세포에서의 상전이와 크로마틴 구조

https://doi.org/10.5757/vacmac.5.1.13

김하진, 유제중

Phase Transitions in Cells and the Structure of Chromatins

Hajin Kim and Jejoong Yoo

Phase transition is not unique to solid state systems or homogeneous molecular systems but it is also observed in highly heterogeneous biological systems. Phase transition and phase separation in cells are recently being found to be central to many biological functions by temporarily and locally controlling the storage and exchange of certain proteins and RNAs. There are also clues suggesting them to be playing pivotal roles in the spatial organization of chromosomes into topological domains and its time-dependent control. Here we introduce early efforts to explain at the molecular level how the spatiotemporal organization of chromosomes are programmed and modulated by the sequence and chemical modifications of the DNA. Continuing works may provide a physical framework to understand the molecular level control of chromosome structure and dynamics that determine the epigenetic state and the fate of the cells.

세포에서의 상전이와 상분리

상전이는 비단 고체물리나 화학에서만 접할 수 있는 개념이 아니다. 다양한 분자들이 불균질하게 혼재하여 잘 정의된 집단적 행동이 쉽게 일어나지 않을 것 같은 생체 시스템에서도 상전이는 관찰된다. 생명체의 기본 단위인 세포에서 많은 종류의 상분리(phase separation)된 구조들을 찾을 수 있다. 일단 세포 자체부터 세포막을 통해서 주변과 확실히 분리된 상을 갖춘다. 진핵세포의 경우에는 유전정보를 담고 있는 세포핵, 에너지를 생산하는 미토콘드리아, 단백질을 분해하는 리소좀 등 막(membrane)을 통해 주변으로부터 공간적으로 분리된 구조들이 존재한다. 이러한 막 자체도 그 안에서 지질 분자(lipid)들이 액체 및 젤 상태로 상분리된 도메인들을 형성하는 것으로 알려져 있다. 보다 흥미로운 것은, 반드시 막이 있어야만 상분리가 가능한 것이 아니라는 사실이다. 리보솜을 합성하는 핵소체(nucleolus), Cajal body, 그리고 특정 단백질들과 RNA들이 혼합되어 생겨나는 각종 스트레스 과립(stress granules) 등은 마치 기름과 물을 섞으면 분리된 방울들이 생기듯이 세포 내에서 별도의 막을 형성하지 않고도 주변과 분리된 공간을 만들어낸다. 즉, 액체–액체 상분리(liquid–liquid phase separation)가 세포 내에서 일어나는 것이다 (Hyman, Weber et al. 2014).

이러한 상분리된 구조들이 어떻게 생겨나며 생물학적으로 어떤 목적과 기능을 갖는지는 최근 매우 활발하게 연구되는 주제이다. 최근 들어 밝혀져 가고 있는 한 예

〈저자 약력〉

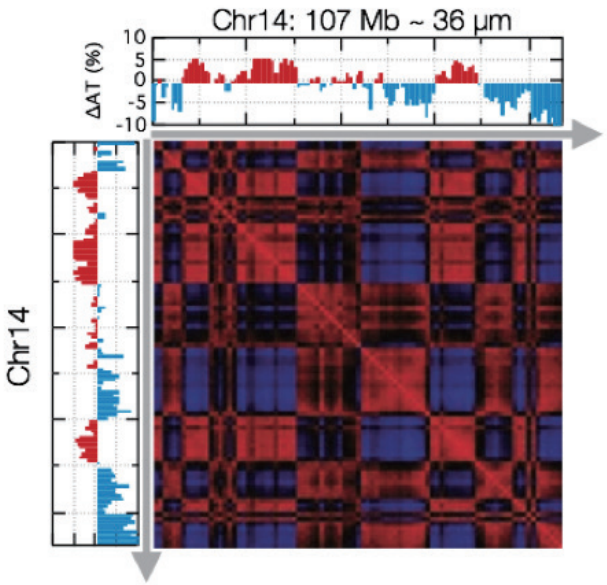
- 김하진 교수는 2006년 서울대학교 물리학과에서 박사학위를 받고, University of California, Berkeley 및 University of Illinois, Urbana–Champaign, Howard Hughes Medical Institute에서 연구원 과정을 거쳐 현재 UNIST에서 조교수로 재직 중이다.
- 유제중 박사는 2010년 University of Wisconsin–Madison에서 박사학위를 받고, University of Illinois, Urbana–Champaign에서 박사후 연구원 과정을 거쳐 현재 기초과학연구원에서 Young Scientist Fellow 로 재직 중이다.

