적되는 기전은 actin을 세포질에서 핵으로 들여보내는 조절인자와 핵 내에서 세포질로 내보내는 조절인자의 변화에 의해서 일어난다는 현상이라는 것을 관찰하였다. 이와 같은 사실은 노화가 진행되고 있는 HDF 세포에서 핵으로 들여보내는 역할을 하는 cofilin의 인산화 정도가 감소해 cofilin의 활성도가 높아져 G-actin의 형성을 촉진할 것이라는 것을 짐작할 수 있었으며 또한 노화가 진행된 세포에서 actin과 같이 cofilin 또한 핵 분획에서 증가하는 현상을 관찰해 노화가 진행 될수록 cofilin도 핵으로 이동한다는 사실을 알 수 있었다. 이 결과들을 통해 노화가 진행될수록 cofilin이 actin을 핵으로 더 많이 들어가게 한다는 것을 예상 할 수 있었다. 그리고 임인경 교수 실험실에서도 이와 같은 사실을 보고한바 있어 현상을 확연하게 할 수 있었다. 다음 실험으로 actin을 세포질로 내보내는 기능을 하는 exportin 6의 발현이 노화가 진행 될 수록 감소하는 것을 관찰하였다. 그리고 exportin 6를 발현 하는 vector을 제작해 actin과 exportin 6가 결합하는 것을 관찰 했다. 이를 통해 노화가 진행 되면 exportin 6의 감소로 인해 actin과 결합하는 정도가 감소하고 이로써 세포질로 내보내는 역할이 결여될 것이라 생각할 수 있었다. 마지막 실험으로 exportin 6가 역할을 수행할 때 중요한 조절인자로 작용하는 Ran이 젊은 세포에서는 핵 내에 주로 존재하다가 노화된 세포에서는 세포질로 이동하는 것을 관찰하였다. 이러한 위치변화는 Ran에 결합되어있던 GTP가 NPC (nuclear pore complex)를 나오면서 GDP로 바뀌어 있다는 것을 의미하며 GDP가 결합되어 있는 Ran은 핵 안에서의 기능이 결여되어 있어

exportin 6의 기능을 제대로 못하게 할 것이라 예상했다. 그리고 Ran의 발현이 감소함을 관찰해 exportin 6의 기능이 억제될 것이라는 생각을 확신했으며 이러한 결과를 종합해 보면 actin을 핵으로 들여보내는 조절인자와 세포질로 내보내는 조절인자에 변화가 있기 때문에 actin이 핵 내에 축적되어있는 것이라고 생각하였다. 이런 현상들이 노화를 유도시켰을 때도 일어나는지 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리해서 노화를 유도시켜 exportin 6와 Ran의 발현변화, cofilin의 인산화된 정도 그리고 Ran의 위치변화를 관찰하였다. 세포가 노화가 진행되었다는 것은 SA-β-gal에 염색된 정도를 보고 알 수 있었고 이때 Ran의 위치변화를 면역형광염색법을 이용해 관찰한 결과 스트레스를 받지않은 세포에서 Ran은 44%가 핵 내에 존재했는데 반해 조기노화가 유도된 세포에서는 4배 가량 떨어진 11%만 핵 내에 존재하는 것을 관찰하였다. 그리고 인산화된 cofilin 정도가 40% 감소하는걸 관찰했다. 하지만 exportin 6나 Ran의 발현은 각각 10%, 20%만 감소하는 것은 관찰했다. 이 결과 actin의 location을 결정하는 주요인이 Ran과 cofilin일거라 예상할 수 있었고 exportin 6의 발현 감소에 의한 영향은 노화가 오래 지속됨에 의해서 나타날 것이라 예상할 수 있었다. 지금까지의 실험은 현상을 관찰한 실험으로써 exportin 6와 Ran의 발현 감소가 나타나는 기전 그리고 Ran이 세포질로 위치가 변화되는 현상이 GTP와 결합된 형태가 감소해서 나타나는 현상인지 밝히는 연구가 계속 진행되어야 할 과제로 남아있다.

## 참 고 문 헌

1. Bettinger BT, Gilbert DM and Amberg DC: Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 410-415. 2004
2. Bohnsack MT, Stuken T, Kuhn C, Cordes VC and Gorlich D: A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. *Nature cell biology.* 8: 257-263. 2006
3. Chen M and Shen X: Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 19: 326-330. 2007
4. Chen Q and Ames BN: Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 4130-4134. 1994
5. Cristofalo VJ and Pignolo RJ: Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol Rev.* 73: 617-638. 1993
6. Duan J, Duan J, Zhang Z and Tong T: Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int J Biochem Cell Biol.* 37: 1407-1420. 2005
7. Gorlich D, Pante N, Kutay U, Aebi U and Bischoff FR: Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *The EMBO journal.* 15: 5584-5594. 1996
8. Harman D: Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci.* 928: 1-21. 2001
9. Hayflick L: The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res.* 37: 614-636. 1965
10. Hofmann WA, Stojiljkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, Philimonenko V, Kysela K, Goodrich JA, Lessard JL, Hope TJ, Hozak P and

