살아 있는 세포 내에서의 단일 형광 분자 관측 기술

DOI: 10.3938/PhiT.22.052

양소라·김동균·이남기

Single-molecule Fluorescence Live-cell Imaging

Sora YANG, Dong-Kyun KIM and Nam Ki LEE

Most current research on molecular and cell biology has been done in vitro using purified DNA, RNA, and proteins. These research efforts have surely provided valuable information on the cellular processes. However, the information obtained from in-vitro studies can be different from the real cellular processes happening inside cells, so a new trend has been to probe directly the complex cellular processes in living cells. In this review, we describe current single-molecule fluorescence-imaging techniques to detect a single protein in living cells. In the near future, as we see movies, single-molecule imaging techniques will visualize the reactions of biological molecules in cells.

서론

현재의 분자 및 세포 생물학에서의 연구는 대부분 정제된 DNA, RNA 그리고, 단백질을 사용하여 이루어지고 있다. 이러한 연구들은 의심의 여지없이 유전자 발현, 신호 전달, 대사 등과 같은 가장 기초적인 세포 내 현상들은 설명하고, 많은 유

용한 정보들을 주었다. 하지만, 이러한 “세포 밖”에서 이루어지는 연구는 “세포 내”라는 실제적인 환경에서도 동일한 현상이 나타나는지를 확인해야 하고, 세포 내에서 일어나는 현상들은 대부분 굉장히 역동적인데 이러한 동역학(dynamics) 정보를 얻기가 어렵고, 세포 내에서 다른 단백질들과 어떻게 상호 작용을 하는지에 대한 연구가 매우 어려운 단점이 있다. 예를 들어, 세포 내에서 mRNA를 만들어 내는 전사단백질(RNA polymerase)은 원핵 세포로부터 진핵 세포까지 그 특성이 잘 연구되어 있다. 이 단백질이 특정 DNA 염기서열과 결합하는 동역학 및 열역학적 연구, X-ray를 이용한 구조 연구를 통해 전사 시작 및 연장 결합 구조 등이 잘 알려져 있다. 하지만, 이러한 연구들은 모두 세포 밖에서 이루어졌고, 이에 따라 세포 안에서 전사 단백질들이 실제로 어떠한 기작으로 전사를 담당하는지에 대한 이해는 매우 미미한 실정에 있다. 특히, 세포 내에는 무수히 많은 단백질들이 존재하는 복잡한 곳이다. 이러한 환경에서 전사 단백질들뿐만 아니라, 다른 다양한 단백질이 어떻게 다른 중요 단백질들과 상호 작용을 하고 있는지에 대한 연구는 매우 중요하다.

만약 생리적 환경에서 하나의 관심 단백질을 실시간으로 추적하고, 이때 이미지를 밀리초 수준의 시간 분해능으로, 나노미터 수준의 공간 분해능을 얻을 수 있다면, 대부분의 세포 내 반응을 관측하는 것이 가능해지고, 이는 각종 질병 기작 규명 및 치료술 개발, 신약의 작용 기작 규명 등에 혁명적인 발전을 가져다 줄 것이다.^[1] 이로 인해 현재 위의 조건들을 충족시킬 수 있는 새로운 이미지를 획득할 수 있는 기술을 개발하는 것은 세계적으로 핵심 이슈이다.

본 특집기고문에서는 현재까지 개발된 단일 단백질을 살아 있는 세포에서 관찰하는 기술에 대해 살펴보고, 이런 기술들이 사용된 생물리적 현상에 대해 기술하고자 한다.

저자약력

양소라는 중앙대학교에서 물리학 학사 학위(2011년)를 취득하였다. 2011년부터 포항공과대학교에서 석박사 통합과정으로 single-molecule fluorescence imaging in living bacterial cells에 대한 연구를 하고 있다.

김동균은 인하대학교에서 생명공학 학사 학위(2010년)를 취득하였다. 2010년부터 포항공과대학교에서 석박사 통합과정으로 single-molecule tracking on plasma membrane에 대한 연구를 하고 있다.

이남기 교수는 서울대학교 생물리화학 박사(2005년)로 2009년부터 포항공과대학교에서 물리학과/시스템생명공학부 교수로 재직 중이다. 단일분자 분광학 분야의 신기술을 개발하여 생분자 및 세포에 적용하는 연구를 하고 있다. (nklee@postech.ac.kr)

REFERENCES

- [1] X. S. Xie, *et al.*, Annu. Rev. Biophys. **37**, 417 (2008).

