

생물학분야에서 Cryo-electron Tomography 활용기법

문 지 영[†], 이 경 은[†], 한 성 식*

고려대학교 생명과학대학 생명공학원 세포 및 생체 3차 구조 연구실

Techniques for Cryo-electron Tomography in Biological Field

Ji Young Mun[†], Kyung Eun Lee[†] and Sung Sik Han*

Laboratory of Cell Engineering & 3-D Structure, Graduate School of Life Sciences and Biotechnology,
Korea University, Seoul 136-701, Korea

(Received April 15, 2008; Accepted June 18, 2008)

ABSTRACT

In Biology, Studies Using Electron Microscopy for making Cell Structure to 3D reconstruction very fast development. Recently, by using Cryo fixation, we can see cell 3D structure without structural change, instead of using chemical fixation which can change cell structure. Before using this technology, we could understand cell structures only in 2D images. But now, through cryo-ET, 3D reconstruction of cell structure without artificial structure changes can be possible and this technology will give us many advantages in Drug delivery and Nanotechnology.

Keywords : Electron tomography, CEMOVIS, 3D reconstruction

현재 전자현미경을 이용한 생물학 연구에 있어서 세포 미 세구조의 3차 구조 구현과 거대분자(macromolecules) 구조 구현은 매우 빠른 속도로 발전하고 있다. 특히 새로운 기기의 개발에 의한 동결 기술의 향상으로 시료 처리 방법이 개선되고, 컴퓨터 기술의 도입에 의해 electron crystallography, helical reconstruction, single particle methods, electron tomography 등의 3차원 복원 방법이 개발되면서 생물학 분야의 전자현미경은 놀라운 발전을 하였다. 이 중 electron tomography (ET) 방법은 관찰 대상을 자르지 않고 그것의 단면도를 얻어내는 imaging 기술로, 그 응용 범위는 전공 분야의 제약 없이 다양하다. 특히 생명과학 분야에서는 세포나 조직의 특정 소기관의 구조 분석, 세포 간 상호 관계 혹은 생리 기작 연구에 적극 활용되고 있다. 또한 이 방법은 시편의 표 면적, 체적 등의 정량 분석에도 이용이 가능하며, 면역전자 현미경법 (immuno electron microscopy)과 연계하여 특정 단

백질의 세포 내 분포 양상 혹은 이동 경로 추적에도 이용될 수 있다. 그 결과 인위적 구조 변형이 없는 세포 구조의 3차 원 구축이 가능해졌으며, 더 나아가 단백질, 바이러스 구조의 3차 구조 구현이 가능하게 되어 고부가성 신약이나 치료 제 개발 등에 필요한 가상 실험에 활용할 수 있게 되었다.

본 논문에서는 cryo-ET에 대한 기본적인 원리와 실험 과 정을 간략하게 설명하고자 한다.

Electron tomography 접근법

TEM을 이용해서 세포의 3차 구조를 구축하기 위한 elec tron tomography 접근법은 시료를 만드는 방법에 따라 네가 지 방법으로 나누어볼 수 있다.

첫째, 일반적인 화학 고정 후 탈수과정을 거쳐 plastic에

[†]Theses authors contributed equally to this work.

* Correspondence should be addressed to Sung Sik Han, Ph. D., Cell Engineering & 3-D structure Laboratory, Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea. Ph.: (02) 3290-3424, Fax: (02) 3290-3924, E-mail: sshan@korea.ac.kr

