

## 연차 보고서 ( 3차년도 )

사업명	KAIST Grand Challenge 30 Project		
과제명	(국문) Tau를 어떻게 볼 것인가		
	(영문) Challenge in Seeing Tau		
연구책임자	최 명 철	소 속	바이오및뇌공학과
총수행기간 (1단계)	2016. 1. 1. ~ 2020. 12. 31. ( 5년 )		
당해연도 협약기간	2018. 1. 1. ~ 2018. 12. 31. ( 1년 )		
당해연도 사업비(원)	20,000,000 원		

자체연구협약서(KAIST Grand Challenge 30 Project)제5조에 의거하여  
연차보고서 2부를 제출합니다.

2019년 1월 1일

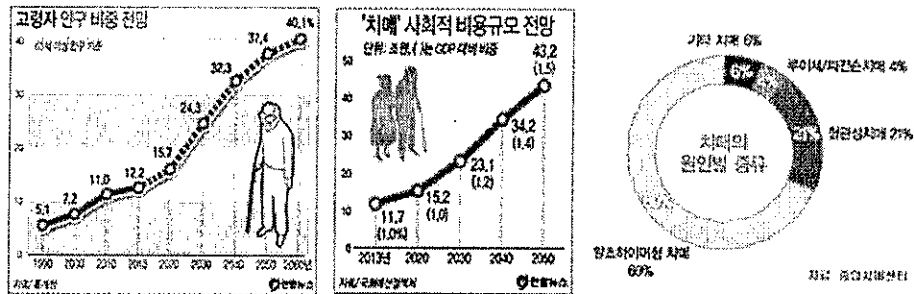
연구책임자: 최 명 철



한국과학기술원 총장 귀하

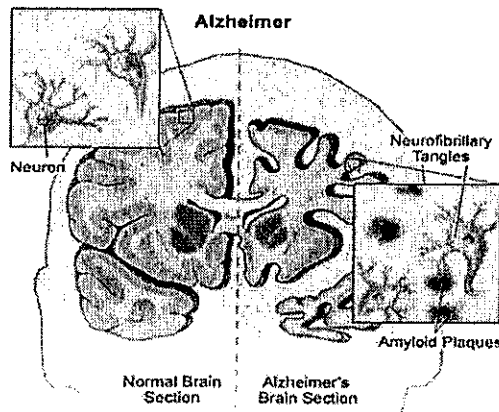
## I. 추진연구 배경

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.



[그림1] (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.

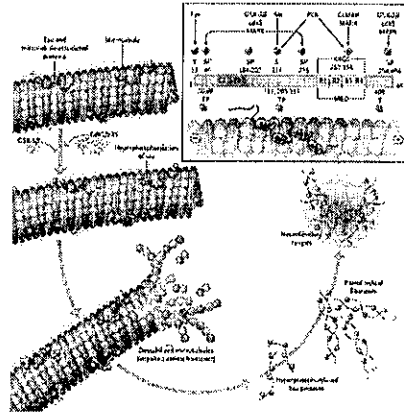
알츠하이머병의 두 가지 Hallmark는 (i) 신경세포 밖에 아밀로이드베타(amyloid beta)의 축적과 (ii) 신경세포 내부에 Tau의 축적이다. (그림 2) Tau는 비교적 최근에야 알츠하이머병의 원인 요소로 인식, 아직 기저 메커니즘이나 치료법에 대한 연구가 미약하다.



[그림2] 알츠하이머병의 Hallmark인 아밀로이드베타(신경세포 외부에서 생성)와 Tau(신경세포 내부에서 생성). Tau에 대한 연구는 아직 미약.

타우 단백질은 마이크로튜블(microtubule)이라는 세포골격에 붙어 그 형태를 유지하는 역할을 수행하지만 부득이 그 기능(과산화 즉 전하의 불균형)을 잃게 되는 경우 마이크로튜블에서 떨어져 나오고 세포의 생활사를 망쳐(세포 물질수송이 붕괴되어) 질병을 유발

