

Membrane fusion machineries: viral vs. intracellular fusion

권대혁/ 안동대학교 생명자원과학부

1. 서론

고등 생명체는 막(membrane)들로 둘러 싸여진 세포의 유기적인 조합이다. 세포는 고립되어 존재하기 보다는 상호 소통하고, 서로 의존하며, 활발한 상호작용을 한다. 개개의 세포에 있어서 막은 결국 그 내용물을 간직하고 다른 세포와의 경계를 이루는 역할을 할 뿐만 아니라 세포와 세포 간의 상호작용이 이루어지는 지점이며, 여러 가지 물질들의 흡수와 배출에 관여하는 지점이다.

막융합(membrane fusion)은 세포의 기능에서 매우 중요한 역할을 수행한다. 세포내 막융합(Intracellular membrane fusion)은 지질, 단백질 등의 막 구성 물질을 다양한 세포 부위로 전달함으로써 모양과 기능을 갖추는 역할을 하기도 한다. 또한, 세포막으로 signaling molecules을 운반해서 세포간에 서로 신호를 주고 받을 수 있게 하기도 한다. 즉, 지질 성분의 전달, 단백질의 이동, 신호의 전달 등에 막융합이 이용되는 것이다. 또한, 세포외로 무엇인가를 배출하고자 할 때에도 막융합이 이용된다. Protein trafficking이나 exocytosis는 매우 좋은 예들이다.

Extracellular membrane fusion은 새 생명의 탄생에 깊이 관여한다. 정자가 난자로 침투하기 위해서는 필수적으로 막융합 과정을 거쳐야 한다. 조직의 형성에도 관여하는데, 예를 들어 근육을 형성하기 위해 근육모세포(myoblasts)가 융합하는 과정이 있다. 바이러스가 세포로 침투할 때에도 막융합은 필수적이다.

독립적으로 존재하던 세포, 바이러스, 세포소기관 등의 것들이 서로 세포/세포, 세포소기관/세포소기관, 세포/바이러스처럼 융합이 되기 위해서는 기본적으로 특정 막부위를 인식하는 요소와 이들을 융합시키는 요소가 존재해야 한다. 당연히 이러한 일꾼의 역할은 생물현상에서는 단백질의 몫이다. 이 글에서는 막융합을 일으키는 기본 요소 중에서 막융합 그 자체를 헌신적으로 수행하는 단백질들에 대해서만 살펴보고자 한다. 매우 재미있는 사실은 어떠한 종류의 막융합이든 간에 매우 유사한 어찌면 공통의 기작이 이용되고 있다는 것이다. 바이러스가 일으키는 막융합과 세포내에서 일어나는 막융합에 대해서 그 공통점과 차이점을 살펴보고자 한다. 이들은 비록 서로 다른 단백질을 이용하지만 실제 작용 기작은 놀랄 만큼 유사하다. 많은 과학자들이 이러한 접근법에 동조하고 있으나 이견은 항상 존재하는 법이다. 즉, 아직도 현재진행형인 이론인 만큼 조심스럽게 읽어주길 바라나, '믿거나 말거나'의 수준으로 생각하기에는 너무나 많은 연구가 진행되었다.

2. SNARE 단백질들과 그 복합체 형성에 의한 intracellular membrane fusion

세포내에서 일어나는 막융합은 SNARE(soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor)라고 하는 단백질들에 의해 일어난다(아직 수많은 논의가 있는 시점에서 단순히 이렇게 말하는 것은 올바른 표현은 아니다. 그러나, 그간의 수많은 논쟁과 반박의 역사를 설명하기에는 지면의 한계를 핑계 대지 않을 수 없다. 다만 현재 가장 유력한 학설이며 상당 부분 공조하기에 이하에서는 “당연지사”로 가정하고 기술하고자 한다). SNARE 단백질은 모든 종에 걸쳐 매우 잘 보존되어 있는 특정 단백질 군을 말하며, SNARE complex는 이 단백질들의 복합체를 의미한다. SNARE 단백질은 target (t-) SNARE와 vesicular (v-) SNARE로 나눌 수 있다. 물론 이러한 분류는 어떤 상황에서 상당히 혼란을 초래할 수 있기 때문에 R-SNARE와 Q-SNARE로 구분하기도 한다. 많은 SNARE 단백질들이 세포의 곳곳에서 각각의 역할을 수행하고 있으나 가장 많이 연구된 neuronal SNARE를 예로 들어 이들의 구조와 역할 등에 대해서 설명하고자 한다.