Fig. 1. (Left) Jellyfish. (Center) The structure of green fluorescent protein (GFP), which was derived from jellyfish. (Right) The mutant forms of GFP generate various colors of fluorescent proteins (<http://www.nobelprize.org>).

을 통해 세포 내의 관심 단백질을 표시할 수 있다는 것이다. 이는 다른 유기 형광염료나 나노점들을 이용해 세포 내 관심 단백질을 표시하는 것이 매우 어렵다는 것과 비교할 때, 형광 단백질만이 갖는 가장 큰 장점이다. 이러한 공로로 녹색 단백질을 개발한 세 연구자는 2008년 노벨 화학상을 수상하였다.

Fig. 2. (a) Detection by localization. (b) Differential interference contrast (DIC) image of two living *E. coli* cells. (c) Two fluorescent proteins were detected as fluorescent spots. (d) The graph is fluorescence signal along the yellow line in (c).^[1,5]

본 론

1. 살아 있는 박테리아에서의 단일분자 형광 검출(Single-molecule fluorescence imaging in living bacterial cells)

(1) Fluorescent protein의 발견

1962년 일본인 해양생물학자 시모무라 오사무는 해파리에서 녹색 형광 단백질(GFP)을 분리하는 데 성공하였다. 이후 Chalfie 그룹에서 이 유전자를 대장균에서 처음 발현시켜 녹색 형광을 내는 대장균을 만들었고, Tsien 그룹은 이 녹색 형광 단백질의 다양한 변이체를 만들어 파란색에서 적색까지 포함하는 다양한 색깔을 내는 형광 단백질을 만들었다(그림 1). 이러한 형광 단백질의 발견과 이에 대한 연구는 세포 이미징 분야의 눈부신 발전을 가져왔다. 형광 단백질이 특히 유용한 것은 유전자 조작

(2) 단일 형광 분자의 세포 내 검출

1990년대 초에 단일 분자를 검출하면서 단일 분자 분광학 분야는 급속도로 발전하였다. 특히 1996년 Ha 그룹에서 형광공명 전달 현상을 단일 분자에서 관찰한 이후에 생물리 분야 전반에 단일분자 기술이 적용되기 시작하였다.^[2] 이러한 단일분자 분광학의 발달과 더불어, 연구자들은 점차 단일 생분자들을 실제 환경, 즉 세포 내에서 관찰하는 연구에 관심을 갖게 되었다. 그 결실로 하버드 대학교의 Sunney Xie 그룹은 2006년 처음으로 단일 형광 단백질을 살아 있는 박테리아 세포 내에서 관찰하는 데 성공하였다.^[3] 살아 있는 세포 내에서 특정 생분자에 형광 단백질을 표시하면 형광 이미징을 통해 이를 관측하는 것이 가능하다. 하지만 세포 자체에서 나오는 강한 자동형광(autofluorescence) 때문에 단 하나의 형광 단백질을 검출하는 것은 매우 어려웠다(Fig. 2(a), 왼쪽).^[1] 이는 형광 단백질을 여기시키기 위해서 레이저를 쏘이면 형광 단백질뿐만 아니라 세포 내에 형광을 내는 다른 분자들에서도 형광이 나오기 때문에 이러한 잡음과 검출하고자 하는 형광 신호를 구별하는 것이 어렵기 때문이다. 이러한 자동형광을 줄여주기 위해 형광을 여기시키는 영역을 최소화해서 형광 신호를 향상시키는 방법이 있다. 대표적인 예로 전반사를 이용한 전반사 형광 현미경(TIRFM)은 evanescent 파를 이용해 빛을 쏘여주는 영역을 한정시켜서 자동형광을 낮춘다.^[4] 하지만 이 방법은 세포막 부분만을 볼 수 있어, 세포 내를 보는 것은 불가능하다. 이러한 한계를 극복하기 위해서는 wide-field 방법을 이용하여 세포 전체 이미지를 얻어야 한다. 하지만, 이 경우 CCD 카메라로 하나의 이미지를 얻는데 약 100밀리초의 시간이 걸리고, 이 시간 동안 세포 내 단백질은 Brownian 확산운동을 하게 된다. Fig. 2(a)의 중간 그림에서 볼 수 있듯이, 단백질이 세포 내에서 빠르게 확산운동을 하면 (확산계수 $\sim 8 \mu\text{m}^2/\text{s}$), 이미지를 얻는 100밀리초 동안에 세포 전체영역을 움직이게 되고, 이로 인해 검출하고자 하는 형광 신호가 자동형광 신호에 묻혀 검

