

KC30사업 1차년도 보고서

KAIST 총장 귀하

본 보고서를 KAIST Grand Challenge 30 Project “Tau를 어떻게 볼 것인가 (Challenge in Seeing Tau)” 과제의 보고서로 제출합니다.

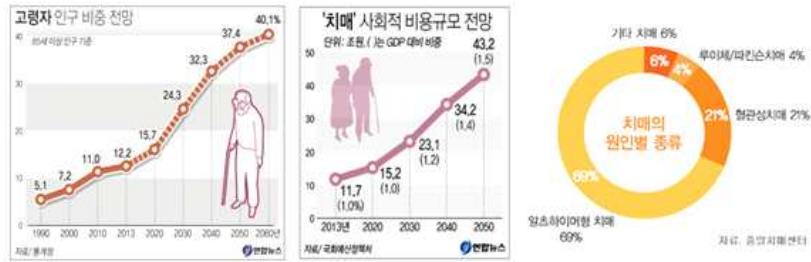
2016. 12. 30

소 속 부 서 : 바이오및뇌공학과

연구 책임자 : 최 명 철

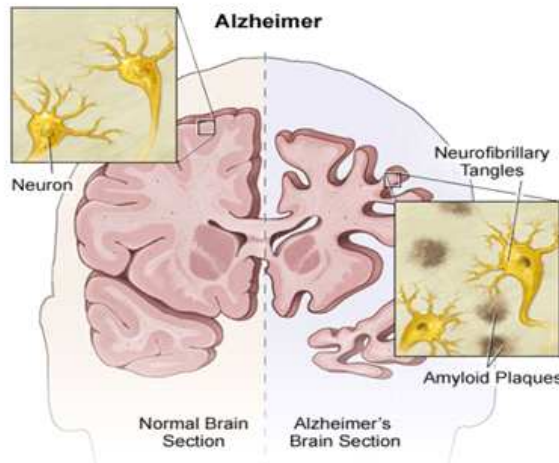
1. 연구의 필요성

범세계적인 고령화 현상이 이어짐에 따라 치매로 인한 사회적 비용이 천문학적으로 증가하고 있다. 2013년 12.2%인 65세 이상 인구 비중은 2050년에는 40%에 육박할 예정이다. 국회 예산 정책처(2014)에서는 노인 인구의 비중이 늘어남에 따라 치매로 인한 사회적 비용 역시 2013년 12조 원에서 2050년 43조 원으로 가파르게 증가할 것으로 내다보았다. 치매 발병 원인의 70%를 알츠하이머병이 차지. 알츠하이머병은 비가역적인 뇌세포 손상을 일으켜 기억, 언어 및 인지능력의 상실을 가져온다.



[그림 1] (좌) 한국의 65세 이상 고령자 인구 비중. (우) 치매 사회적 비용규모 전망(그림출처: 연합뉴스). (우) 치매 발병 원인의 69% 차지하는 알츠하이머병. 혈관성 치매(21%)의 3배가 넘는 수치.

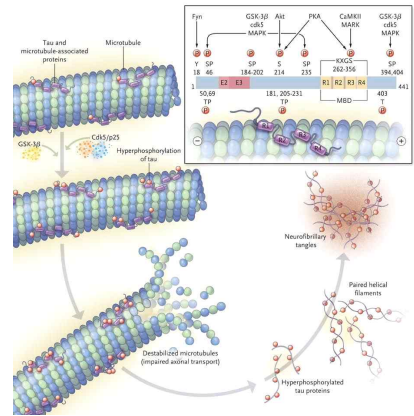
알츠하이머병의 두 가지 Hallmark는 (i) 신경세포 밖에 아밀로이드베타(amyloid beta)의 축적과 (ii) 신경세포 내부에 Tau의 축적이다. (그림 2) Tau는 비교적 최근에야 알츠하이머병의 원인 요소로 인식, 아직 기저 메커니즘이나 치료법에 대한 연구가 미약하다.



[그림 2] 알츠하이머병의 Hallmark인 아밀로이드베타(신경세포 외부에서 생성)와 Tau(신경세포 내부에서 생성). Tau에 대한 연구는 아직 미약.

