

보도시점

배포 즉시

배포

2024.04.25.(목), 08:30

광학전자현미경 같이 쓰는 형광 프로브 개발

- 한국뇌연구원·서울대 공동팀, 국제학술지 Cell Chemical Biology 발표
- 미토콘드리아, 리소좀 등 세포소기관 네트워크의 시각화 장점

한국뇌연구원(원장 서판길)은 신경회로 연구그룹 문지영 박사팀과 이현우 서울대 화학과 교수팀이 광학현미경과 전자현미경을 융합한 이중 이미징 장비에서도 형광 능력을 잃지 않고 사용할 수 있는 프로브를 최초로 개발했다고 25일 밝혔다.

뇌연구에서는 다양한 이미징 장비 사용이 활발하며, 특히 광학현미경과 전자현미경을 동시에 활용하는 연계형 현미경법(CLEM, Correlative Light and Electron Microscopy)*은 세포의 활성 변화를 구조 변화와 연계해 볼 수 있다. 하지만 광학현미경 사용에 꼭 필요한 형광 프로브가 전자현미경의 화학고정처리 후에는 형광 능력을 잃는 단점이 있어 연구가 어려웠다.

*광학-전자 연계 현미경 기술(CLEM): 전사체, 단백질 등 분자생리학 정보를 획득할 수 있는 광학이미징 기법과 현미경 기술 중 가장 초고해상도 기법인 전자현미경 이미징을 연계하는 기술

한국뇌연구원 문지영·정민교 박사와 서울대학교 이현우 교수·Nirmali Sharma(니르말리 샤마) 박사 공동연구팀은 전자현미경 화학고정 후에도 발광능력이 보존되는 형광프로브 및 플렉스(FLEX) 염색기법을 개발하고, 세포소기관 다이내믹스 연구에 적용하여 광학-전자현미경 이중 장비의 장점을 활용한 이미징 기법을 개발하였다.

공동 연구팀은 기존의 형광프로브를 이용한 단순 염색과 달리 과산화 효소인 APEX2에 의한 근접표지법(proximity labeling)을 적용하여, 기존 염색방법보다 형광신호의 증폭이 향상된 것을 확인하였다. 특히, APEX2 효소에 의해 증폭된 FLEX 형광신호는 전자현미경에 필요한 화학고정 처리 후에도 형광이 강하게 유지되어 광학현미경과 전자현미경

에서 얻은 이미지를 왜곡 없이 오버랩하여 연계형 현미경 기술의 병목을 해결할 수 있는 가능성을 확인하였다.

또한, 공동연구팀은 이번에 개발한 플렉스 기법을 활용하여 광학-전자 연계형 이미징 기법(CLEM)으로 미토콘드리아, 리소좀 등 세포소기관 사이의 접촉과 네트워크를 시각화하는데 최적화하였다. 세포소기관의 접촉과 네트워크의 균형은 세포의 기능 유지에 중요한데, 불균형해지면 뇌질환 등 다양한 질환을 일으킬 수 있다. 연구팀은 리소좀과 미토콘드리아의 상호작용을 이중 색상(dual-color)으로 이미징 하는 기법을 최초로 사용하였는데, 이는 이번에 개발한 플렉스 기술이 세포를 2개의 색으로 촬영이 가능하다는 것을 의미한다.