신경전달에 관여하는 neuronal SNARE에서 target이라 함은 presynaptic membrane 이다. 따라서, t-SNARE는 presynaptic membrane에 존재하는 SNARE 단백질을 말하며, v-SNARE는 synaptic vesicle에 존재하는 SNARE 단백질을 일컫는다. 이때 synaptic vesicle은 신경전달물질을 담고 있으며, 당연히 이도 막으로 둘러싸여 있다. t-SNARE는 syntaxin1a(이하 syntaxin)으로 불리는 막단백질(integral membrane protein)과 peripheral membrane protein인 SNAP-25(soluble NSF attachment protein of 25 kDa)으로 이루어지며 그 기능적 단위는 이의 복합체 (t-SNARE complex)로 생각되고 있다. v-SNARE는 vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP2 또는 synaptobrevin)라는 막 단백질을 말한다. 이러한 SNARE 단백질들은 'SNARE core'라고 불리는 60-70 aa 정도의 부위를 가지고 있는데, 이 부위들이 서로 모여 SNARE complex라고 불리는 four-helical bundle을 형성하게 된다. SNARE complex는 4개의 α helix가 coiled-coil을 이루고 있는데, 4개의 helix 구성 요소는 syntaxin과 VAMP2로부터 각각 하나씩 그리고 나머지 둘은 SNAP-25로부터 주어진다(그림 1). 이들 helix들은 서로 나란히(parallel geometry) 배열되어 있다. 다시 말해 모든 단백질의 아미노 말단(N-termini)은 한 쪽 끝에 모여 있으며 카복실 말단(C-termini)은 또 다른 쪽에 모여 있다. 두 개의 helix를 제공하는 SNAP-25는 두 helix사이에 이를 연결하는 linker가 존재한다는 사실을 짐작할 수 있을 것이다(구조 그림에는 나타나 있지 않

다). SNAP-25의 linker는 cysteine이 다량 포함된 부분이 있는데, 이 부분은 posttranslational modification에 의해 palmitoylation 되어 있으며, 따라서 presynaptic membrane에 부착되어 있다. 한편 막 단백질인 syntaxin과 VAMP2는 각각 presynaptic membrane 과 vesicular membrane 에 부착되어 있다. 이들의 transmembrane domain(이하 TMD)는 막을 한번 가로 지른다. SNARE complex의 길이는 약 110 Å 이다. Syntaxin core region (H3) 의 아미노 말단에는 Habc domain으로 불리는 3 helix가 붙어 있다. SNARE complex 가 형성되기 전에는 Habc domain이 H3와 결합하고 있다. 이 부분은 SNARE complex 형성을 조절하는 부분으로 생각된다. 결국, Habc domain이 다른 factor 들에 의해서 분리되어 나가면서 SNARE complex를 형성할 수 있는 H3가 노출되게 된다. SNARE complex는 SDS에 의해서도 풀어지지 않고, 열에도 안정하며, 심지어 Tetanus neurotoxin이나 botulinum toxin에 의한 proteolysis에도 견딘다. Core의 결합은 다른 coiled coil 구조처럼 대체적으로 hydrophobic interaction에 기인한다. 재미있는 것은 core bundle의 한 가운데에는 "ionic zero layer"가 존재한다는 것인데, t-SNARE 단백질들로부터 3개의 glutamine(Q)이 주어지고, v-SNARE로부터 하나의 arginine(R)이 주어진다. SNARE의 분류에서 v-SNARE와 t-SNARE를 구분하는 대신 R-, Q-SNARE로 구분하는 것은 이러한 이유 때문이다. 그 주변의 leucine zipper layers는 peptide backbone과 함께 ionic layer를 감싸서 물이 침투하지 못하게 만든다. 이는 ionic interaction을 주변의 수용성 환경으로부터 분리하는 효과를 가져오며 따라서 complex의 안정성을 증가시킨다. 또한 이러한 비대칭적 ionic layer는 매우 긴 SNARE complex가 어긋나게 맞춰지는 것을 방지하는 "번지" (register) 역할을 한다. Ionic layer에 관여하는 glutamine과 arginine은 SNARE superfamily에 매우 잘 보존되어 있다.

Helix들이 coiled coiling으로 파베기처럼 꼬인 구조를 갖춘 SNARE complex의 끝에는 2개의 막 (각 각 synaptic vesicle과 presynaptic membrane) 이 연결되어 있다 (그림 2). 2개의 막은 매우 가까운 거리에 위치하게 되며 막 융합으로 이어지게 된다. 결국 두 막 사이의 거리가 막 융합을 결정하는 최종 요소로 작용하게 되는 것이다(proximity model). 그러나 이 글에서 언급을 하지는 않지만 단백질의 고리와 같은 구조 (proteinaceous fusion pore)가 막 융합의 결정적인 요인이라는 가설 또한 존재한다.

Proximity 모델은 SNARE complex가 막 융합의 가장 기본적인 단위라는 사실이 밝혀짐으로써 더욱 설득력을 얻게 된다. Weber 등은 정제된 SNARE 단백질들을 large unilamellar vesicle (LUV)에 삽입한 실험에서 2개의 막이 서로 융합될 수 있다는 사실을 밝혔다. VAMP2가 삽입된 막과 t-SNARE complex가 삽입된 막이 서로 융합된다는 사실을 보임으로써 막 융합의 연구에 전환점을 가져왔다. 이 연구에 이용된 막 융합 실험은 fluorescence resonance energy transfer (FRET) 원리를 이용한 실험이다. 동일 년도에 SNARE complex의 구조가 electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy과 X-ray crystallography로 밝혀졌다(그림 1). 그러나 이러한 연구들은 막 융합 연구에 중지부를 찍기 보다는 연구를 더욱 더 촉발시키는 계기가 되었다.