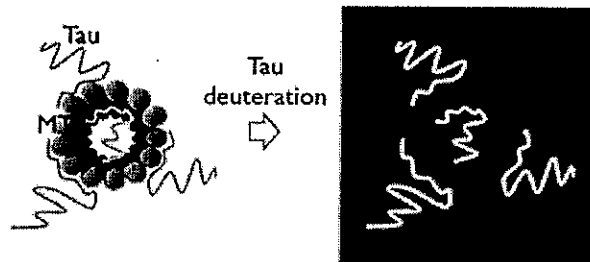
하게 된다. 따라서 타우 단백질이 마이크로튜블과 어떠한 형태(conformation)로 결합하며, 어떠한 힘으로 상호작용하는지 파악하는 것은 알츠하이머병 정복을 위한 필수적인 관문이라고 할 수 있다. (그림 3)



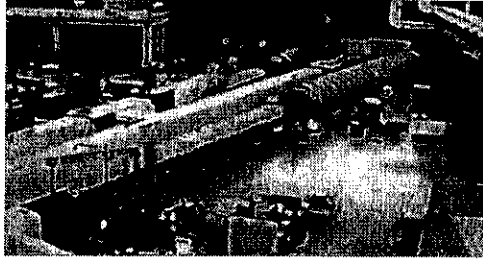
[그림3] 타우와 마이크로튜블의 상호작용 약화로 타우가 떨어져 나와 침착된다.

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, 복합계(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 마이크로튜블과 같게 하여 중성자 산란실험을 수행하면 결국 타우의 산란 패턴을 검출하게 된다.



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



[그림5] 연구용 원자로인 HANARO 40M 소각중성자산란장치 (한국원자력연구원 KAERI)

## II. 해당 연도 추진 현황

### 1. 기술개발 추진 내용

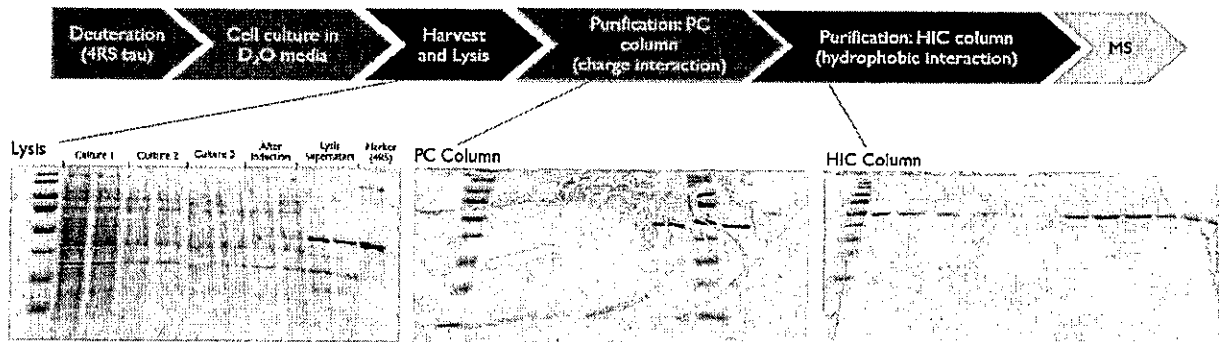
연구내용	2016	2017	2018	2019	2020
Tau Deuteration: 단백질 정제 Protocol을 Optimize 함					
Deuterated Tau의 비율을 정량화함					
Contrast Matching: 마이크로튜브의 SLD를 용매 (Buffer)와 일치시키는 실험					
Neutron Scattering 수행 -Tau의 Conformation에 대한 실험 수행 -Tau Co-assembled 마이크로튜브의 구조 측정					

### 2. 해당 연도 추진 실적

연구목표	연구결과	목표대비 달성도
Tau Deuteration: 단백질 정제 Protocol을 Optimize함	(1) D2O환경에서 Tau의 Harvest and Lysis 성공 (2) Tau의 PC Column 성공 (3) Tau의 HIC Column 성공	100%
Contrast Matching 실험: 마이크로 튜브의 SLD를 Buffer와 일치시키는 실험	HANARO 40M SANS 빔라인에서 마이크로 튜브의 Contrast Matching 실험 성공	100%