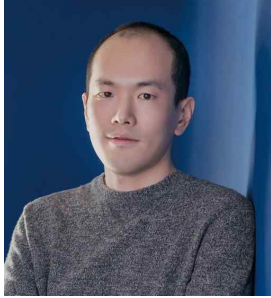
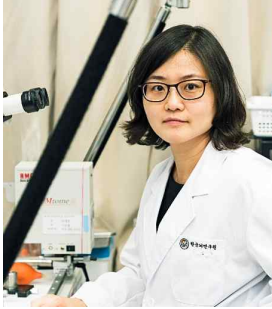
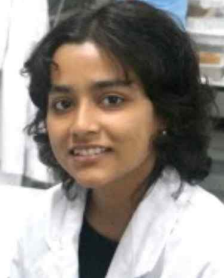
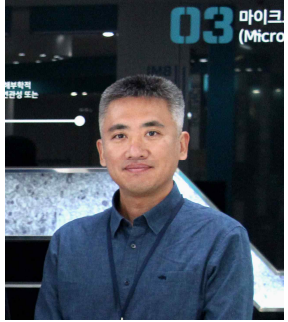
이현우 교수와 문지영 박사는 “이번에 개발한 형광프로브를 활용한 플렉스 기술을 뇌 조직에 활용하면 뇌신경회로의 활성 변화를 구조적인 변화와 연계하여 증명할 수 있을 것”이라면서, “특히, APEX2 효소는 유전자를 조작해 세포의 특정 위치에 발현할 수 있기 때문에 앞으로 의생물학 연구에 폭넓게 활용될 것”이라고 말했다.

이번 연구는 서울대학교 Nirmali Sharma 박사와 한국뇌연구원 정민교 박사가 제1저자로 참여했으며, 국제학술지인 ‘Cell Chemical Biology (IF:8.6)’ 최신호에 게재되었다.

- * (논문명) FLEX: 엔지니어링된 과산화효소를 사용하여 유전자 인코딩 가능한 효소 형광 신호 증폭 (원제: FLEX: genetically encodable enzymatic fluorescence signal amplification using engineered peroxidase)
- * (저자) Nirmali Sharma(제1저자), 정민교(공동1저자), Pratyush Kumar Mishra, 문지영(공동교신저자), 이현우(공동교신저자)

붙임1

연구팀 사진

			
<p>서울대학교 이현우 교수</p>	<p>한국뇌연구원 문지영 책임연구원</p>	<p>서울대학교 Nirmali Shrma 박사</p>	<p>한국뇌연구원 정민교 연구원</p>

1. 연구의 주요 내용

□ 논문명, 저자정보

논문명	FLEX: genetically encodable enzymatic fluorescence signal amplification using engineered peroxidase
저널명	Cell Chemical Biology
저자정보	Nirmali Sharma(제1저자), 정민교 (공동1저자), Pratyush Kumar Mishra, 문지영 (공동교신저자), 이현우 (공동 교신저자)

□ 논문의 주요 내용

1. 연구 배경

- 최근 다양한 이미징 융합기술의 등장과 성숙은 신경생물학을 비롯하여 다양한 세포 생물학 분야에서 매우 중요한 연구성장을 이끌 수 있음. 이 중 광학현미경과 전자현미경의 장점을 동시에 활용하기 위한 현미경 기법인 연계형 현미경법* (CLEM, Correlative Light and Electron Microscopy)은 세포의 활성변화를 구조적인 변화와 연계하여 증명할 수 있는 궁극적인 현미경 기술로, 국내 뇌연구를 비롯한 세포 생물학 발전을 위하여 필수적인 원천기술임. 이중 장비의 장점을 동시에 활용할 수 있어 그 수요가 급증하고 있지만, 기존의 형광프로브가 전자현미경 샘플 제작 후 형광을 잃는 큰 단점이 존재하였음. 서울대학교 (Nirmali Sharma 박사, 이현우교수)- 한국뇌연구원 (정민교 박사, 문지영 책임연구원) 공동연구팀에서는 샘플 제작 후에도 형광 발광능력이 보존되는 프로브를 개발하였고, 개발된 프로브를 다양한 CLEM기법에 적용해 미토콘드리아, 리소좀과 같은 세포 내 소기관 구조 변화와 그들의 상호작용의 변화를 관찰할 수 있는 기법을 개발하였음.

