

## 크로마핀 세포의 핵 내 칼슘 저장 기관의 3차원 구조

허양훈, 주세윤, 유승현

인하대학교 의과대학 세포분비과립연구단

### 1. 서론

Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)에 의한 핵 내 칼슘 이온의 조절이 염색체 복제나 유전자 전사 조절 (1)과 같은 핵의 기능을 조절하는데 매우 중요한 역할을 수행함에도 불구하고 IP<sub>3</sub>에 의한 핵 내 칼슘 이온 조절 기작의 존재나 작동 여부에 대해서는 거의 알려지지 않았다. 최근 본 연구진은 핵질 내에 chromogranin B, IP<sub>3</sub> receptor, 그리고 인지질로 구성된 복합체가 과립 구조를 형성함을 밝힌바 있다 (2). 따라서 본 연구에서는 핵질 내에 IP<sub>3</sub>에 의해 조절되며 칼슘저장소 역할을 하는 과립 구조의 3차원 입체구조를 초고전압투과전자현미경 (HVEM)을 이용하여 연구하였고, 그 결과 염색질 주변에 과립 구조의 칼슘 저장 기관들이 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 tomogram제작 시 기준이 될 금 입자를 입힌 후 절편 표면에 탄소 증착을 하였다. 완성된 시편은 JEM ARM 1300S HVEM (한국기초과학지원연구원, 대전)으로 관찰하였으며, 가속전압 1250kV에서 +60°에서 -60° 까지 1° 간격으로 총 121장의 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.

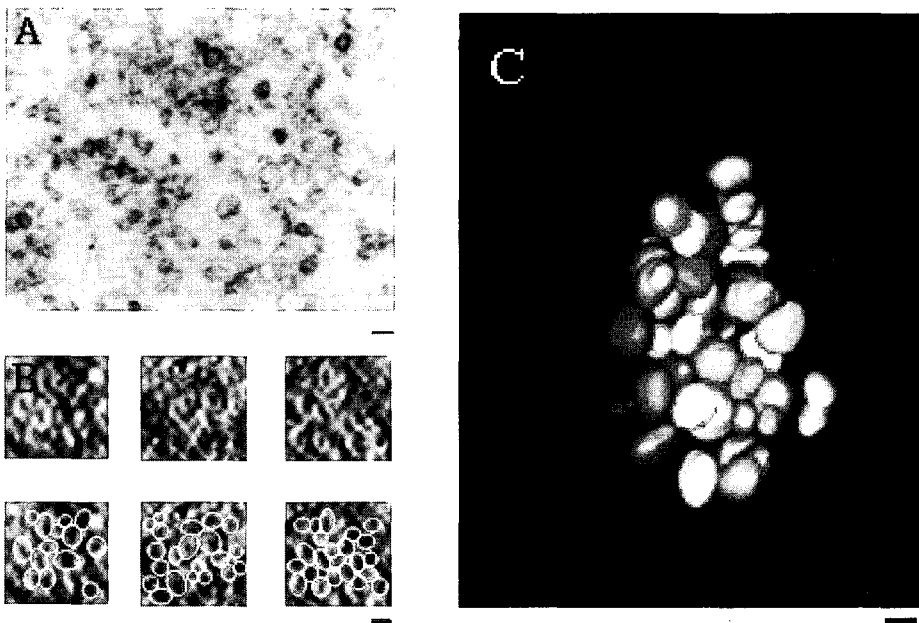
### 3. 결과 및 고찰

소 부신 수질의 chromaffin cell의 핵질 내에 존재하는 과립 구조를 sucrose gradient centrifugation과 FPLC를 통해 정제하여 routine TEM으로 관찰한 결과 과립구조의 칼슘 저장 기관이 존재함을 확인할 수 있었다 (Fig. 1A). Routine TEM 관찰 결과를 바탕으로 250 nm 핵질 시편에 대한 HVEM 관찰을 실시하여 tomogram을 제작하였고, 각 tomographic slice를 추적하여 다수의 구형 과립 구조를 관찰하였다

(white contours in 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.
- [2] S.H. Yoo, S.W. Nam, S.K. Huh, S.Y. Park and Y.H. Huh. (2005) *Biochemistry.* 44, 9246-9254.



**Fig. 1. Structure of  $\text{Ca}^{2+}$  storage vesicles of in nucleoplasm of bovine chromaffin cell.** *A)* Routine TEM structures of  $\text{Ca}^{2+}$  storage vesicles in purified nucleoplasm of bovine adrenal chromaffin cells. *B)* High voltage electron microscopy and electron tomography of  $\text{Ca}^{2+}$  storage vesicles (white contours) in the nucleoplasm. *C)* 3-D reconstruction and surface rendering of the  $\text{Ca}^{2+}$  storage vesicles in the nucleoplasm. Bar = 50 nm.