세포의 물리량과 측정하는 방법들에 대하여

DOI: 10.3938/PhiT.23.001

오승은·박지혜

Physical Properties of Living Cells

Seungeun OH and Jeehae PARK

The cell is the unit of life and the properties of single cells are the basis of their aggregate behavior and of the physiology of living organisms. Among the properties of single cells, we will review the physical properties, including the volume, density, mass, and the electrical properties. While these physical quantities are the most basic of the physical properties of matter, they reflect and affect the underlying complex biological activities in a cell. Physicists and biologists have been asking how biological mechanisms control the cell's physical properties and how physical properties regulate biological processes. For example, the single parameter of transmembrane electrical potential is regulated by a cohort of proteins (ion channels and ion pumps); conversely, the activity of these proteins is controlled by the transmembrane potential. Measuring the physical parameters of a single living cell is difficult because of the small size and fragility of the cell and the aquatic environment required to keep the cell alive. We will review technological advances in the measurement and the control of the physical properties of cells and will illustrate the biological significance of a physical under-

standing of living cells with examples from the authors' research.

정기 건강 검진에서 키와 체중과 체온은 빠지지 않고 측정되는 물리량이다. 이들 물리량은 성장과 건강의 지표가 되기 때문이다. 신체의 물리량이 생리현상과 연관되어 있는 것과 같이 신체를 구성하는 세포의 물리량 또한 세포의 성장, 분화 및 대사와 밀접한 관계를 가지고 있다. 세포의 물리량을 측정하는데 사용할 수 있는 저울과 전압계에 해당하는 기술을 소개하며 물리량의 세포생물학적 의의에 대해 이야기하고자 한다.

길이와 물질 수송

(Length and the Problem of Material Transport)

우리 몸을 구성하는 세포 크기에 대해 누구나 잘 아는 바는 눈에 보이지 않을 정도로 작다는 점이다. 전형적인 체세포는 사람이 맨눈으로 볼 수 있는 분해능보다 조금 더 작은 10~30 μm 정도이며 광학현미경의 발명을 통해 생명체가 세포로 구성되어 있다는 것이 밝혀지게 되었다. 대부분의 체세포가 작은 까닭에 대하여 여러 가지 설명이 있는데 첫 번째는 세포가 원활히 활동할 수 있는 최소한의 표면적과 부피의 비율이 있기 때문이라는 것이다. 세포 외부와의 물질 교환은 표면적에 비례하고 세포의 대사량은 부피에 비례하므로 세포의 대사를 뒷받침하기 위해서 어느 정도 이상의 표면적이 필요하다는 이론이다. 작은 세포들이 둥글고 컴팩트한 반면 크기가 큰 세포들은 길더라도 가늘거나 복잡한 모양을 하고 있어 표면적이 넓어지는 것을 볼 수 있다. 외부와의 물질교환이 빠르게 이루어져야 하는 소장 상피세포는 세포 표면이 촘촘한 돌기와 같이 뻗어 나온 미세융모 구조를 만듦으로 표면적을 극대화하기도 한다. 세포 크기의 상한(upper limit)에 대한 두 번째 설명은 세포분열(mitosis) 동안에 염색체를 분리하고 이동시키며 세포를 반으로 나누는 역할을 하는 분자기계들이 효율적으로 작용할 수 있는 한계가 있기 때문이라는 것이다. 이에 대한 최신

저자약력

오승은 박사는 MIT에서 물리학 박사(2010)를 취득하고 2010년부터 하버드 의대 박사후연구원으로 재직 중이다. 물리량 측정을 통하여 세포의 성장을 정량적이고 통합적으로 연구하는 시스템 생물학 연구에 참여하고 있다. (seungeun_oh@hms.harvard.edu)

박지혜 박사는 University of Illinois at Urbana Champaign에서 Biophysics로 2011년 박사학위를 취득하고 2011년부터 하버드 화학과에서 박사후연구원으로 광학적 방법으로 세포 내 전압을 측정하는 기술을 연구하였다. 현재는 하버드 의대에서 박사후연구원으로 유전체 조절의 물리적 메커니즘을 연구하고 있다. (jeehae_park@hms.harvard.edu)

Fig. 1. Size and shape is characteristic to different cell types. D. A. Guertin & D. M. Sabatini, Cell Size Control, Encyclopedia of Life Sciences (2006).

논의가 아래 참고문헌에 잘 정리되어 있다.^[1] 세포 크기의 한계에 대한 또 다른 설명은 세포질은 세포핵으로부터 mRNA 등의 물질을 공급받아야 하므로 세포핵으로부터의 거리가 멀어지는 데는 한계가 있다는 것이다. 골격근을 이루는 근세포의 경우 근육에 따라 길이가 수 센티미터에 달할 수도 있지만 세포 안에 여러 개의 세포핵이 간격을 두고 분포되어 있어 세포 질로부터 세포핵까지의 거리는 멀지가 않다. 운동 신경세포나 감각 신경세포의 경우 세포핵은 세포체에 한 개뿐이지만 신경 돌기가 길게 뻗어 나와서 세포의 한 끝에서 다른 끝까지의 길이가 수십 센티미터에 달하기도 한다. 이렇게 극단적으로 긴 세포에서는 세포핵에서 생산된 mRNA나 세포체에서 만들어진 단백질들을 어떻게 세포의 말단까지 전달할 것인가가 문제가 된다. 평균 크기의 단백질이 확산(diffusion)에 의해서 10 μm 직경의 세포의 한 끝에서 다른 끝까지 이동하는 데는 10초가량이 걸린다. 확산으로 거리를 이동하는데 걸리는 시간은 거리의 제곱에 비례하므로 크기가 큰 세포에서는 확산은 효율적이지 않다. 실제로 세포에서는 물질의 이동을 돕기 위하여 분자 기계에 의한 능동수송이 이루어질 뿐만 아니라 세포 내부의 물질을 섞어주는 분자 모터가 작동하는 것으로 알려져 있다.^[2]