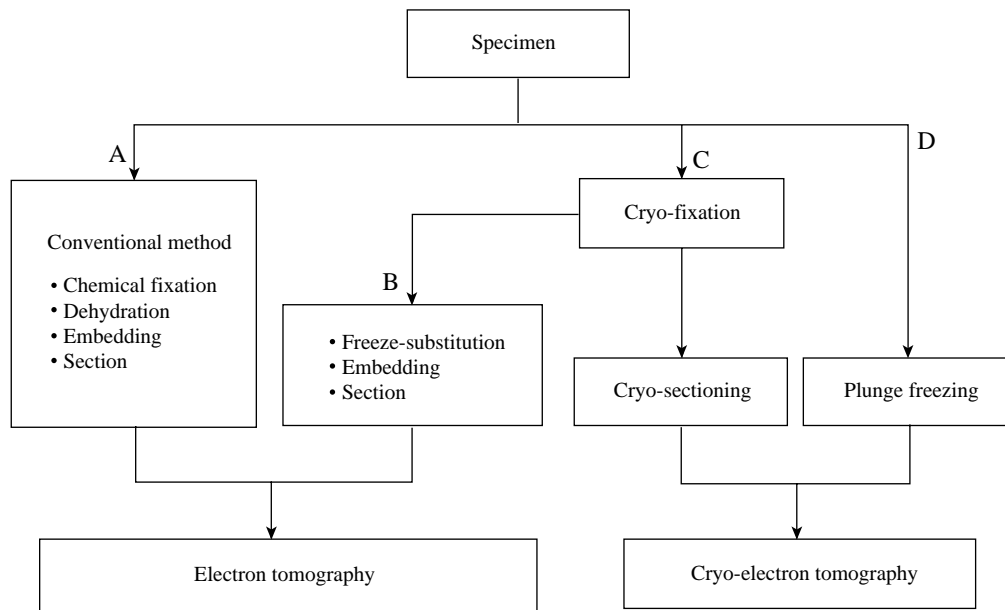


Fig. 1. Electron tomography approach by various sample preparations (Lee & Han, 2007).

embedding하여 절편을 제작한다. 이 방법은 화학 고정이 시료의 구조를 변형시킬 가능성이 있으므로 최근에는 특수한 경우를 제외하고는 이용되지 않는다(Fig. 1A). 둘째, cryo-fixation한 시료를 freeze-substitution과정을 거쳐 plastic에 embedding한 후 절편을 제작한다(Fig. 1B). (Duman et al., 2002). 셋째, cryo-fixation 된 시료를 cryo-ultramicrotome을 이용해 동결된 채로 section 하여 동결된 그대로 cryo-TEM을 통하여 관찰한다(CEMOVIS)(Fig. 1C) (Al-Amoudia et al., 2004). 마지막으로 protein complex나 virus와 같은 macromolecule, 작은 단일 세포, 그리고 분리된 세포 소기관처럼 TEM 내에서 그대로 시료 관찰이 가능한 경우 plunge freezing과 같은 방법으로 동결 고정을 한 후, 바로 cryo-TEM을 이용하여 얻은 영상으로부터 3차 구조를 구할 수 있다(Fig. 1D) (Nicastro et al., 2005).

시료 제작 방법

1. 동결 고정의 필요성

일반적 시료 제작 과정 중 화학적 고정과 탈수 과정은 세포의 구조를 매우 심각하게 훼손시킨다. McDonald의 실험은, *C. elegans*의 경우 일반적으로 사용하는 고정액 속에서 2시간이 지나도 운동하고 있는 것을 보여주었다(McDonald, 2005). 이는 화학적으로 고정하는 일반적 고정 방법이 우리가 보고자 하는 상태를 고정시켜주는 것이 아니라 세포나 조직이 고정액에 의해 서서히 죽어가면서 고정되는

것을 보여주는 단편적인 예이다. 다음의 도식에서 동결 고정을 이용한 다양한 실험의 종류를 보여주고 있다.

2. 세포나 조직의 electron tomography를 위한 시료 제작 방법

1) Cryo-fixation

시료의 동결에서 가장 핵심적인 목표는 세포를 무결정 얼음 상태(amorphous 혹은 vitreous ice)로 만드는 것이다. 동결 과정에서 동결 온도가 높거나 속도가 늦으면 얼음 결정(ice crystal)이 생겨나고, 이들이 구조를 손상시키게 되므로 시료는 얼음 결정 없이 고정되어야 한다(Kellenberger, 1987). 이를 위하여 고안된 동결 고정의 방법은 1) plunge freezing, 2) slam freezing, 3) propane jet freezing, 4) high pressure freezing이 있다(Robards & Wilson, 1997). 이러한 방법들은 시료에 따라 적절히 선택되어 사용되어야 하는데, 각각의 방법은 동결 고정 시 얼음 결정의 손상이 없이 구조가 유지되는 유효 두께에 차이를 갖는다. Plunge freezing은 coolant라고 부르는 냉매에 재료를 직접 신속하게 담그는 방법으로, 쉽게 장치를 제작하여 사용할 수 있다. Slam freezing은 oxygen free copper를 냉각시켜 그 표면에 생물 시료를 급속히 접촉시켜 동결시키는 방법으로, plunge freezing시 필연적으로 생겨나는 gas 층에 의한 동결 속도의 지연 문제를 막을 수 있다. 이 방법의 동결 속도는 $>10^6$ °C/sec로서, 냉각된 구리판에서부터 $\sim 10\mu\text{m}$ 정도의 무결정 동결을 기대할 수 있다. Propane jet freezing은 구리판(disk) 사이에 생물 시료를 넣어 액화시킨 propane을 양쪽에서 분