그림 2는 SNARE complex가 막 융합의 가장 기본적인 단위임을 보이는 그림이다. 그림에서 t-SNARE complex는 단순히 하나의 굵은 선으로 그려졌으나 사실은 3개의 helix로 이루어진 helical bundle이다. t-SNARE complex 가 v-SNARE와 융합할 때에는 3 helical bundle이다. 그러나 구

조적으로 밝혀진 t-SNARE complex는 2개의 syntaxin과 1개의 SNAP-25로 이루어진 4 helical bundle이다. 따라서 막 융합이 이루어짐과 동시에 t-SNARE complex의 syntaxin 중 하나가 VAMP2로 치환되리라 생각되고 있다. 그러나 효모의 t-SNARE complex는 3 helical bundle로 생각되고 있어서 아직 기능적인 t-SNARE complex가 무엇인지는 명확하지 않다. 다시 말해, 4 helical bundle의 t-SNARE complex는 3 helical bundle 보다 더욱 안정한 상태로 존재하는 부산물일 가능성도 배제할 수 없다. 한편 v-SNARE인 VAMP2는 t-SNARE와 결합하기 전에는 구조를 가지고 있지 않은 것으로 알려져 있다. t-SNARE complex와 v-SNARE가 서로 만나서 꼬이기 시작하면 끝에 달려 있는 두 막의 거리는 점점 가까워진다. 그러나 그림을 시간적으로 돌이켜 보면 즉, coiled coiling을 풀어 보면 t-SNARE complex와 v-SNARE의 아미노 말단 들이 먼저 만나게 됨을 생각해 볼 수 있다. 이러한 상태를 "partially zipped state"라고 한다. 따라서 SNARE complex 형성의 방향, 즉 단백질의 폴딩 (folding)의 방향은 아미노 말단에서 시작하여 카르복실 말단으로 진행되리라는 가설이 성립될 수 있다. 그러나 partially zipped complex 나 폴딩의 방향에 대해 검증된 바가 없다. 반드시 그러해야만 할 이유가 없으며, 최근에는 그런 것이 존재하지 않는다는 증거들이 속속 나오고 있다. 다만 확실한 것은 하나의 단백질 complex의 끝에 두 개의 막이 연결되어 있다는 것이다. SNARE complex의 이러한 상태를 'trans complex'라 부른다. 이 trans complex의 존재에 대해서도 명확하게 밝혀진 바가 없으나, 어떠한 형태로든 최소한 매우 짧은 시간 동안 존재할 수 밖에 없음은 자명하다. 이러한 trans complex 상태를 거쳐 막 융합이 완성되게 되면 소위 'cis complex'가 만들어진다. cis complex는 SNARE complex가 하나의 막에 존재하는 상태를 말한다. 아직 상당 부분 모호한 부분들이 있으나, SNARE complex의 형성이 두 막을 가까운 위치로 끌어당길 (apposition) 수 있는 구조를 가지고 있고, 또 그러한 역할을 수행한다는 것 만큼은 명확해 보인다.

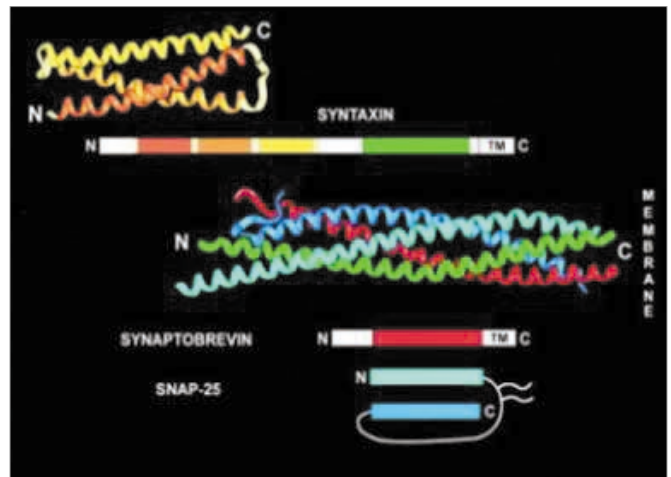


그림 1. SNARE complex의 구조. 그림에서 syntaxin 1a (green), VAMP2 (red), SNAP-25 (blue and cyan)으로 나타내어져 있다. SNARE complex의 soluble, cytoplasmic 부분 만이 그려져 있다. Syntaxin의 Habc domain 과 H3는 색깔로 구분되어져 있다. 구조 그림에서 SNAP-25의 두 helix가닥을 연결하는 긴 linker는 생략되어져 있다. SNARE complex는 매우 안정하며 "virtually irreversible" 하다. Superhelix는 left-handed 이다. Complex의 한 가운데에는 ionic zero layer가 존재한다. Ionic zero layer는 3개의 glutamine과 1개의 arginine 아미노산으로 구성되는데, 3 개의 glutamine은 t-SNARE로부터 1개의 arginine은 v-SNARE로부터 주어진다. 이러한 특징에 따라 Q-SNARE와 R-SNARE로 불리기도 한다. 한편 syntaxin과 VAMP2의 카르복실 말단은 막에 부착되어 있으나 그림에서는 생략되었다.