부피와 삼투압 평형(Volume and the Regulation of Osmotic Pressure Balance)

세포막은 반투막이기 때문에 체액보다 더 낮은 삼투압의 액체에 노출된 세포는 삼투압에 의해서 부풀어 오르고 더 높은

삼투압의 액체에 노출된 세포는 쪼그라든다. 세포는 삼투압에 의한 부피 변화에 반응하여 능동적으로 원래의 부피를 회복하는 메커니즘을 가지고 있다. 세포가 자신의 부피를 ‘아는’ 것처럼 ‘행동’하는 이 현상을 설명하기 위해 많은 연구가 이루어졌으며 세포막에 이온 채널이 존재하고 이온 펌프들이 에너지(ATP)를 소비하며 작동하여 세포 안팎에서 이온들이 전기화학적 Gibbs-Donnan 평형을 이루는 것이 알려졌다.

세포의 부피의 자리수(order of magnitude)는 작은 세포의 경우 picoliter 큰 세포의 경우 nanoliter 정도가 된다. 예컨대 세포의 직경이 15 μm 이면 완벽한 구형의 세포의 부피는 $1766 \mu\text{m}^3$ 곧 1.766 picoliter가 되고 운동신경세포의 축삭돌기(axon)의 직경이 1.5 μm 이고 길이가 10 cm라면 세포의 부피는 180 picoliter 이상이 될 것이다. 불규칙한 모양의 세

포의 부피를 직접 측정하기 위해서는 광학현미경과 쿨터카운터(Coulter counter)가 널리 사용된다. 1950년대에 Wallace H. Coulter가 발명한 쿨터카운터는 완충액(buffer solution)을 통해 약한 전류를 흘리면서 전기저항을 측정하되 병목 역할을 하는 좁은 지점을 만들어 대부분의 저항이 이 지점에서 발생하게 만든다.^[3] 펌프로 세포가 들어있는 완충액을 병목을 통과하여 이동시키면 세포가 병목을 통과할 때마다 저항이 증가하는데 세포의 부피가 클수록 저항이 더 커지는 것을 이용하여 세포의 부피를 얻을 수 있다. 많은 수의 세포의 부피를 통계적으로 측정하고자 할 때 유용하며 혈액학에 많은 기여를 했다. 개개의 세포의 부피를 측정하기 위해서는 광학현미경을 이용하는데 널리 사용되는 방법은 DIC나 confocal microscope 등 depth sectioning이 가능한 현미경으로 세포의 단면의 면적을 층층이 구한 다음 이를 합산하고 층간의 높이를 곱하여 계산하는 것이다.^[4] 이러한 접근법은 그 정확도에 한계가 있는데 대부분의 광학현미경의 높이 방향 분해능이 평면 방향의 분해능보다 2-3

REFERENCES

- [1] W. F. Marshall *et al.*, "What determines cell size?", BMC Biology (2012).
- [2] C. P. Brangwynne, G. H. Koenderink, F. C. MacKintosh and D. A. Weitz, J. Cell Biol. **183**, 583 (2008).
- [3] Wallace H. Coulter, Proceedings of the National Electronics Conference **12**, 1034 (1956).
- [4] D. Hevia *et al.*, Protocol exchange, cell volume and geometric parameters determination in living cells using confocal microscopy and 3D reconstruction (2011).

배 정도 나쁘기 때문이다. 높이 방향 분해능이 $0.8\mu\text{m}$ 이라면 $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ 인 가상의 세포의 부피를 이 방법으로 얻을 때에 불확실성은 윗면과 아랫면의 면적에 높이 방향 분해능을 곱한 값으로 총 부피의 16%나 된다. 모양이 불규칙한 세포의 부피를 높은 정확도로 측정하려면 Atomic force microscopy나 Scanning ion conductance microscopy^[5] 등 세포의 높이를 정확히 측정하는 방법으로써 부피를 얻을 수 있으나 앞의 두 방법만큼 보편적으로 사용되지는 못하고 있다.

질량과 세포의 성장

(Mass and the Biology of Cell Growth)

1. 세포 중량의 생물학적 맥락

보통 크기의 체세포의 질량은 수 나노그램 정도이지만 70–80%가량이 물이며 건조중량, 곧 단백질, 지질, 핵산 등이 기여하는 중량은 수백 피코그램 정도이다. 세포의 증식(proliferate)은 세포의 크기가 두 배로 커진 후에 분열을 통해 두 개의 세포로 나뉘는 과정을 가리키는데 이러한 성장과 분열의 주기를 세포주기(cell cycle)라고 한다. 신호 전달 인자인 cyclin과 cyclin dependent kinase와 Anaphase Promoting Complex가 세포 주기의 과정에서 일어나는 다양한 프로세스의 타이밍을 제어한다.^[6] 세포주기에 맞추어서 정확하게 제어되는 프로세스 가운데 염색체의 복제가 있는데 S기(S phase) 동안에 합성되어 양이 2배로 증가하고 세포 분열로 세포가 둘로 나뉘면서 본래의 양으로 돌아간다. DNA는 (사람의 경우) 23쌍의 염색체로서 존재하며 질량으로는 수 피코그램 정도이고 세포의 건조중량의 대부분은 수백 피코그램이 되는 단백질이 차지한다. 단백질 역시 세포 주기 동안에 양이 2배 정도로 증가하나 단백질 합성의 세포주기와 DNA합성의 세포주기와 차이점은, 증가하는 정도가 평균적으로는 2배이지만 개별 세포에서는 조금씩 차이가 나며 간기 전체, 곧 G1기, S기, G2기 동안에 합성이 계속 된다는 점이다. 또한 DNA는 S기 동안에만 합성이 되고 그 전후로 DNA 분자는 안정적인 상태를 유지하지만 단백질이나 인지질은 끊임없이 합성되고 분해되며 새로운 분자로 치환된다. 합성과 분해의 기작은 전혀 다른데, 어떤 단백질을 만들어야 할지에 대한 mRNA의 정보를 리보솜(ribosome)에서 받아들여 세포질 내에 있는 아미노산을 이용하여 단백질이 합성되는 기작이 밝혀져 있으며 mTOR를 핵심으로 하는 신호전달체계가 이 기작을 조절한다는 것이 알려져 있다. 한편 단백질의 분해는 라이소솜(lysosome)이라는 소기관이나 프로테아좀(proteasome)이라는 단백질 컴플렉스를 통해서 이루어진다. 이렇게 전혀 다른 메커니즘을 가지고 있는 단백질 합성과 분해가 어떻게 조정되는지는 아직 밝혀지지 않은 문제이다. 세포의