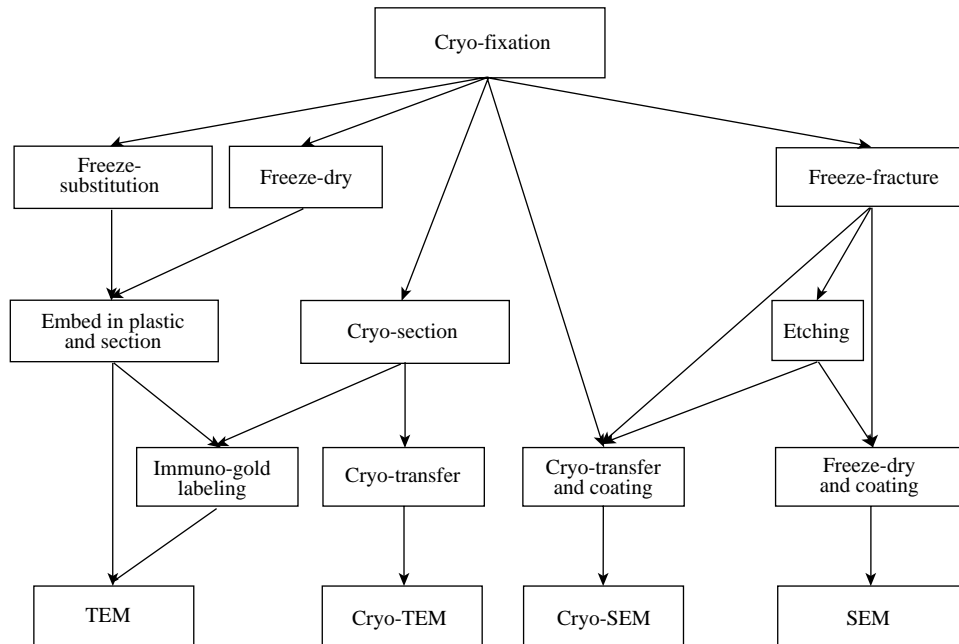


Fig. 2. Applications of freeze fixation (Lee & Han, 2007).

사시커 동결시키는 방법이다. 이 경우 유효한 동결 고정의 두께는 40 μm 정도이다. 현재까지 개발된 동결 기술들 중에서 가장 두꺼운 유효 두께를 갖는 방법은 high-pressure freezing 법이다. 이 경우 2,100 bar 이상의 고압 상태에서 liquid nitrogen을 냉매로 이용하여 얼리는 방법으로서 100 ~ 300 μm 의 두께를 기대할 수 있다. Fig. 3은 위에 소개한 방법 중 plunge freezing 방법과 propane jet freezing 방법을 이용하여 *C. elegans* 근육세포를 동결 고정한 결과이다. *C. elegans*의 근육세포의 경우, 압력과 프로판 가스를 이용하여 시료를 냉각한 경우, 결빙이 없는 얼음이 형성됨을 알 수 있다.

위의 방법들을 이용하여 보다 효과적인 동결 고정을 하기 위하여 고려해야 할 점을 몇 가지 기술하면 다음과 같다.

(1) Specimen carrier

carrier는 시료를 동결할 때 사용하는 accessory로서 그 재질과 디자인이 열전도 능력에 중요한 역할을 한다(Ding et al., 1991). 현재 상업적으로 판매되고 있는 carrier의 종류는 cup-shape carrier, tube-shape carrier, live cell carrier, freeze-fracture를 위한 specialty carrier 등이 있으며 그 재료는 열전도가 빠른 copper, aluminum이 일반적이다. Gold도 열전도율이 좋아 carrier로 쓰일 수 있지만, 가격이 높아 보편적으로 사용하기 어렵다. Sapphire는 배양된 세포를 그대로 동결할 수 있고 열전도가 copper나 aluminum에 비하여 두 배 높은 장점이 있다(Reipert et al., 2004).

(2) Filler

Ice damage 없이 동결 고정하기 위해서는 specimen carrier에 시료를 넣고 남은 공간을 채우는 것이 중요하다. Filler는 열전달 능력이 좋고 시료에 영향을 주지 않아야 하며, cryoprotectant의 특성을 가져야 한다. 이는 시료를 투과할 수 있는 것과 투과할 수 없는 것으로 나눌 수 있는데, 전자의 종류로는 glycerol (5 ~ 15%), methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, 후자의 종류로는 1-hexadecene, yeast paste, Escherichia coli paste, cold water fish gelatin, sucrose, serum albumin, dextran, ficoll 등이 있다. Fig. 4는 dextran과 hexadecene을 filler로 사용하여 *C. elegans*의 근육세포를 고정한 결과이다.