- de Lanerolle P: Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nature cell biology*. 6: 1094-1101. 2004
11. Iida K, Matsumoto S and Yahara I: The KKRKK sequence is involved in heat shock-induced nuclear translocation of the 18-kDa actin-binding protein, cofilin. *Cell Struct Funct*. 17: 39-46. 1992
  12. Izaurralde E, Kutay U, von Kobbe C, Mattaj IW and Gorlich D: The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *The EMBO journal*. 16: 6535-6547. 1997
  13. Jonsson AP, Aissouni Y, Palmberg C, Percipalle P, Nordling E, Daneholt B, Jornvall H and Bergman T: Recovery of gel-separated proteins for in-solution digestion and mass spectrometry. *Anal Chem*. 73: 5370-5377. 2001
  14. Kim HS, Song MC, Kwak IH, Park TJ and Lim IK: Constitutive induction of p-Erk1/2 accompanied by reduced activities of protein phosphatases 1 and 2A and MKP3 due to reactive oxygen species during cellular senescence. *J Biol Chem*. 278: 37497-37510. 2003
  15. Kwak IH, Kim HS, Choi OR, Ryu MS and Lim IK: Nuclear accumulation of globular actin as a cellular senescence marker. *Cancer Res*. 64: 572-580. 2004
  16. Lim IK, Won Hong K, Kwak IH, Yoon G and Park SC: Cytoplasmic retention of p-Erk1/2 and nuclear accumulation of actin proteins during cellular senescence in human diploid fibroblasts. *Mech Ageing Dev*. 119: 113-130. 2000
  17. Moore MS: Ran and nuclear transport. *J Biol Chem*. 273: 22857-22860. 1998
  18. Nakielny S and Dreyfuss G: Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell*. 99: 677-690. 1999

19. Pendleton A, Pope B, Weeds A and Koffer A: Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *J Biol Chem.* 278: 14394-14400. 2003
20. Percipalle P and Visa N: Molecular functions of nuclear actin in transcription. *J Cell Biol.* 172: 967-971. 2006
21. Robles SJ and Adami GR: Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene.* 16: 1113-1123. 1998
22. Sanes DH, Goldstein NA, Ostad M and Hillman DE: Dendritic morphology of central auditory neurons correlates with their tonotopic position. *J Comp Neurol.* 294: 443-454. 1990
23. Schwoebel ED, Ho TH and Moore MS: The mechanism of inhibition of Ran-dependent nuclear transport by cellular ATP depletion. *J Cell Biol.* 157: 963-974. 2002
24. Serrano M and Blasco MA: Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol.* 13: 748-753. 2001
25. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D and Lowe SW: Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 88: 593-602. 1997
26. Sherwood SW, Rush D, Ellsworth JL and Schimke RT: Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85: 9086-9090. 1988
27. Shumaker DK, Kuczmarski ER and Goldman RD: The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Curr Opin Cell Biol.* 15: 358-366. 2003

28. Smith A, Brownawell A and Macara IG: Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol.* 8: 1403-1406. 1998
29. Stuken T, Hartmann E and Gorlich D: Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *The EMBO journal.* 22: 5928-5940. 2003
30. Van Impe K, Hubert T, De Corte V, Vanloo B, Boucherie C, Vandekerckhove J and Gettemans J: A new role for nuclear transport factor 2 and Ran: nuclear import of CapG. *Traffic.* 9: 695-707. 2008
31. Wada A, Fukuda M, Mishima M and Nishida E: Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *The EMBO journal.* 17: 1635-1641. 1998
32. Yasuda Y, Miyamoto Y, Saiwaki T and Yoneda Y: Mechanism of the stress-induced collapse of the Ran distribution. *Exp Cell Res.* 312: 512-520. 2006
33. Zhao K, Wang W, Rando OJ, Xue Y, Swiderek K, Kuo A and Crabtree GR: Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell.* 95: 625-636. 1998
34. Zhu J, Woods D, McMahon M and Bishop JM: Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* 12: 2997-3007. 1998

-ABSTRACT-

**Nuclear accumulation of G-actin in cellular senescence: Reduced expressions of  
exportin 6 and Ran small G protein**

Su Hyun Park

Department of Medical Sciences  
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by professor In Kyoung Lim)

Actin is a highly conserved, ubiquitous cytoskeletal protein, which contains two leucine-rich nuclear export signal (NES) sequences in the middle of the molecule. It has been known that actin is exclusively kept in the cytoplasm by exportin 1 (CRM1)-driven nuclear export. However, CRM1 has been reported to be not directly involved in actin export from vertebrate or *Drosophila* nuclei. On the other hand, exportin 6 (exp6) has been found as a novel family member from higher eukaryotes. Exp6 mediates nuclear export of profilin-actin complexes. We earlier reported that actin was accumulated in nucleus during replicative senescence of human diploid fibroblast (HDF). In the present study, we found that the increase of doubling time of HDF cells decreased exp6 and Ran expression as well as phosphorylated cofilin. Concurrently, Ran was transported into the cytoplasm. We attempted to determine possible involvement of exp6 in the regulation of actin accumulation in nuclei,

by employing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent model. Exp6 and Ran expressions were not changed and Ran was localized in cytoplasm. Phosphorylated cofilin was decreased in induced senescent cells. These results suggest that exp6, Ran and cofilin are involved in the regulation of actin accumulation in nuclei during cellular senescence.

---

Key words : ran , exportin 6, actin, induced-cellular senescence, HDF, Huh7