증식이 일어나기 위해서는 세포의 중량이 느는 것이 반드시 필요하기 때문에 암세포의 성장을 막는 신약 개발의 타겟으로서도 mTOR를 비롯한 단백질 합성의 기작이 활발히 연구되고 있다. 한편 증식하는 세포의 일부는 분화 과정을 거쳐 상피세포, 신경세포, 심근세포 등 다양한 세포형으로 바뀐다. 분화의 과정을 통해 유전자 발현과 단백질 표현이 세포형에 고유한 패턴으로 바뀌며 세포의 모양과 크기의 변화가 수반된다. 이러한 분화 과정에 수반되는 세포의 질량과 크기 변화는 발생과 성장에 중요한 역할을 한다.

세포 성장과 그 조절을 연구하기 위해서는 개별 세포의 성장을 정량적으로 정의하고 측정하는 것이 필요하다. 세포에 포함된 물의 양은 삼투압에 의해 변할 수 있지만 유기물의 양은 오직 합성과 분해와 분비를 통해서만 변하므로 총 중량보다는 세포의 건조중량, 곧 유기물만의 중량이 세포 성장에 더 유의미한 물리량이라고 생각된다. 세포를 구성하는 유기물의 60% 정도가 단백질, 5%가량이 DNA와 RNA, 17%가량이 지질인 것으로 알려져 있는데,^[7] DNA와 단백질의 성장 패턴이 전혀 다른 것에서 볼 수 있듯이 총 건조중량뿐 아니라 구성요소 각각의 질량을 측정하는 것도 유용하다.

생물학과 분석화학에서 단백질의 양을 재는 전통적인 방법은 단백질과 반응하여 색이 변하는 지시약을 이용하는 Bradford 반응, bicinchoninic acid 반응, Lowry 단백질 반응 등이 있다. 그러나 이 방법들은 수용액 상태의 샘플에 적용되며 날개 세포에는 적용하기 어렵다. 개별 세포를 측정하기 위해서는 단백질 또는 핵산에 선택적으로 결합하도록 디자인된 형광염료가 사용된다. 단백질의 경우 succinimidyl ester가 아민기(H_2N -)와 결합하므로 여기에 대중적인 형광염료인 Alexa Fluor를 결합시킨 것을 사용한다.^[8] 그러나 이 방법을 적용하기 위해서는 세포를 포르말린으로 고정해야하며 또한 염료의 농도나 반응성에 따라 형광 신호의 세기가 변할 수가 있어서 상대적인 비교는 가능해도 절대적인 측량에 이용하기에는 어려움이 있다. 핵산에 선택적으로 결합하는 형광염료는 DAPI, Hoechst, DRAQ5, Vybrant Dycycle 등이 있으며 살아있는 세포 또는 고정된 세포에 적용할 수 있다. 그러나 여러 가지 요인이 (염료 분자의 접근이 DNA와 결합한 다른 단백질에 의해 차단되는 등) 염색의 효율에 영향을 미치므로 정량적 측정의 정확성에 한계

REFERENCES

- [5] Y. E. Korchev, *et al.*, Biophys. J. **78**, 451 (2000).
- [6] David O. Morgan, *The Cell Cycle: Principles of Control* (Sinauer Associates, Inc., 2007).
- [7] Bruce Alberts *et al.*, *The Molecular Biology of the Cell* (Garland Science, 2007).
- [8] R. Kafri, J. Levy, M. B. Ginzberg, S. Oh, G. Lahav and M. W. Kirschner, *Nature* **494**, 480 (2013).

Fig. 2. (a) The wave front of light traversing a cell is retarded by the cell's refractive index. (b) Quantitative phase map of a spherical cell obtained by QPM. Colorbar is radians. (c) Layout of a diffraction type QPM.

가 있다.^[9] 염료의 선택적 반응을 이용하는 화학적 측정법들과 달리 아래 소개하는 물리적인 측정법들은 전적으로 새로운 접근을 통해 살아있는 세포의 중량을 보다 나은 정확도로 절대 값을 측정할 수 있게 해준다.