2) Post-freezing Processing

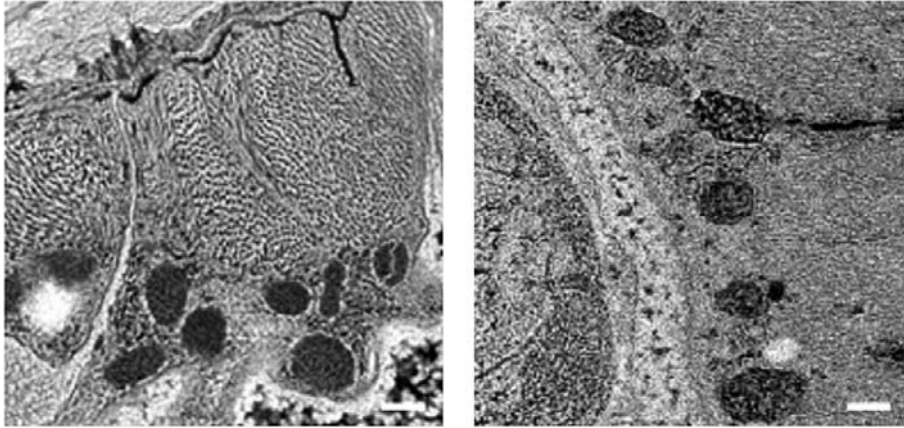
(1) Freeze-substitution

이 과정은 동결 고정 방법에 의해 물리적으로 고정된 상태의 시료를 상온에서 작업할 수 있게 탈수하는 과정이다(Hess, 2003). 즉, 동결 상태에서 유기용매의 강력한 탈수 능력을 이용하여 수분이 제거되면서 상온으로 올라온다. 이 과정이 끝나면 시료는 상온에서 무수 acetone으로 2~3차례 세척한 후 resin polymerization을 하여 section을 하게 된다. 이 과정에서 hexagonal이나 cuboidal ice가 인위적으로 형성되지 않은 좋은 결과를 얻기 위해서는 다음과 같은 요소를 주의해야 한다.

① 동결 치환 용액

치환을 위한 유기용매를 선택하기 위해서는 고정액의 중

Plunge freezing method



Jet freezing method

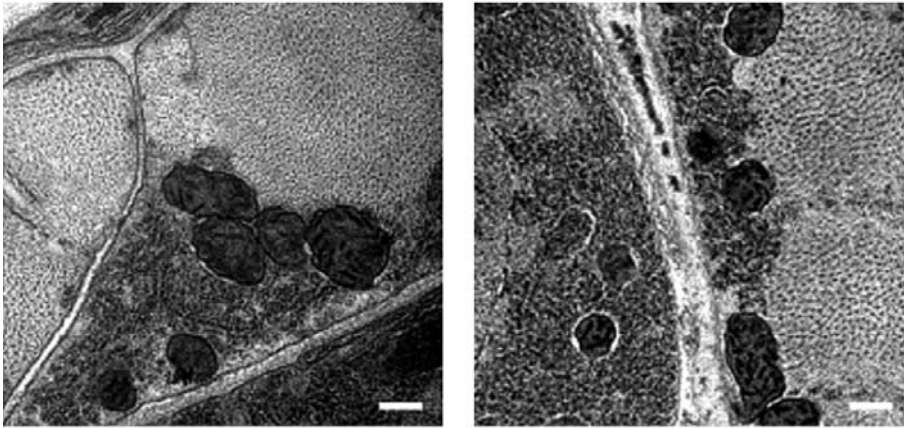
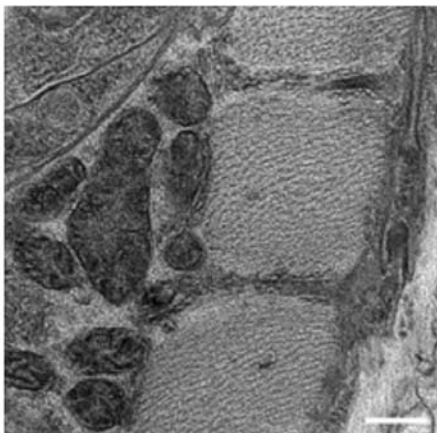


Fig. 3. Examples of freezing fixation. Size bars. 0.2 μm .