### III. 기술개발결과

#### 1. Deuterated Tau 단백질의 분리 및 정제 Protocol의 Optimization



[그림6] Scheme of Tau Deuteration Protocol

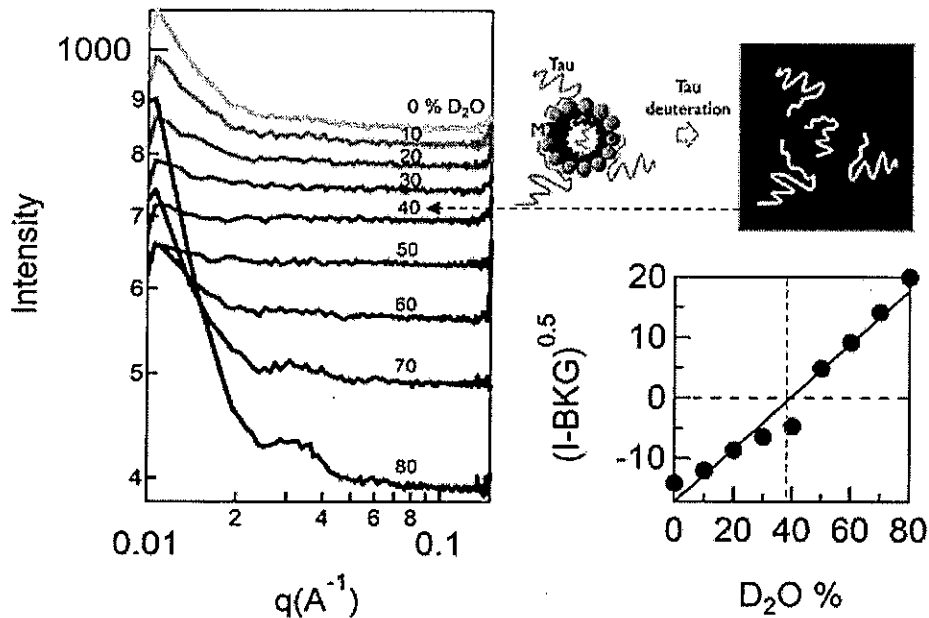
[그림 6] 은 Deuterated Tau 단백질의 정제 protocol과 각 과정에서 얻은 타우 단백질이 포함된 용액을 SDS-page에서 확인한 결과이다. 먼저 D<sub>2</sub>O 배지에서 박테리아를 키운 뒤, 박테리아만 채집하여 세포막을 부수고 단백질들을 얻어내는 과정(Lysis)을 거친다. 타우 단백질은 양극성을 띠는 수용성 단백질이므로 Lysis 단계 이후 원심 분리하여 수용액만을 분리한다. 이렇게 얻어낸 수용액에는 타우 단백질 외에도 다른 수용성 단백질들이 포함되어 있다. 그러므로 타우 단백질만을 분리하는 정제과정인 Phospho Cellulose (PC) Column과 Hydrophobic Interaction Column (HIC)을 거친다. 정제과정에서는 100 % D<sub>2</sub>O-buffer 용액을 사용하였다.

PC column에서 그물망처럼 생긴 PC resin에 붙어 있는 타우 단백질은 전하를 가지고 있으므로 이온 강도를 높여가며 buffer 용액(BRB80)을 흘려주었을 때, 특정 이온 강도에서 녹아 분리된다. 이를 위해, 0.1 ~ 1 M의 다양한 이온 강도를 가진 용액을 사용하여 실험하였다. H<sub>2</sub>O 환경에서 얻은 타우 단백질은 200 mM NaCl 용액에 녹아 분리된다. 그러나 중수 환경에서 얻은 타우 단백질은 이보다 높은 이온 강도를 가진 용액에서 분리되었다. HIC column에서는 반대로 2 M 만큼의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 타우 단백질이 녹아 있는 buffer 용액에 녹여 흘려준다. 가림(screening) 효과에 의해 membrane과 타우 단백질 간 hydrophobic interaction이 강해져 타우 단백질은 column을 통과하지 않는다. 이렇게 준비된 column에 역시 2 M 만큼의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 이온이 포함된 buffer 용액과 이온이 포함되지 않은 buffer 용액의 비율을 0-100%까지 농도 gradation을 만들며 흘려주었다. 이온 강도가 낮은 농도 영역에서 hydrophobic interaction이 점차 약화되어 타우 단백질이 녹아 분리되었다. 마지막으로 두 가지 정제법 모두 다량의 이온을 사용하기 때문에 한 가지 과정이 끝난 다음에는 이온이 포함되지 않은 buffer 용액으로 용매를 바꿔줄 필요가 있다. 타우 단백질의 크기를 고려하여 알맞은 조건의 Amicon filtration tube를 사용하여 이온이 포함되지 않은 buffer 용액으로 여러 번 원심분리하였다. HIC를 거치고, 이온을 제거한 타우 단백질 수용액은 -

80°C 에서 급속 냉각시켜 보관하였다.