2. 굴절률을 이용한 날개 세포의 건조중량 측정

진공에서의 빛의 속도가 일정한 반면 빛이 투명한 물질을 통과할 때에는 속도가 느려진다. 진동하는 전자기장인 빛이 물질을 구성하는 전자들을 가속, 진동시키고 이 진동하는 전자들이 방출하는 전자기장의 효과가 더해져서 최종적인 효과가 빛의 속도가 느려지는 것이다. 전자가 얼마나 잘 가속되는지를 나타내는 분극률(polarizability)은 전자구름이 작고 타이트할수록 작아지고 전자구름이 크고 퍼져 있을수록 커지는 원자/분자의 성질이다. 간단히 표현하자면 분극률에 기여하는 전자구름이 많은 샘플일수록 통과하는 빛이 더욱 느려진다고 할 수 있으며 이것이 수용액 샘플에서 용질의 농도가 높아질수록 굴절률이 올라가는 이유이다. 굴절률을 이용하여 용액의 농도를 재는 Brix 굴절계는 농축산업에서 꿀, 와인, 우유 등의 농도를 측정하는데 사용되기도 한다. 세포 역시 유기물의 콜로이드 용액으로 생각할 수 있고 (실제로 용액 상태는 아니지만 많은 세포 소기관들이 빛의 파장보다 작으므로 근사적으로 용액으로

여길 수 있다) 세포질의 굴절률은 유기물의 농도를 반영한다. 유기물의 농도가 1 g/ml이 증가할 때 굴절률은 단백질의 경우 평균 0.19 정도, 지질과 탄수화물의 경우 0.14–0.15 정도가 증가한다. 이들의 혼합물인 세포질의 평균 굴절률 증가율은 1 g/ml당 0.18이다. (평균적인 체세포에 해당하며 적혈구나 박테리아, 바이러스는 다른 값을 가진다.) 가시광선 영역에서 물의 굴절률은 1.333 가량이고 세포질의 굴절률은 1.366 안팎이므로 세포질의 농도는 0.2 g/ml 가량이다.

굴절률을 이용하여 세포의 중량을 측정하는 대표적인 방법은 정량위상현미경(Quantitative phase microscopy)이 있다. 빛의 위상이란 전자기파의 같은 상태가 일정 간격으로 반복되는 것을 그 주기에 대한 2π 의 분율로 나타낸 것이다. 위상은 세포를 투과하는 빛이 느려져서 파면(wave front)이 늦어지는 것을 정량적으로 기술하는 물리량으로서 간섭현상을 이용하여 측정할 수 있다. 세포를 투과한 빛과 이에 결맞는(coherent) 평면파를 중첩시켜 그 간섭무늬를 측정하고 여기에 더하여 공간상 혹은 시간상으로 위상을 이동시킴으로써 간섭무늬에서 위상을 계산할 수 있다. 이런 종류의 정량위상현미경은 투과광학현미경에 간섭계를 결합한 것이라 할 수 있다. 세포에 의해 위상이 늦춰지는 정도는 세포의 굴절률의 선적분에 비례하므로 세포의 굴절률이 높을수록, 세포의 두께가 두꺼울수록 위상이 더 늦어지게 된다. 따라서 정량위상이미지에서 위상 값은 세포의 건조중량의 2차원 투영 분포를 보여준다. CT스캔의 원리를 이용하여 각도에서 얻은 정량위상이미지로부터 건조중량의 3차원 분포를 구하는 단층위상현미경(Tomographic phase microscope)도 개발되어 있다.^[10] 굴절률이 파장에 따라 달라지는 분산(dispersion)을 이용하면 건조중량의 구성성분들을 구별할 수도 있다. 가시광선 영역에서 분산값이 큰 헤모글로빈에 적용된 경우가 있으며^[11] 자외선 영역에서 분산값이 커지는 단백질과 핵산을 개별적으로 정량화하기 위해 자외선을 광원으로 하는 정량위상현미경이 개발된 바가 있다.^[12]

3. 자외선 흡광률을 이용한 단백질과 핵산 측정

흡광 광도법(absorption spectrophotometry)은 분자가 빛을 흡수하는 정도가 빛의 파장에 따라 다르다는 것을 이용하여

REFERENCES

- [9] Zbigniew Darzynkiewicz, "Critical Aspects in Analysis of Cellular DNA Content", *Curr. Protoc. Cytom.* (2010).
- [10] W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, S. Oh, N. Lue, R. Dasari and M. S. Feld, *Nat. Methods* **4**, 717 (2007).
- [11] Y. Park, T. Yamauchi, W. Choi, R. Dasari and M. S. Feld, *Opt. Lett.* **34**, 3668 (2009).
- [12] D. Fu, W. Choi, Y. Sung, Z. Yaqoob, R. R. Dasari and M. Feld, *Biomedical Optics Express* **1**, 347 (2010).

Fig. 3. (a) Illustration of the suspended microchannel resonator. (b) Schematic of fluidics: sample is injected in parallel through the left and right inlets (IL and IR) and collected at the left and right outlets (OL and OR). While trapping, IL, IR and OL are kept at the same constant pressure; variable pressure at OR applied by a computer-controlled regulator determines the direction of fluid flow in the device. (c) The resonant frequency of the cantilever shifts from the baseline as cells pass through the channel.^[17]

용액 또는 기체에 들어있는 분자 종류를 알아보거나 그 농도를 측정하는 분석방법이다. Beer-Lambert 법칙은 분자에 흡수되는 빛의 세기가 지수적으로 감소하는 것을 표현하는데 곧 빛이 시료를 통과한 거리와, 시료 안에 있는 분자의 몰농도와, 분자의 몰당 흡광률의 곱을 지수로 하는 함수로 나타내어진다. 분자의 흡광률이 빛의 파장에 따라 달라지는 것을 이용하면 혼합물이 들어있는 시료에서 구성 성분들을 알아낼 수가 있다. 단백질과 핵산의 경우 220–280 nm 영역 자외선에서 높은 흡광률을 보이는데 단백질의 흡광률과 핵산의 흡광률의 비율이 220 nm에서는 > 100 : 1, 260 nm에서는 ~ 5 : 1, 280 nm에서는 ~ 15 : 1으로 차이가 난다. 이 흡광률의 비율을 이용하여 두 세 파장에서 측정된 시료의 흡광률로부터 단백질과 핵산의 양을 계산해낼 수 있다. 날개 세포에 적용하기 위해서는 흡광광도법을 투과현미경과 결합시켜야 하는데 자외선 광원의 파장을 조절할 수 있어야 하고, 렌즈 및 슬라이드 유리의 투과율과 카메라의 민감도가 자외선에 적절해야 한다.^[13] 자외선 흡광 현미경으로 얻어진 세포의 이미지에서는 자외선이 세포에 흡수되는 부분이 바탕보다 어둡게 나타난다. 세포의 높이가 더 높거나 단백질, 핵산이 더 높은 농도로 있는 부분이 더 어둡게 나타나는 것이다. 이러한 이미지를 두 개 이상의 파장에서 얻어