Dextran



Hexadecene

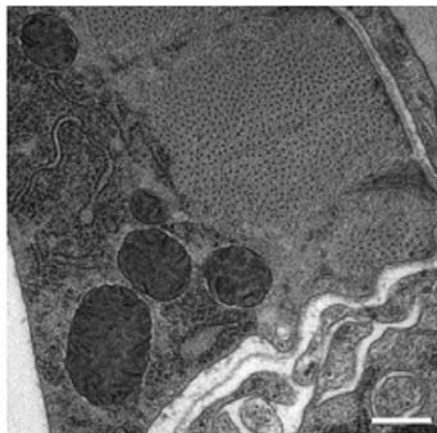


Fig. 4. Applications of filler during freezing fixation. Size bars, 0.2 μm .

류, 고정액의 농도, 그리고 첨가제를 결정해야한다. 형태의 관찰을 위해서 아세톤 용액에 1% osmium tetroxide를 녹여

사용하는 것을 보통으로 하는데, 고정액의 농도를 높이거나 0.1% uranyl acetate를 첨가하면 contrast가 향상되는 효과를

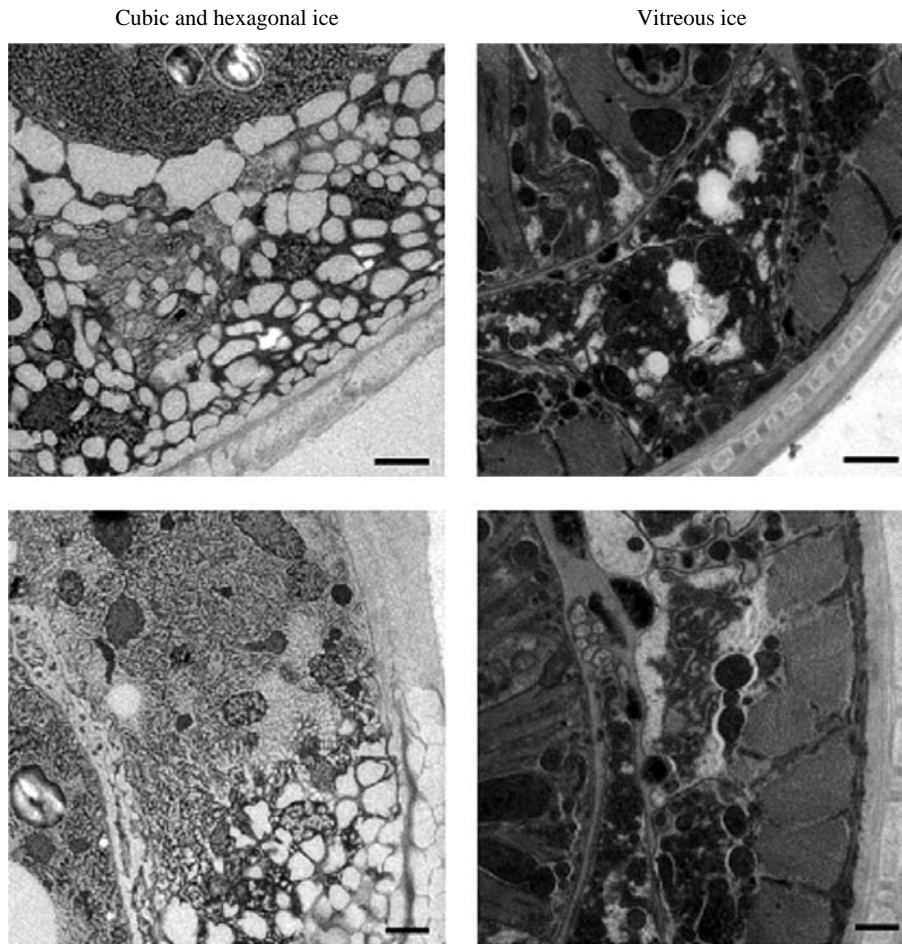


Fig. 5. Ice crystallization for freeze substitution. Size bars, 1 μ m.

볼 수 있다. 또 유기용매의 종류를 바꾸어 침투의 속도를 조절할 수도 있다. 참고로 acetone은 -30° 이상의 온도에서, 2% glutaraldehyde는 -50° , 3% glutaraldehyde는 -45° 이상의 온도에서 침투가 용이하다. Fig. 5에서 온도 조절이 잘 되지 않아 ice growth가 일어난 시료와 freeze substitution이 잘 되어 ice damage가 없는 시료의 영상을 비교하였다.

