

電氣의 場媒介에 의한 세포의 융합

- 세포의 전기융합기술 -

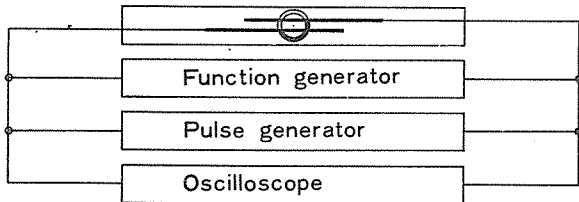
金 宇 鎬

〈강원대 생명과학연구소〉

『電氣作動으로 현미경하의 융합 Chamber 에서 高率로 각종세포를 융합시킬 수 있다.』

細胞融合 (cell fusion) 은 膜의 연구나 遺傳子 地圖化등에 커다란 잠재력을 지니고 있다. 더구나 體細胞의 雜種形成法은 遺傳子工學과 더불어 植物細胞를 修飾하여 결과적으로 改良作物을 만들어내는 方途를 제공한다. 또한 抗體生産能力을 지니는 淋巴球를 永久培養이 가능한 骨髓腫 (myeloma) 細胞와 같은 株化細胞系와

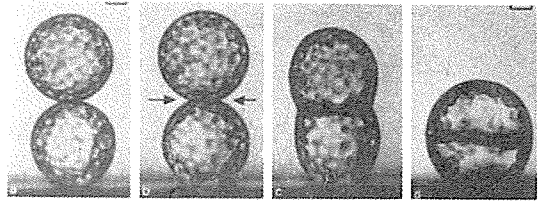
Fusion chamber



〈圖 1〉 電氣의 場에 의한 細胞融合에 사용되는 實驗裝置의 設置圖式

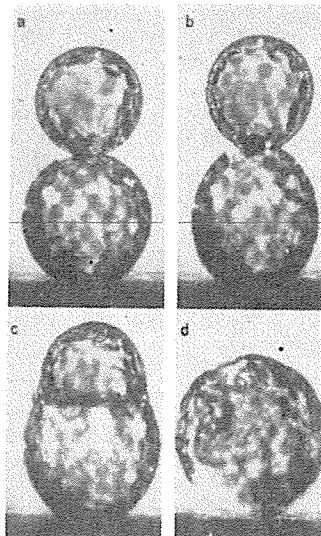
顯微鏡下에서 관찰할 수 있는 두 電極 (白金線)을 平行하게 Slide glass 上에 固着시킨다. Dielectrophoresis用 電壓의 周波數와 振幅은 function generator에 의해서 調節되며, 동시에 pulse generator와 連結되어 膜破損 pulse를 발생시키는데 사용된다. 作用시킨 電壓은 Oscilloscope에 기록된다. (Zimmermann 博士의 書信에 의하면 美國의 GCA Corporation社는 이 裝置를 製作中이며 今年末에 市販할 예정이라 하였다).

융합시키면, 사전에 정해진 特定抗原決定基에 대응하는 monoclonal(單클론性)抗體를 생산할 수 있는 소위 hybridoma 細胞가 형성된다. 雜種融合細胞腫이라고 할 수 있는 hybridoma가 合成分泌하는 monoclonal抗體 (MAb)는 장차 臨床診斷과 感染病의 치료에 있어서 뿐만아니라 細胞生物學的 및 醫學的인 化合物의 純化 및 豐盛化에 있어서도 중요한 도구로 등장하게 될 것이다. 또한 최근에는 農業 및 食品産業分野에 있



〈圖 2〉 Avena sativa (귀리)의 mesophyll protoplast (葉肉原研質體)間的 融合 (interference contrast micrograph).

(a) 0.5M mannitol液에서 高稀釋으로 浮游시킨 細胞가 電氣作動으로 "pearl Chain"을 형성한 모양 (強度 200V/cm, 非平等交流周波數 500kHz), 두 近接細胞가 서로 膜面을 접촉시키고 있다. (b) 交流電界強度를 증가시키므로서 成就된 細胞膜接觸部位가 平平하게 된다. (c, d) 600V/cm의 直流電界pulse를 5 μ s (100萬分之 15秒)間 作用시키므로서 두 細胞가 融合된다. (c)는 15초후, (d)는 30초후. (Bar: 10 μ m).