서 두 이미지에 나타난 흡광률과 그 차이로부터 단백질과 핵산의 절대량을 계산하게 된다. 이 방법은 살아있는 세포나 고정된 세포 모두에 적용이 가능한 장점이 있으나 단백질의 흡광 스펙트럼과 DNA의 흡광 스펙트럼이 아미노산 구성과 핵산 구성에 따라 조금씩 다를 뿐더러 온도와 pH에도 영향을 받기 때문에 정확한 정량화는 많은 주의를 요한다.^[14,15]

4. Suspended Microchannel Resonator를 이용한 중량 측정

앞서 방법들이 건조중량에 비례하는 광학적 성질을 측정한 것과 달리 역학적인 방법을 이용하여 세포의 부력중량(buoyant mass)을 측정하는 기술이 MIT의 Manalis 팀에 의해 개발되었다.^[16] 마이크로미터 크기의 외팔보(cantilever) 내부에 마이크로채널(microchannel)관을 만들어 세포가 외팔보를 따라 이동하게 만든 현수 마이크로 채널 공진기(Suspended microchannel resonator, SMR)가 그 기술이다. 구조물의 공진 주파수가 질량에 따라 변하는 것을 이용하여 SMR 내부를 통과하는 세포의 질량을 극히 정밀하게 측정할 수 있다. 세포가 SMR에 진입할 때에 생기는 질량의 차이를 측정하기 때문에 부력중량, 곧 총 중량에서 세포의 부피에 해당하는 물(배지 또는 완충액)의 질량을 뺀 중량이 측정된다. 부력중량은 건조중량과 일정한 관계가 있으며 밀도가 다른 두 종류의 완충액을 이용하면 세포의 부피와 총 질량, 건조중량도 구할 수 있다.^[17] 부유배양을 할 수 있는 세포나 trypsin 처리에 의해 분리된 세포들에 적용이 가능하며 microfluidics 기술을 이용하여 같은 세포를 장기간 측정하는 것도 가능하다는 것을 보였다. 현재 SMR의 정밀성을 이용한 세포의 성장률에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.^[18,19]

5. 적용과 전망

세포의 부피와 중량을 측정하는 다양한 방법이 혈액학과 세포성장 등 생물학의 다양한 분야에 적용되었다는 것을 앞서 언급하였다. 저자의 경우 위상현미경을 이용하여 성장판 연골 세포의 성장을 건조중량과 부피로써 정량화하는 연구를 시행했

REFERENCES

- [13] B. J. Zeskind *et al.*, *Nature Methods* **4**, 567 (2007).
- [14] M. J. Cavaluzzi and P. N. Borer, *Nucleic Acids Res.* **32**, e13 (2004).
- [15] I. W. Sizer and A. C. Peacock, *J. Biol. Chem.* **171**, 767 (1947).
- [16] T. P. Burg *et al.*, *Nature* **446**, 1066 (2007).
- [17] W. H. Grover, A. K. Bryan, M. Diez-Silva, S. Suresh, J. M. Higgins, S. R. Manalis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 10992 (2011).
- [18] M. Godin *et al.*, *Nat. Methods* **7**, 387 (2010).
- [19] S. Son *et al.*, *Nature Methods* **9**, 910 (2012).

Fig. 4. (A) Quantitative phase image of dissociated chondrocytes from P5 mouse tibia growth plate. (B) Scatter plot of dry mass versus volume of individual chondrocytes. Solid line is the linear regression for cells up to 1,000 fl. (C) Dry mass density versus volume plot from the same data as B. Change of dry mass density marks the three stages. (D) Cross sections from Tomographic Phase Microscopy image of stage 1 and stage 3 hypertrophic chondrocytes showing the intracellular dry mass distribution. Color bar is in g/ml. (E-F) Dry mass density vs volume of mouse metatarsal and jerboa metatarsal follow similar swelling-hypertrophy dynamics with shorter (E) and longer (F) third stages than mouse tibia.^[20]

다.^[20] 성장판의 연골 세포는 세포의 부피 성장이 뼈를 길이방향으로 성장하게 만드는 역할을 하는데 키가 전반적으로 자라는 과정을 일으킬 뿐만 아니라 신체 골격의 구조 자체, 곧 손가락뼈는 짧고 정강이뼈는 길게 되는 등을 결정하는 발생의 메커니즘에 핵심적인 역할을 한다. 그러나 이 세포의 부피 성장이 어떻게 이루어지는지에 대한 정보는 매우 부족한 상황이었다. 전자현미경으로 관찰된 바, 세포질 내에 흩어져 있는 세포소기관의 밀도가 현저히 낮아지는 것이 관찰되었고, 이로부터 성장판 연골 세포의 성장은 수분에 의한 부피 팽창이라는 가설이 제시되었다. 그러나 삼투압에 대한 반응으로부터 세포질의 수분함량을 유도하는 실험에서는 성장판 연골세포의 수분함량이 항상 일정하다는 상반되는 결과 또한 나와 있었다. 우리는 정량위상현미경을 이용하여 각 세포의 건조 중량과 부피를 구함으로써 세포의 부피 팽창이 일부 수분함량의 증가에 의해 일어난다는 것을 입증할 수 있었다. 그뿐만 아니라 세포질의 밀도를 정량적으로 측정함으로써 세포의 부피/중량 증가가 정확히 구분되는 세 단계를 거쳐 일어나는 것을 발견할 수 있었다. 이는 성장판 발달의 생리학과 세포 부피 조절 기작의 연구에 의미있는 발견이며, 물리량 측정을 통한 세포의 정량적 연구는 앞으로 많은 발견에 기여할 것으로 기대된다.