② 시간과 온도

대부분의 protocol에서 사용하는 freeze-substitution 온도는 -80° ~ -90° C이지만, 시간은 수시간에서 1주일까지 다양하고, 온도를 올리는 속도도 다양하다. 대부분의 연구자들은 -90° C에 8~72 시간, 그리고 온도를 올리는 속도는 6~24시간을 기준으로 시료에 따라 시간을 조절한다. 이 다양한 protocol은 University of California Electron Microscope Laboratory Web site에서 찾아볼 수 있다(<http://emlab.berkeley.edu/EML/protocols.php>).

③ 포매

일반적인 구조에 대한 electron tomography를 위해서는

주로 spurr, epon 등의 포매제가 사용되는데 반하여, immuno-gold labeling과 같이 특별한 목적을 위한 경우에는 low temperature embedding media를 이용하여 낮은 온도에서 UV로 polymerization 하는 것이 antibody가 결합하는 antigen을 보호할 수 있어 좋은 결과를 가져올 수 있다 (Monaghan et al., 1998).

(2) Section

Electron tomography를 위한 이미지를 획득하기 위해서는 단일 축을 기준으로 시편을 기울여 연속적으로 촬영하는 방법이 수행된다. 이 촬영에는 코사인 법칙이 이용되어 60° 각도로 기울인 이미지는 실제 두께의 2배만큼, 70° 의 경우에는 세배만큼 두껍게 된다. 따라서 절편의 두께를 결정하는 것이 중요한데, 이는 이용할 TEM의 가용 voltage, 생물 시료의 density, 연구 대상의 배율 등을 고려하여 결정하여야 한다. 이러한 이유로 중간전압 투과전자현미경 (200~400 kV, IVEM)과 초고압 투과전자현미경 (1.0~3.0 MV, UHV-EM) 또는 에너지 여과 현미경의 이용이 불가피하다.

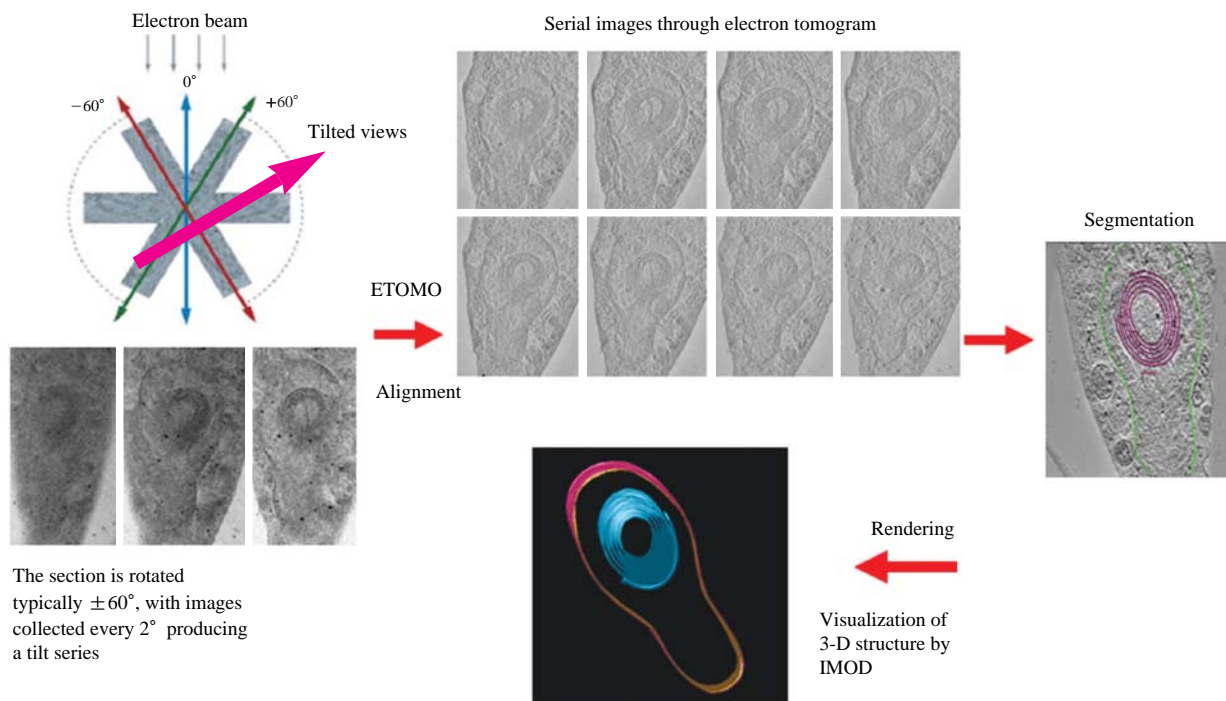


Fig. 6. Example of 3D reconstruction by electron tomography (Mitochondria in muscle cell of *C. elegans*).

