

튜불린 기반 단백질 나노튜브 개발 및 항암제 전달체로의 응용

2020년 본 그룹에서는 몸 속에서 미세소관 (Microtubule, MTs)을 형성하는 튜불린 단백질을 바이오-나노 재료의 기초 빌딩블록으로 활용할 수 있음을 보여주는 논문 두 편을 연달아 발표했다. 두 연구는 분자스위치를 이용한 튜불린 자기조립 구조의 제어를 다루고 있다는 공통점이 있다. 여기서는 두 논문의 개요, 결과, 의의를 포함하는 전체적인 내용을 요약함과 동시에 포항가속기연구소 4C SAXS 빔라인에서 얻은 데이터가 이 단백질 기반 나노구조체 분석에 어떻게 활용되었는지 다루고자 한다.

1. 튜불린 단백질의 2D 형태 변형 제어를 통한 ‘튜불린 이중나선’ 구조 형성 (Small, 2020)

작고 단순한 빌딩블록들이 조립되어 복잡하고 거대한 나노구조를 형성하는 예는 자연에서 산업에 이르기까지 다양하다. 대표적인 예라고 할 수 있는 몸 속의 미세소관은 지름 25 nm의 나노튜브로, 튜불린 단백질의 자기조립으로 형성된다. 미세소관은 세포 분열 시 유전체를 두 개의 딸 세포로 분리시키는 방추사의 핵심 구조물과 같은 분자 기계 역할을 수행한다. 이는 튜불린 단백질의 형태가 두 방향으로 변형되고, 이들이 길게 이어져 형성하는 프로토티라멘트 (Protofilament)의 곡률이 길이 방향과 측면 방향으로 변하여, 결과적으로 미세소관의 길이가 제어되기 때문이다. 이 과정에서 튜불린의 형태는 베타-튜불린에 결합하는 뉴클레오티드의 가수 분해 상태, 다양한 마이크로튜불-연관 단백질 (Microtubule-associated protein, MAP)의 결합 등에 의해 복합적으로 제어된다. 우리는 이 논문에서 튜불린의 두 방향 형태를 제어할 수 있는 양전하

폴리머 분자스위치를 찾아내고, 그 결과로 튜불린 이중나선 구조가 형성됨을 보였다.

미세소관이 강한 음전하를 띠는 나노튜브이고 많은 MAP들이 양전하를 띠는 부분을 통해 미세소관과 상호작용한다는 사실에 착안하여, 양전하 폴리머인 폴리라이신 (Poly-L-Lysine, PL) 분자스위치를 찾아냈다. 폴리라이신이 존재할 때, 미세소관을 이루는 프로토티라멘트의 곡률은 길이 방향으로 0에서 $\sim -1/20 \text{ nm}^{-1}$ 로, 측면 방향으로 $1/10$ 에서 $\sim 0 \text{ nm}^{-1}$ 로 변한다[그림 1(a)-(c)]. 그 결과, 기존에 존재하던 미세소관이 붕괴되고, 튜불린 이중나선과 이를 구성요소로 하는 다양한 나노튜브 구조들이 형성되었다. 이들은 미세소관을 안쪽 레이어로 하고 바깥에 이중나선이 감겨 있는 이중벽 튜불린 튜브 (Double-walled tubulin tubule)들과 오로지 이중나선으로 된 레이어만 존재하는 일중벽 튜불린 튜브 (Single-walled tubulin tubule)이다[그림 1(d)].

