

고려대 이병천 교수팀, 생체 내 산화스트레스 측정 바이오센서 개발

-노인성 질환의 새로운 진단 도구 발명-



- 고려대학교 이병천 교수 연구팀 (사진 왼쪽부터 이병천 교수, 연세대학교 민필기 교수, 충남대학교 최동욱 교수, 석박통합과정생 노연진, 석사 졸업생 김세현)이 노인성 질환의 원인이 되는 산화스트레스를 측정할 수 있는 형광단백질 기반 바이오센서를 개발했다고 밝혔다.

- 이번 연구의 성과는 JCR 분석화학분야 1위 저널 '바이오센서스 앤 바이오일렉트로닉스 (Biosensors and Bioelectronics)'에 4월 15일 게재되었다.

- 노화가 진행됨에 따라 항산화 기전의 불균형으로 체내에 활성 산소에 의한 산화스트레스가 축적되어 노인성 질환의 원인이 되는데, 연구팀은 이러한 산화스트레스의 축적을 보여주는 새로운 바이오마커로 free methionine-R-sulfoxide (fMetRO)를 제시하였고, 이를 특이적으로 측정할 수 있는 바이오센서(TyFR; TrxA-cpYFP-fRMsR)를 개발하였다.

- 개발한 바이오센서를 이용하여 대조군 대비 급성 관동맥 증후군 환자의 혈액에서 fMetRO가 축적되어있는 것을 확인하였으며 향후 노인성 질환의 진단 도구로써 활용가능성을 입증하였다.

○ 생체는 다양한 항산화 시스템을 통해 활성산소 발생에 대응하는 기전을 가지고 있다. 하지만 노화가 진행됨에 따라 이러한 균형이 깨지고 과량의 활성산소에 의한 생체분자들의 손상이 축적되어 산화스트레스의 주요한 원인이 된다. 산화스트레스는 다양한 노인성 질환의 원인이 되기 때문에 체내 활성산소의 양은 노화 및 질병상황에서 매우 중요한 정보이다.

○ 따라서 생체 내 활성산소의 양을 측정하기 위해 다양한 방법들이 고안되었으나 활성산소는

순간적으로 발생하고 다른 생체 내 물질들과 즉각적으로 반응하기 때문에 일반적인 생체 샘플에서 활성산소의 양을 직접적으로 측정하기에 어려움이 있다.

○ 그 대안으로 이병천 교수 연구팀은 활성산소에 의해 직접적으로 산화되며 고등동물의 생체 내에서는 효소 반응을 거치지 않아 지속적으로 축적되는 free methionine-R-sulfoxide (fMetRO)를 새로운 산화스트레스의 바이오마커로 제시하였다. 더불어 이 바이오마커에 대해 매우 특이적이며 높은 감도로 정량할 수 있는 형광단백질 기반 바이오센서(TYfR; TrxA-cpYFP-fRMsR)를 개발하였다. 이를 통해 체내 산화스트레스를 정량적으로 측정할 수 있을 뿐만 아니라 노인성 질환의 진단 도구로 활용할 수 있는 기반을 마련하였다.

○ fRMsR 단백질은 활성산소에 의해 산화된 Methionine의 여러 형태 중 fMetRO를 특이적으로 환원시켜주는 단백질이다. 하지만 고등동물의 생체 내에는 이 효소가 존재하지 않아 fMetRO가 다시 Methionine으로 환원되지 못하고 축적된다. 이를 활용하여 E.coli의 fRMsR 유전자에 cpYFP (구조 변화에 따라 형광 값이 바뀌도록 조작된 형광단백질)와 활성부위를 조작한 TrxA 유전자를 결합하여 샘플 내 fMetRO의 양에 따라 형광값이 변화하는 TYfR 센서를 구현하였다.

○ In vitro 특성 분석을 통해 TYfR 센서가 fMetRO에 nM 단위까지 매우 민감하고 특이적으로 반응한다는 사실을 확인하였다. 더불어 실제 산화스트레스를 유도한 마우스 모델에서 시간이 지남에 따라 혈청 샘플 내의 fMetRO가 확연히 축적되는 것 역시 TYfR 센서를 이용하여 확인할 수 있었다.

○ 또한 TYfR 센서를 세포 내 발현에 발현시키거나 면역결핍 마우스 모델에 직접 주입하여 산화스트레스 유도에 따른 형광 변화를 실시간으로 측정하여 이미지로도 나타낼 수 있었다.

○ 마지막으로 대표적인 노인성 질환이자 산화스트레스의 축적에 기인하는 것으로 알려진 골관절염과 급성 관상동맥 증후군에 대하여 마우스 모델 및 환자의 혈청 샘플에서 fMetRO가 확연히 축적되는 것을 확인하였다.