는 예쁜꼬마선충의 배아줄기세포에서 액체 방울의 성질을 지닌 P 과립 (P granule)이 형성된다는 것이다 (Brangwynne, Eckmann et al. 2009). 이들은 단일세포 상태일 때부터 배아의 앞쪽과 뒤쪽이 될 영역을 차별하여 분포하고, 다양한 RNA를 안에 머금음으로써 가용한 RNA의 농도를 시간에 따라 조절하여 위치와 시간에 따른 세포들의 올바른 분화를 유도하는 것으로 추측되고 있다. 상분리된 생체분자들은 질병과도 깊이 연관되어 있는데, 최근의 한 흥미로운 연구는 CAG 염기서열의 반복이 확장되면서 생기는 헌팅턴병이나 GGGGCC 서열이 반복되면서 생기는, 흔히 루게릭병이라고 불리는 근위축성 측색경화증(amyotrophic lateral sclerosis)에서 이러한 반복염기서열이 발현된 RNA들이 세포핵 내에서 뭉치면서 상분리된 방울들을 형성하고 이것이 발병의 기작일 것이라고 제시하고 있다 (Jain and Vale 2017). 세포 내의 상분리에 대한 연구는 이제 막 시작했다고 해도 과언이 아니며, 앞으로 이러한 관점에서 그동안 이해하지 못 했던 많은 생물학적 현상을 설명할 수 있을 것이다.

염색체의 도메인 구조와 상분리

생명체의 가장 중요한 분자인 DNA에서도 상전이 및 상분리 현상이 일어나며 그것이 유전자 발현의 조절을 통해 세포의 운명을 결정하는 중요한 기작일 것이라는 가설들이 제시되고 있다. 각 세포는 2 m에 달하는 길이의 DNA를 갖고 있고, 이들이 수 마이크론의 세포핵 내에 들어가기 위해 DNA가 히스톤 단백질에 감긴 뉴클레오좀이라는 가장 기본 단위로부터, 여러 단계에 걸쳐 계층적으로 고차원 구조를 만든다. 이 과정에서 DNA는 단순히 접히고 말리는 것이 아니라, 보다 열려있고 유전자 발현 활성을 갖는 euchromatin 영역과, 반대로 닫혀있고 유전적으로 비활성화된 heterochromatin이라는 영역으로 나뉘는 것을 포함하여 다양한 종류의 복잡한 도메인 구조를 이룬다.

흥미로운 것은, 최근의 한 연구에 따르면, HP1a라는 heterochromatin을 형성하는 단백질이 위에서 보인 예들과 마찬가지로 상분리된 액체 방울들을 형성하고 이 방울들이 곧 heterochromatin 도메인의 형성을 나타낸다는 것이다 (Strom, Emelyanov et al. 2017). 이는 HP1a가 크로마틴의 응축을 통해 마치 침전덩어리와도 같은 heterochromatin 도메인을 만든다는 기존의 관점으로부터, 상분리되었지만 마치 물 속의 기름방울들처럼 여전히 액체의 성질을 갖고 동적으로 자기들끼리 뭉치고 분리되거나 분자를 주고받을 수 있는 영역들로 존재한다는 새로운 관점으로의 전환을 의미한다.



[Fig. 1] Correlation between the Hi-C map (2D heat map; data reproduced from Lieberman-Aiden et al., 2009 (Lieberman-Aiden, van Berkum *et al.* 2009)) and the variation of local sequence composition (bar graphs showing regions with higher (red) and lower (blue) AT content).