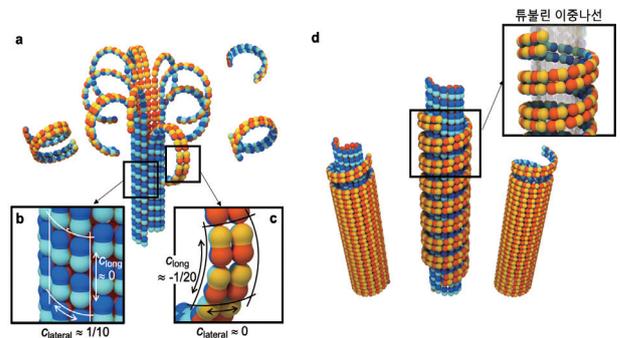


그림 1. 폴리라이신 분자스위치에 의한 튜불린 이중나선 형성. (a) 튜불린 프로토티라멘트의 두 방향 곡률 변화에 따른 미세소관의 붕괴. (b) 미세소관을 이루는 프로토티라멘트의 두 방향 곡률. (c) 튜불린 이중나선을 이루는 프로토티라멘트의 두 방향 곡률. (d) 튜불린 이중나선을 기반으로 한 다양한 나노튜브들

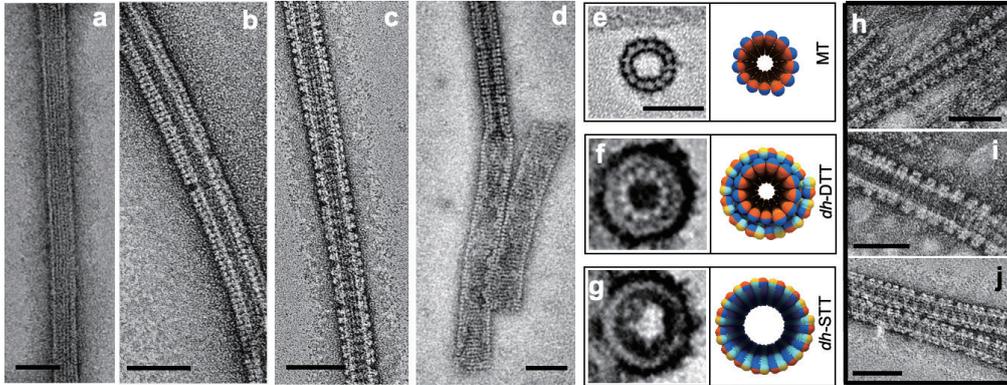


그림 2. 튜블린 이중나선 나노튜브의 투과전자현미경 이미지. (a) 미세소관. (b) 뺨뺨한 이중나선을 가지는 이중벽 튜블린 튜브. (c) 간격이 벌어진 이중나선을 가지는 이중벽 튜블린 튜브. (d) 일중벽 튜블린 튜브. (e)-(g) 미세소관, 이중벽, 일중벽 튜블린 튜브의 단면 (cross-section) 이미지와 카툰. (h)-(j) 튜블린 이중나선 구조를 보여주는 이미지. 스케일바: 50 nm (a-d, h-j), 25 nm (e-g)

이중나선으로 이루어진 나노튜브의 구조는 투과전자현미경 (Transmission electron microscopy, TEM) [그림 2]과 싱크로트론 소각 X-선 산란 (Small-angle X-ray scattering, SAXS) 기술로 관찰되었다 [그림 3]. 각기 다른 튜블린 레이어를 가지는 나노튜브들 - 미세소관, 일중벽, 이중벽 튜블린 튜브들 - 의 산란 데이터는 각 구조에 해당하는 전자 밀도 모델을 이용해 피팅하였다. 특히, 이중벽 튜블린 튜브는 바깥 레이어가 다른 구조인 두 종류의 튜브가 존재하는데, 아래의 식 [그림 3(b)]을 이용

한 피팅을 통해 이들이 이중나선의 피치 P (helical pitch) 가 각각 $P \sim 11.9$ nm인 뺨뺨한 이중나선과 $P \sim 14.5$ nm로 간격이 벌어진 이중나선으로 이루어져 있음을 밝혀냈다 [그림 3(c),(d)].

