

DPPC 다중막의 수직 구조 향상을 유도하는 콜레스테롤에 의한 리플 상에서 정렬된 액체상으로의 상전이: 싱크로트론 X-선 반사도 연구

발표논문 : Lee, S., Jeong, D.-W. and Choi, M. C. Vertical order of DPPC multilayer enhanced by cholesterol-induced ripple-to-liquid ordered (LO) phase transition: Synchrotron X-ray reflectivity study. *Curr. Appl. Phys.* 17, 392-397 (2017).

콜레스테롤은 작은 하이드록실기와 비교적 부피가 큰 스테로이드 고리로 이루어진 양친매성(amphiphilic) 분자이며, 세포막의 구조 유지와 유동성 확보를 위해 꼭 필요한 세포막의 주요 구성요소이다. 이러한 콜레스테롤의 여러 중요한 생물학적 역할들 중에서 세포막의 구조를 조절하는 기능은 지질과 콜레스테롤이 단단하게 뭉쳐있는 복합체인 지질 뗏목의 생성에 있어 핵심 프로세스로 여겨지고 있다. 이 지질 뗏목은 세포 신호전달, 엔도사이토시스(endocytosis), 질병 발병 등 매우 많은 세포 활동에 중추적인 역할을 하는 일종의 구조적 플랫폼인데, 특히 이 지질 뗏목과 알츠하이머병, 파킨슨병 등 퇴행성 뇌질환 사이의 연관성이 최근 많은 주목을 받고 있으며, 세포막의 콜레스테롤을 제거하여 알츠하이머를 치료하려는 연구가 보고되기도 했다.

이러한 중요성에 따라 콜레스테롤이 지질막 구조를 어떻게 바꾸는지에 대한 다양한 연구가 지속적으로 이루어져 왔다. 그러나 실제 세포를 이용하여 실험을 하는 경우 수많은 구성요소로 이루어진 세포막의 복잡성 때문에 통

제된 실험이 쉽지 않기 때문에 세포막을 간단하게 모사하는 차원에서 dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC)라는 세포 외막의 주요 구성 지질과 콜레스테롤의 조합이 가장 널리 연구가 되어왔다. 공초점 현미경 [1, 2], 핵자기공명 분석(nuclear magnetic resonance) [3, 4], 시차 주사 열계량법(differential scanning calorimetry) [5] 그리고 X-선 산란(X-ray scattering) 기술 [6, 7]과 같은 다양한 분석 방법들이 DPPC-콜레스테롤 막의 콜레스테롤의 농도에 따른 구조를 알아보는 데에 사용되었으며, 막이 콜레스테롤 농도 6.5 ~ 7 %에서 고체 젤(gel) 상(phase)에서 정렬된 액체상(liquid ordered phase)으로 상전이(phase transition)가 일어난다는 것과 함께 분자 수준에서 해당 상들의 구조를 밝혀내었다.

그러나, 이러한 연구들은 대부분 단일막 혹은 이중막을 이용하여 xy 평면 상에서 지질과 콜레스테롤 분자의 배열을 관찰하는 데에 집중되어 있고, 콜레스테롤이 가져오는 수직 방향의 구조변화에 대한 연구는 이중막의 얇은 두께 때문에 제한적인 범위 내에서 이루어져 왔다. 그러나 최근 지질 이중막을 수 ~ 수십층을 쌓아 X-선 반사도(reflectivity)를 통해 막의 수직 구조 관찰이 용이하게 만든 형태의 지질 스핀 코팅 다중막이 제시됨으로써[8], 지질-콜레스테롤 막의 수직 구조 연구에 대한 접근이 보다 쉬워졌다.

본 연구는 이러한 배경에 기반하여, 싱크로트론(synchrotron) X-선 반사도를 이용해 실리콘 웨이퍼 위에 형성된 DPPC-콜레스테롤 스핀 코팅 지지 지질 다중막(spin-coated supported

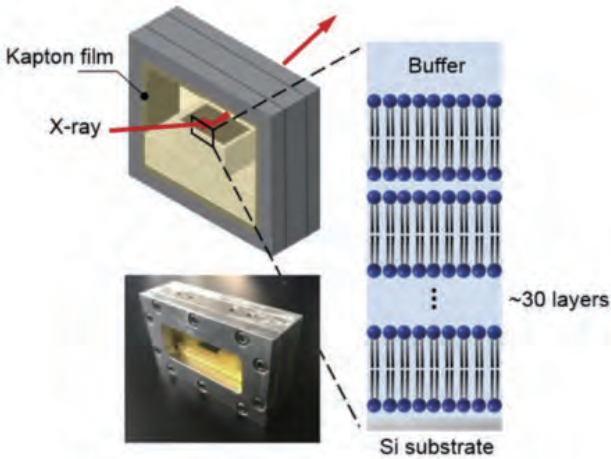


그림 1. 자체 개발한 X-선 반사도(reflectivity) 액체 시료 셀(cell)을 표현한 개략도. 친수성(hydrophilic)으로 처리된 실리콘 기판 위에 스피너 코팅(spin coating) 방법으로 약 30층으로 구성된 지질 다중막(lipid multilayer)을 만든다.