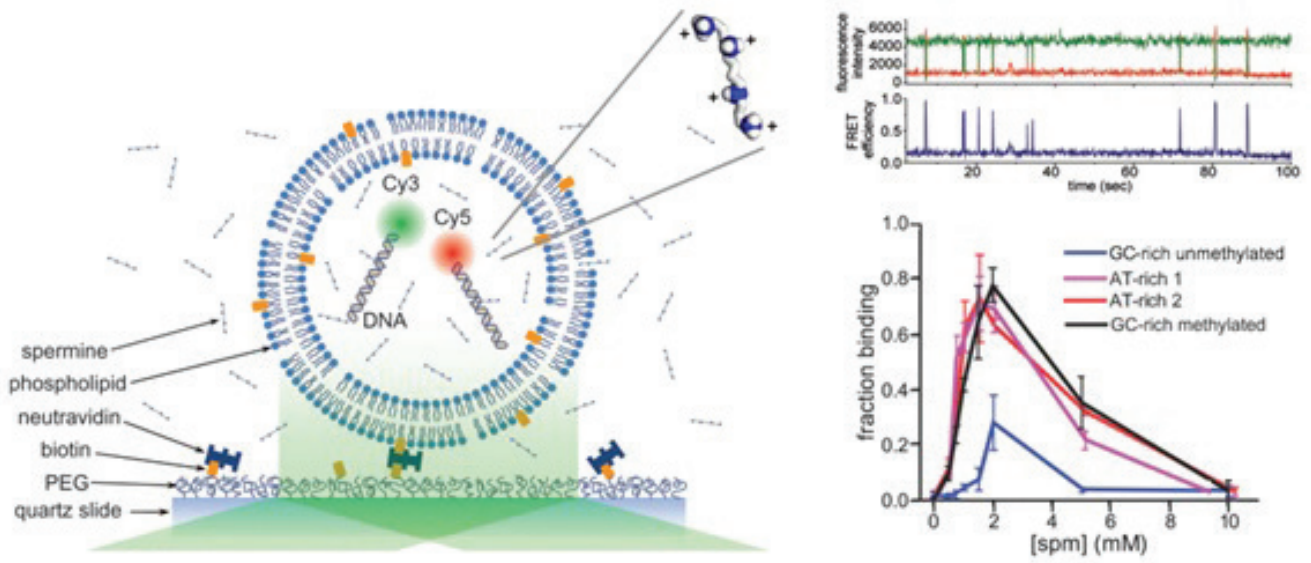
염색체 혹은 크로마틴의 도메인 구조는 Hi-C라는 기술의 발달과 함께 본격적으로 밝혀지기 시작했다 (Lieberman-Aiden, van Berkum et al. 2009). 전체 염색체 상의 임의의 두 영역 사이에 화학적으로 crosslink되는 확률을 시퀀싱 기술을 통해 측정함으로써 3차원 상에서 두 영역이 얼마나 가까이 존재하는지 정량화하는 것으로서 이는 접촉확률을 가시화한 2차원 heat map으로 표현된다. 우리는 기본적인 유전체 (genome) 분석을 통해 이 Hi-C 구조가 DNA의 염기서열 분포와 어떤 연관이 있는지 보았다. DNA상에 A-T 염기쌍과 G-C 염기쌍은 꽤 불균일하게 분포되어 있어서 인간의 경우 염색체 상의 위치에 따라 그 함량이 약 10% 까지 달라진다. 놀랍게도 이것과 Hi-C 구조 사이에는 매우 높은 상관관

계가 있다 (Figure 1). 특정 염색체 만이 아닌 모든 염색체들의 대부분 영역에서 비슷한 상관관계가 관찰되기에, 특정 염기서열에 작용하는 특정 단백질들에 의한 결과가 아니라 보다 일반화할 수 있는 물리/화학적 원리가 존재할 것으로 기대할 수 있는데 이에 대한 분자 수준의 설명은 아직 이루어지지 않고 있다.