$$\left| F_{\text{이중벽 튜블린 튜브}} \right|^2 = \left| F_{\text{미세소관}} + F_{\text{이중나선}} \right|^2$$

$$\left| F_{\text{이중나선}} \right|^2 \propto$$

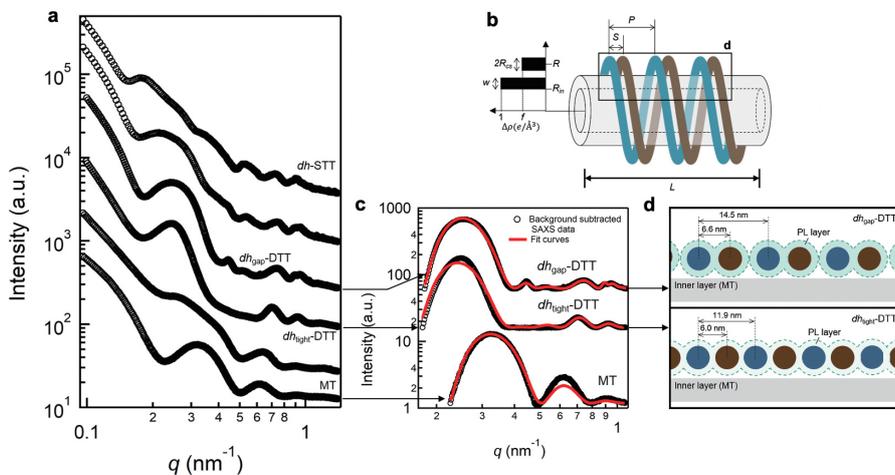


그림 3. 튜블린 이중나선 나노튜브의 싱크로트론 소각 X-선 산란 데이터. (a) 미세소관, 이중벽, 일중벽 튜블린 튜브의 산란 데이터. (b) 튜블린 이중나선 이중벽 튜블린 튜브 모델. (c) 모델을 이용한 산란 데이터 피팅. 빨간색: 피팅 커브. (d) 피팅 결과를 바탕으로 구현한 이중벽 튜블린 튜브 측면 그림

$$\sum_{n=0}^{\infty} \left\{ [1 + \cos(q_z S)] J_n^2(q_1 R) \exp\left(-\frac{q^2 R_{cs}^2}{8}\right) \exp\left(-\left(q_z - \frac{2\pi n}{P}\right)^2 L^2 / 4\pi\right) \right\}$$

미세소관에서부터 튜블린 이중나선으로 이루어진 다양한 나노튜브들까지 포함하는 이 튜블린-폴리라이신 복합체는 분자스위치인 폴리라이신의 분자량과 농도라는 두 가지 요인에 의해 제어된다. 우리는 SAXS 데이터를 기반으로 두 요인에 따른 튜블린 아키텍처의 상태도 (phase diagram)을 그려냈다(그림 4). 분자스위치 농도가 증가함에 따라, 미세소관이 붕괴되면서 튜블린 이중나선이 형성되고, 두 종류의 이중벽 튜블린 튜블을 거쳐 일중벽 튜블린 튜블이 형성됨을 확인하였다. 흥미롭게도, 분자스위치의 크기가 각각 튜블린 크기인 4 nm와 미세소관의 지름인 25 nm보다 커질 때마다 형성할 수 있는 튜블린 아키텍처의 수가 하나씩 증가했다. 우리는 논문에서 이 분자량-농도 데이터를 기반으로 분자스위치인 폴리라이신이 튜블린 나노튜브 형성에 어떻게 관여하고 있는지 분자 메커니즘을 제시할 수 있었다.

이 연구는 튜블린이 두 방향으로 형태 변형이 가능한 나노 빌딩블록이며, 분자스위치의 농도와 분자량을 통해

제어할 수 있음을 보여준다. 이는 튜블린을 이용해 나노소재 개발하는 새로운 나노공학 분야의 출발점을 제시하는 것이다. 형성된 튜블린 나노구조체들은 나노미터 크기의 광학, 전기, 의료 소재를 개발하는 플랫폼으로 모터 단백질인 키네신 (kinesin)과 결합하여 분자 기계를 개발하는 등으로 활용될 수 있다.