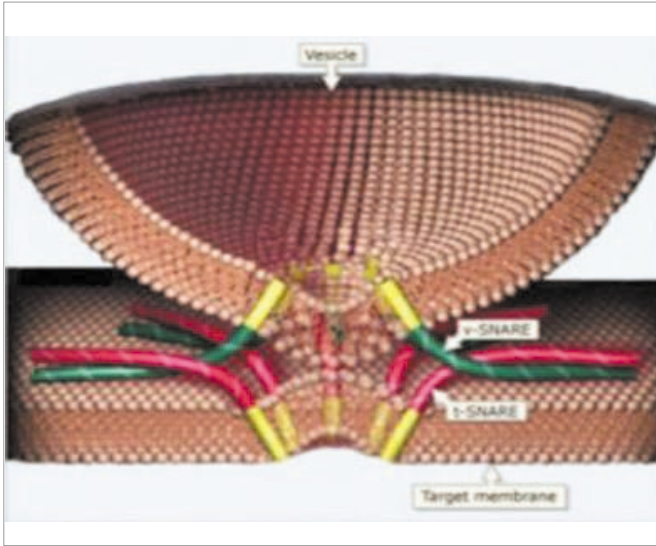


그림 2. SNARE에 의한 막 융합 모델. 그림을 단순화하기 위하여 t-SNARE complex가 빨간색의 굵은 선으로 그려졌다. 그림에서 현재 cytoplasmic 부분은 그 구조가 밝혀졌으나, TMD와 linker 부분은 아직 알려지지 않았다. Linker부분에 대한 연구는 SNARE complex가 막에 어떻게 결합되어 있는지를 앞으로써 에너지가 어떻게 막 융합에 이용될 수 있을지를 알려 줄 것으로 기대되고 있다. TMD 또한 SNARE를 막에 고정시키는 역할 이상을 할 것으로 기대되고 있다. TMD의 helix가 SNARE complex의 core에서 발견되는 helix로 구조의 변화없이 그대로 연결되는 것처럼 나타나어져 있다. 이는 crystal 구조를 제안한 저자가 임의로 제안하였으나, 몇가지 문제점을 내포하고 있다. 그림에서 보듯이 helix가 상당한 각도로 꺾어지는 구조가 만들어질 수 밖에 없는데, 이러한 구조는 예상하기 힘들다. 또한 막 융합에 있어서 이런 helical continuity가 꼭 필요하지는 않다는 사실이 입증된 바 있다. 그림 1에서 보인 soluble SNARE complex 구조는 그 정의 자체 또한 명확하지 않다. 그림 1의 SNARE complex 구조가 이루어짐으로써 막 융합이 시작되는 것인지 아니면 그 구조가 막 융합이 이루어진 최종의 그림이 될 것인지조차 알 수가 없으나, 후자에 좀 더 무게를 두고 싶다. 따라서 위 그림 또한 매우 조심해야 보아야 한다. 위 그림에서 융합이 이루어지는 부분의 막이 뾰족하게 튀어나오는 (nipple formation) 것은 여러가지 연구들에서 밝혀진 바 있다.

3. Viral fusion machinery

SNARE에 의한 막융합에서는 v-, t-SNARE는 융합시키고자 하는 두 개의 막들에 각각 부착되어 있었다. 그러나 재미있게도 viral fusion에서는 막 융합을 일으키는 기구는 오직 바이러스에만 부착되어 있다. 그럼에도 불구하고 SNARE와 매우 유사한 방식으로 막융합을 일으킨다고 하는 것은 무슨 이유 때문일까? Viral fusion 단백질은 크게 2종류로 분류한다. Class I에는 influenza, Ebola, HIV 등이 포함된다. Class II에는 tick-borne encephalitis, dengue, yellow fever 등의 바이러스가 포함된다. 이들은 구조적인 측면에서는 약간 다르다고 할 수 있으나 실제 막융합 기작 자체는 매우 비슷하다.

Class I viral fusion 단백질의 가장 대표적인 것은 influenza 바이러스의 hemagglutinin(HA)이다. Prefusion state의 HA는 triple stranded coiled coil을 이루는 trimer이다. HA는 전구체 형태로 만들어진 이후에 proteolytic cleavage에 의해서 활성형으로 바뀌는데, 이러한 과정에서 아미노 말단 쪽에 fusion peptide라는 부위가 노출되게 된다. 이 fusion peptide는 prefusion state에서는 trimer내부에 갇혀 있던 것이다. HA가 숙주세포 막표면에 존재하는 수용체인 sialic acid에 결합하면, 바이러스

가 숙주세포에 부착할 수 있게 되며 이후 endocytosis 된다. 이때 생기는 pH의 변화로 인하여 fusion peptide는 trimer 외부로 돌출되고 아미노 말단 쪽의 helix는 더욱 길어진다. Fusion peptide는 막을 투과하는 성질을 가지고 있는데, 이를 이용해서 HA의 fusion peptide는 숙주세포막에 부착될 수 있는 것이다. 이후에는 매우 dramatic한 단백질의 refolding이 membrane fusion을 일으키게 되는데, HA의 카르복실 말단 쪽에서 refolding이 일어나면서 antiparallel coiled coil을 만들게 된다. HA의 C-말단은 TMD로 viral membrane에 부착되어 있고, fusion peptide는 cellular membrane에 부착되어 있는데, 이 때까지는 3 helical bundle이다. 이 3 helical bundle이 반으로 쪼개지면서 6 helical bundle을 만들면서 각각 3개의 helix들이 antiparallel하게 늘어지게 되면 2개의 막을 서로 가까운 위치로 끌어당길 수 있게 된다고 생각하면 큰 무리가 없다. Class II viral fusion는 그림에서 보여주는 설명으로 대체하고자 한다.