REFERENCES

- [2] T. Ha, Th. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. Selvin and S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 6264 (1996).
- [3] J. Yu, *et al.*, *Science* **311**, 1600 (2006).
- [4] Y. Sako, S. Minoghchi and T. Yanagida, *Nat. Cell. Biol.* **2**, 168 (2000).

Fig. 3. Real-time monitoring of the protein expression in living cells. Dotted lines indicate the cell division times.^[5]

출이 어렵게 된다. 이 때문에 이전에는 세포 내에서 단일분자 형광을 검출하는 것이 불가능하였다. 하지만, 이러한 한계는 아주 간단한 아이디어로 극복되었다. 만일 단일형광 분자가 이미지를 얻는 100밀리초 동안에 한 점에 고정되어 있다면, 형광이 한 점에서만 방출되기 때문에 자동형광보다 더 강한 형광 신호를 검출할 수 있게 되는 것이다 (Fig. 2(a), 아래). 이러한 방법을 이용하여, Xie 그룹은 세포 내에서 단일분자 형광을 검출할 수 있었다.

(3) 단일 형광 분자의 세포 내 검출의 응용 1: 단백질 생성 실시간 관찰

Xie 그룹에서 2006년에 처음으로 세포 내에서 하나의 형광 단백질을 검출하는 데 성공할 때 사용한 단백질은 세포막에 고정되는 단백질이다.^[3] 세포막에 고정되면 단백질의 확산계수가 $\sim 10^{-2} \text{ um}^2/\text{s}$ 로 크게 줄어들어, 약 100배 정도 천천히 움직이게 된다. 이에 따라 이미지를 얻는 100밀리초 동안 단백질이 한 점에 고정되고, 단일분자 형광이 검출되었다 (Fig. 3). 이들은 살아있는 박테리아 세포 내에서 하나의 단백질 분자가 만들어지는 것을 실시간으로 관측하고, 이를 통해서 단백질은 Fig. 3과 같이 한 번에 여러 개씩 burst 형태로 생성된다는 것을 확인하였다. 한번의 burst에서 평균 4개의 단백질이 만들어졌고, burst는 박테리아의 한 세대 동안 한 번 정도 나타났다. 세포 주기(cell cycle) 동안 발생하는 burst의 개수는 Poisson distribution으로 나타났는데, 이는 burst가 만들어지는 과정이 random process라는 것을 의미한다. Berg은 1978년 한번의 burst에서 만들어지는 단백질의 개수는 기하 분포(geometric distribution)를 따를 것이라고 이론 모델을 통해 예측하였는데,^[6] 이것이 본 단일분자 실험을 통해 처음으로 증명된 것이다.

(4) 단일 형광 분자의 세포 내 검출의 응용 2: 단백질의 세포 내에서의 확산 모델(facilitated diffusion of protein)

유전자 발현의 첫 단계는 DNA의 유전정보를 전달하는 매개체인 mRNA를 생성하는 것이고 이 과정을 전사(transcription)라 한다. 이러한 전사가 일어나기 위해서는 전사 과정을 조절하는 전사 단백질이 전체 DNA 영역 중에서 목표 지점을 찾아가 결합해야 한다. 대장균의 경우, 전체 게놈이 약 460만 염

Fig. 4. Model of facilitated diffusion.^[1]

기쌍으로 이루어져 있는데, 실제로 전사 단백질이 결합하는 영역은 약 30 염기쌍 정도로 전체 게놈의 약 0.0007%를 차지한다. 즉, 이는 전사 단백질이 전체 DNA 중에서 결합할 수 있는 장소를 찾는 일은 마치 모래사장에서 바늘 찾기와 같다는 뜻이다. 따라서 연구자들은 이 문제를 해결하기 위해 오랜 시간 동안 다양한 방법으로 연구를 진행해왔다.