○ 위의 결과들을 바탕으로 fMetRO를 산화스트레스의 새로운 바이오마커로서 제시하고, 이를 민감하고 특이적으로 측정하는 TYfR 센서를 통해 생체 내 산화스트레스의 축적을 쉽고 빠르게 측정할 수 있는 방법을 확립하였다.

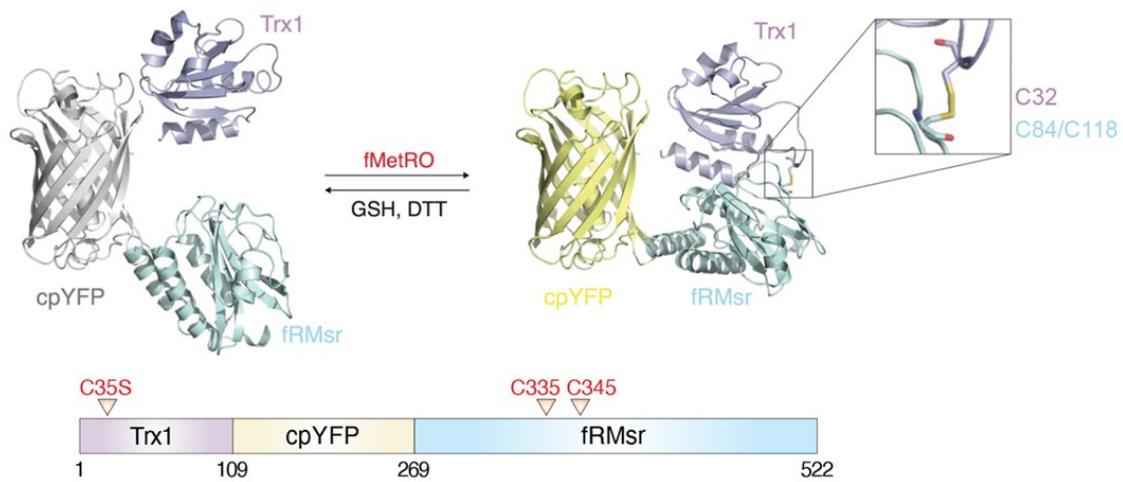
○ 바이오센서 관련 시장은 지속적으로 성장하고 있으며, 특히 질병 진단을 위한 의료용 바이오센서 분야가 가장 큰 시장을 차지하고 있다. 더불어 인구 고령화가 가속되면서 노인성 질환에 대한 진단도구의 필요성이 증가되고 있다.

○ TYfR 센서는 매우 소량의 혈청 샘플만으로도 기존의 여느 방법보다도 정확하게 fMetRO를 통해 산화스트레스 수준을 측정할 수 있으며 혈청 외의 여러 바이오샘플에 대해서도 적용이 가능하며 향후 산화스트레스에 기인하는 노인성 질환의 진단에 널리 활용될 가능성이 크다.

○ 또한 노화 및 산화스트레스에 대한 기초 연구에서부터, 관련 질환에 대한 의약품 및 항산화

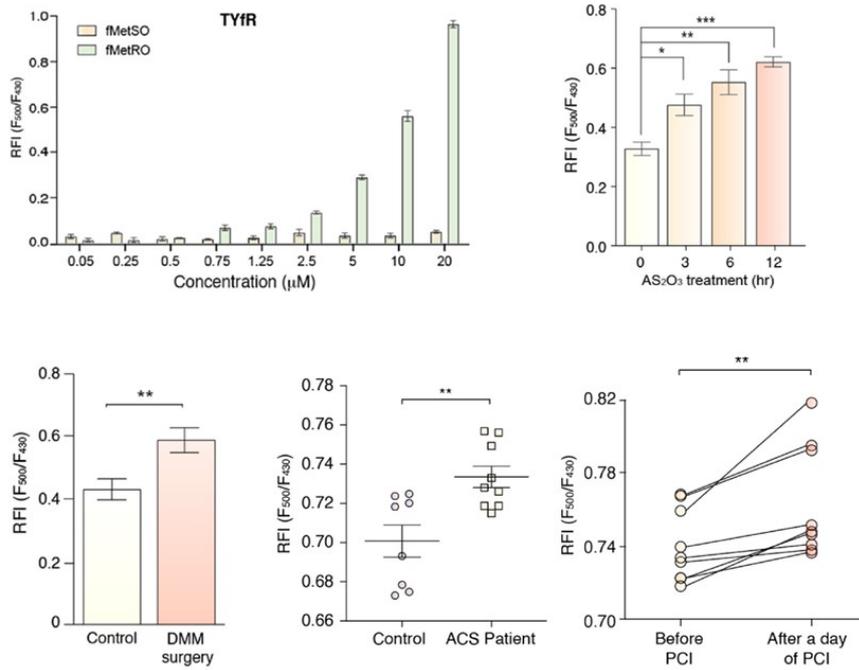
제의 효능 평가까지 다양한 분야에서 활용될 수 있다.