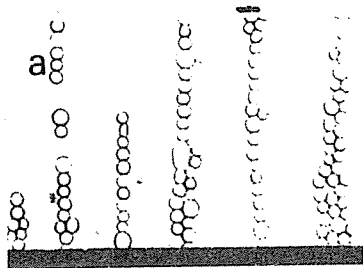


〈圖 3〉 Vicia faba (蠶豆)의 mesophyll protoplast間的 電氣刺戟에 의한 細胞融合過程

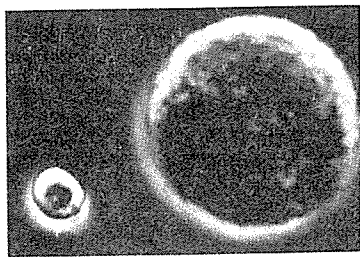
(a) 2個 protoplast가 dielectrophoresis에 의해서 나란히 接觸한다. 直流電氣場 pulse (1.5V, 30 μ s)를 作用시킨 後 각각 (b) 10秒後, (c) 4分後, (d) 30分後의 融合狀態이며, 30分으로 融合이 完了된다.

어서의 MAb의 潜在的 應用的 有用성이 力說되고 있다. 그러나 數 많은 희망적인 結果와 노력에도 불구하고 細胞融合技術은 아직도 克明한 科學이라기보다 예술의 어떤 境地를 聯想케 하는 것이다.

現象論的으로 細胞融合은 현재 주로 化學劑에 의해서 試驗管內에서 行해지는 것으로, 膜破損製劑에 의해서 非生理的인 과정이나 조건(高 Ca^{2+} 濃度, 높거나 낮은 PH價, 低張狀態등) 下에서 성취된다. 그동안 많은 연구가 行해졌으나 아직도 이 方法으로는 세포의 融合過程에 關한 分子機轉을 解析하는데에는 어려움이 있으며, 몇가지 限制점을 지니고 있는 것이다.



癌化된 mouse 赤芽細胞가 兩電極사이에서 “pearl Chain”을 形成(dielectrophoresis)하고 있는 모습. 세포를 1 mg/ml의 pronase 가 含有된 0.3 M mannitol液(室溫)에 浮游시킨다. (b) 4kV/cm, 20 μ s 동안 電氣場 pulse를 적용시킨 5分 후의 Friend 融合巨細胞(1,000個 以上의 세포가 融合될수 있음).



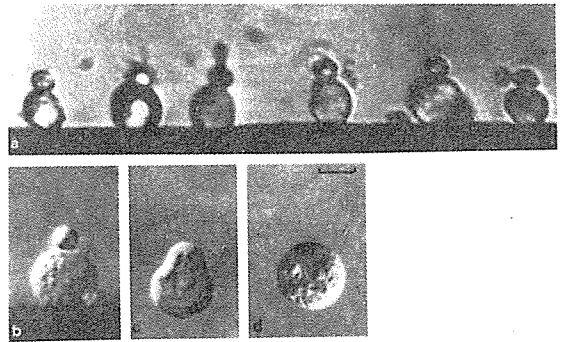
〈圖 4〉 電界에 의한 Friend細胞의 融合. (a) 50V/cm, 2 MHz의 交流電界作動으로 Friend細胞(Friend virus에 의해서

◇ 電氣場(電界)에 의한 細胞의 融合(電氣融合技術)

約 2年前 西獨의 Jülich核醫學研究所(膜研究教室)의 Zimmermann博士와 그 協同研究者는, 細胞(植物)를 低強度의 非平等交流電氣場(non-uniform, alternating electric field of low strength)에 노출시킨 다음 뒤이어 高強度의 直流電氣場 pulse를 短時間(short electric field

pulse of high intensity) 적용하는 새로운 融合技術을 처음으로 보고하였다. 적어도 2個細胞

〈圖 5〉 Mouse B淋巴球와 骨髓腫細胞와의 電氣的 融合으로 hybridoma細胞를 形成하는過程(interference contrast micrograph)