1970년 Riggs 그룹은 시험관 실험을 통해 DNA 결합 단백질이 3차원 확산(diffusion) 운동보다 더 빠르게 DNA의 목표 지점을 찾아 결합하는 것을 발견하였고,^[7] 이 실험 결과로 단순한 3차원 확산이 아닌 facilitated diffusion 모델을 제시하였다.^[8] Fig. 4와 같이 단백질은 목표 지점(operator)을 찾기 위해 세포질 내에서 3차원 확산운동을 하다가 일단 DNA의 아무 지점에 결합한다. 그리고 그 자리에서 1차원 확산운동을 통해 목표 지점을 찾는다. 하지만 이때 실패하면 다시 그 DNA 영역에서 떨어지고 다른 지점으로 3차원 확산운동을 통해 이동한다. 이러한 1차원 확산운동과 3차원 확산운동의 결합을 통해 DNA 결합 단백질은 더 빠른 시간 내에 효과적으로 목표 지점을 찾을 수 있게 된다. 하지만 이전까지 실제로 살아 있는 세포 내에서 DNA 결합 단백질의 동역학을 연구할 수 있는 방법이 없었기 때문에 facilitated diffusion model을 세포 내에서 검증할 수 없었다. Xie 그룹은 DNA가 세포 내에서 상대적으로 거의 움직이지 않고, 단백질이 DNA에 결합하면 결국 이는 단백질이 고정되는 효과를 갖게 된다는 것에 착안하여 앞에서 소개한 세포 내 단일 형광 분자 검출 방법을 사용하

REFERENCES

- [5] G. W. Li and X. S. Xie, *Nature* **475**, 308 (2011).
- [6] O. G. Berg, *J. Theor. Biol.* **71**, 587 (1978).
- [7] A. D. Riggs, S. Bourgeois and M. Cohn, *J. Mol. Biol.* **53**, 401 (1970).
- [8] P. H. von Hippel and O. G. Berg, *J. Biol. Chem.* **264**, 675 (1989).

Fig. 5. YFP-labeled lacI binds at operator per cell. The fluorescence intensity along the red line is plotted.^[9]

였다.^[9] lacI라는 DNA 결합 단백질에 형광 단백질을 표지를 하여, 이 단백질이 DNA와 결합했을 때 단일분자 수준의 검출이 가능해짐을 확인하였고 (Fig. 5), 이를 이용하여 이 단백질의 DNA 결합 자리를 찾는 시간을 측정할 수 있었다. 그 결과, 세포 안에서 하나의 lacI가 목표지점을 찾는데 약 360초 걸린다는 것을 알아냈다. 이에 대한 후속 연구로 동일한 방법을 이용하여 lacI가 실제로 DNA 위에서 45 ± 10 염기쌍만큼의 거리를 1차원 sliding 운동을 한다는 것과 이를 통해 facilitated diffusion으로 DNA 내의 목표 지점을 찾는다는 것을 밝혀내었다.^[10]

(5) 단일 형광 분자의 세포 내 검출의 응용 3: A stochastic single-molecule event determines the fate of a cell

형광단백질을 이용하면 형광 세기로부터 세포 내의 단백질 개수를 측정하는 것이 가능하다. 이를 이용하여 유전적으로 동일한 세포들을 동일한 환경에서 배양해서 형광 세기를 측정하면 Fig. 6(c)처럼 형광 세기는 확률 분포로 나타난다. 이는 동일한 유전정보를 가진 세포가 동일한 환경에서 자랐더라도 물리적, 화학적, 생리적으로 서로 다른 상태에 있을 수 있다는 것을 의미한다. 또한 Fig. 6(c)처럼 이러한 상태는 하나의 분포가 아닌 두 개의 분포(bimodal distribution)로 나타나기도 하며 이를 bistability라고 한다. 또한 세포는 확률적 과정(stochastic process)을 통해 다른 상태로 이동할 수도 있다 (Fig. 6(d)). 따라서 이러한 세포 상태의 전환을 가능케 하는 분자 수준의 메커니즘을 밝히는 것은 분자 생물학에서 오랜 시간 제시되어온 중요한 질문 중 하나이다.