DNA-DNA 상호작용의 측정

이에 대하여, 우리는 크로마틴의 응축에 관한 가장 작은 단위인 DNA-DNA 간의 상호작용으로부터 시작하여 점진적으로 답을 찾아나가고자 한다. 이중나선 구조를 갖는 DNA의 기본적인 물리적 특성에는 얼만큼의 강도를 갖는지 (얼마나 잘 휘는지), 얼마나 잘 녹는지 (얼마나 이중나선이 잘 분리되는지), 얼마나 잘 꼬이는지 (twisting), 그리고 다른 DNA를 얼마나 끌어당기거나 밀어내는지 등이 있다. 기본적으로 DNA는 매 염기마다 하나씩의 phosphate 이온을 갖기에 높은 밀도의 음전하를 갖고 따라서 보통의 수용액 상태에서는 다른 DNA와의 사이에 반발력을 보인다. 하지만, 다가양이온들이 사이에 들어가면 DNA들 사이에 거꾸로 인력이 작용하고 DNA의 강한 응축을 일으킨다는 것이 알려져 있다. 한편 이러한 응축이 DNA의 염기서열이나 화학적 변이 등에 따라 어떻게 달라지는지는 아직 밝혀지지 않고 있었다.

우리는 단분자 동역학 측정을 통해 DNA 간 응축의 초기 과정을 관측할 수 있었다. 색깔이 다른 형광분자를 붙인 한 쌍의 DNA를 지질 소포체에 가두고 짧은 파장의 형광분자를 여기시키면, fluorescence resonance energy transfer (FRET)라는 현상에 의해 두 DNA가 가까운 거리에 있을 때 그 에너지 일부가 긴 파장의 형광분자로 전이하여 발산된다 (Figure 2). 따라서 두 형광분자의 형광신호를 시간에 따라 기록함으로써 DNA 사이에 붙고 떨어지는 것을 바로 볼 수 있다. Spermine이라는 다가양이온은 생체 내에 존재하며 네 개의 아민 그룹을 지녀 DNA를 강하게 응축시키는 것으로 알려져 있다. 응축의 성질상 한 쌍의 DNA만 존재할 때에는 그 붙으려는 힘이 강하지 않기에 간헐적으로 붙었다 떨어지는 것이 보이는데, spermine 농도에 따라 이 빈도는 올라가다가 어느 이상에서는 DNA의 용해도가 도로 증가하면서 내려가는데, 이는 다가양이온에 의한 overscreening에 의해서 일어나는 것으로 추측된다 (Figure 2). 염기서열의 구성을 바꾸어 가면서 동일한 서열을 갖는 한 쌍의 DNA를 가두었을 때 A-T 염기쌍이 많은 DNA는 G-C 염기쌍이 많은 DNA보다 이 달라붙는 빈도가 훨씬 높은 것으로 관찰



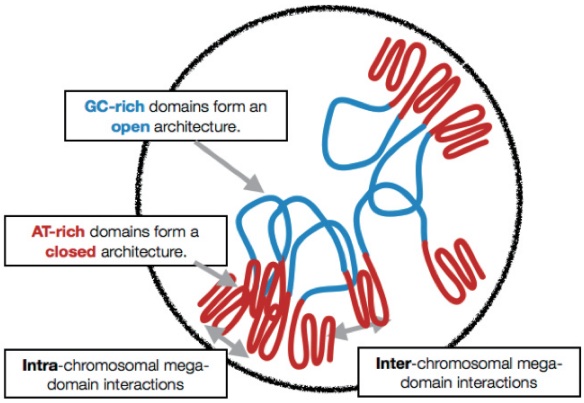
[Fig. 2] Schematic of the single molecule measurement of the inter-DNA dynamics, representative single molecule trace exhibiting binding events between a pair of duplex DNAs, and the fraction of the traces with binding events measured at varying spermine concentration and for different DNA sequences. (reproduced from Yoo *et al.*, 2016 (Yoo, Kim et al. 2016))

되었다 (Yoo, Kim et al. 2016). A-T 함량만 높다면 두 DNA의 서열을 다르게 조합해도 마찬가지의 결과였기에, 이 달라붙는 현상은 DNA 사이에 정확한 염기서열을 인식하는 것이 아니라 A-T 함량의 패턴을 인식한다고 생각할 수 있다.