(a) 特殊한 融合 chamber에서 誘電泳動(dielectrophoresis)으로 電極에 個個骨髓腫(myeloma)細胞가 附着한다. 뒤이어 같은 方法으로 個淋巴球가 各骨髓腫細胞上에 덧붙도록 한다(異種2個 細胞의 “pearl chain” 形成). 實驗直前에 pronase P(1mg/ml)를 加入한다. (b~d) 電界 pulse(4kV/cm, 20 μ s 동안) 作用後 融合細胞를 chamber로 부터 채취하여 150mM NaCl 및 1mM $CaCl_2$ 를 含有한 溶液에 浮游시키면 融合細胞인 hybridoma가 圓形化한다. 融合過程 (b) 電界 pulse 作用直後, (c) 15分後, (d) 30分後. (Bar: 10 μ m)

間의 확고한 膜의 接觸이 非平等交流電氣場에 의한 “dielectrophoresis”(誘電泳動) 즉, 세포의 眞珠連鎖(“pearl chain”) 形成에 의해서 야기되며, 뒤이어 高強度의 電氣場 pulse의 注入에 의해서 細胞膜 接觸部位에 可逆的인 電氣的破損(小孔形成)이 일어나게 되며, 결과적으로 세포 融合이 이루어진다. (圖 1~6 參照)

이와같은 電氣場에 의한 細胞融合(electric field-induced cell fusion)技術은 化學的(PEG등) 또는 virus에 의한 融合過程에 있어서의 大部分의 불리한 점을 회피할 수 있다는 것이다. 이와같은 電氣融合(electrofusio)에 關한 연구는 膜融合의 새로운 개념에 대한 상당량의 정보를 축적시켰으며 精確화시켰다. 그러나 Zimmerm-

ann 博士에 따르면 더 많은 實驗을 필요로 하며 이 특수한 분야의 연구가 계속 진행되고 있다는 것이다.

Zimmermann 博士등의 論文을 통해서 細胞의 電氣融合術을 간략히 설명하면 다음의 2 단계로 진행된다(圖 1~6 및 表 1).

1) 細胞(浮游液)를 融合 chamber의 두 電極 사이에 넣고 function generator로 低強度의

秒~數十秒) 작용시키므로서 “pearl chain”으로 접촉된 細胞膜部位에 可逆的인 電氣의 毀損(小孔形成)이 일어나 결과적으로 세포들이 융합된다. “pearl chain”을 형성한 세포는 電氣場에 平行하여 竝列하므로 電氣의 膜破損은 주로 두 細胞間의 接觸部位에서 일어난다. 膜破損後의 融合과정은 세포의 種에 따라 數秒에서 數分 사이에 수행된다.

(表 1) U. Zimmermann 등이 施行한 細胞의 電氣融合成績의 概要

細胞 1	細胞 2	培 地 添 加 物	細小常 腔間隔 (μm)	Dielectrophoresis (電氣誘引)의 條件		膜破損을 위한 電氣場의 條件		融 合 時 間 (分)
				最大電氣 場強度 (V/cm)	電氣誘引 의 時間 (MHz)	電氣場의 強度 (V/cm)	作用時間 (μs)	
Avena sativa(燕麥)의 mesophyll-protoplast (葉肉細胞)	1 對向-	0.5M mannitol	200	200	0.5	750	20	3~60
Vicia faba(蠶豆)의 mesophyll-protoplast	1 對向-	"	200	200	0.5	750	50	30~60
Vicia faba의 孔道 (guard) 細胞의 protoplast	Vicia faba의 mesophyll- protoplast	0.6M mannitol	200	200	0.5	2,000	50	20~40
Petunia의 mesophyll-protoplast	1 對向-	0.5M mannitol	200	200	0.5	750	50	30~60
Kalanchoe의 mesophyll-protoplast	1 對向-	0.3M sorbitol	300	70	1	570	20	0.5
"	Kalanchoe의 液 體	"	300	70	1	500	20	0.5
Kalanchoe의 液 體	1 對向-	0.4M Sorbitol	300	5.50	1	570	20	0.1~0.2
Kalanchoe의 mesophyll-protoplast	Avena Sativa 의 mesophyll- protoplast	"	300	70	1	570	20	1
Saccharomyces 酵母 protoplast (發 酵 菌)	1 對向-	1.2M So- rbitol & 1mM CaCl ₂	30?	1,000	2	11,000	7	1.5~
"	1 對向-	"	"	1,000	2	7,000~ 8,000	40	2~
(海 參)의 細胞	1 對向-	1.2M glucose	70	2	2	500	25	
"	1 對向-	+ pronase 2mg/ml	140	2	2	1,000	50	
사람의 赤血球	1 對向-	0.3M glucose	100	1,000	2	2,200	4	2~4
Friend 細胞	1 對向-	"	100	1,000	2	2,200	1~2	5~50
Mouse 3T3 纖維母細胞	1 對向-	0.3M mannitol	400	1	1	7,000	40~50	
Mouse S 細胞	1 對向-	" + pronase 1mg/ml	200	5	5	5,000	20	
Mouse 骨髓 細胞	Mouse 淋巴 球(B細胞)	280mM mannitol + 20mM histidine + pronase $\mu\text{g}/\text{ml}$	100	100	1	4,000	20	20~30
Liposome (人工脂質膜小胞)	1 對向-	0.75M Sucrose	300	330	2	660	20	<0.1