전압과 생체전기 신호

(Voltage and the Electrical Signaling in Cells)

1. 세포막 전압의 생물학적 의의

세포 내외의 구조는 비전도체인 지방막으로 형성되어 있는데

막을 중심으로 안과 밖의 이온의 종류와 농도 그리고 각 이온의 막 침투성 정도에 따라서 막의 양쪽에 전압차가 발생하게 된다. 세포는 이 전압차이를 에너지원으로 이용하여 막간의 물질을 수송하고 또 저장과 이동이 보다 용이한 에너지 매개 물질인 ATP를 만들어 대사를 조절하기도 한다. 동물 세포에서 이런 에너지 대사가 일어나는 곳은 세포소기관인 미토콘드리아인데 미토콘드리아 막은 여러 세포막 중 가장 큰 전압차(-200 mV) 가지고 있으며 세포자가사멸(apoptosis) 과정에서도 이 전압의 변화가 관여하는 것으로 알려져 있다. 신경이나 근육 세포 등의 Excitable 세포들은 세포 외막(plasma membrane) 전압의 변화를(-70 mV ~ 30 mV) 이용하여 신호를 전달한다. 고전적으로 뇌과학 분야에서는 하나 이상의 세포들의 전기적 신호를 측정하는 방법이 부재하여 대신 전기 신호 후에 2차로 발생하는 칼슘 이온의 농도를 측정해 왔다. 그러나 칼슘 신호는 반응이 느리고 뇌의 실질적 신호 전달 과정을 상세히 반영해 주지 않기 때문에 보다 나은 전기 신호 측정기술이 절실히 요구되어 왔다. 또 한편 최근 기술의 발전으로 이전에 관심을 가지지 않았던 새로운 막 전압 조절 기작이 밝혀지기도 한다. 예를 들어 박테리아와 같은 미세 막의 전압도 측정할 수 있게 되었는데 그 결과 미생물은 막전압을 주기적으로 변화시켜 불필요한 물질들을 방출하는 기작을 가지고 있다는 것이 밝혀졌다.^[21] 세포 내 모든 막구조는 안팎의 전압차를 가지고 있으므로 세포가 막전압을 이용하여 수행하는 기능들은 이제껏 밝혀진 것들보다 훨씬 많은 것으로 예상된다.

2. 전압 측정 방법

세포 전압을 측정하는 기술은 급격하게 발전하고 있으나 모든 조건을 충족시키는 범용 기술은 존재하지 않기 때문에 관찰하고자 하는 특정 막전압의 dynamic range, time scale, 세포 내 막의 위치, 관찰 시간과 관찰 범위에 따라서 각기 다른 접근법이 시도되고 있다. 세포 하나의 막전압을 단기간 동안 측정하는 경우에는 고전적인 전기생리학적 방법인 patch clamp를 이용하면 세포의 전압을 가장 정확하게 측정할 수 있을 뿐만 아니라 전압 clamp, 전류 clamp 등의 방법으로 원하는 perturbation을 줄 수 있다. 이 방법은 1970년대에 고안되어 이미 확립이 된 방법이기 때문에 이 글에서는 자세히 언급하지 않겠다. 반면에 여러 개의 세포를 동시에 관찰하여 전기 신호의 이동을 연구하거나, electrode가 물리적으로 닿기 어려운 세포 내 compartment에서의

REFERENCES

- [20] K. L. Cooper, S. Oh, Y. Sung, R. R. Dasari, M. W. Kirschner, C. J. Tabin, *Nature* **495**, 375 (2013).
- [21] J. M. Kralj, D. R. Hochbaum, A. D. Douglass and A. E. Cohen, *Science* **333**, 345 (2011).

전압, 또 앞에서 언급했듯이 patch electrode보다 크기가 작은 미생물막에서의 전압 등을 측정하기 위해서는 형광 전압 센서를 이용하여 광학적으로 접근하는 방법이 가장 각광을 받고 있다.

3. 전압에 반응하는 형광 센서

전압에 반응하는 형광 센서는 크게 두 가지 부류로 나눌 수 있다. 하나는 작은 유기 합성 분자 probe (Voltage Sensitive Dye, VSD)이고 다른 하나는 유전적인 방법으로 세포가 스스로 합성할 수 있는 단백질 probe (Genetically encodable voltage indicator, GEVI)이다. 전자는 대체로 형광의 정도가 밝고, 쓰는 방법이 간편하며, 센서의 반응 속도가 비교적 빠르다는 장점이 있는 반면에 반응도(sensitivity)가 대체로 낮고 세포막에 Capacitance loading을 심하게 일으키며 phototoxic하다는 단점들을 가지고 있다. 따라서 VSD는 일반 광학현미경을 가지고 단시간 안에 관찰할 수 있는 대상에 적용하는 용도로 적합하다. GEVI의 경우에는 probe 단백질을 만들 수 있는 DNA를 세포에 주입하여 세포가 이를 발현시키는 것이기 때문에 급속도로 발전하고 있는 분자 생물학적인 방법과 결합하여 특정시간에 특정 종류의 세포 또는 특정 연결성을 이루고 있는 세포들에만 발현을 시킬 수 있는, 시공간적 통제가 가능하다는 장점을 지닌다. 또한 VSD들에 비해 toxicity가 낮기 때문에 세포막의 성질을 덜 변형시키며 장시간 대상을 관찰을 하는 데에 유리하다. GEVI는 Optogenetic actuator들과 물리적으로 결합시켜 세포에서 발현시킬 수 있기 때문에 원하는 시스템에 대한 전광학적 제어 및 모니터링을 가능케 해 줄 수 있다는 전망을 제시한다.