*광학-전자 연계 현미경 기술 (CLEM)은 전자체, 단백질 등 분자생리학 정보를 획득할 수 있는 광학이미징 기법과, 현미경 기술 중 가장 초고해상도 기법인 전자현미경 이미징을 연계하는 기술

2. 연구 내용

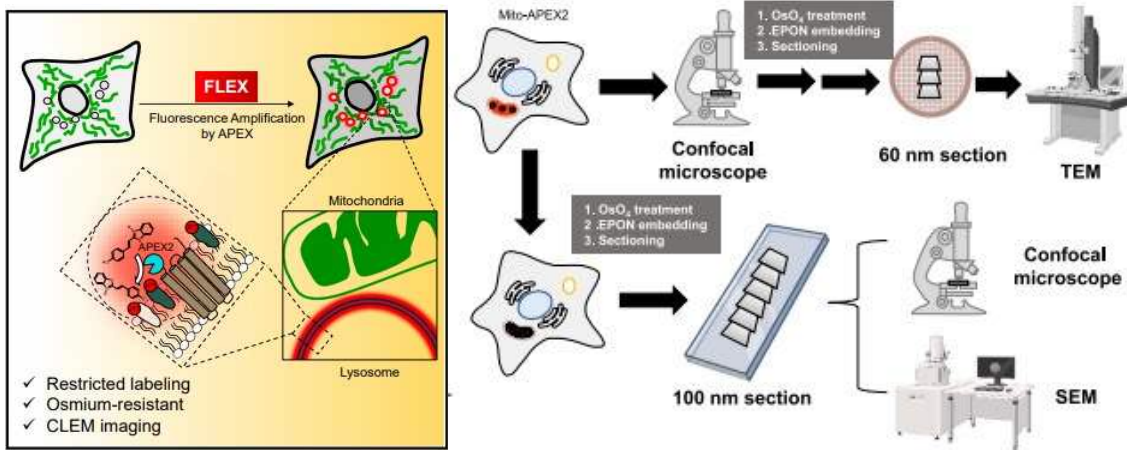
- 전자현미경 화학고정 이후에도 형광 발광능력을 유지할 수 있는 형광프로브 (JF Probe)를 개발하고 이를 세포 내 미토콘드리아, 리소좀 등 세포소기관의 다이내믹스를 연구하는데 적용하여 광학-전자현미경 이중의 장비를 동시에 사용하여 두 장비의 장점을 모두 살릴 수 있었음.
- FLEX 염색 기법은 기존의 형광프로브를 이용한 단순염색과 달리 과산화효소인 APEX2에 의한 근접 표지방법*과 결합하여 기존의 염색과 비교해 향상된 형광 신호 증폭을 보였음
 - * 근접표지 방법 - 생명분자들이 모여있는 특정한 세포 내부의 특정 공간에서 마치 스프레이를 뿌리듯이 단백질 표면작용기에 바이오틴 (biotin)을 무작위적으로 달아주는 근접분자 표지기술(proximity labeling)은 약 10년전에 개발되어 현재 단백질체 지도를 구축하는데 중요한 역할을 하고 있는데, 이번 연구에서는 이 원리를 CLEM (광학-전자 연계형 현미경 이미징 기법)에 활용할 수 있는 프로브와 결합하였다는 점에서 그 우수성이 있음
- APEX2에 의한 증폭된 FLEX 형광 신호는 오스뮴 (전자현미경용 고정액) 및 유기용매 처리 후에도 강하게 유지되기 때문에 이미지의 왜곡 없이 이중의 장비에서 얻은 이미지를 오버랩할 수 있음
- 개발된 FLEX 기법은 광학현미경에서 2개의 색으로 촬영이 가능한 장점이 있어 활용도가 넓음
- 연구팀은 FLEX를 활용하여 미토콘드리아, 리소좀 등 세포소기관끼리의 접촉과 네트워크*를 시각화하는데 최적화 하였음

* 세포소기관 접촉 (contact), 네트워크 (network)의 균형은 세포의 기능을 유지하는데 중요하기 때문에 그 불균형은 뇌질환 등 다양한 질환을 유발 할 수 있음