非平等交流電氣場을 작용시키면 細胞의 偏極移動에 따라 兩電極 사이에 竝列하면서 세포가 서로 膜을 확고히 접촉시킨다. 이 작용을 “dielectrophoresis”(誘電泳動)라고 하며, 俗稱 “pearl chain”(眞珠連鎖)의 형성이라고도 한다(圖 4의 a).

“pearl chain”의 길이는 細胞浮游液의 濃度(細胞密度)와 電氣場의 非平等性에 의거하는 것으로, hybridoma 細胞와 같이 單 2個의 異種細胞가 접촉하도록 하기 위해서는 특수한 融合 chamber를 사용하여야 한다.

2) 形成된 “pearl chain”에서의 細胞間的 融合은 pulse generator로, 뒤이은 높은 電界強度를 갖는 直流 pulse를 超短時間(百萬分之 數

◇ MAb 生産을 위한 電氣融合術에 의한 hybridoma 細胞의 作製

MAb의 有用性은 널리 이해되어 있으므로 本橋에서는 설명을 생략하기로 한다.

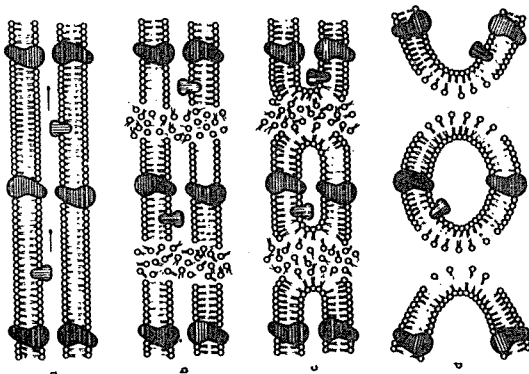
Zimmermann 博士팀은 細胞의 電氣의 融合研究에서, 지난해에 電氣水力學的方法(electrohydraulic procedure)으로 hybridoma 細胞를 高率로 生産시키는 實驗을 시행하였다. 이것은 특수한 融合 chamber內的 誘電泳動에 있어 높은 稀釋의 細胞浮游液중의 각각 상이한 종류의 2개 細胞(淋巴球와 骨髓細胞)만이 접촉하도록 하는 방법으로서, MAb를 分泌하는 hybridoma 細胞