2. 미세소관-표적 치료제의 전달체로 활용될 수 있는 튜블린 기반 나노튜브 개발 (Advanced Materials, 2020)

미세소관 표적 치료제 (Microtubule-targeting agent, MTA)는 튜블린에 결합하여 미세소관의 성장과 붕괴를 방해함으로써 암세포의 분열을 억제, 결국 사멸을 유도하는 방식의 항암 약물로, 다양한 암의 치료에 사용되고 있다. MTA들은 기본적으로 소수성을 띠기 때문에 치료에 활용하기 위해서는 각 약물에 적합한 전달체를 개발해야 했다. 이 연구에서는 튜블린 단백질에 MTA들이 강하게 결합하는 고유의 결합 자리 (binding site)가 여럿 존재한다는 점에 착안하여, 튜블린을 약물 전달체로 사용한다는 아이디어를 구현했다. 앞서 언급했던 분자스위치를 활용하여 튜블린으로 이루어진 나노튜브 구조체를 형성하고,

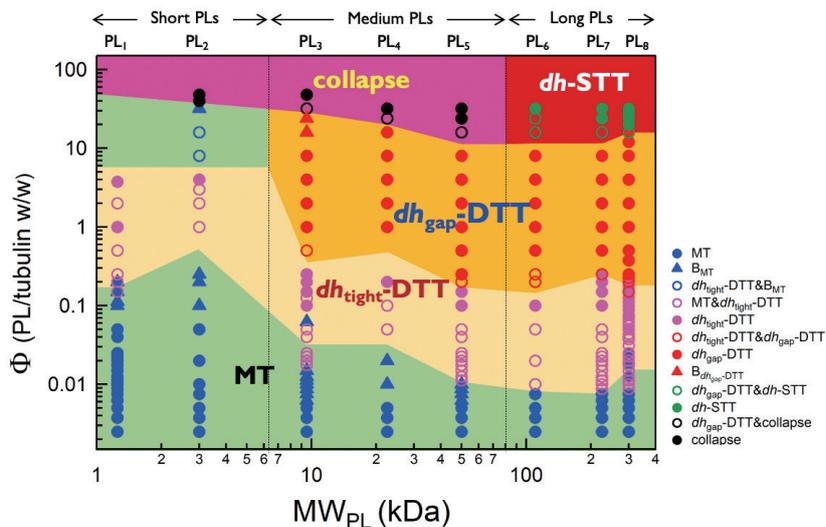


그림 4. 분자스위치의 분자량과 농도에 따른 튜블린 아키텍처 상태도 (phase diagram)

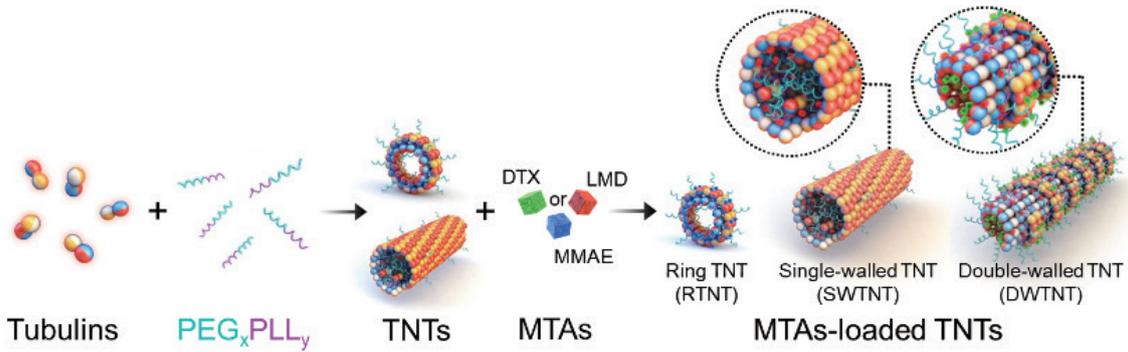


그림 5. 분자스위치 PEG-PL을 이용한 튜블린 나노튜브 (TNT)의 형성. 다양한 미세소관 표적 치료제가 탑재될 수 있다

여기에 MTA들을 실어 *in vitro*와 *in vivo*에서 항암 효능을 확인했다.