4. 유기 합성 분자 센서

VSD는 작동 원리에 따라 Electrochromic dye와 FRET/Quenching dye 그리고 Photo induced transfer dye 세 종류로 나눌 수 있다. Electrochromic dye는 chromophore가 electric field와 직접 반응을 하여 특정 파장의 빛과 반응했을 때 나타나는 excited state dipole을 변화시킨다. 이때 Stark effect에 의해 흡수파장스펙트럼이 shift가 되는데 이런 특성 때문에 반응 속도는 매우 빠르지만 스펙트럼 가장자리 파장을 사용한다고 해도 sensitivity가 낮을 수밖에 없다. FRET/Quenching 방법은 막 사이로 들어가는 친유성 dye와 막 바깥에 위치하는 다른 dye 두 가지를 사용하는데 친유성 dye가 전압에 따라 막간에서 이동하여 막 바깥쪽 dye와 거리가 달라짐에 따라 각 dye의 형광의 세기가 달라지는 특성을 이용한다. 마지막 photo induced electric transfer 방법은 최근에 고안된 방법으로 dye와 quencher를 물리적으로 연결시켜 전자 전달을 통해 형광을 억제하는데 전압이 바뀌면 전자 전달이 막간 전기장으로 인해 방해받아서 형광 억

Fig. 5. Optical recording of action potentials with Arch. (Left) Cultured rat hippocampal neuron imaged via fluorescence of Arch. Scale bar is 50 μ m. (Right) Whole-field fluorescence (red) during a single-trial recording at 500 frames s^{-1} . The fluorescence was scaled to overlay on the electrical recording (blue).^[21]

제가 더 이상 일어나지 않으므로 밝은 신호가 나오게 된다.^[22] 이외에도 Quantum dot 등의 Semiconductor nanocrystal같은 비유기 소재로 다양한 VSD를 만들려는 노력들이 시도되고 있다.^[23]

5. 유전적으로 발현 가능한 단백질 센서

단백질로 발현되는 센서인 GEVI의 경우 앞에서 언급된 장점들과 무한한 활용 가능성들로 인해서 각광받고 있지만 아직 센서의 필요조건을 모두 만족시키는 GEVI의 부재로 세계 각국에서 이를 만들기 위해 치열한 경쟁을 벌이고 있다. Optogenetic actuator, ion sensor, pH sensor 같은 여러 기능성 단백질들은 지난 수십 년 사이에 비약적인 발전을 이룬 반면에 GEVI 엔지니어링은 여전히 고전을 면치 못하고 있다. 그 이유는 단백질 구조 내에 복합적 기능성이 유기적으로 얹혀있어 순차적으로 조건들을 향상시키기 어렵고 센서의 특성상 막전압을 일일이 변화시켜 테스트해야 하는 이유로 High-throughput screening을 하는 것이 불가능했기 때문이다. 최근에는 막전압이 주기적으로 변하는 인간 배양 세포가 개발되었는데 이를 이용하면 전광학적으로 빠르고 쉽게 screening을 할 수 있어 GEVI엔지니어링의 가장 큰 장애물을 극복하는데 도움이 될 것으로 보여진다.^[24]

현재 가장 각광받으며 발전, 활용되고 있는 GEVI는 Arclight이다. 이는 전압 센서 domain과 형광 기능의 domain을 결합시켜 만들어진 센서로 여타 GEVI에 비해 밝고 비교적 반응성이 좋다.^[25] 반면 단점은 반응 속도가 느리기 때문에 millisecond

REFERENCES

- [22] E. W. Miller, J. Y. Lin, E. P. Frady, P. A. Steinbach, W. B. Kristan and R. Y. Tsien, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109**, 2114 (2012).
- [23] J. D. Marshall and M. J. Schnitzer, ACS Nano **7**, 4601 (2013).
- [24] J. Park, C. A. Werley, V. Venkatachalam, J. M. Kralj, S. D. Dib-Hajj, S. G. Waxman and A. E. Cohen, PLoS ONE, **8**, e85221 (2013).
- [25] G. Cao, J. Platisa, V. A. Pieribone, D. Raccuglia, M. Kunst and M. N. Nitabach, Cell **154**, 904 (2013).

단위로 작용하는 신경생물학적 현상을 probe하기에는 불충분하다. 현재 가장 반응 속도가 빠르며 반응성 역시 높은 GEVI는 Archaelhodopsin-3 (Arch)이다. 2012년에 처음으로 도입된 Arch는 rhodopsin의 일종으로 기존의 센서 엔지니어링과 획기적으로 다른 개념으로 작동하며 sub millisecond대의 반응 속도로 뇌신경세포(neuron)의 action potential을 측정해 낸 최초의 GEVI이다.^[26] 하지만 Arch는 매우 어둡다는 단점이 있어서 high intensity laser와 감도 높은 EMCCD카메라를 이용해야 관찰이 가능하기 때문에 범용으로 쓰이지는 못하고 있다. 가장 역사가 오래된 GEVI는 VSFP 군으로 여러 색깔이 존재하며 최근에는 two-photon excitation이 가능한 버전이 개발되어 뇌처럼 불투명해서 빛의 산란이 심하게 일어나는 대상에 대해 deep tissue imaging을 할 수 있는 가능성을 제시하였다.^[27]

