

핵질 내 과립의 3차원 구조

Three Dimensional Structure of Granules in Nucleoplasm

허양훈, 주세윤, 권희석¹, 유승현

인하대학교 의과대학 세포분비과립연구단, ¹한국기초과학지원연구원 전자현미경팀

1. 서론

Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃)에 의한 핵 내 칼슘 이온의 조절이 염색체 복제나 유전자 전사 조절 (1)과 같은 핵의 기능을 조절하는데 매우 중요한 역할을 수행함에도 불구하고 IP₃에 의한 핵 내 칼슘 이온 조절 기작의 존재나 작동 여부에 대해서는 거의 알려지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 핵질 내에 IP₃에 의해 조절되며 칼슘저장소 역할을 하는 과립 구조가 존재하는지를 초고전압투과전자현미경 (HVEM)을 이용하여 연구하였고, 그 결과 염색질 주변에 과립들이 가득 차 있음을 알 수 있었다.

2. 실험 방법

HVEM 관찰을 위한 정제된 시료는 일반적인 전자현미경 관찰을 위한 시료제작법을 통해 만들어졌다. Tomography를 통한 시편의 3차원 구조 분석을 위해 250 nm 두께의 절편을 formvar막을 입힌 grid에 올려 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하고 tomogram 제작 시 기준이 될 금 입자를 입힌 후 절편 표면에 탄소 증착을 하였다. 완성된 시편은 JEM ARM 1300S HVEM (한국기초과학지원연구원, 대전)으로 관찰하였으며, 가속 전압 1250kV에서 +60°에서 -60° 까지 2° 간격으로 총 61장의 이미지를 60,000배의 배율로 필름에 기록한 후 디지털화 하였다. 디지털화된 각각의 tilting 이미지들은 금 입자를 좌표상의 표지로 사용하여 정렬한 후 IMOD 프로그램 (University of Denver, Denver, Co)을 이용하여 tomogram 및 3차원 구조 모델을 제작하였다.

3. 결과 및 고찰

소 부신 수질의 chromaffin cell의 핵질 내에 과립 구조가 존재하고, 과립 구조 내에 CGB와 IP₃R이 함께 존재하는지를 알아보기 위해 면역금표지를 실시한 결과, CGB와 IP₃R이 염색질 주변의 과립 구조에 함께 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 1A). Routine TEM 관찰 결과를 바탕으로 250 nm 핵질 시편에 대한 HVEM 관찰을 실시하여 tomogram을 제작한 결과 총 81장의 3 nm 두께 tomographic slice를 얻었고, 각 slice를 추적하여 구형의 과립 구조를 약 10장의 slice상에서 재구축 하였다 (Fig. 1B). IMOD

program을 이용하여 Tomographic slice상에서 추적된 과립의 contour를 그리고 3차원 모델로 제작한 결과 구형의 입체 구조를 지닌 과립들이 핵질 내에 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 1C).

참고문헌

[1] M.J. Berridge, P.Lipp and M.D. Bootman. (2000) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 11-21.

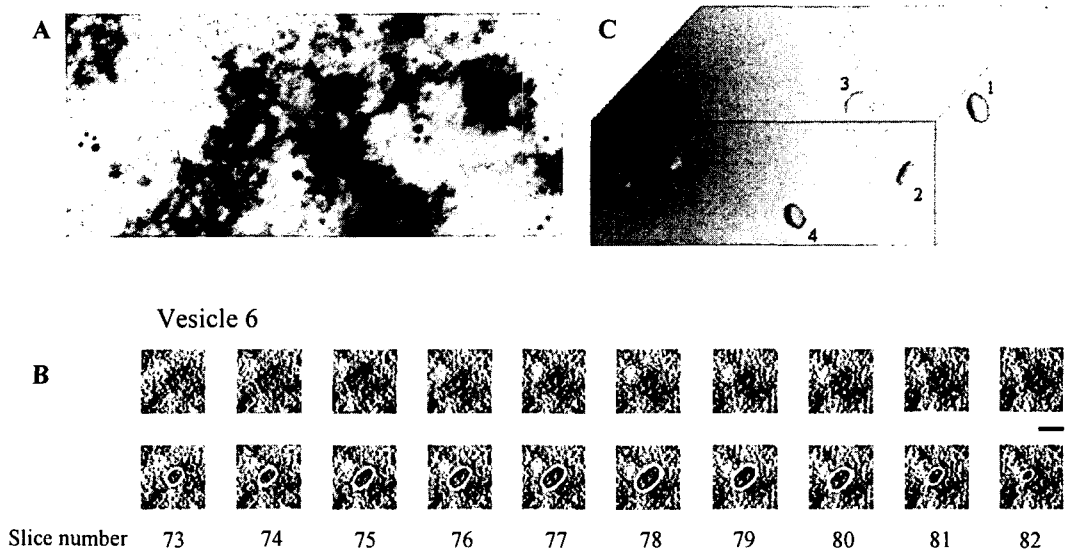


Fig. 1. Conventional TEM and HVEM structure of granules in nucleoplasm of chromaffin cell. A) Double immunogold electron microscopy showing colocalization of CGB (10 nm gold) and IP₃R (15 nm gold) in the vesicles in purified nucleoplasm of bovine adrenal chromaffin cells. **B)** High voltage electron microscopy and electron tomography of vesicles in the nucleoplasm. Set of ten 3 nm tomographic slices prepared from a 2° tilt-series showing the almost regions of each vesicle except top and bottom region of vesicle. Bar = 50 nm. **C)** 3-D reconstruction and surface rendering of the 6 selected individuals illustrating the sphere structure of vesicles in the nucleoplasm.