

원자간력 현미경을 이용한 골격근세포 분화유도 마커단백질의 역학적 검출

한성웅*, Adachi Taiji

(교토대학교)

1. 머리말

iPS(Induced pluripotent stem cells) 세포의 개발과 in vitro에서 인간 iPS세포의 분화유도가 성공함으로써, 인류는 가까운 미래에 자신의 체세포를 iPS세포와 기능세포로 분화유도하여 조직이식에 사용할 수 있게 될 것이다. 이러한 목표를 이루기 위해서는 정확하고 완벽한 비침습성 세포 분류기술의 개발이 필수적이다. 그러나 기존의 분화유도 검출기술을 이용한 세포분류는 개개의 세포를 정확하게 분류하기 어렵고, 이로 인한 미분화세포의 완전한 배제가 불가능함으로써 이식으로 인해 암을 발생시킬 수 있는 가능성을 가지고 있다. 미분화세포의 기능세포로의 분화유도는 매우 복잡한 과정이고, 이 과정을 분석하기 위해서는 RNA의 발현을 검출하는 노던블롯팅(northern blotting), RT-PCR과 단백질발현을 검출하는 웨스턴블롯팅(western blotting), 면역염색법 등이 널리 이용되고 있다. 이러한 기존의 방법들은 세포의 분화유도과정중의 시그널링을 분석할 수 있는 매우 유용한 방법이지만, 분석을 위해서는 세포파쇄가 필수적이어서, 분석에 이용한 세포의 연속적인 분석/재사용이 불가능한 단점을 가지고 있다. 셀소터(flow cytometry)의 경우는 살아있는 세포를 연속적으로 분류할 수 있는 매우 유용한 방법이지만, 세포표면을 형광물질로 표

식 함으로써, 분류된 세포를 임상에 이용할 경우 면역거부반응을 감수하여야 한다.

2. 골격근세포의 분화유도와 마커단백질검출

마우스 간엽 줄기세포(mouse mesenchymal stem cell)는 아자시티딘(5-azacitidine) 처리에 의해 골격근세포로 분화유도된다. 아자시티딘은 생체내에서 인산화되어 핵산에 편입되고, DNA의 합성을 저해한다. 아자시티딘은 마우스 간엽 줄기세포에서 MyoD, 마이오제닌(myogenin), myd 등의 골격근세포분화 마스터 DNA의 합성을 조절한다. 마우스 간엽 줄기세포의 한 종류인 C3H10T1/2의 세포배양 중에 아자시티딘을 첨가시키면 아자시티딘은 DNA메틸화효소의 활성을 저해하여 MyoD의 발현량을 증가시키고, C3H10T1/2는 증식/융합하여 근관(myotube)으로 분화유도 된다. C3H10T1/2세포의 골격근세포로의 분화과정에서는 인슐린 유사 성장인자 I(insulin-like growth factor: IGF-I)과 IGF-II가 IGF-I 리셉터(IGF-IR)와 결합하고, 막단백질인 티로신 키나아제 등 몇몇 단백질을 활성화시켜 골격근세포 분화유도 시그널링을 활성화시킨다. 활성화된 IGF-II의 자가분비(autocrine)는 MyoD의 기능을 활성화 시키고 골격근세포 분화유도의 포지티브피드백 시그널링으로 활용된다. 이 글에서는 골격근세포 분화유

* E-mail : sw-han@frontier.kyoto-u.ac.jp

도에 있어서의 IGF-II의 자가분비의 원자간력현미경(atomic force microscopy: AFM)을 이용한 역학적 검출방법을 소개하고자 한다. 그림 1은 이 검출방법의 모식도를 나타낸다.

3. AFM을 이용한 IGF-II 항체와 리간드의 결합파단력 측정

AFM을 이용하여 항마우스 IGF-II 항체와 IGF-II 단백질간의 상호작용을 역학적으로 측정하였다. 항체는 AFM의 탐침에, 단백질은 마이카기판에 각각 화학적 수식방법을 이용하여 수식하고 단분자역학검출법(single molecule force