타우 단백질은 마이크로튜불(microtubule)이라는 세포골격에 붙어 그 형태를 유지하는 역할을 수행하지만 부득이 그 기능(과산화 즉 전하의 불균형)을 잃게 되는 경우 마이크로튜불에서 떨어져 나오고 세포의 생활사를 망쳐(세포 물질수송이 붕괴되어) 질병을 유발하게 된다. 따라서 타우 단백질이 마이크로튜불과 어떠한 형태(conformation)로 결

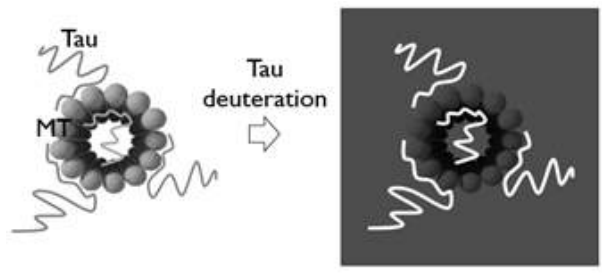
합하며, 어떠한 힘으로 상호작용하는지 파악하는 것은 알츠하이머병 정복을 위한 필수적인 관문이라고 할 수 있다. (그림 3)



[그림 3] 타우와 마이크로튜불의 상호작용 악화로 타우가 떨어져 나와 침착된다.

그러나 타우 단백질은 미접힘(unfolded) 단백질로, 일반적으로 알고 있는 3차원 구조를 가진 단백질들과 달리 하나의 고정된 모양을 가지고 있지 않고 길게 풀어진 실타래 같은 형태(conformation)를 가지는 것이 그 특징이다. 이러한 구조적 특징은 타우 단백질을 관찰하는데 큰 제약을 가져왔다.

중성자 산란(Neutron Scattering)은 중성자가 물체에 맞아 산란되는 패턴을 수집, 분석하여 물체의 구조를 파악하는 기술이다. Contrast Matching 테크닉을 사용하면, 복잡한 계(complex system)에서 필요 없는 것은 숨기고 원하는 것만 관찰하는 선택적인 측정이 가능하다. 시료가 가지는 고유의 산란값인 scattering length density(SLD)를 용매와 같게 하면 해당 시료는 산란 패턴을 보이지 않게 된다. 그러나 이것과 SLD값이 많이 나는 물질이 포함되어 있다면 그 물질의 중성자 산란 패턴은 검출할 수 있게 된다. (그림 4-5) 따라서, 타우를 중성자 치환(deuteration) 시키고, 산란값을 마이크로튜불과 같게 하여 중성자 산란실험을 수행하면 결국 타우의 산란 패턴을 검출하게 된다.



[그림4] Contrast Matching에 대한 개념. 중수소치환된 타우의 산란값이 용매에 대해 두드러진다.



[그림] 연구용 원자로인 HANARO 40M 소각중성자산란장치 (한국원자력연구원 KAERI)

3. 연차별 연구 목표

연구내용	2016 (6월-12월)	201 7	201 8	201 9	202 0
Tau Deuteration: 단백질 정제 Protocol을 Optimize함					
Contrast Matching: 마이크로튜브의 SLD를 용매(Buffer)와 일치시키는 실험					
Neutron Scattering: -Tau의 Conformation에 대한 실험 수행 -Tau Coassembled MTs에서 Tau의 결합위치를 측정함					

3. 연구 결과

(1) Auto Induction Medium(AIM)을 사용한 Tau 정제 방식 시도.

LB 배지 160 ml가 들어있는 플라스크에 부피비 1 %가 되도록 ampicillin을 넣어 사용할 박테리아 외의 균 번식을 방지한다. 다음 tau를 생산하도록 조작된 plasmid를 가지는 박테리아(*Escherichia Coli*, BL21(DE3))를 LB 배지에 inoculate하여 자라도록 한다. 600 nm에서 측정된 흡광도(OD₆₀₀)가 1.6~1.7에 이를 때까지 incubator에서 약 12시간 둔다. (37°C, 250 rpm) 충분한 개체수가 번식한 LB 배지를 AIM 배지로 옮겨준다. 각 1L AIM이 들어있는 두 플라스크에 1 %(v/v) ampicillin을 먼저 넣고, LB 배지를 80 ml씩 나눠 넣는다. 두 개의 AIM 플라스크를 마찬가지로 incubator(37°C, 250 rpm)에 두어 약 24시간 박테리아를 자라게 한다.

(2) Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)를 사용한 Tau 정제 방식 시도.

기존에 사용하던 AIM과 달리 IPTG를 사용할 때의 적절한 온도와 시간을 알기 위해 다음과 같이 실험하였다. LB 배지 1 L와 1 % (v/v) ampicillin이 든 큰 플라스크에 Tau를 생산하는 박테리아 (*Escherichia Coli*, BL21(DE3))를 inoculate한다. 30 - 37°C 사이의 온도를 갖춘 incubator에서 약 12시간을 자라게 둔 다음 흡광도 (OD₆₀₀)를 측정한다. 흡광도 (OD₆₀₀)가 1.0 - 1.5 사이일 때, IPTG를 넣어 induction을 시작한다. 마찬가지로 30 - 37°C 사이의 온도를 갖춘 incubator에 6시간, 12시간, 24시간 동안 자라도록 한 다음 흡광도 (OD₆₀₀)를 측정하였다. 다음으로 박테리아를 lysis하여 SDS-page gel에서 tau의 양을 비교하였다.