원자 수준까지 구현한 분자동역학 계산으로부터 우리는 이러한 차이가 cytosine에는 없고 thymine만 갖고 있는 C5 methyl group 때문임을 밝힐 수 있었다 (Yoo, Kim et al. 2016). Spermine은 위의 그림에서 보듯이 네 개의 아민 그룹이 선형으로 이어진 모양이며 이는 DNA 이중나선의 major groove에 감기듯이 붙을 수 있다. 그런데 C5 methyl group이 이 major groove에 존재함으로써 steric hindrance를 통해 이러한 흡착을 방해한다. Spermine은 DNA의 음전하를 상쇄시키기 위해 DNA의 보다 바깥쪽에 붙게 되고 결과적으로 두 DNA 사이를 잇는 bridging site에 더 많이 존재하게 된다. 즉 methyl group이 다가양이온을 밖으로 밀어냄으로써 오히려 DNA 사이에 더 강한 응축으로 이어진다는 것이 우리가 찾아낸 설명이다.

이 C5 methyl group은 생물학적으로 중요한 의미를 갖는데, CpG site 혹은CpG island라고 부르는 "CG" 서열 내의 cytosine에 C5 methyl group을 붙이면 곧 후성유전학(epigenetics)에서 가장 주요한 화학적 변이인 DNA methylation이 되기 때문이다. 이러한 methylated cytosine은 구조적으로 thymine과 유사하고, 따라서 위의 계산으로부터 찾아낸 가설이 맞다면 A-T가 많은 DNA와 마찬가지로 강한 응축을 일으킬 것으로 예상할 수 있다. 예상한 대로, 우리는 G-C가 많은 DNA에 인위적으로 methylated cytosine을 넣으면 A-T가 많은 DNA와 마찬가지의 응축 성질을 갖는다는 것을 실험적으로 볼 수 있었다 (Figure 2). 이는 DNA의 후성유전적 변이가 그 물리적 성질을 조절하는 것을 보여주는 것으로서, 어쩌면 생명체가 후성유전학적 변이를 유전자 발현 조절로 연결시키는 데에 물리적 메커니즘을 이용할 수도 있다는 흥미로운 결과이다.

우리는 이로부터 염색체의 공간적 배치와 조절에 대해 아래 그림과 같은 단순화된 모델을 생각해 볼 수 있다 (Figure 3). A-T 염기쌍이 풍부한 영역들이 세포핵 내의 다가양이온들에 의하여 보다 닫힌 구조를 형성하고 이는 핵의 변두리 쪽에 위치하여 각 염색체를 적절



[Fig. 3] Schematic representation of the model for controlling chromosome architecture based on the modulated inter-DNA attractive potential.

한 곳에 배치시키는 역할을 한다. 또한 이들 A-T가 풍부한 영역들 사이에는 다시 인력이 작용함으로써 원거리 상호작용 혹은 염색체 간 상호작용이 존재하게 된다. G-C 염기쌍이 풍부한 영역들은 보다 열린 구조를 형성하며 핵의 중심에 가깝게 위치하여 전사를 담당하는 효소들의 유전자에의 접근을 용이하게 한다. 때로는 이들이 소위 transcription factory라고 불리는, 전사에 관련된 machinery들이 밀집된 영역과 결합함으로써 높은 효율의 전사 활동을 일으킨다.

열린 결말

물론 위의 모델은 실제 세포핵 내 염색체의 상황에 비하여 매우 단순화되어 있다. 우선 염색체 상의 도메인들은 Hi-C 데이터에서는 대략 크게 두 개의 그룹으로 나뉘어지는 것으로 보이지만, 최신의 유전체 (genome) 연구들로부터 드러나듯 보다 세분화된 종류의 영역들로 나뉘며, 무엇보다도 DNA에는 히스톤이 매우 높은 밀도로, 또 영역에 따라 다른 밀도로 붙어있으며, 이들 히스톤에는 DNA보다 훨씬 다양한 종류의 화학적 변이들이 존재하여 많은 종류의 효소들에 의하여 동적으로 조절된다. 이들 화학적 변이 각각은 크로마틴의 국지적 구조와 유전적 활성을 매우 정교하게 조절한다. 게다가 DNA에 붙어서 유전적 활성을 조절하는 수천 종류의 전사인자(transcription factor)들이 알려져 있으며 이 중 많은 수는 DNA의 구조나 물리/화학적 성질도 변형시킬 것이다.