○ 논문 게재와 함께 TYfR 센서에 대해 특허를 출원하였으며, 특허 등록 후 기술 이전을 통해 상용화될 가능성이 높다.



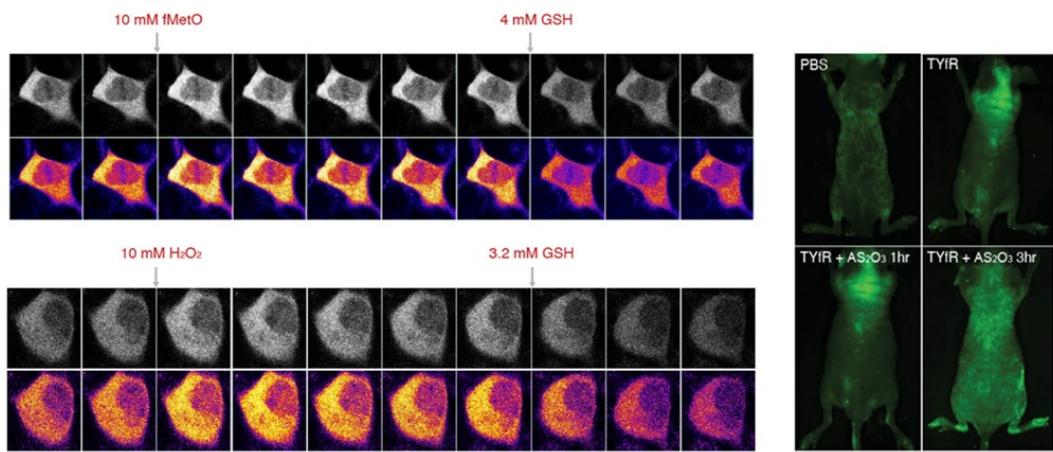
(그림 1) TrxA-cpYFP-fRMsr (TYfR)의 센서의 구조 모식도 및 작동 원리

cpYFP는 구조변화에 따라 형광 값이 바뀌도록 조작된 형광단백질로 TYfR 센서의 중앙에 위치하며 양 옆에 35번 시스테인을 세린으로 치환시킨 Trx1 단백질과 fRMsr이 존재한다. 일반적으로 fRMsr은 fMetRO를 특이적으로 환원시켜 메티오닌으로 돌려주며 스스로 산화되고 산화된 fRMsr은 다시 Trx1 단백질에 의해 환원되어 재생된다. 이 때, fRMsr과 Trx1 단백질 사이에 분자 간 이황화 결합이 형성되고 Trx1 단백질의 35번 시스테인에 의해 이 분자 간 이황화 결합이 Trx1 단백질의 분자 내 이황화 결합으로 치환되며 반응이 진행된다. 이를 응용하여 센서 내에 35번 시스테인이 세린으로 치환된 Trx1을 사용하여 fRMsr과 Trx1 단백질의 분자 간 이황화 결합을 유지하도록 구성하여 이 결합에 의해 두 단백질 사이의 거리가 가까워짐에 따라 cpYFP의 형광 값이 변화하여 fMetRO를 정량할 수 있도록 하였다.



(그림 2) In vitro test를 통한 기질 특이성 확인 및 질병 모델 혈청 샘플에서 유의성 확인

In vitro test를 통해 TYfR 센서가 fMetRO에 매우 특이적이며 nM 단위까지 민감하게 검출할 수 있음을 확인하였다. 그리고 AS₂O₃를 통해 산화스트레스를 유도한 마우스에서 시간이 지남에 따라 혈청 내에 fMetRO가 확연히 축적되는 것 역시 확인하였다. 최종적으로 산화스트레스 관련 노인성 질환인 골관절염 유도 마우스 (DMM surgery model) 및 급성 관상동맥증후군 (ACS; acute coronary syndrome, PCI; percutaneous coronary intervention) 환자의 혈청 샘플에 대하여 대조군 대비 유의한 결과를 얻었다.



(그림 3) TYfR 센서를 이용한 in vivo 실시간 산화스트레스 측정

오른쪽 이미지는 HEK293FT 세포주에 TYfR 센서를 발현시켜 기질 처리후 시간에 따른 형광변화를 live cell imaging을 통해 얻었으며, 왼쪽 이미지는 면역결핍 마우스 모델에 TYfR 센서를 꼬리정맥에 주입하고 As_2O_3 를 통해 산화스트레스를 유도한 후 시간에 따른 형광 변화를 in vivo imaging system을 통해 얻었다. 이를 통해 TYfR 센서가 생체 내 산화스트레스를 실시간으로 검출할 수 있음을 입증하였다.