

Advanced electron microscopic approach in cell biology :Golgi dynamics during intra-Golgi transport

권희석

한양대학교 대학원 환경과학과

1. 배경 및 목적

ER로부터 이동한 cargo 간의 융합으로 새로운 수조를 형성하여 이들 수조가 성숙되어 가는 방식으로 골지내 물질 수송을 설명하고 있는 수조성숙모델 (cisterna-maturation model)은 현재까지 골지내 수송 기작을 설명할 수 있는 가장 적절한 모델로 받아들여지고 있다. 수조성숙모델에 의하면 골지 내재 효소들의 골지 수조간 환원은 골지체 주변에 존재하는 골지 소낭 (peri-Golgi vesicle)을 이용하여 이루어지고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 이들 골지 소낭 내 효소의 농도는 수조내의 그것보다 현저하게 높거나 유사하여야 할 것이다. 그러나 최근에 수조에 인접한 소낭형 구조체 내 Mannosidase II의 농도에 대하여 상이한 결과가 보고되었다 (Cosson *et al.*, 2002; Martinez-Menarguez *et al.*, 2001). 즉 Mannosidase II가 소낭 내에서 현저히 높은 빈도로 발견되었다는 것과 이와는 반대로 거의 발견되지 않았다는 보고가 그것이다. 이는 골지 소낭들의 정확한 기능을 확인하는데 상당한 혼란을 초래하고 있다. 이러한 혼란을 바로 잡기 위하여 서로 다른 형태의 골지 cargo (확산 가능한 cargo로서 VSVG protein과 확산 불가능한 ER procollagen aggregates)에 대한 골지체 통과 방법을 확인하고 이때 골지 내재 단백질과 골지 소낭들의 dynamics를 추적하였다.

2. 재료 및 방법

판독의 정확도를 높이기 위하여 다음과 같은 방법을 통하여 연구를 수행하였다.

1) 세포주와 synchronization protocol

Human fibroblasts, NRK cells, RBL cell 및 COS7 cell 등의 다양한 세포주를 이용하였다. 또 각 단백질들의 synchronization을 위하여 Mironov 등 (2001)의 protocol을 이용하였다.

2) Cryo-thin sectioning, immuno-electron microscopy와 morphometry

실험에 쓰인 세포는 osmication 없이 1차 고정만으로 즉시 동결시킨 후 약 50 nm 두께로 냉동 초박편절단하여 immuno-gold labeling을 실시하고 relative labelling index 방법에 따라 정량 분석을 수행하였다.

3) EM tomography and 3-D reconstruction

일반적으로 60-80 nm 두께의 단일 절편에 대한 전자현미경상의 이차원 사진 판독에 의하여 직경 50-60 nm의 골지 소낭을 구분하기란 사실상 불가능하다. 따라서 200-250 nm의 충분히 두꺼운 절편으로부터 매 1°간격으로 $\pm 75^\circ$ 까지 tilting 에 의한 가상 연속 절편을 만들고 이들을 3차원 상으로 조합함으로써 골지체의 3차 구조를 제작하여 골지 소낭 및 기타 구조물의 입체 형상을 분석하였다.

4. 결과 및 고찰

골지 소낭 내에 골지 내재 효소들의 농도는 수조와 비교하여 현저하게 낮았다 (Fig.1). 대신 이들 골지 효소들이, 소낭이 아닌 그러나 정단면 박편 절단에 의해 소낭으로 판독될 수 있는 골지체 주변의 소관 혹은 골지 수조의 가장자리에 분포한 perforated zones에 존재하고 있음을 발견하였다 (Fig.2). 또한 막융합을 막은 후 골지 소낭의 수가 현저하게 증가하였음에도 불구하고 골지 효소는 여전히 골지 소낭에는 존재하지 않았다. 특히 골지 효소들은 resting condition에서 골지 수조의 perforated zone에 집중되어 있었으며 수송 과정에서 이러한 비대칭적 segregation이 소실되었다.

결론적으로 골지 효소는 골지 소낭으로부터 배제되어 있었고 대신 일시적으로 골지 수조의 perforated rim에 농축되고 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 골지내 수송을 골지 소낭의 환원에 기초하여 설명한 고전 수조성숙모델과는 배치되는 것으로서 non-vesicular mechanism을 기반으로 한 골지 효소의 환원 개념이 새로운 골지성숙모델에 도입되어야 함을 강력히 시사하는 것이다.

