

세포 구조 연구를 위한 Electron Tomography

한 성 식

Laboratory of cell engineering and 3D structure, School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701

세포의 구조 연구는 여러 종류의 현미경을 통해 이루어져 왔다. 광학현미경이나 형광현미경은 조직이나 세포의 구조를 쉽게 볼 수 있는 방법으로 이용되어 왔으나, 해상도 한계에 의해 세포내 소기관의 구조를 연구하는데 이용되기는 어렵다. 그에 반해 짧은 파장의 전자빔을 광원으로 하는 투과전자현미경은 세포 내 소기관의 구조를 연구하는 데 충분한 해상도를 제공한다. 그러나 일반적인 투과전자현미경은 100 nm 이하의 매우 얇은 시료만이 관찰 가능하며, 대개 연구하고자 하는 시료의 심도방향의 구조 정보는 상당 부분 소실된다. 또한 투과전자현미경으로부터 얻어지는 영상은 그 두께 내의 시료를 투사해서 얻어지는 영상이므로 이 투사된 2차원의 단면 영상은 구조를 해석함에 있어 오류를 범할 가능성을 준다. 이에 세포 내 소기관들에 대한 구조연구에 있어 3차원 입체 구조의 구현은 세포생물학 연구에 매우 중요하다. 투과전자현미경의 영상으로부터 3차 구조를 구현하는 방법은 구현하고자 하는 시료가 무엇인지에 따라 크게 세포나 세포내 소기관들의 구조를 구하는 방법과 단백질이나 바이러스처럼 생체 내에서 입자로 존재하는 개별의 물질의 구조를 구하는 방법으로 나눌 수 있다. 우선, 세포와 세포 내 소기관의 3차 구조를 구현하는 방법은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 연속 절편의 3차 구조 구현과 tilt된 영상의 3차 구조 구현이 그것이다. 첫 번째로 연속절편의 3차 구조 구현 방법은 시료를 연속적으로 section함으로써 얻어지는 연속절편을 투과전자현미경으로부터 영상을 얻어내어 그 연속절편 영상들을 이용한다. 투과전자현미경으로부터 획득된 영상들을 쌓아서 각 방향에 맞추어 정렬을 거친 후, 각 절편에서 구현하고자 하는 부분의 구조를 윤곽선으로 그려내어 surface rendering을 통해 3차원적으로 보여지게 된다. 이것은 비교적 크기가 큰 소기관이나 세포의 구조를 구현하는 데 유용하다. 두 번째 방법은 시편을 tilt해서 얻어진 영상을 이용하는 방법으로, 한 시편 내의 3차 구조를 구현하는 방법이다. 일반적으로 한 시료를 -60도에서 +60도까지 1도 내지 2도 간격으로 점차적으로 기울여 투과전자현미경 영상을 획득한다. 이것은 앞의 방법과 마찬가지로 정렬을 거쳐 3차원으로 보여줄 수 있다. 이 방법을 통해서 한 시편 내에 있는 세포나 소기관의 3차 구조를 확인 할 수 있다. 이 방법은 mitochondria와 같은 세포 내 소기관들의 미세 구조를 구하는데 상당히 유용하다. 이 방법에서는 관찰되는 시편의 두께가 두꺼울수록 더 많은 심도 방향의 구조 정보를 얻을 수 있다. 따라서 일반적으로 관찰하는 투과전자현미경 시료의 두께인 100 nm 이내 보다 두꺼운 시료를 이용하여 구조를 구하는 것이 좋다. 투과전자현미경으로 관찰하는 시편의 두께는 투과전자현미경의 가속전압에 의해 결정된다. 가속 전압이 높을수록 더 짧은 파장의 빔을 만들어 냈으므로 보다 두꺼운 시료를 투과할 수 있다. 따라서 더 많은 구조 정보 분석을 위해서는 두꺼운 시료를 투과해서 영상을 얻을 수 있는 초고압 투과전자현미경의 이용이 유용하다. 이 방법으로 얻어진 영상 중 +8도와 -8도의 두 영상만으로 stereo-mirror나 적목 안경을 끼고 보는 analography 기법을 통해 시편 내의 각 구조체들의 입체적 관계를 쉽게 볼 수 있다. 또한 tilt된 연속 영상은 weighted back-projection algorithm과 같은 방법을 통해 광학적으로 만들어진 연속된 영상으로 만들어져 앞의 연속절편 3차 구조 구현과 같은 방법으로 시료를 볼 수 있게 해 준다. 단백질이나 바이러스 같은 생체 내에 존재하는 거대분자의 3차 구조를 구현하는 방법은 Manfred Auer가 거대분자의 종류에 따라 single particle analysis, electron crystallography, icosahedral reconstruction, helical reconstruction의 방법들로 명확하게 분류하여 놓았다. Single particle analysis 방법은 500kDa 이상의 거대 단백질이나 단백질 복합체의 구조를 구하는 데 유용하다. 이 방법은 한 입자를 여러 방향에서 본 후에 각 방향에서의 구조를 한 공간 안에 모아놓으면, 그 입자의 3차 구조를 알 수 있다는 개념에서부터 출발한다. 이 방법은 구조가 같은 단백질들이 여러 방향으로 놓여있는 여러 장의 영상을 획득한 후, 그 영상을 한 공간 안에 각 방향에 맞추어 쌓음으로서 3차 구조를 구현할 수 있게 된다. 이때 이용된 영상의 수가 많을수록 구현되는 구조의 질은 향상될 수 있다. Electron crystallography는 잘 정렬된 단백질의 이차원 crystal을 전자현미경으로 분석하는 기술로, lipid layer 사이에 포함되어 있는 막성 단백질을 lipid와 단백질의 잘 정렬된 이차원 결정을 만들어 분석함으로써 막성 단백질의 구조 구현에 매우 유용하게 이용되고 있다. 이차원 결정으로부터 얻어진 영상은 반복적인 패턴을 보여주고 있어서 더 많은 영상을 얻는데 용이하며, 반복 패턴을 분석하는 기법으로 더 나은 구조를 구현하게 할 수 있다. Icosahedral reconstruction 기법은 대칭성을 갖는 바이러스의 구조를 구하는데 유용하다. 일부 바이러스는 capsid 단백질이 존재하여 대칭성을 나타내는 데, 대표적인 대칭구조는 정이십면체 구조이다. 대칭성은 구조의 방향을 결정하는 데 도움을 주므로 single particle analysis 보다 더 좋은 결과를 보여줄 수 있다. 마지막으로 helical reconstruction 기법이 있다. 이것은 actin이나 microtubule처럼 helical 형태로 대칭성을 갖는 단백질의 구조를 구현하는 데 유용한 방법이다. 이러한 단백질들은 다르게 긴 방향을 따라 일정한 구조가 반복되므로 tubular crystal이라고도 할 수 있다. Biological process들은 시간에 따라 공간 안에서 일어나는 것이며, 이를 올바르게 이해하기 위해서는 시간과 공간에 따른 구조 연구가 필요하다. 이전의 이차원 공간에서의 구조 연구는 구조 분석의 오류에 의해 기능의 해석에 오류를 줄 수 있었으나, 3차원 구조 연구를 통해서 보다 정확한 구조 연구가 가능해졌다. 따라서 3차원 공간 안에서 세포의 구조 분석은 세포의 기능을 해석하는데 유용한 방법이 되며, 이를 위해서는 위에서 설명된 여러 가지 방법들이 이용될 수 있다.