spectroscopy)을 수행하였다. 그림 2는 IGF-II 항체와 IGF-II의 단분자역학검출 결과를 나타낸다. 복수의 결합파단이 관찰될 경우에는 최후의 결합파단력만을 히스토그램에 반영하였다. IGF-II 항체와 IGF-II의 결합파단력의 히스토그램을 가우스 함수로 근사치를 구한 결과, 네 개의 뚜렷한 피크를 관찰할 수 있었다. 첫 번째 피크인 33 pN을 비특이적 결합에 따른 결합파단력으로 판단하면 나머지 피크인 95, 189, 293 pN을 각각 한 분자, 두 분자, 세 분자의 IGF-II 항체와 IGF-II의 결합파단에 의해서 나타난 피크라고 할 수 있다. 단위시간당의 힘부하율의 변화에 따른 단분자의 IGF-II 항체와 IGF-II의 결합력의 변화는 기존의 Bell-Evans 모델에서의 결과와 같이 선형적으로 증가한다는 것을 알 수 있었다.

4. 세포표면에서의 리셉터/리간드/항체의 샌드위치 결합파단력 측정

골격근 세포분화중의 자가분비시스템에 의해서 분비된 IGF-II는 세포막에서 수용체인 IGF-IR과 결합한다. 이 측정에서는 골격근세포에의 데미지를 최소화하고 세포표면과 AFM 탐침간의 접촉면적을 넓히기 위하여 에칭탐침(그림 1 참조)을 이용하였다. 또한 아자시티딘 처리 2일 후의 C3H10T1/2를 이용하였다. 그림 3의 측정결과와 같이 in vitro에서의 IGF-II 항체와 리간드간의 결

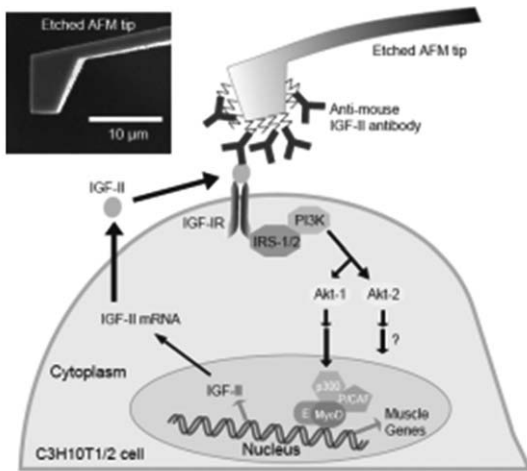
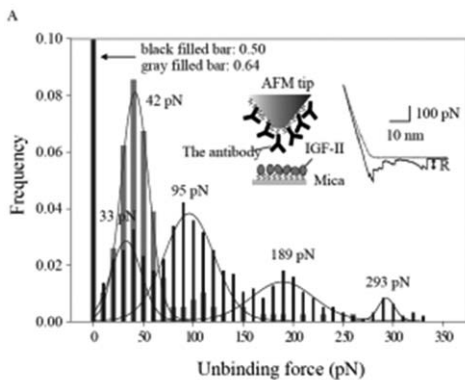
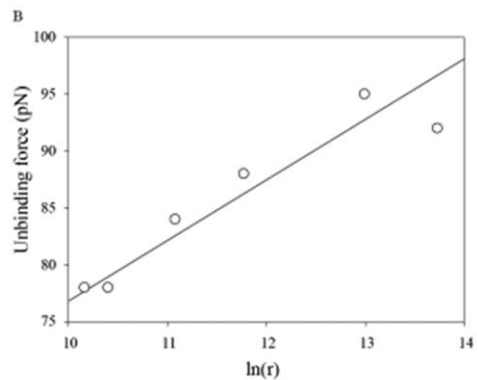


그림 1 원자간력 현미경을 이용한 골격근세포 분화유도 마커단백질의 역학적 검출 모식도



(a) 결합파단력의 분포도



(b) 단위시간당 힘부하율의 변화에 따른 결합파단력의 변화

그림 2 AFM을 이용한 IGF-II 항체와 리간드의 결합파단력 측정결과(Han, S. et al., 2011, J. Mol. Recognit., 2011, 24)

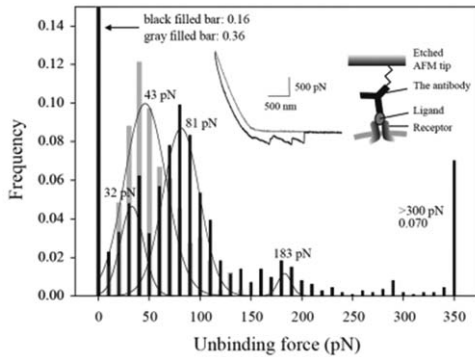


그림 3 AFM을 이용한 세포표면에서의 리셉터/IGF-II/항체의 샌드위치 결합과 단력 측정 결과(Han, S. et al., 2011, J. Mol. Recognit., 2011, 24)