4. 참고 문헌

- Cosson, P., Amherdt, M., Rothman, J.E., and Orci, L. (2002). A resident Golgi protein is excluded from peri-Golgi vesicles in NRK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12831-12834.
- Martinez-Menarguez, J.A., Prekeris, R., Oorschot, V.M., Scheller, R., Slot, J.W., Geuze, H.J., and Klumperman, J. (2001). Peri-Golgi vesicles contain retrograde but not anterograde proteins consistent with the cisternal progression model of intra-Golgi transport. *J. Cell Biol.* 155, 1213-1224.
- Mironov, A.A., *et al.* (2001). Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *J. Cell Biol.* 155, 1225-1238.

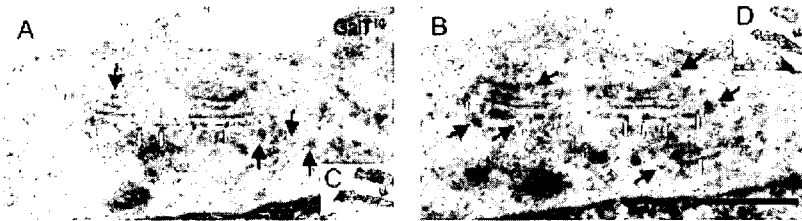


Fig. 1. Immunogold EM labeling of the Golgi for galactosyltransferase (GalT) at steady-state. (A and B, 10-nm gold, serial sections; C and D, low magnification of A and B). Ultrathin cryosections of HFs. Arrows indicate GE-negative peri-Golgi RPs. White lines in A and B indicate gold labeling of GalT. Bar:(A and B) 480 nm; (C and D) 35 μ m.

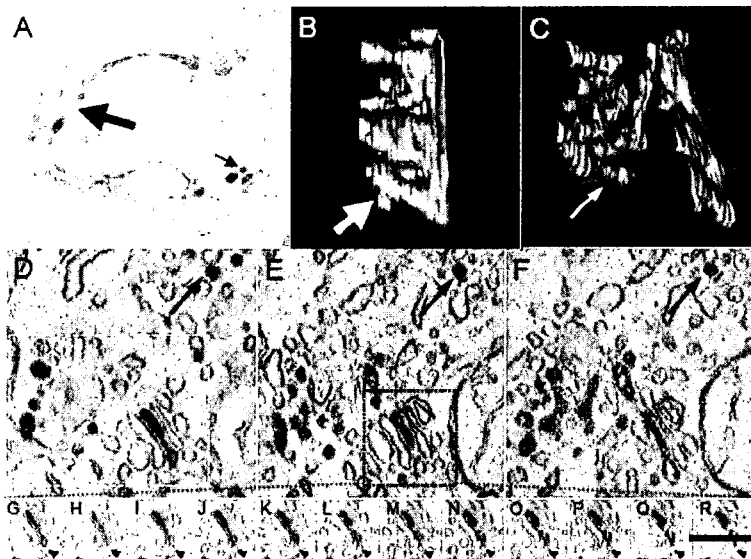


Fig. 2. 3D reconstruction of a labeled Golgi from an NRK cell stably transfected with STF-HRP (A-R). In spite of the visualization of RPs filled with DAB precipitate on 50-nm routine sections (A) and virtual 5-nm sections taken from the surfaces (D and F) and from the middle (E) of thick 200-nm sections subjected to EM tomography, 3D reconstruction and surface rendering of the DAB-positive membranes (presented inside white box) reveal that DAB-positive vesicles (spheres isolated from other membranes) are not present in the Golgi area (B and C). Instead, RPs often represent sections of tubules (arrow in C) or processes of DAB-negative tubules (blue) with a DAB-positive part (green). Arrows in D-F indicate cross-sections of a DAB-positive tubule. In G-R (enlargement of red box in E), consecutive 5-nm virtual sections of a cisternal bud with COPI-like coat (arrowheads, shown with a white thick arrow in B) but without STF-HRP are shown. Bar: (A) 450 nm; (B and C) 350 nm; (D-F) 230 nm; (G-R) 400 nm.