박테리아 내의 젖당 분해 효소(lactose permease)는 이러한 bistability를 갖는 예 중 하나이다. 이 단백질은 lacI라 불리는 억제 효소(Fig. 6(a), 보라색 구)에 의해 발현이 억제되어 있는데, 유도체(inducer)가 세포 내로 들어오면 lacI가 DNA에서 분리되고, 분해 효소의 발현이 유도된다. 이렇게 분해 효소가 만들어지기 시작하면 세포 내로 유도체의 흡수가 더 증가하고, 이렇게 더 많은 lacI를 비활성화시켜 분해 효소 발현의 정귀환(positive feedback)이 일어난다. Fig. 6(c)처럼 유도체가

Fig. 6. (a) The positive feedback results in bistability. (b) Fluorescence images show two distinct phenotypes. (c) Distributions of fluorescence intensity. Bimodal distributions at moderate inducer (TMG) concentration. (d) Sequence of images of E.coli cells. One cell switches the phenotype to express many YFP fused molecules.^[5]

없는 경우(red histogram), 분해효소는 거의 만들어지지 않고, 유도체의 농도가 높은 경우(white histogram), 대다수 세포 내의 분해효소가 발현된다. 유도체 농도가 중간인 경우(blue histogram), 그림과 같이 세포 내 분해 효소 농도는 bistability를 띠게 된다. Xie 그룹은 단일 세포가 어떠한 메커니즘으로 이러한 bistability를 가지게 되는지 단일분자 형광 이미징을 통해 밝혀내었다.^[11] 정귀환이 일어나기 위해서는 세포 내의 분해효소 개수가 임계점(~ 375 개)을 넘어야 했고, 이러한 임계점에 해당하는 분해효소를 갖기 위해서는 단백질 합성이 거대한 burst로 일어나야 한다. 이들은 lacI의 구조와 DNA의 lacI 결합 장소가 두 개라는 사실을 통해서 lacI가 두 개의 결합 장소

REFERENCES

- [9] J. Elf, G. W. Li and X. S. Xie, *Science* **316**, 1191 (2007).
- [10] P. Hammar, *et al.*, *Science* **336**, 1595 (2012).
- [11] P. J. Choi, *et al.*, *Science* **322**, 442 (2008).

Fig. 7. (a) Model of EGFR Dimerization by natural ligand EGF-atto532/Cy5. (b) Image of FRET donor EGF-atto532. (c) Image of FRET acceptor EGF-Cy5. (d) The binding of EGF-Cy5 to EGFR dimer induces FRET from atto532 to Cy5.

로부터 완전히 분리되는 이벤트가 확률적으로 발생했을 때, 분해 효소의 합성이 거대한 burst로 발생하는 것이 가능하고 이를 통해 세포 내 분해효소의 농도가 임계점을 넘어서 세포 상태의 전환이 일어난다고 설명했다.

2. 살아 있는 포유세포에서의 단일분자 형광 검출(Single-molecule in mammalian cell)

박테리아는 일반적으로 자동형광이 상대적으로 작고, 세포 크기 1 마이크로미터 수준이어서, 단일 형광 분자 연구가 비교적 용이하였다. 하지만, 암세포 등의 포유세포에서는 자동 형광이 강하여, 살아 있는 세포에서 단일 형광 분자를 관찰하는 것이 더욱 어렵다. 이로 인해 현재까지 대부분의 단일형광 분자 관찰은 세포 표면, 즉 plasma membrane 부분에서 이루어졌다. Membrane에서 단일 형광 분자를 관찰하는 방법은 다음과 같다.

(1) Single-molecule FRET on plasma membrane

Fluorescence(=Förster) Resonance Energy Transfer(FRET)는 공여자(donor)의 여기된 상태의 에너지가 수여자(acceptor)로 전달되는 현상을 의미한다. 공여자는 일반적으로 수증자에 비해 더 짧은 파장의 빛을 방출하게 되는데, 이때 방출 파장은 수증자의 흡수 파장과 중첩이 있어야 한다. 에너지 전달 효율은 공여자와 수증자 파장의 중첩정도, 수증자의 양자효율, 공여자와 수증자의 전이 쌍극자의 상대적 배열정도, 그리고 공여자와 수증자의 거리에 의존한다. 특히, FRET 현상에 관련된 여러 요소들 중 '거리 의존적' 특성을 통해 많은 연구들이 이루어졌다.^[12] 이러한 FRET을 이용하면, 살아 있는 세포의 plasma membrane에서 단백질이 중합체를 이루는 것을 관찰하는 것이 가능하다. 예를 들어, 동물세포가 가지고 있는 대표적인 막 단백질인 epidermal growth factor receptor(EGFR)은 세포 외부 신호에 의해 이합체를 형성한다(Fig. 7). 이러한 현상은 EGFR