胞의 생산에 있어 획기적인 잠재력을 지니는 것으로 보인다. 특히 異種核型의 細胞間의 경우 電氣場을 작용시키기 前 pronase 또는 dispase 와 같은 酵素를 細胞浮游液에 첨가하여야 한다 (表1 參照). 이와같은 特殊酵素의 이용은 骨髓腫細胞와 淋巴球細胞와 같은 크기가 상이한 細胞의 電氣의融合에서 필요하다. 예컨대, mouse의 淋巴球는 mouse 骨髓腫細胞에 비해 훨씬 작으므로 球形細胞에 대한 集積된 Laplace等式에 따르면, 電氣의 強度는 容積의 기능이기 때문에 두 細胞型에 대해서 電氣場의 強度가 각각 상이한 것이다. 그러나 骨髓腫細胞를 더 오랜 시간 高濃度의 pronase (1mg/ml)로 事前處理하면 더 높은 電界強度의 더 긴시간의 폭로에 대해서 안정하게 된다. 그런 다음 全然 pronase로 처리하지 않았거나 低濃度의 것으로 처리한 淋巴球와 융합시키면 高率의 生存可能 hybridoma細胞를 얻을 수 있다는 것이다 (50~

80% 또는 그以上). 이때 融合過程은 顯微鏡下에서 이루어지기 때문에 융합된 세포인 hybridoma를 쉽사리 識別할 수 있으며 (圖5 參照), 따라서 既存方法에서, 骨髓腫細胞나 淋巴球로부터 hybridoma細胞를 분리하고자 사용한 HAT培地와 같은 選擇培養液의 이용을 피할 수 있다는 것이다.

적절한 細胞密度(浮游液)와 電極(白金線)의 크기의 융합으로 융합될 세포의 數를 事前에 조성할 수 있다. 미소한 兩電極사이에 竝列된 數百, 數千個의 同種細胞를 융합시켜 生存可能의 巨大細胞도 만들 수 있으나 (圖4의 b參照), 前述한바와 같이 異型核의 單2個의 세포로 雜種融合細胞를 만들때는 특수한 融合chamber를 사용하는 水力學的方法이 이용되어야 한다. 다양한 各가지 抗屬에 대해서 MAb를 생산할 수 있는 hybridoma細胞의 大量生産이 電氣의融合術에 의해서 가능하며, HAT培地에서의 時間消耗的이며 구차한 hybridoma細胞의 選抜過程도 피할 수 있을 것이다.

〈圖 6〉 電界(電氣의 場) 媒介融合機轉의 假定的 概要圖解



(a) 두 細胞의 膜이 誘電泳動(dielectrophoresis)에 의한 "pearl chain"形成으로 密接하게 接觸한다. 交流電氣場에 의한 蛋白質의 側面移動(화살표)으로 蛋白質이 없는 脂質 domain이 露現하게 된다. 酵素가 존재하거나 또는 매우낮은 Ca 濃度가 이 過程을 촉진하는 것으로 推定된다. (b) 電氣의 膜破損은 膜接觸部位內에 小孔을 형성하게끔 한다. (c) 本圖에서는 다만 2個의 小孔이 나타나 있으며, 脂質分子의 橋梁이 나란히 놓인 二重膜사이에 형성된다. (d) 그리하여 小胞形成이 야기되고 두 細胞間의 細胞質的 連續性이 성취된다.

◇ 결 언

電氣場의 媒介에 의한 세포의 融合技術이 아직은 幼兒期狀態라 할지라도 Zimmermann 博士 팀의 研究結果로 미루어, 이 新技術이 모든 종류의 세포나 liposome과 같은 人工的인 小胞系의 융합에 널리 응용될 수 있을 것이다.

이 기술은 電氣場에 의한 物質內에서의 二重極의 발생과 細胞膜의 破損에 근거하며, 이 兩效果는 모든 生細胞나 人工的인 小胞系에서 관찰되고 있다. 電氣場의 媒介에 의한 融合技術의 보편적인 적용은 고유의 膜電氣場에 있어서의 변화가 細胞對細胞의 융합에 있어서의 1次的 段階일 것으로 추정된다. 이 기술을 이용하여 장차 융합의 機轉이 電子顯微鏡的 및 螢光分光術과 같은 光學的測定方法으로 해명될 수 있을 것이다. 이것은 電氣的으로 야기된 세포 융합의 同調的過程 때문에 가능할 것이다. 電氣場의 응용에 의해서 얻어지는 雜種細胞의 高率生産方法은 膜研究에서 뿐만 아니라 醫學 및 農業(植物)에 있어서의 강력한 잠재적 응용성을 지니는 것으로 믿어진다.