lipid multilayer)의 구조를 관찰한 연구이다. [그림 1]과 같이 약 30여 개의 지질 이중막으로 이루어져 있는 지질 다중막은 X-선 반사도 상에서 단일 이중막에 비해 강한 상관 피크(correlation peak)를 보인다. 그러므로 지질 다중막의 활용은 콜레스테롤이 지질 막의 구조, 특히 수직 방향 구조를 연

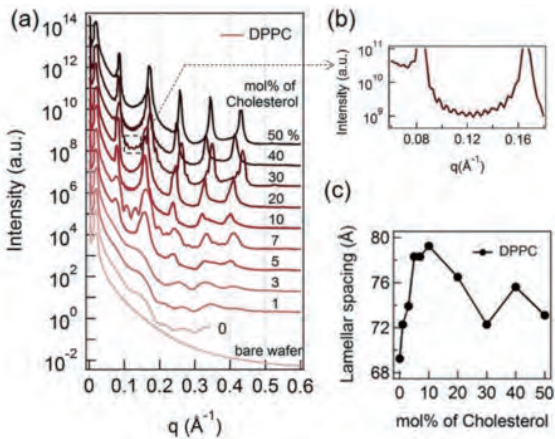


그림 2. (a)콜레스테롤 농도에 따른 DPPC-콜레스테롤 다중막의 싱크로트론(synchrotron) X-선 반사도 곡선. 콜레스테롤 농도가 증가할수록 상관 피크들이 더 높은 q 값으로 이동하면서 더 강해지고, 선명해지는 것을 볼 수 있다. (b)다중막 전체 두께에 의해서 나타나는 작은 신호의 요동을 보여주는 확대된 이미지 (c)콜레스테롤의 몰 농도에 따른 DPPC-콜레스테롤 다중막의 층 간격 변화. 층 간격은 빠르게 증가했다가 (< 10 % 콜레스테롤 영역) 천천히 감소한다 (> 10 % 콜레스테롤 영역)

구하는데 있어 장점을 가지고 있다.

우리는 먼저 형광 현미경을 통해 이러한 우리의 DPPC-콜레스테롤 지지 다중막이 콜레스테롤 농도 5 %와 7 % 사이에서 젤(gel) 상태에서부터 정렬된 액체상으로 상전이가 일어난다는 것을 관찰하였다. [그림 2]에 나와 있듯이, 싱크로트론 X-선 반사도에서는 콜레스테롤 농도가 10 % 이하인 영역에서 DPPC의 꼬리 사슬이 콜레스테롤이 들어가면서 점점 똑바로 서게 되어 다중막의 층 간격(lamellar spacing)이 빠르게 증가하는 모습을 보였고, 그 이상의 농도에서는 최대 농도 50 %까지 층 간격이 천천히 감소하였다. 이를 기반으로 우리는 DPPC-콜레스테롤 다중막이 콜레스테롤의 농도에 따라 두 가지 다른 상태 - 낮은 콜레스테롤 농도에서의 리플상(ripple phase)과 높은 콜레스테롤 농도에서의 정렬된 액체상 - 을 가지고 있을 것으로 추측하였다. 특히 [그림 3]의 그래프에 나타난 콜레스테롤 농도 3 ~ 10 %에서 X-선 반사도 피크의 FWHM(Full width at half maximum) 값의 급격한 감

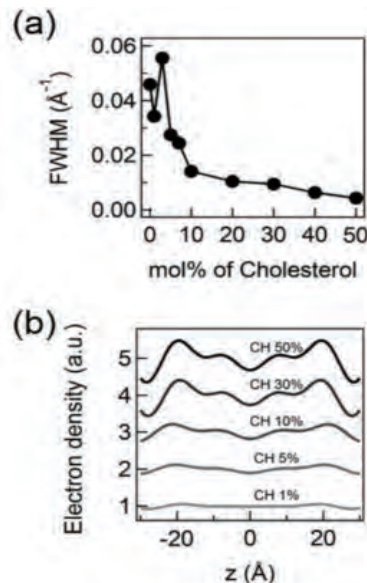


그림 3. (a) DPPC-콜레스테롤 다중막 X-선 반사도 세번째 피크의 FWHM (full width at half maximum), FWHM 값은 콜레스테롤 농도가 증가함에 따라 감소한다. (b)DPPC-콜레스테롤 다중막의 전자 밀도 그래프. 높은 콜레스테롤 농도로 갈수록 그래프의 개형이 뚜렷해지는데, 이는 다중막 수직 구조의 향상을 의미한다.

