

HVEM을 이용한 세포소기관의 3차원 입체 구조 분석법

Electron Tomography of Subcellular Structure

Using the High Voltage Electron Microscope

강지선, 안영현, 이주연, 이지영, 권희석
한국기초과학지원연구원 전자현미경팀

1. 서론

Electron tomography는 투과전자현미경 상으로부터 3차원 구조에 관한 정보를 얻어 낼 수 있는 방법으로써 투과전자현미경 관찰을 위하여 준비된 다양한 시편, 즉 세포 혹은 조직의 cryo- 또는 플라스틱 절편을 통한 세포 소기관의 3차 구조를 파악할 수 있는 최신 기법 중 하나이다. 이는 분자 수준에서의 구조와 기능 간의 관계를 연관 지어 이해할 수 있다는 점에서 현대 생물학에 있어 가장 중요한 연구 기법으로 부상하고 있다 (McIntosh *et al.*, 2005). 특히 컴퓨팅 기술 및 관련 소프트웨어의 발달과 더불어 시료의 3차 구조 복원을 위한 다양한 노력이 지속되었으며 실제로 괄목할 만한 발전을 이루게 되었다(Marco, *et al.*, 2004). Electron tomography는 원칙적으로 정상 두께보다 두꺼운 절편 (약 250~300 nm)에 대한 전자현미경의 goniometer tilting으로 얻어진 상들을 차례로 합쳐 연속상으로 전환하는 기법이다. 따라서 시료의 가상 연속 절편인 tomogram으로부터 컴퓨터 처리 과정을 거쳐 시편의 입체 구조 구현이 가능하며 높은 해상도(3~5 nm)를 지니고 있어 정밀한 구조 분석이 가능하다. 그러나 대다수의 주요 세포 소기관들은 그 크기가 절편의 두께를 초과하는 경우가 많아 전자현미경의 투과력 한계로 인하여 3차 구조의 부분적인 복원이 불가피하였다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 세포 혹은 세포 소기관 전체를 관찰할 수 있는 시스템이 반드시 필요하다.

한국기초과학지원연구원에서 2004년 4월부터 설치, 운영하고 있는 초고전압 투과전자현미경(JEM-ARM1300S, JEOL, 이하 HVEM)은 최고 가속전압 1,300 kV로써, 특히 생물 시료에 대하여 1) 최고 0.12 nm의 높은 해상도, 2) 전자선에 의한 시편 손상 극소화, 3) 탁월한 전자선의 시편 투과력, 4) 시편에 대한 회절 콘트라스트 감소 등의 장점을 제공한다. 따라서 HVEM을 electron tomography와 접목시킬 경우 기존의 부분적 3차 구조가 아닌 완전한 형태의 3차 구조를 분석할 수 있을 것이다. 본 연구에서 HVEM을 이용하여 1 μm 이상의 시료에 대한 3차 구조 복원을 실시함으로써 기존 electron tomography의 한계를 극복하고 이를 통하여 HVEM과 연계한 electron tomography를 생명과학 분야 연구의 새로운 방법론으로써 제시하고자 하

였다.

2. 재료 및 방법

연속상의 획득을 위하여 한국기초과학지원연구원에 설치 운영되고 있는 HVEM을 사용하였다. 일반 시편 제작법에 따라 제작된 쥐의 장조직으로부터 원하는 세포 소기관의 모든 구조가 손상없이 포함될 수 있도록 정상 두께보다 두껍게(1 μm) 절단하여 이중 염색까지 진행하였다. 최종 컴퓨팅 작업 시 화상의 정렬을 위한 기준 물질 (reference)로써 상용 immuno gold particle(10 nm)을 절편의 표면에 적정량 도포하였다. 좌우 최대 60°까지 2° 간격으로 tilting 시켜 연속상을 획득한 후 필름 작업, 일반 스캐너를 통한 스캐닝 작업 및 일련의 컴퓨팅 작업을 통하여 3차원 영상 처리를 하였다(Kweon *et al.*, 2004). 컴퓨팅 작업을 위하여 Silicon Graphics Tezro(SGI, USA)와 화상 처리를 위한 소프트웨어는 IMOD를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가속전압 100 kV급의 일반 전자현미경의 경우 전자선의 시료에 대한 투과력 한계로 인하여 세포 소기관의 전체 구조를 표현하기가 쉽지 않다. 이를 극복하기 위하여 250 nm의 절편을 각각 복원한 후 합성하는 방법이 사용되기도 하였다. 그러나 이러한 경우 각각의 단위 모델간의 합성 지점인 경계면에서 수십 나노미터의 구조적 손실을 감수하여야 한다. 반면 가속전압 1,250 kV의 HVEM을 이용할 경우 이러한 문제점을 해결할 수 있다. 그림 1은 쥐의 장세포로부터 재복원된 소포체의 3차 구조이다. 시료의 두께는 1 μm 로 소포체의 모든 부분을 표현하지는 못하였으나 소포체가 세포 전반에 걸쳐 광범위하게 존재함을 감안할 때 기타 세포 소기관들의 경우 전체 구조 복원이 가능할 것이라 사료된다. 향후 3차 구조 복원이 가능한 즉 전자빔이 투과 가능한 최고 한계의 절편 두께까지 시도할 예정이다. 이를 위하여 가장 중요한 것은 염색 방법의 개선으로써 이를 해결할 경우 세포 소기관의 부분적인 복원에서 완전한 3차 구조를 복원할 수 있도록 electron tomography 수준을 획기적으로 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구를 통하여 HVEM을 이용한 electron tomography를 세포 소기관에 대한 고해상 3차원 모델링 및 분석 방법으로 제시하였다. Electron tomography를 HVEM과 접목시킬 경우 컴퓨팅 기술의 발달과 함께 분자 수준으로부터 세포 소기관 혹은 세포 수준에 이르는 폭넓은 연구를 실현할 수 있는 가장 강력하고 정밀한 현대 생명과학의 연구 방법이 될 것으로 기대한다.