이 중에 DNA 상의 특정 서열 혹은 영역에 붙어서 loop을 형성하고 더 나아가 도메인의 경계를 결정 및 조절하는 여러 종류의 단백질들도 알려져 있다.

따라서, 당장 DNA에 높은 밀도로 달라붙는 히스톤부터 같이 고려하여 DNA의 응축이나 looping 성질을 연구해야 하고, 나아가 히스톤의 다양한 후성유전적 변이에 의해 이들이 어떻게 달라지는지 보아야 한다. 그리고 이들 히스톤과 전사인자들이 특정 DNA 서열, 특정 단백질, 특정 화학변이들 사이의 생화학적인 메커니즘에 의해 크로마틴 구조를 조절하는데 그 부가작용으로 Hi-C에서 보는 것과 같은 도메인 구조가 나오는 것인지, 아니면 상분리 등의 거시적 현상에 의해 도메인을 큰 스케일에서 형성하는 메커니즘이 있고 그렇게 결정된 도메인이 미시적인 생화학적인 작용들의 터를 마련하는 것인지, 마치 닭-달걀과 같은 문제를 풀어야 한다.

한 가지 눈여겨 볼 점은 각 히스톤 단백질은 접혀서 구조를 형성하지 않는 자유로운 꼬리(tail)를 갖고 있는데, 이들 히스톤 꼬리에는 공통적으로 lysine 혹은 arginine이 자주 연달아 나올 정도로 풍부하다. Lysine과 arginine 둘 다 아민 그룹을 통해 양전하를 갖는 아미노산이기에, lysine/arginine을 연달아 갖는 히스톤 꼬리는 마치 또다른 종류의 폴리아민 다가양이온으로 볼 수 있는 것이다. 또한 이들은 대부분의 히스톤 후성유전적 변이가 일어나는 지점이기도 하며 그에 의해 이들의 전하 상태가 달라진다. 물론 히스톤 꼬리의 특정 후성유전적 변이들을 인식하여 달라붙는 단백질들이 이미 알려져 있지만, 어쩌면 이런 분자특이적인 메커니즘 외에도 히스톤 꼬리의 화학적 조작을 통해서 전기적으로 DNA의 응축을 조절하는 메커니즘 역시 사용되고 있는 것일 수도 있다. 이에 생물학적 관점 뿐 아니라 물리/화학적 관점에서도 DNA, 크로마틴, 염색체의 동역학에 대한 앞으로의 많은 연구가 요구되는 바이다.

References

[1] Brangwynne, C. P., C. R. Eckmann, D. S. Courson, A. Rybarska, C. Hoege, J. Gharakhani, F. Jülicher and A. A. Hyman (2009). "Germline P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled Dissolution/Condensation." Science 324(5935): 1729-1732.

[2] Hyman, A. A., C. A. Weber and F. Jülicher (2014). "Liquid-Liquid Phase Separation in Biology." Annual Review of Cell and Developmental Biology 30(1): 39-58.

[3] Jain, A. and R. D. Vale (2017). "RNA phase transitions in repeat expansion disorders." Nature 546: 243.

[4] Lieberman-Aiden, E., N. L. van Berkum, L. Williams, M. Imakaev, T. Ragoczy, A. Telling, I. Amit, B. R. Lajoie, P. J. Sabo, M. O. Dorschner, R. Sandstrom, B. Bernstein, M. A. Bender, M. Groudine, A. Gnirke, J. Stamatoyannopoulos, L. A. Mirny, E. S. Lander and J. Dekker (2009). "Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome." Science 326(5950): 289-293.

[5] Strom, A. R., A. V. Emelyanov, M. Mir, D. V. Fyodorov, X. Darzacq and G. H. Karpen (2017). "Phase separation drives heterochromatin domain formation." Nature 547: 241.

[6] Yoo, J., H. Kim, A. Aksimentiev and T. Ha (2016). "Direct evidence for sequence-dependent attraction between double-stranded DNA controlled by methylation." Nature Communications 7: 11045.