전달체로 개발된 튜블린 나노튜브 (Tubulin-based nanotube, TNT)는 튜블린 단백질에 PEG 분자와 폴리아민이 결합된 블록 혼성 중합체 (block copolymer)를 섞어 만들어졌다 [그림 5]. 그 다음 각기 다른 튜블린 결합 자리에 결합하는 도세탁셀 (docetaxel), 라우리말라이드 (laulimalide), 모노메틸아우리스타틴 E (monomethyl auristatin E) 3종의 MTA를 TNT에 탑재하였다.

PEG-PL의 분자량과 농도, 그리고 탑재하는 약물의 종류와 개수에 따라 TNT의 구조와 약물 전달체로서의 물리, 화학적 특성도 달라짐을 확인했다. 전달체로 적합한 TNT의 구조 정량화는 TEM과 SAXS를 통해 얻어졌다 [그림 6]. 특히, 도세탁셀과 라우리말라이드 두 종류의 약물이 결합된 경우 TNT는 두 개의 튜블린 레이어를 가지는데 [그림 6(b)], SAXS 데이터에서 이중나선 베셀함수 J_1, J_2 의 위치를 통해 바깥쪽 이중나선의 피치가 $P \sim 16.9$ nm임을 확인하였다 [그림 6(c)]. 이는 지름이 ~ 7 nm인

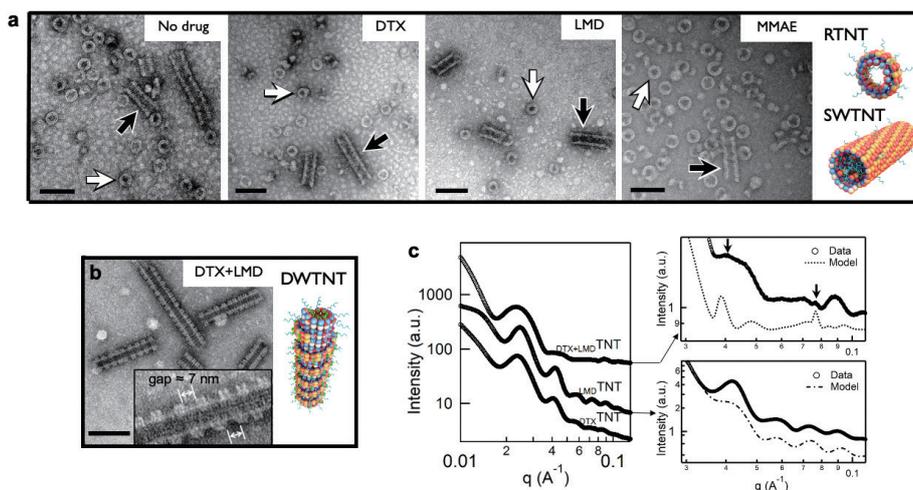


그림 6. 튜블린 나노튜브의 투과전자현미경 및 소각 X-선 산란 데이터. (a) 약물이 탑재되지 않거나 단일 약물만 탑재되었을 경우 짧은 고리 구조 (RTNT, 하얀색 화살표)와 일중벽 나노튜브 (SWTNT, 검은색 화살표)가 형성된다. (b) 도세탁셀과 라우리말라이드가 모두 탑재되었을 경우 큰 이중나선 피치를 가지는 이중벽 나노튜브 (DWTNT)가 형성된다. (c) 나노튜브의 엑스선 산란 데이터. 이중나선의 베셀함수 J_1, J_2 의 위치 (검은색 화살표)를 통해 나선 피치가 $P \sim 16.9$ nm임을 알 수 있다