References

Kweon, H.S., G.V. Beznoussenko, M. Micaroni, R.S. Polishchuk, A. Trucco, O. Martella, D. Di Giandomenico, P. Marra, A. Fusella, A. Di Pentima, E.G. Berger, W.J. Geerts, A.J. Koster, K.N. Burger, A. Luini and A.A. Mironov, 2004. Golgi enzymes are enriched in perforated zones of golgi cisternae but are depleted in COPI vesicles. *Mol Biol. Cell.*, 15: 4710-4724.

Marco, S., T. Boudier, C. Messaoudi and J.L. Rigaud, 2004. Electron tomography of biological samples. *Biochemistry*, 69: 1219-1225.

McIntosh, J.R., D. Nicastro and D.N. Mastronarde, 2005. New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography. *Trends Cell Biol.*, 15: 43-51.

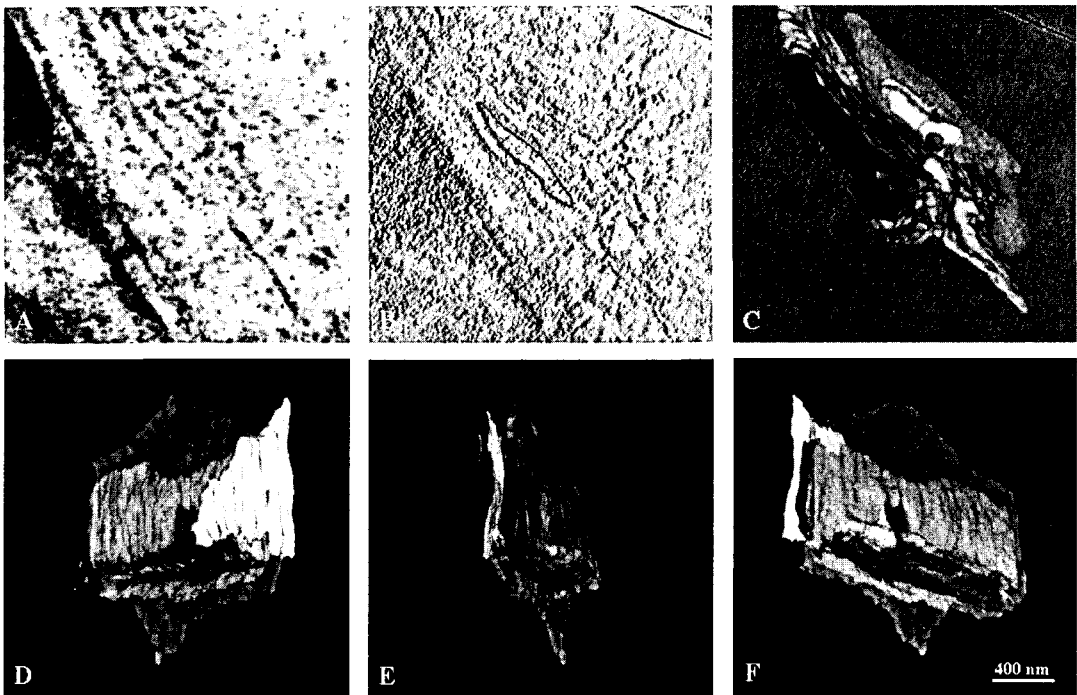


그림 1. HVEM을 이용해 분석한 쥐 장세포의 1 μm 절편으로 부터 재복원된 소포체의 3차원 입체 영상. 강력한 전자선의 투과력을 바탕으로 비교적 넓은 영역의 구조를 물리적 손상없이 분석할 수 있다. **A.** 두께 1 μm thick section의 HVEM 상. 핵의 상단으로 분포한 소포체를 관찰할 수 있다. **B.** Tomogram의 가상 절편을 기반으로 그려진 소포체의 윤곽선. **C.** 가상절편 위에 복원된 소포체의 3차 구조. **D-F.** 여러 방향에서 관찰한 소포체의 3차 구조.