(3) CEMOVIS (Cryo-electron microscopy of vitreous ice sections)

이 방법은 동결 고정된 시료를 동결된 상태 그대로 section하는 방법을 말한다(Al-Amoudia et al., 2004). 이 상태의 시료는 탈수 과정을 전혀 거치지 않게 되므로 수화된 상태의 시료를 관찰할 수 있게 된다. 일반적으로 이 방법은 high pressure freezer로 동결한 시료를 액체 질소에 담근 채로 cryo-ultramicrotome을 이용하여 cryo-section을 하는 과정을 거친다. 이 section은 액체 질소로써 저온으로 유지되는 장치를 통해 cryo-TEM으로 직접 관찰할 수 있다.

3. 거대분자의 electron tomography를 위한 시료 제작 방법

단백질 복합체나 바이러스 같은 macromolecule들의 동결 고정 방법은 수용액 채로 얇게 얼리고 그대로 관찰해야 하기 때문에, 세포의 동결과는 달리 제한적으로 사용된다. Plunge freezing이 주로 적용되고 있으며, 냉매로서는 액화 propane, ethane, 혹은 이 두 가지 혼합액을 사용한다. 이 때 단백질이나 virus의 양은 크기나 성질에 따라서 조금씩 달라질 수 있으나, $1 \sim 2 \text{ mg/mL}$ 이상에서 실험하는 것이 적절하다. 작은 구멍이 형성되어 있는 holey grid 위에 동결 시키고자 하는 용액을 올린 후, filter paper로 잉여 용액을 제거하여 grid의 hole안에 얇은 수막을 형성시킨다. Cryo-TEM은 동결 상태로 시료를 관찰할 수 있도록 온도를 liquid nitrogen 혹은 liquid helium으로 저온으로 유지할 수 있는

장비로서 동결된 시료는 이 장비에 의해 직접 관찰이 가능하다. 이 방법은 수용액 상태에서 macromolecule의 구조를 그대로 보여줄 수 있기 때문에, 지능형 약물 전달 시스템(DDS, Drug Delivery System)이나 화장품 산업의 영양분 전달체의 구조분석에 필수적이다(Almgren et al., 2000).

Data collection과 electron tomography

최근 CCD camera의 이용, 영상 처리 기법의 발달, data 획득의 자동화가 가능하게 되면서, 더욱 정밀한 3차원 구조의 구현이 가능하게 되었다. 이미지는 보통 70° 각도 이내에서 수집이 가능하지만, 현재는 기울기 각도 90° 까지 가능한 홀더가 개발되어 사용되고 있다. 연속된 기울기에 따라 촬영한 이미지는 표지 정렬과 무표지 정렬 두가지 방법으로 정렬할 수 있다. 상용화된 많은 소프트웨어가 표지 정렬 방법을 이용하고 있으며 표지는 금 입자를 주로 이용한다. 한 축을 기준으로 정렬된 이미지는 3차원 구조로 복원되기 위한 과정을 거친다. 보통 복원 방식은 back-projection 방법을 이용하는데, 각 projection으로부터 Fourier 변환에 의해 이루어진다(Lucic et al., 2005). 3차원 구조의 재구성은 구조의 양적 측정, 다른 구조와의 연결 구조를 밝히는데 중요한 역할을 한다. Fig. 6에서 tilt에 의하여 얻은 영상을 3차원 구조로 재구성하는 과정을 설명하였다.

Reconstruction data의 visualization

가장 일반적인 방식은 제1의 사진에서 구조가 trace된 후 제2의 연속 사진에 중첩되어 이전의 절편 표면을 입력시키는 surface rendering 방식이다. 이 표면들은 계속 연결되어 지형도와 같은 양상으로 재구성된다. 또 다른 방식은 voxel에서 그 밀도를 부피로 표현하여 보여주는 volume-rendering 방식이다. 현대 그래픽 기술의 발달은 3차원 영상을 만드는 데 소요되는 시간을 단축시키는 역할을 하고 있다.