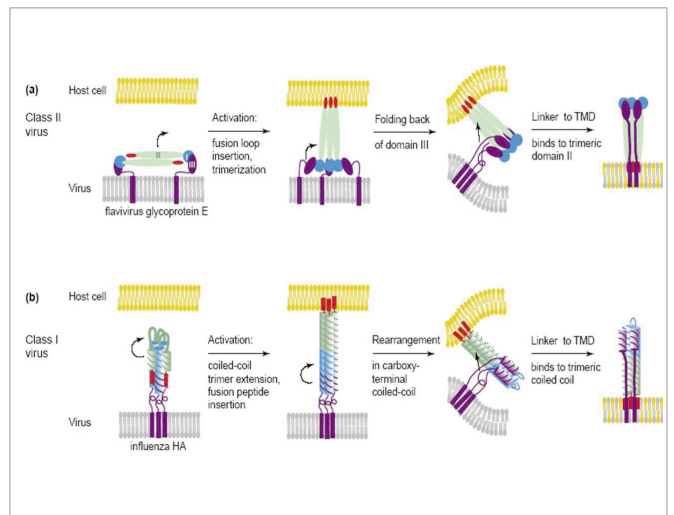


그림 3. Viral membrane fusion 기구의 비교. 그림에서는 예상되는 intermediates의 구조들을 포함하여 가장 큰 구조적인 변화를 보이는 면들만을 강조하였다. 따라서, 초기의 tethering 단계는 생략되어 있다. Fusion peptides와 loops는 빨간색으로 그려져 있으며, conformational rearrangements와 protein folding events는 화살표로 표시되어 있다. (a) Viral class II fusion protein, 간략하게 보이기 위해서 flavivirus glycoprotein E의 TMD 2개중 하나만이 그려져 있다. (b) Influenza hemagglutinin HA가 proteolytic cleavage에 의해 생성된 HA2 domain만이 표시되었다. HA1 domain은 sialic acid binding에 관여하는 부위인데 그림에서는 생략되었다.

4. A uniting mechanism

SNARE에 의한 membrane fusion이든지 viral membrane fusion이든지 모두 단백질의 folding에 의한 것이며 fusion protein precursors는 모두 동역학적으로 안정한 high-energy state에 있는 것으로 보인다. 따라서 외부에서 에너지의 유입이 없이도 fusion event는 일어날 수 있다. 열역학적인(thermodynamics) 차이와 동역학(kinetics)인 차이의 의미를 염두에 두는 것이 좋을 듯 하다. 즉, 두 가지의 기구 모두에서 prefusion 상태는 열역학적으로 안정한 상태는 아니다. 그러나 이들은 kinetically trapped되어 있는 상태이다 (이러한 notion은 많은 논문들을 읽어보아도 직접적으로 말하지는 않는다. 왜냐하면 결정적인 증거가 없기 때문인데, 즉 ΔG , Ea, 속도상수 등을 구하기가 어렵다는 것인데, 이러한 문제의 해

결에 뛰어든다는 것은 어찌 보면 무모한 일이기도 하다. ‘가정’이 아직 유효하지 않은 상태에서 이러한 숫자들은 큰 의미가 없다. 그러나 이 분야를 리드하는 입장이라면 다를 수 있다. 어쨌든 이러한 notion은 많은 사람들의 입 속에서 맴도는 말이 틀림없을 것이라 생각한다.) Kinetic trap을 어떻게 극복하는가는 별도로 하고, 열역학적인 측면에서만 살펴 보면, 단백질의 folding은 2개의 막을 매우 가까운 위치로 끌어당길 정도의 힘을 만들어 낼 수 있을 것으로 생각된다. 2개의 막 사이에는 서로 매우 강한 척력이 있으므로(인지질로 구성된 막의 음전하들을 생각하자), 단백질의 folding에 의해 생산되는 에너지는 막들간의 척력을 극복할 수 있을 정도로 커야 한다. 막융합의 전체적인 반응을 다음과 같은 5개의 단계들로 분해해보자.

- (1) Initial tethering step: 바이러스와 숙주세포 사이 또는 transport vesicle과 intracellular target membrane사이의 최초의 contact를 일으키는 단계이다. Specificity가 있으며 (즉 바이러스가 자기 숙주만 찾는다든지, 어떤 vesicle이 특정 target membrane만 찾는다든지 하는……) 대체로 이는 fusion machinery에 직접적으로 연결되어 있다.
- (2) 막융합 기구의 활성화: 융합되려는 2개의 막을 fusion machinery(HA 든 SNARE든)가 붙잡을 수 있게 된다. 이러한 활성화는 tethering에 의해서 일어날 수도 있고 뒤따르는 환경적인 변화에 의한 것일 수도 있다. 예를 들어 낮은 pH가 HA2의 구조적인 변화를 일으키는 경우가 있다. 특히 viral fusion에서는 단백질의 구조적인 변화는 fusion peptide가 숙주세포막과 부착되는 필수적인 반응을 포함한다. 그러나 SNARE에 의해 매개되는 막융합에서는 이러한 스텝은 필요 없다. 왜냐하면 각각의 t-, v- SNARE들은 이미 자기의 막속에 TMD를 통하여 부착되어 있기 때문이다. 그러나 이들의 complex assembly 또한 Habc domain 등을 통하여 철저히 조절된다.
- (3) Membrane apposition: 단백질의 refolding이 2개의 막을 매우 가까운 거리(proximity)로 끌어당긴다(apposition). Viral fusion에서는 3 helical bundle이 fold back하면서, 즉 반이 똑 부러져 접히듯이, 2개의 막을 접촉시킨다. Intracellular membrane fusion에서는 미리 assemble되어 있는 t-SNARE complex와 v-SNARE와 coiled-coil을 형성하면서 막들을 가까운 위치로 끌어당긴다. 이때 t-SNARE complex는 v-SNARE folding의 template와 같다고 해도 무방하다.
- (4) Hemifusion intermediate: 매우 가까운 위치로 끌어당겨진 2개의 막은 바깥쪽 껍질부터 융합되면서 일시적으로 hemifusion intermediate를 형성한다. Lipid bilayer에서 outer layer부터 융합이 된다는 것인데, 이와 관련된 ‘힘’의 문제는 이 글에서는 생략하고자 한다. 또한 이러한 hemifusion state가 반드시 존재하여야 하는 것인지에 대한 이론적 논의 또한 빈번하게 일어나고 있다. HA의 TMD를 변화시킴으로써 viral hemifusion intermediate를 정지시켜 관찰할 수 있었는데, TMD의 길이를 짧게 한다든지 TMD를 GPI anchor등으로 대체함으로써 가능하였다. Viral fusion peptide는 TMD와는 달리 lipid bilayer를 완전히 통과하지는 않는다. 따라서 hemifusion state는 어쩌면 이 viral system에서는 당연한 것인지도 모른다. 반면에, SNARE는 양쪽 모두 TMD를 가지고 있으며 이들은 membrane을 통과한다(span).