합과 단력 측정결과와 매우 유사한 측정결과를 얻을 수 있었다. 32 pN의 비특이적 결합과 단력 이외에 81 pN, 183 pN에 뚜렷한 피크가 관찰되었다. 또한 81 pN에서 관찰된 피크는 *in vitro*에서의 단백질의 항체-리간드간의 결합과 단력과 비슷한 크기를 나타냄으로써, 세포표면에서 항체와 리간드간의 결합과 단력에 의해 얻어진 결과로 보여진다. 또한 이 측정방법을 이용하여 C3H10T1/2세포 표면에서 IGF-II의 자가분비에 의한 수용체와의 결합을 검출할 수 있다는 것을 이 결과로 알 수 있다.

5. C3H10T1/2 세포표면에서의 IGF-II 자가분비의 연속적 검출

아자시티딘 처리에 의한 C3H10T1/2의 골격근 세포 분화유도 과정에서의 IGF-II의 자가분비를 연속적으로 검출하였다. 그림 3에서 비특이적 결합과 단력은 100 pN 이하에서만 관찰되었으므로 100 pN을 한계치로 설정하였고, 비특이적 결합과 단력은 10 %였고 100 pN이상의 결합과 단력의 검출확률은 32 %를 나타내었다. 배양일에 따른 IGF-II의 검출을 수행하였고, 매번의 실험에 2~6 개의 배양용 페트리 접시에 대하여 20~90 세포를 이용하여 180~880 차례 역학적 측정을 실시하였다. Day 0를 기준으로 아자시티딘 처리를 실행하였다. 그 결과, 그림 4에서와 같이 아자시티딘 미처리 C3H10T1/2의 경우 10 % 이하의 경우에서만

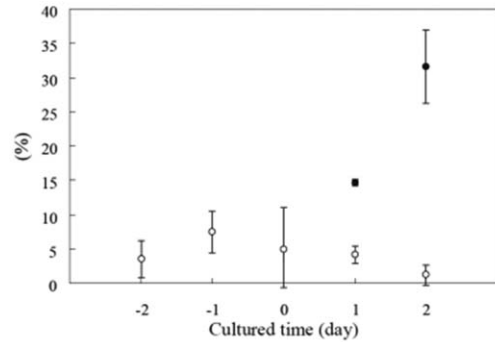


그림 4 C3H10T1/2 세포표면에서의 IGF-II 자가분비의 연속적 검출(Han, S. et al., 2011, J. Mol. Recognit., 2011, 24)

100 pN이상의 결합과 단력이 관찰되고, 그 확률도 배양시간에 따라 큰 변화를 나타내지 않았다. 한편, 아자시티딘 처리 C3H10T1/2의 경우, 처리 하루 후에 15 %의 측정에서 100 pN 이상의 결합과 단력이 관찰되었고, 처리 이틀 후에는 32 %로 크게 증가하였다.

100 pN 이상의 결합과 단력의 검출확률증가는 아자시티딘에 의한 근세포 분화유도에 의하여 세포표면의 IGF-II의 밀도가 증가한 결과로 보여진다. 이 결과를 통하여 AFM을 이용하여 IGF-II를 역학적으로 측정함으로써 골격근세포의 분화유도과정을 연속적으로 검출할 수 있었다.

4. 맺음말

지금까지 AFM을 이용한 골격근세포 분화유도 마커단백질의 역학적 검출에 대해서 간략히 알아보았다. 이 검출시스템을 응용하여 세포분화 초기의 분화도를 검출함으로써 정확한 셀소팅 기술로 발전되기를 기대한다. 또한 기존의 전통적인 나노-기계공학 장치를 이용하여 바이오분야의 접목 가능성을 제시함으로써, 다양한 바이오 연구에도 응용가능할 것으로 기대한다. 나노기술, 나노바이오기술은 기존의 학문과 기술의 통합/융합에 의하여 발전할 것이며, 이러한 연구결과가 기존 학문의 통합/융합에 조그마한 역할을 할 것을 기대한다. KSNVE