Image processing

Cryo-ET에서는 고정이나 염색을 위한 화학 제제를 사용하지 않기 때문에 시료의 변형은 없으나, 획득된 영상에서의 signal to noise가 매우 낮아 reconstruction된 구조의 해상도에 한계를 갖게 된다. 특히 macromolecule의 경우 수 nm 해상도에서 그 구조를 명확히 판별해 내기 어려우며, 세포 내에서도 유사한 배경으로부터 얻어진 구조일 경우에는 더욱 그러할 것이다. 이를 해결하기 위한 노력으로 signal-to-Noise Ratio (SNR)를 향상시키는 영상처리 방법이나 고해상도의 단백질 구조를 template로 이용하여 세포 내 존재하는 macromolecules을 찾아내는 방법들이 도입되고 있다 (Bohm et al., 2000).

지금까지는 간단한 단편적인 2-D image로만 세포의 구조, 그리고 기능을 이해해왔다. 그러나 새로운 기술의 도입을 통해 삼차원 구조 구현이 가능해지면서 mitochondria와 Golgi complex의 구조의 예처럼 이전에 밝혀지지 못했던 구조가 밝혀지고 있다. 앞으로도 cryo-electron tomography 기법의 발달은 생물물리학적 지식과 기계적, 전자적, 그리고 컴퓨터공학의 발전이 어우러져 생명공학 (BT), 나노공학 (NT), 정보공학 (IT), 더 나아가 나노-바이오-정보가 접목된 융합 학문 발전에 이바지 할 것이다.

참 고 문 헌

Al-Amoudia A, Norlenb LPO, Dubochet J: Cryo-electron microscopy of vitreous sections of native biological cells and tissues. *J Struct Biol* 148 : 131-135, 2004.
 Almgren M, Edwards K, Karlsson Gr: Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 174 : 3-21, 2000.

Bohm J, Frangakis AS, Hegerl R, Nickell S, Typke D, Baumeister W: Toward detecting and identifying macromolecules in a cellular context: Template matching applied to electron tomograms. *PNAS* 97 : 14245-14250, 2000.
 Ding B, Turgeon R, Parthasarathy MV: Routine cryofixation of plant tissue by propane jet freezing for freeze substitution. *J Electron Microscop Tech* 19 : 107-117, 1991.
 Duman JG, Pathak NJ, Ladinsky MS, McDonald KL, Forte JG: Three-dimensional reconstruction of cytoplasmic membrane networks in parietal cells. *J Cell Sci* 115 : 1251-1258, 2002.
 Hess MW: Of plants and other pets: practical aspects of freeze-substitution and resin embedding. *J Microsc* 212 : 44-52, 2003.
 Kellenberger E: The response of biological macromolecules and supramolecular structures to physics of specimen cryopreparation. In: Steinbrecht RA, Zeirold K, ed, *Cryotechniques in biological electron microscopy*. pp. 35-63, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1987.
 Lee KE, Han SS: Cryo-elctron tomography. *Mol Cell Biol news* 19 : 26-35, 2007.
 Lucic V, Forster F, Baumeister W: Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annu Rev Biochem* 74 : 833-865, 2005.
 McDonald K: New developments and applications of high pressure freezing. *Microsc Microanal* 11 : 1092-1093, 2005.
 Monaghan P, Perusinghe N, Muller M: High-pressure freezing for immunocytochemistry. *J Microsc* 192 : 248-258, 1998.
 Nicastro D, McIntosh R, Baumeister W: 3D structure of eukaryotic flagella in a quiescent state revealed by cryo-electron tomography. *PNAS* 102 : 15889-15894, 2005.
 Reipert S, Fischer I, Wiche G: High-pressure freezing of epithelial cells on sapphire coverslips. *J Microsc* 21 : 81-85, 2004.
 Robards AW, Wilson AJ: Low-temperature Methods for TEM and SEM. In: Robards AW, Wilson AJ, eds, *Procedures in electron microscopy*, pp. 16:11.11-16:18.18, John Wiley & Sons, New York, 1997.

< 국문 초록 >

현재 생물학 분야에서 세포 구조를 3차로 구현하기 위해 전자 현미경을 이용하는 연구는 매우 빠르게 발전하고 있다. 최근에는 시료의 구조를 변형시키는 화학 고정법 대신 시료를 빠른 시간 내에 동결고정시킴으로써 구조 변형 없이 세포 3차 구조 구현이 가능해졌다. 이러한 기술의 도입으로 단편이미지로만 세포 구조를 이해해왔던 지금까지와 달리 Cryo-ET를 통해 인위적인 구조 변형 없는 3차 구조 구현이 가능해졌고, 이 기법은 약물전달, 나노 공학 등 여러 학문 분야에 활용됨으로써 학문 발전에 이바지 할 것이다.