## 2. Contrast Matching 실험

앞서 설명하였듯 타우 단백질만의 선택적인 관찰을 위해 마이크로튜블의 산란값 (Scattering Length Density, SLD)을 용매의 산란값과 일치시켜 마이크로튜블의 산란 패턴은 보이지 않도록 만들 필요가 있다. 아래의 [그림 7] 은 이러한 마이크로튜블의 contrast matching 실험 결과를 보여주고 있다.



[그림7] 마이크로튜블 Contrast Matching 실험 결과

실험 과정은 다음과 같다. 튜블린(Tubulin)을 buffer(PEM50) 용액 상에서 GTP, Glycerol를 넣어 자가 조립에 의해 마이크로튜블로 합성시켜 시료를 만든다. 이러한 시료를 H<sub>2</sub>O와 D<sub>2</sub>O의 비율을 달리해 0~80 %까지 다양한 buffer 용액에 준비한다. 이 시료들의 중성자 산란 패턴을 각각 얻었을 때, 산란 패턴이 거의 측정되지 않는 용매의 특정 D<sub>2</sub>O %를 찾는다. [그림 7]의 결과에서 약 40 % D<sub>2</sub>O buffer 용액에서 산란 패턴의 세기가 약해진 것을 볼 수 있다. 이는 튜블린 고유의 산란값(SLD)이 용매의 산란값과 유사하기 때문이며, 이 D<sub>2</sub>O % 용매에서 타우 단백질은 다른 산란값을 가진다면 타우 단백질의 산란 패턴만을 얻을 수 있다.

## IV. 결론 및 차년도 계획

### 1. Mass spectroscopy를 이용한 deuterated Tau 단백질의 중수소 치환율 측정

본 연구의 주목적은 마이크로튜브와 타우 단백질이 혼합된 시료에서 contrast matching 기법을 사용한 타우 단백질의 선택적 관찰이다. Deuteration은 수소를 중수소로 치환하는 과정인데, 수소(H)와 중수소(D)는 이 SLD 값이 큰 차이가 나는 원소들로 치환율에 따라 SLD값이 큰 폭으로 변화하게 된다. 이렇듯 deuterated Tau의 중수소 치환율은 본 연구의 주요한 조건이므로 SANS 실험에 앞서 되도록 정확한 값을 얻어야 한다.

수소(H)와 중수소(D)는 중성자의 개수가 다르기 때문에 질량이 다른 동위원소이다. 중수소 치환율이 높아짐에 따라 타우 단백질에 포함된 중수소의 개수가 늘어나게 된다. 즉, deuterated Tau의 정밀한 질량 분석(Mass spectroscopy) 결과로부터 중수소 치환율을 계산할 수 있다. 한국과학기술원 중앙분석센터(KARA)의 mass spectroscopy 장비를 사용하여 deuterated Tau 시료를 측정 및 분석할 계획이다.

다음으로 중수소 치환율에 따른 SLD값을 계산하여 contrast matching 기법을 사용함에 있어 타우 단백질의 관찰이 용이한지 비교할 필요가 있다. 만일 마이크로튜브와 타우의 SLD값이 비슷하다면 contrast matching 기법을 쓰기 어려우므로 치환율을 조절해야 한다. 따라서 중수소 치환율을 측정해가며 프로토콜을 유지 또는 수정이 필요하다.

## 2. 해외 원자력 연구소의 SANS 이용 신청

현재 한국 원자력 연구원의 HANARO 원자로가 가동이 잠정 중단된 상태다. 본격적인 SANS 실험은 해외 원자로 이용이 불가피하다고 판단되어 일본의 J-PARC 연구소에 SANS 이용 신청 접수를 한 상태이며 호주의 ANSTO를 비롯한 다른 원자로도 고려하고 있다.

## V. 기타

해당사항 없음