6. 새로운 가능성 및 향후 전망

2013년 미국 정부는 차세대 기술로 뇌과학에 집중 투자할 것이라고 발표했고 이에 따라서 뇌세포의 신호전달 체계를 이해하려는 여러 노력들이 박차를 가하고 있다. 이 글에서 소개된 광학적 접근 이외에도 전압을 측정하기 위한 새로운 시도들도 이루어지고 있다. 예를 들면 최근에는 수직 나노와이어 전극 array에 세포를 배양하여 전기적 신호를 직접 얻어내는 방법으로 여러 뇌세포에서 action potential을 동시에 측정하는 방법이 성공하여 새로운 가능성을 제시했다.^[28] 가까운 미래에는 보다 발전된 전압 측정기술을 이용하여 뇌를 구성하는 세포들의 전압 변화를 실시간으로 관찰하여 뇌의 기능적인 회로를 이해할 수 있게 될 것이다. 이중에 특히 GEVI의 지속적인 개발은 optogenetics와 함께 뇌과학의 근본이자 핵심 기술로 자리잡게 될 것으로 전망된다.

그 밖의 물리량들

앞서 소개한 물리량 외에도 세포와 생체조직의 연구에 중요한 물리량들이 많이 있다. 대표적으로 탄성, 점성, 힘 등 역학적 성질을 단일 분자, 단일 세포, 혹은 생체조직 수준에서 측정하는 것은 중요하면서도 매우 활발한 연구가 이루어지고 있는 분야이다. 세포골격(cytoskeleton)이 되는 분자들이 세포나 조직의 역학적 성질을 조절하며, 세포외기질(extracellular matrix)의 역학적 성질이 세포의 행동과 분화를 조절하기도 한다.^[29] 단일 분자 동력학의 연구는 복잡한 생체분자의 작용을 가장 근원적인 단계의 설명으로 환원하는 것을 가능하게 한다.^[30] 한편 우리 몸의 체온은 37도로 일정하게 유지되는데 이는 세포 안에서 일어나는 화학반응에서 열이 발생하기 때문이다. 장기마다 열을 발생하는 정도가 다르지만 특히 체열 발생을 위해 특화된 갈색

지방세포와 같은 경우도 있다. 결국 발열의 근원은 세포이므로 단일 세포의 온도를 측정하는 방법들이 개발되어 있다.^[31,32]

맺음말

생명체와 무생물의 놀라운 차이점들 때문에 옛 과학자들은 생명체를 구성하는 물질은 무생물을 구성하는 물질과 근본적으로 다른지를 고민했으나 과학의 발전을 통해 이제 우리는 생명체도 분자와 원자로 만들어져 있으며 동일한 물리법칙을 따른다는 것을 알게 되었다. 생명체의 생명현상은 그 구성원소가 특별하기 때문이 아니며, 무생물과 다르지 않은 원소들의 집합을 통해 창발되는 것이다. 생명현상 창발의 메커니즘을 이해하는 것은 자연과학의 목표 중의 하나이며 수학, 물리, 화학, 생물학적 원리가 겹겹이 작용하고 있는 것으로 생각된다. 물리학은 원자를, 화학은 분자를, 생물학은 세포를 설명한다는 도식에 의해 생명현상에서 물리적인 원리가 원자 혹은 분자 레벨에서 끝나고 그 상위레벨의 창발현상에는 크게 관여하지 않는 것으로 오해하는 경우가 간혹 있는데 전혀 그렇지 않으며 세포생리학, 발생생물학, 생리학에서 물리적인 원리로 일어나는 현상의 예가 많이 있다. 생리학에서는 순환계에 적용되는 유체역학이나 신장의 작용을 설명하는 삼투현상 등을 들 수 있다. 물리법칙이 생명현상을 어떻게 제어하는지에 대해서는 J. B. S. Haldane의 에세이 On being the right size (1926)이나 K. Dill, K. Ghosh, J. D. Schmit의 논문 Physical limits of cells and proteomes (2011)를 읽어보기를 추천한다. 물리적인 메커니즘에 의해 일어나는 생명현상이 있는가 하면 역으로 생물학적인 메커니즘으로 조절되는 물리량이 있다. 앞서 예시한 것과 같이 세포막전위나 세포의 질량 등 생명체의 물리량들이 생명현상에 의해 능동적으로 조절된다. 이러한 물리량들을 측정하는 새로운 테크놀로지 개발이 이를 조절하는 생물학적 메커니즘 연구를 가능하게 한다. 앞으로도 생명현상의 이해에 물리학이 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

REFERENCES

- [26] J. M. Kralj, A. D. Douglass, D. R. Hochbaum, D. Maclaurin and A. E. Cohen, Nature Methods **9**, 90 (2012).
- [27] W. Akemann, M. Sasaki, H. Mutoh, T. Imamura, N. Honkura and T. Knöpfel, Scientific Reports **3**, 2231 (2013).
- [28] J. T. Robinson, M. Jorgolli, A. K. Shalek, M.-H. Yoon, R. S. Gertner and H. Park, Nature Nanotechnology **7**, 180 (2012).
- [29] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, Science **276**, 1425 (1997).
- [30] H. Kim and T. Ha, "Single-molecule nanometry for biological physics", Reports on Progress in Physics **76** (2013).
- [31] G. Kucsko, P. C. Maurer, N. Y. Yao, M. Kubo, H. J. Noh, P. K. Lo, H. Park, M. D. Lukin, Nature **500**, 54 (2013).
- [32] J. S. Donner, S. A. Thompson, M. P. Kreuzer, G. Baffou, R. Quidant, Nano Lett. **12**, 2107 (2012).