SNARE에서는 hemifusion state를 관찰하지 못했다.

- (5) Fusion pore의 형성 및 dilation: Fusion pore란 막융합의 결과로 생겨난 작은 통로를 말한다. 그림 4에서 보듯이 막과 막의 내용물들이 서로 통과할 수 있도록 작은 통로가 만들어지게 되는데, hemifusion state를 거친 다음 lipid bilayer들의 inner leaflet들이 융합하게 되면 이러한 통로가 만들어 지게 된다. Fusion pore에 대해서도 참으로 많은 이야기가 있고 아직 덜 정립되어 있는 상태이다. 예를 들어 단백질들의 oligomerization이 중요한 것인가, hemifusion state에서 fusion pore를 형성하는 과정은 단백질의 도움없이 자발적으로 이루어지는 것인가, fusion pore의 형성에 있어서 TMD의 역할은 무엇인가, fusion pore 형성의 kinetics는 어떻게 되는가, fusion pore의 사이즈는 얼마만큼 커져야 할 것인가 하는 것들이 아직도 연구되고 있다. Fusion pore가 형성되고 난 이후에는 이러한 fusion pore가 점점 커지면서(dilation) 되면서 vesicle이 target membrane에 완전히 통합되는 것이다.

5. 결론

Membrane fusion에 관한 연구는 실제 viral membrane fusion에 관한 부분이 먼저 이루어지기 시작하였다. Viral fusion machinery는 오직 virus에만 부착되어 있으며 이는 여러 단계의 과정을 거치면서 숙주 세포막과 viral membrane을 융합시킬 수 있게 된다. 혼자서 복치고 장구치고 하는 격인데 한 마디로 viral membrane fusion machinery는 generalist이다. 다른 한편으로 SNARE는 뒤 늦게 연구가 시작되었지만 막융합에 관한 정보를 매우 많이 제공하였는데, 그 이유는 단백질들이 융합되는 2개의 막에 각각 부착되어 있기 때문이다. 각각의 단백질들을 분리하여 연구할 수 있었으므로 과학자들은 더 많은 아이디어를 테스트할 수 있었던 것이다. SNARE는 부착되어 있는 membrane에 따라 이름도 다르고 모양도 다르고 기능도 다르다. 따라서 이들은 specialist이다. Membrane fusion machinery를 generalist라고 표현하든 specialist라고 표현하든 겉에서 보기에는 단지 단백질의 refolding일 뿐이다. 단순한 단백질의 refolding이 막융합을 일으키고 이러한 막융합이 세포의 매우 중요한 반응들을 매개하고 현재 매우 중요한 연구의 주제가 되고 있다. 그러나 이러한 막단백질들은 그 연구가 쉽지 않은데, 첫째 재조합 단백질의 발현 자체가 매우 어렵다. 단백질을 다루는데 있어서 DNA 재조합 기술을 이용하여 단백질을 얻어내는 것이 얼마나 중요한지는 bioxxxxxx의 실험실에 있는 모든 사람들이 공감할 수 있을 것이다. 둘째, 이들의 구조, 구조의 변화, 생화학적/생물리학적 성질 등을 관찰할 수 있는 연구 기술이 매우 부족한 실정이다. 막단백질은 세포 전체 단백질의 1/3 이상이 될 것으로 생각되는 데도 이를 연구할 수 있는 기법이 부족하므로 아직도 soluble 단백질에 비하여 매우 연구가 덜 되어 있다. 따라서 이러한 막단백질의 연구에 눈을 돌려 보는 것도 과학자로서 성공할 수 있는 좋은 기회를 얻을 수 있을 것이다. 마지막으로 membrane fusion과 관련된 읽을 거리 몇 가지를 추천한다.