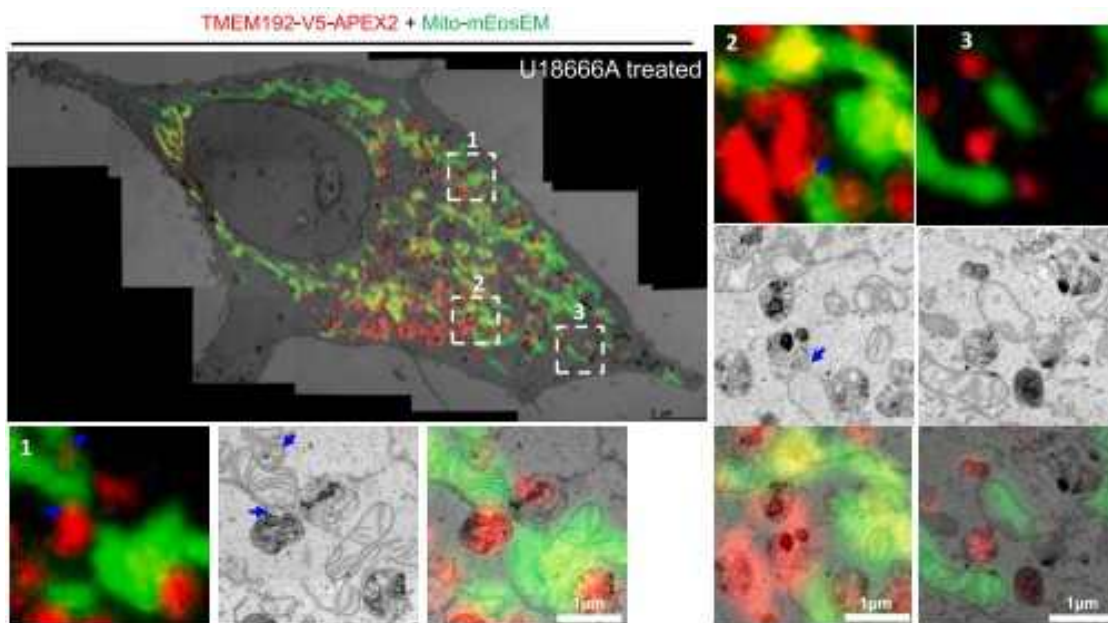
3. 연구 성과 및 기대효과

- 서로 다른 장비에서 얻은 이미지를 동시에 활용하려면 각 장비에서 얻은 정보의 왜곡 현상을 최소화하는 등 CLEM 기술의 한계를 극복해야 함. 본 연구에서는 이중장비에서 모두 사용가능한 프로브 개발을 통해 연계형 현미경법의 병목을 해결할 수 있는 가능성을 보여줌
- 본 프로브를 활용한 CLEM 기술을 뇌 조직에 활용할 수 있다면 뇌신경회로의 활성 변화를 구조적인 변화와 연계하여 증명할 수 있는 궁극적인 현미경 기술로 발전시킬 수 있을 것임
- 본 논문에서는 서로 다른 세포 소기관인 리소좀과 미토콘드리아의 커뮤니케이션을 녹색 형광의 mito-mEosEM 형광 단백질과 리소좀-APEX로 증폭된 적색 형광의 FLEX 프로브로 시각화하여 dual-color CLEM 이미징하는 기법을 처음으로 소개하였음
- 본 FLEX 기법에 사용되는 APEX2는 유전자조작이 가능하며, 세포의 어떤 특정 공간에 발현시킬 수 있도록 디자인이 가능하기 때문에 광범위한 의생물학연구에 활용 할 수 있음

2. 연구내용 그림 설명



FLEX는 전자현미경 시약에도 형광을 잃지 않은 형광 프로브 신호 증폭 기술로 새로운 광학-전자 연계형 이미징 (CLEM) 기법에 이용될 수 있음. 오른쪽은 광학 전자 연계형 기법의 순서



FLEX 를 활용한 광학-전자 연계형 이미징 (CLEM) 기법으로 미토콘드리아-리소좀의 컨택*을 연구한 사례 *미토콘드리아-리소좀의 컨택 - 미토콘드리아-리소좀 접촉은 콜레스테롤 이동과 에너지 생산에 영향을 미쳐 세포 기능에 중요한 역할