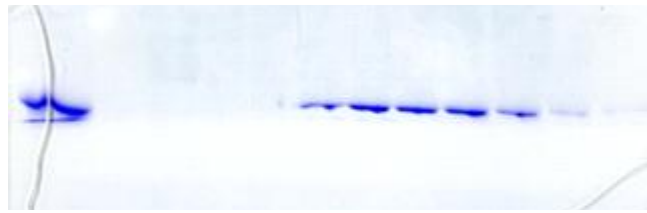
그 결과, 온도는 30°C를 계속 맞춰 주었을 때만 tau가 생산되었고, 12시간 동안 박테리아를 키운 샘플과 24시간 동안 키운 샘플의 tau 양이 비슷했다. IPTG를 사용하는 방식에서 incubator 온도는 30°C, H₂O를 사용한 실험에서는 induction 시간을 12시간으로 optimize하였다.

D₂O 환경에서 박테리아는 H₂O 환경에서보다 훨씬 더디게 자라므로 시간은 D₂O를 사용한 실험에서 추후 optimize할 계획이다.

IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)는 allolactose와 분자적으로 유사한 물질이다. 일반적으로 plasmid에 원하는 단백질의 유전정보를 삽입할 때, lac operon에 넣게 된다. lac operon은 박테리아가 lactose를 분해하여 영양소를 얻도록 하는 기작이다. Lactose가 박테리아 효소에 의해 allolactose로 변하면 lac operon의 억제 단백질과 반응하여 lac operon의 활성을 돕는다. 마찬가지로 분자적 구조가 유사한 IPTG는 lac operon을 활성화하여 그 부분에 삽입된 원하는 단백질을 생산하도록 한다. 차이점은 lac operon이 발현되어 생산된 효소에 의해 allolactose는 분해되지만 IPTG는 분해되지 않는다는 점이다. 따라서 IPTG는 소량을 사용하여도 배지에 계속 남아 박테리아가 원하는 단백질을 생산하도록 한다. 단, 박테리아가 충분히 자란 후에 induction을 시작하도록 IPTG를 넣어주는 시점과 충분한 IPTG의 양을 실험자가 상황에 맞게 조건을 잡아야 한다.

AIM은 박테리아가 충분히 자라면 자동으로 induction되도록 한다. 박테리아 glucose를 먼저 소비하여 성장한 후에 lactose를 소비하며 원하는 단백질을 생산하는 방식이다. 실험자가 박테리아가 충분히 자랐는지 확인하고 induction 시점을 정해야 하는 방식보다 간단하다는 장점이 있다. 그러나 induction 시점을 정확히 알 수 없으므로 이를 통제해야 하는 상황에서는 오히려 단점이라고 할 수 있다.

	Culture 1	Culture 2	Culture 3	IPTG induction
	100 % H ₂ O			
Total volume	10 ml	45 ml	102 ml	1 L
Inoculating with	4RS WT (B type)	9 ml	43 ml	100 ml
LB added	+10 ml	+36 ml	+59 ml	+900 ml
Temperature	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
Time (hour)	8~9	1.5	1.5~2 (tot. 11.5 hr.)	12
OD ₆₀₀	0.8~1	0.8~1	1~1.2	1.57~1.65



[그림] H₂O 환경에서 IPTG induction 방식의 optimization. 시간에 따른 흡광도(OD₆₀₀) 값과 HIC 후의 SDS-PAGE 결과. 4RS Tau를 추출함.

4. 연구결과의 활용방안 및 기대효과

본 협력 연구를 통해 치매 단백질과 약물 그리고 마이크로튜불의 상호작용에 대한 이해의 폭이 증가할 경우, 알츠하이머 혹은 파킨슨병의 일종인 FTDP-17와 같은 치매의 치료에 다양하게 적용될 것이다.

이 연구가 난치병인 치매의 메커니즘을 규명하는데 한 발 더 가까이 다가가려는 시도인 만큼, 이 연구의 성공적 수행되어 치매 병 치료에 적용될 경우 경제적으로 끼칠 영향- 즉, 치매환자의 치료에 지출되는 사회적 비용을 줄임-이 결코 작지 않을 것이고, “인류의 건강증진을 통한 삶의 질적향상”이라는 사회적 측면이 우리에게 시사하는 바는 더욱 크다.