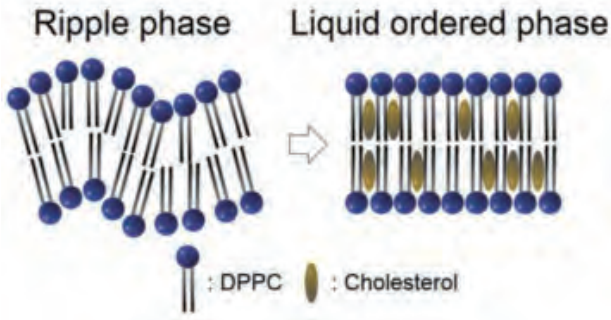


그림 4. 콜레스테롤이 유도하는 DPPC 다중막의 상전이에 의한 수직 구조 향상을 나타낸 모사도. DPPC 다중막은 낮은 콜레스테롤 농도 (0 ~ 10%)에서는 리플상(ripple phase)으로 존재한다. 콜레스테롤 농도가 높아지면서 리플상에서 정렬된 액체상으로의 상전이가 일어나고 이는 층간의 정렬 수준을 향상시킨다.

소는 해당 콜레스테롤 농도 영역에서 다중막의 수직 구조가 보다 잘 정렬된 형태로 변화한다는 것을 의미하며, 이는 상전이가 일어남을 함축하고 있다. 전자 밀도 그래프 또한 이러한 결과를 재확인 해주었다. 상전이가 일어나면서 다중막의 수직 구조가 향상되려면, 낮은 콜레스테롤 농도에서 DPPC-콜레스테롤 다중막이 단순한 젤상(gel phase)이기보다는 주기적인 수직방향 구조 변동을 가지는 리플상이어야 한다. 즉, [그림 4]에 표현된 것처럼 콜레스테롤이 DPPC 다중막의 상을 리플상에서 정렬된 액체상으로 변화시키고, 해당 과정에서 다중막의 수직 구조가 향상됨을 발견하였다고 할 수 있다.

본 연구를 통해 우리는 DPPC 다중막에 콜레스테롤이 들어가면서 생기는 수직 구조변화에 대한 최초의 실험적 결과를 제시했다. 특히 연구 방법론적 측면에서, 스핀 코팅 방법으로 제작된 지질 지지 다중막과 이를 X-선 반사도를 통해 분석할 수 있도록 개발한 시료 셀의 활용은 지질 다중막의 수직 구조에 대한 보다 효과적인 연구를 가능케 하였다. 우리는 지질막의 분석에 대한 이러한 접근법이 앞으로 다양한 지질막의 수직 구조와 그 변화를 관찰하는 데 있어서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각하며, 실제 세포막의 수직 구조 변화와 그 생물학적 연관성에 대한 연구를 촉진시킬 것으로 기대한다.

참고문헌

[1] G.W. Feigenson, J.T. Buboltz, Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol, *Biophys. J.* 80 (2001).
 [2] S. Veatch, S. Keller, Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin, *Phys. Rev. Lett.* 94 (2005).
 [3] T.H. Huang, C.W. Lee, S.K. Das Gupta, A. Blume, R.G. Griffin, A 13C and 2H nuclear magnetic resonance study of phosphatidylcholine/cholesterol interactions: characterization of liquid-gel phases, *Biochemistry* 32 (1993).
 [4] M.R. Vist, J.H. Davis, Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry, *Biochemistry* 29 (1990).
 [5] T.P. McMullen, R.N. McElhaney, New aspects of the interaction of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as revealed by high-sensitivity differential scanning calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta* 1234 (1995).
 [6] H.W. Meyer, K. Semmler, P.J. Quinn, The effect of sterols on structures formed in the gel/subgel phase state of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers, *Mol. Membr. Biol.* 14 (1997).
 [7] T. Mills, J. Huang, G.W. Feigenson, J.F. Nagle, Effects of cholesterol and unsaturated DOPC lipid on chain packing of saturated gel-phase DPPC bilayers, *Gen. Physiol. Biophys.* 28 (2009).
 [8] U. Mennicke, T. Salditt, Preparation of solid-supported lipid bilayers by spin-coating, *Langmuir* 18 (2002).
 [9] Lee, S., Jeong, D.-W. & Choi, M. C. Vertical order of DPPC multilayer enhanced by cholesterol-induced ripple-to-liquid ordered (LO) phase transition: Synchrotron X-ray reflectivity study. *Curr. Appl. Phys.* 17, 392-397 (2017).

저자약력

이수호 학생은 한국과학기술원 바이오및 뇌공학과에서 2012년 학사, 2014년 석사 학위를 받은 후, 현재 동 대학원 생물물리 연구실(지도교수 최명철)에서 박사과정으로 수학 중이다.



최명철 교수는 2005년 한국과학기술원 물리학과에서 박사학위를 받고, 2005년부터 2010년까지 University of California Santa Barbara (UCSB)에서 post-doc으로서 연구를 한 후, 2010년부터 현재까지 한국과학기술원 바이오및뇌공학과에서 조교수로 재직 중이다. myungchul.choi@gmail.com