Fig. 8 Principle of sptPALM. 405 nm laser activates fluorescent proteins, which are detected by 561 nm laser. After tracking activated proteins, re-activation and detection processes are repeated until full trajectories are obtained.

의 신호 물질인 EGF에 각각 FRET 쌍 유기 형광 염료를 달고 단분자 수준에서 FRET을 관찰함으로써 규명할 수 있다. 동물세포의 막에 존재하는 막단백질은 시간과 공간에 따라서 다양한 모습으로 존재하고 있다. 기존의 ensemble 수준에서의 관찰방법은 이러한 다양성이 평균 안에 감추어져 있었다. 하지만 단일 분자 방법을 통해 존재하는 다양한 모습, 예를 들어, 구조적 변화, 구성의 변화 그리고 변화의 속도 등을 관찰할 수 있다.^[13]

(2) Single-molecule tracking on plasma membrane

Single-particle tracking(SPT) 방법은 운동성을 갖는 하나의 분자를 시간차이를 두고 이미징을 한 후, 그 공간 내에서 분자의 좌표정보와 시간정보를 이용하여 분자의 운동성을 구하는 방법이다. 이 방법을 이용하면 단일 분자를 실시간으로 추적하므로 여러 분자들 간에 존재하는 확산운동의 불균일성(heterogeneity)을 관찰할 수 있다. 예를 들어, 세포막에 존재하는 단백질, 즉 막단백질들은 단순 확산운동을 하는 경우 MSD(mean square displacement)와 시간 간격 간에 비례하는 특징을 갖는다. 하지만 막 단백질이 주위 환경에 의해 한 곳에 갇혀 있는 경우에는 충분한 시간이 흐르더라도 특정 지역을 벗어나지 못해 MSD가 변하지 않는다. 반면, 막 단백질이 일정한 방향성을 가지며 진행되는 경우 예측되는 MSD보다 커지게 된다. 하지만, 기존의 SPT 방법으로 한 세포에서 추적할 수 있는 분자의 개수가 수십에서 수백 개로 제한되어 통계적으로 의미 있는 data를 얻는 데는 한계점이 있었다. 이러한 한계는 최근 SPT 방법과 photo-switchable protein이 접목되며 해결되었다. Photo-switching 또는 photo-activation 방법은 형광 단백질의 꺼짐과 켜짐을 조절함으로써, 존재하는 형광 단백질을 모두 켜지

REFERENCES

- [12] Steven S. Vogel *et al.*, *Fanciful FRET*, Science signaling, p. 311 (2006).
- [13] Pascale Winckler *et al.*, *Identification and super-resolution imaging of ligand-activated receptor dimers in live cells*, Scientific reports, 3.2387, doi:10.1038/srep02387 (2013).

Fig. 9. (a) The movement of Integrin beta3 in mouse embryonic fibroblast. Purple color = active diffusion. Green = confined diffusion. Orange = immobile. (b) Blow-up image.

않고, 일부분만을 켜서 관찰하는 것이다. 이러한 방법을 photo-activated localization microscopy(PALM)이라 하며, 2008년에 처음으로 SPT 방법과 PALM 방법을 합쳐서 sptPALM 기술이 구현됐다(Fig. 8). 이 기술은 PALM 방법을 이용해 선택적으로 형광 단백질을 관찰 가능한 상태로 만들고, 시간에 따라 형광 단백질과 연결된 막단백질의 운동 정보를 얻을 수 있다.^[14]

일례로, sptPALM 기술은 동물세포에서 integrin beta1과 beta3라는 세포막 단백질의 움직임을 관찰하는데 적용되었다. 그림 9에서 보여지듯이 integrin beta3의 움직임을 세포의 focal adhesion 안팎에서 diffusive와 confined 확산, 그리고 immobile로 총 3가지의 움직임으로 정의할 수 있었고, 그 결과 integrin 단백질이 focal adhesion 안팎에서 다른 움직임을 갖는다는 것을 규명할 수 있었다(Fig. 9).^[15]