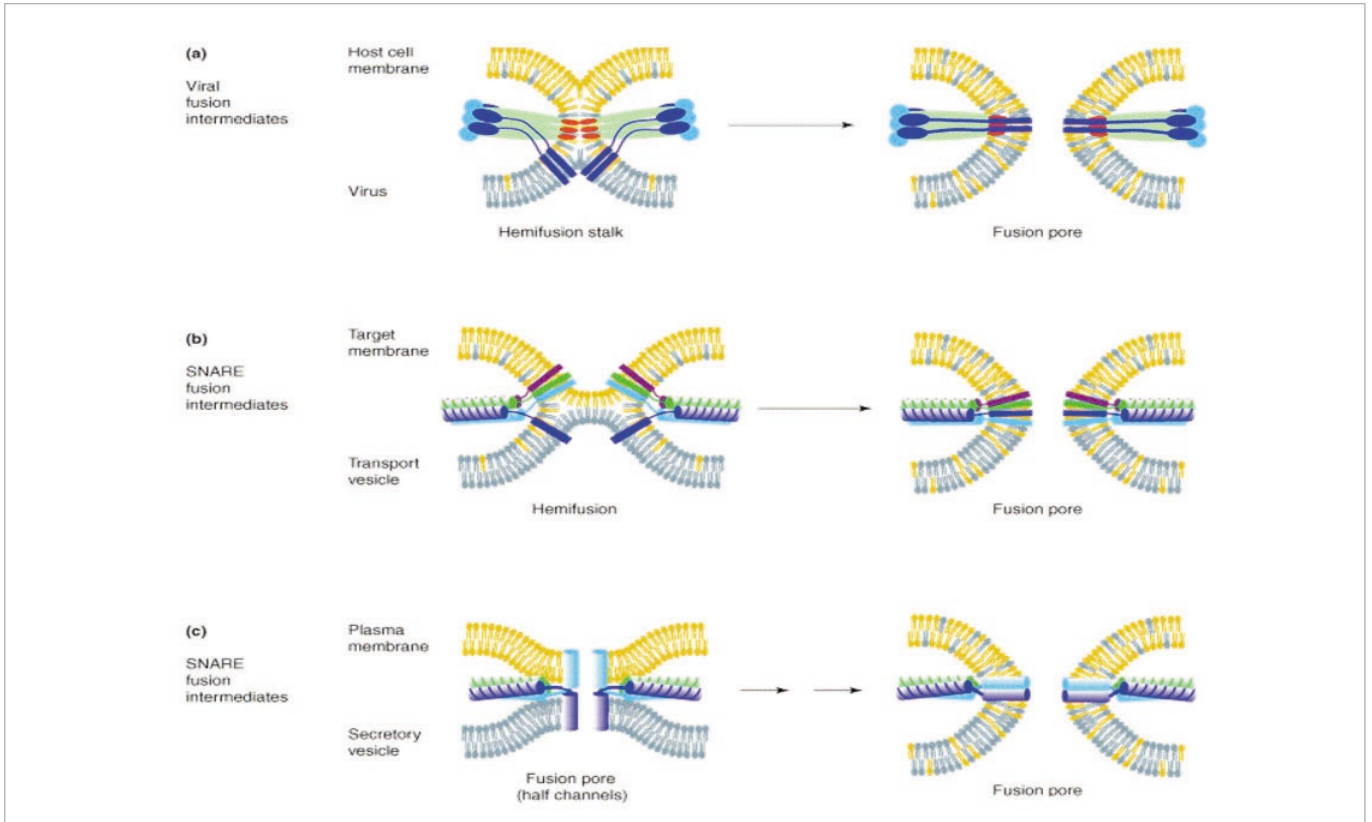


그림 4 Fusion intermediates. (a) Viral fusion에서의 hemifusion stalk, (b) SNARE-driven fusion에서의 hemifusion intermediate, (c) SNARE half channels에 의해 생성된 exocytic fusion pore. (b)와 (c)는 서로 다른 아이디어에서 출발하는 다른 모델이다. (c)에서의 fusion pore는 실제 존재할지 알지 못하나 최근의 Science 논문에서는 이러한 형태가 존재할 수 있음을 시사하고 있다(그렇다고 믿으라는 뜻은 아니다). hemifusion intermediates나 fusion pore가 어느정도로 lipid flow를 허용하는지에 대해서는 아직 명확하지 않다.

6. 참고문헌 및 읽어거리들

1. Rothman, J. E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-63.
2. Jahn, R. and Südhof, T. C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 863-911.
3. Lin, R.C. and Scheller, R. H. (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**, 19-49.
4. Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H. and Rothman, J. E. (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-772.
5. Kweon, D.-H., Kim, C.S., and Shin, Y.-K. (2003). Regulation of neural SNARE assembly by the membrane. *Nat. Struct. Biol.* **16**, 440-447.
6. Chen, Y., Xu, Y., Zhang, F., and Shin, Y.K. (2004) Constitutive versus regulated SNARE assembly: a structural basis. *EMBO J.* **23**, 681-689.
7. Han, X., Wang, C.-T., Bai, J., Chapman, E.R., and Jackson, M. B. (2004) Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Science* **304**, 289-292.