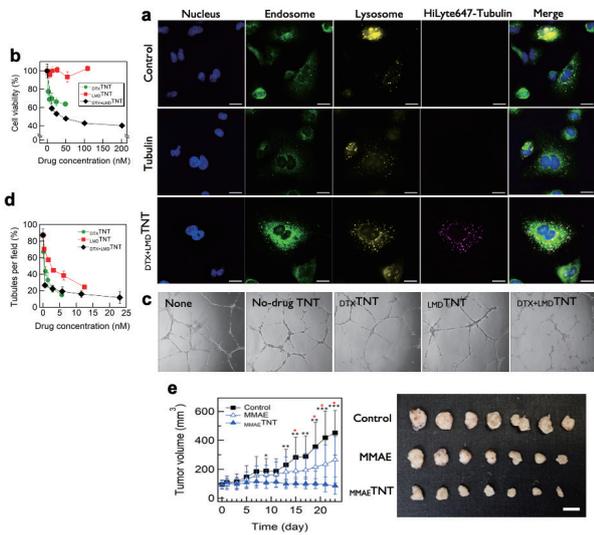


그림 7. 약물이 탑재된 튜블린 나노튜브의 *in vitro*, *in vivo* 항암효능. (a) 튜블린 나노튜브가 엔도솜-리소솜 경로를 거쳐 암세포로 들어감을 보여주는 공초점 레이저 현미경 이미지. (b) 튜블린 나노튜브의 *in vitro* 항암 효능 데이터. (c)-(d) 튜블린 나노튜브의 *in vitro* 혈관형성 억제 데이터. e) 튜블린 나노튜브의 *in vitro* 항암 효능 데이터. 스케일바: 20 μm (a), 1 cm (e)

분자스위치의 PEG 부분 ($M_w = 5 \text{ kDa}$)이 이중나선 사이로 비집고 나와 $\sim 6.9 \text{ nm}$ 정도의 간격을 만들어 내고 있음을 가리킨다. 이로부터, 튜브 표면에서 이중나선의 사이 간격에 해당하는 퍼센트 즉, 적어도 40 %는 PEG에 의해 감싸져 있음을 알 수 있었다.

MTA를 탑재한 TNT의 항암효과는 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 확인되었다. A549 폐암 세포주와 HUVECs

(human umbilical vein endothelial cells)을 이용한 세포실험에서 TNT가 엔도솜-리소솜 경로(endo-lysosomal pathway)를 통해 암세포로 들어가며, 뛰어난 항암 및 혈관 형성 억제 효과를 보임을 관찰했다 [그림 7(a)-(d)]. 쥐를 이용한 동물실험에서는, 모노메틸아우리스타틴 E가 탑재된 TNT가 그냥 약물만을 사용했을 때보다 훨씬 뛰어난 암 성장 억제 효과를 보임을 확인할 수 있었다 [그림 7(e)].

이 연구는 튜블린 나노튜브의 구조·특성 분석부터 세포·동물 항암 효능까지 확인함으로써 약물의 표적 단백질인 튜블린을 약물 전달체로 활용한다는 아이디어를 실현했다. 여기서 밝혀진 분자스위치의 역할과 탑재되는 약물의 종류에 따른 구조, 특성, 항암 효능의 변화는 앞으로 약물 전달체로서의 튜블린 나노튜브 개발에 기초가 될 것이다. 개발된 TNT는 본질적으로 모든 미세소관 표적 치료제를 탑재할 수 있는 만능 약물 전달체라고 할 수 있다. 또한 여러 약물의 동시 탑재가 가능하므로, 세포, 동물실험 단계에서 다양한 항암제들의 시너지 효과를 연구하기에도 좋은 플랫폼 전달체가 될 것이라 기대된다.

저자 약력

이준철 연구원은 현재 KAIST 바이오 및 뇌공학 학과 박사과정에 재학 중이다.



최명철 교수는 KAIST 물리학과에서 박사학위를 받고, UCSB 박사후 연구원을 거쳐, 현재 KAIST 바이오및뇌공학과에 재직 중이다. mcmc@kaist.ac.kr