(3) Single-molecule in nuclear membrane

현재까지 대부분 동물세포에서의 단일 단백질 검출은 세포 표면인 plasma membrane에서만 이루어졌다. 이는 전반사를 이용한 현미경(TIRF)을 사용할 경우 자동 형광을 효과적으로 줄이는 반면, 표면에서 200 nm 이내만 볼 수 있기 때문이다. 이에 따라 세포 안쪽은 여전히 연구하기 어려운 실정에 있었다. 이를 극복하기 위해서 최근에 Harvard 대의 Xie 그룹에서 Reflected light-sheet microscopy(RLSM) 방법을 개발하였다.^[16] 이 방법은 AFM의 cantilever와 추가적인 대물렌즈를 이용하여 세포의 핵 부분을 관찰하는 것이 가능하게 하였다. 대물렌즈를 통해 모여진 여기용 laser가 cantilever에 반사되면서 세포의 가운데 부분에 위치하고 있는 핵 부분을 효과적으로 여기시키게 되고, 다른 대물렌즈를 통해 방출되는 형광 정보를 수집하게 된다. 이를 통해 전반사 방법으로는 접근할 수 없었던 세포의 핵 부분을 관찰할 수 있었다. Xie 그룹은 이 방법을 이용하여 세포 핵 안에서 단백질이 DNA에 붙는 것을 관찰할 수 있었고, 동물 세포에서도 단백질의 DNA와 결합하는 동역학 정보를 얻을 수 있었다. 이 기술을

Fig. 10. (a) Experimental scheme of RLSM. (b) Comparison between RLSM and HILO. RLSM can observe inside cell with better signal-to-noise ratio than HILO. (c) top, image of fluorescent protein moving on DNA. down, image of fluorescent protein immobile on DNA.

통하여 그동안 세포의 표면에 존재하는 막단백질만을 관찰한 기존의 한계를 뛰어넘을 수 있다는데 그 중요성이 있다(Fig. 10).^[16]

결론

본 기고문에서는 살아 있는 세포에서 하나의 단백질의 움직임 및 상호 작용을 이미징하는 현대 기술에 대해서 살펴보았다. 이미 언급한 바와 같이, 세포 내에서 확률적으로 일어나는 반응이 세포의 운명을 결정할 수 있다. 이러한 또 다른 예 중 하나가 박테리아가 항생제에 대해 저항성을 갖는 것이다.^[17] 이러한 항생제 저항성에 대한 분자 수준의 메커니즘은 아직까지 밝혀지지 않았다. 단일분자 이미징 기술은 이러한 복잡한 생명 현상을 세포 내에서 직접 관측하고 연구하는 것을 가능케 할 것이다. 단일분자 기술들의 가장 큰 공통된 장점은 ensemble average 방법으로 보이지 않았던 개개의 분자들의 특징적인 움직임들을 하나씩 볼 수 있다는 데 있다. 현재 세포 내 연구 기술은 박테리아에서는 3차원 수준으로 추적이 어느 정도 가능하며, 동물 세포에서는 세포막에서 만큼은 연구가 충분히 가능하다. 앞으로 보다 향상된 형광 단백질 및 형광 염료가 개발되면, 머지않아 세포 내에서 단백질의 모든 움직임을 관측하는 것이 가능해질 것이다. 이는 현재의 세포 생물학 및 의학 분야에 혁명적인 발전을 가져다 줄 것이다. 한 가지 흥미로운 것은, 역사적으로 이미 증명되었듯이, 이러한 기술을 개발하는 역할을 담당하는 것은 생물학자나 의학자가 아니라, 언제나 생물물리학자이었다는 것이다.

REFERENCES

- [14] Suliana Manley *et al.*, Nature Method **5**, 155 (2008).
- [15] Olivier Rossier *et al.*, Nature Cell Biology **14**, 1057 (2012).
- [16] J. Chrostof M Gebhardt *et al.*, Nature Method **10**, 421 (2013).
- [17] N. Q. Balaban, *et al.*, Science **305**, 1622 (2004).