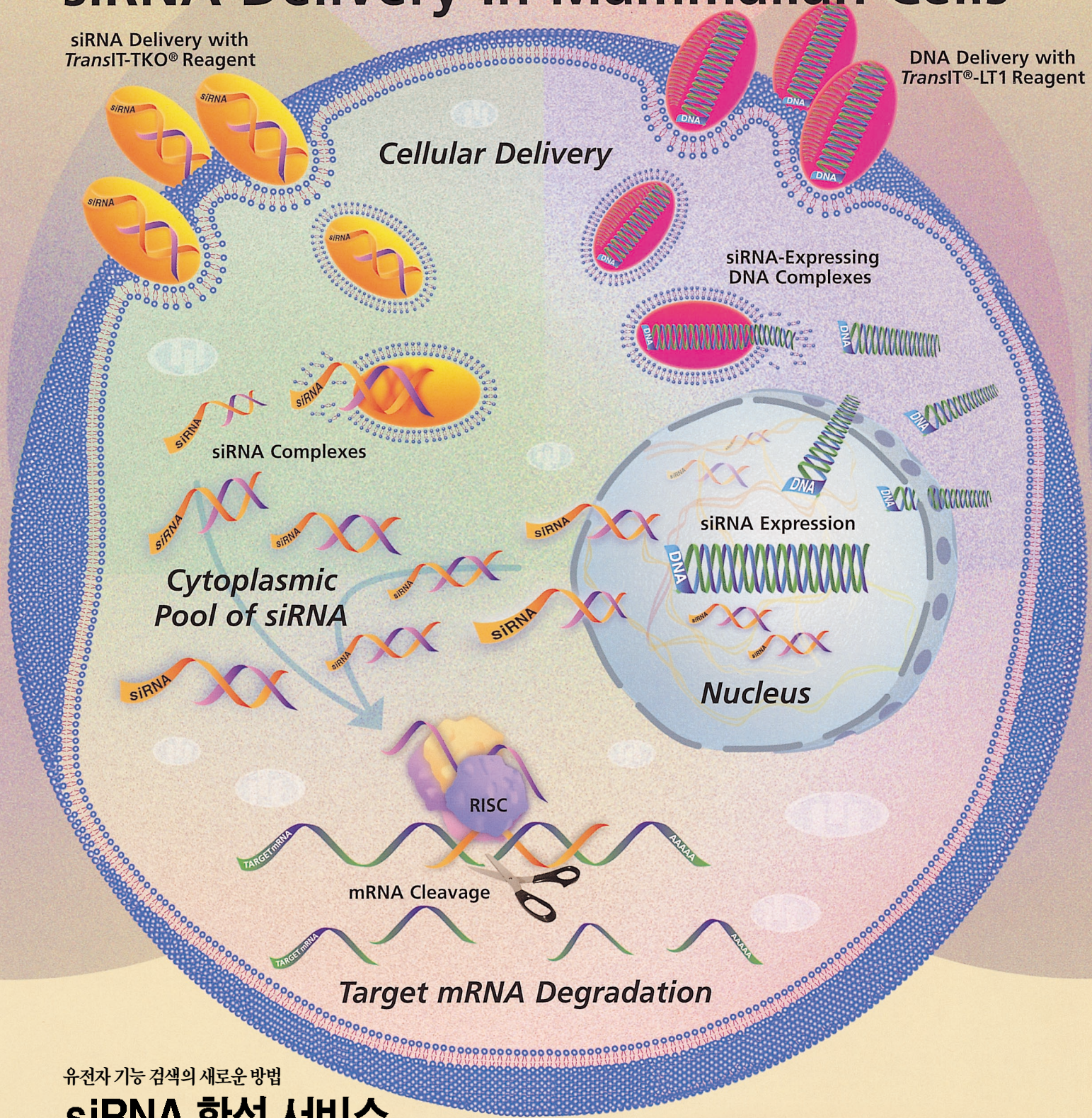
권대혁 dhkweon@andong.ac.kr
안동대학교 전임교수

1990.03 - 1995.02	서울대학교 식품공학 학사
1995.03 - 1997.02	서울대학교 생물화학공학 석사
1997.03 - 2001.02	서울대학교 생물화학공학 박사
2001.03 - 2001.08	서울대학교 박사후 연구원
2001.08 - 2003.02	아이오와 주립대학 박사후 연구원
2003.03 - 현재	안동대학교 전임교수

siRNA Delivery In Mammalian Cells

siRNA Delivery with
TransIT-TKO® Reagent

DNA Delivery with
TransIT®-LT1 Reagent



유전자 기능 검색의 새로운 방법

siRNA 합성 서비스

TaKaRa에서는 유전자의 기능을 검색할 수 있는 획기적인 방법인 RNA interference(RNAi)를 유도하는 siRNA 합성 서비스를 제공합니다.

서비스내용

- siRNA 검색 서비스
- siRNA 합성 서비스
 - (1) Double strand siRNA
 - (2) Single strand pair siRNA (Sense, Antisense set)

특징

고도의 기술력, 최신식 전용 합성 시설, 무료 검색 서비스
Fluorescein, Biotin 등의 labeling 가능

가	격 : Double strand siRNA	1,000,000 원
	Single strand pair siRNA	770,000 원

보 증 양 : 30 nmol
 보 증 순 도 : 97 % 이상
 분석데이터 : DEAE-HPLC chart
 TOP-MS 분석 data
 PAGE data (annealing 진행시)

Key

- siRNA TransIT-TKO® Reagent/siRNA Complex
- DNA TransIT®-LT1 Reagent/siRNA-Expressing DNA Complex
- Free siRNA
- RISC dsRNA-Induced Silencing Complex